

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

---

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Biologicky aktivní metabolity rostlin VI. Alkaloidy *Eschscholtzia  
californica* Cham. a jejich biologická aktivita

Biologically active metabolites of plants VI. Alkaloids from  
*Eschscholtzia californica* Cham. and their biological activity

Vedoucí rigorózní práce: Doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

2015, Hradec Králové

Mgr. Zdenka Kittlerová

## PROHLÁŠENÍ

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

Hradec Králové

2015

.....

podpis

Tato práce byla vypracována za podpory projektu SVV 260 184.

Děkuji paní Doc. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za pomoc s vypracováním rigorózní práce, za poskytnuté materiály a odborné rady. Dále děkuji panu Ing. Milanu Kurfürstovi, Ph.D. za zmerení a interpretaci NMR spekter, Ing. Katerine Macákové, Ph.D. za zmerení biologických aktivit izolovaných látek. Také bych ráda poděkovala celé katedře Farmaceutické botaniky a ekologie za vřelé přijetí a příjemné pracovní prostředí.

## OBSAH

1. ÚVOD .....	4
2. CÍL PRÁCE.....	7
3. TEORETICKÁ ČÁST .....	9
3.1. Alkaloidy .....	10
3.1.1. Alkaloidy odvozené od ornitinu .....	11
3.1.2. Alkaloidy odvozené od lysinu .....	13
3.1.3. Alkaloidy odvozené od fenylalaninu a tyrosinu .....	15
3.1.4. Alkaloidy odvozené od tryptofanu .....	18
3.1.5. Alkaloidy odvozené od histidinu .....	22
3.1.6. Alkaloidy odvozené od kyseliny asparagové, resp. kyseliny nikotinové....	22
3.1.7. Alkaloidy odvozené od kyseliny antranilové.....	22
3.1.8. Terpenové alkaloidy .....	23
3.1.9. Steroidní alkaloidy.....	24
3.1.10. Alkaloidy vznikající transaminacními reakcemi .....	25
3.1.11. Purinové deriváty .....	26
3.2. Charakteristika rodu Eschscholtzia.....	27
3.2.1. Systematické zarazení .....	28
3.2.2. Botanický popis .....	29
3.3. Obsahové látky taxonu Eschscholtzia .....	30
3.4. Alzheimerova choroba.....	41
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	42
4.1. Všeobecné postupy .....	43
4.1.1. Destilace a odparování .....	43
4.1.2. Chromatografie .....	43
4.2. Materiál a vybavení .....	43
4.2.1. Rozpouštědla a chemikálie pro izolaci alkaloidu v čisté formě.....	43
4.2.2. Detekční činidla .....	44
4.2.3. Chromatografické adsorbenty.....	44
4.2.4. Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii .....	45
4.2.5. Chemikálie a materiál pro stanovení inhibiční aktivity alkaloidu vůči erythrocytární AChE a sérové BuChE .....	45
4.2.6. Chemikálie a materiál ke stanovení antioxidantní aktivity .....	46
4.2.7. Chemikálie a materiál pro stanovení inhibiční aktivity alkaloidu vůči POP .....	46

4.2.8.	Prístroje použité pri stanovovaní biologických vlastností izolovaných látok	47
4.3.	Postup extrakce alkaloidu z <i>Eschscholtzia californica</i> Cham.	47
4.3.1.	Príprava extraktu a jeho čistení	47
4.3.2.	Zpracování frakce 36	50
4.3.3.	Zpracování spojených frakcí 39-45	51
4.4.	Určení struktury izolované látky	52
4.4.1.	Merení hmotnostního spektra	52
4.4.2.	Merení NMR spektra	52
4.5.	Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity izolovaných alkaloidu vuci erythrocytární AChE a sérové BuChE	53
4.5.1.	Podmínky měření	53
4.5.2.	Príprava erythrocytárních pouzder	53
4.5.3.	Stanovení inhibiční aktivity alkaloidu vuci AChE a BuChE	54
4.5.4.	Stanovení antioxidantní aktivity získaných alkaloidu	54
4.5.5.	Stanovení inhibiční aktivity izolovaných látok vuci prolyloligopeptidáze	55
5.	VÝSLEDKY	56
5.1.	Strukturální analýza O-methylkaryachinu	57
5.1.1.	MS studie O-methylkaryachinu	57
5.1.2.	NMR studie O-methylkaryachinu	60
5.2.	Strukturální analýza argemoninu	64
5.2.1.	MS studie argemoninu	64
5.2.2.	NMR studie argemoninu	67
5.3.	Antioxidantní aktivita	71
5.4.	Výsledky testu vlivu látky na aktivitu AChE a BuChE	71
5.5.	Optická otáčivost	72
5.6.	Výsledky testu inhibiční aktivity izolovaných látok vuci prolyloligopeptidáze	72
6.	DISKuze	73
7.	SEZNAM ZKRATEK	76
8.	LITERATURA	78

## 1. ÚVOD

Alzheimerova nemoc (AD) je neurodegenerativní onemocnění charakteristické progresivním zhoršováním paměti a kognitivních funkcí, což může vést až k úplné devastaci organismu se zachováním pouze vegetativního života. Prevalence demencí se počínaje 62,5 rokem věku každých pět let zdvojnásobuje, přičemž prevalence AD se zdvojnásobuje každých 4,5 roku<sup>1</sup>. Je to nejčastější příčina demence ve stáří, postihující více než 20 milionů lidí po celém světě a odhaduje se, že toto číslo vzroste na 114 milionů do roku 2040<sup>2</sup>.

V současné době existuje několik teorií o původu a vývoji AD: kromě cholinergní hypotézy a hypotézy amyloidní kaskády existuje koncepce mírné kognitivní poruchy, hypotéza oxidačního stresu a oxidační nerovnováhy, teorie oxidu dusnatého, teorie neurotoxicity glutamátu / hypotéza vápníku, hypotéza nestability mikrotubulu, koncepce regulace a ovlivnění původních molekul, teorie kovu, hypotéza replikačního stresu DNA, noradrenergí teorie a hypotéza bunecného cyklu<sup>3-8</sup>.

Etiologie AD je stále neznámá, což neumožňuje kauzální terapii a z těchto důvodů je i portfolio léků velmi úzké. V současnosti jsou lékem první volby kognitiva (donepezil, rivastigmin, galanthamin), která svým cholinomimetickým účinkem zlepšují pozornost a paměťové schopnosti a také inhibitory receptoru N-methyl-D-asparagové kyseliny (NMDA) (memantin). Mezi nejvýznamnější inhibitory acetylcholinesterázy (AChE) patří galanthamin a huperzin A (HupA). Galanthamin je již terapeuticky užívanou látkou (např. Reminyl®)<sup>9</sup> a hodnocení jeho účinku se stále zkoumá. HupA je selektivní a dobře tolerovaný inhibitor AChE, který je v současné době v Evropě ve fázi II klinického testování<sup>10</sup>. Dále se k léčbě používají antioxidanty (D, L-tokoferol), inhibitory monoaminoxidázy B (IMAOB) (selegilin), látky zlepšující metabolismus mozku a krevní perfuzi (extrakty Ginkgo biloba, nicergolin) a estrogény u post-klimakterických žen. Nootropické léky a cerebrolysin nepřinesly požadované účinky. Velmi efektivní se ukázalo být užívání psychotropních léků v léčbě poruch chování a deliria, antipsychotik druhé generace (Risperidon a Quetiapin), antidepresiv třetí generace (citalopram, sertralin a fluoxetin) a čtvrté generace (mirtazapin a reboxetin) nebo reverzibilních inhibitorů monoaminoxidázy A (IMAOA) (moclobemid). Také využití monoklonálních látek (crenezumab, gantenerumab a solanezumab), které jsou namířeny proti toxickému účinku  $\beta$ -amyloidu, může poskytovat velmi prospěšné výsledky v léčbě AD<sup>8</sup>.

Stále se hledají nová léčiva, která budou schopna ovlivnit neurodegenerativní procesy na různých úrovních. Velká pozornost je věnována inhibitorům AChE



a butyrylcholinesterázy (BuChE), inhibitorum receptoru NMDA, látkám zvyšující aktivitu cholinacetyltransferázy, antagonistum nikotinových a dalších receptoru, elicitorum NGF (nervový rustový faktor) aj<sup>8</sup>.

Inhibitory AChE a BuChE jsou nejširší skupinou sloučenin, u které se očekává, že poskytne slibný efekt v kognitivní léčbě AD. U látek, které jsou v současné době sledovány se uvádí, že mohou také zasahovat do metabolismu APP (prekurzory amyloidního proteinu) a mají neuroprotektivní účinek<sup>11-13</sup>. Pozornost je také venována přírodním látkám, které inhibují AChE a BuChE.

Důležitou roli při hledání nových látek hrají alkaloidy, zejména z celedi Amaryllidaceae (hlavně sanguinin a některé deriváty lykorinu ukazují srovnatelný účinek jako galanthamin<sup>14</sup>. Mezi potenciální kandidáty nových léčiv můžeme zaradiť některé isochinolinové alkaloidy inhibující cholinesterázy, především acetylcholinesterázu. Tyto látky by se mohly příznive uplatnit v symptomatické léčbě neurodegenerativních onemocnění (zejména AD), neuromuskulárních onemocnění (myastenia gravis), léčbě glaukomu a jako antidotum při otrave anticholinergními látkami<sup>15-18</sup>. Vzhledem k rozsáhlosti problematiky zde nelze uvést přírodní látky, které jsou v centru zájmu. Například více než 700 publikací bylo venováno alkaloidum rodu Amaryllidaceae a přes 470 příspěvků inhibitorum AChE přírodního původu<sup>8</sup>.

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem experimentální části rigorózní práce bylo:

1. dopracování alkaloidního výtrepku chloridu rozpustných v chloroformu, nefenolických z *Eschscholtzia californica*, získaného v rámci diplomové práce Jakuba Doležala<sup>19</sup>,
2. izolace alespon dvou alkaloidu v čisté formě,
3. identifikace alkaloidu pomocí spektroskopických metod (MS, NMR, IR),
4. podílet se na stanovení biologických aktivit izolovaných látek (antioxidacní aktivita, inhibiční aktivita vůči acetylcholinesteráze, butyrylcholinesteráze a prolyloligopeptidáze) a výpočet hodnot  $IC_{50}$  resp.  $EC_{50}$ .

### 3. TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1. Alkaloidy

Alkaloidy jsou organické dusíkaté báze, vyznačující se zpravidla silnými farmakologickými účinky. Mají lipofilní charakter, většinou jsou to tuhé, bezbarvé, ve vodě málo rozpustné látky. Existují však výjimky – např. nikotin, spartein a koniin jsou tekutiny; berberin a chelidonin jsou barevné. Přirozené alkaloidy jsou často opticky aktivní. Pouze některé alkaloidy se rozpouštějí snadno ve vodě; jsou však zpravidla dobře rozpustné v alkoholu, chloroformu, etheru a ve směsi chloroformu s etherem. Také některá organická rozpouštědla bazického charakteru jsou vhodnými rozpouštědly alkaloidu (anilin, pyridin, piperidin). Rozpouštějí se ve zředěných roztocích minerálních kyselin, přičemž vzniká sul, dobře rozpustná ve vodě, ale zato nerozpustná v polárních rozpouštědlech. Tato skutečnost umožňuje snadné oddělení alkaloidu od ostatních obsahových látek extrakcí různě polárními rozpouštědly při různém pH<sup>20</sup>.

Význam alkaloidu pro rostlinu není zatím jednoznačně objasněn. Jejich jedovatost může rostlině působit ochranu proti býložravcům a parazitům. Ne všechny alkaloidy jsou však v dostatečné míře jedovaté. Sama rostlina na jejich syntézu vynakládá mnoho energie a musí vlastnit vysoce specializované enzymy. Proto předpokládáme, že alkaloidy mají pro rostlinu ještě jiný, dosud neobjasněný význam<sup>20</sup>.

Biogeneticky jsou alkaloidy odvozené většinou od aminokyselin. Jde zejména o aminokyseliny ornitin, lysin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan a histidin. Některé alkaloidy vznikají z kyseliny antranilové nebo nikotinové a další vznikají z meziproductu biosyntézy terpenoidu a steroidu za přítomnosti amoniaku. Na syntéze alkaloidu se mohou méně často podílet i další aminokyseliny, jako je glycin, cystein, methionin, kyselina asparagová a prolin. Pomerne malá skupina alkaloidu je tvořena příjmem dusíku do polyketidového řetězce (to je např. případ koniinu). Vzácná je též návaznost dusíkatého heterocyklu na flavonoidní skelet (např. lilalin)<sup>20</sup>.

Z chemického hlediska rozlišujeme dvě základní skupiny alkaloidu – alkaloidy heterocyklické a alkaloidy s exocyklickými atomy dusíku. Významnější jsou pro nás alkaloidy heterocyklické. Heterocyklické alkaloidy jsou přírodní dusíkaté sloučeniny, obsahující dusíkový heteroatom v cyklu. Na základě skeletu a biosyntetických prekurzorů lze heterocyklické alkaloidy rozdělit do několika skupin, a to:

alkaloidy odvozené od ornitinu – pyrolidinové, tropanové a pyrolizidinové alkaloidy,

alkaloidy odvozené od lysinu – piperidinové a chinolizidinové alkaloidy,

alkaloidy odvozené od kyseliny nikotinové – pyridinové alkaloidy,

alkaloidy odvozené od fenylalaninu – tetrahydroisochinolinové a benzyltetrahydroisochinolinové alkaloidy,

alkaloidy odvozené od tryptofanu – indolové alkaloidy,

alkaloidy odvozené od kyseliny anthranilové – chinolinové a akridinové alkaloidy,

alkaloidy odvozené od histidinu – imidazolové alkaloidy,

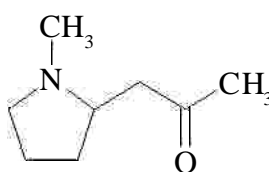
alkaloidy odvozené od kyseliny mevalonové – terpenové a steroidní alkaloidy,

deriváty xantinu – purinové alkaloidy<sup>20</sup>.

### 3.1.1. Alkaloidy odvozené od ornitinu

#### Pyrolidinové alkaloidy

Pyrolidinové alkaloidy jsou alkaloidy, obsahující nasycený pěticelenný uhlíkatý cyklus s jedním dusíkatým heteroatomem – tzv. pyrolidin. Vyskytují se zejména v rostlinách celedi vstavacovitých (Orchidaceae), rudodrevovitých (Erythroxylaceae) a lilkovitých (Solanaceae). Mezi zástupce pyrolidinových alkaloidů patří např. hygrin, kuskohygrin, ruspolinon nebo tyloforin<sup>20</sup>.

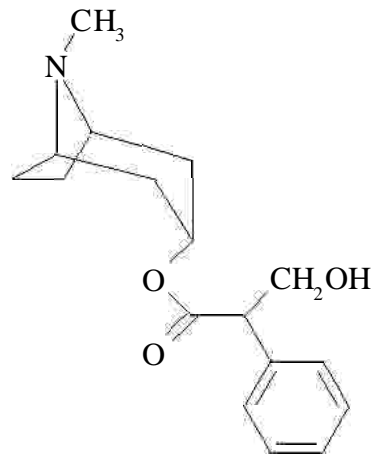


hygrin

#### Tropanové alkaloidy

Tropanové alkaloidy jsou typickými alkaloidy rostlin celedi lilkovitých (Solanaceae). Jsou význačné přítomností bicyklického tropanového skeletu, který je tvořen nasyceným sedmicelenným uhlíkatým kruhem, přemostěným v poloze 1,4 dusíkem, který na sobě ještě nese methylovou skupinu. Různí zástupci skupiny tropanových alkaloidů se mezi sebou liší jednak přítomností dalších substituentů,

zejména hydroxyskupin, karboxylových skupin nebo epoxyskupin, jednak esterifikací těchto skupin. Mezi alkaloidy, odvozené od tropinu, patří (-)-hyoscyamin, atropin, skopolamin. Mezi alkaloidy, odvozené od pseudotropinu, radíme kokain<sup>20,21</sup>.



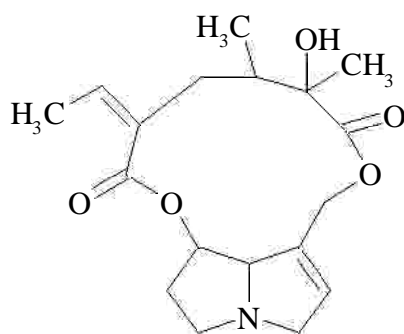
atropin



Obr.1: *Atropa belladonna* – ruřík zlomocný (faf.cuni.cz/daidalea ©)<sup>22</sup>

## Pyrolizidinové alkaloidy

Základní heterocyklický skelet pyrolizidinových alkaloidů je také odvozen od ornitinu. Pyrolizidinové alkaloidy bývají většinou estery dikarboxylových kyselin, příkladem je senecionin, nacházející se v některých rostlinách čeledi hvězdnicovitých (Asteraceae), zejména v rodu starček (Senecio). Většina těchto, tzv. necinových alkaloidů, má hepatotoxické účinky<sup>20</sup>.



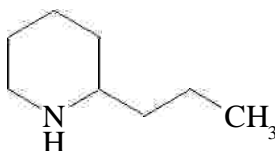
senecionin

### 3.1.2. Alkaloidy odvozené od lysinu

## Piperidinové alkaloidy

Od lysinu se podobně jako od ornitinu odvozují heterocyklické alkaloidy, jejichž kruh je však šesticlenný, nasycený s jedním dusíkem (piperidin). Jednoduché piperidinové alkaloidy mohou být také odvozeny od polyketidu, tímto příkladem je vysoce toxický koniin, 2-propylpiperidin. Jednoduché piperidinové alkaloidy se vyskytují v bolehlavu plamatém (*Conium maculatum*) nebo v marháníku (*Punica*)<sup>20,21</sup>.

Složené piperidinové alkaloidy obsahují kromě heterocyklické dusíkaté části, vzniklé z lysinu, ještě druhou část, vytvořenou z kyseliny šikimové. Nejvýznamnějšími druhy, obsahujícími tento druh alkaloidu, jsou rozchodník (*Sedum*), lobelka (*Lobelia*) či peprovník (*Piper*). Jde zejména o piperin, lobelin, isolobelin a chavicin<sup>20</sup>.



koniin

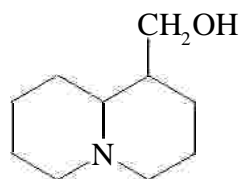




Obr.2: Conium maculatum – bolehlav plamatý (faf.cuni.cz/daidalea ©)<sup>22</sup>

### Chinolizidinové alkaloidy

Chinolizidinové alkaloidy jsou tvořené bicyklickým heterocyklem chinolizidinem, který je tvořen dvěma šesticlennými cykly se společnou stranou, přičemž jeden ze společných uhlíkatých atomů je nahrazen dusíkem. Tyto alkaloidy jsou také odvozeny od lysinu. Mezi chinolizidinové alkaloidy patří lupinin, dále strukturně složitější spartein, jehož odbouráváním vzniká cytisin. Chinolizidinové alkaloidy se vyskytují v rostlinách čeledi bobovitých (Fabaceae), např. rody vlčí bob (Lupinus) nebo janovec (Sarothamnus scoparius)<sup>20</sup>.

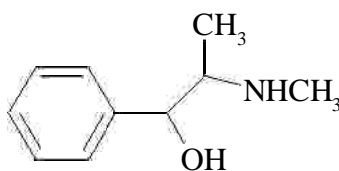


lupinin

### 3.1.3. Alkaloidy odvozené od fenylalaninu a tyrosinu

#### Deriváty fenylalkylaminu

Nejdůležitějšími alkaloidy této skupiny jsou deriváty fenethylaminu. Patří sem efedrin, který se vyskytuje ve chvojnících (*Ephedra* sp.). Do této skupiny látek radíme též meskalin. Kromě derivátu fenethylaminu jsou hojně zastoupeny i deriváty ostatních fenylalkylaminu. K takovým látkám patří např. alkaloid kapsaicin, podstata pálivé chuti papriky, taxin, hlavní toxin tisu, či antibiotikum chloramfenikol<sup>20</sup>.



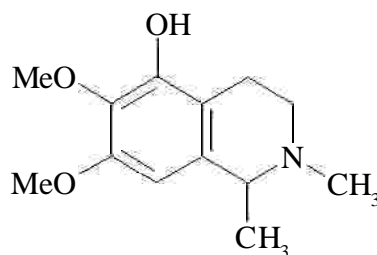
efedrin



Obr.3: *Ephedra distachya* – chvojník dvouklasý (faf.cuni.cz/daidalea ©)<sup>22</sup>

## Tetrahydroisochinolinové alkaloidy

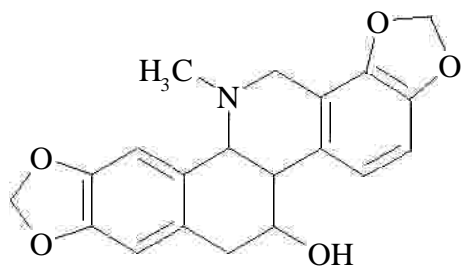
Tyto alkaloidy obsahují tetrahydroisochinolinový kruh. Jedná se o alkaloidy kaktusu, např. gigantín, anhalamin, anhalidin, pelotín a anhalonidin, které vznikají z derivátu fenethylaminu. Dalším zástupcem je též hydrastinin, který spolu s kyselinou opianovou vzniká oxidacním štepením alkaloidu hydrastinu, což je alkaloid rostliny *Hydrastis canadensis*<sup>20</sup>.



gigantín

## Benzyltetrahydroisochinolinové alkaloidy

Do této skupiny patří alkaloidy strukturně odvozené od 1-benzyltetrahydroisochinolinu. Můžeme je rozdělit na několik strukturních typů: morfinový, aporfinový, protopinový, ftalidotetrahydroisochinolinový, benzofenantridinový, berberinový a bisbenzylisochinolinový. První čtyři skupiny tvoří strukturní základ opiových alkaloidů. Berberinový strukturní typ můžeme nalézt v dřevě alu (*Berberis* sp.) a vodního moru (*Hydrastis* sp.). Benzofenantridinové alkaloidy se nacházejí ve vlašovicníku (*Chelidonium majus*)<sup>20</sup>.



chelidonin

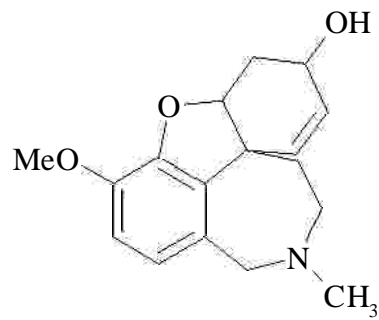


Obr.4: Chelidonium majus – vlašovicník větší (faf.cuni.cz/daidalea ©)<sup>22</sup>

#### Amaryllidaceae alkaloidy

Tzv. amarylkovité alkaloidy, strukturně patří mezi isochinolinové alkaloidy. Pro svoji biologickou hodnotu jsou tyto alkaloidy předmětem intenzivního výzkumu, především v rámci vlastní izolace, stanovení biologické aktivity a jejich chemie<sup>23</sup>. Alkaloidy celedi Amaryllidaceae jsou dle literárních zdrojů rozděleny podle své chemické struktury do 18 typů, z nichž nejvýznamnější jsou: krininový, galanthaminový, lykorinový a pankratistatinový. Další typy jsou belladinový, galanthindolový, homolykorinový, galasinový, montaninový, kripowellinový, cheryllinový, buflavinový, plikaminový, tazzetinový, gracilinový, augustaminový, gracilaminový, hostatininový<sup>24</sup>. Rostliny z celedi Amaryllidaceae jsou významné tím, že produkují strukturně unikátní alkaloidy se širokou škálou zajímavých fyziologických účinků – antivirové, protirakovinné, inhibiční vůči AChE, imunostimulační a antimalarické<sup>25</sup>. Alkaloidy se vyskytují např. v rodech Amaryllis, Galanthus, Nerine, Zephyranthes, Leucojum, Lycoris, Narcissus, Crinum aj.





galanthamin



Obr.5: Galanthus nivalis – sneženka podsnežník (faf.cuni.cz/daidalea ©)<sup>22</sup>

#### 3.1.4. Alkaloidy odvozené od tryptofanu

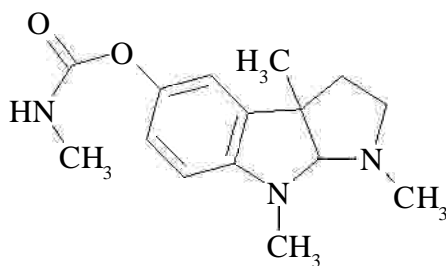
Od tryptofanu odvozujeme tzv. indolové alkaloidy. Patří sem látky s rozličnou chemickou strukturou. Na jejich biogenezi se kromě aminokyseliny účastní také terpenické jednotky. Podle toho rozlišujeme jednoduché, složené a dimerní indolové alkaloidy. Složené indolové alkaloidy můžeme ještě podle počtu obsažených isoprenových jednotek rozdělit na hemiterpenické a monoterpenické<sup>20</sup>.

## Jednoduché indolové alkaloidy

Psilocin a psilocybin jsou hlavními alkaloidy lysohlávek (*Psilocybe* sp.), mohou se však vyskytovat i v jiných příbuzných, halucinogenně působících houbách<sup>20</sup>.

Mezi jednoduché indolové alkaloidy radíme alkaloid fysostigmin, nacházející se v semenech puchýrnatce jedovatého (*Physostigma esera*) z celedi bobovitých.<sup>20</sup>

Kondenzací tryptaminu s aldehydem nebo ketokyselinou můžeme odvodit další dvě skupiny alkaloidu, a to alkaloidy typu tetrahydroharmanu a alkaloidy typu indoleinu<sup>20</sup>.



fysostigmin

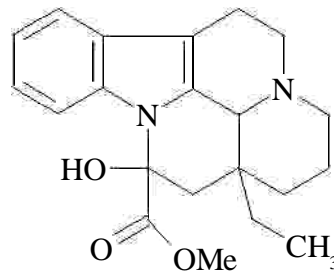
## Složené monoterpenické indolové alkaloidy

Na tvorbě těchto alkaloidů se kromě tryptofanu účastní také monoterpenický prekurzor, odvozený od sekologaninu. Skelet tohoto prekurzoru je identický se skeletem iridoidních sloučenin<sup>20</sup>.

Podle monoterpenické složky se tyto indolové alkaloidy dělí na johimbanoidy (nazývané také alkaloidy loganinového typu), iboganoidy a aspidospermanoidy. Názvy jsou odvozeny od názvu rostlinných druhů, ve kterých se alkaloidy těchto struktur vyskytují<sup>20</sup>.

Mezi johimbanoidy patří alkaloidy ajmalicin, tetrahydroalstonin, reserpin a johimbin. Alkaloidy strychnin a brucin patří také mezi johimbanoidy, tj. alkaloidy loganinového typu. K loganinovému typu patří také chininové alkaloidy, které můžeme nalézt v chinovníku (*Cinchona* sp.). Jde zejména o chinin a jemu příbuzné alkaloidy. Syntéza chininu zahrnuje rozštěpení indolového kruhu, přičemž chinin ve výsledku neobsahuje indolovou strukturu, ale chinolinovou strukturu<sup>20</sup>.

Alkaloidy voakangin, katarantin a ibogain patří k ibogainovému typu. Mezi alkaloidy aspidošperminového typu patří vinkamin, což je alkaloid barvínku menšího (*Vinca minor*)<sup>20</sup>.



vinkamin

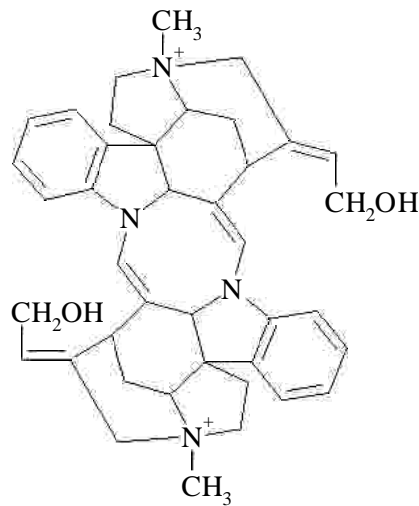


Obr. 6: *Vinca minor* – barvínku menší (brčál) (faf.cuni.cz/daidalea ©)<sup>22</sup>

### Dimerní indolové alkaloidy

Stavebními jednotkami dimerních indolových alkaloidů jsou alkaloidy ibogainového typu katarantin a alkaloid aspidošperminového typu vindolin. Příkladem takového dimeru je alkaloid vinkaleukoblastin či leukokrystin. Oba dva alkaloidy se používají při léčbě některých neoplastických nemocí<sup>20</sup>.

Další skupina dimerních indolových alkaloidů se nachází v kurare, získávaného z druhu rodu *Strychnos*. Typickým představitelem je alkaloid C-toxiferin<sup>20</sup>.

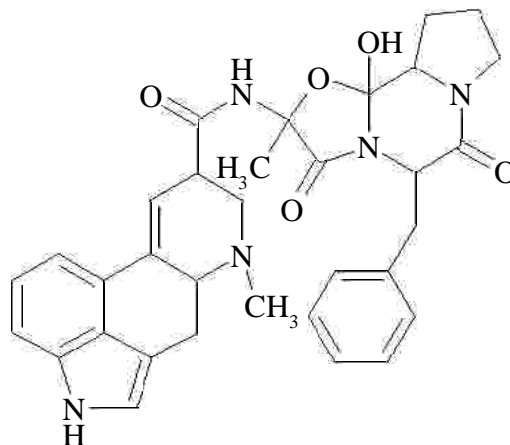


C-toxiferin

### Námelové alkaloidy

Námelové alkaloidy patří mezi hemiterpenické indolové alkaloidy. Vyskytují se zejména v říši hub, napr. v palickovici nachové (*Claviceps purpurea*). V rostlinné říši jsou vzácné, byly nalezeny pouze u některých rodu celedi svlaccovité<sup>20</sup>.

Námelové alkaloidy se rozdelují do dvou skupin – první skupinu tvoří kyselina lysergová a její deriváty, druhou skupinou jsou tzv. klavinové alkaloidy. Důležitějšími jsou deriváty kyseliny lysergové. Stereoizomerem kyseliny lysergové je kyselina isolysergová, jejíž deriváty jsou neúčinné. Farmakologicky účinné deriváty kyseliny lysergové jsou jednak jednoduché amidy kyseliny lysergové, napr. ergometrin, patří sem však také syntetický diethylamid kyseliny lysergové, LSD. Dalšími účinnými deriváty kyseliny lysergové jsou alkaloidy peptidového typu, kde je kyselina lysergová vázaná s tripeptidem. Do této skupiny patří napr. ergotamin<sup>20</sup>.

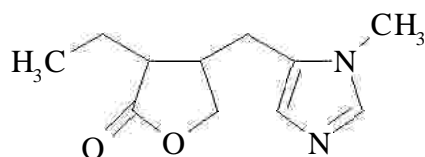


ergotamin



### 3.1.5. Alkaloidy odvozené od histidinu

Nejdůležitějším alkaloidem, odvozeným od aminokyseliny histidinu je imidazolový alkaloid pilokarpin, vyskytující se v listech mrštnoplochu malolistého (*Pilocarpus microphyllus*)<sup>20</sup>.

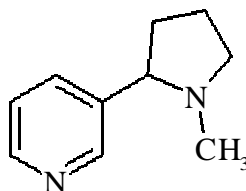


pilocarpin

### 3.1.6. Alkaloidy odvozené od kyseliny asparagové, resp. kyseliny nikotinové

Kyselina nikotinová bývá často v učebnicích uvedena jako prekurzor pyridinových alkaloidu. Sama kys. nikotinová není aminokyselina (AMK), ale vzniká kondenzací glycerol-3-fosfátu a AMK kys. asparagové.

Hlavním zástupcem této skupiny je alkaloid nikotin, vyskytující se v tabáku (*Nicotiana tabacum*). Ricinin, alkaloid ze skocce (*Ricinus communis*), vzniká oxidací nikotinamidu. Alkaloidy arekolin, arekaidin, guvakolin a guvacin je možné nalézt v semenech palm (*Arecaceae*) a jsou odvozeny také od kyseliny nikotinové částečnou hydrogenací, N-methylací, případně esterifikací<sup>20</sup>.

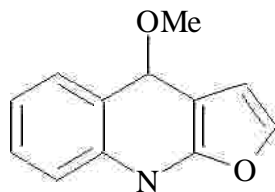


nikotin

### 3.1.7. Alkaloidy odvozené od kyseliny antranilové

Alkaloidy patřící do této skupiny obsahují ve své struktuře nejčastěji chinolinový nebo akridinový skelet. Tyto látky jsou syntetizovány z antranilylkoenzymu A, který kondenzuje s malonylkoenzymem A. Vzniklá ketokyselina podléhá cyklizaci a vzniká

2,4-dihydroxychinolin, který reaguje s dimethylalylidifosfátem (isoprenoidní sloučenina) za vzniku 3-dimethylalyl-2,4-dihydroxychinolinu. Jeho hydroxylací, methyloací a cyklizací vznikají alkaloidy jako diktamin či skimianin<sup>16</sup>.

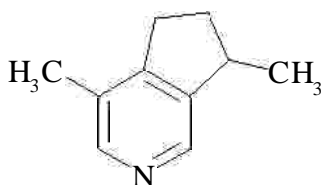


diktamin

### 3.1.8. Terpenové alkaloidy

Do skupiny terpenických alkaloidů radíme dusíkaté báze, jejichž struktura je odvozena od kyseliny mevalonové. Tyto alkaloidy rozdělujeme na hemiterpenové, monoterpenové, seskviterpenové a diterpenové. Mezi hemiterpenové alkaloidy patří 3-methylpyrolidin. Jeho derivát jatrofam můžeme nalézt např. v lilii belavé (*Lilium candida*). Monoterpenické alkaloidy s iridoidním prekurzorem se nacházejí v kozlíku lékařském (*Valeriana officinalis*) a jde např. o aktinidin. Seskviterpenickou strukturu mají alkaloidy leknínu (*Nymphaea alba*) a stulíku (*Nuphar lutea*), tedy nufaridin a jeho deriváty<sup>20</sup>.

Diterpenické alkaloidy se vyskytují v celedi pryskyřníkovitých a jsou strukturně příbuzné diterpenu kaurenu. Jde např. o alkaloidy akonitin, atisin, veatchin a lykoktonin<sup>20</sup>.



aktinidin

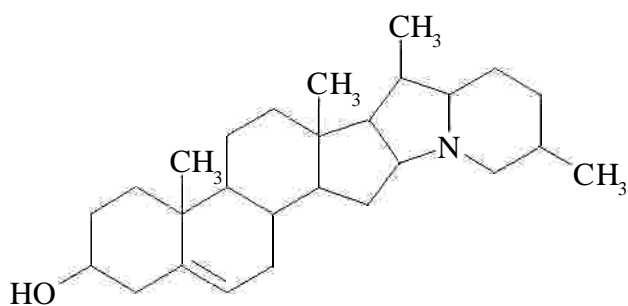


Obr. 7: Valeriana officinalis – kozlík lékařský (faf.cuni.cz/daidalea ©)<sup>22</sup>

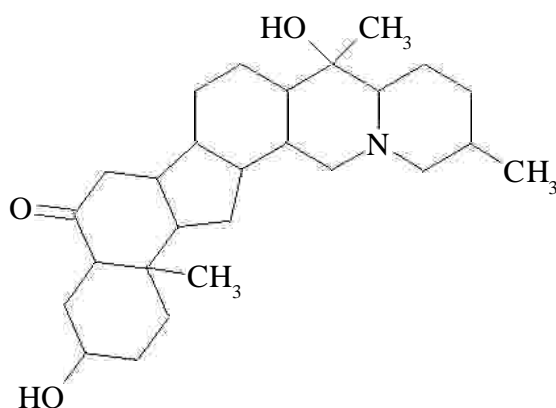
### 3.1.9. Steroidní alkaloidy

Steroidní alkaloidy jsou sloučeniny, které obsahují ve steroidním skeletu navázanou exocyklickou aminoskupinu nebo vlastní dusíkatý heterocyklus. Podle skeletu rozlišujeme alkaloidy typu pregnanu, cholestanu a C-nor-D-homocholestanu. Alkaloidy pregnanového typu můžeme nalézt napr. v zimostřázu (BUXUS) - cyklobuxin, cyklobuxoviridin, buxtauin. Alkaloidy cholestanového typu se tvoří zejména v liliovitých rostlinách. Jako příklad lze uvést solanidin nebo tomatidin<sup>20,21</sup>.

Alkaloidy C-nor-D-homocholestanového typu jsou charakteristické tím, že C kruh je peticlený a D kruh je šesticlený, tedy opačně, než je to u steroidu obvyklé. Můžeme se s nimi setkat u některých zástupců celedi liliovitých. Jako příklad nám poslouží alkaloid imperialin<sup>20</sup>.



solanidin

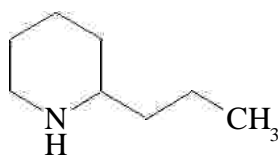


imperialin

### 3.1.10. Alkaloidy vznikající transaminacními reakcemi

Jedná se o pseudoalkaloidy odvozené od acetátového prekurzoru, kdy dusík je do základní struktury zabudován transaminací reakcí karbonylové sloučeniny a zdroje atomu dusíku (AMK).

Do této zvláštní skupiny patří alkaloidy bolehlavu plamatého (*Conium maculatum*). Tyto alkaloidy nejsou odvozeny od aminokyselin, ale lze je zaradit spíše k acetogeninům. Při syntéze se vychází ze čtyř molekul kyseliny octové, ze kterých vzniká tetraketidický retezec. Ten je redukován, přičemž zaniknou dvě ze čtyř ketoskupin (druhá a čtvrtá) a karboxylová skupina se redukuje na aldehydickou. Takto vzniká 5-oxooktanal. Ten podstupuje transaminaci s L-alaninem, jejíž výsledkem je 5-oxooktylamin, jehož cyklizací vzniká ?-konicein (z dusíku vychází nenasycená vazba), jeho redukcí vzniká koniin, hlavní alkaloid bolehlavu plamatého (*Conium maculatum*), který má ochrnující účinky a páchne myšinou<sup>20</sup>.

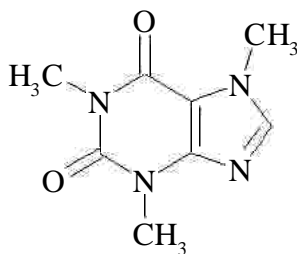


koniin

### 3.1.11. Purinové deriváty

Purinové deriváty jsou základními stavebními jednotkami nukleových kyselin. Patří sem totiž báze nukleových kyselin, adenin a guanin. Nás zajímají především methylované puriny, zejména kofein, teofylin a teobromin. Ty mají sice ve své molekule čtyři dusíkové atomy, ale nemají zásaditý charakter – netvoří s kyselinami soli. Proto se často ani neradí mezi alkaloidy, případně se označují jako pseudoalkaloidy. V rostlinné říši se tyto látky vyskytují velice často, jejich rozptyl je tedy v tomto smyslu značný<sup>20</sup>.

Kofein a ostatní purinové deriváty mají výrazné stimulační účinky a jsou principem působení kávy či čaje<sup>20</sup>.



kofein

### 3.2. Charakteristika rodu *Eschscholtzia*

Rod *Eschscholtzia* Cham. (Papaveraceae) zahrnuje velký počet taxonu nejasné systematické hodnoty. Fedde<sup>26</sup> uvádí 123 druhu, přičemž převážná část je v současné době považována za „microspecies“, nižší systematické jednotky nebo jako synonyma. Duke<sup>27</sup> uvádí 13 platných druhu. Taxonomicky je rod *Eschscholtzia* mimorádne obtížná skupina, protože druhy představují velmi plastické a polytypické skupiny s velkým počtem ekotypu a cytotypu (lišící se v jejich počtu chromozomu)<sup>28</sup>.

Fedde<sup>26</sup> klasifikoval druhy do dvou částí, *Eurycraspedontae* a *Stenocraspedontae*. Navzdory malému počtu druhu, alkaloidy, které byly v minulosti studovány, mohou být v rámci rodu *Eschscholtzia* rozděleny do tří biochemicky různých skupin<sup>29</sup>.

Do první skupiny patří tři příbuzné druhy *E. californica*, *E. glauca* a *E. douglasii*, vše ze sekce *Eurycraspedontae*. Jsou charakteristické výskytem alkaloidu pavinového typu a vysokým obsahem kvartérní alkaloidu<sup>30-34</sup>.

Do druhé skupiny radíme druhy *E. cf. oregana* ze sekce *Stenocraspedontae*, který se vyznačuje vysokým obsahem kvartérních benzylochinolinových alkaloidu, součástí je hlavní alkaloid papaverinového typu *escholamin*<sup>30,35</sup>.

Druhy *E. lobii* patří do třetí skupiny, také z části *Stenocraspedontae*, obsahující především protopinový typ alkaloidu a jsou charakteristické výskytem protopinu, skulerinu a korytuberinu. Na rozdíl od předchozích dvou skupin druh *E. lobii* prakticky neobsahuje kvartérní alkaloidy nebo alkaloidy pavinového typu<sup>29</sup>.

### 3.2.1. Systematické zarazení

Tab.I: Systematické zarazení<sup>36</sup>

Ríše	Plantae	Rostliny
Podříše	Tracheobionta	Cévnaté rostliny
Nadoddelení	Spermatophyta	Semenné rostliny
Oddelení	Magnoliophyta	Krytosemenné
Trída	Magnoliopsida/Rosopsida	Pravé dvoudeložné rostliny
Rád	Ranunculales	Pryskyrníkotvaré
Celed	Papaveraceae	Mákovité
Rod	Eschscholzia	Sluncovka

druh *Eschscholzia androuxii* Still  
druh *Eschscholzia caespitosa* Benth.  
druh *Eschscholzia californica* Cham.  
druh *Eschscholzia glyptosperma* Greene  
druh *Eschscholzia hypocoides* Benth.  
druh *Eschscholzia lemmonii* Greene  
druh *Eschscholzia lobbii* Greene  
druh *Eschscholzia minutiflora* S. Wats.  
druh *Eschscholzia palmeri* Rose  
druh *Eschscholzia papastillii* Still  
druh *Eschscholzia parishii* Greene  
druh *Eschscholzia ramosa* Greene  
druh *Eschscholzia rhombipetala* Greene<sup>37</sup>

*E. californica* Cham., *E. douglasii* (Hook. et Arn.) Walp. a *E. glauca* Greene jsou úzce související taxony, které Fedde zaradil na úroveň druhu do sekce *Eurycraspedontae* Fedde. V poslední době jsou považovány za „microspecies“ nebo jako synonyma a jsou zarazeny do *E. californica* Cham. druhu sensu lato (diverzita druhu). Nicméně, tyto tři zkoumané taxony zobrazují určité chemické rozdíly při vzájemném porovnání, a to zejména s ohledem na odlišné kvartérní alkaloidy, které lze považovat za charakteristický rys všech uvedených taxonů<sup>32</sup>.

### 3.2.2. Botanický popis

Rostliny rodu *Eschscholtzia* jsou jednoleté až vytrvalé byliny, 10-60 cm vysoké. Lodyha je přímá nebo vystoupavá. Listy jsou modravě-zelené, jemne rozptýlené, perenodílné, úkrojky cárkovité. Květy jsou jednotlivé, stopkaté, s asi 5-7 cm saténově mekkými plátky, které jsou ve tvaru malých košíčku a jsou dlouhotrvající. Korunní lístky jsou různobarevné, nejčastěji oranžovo žluté, na bázi tmavší. Semena jsou drobná, černá nebo tmavě hnědá ukrytá v 3-9cm tobolce, která je rozdělená do dvou částí<sup>38</sup>. U nás kvete od června do října, v subtropických oblastech už od února. Druh je velmi variabilní, rozlišují se dva poddruhy: subsp. *californica* a subsp. *mexicana*. U nás se v posledních letech začíná stále častěji objevovat v zahradách, kde se pestuje jako dekorativní letnicka, vzácně i zplňuje<sup>39,40</sup>.



Obr. 8: Kresba *Eschscholtzia californica*<sup>41</sup>



### 3.3. Obsahové látky taxonu *Eschscholtzia*

Hlavními sekundárními metabolity rodu *Eschscholtzia* jsou isochinolinové alkaloidy<sup>42</sup>. Rozdělení jednotlivých alkaloidů v orgánech rostlin se značně liší<sup>43</sup>. Biogeneze alkaloidů se může lišit v závislosti na ekologických podmínkách a klimatologických oblastech<sup>44,45</sup>.

Isochinolinové alkaloidy izolované z různých částí rostlin lze rozdělit do několika základních typů.

#### a) Pavinový typ

Escholtzin je typickým prvkem nadzemních částí, v korenech se téměř nevyskytuje<sup>31,33</sup>.

Kalifornidin (také zvaný N-methyleschscholtzinium hydroxid<sup>31</sup>), je hlavním alkaloidem z nadzemních částí. Jeho obsah v nadzemních částech se značně liší (od 0,19 % do 0,23 % ze suchého rostlinného materiálu)<sup>32</sup>. V korenech se vyskytuje pouze jako sekundární složka<sup>30,46,47</sup>.

Karyachin byl izolován z *E. californica* a také z *Cryptocary chinensis* Hemsl. (Lauraceae)<sup>48-50</sup>.

Isonorargemonin byl také popsán u dvou druhů rodu *Argemone* (Papaveraceae)<sup>51,52</sup> a v *Thalictrum revolutum* (Ranunculaceae)<sup>53</sup>.

Bisnorargemonin – *E. californica*, *E. glauca*, *E. douglasii*<sup>54,55</sup>.

Norargemonin<sup>31,56</sup> byl prokázán v rodu *Eschscholtzia* a také v některých druzích *Argemone*<sup>57,58</sup>. Spolu s bisnorargemoninem byl izolován i v jiné rodině než mákovité, tj. v *Thalictrum dasycarpum* Fisch. et Lall (Ranunculaceae<sup>59</sup>). Norargemonin a bisnorargemonin jsou přítomny v nadzemních částech jen v malém množství, zatímco v korenech tvoří hlavní složku fenolové frakce<sup>33</sup>.

O-Methylkaryachin také zvaný eschscholtzidin.

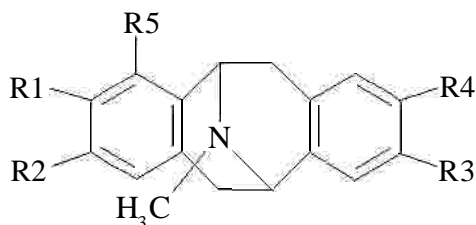
O-Methylneokaryachin byl v nedávné době izolován z *E. douglasii* a *E. glauca*. Tento alkaloid nebyl doposud z přírodního zdroje získán<sup>60</sup>.

Neokaryachin byl izolován z *E. glauca*<sup>60</sup>.

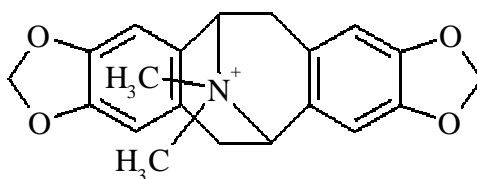
N-Demethylkrychin – *E. douglasii*, *E. glauca*<sup>60</sup>.

Argemonin – *E. glauca*, *E. californica*<sup>60</sup>.

Tab. II: Přehled struktur pavinových terciárních alkaloidů



Alkaloid	R1	R2	R3	R4	R5
Escholtzin	-OCH <sub>2</sub> O	-OCH <sub>2</sub> O	-OCH <sub>2</sub> O	-OCH <sub>2</sub> O	-H
Karyachin	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>2</sub> O	-OCH <sub>2</sub> O	-H
Isonorargemonin	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H
Norargemonin	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H
Bisnorargemonin	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H



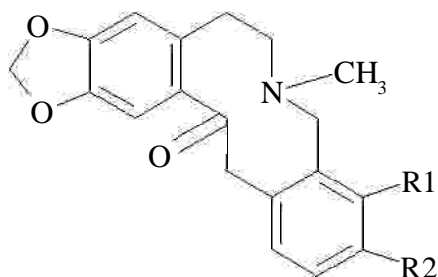
Kvarterní alkaloid kalifornidin

#### b) Protopinový typ

Alkaloidy allokryptopin a protopin jsou dominantní složkou terciárních nefenolických bází (přítomné v přibližně stejné výši, tj. každý asi 0,02 až 0,03 %). Oba alkaloidy se vyskytují jak v nadzemní, tak v kořenové části<sup>61</sup>.

Dalším protopinovým alkaloidem je hunnemanin, který vykazuje významnou antimykotickou aktivitu<sup>45</sup>.

Tab.III: Struktura protopinových alkaloidu

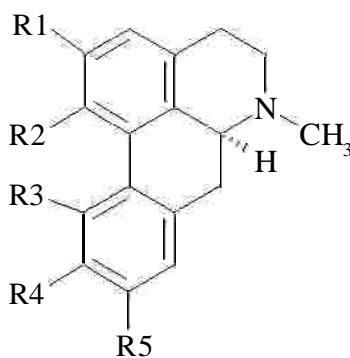


Alkaloid	R1	R2
Allokryptopin	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>
Hunnemanin	-OH	-OCH <sub>3</sub>
Protopin	-OCH <sub>2</sub> O	

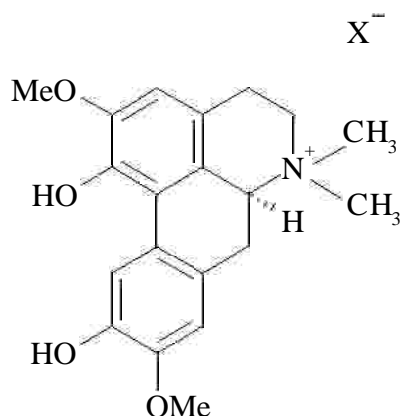
c) Aporphinový typ

Mezi aporphinové alkaloidy radíme N-methylaurotetanin (=lauroscholtzin<sup>55</sup>), korydin, isokorydin<sup>62</sup> a korytuberin. Dalším izolovaným alkaloidem byl esholin<sup>47</sup> (magnoflorin chloristan<sup>34</sup>).

Tab. IV: Struktura terciárních aporphinových alkaloidu



Alkaloid	R1	R2	R3	R4	R5
Lauroscholtzin	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OH
Korydin	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H
Isokorydin	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H



Kvarterní alkaloid esholin

d) Benzofenantridinový typ:

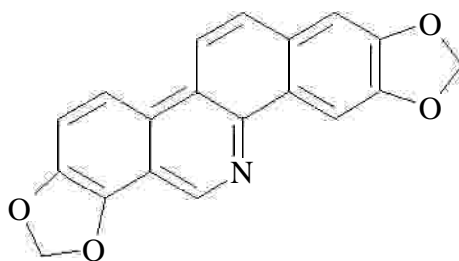
Izolovaná směs kvarterních benzofenantridinu se skládala ze sanguinarinu a chelerytrinu, doprovázená chelirubinem, chelilutinem a macarpinem. Všechny tyto alkaloidy byly již dříve z uvedených druhů izolovány<sup>30,31,63</sup>.

Benzofenantridinové alkaloidy, zejména sanguinarin a chelerytrin, jsou zajímavé pro své léčebné účinky. Mimo jiné se díky antibakteriálnímu účinku používají v zubním lékařství<sup>64,65</sup>. Nedávno bylo u sanguinarinu prokázáno, že by mohl být slibným lékem rakoviny<sup>66-69</sup>. Vyplývá to z jeho schopnosti inhibovat proteinkinázu C, taktéž chelerytrin nabízí potenciál jako protinádorový alkaloid<sup>70,71</sup>.

Dále mezi benzofenantridinové alkaloidy izolované z rodu *Eschscholtzia*, můžeme zaradit norsanguinarin, který se vyznačuje významnou antifungální aktivitou<sup>72</sup>.

Tab.V: Struktura benzofenantridinových alkaloidů

Alkaloid	R1	R2	R3	R4
Sanguinarin	-H	-H	-OCH <sub>2</sub> O	
Chelerytrin	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>
Chelirubin	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>2</sub> O	
Chelilutin	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>
Macarpin	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>2</sub> O	



Norsanguinarin

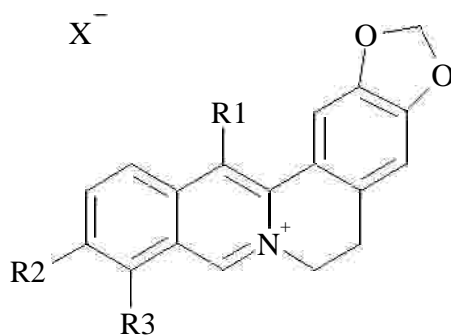
e) Protoberberinový typ

Alkaloid escholidin byl kromě rodu *Eschscholtzia* izolován také z nadzemní části *Hunnemannia fumariaefolia*<sup>32</sup>.

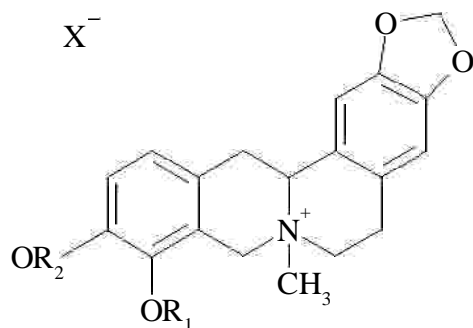
α-Canadin methohydroxid byl izolovaný jako přirozene se vyskytující alkaloid z druhu *Zanthoxylum brachycanthum* F. Muell. (Rutaceae)<sup>73</sup> a později byl nalezen i v několika jiných rostlinách, ale jeho výskyt v celedi *Papaveraceae* dosud nebyl znám<sup>42</sup>.

Dále ve frakci kvartérních protoberberinu ze tří druhů *Escholtzia* (*E. californica*, *E. glauca*, *E. douglasii*) bylo přítomno zanedbatelné množství koptisinu, berberinu, skulerinu a rovněž byly prokázány stopy korysaminu<sup>42,61</sup>.

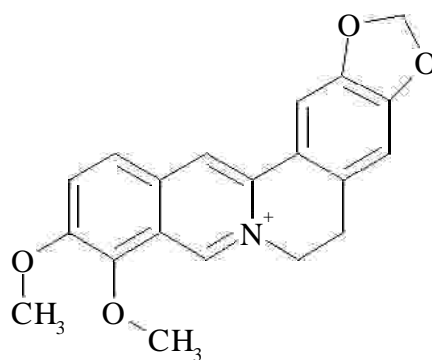
Tab.VI: Struktura protoberberinových alkaloidů



Alkaloid	R1	R2	R3
Koptisin	-H	-OCH <sub>2</sub> O	
Berberin	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>
Korysamin	-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>2</sub> O	



Alkaloid	R1	R2
Escholidin	-CH <sub>3</sub>	-H
a -Canadin methohydroxid	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>



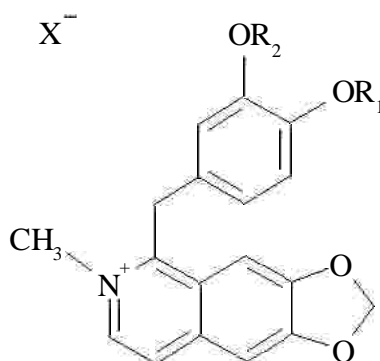
Berberin

f) Benzylochinolinové alkaloidy

Escholamin se v rodu *Escholtzia* vyskytuje pouze v zanedbatelném množství<sup>30,74</sup>.

Dále byly izolovány kvarterní alkaloidy escholamidin jodid a escholinin a terciální alkaloidy retikulín a norretikulín<sup>60,61</sup>.

Tab. VII: Struktura benzylochinolinových alkaloidů



Alkaloid	R1	R2
Escholamin	-CH <sub>2</sub>	
Escholamidin jodid	-CH <sub>3</sub>	- H

### *Eschscholtzia californica* Cham.

*Eschscholtzia californica* roste v západních státech USA (od kalifornského pobřeží po západní Texas) a v severozápadním Mexiku. Do Evropy byla přivezena začátkem 19. století jako okrasná rostlina. Roste na suchých stráních a skalách, často také v pouštních oblastech, v pásmu od pobřeží až do výšky 2 000 m n. m.<sup>39,75</sup>. Je známá pro své hypnotické a analgetické účinky<sup>76,77</sup>. V lidovém léčení se používala nadzemní část rostliny jako anodynum, diaforetikum, diuretikum, afrodisiakum a spasmolytikum<sup>78</sup>. Dodnes se v Americe i v Evropě používá jako mírné sedativum<sup>77</sup>.

*E. californica* je nejvýznamnějším a nejvíce prostudovaným druhem z rodu *Eschscholtzia*. Mezi dominantní alkaloidy v nadzemní části patří escholtzin a kalifornidin. Dominantní složkou terciárních nefenolických bází jsou alkaloidy allokryptopin a protopin. Dále byly izolovány pavinanové alkaloidy isonorargemonin, karyachin, norargemonin, bisnorargemonin a aporfinové alkaloidy N-methylaurotetanin, korydin, isokorydin, korytuberin a esholin<sup>47,61</sup>. Esholin byl získán z korene, kde je jedním z hlavních alkaloidů kvartérní frakce. Na rozdíl od tohoto zjištění se esholin vyskytuje v nadzemních částech *E. californica* pouze ve stopách. Z korene byla izolována také kvarterní báze a to alkaloid escholidin<sup>32</sup>. Ve směsi byly přítomny kvarterní benzophenanthridiny: sanguinarin, chelerytrin, chelirubin, chelilutin a makarpin. Ve stopovém množství byly identifikovány alkaloidy O-methylkaryachin, a-canadin methohydroxid, escholinin, escholamin, escholamidin jodid, koptisin, berberin a korysamin<sup>30,32,61,74</sup>.

Dále se podařilo získat alkaloidy (+) a (-) cheilanthifolin, hunnemanin a norsanguinarin. Cheilanthifolin byl izolován ve formě amorfního prášku, hunnemanin jako bezbarvé jehly a norsanguinarin jako žlutý krystalický prášek<sup>79</sup>. Získané látky byly plně charakterizovány komplexní spektrální analýzou a přímým srovnáním s autentickými vzorky<sup>45</sup>. Protopinový alkaloid hunnemanin byl spolu s norsanguinarinem (benzofenantridinový alkaloid), testován na antitykotoickou aktivitu

proti houbám *Alternaria melongenae*, *A. brassicola*, *A. brassicae*, *Curvularia lunata*, *C. maculans*, *Helminthosporium pennisetii*, *H. oryzae*, *H. turcicum*, *Fusarium undum* a *F. lini*. Hunnemanin 100% inhiboval sporulaci *A. brassicae*, *H. pennisetii* a *F. lini* v koncentraci 1000 ppm, zatímco norsanguinarin vystavoval 100% inhibici k *A. brassicola* a *C. maculans*, také v koncentraci 1000 ppm<sup>72</sup>. Syntetické fungicidy jsou úspěšně používány pro kontrolu různých plísňových onemocnění rostlin. Bezohledné a opakující se používání těchto syntetických látek může vyvolat u některých hub rezistenci. Zbytková toxicita těchto látek má za následek ohrožení lidského zdraví a vyžaduje opatrnost při jejich používání. Díky těmto nebezpečným účinkům se hledají ekologicky bezpečnější alternativní metody pro kontrolu nemocí rostlin. Využívání biodegradabilních fytochemikálií, zejména z léčivých rostlin, které nemají tolik reziduální účinek a nevedou k navození rezistence mikroorganismu, je další aspekt, který nabývá na důležitosti<sup>72,80-84</sup>.

Pro velký zájem o alkaloidy z rodu *Eschscholtzia* byla provedena izolace ze semen *E. californica*. Po extrakci methanolem byly z nefenolické frakce izolovány protopin a allokryptopin a z fenolické frakce laurosoltzin (N-methylaurotetanin). Z chloroformové frakce v roztoku kyseliny chlorovodíkové se izolací éterem získal alkaloid escholtzin. Z matečného louhu předcházející frakce se podařilo vykrytalizovat O-methylkaryachin<sup>57,85</sup>.

Další potenciálně aktivní látky přítomné v *E. californica* jsou flavonoidy<sup>86</sup>. Flavonoidní glykosidy rutin, kvercitrin a isoflavony 2'-methoxyformononetin, 7-methoxy-2',4'-dihydroxyisoflavon byly z tohoto druhu izolovány již dříve<sup>54,87</sup>. Podrobnější přehled je možné nalézt v mé diplomové práci z roku 2011<sup>88</sup>.

Alkaloidy escholtzin, protopin, allokryptopin, skulerin, N-methylaurotetanin byly podrobeny studii inhibiční aktivity vůči lidské erytrocytární AChE a sérové BuChE. Naměřené hodnoty byly výrazně vyšší, nežli hodnoty IC<sub>50</sub> standardu (galanthaminu, eserinu). Na základě získaných hodnot IC<sub>50</sub> nelze považovat izolované látky za potenciálně využitelné v terapii Alzheimerovy nemoci<sup>89,90</sup>.

Escholtzin, neokaryachin, karyachin, O-methylkaryachin, skulerin, salutaridin, retikulin, N-methylaurotetanin, protopin, allokryptopin byly také podrobeny antioxidantní studii, za využití DPPH testu. Výsledky měření jsou shrnuty v tabulce VIII. Stanovené hodnoty EC<sub>50</sub> byly porovnány se standardy kvercetinem (EC<sub>50</sub> = 25,3 μM) a troloxem (EC<sub>50</sub> = 27,8 μM). Zajímavá antioxidantní aktivita byla naměřena u skulerinu, salutaridinu a neokaryachinu. Ostatní alkaloidy se jeví spíše jako neaktivní<sup>90</sup>.



Tab. VIII: Antioxidacní aktivita alkaloidu (hodnoty EC<sub>50</sub>)

Neokaryachin	252 $\mu$ M
Karyachin	951 $\mu$ M
Escholtzin	neaktivní
O-Methylkaryachin	neaktivní
Skulerin	102 $\mu$ M
Salutaridin	228 $\mu$ M
Retikulin	946 $\mu$ M
N-Methylaurotetanin	1827 $\mu$ M
Protopin	neaktivní
Allokryptopin	neaktivní

### *Eschscholzia lobbii* Greene

Alkaloidy *E. lobbii*, ze sekce *Stenocraspedontae* byly zkoumány před několika lety<sup>30</sup>. Protopin byl získán jako hlavní alkaloid spolu s malým množstvím sanguinarinu, koptisinu a berberinu<sup>29</sup>. Pro další studii bylo použito většího množství rostlinného materiálu, aby mohly být izolovány a identifikovány alkaloidy vyskytující se v minoritních koncentracích. Po protopinu bylo z matečného louhu izolováno malé množství allokryptopinu a ve frakci kvarterní benzofenanthridiny byla dokázána přítomnost chelirubinu, chelerythinu, macarpinu a sanguinarinu. Ve frakci hydrochloridu, které jsou extrahovatelné chloroformem bylo nalezeno malé množství korydinu. Hlavní složkou fenolických frakcí byl skulerin, vedle dalších neidentifikovaných bází. Z frakce kvartérní protoberberiny byl izolován koptisin a v matečném louhu bylo zaznamenáno malé množství berberinu a korysaminu. Dále byl získán korytuberin a to extrakcí v chloroformu z jeho hydriodidu<sup>91</sup>. Kvartérní alkaloidy byly zjištěny ve stopových množstvích<sup>29</sup>.

### *Eschscholtzia glauca* Greene

Doposud byly z *E. glauca* izolovány následující alkaloidy: kalifornidin, escholtzin, allokryptopin, protopin, escholinin, escholidin, isonorargemonin, karyachin, norargemonin, bisnorargemonin, korydin, isokorydin, korytuberin, N-methylaurotetanin, a-canadin methohydroxid, sanguinarin, chelerytrin, chelirubin, chelilutin, makarpin, koptisin, berberin, korysamin, magnoflorin jodid, escholamidin jodid, escholamin<sup>30,32,42,61,74</sup>.

Dalším izolovaným alkaloidem z nadzemní části *E. glauca* byl esholin<sup>32,47</sup>. Zajímavé je, že jeho přítomnost nebyla zjištěna v korenech této rostliny, i když v korenech *E. californica* a *E. douglasii* je esholin jedním z dominantních alkaloidu kvartérní frakce. Ultrafialové spektrum esholinu je poněkud podobné hydrochloridu papaverinu a zejména methiodidu papaverinu a escholamin jodidu<sup>47</sup>. Navzdory této podobnosti není esholin papaverinového typu (jak navrhuje Gertig<sup>47</sup>), ale díky jeho optické aktivitě a neschopnosti být redukován, esholin představuje aporfinový derivát<sup>64</sup>.

Z *E. glauca* byl izolován nový pavinový alkaloid, pojmenovaný O-methylneokaryachin<sup>92</sup>.

### *Eschscholtzia douglasii* (Hook. et Arn.)

Další zajímavou rostlinou tohoto rodu je *E. douglasii* u níž byly identifikovány tyto alkaloidy: kalifornidin, escholtzin, allokryptopin, protopin, isonorargemonin, karyachin, norargemonin, bisnorargemonin, N-methylaurotetanin, a-canadin methohydroxid, esholin<sup>47</sup>, escholinin<sup>32</sup>, escholidin, escholamin<sup>30,74</sup>, sanguinarin, chelerytrin, chelirubin, chelilutin, makarpin, korytuberin, koptisin, berberin<sup>42</sup>, korysamin<sup>61</sup>, escholamidin jodid. Korydin a isokorydin byly izolovány z nadzemní části druhu *E. douglasii* poprvé. Z *E. douglasii* byl také izolován kvartérní alkaloid N-methylkaryachinium jodid. Tento alkaloid byl nalezen zatím jen v *Cryptocarya chinensis* Hemsl. (Lauraceae)<sup>61,93</sup>.

### *Eschscholtzia oregana* Greene

Z *E. oregana* byly doposud izolovány alkaloidy escholamin, kalifornidin, escholamidin, korydin, skulerin, (-)-a-stylopin methohydroxid. U stylopin methohydroxidu byly popsány dvě diastereoizomerní formy  $\alpha$ - a  $\beta$ -stylopin

methohydroxid. a- forma byla také nalezena v *E. californica* Cham., *Argemone ochroleuca* Sweet, a *A. Platyceras* Link et Otto. Ve stopovém množství byly získány dva zatím neznámé alkaloidy<sup>35</sup>.

### Enzym (S)-norlaudanosolin syntáza z *Eschscholtzia tenuifolia*

Z *Eschscholtzia tenuifolia* byl izolován enzym (S)-norlaudanosolin syntáza, která katalyzuje syntézu (S)-norlaudanosolinu z dopaminu a 3,4-dihydroxyphenylacetaldehydu. Tento enzym je zodpovědný za syntézu (S)-norlaudanosolinu, což je klíčový intermediát v tvorbě isochinolinových alkaloidů v rostlinném království<sup>94</sup>.

(S)-norlaudanosolin syntáza byla izolována z extraktu *Eschscholtzia tenuifolia* z bunecné suspenze extrakcí zmrazeného bunecného prášku s fosfátovým pufrům. Byla čištěna přibližně 40-krát. Zdánlivá molekulová hmotnost enzymu je 15 500 Daltonu. Ph optimum je 7,8, teplotní optimum 40°C, zjevné Km hodnoty pro dopamin a dihydroxyfenylacetaldehyd jsou 1,5 mM a 0,7 mM, respektive syntáza vykazuje vysokou substrátovou specifitu v tom, že jsou transformovány pouze fenylacetaldehydy, ale ne fenylpyruváty. Čištěný enzym neprokázal žádnou zjevnou závislost na kofaktorech. Prostřednictvím izoelektrické fokusace a gelové elektroforézy byl získán důkaz o existenci čtyř izoenzymů norlaudanosolin syntázy, z nichž žádný nekatalyzuje reakci s 3,4-dopamin dihydroxyfenylpyruvát<sup>94</sup>.

Tyto 4 formy norlaudanosolin syntázy lze jasne rozlišit během chromatografie na sloupcích hydroxyapatitu<sup>94</sup>.

Syntáza se vyskytuje v mnoha bunecných kulturách *Papaveraceae*, *Berberidaceae*, a *Ranunculaceae*<sup>95</sup>. Dále byla také zjištěna v řadě různých rostlin stejných rodin, které byly testovány na výskyt tohoto enzymu, mezi nimi *Papaver somniferum*. Avšak i v případě *P. somniferum* byla nalezena pouze aktivita s fenylacetaldehydy a ne fenylpyruváty. Jak již bylo uvedeno, enzymová aktivita zcela chybí v druzích, které neobsahují isochinolinové alkaloidy, jako je *Nicotiana*, *Catharanthus*, nebo *Daucus*. Je prokázáno, že tento enzym je přítomen a pracuje pouze v určitých rostlinách obsahujících benzyloisochinolinové jádro<sup>95</sup>.

### 3.4. Alzheimerova choroba

Podrobný popis této nemoci, společně s možnostmi terapie a hledáním nových potencionálních látek využitelných v terapii je možné nalézt v mé diplomové práci z roku 2011 vypracované na stejném pracovišti pod vedením stejného školitele<sup>88</sup>. Z tohoto důvodu se na tomto místě zmíním pouze o významu a potencionálním využití prolyloloigopeptidázy v terapii Alzheimerovy nemoci vzhledem ke skutečnosti, že mnou izolované látky byly také testovány na inhibici tohoto enzymu.

#### Inhibice prolyloloigopeptidázy

Zajímavým terapeutickým cílem a pomocnou léčbou u pacientu s AD by mohla být inhibice prolyloloigopeptidázy (POP). POP je cytosolová serinová peptidáza, která štěpí malé peptidy obsahující aminokyselinu prolin. Štěpení probíhá na karboxy-konci prolinových zbytků. Substráty tohoto enzymu jsou například substance P, vazopresin a thyrotropin uvolňující hormony, které jsou zapojeny do procesu učení a paměti<sup>96,97</sup>. Tyto neuropeptidy jsou známy jako důležité modulatory kognitivních funkcí a jejich degradace prostřednictvím POP může urychlovat proces stárnutí a případně hrát roli při neurodegenerativních onemocněních<sup>98</sup>. V posledních letech inhibice POP přitahuje pozornost při léčbě schizofrenie, bipolární afektivní poruchy, či kognitivních poruch. Právě ty se vyskytují u pacientů trpících AD. Některé inhibitory POP se ukázaly efektivními léčivy demencí<sup>99,100</sup>, a tudíž by inhibice POP mohla být využita jako podpurná léčba v terapii AD.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 4.1. Všeobecné postupy

### 4.1.1. Destilace a odparování

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

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

### 4.1.2. Chromatografie

#### 4.1.2.1. Tenkovrstvá chromatografie

Chromatografie na tenké vrstvě byla použita v systému N (normálních) komor. Komory byly použity nasycené mobilní fází. V případě užití malých komor (válcových), průměr 10 cm, trvalo sycení asi 30 minut. U klasických komor (18x18 cm) pak asi hodinu. Chromatografie byla prováděna vzestupně.

#### 4.1.2.2. Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie byla prováděna systémem stupnovité eluce na silikagelu FLUKA, 0,063 - 0,2 mm, deaktivovaném 10 % vody. Sloupec byl plněn obvyklým způsobem - nalitím suspenze adsorbentu do rozpouštědla. Vzorek byl po vysušení v exsikatoru nanesen na rozteru s malým množstvím silikagelu.

## 4.2. Materiál a vybavení

### 4.2.1. Rozpouštědla a chemikálie pro izolaci alkaloidu v čisté formě

#### Rozpouštědla:

Benzin, p.a., PENTA

Cyklohexan, p.a., PENTA, (cHx)  
Diethylamin, p.a., Lachner, (Et<sub>2</sub>NH)  
Ethanol 95%, denaturovaný methanolem, p.a., (EtOH)  
n-hexan, p.a., PENTA (nHx)  
Chloroform, p.a., PENTA, (CHCl<sub>3</sub>)  
Methanol, p.a., PENTA (MeOH)  
Toluen, p.a., PENTA, (To)

#### Chemikálie:

Dusičnan bismutitý zásaditý, p.a., (RNDr. Jan Kulich, s.r.o.)  
Jodid draselný, p.a., PENTA  
Kyselina vinná, p.a., (RNDr. Jan Kulich, s.r.o.)

Všechna vodná rozpouštědla a roztoky kyselin a bazí jsou uváděny v hmotnostních procentech (m/m).

#### 4.2.2. Detekční činidla

D 1: Dragendorffovo činidlo modifikované podle Muniera<sup>101</sup>

- pro alkaloidy a další sloučeniny obsahující dusík.
- roztok A: se připraví rozpuštěním 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody.
- roztok B: se připraví rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody
- zásobní roztok: se připraví smísením roztoku A a B v poměru 1:1. Muže být uložen několik měsíců v lednici.
- činidlo pro analýzu: se připraví tak, že se k roztoku 5 ml kyseliny vinné rozpuštěné v 50 ml vody přidá 5 ml zásobního roztoku.

#### 4.2.3. Chromatografické adsorbenty

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

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

A 2: Oxid hlinitý neutrální, 0,1 - 0,2 mm (40/250 - hrubší) desaktivovaný 5 % H<sub>2</sub>O

A 3: Silikagel FLUKA, 0,063 - 0,2 mm

Komerční adsorbent, zrnitosti 0,063 - 0,2 mm, se na suchém sloupci promyje nejprve chloroformem poté destilovaným ethanolem. Po vyjmutí ze sloupce se vycištěný adsorbent suší několik dní na bezprašném místě. Po vytekání rozpouštědel se aktivuje na tenké vrstve (do 2 cm výšky) 4 hodiny při 160 °C. Po zchladnutí na 80 °C se adjustuje do dobře uzavíratelných lahví.

Tento plně aktivní adsorbent se desaktivuje přidávkem 10 % vody (ekvilibrace 1 hodinu při rotaci).

#### 4.2.4. Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S 1 : cHx+Et<sub>2</sub>NH 95:5

S 2 : cHx+Et<sub>2</sub>NH 9:1

S 3 : To+CHCl<sub>3</sub>+EtOH+Et<sub>2</sub>NH 77:20:3:3

S 4 : To+CHCl<sub>3</sub>+EtOH+Et<sub>2</sub>NH 75:20:5:3

S 5 : To+CHCl<sub>3</sub>+EtOH+Et<sub>2</sub>NH 70:20:10:3

#### 4.2.5. Chemikálie a materiál pro stanovení inhibiční aktivity alkaloidu vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE

##### Chemikálie:

10 mM acetylthiocholin jodid, (Sigma-Adrich)

10 mM butyrylthiocholin jodid, (Sigma-Adrich)

Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a. (Lachema)

Dimethylsulfoxid, (Sigma-Adrich)

5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina, = 98% (Sigma-Aldrich)

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, p.a. (Lachema)

0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4

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

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



### Materiál:

Jako zdroj acetylcholinesterázy byl použit hemolyzát lidských erytrocytu:

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

Zdrojem butyrylcholinesterázy byla lidská plazma.

Jednorázové semimikro-polystyrenové kyvety 1,5 ml PLASTIBRAND®.

#### 4.2.6. Chemikálie a materiál ke stanovení antioxidantní aktivity

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

Kvercetin

Trolox

#### 4.2.7. Chemikálie a materiál pro stanovení inhibiční aktivity alkaloidu vůči POP

##### Solný fosfátový pufr (SFP):

- při přípravě pufru bylo naváženo toto množství bezvodých solí: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g KHPO<sub>4</sub> do 1 l kádinky. Poté bylo přidáno 950 ml H<sub>2</sub>O a změřeno pH roztoku, které bylo 7,4. Roztok byl převeden do 1 l odměrné banky a doplněn vodou po rysku.

##### Roztok propyloligopeptidáza (POP)

- obsah lahvičky komerčně dostupného preparátu enzymu má výrobcem deklarovanou aktivitu =200 U (1 U enzymu dle specifikace přemění 1,0 pM/min. substrátu Ala-Pro-aminomethylkumarinu při pH 7,4 a teplotě 25 °C). Enzym byl v lahvičce narezen 100 µl SFP s obsahem 0,1 % albuminu. Albumin se přidával kvůli stabilizaci enzymu. Objem byl postupně doplněn za promíchávání až do celkového objemu 1 ml. Nespotebovaný enzym se z důvodu nízké stability uchovával při -70 °C. Při použití zamraženého enzymu se vždy provedla kontrola aktivity a před vlastním měřením se upravil objem s pomocí výše uvedeného pufru pro dosažení požadované aktivity.

#### Substrát 5 mM Z-Gly-Pro-p-nitroanilid

- roztok substrátu se připravil navážením 0,952 mg Z-Gly-Pro-p-nitroanilidu a rozpuštěním v 2 ml 1,4-dioxanu. Vždy bylo nutné zmerit absorbanci roztoku (1,4-dioxan zvyšuje absorbanci) a porovnat ji s kontrolním vzorkem. Roztok se vždy připravil cerstvý.

#### 4.2.8. Přístroje použité při stanovování biologických vlastností izolovaných látek

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

pH metr ? 72 METER (Beckmann, USA)

Spektrofotometr UV-1601 CE SHIMADZU

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

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

CMA-Z prutoková cela (1- cm délka)

Váhy Mettler Toledo AB204-S (Mettler Toledo)

Ultrazvuková lázeň Sonorexdigital 10P (BandelinElectronic)

Trepacka mikrodestiček BIOSAN OS-10 (Biotech a.s.)

Sušárna Venticell 55 (BMT a.s.)

Vertex LABdancer IP 40 (IKA a.s.)

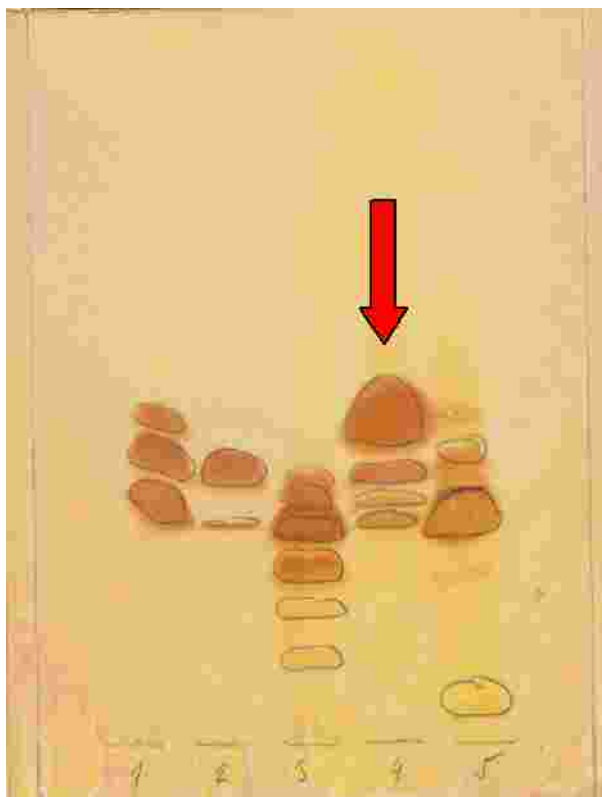
Analyzátor automatický mikrodestičkový reader EL800 (Biotek Instruments, INC.)

#### 4.3. Postup extrakce alkaloidu z *Eschscholtzia californica* Cham.

##### 4.3.1. Příprava extraktu a jeho čištění

Příprava extraktu a jeho čištění nebylo součástí této rigorózní práce. Byla provedena Jakubem Doležalem a její podrobný popis je uveden v jeho diplomové práci<sup>19</sup>.

V rámci mé diplomové a rigorózní práce byl zpracován výtreppek nefenolických alkaloidu z chloridu rozpustných v chloroformu.



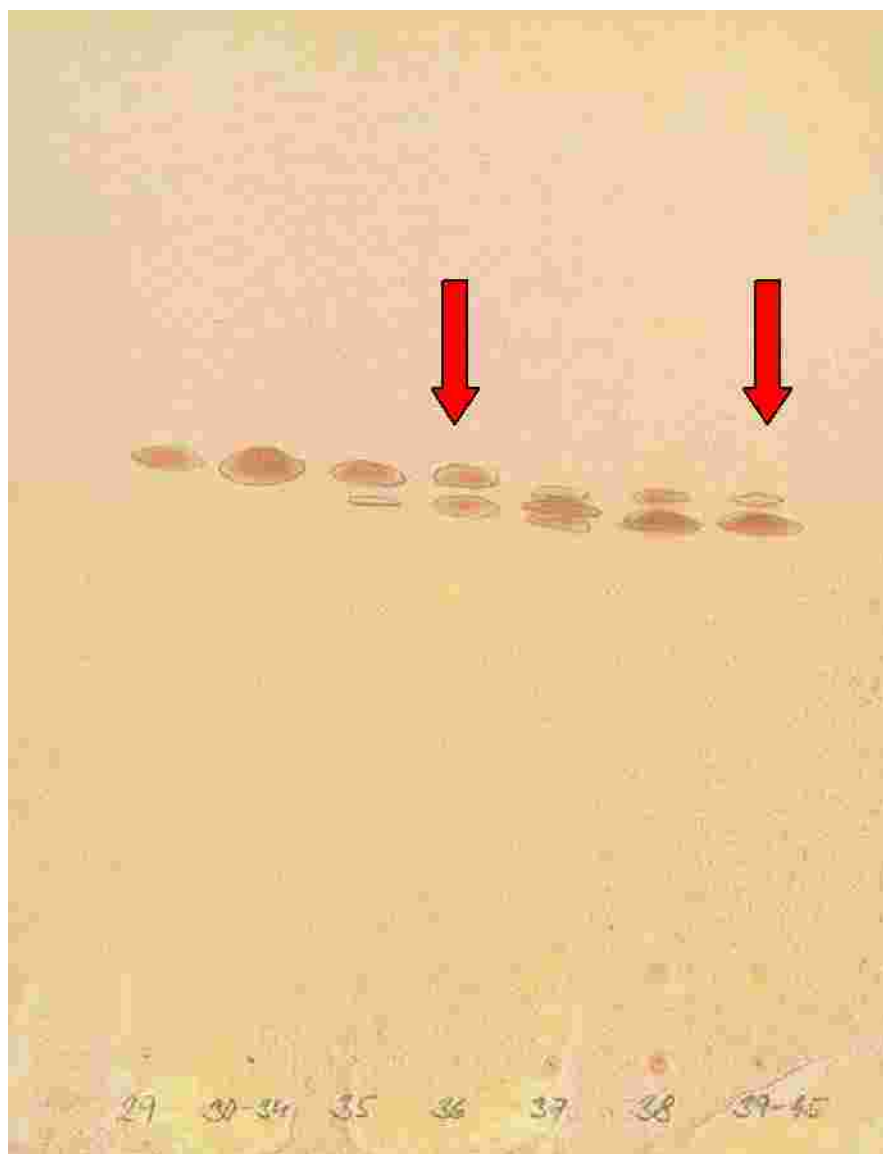
Obr. 9: *E. californica* nat , výtrepek A (popis viz Tab. IX)  
 (Pozn.: Kieselgel UV 254 Merck, 10 cm (dráha 8,5 cm),  
 $C_6H_5CH_3+CHCl_3+EtOH+Et_2NH = 70:20:10:3$ ; komora nasycená, vyvíjení 1×,  
 detekce D1)<sup>19</sup>.

Tab. IX: Popis k obrázku c. 9<sup>19</sup>

Sloupec	Typ soli alkaloidu
1	chloridy nerozpustné v chloroformu, nefenolické
2	krystaly (0/005) z chloridu nerozpustných v chloroformu, nefenolických
3	chloridy nerozpustné v chloroformu, fenolické
4	chloridy rozpustné v chloroformu, nefenolické
5	chloridy rozpustné v chloroformu, fenolické

V mé diplomové práci byla zpracována spojená frakce 30-34 a z ní byl izolován alkaloid escholtzin<sup>88</sup>.

Pro rigorózní práci byla vybrána frakce 36 a spojené frakce 39 - 45. Ostatní frakce byly uloženy pod inertní atmosférou k případnému dalšímu zpracování.



Obr. 10: *E. californica* nat, Nefenolické alkaloidy z chloridu rozpustných  
v chloroformu (popis viz Tab. X)

(Pozn.: Kieselgel UV 254 Merck, 10 cm (dráha 8,5 cm),  
 $C_6H_5CH_3+CHCl_3+EtOH+Et_2NH = 77:20:3:3$ ; komora nasycená, vyvíjení 3×,  
 detekce D1).

Tab. X: Výsledky sloupcové chromatografie matečného louhu

Spoj. fr.	Frakce	Eluční systém	Popis	Hmotnost
1 - 28	1 - 24	CHCl <sub>3</sub>	Nepoužito	0,00 g
	25 - 28	CHCl <sub>3</sub> + 2 % EtOH		
29	29	CHCl <sub>3</sub> + 3 % EtOH	Žlutý, velmi viskózní	0,14 g
30-34	30-34	CHCl <sub>3</sub> + 3 % EtOH	Žlutý, velmi viskózní	5,82 g
35	35	CHCl <sub>3</sub> + 3 % EtOH	Žlutý, velmi viskózní	2,72 g
36	36	CHCl <sub>3</sub> + 3 % EtOH	Žlutý, velmi viskózní, s krystaly	1,57 g
37	37	CHCl <sub>3</sub> + 3 % EtOH	Žlutý, velmi viskózní	0,29 g
38	38	CHCl <sub>3</sub> + 3 % EtOH	Žlutý, velmi viskózní	0,17 g
39	39	CHCl <sub>3</sub> + 3 % EtOH	Žlutý, velmi viskózní	0,10 g
40	40	CHCl <sub>3</sub> + 3 % EtOH	Žlutý, velmi viskózní	0,03 g
41-45	41-45	CHCl <sub>3</sub> + 3 % EtOH	Žlutý, velmi viskózní	0,07 g

#### 4.3.2. Zpracování frakce 36

1,37 g žluté viskózní směsi bylo rozpuštěno v chloroformu. Po přidání hexanu se vysrážely krystaly, které ale nereagovaly s Dragendorfovým činidlem. S největší pravděpodobností se nejednalo o alkaloidy. Krystaly byly odfiltrovány a zbytek frakce byl zahuštěn za vzniku peny o hmotnosti 0,77 g. Pro rozdělení alkaloidu byla vybrána sloupcová chromatografie. Frakce byla rozpuštěna v chloroformu a chromatografována na sloupci s adsorbentem A2. Frakce, které obsahovaly shodné alkaloidy byly na základě tenkovrstvé chromatografie spojeny. Výsledky chromatografie jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. XI).

Izolované látky byly podrobeny spektroskopickým studiím (IR, MS, NMR) za účelem stanovení jejich struktury. Dále byl proveden screening biologických vlastností a stanovena specifická optická otáčivost  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ .

Tab. XI: Výsledky sloupcové chromatografie frakce 36

Hmotnost vzorku (g)	Hmotnost adsorbentu (g)	Eluční systém	Odparek	Oznacení
0,77	254	Benzin + Chloroform	0,1566 g	ZH2
			0,450 g	Fr.36

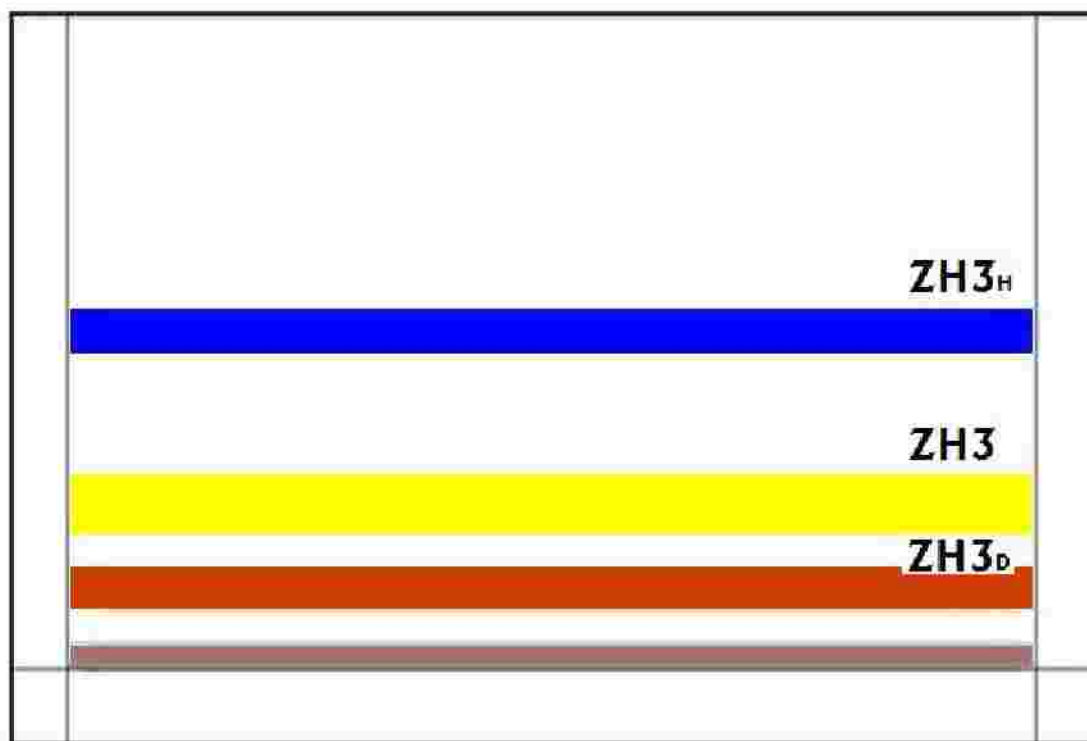
(pozn. ZH2 je čistý O-methylkaryachin, Fr.36 smes escholtzin + O-methylkaryachin)

#### 4.3.3. Zpracování spojených frakcí 39-45

K získání čistých alkaloidu byla využita preparativní tenkovrstvá chromatografie za použití mobilní fáze S1.

Frakce byla rozpuštěna v 10 ml chloroformu a po 1 ml nanesena na desky Silufol, které byly precištené ethanolem. Desky byly vyvinuty celkem petkrát. Na základe UV detekce byly oznaceny tri zóny, které obsahovaly alkaloidy. Jednotlivé zóny byly izolovány společne s adsorbentem z chromatografických desek. Adsorbent byl promyt chloroformem a zahuštený filtrát byl poté filtrován pres 2cm vrstvu  $Al_2O_3$  neutralizovaným 6 % vody. Byly získány tri podfrakce oznacené jako ZH3 (78,8 mg), ZH3<sub>H</sub> (2,1 mg), ZH3<sub>D</sub> (19,8 mg).

Izolované látky byly podrobeny spektroskopickým studiím za účelem jejich identifikace.



Obr. 11: Preparativní TLC frakcí 39-45 (Pozn.: Kieselgel UV 254 Merck, 10 cm (dráha 8,5 cm), cHx+Et<sub>2</sub>NH = 95:5; komora nasycená, vyvíjení 5×, detekce D1).

#### 4.4. Určení struktury izolované látky

##### 4.4.1. Měření hmotnostního spektra

Identifikace alkaloidu z rostliny *Eschscholtzia californica* byla provedena na přístroji Agilent 7890 GC/MSD 5975 v režimu EI 70 eV. Byla použita kolona typu DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm, Agilent Technologies, USA). Teplotní režim byl 100-180°C s nárůstem 15°C/min, 1 min na 180°C, 180-300°C při 5°C/min a po dobu 5 min na 300°C, škála detekce m/z 40-600. Teplota při nanesení byla 280°C. Průtok nosného plynu (helium) byl 0,8 ml/min.

##### 4.4.2. Měření NMR spektra

Spektra byla měřena na spektrometru Varian Inova 500 s pracovní frekvencí 499,9 MHz pro <sup>1</sup>H a 125,7 MHz pro <sup>13</sup>C jádra. <sup>13</sup>C NMR spektra byla měřena v 5 mm

SW širokopásmové sonde,  $^1\text{H}$  a všechna 2D spektra v inverzní 5mm ID PFG sonde s využitím standardních pulzních sekvencí. Experimenty byly měřeny v deuteriochloroformu při 25 °C.

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

#### 4.5. Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vuci erythrocytární AChE a sérové BuChE

##### 4.5.1. Podmínky měření

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek:

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

##### 4.5.2. Příprava erythrocytárních pouzder

Erythrocytární pouzdra byla připravena z čerstvé odebrané krve, ke které byl přidán 1 ml citrátu sodného na 10 ml krve podle lehce upravené metody Stecka a Kanta<sup>102</sup>. Plazma (HuBuChE) byla odstraněna z plné krve centrifugací při rychlosti 4000 ot./min. za použití centrifugy Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Erythrocyty byly přemístěny do 50 ml zkumavek a trikrát promyty 5 mM fosfátovým pufrům (pH 7,4) obsahujícím 150 mM chloridu sodného (12 000 ot./min., Avanti J-301, rotor JA-30,50). Promyté erythrocyty byly míchány s 5 mM fosfátovým pufrům (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 trikrát promyta fosfátovým pufrům.



#### 4.5.3. Stanovení inhibiční aktivity alkaloidu vůči AChE a BuChE

Pro stanovení hodnoty  $IC_{50}$  byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Jako substráty se používají estery thiocholinu, které jsou cholinesterázami štepeny 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 absorpance za 1 minutu. Hodnoty  $IC_{50}$  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  $IC_{50}$  známých inhibitorů cholinesteráz: galathaminem ( $IC_{50} \text{ HuAChE} = 1,71 \pm 0,07 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50} \text{ HuBuChE} = 42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$ ), huprezinem A ( $IC_{50} \text{ HuAChE} = 0,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50} \text{ HuBuChE} > 1000 \mu\text{M}$ ), eserinem  $IC_{50} \text{ HuAChE} = 0,063 \pm 0,001 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50} \text{ HuBuChE} = 0,130 \pm 0,004 \mu\text{M}$ . % I (inhibice) byla vypočítána dle vzorce

$$\% I = 100 - (A_{BL} / A_{SA}) * 100,$$

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

#### 4.5.4. Stanovení antioxidantní aktivity získaných alkaloidů

Antioxidantní aktivita byla testována *in vitro* DPPH testem. Metoda je založena na reakci stabilního 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH) se vzorkem. Snížení absorpance DPPH měřené při 525 nm je závislé na koncentraci antioxidantu ve sledovaném vzorku. Byly použity FIALab pro Windows software, FIALab 3000 analyser (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA), 2,5-ml syringe pump, USB2000-UV/VIS spektrofotometr se zdrojem světla LS-1 (Ocean Optics, USA) a SMA-Z prutoková cela (1-cm délka). Antiradikálová aktivita vzorku byla vyjádřena jako 50% účinná koncentrace ( $EC_{50}$ ), která byla vypočítána pomocí programu GraphPad Prism 3,02, a byla porovnána se známými antioxidanty: kvercetinem  $EC_{50} = 25,3 \mu\text{M}$  a troloxem  $EC_{50} = 27,8 \mu\text{M}^{90}$ .

#### 4.5.5. Stanovení inhibiční aktivity izolovaných látek vůči prolyloligopeptidáze

Před samotným měřením vzorku byla u každého z nich připravena, ze zásobního roztoku ředěním s pomocí DMSO nebo H<sub>2</sub>O, koncentracní řada 10<sup>-1</sup> až 10<sup>-5</sup> M.

Do 96 jamkové mikrotitrací destičky se napipetovalo 170 μl 0,01 M SFP a 5 μl testované látky dané koncentrace (koncentracní škála). Obsah jamky byl promíchán trepackou vertex LABdancer IP40. Dále se přidalo 5 μl enzymu (3U/ml), opět se promíchalo pomocí vertex LABdancer a 5 minut se inhibovalo na trepacce mikrodestiček BIOSAN OS-10. Následně se přidalo 20 μl 5 mM substrátu Z-Gly-Pro-p-nitroanilidu. Objem reakční směsi byl 200 μl.

Mikrotitrací destička byla vložena s reakční směsí na 30 min. při teplotě 37 °C do inkubátoru (sušárny).

Po 30 min. byla mikrotitrací destička vytažena a změna aktivity POP s pomocí ELISA readeru při vlnové délce 405 nm.

Naměřené hodnoty se zaznamenaly v programu Microsoft Excel a pomocí programu GraphPadPrism se vypočítaly hodnoty IC<sub>50</sub>.

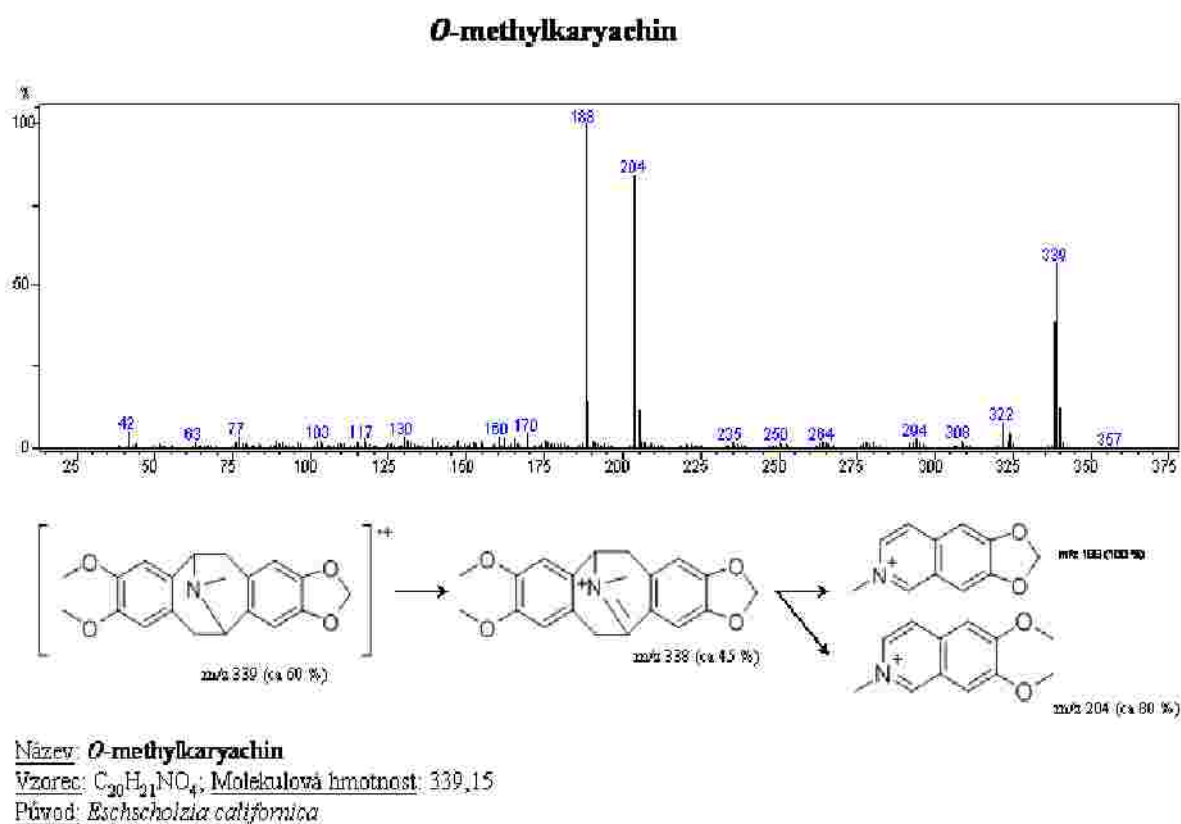
Stejným způsobem byla měřena aktivita čistého enzymu. Přidaný objem inhibitoru se nahradil pufrům. Dál se proměřil kontrolní vzorek testované látky bez enzymu a slepý pokus pufru se substrátem. Jako referenční standardní inhibitor se použil Z-proprinal.

## 5. VÝSLEDKY

## 5.1. Strukturní analýza *O*-methylkaryachinu

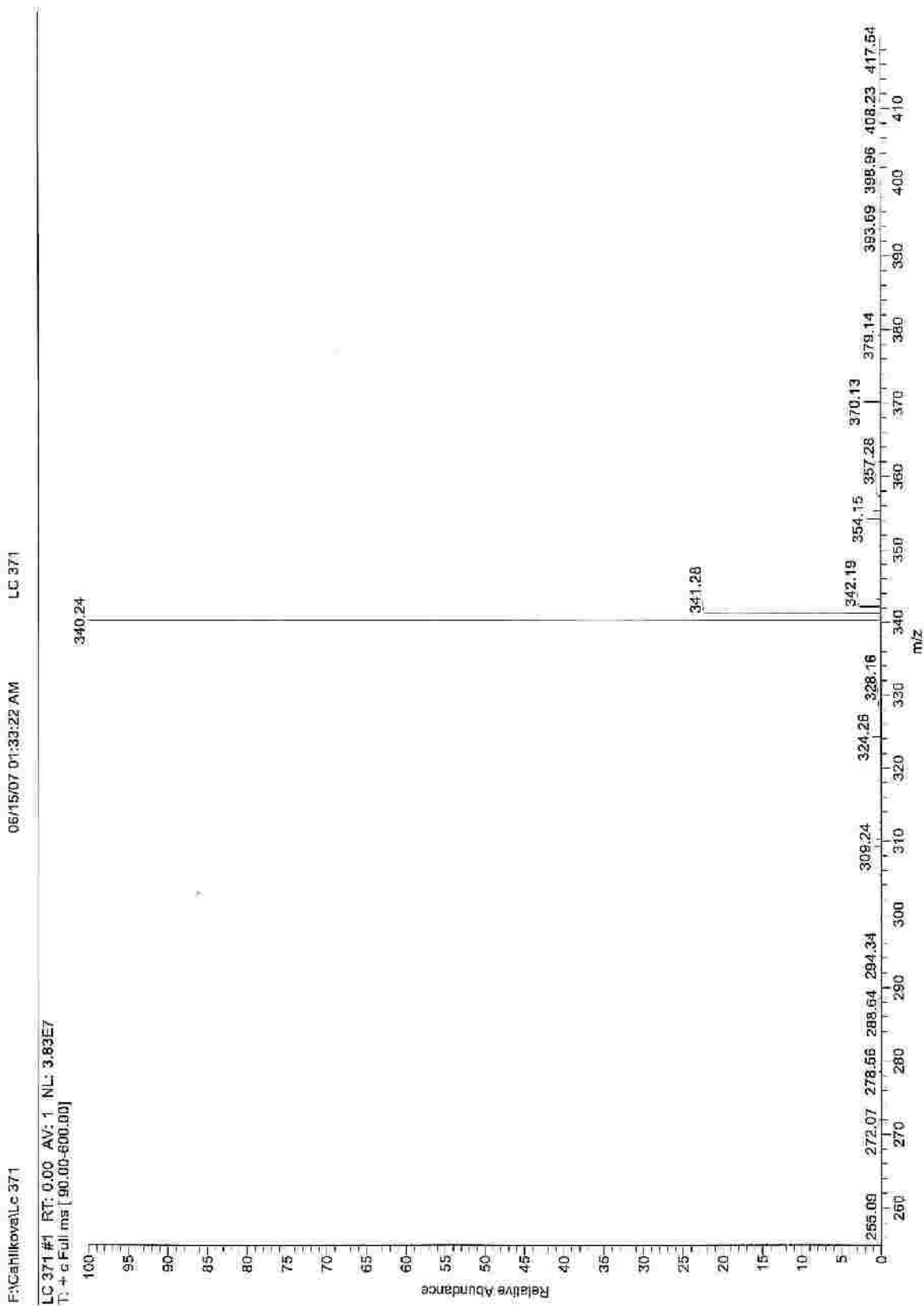
Na základě MS a NMR studií a porovnání dat s literaturou byly izolované látky identifikovány jako *O*-methylkaryachin<sup>103,104</sup> a argemonin<sup>105,106</sup>.

### 5.1.1. MS studie *O*-methylkaryachinu

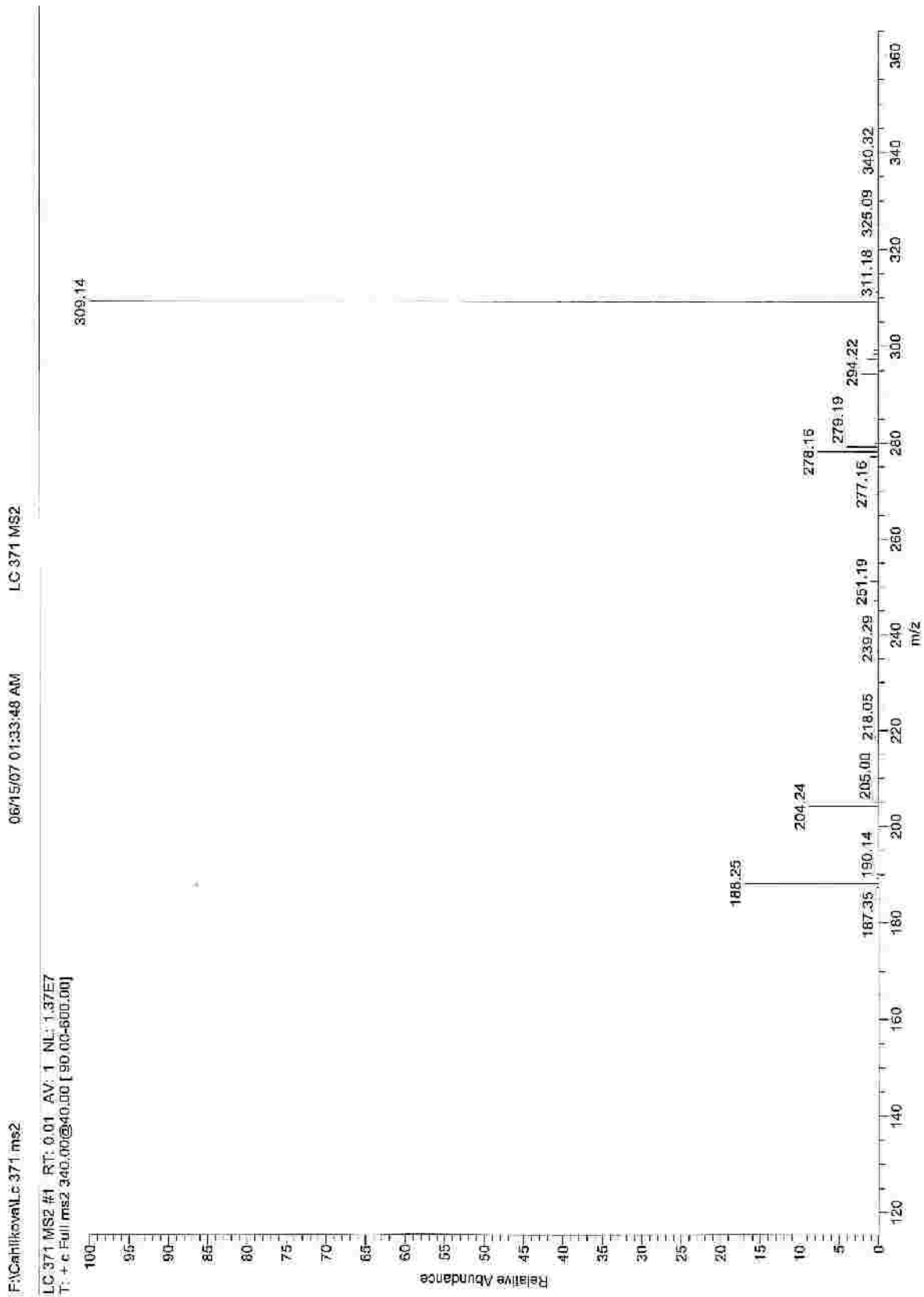


Obr. 12: EI-MS spektrum *O*-methylkaryachinu

ESI-MS m/z 324,2 [M+H]<sup>+</sup> (100). MS2 m/z 293,1 (100), 263,1 (8), 235,1 (7), 188,2 (27) (viz. Obr. 13 a 14).



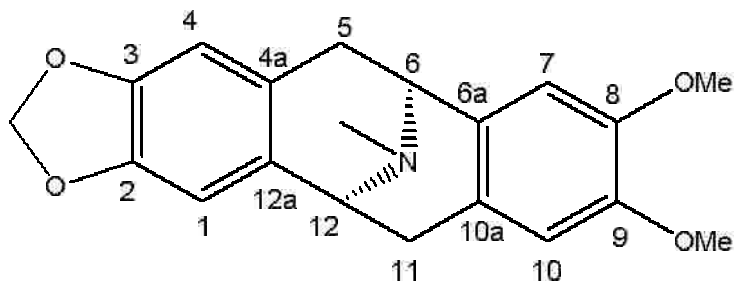
Obr. 13: MS spektrum O-methylkaryachinu (ESI-elektrosprej)



Obr. 14: MS2 spektrum O-methylkaryachinu (ESI-elektrosprej)

### 5.1.2. NMR studie *O*-methylkaryachinu

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

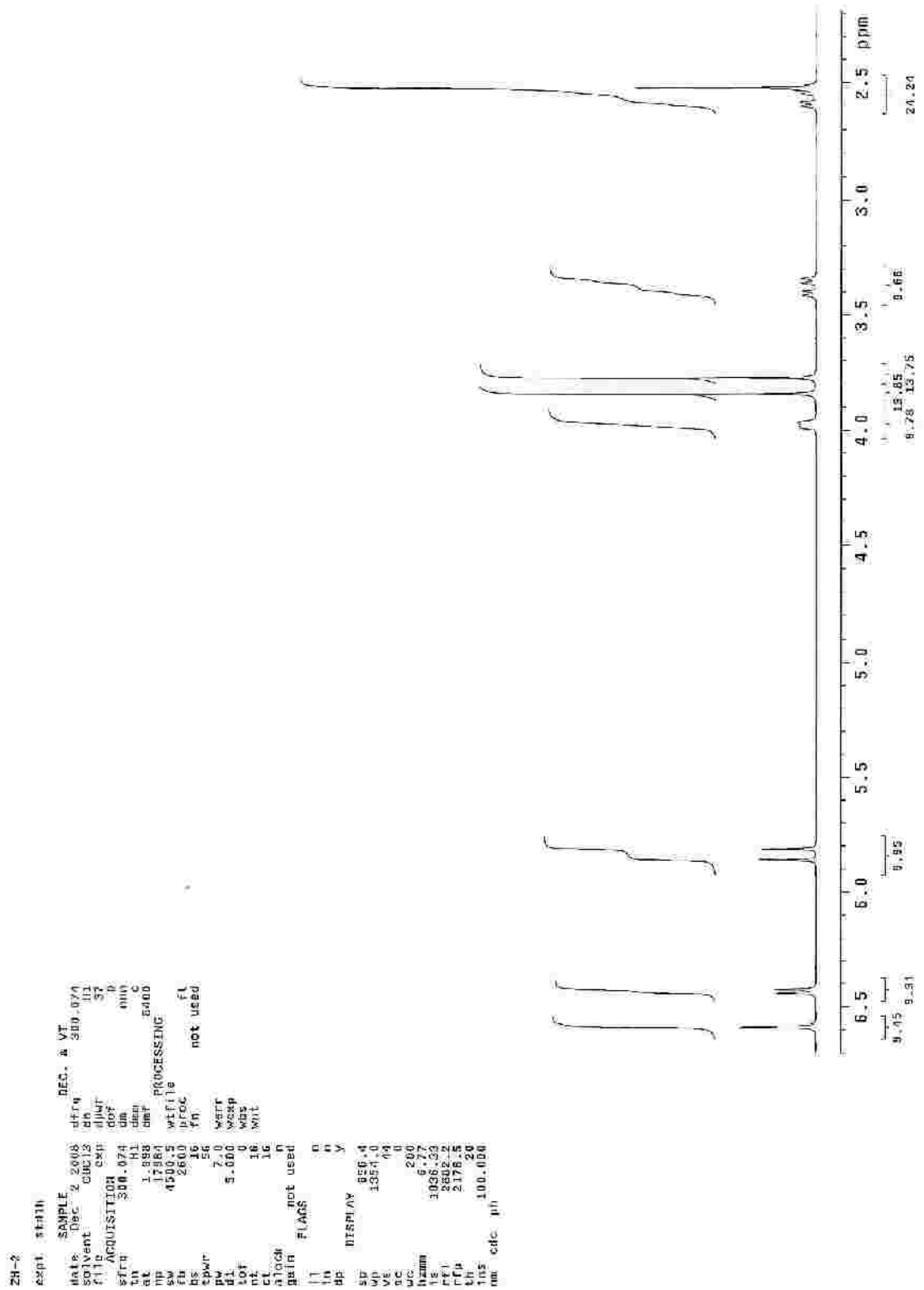


Obr. 15: Struktura *O*-methylkaryachinu

#### 5.1.2.1. $^1\text{H}$ -NMR spektrum *O*-methylkaryachinu

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

2,52 s, N- $\text{CH}_3$ ; 2,55 d, H-5 $\beta$ , ( $^3J_{\text{H}}=15,8$  Hz); 2,6 d, H-11 $\beta$ , ( $^3J_{\text{H}}=16,2$  Hz); 3,35 d, H-11 $\alpha$ ; 3,4 d, ( $^3J_{\text{H}}=15,8$  Hz); 3,78 s, 9- $\text{OCH}_3$ ; 3,85 s, 8- $\text{OCH}_3$ ; 3,98 d, H-6, ( $^3J_{\text{H}}=12,5$  Hz); 8,82-8,88 d, 2,3- $\text{OCH}_2\text{-O}$ ; 6,42 s, H-4; 6,6 s, H-1.



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



5.1.2.2.  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrum *O*-methylkaryachinu

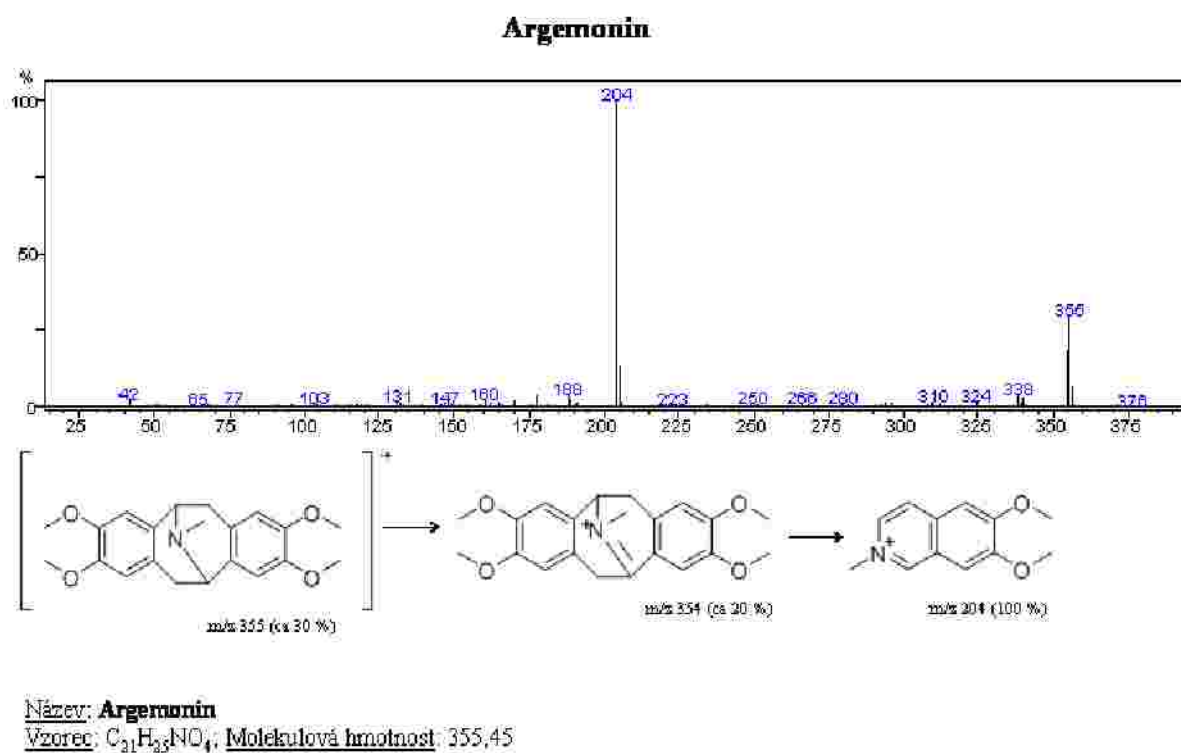
$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ ):

33,42; 34,14; 40,85; 55,67; 55,91; 56,26; 56,77; 76,58; 77,00; 77,42; 100,53; 106,98;  
108,66; 109,93; 111,38; 123,78; 125,03; 129,77; 131,14; 145,89; 146,45; 147,45;  
147,80.



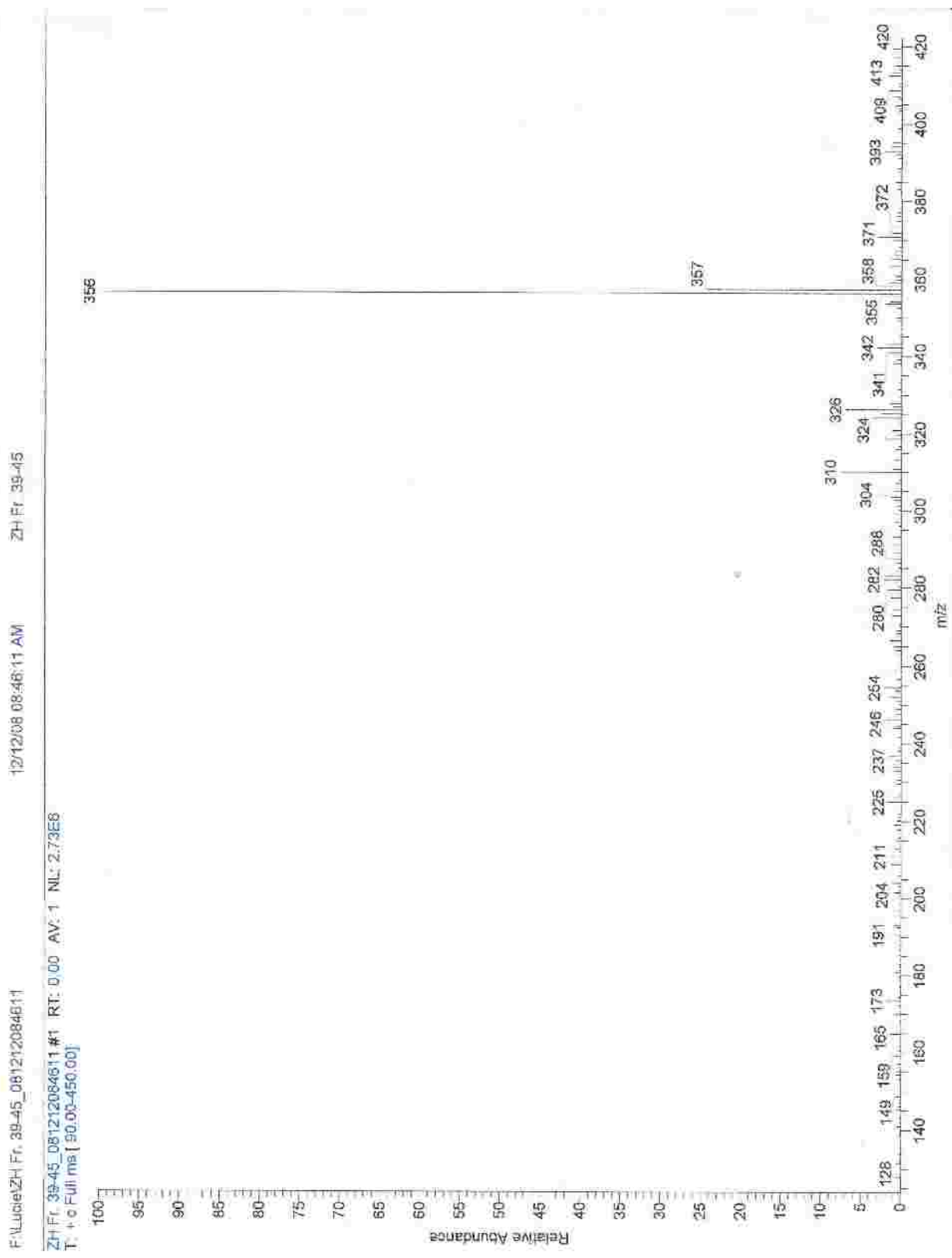
## 5.2. Strukturní analýza argemoninu

### 5.2.1. MS studie argemoninu



Obr. 18: EI-MS spektrum argemoninu

ESI-MS  $m/z$  324,2  $[M+H]^+$  (100); MS2  $m/z$  293,1 (100), 263,1 (8), 235,1 (7), 188,2 (27) (viz. Obr. 19 a 20).

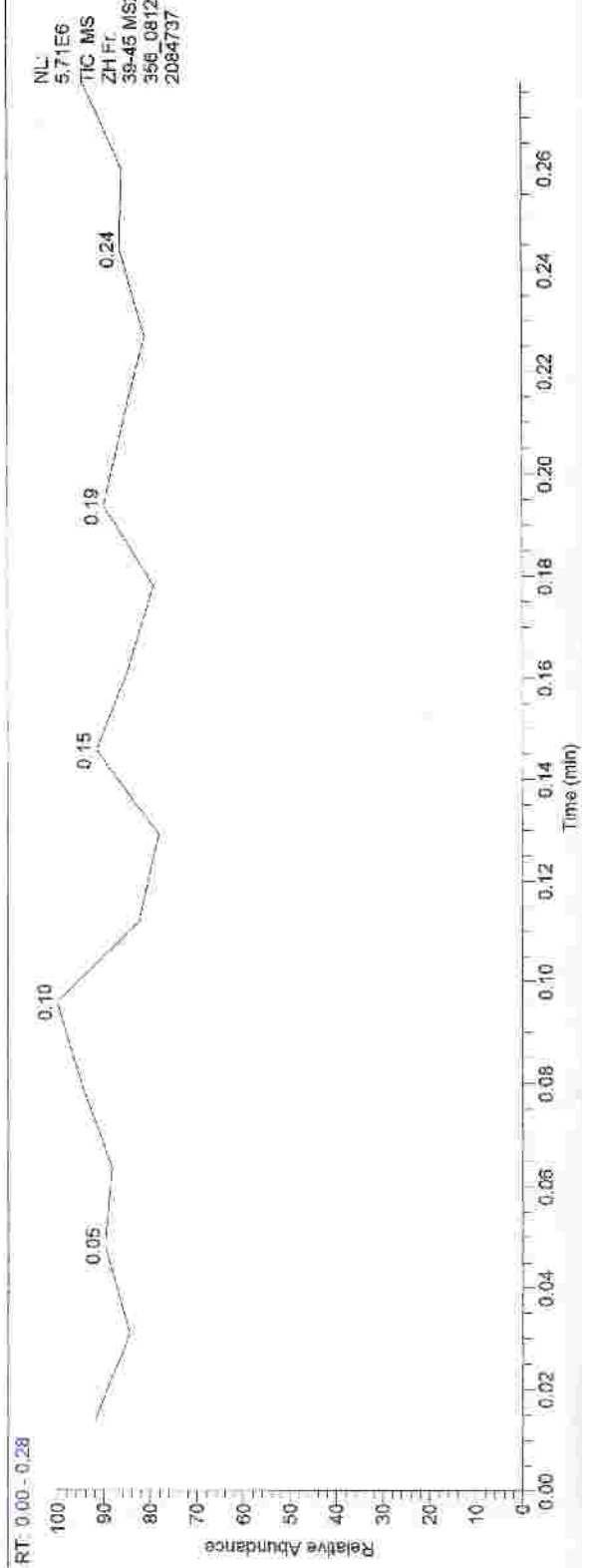
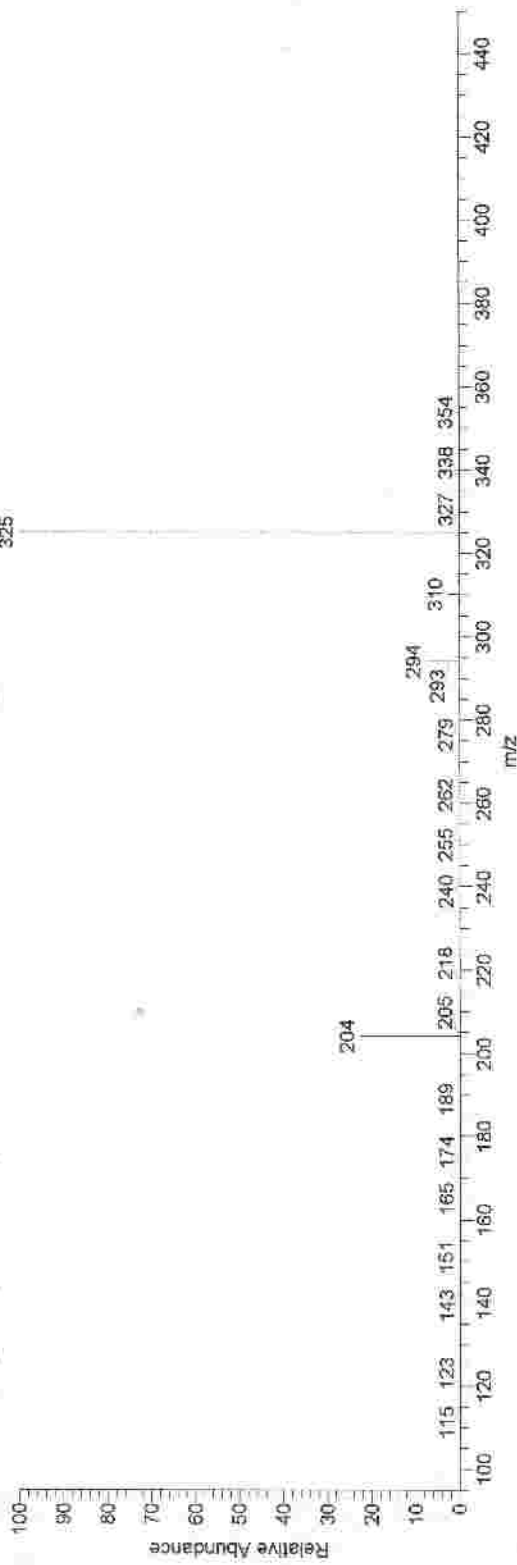


Obr. 19: MS spektrum argemoninu

ZH Fr. 39-45 MS2 356\_081212084737 12/12/08 08:47:37 AM ZH Fr. 39-45 MS2 356

ZH Fr. 39-45 MS2 356\_081212084737 #2-15 RT: 0.03-0.24 AV: 14 NL: 3.55E8

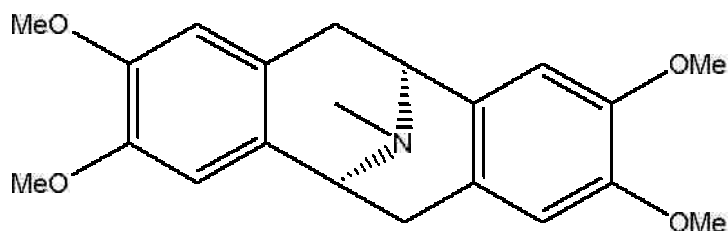
T: + c Full ms2 356.00@40.00 [ 95.00-450.00]



Obr. 20: MS2 spektrum argemoninu

## 5.2.2. NMR studie argemoninu

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



Obr. 21: Struktura argemoninu

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

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

6,65 (2H, s, Ar-H); 6,54 a 6,50 (každý 1H, s, Ar-H); 4,65 – 2,58 (6H, m, Al-H); 3,88 a 3,82 (každý 3H, s,  $2 \times \text{OCH}_3$ ); 3,78 (6H, s,  $2 \times \text{OCH}_3$ ) a 3,35 (3H, s,  $\text{NCH}_3$ ); ( $\text{D}_2\text{O}$ ); d: 7,36 (2H, s, Ar-H); 6,79 a 6,68 (každý 1H, s, Ar-H); 5,10 – 3,00 (6H, m, Al-H); 4,28; 4,22; 3,85 a 3,80 (každý 3H, s,  $4 \times \text{OCH}_3$ ) a 3,62 (3H, s,  $\text{NCH}_3$ ).



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

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

147,7 (C-9); 147,3 (C-8); 129,7 (C-6a); 123,7 (C-11a); 111,4 (C-1); 109,9 (C-4); 66,2 (C-6); 55,8 ( $\text{OCH}_3$ -2); 55,4 ( $\text{OCH}_3$ -3); 40,6 ( $\text{NCH}_3$ ) a 33,3 (C-11).





### 5.3. Antioxidacní aktivita

Izolované alkaloidy byly podrobeny testování jejich antioxidantní aktivity. Výsledky této studie jsou uvedeny v následující tabulce (Tab.XII)..

Tab. XII: Antioxidacní aktivita alkaloidu

Látky	EC <sub>50</sub> (μM)
O-methylkaryachin	> 1000
Argemonin	> 1000
Kvercetrin <sup>b</sup>	25,30 ± 1,20
Trolox <sup>b</sup>	27,80 ± 0,80

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

<sup>b</sup> Referenční látka

### 5.4. Výsledky testu vlivu látky na aktivitu AChE a BuChE

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

Tab. XIII: In vitro inhibiční aktivita izolovaných alkaloidu vůči AChE a BuChE

Látky	IC <sub>50</sub> , (μM) <sup>a</sup> HuAChE	IC <sub>50</sub> , (μM) <sup>a</sup> HuBuChE
O-methylkaryachin	498,00 ± 7,10	>1000
Argemonin	>1000	>1000
Galanthamin <sup>b</sup>	6,90 ± 0,30	156,00 ± 6,90
Huperzin A <sup>b</sup>	0,25 ± 0,01	>1000

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

<sup>b</sup> Referenční látka

## 5.5. Optická otáčivost

O-methylkaryachin  $[\alpha]_D^{25\text{ }^\circ\text{C}} = +225,35^\circ$  (c = 0,213, MeOH)

Argemonin  $[\alpha]_D^{25\text{ }^\circ\text{C}} = +215,00^\circ$  (c = 2,110, EtOH)

## 5.6. Výsledky testu inhibiční aktivity izolovaných látek vůči prolyloligopeptidáze

Tab. XIV: Inhibiční aktivita isochinolinových alkaloidů vůči POP

Látky	POP IC <sub>50</sub> (μM)
O-methylkaryachin	>1000
Argemonin	337,20 ± 23,40
Z-prolyl-prolinal <sup>a</sup>	2,75 x 10 <sup>-3</sup>

<sup>a</sup> Referenční látka

## 6. DISK UZE

Tato experimentální rigorózní práce navazuje na vlastní diplomovou práci z roku 2011<sup>88</sup>, v rámci které byl z rostliny *Eschscholtzia californica* z frakce alkaloidu nefenolických z chloridu rozpustných v chloroformu izolován alkaloid escholtzin. U escholtzinu byly provedeny studie inhibiční aktivity vůči humánní erytrocytární AChE a sérové BuChE. Hodnoty  $IC_{50}$  escholtzinu byly výrazně vyšší, nežli hodnoty  $IC_{50}$  použitých standardů. Na základě získaných hodnot  $IC_{50}$  nebylo možné považovat escholtzin za látku potenciálně využitelnou v terapii Alzheimerovy nemoci. Tato látka byla také podrobena antioxidantní studii, za využití DPPH testu, ale výsledky ukázaly, že tato látka nevykazuje žádnou antioxidantní aktivitu.

Úkolem předložené práce bylo pokračovat ve zpracování frakce alkaloidu nefenolických z chloridu rozpustných v chloroformu. Byly vybrány frakce 36 a 39-45. Z frakce 36 bylo za využití sloupcové chromatografie získáno 157 mg čistého alkaloidu označeného ZH2, který byl podroben spektroskopickým studiím za účelem stanovení jeho struktury. Izolovaná látka byla na základě MS a NMR studií identifikována jako O-methylkaryachin. O-methylkaryachin je pavinový alkaloid radící se mezi isochinolinové alkaloidy.

Z frakce 39-45 byly za využití preparativní tenkovrstvé chromatografie získány tři podfrakce alkaloidu označené jako ZH3 (78,8 mg), ZH3<sub>H</sub> (2,1 mg), ZH3<sub>D</sub> (19,8 mg). Izolovaná látka označená jako ZH3 byla identifikována jako argemonin. Zbylé dva alkaloidy byly uschovány pro případné další zpracování. Argemonin patří také do skupiny pavinových isochinolinových alkaloidů.

Oba izolované alkaloidy byly podrobeny studii na inhibiční aktivitu vůči humánní erytrocytární AChE a sérové BuChE. Použita byla Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Získané hodnoty  $IC_{50}$  O-methylkaryachinu byly pro AChE  $498,00 \pm 7,10 \mu\text{M}$  a pro BuChE byla hodnota vyšší než  $1000 \mu\text{M}$ . Hodnoty  $IC_{50}$  argemoninu byly pro AChE i pro BuChE vyšší než  $1000 \mu\text{M}$ . Získané hodnoty byly výrazně vyšší, nežli hodnoty  $IC_{50}$  standardů (galanthaminu, eserinu). Na základě získaných hodnot  $IC_{50}$  nelze izolované látky považovat za potencionální AChE či BuChE inhibitory.

Vzhledem k tomu, že významnou roli v etiologii této choroby hraje i oxidací stres, byly tyto látky podrobeny také antioxidantní studii, za využití DPPH testu. Stanovená hodnota  $EC_{50}$  byla u obou alkaloidů větší než  $1000 \mu\text{M}$ , z toho plyne, že tyto látky nevykazují žádnou antioxidantní aktivitu.

V rámci této rigorózní práce byla také testována inhibiční aktivita izolovaných látek vuci prolyloligopeptidáze. Hodnota POP IC<sub>50</sub> O-methylkaryachinu byla vyšší než 1000 μM a hodnota POP IC<sub>50</sub> argemoninu byla 337,20 ± 23,40 μM. V porovnání se standardy, zejména se standardem baikalinu, vykázal argemonin zajímavou aktivitu vuci POP. U O-methylkaryachinu nebyla aktivita vuci POP prokázána.

## 7. SEZNAM ZK RATEK

AChE	acetylcholinesteráza
AD	Alzheimerova nemoc
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	oxid hlinitý
AMK	aminokyselina
APP	prekurzory amyloidního proteinu
BuChE	butyrylcholinesteráza
cf.	confer = porovnat
DMSO	dimethylsulfoxid
DPPH	2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny
EC <sub>50</sub>	střední účinná (efektivní) koncentrace
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HuAChE	lidská acetylcholinesteráza
HuBuChE	lidská butyrylcholinesteráza
Hup A	huprezin A
IC <sub>50</sub>	inhibiční koncentrace
IR	infracervené záření
KCl	chlorid draselný
KHPO <sub>4</sub>	hydrogenfosforečnan draselný
K <sub>m</sub>	Michaelisova konstanta
LSD	diethylamid kyseliny lysergové
MAOA	monoaminoxidáza A
MAOB	monoaminoxidáza B
MS	hmotnostní spektrometrie
NaCl	chlorid sodný
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	hydrogenfosforečnan sodný
napr.	například
NGF	nervový růstový faktor
NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina
NMR	nukleární magnetická rezonance
obr.	obrázek
POP	prolyloligopeptidáza

ppm	parts per million
SFP	solný fosfátový pufr
sp.	species
subsp.	subspecies
tab.	tabulka
tj.	to je
TLC	tenkovrstvá chromatografie
tzv.	takzvaný
UV	ultrafialové záření



## 8. LITERATURA

- <sup>1</sup> Koukolík F., Jiráček R.: Alzheimerova nemoc a další demence. Grada Publ., Praha 1998.
- <sup>2</sup> Wimo A., Wimblad B., Stoffler A., Wirth Y., Mobius H.J.: The magnitude of dementia - occurrence in the world. *Alz. Dis. Assoc. Disor.* 2003, 17, 63-67.
- <sup>3</sup> An Y., Zhang Ch., He S., Yao Ch., Zhang L., Zhang Q.: Main hypotheses, concepts and theories in the study of Alzheimer's disease. *Life Sci. J.* 2008, 5, 1-5.
- <sup>4</sup> Bush A. I.: The metal theory of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2013, 33 (Suppl. 1), 277-281.
- <sup>5</sup> Yurov Y. B., Vorsanova S. G., Iourov I. Y.: The DNA replication stress hypothesis of Alzheimer's disease. *Sci. World J.* 2011, 11, 2602-2612.
- <sup>6</sup> Robertson I.H.: A noradrenergic theory of cognitive reserve: implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2013, 34, 298-308.
- <sup>7</sup> Webber K.M., Raina A.K., Marlatt M.W., Zhu X., Prat M.I., Morelli L., Casadesus G., Perry G., Smith M.A.: The cell cycle in Alzheimer disease: a unique target for neuropharmacology. *Mech. Ageing Dev.* 2005, 126, 1019-1025.
- <sup>8</sup> Čahlíková L., Macáková K., Benešová N., Chlebek J., Hošťálková A., Opletal L.: Natural compounds (small molecules) as potential and real drugs of Alzheimer's disease: a critical review, *Stud. Nat. Prod. Chem.* 2014, 42, 153-194.
- <sup>9</sup> Zhu D., Wang J., Zheng Q., Zhang Z, Yan R.: A novel endophytic Huperzine A-producing fungus, *Shiraia* sp. Slf14, isolated from *Huperzia serrata*. *J. Appl. Microbiol.* 2010, 109, 1469-1478.
- <sup>10</sup> Geromichalos G. D., Lamari F. N., Papandreou M. A., Trafalis D. T., Margarity M., Papageorgiou A., Sinakos Z.: Saffron as a source of novel acetylcholinesterase inhibitors: molecular docking and in vitro enzymatic studies. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 6131-6138.

- <sup>11</sup> Fisher A.: Cholinergic modulation of amyloid precursor protein processing with emphasis on M1 muscarinic receptor: perspectives and challenges in treatment of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 2012, 120 (Suppl. 1), 22–33.
- <sup>12</sup> Nair J. J., van Staden J.: Acetylcholinesterase inhibition within the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Nat. Prod. Commun.* 2012, 7, 959–962.
- <sup>13</sup> Anand P., Singh B., Singh N.: A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem.* 2012, 20, 1175–1180.
- <sup>14</sup> Uriarte-Pueyo I., Calvo M.I.: Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 2011, 18, 5289–5302.
- <sup>15</sup> Houghton P. J., Ren Y., Howes M. J.: Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat. Prod. Rep.* 2006, 23, 181–199.
- <sup>16</sup> Ellis J. M.: Cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 2005, 105, 145–158.
- <sup>17</sup> Henze T.: Therapy of myasthenia gravis with cholinesterase inhibitors: principles and pharmacologic monitoring. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.* 1996, 64, 110–121.
- <sup>18</sup> Lincová D., Farghali H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vyd. Galén, Praha 2007.
- <sup>19</sup> Doležal J.: Biologická aktivita obsahových látek rostlin VIII. Vliv alkaloidu z různých rostlinných taxonu na acetylcholinesterázu, UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2008. Diplomová práce. 65 s.
- <sup>20</sup> ---: cs.wikibooks.org.: [http://cs.wikibooks.org/wiki/P%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADI%C3%A1tky/Chemie\\_p%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADch\\_1%C3%A1tek/P%C5%99ehled\\_p%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADch\\_1%C3%A1tek/Alkaloidy](http://cs.wikibooks.org/wiki/P%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADI%C3%A1tky/Chemie_p%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADch_1%C3%A1tek/P%C5%99ehled_p%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADch_1%C3%A1tek/Alkaloidy), vystaveno dne 7. 4. 2014.

- <sup>21</sup> ---: biotox.cz.: <http://www.biotox.cz/toxikon/rostliny/alkaloidy.php>, vystaveno dne 7. 4. 2014.
- <sup>22</sup> ---: apps.faf.cuni.cz/daidalea/: <http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/>, vystaveno dne 5. 4. 2015
- <sup>23</sup> Unver N.: New skeletons and new concepts in Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochem. Rev.* 2007, 6, 125-135.
- <sup>24</sup> Jin Z.: Amaryllidaceae and Scetium alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 2009, 26, 363-381.
- <sup>25</sup> Hohman J, Forgo P, Molnar J, Wolfard K, Molnar A, Thalhammer T, Mathe I, Sharples D. Antiproliferative amaryllidaceae alkaloids isolated from the bulbs of *Sprekelia formosissima* and *Hymenocallis x festalis*. *Planta Med.* 2002, 68, 454-457.
- <sup>26</sup> Fedde F.: *Papaveraceae-Hypecoideae et Papaveraceae-Papaveroideae* in the book: *Das Pflanzenreich-Regni vegetabilis conspectus* ( A. Engler, Ed.). Leipzig 1909, Part IV, Band 104.
- <sup>27</sup> Duke J. A.: *Papaveraceous Polyclave*, *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 1974, 3, 1-95.
- <sup>28</sup> Hegnauer R.: *Chemotaxonomie der Pflanzen. Eine Übersicht über die Verbreitung und die systematische Bedeutung der Pflanzenstoffe*. Birkhäuser, Basel, Stuttgart 1969, Band 5.
- <sup>29</sup> Slavík J., Novák V., Slavíková L.: Alkaloids from *Eschscholtzia lobii* Greene. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1976, 41, 2429-2432.
- <sup>30</sup> Slavíková L., Slavík J.: Alkaloide der mohngewächse (Papaveraceae) XXXIII. Über die alkaloide von drei arten der gattung *Eschscholtzia* und über die konstitution des neuen alkaloids escholamin. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1966, 31, 3362-3372.
- <sup>31</sup> Slavík J., Slavíková L., Haisová K.: Alkaloids of Papaveraceae. XXXVI. Further alkaloids of *Eschscholtzia douglasii* and *E. glauca*, and on the constitution of californidine. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1967, 32, 4420-4430.

- <sup>32</sup> Slavík J., Dolejš L., Sedmera P.: Alkaloids of the Papaveraceae XLIV. Quaternary alkaloids from roots of three *Eschscholtzia* species and from the aerial part of *Hunnemannia fumariaefolia* Sweet: Constitution of Escholidine: Collect. Czech. Chem. Commun. 1970, 35, 2597-2612.
- <sup>33</sup> Slavík J., Slavíková L.: Alkaloids of the Papaveraceae. XLV. Phenolic nonquaternary alkaloids from the roots of three *Eschscholtzia* species. Collect. Czech. Chem. Commun. 1971, 36, 2067-2069.
- <sup>34</sup> Slavík J., Dolejš L.: Alkaloids of the Papaveraceae. LII. The constitution of escholine and the identity of esholine with magnoflorine. Collect. Czech. Chem. Commun. 1973, 38, 3514-3520.
- <sup>35</sup> Slavík J., Slavíková L., Dolejš L.: Quaternary alkaloids of an *Eschscholtzia* species (*E. oregana* GREENE?). Collect. Czech. Chem. Commun. 1975, 40, 1095-1102.
- <sup>36</sup> ---: plant.usda.gov: <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=ESCHS>, vystaveno dne 8. 4. 2014.
- <sup>37</sup> ---: biolib.cz.: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id3516/>, vystaveno dne 8. 4. 2014.
- <sup>38</sup> ---: rostliny.net: [http://www.rostliny.net/rostlina/Eschscholzia\\_californica#.U63HHPIvuM](http://www.rostliny.net/rostlina/Eschscholzia_californica#.U63HHPIvuM), vystaveno dne 8. 4. 2014.
- <sup>39</sup> ---: Botany.cz: <http://botany.cz/cs/eschscholzia-californica/>, vystaveno dne 7. 4. 2014.
- <sup>40</sup> Cahlíková L., Macáková K., Vytlačilová J., Chlebek J., Opletal L., Kurfürst M., Jahodár L.: Sekundární metabolity rostlin rádu Papaverales, jejich izolace, identifikace a biologická aktivita, 44. Konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, 27. – 29. listopadu 2009, Nymburk, Chem. listy, 2009, 103 (11), 941-942.
- <sup>41</sup> ---: en.wikipedia.org: [http://en.wikipedia.org/wiki/California\\_poppy](http://en.wikipedia.org/wiki/California_poppy), vystaveno dne 8. 4. 2014.

- <sup>42</sup> Sando C. E., Bartlett H. H.: Rutin, the flavone pigment of *Escholtzia californica* Cham., J. Biol. Chem. 1920, 41, 495-501.
- <sup>43</sup> Tome F., Colombo M. L., Caldiroli L.: A Comparative Investigation on Alkaloid Composition in Different Populations of *Eschscholtzia californica* Cham., Phytochem. analysis 1999, 10, 264-267.
- <sup>44</sup> Chapman and Hall: Dictionary of Natural Products. Chapman and Hall, London 1994.
- <sup>45</sup> Jain L., Tripathi M., Pandey V. B.: Alkaloids of *Eschscholtzia californica*. Planta Med. 1996, 62, 188.
- <sup>46</sup> Gertig H.: Alkaloids of *Eschscholtzia californica* Cham. VI. Alkaloids in the methanolic extract from the aerial parts obtained subsequently to the benzene extraction of the raw material. Acta Pol. Phar. 1965, 22, 443-448.
- <sup>47</sup> Gertig H.: Alkaloids in *Eschscholtzia californica* Cham. V. Alkaloids obtained from the methanolic extract of roots previously extracted with benzene. Acta Pol. Phar. 1965, 22, 367-372.
- <sup>48</sup> Lu S.-T., Lan P.-K.: Studies on the alkaloids of Formosan lauraceous plants. 8. Alkaloids of *Cryptocarya chinensis* hemsl. 1. Structures of the new alkaloids "crychine" and "caryachine". Yakugaku Zasshi 1966, 86, 177-184, Chem. Abst. Nr. 1966: 414058.
- <sup>49</sup> Lu S.-T.: Studies on the alkaloids of Formosan lauraceous plants. IX. Alkaloids of *Cryptocarya chinensis* Hemsl. and *Cryptocarya konishii* Hayata. Yakugaku Zasshi 1966, 86, 296-299, Chem. Abst. Nr. 1966: 414058.
- <sup>50</sup> Chen C.-H., Wu J., Shaath N. A., Soine T. O.: The structures of ( $\pm$ )-caryachine and sevanine. Taiwan Yakugaku Zasshi 1975, 27, 105-107, Chem. Abst. Nr. 1977: 106835.
- <sup>51</sup> Stermitz F. R., McMurtrey K. D.: Alkaloids of the Papaveraceae, X. New Alkaloids from *Argemone gracilentia* Greene. J. Org. Chem. 1969, 34, 555-559.

- <sup>52</sup> Stermitz F. R., Stermitz J. R., Zanoni T. A., Gillespie J. P.: Alkaloid of the Papaveraceae. XXI. Alkaloids of *Argemone subintegrifolia* and *A. munita*. *Phytochemistry* 1974, 13, 1151-1153.
- <sup>53</sup> Wu J., Beal J. L., Wu W.-N., Doskotch R. W.: Alkaloids of *Thalictrum*. XXIV. Isolation and identification of alkaloids from the tertiary phenolic fraction of *Thalictrum revolutum* tops. *Lloydia*, 1977, 40, 593-601.
- <sup>54</sup> Harborne, J. B.: *Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure-activity relationships*. Alan R. Liss. 1986, 15-24.
- <sup>55</sup> Manske R. H. F., Shin K. H.: The alkaloids of papaveraceous plants. LIII. *Eschscholtzia californica* Cham. *Can. J. Chem.* 1965, 43, 2180-2182.
- <sup>56</sup> Manske R. H. F., Shin K. H.: The alkaloids of papaveraceous plants. LVI. A new alkaloid, eschscholtzidine, and its structure. *Can. J. Chem.* 1966, 44, 1259-1260.
- <sup>57</sup> Slavík J., Slavíková L.: Alkaloide der mohngewächse (Papaveraceae) XXII. Über die alkaloide aus *Argemone platyceras* LINK et OTTO. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1963, 28, 1728-1737.
- <sup>58</sup> Stermitz F. R., Seiber J. N.: Alkaloids of the Papaveraceae, IV. *Argemone hispida* and *A. munita* subsp. *rotundata*. *J. Org. Chem.* 1966, 31, 2925-2933.
- <sup>59</sup> Kupchan S. M., Yoshitake A.: *Thalictrum* alkaloids. IX. The isolation, structural elucidation, and synthesis of thalisopavine. *J. Org. Chem.* 1969, 34, 1062-1065.
- <sup>60</sup> Cahlíková L., Kucera R., Hošťálková A., Klimeš J., Opletal L.: Identification of Pavinane Alkaloids in the Genera *Argemone* and *Eschscholtzia* by GC-MS. *Nat. Prod. Commun.* 2012, 7, 1279-1281.
- <sup>61</sup> Slavík J., Slavíková L.: Alkaloids of the Papaveraceae. Part LXXXII. Alkaloids from the aerial parts of three *Eschscholtzia* species. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1986, 51, 1743-1751.

- <sup>62</sup> Parfeinikov S. A., Murav'eva D. A.: Eschscholzia californica alkaloids. Khim. Prir. Soedin. 1983, 242-243.
- <sup>63</sup> Slavík J., Slavíková L.: Alkaloide der Mohngewächse (Papaveraceae) III. Alkaloide des Kalifornischen kappen-mohns (Eschscholtzia californica Cham.). Chem. Listy 1954, 48, 1387, Collect. Czech. Chem. Commun. 1955, 20, 27-31.
- <sup>64</sup> Grenby T.H.: The use of sanguinarine in mouthwashes and toothpaste compared with some other antimicrobial agents. Br. Dent. J. 1955, 178, 254-258.
- <sup>65</sup> Eley B.M.: Antibacterial agents in the control of supragingival plaque-a review. Br. Dent. J. 1999, 186, 286-296.
- <sup>66</sup> Ahmad N., Gupta S., Husain M.M., Heiskanen K.M, Mukhtar H.: Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. Clin. Cancer Res. 2000, 6, 1524-1528.
- <sup>67</sup> Weerasinghe P., Hallock S., Tang S.C., Liepins A.: Role of Bcl-2 family proteins and caspase-3 in sanguinarine-induced bimodal cell death. Cell. Biol. Toxicol. 2001, 17, 371-381.
- <sup>68</sup> Weerasinghe P., Hallock S., Tang S.C., Liepins A.: Sanguinarine induces bimodal cell death in K562 but not in high Bcl-2-expressing JM1 cells. Pathol. Res. Pract. 2001, 197, 717-726.
- <sup>69</sup> Slaninová I., Táborská E., Bochoraková H., Slanina J.: Interaction of benzo[c]phenanthridine and protoberberine alkaloids with animal and yeast cells. Cell. Biol. Toxicol. 2001, 17, 51-63.
- <sup>70</sup> Chmura S. J., Dolan M. E., Cha A., Mauceri H. J., Kufe D.W., Weichselbaum R.R.: In vitro and in vivo activity of protein kinase C Inhibitor chelerythrine chloride induces tumor cell toxicity and growth delay in vivo. Clin. Cancer. Res. 2000, 6, 737-742.



- <sup>71</sup> Klvana M., Chen J., Lepine F., Legros R., Jolicoeur M.: Analysis of secondary metabolites from *Eschscholtzia californica* by high-performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* 2006, 17, 236-242.
- <sup>72</sup> Singh, S., Jain L., Pandey M. B., Singh U. P., Pandey V. B.: Antifungal activity of the alkaloids from *Eschscholtzia californica*, *Folia Microbiol.* 2009, 54 (3), 204-206.
- <sup>73</sup> Jowett H. A. D., Pyman F. L.: XXXVI. - The alkaloids of *Xanthoxylum brachyacanthum*. *J. Chem. Soc.* 1913, 103, 290-300.
- <sup>74</sup> Birch A. J., Jackson A. H., Shannon P. V. R., Varma P. S. P.: An improved route to isoquinolines; synthesis of the alkaloids escholamine and takatonine. *Tetrahedron Lett.* 1972, 47, 4789-4792.
- <sup>75</sup> Bruneton J.: *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, Intercept Ltd. Paris, France, 1999.
- <sup>76</sup> Cheney R.H.: Therapeutic potential of *Eschscholtzia californica* herba. *J. Crude Drug* 1963, 3, 413-416.
- <sup>77</sup> Rolland A., Fleurentin J., Lanhers M. C., Younos C, Misslin R., Mortier F., Pelt J. M.: Behavioural effect of the American traditional plant *Eschscholtzia californica*: sedative and anxiolytic properties. *Planta Med.* 1991, 57, 212-216.
- <sup>78</sup> Duke J. A.: *CRC Handbook of Medicinal Herbs*. FL.: CRC Press, Boca Ralton 1985.
- <sup>79</sup> Rucker G., Breitmaier E., Zhang G. L., Mayer R.: Alkaloids from *Dactylicapnos torulosa*. *Phytochemistry* 1994, 36, 519-523.
- <sup>80</sup> Kobayashi K., Nishirio H., Fukushima M., Tomita H.: Antifungal activity of pisiferic acid and derivatives against rice blast fungus. *Phytochemistry* 1987, 26, 3175-3179.
- <sup>81</sup> Maillard M., Gupta M.P., Hostettmann K.: A new antifungal prenylated flavone from *Erythrina berteroana*. *Planta Med.* 1987, 53, 563-564.

- <sup>82</sup> Singh U.P., Prithiviraj B., Wagner K.G., Shumacher K.P.: Effect of ajoene, a constituent of garlic (*Allium sativum*) on powdery mildew (*Erysiphe pisi*) of pea (*Pisum sativum*). J. Plant Dis. Prot. 1995, 102, 399-406.
- <sup>83</sup> Prithiviraj B., Singh U.P., Singh K.P., Shumacher K.P.: Field evaluation of ajoene, a constituent of garlic (*Allium sativum*) and neemazal, a product of neem (*Azadirachta indica*) against powdery mildew (*Erysiphe pisi*) of pea (*Pisum sativum*). J. Plant. Dis. Prot. 1998, 105, 274-278.
- <sup>84</sup> Reimers F., Smolka S.E., Werres S., Shumacher K.P., Wagner K.G.: Effect of ajoene, a compound derived from *Allium sativum* on phytopathogenic and epiphytic microorganisms. J. Plant Dis. Prot. 1993, 100, 622-633.
- <sup>85</sup> Döpke W., Fritsch G.: Der alkaloidgehalt von *Eschscholtzia californica*, Sektion Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin, Hessische 1969, Str. 1-2, 203-204.
- <sup>86</sup> von der Heydt H., Isolierung, Charakterisierung und Quantifizierung von Flavonoiden und Alkaloiden aus Trockenextrakten der *Eschscholtzia californica* Cham, PhD thesis, University of Mainz, Germany 1994.
- <sup>87</sup> Harborne, J. B.: The flavonoids: advances in research since 1986. Chapman and Hall, London 1994.
- <sup>88</sup> Horcicková Z.: Biologicky aktivní metabolity rostlin I. Alkaloidy *Eschscholtzia californica* Cham. a jejich inhibiční aktivita vůči acetylcholinesteráze, UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2011. Diplomová práce. 67 s.
- <sup>89</sup> Cahlíková L., Opletal L., Schraml J., Kurfürst M., Pavlíček O.: Isoquinoline alkaloids: Potent acetylcholinesterase inhibitors from *Eschscholtzia californica* (Papaveraceae), 43. Konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, listopad 2008, Nymburk, Chem. listy 2008, 102 (11), 1029.

- <sup>90</sup> Cahlíková L., Horcicková Z., Opletal L., Macáková K., Kurfürst M.: Isochinolinové alkaloidy a jejich biologická aktivita, 38. Konference Syntéza a analýza léčiv, 14.-16. září 2009, Hradec Králové, Sborník abstraktu, s. 73.
- <sup>91</sup> Novák V., Slavík J.: Further alkaloids from *Glaucium flavum* CR. Collect. Czech. Chem. Commun. 1974, 39, 3352-3356.
- <sup>92</sup> Chang Y.C., Chang F.R., Khalil A.T., Hsieh P.W., Wu Y.C.: Cytotoxic benzophenanthridine and benzyloquinoline alkaloids from *Argemone mexicana*. Z. Naturforsch. C. 2003, 58, 521-526.
- <sup>93</sup> Chen C.-H., Lee S.-S., Lai C.-F., Wu J., Beal J. L.: A Caryachnine N-Methosalt from *Cryptocarya chinensis* and PMR spectral characteristics of some quaternary pavine alkaloids. J. Nat. Prod. 1979, 42, 163-167.
- <sup>94</sup> Schumacher H.-M., Rüffer M., Nagakura N., Zenk M. H.: Partial Purification and Properties of (S)-Norlaudanoline synthase from *Eschscholtzia tenuifolia* cell cultures, *Planta Med.* 1983, 48, 212-220.
- <sup>95</sup> Rueffer M., El-Shagi H., Nagakura N., Zenk M. H.: (S)-norlaudanoline synthase: The first enzyme in the benzyloquinoline biosynthetic pathway. *FEBS Lett.* 1981, 129, 5-9.
- <sup>96</sup> Polgár L.: The prolyl oligopeptidase family. *Cell. Mol. Life Sci.* 2002, 59, 349-362.
- <sup>97</sup> García-Horsman J. A., Männistö P. T., Venäläinen J. I.: On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides* 2007, 41, 1-24.
- <sup>98</sup> Puttonen K. A., Lehtonen S., Raasmaja A., Männistö P. T.: A prolyl oligopeptidase inhibitor Z-Pro-Prolinal, inhibits glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase translocation and production of reactive oxygen species in CV1-P cells exposed to 6-hydroxydopamine. *Toxicol. in Vitro* 2006, 20, 1446-1454.

- <sup>99</sup> Toide K., Shinoda M., Fujiwara T., Iwamoto Y.: Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on spatial memory and central cholinergic neurons in aged rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1997, 56, 427-434.
- <sup>100</sup> Tarragó T., Kichik N., Claasen B., Prades R., Teixidó M., Giralt E.: Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 7516-7524.
- <sup>101</sup> Stahl E.: *Thin-layer Chromatography: A Laboratory Handbook.* Springer Verlag, Berlin 1969.
- <sup>102</sup> Steck T. L., Kant J. A.: Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods Enzymol.* 1974, 31, 172-180.
- <sup>103</sup> Fabre N., Claparols C., Richelme S., Angelin M.-L., Fouraste I., Moulis C.: Direct characterization of isoquinoline alkaloids in a crude plant extract by ion-pair liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: example of *Eschscholtzia californica*. *J. Chromatogr. A* 2000, 904(1), 35-46.
- <sup>104</sup> Wu T.-S., Lin F.-W.: Alkaloids of the wood of *Cryptocarya chinensis*. *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 1404-1407.
- <sup>105</sup> Ruchirawat S., Namsa-aid A.: An efficient synthesis of argemonine, a pavine alkaloid. *Tetrahedron Lett.* 2001, 42, 1359-1361.
- <sup>106</sup> Johnson A. P., Luke R.W.A., Singh G., Boa A. N.: Synthesis and reactions of N,N-bis[1-(trimethylsiloxy)alkyl]-formamides: preparation of (±)-argemonine and (±)-norargemonine. *J. Chem. Soc.* 1996, Perkin Trans. 1, 907-913.