

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**Katedra farmaceutické botaniky a ekologie**

**Biologický účinek rostlinných metabolitů III.**  
**Izolace alkaloidů z *Eschscholzia californica* Cham.**

**Biological Effect of Plant Metabolites III.**  
**Isolation of Alkaloids from *Eschscholzia californica***  
**Cham.**

(diplomová práce)

Děkuji PharmDr. Janě Karličkové, Ph.D. za odborné vedení, připomínky a rady při tvorbě této diplomové práce a také kolektivu katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vytvoření dobrých podmínek pro práci a přátelského prostředí.

## Obsah

<b>I.</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>5</b>
<b>II.</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>8</b>
<b>III.</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
	1. Botanická charakteristika a využití.....	11
	2. Biologické účinky a klinické využití popsané v literatuře.....	13
	3. Kvartérní benzofenantridinové alkaloidy.....	16
	4. Další alkaloidy.....	24
	5. Pracovní postupy.....	28
	5.1. Filtrace.....	28
	5.2. Odpařování.....	28
	5.3. Chromatografie.....	28
	5.4. Adsorpční chromatografie.....	28
	5.5. Kolonová (sloupcová) chromatografie.....	29
	5.6. Tenkovrstvá chromatografie.....	29
	5.7. Krystalizace.....	29
<b>IV.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY</b> .....	<b>30</b>
	1. Potřeby.....	31
	1.1. Přístroje.....	31
	1.2. Materiál.....	31
	1.3. Chemikálie.....	31
	1.4. Vytvářející soustava pro chromatografii.....	31
	1.5. Detekční činidlo.....	31
	2. Izolace.....	33
	2.1. Příprava extraktu.....	33
	2.1.1. Původ drogy.....	34
	2.1.2. Příprava primárního extraktu a jeho čištění.....	34
	2.1.3. Příprava alkaloidního výtřepku A z primárního extraktu....	34
	2.2. Příprava chromatografické kolony.....	34
	2.2.1. Příprava silikagelu pro sloupcovou chromatografii.....	34

2.2.2. Příprava roztěru.....	34
2.3. Sloupcová chromatografie.....	35
2.3.1. Jímání frakcí.....	35
2.3.2. Spojování frakcí.....	38
2.3.3. Oddělování alkaloidů.....	39
<b>V. DISKUZE A ZÁVĚR.....</b>	<b>42</b>
<b>VI. PŘÍLOHY.....</b>	<b>46</b>
<b>VII. LITERATURA.....</b>	<b>50</b>
<b>VIII. ABSTRAKT.....</b>	<b>54</b>

# I. ÚVOD

V současné době je většina z nás vystavena stresovým situacím a nepříznivým faktorům životního prostředí, které pro lidský organismus přináší zvýšené riziko výskytu degenerativních onemocnění především centrálního nervového systému. Mezi takové choroby patří především Alzheimerova a Parkinsonova nemoc.

Alzheimerovu chorobu poprvé popsal již na počátku 20. století německý lékař Alois Alzheimer. Počáteční stádium si můžete snadno splést s přirozeným stárnutím. Nejprve dochází k poruchám paměti – zapomínání a neschopnost zapamatovat si nové věci. Zhoršuje se obrazová představivost, logické uvažování, schopnost úsudku a počítání. Objevují se poruchy prostorové orientace. Nemocný má sníženou schopnost plynulého vyjadřování a mohou se vyskytnout i první psychologické příznaky a poruchy chování – deprese, poruchy vnímání, ojedinele i bludy. Postupně se mění osobnost a povaha nemocných. V těžkém stádiu choroby se u pacienta vyskytují poruchy chůze, pády, neurologické poruchy, poruchy chování – především agresivita, odpolední a noční stavy zmatenosti. Dále se zhoršuje schopnost řeči. Nemocný je zcela závislý na cizí pomoci. Dochází k naprosté ztrátě soběstačnosti, nemocný je zcela odkázán na pečovatele. (1)

Přesné příčiny Alzheimerovy choroby zatím neznáme. Existuje ale několik parametrů, které mohou zvyšovat riziko jejího vzniku. Určitě nejdůležitějším faktorem propuknutí této nemoci je věk. V současnosti trpí 1/4 lidí starších 85 let demencí. Alzheimerova choroba se na tomto čísle podílí z 50-60%. Ve věku nad 65 let trpí touto nemocí každý 20. člověk, ve věku nad 85 let dokonce každý 4. člověk. Alzheimerova choroba není nemoc jen těch nejstarších. Ve výjimečných případech, většinou při dědičném výskytu, může ojedinele postihnout i osoby kolem 50. roku života. Dalšími faktory, které hrají významnou roli při rozvoji Alzheimerovy choroby, jsou kromě dědičnosti, nízký stupeň dosaženého vzdělání a hormony (častější výskyt Alzheimerovy choroby u žen). (1)

Alzheimerova choroba je onemocnění, při kterém dochází k úbytku mozkových buněk. V mozku postižených vznikají škodlivé bílkoviny. Ty se ukládají uvnitř v podobě vláken nebo v okolí nervových buněk jako tzv. amyloidové plaky. Dochází k poškození a zániku nervových buněk a jejich spojů. Současně v mozkové tkáni ubývá acetylcholin. Tuto látku mozek potřebuje k přenosu nervových vzruchů. Při jeho nedostatku ztrácí buňky schopnost vzájemně si vyměňovat informace. Právě to se projeví postupným zhoršováním paměťových a rozumových schopností, rozvíjí se demence. (1)

Alzheimerovu chorobu nemůžeme úplně vyléčit. Vhodně zvolenou a včas zahájenou léčbou však umíme velmi významně oddálit propuknutí nemoci v plné síle a zmírnit její příznaky. Moderní léky zpomalují úbytek poznávacích funkcí a pomáhají zachovat schopnost nemocného zajistit si každodenní potřeby. Pacientovi i jeho rodině tak prodlouží období aktivního života. (1)

Základem léčby Alzheimerovy choroby jsou kognitiva. Tyto léky pomáhají v mozku obnovit potřebné množství acetylcholinu, který je nezbytný pro přenos nervových signálů. Zvyšují jeho hladinu pomocí inhibice acetylcholinesterázy. Do této skupiny léčiv můžeme mimo jiné zařadit látky izolované z rostlin. Mezi látky, které jsou používány i v naší republice, patří galantamin. Je to alkaloid z některých druhů sněženek a narcisů. V Číně se využívá alkaloid z čínského lišejníku (*Huperzia serrata*) huperzin A. (2)

Katedra botaniky a ekologie se tedy rozhodla pro vyhledávání látek přírodního původu, které by mohly pomoci usnadnit léčbu této choroby. Jedním z taxonů, který by se dal pro léčení této choroby použít, je taxon *Eschscholzia californica* z čeledi *Papaveraceae*.

## **II. CÍL PRÁCE**



Cílem této diplomové práce bylo:

1. zpracovat výtřepok J1, získaný ze suché nati s kořeny z rostliny *Eschscholzia californica* Cham.
  - nalézt vhodnou dělicí soustavu pro chromatografický sloupec
  - provést vlastní chromatografické dělení
  - izolovat alespoň jeden čistý kvartérní alkaloid
2. provést identifikaci získaného alkaloidu
3. podílet se na stanovení aktivity izolovaného alkaloidu vůči erythrocytární acetylcholinesteráze

### **III. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1. Botanická charakteristika a využití

### Sluncovka kalifornská, *Eschscholzia californica*

Říše:	Rostliny
Oddělení:	Magnoliophyta
Třída:	Magnoliopsida
Podtřída:	Ranunculidae
Řád:	Papaverales
Čeleď:	Papaveraceae
Rod:	<i>Eschscholzia</i>
Druh:	<i>E. californica</i> Cham.



Obrázek 1: *Eschscholzia californica* Cham. (3)

*Eschscholzia californica* je první pojmenovaný zástupce rodu *Eschscholzia*, který pojmenoval německý botanik Adelbert von Chamisso po dalším botanikovi Johannu Friedrichu von Eschscholtzovi, jeho příteli a kolegovi na vědecké expedici do Kalifornie na začátku 19. století.

Sluncovka kalifornská je státní květinou státu Kalifornie. Její zlaté květy byly považované za vhodný symbol Kalifornie. Každý rok 6. dubna lidé v Kalifornii slaví „California Poppy Day.“ (4)

Rod *Eschscholzia* zahrnuje asi 125 druhů, které rostou zejména na západě Severní Ameriky (zejména Kalifornie). Tato rostlina byla používána již v tradiční indiánské medicíně k uvolnění křečí a jako bylina obecně uklidňující, snižující úzkost, psychické napětí a tišící bolest. (3) Američtí Indiáni žijící na západním pobřeží jedli listy uvařené nebo pražené na horkých kamenech a příležitostně kouřili listy a okvětní lístky. *Eschscholzia californica* je také starodávnou tradiční rostlinou používanou venkovskými obyvateli Kalifornie pro spasmolytické vlastnosti, jako obklad na proleženiny a vředy a kromě toho byla rostlina smíchaná s černým pepřem používána u zimnice, žloutenky a kožních onemocnění. Tinktura nebo suchý extrakt z *Eschscholzia californica* se používají v Evropě, hlavně v Německu a Francii, pro sedativní a antineuralgické vlastnosti. (5) Její účinky jsou podobné účinkům máku setého, ale jsou mnohem mírnější a droga není návyková, takže ji lze použít i u dětí, kdy může napomoci např. při psychicky podmíněném nočním pomočování. (3) Pyl je možno využít v kosmetice.

Sklízí se kvetoucí nať a podává se nejčastěji ve formě tinktury. V České republice roste jako jednoletá, v domovině jako dvouletá až vytrvalá rostlina. Lodyha je 20 až 80 cm vysoká, vzpřímená, ronící bezbarvé mléko, listy peřenodílné v čárkovité úkrojky. Květy jsou dlouze stopkaté, jednotlivé. Korunní lístky jsou 1 – 6 cm dlouhé. Barva květů je různá, mohou se vyskytovat varianty

žluté, oranžové i bílé, na bázi tmavší. Plodem je tobolka, 5 – 6 cm dlouhá. Kvete v červnu až říjnu.

Často se pěstuje jako okrasná letnička v různobarevných a plnokvětých kultivarech a vzácně zplaňuje. (6) Dobře roste v chudších, dobře propustných půdách na teplém a slunném stanovišti. Množí se semeny výsevem na podzim (září) nebo na jaře (duben) přímo na venkovní stanoviště, neboť špatně snáší přesazování. Sluncovky se rovněž ochotně množí samovýsevem. (3)

Rostlina obsahuje mnoho alkaloidů, hlavními jsou protopin ( $C_{20}H_{19}NO_5$ ), který byl poprvé izolován v roce 1871 Hessem z opia a později identifikován mezi různými druhy *Fumariaceae* (fumarin) a *Papaveraceae*, a californin (= eschschooltzin nebo crychin,  $C_{19}H_{17}NO_4$ ), který patří do skupiny pavínů, byl izolován v roce 1964 Gertigem (poprvé pojmenovaný „Fz“) a pak ho izolovali Manske a Shin, kteří ho pojmenovali eschschooltzin. Další alkaloidy jsou specifické pro rod *Eschscholzia* (chelerytrin, sanguinarin,  $\alpha$ - a  $\beta$ - homoche-lidonin. (7)

V tomto druhu byl také zaznamenán flavonoid rutin. Z celé rostliny byly izolovány dva nové izoflavony, spolu s kvercitrinem. Struktury těchto dvou izoflavonů jsou: 2'-methoxy-formononetin a 7-methoxy-2',4'-dihydroxyizoflavon. Dále byly ještě izolovány flavonoly a anthokyanidy z vodné frakce květů. (5)

### **Základní charakteristika**

Původ: Severní Amerika

Pojmenování: Sluncovka kalifornská

*Eschscholzia californica* Cham.

California poppy (angl.)

Mak kalifornijski (pol.)

Kalifornischer Mohn (něm.)

Pavot de Californie (fran.)

Globe du Soleil

Dedal de oro

Synonyma: *Eschscholtzia californica* Chamisso

*Eschscholzia douglasii* Wolfers

*Eschscholzia crocea* Bentham

Výška rostliny: 20 – 80 cm

Květ: 6 – 8 cm v průměru

Plod: tobolka

## 2. Biologické účinky a klinické využití popsané v literatuře

Biologické aktivity a nejznámější využití *Eschscholzia californica* popsané v literatuře jsou:

✓ Navození spánku a anxiolytická aktivita:

K léčení úzkosti a k navození spánku u pacientů trpících nespavostí se *Eschscholzia californica* používá buď sama, nebo ve spojení s ostatními rostlinnými léčivy (mučenka jedlá, kozlík lékařský, meduňka lékařská).

Mechanismus účinku *Eschscholzia californica* stále není známý. Při experimentech měla sluncovka sedativní účinek na centrální nervovou soustavu a uvolňující účinek na hladké svalstvo ilea. Složky, obsažené v vodnoalkoholovém extraktu z *Eschscholzia californica*, inhibují enzymatickou degradaci a neosyntézu katecholaminů. Jak dopamin- $\beta$ -hydroxyláza, tak i monoaminoxidáza jsou inhibovány extraktem *Eschscholzia californica* a to může vysvětlovat část sedativních a uspávacích účinků.

Kromě toho je známo, že enkefaliny, polypeptidové neuromodulátory zapojené do regulace sekrece a nocicepce, jsou inaktivovány pomocí peroxidace a dimerizace. Bylo demonstrováno, že sluncovka inhibuje tento typ inaktivace, takže prodlužuje aktivitu enkefalinů. Je možné, že část účinku *Eschscholzia californica* na centrální nervový systém je zásluhou tohoto mechanismu účinku. Podoba mezi alkaloidy *Eschscholzia californica* a *Papaver somniferum* vždy podporovala dohady o shodném účinku mezi dvěma skupinami aktivních principů. Ve skutečnosti někteří autoři zastávají názor, že izochinolinové alkaloidy účinkují na centrální nervový systém pomocí navození spánku a na periferní systém pomocí snižování tonu na hladké svalstvo, zejména na hladký sval střeva. Z tohoto důvodu se sluncovka řadí mezi rostliny se sedativním, analgetickým a protikřečovým účinkem, ale na rozdíl od alkaloidů máku setého, alkaloidy *Eschscholzia californica* nevyvolávají toleranci a závislost.

Rostlina také může být použita při potížích, charakterizovaných křečemi hladkého svalstva - u některých typů astmatu, při bolestivých spasmech gastroenterického traktu a zvláště u některých forem podrážděného tlustého střeva a při úpravě gastrointestinálních a abdominálních funkcí psychosomatického původu.

✓ Účinek proti bolestem hlavy:

*Eschscholzia californica* se tradičně využívá v léčbě některých forem bolestí hlavy. Enkefaliny se zúčastňují zpracování vnímání bolesti

přicházející z periferních nociceptivních zakončení, a proto látka, která zpomaluje inaktivaci a prodlužuje aktivitu enkefalinů, obvykle působí analgeticky. Tento mechanismus je odpovědný za účinek *Eschscholzia californica* při vasomotorických bolestech hlavy. Také by mohlo být zmíněno, že když je bolest hlavy způsobena pestrá patogenezi a zcela určitě úzkostnou složkou, je terapeutický účinek *Eschscholzia californica* zvýšen.

✓ Další účinky:

Sanguinarin, jeden z hlavních alkaloidů *Eschscholzia californica*, má také antibakteriální a protizánětlivé účinky a je obvykle používán do zubních past a ústních vod proti bakteriálnímu plaku. Sanguinarin má také pozitivně inotropní účinek a inhibuje množství enzymů (ATPáza, diaminoxidáza, aminotransferáza).

✓ Snášenlivost:

*Eschscholzia californica* je léčivá rostlina s vysokou snášenlivostí a bez význačných vedlejších účinků. Je velice často předepisován jako lék psychoterapeutický, tak i jako léčivo proti poruchám spánku u dětí. Nebyly provedeny kontrolované klinické studie týkající se těhotných nebo kojících žen, nicméně někteří autoři se hlásí k názoru, že některé složky rostliny mohou mít uvolňující účinek na izolovanou dělohu morčat. Užívání této drogy vyžaduje opatrnost během těhotenství a kojení pouze v nutných případech. (8)

Byla provedena dvojité zaslepená, randomizovaná, placebem kontrolovaná studie, která měla zhodnotit účinnost a bezpečnost fixní kombinace dvou rostlinných extraktů (*Crataegus oxyacantha* a *Eschscholzia californica*) a hořčíku při mírných až středních úzkostných poruchách. Pro zjištění intenzity úzkosti se používalo celkové Hamiltonovo úzkostné skóre, pro mírné až střední úzkostné stavy Hamiltonovo skóre odpovídá hodnotám 16 – 28. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin, jedna obdržela studovanou kombinaci a druhá placebo. Prokázalo se snížení Hamiltonova skóre během studie, pokles byl větší u pacientů ve skupině se studovanou kombinací než ve skupině s placebem. U obou sledovaných skupin se objevily nežádoucí účinky. Ty byly mírné až střední, charakteru střevních a psychopatologických potíží. (9)

Biologická aktivita kvartérních benzofenantridinových alkaloidů je velmi různorodá. Je třeba rozlišit skupinu sanguinarinu a skupinu nitidinu. Sanguinarin a chelerytrin vykazují zřetelný antimikrobiální, antimykotický, antiplakový a protizánětlivý účinek. Kombinace těchto aktivit je výhodná zejména pro stomatologické aplikace v léčbě a prevenci zánětlivých onemocnění parodontu. Originální český výrobek SANTOIN (zubní pasta, ústní voda) obsahuje směs sanguinarinu a chelerytrinu z *Macleaya cordata* a je patentově chráněný.

V Rusku je podobná směs pod názvem SANGUIRITRIN užívaná zevně jako antimikrobiální přípravek a vnitřně při myopatiích a následcích obrny (inhibice acetylcholinesterázy). Vhodnost perorální aplikace těchto alkaloidů je problematická vzhledem k prokázané hepatotoxicitě sanguinarinu. Chelerytrin je v současné době studován jako selektivní inhibitor proteinkinázy C. Alkaloidy nitidin a fagaronin vykazují naproti tomu určité antileukemické aktivity a nemají účinky sanguinarinu. (10)





základním tetracyklinovém skeletu se nalézají různé kombinace methoxylové, methylendioxidové nebo hydroxylové skupiny. Podle typu substituce rozlišujeme čtyři podskupiny kvartérních benzofenantridinových bází:

- 1) 2,3,7,8-tetrasubstituované alkaloidy jsou sanguinarin, chelerytrin, fagaridin a izofagaridin
- 2) 2,3,8,9-tetrasubstituované nitidin, avicin, fagaronin
- 3) pentasubstituované sanguilutin, sanguirubin, chelirubin, chelilutin, 10-hydroxysanguinarin a 10-hydroxychelerytrin
- 4) hexasubstituované makarpin a 12-hydroxychelirubin (10)

Kvartérní benzofenantridinové alkaloidy se vyskytují v řadě rostlinných druhů čeledi makovitých (*Papaveraceae*), zemědýmovitých (*Fumariaceae*) a routovitých (*Rutaceae*). Jejich zastoupení v rostlinách kolísá od dominantních alkaloidů až po minoritní. Pravděpodobně nejbohatším zdrojem sanguinarinu je severoamerická bylina *Sanguinaria canadensis* L. Při poranění roní intenzivně červený latex a proto se lidově nazývá krvavý kořen (bloodroot). Obsah kvartérních benzofenantridinových alkaloidů v oddencích dosahuje až 6 % sušiny. Jediným našim (a evropským) druhem produkující sanguinarin ve větším množství je známá bylina vlašovičnick větší (*Chelidonium majus* L.) Celá rostlina je bohatě prostoupena mléčnicemi a při poranění roní hustý oranžový latex. Barva latexu je výsledkem kompozice červeného sanguinarinu, žlutého chelerytrinu a dvou protoberberinových alkaloidů, oranžového koptisinu a žlutého berberinu. Obsah kvartérních benzofenantridinových alkaloidů v kořeni vlašovičnicku je kolem 0,6 % sušiny, v latexu je až 10x vyšší. Dalším významným zdrojem kvartérních benzofenantridinových alkaloidů je himálájská bylina *Dicranostigma lactucoides* Hook f et Thoms, obsahující až 4 % kvartérních benzofenantridinových alkaloidů v suchém kořeni, oba druhy rodu *Macleaya*, tj. *M. microcarpa* Fedde a *M. cordata* R Br rostoucí na Dálném Východě a u nás často pěstované jako dekorativní rostliny, a některé druhy rodu *Bocconia* ze Střední a Jižní Ameriky. Obecně platí, že obsah kvartérních benzofenantridinových alkaloidů v kořenech je podstatně vyšší (až o několik řádů) než v nadzemních částech rostliny. Alkaloidy typu nitidinu se nalézají pouze v čeledi *Rutaceae*. (10)

Sanguinarin a chelerytrin, jediné dva komerčně dostupné kvartérní benzofenantridinové alkaloidy, byly objeveny v minulém století (tabulka 1).

Sanguinarin poprvé popsal James Dana roku 1827 jako hlavní barevnou složku *S. canadensis*. Čistý sanguinarin připravil poprvé Gadamer. Strukturu obou alkaloidů objasnili v roce 1931 rakouští chemici Ernst Spath a Fritz Kuffner na základě chemické degradace. V letech 1954-1960 izolovali Slavík a Slavíková několik minoritních kvartérních benzofenantridinových alkaloidů: chelirubin a chelilutin z *Chelidonium majus* a ze *Sanguinaria canadensis* a kromě nich sanguilutin a sanguirubin ze *S. canadensis*. První polovina názvu odkazuje na rostlinný druh, druhá polovina je odvozena z latinského výrazu pro

příslušnou barvu (*luteus* žlutý, *ruber* červený). Tři nové hydroxylované deriváty (10-hydroxysanguinarin, 10-hydroxychelerytrin a 12-hydroxychelirubin) získali Tanahashi a Zenk z buněčných kultur *Eschscholzia californica* po aplikaci kvasinkového elicitoru, patogenního faktoru, který vyvolává obrannou reakci rostlinných buněk spojenou se zvýšenou biosyntézou kvartérních benzofenantridinových alkaloidů. Zcela nedávno zjistili Nakanishi a Suzuki na základě důkladných studií UV a NMR spekter, že fagaridin má ve skutečnosti strukturu izofagaridinu. Látka fagaridin není považována za přírodní produkt. (10)

Tabulka 1: Chronologický přehled objevů kvartérních benzofenantridinových alkaloidů (10)

Alkaloid	Objev		Rostlinný druh
Sanguinarin	1827	Dana	<i>Sanguinaria canadensis</i>
Chelerytrin	1839	Probst	<i>Chelidonium majus</i>
Chelirubin	1954	Slavík	<i>Chelidonium majus</i>
Chelilutin	1954	Slavík	<i>Chelidonium majus</i>
Makarpin	1955	Slavík	<i>Macleaya microcarpa</i>
Avicin	1959	Arthur	<i>Zanthoxylum avicennae</i>
Nitidin	1959	Arthur	<i>Zanthoxylum nitidum</i>
Sanguirubin	1960	Slavík	<i>Sanguinaria canadensis</i>
Sanguilutin	1960	Slavík	<i>Sanguinaria canadensis</i>
Fagaronin	1972	Messmer a kol.	<i>Fagara zanthoxyloides</i>
Fagaridin	1973	Torto a kol.	<i>Fagara zanthoxyloides</i>
10(12)-Hydroxy-sanguinarin chelerytrin chelirubin	1990	Tanahashi, Zenk	<i>Eschscholzia californica</i>
Izofagaridin	1993	Fang a kol.	<i>Zanthoxylum nitidum</i>

Benzo[c]fenantridinové alkaloidy náleží do velké skupiny izochinolinových alkaloidů biosyntetizovaných z fenylalaninu (11.6). Biosyntéza izochinolinových alkaloidů vychází z S-norkoklaurinu, který vzniká z dopaminu a 4-hydroxyfenylacetaldehydu. (S)-norkoklaurin je přeměněn na (S)-retikulin 6-O-methyltransferázou, N-methyltransferázou, P450 hydroxylázou a 4'-O-methyltransferázou. Další krok v syntéze zahrnuje konverzi N-methylové skupiny (S)-retikulinu na methylenový můstek (S)-skoulerinu působením BBE (berberin bridge enzyme). (S)-skoulerin je pak přeměněn dvěma P450-dependentními oxidázami, N-methyltransferázou a dvěma P450-dependentními hydroxylázami na dihydrosanguinarin. To zahrnuje vznik stylopinu a po otevření kruhu B mezi atomem C-6 a dusíkem vzniká aldehyd, z něhož se po otočení nedusíkaté části molekuly a uzavření kruhu tvoří alkaloidy benzofenantridinové skupiny. Dihydrosanguinarin je prvním alkaloidem s benzofenantridinovým jádrem. Finální krok vedoucí k přeměně na dihydromakarpin a příbuzné

intermediáty je zprostředkován dalšími P450-dependentními monooxygenázami a O-methyltransferázou. (11)

Obecný izolační postup k získání frakce kvartérních benzofenantridinových alkaloidů je typicky platný pro druhy s dominantním zastoupením kvartérních benzofenantridinových alkaloidů (*Dicranostigma lactuoides*, *S. canadensis*). Může být popsán následujícím způsobem. Rostlinný materiál je extrahován methanolem za horka, surový extrakt je po zahuštění rozpuštěn ve zředěné kyselině sírové. Kyselý filtrát je alkalizován roztokem  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Nelze použít NaOH, protože by došlo ke kontaminaci podílu bázemi kvartérních protoberberinů. Vzniklá sraženina volných bází alkaloidů je extrahována etherem. Organická fáze je oddělena, odpařena a krystalována ze zředěné HCl. Chloridy kvartérních benzofenantridinových alkaloidů jsou v kyselém prostředí méně rozpustné než hydrochloridy ostatních, hlavně proteinových alkaloidů. Oddělená směs kvartérních chloridů je dále dělena kolonovou chromatografií na kyselém  $\text{Al}_2\text{O}_3$  buď jako směs acetátů nebo chloridů. Alternativním způsobem dělení kvartérních benzofenantridinových alkaloidů je preparativní chromatografie s nepolárním sorbentem a vodnou mobilní fází. Tento postup nelze použít tam, kde jsou ve značné převaze alkaloidy tvořící téměř nerozpustný hydrochlorid, např. chelidonin v *Ch. majus*. Tam, i všude jinde, kde jsou kvartérní benzofenantridinové alkaloidy v malém množství, je nezbytné k jejich oddělení použít např. selektivní vysrážení kyanidovým aniontem. (10)

Základním chemickým rysem kvartérních benzofenantridinových alkaloidů je citlivost k nukleofilnímu ataku na iminovou vazbu  $\text{C}=\text{N}^+$  (schéma 1, Nu = nukleofil).

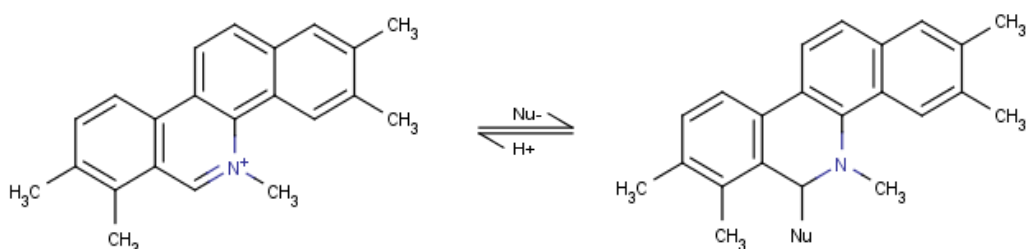


Schéma 1: Nukleofilní atak na iminovou vazbu (10)

Tento proces je spojen s řadou nápadných změn. Kvartérní kation alkaloidů je barevný a ve vodě rozpustný, vzniklý adukt s trojvazným atomem dusíku je bezbarvý a ve vodě nerozpustný. V případě derivátů s charakterem aminoacetalů a aminalů (schéma 1, Nu = OR, NHR) je reakce v zásadě reverzibilní, tzn., že působením kyseliny na adukt vzniká opět barevná kvartérní sůl. Jiné deriváty, např. 6-kyan-dihydrobenzofenantridiny (schéma 1, Nu = CN), jsou naopak značně odolné vůči kyselinám. V literatuře je řada informací o těchto derivátech a okolnostech jejich vzniku, zejména o přeměnách s C-nukleofily ( $\text{CN}^-$ , Grignardova činidla, nitromethan, aceton, butanon, acetaldehyd). Naproti tomu jsou minimální údaje o reakcích s kyslíkatými,

sírnými a dusíkatými nukleofily. Některé C-adeny byly izolovány z rostlin a představují zajímavé přírodní produkty. Alkaloid nitrotyrasanguinarin, izolovaný z *Hypocoum imberbe* je jednou z mála nitrosloučenin. Předpokládá se, že vzniká oxygenací tyraminu a následnou adicí  $\alpha$ -nitrokarbaniontu na iminovou vazbu sanguinarinu. Z druhů *Zathoxylum* bylo izolováno několik neobvyklých derivátů chelerytrinu s různou uhlíkatou funkcí v poloze 6. Alkaloidy 6-methyldihydrochelerytrin a simulachinolin, obsahující 2-chinolinon, byly nalezeny v *Z. simulans*. Atlanthoidin ze *Z. atlanthoides* obsahuje 4-kyanpyridin. Zpracováním kůry *Z. spinosum* byly objeveny 6-karboxymethyldihydrochelerytrin, 6-(4-methyl-2oxopentyl)dihydrochelerytrin a chelelaktam s navázaným 2-pyrrolidonem. Kromě toho byl získán dimer m alkaloid kajmandimerin, v němž jsou dvě jednotky dihydrochelerytrinu spojeny formylmethylenovou skupinou. (10)

Specifickou kapitolou v chemii kvartérních benzofenantridinových bází je tvorba volných bází. Pojem volná báze (free base) je v chemii alkaloidů univerzálně používán na označení produktu bazického charakteru, který vznikl alkalizací soli alkaloidu a v kyselém prostředí poskytuje opět sůl. Citlivost na míru alkalizace je dána hodnotou  $pK_A$  amoniové soli a závisí na chemické povaze alkaloidní struktury. Volné báze alkaloidů se nemohou vyskytovat v rostlinných tkáních pro jejich více či méně kyselou reakci a proto je můžeme považovat za svého druhu artefakty.

Existují dva způsoby jak připravit volné báze kvartérních benzofenantridinových alkaloidů:

- 1) Sůl kvartérního benzofenantridinového alkaloidu je rozpuštěna ve vodě a roztok je zalkalizován  $Na_2CO_3$ . Bílá sraženina báze je oddělena, promyta vodou a sušena. Tato metoda zaručuje velmi dobrý výtěžek s minimálními ztrátami, poskytuje však amorfni produkt. Předpokladem je vysoce čistá kvartérní sůl alkaloidu.
- 2) Elegantnější alternativou je extrakce sraženiny báze do nepolárního rozpouštědla. Používali jsme přednostně diethylether, možno použít i benzen či jiná uhlovodíková rozpouštědla. Nevhodný je chloroform (zbytky kyselin rozkládají bázi) či vyšší alkoholy (riziko chemických přeměn). Organická fáze je oddělena a zahuštěna ke krystalizaci. V tomto případě jsou báze kvartérních benzofenantridinových alkaloidů získány jako bezbarvé krystaly s vyšší a ostřejší teplotou tání, ale výtěžek je zpravidla nižší než v první metodě. V některých případech autoři článku pozorovali vznik vedlejších produktů dosud nezjištěné konstituce.

Předpokládalo se, že volné báze kvartérních benzofenantridinových alkaloidů mají hydroxylovou skupinu kovalentně vázanou na atom 6 (schéma 1, Nu = OH), přestože experimentálně její přítomnost nebyla prokázána. Jde o cyklický semiaminoacetal, často nazývaný historickým termínem pseudobáze. (schéma 2)

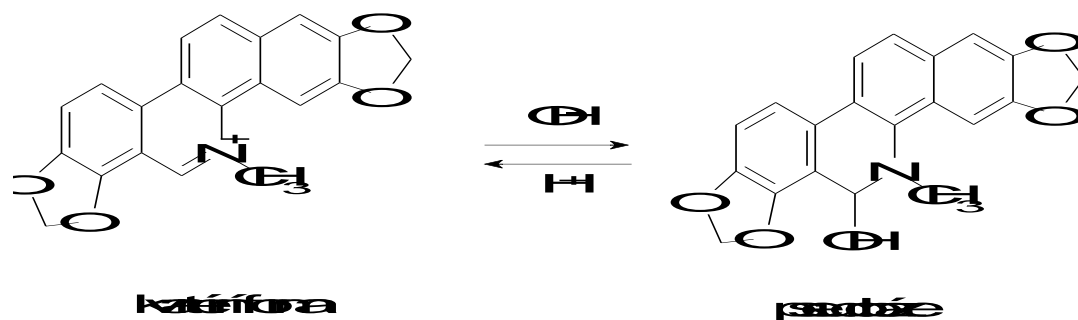


Schéma 2: Strukturní formy kvartérních benzofenantridinových alkaloidů (11)

Autoři článku zjistili, že báze sanguinarinu má konstituci bis(dihydrosanguinarinyl)etheru (schéma 3).

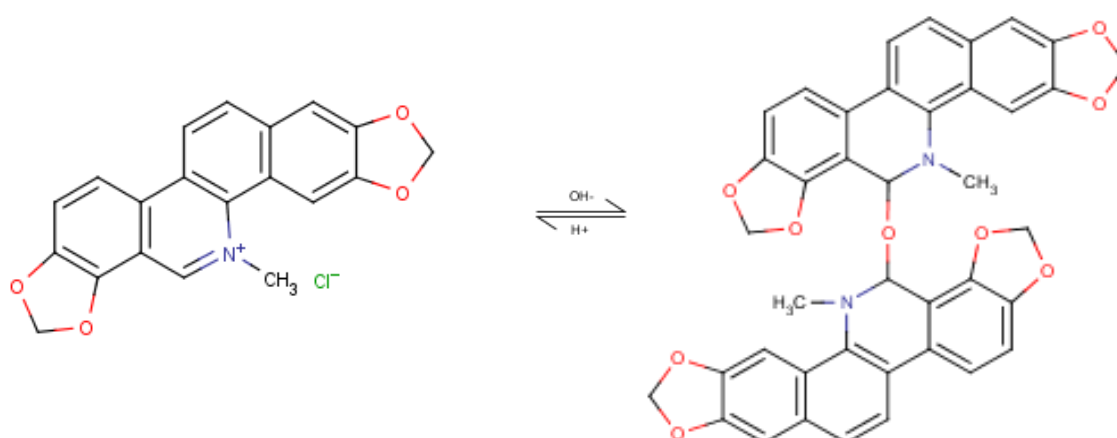


Schéma 3: Vznik struktury bis(dihydrosanguinarinyl)etheru (10)

V alkalickém prostředí dochází ke kondenzaci dvou molekul pseudobáze za uvolnění molekuly vody. Disproporcionace heterocyklických pseudobází je jev obecně známý, popsáný i u jiných systémů.

6-Hydroxydihydrosanguinarin byl nedávno popsán jako nový alkaloid z *Dactyloctenium aegyptium*. Autoři látku popisují jako amorfní prášek žluté barvy a uvádějí spektrální charakteristiky. Srovnání  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spekter s našimi údaji ukazuje zřetelnou diskrepanci. Navíc se zdá nepravděpodobné, že by semiaminoacetal mohl být izolován v intaktním stavu, když byla při izolaci použita 5 % HCl.

Podobná konstituce volné báze jako u sanguinarinu byla zjištěna také u chelerytrinu, chelirubinu a chelilutinu. V případě sanguilutinu, pentamethoxy-substituovaného alkaloidu, byla jako báze prokázána skutečná heterocyklická pseudobáze. Hydroxylová skupina byla potvrzena v IČ a  $^1\text{H}$  NMR spektru. Krystalizací této pseudobáze z benzenu byl získán monokrystal vhodný pro rentgenostrukturální analýzu. Po provedené analýze bylo zjištěno, že krystal byl racemický bis(dihydrosanguilutinyl)ether. Nepolární prostředí tedy podporuje vznik méně polárního derivátu.

Autoři článku také studovali reakci sanguinarinu s koncentrovaným vodným amoniakem. Vzniklá sraženina obsahuje směs dimerní báze a jejího dusíkatého analogu, bis(dihydrosanguinarinyl)aminu a poměru cca 1:3 jako

výsledek kompetice obou nukleofilů přítomných ve vodném  $\text{NH}_3$ . Krystalizace reakční směsi z etheru poskytla dimerní amin. Elementární analýza potvrdila přítomnost tří atomů dusíku a skupina  $\text{NH}_3$  vykazovala diagnostický pás při  $3372\text{ cm}^{-1}$  v IČ spektru. Podobně reagovaly s vodným  $\text{NH}_3$  i další studované kvartérní benzofenantridinové alkaloidy. Dimerní aminy (aminaly), stejně jako dimerní báze (aminoacetaly), poskytují se zředěnými kyselinami okamžitě barevnou kvartérní sůl ve smyslu schématu 3. (10)

### Sanguinarin

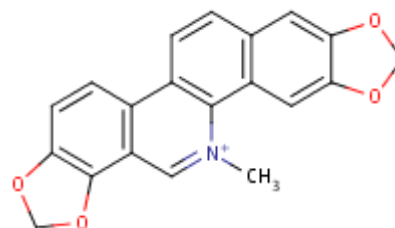
Sumární vzorec:  $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{NO}_4^+$

Molární hmotnost: 332,32

Teplota tání:  $266,7\text{ }^\circ\text{C}$

Systematický název IUPAC: 13-methyl-2H,10H-[1,3]dioxolo[4,5-i][1,3]dioxolo

[4',5':4,5]benzo[1,2-c]phenanthridinium



Obrázek 3: Struktura sanguinarinu (12)

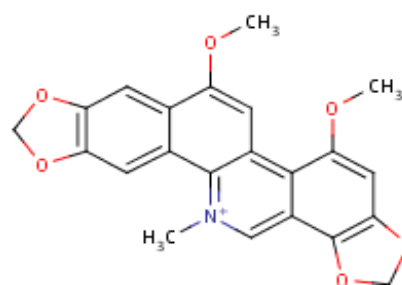
Sanguinarin je alkaloid, získávaný extrakcí z některých rostlin, například *Sanguinaria canadensis*, mák mexický (*Agremone mexicana*), *Chelidonium majus* a *Macleaya cordata*. Můžeme ho také najít v kořenech, stonku a listech máku setého, ale nenajdeme ho v tobolce. Sanguinarin ničí živočišné buňky vlivem na  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPázový}$  transmembránový protein. Epidermální edém je nemoc, která je výsledkem příjmu sanguinarinu. (12)

### Makarpin

Sumární vzorec:  $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{NO}_6^+$

Molární hmotnost: 392,38146

Systematický název IUPAC: 5,7-dimethoxy-3-methyl-2H,10H-[1,3]dioxolo[4,5- $\lambda$ ][1,3]dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2-c]phenanthridinium



Obrázek 4: Struktura makarpinu (13)

Makarpin si získává především z vlašovičnicku. Vyzařuje jasnou fluorescenci ve žluté až červené oblasti viditelného spektra, a zároveň proniká velmi rychle do živých buněk, kde se okamžitě váže na DNA a menší mírou i na RNA. Látka, která se získává z některých druhů rostlin, umožňuje označit buněčná jádra (14)

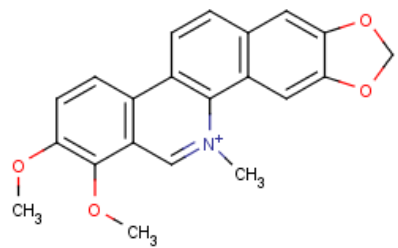
### Chelerytrin

**Sumární vzorec:**  $C_{21}H_{18}NO_4^+$

**Molární hmotnost:** 348,37192

**Teplota tání:** 282 – 3 °C

**Systematický název IUPAC:** 1,2-Dimethoxy-12-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-c]phenanthridinium



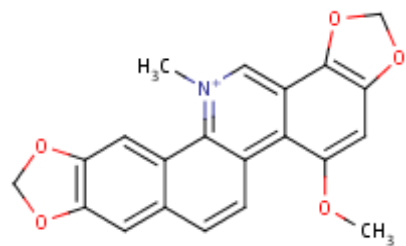
Obrázek 5: Struktura chelerytrinu (15)

### Chelirubin

**Sumární vzorec:**  $C_{21}H_{16}NO_5^+$

**Molární hmotnost:** 362,35548

**Systematický název IUPAC:** 5-methoxy-13-methyl-2H,10H[1,3]dioxolo[4,5][1,3]dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2c]phenanthridinium



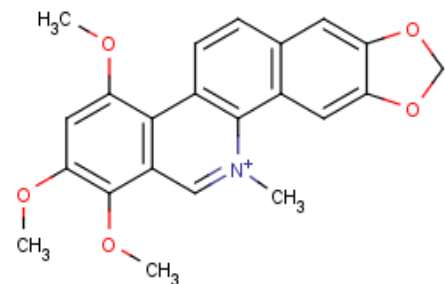
Obrázek 6: Struktura chelirubinu (15)

### Chelilutin

**Sumární vzorec:**  $C_{22}H_{20}NO_5^+$

**Molární hmotnost:** 378,404

**Systematický název IUPAC:** 1,2,4-Trimethoxy-12methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-c]-phenanthridinium



Obrázek 7: Struktura chelilutinu (15)

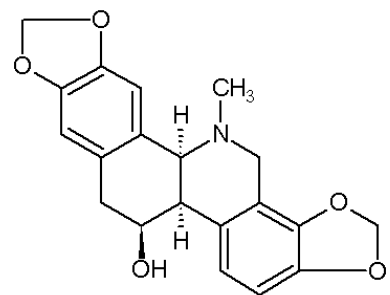
### Chelidonin

**Sumární vzorec:**  $C_{20}H_{19}NO_5$

**Molární hmotnost:** 353,37

**Teplota tání:** 182°C

Alkaloid nacházející se v *Chelidonium majus* L.  
Je to žlutohnědý prášek.



Obrázek 8: Struktura chelidoninu (16)

## 4. Další alkaloidy

### Morfinanové alkaloidy

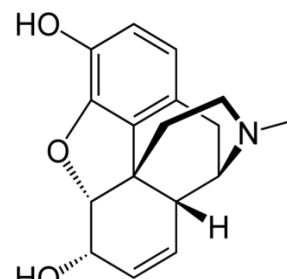
#### Morfin

Sumární vzorec:  $C_{17}H_{19}NO_3$

Molární hmotnost: 285,4

Teplota tání: 253-4 °C

Systematický název IUPAC: (5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ )-7,8-didehydro-4,5-epoxy-17-methylmorfinan-3,6 - diol



Obrázek 9: Struktura morfinu (17)

Morfin, také morfium, je alkaloid morfinanového typu, obsažený v opiu. Tvoří přibližně 10 % hmotnosti surového opia.

Používá se primárně v lékařství jako silné analgetikum a též jako surovina na výrobu dalších opioidů morfinového typu (např. kodeinu, ethylmorfinu, hydromorfonu, heroinu a folkodinu). Je prototypem silných analgetik (anodyna), taktéž i referenční látkou, k níž se vztahuje účinnost ostatních opioidů. Jeho účinky na organismus i psychiku vyplývají z jeho působení na opioidní receptory především v centrální nervové soustavě. Při užívání se rychle rozvíjí tolerance. To znamená, že k dosažení stejné účinnosti je třeba podávat stále vyšší dávky. S tím souvisí i jeho silná návykovost. Morfin je omamná látka a kromě svého použití v medicíně je též zneužíván jako droga nebo surovina k výrobě heroinu. Podléhá proto zvláštnímu pravidlům zacházení při výrobě, distribuci a ve zdravotnických zařízeních.

V čisté podobě tento alkaloid jako první izoloval lékárník Friedrich Sertürner roku 1804, který mu dal jméno „morphium“. Název morfium byl později změněn na morfin.

Morfin je alkaloid, tj. organická dusíkatá báze (amin) přírodního původu. Má morfinanovou (od uhlovodíku fenatrenu odvozenou) kostru, tvořenou pěti kondenzovanými cykly. Aminový dusík v poloze 17 morfinanového skeletu je terciární (jsou na něj vázány tři organické radikály), má jeden volný (nevazebný) elektronový pár, v důsledku čehož je molekula schopná protonizace (tvorby kationtu protonakceptorní reakcí s roztokem kyseliny) – vzniká kation zvaný morfinium.

Morfin k medicínskému použití je tvořen solemi morfinia – nejčastěji hydrochloridem a hemisulfátem morfinu. Lékopisný chlorid morfinia (morphini hydrochloridum trihydricum) krystalizuje se třemi molekulami vody - tvoří trihydrát; lékopisný síran morfinia (morphini sulfas pentahydricus) krystalizuje s pěti molekulami vody – tvoří pentahydrát. Méně používanými solemi morfinia jsou např. octan (morfinium acetát), vínan (morfinium tartrát) a polistyrex (morfinium poly(styresulfonát)) morfinia.



Kromě tohoto bazického centra je v molekule morfinu přítomné i centrum acidické (kyselé) – protondonorní fenolický hydroxyl v poloze 3. Proto je morfin možné silnou zásadou deprotonizovat – tvoří v silně zásaditých roztocích rozpustný anion morfinát (morfinan), proto je molekula morfinu amfifilní, tj. tvořící soli s kyselinami i zásadami. Této vlastnosti morfinu se využívá především při jeho izolaci z přírodních zdrojů – opia a makoviny („maková sláma“, sušené prázdné makovice).

Volná báze morfinu je prakticky nerozpustná ve vodě (méně než 0,2 g na litr za pokojové teploty), ačkoli tvoří s vodou hemihydrát – krystalizuje s polovičním látkovým množstvím vody. Nejlépe rozpustná je volná báze morfinu v methanolu a ve vroucím ethanolu, v jiných organických rozpouštědlech je rozpustná málo. Soli morfinu, morfinium i morfinát jsou lépe rozpustné ve vodě, chlorid trihydrát cca 57 g na litr vody při 20 °C, síran pentahydrát cca 65 g na litr vody při 20 °C, octan trihydrát dokonce až 440 g na litr vody při 20 °C, tvoří slabě kyselé vodné roztoky (pH cca 5); morfináty alkalických kovů a kovů alkalických zemin jsou velice dobře rozpustné ve vodě, tvoří alkalické roztoky (pH cca. 11).

Totální syntéza morfinu je možná, avšak není ekonomicky výhodná – izolace morfinu z přírodní drogy (opium, makovina) je nejenom levnější, ale i jednodušší. Obvykle se podává morfin k tlumení akutních i chronických nesnesitelných bolestí po úrazech, chirurgických operacích, infaktu myokardu. Rovněž se používá při předoperační přípravě. Tlumivého účinku na dýchací centrum lze otoku (edému) plic k odstranění neekonomické hyperventilace (nadměrně zrychleného dýchání) a tíživého pocitu dušnosti.

V současnosti se morfin již zřídka používá při těžkém, neztížitelném kašli při zhoubných onemocněních dýchacích cest (neúčinkuje-li kodein dostatečně) a zcela výjimečně (jako účinná látka opiové tinktury) na utlumení jinak nezvládnutelného průjmu (v současnosti nahrazen loperamidem a difenoxylátem). Dávkování je vysoce individuální, vždy přesně určuje lékař. (17)

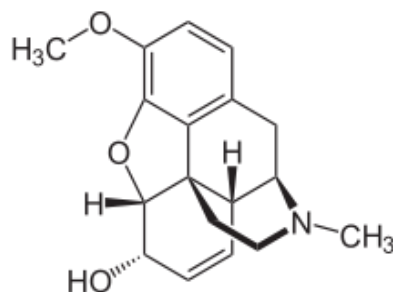
### Kodein

*Sumární vzorec:* C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>

*Molární hmotnost:* 299.36

*Teplota tání:* 155°C

*Systematický název IUPAC:* (5α,6α)-7,8-didehydro-4,5-epoxy-3-methoxy-17-methylmorphinan-6-ol



Obrázek 10: Struktura kodeinu (18)

Kodein je alkaloid nacházející se v opiu v koncentraci 0,3 – 3,0 %, dnes se synteticky vyrábí metylací morfinu. Poprvé ho izoloval Jean –Pierre Robiquet v roce 1832 ve Francii. Používá se pro analgetické, antitusické a protiprůjmové

účinky. Vytváří bílý nebo téměř bílý prášek, na vzduchu ztrácí krystalovou vodu, na světle se časem barví žlutě; je bez zápachu. (18)

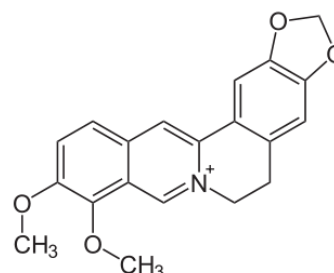
### *Protoberberinové alkaloidy*

#### Berberin

**Sumární vzorec:**  $C_{20}H_{18}NO_4^+$

**Molární hmotnost:** 336,36

**Teplota tání:** 205-7°C



Obrázek 11: Struktura berberinu (19)

Berberin je kvartérní amonná sůl ze skupiny izochinolinových alkaloidů. Nachází se např. v dřevě kanadské (*Hydrastis canadensis*) a v koptisu čínském (*Coptis chinensis*) obvykle v kořenech, oddencích, stoncích a kůře. Berberin je ostře žlutě zbarven a proto se dříve používal k barvení vlny, kůže a dřeva. V Indii se stále berberin používá j barvení vlny. Pod ultrafialovým světlem berberin vykazuje silně žlutou fluorescenci. Proto se používá v histologii k barvení heparinu v žírných buňkách.

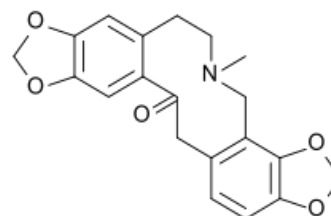
Jako léčivo berberin vykazuje aktivitu proti houbové infekci, proti kandidám, kvasinkám, parazitům, bakteriím a virům. Některé výzkumy byly zaměřeny na možnost využití na infekci MRSA (methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*). (19)

#### Protopin

**Sumární vzorec:**  $C_{20}H_{19}NO_5$

**Molární hmotnost:** 353,38

**Teplota tání:** 206-7°C



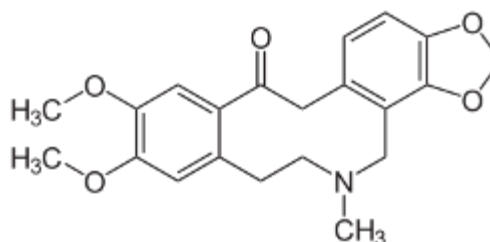
Obrázek 12: Struktura protopinu (20)

#### Kryptopin

**Sumární vzorec:**

**Molární hmotnost:** 369,42

**Teplota tání:** 159-160°C



Obrázek 13: Struktura kryptopinu (15)

Kryptopin je bezbarvý krystalický alkaloid, který je obsažen v malém množství v opiu. (21)

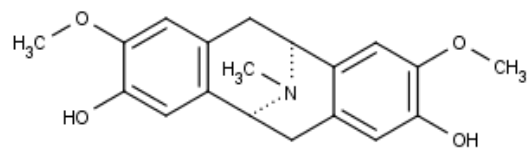
*Pavinové alkaloidy*

Bisnoragremonin

*Sumární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>*

*Molární hmotnost: 327,39*

*Teplota tání: 254°C*



Obrázek 14: Struktura bisnoragremoninu (15)

## 5. Pracovní postupy

### 5.1. Filtrace

Filtrace je separační metoda založená na oddělení tuhé látky a kapaliny pomocí různě propustných materiálů. Filtrační zařízení se skládá z nálevky, filtrační bariéry a jímadla na filtrát.

### 5.2. Odpařování

Odpařování je pomocná operace, při níž je prioritní zájem na získání odparku v žádané konzistenci. Cílem je oddělení látek s rozdílnou teplotou varu a skupenstvím. Princip dělicího procesu spočívá v rozdílu mezi složením kapalné fáze a par, které se z ní vytvoří za současného znovuuustalování rovnováhy celého systému. My jsme použily odpařování za sníženého tlaku. To má řadu výhod: probíhá při nižší teplotě a odpařovací rychlost je vyšší. Mezi nevýhody patří významnější ztráta těkavějších rozpouštědel. (22)

### 5.3. Chromatografie

Chromatografie je fyzikálně-chemický separační proces, používaný k dělení směsi látek na jednotlivé složky. V jeho průběhu se tyto složky (anebo alespoň některá z nich) pohybují nestejněměrně v systému dvou fází: stacionární (absorbent) a mobilní (rozpouštědlo, eluent). Má tři základní fáze: nanesení vzorku, dělicí proces a detekci. Podle metody separačního procesu lze chromatografii rozdělit na adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou, gelovou a afinitní. Chromatografii lze také rozdělit podle uspořádání aparatury na kolonovou a v plošném uspořádání. (22)

### 5.4. Adsorpční chromatografie

Adsorpční chromatografie je metoda založená na zadržení rozpuštěné látky povrchovou sorpcí. Separace závisí na rovnováze, která se ustavuje na rozhraní mezi částicemi nepohyblivé fáze a pohyblivé kapalně fáze a na relativní rozpustnosti látky v kapalně fázi. Konkurence mezi molekulami rozpuštěné látky a rozpouštědla o sorpční místa na povrchu adsorbentu vytváří dynamický proces, ve kterém molekuly rozpuštěné látky i rozpouštědla nepřetržitě přecházejí do styku s povrchem, jsou přechodně zadržovány a znovu přechází do pohyblivé fáze. Která z obou látek bude silněji vázána na povrchu, záleží na sorpční afinitě těchto dvou molekul. Při desorpci jsou molekuly rozpuštěné látky nuceny pohybovat se vpřed s proudem mobilní fáze.

Tato síla působí na všechny látky po dobu, po niž jsou v pohyblivé fázi, stejně. Pouze molekuly s vyšší afinitou k sorbentu budou selektivně zpomalovány.

Rozpouštědla mají různou eluční schopnost, jejich funkce se projevuje v tom, že se uplatňují při ustanovování rovnováhy mezi adsorbovanou látkou a aktivními centry adsorbentu a vytěsňují přitom chromatografovanou látku. Na polárních adsorbentech je adsorpce tím vyšší, čím je rozpouštědlo polárnější. (22)

### **5.5. Kolonová (sloupcová) chromatografie**

Při kolonové pracovní metodice se směs látek, určená k dělení, vnese vhodným způsobem na adsorbent v chromatografické trubici, na kolonu se vlévá eluent, který z kolony vytéká (a obsahuje komponenty dělené směsi), nazývá se eluát a jímá se po frakcích konstantního objemu. (22)

### **5.6. Tenkovrstvá chromatografie (Thin-Layer Chromatography, TLC)**

Dělení směsi látek probíhá na základě kapilárního nasávání rozpouštědla stacionární fází, protože deska je svou dolní hranou ponořena do eluční soustavy v chromatografické nádobě. Přitom se uplatňují podle povahy sorbentu a složení mobilní fáze všechny známe principy chromatografického dělení a to buď každý sám, nebo ve vzájemné kombinaci. Tento typ umožňuje výkonné dělení.

Silikagel je nejvíce používaný anorganický adsorbent. Má velkou sorpční kapacitu a snadno se připraví různé typy s rozdílnou velikostí pórů a rozdílným celkovým povrchem. Je vhodný pro dělení velké většiny látek, avšak z důvodů slabě kyselého povrchu (pH 3-5) se nehodí na silně bazické látky, které se na něj vážou. Silikagel je typicky polárním adsorbentem, u kterého se uplatňují dva faktory: vazba vodíkovými můstky a disperzními silami. (22)

### **5.7. Krystalizace**

Krystalizace je proces vylučování pevné látky z roztoků nebo tavenin ve formě krystalů, tj. geometrických útvarů určité prostorové struktury a homogenního chemického složení, vyjádřitelného vzorcem. Aby nastala krystalizace z roztoku, musí být porušena fázová rovnováha soustavy, tzn. roztok musí být přesycen. (22)

## **IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY**

## 1. Potřeby

### 1.1. Přístroje

Vakuová odparka Büchi Rotavapor R-114  
Vodní lázeň Büchi WaterBath B-480  
Fén BaByliss Paris  
Vakuová membránová pumpa Vakuubrand MZ2C  
Vaříč Fischer Scientific  
Digitální váhy KERN 440-35A  
UV lampa Camag 254/366 nm

### 1.2. Materiál

Alobal  
Komora  
Kolona o objemu 100 ml a 2000 ml  
Parafilm M PECHINEY  
Pipety o objemu 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml  
TLC desky: hliníková fólie Silikagel 60 F254 MERCK 20x20 cm  
tloušťka vrstvy 0,2 mm  
Chemické laboratorní sklo

### 1.3. Chemikálie

Dragendorffovo činidlo  
Ethanol 96% (EtOH)  
Chloroform p.a. (stabilizovaný  $\pm$  1% etylalkoholem) PENTA ( $\text{CHCl}_3$ )  
Kyselina octová čistá LACHEMA ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )  
Kyselina vinná p.a. PENTA  
Voda destilovaná ( $\text{H}_2\text{O}$ )

### 1.4. Vytvájecí soustava pro chromatografii

$\text{EtOH} : \text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{O} \quad 60 : 30 : 10$

### 1.5. Detekční činidlo

Jako detekční činidlo na zjištění přítomnosti alkaloidů jsme používaly Dragendorffovo činidlo. Připravovaly jsme ho v den potřeby rozpuštěním 10g kyseliny vinné v 5 ml zásobního roztoku Dragendorffova činidla a následně

zředěním 50 ml destilované vody. V případě potřeby jiného množství činidla jsme si navážky přepočítaly podle potřeby.

Složení zásobního roztoku (Dragendorffovo činidlo modifikované podle Muniera):

- *roztok A*: byl připraven rozpuštěním 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody.
- *roztok B*: se připraví rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody
- *zásobní roztok*: se připraví smísením roztoků A a B v poměru 1:1. Může být uložen několik měsíců v lednici. (23)



## 2. Izolace

### 2.1. Příprava extraktu

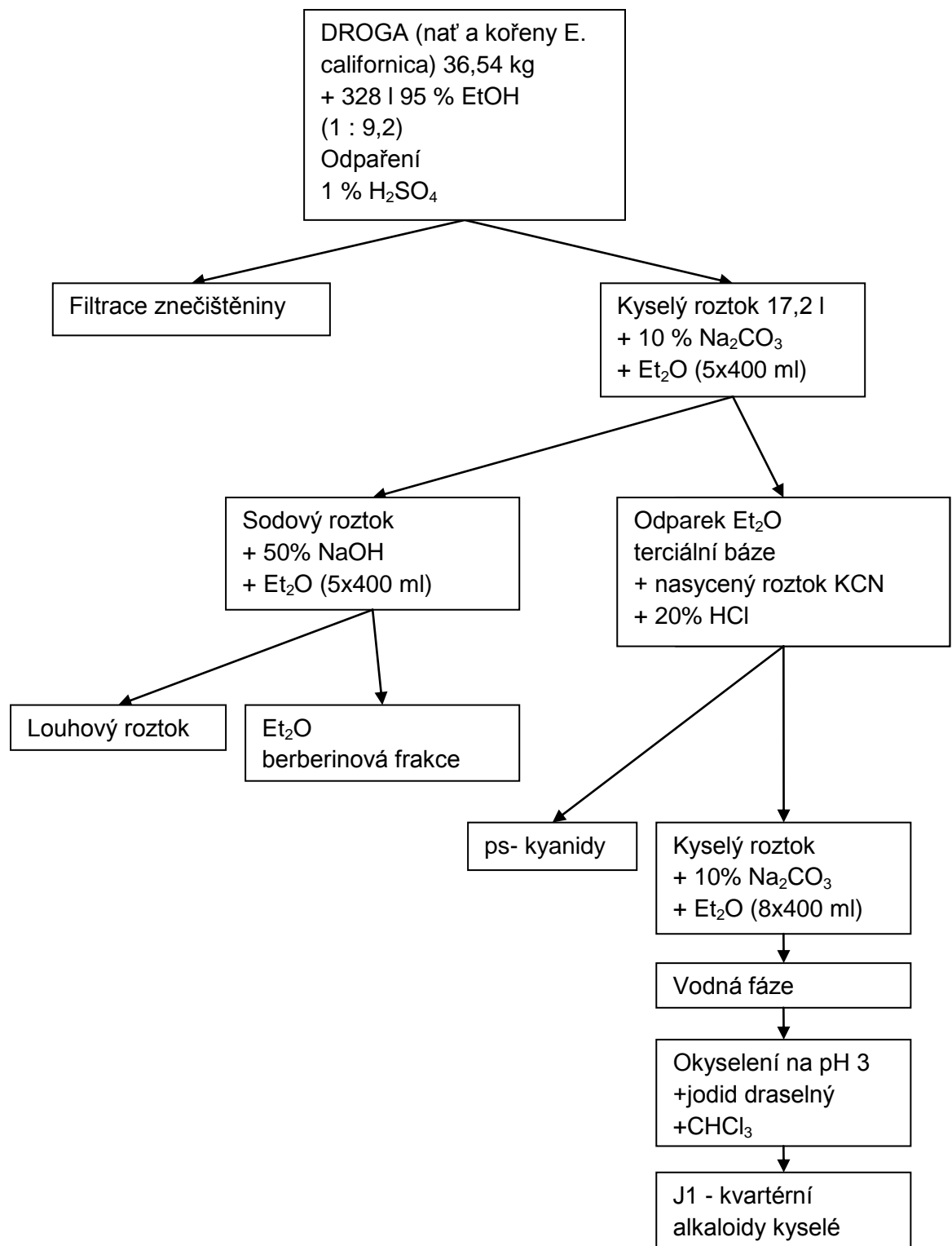


Schéma 4: Souhrn postupu (24)

### **2.1.1. Původ drogy**

Droga ve formě sušené natě s kořeny byla získána sběrem z introdukované kultury (komerční osivo) firmou Planta Naturalis; Markvartice u Sobotky. (24)

### **2.1.2. Příprava primárního extraktu a jeho čištění**

36,54 kg drogy bylo umístěno do perkolátoru, zalito 95% ethanolem a po dvou dnech stání perkolováno celkem 328 litry (1:9,2). Získaný extrakt byl zahuštěn na cca 4 litry a následně digеровán při 50 °C třikrát několika litry 1% kyseliny sírové p.a.; vodná vrstva byla vždy slita. Byl získán hnědý roztok o pH ~ 2.

Tento spojený hnědý digerát byl zfiltrován nejprve přes viskóznový filtr, posléze přes vrstvu křemeliny. Jeho celkový objem byl 17,2 litrů. (24)

### **2.1.3. Příprava alkaloidního výtřepku A z primárního extraktu**

Kyselý vodný extrakt byl zpracován po 1000 ml: do třepací nálevky bylo k tomuto roztoku nalito 400 ml etheru a po částech a za stálého třepání byla provedena alkalizace 10% uhličitanem sodným až na pH 9 ~ 10. Vytřepání 400 ml etheru bylo provedeno pětkrát.

Získaný etherový výtřepok byl odpařen téměř do sucha, odparek byl za mírného zahřátí (50 °C) rozpuštěn v 1000 ml 1% kyseliny sírové p.a. (odstranění pryskyřičnatých podílů). Následně bylo přidáno 400 ml etheru a po částech a za neustálého třepání potřebné množství 10% uhličitanu sodného, až na pH 9 - 10. Vytřepání etherem (vždy 400 ml) bylo provedeno osmkrát.

Po odpaření byl získán nahnědlý výrazně krystalický odparek. Spojené sodové fáze byly použity pro izolaci dalších alkaloidů. (24)

## **2.2. Příprava chromatografické kolony**

### **2.2.1. Příprava silikagelu pro sloupcovou chromatografii**

Silikagel byl 4 hodiny aktivován v sušárně při 160 °C ve vrstvě menší než 2 cm. Po vychladnutí byl deaktivován na 12 % obsahu vody.

### **2.2.2. Příprava roztěru**

Extrakt, který jsme nanášely na kolonu, byl rozpuštěn v chloroformu, tedy v rozpouštědle, ve kterém se nejlépe rozpouští. Vypočetly jsme si množství extraktu, které jsme nanášely na kolonu (množství silikagelu na roztěr 100 g,

množství extraktu 60 g). V odpařovací misce jsme smísily vypočtené množství silikagelu s malým množstvím extraktu. Misku jsme umístily na vodní lázeň a za stálého míchání se rozpouštědlo odpařovalo do sucha. Takto jsme získaly silikagel, který byl nasycen extraktem.

### 2.3. Sloupcová chromatografie

Chromatografickou kolonu jsme připravily tímto postupem: po upevnění kolony jsme odtokovou část oddělily smotkem vaty od separačního prostoru. Pak jsme nalily suspenzi čistého silikagelu (500 g silikagelu) do kolony za současně mírně otevřeného kohoutku. Na hladinu jsme nanasly nasycený silikagel, který jsme nakonec opatrně překryly filtračním papírem a ten upevnily pomocí skleněných kuliček. Nakonec jsme přilily asi 300 ml chloroformu a začaly pomalu odpouštět tak, aby silikagel vytvořil kompaktní objem kolony.

#### 2.3.1. Jímání frakcí

Rozpouštědlo jsme odpouštěly, až sledovaná zóna klesla do dvou třetin výšky kolony (mrtvý bod) a pak jsme začaly jímat frakce, a to po konstantních objemech 250 ml. U každé frakce jsme popsaly vzhled a zaznamenaly složení rozpouštědla. (tabulka č. 2) Každou frakcí jsme rozdělily na dvě části:

1) Z celkového objemu jsme odebraly malý vzorek, vyfoukaly jsme rozpouštědlo pomocí vzduchové pumpy do sucha, pak jsme nanasly kapku chloroformu a rozpustily jsme v ní dané látky. Z takto připraveného vzorku jsme nanasly dvě kapky pomocí skleněné kapiláry na chromatografickou desku přiměřené velikosti, nechaly zaschnout a vložily do chromatografické komory předem naplněné vyvíjecí soustavou a nasycené jejími parami. Vyvíjely jsme vzestupně přibližně jednu hodinu. Po ukončení vyvíjení jsme desku vysušily proudem teplého vzduchu, umístily pod UV lampu s vlnovou délkou 254 nm a 366 nm a označily jsme si zóny, které pod UV světlem 366 nm svítily.

2) Větší část jsme přelily z Ehrlenmayerovy baňky do baňky destilační a umístily na vakuovou rotační odparku s vodní lázní. Rozpouštědlo jsme odstraňovaly pomocí zahřívání (teplota byla okolo 50 °C) za sníženého tlaku (cca 1,6 kPa), tak dlouho, až v destilační baňce zbylo malé množství zahuštěné frakce. Tento zbytek jsme přenesly do zkumavky a uchovaly v lednici.

Frakce číslo	rozpouštědlo	alkaloidy	Popis frakce
1	100	Ano	Žlutohnědá
2	100	Ano	Světle žlutá
3	100	Ne	Světlá

<b>Frakce číslo</b>	<b>rozpouštědlo</b>	<b>alkaloidy</b>	<b>Popis frakce</b>
4	100	Ano	Žlutá
5	100	Ano	Zelená
6	100	Ano	Světle žlutá
7	100	Ne	Světle žlutá
8	100	Ne	Světle žlutá
9	100	Ne	Čirá žlutavá
10	100	Ne	Čirá mírně žlutavá
11	100	Ne	Světle žlutá
12	100	Ne	Světle žlutá
13	99,5 : 0,5	Ne	Světle žlutá
14	99,5 : 0,5	Ne	Světle žlutá
15	99,5 : 0,5	Ne	Tmavě žlutá
16	99,5 : 0,5	Ne	Světle žlutá
17	99,5 : 0,5	Ne	Čirá lehce žlutá
18	99,5 : 0,5	Ne	Čirá světle žlutá
19	99,5 : 0,5	Ne	Čirá světle žlutá
20	99,5 : 0,5	ne	Čirá lehce naoranžovělá
21	99 : 1	Ne	Čirá světle žlutá
22	99 : 1	Ne	Čirá světle žlutá
23	99 : 1	Ano	Čirá světle žlutá
24	99 : 1	Ano	Čirá světle žlutá
25	99 : 1	Ano	Čirá světleoranžová
26	99 : 1	Ano	Čirá světle naoranžovělá
27	99 : 1	Ano	Čirá světle žlutá
28	99 : 1	Ano	Čirá žlutá
29	99 : 1	Ano	Čirá žlutá
30	98 : 2	Ano	Čirá slabě naoranžovělá
31	98 : 2	Ano	Čirá středně oranžová
32	98 : 2	Ano	Čirá středně oranžová, tmavá zóna
33	98 : 2	Ano	Čirá středně oranžová
34	98 : 2	Ano	Čirá světlejší oranžová
35	98 : 2	Ano	Čirá středně žlutá
36	98 : 2	Ano	Čirá středně žlutá
37	98 : 2	Ano	Čirá středně žlutá
38	98 : 2	Ano	Čirá středně žlutá
39	98 : 2	Ano	Čirá středně žlutá
40	98 : 2	Ano	Čirá středně žlutá
41	98 : 2	Ano	Čirá světle žlutá
42	98 : 2	Ano	Čirá světle žlutá
43	98 : 2	Ano	Čirá žlutá
44	98 : 2	Ano	Čirá žlutá
45	98 : 2	Ano	Čirá žlutá, krystal
46	98 : 2	Ano	Žlutá
47	98 : 2	Ano	Žlutá
48	98 : 2	Ano	Světlejší žlutá
49	98 : 2	Ano	Světle žlutá

<b>Frakce číslo</b>	<b>rozpouštědlo</b>	<b>alkaloidy</b>	<b>Popis frakce</b>
50	98 : 2	Ano	Světle žlutá
51	98 : 2	Ano	Světle žlutá
52	98 : 2	Ano	Světle žlutá
53	98 : 2	Ano	Světle žlutá
54	98 : 2	Ano	Světle žlutá
55	98 : 2	Ano	Světle žlutá
56	98 : 2	Ano	Světle žlutá
57	98 : 2	Ano	Světle žlutá
58	98 : 2	Ano	Světle žlutá
59	98 : 2	Ano	Světle žlutá
60	98 : 2	Ano	Světle žlutá
61	98 : 2	Ano	Světle žlutá
62	98 : 2	Ano	Světle žlutá
63	98 : 2	Ano	Světle žlutá
64	98 : 2	Ano	Světle žlutá
65	98 : 2	Ano	Světle žlutá
66	98 : 2	Ano	Světle žlutá
67	98 : 2	Ano	Světle žlutá
68	98 : 2	Ano	Světle žlutá
69	98 : 2	Ano	Světle žlutá
70	97 : 3	Ano	Světle žlutá
71	97 : 3	Ano	Světle žlutá
72	97 : 3	Ano	Světle žlutá
73	97 : 3	Ano	Světle žlutá
74	97 : 3	Ano	Světle žlutá
75	95 : 5	Ano	Světle žlutá
76	95 : 5	Ano	Světle žlutá
77	95 : 5	Ano	Světle žlutá
78	95 : 5	Ano	Světle žlutá
79	95 : 5	Ano	Světle žlutá
80	95 : 5	Ano	Světle žlutá
81	95 : 5	Ano	Světle žlutá
82	95 : 5	Ano	Světle oranžová
83	95 : 5	Ano	Světle žlutá
84	95 : 5	Ano	Světle žlutá
85	93 : 7	Ano	Světle žlutá
86	93 : 7	Ano	Světle žlutá
87	93 : 7	Ano	Světle žlutá
88	93 : 7	Ano	Světle žlutá
89	93 : 7	Ano	Světle žlutá
90	93 : 7	Ano	Světle růžová
91	93 : 7	Ano	Světle žlutá
92	90 : 10	Ano	Světle žlutá
93	90 : 10	Ano	Světle žlutá
94	90 : 10	Ano	Světle žlutá
95	90 : 10	Ano	Světle žlutá
96	90 : 10	Ano	Světle žlutá

Frakce číslo	rozpouštědlo	alkaloidy	Popis frakce
97	90 : 10	Ano	Světle růžová
98	90 : 10	Ano	Světle žlutá
99	90 : 10	Ano	Světle žlutá
100	85 : 15	Ano	Světle žlutá
101	85 : 15	Ano	Světle žlutá
102	85 : 15	Ano	Světle žlutá
103	85 : 15	Ano	Světle žlutá
104	80 : 20	Ano	Světle žlutá
105	80 : 20	Ano	Světle žlutá
106	80 : 20	Ano	Žlutá
107	75 : 25	Ano	Žlutá
108	75 : 25	Ano	Žlutá
109	70 : 30	Ano	Žlutá
110	70 : 30	Ano	Žlutá
111	70 : 30	Ano	Žlutá
112	70 : 30	Ne	Žlutá
113	65 : 35	Ne	Žlutá
114	65 : 35	Ne	Žlutá
115	65 : 35	Ne	Žlutá
116	60 : 40	Ne	Žlutá
117	60 : 40	Ne	Žlutá
118	60 : 40	Ne	Žlutá
119	55 : 45	Ne	Žlutá
120	55 : 45	Ne	Žlutá
121	55 : 45	Ne	Žlutá
122	50 : 50	Ne	Žlutá
123	50 : 50	Ne	Žlutá
124	50 : 50	Ne	Žlutá
125	45 : 55	Ne	Žlutá

Tabulka 2: Souhrn jímání frakcí: poměr rozpouštědel (chloroform : ethanol), přítomnost alkaloidů a popis frakce

### 2.3.2. Spojování frakcí

Po ukončení jímání frakcí jsme kolonu uzavřely, ohodnotily výsledky chromatografie a dohodly spojování frakcí. Spjovaly jsme frakce s podobným spektrem zón na chromatografické desce po postřiku Dragendorffovým činidlem (tabulka č: 3).

Označení spojených frakcí	Číslo frakce
1	1 – 22
2	23
3	24
4	25
5	26 - 31
6	32 - 42

Označení spojených frakcí	Číslo frakce
7	43 - 58
8	59 - 72
9	73 - 91
10	92
11	93 - 95
12	96
13	97 - 103
14	104 - 106

Tabulka 3: Spojování frakcí

Frakce jsme spojily do zkumavek a uložily do lednice.

### 2.3.3. Oddělování alkaloidů

Naše práce pokračovala pouze se spojenou frakcí číslo 5 (frakce 26 – 31; viz Příloha, chromatogram 1 - 4). Tato frakce byla po odpaření rozpouštědla a spojení tmavě hnědá a tekuté konzistence. Po zředění chloroformem (ředění jsme provedly za účelem lepšího rozdělení na chromatografické desce) jsme nanášely frakci číslo 5 na chromatografické desky velkého rozměru. Nanášely jsme pomocí skleněného aplikátoru, který jsme upravily tak, že jsme na rozhraní úzké a hrubé části vložily smotek vaty proto, abychom docílily pomalejšího a stejnoměrného toku. Vyvíjely jsme v chromatografické komoře, která byla naplněna stejnou vyvíjecí soustavou jako při orientační detekci alkaloidů. Vyvíjení trvalo přibližně tři hodiny.

Po ukončení vyvíjení jsme desku vysušily proudem teplého vzduchu a zhodnotily pod UV světlem. Při UV o vlnové délce světla 254 nm byly vidět dva tmavé proužky (spodní linku jsme označily 5/1) a pod UV světlem 366 nm bylo vidět mnoho barevných pruhů (vrchní linku jsme označily 5/2).

Označené linky jsme vystříhly z chromatografické desky a snažily jsme se oddělit rozdělené látky. Proužek jsme nastříhaly na malé kousky a zalily chloroformem. Silikagel jsme oddělily filtrací přes skládaný filtr a filtrát jsme shromažďovaly. Tento postup jsme provedly u vzorku 5/1 i 5/2. Ze získaných roztoků jsme odpařily rozpouštědlo na rotační odparce až na cca 1/3 objemu.

Kvůli důkazu správného oddělení obou látek jsme provedly další vyvíjení pomocí TLC. Obě látky jsme zvlášť nanesly na chromatografickou desku a nechaly vyvíjet. Pak jsme výsledek pozorovaly pod UV lampou. Vzorek 5/1 vykazoval jednu slabou skvrnu a na desce se vzorkem 5/2 byly viditelné dvě skvrny. Z toho vyplývá, že vzorek 5/2 byl špatně rozdělen a v roztoku s izolovanou látkou jsme oddělily i nečistotu. Po postříku Dragendorffovým činidlem byla na vzorku 5/1 dobře viditelná skvrna. Na vzorku 5/2 jsme detekovaly jednu látku.

Koncentrované roztoky uskladněné v destilačních baňkách jsme obalily alobalem a nechaly stát v digestoři za účelem oddělení krystalické formy

izolované látky. Jelikož jsme nezaznamenaly úspěch za pokojové teploty, umístily jsme oba vzorky na delší dobu do lednice. Když se ani po třech dnech neukázala změna, pokračovali jsme jiným postupem.

Odpařily jsme rozpouštědlo do sucha a baňky jsme zvažily. Tak jsme zjistily hmotnost izolovaných látek.

Hmotnost vzorku 5/1:

Hmotnost prázdné zkumavky: 75,514 g

Hmotnost zkumavky s izolovanými látkami: 75,533 g

Hmotnost izolovaných látek:  $75,533 - 75,514 = 0,019$  g

Hmotnost vzorku 5/2:

Hmotnost prázdné zkumavky: 75,575 g

Hmotnost zkumavky s izolovanými látkami: 75,617 g

Hmotnost izolovaných látek:  $75,617 - 75,575 = 0,042$  g

Po zvážení jsme do destilační baňky vnesly 1 ml methanolu a pozorovaly zakalení roztoků. Proto jsme vzorky zabalily do alobalu a nechaly stát v lednici. Za dva dny jsme vzorky z lednice vyjmuly a nepozorovaly jsme žádnou změnu. Proto jsme methanol (obsahoval izolovanou látku a nečistoty) odebraly a vložily do zkumavek označených I.

Zbytky v destilačních baňkách jsme vymyly chloroformem a uložily je do zkumavek označených II. Pak jsme přistoupily k odpaření chloroformu. Po odpaření zůstaly na stěnách zkumavek bílá vlákna a stěny byly zabarveny do hněda. Po zvážení izolovaných látek jsme provedly orientační zkoušku pomocí TLC. Ukázalo se, že jsme izolovaly jak alkaloidy, tak i nečistoty (chromatogram č. 5).

Retenční faktory zjištěných látek:

$$R_F 5/1 = 0,701$$

$$R_F 5/2 = 0,866$$

Hmotnost izolovaných látek:

II (5/1)      7,2083 g (prázdná zkumavka)  
7,2247 g (zkumavka po odpaření rozpouštědla, tzn. s obsahem izolovaných látek)  
 $7,2247 - 7,2083 = 0,0164$  g izolovaných látek

II (5/2)      7,4614 g (prázdná zkumavka)  
7,4760 g (zkumavka s obsahem izolovaných látek)  
 $7,4760 - 7,4614 = 0,0146$  g izolovaných látek



Podařilo se nám izolovat 0,0164 g látky 5/1 a 0,0146 g látky 5/2.

## **V. DISKUZE A ZÁVĚR**

Tato diplomová práce navazuje na poznatky získané z práce: Doležal, J.: Biologická aktivita obsahových látek rostlin VIII. Vliv alkaloidů z různých rostlinných taxonů na acetylcholinesterázu. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2008, 65 s.

Naše katedra se rozhodla vyhledávat látky přírodního původu, které by mohly pomoci usnadnit léčbu Alzheimerovy choroby. Doposud nebyl nalezen účinný lék proti této nemoci a probíhá intenzivní výzkum látek umožňujících zpomalit její průběh, případně ho zcela zastavit.

Jako potenciálně využitelné látky k léčbě Alzheimerovy choroby se ukázaly inhibitory acetylcholinesterázy. Do této skupiny, mimo jiných látek izolovaných z rostlin, patří alkaloidy. Jedním z taxonů, který tento typ látek obsahuje, je taxon *Eschscholzia californica* z čeledi *Papaveraceae*.

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat výtřepek J1 získaný ze suché nati s kořeny z rostliny *Eschscholzia californica* Cham., nalezení vhodné dělicí soustavy pro chromatografický sloupec, provést chromatografické dělení a izolovat alespoň jeden čistý kvartérní alkaloid. Dalším úkolem bylo provést identifikaci tohoto alkaloidu a podílet se na stanovení jeho aktivity vůči erythrocytární acetylcholinesteráze.

Nejprve jsme si výtřepek J1 naředily chloroformem na 5 % koncentraci, ale po provedení kontrolní tenkovrstvé chromatografie jsme tuto koncentraci ještě snížily na 1 %.

Před provedením vlastního dělení jsme zjišťovaly soustavu, která by byla vhodná pro dělení extraktu. Po nalezení této směsi rozpouštědel a ověření dělitelnosti extraktu jsme začaly provádět sloupcovou chromatografii.

Chromatografická kolona byla naplněná silikagelem, který prošel aktivací při 160 °C v sušárně a deaktivací přidáním vody. Na kolonu naplněnou 500 g silikagelu jsme nanesly roztěr. Ten byl připraven smícháním rozpuštěného a naředěného extraktu (60 g) se 100 g silikagelu a následným odpařením rozpouštědla. Po nanesení roztěru jsme zajistily hladinu silikagelu filtračním papírem a skleněnými kuličkami a začaly nalévat rozpouštědlo. Jako základní rozpouštědlo jsme používaly chloroform a k němu jsme postupně přidávaly ethanol až do poměru 45 : 55 (chloroform : ethanol). Jednotlivé frakce jsme jímaly po konstantních objemech 250 ml. Zaznamenávaly jsme vzhled frakcí, jejich zabarvení, poměr rozpouštědel a přítomnost alkaloidů. Takto jsme odebraly 125 frakcí.

U každé frakce jsme odebraly vzorek a u něj jsme provedly orientační TLC. Vzorek jsme nanesly na chromatografickou desku a ta pak byla vyvíjena v chromatografické komoře, která byla nasycena parami vyvíjející soustavy.

Tuto soustavu jsme také zjišťovaly experimentálně. Z mnoha směsí chemikálií jsme za nejvhodnější určily poměr látek ve složení ethanol : kyselina octová : voda (60 : 30 : 10). Látky obsažené v jednotlivých frakcích jsme detekovaly pomocí UV záření o vlnové délce 254 nm a 366 nm a postřikem detekčního činidla. Jako detekční činidlo jsme vybraly Dragendorffovo činidlo. To jsme si připravovaly vždy v den potřeby smícháním 5 ml zásobního roztoku Dragendorffova činidla, 10 g kyseliny vinné a 50 ml destilované vody. V příloze je uveden vzhled TLC chromatogramů pod UV světlem (chromatogramy č. 6, 7 a 8) a také po postřiku Dragendorffovým činidlem (chromatogramy č. 1, 2, 3, 4 a 5).

Po vyhodnocení obsahu frakcí jsme sloučily ty frakce, které měly po postřiku detekčním činidlem podobné spektrum obsažených látek. Ze 14 spojených frakcí jsme dále pracovaly s frakcí č. 5. Potřebovaly jsme izolovat co nejčistší alkaloid. Po zředění zahuštěného extraktu chloroformem jsme tuto směs látek nanášely na velké chromatografické desky a vyvíjely v chromatografické komoře za stejných podmínek jako při orientační detekci látek obsažených v jímaných frakcích. Po vyvinutí a usušení desek jsme detekovaly alkaloidy pomocí UV záření o vlnové délce 254 nm a 366 nm a Dragendorffova činidla. Zjistily jsme dva pruhy, které jsme oddělily odstřížením a každý pruh jsme zpracovávaly zvlášť. Pruh jsme rozstříhaly na co nejmenší kousky a nasypaly do kádinky s chloroformem. Po vymytí látek jsme roztok přefiltrovaly a filtrát byl zahuštěn. Pak jsme provedly orientační TLC a zjistily jsme přítomnost alkaloid v roztoku. Kromě izolovaného alkaloidu jsme ale zachytily i malé množství nečistot.

Proto následovalo čištění směsi. Zahuštěný filtrát jsme umístily do lednice a očekávaly jsme vypadnutí krystalické formy alkaloidů. Ale to se bohužel nepovedlo, tak jsme přistoupily k vykrystalizování pomocí rozpouštědla s větší polaritou. Ale ještě před provedením jsme si zjistily hmotnost izolovaných látek (alkaloidů i s nečistotami) odpařením rozpouštědla a zvážením. Získaly jsme 0,019 g směsi 5/1 a 0,042 g směsi 5/2.

Obě směsi jsme rozpustily v methanolu a ihned jsme zaregistrovaly zakalení směsí. Krystalky byly jemné, proto jsme směsi uložily do lednice. Ale ani po delší době nedošlo ke zvětšení velikosti krystalků. Proto jsme rozpouštědlo odsály a zbytky ve zkumavkách rozpustily v chloroformu. Na stěnách zkumavek vznikla po odpaření chloroformu bílá vlákna. Z těch jsme si odebraly vzorky a provedly orientační TLC. Po detekci Dragendorffovým činidlem jsme zjistily výskyt dvou různých alkaloidů, ale i malého množství nečistot. U obou alkaloidů jsme zjistily retenční faktor.

Obě izolované látky jsme odeslaly na zjištění struktury pomocí NMR spektroskopie.

Na závěr mohu konstatovat, že se nám sice podařilo izolovat alkaloidy, ale to pouze dva a ještě ve velmi malém množství. Důvodem mohlo být špatné rozdělení na chromatografické koloně, dělení bylo komplikované a zdlouhavé. Z důvodu dlouhého rozdělování látek v chromatografické koloně mohlo dojít k nežádoucím reakcím, které ovlivnily složení směsi a následně i kvalitu rozdělení látek. Dalším důvodem neúplného rozdělení může také být nesprávně zvolená soustava.

Pro malé množství a doposud neprovedenou identifikaci získaného alkaloidu nebylo možno stanovit jeho aktivitu vůči erytrocytární acetylcholinesteráze.

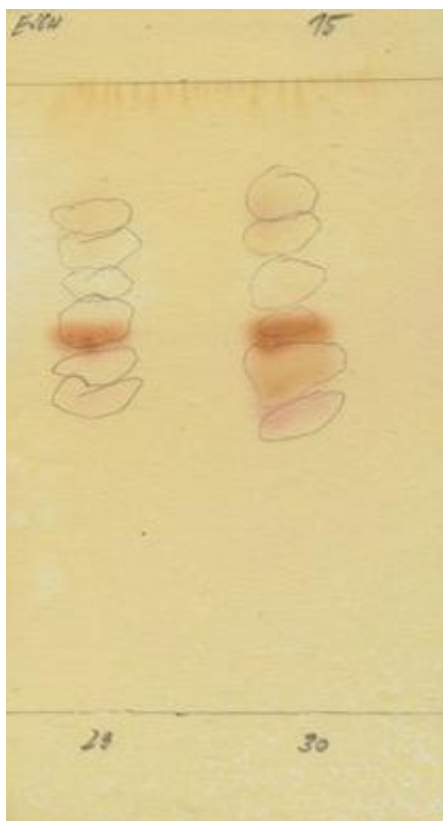
## **VI. PŘÍLOHY**



Chromatogram č. 1



Chromatogram č. 2



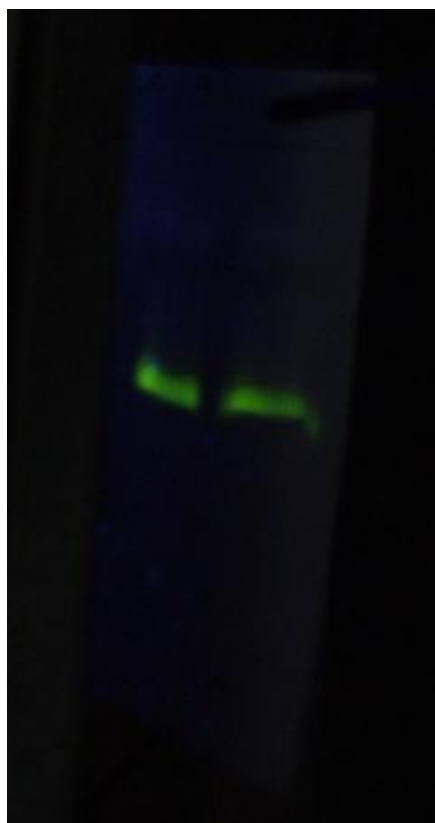
Chromatogram č. 3



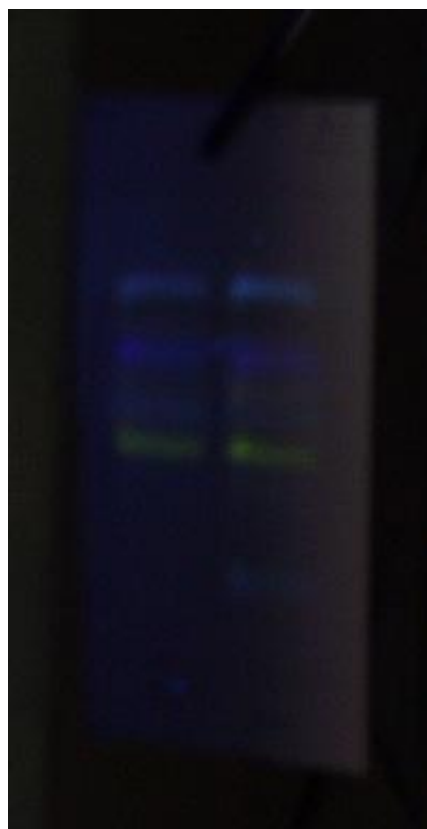
Chromatogram č. 4



Chromatogram č. 5

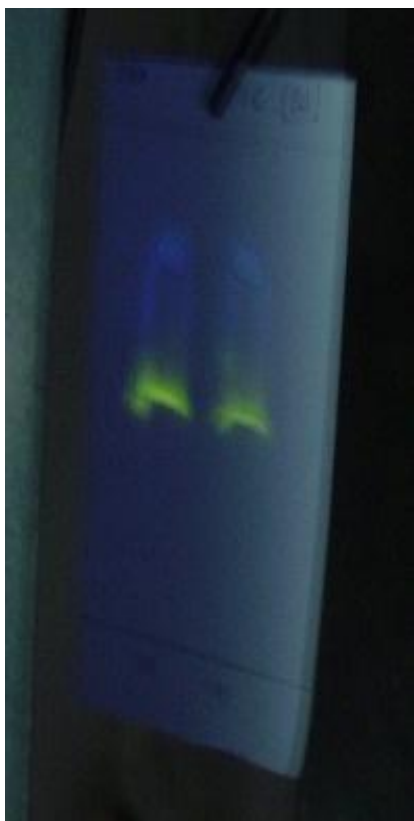


Chromatogram č. 6: Zóny pod UV zářením



Chromatogram č. 7: Zóny pod UV zářením





Chromatogram č. 8: Zóny pod UV zářením



Barva frakce

## **VII. LITERATURA**

1. <http://www.ordinace.cz/clanek/alzheimerova-choroba> (vystaveno 8. června 2004)
2. <http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xbcr/zc/156.pdf> (nalezeno 15. prosince 2008, převzato z časopisu Psychiatrie pro praxi, 2002, str. 55 - 58)
3. <http://botanika.wendys.cz/kytky/K496.php> (nalezeno 13. listopadu 2008)
4. [http://en.wikipedia.org/wiki/Eschscholtzia\\_californica](http://en.wikipedia.org/wiki/Eschscholtzia_californica) (vystaveno 23. prosince 2008)
5. Tomè F., Colombo M. L., Caldiroli L.; A Comparative Investigation on Alkaloid Composition in Different Populations of *Eschscholtzia Californica* Cham.; Phytochemical Analysis 10 (1999), John Wiley & Sons, Ltd., str. 264 – 267
6. Hejný S., Slavík B.; Květena české socialistické republiky 1, Academia (1988), str. 494
7. Rey J. P., Levesque J., Pousset J. L., Roblot F.; Analytical and quantitative studies of californin and protopin in aerial part extracts of *Eschscholtzia californica* Cham. with HPLC, Journal of Chromatography 587 (1991), Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, str. 314 – 317
8. <http://www.aboca.us/pdf/herbs/poppy.pdf> (nalezeno 20. listopadu 2008)
9. Hanus M., Lafon J., Mathien M.; Double-blind, randomised, placebo - controlled study to evaluate the efficacy and safety of a fixed combination containing two plant extracts (*Crataegus oxyacantha* and *Eschscholtzia californica*) and magnesium in mild – to – moderate anxiety disorders, Current Medical Research and Opinion, Volume 20, Number 1 (2004), str. 63 – 71
10. Dostál J., Slavík J.; Novější poznatky o sanguinarinu a příbuzných alkaloidech, Chemické listy 94 (2000), str. 15 – 20
11. Suchomelová J., HPLC studium kvartérních benzo fenanthridinových alkaloidů ve vybraných rostlinných druzích čeledi *Papaveraceae*, Disertační práce, Biochemický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova universita, Brno (2007)

- 11.1. Minařík J., Farmakognosie, Avicenum, 1. Vydání, Praha (1979), str. 384
- 11.2. Cordell G. A., Quinn-Beattie M. L., Fergusworth N. R.; The Potential of Alkaloids In Drug Discovery, *Phytoter. Res.* 15 (3) (2001), str. 183 – 205
- 11.3. Slavík J.; Alkaloidy čeledi Makovitých (*Papaveraceae*), Doktorantská disertační práce, Katedra lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta univerzity J. E. Purkyně v Brně, Brno (1980)
- 11.4. Vavrečková C. a kol.; Biologická aktivita kvartérních benzofenantridinových alkaloidů sanguinarinu a chelerytrinu, *Chemické listy* 88 (1994), str. 238 – 248
- 11.5. Dostál J., Slavík J.; *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier Science B.V. (2002), str. 155 – 184
- 11.6. Dostál J., Potáček M.; Quarternary benzo[c]phenanthridine alkaloids, *Collect Czech Chem. Commun.* 55 (12) (1990), str. 2840 – 2873
12. <http://en.wikipedia.org/wiki/Sanguinarine> (vystaveno 12. prosince 2008)
13. <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchFreeText.do?searchString=macarpine> (nalezeno 20. listopadu 2008)
14. <http://www.projektmedved.eu/stredisko/node/9> (vystaveno 15. února 2007)
15. Obrázek byl vytvořen za použití aplikace ChEBI (<http://www.ebi.ac.uk/chebi/advancedSearchForward.do>) (nalezeno 20. listopadu 2008)
16. <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structure---C/chelidonine.htm> (nalezeno 26. prosince 2008)
17. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Morfin> (vystaveno 10. ledna 2009)
18. <http://en.wikipedia.org/wiki/Codeine> (vystaveno 9. ledna 2009)
19. <http://en.wikipedia.org/wiki/Berberine> (vystaveno 31. prosince 2008)
20. [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a8/Protopine\\_structure.svg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a8/Protopine_structure.svg) (vystaveno 2. listopadu 2008)

21. <http://www.thefreedictionary.com/cryptopine> (nalezeno 25. prosince 2008)
22. Opletal L., Drašar P.; *Fytochemické metody 1. Izolace obsahových látek (laboratorní technika)*, Praha (1994), str. 45 – 130
23. Stahl E.; *Thin – Layer Chromatography; A Laboratory Handbook*, Springer Verlag Berlin; Heidelberg, New York (1969), str. 873
24. Doležal J.; *Biologická aktivita obsahových látek VIII. Vliv alkaloidů z různých rostl. taxonů na acetylcholinesterázy*, Diplomová práce, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze (2008)

## VIII. ABSTRAKT

Linzerová, Petra.: Biologický účinek rostlinných metabolitů III. Izolace alkaloidů z *Eschscholzia californica* Cham. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2009, 54 stran

Cílem této diplomové práce bylo izolovat alkaloidy z J1 extraktu získaného z natě s kořeny z rostliny *Eschscholzia californica* Cham., provést identifikaci získaného alkaloidu a podílet se na stanovení aktivity izolovaného alkaloidu vůči erythrocytární acetylcholinesterázy.

Po nalezení vhodné eluční soustavy jsme rozdělily extrakt na chromatografické koloně naplněné silikagelem soustavou chloroform : ethanol za postupného navyšování koncentrace ethanolu. Z odebraných eluátů jsme provedly orientační TLC s vyvíjecí soustavou kyselina octová : ethanol : voda (60 : 30 : 10). Alkaloidy byly detekovány pomocí UV záření a postřikem Dragendorffova činidla. Po spojení frakcí s podobným spektrem látek bylo provedeno čištění vybrané směsi. Získaly jsme dva alkaloidy, NMR spektroskopie bude použita ke zjištění struktury alkaloidů.

Klíčová slova: *Eschscholzia californica* Cham., sluncovka kalifornská benzo[c]fenantridinové alkaloidy, sloupcová chromatografie, Alzheimerova choroba, inhibitory acetylcholinesterázy

## ABSTRACT

Linzerová, Petra.: Biological Effect of Plant Metabolites III. Izolation of Alkaloids from *Eschscholzia californica* Cham. A Diploma Work, Charles University in Praque, Faculty Of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany And Ecology, Hradec Králové 2009, 54 pages

Aims of this diploma thesis were to isolate alkaloids from J1 extract obtained from a herb with roots from a plant *Eschscholzia californica* Cham., to perform the identification of gained alkaloid and to participate in determination of activity of isolated alkaloid against the erythrocytic acetylcholinesterase.

After finding suitable mix of reagents we divided the extract on a chromatografic column filled with silica gel by system of chloroform : ethanol with gradual increasing of concentration ethanol. With obtained eluents we made a orientation thin layer chromatography with developing system acetic acid : ethanol : water (60 : 30 : 10). Alkaloids were detected by UV radiation and spray with Dragendorff reagent. After decantation of fractions with similar spectrum of matters we cleared selected mixture. We obtained two alkaloids; NMR spectroscopy will be used to determine the structures of these alkaloids.

Keywords: *Eschscholzia californica* Cham., benzo[c]phenantridin alkaloids, column chromatography, Alzheimer disease, inhibitors of acetylcholinesterase