

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BIOLOGICKÁ AKTIVITA SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ ROSTLIN X.

ALKALOIDY *VINCA MINOR* L.

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Anna Hošťálková, Ph.D.

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

Hradec Králové, květen 2019

Pavla Šípková

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY

DIPLOMA THESIS

BIOLOGICAL ACTIVITY OF SECONDARY PLANTS METABOLITES X.
ALKALOIDS OF *VINCA MINOR* L.

Supervisor: PharmDr. Anna Hošťálková, Ph.D.

Head of Department: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, May 2019

Pavla Šípková

Tímto bych chtěla velice poděkovat za vedení diplomové práce Ing. Miroslavu Ločárkovi, který byl velice nápomocen v počátcích experimentální fáze práce a PharmDr. Anně Hošťálkové, Ph.D. za trpělivost, vstřícnost a odborné vedení při vypracovávání diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za změření a interpretování NMR spekter. Dále bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za změření a stanovení biologické aktivity alkaloidů. Také všem pracovníkům Katedry farmaceutické botaniky za pomoc práci v laboratoři a vstřícný přístup. A závěrem bych chtěla poděkovat celé své rodině a příteli za podporu a trpělivost během celého mého studia.

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

v Hradci Králové, 2019

Pavla Šípková

OBSAH

| | |
|--|----|
| PŘEHLED OBRÁZKŮ..... | 8 |
| PŘEHLED TABULEK..... | 9 |
| SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 10 |
| 1 ÚVOD..... | 11 |
| 2 CÍL PRÁCE | 13 |
| 3 TEORETICKÁ ČÁST | 14 |
| 3.1 Alzheimerova choroba..... | 14 |
| 3.1.1 Klinický obraz | 14 |
| 3.1.2 Patofyziologie..... | 15 |
| 3.1.3 Terapie | 16 |
| 3.2 <i>Vinca minor</i> L..... | 19 |
| 3.2.1 Taxonomické zařazení, klasifikace | 21 |
| 3.2.2 Čeleď Apocynaceae | 21 |
| 3.2.3 Rod <i>Vinca</i> | 22 |
| 3.2.4 Obsahové látky..... | 24 |
| 3.2.5 Biologická aktivita nativních alkaloidů či jejich významných derivátů..... | 33 |
| 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST..... | 39 |
| 4.1 Všeobecné postupy | 39 |
| 4.1.1 Příprava a čištění rozpouštědel..... | 39 |
| 4.1.2 Odpařování rozpouštědel | 39 |
| 4.1.3 Flash chromatografie..... | 39 |
| 4.1.4 Tenkovrstvá chromatografie..... | 39 |
| 4.1.5 Příprava skleněných desek na preparativní TLC | 39 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.1.6 | Detekce alkaloidů | 40 |
| 4.2 | Potřeby a chemikálie pro izolaci látek | 40 |
| 4.2.1 | Rozpouštědla a chemikálie | 40 |
| 4.2.2 | Pomocný materiál | 41 |
| 4.2.3 | Detekční činidla | 41 |
| 4.2.4 | Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii | 41 |
| 4.2.5 | Chromatografické adsorbenty | 41 |
| 4.2.6 | Přístroje | 42 |
| 4.3 | Potřeby a chemikálie pro stanovení inhibiční aktivity | 42 |
| 4.3.1 | Chemikálie ke stanovení inhibiční aktivity | 42 |
| 4.3.2 | Pufry | 42 |
| 4.3.3 | Přístroje | 42 |
| 4.3.4 | Biologický materiál | 43 |
| 4.4 | Izolace alkaloidů | 43 |
| 4.4.1 | Extrakce a získaná frakce | 43 |
| 4.4.2 | Rozdělení extraktu na frakce | 44 |
| 4.4.3 | Izolace jednotlivých alkaloidů | 44 |
| 4.5 | Analýza struktury | 46 |
| 4.5.1 | GC/MS analýza a identifikace | 46 |
| 4.5.2 | ESI/MS analýza | 46 |
| 4.5.3 | NMR analýza | 47 |
| 4.5.4 | Optická otáčivost | 47 |
| 4.6 | Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů | 47 |
| 4.6.1 | Příprava plazmy a hemolyzátu | 47 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.6.2 | Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (IC_{50})..... | 48 |
| 5 | VÝSLEDKY..... | 50 |
| 5.1 | Strukturní analýza látek | 50 |
| 5.1.1 | PŠ-1: Vinkarubin | 50 |
| 5.1.2 | PŠ-2: (-)-Vinoxin..... | 51 |
| 5.2 | Stanovení inhibiční aktivity (IC_{50}) | 52 |
| 6 | DISKUSE..... | 53 |
| 7 | LITERATURA..... | 54 |
| 8 | ABSTRAKT | 65 |
| 9 | ABSTRACT | 66 |

PŘEHLED OBRÁZKŮ

| | |
|--|----|
| Obrázek 1: Vzorec donepezilu..... | 17 |
| Obrázek 2: Vzorec rivastigminu | 18 |
| Obrázek 3: Vzorec galanthaminu | 18 |
| Obrázek 4: Vzorec memantinu..... | 19 |
| Obrázek 5: <i>Vinca minor</i> L. – květ [40]..... | 20 |
| Obrázek 6: <i>Vinca minor</i> L. – květ [40]..... | 20 |
| Obrázek 7: <i>Vinca minor</i> L. – list [40]..... | 21 |
| Obrázek 8: <i>Vinca minor</i> L. [40] | 21 |
| Obrázek 9: <i>Vinca major</i> L. [45] | 23 |
| Obrázek 10: <i>Vinca herbacea</i> Waldst. & Kit. [46]..... | 23 |
| Obrázek 11: <i>Vinca soneri</i> Koyuncu [48]..... | 23 |
| Obrázek 12: <i>Vinca erecta</i> Regel & Schamlh [49]..... | 23 |
| Obrázek 13: <i>Vinca difformis</i> Pourr. [52] | 24 |
| Obrázek 14: <i>Vinca ispartensis</i> Koyuncu & Eksi [53] | 24 |
| Obrázek 15: Vzorec vinkaminu..... | 34 |
| Obrázek 16: Vzorec vinblastinu..... | 35 |
| Obrázek 17: Vzorec vinorelbinu | 35 |
| Obrázek 18: Vzorec vindesinu | 36 |
| Obrázek 19: Vzorec vinkristinu | 37 |
| Obrázek 20: Vzorec vinfluninu | 37 |
| Obrázek 21: Vzorec vinpocetinu | 38 |
| Obrázek 22: Tenkovrstvá chromatografie frakce VM 299..... | 43 |
| Obrázek 23: Kontrolní tenkovrstvá chromatografie frakce č. 35..... | 45 |
| Obrázek 24: Kontrolní tenkovrstvá chromatografie frakce č. 39..... | 45 |
| Obrázek 25: Vinkarubin | 50 |
| Obrázek 26: (-)-Vinoxin..... | 51 |

PŘEHLED TABULEK

| | |
|--|----|
| Tabulka 1: Taxonomie <i>Vinca minor</i> L. [8] | 21 |
| Tabulka 2: Alkaloidy eburnamoninového typu | 25 |
| Tabulka 3: Alkaloidy akuamminového typu | 28 |
| Tabulka 4: Alkaloidy sarpaginového typu | 29 |
| Tabulka 5: Alkaloidy ajmalinového typu | 30 |
| Tabulka 6: Alkaloidy oxindolového typu | 31 |
| Tabulka 7: Další alkaloidy | 32 |
| Tabulka 8: Biologická aktivita alkaloidů z <i>V. minor</i> | 33 |
| Tabulka 9: Charakteristika frakce VM 299 | 43 |
| Tabulka 10: Dále zpracovávané frakce flash chromatografie | 44 |
| Tabulka 11: Podmínky GC/MS analýzy | 46 |
| Tabulka 12: Hodnoty inhibičních aktivit | 52 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|----------|---|
| AChE | acetylcholinesterasa |
| Apo-E IV | apolipoprotein E-IV |
| APP | amyloidní prekurzorový protein |
| BuChE | butyrylcholinesterasa |
| CNS | centrální nervový systém |
| COX-2 | cyklooxygenasa typu II |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DTNB | 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina |
| GC | plynová chromatografie |
| MAO | monoaminoxidasa |
| MCI | mírná kognitivní porucha |
| MS | hmotnostní spektrometrie |
| NMDA | <i>N</i> -methyl-D-aspártátová kyselina |
| NMR | nukleární magnetická rezonance |
| PDE-1 | fosfodiesterasa typu I |
| TLC | tenkovrstvá chromatografie |

1 ÚVOD

Díky moderní medicíně a jejím pokrokům dochází k tomu, že populace stárne a lidé se dožívají mnohem déle. Právě toto je jedním z důvodů nárůstu počtu onemocnění, které se projevují zejména v pozdějším věku. Demence patří právě mezi ně. V roce 2000 v ČR trpělo demencí zhruba 90 tisíc lidí a v roce 2015 se zvýšil počet dokonce na 156 tisíc. Počet lidí, kteří trpí demencí, tak neustále narůstá. [1]

Právě mezi nejčastější druhy demence patří Alzheimerova choroba. Jedná se o neurodegenerativní progredující onemocnění, které postihuje především starší populaci. Poprvé byla tato nemoc mozku popsána již ve 20. století neuropatofyziologem Aloisem Alzheimerem. V počátečních stádiích mají pacienti problémy s organizací, učením, postupně však dochází k poruchám myšlení, řeči, až v těch závažnějších stádiích nezvládají běžné denní aktivity a jsou odkázáni na pomoc a péči ostatních. [2–6]

Léčba Alzheimerovy choroby je pouze symptomatická a spočívá ve zpomalení a oddálení závažnějších stádií choroby. Je tedy potřeba neustále hledat nová a nová léčiva, která by mohla nemoc vyléčit. V současné době se využívají 2 skupiny látek, inhibitory *N*-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů a inhibitory cholinesteras. Mezi inhibitory NMDA receptorů patří memantin, který snižuje influx vápenatých iontů do neuronů a zabraňuje tak apoptóze buněk v mozku. Do druhé skupiny patří galanthamin, donepezil a rivastigmin. Tyto látky fungují na principu inhibice enzymu, který odbourává acetylcholin. Dochází tedy ke zvýšení hladin acetylcholinu v mozku. [5, 7]

Čeleď Apocynaceae je významná čeleď, do které řadíme mimo okrasných rostlin právě také mnoho druhů rostlin léčivých, které se využívají v lidovém léčitelství nebo v medicíně. Mezi významnou rostlinu, kterou se také zabývá tato diplomová práce, patří *Vinca minor* L. Jedná se o stálezelenou rostlinu z rodu *Vinca*, která původem pochází z jižní Evropy. Hlavními obsahovými látkami v rostlině jsou indolové alkaloidy. Jejich hlavní uplatnění je zejména v léčbě nádorových onemocněních. Mezi nejvýznamnější alkaloidy patří vinkamin, vinkristin a vinblastin. [8, 9]

V poslední době se věnuje pozornost právě přírodním látkám, především alkaloidům a zkoumá se jejich biologická aktivita, která by potenciálně mohla být využita v léčbě Alzheimerovy choroby.

2 CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo:

- vypracování literární rešerše o *Vinca minor* L. jako rostlinném druhu, jeho obsahových látek včetně biologické aktivity
- výběr vhodných metod k izolaci alkaloidů
- izolace alkaloidů z vybrané frakce alkaloidního extraktu *Vinca minor* L.
- podíl na identifikaci alkaloidů a vyhodnocení jejich aktivity
- zasazení získaných výsledků v kontextu současného výzkumu a zhodnocení jejich potenciálu pro využití ve farmakoterapii

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je jedna z nejčastějších druhů demence, kdy tvoří kolem 70 % zaznamenaných případů. Jedná se o progredující a nevratné onemocnění mozku, které postihuje zejména starší osoby. [2, 10]

Tato choroba nese jméno po německém neuropatofyziologovi Aloisi Alzheimerovi, který tuto nemoc jako první popsal v roce 1906. [4]

Jde o onemocnění mozku, kdy postupně dochází k poruše paměti, uvažování, chápání a myšlení. Pro udržení kognitivního zdraví je doporučováno pravidelně cvičit, mít dostatek kvalitního spánku, nekouřit, nepožívat alkoholické nápoje a pravidelně procvičovat paměť. Průměrně po 7–10 letech od nástupu prvních klinických příznaků dochází ke smrti. [3, 7, 11, 12]

3.1.1 Klinický obraz

Prvotní příznaky demence jsou obtížně diagnostikovatelné. Onemocnění se postupně šíří a projevy neustále prohlubují. V pozdějších stádiích jsou narušeny denní aktivity člověka. Postupně se zhoršuje paměť, dochází ke snížení intelektu, prostorového vnímání a objevují se problémy s řečí. Často se vyskytuje také apatie, bloudění a abulie. [5, 7, 13, 14]

Podle symptomů můžeme rozlišit poruchy kognitivní a nekognitivní. Mezi kognitivní poruchy patří právě poruchy paměti, učení a úsudku. Tito lidé mají problémy také s plánováním, organizací a abstrakcí. Co se týká nekognitivních poruch, patří sem například poruchy příjmu potravy (bulimie, anorexie), agresivita, deprese nebo halucinace až dokonce i bludy. [3]

Existují 3 stádia Alzheimerovy choroby. V počátečním mírném stádiu pacient nepocítuje žádné subjektivní potíže, avšak v mozku se mohou už nacházet patologické známky tohoto onemocnění. Onemocnění poté progreduje do tzv. mild cognitive impairment fáze (MCI), mírné kognitivní poruchy, kdy si poruchy kognice začíná všimnout okolí. Při MCI fázi mají lidé často problémy s pamětí, ale ještě nedochází k narušení jejich denních aktivit. Ve 3. fázi už dochází k narušení

činností, které jsou potřeba při běžných denních aktivitách. V tomto závažnějším stádiu nejsou pacienti schopni se sami obléct, najíst a může docházet k inkontinenci. Lidé jsou tak většinu času na lůžku a jsou zcela odkázáni na pomoc druhých. [2, 6, 7]

3.1.2 Patofyziologie

Už 15 let před začátkem nástupu demence a projevení prvních příznaků dochází k patologickým změnám v mozku. Důvody Alzheimerovy choroby byly zkoumány už od 2. poloviny 20. století. [6, 15]

3.1.2.1 Genetické predispozice

Jako jedním z predispozičních faktorů, které zvyšují riziko výskytu Alzheimerovy choroby, patří apolipoprotein E-IV (Apo E-IV). Apo E-IV hraje významnou roli v metabolismu β amyloidních plaků. Gen pro tento lipoprotein se nachází na chromozomu č. 19. Toto onemocnění se však nerozvine u všech, kteří jsou nosiči právě genu Apo E-IV, ale zásadně zvyšuje riziko časného nástupu tohoto onemocnění. [4, 16, 17]

Malé procento případů je založeno také na podkladě mutace jednoho z těchto tří genů: amyloidního prekurzorového proteinu (APP), presenilinu 1 a presenilinu 2. U osob, které mají mutaci těchto genů, je velmi pravděpodobný rozvoj Alzheimerovy choroby v průběhu života. [16]

3.1.2.2 Cholinergní systém

Při tomto onemocnění je již na začátku porušen cholinergní systém. Dochází k narušení produkce acetylcholinu v důsledku snížení aktivity cholinacetyltransferasy, enzymu, který je potřeba k syntéze acetylcholinu. V mozku je koncentrace tohoto enzymu snížena až o téměř 90 %. Výsledkem je pak nedostatek mediátoru acetylcholinu na synapsích. Hlavní roli tvoří 2 enzymy: acetylcholinesterasa (AChE) a butyrylcholinesterasa (BuChE). Pomocí obou těchto enzymů se odbourává acetylcholin. Tyto enzymy se vyskytují v 6 formách, které se dělí do 2 tříd, do třídy globulární a do třídy asymetrické, v závislosti na tom, zda mají nebo nemají tzv. collagen-like tail. Formy G_1 , G_2 a G_4 patří mezi globulární. G_4 je forma, která převládá v CNS a zodpovídá za degradaci acetylcholinu na synapsích. G_1 forma se přirozeně vyskytuje v mozku v malém množství. Při Alzheimerově chorobě se postupně forma G_1 AChE i BuChE zvyšuje, G_1 AChE je zvýšena především

kolem β amyloidních plaků, zatímco G_4 forma AChE se snižuje hlavně v amygdale a hipokampu. G_1 a G_2 formy AChE se snižují v nucleus caudatus a putamen, v parietální a frontální kůře jsou hladiny nezměněné. Počet nikotinových receptorů u Alzheimerovy choroby může být snížen, zatímco množství muskarinových receptorů je zachováno. [10, 18–22]

3.1.2.3 Senilní plaky

Za normálních podmínek je APP v mozku štěpen α -sekretasou na velmi krátké rozpustné fragmenty, které mají neuroprotektivní účinek. U Alzheimerovy choroby však dochází ke štěpení prekursorového proteinu pomocí β - a γ -sekretasy na daleko delší úseky, které se shlukují a polymerují, až dochází ke vzniku abnormálních a neurotoických tzv. amyloidních (senilních) plaků. Plaky způsobují nekontrolovaný a přebytný vtok vápníku do buňky a následně dochází k apoptóze buněk. Právě tvorba plaků patří mezi jednu z prvních změn, kterou lze odhalit. [6, 7, 23]

3.1.2.4 τ -Protein

Také dochází k fosforylaci τ -proteinu, který způsobuje následnou apoptózu buněk. Postupně tak zdravé neurony přestávají fungovat a postupně se ztrácí i spojení s ostatními neurony. K těmto změnám dochází především zpočátku v hipokampu, následně ale dochází k poškození po celém mozku. Fosforylovaný τ -protein lze odhalit z mozkomíšního moku a je poměrně specifickým ukazatelem Alzheimerovy choroby. [2, 6, 7]

3.1.3 Terapie

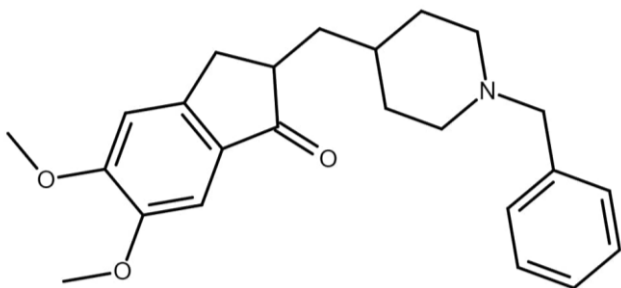
Bohužel doposud nejsou žádné účinné léky, které by toto onemocnění zcela vyléčily. Farmakologická léčba pouze zmírňuje příznaky a oddaluje tím horší a závažnější stádium nemoci. [5, 16]

U pacientů s Alzheimerovou chorobou je důležité kombinovat oba přístupy v léčbě: farmakologický i nefarmakologický. Nefarmakologická léčba zahrnuje hlavně aktivizaci pacienta. Je důležité povzbuzovat a motivovat pacienta. Farmakologická léčba se skládá ze 2 přístupů: terapie kognitivních a nekognitivních poruch. Do terapie nekognitivních poruch patří především terapie deprese, agresivity nebo poruch spánku. Rozhodně nepodáváme léky, které

podporují anticholinergní aktivitu. U agresivních pacientů se často používají tzv. atypická antipsychotika, jelikož benzodiazepiny by mohli zhoršovat právě kognitivní funkce pacienta. V terapii kognitivních poruch se používají léčiva ze 2 skupin: inhibitory cholinesteras a inhibitory NMDA receptorů. Mezi inhibitory cholinesteras, které inhibují AChE a BuChE v mozku, patří donepezil, galanthamin a rivastigmin. Díky těmto látkám nedochází k nežádoucímu odbourávání acetylcholinu. [3, 7]

3.1.3.1 Donepezil

Donepezil se používá k symptomatické léčbě lehké až středně těžké formy Alzheimerovy choroby. Je jedna z prvních léčivých látek, která byla Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv schválena pro tuto indikaci. Jedná se o piperidinový inhibitor AChE, který navíc má aktivizující účinek na nikotinové receptory. Právě díky tomuto aktivizujícímu účinku zlepšuje mikrocirkulaci mozku. Díky inhibici AChE, která hydrolyzuje acetylcholin, dochází ke zvýšení hladin acetylcholinu v mozku. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří bolesti hlavy, nevolnost a gastrointestinální potíže. [24–27]

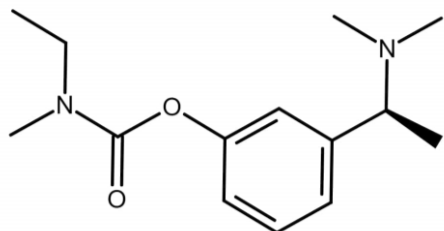


Obrázek 1: Vzorec donepezilu

3.1.3.2 Rivastigmin

Rivastigmin patří mezi derivát karbamátu, který irreverzibilně inhibuje oba typy cholinesteras. Jedná se tedy o duální inhibitor, který blokuje AChE i BuChE. Jako nežádoucí účinky jsou časté gastrointestinální potíže, proto se tato látka využívá i ve formě transdermální náplasti, kdy jsou

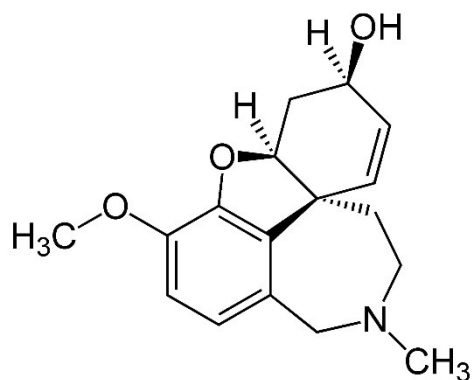
tyto nežádoucí účinky minimalizovány. Výhodou transdermální náplasti je také postupné uvolňování do cévního řečiště a tím zajištění kontinuální dávky. [27–29]



Obrázek 2: Vzorec rivastigminu

3.1.3.3 Galanthamin

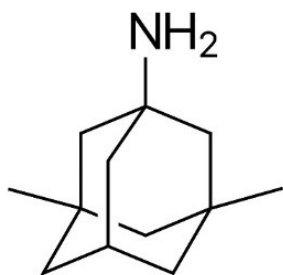
Jedná se o alkaloid, který vykazuje malou inhibiční aktivitu BuChE, ale dokáže významně blokovat AChE. Také se váže na nikotinové receptory, které dokáže modulovat. Galanthamin lze syntetizovat organickou syntézou, nicméně i rostliny jsou stále zdrojem této látky. Jako první se izoloval z *Galanthus woronowii*, ale obsažen je např. i v rodu *Narcissus* (*Narcissus Pseudonarcissus* cv. Carlton), *Lycoris radiata*, *Leucojum aestivum* nebo *Galanthus nivalis*. Mezi hlavní nežádoucí účinky patří bradykardie a střevní potíže. [27, 28, 30–33]



Obrázek 3: Vzorec galanthaminu

3.1.3.4 Memantin

Tato látka má významný klinický účinek u pacientů se středně těžkou až těžkou formou Alzheimerovy choroby. Na rozdíl od inhibitorů AChE, má tato látka odlišný mechanismus působení. Jedná se o antagonistu glutamátových NMDA receptorů. Snižuje vtok vápníku do neuronů, zabraňuje tedy hyperaktivaci receptorů a brání tak apoptóze neuronů. Jedná se o neuroprotektivní látku a nežádoucí účinky jsou velmi vzácné. [27, 28, 34]



Obrázek 4: Vzorec memantinu

3.1.3.5 Další látky

Několik klinických studií prokázalo, že při užívání extraktu *Ginkgo biloba* EGb761 došlo u pacientů s Alzheimerovou chorobou ke zlepšení. Tento extrakt se však používá spíše jako doplněk léčby k inhibitorům AChE nebo memantinu. [27]

U pacientů, kteří užívali estrogény se ukázalo, že bylo riziko vzniku této nemoci podstatně nižší. Jedná se spíše o protektivní efekt u žen v klimakteriu. Při léčbě Alzheimerovy choroby nemělo užívání estrogenů žádné klinické výsledky. [27, 35]

3.2 *Vinca minor* L.

Vinca minor L., česky barvínek menší, patří do čeledi Apocynaceae (toješťovité). Tato rostlina původem zejména ze severního Španělska a západní Francie, je pěstována nejen jako okrasná, ale také jako lékařsky využitelná rostlina. Jako jediná rostlina z čeledi Apocynaceae se volně vyskytuje i na území ČR, kde je považována za jedovatou. *Vinca minor* L. je vytrvalá přízemní rostlina, která je v lidovém léčitelství známa pro svůj účinek sedativní, hypotenzní, antidiabetický a také pro léčbu poruch krevního oběhu v mozku nebo podporu mozkového metabolismu. [8, 9, 36, 37]

Dorůstá výšky kolem 10–20 cm. Roste hlavně na vlhkých, propustných a stinných místech. Mezi nejčastější místa výskytu patří listnaté lesy, křoviny, skalky. Může se nacházet také v okolí kostelů, hřbitovů, zřícenin či hradů. Kvete v období od března do června. Rozmnožuje se vegetativně pomocí oddenků. [38]

Lodyha je poléhavá, na bázi dřevnatí. Listy jsou vstřícné, řapíkaté, kožovitě tuhé a lesklé. Mají výraznou tmavě zelenou barvu, na rubu jsou však světlejší. V listech dochází k produkci alkaloidů, které mají významnou neuroprotektivní a cerebrovasodilatační aktivitu. Obsah alkaloidů můžeme zvýšit pomocí hnojiv, které obsahují větší množství dusíku. Také v závislosti na období se obsah alkaloidů liší. V období květu je obsah alkaloidů nejvyšší. Plodem je 7-8 mm dlouhý kuželovitý, dvojité měchýřek, který praská na vnitřním švu. Semena mají hnědou barvu. Květy jsou pravidelné, pětičetné a oboupohlavné. Vyznačují se jasně modrou barvou. Koruna je pětičetná, obsahující 2 svrchní semeníky a 5 volných tyčinek. [8, 9, 38, 39]



Obrázek 5: *Vinca minor* L. – květ [40]



Obrázek 6: *Vinca minor* L. – květ [40]



Obrázek 7: *Vinca minor* L. – list [40]



Obrázek 8: *Vinca minor* L. [40]

3.2.1 Taxonomické zařazení, klasifikace

Tabulka 1: Taxonomie *Vinca minor* L. [8]

| | |
|-----------|-----------------------|
| Říše: | Plantae |
| Oddělení: | Magnoliophyta |
| Třída: | Magnoliopsida |
| Podtřída: | Lamiidae |
| Řád: | Gentianales |
| Čeleď: | Apocynaceae |
| Rod: | <i>Vinca</i> |
| Druh: | <i>Vinca minor</i> L. |

3.2.2 Čeleď Apocynaceae

Čeleď Apocynaceae patří do řádu Gentianales (hořcotvaré) spolu s dalšími čeleděmi Loganiaceae, Rubiaceae, Asclepiadaceae, Gentianaceae. [8]

Do této čeledi se řadí byliny, keře, polokeře a v tropických oblastech hlavně stromy a liány. Jde o velmi obsáhlou čeleď s více než 5000 druhy rostlin. Pro tuto čeleď je charakteristický výskyt zejména v subtropických a tropických oblastí. Monoterpeny, indolové alkaloidy a kardioaktivní glykosidy jsou hlavními látkami obsaženými v rostlinách této čeledi. Alkaloidy jsou často využívány

v medicíně. Pro obsah kaučuku jsou známé především tropické druhy. Květy jsou čtyř- až pětičetné, listy vstřícné nebo v přeslenech, výjimečně střídavé. Plodem je nejčastěji měchýřek, vyskytuje se však i tobolka, peckovice, nažka nebo bobule. [8, 39, 41]

Rostliny této čeledi mají mnoho využití. Určité druhy se využívají jako surovina pro farmaceutický průmysl (*Catharanthus roseus*), některé druhy se pěstují pro okrasné účely (*Plumeria rubra*, *Carissa* spp.). Patří sem i rostliny, které jsou považovány za jedovaté (*Nerium oleander*). [41]

3.2.3 Rod *Vinca*

Do rodu *Vinca* řadíme celkem 7 druhů: *Vinca minor* L., *Vinca major* L., *Vinca herbacea* Waldst. & Kit., *Vinca soneri* Koyuncu, *Vinca erecta* Regel & Schamleh., *Vinca difformis* Pourr., *Vinca ispartensis* Koyuncu & Eksi. [9, 42]

Vinca major L. – česky barvínek větší nebo brčál větší, je polokeř, který se svým vzhledem velmi podobá *Vinca minor* L. Roste především v oblasti Středomoří. Od barvíneku menšího se odlišuje tím, že okraje listů jsou mírně brvité (u *V. minor* L. lysé) a celkově je rostlina větší. Od ostatních druhů se dá rozlišit také tím, že po celou dobu zimy zůstává zelený včetně nadzemní části rostliny. [43]

Vinca herbacea Waldst. & Kit. – českým názvem barvínek bylinný nebo brčál bylinný. Roste především v Maďarsku, Rakousku, v jižní části Ruska a v Íránu, a to na vápencových půdách. Lodyha je vysoká do 20 cm, poléhavá s postranními výhonky, které dorůstají až do 60 cm. Kvete nejčastěji v období duben–květen. Květ má modrofialovou barvu a korunní lístky jsou na okrajích brvité. V zimě zahyne celá nadzemní část rostliny, kořen ale přežívá. [42, 44]



Obrázek 9: *Vinca major* L. [45]



Obrázek 10: *Vinca herbacea* Waldst. & Kit. [46]

Vinca soneri Koyuncu – tento druh roste hlavně na suchých stráních v Turecku. Lze ho poznat podle absence plazivých postranních výhonků. Kvete bíle, od května do června a v zimě nadzemní část odumírá. [42]

Vinca erecta Regel & Schamllh – tento druh roste na území Uzbekistánu, Afghánistánu a Kyrgyzstánu. Květy jsou zabarveny do světlé modré až bílé barvy. Dále má rostlina úzké a brvité listy. [47]



Obrázek 11: *Vinca soneri* Koyuncu [48]



Obrázek 12: *Vinca erecta* Regel & Schamllh [49]

Vinca difformis Pourr. (syn. *V. acutiflora* Bertol. ex Koch) - stálezelený polokeř s poléhavými výhonky. Vyskytuje se především v oblasti Středomořího moře, kde kvete na konci zimy a začátku jara, květy jsou bleděmodré až do bíla a listy jsou bez brv. [50]

Vinca ispartensis Koyuncu & Eksi – vyskytuje se hlavně na kamenitých místech a na vápenatých půdách, postranní výhonky dosahují délky 25–50 cm. Kvete v období od dubna do května a květy mají modrou barvu. V zimě odumírá nadzemní část rostliny a listy opadají. [51]



Obrázek 13: *Vinca difformis* Pourr. [52]



Obrázek 14: *Vinca ispartensis* Koyuncu & Eksi [53]

3.2.4 Obsahové látky

Hlavními látkami *Vinca minor* L. jsou především indolové alkaloidy, jejichž množství kolísá v rozmezí 0,1–3 %. Dominantním alkaloidem je vinkamin, dále vinblastin a vinkadiformin. Jako další látky se vyskytují třísloviny, saponiny, hořčiny, polysacharid pektin a kyselina ursolová. [36, 54]

3.2.4.1 *Vinca* alkaloidy

Vinca alkaloidy patří mezi organické sloučeniny a původně byly izolovány z rostliny *Catharanthus roseus*. Byly objeveny v 50. letech zásluhou dvou kanadských vědců, Robert Noble a Charles Beer. Díky jejich cytotoxickému a hypoglykemickému účinku se dříve používaly v léčbě diabetu, vysokého krevního tlaku nebo jako dezinfekční prostředky. Dnes jsou především hodně využívané látky při léčbě rakoviny. V metafázi, díky vazbě na tubulin, poškozují funkci mikrotubulů, zastavují tak buněčné dělení, a nakonec dochází k apoptóze buňky. [55, 56]

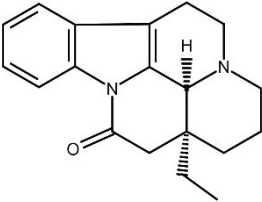
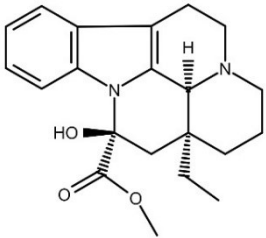
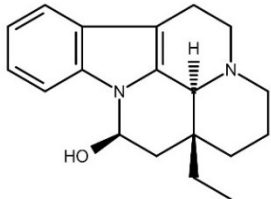
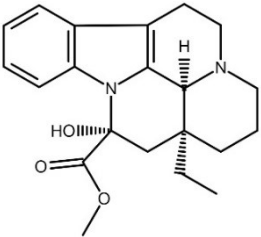
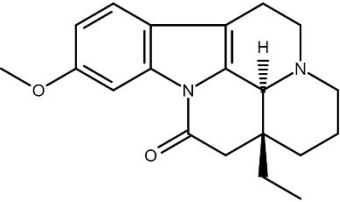
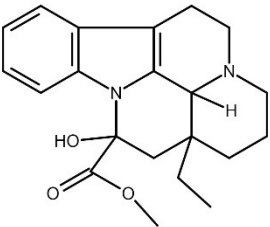
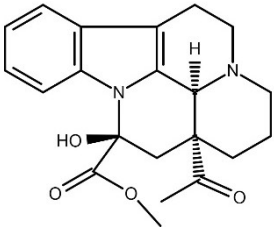
Hlavními metabolity jsou terpenoidní indolové alkaloidy. Doposud bylo izolováno přes 50 indolových alkaloidů z nadzemní části *Vinca minor* L. *Vinca* alkaloidy řadíme do 5 hlavních

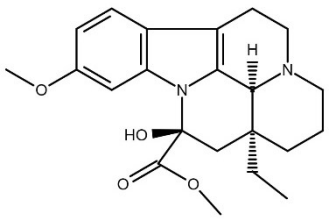
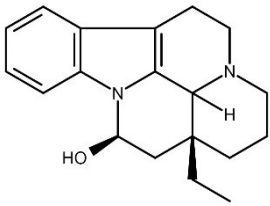
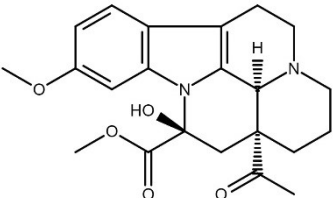
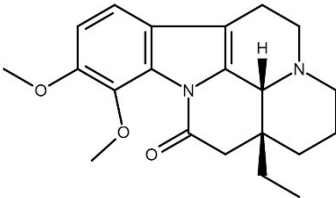
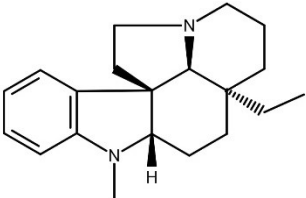
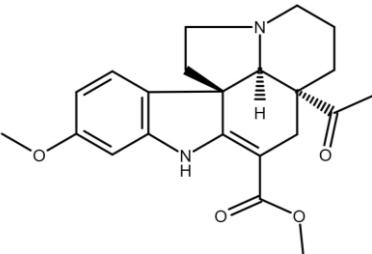
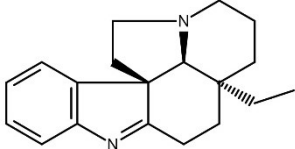
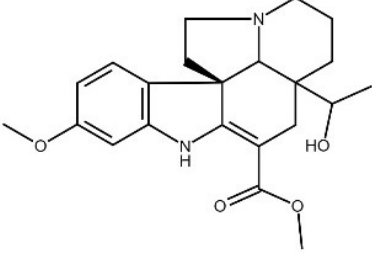
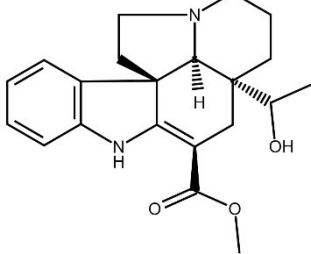
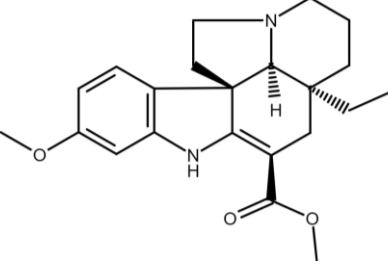
skupin dle struktury: eburnamoninový, sarpaginový, ajmalinový, oxindolový a akuamminový typ.
[57]

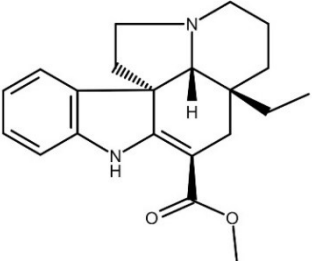
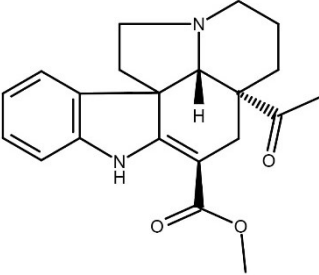
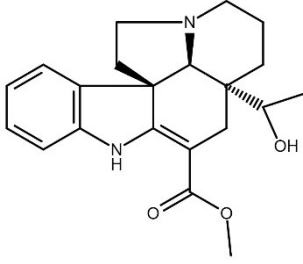
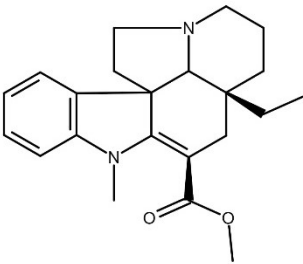
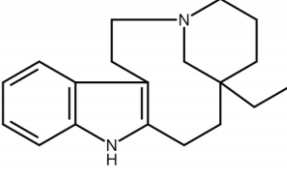
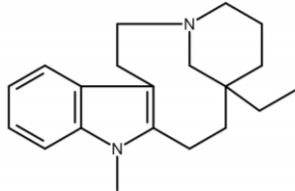
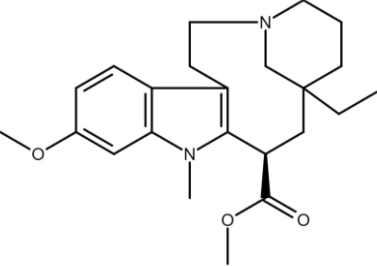
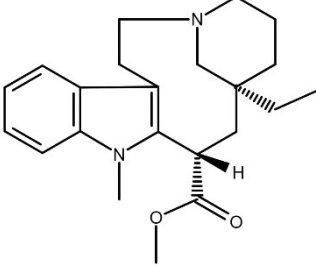
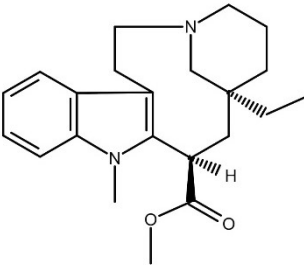
EBURNAMONINOVÝ TYP

Do této skupiny patří alkaloidy, které mají strukturu podobnou eburnamoninu. Eburnamonin, často nazýván vinburnin, patří mezi indolové alkaloidy s pentacyklickou strukturou, které se vyskytují v čeledi Apocynaceae. [58–60]

Tabulka 2: Alkaloidy eburnamoninového typu

| | | | |
|-----------------------------|---|--|---|
| <p>(±)-eburnamonin [61]</p> |  | | |
| <p>vinkamin [9, 57]</p> |  | <p>(+)-isoeburnamin [62]</p> |  |
| <p>14-epivinkamin [63]</p> |  | <p>11-methoxyeburnamonin [64]</p> |  |
| <p>isovinkamin [65]</p> |  | <p>vinkarein = vinkaminin [65, 66]</p> |  |

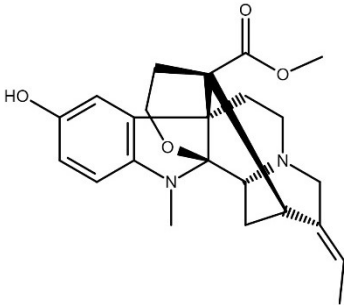
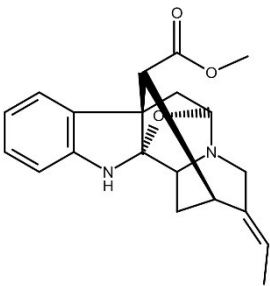
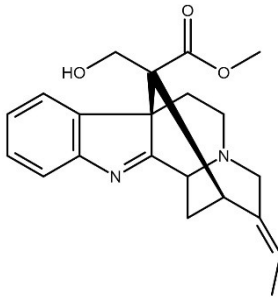
| | | | |
|--|---|--|---|
| <p>11-methoxy- vinkamin = vincin [66–68]</p> |  | <p>(-)-eburnamin [62]</p> |  |
| <p>vincinin [66]</p> |  | <p>11,12-dime- thoxyeburna- monin [69]</p> |  |
| <p>(+)-<i>N</i>-methyl- aspidosper- midin [62, 70]</p> |  | <p>16-methoxy- minovincin [70]</p> |  |
| <p>1,2-dehydro- aspidosper- midin [62, 71]</p> |  | <p>16-methoxy- minovincinin [70]</p> |  |
| <p>minovincinin [66,70]</p> |  | <p>16-methoxy- vinkadiformin [72]</p> |  |

| | | | |
|--------------------------------------|---|------------------------------------|---|
| <p>(±)-vinkadifformin [66,70,73]</p> |  | <p>minovincin [9, 66, 70]</p> |  |
| <p>vincetin [74]</p> |  | <p>minovin [9]</p> |  |
| <p>(+)-kebračamin [62]</p> |  | <p>(±)-N-methylkebračamin [75]</p> |  |
| <p>vinkaminoridin [66, 76]</p> |  | <p>vinkaminorin [9, 66]</p> |  |
| <p>vinkaminorein [9, 66]</p> |  | | |

AKUAMMINOVÝ TYP

Akuammin, nazýván také jako vinkamajoridin, byl izolován ze semen *Picralima nitida* z čeledi Apocynaceae. Tato látka vykazuje sympatomimetickou aktivitu, dále antipyretickou a také antimalarickou. V odborné literatuře je možné se setkat s hypotézou, že akuammin je zodpovědný za antilipasovou aktivitu extraktu *Vinca minor*. [77, 78]

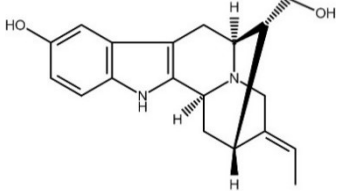
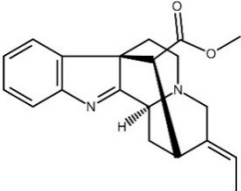
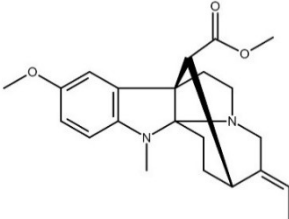
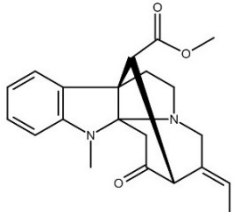
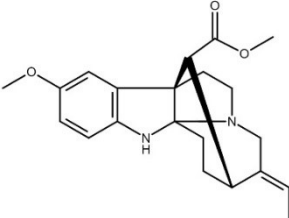
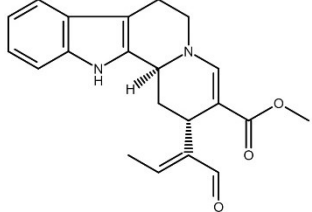
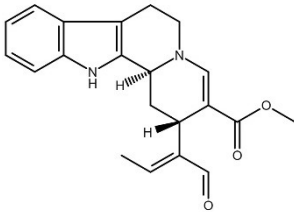
Tabulka 3: Alkaloidy akuamminového typu

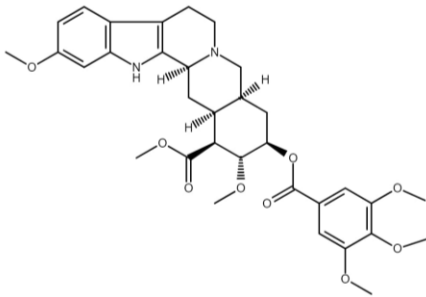
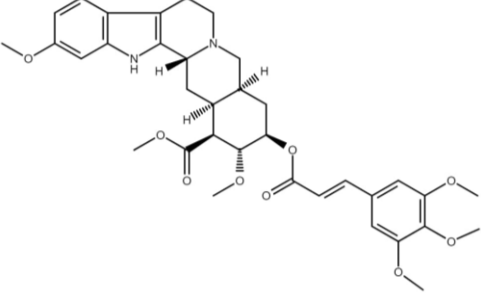
| | | | |
|---------------|---|--------------------------|---|
| akuammin [57] |  | | |
| pikrinin [79] |  | desacetylakuammilin [80] |  |

SARPAGINOVÝ TYP

Sarpagin, synonymem raupin, patří mezi indolové alkaloidy, které mají 4 centra chiralit na C₃, C₅, C₁₅ a C₁₆. Tento alkaloid je obsažen zejména v čeledi Apocynaceae, především v rodech *Alstonia* a *Rauwolfia*. Sarpaginové alkaloidy jsou svou strukturou velmi podobné ajmalinovým. [81, 82]

Tabulka 4: Alkaloidy sarpaginového typu

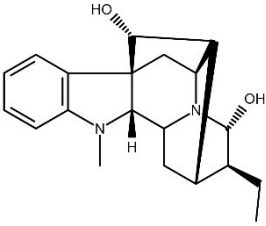
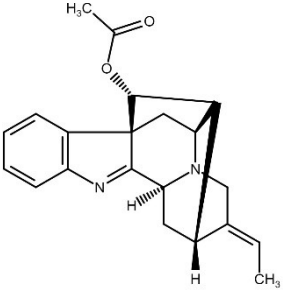
| | | | |
|------------------------------------|---|------------------------|---|
| sarpagin [83] |  | | |
| vinkamidin = striktamin [66,84,85] |  | vinkorin [66] |  |
| vinkoridin [66, 86] |  | (-)-1-norvinkorin [87] |  |
| isovallesiachotamin [88] |  | vallesiachotamin [88] |  |

| | |
|---------------------|--|
| reserpin [66, 85] |  |
| reserpinin [57, 85] |  |

AJMALINOVÝ TYP

Tato skupina obsahuje alkaloidy, které mají strukturu velmi podobnou s alkaloidem ajmalinem. Ajmalin byl izolován z kořene rostliny *Rauwolfia serpentina* a patří mezi antiarytmika I_a třídy díky blokádě K⁺ kanálů v srdci. [82, 89]

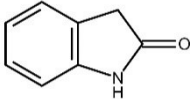
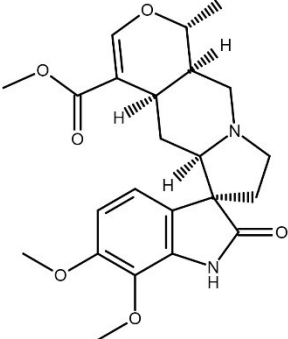
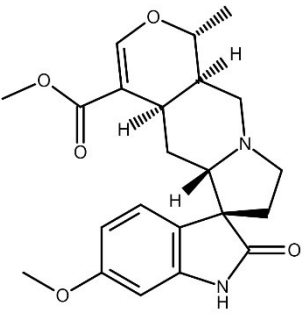
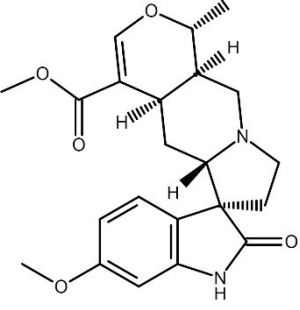
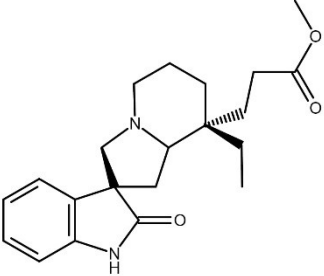
Tabulka 5: Alkaloidy ajmalinového typu

| | |
|--------------|--|
| ajmalin [89] |  |
| vinorin [90] |  |

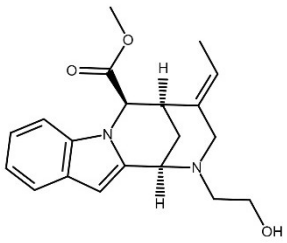
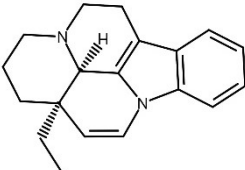
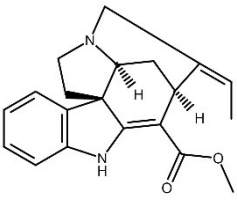
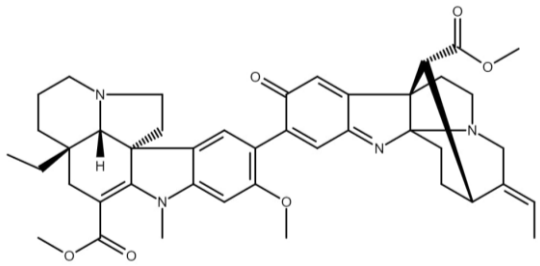
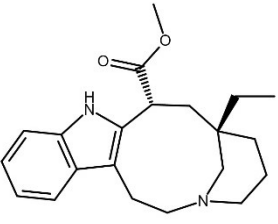
OXINDOLOVÝ TYP

Do této skupiny patří alkaloidy, které ve své struktuře obsahují oxindol. Oxindol se skládá z pyrrolidinového jádra připojeného k benzenu (vzniká 2,3-dihydroindol), kdy v poloze 2 obsahuje oxoskupinu. [91]

Tabulka 6: Alkaloidy oxindolového typu

| | | | |
|-------------------------|---|--|---|
| oxindol [91] | |  | |
| majdin [57, 85] |  | vineridin [57, 85, 92] |  |
| vinerin [57, 85, 92] |  | (±)-vinkatin [74, 93] |  |

Tabulka 7: Další alkaloidy

| | |
|--------------------------|--|
| <p>vinoxin [62, 94]</p> |  |
| <p>eburnamenin [62]</p> |  |
| <p>akuammicin [85]</p> |  |
| <p>vinkarubin [9]</p> |  |
| <p>vinkadin [66, 95]</p> |  |

3.2.5 Biologická aktivita nativních alkaloidů či jejich významných derivátů

Mezi klinicky nejvýznamnější patří především vinblastin, vindesin, vinorelbin a vinkristin. Závažným problémem těchto látek jsou vedlejší účinky. Právě kvůli snížení toxicity látek byla vyvinuta řada moderních technologií, jako jsou lipozomy nebo chemicky modifikovaná léčiva. [57, 96]

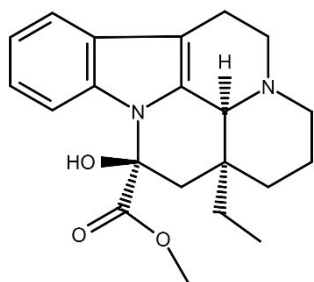
Tabulka 8: Biologická aktivita alkaloidů z *V. minor*

| | |
|---------------------------------|--|
| vinkarubin | cytotoxický účinek proti leukemickým buňkám P388 [9] |
| vinkamin | neuroprotektivní a antihypoxický účinek [9] |
| | léčba a prevence poruch cerebrovaskulárního systému [9] |
| | zlepšuje tok krve v mozku, spotřebu kyslíku a utilizaci glukózy [9] |
| | příznivý účinek u pacientů s poruchami mozku (vertigo, poruchy paměti) [9] |
| aspidospermin = vinkaminorin | inhibiční účinek proti trypanothionové reductase [97] |
| | cytotoxický účinek na buňky P388 [98] |
| vinkaminorein | cytotoxický účinek na buňky P388 [98] |
| pikrinin | antiastmatický a antitusivní účinek in vivo (v dávce 10 mg/kg) [99] |
| | analgetický a protizánětlivý účinek in vivo (v dávce 10 mg/kg) [100] |
| | inhibiční účinek na 5-lipoxygenasu [100] |
| akuammicin | mírný cytotoxický účinek proti A549 buňkám lidského karcinomu plic [101] |
| | agonista na K-opioidních receptorech in vivo u morčat [102] |
| | zvyšuje příjem glukózy v adipocytech 3T3-L1 [103] |
| | stimuluje vychytávání glukózy v diferenciovaných adipocytech [103] |
| majdin | indukce apoptózy in vitro [104] |
| | antioxidační a chelatační účinek in vitro [104] |
| vinkamedin | vasorelaxační aktivita ex vivo v aortě potkana [105] |
| vinkadiformin | antiplasmodiální aktivita [106] |
| | cytotoxický účinek na buňky P388 [98] |
| reserpinin | hypotenzní účinek [107, 108] |

| | |
|------------------|--|
| vallesiachotamin | cytotoxicita proti lidské buněčné linii promyelocytické leukémie (HL-60) [109] |
| | cytotoxicita proti lidské buněčné linii hepatokarcinomu (SMMC-7721) [109] |
| | cytotoxicita proti lidské buněčné linii plicního adenokarcinomu (A549) [109] |
| | cytotoxicita proti lidské buněčné linii rakoviny prsu (SK-BR-3) [109] |
| | cytotoxická aktivita proti melanomovým buňkám (SK-MEL-37) in vitro [110] |
| striktamin | inhibiční aktivita proti adenoviru a herpes simplex viru [111] |
| | inhibiční účinek na COX-2 [100, 109] |
| | inhibiční aktivita MAO in vitro v mozku krys a in vivo u myší [112] |

Vinkamin

Vinkamin patří mezi indolové alkaloidy izolované z *Vinca minor* L. Jeho struktura vychází z eburnamoninu. Používá se při mozkové skleróze a také v terapii metabolických poruch mozku, zejména u pacientů s cerebrální ischemií. Způsobuje vasodilatace a zlepšuje tak průtok krve v mozku. Vinkamin se používá jako nootropikum. Mezi nežádoucí patří leukocytopenie, proarytmogenní účinek, sedace, nauzea. [113–115]

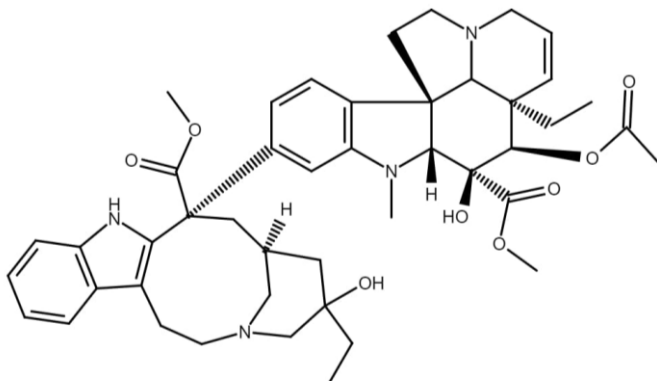


Obrázek 15: Vzorec vinkaminu

Vinblastin

Vinblastin, nazýván také vinkaleukoblastin nebo vinkoblastin, je přírodní alkaloid, který byl poprvé izolován roku 1958 z *Catharanthus roseus*. Alkaloid působí přes tubulin, kdy zastavuje syntézu mikrotubulů a zastavuje tak buněčný cyklus v M-fázi. Používá se při léčbě karcinomů varlat,

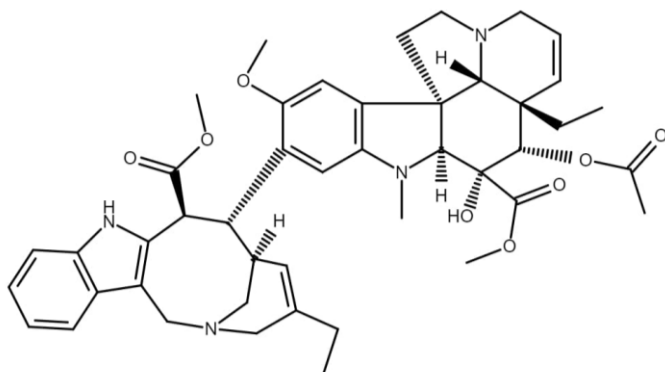
non-Hodgkinových a Hodgkinových lymfomů, neuroblastomů, nádorů prsu, Kaposiho sarkomu a histiocytózy. Mezi nejčastější nežádoucí účinky se u této látky uvádí toxicita bílých krvinek, horečka, zvracení a zácpa. Také se může objevit mukositida. [55, 96, 116]



Obrázek 16: Vzorec vinblastinu

Vinorelbin

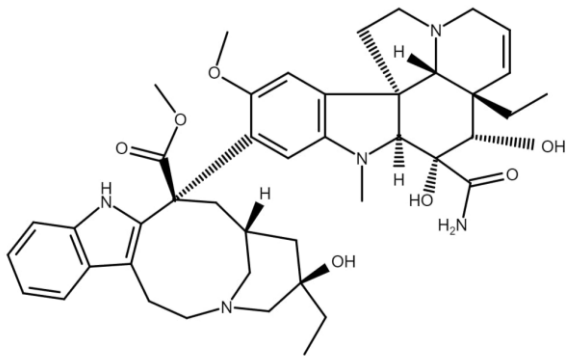
Vinorelbin patří mezi polosyntetické alkaloidy, derivát vinblastinu, který opět brání v tvorbě mitotického vřeténka a způsobuje následně apoptózu buňky. Je používán především v léčbě pokročilé rakoviny prsu rezistentní na trastuzumab, dále v léčbě neuroblastomu, osteosarkomu, karcinomu vaječníků a v terapii akutní leukémie nebo rakovině jícnu. V USA se využívá při léčbě pokročilého karcinomu plic buď samostatně nebo i v kombinaci s *cis*-platinou. Jako nežádoucí účinky se uvádějí neutropenie, myelosuprese, modřiny, anémie, krvácení, gastrointestinální obtíže (zácpa, průjem, zvracení, nauzea) nebo únava a celková slabost. [55, 96, 117]



Obrázek 17: Vzorec vinorelbinu

Vindesin

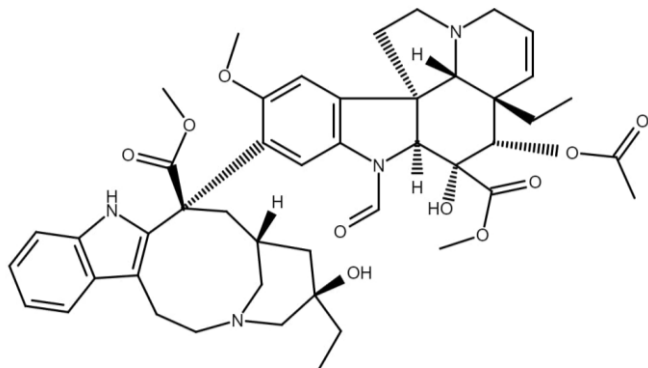
Vindesin je syntetický derivát vinblastinu. Působí tak, že zastavuje polymeraci tubulinu a dělení buňky je v metafázi zastaveno. Dnes je využíván hlavně při lymfocytární leukémii u dětí, kdy nezabírá léčba vinkristinem, nemalobuněčného karcinomu plic, metastatických karcinomů tlustého střeva, konečníku nebo prsou, a v terapii maligního melanomu. Neutropenie je nejčastějším nežádoucím účinkem, dále se ale může vyskytnout myelosuprese nebo neurotoxicita. [55, 118]



Obrázek 18: Vzorec vindesinu

Vinkristin

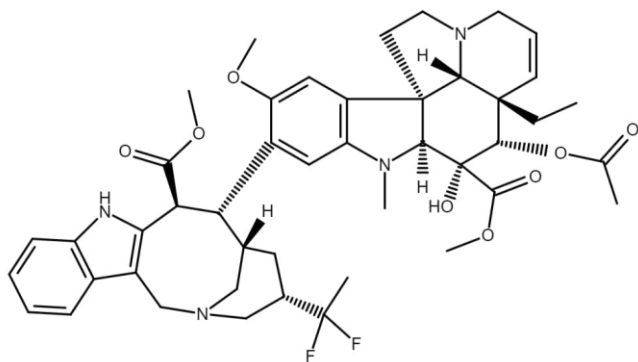
Vinkristin, synonymem leurokristin, je nativní alkaloid, který byl izolován z rostliny *Catharantus roseus*. Nevratně se váže na mikrotubuly v S-fázi a blokuje vznik mitotického vřeténka. Tato látka také ovlivňuje metabolismus aminokyselin, glutathionu, cyklického adenosinmonofosfátu, buněčného dýchání a biosyntézy nukleových kyselin. Je využíván v léčbě kolorektálního karcinomu a gliomu. Také je klíčovou látkou v léčbě akutní lymfoblastické leukémie, lymfomů, neuroblastomu a rhabdomyosarkomu. Vinkristin má největší neurotoxický potenciál. Záleží však na dávce a době trvání a je charakterizován parestéziemi (mravenčení, brnění), ztrátou smyslů, neuropatiemi a svalovou slabostí. Často způsobuje deprese, halucinace, nespavost a zmatenost. [55, 96, 119, 120]



Obrázek 19: Vzorec vinkristinu

Vinflunin

Vinflunin patří mezi první fluorovaný *vinca* alkaloid, přesněji bifluorovaný derivát vinorelbinu, který také zastavuje buněčné dělení a navozuje buněčnou smrt pomocí apoptózy. Od roku 2009 je schválen Evropskou lékovou agenturou, jako druhá linie léčby karcinomu močového měchýře po selhání *cis*-platiny. Oproti ostatním látkám je méně neurotoxický. [55, 96, 121]

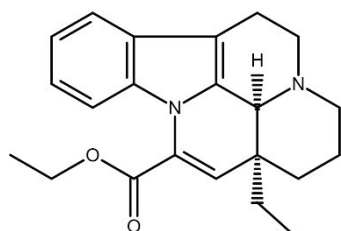


Obrázek 20: Vzorec vinfluninu

Vinpocetin

Vinpocetin je alkaloidy, který byl v 60. letech syntetizován z vinkaminu, alkaloidu izolovaného z listů *Vinca minor*. Inhibuje fosfodiesterasu typu 1 a snižuje uvolňování markerů zánětu. Jeho účinky také souvisí s inhibicí napětově řízených sodných kanálů a nepřímou inhibicí zpětného vychytávání adenosinu, který působí jako inhibiční mediátor. Také dokáže zvýšit hladinu

neuromediátorů jako je noradrenalin, dopamin a acetylcholin. Léčivé přípravky s vinpocetinem se využívají jako nootropika, k prevenci příznaků spojených se stárnutím a jako prevence cerebrovaskulárních poruch, kdy zlepšuje průtok krve v mozku a zvyšuje metabolismus mozku. Vinpocetin také poskytuje významný neuroprotektivní účinek. Tato látka prochází přes hematoencefalickou bariéru a dostává se tak přímo do mozkové tkáně. Bylo prokázáno, že vinpocetin má i významný vasodilatační účinek a snižuje agregaci krevních destiček. Proto tato látka má největší klinický účinek u pacientů s chronickou mozkovou příhodou, akutní cévní mozkovou příhodou, různými druhy demence nebo močovou inkontinencí. Při užívání vinpocetinu se mohou objevit vyrážky, návaly horka nebo gastrointestinální potíže. [122–124]



Obrázek 21: Vzorec vinpocetinu

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Příprava a čištění rozpouštědel

Rozpouštědla, která byla při práci používána, byla pomocí destilace přečištěna. Následně byla uchovávána v tmavých stojátkách ze skla, aby byla chráněna před světlem.

4.1.2 Odpařování rozpouštědel

Extrakty byly odpařovány pomocí rotační vakuové při sníženém tlaku a o teplotě do 40 °C, případně byly dosušeny přes proud vzduchu na vodní lázni. Závěrečné dosušení proběhlo v exsíkátoru, ve vakuu, nad perlami silikagelu, po dobu nejméně 24 hod. Po dosušení byly následně skladovány při teplotě 2–8 °C v lednici.

4.1.3 Flash chromatografie

Frakce byly děleny pomocí flash chromatografie. Vzorky byly nanесeny na komerční kolonu a dělení probíhalo při rychlosti průtoku 30 ml·min⁻¹. Následná detekce látek probíhala při 254 nm.

4.1.4 Tenkovrstvá chromatografie

Chromatografie na tenké vrstvě byla prováděna standardním způsobem v chromatografických komorách, které byly nasyceny po určitou dobu parami zvolené mobilní fáze a poté do nich byly vkládány komerční hliníkové desky o tloušťce 0,2 mm nebo připravené skleněné desky, pokryté vrstvou silikagelu, na kterých byly nanесeny vzorky.

4.1.5 Příprava skleněných desek na preparativní TLC

Skleněné desky o rozměrech 150x150 mm, které byly používány pro preparativní TLC, byly nejdříve omyty vodou a poté odmaštěny ethanolem. Suspenze byla připravena z 6,5 g silikagelu a 22,4 ml vody. Dobře promíchaná suspenze byla nanесena na desku a rozprostřena na celou její plochu. Takto připravené desky byly nechány minimálně na 24 hod schnout při pokojové teplotě.

4.1.6 Detekce alkaloidů

Detekce alkaloidů byla provedena nejprve pod UV lampou o vlnové délce 254 nm a 366 nm. Následně desky byly postříkány Dragendorffovým činidlem (jedná se o tetrajodobismutitan draselný $K[BiI_4]$), kdy v přítomnosti alkaloidů došlo k oranžovému, oranžovo-červenému nebo oranžovo-hnědému zbarvení. Reakce se využívá k důkazu přítomnosti alkaloidů ve vzorcích, které ve své molekule obsahují kvartérní nebo terciární dusík. Detekce je poměrně citlivá.

Detekce byla provedena vždy po odpaření zbytkových rozpouštědel.

4.2 Potřeby a chemikálie pro izolaci látek

4.2.1 Rozpouštědla a chemikálie

Aceton p. a. (CH_3COCH_3), Penta, Praha

Acetonitril p. a. (CH_3CN), Balex, Pardubice-Rosice

Amoniak 25% p. a., vodný roztok (NH_3), Penta, Praha

Kyselina octová 99% (CH_3COOH), Penta, Praha

Cyklohexan č. (C_6H_{12}), Lachner, Neratovice

Diethylamin p. a. (Et_2NH), Penta, Praha

Ethanol 95% ($EtOH$), Lihovar Chrudim, Chrudim

Ethylacetát p. a. ($EtOAc$), Penta, Praha

Chloroform p. a. ($CHCl_3$), Penta, Praha

Kyselina mravenčí 98% p. a. ($HCOOH$), Penta, Praha

Kyselina trifluoroctová > 99,5% (TFAA), Fluka, Bukurešť

Methanol p. a. ($MeOH$), Penta, Praha

Toluen č. (To), Penta, Praha

4.2.2 Pomocný materiál

Křemelina C 535 Celite, Sigma-Aldrich, Praha

Vata

4.2.3 Detekční činidla

D 1: *Dragendorffovo činidlo* [125]

Roztok A: 20 g kyseliny vinné bylo rozpuštěno s 1,7 g dusičnanu bismutitého (bazického) v 80 ml vody

Roztok B: ve 40 ml vody bylo rozpuštěno 16 g jodidu draselného

Zásobní roztok: smísení roztoku A + B (1 : 1)

Detekční roztok: 5 ml zásobního roztoku bylo smícháno s roztokem 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody a tento roztok byl používán k detekci alkaloidů. Roztoky byly uchovávány při 4 °C v lednici.

4.2.4 Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S 1: cHx + CH₃COCH₃ + Et₂NH (75 : 25 : 2)

S 2: CH₃CN + MeOH + TFAA (40 : 10 : 0,1)

S 3: EtOAc + HCOOH + CH₃COOH + H₂O (100 : 11 : 11 : 27)

S 4: To + cHx + Et₂NH (6 : 3 : 1)

S 5: To + CH₃COCH₃ + EtOH + NH₃ (40 : 40 : 6 : 2)

4.2.5 Chromatografické adsorbenty

Komerční hliníkové TLC desky Silica gel 60 F₂₅₄, Merck, Praha

Silikagel pro přípravu litých vrstev pro TLC: Silica gel Kieselgel 60 GF₂₅₄, Merck, Praha

Sepacore Silica Flash Cartridge, 12 g, Büchi, Switzerland

4.2.6 Přístroje

Vakuová odparka Laborota 4000, Heidolph, Germany

Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P, Bandelin, Germany

Spektrometr ESI/MS Thermo Finnigan LCQDuo, GenTech, USA

Spektrometr VNMR S500, Varian, USA

Flash systém s kontrolní jednotkou C-620 s detektorem C-640, kolektorem frakcí C-660 a pumpou C-605, Büchi, Switzerland

Polarimetr P3000, A. Krüs Optronic, Germany

4.3 Potřeby a chemikálie pro stanovení inhibiční aktivity

4.3.1 Chemikálie ke stanovení inhibiční aktivity

Acetylthiocholin jodid 10mM roztok, Sigma-Aldrich, Praha

Butyrylthiocholin jodid 10mM roztok, Sigma-Aldrich, Praha

Dimethylsulfoxid p.a. (DMSO), Sigma-Aldrich, Praha

Galanthamin hydrobromid, Changsha Organic Haerb Inc, China

Huperzin A, Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co, Ltd., China

5mM roztok 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina \geq 98% (DTNB), Sigma-Aldrich, Praha

4.3.2 Pufry

Fosfátový pufr 5mM, pH 7,4

Fosfátový pufr 5mM, pH 7,4 s obsahem 150 mM NaCl

Fosfátový pufr 100 mM, pH 7,4

4.3.3 Přístroje

Centrifuga Boeco U-32 R, Boeco, Germany a rotor Hettich 1611, Hettich, Germany

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

4.3.4 Biologický materiál

Jako zdroj lidské AChE byl použit hemolyzát lidských erytrocytů a jako zdroj lidské BuChE byla použita lidská plazma.

4.4 Izolace alkaloidů

4.4.1 Extrakce a získaná frakce

V diplomové práci byla použita frakce VM 299 o hmotnosti 8,3 g, která byla získána sloupcovou chromatografií alkaloidního extraktu *Vinca minor* L. (rostlinná droga byla nejprve extrahována ethanolem, roztok odpařen a posléze extrahován rozpouštědly vytřepáváním při různém pH). Tyto práce odvedli prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc. a Ing. Miroslav Ločárek na Katedře farmaceutické botaniky.

Tabulka 9: Charakteristika frakce VM 299

| název frakce | váha odparku (g) | popis |
|--------------|------------------|---------------------|
| VM 299 | 8,3 | tuhý, červeno-hnědý |



Obrázek 22: Tenkovrstvá chromatografie frakce VM 299, Silikagel Kieselgel 60_{GF254} Merck, cHx + CH₃COCH₃ + Et₂NH (75 : 25 : 2), detekce Dragendorffovo činidlo

4.4.2 Rozdělení extraktu na frakce

Frakce VM 299 byla dále dělena metodou flash chromatografie. Dělení probíhalo na koloně, kdy adsorbentem byl silikagel, 12 g. Frakce byla nanášena v množství 500 mg ve formě 10% roztoku $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (1:1). Mobilní fáze byla tvořena $\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{CH}_3\text{COCH}_3 + \text{Et}_2\text{NH}$ v poměru 75 : 25 : 2. Průtoková rychlost byla $30 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a detekce jednotlivých alkaloidů byla prováděna při vlnové délce 254 nm. Flash chromatografií bylo získáno z extraktu celkem 302 frakcí. Frakce byly průběžně kontrolovány pomocí TLC a na základě podobnosti obsahu byly některé frakce spojeny. Výsledný počet po spojení byl 48 frakcí, z nichž 2 frakce byly vyloučeny z důvodu nepotvrzeného obsahu alkaloidů. Dále byly pomocí preparativní chromatografie zpracovávány frakce 35 a 39 viz tabulka 10.

Tabulka 10: Dále zpracovávané frakce flash chromatografie

| Číslo | Spojené frakce | Odparek (g) | Popis |
|-------|----------------|-------------|---------------------------|
| 35 | 224-225 | 0,0821 | červenohnědý; viskózní |
| 39 | 239-256 | 0,2457 | žlutý; řídký |

4.4.3 Izolace jednotlivých alkaloidů

4.4.3.1 Frakce č. 35

Frakce č. 35 o hmotnosti 82,1 mg byla dále dělena pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie. Frakce byla nanesena na celkem 5 komerčních hliníkových TLC desek a vyvinuta v chromatografických komorách, které byly nasyceny parami mobilní fáze. Mobilní fázi tvořila směs $\text{CH}_3\text{CN} + \text{MeOH} + \text{TFAA}$ v poměru 40 : 10 : 0,1. Frakce byla pomocí preparativní TLC rozdělena na 3 podfrakce 35-A, 35-B a 35-C. Jednotlivé podfrakce byly vyškrábány a spolu s příměsí křemeliny promyty 10násobným množstvím směsi $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (1 : 1). Poté byla rozpouštědla odpařena a byla provedena TLC v soustavě $\text{CH}_3\text{CN} + \text{MeOH} + \text{TFAA}$ v poměru 40 : 10 : 0,1. Výsledek je znázorněn na obrázku (Obrázek 23).

Pro další práci byl vybrán vzorek 35-B, který byl následně přečištěn na 3 komerčních hliníkových TLC deskách a vyvinut v soustavě To + cHx + Et₂NH v poměru 6 : 3 : 1. Bylo získáno 25,3 mg čisté látky PŠ-1, která byla poté podrobena zkoumání biologické aktivity.

4.4.3.2 Frakce č. 39

Frakce č. 39 o hmotnosti 245,7 mg byla dále dělena pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie. Frakce byla nanášena celkem na 8 připravených skleněných desek a vyvinuta v chromatografických komorách, které byly nasyceny parami mobilní fáze. Mobilní fází tvořila směs EtOAc + HCOOH + CH₃COOH + H₂O v poměru 100 : 11 : 11 : 27. Byly získány 3 podfrakce 39-A, 39-B a 39-C. Jednotlivé podfrakce byly vyškrábány a spolu s příměsí křemeliny promyty 10násobným množstvím směsi CHCl₃ + EtOH (1 : 1). Poté byla rozpouštědla odpařena a byla provedena TLC v soustavě To + cHx + Et₂NH v poměru 6 : 3 : 1. Výsledek je znázorněn na obrázku (Obrázek 24).

Pro další práci byl vybrán vzorek 39-A, který byl následně přečištěn na 6 komerčních hliníkových TLC deskách a vyvinut v soustavě To + CH₃COCH₃ + EtOH + NH₃ v poměru 40 : 40 : 6 : 2. Bylo získáno 98,2 mg čisté látky PŠ-2, která byla poté podrobena zkoumání biologické aktivity.



Obrázek 23: Kontrolní tenkovrstvá chromatografie frakce č. 35, Silikagel Kieselgel 60_{GF254} Merck, CH₃CN + MeOH + TFAA (40 : 10 : 0,1), detekce Dragendorffovo činidlo



Obrázek 24: Kontrolní tenkovrstvá chromatografie frakce č. 39, Silikagel Kieselgel 60_{GF254} Merck, To + cHx + Et₂NH (6 : 3 : 1), detekce Dragendorffovo činidlo

4.5 Analýza struktury

4.5.1 GC/MS analýza a identifikace

Analýza struktur izolovaných alkaloidů byla prováděna pomocí plynové chromatografie s detekcí hmotnostním spektrometrem. Pro identifikaci byl použit chromatograf Agilent Technologies 7890A spolu s hmotnostním detektorem Agilent Technologies 5975.

Tabulka 11: Podmínky GC/MS analýzy

| | |
|----------------------|---|
| Typ kolony | Agilent Technologies HP-5MS, 30 m x 0,250 mm x 0,250 μm |
| Nosné médium | Helium 5.0 (Linde) |
| Průtok nosného plynu | 0,8 ml·min ⁻¹ |
| Teplotní program | 15 °C/min z teploty 100 °C na 180 °C, 1 min udržování na teplotě 180 °C |
| | 5 °C/min z teploty 180 °C na 300 °C, 40 min udržování na teplotě 300 °C |
| Nástřik | Při 280 °C v 1 μl , split 1:10 |
| Zkoušený vzorek | methanolický roztok extraktu v koncentraci 1 mg·ml ⁻¹ |

Při 230 °C došlo k elektronové ionizaci 70 eV. Fragmenty byly detekovány při rozmezí 40–600 m/z. Analýza struktur izolovaných alkaloidů byla porovnávána se spektry dostupnými v National Institute of Standards and Technology Library (NIST11) v USA a s daty nalezenými v literatuře.

4.5.2 ESI/MS analýza

ESI/MS analýzu provedla PharmDr. Anna Hošťálková, Ph.D.

Za účelem získání Mr hodnot byla provedena analýza pomocí ionizace elektrosprejem v kladném módu na přístroji ESI/MS Thermo Finnigan LCQDuo. Spektra byla měřena při energii kolize 40 eV. Látky byly rozpuštěny v methanolu.

4.5.3 NMR analýza

NMR analýzu provedl doc. PharmDr. Jiří Kuneš na Katedře organické a bioorganické chemie.

NMR spektra ^1H -NMR a ^{13}C -NMR izolovaných látek, byla naměřena na spektrometru VNMR S500 při teplotě 25 °C. Pro jádra ^1H spektrometr pracoval při frekvenci 499,87 MHz a pro jádra ^{13}C při frekvenci 125,70 MHz. Chemické posuny δ byly vyjádřeny v ppm (pars per milion) a nepřímo vztaženy ke standardu tetramethylsilanu.

4.5.4 Optická otáčivost

Měření bylo prováděno na polarimetru P 3000. Látky byly rozpuštěny v CHCl_3 nebo EtOH. Následně byla specifická optická otáčivost vypočítána pomocí vzorce.

$$[\alpha]_D^t = \frac{100 \times a}{c \times l}$$

| |
|--|
| l – tloušťka vrstvy [dm] |
| t – teplota měření [°C] |
| D – D-linie ze sodíkové výbojky o $\lambda = 589,3$ nm |
| c – koncentrace naměřené látky [g/l] |
| α - naměřená hodnota optické otáčivosti [°C] |

4.6 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů

4.6.1 Příprava plazmy a hemolyzátu

Hemolyzát a plazma byly získány z čerstvé krve, která byla odebrána a následně smíchána s citronanem sodným v poměru 1 : 9 (odpovídá 2 ml 3,4% citronanu a 18 ml krve) z důvodu zábrany koagulace. Následně byla krev rovnoměrně rozdělena do zkumavek. Byla provedena centrifugace rychlostí 4000 ot·min⁻¹ při teplotě 4 °C a po dobu 10 min. Oddělená plazma poté byla zdrojem BuChE.

Z usazených erytrocytů se odsály zbytky plazmy a sediment byl zředěn 5mM fosfátovým pufrům o pH 7,4 s obsahem 150mM NaCl. Takto vzniklá suspenze byla dostatečně promíchána, rozdělena do zkumavek a byla provedena centrifugace za stejných podmínek. Erytrocyty byly promyty centrifugací celkem 3x, poté byla odstraněna promývací kapalina a byl přidán 5mM fosfátový pufr o pH 7,4 v poměru 1 : 9 (erytrocyty + fosfátový pufr). Tato směs byla převedena do Erlenmayerovy baňky a za stálého míchání na magnetické míchačce pomocí míchadla byla nechána hemolyzovat.

Po skončení procesu hemolýzy byla změřena aktivita hemolyzátu. Hodnoty absorbance AChE v hemolyzátu i BuChE v plazmě byly upraveny pomocí 5mM fosfátového pufru podle potřeby.

Hemolyzát i plazma, které byly získány, byly uchovávány při teplotě -22 °C.

4.6.2 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (IC₅₀)

Měření bylo provedeno prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. na Katedře farmaceutické botaniky následujícím postupem.

Hodnoty inhibiční aktivity byly stanoveny pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody s použitím DTNB. Metoda je založena na hydrolýze esterů thiocholinu cholinesterasou za vzniku thiocholinu a příslušné kyseliny. SH- skupina thiocholinu následně reaguje s DTNB za vzniku žlutého zbarvení. Následně byl sledován spektrofotometrickou metodou nárůst absorbance po dobu 1 min při vlnových délkách $\lambda = 436$ nm pro AChE a $\lambda = 412$ nm pro BuChE.

Ke stanovení aktivity enzymů bylo pipetováno na mikrotitrační destičku 8,3 μ l hemolyzátu (pro AChE) nebo 8,3 μ l krevní plazmy (pro BuChE). Následně bylo přidáno 283 μ l 5mM DTNB a 8,3 μ l DMSO. Směs byla dostatečně promíchávána v mikrotřepačce po dobu 1 min a poté inkubována při 37 °C 5 min. Následně bylo přidáno 33,3 μ l roztoku 10mM acetylthiocholin jodidu nebo 10nM butyrylthiocholin jodidu jako substrátu a při vlnové délce $\lambda = 436$ nm pro AChE a $\lambda = 412$ nm pro BuChE byla zjišťována hodnota absorbance.

Ke stanovení IC₅₀ izolovaných látek bylo pipetováno na mikrotitrační destičku 8,3 μ l hemolyzátu (pro AChE) nebo 8,3 μ l krevní plazmy (pro BuChE). Následně bylo přidáno 283 μ l 5mM DTNB a 8,3 μ l roztoku látek s DMSO v sestupné koncentraci 40mM, 10mM, 4mM, 1mM a 0,4mM. Směs byla dostatečně promíchávána v mikrotřepačce po dobu 1 min a poté inkubována při 37 °C 5 min. Následně bylo přidáno 33,3 μ l roztoku 10mM acetylthiocholin jodidu nebo 10mM butyrylthiocholin jodidu a hodnoty naměřené absorbance byly po 2 min odečteny.

Výpočet hodnot IC_{50} byl provedený v programu GraphPad Prism. Poté byly získané hodnoty porovnány se známými hodnotami IC_{50} . Procenta inhibice byla vypočítána dle vzorce:

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

$\% I$ – procenta inhibice

ΔA_{BL} – nárůst absorbance u slepého vzorku za 1 min

ΔA_{SA} – nárůst absorbance u měřeného vzorku za 1 min

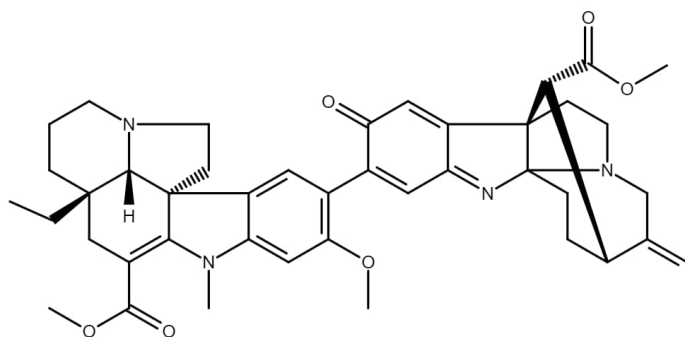
5 VÝSLEDKY

5.1 Strukturní analýza látek

5.1.1 PŠ-1: Vinkarubin

Dle výsledků z MS analýzy a NMR analýzy, byla izolovaná látka PŠ-1 identifikována jako vinkarubin.

Sumární vzorec: C₄₃ H₅₀ N₄ O₆



Obrázek 25: Vinkarubin

5.1.1.1 GC/MS analýza

Za daných podmínek nebyla látka detekována.

5.1.1.2 MS analýza

MS (ESI): m/z (%) = [M+H]⁺ 719 (100), 737 (12), 611 (10), 687 (7), 360 (4), 751 (4).

5.1.1.3 NMR analýza

Spektra byla porovnávána s literaturou. [126]

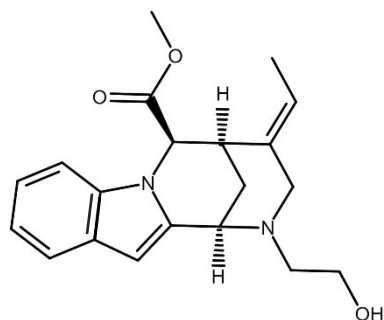
5.1.1.4 Optická otáčivost

Hodnota $[\alpha]_{20}^D = -$ (c = 0,084; EtOH)

5.1.2 PŠ-2: (-)-Vinoxin

Dle výsledků z MS analýzy a NMR analýzy, byla izolovaná látka PŠ-2 identifikována jako (-)-vinoxin.

sumární vzorec: C₂₀ H₂₄ N₂ O₃



Obrázek 26: (-)-Vinoxin

5.1.2.1 GC/MS analýza

Za daných podmínek nebyla látka detekována.

5.1.2.2 MS analýza

MS (ESI): m/z (%) = [M+H]⁺ 280 (100), 341 (95), 220 (93), 205 (18), 251 (17), 225 (14), 424 (10), 395 (10), 309 (9), 247 (8).

5.1.2.3 NMR analýza

Spektra byla porovnáována s literaturou. [94]

5.1.2.4 Optická otáčivost

Hodnota $[\alpha]_{20}^D = -13,7^\circ$ (c = 0,204; CHCl₃)

5.2 Stanovení inhibiční aktivity IC₅₀

U obou izolovaných látek, PŠ-1 a PŠ-2, byla stanovována inhibiční cholinesterasová aktivita. Hodnoty inhibičních aktivit izolovaných alkaloidů jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 12).

Tabulka 12: Hodnoty inhibičních aktivit

| Název látky | IC ₅₀ : AChE [μ M] | IC ₅₀ : BuChE [μ M] |
|-------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Vinkarubin | 384,8 \pm 73,15 | > 1000 |
| (-)-Vinoxin | > 1000 | 24,61 \pm 1,71 |
| Galanthamin | 1,710 \pm 0,065 | 42,30 \pm 1,30 |
| Huperzin A | 0,033 \pm 0,001 | > 1000 |

6 DISKUSE

Tato diplomová práce se zabývala izolací alkaloidů z frakce VM 299, která byla získána už dříve na Katedře farmaceutické botaniky z rostliny *Vinca minor* L.

Frakce VM 299 byla pomocí flash chromatografie rozdělena na frakce, které byly pomocí TLC na základě podobnosti obsahu spojeny. Výsledný počet frakcí byl 48. V diplomové práci byly zpracovávány frakce č. 35 a č. 39, ze kterých byly izolovány dvě látky.

Obě látky byly na základě MS a NMR analýzy identifikovány a jejich spektra porovnány s literaturou. Látka PŠ-1 byla identifikována jako vinkarubin a látka PŠ-2 byla identifikována jako (-)-vinoxin. U izolovaných látek byla také měřena optická otáčivost, nicméně u vinkarubinu nebyla měřitelná ani při nižší koncentraci pro nedostatek světla, které bylo dáno červeným zbarvením alkaloidu a měřeného roztoku.

Alkaloid vinkarubin byl již dříve izolován z rostliny *Vinca minor* L. Jedná se o jediný bisindolový alkaloid izolovaný z této rostliny, který byl nalezen pouze v listech ve velmi malém množství. Alkaloid (-)-vinoxin byl také z *Vinca minor* L. izolován již dříve. [9]

Dále u izolovaných alkaloidů byla zjišťována biologická aktivita. Získané hodnoty byly porovnávány se standardy huperzinem A a galanthaminem. Izolovaný alkaloid vinkarubin vykazoval nevýznamnou aktivitu vůči AChE ($IC_{50} = 384,8 \pm 73,15 \mu M$) i BuChE ($IC_{50} > 1000 \mu M$). Alkaloid (-)-vinoxin také vykazoval nevýznamnou aktivitu vůči AChE ($IC_{50} > 1000 \mu M$), nicméně inhibiční aktivita vůči BuChE byla poměrně vysoká ($IC_{50} = 24,61 \pm 1,71 \mu M$). Přesto je aktivita (-)-vinoxinu relativně nevýznamná.

Z výsledků tedy vyplývá, že vinkarubin není významný inhibitor cholinesteras. (-)-Vinoxin inhibuje AChE zanedbatelně, zatímco vůči BuChE vykazoval inhibiční aktivitu vyšší než u zmíněných standardů. Inhibiční aktivita vůči cholinesterasám dosud nebyla měřena.

7 LITERATURA

1. Mátl O., Mátlová M., Holmerová I.: *Zpráva o stavu demence 2016*. Česká alzheimerovská společnost, Praha 2016.
2. Alzheimer's Disease Fact Sheet. *National Institute on Aging* [online]. Dostupné z: <https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-fact-sheet#changes>, staženo 8. října 2018.
3. Resner P.: Alzheimerova choroba - diagnostika a léčba. *Neurol. praxi* 1, 11 (2004).
4. Turkington C., Harris J. R.: *The Encyclopedia of the Brain and Brain Disorders*. Vyd. 3. Infobase Publishing, New York 2009.
5. Alzheimer's Disease. *Medline Plus - Health Information from the National Library of Medicine* [online]. Dostupné z : <https://medlineplus.gov/alzheimersdisease.html>, staženo 8. října 2018.
6. Vyhnálek M., Laczó J., Nikolai T., Sheardová K., Hort J.: Časná diagnostika Alzheimerovy nemoci ve světle nových diagnostických kritérií. *Neruol. praxi* 13, 325 (2012).
7. Jiráček R.: Diagnostika a terapie alzheimerovy choroby. *Neurol. praxi* 9, 240 (2008).
8. Jahodář L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Vyd. 3. upravené a doplněné. Karolinum, Praha 2011.
9. Farahanikia B., Akbarzadeh T., Jahangirzadeh A., Yassa N., Shams Ardekani M. R., Mirnezami T., Hadjiakhoondi A., Khanavi M.: Phytochemical Investigation of *Vinca minor* Cultivated in Iran. *Iran. J. Pharm. Res.* 10, 777 (2011).
10. Silbernagl S., Lang, F.: *Atlas patofyziologie člověka*. Grada, Praha 2012.
11. Assessing Risk for Alzheimer's Disease. *National Institute on Aging* [online]. Dostupné z: <https://www.nia.nih.gov/health/assessing-risk-alzheimers-disease>, staženo 8. října 2018.
12. Cognitive Health and Older Adults. *National Institute on Aging* [online]. Dostupné z: <https://www.nia.nih.gov/health/cognitive-health-and-older-adults#keep>, staženo 8. října 2018.

13. What is Alzheimer's. *Alzheimer's association* [online]. Dostupné z: <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/what-is-alzheimers>, staženo 8. října 2018.
14. Vlček J., Fialová D.: *Klinická farmacie I*. Grada, Praha 2010.
15. Doležal M., Kučerová M., Miletín M., Musílek K., Opletalová V., Zimčík P.: *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. Karolinum, Praha 2013.
16. Alzheimer's Association: 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 11, 332 (2015).
17. Liu C. C., Liu C. C., Xu H., Bu G.: Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 106 (2013).
18. Nordberg A., Ballard C., Bullock R., Darreh-Shori T., Somogyi M.: A review of butyrylcholinesterase as a therapeutic target in the treatment of Alzheimer's disease. *Prim. Care Companion CNS Disord.* 15, (2013).
19. Mushtaq G., Greig N. H., Khan J. A., Kamal M. A.: Status of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. *CNS Neurol. Disord.: Drug Targets* 13, 1432 (2014).
20. Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klin. Farmakol. Farm.* 18, 212 (2004).
21. Raboch J., Zvolský P., Beran J., Bouček J., Češková E., Drtílková I., Fišar Z., Honzák R., Hrdlička M., Hýnek K., Janotová D., Jiráček R., Libiger J., Papežová H., Pavlovský P., Popov P., Procházka L., Študent V., Švestka J., Vymětal J., Zvěřina J., Žukov I.: *Psychiatrie*. Vyd. 1. Galén, Praha 2001.
22. García-Ayllón M. S., Small D. H., Avila J., Sáez-Valero J.: Revisiting the role of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease: cross-talk with P-tau and β -amyloid. *Front. Mol. Neurosci.* 4, 1 (2011).
23. Cibičková L., Palička V.: Alzheimerova choroba, cholesterol a apolipoprotein E. *Klin. Biochem. Metab.* 13, 127 (2005).

24. Kumar A., Sharma S.: Donepezil. *National Center for Biotechnology Information* [online]. StatPearls Publishing, 2018. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513257/>, staženo 9. října 2018.
25. Knowles J.: Donepezil in Alzheimer's disease: an evidence-based review of its impact on clinical and economic outcomes. *Core Evidence* 1, 195 (2006).
26. Wilkinson D. G.: The pharmacology of donepezil: a new treatment for Alzheimer's disease. *Expert Opin. Pharmacother.* 1, 121 (1999).
27. Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Prakt. lékařem.* 8, 107 (2012).
28. Szeto J. Y., Lewis S. J.: Current treatment options for Alzheimer's disease and Parkinson's disease dementia. *Curr. Neuropharmacol.* 14, 326 (2016).
29. Kandiah N., Pai M. C., Senanarong V., Loo I., Ampil E., Park K. W., Karanam A. K., Christopher S.: Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia. *Clin. Interventions Aging* 12, 697 (2017).
30. Mucke H. A.: The case of galantamine: repurposing and late blooming of a cholinergic drug. *Future Sci. OA* 1, (2015).
31. Takos A. M., Rook F.: Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 11713 (2013).
32. Lilienfeld S.: Galantamine - a novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev.* 8, 159 (2002).
33. Olin J., Schneider L.: Galantamine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.*, (2002).
34. Sheardová K., Hort J., Rusina R., Bartoš A., Líněk V., Rössner P., Rektorová I.: Doporučené postupy pro terapii Alzheimerovy nemoci a ostatních demencií. *Psychiatr. pro Praxi* 10, 216 (2009).

35. Paganini-Hill A., Henderson V. W.: Estrogen replacement therapy and risk of Alzheimer disease. *Arch. Intern. Med.* 156, 2213 (1996).
36. Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M.: *Farmakognozie*. Karolinum, Praha 2016.
37. Moeller S., Wöhrmann T., Huettel B., Weising K.: Development of 18 polymorphic microsatellite markers for *Vinca minor* (Apocynaceae) via 454 pyrosequencing. *Appl. Plant Sci.* 3, (2015).
38. Barvínek menší - *Vinca minor*. *Květena České republiky - plané rostliny ČR* [online]. Dostupné z: <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=140>, stažen 18. října 2018.
39. Polívka F.: *Názorná květena zemí koruny české - svazek III*. R. Promberger, Olomouc 1901.
40. *Vinca minor* L. - barvínek menší (brčál). *Daidalea* [online]. Dostupné z: <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantSpecies.asp?id=10024>, staženo 15. března 2019.
41. Wong S. K., Lim Y. Y., Chan E. W. C.: Botany, uses, phytochemistry and pharmacology of selected Apocynaceae species: A review. *Pharmacogn. Commun.* 3, 2 (2013).
42. Koyuncu M.: A new species of *Vinca* (Apocynaceae) from eastern Anatolia, Turkey. *Turk. J. Bot.* 36, 247 (2012).
43. Arora R.: *Medicinal plant biotechnology*, CAB International, Wallingford 2010.
44. Csiky J., Purger D.: Herbaceous periwinkle, *Vinca herbacea* Waldst. et Kit. 1799 (Apocynaceae), a new species of the Croatian flora. *Acta Bot. Croat.* 72, 399 (2013).
45. *Vinca major*. *RHS - Inspiring everyone to grow* [online]. Dostupné z: <https://www.rhs.org.uk/Plants/18969/Vinca-major/Details>, staženo 24. dubna 2019.
46. Periwinkle *Vinca herbacea* Waldst. et Kit. *Life on chalk* [online]. Dostupné z: <http://chalksteppe.org/en/flora-and-fauna/species/vinca-herbacea.html>, staženo 15. března 2019.

47. *Vinca erecta* Regel & Schmalh. *Encyclopedia of Life* [online]. Dostupné z: <https://eol.org/pages/47138994/articles>, staženo 7. listopadu 2018.
48. *Vinca soneri*. *Türkiyebitkileri.com* [online]. Dostupné z: <https://www.turkiyebitkileri.com/en/photo-gallery/view-album/641.html>, staženo 15. března 2019.
49. *Vinca erecta* Regel & Schmalhausen. *Plantarium* [online]. Dostupné z: <http://www.plantarium.ru/page/image/id/167167.html>, staženo 15. března 2019.
50. Cullen J., Knees S. G., Cubey S.: *The European garden flora. Volume IV*. Cambridge University Press, New York 2011.
51. Koyuncu M., Eksi G., Ozkan A. M. G.: *Vinca ispartensis* (Apocynaceae), a new species from Turkey. *Ann. Bot. Fenn.* 52, 340 (2015).
52. Hall T.: Periwinkle - *Vinca difformis*. *Andalucia.com* [online]. Dostupné z: <http://www.andalucia.com/environment/wildflowers/periwinkle-vinca-difformis.htm>, staženo 15. března 2019.
53. *Vinca ispartensis*. *Dogalhayt.org* [online]. Dostupné z: <http://dogalhayt.org/property/vinca-ispartensis/>, staženo 15. března 2019.
54. Korbelař J., Endris Z.: *Naše rostliny v lékařství*. Avicenum, Praha 1981.
55. Moudi M., Go R., Yien C. Y., Nazre M.: *Vinca* alkaloids. *Int. J. Prev. Med.* 4, 1231 (2013).
56. van Vuuren R. J., Visagie M. H., Theron A. E., Joubert A. M.: Antimitotic drugs in the treatment of cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 76, 1101 (2015).
57. Cheng G. G., Zhao Y. L., Zhang Y., Lunga P. K., Hu D. B., Li Y., Gu J., Song C. W., Sun W. B., Liu Y. P., Luo X. D.: Indole alkaloids from cultivated *Vinca major*. *Tetrahedron* 70, 8723 (2014).
58. Herrmann J. L., Cregge R. J., Richman J. E., Kieczkowski G. R., Normandin S. N., Quesada M. L., Semmelhack C. L., Poss A. J., Schlessinger R. H.: Total synthesis of the indole alkaloids dl-eburnamonine and dl-vincamine. *J. Am. Chem. Soc.* 101, 1540 (1979).

59. Dopke W.: The Eburnamine-Vincamine Alkaloids. *Alkaloids Chem. Physiol.* **20**, 297 (1981).
60. Vinburnine. *The PubChem Project* [online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vinburnine>, staženo 17. listopadu 2018.
61. Vas A., Gulyás B.: Eburnamine derivates and the brain. *Med. Res. Rev.* **25**, 737 (2005).
62. Mokrý J., Kompiš I., Spitteller G.: Alkaloids from *Vinca minor* L. XX. Further minor alkaloids. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **32**, 2523 (1967).
63. Mokrý J., Kompiš I.: 14-epivincamine, a new alkaloid from *Vinca minor* L. *Tetrahedron Lett.* **4**, 1917 (1963).
64. Doepke W., Meisel H., Grundemann E., Spitteller G.: Structure of a new alkaloid from *Vinca minor*. *Tetrahedron Lett.* **15**, 1805 (1968).
65. Bauerová O., Mokrý J., Kompiš I., Bauer Š., Tomko J.: Alkaloidy z *Vinca minor* L. (II) hodnotenie chromatografiou na papieri. *Chem. zvesti* **7**, 523 (1961).
66. Manske R. H. F. (Ed): *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*. Academic Press, New York 1965.
67. Trojánek J., Kavková K., Štrouf O., Čekan Z.: Alkaloids. IV. Isolation of vincine, a new alkaloid of *Vinca minor* L. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **26**, 867 (1961).
68. Štrouf O., Trojánek J.: Structure of vincine. *Chem. Ind.* **1962**, 2037.
69. Dopke W., Meisel H., Spitteller G.: Dimethoxyeburnamonine, a new alkaloid from *Vinca minor*. *Pharmazie* **23**, 99 (1968).
70. Malikov V. M., Yunusov S. Y.: *Vinca* alkaloids. *Chem. Nat. Compd.* **13**, 497 (1977).
71. Prokša B., Grossmann E.: High performance liquid chromatographic determination of alkaloids from *Vinca minor* L. *Phytochem. Anal.* **2**, 74 (1991).
72. Doepke W., Meisel H.: 16-Methoxyvincadiformine, a new alkaloid from *Vinca minor*. *Pharmazie* **23**, 521 (1968).

73. Adizov S. M., Tashkhodzhaev B., Bruskov V. P., Talipov S. A., Yuldashev P. K., Malikov V. M.: On nitrogen coordination in vincadifformine-type alkaloids. *Chem. Nat. Compd.* **53**, 512 (2017).
74. Doepke W., Meisel H.: Isolation of vincatine and vincesine, two new alkaloids from *Vinca minor*. *Pharmazie* **21**, 444 (1966).
75. Mokřý J., Kompiš I.: (\pm)-Ind-*N*-metylquebrachamin, štvrtý racemický alkaloid z *Vinca minor* L. *Chem. Zvesti* **17**, 852 (1963).
76. Kutney J. P., Chan K. K., Failli A., Fromson J. M., Gletsos C., Leutwiler A., Nelson V. R., de Souza J. P.: Total synthesis of indole and dihydroindole alkaloids. VI. The total synthesis of some monomeric *vinca* alkaloids: dl-vincadine, dl-vincaminoreine, dl-vincaminorine, dl-vincadifformine, dl-minovine and dl-vincaminoridine. *Helv. Chim. Acta* **58**, 1648 (1975).
77. Singh S. K., Kanwar S. S.: Antilipase activity guided fractionation of *Vinca major*. *J. King Saud Univ., Sci.* **30**, 433 (2018).
78. Lewin G., Le Ménez P., Rolland Y., Renouard A., Giesen-Crouse E.: Akuammine and dihydroakuammine, two indolomonoterpene alkaloids displaying affinity for opioid receptors. *J. Nat. Prod.* **55**, 380 (1992).
79. Dylan L., Cázares P., Yu F., De Kuca V.: A picrinine *N*-methyltransferase belongs to a new family of γ -tocopherol-like methyltransferases found in medicinal plants that make biologically active monoterpenoid indole alkaloids. *Plant Physiol.* **170**, 1935 (2016).
80. Glasby J.: *Encyclopedia of the Alkaloids, svazek 4*. Springer US, New York 1983.
81. Sarpagine. *The PubChem Project* [online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/20055020>, staženo 17. listopadu 2018.
82. Namjoshi O. A., Cook J. M.: Sarpagine and related alkaloids. *Alkaloids Chem. Biol.* **76**, 63 (2016).
83. Edwankar C. R., Edwankar R. V., Namjoshi O. A., Liao X., Cook J. M.: Stereospecific approach to the synthesis of ring-A oxygenated sarpagine indole alkaloids. Total synthesis of the dimeric

indole alkaloid P-(+)-dispegatine and six other monomeric indole alkaloids. *J. Org. Chem.* **78**, 6471 (2013).

84. Devi B., Bhattacharya S.: Influence of AMF (*Glomus coronatum* and *Glomus etunicatum*) on plant growth and physiological parameter of *Vinca minor* growing under Himalayan condition. *World J. Pharm. Res.* **7**, 1686 (2018).

85. Tulyaganov T. S., Nigmatullaev A. M.: Alkaloids of *Vinca minor*. *Chem. Nat. Compd.* **36**, 540 (2000).

86. KNApSACk Metabolite C00027094. *GenometNet* [online]. Dostupné z: https://www.genome.jp/db/pcidb/kna_cpds/27094, staženo 6. ledna 2019.

87. Prokša B., Uhrín D., Grossmann E., Votický Z.: (-)-1-Norvincorine, a new alkaloid from *Vinca minor*. *Planta Med.* **53**, 120 (1987).

88. Bahadori F., Topcu G., Boga M., Türkekul A., Kolak U., Karal M.: Indole alkaloids from *Vinca major* and *V. minor* growing in Turkey. *Nat. Prod. Commun.* **7**, 731 (2012).

89. Ajmaline. *The PubChem Project* [online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441080>, staženo 17. listopadu 2018.

90. Meisel H., Doepke W., Gruendemann E.: Structure and stereochemistry of vinorine. *Tetrahedron Lett.* **17**, 1291 (1971)

91. Oxindole. *The PubChem Project* [online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/321710>, staženo 17. listopadu 2018.

92. Knölker J. H. (Ed): *The Alkaloids, vol. 76*. Academic Press, New York 2016.

93. Doepke W., Meisel H., Fehlhaber H. W.: Structure of vincatine, an oxindole alkaloid from *Vinca minor*. *Tetrahedron Lett.* **21**, 1701 (1969).

94. Votický Z., Grossmann E., Potier P.: Alkaloids from *Vinca minor* L. XXV. Vinoxine, a novel type of indole alkaloid. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2**, 548 (1977).

95. Mokřý J., Doubravková L., Ševčovič P.: Alkaloids from *Vinca minor*. Vincadine, minovine, and vincorine. *Experientia* **18**, 564 (1962).
96. Lee C. T., Huang Y. W., Yang C. H., Huang K. S.: Drug delivery systems and combination therapy by using *vinca* alkaloids. *Curr. Top. Med. Chem.* **15**, 1491 (2015).
97. Galarreta B. C., Sifuentes R., Carrillo A. K., Sanchez L., Amado M. R., Maruenda H.: The use of natural product scaffolds as leads in the search for trypanothione reductase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 6689 (2008).
98. Sturdíková M., Fuksa J., Grossmann E., Votický Z.: New compounds with cytotoxic and antitumor effects. Part 6: Monomeric indole alkaloids of *Vinca minor* L. and their effect on P388 cells. *Pharmazie* **41**, 270 (1986).
99. Shang J. H., Cai X. H., Zhao Y. L., Feng T., Luo X. D.: Pharmacological evaluation of *Alstonia scholaris*: anti-tussive, anti-asthmatic and expectorant activities. *J. Ethnopharmacol.* **129**, 293 (2010).
100. Shang J. H., Cai X. H., Feng T., Zhao Y. L., Wang J. K., Zhang L. Y., Yan M., Luo X. D.: Pharmacological evaluation of *Alstonia scholaris*: anti-inflammatory and analgesic effects. *J. Ethnopharmacol.* **129**, 174 (2010).
101. Gan L. S., Yang S. P., Wu Y., Ding J., Yue J. M.: Terpenoid indole alkaloids from *Winchia calophylla*. *J. Nat. Prod.* **69**, 18 (2006).
102. Menzies J. R., Paterson S. J., Duwiejua M. Corbett A. D.: Opioid activity of alkaloids extracted from *Picralima nitida* (fam. Apocynaceae). *Eur. J. Pharmacol.* **350**, 101 (1998).
103. Kaushik N. K., Kaushik N., Attri P., Kumar N., Kim C. H., Verma A. K., Choi E. H.: Biomedical importance of indoles. *Molecules* **18**, 6620 (2013).
104. Gülcin I., Beydemir S., Topal F., Gagua N., Bakuridze A., Bayram R., Gepdiremen A.: Apoptotic, antioxidant and antiradical effects of majdine and isomajdine from *Vinca herbacea* Waldst. and kit. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **27**, 587 (2012).

105. Arai H., Zaima K., Mitsuta E., Tamamoto H., Saito A., Hirasawa Y., Rahman A., Kusumawati I., Zaini N. C., Morita H.: Alstiphyllanines I–O, ajmaline type alkaloids from *Alstonia macrophylla* showing vasorelaxant activity. *Bioorg. Med. Chem.* *20*, 3454 (2012).
106. Mustofa M., Mallié M., Valentin A., Lewin G.: In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of vincadifformine and its semisynthetic derivatives. *Indones. J. Biotech.* *11*, 878 (2006).
107. Lobay D.: Rauwolfia in the treatment of hypertension. *Interg. Med.* *14*, 40 (2015).
108. Reserpine. *The PubChem Project* [online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/32681>, staženo 23. ledna 2019.
109. Wiart Ch.: *Lead Compounds from Medicinal Plants for the Treatment of Cancer*. Academic Press, New York 2012.
110. Soares P. R., de Oliveir P. L., de Oliveira C. M., Kato L., Guillo L. A.: In vitro antiproliferative effects of the indole alkaloid vallesiachotamine on human melanoma cells. *Arch. Pharmacol Res.* *35*, 565 (2012).
111. Zhang L., Zhang C. J., Zhang D. B., Wen J., Zhao X. W., Li Y., Gao K.: An unusual indole alkaloid with anti-adenovirus and anti-HSV activities from *Alstonia scholaris*. *Tetrahedron Lett.* *55*, 1815 (2014).
112. Kanba S., Richelson E.: *Herbal Medicines for Neuropsychiatric Diseases: Current Developments and Research*. Routledge, New York 1999.
113. Wu L., Ye M., Zhang J.: Vincamine prevents lipopolysaccharide induced inflammation and oxidative stress via thioredoxin reductase activation in human corneal epithelial cells. *Am. J. Transl. Res.* *10*, 2195 (2018).
114. Han J., Qu Q., Qiao J., Zhang J.: Vincamine alleviates amyloid- β 25–35 peptides-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Pharmacogn. Mag.* *13*, 123 (2017).
115. Vincamine. *The PubChem Project* [online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/vincamine>, staženo 25. listopadu 2018.

116. Vinblastine. *ThePubChem Project* [online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/vinblastine>, staženo 8. listopadu 2018.
117. Navelbine base. *ThePubChem Project* [online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/vinorelbine>, staženo 8. listopadu 2018.
118. Vindesine. *The PubChem Project* [online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/40839>, staženo 8. listopadu 2018.
119. Vincristine. *The PubChem Project* [online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/vincristine>, staženo 8. listopadu 2018.
120. Khalil H. A., Belal T. S., El-Yazbi A. F., Hamdy D. A.: The effect of increased lipoproteins levels on the disposition of vincristine in rat. *Lipids Health Dis.* 15, 152 (2016).
121. Vinflunine. *The PubChem Project* [online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vinflunine>, staženo 8. listopadu 2018.
122. Zhang L., Yang L.: Anti-Inflammatory Effects of Vinpocetine in atherosclerosis and ischemic stroke: a review of the literature. *Molecules* 20, 335 (2015).
123. Patyar S., Prakash A., Modi M., Medhi B.: Role of vinpocetine in cerebrovascular diseases. *Pharmacol. Rep.* 63, 618 (2011).
124. Jha M. K., Rahman M. H., Sheikh H.: Vinpocetine: a smart drug and a smart nutrient: a review. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 3, 346 (2012).
- 2012, Sv. 3, 2.
125. Svendsen A. B., Verpoorte R.: Chapter 2 Detection of alkaloids in TLC, *J. Chromatogr. Libr.* 23, 11 (1983).
126. Prokša B., Uhrín D., Grossmann E., Votický Z.: Vincarubine, a novel bisindole alkaloid from *Vinca minor* L. *Tetrahedron Lett.* 27, 5413 (1986).

8 ABSTRAKT

Šípková, P.: Biologická aktivita sekundárních metabolitů rostlin X. Alkaloidy *Vinca minor* L. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky, Hradec Králové, 2019, 66 s.

Klíčová slova: Apocynaceae, *Vinca minor*, alkaloidy, izolace, biologická aktivita, screening

Alzheimerova choroba je progredující onemocnění mozku. Počet pacientů zasažených touto chorobou neustále roste. Tuto nemoc nelze léčit kauzálně, proto objevování a testování nových látek, které by mohly být potenciálně využity v léčbě, je velmi důležité.

Pomocí flash chromatografie byla separována frakce po sloupcové chromatografii z rostliny *Vinca minor* L. Izolace jednotlivých alkaloidů byla provedena pomocí preparativní TLC. Na základě NMR a MS analýzy a následném porovnání s literaturou byly alkaloidy identifikovány jako vinkarubin a (-)-vinoxin.

Izolované alkaloidy byly testovány na cholinesterasovou inhibiční aktivitu pomocí modifikované Ellmanovy metody. Acetylcholinesterasa (AChE) a butyrylcholinesterasa (BuChE) jsou enzymy, které hrají velmi důležitou roli v patofyziologii Alzheimerovy choroby. (-)-Vinoxin vykazoval poměrně vysokou inhibiční aktivitu vůči BuChE ($IC_{50} = 24,61 \pm 1,71 \mu M$), inhibiční aktivita vůči AChE byla nevýznamná ($IC_{50} > 1000 \mu M$). Vinkarubin nevykazoval významnou aktivitu vůči cholinesterasám ($IC_{50} AChE = 384,8 \pm 73,15 \mu M$; $IC_{50} BuChE > 1000 \mu M$).

9 ABSTRACT

Šípková, P.: Biological activity of secondary plants metabolites X. Alkaloids of *Vinca minor* L. Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany, Hradec Králové, 2019, 66 s.

Key words: Apocynaceae, *Vinca minor*, alkaloids, isolation, biological activity, screening

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disease. The number of affected patients is constantly increasing. This disease cannot be treated casually, therefore discovering and testing new substances that could potentially be used in a treatment is very important.

The *Vinca minor* L. fraction after column chromatography was separated by flash chromatography. Isolation of the individual alkaloids was performed by preparative TLC. Based on NMR and MS analyses and comparison with literature, alkaloids were identified as vincarubine and (-)-vinoxine.

Modified Ellman's method was used to test cholinesterase inhibitory activity of isolated alkaloids. Acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) are enzymes, that play a very important role in the pathophysiology of Alzheimer's disease. (-)-Vinoxine showed relatively high activity against BuChE ($IC_{50} = 24,61 \pm 1,71 \mu M$), inhibitory activity against AChE was insignificant ($IC_{50} > 1000 \mu M$). Vincarubin did not show important activity against cholinesterase ($IC_{50} \text{ AChE} = 384,8 \pm 73,15 \mu M$; $IC_{50} \text{ BuChE} > 1000 \mu M$).