

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

RIGORÓZNÍ PRÁCE

**Alkaloidy rodu *Narcissus* (*Amaryllidaceae*) a jejich biologická
aktivita**

**The alkaloids of the genus *Narcissus* (*Amaryllidaceae*) and its
biological activity**

Vedoucí katedry: Doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

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

Hradec Králové, 2015

Mgr. Václav Hrstka

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové 2015

.....
Podpis

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

Rád bych na tomto místě velice poděkoval Doc. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za podporu, odbornou pomoc při interpretaci MS spekter a tvorbě této diplomové práce, poskytnuté materiály a cenné rady a připomínky při praktických úkolech. Dále tímto děkuji Prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za změření biologických aktivit alkaloidních extraktů. V neposlední řadě také děkuji celé katedře farmaceutické botaniky a ekologie za příjemné pracovní prostředí a kolegiální.

1	ÚVOD.....	6
2	CÍL PRÁCE	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1	Čeleď <i>Amaryllidaceae</i> a její alkaloidy.....	12
3.2	Rod <i>Narcissus</i>	18
3.2.1	Alkaloidy rodu <i>Narcissus</i>	19
3.3	Biologická aktivita <i>Amaryllidaceae</i> alkaloidů (AA).....	20
3.3.1	Prolyloligopeptidáza.....	22
3.3.2	Protinádorová aktivita AA	24
3.3.2.1	Alkaloidy lykorinového strukturního typu.....	24
3.3.2.2	Alkaloidy homolykorinového strukturního typu	25
3.3.2.3	Alkaloidy haemanthaminového strukturního typu.....	25
3.3.2.4	Alkaloidy tazettinového strukturního typu	26
3.3.2.5	Alkaloidy pankratistatinového strukturního typu.....	26
3.3.3	Antimikrobiální aktivita AA	26
3.3.4	Neuroprotektivní aktivita AA	30
3.3.5	Antivirotická aktivita	30
3.3.6	Další účinky AA.....	31
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
4.1	Všeobecné postupy.....	33
4.1.1	Destilace a odpařování.....	33
4.1.2	Materiál a vybavení.....	33
4.1.2.1	Rozpouštědla.....	33
4.1.2.2	Chemikálie.....	33
4.2	Příprava sumárních extraktů a GC/MS analýza.....	33
4.2.1	Biologický materiál.....	33
4.2.2	Příprava ethanolového a alkaloidního extraktu.....	34
4.2.3	GC/MS analýza a identifikace alkaloidů	34
4.3	Stanovení inhibiční aktivity alkaloidních extraktů a čistých alkaloidů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE	35
4.3.1	Chemikálie a materiál použité pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity	35
4.3.1.1	Chemikálie.....	35
4.3.1.2	Pufry	35
4.3.1.3	Biologický materiál.....	36

4.3.2	Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity	36
4.3.3	Podmínky měření	36
4.3.4	Příprava hemolyzátu lidských erytrocytů.....	36
4.3.5	Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (hodnoty IC ₅₀)	37
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	38
5.1	Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny <i>Narcissus bulbocodium</i> var. <i>conspicus</i> a jeho GC/MS analýza	39
5.2	Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny <i>Narcissus</i> cv. Fortissimo a jeho GC/MS analýza	43
5.3	Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny <i>Narcissus</i> cv. Delnashaugh a jeho GC/MS analýza	46
5.4	Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny <i>Narcissus</i> cv. Sealing a jeho GC/MS analýza	49
5.5	Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny <i>Narcissus</i> cv. Ice Follies a jeho GC/MS analýza	52
5.6	Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny <i>Narcissus canaliculatus</i> a jeho GC/MS analýza	55
6	ZÁVĚR	58
7	LITERATURA.....	61
8	SEZNAM ZKRATEK	71

1 ÚVOD

Rostliny jsou nedílnou součástí lidského života již od nepaměti. Na počátku byly zdrojem obživy, s postupem času a získáváním dalších zkušeností a vědomostí se začaly objevovat jejich toxické účinky, které se postupně dařilo převádět k léčebnému využití. Jak se společnost vyvíjela odkrývaly se nové poznatky léčivého charakteru rostlin. Části rostlin, tedy jejich orgány, se upravovaly a konzervovaly jednoduchými metodami. Po nějaké době bylo zjištěno, že účinek je vázán na látky v těchto orgánech obsažených a vyvstala potřeba podrobnějšího poznávání těchto léčivých bylin a jejich složek, jejich vývoje, účinku, způsobu pěstování a uchovávání. To bylo úrodnou půdou pro vznik nového, důležitého oboru, farmakognozie.

Farmakognozie šla od počátku ruku v ruce s další vědní disciplínou, farmaceutickou chemií.^{1,2} Jejich společným cílem je hledání nových potenciálních látek využitelných jako stabilní bezpečná léčiva. V 18. století se cesty těchto oborů rozešly a zatímco farmaceutická chemie se zaměřila na syntézu a chemickou úpravu různých látek, farmakognozie se soustředila na poznávání látek přírodních, jejich zdrojů, standardizaci a využití v léčitelství. V současné době se tyto obory opět prolínají při hledání účelně využitelných léčiv. Semisyntetická příprava aktivních molekul z přírodních zdrojů nebo zvýšení účinnosti přírodních látek přípravou jejich derivátů jsou příklady efektivní aplikace znalostí z obou oborů. Společné využití těchto disciplín je dobrým předpokladem k hledání nových cest k léčbě nejdůležitějších civilizačních chorob dnešní doby.

Vývoj společnosti a zvýšení životní úrovně je důsledkem prodloužení průměrné délky života a s ní četnější projevy chorob s tím spojených. Tzv. neurodegenerativní onemocnění se stávají velkým problémem dnešní vyspělé společnosti. V současné době je z těchto onemocnění nejčastější Alzheimerova choroba (AD). Této nemoci je také na poli vědy věnována velká pozornost, především za účelem nalezení účinnějších látek využitelných v terapii tohoto závažného onemocnění. Lidé postižení touto nemocí ztrácí schopnosti samostatného života a s postupně se rozvíjející demencí je konečným stádiem smrt. Kauzální léčba pro stále neznámou přesnou patogenezí choroby není možná, a hlavní terapií tedy zůstává léčba symptomatická. Ve všech stádiích onemocnění hrají největší roli inhibitory lidských cholinesteráz; acetylcholinestrázy (HuAChE) a butyrylcholinesterázy (HuBuChE). Jejich inhibicí dochází k větší dostupnosti acetylcholinu v neurosynapsích a snížení tvorby a toxicity β -amyloidu, což je zatím

nejuznávanější teorie patogeneze AD.³ Z přírodních látek spadajících do této skupiny je registrován alkaloid galantamin izolovaný původně z cibulí sněženky *Galanthus woronowii*⁴. Tento inhibitor poukázal na velký potenciál alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae*, a proto se věnuje velká pozornost zkoumání těchto látek jakožto inhibitorů esteráz i dalších enzymů využitelných v léčbě AD. Na katedře farmaceutické botaniky a ekologie se v roce 2005 začala věnovat této problematice pracovní skupina ADINACO Research Group⁵ pod vedením Prof. RNDr. Lubomíra Opletala, CSc. Tato práce, která vznikla v rámci zmíněné pracovní skupiny, je zaměřena na hledání účinných látek, konkrétně alkaloidů z rodu *Narcissus*. Po extrakci alkaloidních látek z cibulí jednotlivých druhů rostlin následovala jejich identifikace a měření inhibice vůči HuAChE a HuBuChE za účelem vytipování vhodných druhů k podrobnější studii, případně k izolaci perspektivních alkaloidů.

2 CÍL PRÁCE

Cíle rigorozní práce:

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

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Čeleď *Amaryllidaceae* a její alkaloidy

Čeleď amarylkovitých rostlin sestává z jednoděložných, víceletých rostlin s cibulovitými kořeny převážně se vyskytujících v oblastech tropů a subtropů. Na území České republiky se nachází 3 známé původní rody této čeledi, rod *Narcissus* (narcis), rod *Galanthus* (sněženka) a rod *Leucojum* (bledule). V přírodě se můžeme setkat s druhy *N. poeticus* a *N. pseudonarcissus* původem z jihozápadní Evropy, které u nás zdomácněly.^{6, 7} Mnoho dalších druhů se u nás pěstuje jako okrasné rostliny, jsou to například *N. tazetta* a jeho kultivary, dále rod *Amaryllis*, *Eucharis* aj. Po celém světě je známo více než 1100 druhů, které se řadí do 85 rodů⁸. Na Obr. 1. jsou zobrazeny příklady některých druhů této rozsáhlé čeledi.



A

B

C

Obr. 1. Rostliny čeledi *Amaryllidaceae*

A *Narcissus cyclamineus* (Narcis bramboříkový)⁹

B *Eucharis amazonica* (Libenka velkokvětá)¹⁰

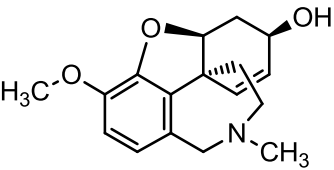
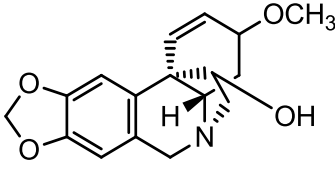
C *Hippeastrum reticulatum* (Hvězdník sp.)¹¹

Tyto rostliny se hojně využívaly v lidovém léčitelství. První zmínky použití těchto rostlin jako léčiv sahají až do 4. století př. Kristem.¹² Od této doby našla celá řada těchto rostlin široké uplatnění v terapii různých onemocnění. V období starého Říma se jednalo především o léčbu nádorových onemocnění. Postupem času se přišlo na další možnosti jejich uplatnění, například některé druhy rodu *Crinum* se ukázaly jako dávidla (*Crinum amabile* Donn), jiné se osvědčily při léčbě malarie (*Crinum bulbispermum* Milne-Redh & Schweick).¹³ Dnes jsou různé druhy rostlin této čeledi cílem rozličných výzkumů jejich potenciálního účinku u nádorových onemocnění nebo jako antimikrobních látek, léčiv potlačujících progresi neurodegenerativních chorob (AD) jako inhibitory lidských cholinesteráz, antifungálního působení, analgetického účinku a

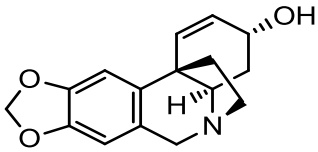
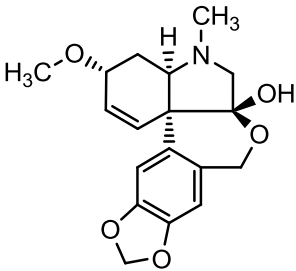
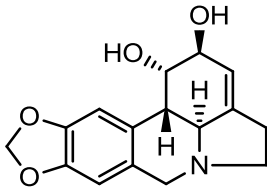
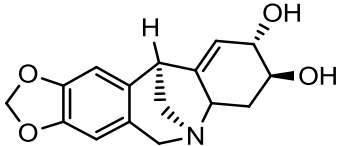
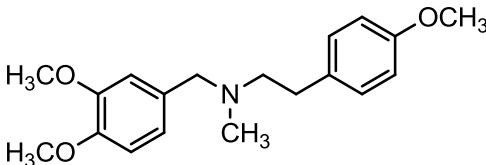
jako potenciální antimalarika.⁸ Do popředí se také dostává významný účinek některých druhů jako inhibitorů enzymu propyloligopeptidázy (POP), dalšího mechanismu případně použitelného jako podpůrná léčba AD.¹⁴ Látkami zodpovědnými za tyto vlastnosti jsou tzv. *Amaryllidaceae* alkaloidy.

Pro svou velmi širokou biologickou aktivitu patří k nejdůležitějším obsahovým látkám těchto rostlin. Kromě výše uvedených biologických účinků jsou to látky jedovaté, což může být chápáno jako obranný mechanismus rostliny. Tyto heterocyklické sloučeniny obsahující ve své struktuře atom dusíku se dělí na základě své biosyntetické cesty a strukturní podobnosti do několika skupin. Základní tzv. norbelladinová cesta biosyntézy AA z L-fenylalaninu a L-tryptofanu je podrobně popsána v mé diplomové práci.¹⁵ Touto cestou vzniká převážná většina strukturních skupin. Některé méně často se vyskytující typy a montaninový strukturní typ jsou syntetizovány nejspíše jinou biosyntetickou cestou, která nebyla dosud uspokojivě objasněna. Dosud známé strukturní typy včetně jejich zástupců a výskytu jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. I.)

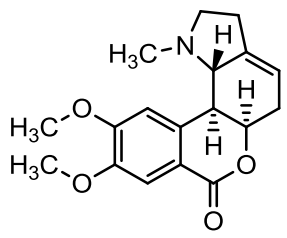
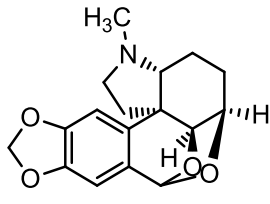
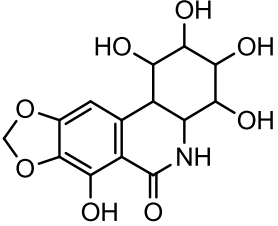
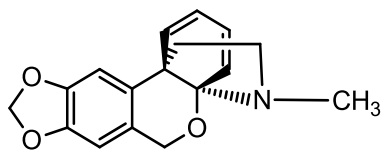
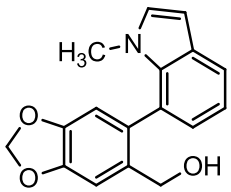
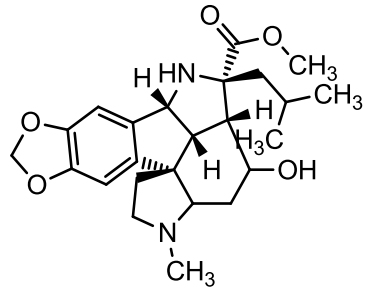
Tabulka I Rozdělení *Amaryllidaceae* alkaloidů do jednotlivých strukturních skupin včetně jejich zástupců a příkladů rostlin, ze kterých byly izolovány.

Strukturní typ	vzorec	zástupce	izolace
galanthaminový		galanthamin	<i>Narcissus tortifolius</i> ¹⁶ <i>Galanthus elwesii</i> ^{17, 18} <i>Leucojum vernum</i> ¹⁹
haemanthaminový		haemanthamin	<i>Narcissus triandruss</i> cv. <i>Thalia</i> ²⁰ <i>Narcissus confusus</i> ²¹

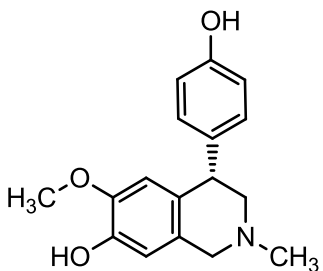
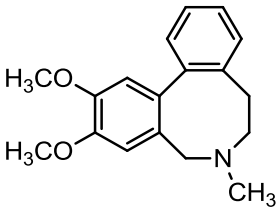
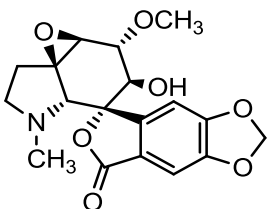
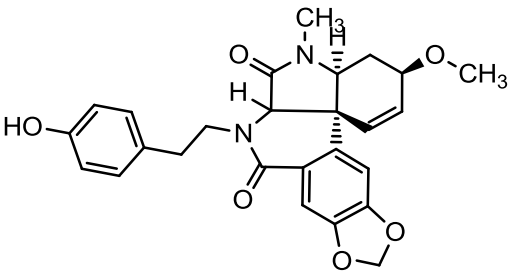
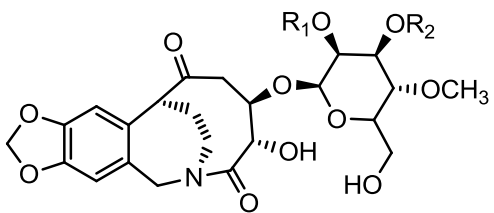
Tabulka I Pokračování

Strukturní typ	vzorec	zástupce	výskyt
krininový		krinin	<i>Narcissus poeticus</i> var. <i>recurvus</i> ²² <i>Narcissus filifolia</i> ²² <i>Nerine bowdenii</i> ²³
tazettinový		tazettin	<i>Narcissus tazetta</i> ^{24, 25} <i>Zephyranthes robusta</i> ²⁶ <i>Narcissus tazetta</i> var. <i>chinensis</i> ²⁷
lykorinový		lykorin	<i>Narcissus poeticus</i> ^{28, 29} <i>Ammocharis coranica</i> ³⁰ <i>Lycoris radiata</i> ^{31, 32} <i>Brunsvigia radulosa</i> ³³
montaninový		montanin	<i>Lycoris squamigera</i> ³⁴
belladinový		belladin	<i>Nerine filifolia</i> ³⁵ <i>Chlidanthus fragrans</i> ^{36, 37}

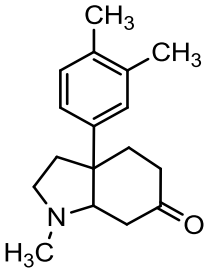
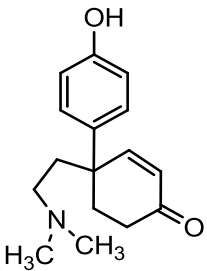
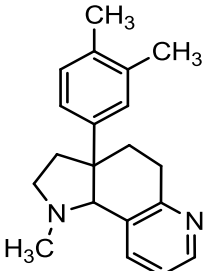
Tabulka I Pokračování

Strukturní typ	vzorec	zástupce	výskyt
homolykorinový		homolykorin	<i>Narcissus broussoneti</i> ³⁸ <i>Narcissus pseudonarcissus</i> cv. <i>Carlton</i> ³⁹ <i>Hippeastrum morelianum</i> ⁴⁰
augustaminový		augustamin	<i>Crinum kirkii</i> ⁴¹
pankratistatinový		pankratistatin	<i>Haemanthus kalbreyeri</i> ⁴² <i>Pancratium littorale</i> ⁴³
gracilinový		gracilin	<i>Galanthus gracilis</i> ^{44, 45}
galanthindolový		galanthindol	<i>Galanthus plicatus</i> ⁴⁶
gracilaminový		gracilamin	<i>Galanthus gracilis</i> ^{44, 45}

Tabulka I Pokračování

Strukturní typ	vzorec	zástupce	výskyt
cheryllinový		cheryllin	<i>Narcissus angustifolius</i> subsp. <i>transcarpathicus</i> ⁴⁷
buflavinový		buflavin	<i>Boophane flava</i> ⁴⁸
galasinový		galasin	<i>Galanthus elwesii</i> ¹⁸
plikaminový		plikamin	<i>Galanthus plicatus</i> ⁴⁹
kripowellinový		kripowellin A $R_1, R_2 = -CH_2OCH_2-$ kripowellin B $R_1, R_2 = -CH_3$	<i>Crinum powellii</i> ⁵⁰

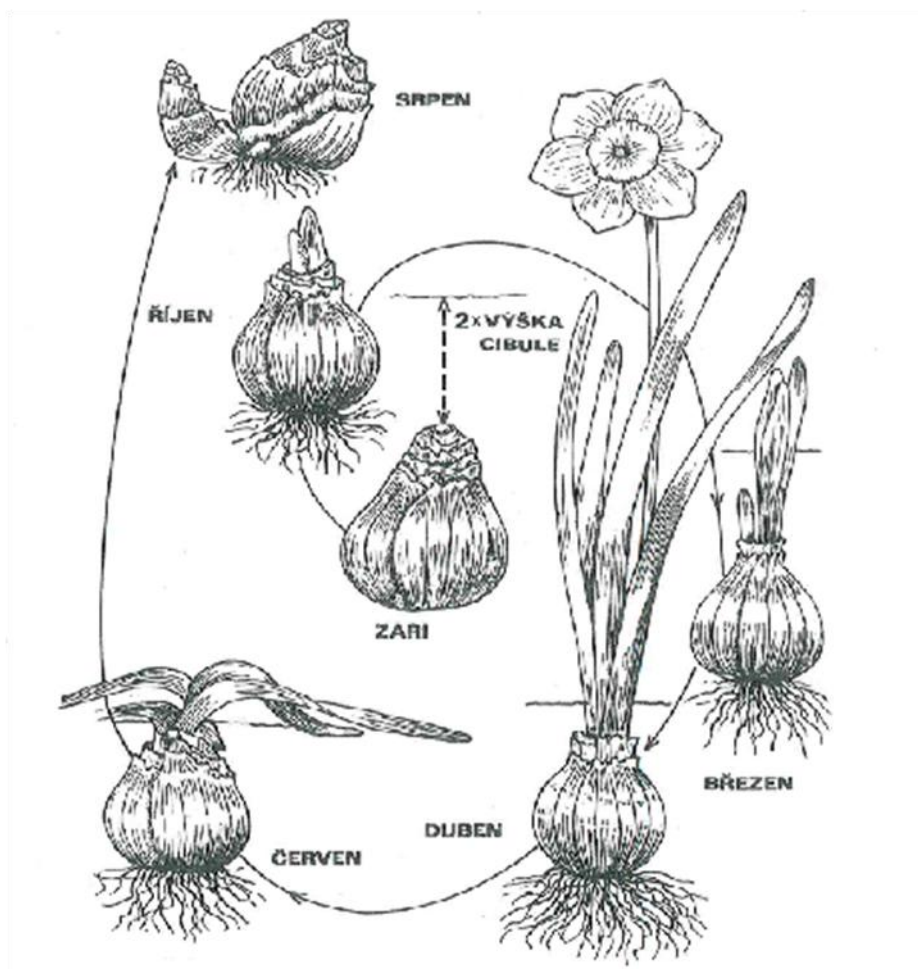
Tabulka I Pokračování

Strukturní typ	vzorec	zástupce	výskyt
		mesembrin	
mesembranový		joubertiamin	<i>Narcissus triandrus</i> ⁵¹ <i>Narcissus pallidus</i> ^{52, 53}
		Skeletin A4	

3.2 Rod *Narcissus*

Vzhledem k zaměření této práce bude na tomto místě podrobněji popsán rod *Narcissus*. Rozdělení alkaloidů s jejich zástupci je součástí mé diplomové práce z roku 2013¹⁵. Následující přehled bude soustředěn především na botanické zařazení druhů s uvedením nových poznatků získaných v posledních letech.

Narcisy mají rychlý vývoj, proto potřebují dostatek živin, které jsou uloženy v cibulích. Na obrázku dole je zachycen vegetační vývoj narcisu (Obr. 2.). Cibule jednotlivých druhů se od sebe liší tvarem i barvou slupky, obecně však jsou tvarem kulaté, případně zploštělé s tenkou papírovitou slupkou žluté až hnědé barvy. Dceřiné cibule se tvoří po stranách mateřské a dorůstají 1 a 3 roky, pak se samy oddělí.⁵⁴



Obr. 2. Vegetační vývoj narcisu⁵⁴

Listy narcisů jsou řemenovité nebo čárkovité. Stonek je bezlistý, kulatý až zploštělý. Květy jsou složeny z 6 okvětních lístků rozverných tvarů a barev. Pakorunka uprostřed květu je utvářena rozmanitě.⁵⁴ Většina narcisů je domácích v Evropě, ale najdeme je také na severu Afriky podél střeozemního moře. Původ narcisů náleží Řecku, kde také tyto okrasné rostliny získaly svůj název - *Narcissus* z řec. narkos (omamující) podle opojné vůně *N. poeticus*. Historicky najdeme narcisy také ve staré Číně, kde byly uctívány jako symbol čistoty.⁵⁴

Na rozšíření narcisů v evropských zahradách se podíleli především Holanďané a Angličané. Od 19. století bylo započato šlechtění narcisů, a v současnosti tak máme k dispozici tisíce různých odrůd a kultivarů, které jsou průběžně obměňovány.⁵⁴

Rod *Narcissus* obsahuje přibližně 40 druhů. Vzhledem k početnému zastoupení odrůd došlo postupně k redukci a botanicky byly narcisy rozděleny do několika skupin. Dalším, používanějším typem rozdělení je zahradnické třídění, podle kterého jsou narcisy rozděleny do 12 skupin a jejich podskupin, v nichž jsou jednotlivé odrůdy.⁵⁴

3.2.1 Alkaloidy rodu *Narcissus*

Biosyntéza a popis alkaloidů v tomto rodu jsou detailně shrnuty v mé diplomové práci.¹⁵ Zde budou uvedeny poznatky o vývoji biosyntézy alkaloidních skupin v těchto rostlinách. V cibulích různých druhů narcisů se nachází široké spektrum alkaloidů lišící se koncentrací, strukturním typem i množstvím jednotlivých typů alkaloidů. Podrobným rozbohem alkaloidních extraktů mnoha druhů rodu *Narcissus* bylo zjištěno, že původními strukturními typy jsou alkaloidy lykorinového a homolykorinového typu, přičemž lykorinový typ se zdá být i nejpůvodnějším v celé čeledi *Amaryllidaceae*. Dokazuje to nejen jejich nejširší zastoupení napříč celou čeledí, ale také jejich dominantní zastoupení ve starších rodech *Clivia* a *Lapiedra*. Později se vyvinula syntéza haemanthaminového, tazettinového a galanthaminového typu.⁵³

Výzkum také poukázal na 2 odlišné cesty vývoje druhů spočívající v syntéze alkaloidů korespondující s jejich růstem. Zatímco první cesta směřovala k rozmanité syntéze strukturních skupin alkaloidů různě ukládaných v jednotlivých částech rostlin zároveň s větším růstem, která dávala rostlině větší možnost obrany a přizpůsobení se různým podmínkám prostředí (př. skupina *Pseudonarcissus*), druhá naopak vedla k

významnému omezení syntézy i vzrůstu rostliny (př. skupina *Bulbocodium*) či až k úplnému útlumu biosyntézy alkaloidů (př. skupina *Apodanthi*).⁵³

Na našem pracovišti byly od vydání mé předchozí práce provedeny analýzy dalších druhů a odrůd narcisů, ve kterých se podařilo identifikovat řadu známých alkaloidů i několik dalších látek, jejichž strukturu se zatím nepodařilo identifikovat. Kromě měření inhibiční aktivity vůči HuAChE a HuBuChE byla dále měřena inhibiční aktivita vůči enzymu propyloligopeptidáze (POP) u dvou izolovaných alkaloidů narwedinu a inkartinu (Obr. 5.), jež se ukázala jako zajímavá.⁵⁵ O významu inhibice POP bude pojednáno dále.

3.3 Biologická aktivita Amaryllidaceae alkaloidů (AA)

O využití AA jako inhibitorů lidské acetylcholinesterázy (HuAChE) a lidské butyrylcholinesterázy (HuBuChE) při léčbě AD a její patofyziologii je blíže pojednáno v mé diplomové práci¹⁵ u rodu *Narcissus*, proto budou v následujících odstavcích shrnuty nové poznatky spojené s touto aktivitou u jiných druhů a dále bude věnováno více pozornosti jiným zajímavým aktivitám těchto alkaloidů.

Do dnešní doby bylo testováno široké množství rodů z čeledi *Amaryllidaceae*, zajímavou aktivitu vůči HuBuChE vykázal sumární alkaloidní extrakt rostliny *Nerine bowdenii* ($IC_{50} = 14.8 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$), u které bylo detekováno 22 alkaloidů, z nichž se podařilo 19 identifikovat.²³ Dalším analyzovaným druhem z rodu *Nerine* byla *N. undulata*, která prokázala zajímavou hodnotou inhibice HuAChE ($IC_{50} = 14.3 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$). Zde se podařilo identifikovat 11 různých alkaloidů.⁵⁶

Velmi zajímavá inhibice vůči HuBuChE byla zjištěna u cibulí rostliny *Sternbergia lutea* (Obr. 3.). Získaná hodnota byla $IC_{50} = 3.7 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$. Přestože u této rostliny byl identifikován pouze lykorin a haemantamin, samy o sobě tyto alkaloidy významnou aktivitu neprokázaly. Není tedy zatím uspokojivě vysvětleno, co je příčinou této zajímavé hodnoty. Nabízí se možnost synergického působení více látek nebo významné působení minoritních či neidentifikovaných látek.²²

Extrakt z cibulí *Chlidanthus fragrans* (Obr. 4.) také prokázal dobrou míru inhibice HuAChE, konkrétně $IC_{50} = 20.1 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$. Převažovaly u něj alkaloidy tazettinového a galantaminového typu.⁵⁷

Podrobné fytochemické studii byl podroben druh *Zephyranthes robusta*, ze kterého bylo izolováno 13 alkaloidů následně testovaných na inhibiční aktivitu lidských cholinesteráz. Z izolovaných látek prokázal největší aktivitu galanthamin, dále se také zajímavou hodnotou inhibice HuAChE projevil 8-O-demethylmaritidin, alkaloid krininového strukturního typu (Obr. 5). Tato rostlina se ukázala jako zajímavý zdroj alkaloidů pro izolaci a přípravu možných derivátů.²⁶



Obr. 3. *Sternbergia lutea*⁵⁸



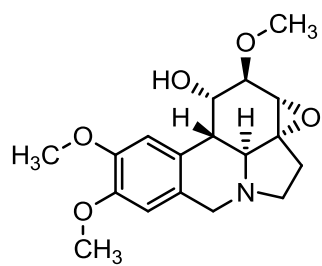
Obr. 4. *Chlidanthus fragrans*⁵⁹

3.3.1 Prolyloligopeptidáza

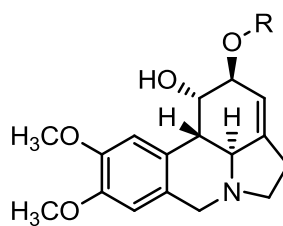
Prolyloligopeptidáza (POP), také známa jako prolyl endopeptidáza spadá do skupiny serinových oligopeptidáz. Tento enzym se nachází jak v solubilní tak částicové formě v cytosolu a membránách buněk různých tkání, obzvláště významně pak v centrální nervové soustavě. Bylo zjištěno, že v různých částech mozku se jeho koncentrace liší.⁶⁰ Funkcí POP je hydrolýza karboxylového konce prolinových částí peptidů. Mezi tyto peptidy patří například vasopresin, thyreotropní hormon (TRH), substance P, neurotensin aj. Tyto látky hrají důležitou roli v procesu učení a paměti, jsou důležitými modulátory v kognitivních procesech a jejich degradace POP může být jednou z příčin urychlení procesu stárnutí a rozvoje neurodegenerativních onemocnění jako bipolární afektivní porucha, schizofrenie, či Alzheimerova choroba. U těchto onemocnění je důležitá role neuronální komunikace pomocí různých neuropeptidů, jejichž součástí je inositol- 1,4,5- trifosfát. Metabolismus této molekuly ovlivňuje právě také POP, což může mít také svou roli při patogenezi těchto chorob.⁵⁵

Z mechanismu účinků POP vyplývá potenciální užitek z inhibice tohoto enzymu. Bylo zjištěno, že v neuroprotektivním procesu inhibitorů POP hrají svou roli i receptory mediátorů substrátů degradovaných POP (receptory pro vasopresin, TRH). Při podání antagonistů těchto receptorů se vyrušil neuroprotektivní účinek neuromediátorů indukovaných inhibitory POP.¹⁴

V současné době probíhá výzkum potenciálních inhibitorů POP. Na našem pracovišti probíhá ve spolupráci s centrem pokročilých studií, Univerzity obrany testování inhibičních aktivit doposud izolovaných alkaloidů. U dvou alkaloidů izolovaných z rostliny *Zephyranthes robusta* (Obr. 6.) neaktivních vůči AChE a BuChE byla naměřena zajímavá aktivita právě vůči POP. Jednalo se o galanthin a 9-O-demethylgalanthin (Obr. 5.), přičemž právě derivát galanthinu byl přibližně 10krát aktivnější inhibitor.⁶² Z rodu *Narcissus* byly testovány aktivity některých získaných alkaloidů. Slibné hodnoty byly zjištěny u alkaloidů inkartinu a narwedinu, které se blížily inhibici baikalinu použitého jako standardu. Je zajímavé, že i tyto dva alkaloidy se zajímavou aktivitou vůči POP byly proti AChE a BuChE neaktivní.⁵⁵

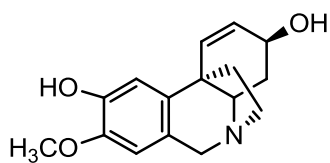


inkartin

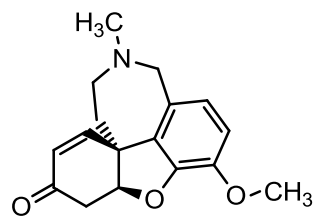


R = CH₃ galantamin

R = H 9-O-demethylgalantamin



8-O-demethylmaritidin



narwedine

Obr. 5. Struktury vybraných alkaloidů



Obr. 6. *Zephyranthes robusta*⁶¹

Kromě přírodních látek jsou hledány inhibitory také na poli chemických látek. Vědecký tým z finské univerzity v Helsinkách zkoumal možný efekt některých psychofarmak jako anxiolytika, antidepresiva, modulátory nálady, antipsychotika aj. na inhibici POP. Některé látky se jeví jako kompetitivní, nekompetitivní i jako smíšené inhibitory. Vzhledem k vyšší lipofilitě se tyto látky snadněji dostávají přes hematoencefalickou bariéru do mozku, proto se předpokládá i větší efekt působení. Bohužel určitou zajímavou inhibiční aktivitu vykazaly pouze některé testované látky. Z tohoto důvodu se tyto látky do budoucna nejeví jako potenciálně použitelné POP inhibitory.⁶³ Z jiného směru byla POP zkoumána na svou možnou participaci v kancerogenních procesech různých tkání. Na základě předpokladů, že se POP těchto procesů přímo účastní, byl proveden výzkum, měřící aktivitu POP v několika lidských tkáních jak zdravých tak neoplastických. Zjistilo se, že aktivita POP byla u většiny tkání postižených rakovinou znatelně vyšší, než ve zdravých tkáních stejného druhu.⁶⁴ Z uvedeného lze soudit, že POP může mít podíl při patogenezi nádorových onemocnění a bude třeba dalších studií, které by zhodnotily, zda by inhibitory POP mohly být i přínosnými léčivy v oblasti antineoplastik.

3.3.2 Protinádorová aktivita AA

Některé *Amaryllidaceae* alkaloidy prokázaly cytotoxickou aktivitu a účinnost při regresi tumorových onemocnění. Vybrané alkaloidy jsou uvedeny blíže.

3.3.2.1 Alkaloidy lykorinového strukturního typu

Lykorin inhibuje u zvířat různé rakovinné buňky. Byla prokázána účinnost proti buňkám BL6 myšího melanomu a HeLa buňkám. Zjistilo se snížení buněčné aktivity v kostní dřeni stehenní kosti, což zapříčinilo granulocytickou leukopenii a snížení produkce erytrocytů. Mechanismus účinku zřejmě spočívá v inhibici syntézy proteinů v ribozomech. Lykorin také inhibuje produkci tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α) a oxidu dusného. Místem působení u suprese lidské leukémie je G2/M fáze buněčného cyklu a indukce apoptózy rakovinných buněk.⁶⁵

Ze skupiny lykorinových alkaloidů jsou ještě aktivní vůči některým rakovinným buňkám například karantin, pseudolykorin, galanthin a 2-O-acetylpseudolykorin.⁶⁵ Ungeremin (Obr. 7.) jakožto přírodní metabolit lykorinu je částečně zodpovědný za inhibiční účinek lykorinu u leukemie.^{66, 67}

3.3.2.2 Alkaloidy homolykorinového strukturního typu

Aktivní alkaloidy této skupiny jsou například homolykorin, dubiusin (Obr. 7.), hippeastrin nebo lykorenin. Prokázaly účinnost *in vitro* i *in vivo* u některých nádorových buněk. Byly to především buňky lidského jaterního karcinomu HepG2, leukemické buňky MOLT-4 a lidské buňky karcinomu prostaty. Kromě pozitivních supresivních účinků vůči těmto nádorům vykazaly tyto látky také cytotoxickou aktivitu proti nenádorovým buňkám myších fibroblastů LMTK.

3.3.2.3 Alkaloidy haemanthaminového strukturního typu

Mezi antitumorálně aktivní alkaloidy této řady patří například haemanthamin, haemanthidin, krinamin a maritidin. Zmíněné látky vykazují aktivitu proti Rauscherově virové leukemii, MOLT-4 leukemii, HeLa buňkám, lidskému hepatokanceromu a dalším. Krinamin a haemanthamin mají schopnost selektivní aktivace apoptozy nádorových buněk potkaního hepatocelulárního karcinomu 5123tc bez cytotoxického působení na lidské embryonální buňky ledvin HEK 293T při stejných koncentracích. Mechanismus inhibice proteosyntézy haemanthaminem zřejmě spočívá v blokaci tvorby peptidových vazeb na 60S ribozomální podjednotce.⁶⁵

Haemanthamin a haemanthidin také prokázaly inhibici růstu buněk myšího lymfomu L5178 podobným mechanismem jako u lykorinu, tedy navázáním na tRNA za tvorby blokujícího komplexu. Dalším zjištěním byl popis inhibičního účinku na p53-negativní T-lymfoblastovou leukemii Jurkat.⁶⁵

Další alkaloid této řady, distichamin (Obr. 7.), vykázal cytotoxické působení k nádorovým buňkám MCF-7, HeLa, G361, K562, BJ, a CEM. U lidských buněk T-lymfoblastické leukémie v závislosti na aplikované dávce vedl k akumulaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu a indukoval tvorbu proteinu p53.⁶⁸

3.3.2.4 Alkaloidy tazettinového strukturního typu

U tazettinu byla zjištěna jen mírná cytotoxická aktivita proti některým rakovinným buňkám, ovšem jeho biologický prekurzor pretazettin vykázal v biologických testech silnou účinnost proti buňkám Rauscher leukemie, Lewisova karcinomu a spontánní AKR lymfocytární leukemie. Velmi vysokou aktivitu projevuje vůči T-lymfoidním buňkám MOLT-4. Působením pretazettinu docházelo k inhibici růstu HeLa buňek.⁶⁵

3.3.2.5 Alkaloidy pankratistatinového strukturního typu

Důležitým alkaloidem této skupiny je narciclasin. Jeho dlouho známým účinkem je antimitotické působení na eukaryotní buňky. Mechanismus účinku spočívá v inhibici peptidyltransferázy navázáním na 60S ribozomální podjednotku, důsledkem tohoto působení je zastavení tvorby nových proteinů. Pankratistatin (Obr. 7.) zpomaluje růst HeLa buněk, působí proti leukemii a je aktivní například vůči rakovině hrtanu nebo buňkám Ehrlichova tumoru.⁶⁵

3.3.3 Antimikrobiální aktivita AA

Z egyptské rostliny *Amaryllis belladonna* byl izolován nový alkaloid lykorinové řady amarbellisin (Obr. 7.). Spolu s dalšími izolovanými alkaloidy lykorinem, pankracinem, hippeastrinem, vittatinem a 11-hydroxyvittatinem (Obr. 7.) byla proměřena jejich antimikrobiální a antifungální aktivita. S výjimkou lykorinu a hippeastrinu, měly všechny testované alkaloidy antibakteriální efekt. Byla zjišťována aktivita vůči *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Vůči *E. coli* byly aktivní pouze amarbellisin a vittatin. Vůči *P. aeruginosa* byl aktivní pouze vittatin, zatímco vůči *S. aureus* prokázaly aktivitu všechny 4 alkaloidy. Antifungální účinek (vůči *Candida albicans*) vykazaly však všechny testované alkaloidy, přičemž nejaktivnější se ukázal lykorin, amarbellisin a hippeastrin.⁶⁹

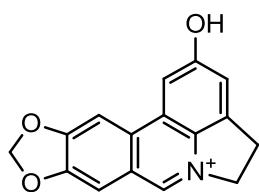
Další antimikrobiální studii byl podroben extrakt (CH₂Cl₂/MeOH) z listů rostliny *Crinum purpurascens* z čeledi *Amaryllidaceae*. Ten byl testován vůči 6 agens a to *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *Salmonella typhi* a *Salmonella paratyphi B*. Extrakt ukázal zajímavou inhibiční aktivitu vůči všem použitým mikrobům. Následně byly z extraktu izolovány 2 alkaloidy, hippadin a pratorimin, a jedna steroidní látka. Pratorimin nejevil žádné antibakteriální účinky. Hippadin byl aktivní vůči všem patogenům kromě *P. aeruginosa* a *K. pneumoniae*. Přestože účinek hippadinu byl označen za baktericidní, byl až o 150krát méně účinný než standard ciprofloxacin.⁷⁰

Hymenocallis littoralis (Obr. 8.) je dalším druhem podrobeným testování aktivity vůči mikrobům. Petroletherový extrakt této rostliny byl studován v účinnosti proti Gram-pozitivní bakterii *S. aureus* a Gram-negativní *P. aeruginosa* a *E. coli*. Vůči *E. coli* a kvasince *C. albicans* nebyla zjištěna žádná aktivita. Zbylé 2 bakteriální kmeny byly extraktem inhibovány v růstu, ale jen v poloviční efektivitě oproti standardům ciprofloxacinu a cefalosporinu.⁷¹

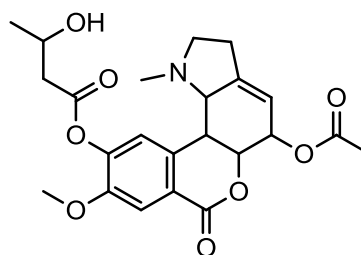
Další dva druhy rostlin z rodu *Crinum* byly podrobeny vyhodnocení antimikrobní aktivity. Alkaloidní extrakty z rostlin *Crinum latifolium* (Obr. 9.) a *Crinum asiaticum* rostoucí ve Vietnamu, které obsahovaly identifikované alkaloidy lykorin, pratorinin, krinin, crinamidin, 1-*O*-acetyllykorin, 1,2-di-*O*-acetyllykorin a lykorin-1,2-di-*O*-β-*D*-glukosid, prokázaly silnou aktivitu vůči Gram-pozitivní bakterii *Sarcina lutea*. Izolovaný alkaloid pratorinin byl pak aktivní vůči Gram-pozitivnímu koku *S. aureus*.⁷²

Alkaloidní extrakt z cibulí *Crinum angustum*, který obsahoval alkaloidy patřící do 6 strukturních typů, byl testován na aktivitu vůči vybraným kmenům bakterií včetně dvou rezistentních forem bakterií, methicillin rezistentní *S. aureus* a carbapenemázu produkující *K. pneumoniae*. Extrakt vykázal zajímavou účinnost vůči 6 z 9 testovaným kmenům, přičemž převládal efekt proti Gram-pozitivním bakteriím než Gram-negativním. Byla také potvrzena aktivita vůči kvasince *C. albicans* a slibnou aktivitu prokázal extrakt také u rezistentních testovaných kmenů.⁷³

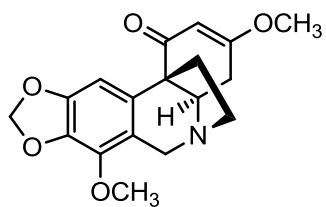
Alkaloid narciklasin sám o sobě disponoval aktivitou vůči hned několika patogením organismům. Inhiboval růst *Corynebacterium fascians* a kvasinky *Cryptococcus neoformans*. Jeho deriváty, jako 2,3,4,7-tetra-*O*-acetylnarciklasin inhibovaly patogenní bakterii *Neisseria gonorrhoeae*.



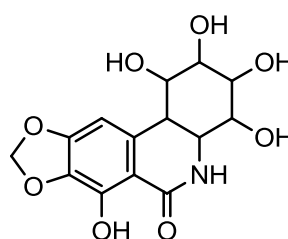
ungeremin



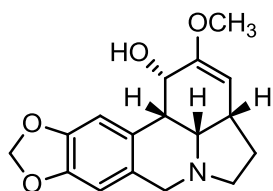
dubiusin



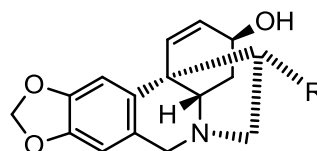
distichamin



pankratistatin



amarbellisin



R = H vittatin

R = OH 11-hydroxyvittatin

Obr. 7. Struktury vybraných alkaloidů s protinádorovou a antimikrobiální aktivitou.



Obr. 8. *Hymenocallis littoralis*⁷⁴



Obr. 9. *Crinum latifolium*⁷⁵

3.3.4 Neuroprotektivní aktivita AA

Kromě inhibiční aktivity AA vůči AChE vyvstávají otázky na jejich neuroprotektivní účinky a případnou souvislost s inhibicí AChE. Byla provedena srovnávací studie, ve které byly zkoumány alkaloidní extrakty 5 druhů rostlin čeledi *Amaryllidaceae*: *Crinum jagus*, *C. bulbispermum*, *Hippeastrum barbatum*, *H. puniceum* a *Zephyranthes carinata*. Alkaloidní extrakt z druhu *C. jagus* obsahující převážně lykorin a vittatin, tedy alkaloidy lykorinové a krininové řady, prokázal určité neuroprotektivní působení u kortikálních neuronů vystavených oxidačnímu stresu z působení glutamátu. Byla tedy vyhodnocována protekce neurotoxického působení glutamátu na tyto neurony. Zároveň byla zjištěna znatelná inhibice AChE extraktem *Z. carinata*, u které převažovaly alkaloidy galanthaminového a lykorinového typu. Na základě těchto výsledků a vyhodnocení dalších studií se autoři domnívají, že neuroprotektivní účinek může být vázán na lykorinové a krininové alkaloidy, zatímco inhibiční účinek na AChE je vázán na alkaloidy galanthaminového typu. Případné synergické působení těchto alkaloidů stejně jako potvrzení či vyvrácení, zda nositelem účinnosti nejsou také minoritně zastoupené alkaloidy, je třeba prokázat dalšími studiemi.⁷⁶

3.3.5 Antivirotická aktivita

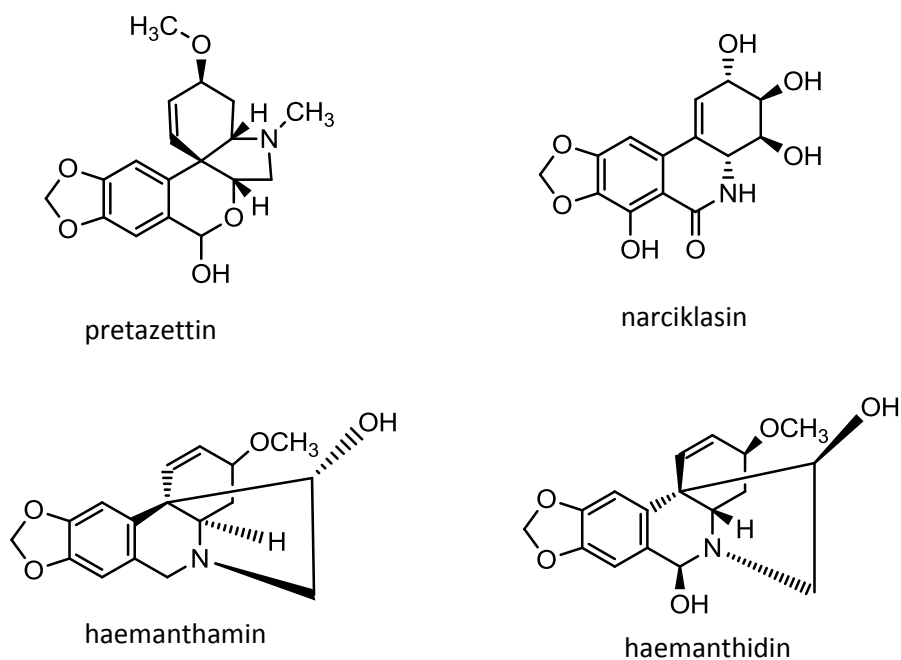
Lykorin a pseudolykorin vykázali široké spektrum antivirotického působení. Bylo provedeno několik studií, ve kterých byla prokázána účinnost vůči flaviviru, Punta Toro a Rift Valley chřipkovému viru. Lykorin dále působil proti koronavirem zprostředkovanému akutnímu těžkému respiračnímu syndromu (SARS-CoV). Slibný efekt projevil také u herpes virů typu 1. Studie působení alkaloidů proti virům poukázala na možnou strukturální souvislost antivirotického účinku s výskytem hexahydroindolového kruhu se dvěma funkčními hydroxylovými skupinami. Mechanismem účinku je zřejmě snížení aktivity virové DNA-polymerázy, a tudíž inhibice multiplikace virových jednotek uvnitř buňky, spíše než inaktivace extracelulárně se vyskytujícího viru.⁶⁵

Zajímavá biologická aktivita byla zjištěna u dalšího AA pretazettinu (Obr. 10.). Účinně se projevil proti některým RNA flavivirům a bunyavirům. Slibnou aktivitu prokázal také proti herpes simplex viru. Mechanismus účinku zřejmě tkví v inhibici proteinové syntézy během replikace viru.

Mezi některé další alkaloidy s antivirotickou aktivitou můžeme dále zařadit narciklasin (Obr. 10.) s účinností proti RNA flavivirům a bunyavirům, haemanthamin a hippeastrin účinný proti herpes simplex virům typu 1 nebo homolykorin s vysokou aktivitou, ale nízkým terapeutickým indexem.⁶⁵

3.3.6 Další účinky AA

Jak bylo výše uvedeno, *Amaryllidaceae* alkaloidy vykazují rozmanitou paletu biologických aktivit. Z výše neuvedených lze jmenovat například hypotenzní účinek dubiusinu, lykoreninu, 8-*O*-demethylhomolykorinu a homolykorinu, prokázaný u normotenzních krys nebo vasodilatační efekt lykorninu, jehož příčinou je blokáda α -adrenergických receptorů.⁶⁵ Haemanthamin, hemanthidin (Obr. 10.) a krinamin disponují také antimalarickou aktivitou vůči *Plasmodium falciparum*.⁶⁵ Lykorenin a hemanthidin mají silnou analgetickou a antiflogistickou účinnost, dokonce vyšší než aspirin. Vitattin se projevil jako účinné koanalgetikum morfinu. Tento efekt prokázal také narwedin.⁶⁵



Obr. 10. Struktury vybraných alkaloidů s antivirotickými a antimalarickými účinky

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Destilace a odpařování

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

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

4.1.2 Materiál a vybavení

4.1.2.1 Rozpouštědla

Diethylamin, p.a. (Lachner)

Diethyleter, p.a. (Penta)

Ethanol 95%, denaturovaný methanolem, p.a.

Ethylacetát, p.a. (Penta)

Methanol LC-MS CHROMASOLV® (Sigma-Aldrich)

Toluen, p.a. (Penta)

4.1.2.2 Chemikálie

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

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

4.2 Příprava sumárních extraktů a GC/MS analýza

4.2.1 Biologický materiál

Čerstvé cibule rostlin *Narcissus bulbocodium* var. *conspicus*, *N.* cv. Fortissimo, *N.* cv. Delnashaugh, *N.* cv. Sealing, *N.* cv. Ice Follies a *N. canaliculatus* byly získány od komerčního prodejce Lukon Glands (Sadská, Česká republika). Verifikace vzorků byla provedena Prof. RNDr. Lubomírem Opletalem CSc. Dokladné vzorky rostlin jsou uloženy v herbáři na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pod následujícími čísly:

CUFPH-16130/AL-437 (*N. cv. Fortissimo*)
CUFPH-16130/AL-438 (*N. cv. Sealing*)
CUFPH-16130/AL-439 (*N. bulbocodium var. conspicus*)
CUFPH-16130/AL-440 (*N. canaliculatus*)
CUFPH-16130/AL-445 (*N. cv. Ice Follies*)
CUFPH-16130/AL-451 (*N. cv. Delnashaugh*)

4.2.2 Příprava ethanolového a alkaloidního extraktu

Čerstvé cibule narcisů byly rozdrobeny a extrahovány ethanolem (3 krát po 125 ml) při teplotě varu ethanolu 30 minut. Po následné filtraci přes křemelinu bylo rozpouštědlo odpařováno na vakuové odparce. Po odpaření do sucha byl zbytek rozpuštěn v 10 ml 2% HCl a vytřepán diethyletherem (3 × 15 ml) pro odstranění neutrálních sloučenin. Dalším krokem byla úprava pH na cca 9-10 přidáním 25% amoniaku k vodné fázi. Vodná fáze byla vytřepána ethylacetátem (3 × 15 ml) a organická odpařena do sucha. Ke konečnému vysušení došlo v exsikátoru. Z každého odparku bylo odebráno 2 krát 10 mg extraktu na biologické testy, dále byl připraven vzorek pro GC/MS analýzu o koncentraci 1 mg/ml. Zbývající extrakty byly uloženy pro případné využití.

4.2.3 GC/MS analýza a identifikace alkaloidů

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

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

4.3.1 Chemikálie a materiál použité pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

4.3.1.1 Chemikálie

- Acetylthiocholin jodid (Sigma-Adrich) (použit 10mM roztok)
- Butyrylthiocholin jodid (Sigma-Adrich) (použit 10mM roztok)
- Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Adrich)
- 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich) (použit 5mM roztok)
- Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)
- Huperzin A (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

4.3.1.2 Pufry

- 5mM Fosfátový pufr pH 7,4

Zásobní roztok A

10 mM roztok NaH_2PO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 1,20 g NaH_2PO_4 , nebo 1,38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, nebo 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).

Zásobní roztok B

10 mM roztok Na_2HPO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 1,42 g Na_2HPO_4 , nebo 1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, nebo 3,58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$).

Smíchá se 57 ml roztoku A a 283 ml roztoku B a 300 ml vody.

- 5mM Fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM chloridu sodného
8,766 g chloridu sodného p. a. se rozpustí v 5mM fosfátovém pufru pH 7,4 a doplní se jím do 1000 ml.

- 100mM Fosfátový pufr, pH 7,4

Zásobní roztok A

200 mM roztok NaH_2PO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 24,0 g NaH_2PO_4 , nebo 27,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, nebo 31,2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).

Zásobní roztok B

200 mM roztok Na_2HPO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 28,4 g Na_2HPO_4 , nebo 35,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, nebo 71,63 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$).

Smíchá se 57 ml roztoku A a 243 ml roztoku B a 300 ml vody.

4.3.1.3 Biologický materiál

Jako zdroj acetylcholinesterasy (HuAChE) byl použit hemolyzát lidských erytrocytů. Zdrojem butyrylcholinesterasy (HuBuChE) byla lidská plazma. Měření bylo prováděno v mikrotitračních destičkách.

4.3.2 Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

4.3.3 Podmínky měření

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek:

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

4.3.4 Příprava hemolyzátu lidských erytrocytů

Erytrocyty se získají z čerstvě odebrané citrátované krve zdravých dobrovolníků (18 ml krve + 2 ml 3,4% roztoku citrátu). Bezprostředně po odběru se krev rozdělí stejnoměrně po 5 ml do šroubovacích zkumavek a provede se centrifugace při rychlosti 4000 rpm při 4 °C po dobu 10 minut. Po této první centrifugaci se plazma odsaje tak, aby v ní nebyly erytrocyty, a uchovává se do doby stanovení aktivity BuChE v chladničce při 4 °C (nejdéle však 6 hodin).

Zbytek plazmy z erytrocytárního sedimentu se opatrně odsaje bezpopelovým filtračním papírem s hlazeným povrchem, jehož špička je sestřižena (při naklonění zkumavek), odečte se objem erytrocytární masy a tento sediment se zředí takovým množstvím 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 obsahujícím 150 mM chloridu sodného a suspence se rozdělí do zkumavek o objemu 13 ml, aby těchto zkumavek bylo 8 a objem v každé z nich byl 10-12 ml, obsah se dobře promíchá a provede se centrifugace

stejným způsobem, jak je uvedeno výše při oddělování plazmy. Promytí tímto způsobem se provede celkem 3x a promývací kapalina se dokonale odstraní. Po tomto promytí se přidá takové množství 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 bez obsahu chloridu sodného, aby byl objemový poměr erythrocyty : pufr 1 : 9, směs se opět homogenizuje, přelije do Erlenmayerovy baňky a erythrocyty se ponechají spontánně hemolyzovat za míchání teflonovým míchadlem při 300 rpm. Ihned po skončení této řízené hemolýzy se u suspenze stanoví aktivita, případně se 5mM fosfátovým pufrům upraví absorbance (hodnota absorbance musí být 0,08–0,15) a naředěný hemolyzát se uchovává do doby použití při -22 °C.

Cholinesetrasová aktivita plazmy se stanoví stejným způsobem (hodnota absorbance musí být 0,15–0,20), uchovává se stejným způsobem jako hemolyzát.

4.3.5 Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (hodnoty IC₅₀)

Pro stanovení hodnoty IC₅₀ byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)⁷⁷. Jako substráty se používají estery thiocholinu, které jsou cholinesterázami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB za vzniku žlutě zbarveného produktu, který se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm. Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC₅₀ 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 IC₅₀ známých inhibitorů cholinesteráz: galataminem (IC₅₀ HuAChE = 0,63 ± 0,025 µg/ml, HuBuChE = 15,58 ± 0,48 µg/ml) a huperzinem A (IC₅₀ HuAChE = 7,99 ± 0,24 × 10⁻³ µg/ml, HuBuChE >500 µg/ml). % I (inhibice) byla počítána dle vzorce:

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

kde ΔA_{BL} je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a ΔA_{SA} je nárůst absorbance měřeného vzorku.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny *Narcissus bulbocodium* var. *conspicus* a jeho GC/MS analýza

Při fytochemické GC/MS analýze tohoto botanického druhu narcisu (Obr. 11.), bylo detekováno 10 alkaloidních látek, z nichž 4 se podařilo identifikovat na základě porovnání jejich spekter s databází NIST a literaturou. Plný výčet změřených látek shrnuje tabulka na následující straně (Tab. II). Nejvyšší zastoupení měl identifikovaný alkaloid tazettin jak je zachyceno na chromatografickém záznamu (Obr. 12). Vedle tazettinu se podařilo identifikovat dvě látky lykorinového strukturního typu lykorin a didehydroasooanin. Ostatní látky se bohužel na základě hmotnostního spektra nepodařilo identifikovat. S velkou pravděpodobností se může jednat o látky nové doposud nepopsané. Je vysoká šance, že tyto relativně nezajímavé alkaloidy jsou spojeny s biologickou aktivitou jak identifikovaných tak látek, které se identifikovat nepodařilo. Zajímavou látkou je látka označená A6 a to vzhledem k vysokému zastoupení v extraktu (32% TIC). Šance na izolaci a strukturní identifikaci je ve srovnání s ostatními neidentifikovanými látkami vysoká. Inhibiční aktivita alkaloidního extraktu byla vůči AChE ($IC_{50} = 52,05 \pm 6,19 \mu\text{g/ml}$) nevýrazná, ale vůči BuChE



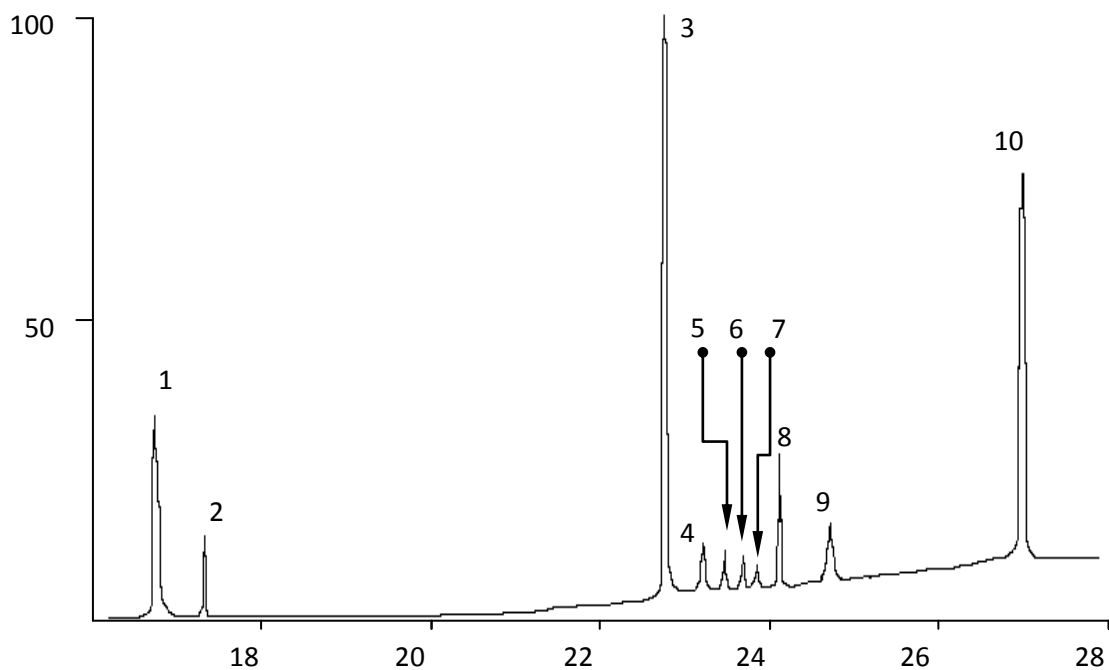
Obr. 11. *Narcissus bulbocodium* var. *conspicus*⁷⁸

($IC_{50} = 22,37 \pm 3,14 \mu\text{g/ml}$) byla průměrná. Nízké zastoupení alkaloidů lykorinového typu, které jsou známy svou nízkou inhibiční aktivitou⁷⁹, spolu s vysoce zastoupeným neidentifikovaným alkaloidem může být příčinou nízké aktivity vůči HuAChE. Navíc alkaloidy tazettinového typu jak známo nejsou nositeli silného inhibičního efektu vůči AChE. Pro srovnání strukturních odlišností obou skupin identifikovaných alkaloidů jsou vyobrazeny 2 z popsaných látek na Obr. 13. Inhibice HuBuChE byla oproti tomu zajímavější, zatím však stále nejsme schopni říct, které alkaloidní struktury jsou za tyto účinky zodpovědné, proto může být tato hodnota výsledkem působení majoritně zastoupené neidentifikované látky, či silně aktivní látkou minoritně obsaženou, stejně jako synergické působení více látek v extraktu. 6 látek se nám identifikovat nepodařilo a právě pro zajímavou hodnotu inhibice HuBuChE a velkým portfoliem neznámých látek včetně majoritně zastoupené neznámé látky skýtá tato rostlina potenciál pro další analýzu a izolaci neznámých alkaloidů.

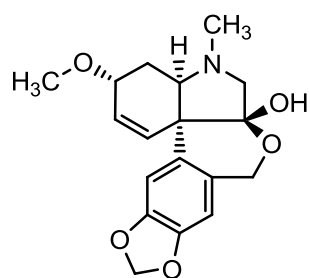
Tabulka II GC/MS analýza alkaloidního extraktu *N. bulbocodium* var. *conspicua*.

Sloučenina	RT ^a (min)	RI	[M ⁺] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita)	% TIC ^b	Reference pro MS
1 A1	16,94	2264	287(5), 272(5), 257(5)203(40), 115(5), 70(100)	11	
2 6- Epimesembrenol	17,54	2301	301(4), 288(4), 273(4), 219(42), 70(100)	4	51
3 Tazettin	22,75	2645	331(20), 316(20), 298(25), 247(100), 230(10)	34	NIST
4 Didehydroassoanin	23,19	2676	265(84), 264(100), 248(15), 220(14), 191(14), 178(16), 133(10)	3	80
5 A2 ^c	23,43	2692	316(12), 259(25), 258(32), 257(75), 256(35), 247(20), 229(40), 226(75), 225(100), 199(27), 197(20), 139(32)	3	
6 A3 ^c	23,65	2707	341(18), 317(25), 247(100), 242(25), 230(26), 221(24), 200(20), 199(28), 173(20), 152(17), 115(20), 96(27)	2	
7 A4 ^c	23,80	2718	389(100), 388(32), 387(30), 358(60), 325(35), 265(31), 241(60), 210(25), 191(30), 148(30), 135(30), 116(30)	1	
8 Lykorin	24,06	2734	287(35), 286(30), 268(20), 250(15), 227(70), 226(100)	7	NIST
9 A5 ^c	24,72	2784	315(42), 266(33), 242(25), 241(98), 240(100), 226(12), 196(10)	3	
10 A6 ^c	26,82	2939	315(8), 296(18), 295(98), 294(100), 284(20), 288(12), 266(11), 250(10), 178(9), 148(11)	32	

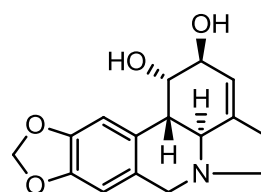
^a podmínky GC/MS analýzy viz experimentální část, ^b celkový iontový proud, ^c nebylo identifikováno



Obr. 12. Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí
N. bulbocodium var. *conspicua*



3 tazettin



8 lykorin

Obr. 13. Vybrané struktury identifikovaných látek v rostlině
N. bulbocodium var. *conspicua*

5.2 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny *Narcissus* cv. Fortissimo a jeho GC/MS analýza

V alkaloidním extraktu z cibulí *Narcissus* cv. Fortissimo (Obr. 14.) bylo určeno 9 látek alkaloidní povahy, z nichž se 6 podařilo identifikovat. Tyto alkaloidy se řadí do galantaminového, krininového, lykorinového a homolykorinového strukturního typu (Tab. III; Obr. 16.). 3 látky se nám na základě jejich MS spekter nepodařilo identifikovat. Zbýlých 6 bylo určeno na základě porovnání dat s databází NIST a literatury. Výrazně zastoupený galantamin společně s dalšími alkaloidy galantaminového a lykorinového strukturního typu (Obr. 16.) je s velkou pravděpodobností zodpovědný za zajímavou inhibiční aktivitu vůči AChE $IC_{50} = 11,8 \pm 0,66 \mu\text{g/ml}$. Zbýlé identifikované alkaloidy krininové a homolykorinové řady dle literatury nejeví významné inhibiční účinky na cholinové esterázy.⁷⁹ Aktivita extraktu vůči HuBuChE $IC_{50} = 37,90 \pm 3,41 \mu\text{g/ml}$ je spíše nezajímavá. Minoritní zastoupení neidentifikovaných alkaloidů společně s nízkou aktivitou vůči HuBuChE a aktivitou vůči HuAChE vysvětlenou přítomností galantaminu činí tuto rostlinu dále spíše neperspektivní pro budoucí fytochemické práce.

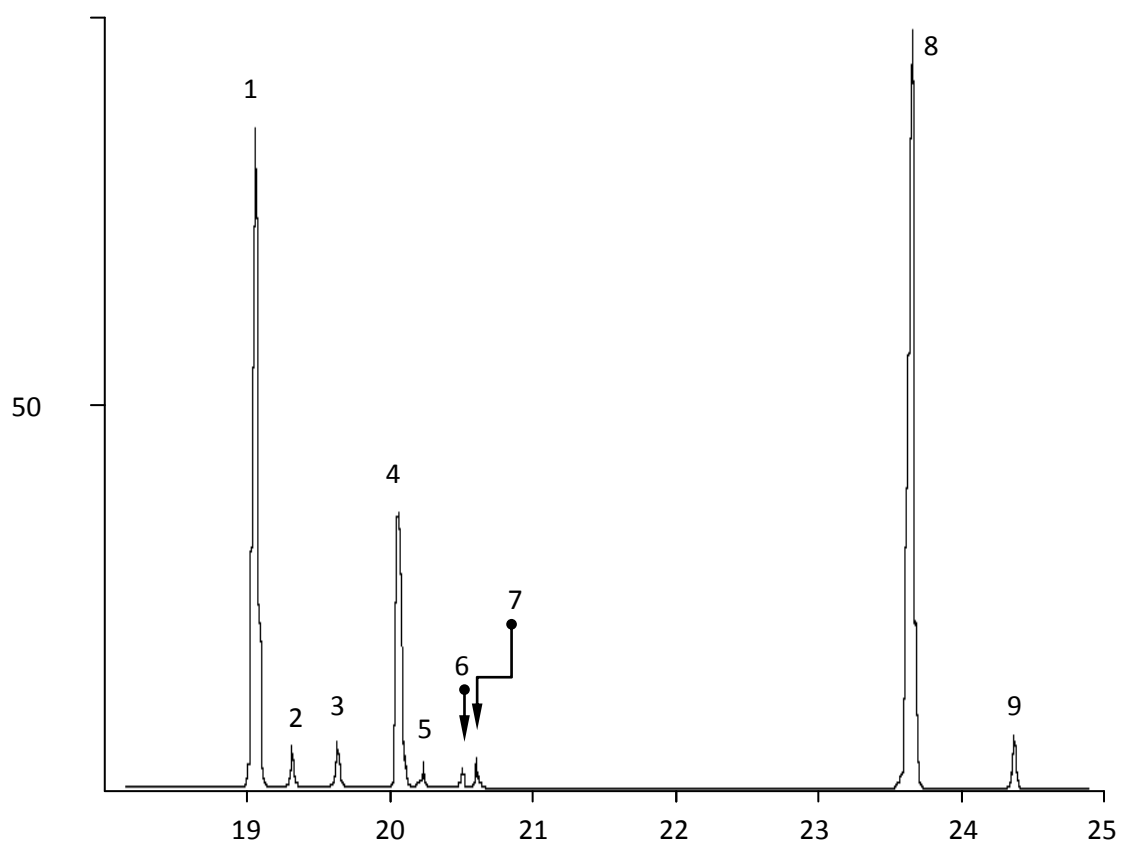


Obr. 14. *Narcissus* cv. Fortissimo⁸¹

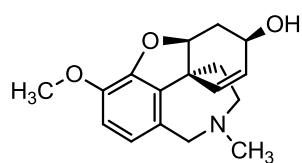
Tabulka III GC/MS analýza alkaloidního extraktu *N. cv. Fortissimo*

Sloučenina	RT ^a (min)	RI	[M ⁺] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita)	%TIC ^b	Reference pro MS
1 Galanthamin	19,09	2400	287(90), 286(100), 270(20), 244(30), 230(5), 216(45)	30	NIST
2 Lykoramin	19,34	2417	289(65), 288(100), 274(10), 232(10), 202(30)	2	NIST
4 Krinin	20,08	2465	271(100), 254(8), 242(8), 228(25), 216(14), 199(48), 187(43)	14	NIST
5 B1 ^c	22,24	2476	285(33), 284(33), 274(13), 273(62), 272(63), 252(13), 216(18), 188(30), 187(33), 174(19), 115(19), 109(100)	2	
6 O- Methyllykorenin	20,53	2494	331(1), 300(3), 207(5), 191(10), 147(5), 110(9), 109(100), 94(3), 82(2)	1	82
7 B3 ^c	20,62	2499	273(100), 230(25), 203(21), 202(25), 201(95), 189(58), 175(24), 174(21), 157(20), 128(22), 115(23)	2	
8 Galantin	23,64	2706	317(30), 298(15), 284(15), 268(15), 243(100), 242(95)	44	NIST
9 Homolykorin	24,34	2757	301(-), 207(1), 178(3), 110(8), 109(100), 108(20), 94(3), 82(3)	2	NIST + standard

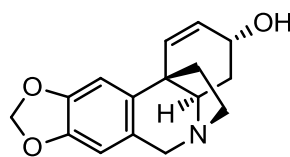
^a podmínky GC/MS analýzy viz experimentální část, ^b celkový iontový proud, ^c nebylo identifikováno



Obr. 15. Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *N. cv. Fortissimo*



1 galanthamin



4 krinin

Obr. 16. Vybrané struktury identifikovaných látek v rostlině *N. cv. Fortissimo*

5.3 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny *Narcissus* cv. Delnashaugh a jeho GC/MS analýza

Celkem 9 alkaloidů bylo nalezeno při fytochemické analýze kultivaru *Narcissus* cv. Delnashaugh (Obr. 17.). Identifikované alkaloidy patří do dvou strukturních skupin lykorinových a galantaminových alkaloidů s výjimkou haemanthaminu, který je zástupcem své vlastní skupiny. Níže uvedená tabulka předkládá úplný výčet určených alkaloidů a jejich hmotnostních spekter (Tab IV). Graf na Obr. 18 poté vyobrazuje zastoupení jednotlivých látek, z něhož je čitelné, že nejvíce je v extraktu obsažen galantamin a galantin. Právě příslušnost valné většiny alkaloidů v extraktu k lykorinovým a galantaminovým strukturním skupinám je zřejmě také příčinou velmi zajímavé inhibiční aktivity vůči HuAChE ($IC_{50} = 8,43 \pm 0,71 \mu\text{g/ml}$). Ve vysokém zastoupení byl také zjištěn alkaloid haemanthamin spadající do vlastní skupiny haemanthaminových alkaloidů, podobných skupině krininových, od kterých se liší pouze izomerií ethylenového můstku v pozici 5,10. Ani jeden z těchto strukturních typů ovšem neukázal zajímavou aktivitu vůči lidským cholinesterázám jak je dosud známo z literatury.⁸⁴ Zatím jedinou výjimkou se jeví alkaloidy undulatin a



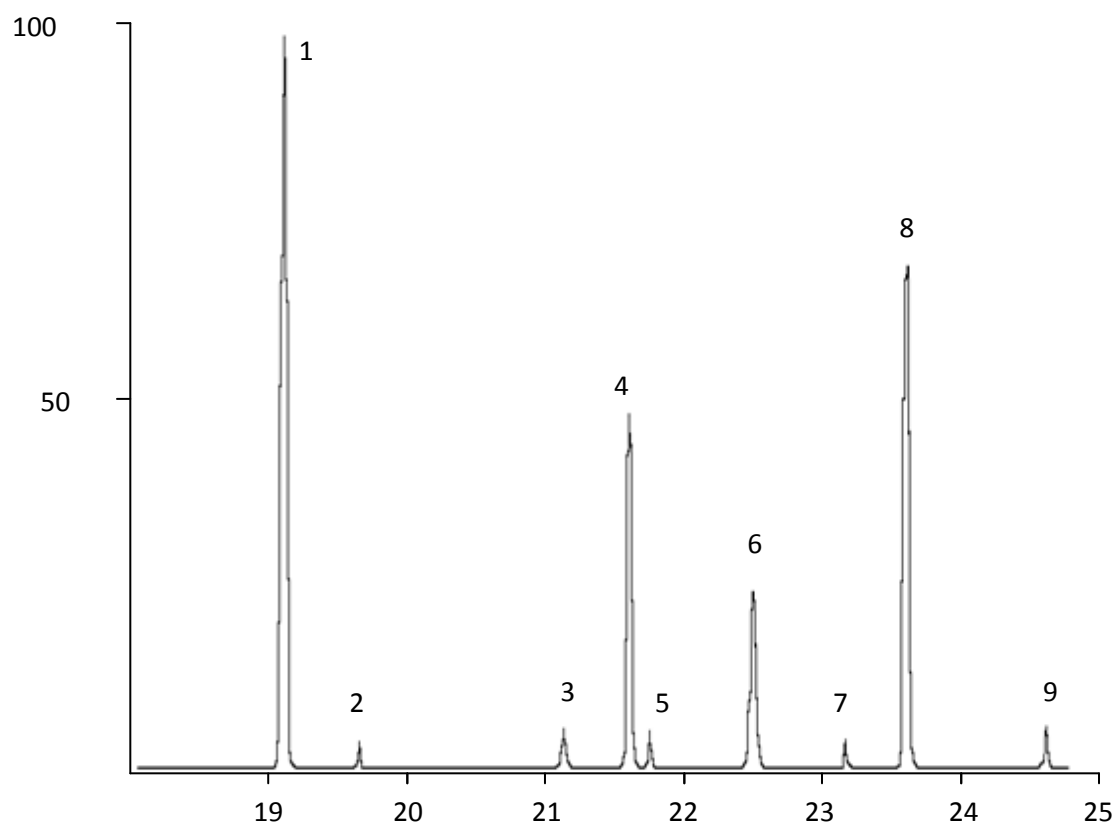
Obr. 17. *Narcissus* cv. Delnashaugh⁸³

8-O-demethylmaritidin, které určitou aktivitu prokázaly. Zvláště undulatin, alkaloid krininového strukturního typu, prokázal zajímavou inhibiční aktivitu vůči AChE a také pasivní permeabilitu přes hematoencefalickou bariéru.⁸⁵ Oproti slibnému výsledku inhibice HuAChE byla míra inhibičního působení na HuBuChE nezajímavá ($IC_{50} = 46,09 \pm 6,41 \mu\text{g/ml}$). Na následujícím obrázku (Obr. 19.) jsou uvedeny struktury některých alkaloidů identifikovaných v alkaloidním profilu studované rostliny. Z výše zmíněných důvodů se tato rostlina jeví spíše jako nezajímavá pro podrobnou fytochemickou studii.

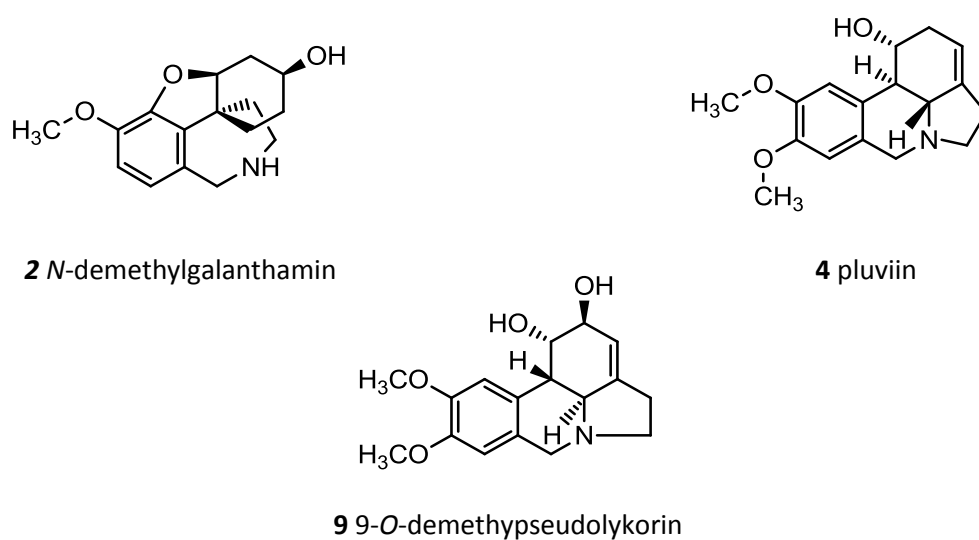
Tabulka IV GC/MS analýza alkaloidního extraktu *N. cv. Delnashaugh*.

Sloučenina	RT ^a (min)	RI	[M ⁺] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzita)	% TIC ^b	Reference pro MS
1 Galanthamin	19,09	2400	287(90), 286(100), 270(20), 244(30), 230(5), 216(45)	35	NIST
2 <i>N</i> - demethylgalantamin	19,34	2436	273(80), 272(100), 230(33), 202(27), 174(12)	2	86
3 Elwesin	21,14	2535	273(100), 256(14), 244(16), 230(25), 203(25), 201(100), 189(55), 175(25), 157(30), 131(17), 115(25)	2	NIST
4 Pluviin	21,59	2566	287(81), 286(48), 268(52), 254(15), 243(66), 242(100), 228(23)	17	NIST
5 Assoanin	21,74	2576	267(60), 266(100), 250(27), 222(10), 193(7), 180(10)	2	87
6 Haemanthamin	22,50	2627	301(15), 272(100), 240(15), 225(5), 211(15)	14	NIST
7 Didehydroassoanin	23,17	2674	265(82), 264(100), 248(17), 220(14), 191(14), 178(18)	1	80
8 Galanthin	23,61	2705	317(30), 298(15), 284(15), 268(15), 243(100), 242(95)	25	NIST
9 9- <i>O</i> - methylpseudolykorin	24,62	2777	303(28), 302(20), 284(20), 244(19), 243(96), 242(100), 228(17), 162(24)	2	NIST

^a podmínky GC/MS analýzy viz experimentální část, ^b celkový iontový proud, ^c nebylo identifikováno



Obr. 18. Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *N.* cv. Delnashaugh



Obr. 19. Vybrané struktury identifikovaných látek v rostlině *N.* cv. Delnashaugh

5.4 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny *Narcissus* cv. Sealing a jeho GC/MS analýza

V alkaloidním profilu cibulí okrasného kultivaru *Narcissus* cv. Sealing (Obr. 20.) bylo identifikováno nejširší spektrum látek ze všech studovaných rostlin. Celkem se podařilo určit 13 látek alkaloidní povahy, z nichž bylo 10 identifikováno. Identifikované alkaloidy lze zařadit do 4 různých strukturních skupin, z nichž největší podíl náleží alkaloidu haemanthaminu. Dalšími významně zastoupenými alkaloidy jsou galantamin a galantin, tedy skupiny galantaminové a lykorinové (Tab. V). Ostatní určené látky patří do řady homolykorinové, především pak homolykorin sám. Tento alkaloid byl v mé předchozí práci izolován z rostliny *Narcissus* cv. Sir W. Churchilli a podroben analýze inhibiční aktivity vůči esterázám, bohužel nebyly zjištěny zajímavé hodnoty biologické aktivity.¹⁵ Jak je známo, alkaloidy lykorinové řady s výjimkou lykorinu samotného jsou dobrými inhibitory AChE.^{79, 88} Alkaloid inkartin v tomto extraktu tuto aktivitu spíše postrádá.⁸⁹ Majoritní zastoupení haemanthaminu, které můžeme také vidět na chromatografickém záznamu (Obr. 21.), a spíše menší obsah alkaloidů galantaminové a lykorinové řady je zřejmě příčinou ne příliš významného inhibičního působení na HuAChE ($IC_{50} = 27,79 \pm 2,30 \mu\text{g/ml}$). Také IC_{50} HuBuChE nedosahovala vysokých hodnot ($IC_{50} = 38,66 \pm 4,64 \mu\text{g/ml}$). Na Obr. 22. je kromě struktury hippeastrinu zaznamenána struktura alkaloidu assoaninu, který patří mezi nejaktivnější inhibitory lykorinového typu.⁹⁰ Další podrobnější zkoumání této rostliny je vzhledem k výše zmíněným důvodům spíše nepravděpodobné.

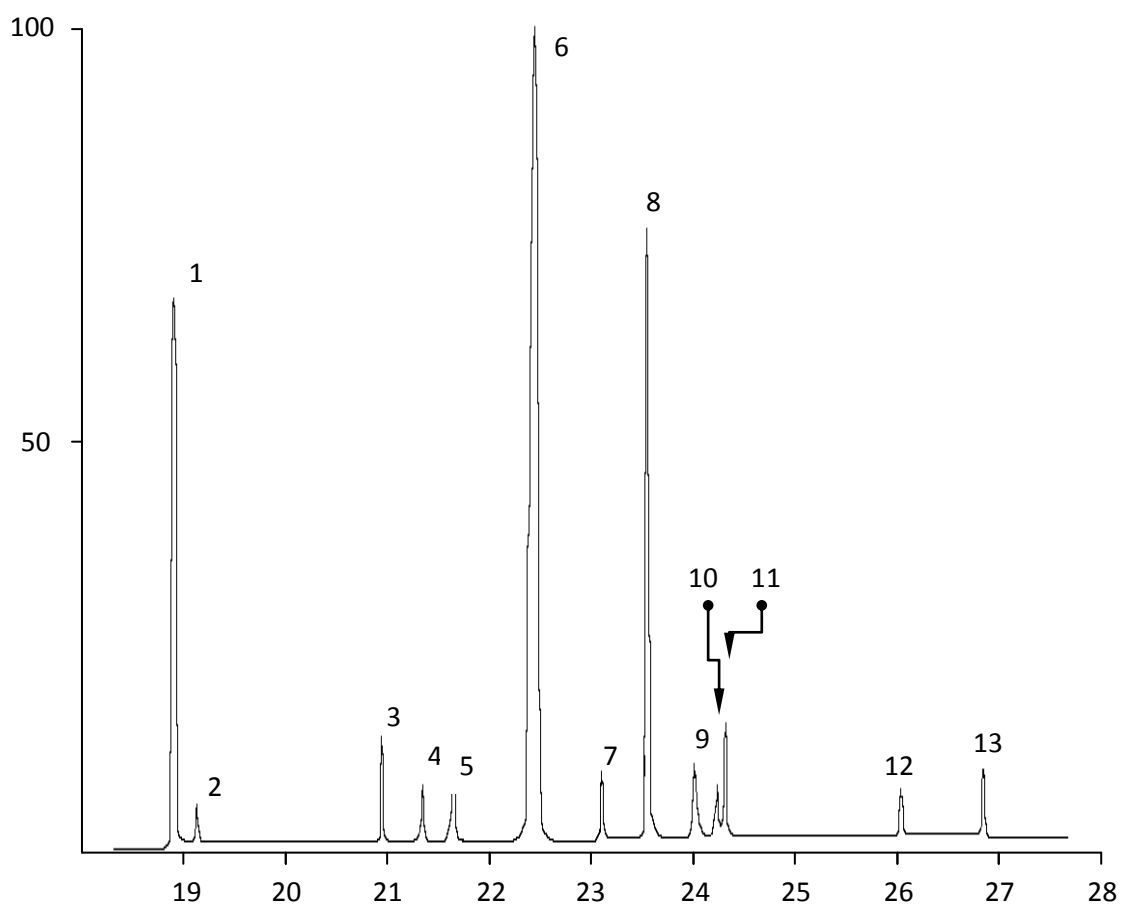


Obr. 20. *Narcissus* cv. Sealing⁹⁰

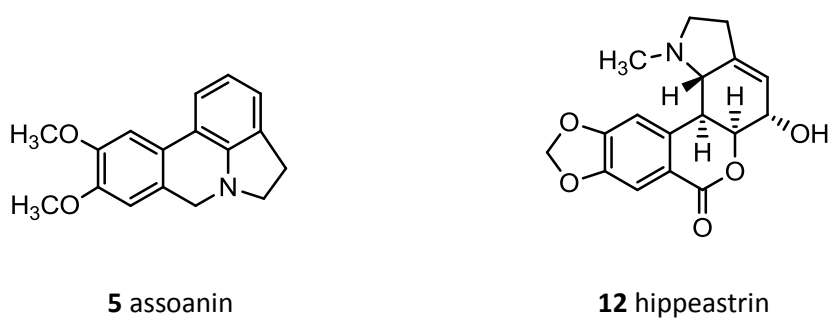
Tabulka V GC/MS analýza alkaloidního extraktu *N. cv. Sealing*.

Sloučenina	RT ^a (min)	RI	[M ⁺] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzita)	% TIC ^b	Reference pro MS
1 Galanthamin	19,09	2400	287(90), 286(100), 270(20), 244(30), 230(5), 216(45)	16	NIST
2 Lykoramin	19,35	2417	289(65), 288(100), 274(10), 232(10), 202(30)	2	NIST
3 D1 ^c	21,09	2532	329(70), 328(84), 270(33), 269(48), 267(22), 266(46), 254(22), 242(34), 240(30)	3	
4 D2 ^c	21,48	2558	287(75), 286(100), 270(22), 266(19), 258(25), 243(15), 242(45), 230(11)	1	
5 Assoanin	21,76	2575	267(60), 266(100), 250(27), 222(10), 193(7), 180(10)	3	87
6 Haemanthamin	22,54	2630	301(15), 272(100), 240(15), 225(5), 211(15)	43	NIST
7 11,12- Didehydroassoanin	23,18	2677	265(82), 264(100), 248(17), 220(14), 191(14), 178(18)	2	80
8 Galantin	23,61	2705	317(30), 298(15), 284(15), 268(15), 243(100), 242(95)	16	NIST
9 Lykorin	24,07	2738	287(35), 286(30), 268(20), 250(15), 227(70), 226(100)	3	NIST
10 Inkartin	24,07	2752	333(45), 332(100), 296(30), 259(70), 258(85), 250(30)	2	NIST
11 Homolykorin	24,36	2758	301(-), 207(1), 178(3), 110(8), 109(100), 108(20), 94(3), 82(3)	4	NIST
12 Hippeastrin	26,04	2880	315(-), 162((4), 134(4), 125(100), 96(36), 82(3)	2	NIST
13 D3 ^c	26,83	2940	295(93), 294(100), 278(11), 250(7), 237(5), 221(6), 208(5), 194(6), 178(7), 148(14)	2	

^a podmínky GC/MS analýzy viz experimentální část, ^b celkový iontový proud, ^c nebylo identifikováno



Obr. 21. Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *N. cv. Sealing*



Obr. 22. Vybrané struktury identifikovaných látek v rostlině *N. cv. Sealing*

5.5 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny *Narcissus* cv. Ice Follies a jeho GC/MS analýza

Tento zahradní druh narcisu na první pohled zaujme ledově bílými okvětními listy (Obr. 23.). Cibule této rostliny byly podrobeny fytochemické práci se ziskem širokého spektra alkaloidů. Chromatografický záznam z GC-MS analýzy je na obrázku dále (Obr. 24.). Celkem bylo určeno 10 alkaloidů patřících do 5 různých strukturních skupin. Jedna látka zůstala neznámá. Největší podíl z obsahu alkaloidů zastupoval galantamin, který spolu s narwedinem patří do skupiny galantaminových alkaloidů (Tab. VI). Dalšími hojně zastoupenými strukturními typy byly alkaloidy homolykorinové řady zde zastoupené massoninem, hippeastrinem, odulinem a jeho derivátem *O*-methylo-dulinem a haemanthaminové prezentující se samotným haemanthaminem, jenž zaujímá pětinu z naměřeného obsahu. Lykorin a krinín, kteří jsou zástupci vlastních strukturních řad, byli zastoupeni minoritně. Naměřená aktivita u tohoto extraktu byla velmi zajímavá a ve srovnání s ostatními rostlinami v této práci dosáhla nejlepších výsledků. Hodnota pro HuAChE byla $IC_{50} = 7,28 \pm 0,66 \mu\text{g/ml}$ a pro HuBuChE dokonce $IC_{50} = 14,95 \pm 2,01 \mu\text{g/ml}$. Inhibice acetylcholinesterázy se blíží inhibici galantaminu a s vysokou pravděpodobností bude způsobena právě jeho vysokým zastoupením, neboť ostatní zde nalezené skupiny aktivitu vůči HuAChE spíše postrádají.^{79, 88, 91} Zajímavou inhibiční aktivitu, kterou extrakt projevil proti HuBuChE však zatím přesně vysvětlit nedokážeme. Nabízí se možnost synergického působení homolykorinových alkaloidů, byť homolykorin sám takovou aktivitu nemá.¹⁵ Také



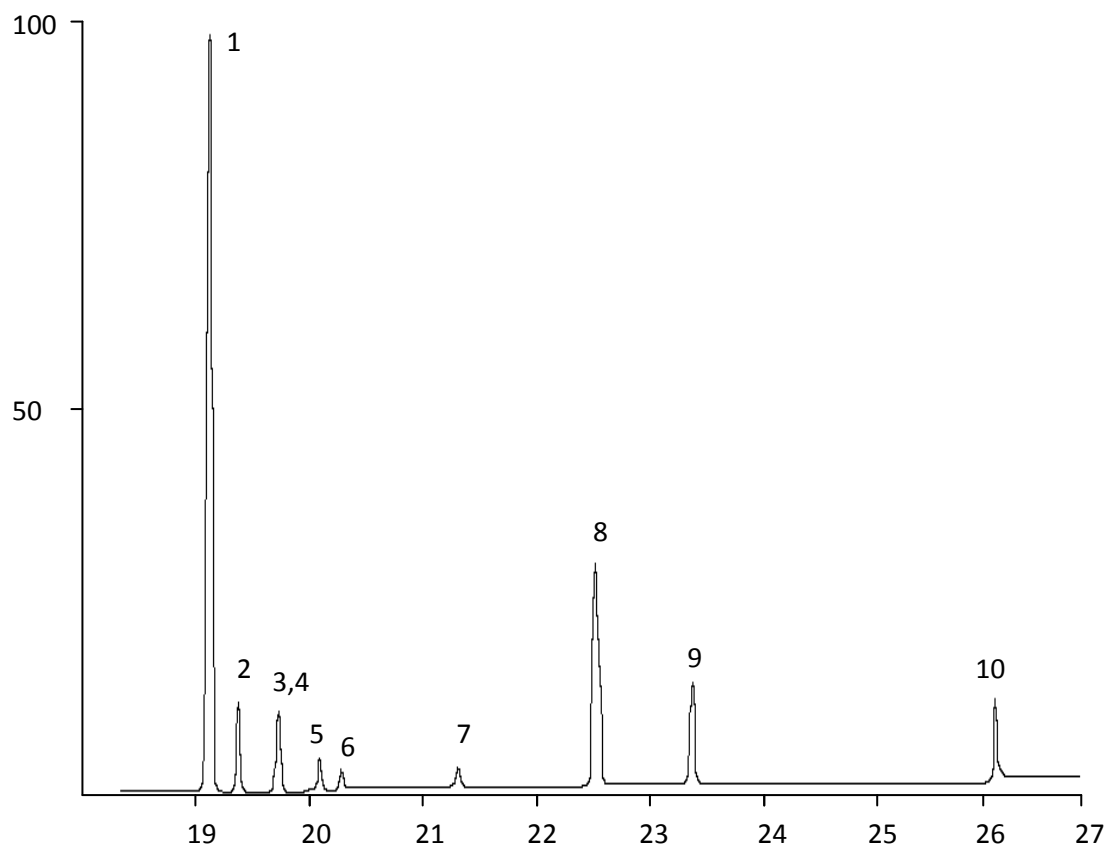
Obr. 23. *Narcissus* cv. Ice Follies⁹²

neidentifikované látky mohou být vysoce aktivní i v malém množství. Pro potvrzení či vyvrácení bude potřeba dalších studií v tomto směru. Pro zajímavý výsledek extraktu při tlumení HuBuChE skýtá *Narcissus* cv. Ice Follies potenciál k dalšímu zkoumání, zda některé z jeho alkaloidů jsou nositeli tohoto účinku. Na Obr. 25. jsou 2 zástupci alkaloidů z homolykorinové řady nalezené v této rostlině.

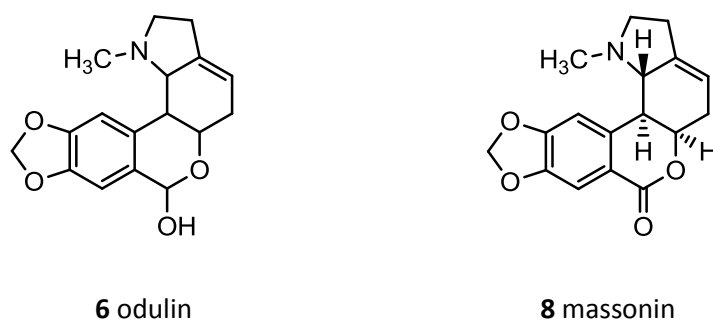
Tabulka VI GC/MS analýza alkaloidního extraktu *N.* cv. Ice Follies.

Sloučenina	RT ^a (min)	RI	[M ⁺] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita)	% TIC ^b	Reference pro MS
1 Galanthamin	19,10	2401	287(90), 286(100), 270(20), 244(30), 230(5), 216(45)	44	NIST
2 Lykorin	19,36	2418	287(35), 286(30), 268(20), 250(15), 227(70), 226(100)	7	NIST
3 E1 ^c	19,68	2440	287(65), 286(100), 258(5), 244(5), 230(6), 218(15), 216(10), 202(22), 187(17)	4	
4 O- Methyldulin	19,72	2442	315(<1), 284(2), 250(1), 175(10), 109(10)	5	93
5 Krinin	20,08	2465	271(100), 254(8), 242(8), 228(25), 216(14), 199(48), 187(43)	2	NIST
6 Narwedín	20,27	2477	285(90), 284(100), 242(25), 228(20), 216(43), 199(35), 174(50), 128(30), 115(32)	1	NIST
7 Odulin	23,32	2546	301(<1), 283(14), 209(7), 165(16), 133(7), 109(100), 108(29), 89(13)	3	93
8 Haemanthamin	22,52	2629	301(15), 272(100), 240(15), 225(5), 211(15)	21	NIST
9 Massonin	23,38	2688	299(<1), 190(2), 164(4), 134(1), 109(100), 108(23), 94(4), 82(2)	7	NIST
10 Hippeastrin	26,05	2881	315(-), 162((4), 134(4), 125(100), 96(36), 82(3)	6	38

^a podmínky GC/MS analýzy viz experimentální část, ^b celkový iontový proud, ^c nebylo identifikováno



Obr. 24. Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *N. cv. Ice Follies*



Obr. 25. Vybrané struktury identifikovaných látek v rostlině *N. cv. Ice Follies*

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

Posledním zkoumaným druhem je ozdobný *Narcissus canaliculatus* zobrazený na následujícím obrázku (Obr. 26.). V naší laboratoři byl podroben fytochemickému rozboru s následujícími výsledky. Identifikováno bylo celkem 5 alkaloidů galantaminového a lykorinového typu a tazettin spadající do vlastní strukturní řady. Všechny látky se nám podařilo popsat dle záznamů z literatury a porovnání jejich MS spekter s knihovnou spekter NIST (Tab. VII). Prakticky celý extrakt tvoří tři alkaloidy: lykorin zastoupený z 80% v celém extraktu a dále galantamin a tazetin s vyrovnaným zastoupením blížícím se 10%. V nepatrných množstvích byl zachycen lykorinový derivát 11,12-didehydroanhydrolykorin a lykoramin, který náleží alkaloidům galantaminového strukturního typu. Obě struktury jsou zobrazeny na Obr. 28. Extrakt z cibulí tohoto narcisu inhiboval HuAChE nejvíce ze všech testovaných ($IC_{50} = 6,39 \pm 0,68 \mu\text{g/ml}$). Vystává otázka, které alkaloidy jsou za tuto aktivitu zodpovědné, neboť drtivě převažující lykorin jak známo takovou aktivitu nemá.^{79, 84, 88} Nabízí se teorie⁷⁹, že zvýšení inhibičního účinku může být spojeno s planární konformací C kruhu, který má 11,12-didehydroanhydrolykorin aromatizovaný podobně jako neaktivnější lykorinový



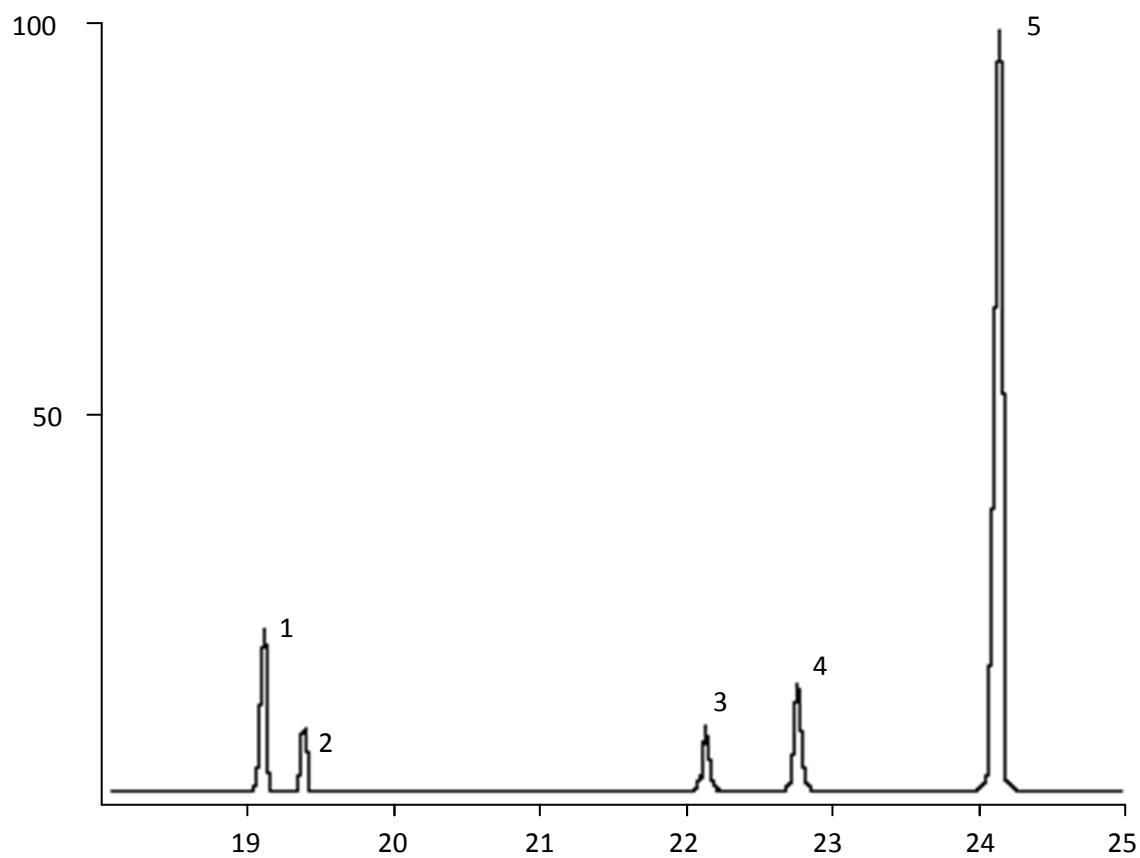
Obr. 26. *Narcissus canaliculatus*⁹⁴

alkaloid assoanin. Pro potvrzení tohoto předpokladu je potřeba dalších podrobnějších studií a izolace tohoto derivátu pro změření jeho aktivity. Ani dále přítomný tazettin nepatří k významným AChE inhibitorům.⁷⁹ Vzhledem k nízkému obsahu galantaminu nepředpokládám, že za zvýšenou aktivitou stojí tato látka. Oproti tomu působení na HuBuChE takto zajímavé nebylo ($IC_{50} = 43,71 \pm 4,68 \mu\text{g/ml}$) a bylo jedním z nejslabších v této práci. Na Obr. 27. je chromatografický záznam z GC/MS analýzy.

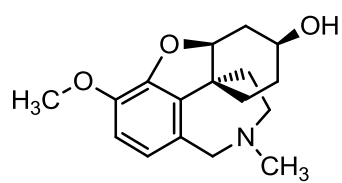
Tabulka IIIII GC/MS analýza alkaloidního extraktu *N. canaliculatus*.

Sloučenina	RT ^a (min)	RI	[M ⁺] a	% TIC ^b	Reference pro MS
			charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzita)		
1 Galanthamin	19,78	2399	287(90), 286(100), 270(20), 244(30), 230(5), 216(45)	10	NIST
2 Lykoramin	19,34	2417	289(65), 288(100), 274(10), 232(10), 202(30)	<1	NIST
3 11,12-Didehydroanhydrolykorin	22,08	2598	249(48), 248(100), 190(15), 95(17)	<1	55
4 Tazettin	22,73	2644	331(20), 316(20), 298(25), 247(100), 230(10)	9	NIST
5 Lykorin	24,12	2741	287(35), 286(30), 268(20), 250(15), 227(70), 226(100)	80	NIST

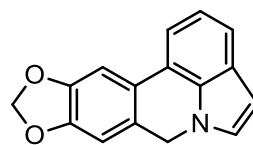
^a podmínky GC/MS analýzy viz experimentální část, ^c nebylo identifikováno



Obr. 27. Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *N. canaliculatus*



2 lykoramin



3 11, 12-didehydroanhydrolykorin

Obr. 28. Vybrané struktury identifikovaných látek v rostlině *N. canaliculatus*

6 ZÁVĚR

V této práci byly podrobeny studii extrakty z čerstvých cibulí 6 druhů (botanických nebo kultivarů) narcisů z čeledi *Amaryllidaceae*. Byly identifikovány alkaloidy různých strukturních skupin charakteristických pro tento rod. Identifikace byla provedena porovnáním s daty v literatuře nebo porovnáním spekter látek dříve izolovaných na pracovišti. Některé látky se nepodařilo na základě EI hmotnostních spekter určit. S velkou pravděpodobností se může jednat o nové, dosud nepopsané struktury *Amaryllidaceae* alkaloidů. U některých z nich ale bude jejich kompletní charakterizace náročná vzhledem k zastoupení, ve kterém se v alkaloidních extraktech nacházely (TIC \leq 1%).

Záměrem této studie bylo testování inhibice lidských cholinesteráz alkaloidními extrakty vybraných druhů rodu *Narcissus* za účelem vybrání nejvhodnějších rostlin k podrobným fytochemickým studiím, v rámci kterých by mohly být izolovány látky se zajímavými biologickými aktivitami. Ze získaných výsledků nejzajímavější aktivitu vůči HuAChE vykázal extrakt z rostliny *Narcissus canaliculatus*. Vzhledem ke spektru identifikovaných alkaloidů je hodnota $IC_{50} = 6,39 \pm 0,68 \mu\text{g/ml}$ velmi zajímavá, neboť zde zřejmě nejde o inhibici galantaminových alkaloidů, které jsou zde zastoupeny jen minoritně přítomným galantaminem a lykoraminem. Ani nejvíce obsažený lykorin takovou aktivitou nevyniká.^{79, 84, 88} Nabízí se tedy možnost významné aktivity méně zastoupených alkaloidů, či synergické působení obsažených látek. Dalším zajímavým druhem byl *Narcissus* cv. Ice Follies, který ukázal nejlepší inhibicí vůči oběma esterázám. Inhibice HuAChE, jež dosáhla hodnoty $IC_{50} = 7,28 \pm 0,66 \mu\text{g/ml}$, je zřejmě způsobena přítomností galantaminových alkaloidů, ovšem zajímavý výsledek inhibice HuBuChE ($IC_{50} = 14,95 \pm 2,01 \mu\text{g/ml}$) zatím nelze s určitostí vysvětlit pro nedostatek podrobnějších studií. Hojně zastoupené homolykorinové alkaloidy zde mohou hrát svou roli. Toto bude potřeba zjistit další podrobnější prací. Také *Narcissus bulbocodium* var. *conspicus* prokázal zajímavé působení proti HuBuChE. Se svým výsledkem $IC_{50} = 22,37 \pm 3,14 \mu\text{g/ml}$ patří k nejlepším ze zde testovaných a ze stejných důvodů popsaných dříve u druhu *Narcissus* cv. Ice Follies bude potřeba další analýzy pro objasnění této vysoké inhibice. Navíc u této rostliny zůstalo velké množství neidentifikovaných alkaloidů, které také mohou být potenciálními nositeli těchto inhibičních účinků. Bude tedy rozhodně účelné podrobit tento druh k dalšímu podrobnějšímu zkoumání.

Jak ze zadání této rigorozní práce vyplývá, je třeba určit druhy nejvhodnější k dalším fytochemickým analýzám. Nejlepších parametrů tedy dosahují rostliny *Narcissus bulbocodium* var. *conspicus* pro velký potenciál objevu neznámých alkaloidů a látek s vysokou inhibiční aktivitou vůči HuBuChE, dále *Narcissus* cv. Ice Follies pro nejlepší výsledek tlumení HuBuChE, který je třeba objasnit a konečně *Narcissus canaliculatus*, u něhož bude potřeba vyjasnit zajímavou inhibici HuAChE, která zřejmě není zapříčiněna galantaminovými alkaloidy. Zbylé druhy narcisů nevykázaly dostatečnou míru inhibice, nebo jejich výsledek byl s vysokou pravděpodobností objasněn již známými okolnostmi.

7 LITERATURA

1. Opletal L., Opletalová V. *Lék a jeho vývoj v dějinách*. Karolinum, Praha, **1999**, 128 s.
2. Opletal L. Prologomenon české farmakognozie: 21. století. *Česk. Slov. Farm.* **2013**, *62*, 99-102.
3. Jiráček R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia* **2009**, *5*.
4. Heinrich M. Galanthamine from *Galanthus* and other *Amaryllidaceae* – chemistry and biology based on traditional use. *Alkaloids* **2010**, *68*, 157-165.
5. *ADINACO Research Group* [online]. 2015 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: <http://portal.faf.cuni.cz/Groups/ADINACO/>
6. Hejný S., Slavík B. *Květena ČSSR. 2. díl*. Academia, Praha, **1988**, 783 s.
7. Kubát K. et al. *Klíč ke květeně České republiky*, Academia, Praha, **2002**, 928 s.
8. Jin Z. *Amaryllidaceae* and *Sceletium* alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 363-81.
9. *Zahradnický portál Zeleně: Narcissus cyclamineus* [online]. 2015 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: http://www.zelen.cz/detail_galerie_rostlin/Narcissus_cyclamineus_Peeping_Tom_narcis
10. *Typicalgardener's Blog: Eucharis amazonica* [online]. 2010 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: <https://typicalgardener.wordpress.com/2010/11/04/eucharist-lily-eucharis-amazonica/>
11. *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* [online]. 2001 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: <http://www.amaryllidaceae.org/photo/Chesnais/Hippeastrum-reticulatum-hyb.htm>
12. Kornieko A., Evidente A. Chemistry, biology and medicinal potential of narciclasine and its congener. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1982-2014.
13. Fennel C.W., van Staden J. *Crinum* species in traditional and modern medicine. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *78*, 15-26.
14. Hermezc I., Kánai K. Prolyl endopeptidase inhibitors. II *Farmaco.* **2000**, *55*, 188-190.

15. Hrstka V. Neurotropní a antioxidační aktivita vybraných druhů jednoděložných alkaloidních rostlin. IV. Hradec Králové, 2013. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie.
16. Bastida J., Codina C., Viladomat F., Rubiralta M., Quirion J.C., Husson H.P. 9-O-Demethyl-2 α -hydroxyhomolycorine, an alkaloid from *Narcissus tortifolius*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2683-2684.
17. Berkov S., Sidjimova B., Evstatieva L., Popov S. Intraspecific variability in the alkaloid metabolism of *Galanthus elwesii*. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 579-586.
18. Latvala A., Önür M.A., Gözler T., Linden A., Kivcak B., Hesse M. Alkaloids of *Galanthus elwesii*. *Phytochemistry* **1995**, *39*, 1229-1240.
19. Szlávik L., Gyuris Á., Minárovits J., Forgo P., Molnár J., Hohmann J. Alkaloids from *Leucojum vernalis* and antiretroviral activity of *Amaryllidaceae* alkaloids. *Planta Med.* **2004**, *70*, 871-873.
20. Boit H.G., Stender W., Beitner A. XVII. Mitteil. über Amaryllidaceen-Alkaloide. Die Alkaloide einiger Gartensorten von *Narcissus Jonquilla*, *N. triandrus* und *N. cyclamineus*. *Chem. Ber.* **1957**, *90*, 725-728.
21. Bastida J., Viladomat F., Llabrés J.M., Codina C., Feliz M., Rubiralta M. Alkaloids from *Narcissus confusus*. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1519-1524.
22. Cahlíková L., Benešová N., Macáková K., Kučera R., Hrstka V., Klimeš J., Jahodář L., Opletal L. Alkaloids from some *Amaryllidaceae* species and their cholinesterase activity. *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7*, 571-574.
23. Cahlíková L., Zavadil S., Macáková K., Valterová I., Kulhánková A., Hošťálková A., Kuneš J., Opletal L. Isolation and cholinesterase activity of *Amaryllidaceae* alkaloids from *Nerine bowdenii*. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, *6*, 1827-1830.
24. Abdallah O. M. Narcisine, an alkaloid from *Narcissus tazetta*. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 1447-1448.
25. Tani S., Kobayashi N., Fujiwara H., Shingu T., Kato A. Isolation of O-methylmaritidine from bulbs of *Narcissus tazetta* L. *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 3381-3384.

26. Kulhánková A., Cahlíková L., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Opletal L. Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase-inhibitory activity. *Chem. Biodiv.* **2013**, *10*, 1120-1127.
27. Ma G-E., Li H-Y., Lu Ch-E., Yang X-M. Hong S-H. 6a/6b-Hydroxy-3-O-methylepipimaritidine, Two new alkaloids from *Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem. *Heterocycles* **1986**, *24*, 2089-2092.
28. Boit H.G., Döpke W. Alkaloide von *Narcissus tazetta* und *N. poeticus* (XIII. Mitteil.: Über Amaryllidaceen-Alkaloide). *Chem. Ber.* **1956**, *89*, 2462-2465.
29. Boit H-G. Stender A.W. Über die Alkaloide von *Narcissus poeticus* (I. Mitteil. über Amaryllidaceen-Alkaloide). *Chem. Ber.* **1954**, *87*, 624-627.
30. Koorbanally N., Mulholland D.A., Crouch N.R. Alkaloids and triterpenoids from *Ammocharis coranica*. *Phytochemistry* **2000**, *54*, 93-97.
31. Yang H., Yoon K.D., Chin Y-W., Kim Y.C., Kim J. The isolation of acetylcholinesterase inhibitory constituents from *Lycoris radiata* using online HPLC-biochemical detection system. *Nat. Prod. Sci.* **2010**, *16*, 228-232.
32. Feng T., Wang Y.Y., Su J., Li Y., Cai X-H., Luo X-D. *Amaryllidaceae* alkaloids from *Lycoris radiata*. *Helv. Chim. Acta.* **2011**, *94*, 178-183.
33. Crouch N.R., Chetty J., Mulholland D.A., Ndlovu E. Bulb alkaloids reputedly psychoactive *Brunsvigia radulosa* (*Amaryllidaceae*). *S. Afr. J. Bot.* **2002**, *68*, 86-89.
34. Kitajima M., Kinoshita E., Kogure N., Takayama H. Two new alkaloids from bulbs of *Lycoris squamigera*. *Heterocycles* **2009**, *77*, 1389-1396.
35. Nair J.J., Cambell W.E., Brun R., Viladomat F., Codina C., Bastida J. Alkaloids from *Nerine filifolia*. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 373-382.
36. Cahlíková L., Macáková K., Zavadil S., Jiroš P., Opletal L., Urbanová K., Jahodář L. Analysis of *Amaryllidaceae* alkaloids from *Chlidanthus fragrans* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, *6*, 603-606.
37. Cahlíková L., Hrabínová M., Kulhánková A., Benešová N., Chlebek J., Jun D., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Opletal L. Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyloligopeptidase activities. *Nat. Prod. Commun.* **2013**, *8*, 1541-1544.

38. Pigni N. B., Ríos-Ruiz S., Martínez-Francés V., Nair J. J., Viladomat F., Codina C., Bastida J. Alkaloids from *Narcissus serotinus*. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1643-1647.
39. Kreh, M., Matusch R. *O*-Methyloduline and *N*-demethylmasonine, alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus*. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 1533-1535.
40. Giordani R.B., de Andrade J.P., Verli H., Dutilh J.H., Henriques A.T., Berkov S., Bastida J., Zuanazzi J.A.S. Alkaloids from *Hippeastrum morelianum* Lem. (*Amaryllidaceae*). *Magn. Reson. Chem.* **2011**, *49*, 668-672.
41. Machocho A.K., Bastida J., Codina C., Viladomat F., Brun R., Chhabra S.C. Augustamine type alkaloids from *Crinum kirkii*. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 3143-3149.
42. Ghosal S., Singh S., Kumar Y., Srivastava R.S. Chemical constituents of *Amaryllidaceae*. Part. 29. Isocarbostryl alkaloids from *Haemanthus kalbreyeri*. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 611-613.
43. Pettit G.R., Gaddamidi V., Herald D.L., Singh S.B., Cragg G.M., Schmidt J.M., Boettner F.E., Williams M., Sagawa Y. Antineoplastic agents, 120. *Pancratium littorale*. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 995-1002.
44. Noyan S., Rentsch G.H., Onur M.A., Gozler T., Gozler B., Hesse M. The gracilines: a novel subgroup of the *Amaryllidaceae* alkaloids. *Heterocycles* **1998**, *48*, 1777-1791.
45. Buková V. Alkaloidy rostlin čeledi *Amaryllidaceae* a jejich biologická aktivita (1960-2010). Hradec Králové, 2011. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra farmaceutické botaniky a ekologie.
46. Ünver N., Kaya G.I., Verpoorte R., Gözler B. Galanthindole: a new indole alkaloid from *Galanthus plicatus* ssp. *byzantinus*. *Planta Med.* **2003**, *69*, 869-871.
47. Labraña A., King'ori M.K., Brun R., Codina C., Viladomat F., Bastida J. Alkaloids from *Narcissus angustifolius* subsp. *transcarpathicus* (*Amaryllidaceae*). *Phytochemistry* **2002**, *60*, 847-852.
48. Viladomat F., Bastida J., Codina C., Campbell W.E., Mathee S. Alkaloids from *Boophane flava*. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 307-311.

49. Ünver N., Gözler T., Walch N., Gözler B., Hesse M. Two novel dinitrogenous alkaloids from *Galanthus plicatus* ssp. *byzantinus* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry* **1999**, *50*, 1255-1261.
50. Velten R., Erdelen Ch., Gehling M., Göhrt A., Gondol D., Lenz J., Lockhoff O., Wachendorff U., Wendisch D. Cripowellin A and B, a novel type of Amaryllidaceae alkaloid from *Crinum powelii*. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1737-1740.
51. Pigni N.B., Ríos-Ruiz S., Luque F.J., Viladomat F., Codina C. Wild daffonils of section Ganymedes from the Iberian Peninsula as a source of mesembrane alkaloids. *Phytochemistry* **2013**, *95*, 384-393.
52. Bastida J., Viladomat F., Llabrés J.m., Ramírez G., Codina C. *Narcissus* alkaloids VIII. Mesembrenone: an unexpected alkaloid from *Narcissus pallidus*. *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 478-480.
53. Berkov S., Martínéz-Francés V., Bastida J., Codina C., Ríos S. Evolution of alkaloid biosynthesis in genus *Narcissus*. *Phytochemistry* **2014**, *99*, 95-106.
54. Vaněk V. a kol., *Tulipány, narcisy, hyacinty*. SZN, Praha, **1974**, 197 s.
55. Havlasová J., Šafratová M., Siatka T., Štěpánková S., Novák Z., Ločárek M., Opletal L., Hrabínová M., Jun D., Benešová N., Kuneš J., Cahlíková L. Chemical composition of bioactive alkaloid extracts from some *Narcissus* species and varieties and their biological activity. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, *9*, 1151-1155.
56. Cahlíková L., Benesová N., Macáková K., Urbanová K., Opletal L. GC/MS analysis of three Amaryllidaceae species and their cholinesterase activity. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, *6*, 1255-1258.
57. Cahlíková L., Macáková K., Zavadil S., Jiroš P., Opletal L., Urbanová K., Jahodář L. Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Chlidanthus fragrans* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, *6*, 603-606.

58. *Sternbergia lutea* [online]. 2015 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z:[http://lh6.ggpht.com/luirig/R5xo65TeVSI/AAAAAAAAALF0/3dCGY5Wv92o/s800/sternbergia lutea 24.jpg](http://lh6.ggpht.com/luirig/R5xo65TeVSI/AAAAAAAAALF0/3dCGY5Wv92o/s800/sternbergia+lutea+24.jpg)
59. *Australian gardener: Chlidanthus fragrans* [online]. 2009 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z:<http://www.ausgardener.com.au/pages.php?pageid=41%20>
60. Irazusta, J., Larrinaga G., González-Maeso J., Gil J., Meana J.J., Casis L.. Distribution of prolyl endopeptidase activities in rat and human brain. *Neurochem. Int.* **2002**, *40*, 337-345.
61. *Lilium aquae: Zephyranthes robusta* [online]. 2009 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z:<http://www.liliumaquae.com/it/gallery/perenni-per-terreno-umido/zephyranthes-robusta/>
62. Safratová M., Novák Z., Kulhánková A., Kunes J., Hrabínová M., Jun D., Macáková K., Opletal L., Cahlíková L. Revised NMR data for 9-O-demethylgalanthine: an alkaloid from *Zephyranthes robusta* (Amaryllidaceae) and its biological activity. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, *9*, 787-788.
63. Peltonen I., Pekka T. M. Effects of diverse psychopharmacological substances on the activity of brain prolyloligopeptidase. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2011**, *108*, 46-54.
64. Larrinaga G., Perez I., Blanco L., López J. I., Andrés L., Etxezarraga C., Santaolalla F., Zabala A., Varona A., Irazusta J. Increased prolyl endopeptidase activity in human neoplasia. *Regul. Pept.* **2010**, *163*, 102-106.
65. Bastida J., Lavilla R., Viladomat F. Chapter 3 Chemical and Biological Aspects of *Narcissus Alkaloids*. *Alkaloids Chem. Biol.* **2006**, *63*, 87-179.
66. Ghosal S., Singh S., Kumar Y., Unnikrishnan S., Chattopadhyay S. The role of ungeremine in the growth-inhibiting and cytotoxic effects of lycorine: Evidence and speculation. *Planta Med.* **1988**, *54*, 114-116.
67. Zee-Cheng R. K. Y., Yan S-J., Cheng C. C.. Antileukemic activity of ungeremine and related compounds. Preparation of analogs of ungeremine by a practical photochemical reaction. *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 199-203.

68. Dalecká M., Havelek R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L. Alkaloidy rostlin čeledi *Amaryllidaceae* jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chem. Listy*. **2013**, *107*, 701-708.
69. Evidente A., Andolfi A., Abou-Donia A. H., Touema S. M., Hammoda H. M., Shawky E., Motta A. (-)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2113-2118.
70. Nkanwen E.R., Gatsing D., Ngamga D., Fodouop S.P., Tane P. Antibacterial agents from the leaves of *Crinum purpurascens* herb (*Amaryllidaceae*). *Afr. Health Sci.* **2009**, *9*, 264-269.
71. Abou-donia A.H., Toaima S.M., Hammoda H.M., Shawky E., Kinoshita E., Takayama H. Phytochemical and biological investigation of *Hymenocallis littoralis* SALISB. *Chem. Biodivers.* **2008**, *5*, 332-340.
72. Phan T. S., Tran B. D., Phan M.G., Nguyen T.M., Hoang T.H., Le M.H. Investigation of antimicrobial and cytotoxic properties of alkaloids from some species of *Crinum* in Vietnam. *Tap Chi Duoc Hoc.* **2003**, *4*, 18-21.
73. Iannello C., Bastida J., Bonvicini F., Antognoni F., Gentilomi G.A., Poli F. Chemical composition, and in vitro antibacterial and antifungal activity of an alkaloid extract from *Crinum angustum* Steud. *Nat. Prod. Res.* **2014**, *28*, 704-710.
74. *Hymenocallis littoralis* [online]. 2010 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: <http://alltheplants3.blogspot.cz/2010/11/hymenocallis-littoralis-spider-lily.html>
75. *Plant delight nursery, Inc: Crinum latifolium* [online]. 2015 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: <http://www.plantdelights.com/Crinum-latifolium-D-Lehmiller/>
76. Cortes N., Posada-Duque R.A., Alvarez R., Alzate F., Berkov S., Cardona-Gómez G.P., Osorio E. Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five *Amaryllidaceae* species: A comparative study. *Life Sci.* **2015**, *122*, 42-50.
77. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr., Feather-Stone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88-95.
78. *Lyn and malcolms garden: Narcissus bulbocodium var. conspicus* [online]. 2011 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: <http://www.lynandmalc.co.uk/genus/Narcissus/slides/Narcissus%20bulbocodium%20Conspicuous.html>

79. López S., Bastida J., Viladomat F., Codina C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some *Amaryllidaceae* alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sci.* **2002**; *71*, 2521-2529.
80. Torres J.C., Pinto A.C., Garden S.J. Application of a catalytic palladium biaryl synthesis reaction, via C-H functionalization, to the total synthesis of *Amaryllidaceae* alkaloids. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 9889-9900.
81. *Tradewinds international: Narcissus* cv. Fortissimo [online]. 2015 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: <http://tradewindsinternational.ca/product/narcissus-Fortissimo/>
82. de Andrade J.P., Pigni N.B., Torras-Claveria L., Berkov S., Codina S., Viladomat F., Bastida J. Bioactive alkaloid extract from *Narcissus broussonetii*: Mass spectral studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *70*, 13-25.
83. *Narcissus* cv. Delnashaugh [online]. 2007 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: <http://base.bestgarden.ru/plant/Delnashaugh/>
84. Elgorashi E. E., Stafford G. I., Van Staden J. Acetylcholinesterase Enzyme Inhibitory Effects of *Amaryllidaceae* Alkaloids. *Planta Med.* **2004**, *70*, 260-262.
85. Cahlíkova L., Pérez D.I., Štěpánková Š., Chlebek J., Šafránová M., Hošťálková A., Opletal L. *In Vitro* Inhibitory Effects of 8-O-Demethylmaritidine and undulatine on acetylcholinesterase and their predicted penetration across the blood–brain barrier. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1189-1192.
86. Berkov S., Pavov A., Ilieva M., Burrus M., Popov S., Stanilova M. CGC-MS of alkaloids in *Leucojum aestivum* plants and their in vitro cultures. *Phytochem. Anal.* **2005**, *19*, 98-103.
87. Llabrés J.M., Viladomat F., Bastida J., Codina C., Rubiralta M. Phenanthridine alkaloids from *Narcissus assoanus*. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 2637-2638.
88. Houghton P., Ren Y., Howes M. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 181-189.
89. Berkov S., Reyes-Chilpa R., Codina C., Viladomat F., Bastida J. Revised NMR data for Incartine: an Alkaloid from *Galanthus elwesii*. *Molecules* **2007**, *12*, 1430-1435.
90. *Daffodil bulbs: Narcissus* cv. Sealling [online]. 2015 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: <http://www.daffodil-bulbs.co.uk/shop/4584954382/Sealing-wax/8348299>

91. Kulhánková A., Cahlíková L., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Opletal L.. Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and Their Acetylcholinesterase- and Butyrylcholinesterase-Inhibitory Activity. *Chem. Biodivers.* **2013**, *10*, 1120-1127.
92. *Safro Milan Havlis: Narcissus* cv. Ice Follies [online]. 2015 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: <http://www.havlis.cz/karta.php?kytkaid=253>
93. Kreh M., Matusch R., Witte L. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of *Amaryllidaceae* alkaloids. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 773-776.
94. *Kylemore Abbey: Narcissus canaliculatus* [online]. 2013 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: <http://www.kylemoreabbeytourism.ie/garden-diary-for-april-2013/>

8 SEZNAM ZKRATEK

AA	<i>Amaryllidaceae</i> alkaloidy
AD	Alzheimerova choroba
AChE	Acetylcholinesteráza
BuChE	Butyrylcholinesteráza
cv.	Kultivar
DTNB	Kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová
GC	Plynová chromatografie
HuAChE	Humánní acetylcholinesteráza
HuBuChE	Humánní butyrylcholinesteráza
IC	Inhibiční koncentrace
MS	Hmotnostní spektrometrie
NIST	Knihovna hmotnostních referenčních spekter
POP	Prolyloligopeptidáza
RI	Retenční index
RT	Retenční čas
TIC	Celkový iontový proud
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor alfa
TRH	Thyreotropní hormon
USA	Spojené státy americké

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Mgr. Václav Hrstka

Konzultant: Doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Název rigorózní práce: Alkaloidy rodu *Narcissus* (*Amaryllidaceae*) a jejich biologická aktivita.

Náplní této rigorózní práce byla příprava alkaloidních extraktů 6 vybraných druhů rostlin z rodu *Narcissus*. Sumární extrakty byly podrobeny GC/MS analýze pro identifikaci jednotlivých alkaloidů a změřeny na inhibiční aktivitu vůči lidské acetylcholin- a butyrylcholinesteráze. Ze získaných výsledků byly následně vytipovány nejvhodnější druhy k podrobnějším fytochemickým studiím.

Z testovaných rostlin vykázal nejvyšší aktivitu vůči HuAChE extrakt z cibulí *Narcissus canaliculatus*, a to $IC_{50} = 6,39 \pm 0,68 \mu\text{g/ml}$. Nejlepší inhibiční účinek na obě esterázy měl extrakt z rostliny *Narcissus* cv. Ice Follies, pro něhož byly získány následující hodnoty inhibice ($IC_{50} = 7,28 \pm 0,66 \mu\text{g/ml}$ pro HuAChE a $IC_{50} = 14,95 \pm 2,01 \mu\text{g/ml}$ pro HuBuChE), což je zároveň nejlepší výsledek inhibice HuBuChE z testovaných rostlin. Významnou aktivitou proti HuBuChE se projevil také extrakt z kultivaru *Narcissus bulbocodium* var. *conspicus*, u něhož bylo naměřeno $IC_{50} = 22,37 \pm 3,14 \mu\text{g/ml}$.

Klíčová slova: Amaryllidaceae, alkaloidy, *Narcissus* sp., *bulbocodium* conspiscus, Sealing, Fortissimo, Ice Follies, Delnashaugh, GC/MS, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of pharmaceutical botany and ecology

Candidate: Mgr. Václav Hrstka

Consultant: Doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Title of Thesis: The alkaloids of the genus *Narcissus* (*Amaryllidaceae*) and its biological activity

The content of this thesis was to prepare alkaloidal extracts from 6 selected species of genus *Narcissus*. Summary extracts were evaluated by GC/MS analysis for identification of each alkaloid and measuring of their inhibitory activity to human cholinesterases (HuAChE and HuBuChE) was included. The results obtained were subsequently identifying the most suitable species for more detailed analysis

From tested plants the most active extract was from species *Narcissus canaliculatus*, $IC_{50} = 7,28 \pm 0,66 \mu\text{g/ml}$ respectively. The best inhibitory effect on both the esterase had extract from the plant *Narcissus* cv. Ice Follies, which reached values of $IC_{50} = 7.28 \pm 0.66 \mu\text{g/ml}$ for HuAChE and $IC_{50} = 14,95 \pm 2,01 \mu\text{g/ml}$ for HuBuChE, which is the best result of the downturn HuBuChE from tested plants. Significant activity against HuBuChE was also reflected in the extract from the cultivar *Narcissus bulbocodium* var. *conspicus*, which has been measured by $IC_{50} = 22,37 \pm 3,14 \mu\text{g/ml}$.

Keywords: *Amaryllidaceae*, alkaloids, *Narcissus* sp., *bulbocodium* *conspicus*, Sealing, Fortissimo, Ice Follies, Delnashaugh, GC/MS, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase.