

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



RIGORÓZNÍ PRÁCE

Biologicky aktivní metabolity rostlin I. Alkaloidy *Corydalis cava* (L.) Shweigg. & Körte (*Fumariaceae*) a screening jejich biologických vlastností.

Biological Active Plant Metabolites I. Alkaloids of *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Körte (*Fumariaceae*) and Screening of Their Biological Properties.

Školitel: Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

2010

Mgr. Marek Sekula

PROHLÁŠENÍ

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

15. ledna 2010, Hradec Králové

Marek Sekula

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat paní Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D., za veškerou pomoc, trpělivost, cenné odborné rady, pomoc s interpretací MS spekter a poznámky k NMR spektrům, veškeré poskytnuté materiály a vedení během vypracovávání mé rigorózní práce. Dále bych chtěl poděkovat za změřeni a interpretaci NMR spekter doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc., z Katedry anorganické a organické chemie a Ing. Kateřině Macákové z Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za změřeni biologických aktivit izolované látky. Dále kolektivu katedry farmaceutické botaniky a ekologie za příjemné prostředí a pomoc při řešení technických a teoretických problémů.

Marek Sekula

OBSAH

| | |
|---|----|
| Obsah..... | 1 |
| 1 Úvod | 4 |
| 2 Cíl práce | 7 |
| 3 Teoretická část | 9 |
| 3.1 Charakteristika demence | 10 |
| 3.2 Charakteristika Alzheimerovy choroby | 10 |
| 3.2.1 Terapie Alzheimerovy choroby | 12 |
| 3.3 Kritéria výběru rostliny pro fytochemický výzkum | 12 |
| 3.4 Dymnivka dutá, <i>Corydalis cava</i> (<i>Fumariaceae</i>) | 13 |
| 3.4.1 Preferované jméno | 13 |
| 3.4.2 Synonyma | 13 |
| 3.4.3 Botanický popis | 14 |
| 3.4.4 Ekologie..... | 14 |
| 3.4.5 Celkové rozšíření | 15 |
| 3.4.6 Rozšíření v ČR | 15 |
| 3.5 Obsahové látky <i>Corydalis cava</i> (L.) Schweigg. Et Köerte..... | 16 |
| 3.5.1 Isochinolinové alkaloidy z <i>Corydalis cava</i> (L.) Schweigg. Et Koerte | 16 |
| 3.5.2 Ostatní sekundární metabolity izolované z <i>Corydalis cava</i> (L.) Schweigg. Et Köerte | 24 |
| 3.6 Biologická aktivita látek izolovaných z <i>Corydalis cava</i> | 25 |
| 3.6.1 Inhibiční aktivita isochinolinových alkaloidů vůči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze 25 | |
| 3.6.2 Další biologické aktivity alkaloidů z <i>Corydalis cava</i> | 29 |
| 3.7 Fytochemické a biologické studie dalších druhů rodu <i>Corydalis</i> | 30 |
| 4 Experimentální část | 32 |
| 4.1 Všeobecné postupy | 33 |
| 4.1.1 Destilace a odpařování..... | 33 |
| 4.1.2 Chromatografie | 33 |
| 4.2 Materiál a vybavení | 34 |
| 4.2.1 Rozpouštědla a chemikálie | 34 |
| 4.2.2 Chemikálie a materiál ke stanovení účinku AChE a BuChE (IC ₅₀)..... | 34 |
| 4.2.3 Chemikálie ke stanovení antioxidační aktivity | 35 |
| 4.2.4 Přístroje použité při stanovení biologických účinků izolovaných látek..... | 35 |
| 4.2.5 Detekční činidla | 36 |
| 4.2.6 Chromatografické desky a adsorbenty | 36 |
| 4.2.7 Vytvářecí soustavy pro analytickou tenkovrstvou chromatografii | 36 |
| 4.2.8 Vytvářecí soustavy pro preparativní tenkovrstvou chromatografii..... | 37 |
| 4.3 Zpracování chloroformového výtřepku B z <i>Corydalis cava</i> | 37 |
| 4.3.1 Původ drogy..... | 37 |
| 4.3.2 Příprava a čištění výtřepku <i>Corydalis cava</i> /B/CHCl ₃ | 37 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.3.3 | Sloupcová chromatografie výtřepku <i>Corydalis cava</i> /B/CHCl ₃ | 38 |
| 4.3.4 | Zpracování spojených frakcí 7 a 8 | 40 |
| 4.3.5 | Čištění a separace minoritních alkaloidů z F ₁ | 41 |
| 4.3.6 | Izolace alkaloidů z podfrakce F ₁ -1 | 42 |
| 4.4 | Určení struktury izolované látky | 44 |
| 4.4.1 | Měření hmotnostního spektra | 44 |
| 4.4.2 | Měření NMR spektra | 44 |
| 4.4.3 | Měření IR spektra izolované látky | 44 |
| 4.4.4 | Měření optické aktivity izolovaných látek | 44 |
| 4.5 | Stanovení biologických aktivit | 45 |
| 4.5.1 | Stanovení účinku alkaloidu na AChE a BuChE (IC ₅₀) | 45 |
| 4.6 | Stanovení antioxidační aktivity | 45 |
| 5 | Výsledky | 46 |
| 5.1 | Strukturní analýza izolované látky F ₁ -1A | 47 |
| 5.1.1 | Hmotnostní spektrum | 47 |
| 5.1.2 | NMR studie izolované látky F ₁ -A1 | 48 |
| 5.1.3 | Optická otáčivost | 51 |
| 5.1.4 | IČ spektrum izolované látky | 51 |
| 5.2 | Strukturní analýza izolované látky F ₁ -1C | 51 |
| 5.3 | Screening biologických vlastností izolované látky | 51 |
| 5.3.1 | Antioxidační aktivita alkaloidů | 51 |
| 5.3.2 | Inhibiční aktivita alkaloidu vůči AChE a BuChE | 51 |
| 6 | Diskuze | 52 |
| 7 | Literatura | 54 |
| 8 | Seznam zkratk | 60 |
| 9 | Příloha | 62 |

1 ÚVOD

V současné době mají přírodní léčiva nezastupitelné místo v medicíně. Moderní výzkum nových léčiv se po určité době opět vrací k rostlinnému materiálu, který je v dnešní době ekonomicky výhodnějším a mnohdy levnějším zdrojem biologicky aktivních látek. Velká pozornost je v současnosti věnována rostlinám tradiční čínské medicíny, která využívá asi 5000 léčivých rostlin u nás nepříliš známých nebo terapeuticky nevyužívaných^{1,2}. Do popředí se také dostávají rostliny dříve považované za okrasné.

Jednou ze skupin látek přírodního původu, které jsou již delší dobu sledovány jsou alkaloidy. Alkaloidy se vyskytují především ve vyšších rostlinách. Odhaduje se, že 10-20 % všech rostlin obsahují alkaloidy. Biogeneticky jsou tyto látky odvozené od aminokyselin. Podle původní aminokyseliny se dělí na základní strukturní typy (tropanové, isochinolinové, chinolinové atd.), které se dále dělí na podstrukturní typy³.

Jedna z nejvýznamnějších a nejrozšířenějších skupin alkaloidů je skupina isochinolinových alkaloidů. Tyto látky se vyznačují širokým spektrem výskytu, struktur a biologických účinků. Jsou soustředěny především do čeledí *Papaveraceae* (mákovité), *Berberidaceae* (dřišťálovité), *Ranunculaceae* (pryskyřníkovité), *Fumariaceae* (zemědýmovitě) a *Amarylidaceae* (amarylkovitě)⁴⁻⁶.

Těmto látkám je v současné době věnována velká pozornost pro jejich schopnost inhibovat cholinesterázy, které se podílejí na vzniku neurodegenerativních onemocnění. Mezi tyto nemoci patří především Alzheimerova choroba, která je zodpovědná za cca 50-60 % všech demencí. Tímto onemocněním trpí každý desátý člověk starší 65 let a až každý druhý starší 85 let. Tato choroba se v současné době nedá vyléčit, pouze je možné zmírnit a zpomalit její příznaky. Vzhledem k celosvětovému stárnutí populace se neurodegenerativní choroby a jejich terapie stávají velkým sociálním problémem a hledání nových potencionálních léčiv, jak přírodního tak i syntetického původu, se věnuje řada pracovních skupin po celém světě^{7,8}.

Jedním z rostlinných druhů obsahujících isochinolinové alkaloidy je rod *Corydalis*, který se v Asii, ale i v Evropě a Americe široce používá v lidovém léčitelství. Z tohoto rodu byla

doposud izolována celá řada isochinolinových alkaloidů, ale biologické aktivitě většiny z nich nebyla doposud věnována velká pozornost⁹.

2 CÍL PRÁCE

Cílem mé rigorózní práce bylo:

1. Provést preparativní tenkovrstvou chromatografií podfrakce F_1 , získané v rámci diplomové práce¹⁰.
2. Získání minimálně jedné látky v čistém stavu, určení jejích základních fyzikálně-chemických charakteristik za účelem stanovení jejich struktury.
3. Příprava vzorků na biologické testování.
4. Podílet se na stanovení biologických aktivit (inhibice AChE, BuChE, antioxidační aktivita) izolovaných látek.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Charakteristika demence

Demencemi nazýváme choroby, které postihují zejména paměť, intelekt a jiné kognitivní funkce. Mohou se projevit již v dětství, jejich výskyt však výrazně stoupá s věkem. Podle příčiny je lze rozdělit do tří skupin:

- 1) Atroficko-degenerativní demence – mezi něž patří Alzheimerova nemoc, korová nemoc s Lewyho tělísky, demence při Parkinsonově chorobě aj.
- 2) Ischemicko-vaskulární demence vznikající jako následek cévních postižení mozku. Do této skupiny patří například multiinfarktová demence, vaskulární demence s náhlým začátkem, nebo Binswangerova choroba.
- 3) Třetí skupinu představují další symptomatické demence, které jsou způsobeny postižením mozkové funkce v následku jiných chorob, zraněním mozku nebo intoxikacemi¹¹.

3.2 Charakteristika Alzheimerovy choroby

Alzheimerova choroba postihuje 50-60% pacientů postižených demencí. K hlavním příznakům onemocnění patří progredující porucha paměti a prostorové orientace, ztráta intelektuálních a sociálních dovedností s emocionální labilitou projevující se agitovaností, úzkostí, depresí nebo agresivitou, dále je narušen cyklus spánek - bdění. Dochází k celkové atrofii mozkové nervové tkáně.

K úbytku neuronů dochází zejména v oblasti hippocampu a předního mozku. Postižena je zejména cholinergní aktivita. Typicky je postižena presynaptická oblast. Dochází ke snížení aktivity enzymu syntetizujícího acetylcholin (cholinacetyltransferáza), je snížen vstup prekurzorů (cholin, acetyl-koenzym A) a zpětné vychytávání acetylcholinu (ACh) i jeho uvolnění z presynaptického zakončení. Z dalších systémů je postižen systém serotoninergní, je snížena hladina somatostatinu. S věkem klesá i syntéza dopaminu a stoupá jeho inaktivace

monoaminoxidázami (MAO). Zvláště stoupá aktivita MAO typu B, jak s věkem, tak výrazněji u Alzheimerovy choroby¹².

Předpokládá se, že dysfunkce a odumírání nervových buněk je způsobeno především narušením metabolické a iontové homeostázy a oxidačním poškozením¹³.

Podle věku, ve kterém dochází k rozvoji nemoci, rozlišujeme Alzheimerovu chorobu s časným začátkem (rychlá progresse choroby) a s pozdním začátkem (pomalejší progresse choroby).

Z hlediska dědičnosti se dělí na familiární formu, děděnou v rodině z generace na generaci (velmi vzácná, představuje 1-5% všech případů) a na sporadickou formu¹⁴.

Ve vývoji Alzheimerovy choroby lze rozlišit tři stádia:

1) mírná forma (často přehlédnutelné příznaky) – vyznačuje se především zhoršováním paměti časovou dezorientací, prostorovou dezorientací, ztrátou iniciativy, apod. Období prvotní fáze nemoci trvá obvykle 2-4 roky.

2) středně těžká forma – jsou patrné významné výpadky paměti (včetně jmen členů vlastní rodiny), snížená schopnost postarat se sám o sebe, nemocný se často ztratí nebo zabloudí i na známých místech, zhoršují se řečové schopnosti, halucinace. Druhé stádium nemoci obvykle trvá od 2-10 let. Velmi často již nemocní vyžadují trvalý dohled.

3) těžká forma (úplná závislost a rozklad celé osobnosti) – v této fázi choroby nastávají obtíže při příjmu potravy, nutnost pomoci druhé osoby, neschopnost poznat známé lidi, dokonce ani členy vlastní rodiny, obtíže s chůzí, někdy až upoutání na lůžko, inkontinence moči a/nebo stolice, výrazné poruchy chování. Tato fáze trvá 1-3 roky. Nemocní vyžadují trvalou péči. Projevuje se sklon k podvýživě, infekcím, zánětům plic a dalším infekcím, které jsou často příčinou smrti nemocného¹⁴.

Podrobnějším popisem jednotlivých stádií Alzheimerovy choroby a příčin tohoto onemocnění se zabývá diplomová práce Jakuba Doležala¹⁵.

3.2.1 Terapie Alzheimerovy choroby

Terapie Alzheimerovy choroby je komplexní, zahrnuje farmakoterapii, psychoterapii a socioterapii, léčbu interkurentních onemocnění, rehabilitaci a spolupráci s rodinou a pečovateli nemocného.

Jednou z nejvýznamnějších terapií této choroby je podávání inhibitorů acetylcholinesterázy (AChE). Zablokováním AChE se zvýší množství acetylcholinu schopného vazby na své receptory. Důležité je, aby tyto látky specificky blokovaly mozkovou AChE bez ovlivnění její periferní formy, to by totiž mohlo vést k řadě nežádoucích účinků, jako např. svalové křeče, nauzea, pocity slabosti, průjemy, pocení, tachyarytmie¹².

Na základě posledních studií bylo zjištěno, že AChE může být určitou měrou nahrazena BuChE při hydrolýze mozkového acetylcholinu¹⁶. U pacientů trpících Alzheimerovou chorobou byla v mozku zjištěna daleko vyšší koncentrace BuChE než-li u zdravých lidí. Z tohoto důvodu by bylo v terapii výhodné použití látek schopných inhibice obou enzymů, AChE i BuChE. Touto problematikou se na celém světě zabývá několik pracovních skupin^{7,8}.

3.3 Kritéria výběru rostliny pro fytochemický výzkum

Na základě screeningu biologických vlastností sumárních ethanolových extraktů alkaloidních rostlin provedených v roce 2007 na pracovišti KFBE doc. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. a literární rešerše, byla pro fytochemickou studii vybrána rostlina *Corydalis cava* (L.)¹⁷⁻¹⁹.

Corydalis cava (Dymnivka dutá) je vytrvalá bylina, patřící do čeledi *Fumariaceae* a je bohatým zdrojem isochinolinových alkaloidů. Tato rostlina je široce rozšířena a využívána především v Asii v lidovém léčitelství na zmírnění bolesti hlavy, kloubů, při gastrointestinálních obtížích²⁰ a při léčbě chorob CNS²¹. Do rodu *Corydalis* patří celá řada dymnivek, které jsou rozšířené po celém světě. Mnoho z nich bylo podrobena fytochemickému výzkumu a screeningu

biologických vlastností jejich sumárních extraktů izolovaných látek (*C. cava*, *speciosa*, *nobilis*, *solida*, *yanhusuo*, *sempervirens* atd.)²²⁻²⁵.

3.4 Dymnivka dutá, *Corydalis cava* (*Fumariaceae*)

3.4.1 Preferované jméno

Corydalis cava (L.) Schweigg. & Körte (1811)²⁶.

3.4.2 Synonyma

Fumaria cava (L.) Miller (1768), *Fumaria bulbosa* (L.), (1753) subsp. *cava* (L.) Ehrh.(1780), *Capnoides cava* (L.) Moench (1794), *Pistolochia cava* (L.) Bernh. (1800), *Capnites cava* (L.) Dumort. (1829), *Corydalis bulbosa* subsp. *cava* (L.) Bonnier & Layens (1894)²⁶.



Obr. 1: *Corydalis cava* (Gábor Kurucz ©)²⁷

3.4.3 Botanický popis

Vytrvalá bylina dorůstající výšky 10-30 cm. Z velké a duté podzemní hlízy vyrůstá lysá přímá lodyha, která není pokrytá šupinami. Ta u většiny druhů začátkem léta usychá a rostlina přečkává zbytek vegetačního období pod zemí. Silná lodyha nese pouze dva listy, které mají sivozelenou barvu. Vyrůstají na krátkých řapících, v obrysu mají tvar široce trojboký. Listy jsou 2× trojčetné. Lístky mají v obrysu tvar klínovitě obvejčitý, jsou nepravidelně laločnaté, někdy až dělené do zašpičatělých podlouhlých úkrojků. Oboupohlavní souměrné květy, které vyrůstají v úžlabí celokrajných a vejčitých listenů, se skládají do přímého a bohatého hroznu. Šupinkatý kalich je tvořen dvěma volnými lístky, je prchavý. Koruna je tvořena čtyřmi plátky. Vnější horní plátek se protahuje v ostruhu, ale vnější dolní plátek se na vzniku ostruhy nepodílí. Dva vnitřní plátky mají podlouhlý tvar, v přední části jsou černé. Barva koruny bývá růžová se šedým nádechem nebo žlutavě bílá. Ostruha je dlouhá, na konci dolů ohnutá. Celý květ i s ostruhou pak měří 18-28 mm. V květech se nacházejí pouze dvě tyčinky, svrchní semeník srůstá ze dvou plodolistů²⁸.

Plodem je podlouhlá jednopouzdrá tobolka o velikosti až 25 mm s dvěma chlopněmi. Semena jsou černá lesklá s velkým bělavým masitým přívěškem. Semena tohoto druhu jsou myrmekochorní²⁹. Rostlina kvete od března do května, je mrazuvzdorná²⁹ a má ostře hořkou chuť²⁸.

3.4.4 Ekologie

Dymnivku dutou najdeme v křovinách²⁸, ve světlých listnatých lesích a lužních hájích³⁰, někdy i na loukách. Roste na vlhčích, humózních, na minerály bohatších, kyprých půdách a to jak v nížinách, tak i v podhůří. Přednost dává teplejším stanovištím²⁸.



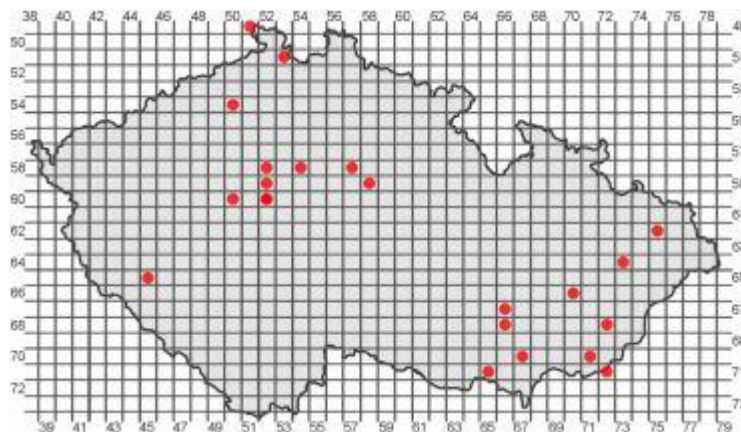
Obr. 2: Dymnivka dutá³¹

3.4.5 Celkové rozšíření

Rostlina je rozšířená od nížin do podhůří²⁸. Dymnivka pochází nejčastěji z mírného pásu severní polokoule, především ze severovýchodní Asie²⁹. Vyskytuje se také v Evropě, ale především v Evropě střední. Zavlečená byla do Švédska, Dánska a Anglie²⁸. Na východ a jihovýchod se vyskytuje po povodí Donu a pohoří Kavkaz²⁷. Některé druhy rostou také v oblasti Středozemního moře²⁹.

3.4.6 Rozšíření v ČR

Na území České republiky roste hojně²⁸. V termofytiku a teplejších částech mezofytika se nachází obecně. Nejčastěji roste v jižní polovině Čech, ale též v západních Čechách a na jihozápadní a severní Moravě. V oreofytiku roste jen vzácně a většinou jen v nižších polohách²⁷.



Obr. 3: Oblasti výskytu *Corydalis cava* v ČR³⁰

3.5 Obsahové látky *Corydalis cava* (L.) Schweigg. Et Köerte

Z fytochemického hlediska byla *Corydalis cava* intenzivně studována hlavně v minulém století. Z různých částí rostliny (hlízy, kořeny, nadzemní části) bylo izolováno velké množství terciárních a kvartérních isochinolinových alkaloidů patřících do několika strukturních typů^{32,33}.

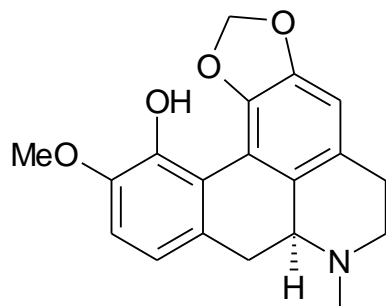
Pomocí moderních analytických metod (GC-MS, HPLC-MS, CE-MS)^{34,35} bylo v poslední době identifikováno mnoho minoritních alkaloidů, které nebyly doposud izolovány v čistém stavu. Velice intenzivně se studiu isochinolinových alkaloidů věnoval v 60. až 80.-tých letech minulého století český chemik J. Slavík, který izoloval a strukturně popsal řadu látek z rostlin řádu *Papaverales*³⁶⁻³⁸.

3.5.1 Isochinolinové alkaloidy z *Corydalis cava* (L.) Schweigg. Et Koerte

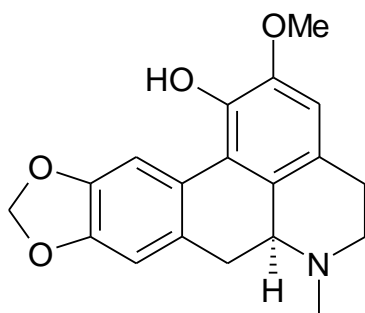
Doposud izolované alkaloidy z *Corydalis cava* lze rozdělit do několika strukturních typů. V následující přehledu jsou shrnuty nejvíce zastoupené alkaloidy, izolované z různých částí rostliny *Corydalis cava*.

1) aporfinové alkaloidy:

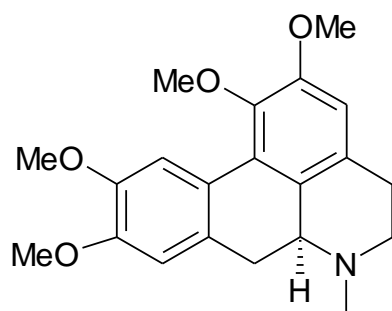
(+)-bulbokapnin – izolován z hlíz, kořenů i nadzemních částí rostliny^{38,39}



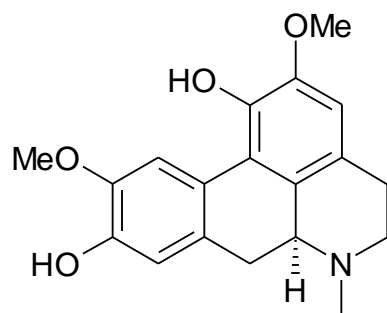
(+)-domesticin – izolován z nadzemní části rostliny³⁹



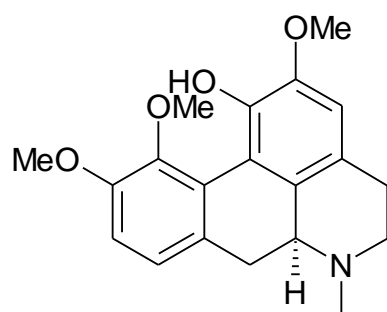
(+)-glaucin – izolován z nadzemní části rostliny^{38,39}



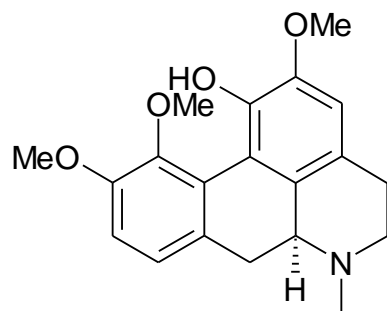
(+)-isoboldin – izolován z hlíz a nadzemních částí rostliny^{38,39}



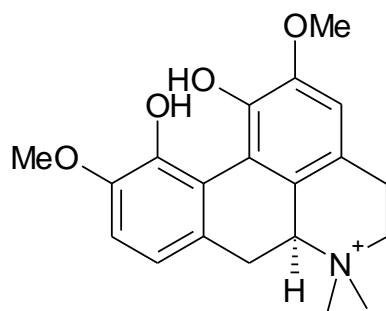
(+)-korydin - izolován z hlíz^{21,38}



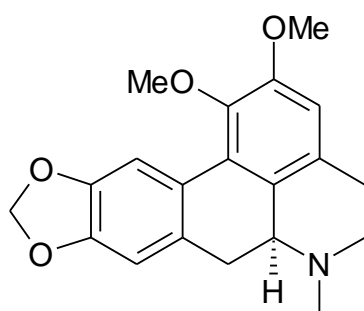
(+)-korytuberin - izolován z hlíz³⁸



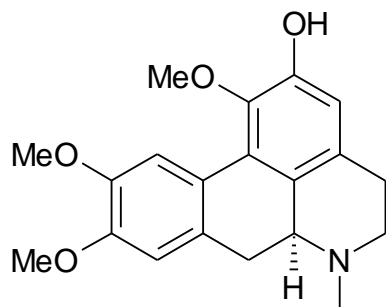
(+)-magnoflorin – izolován z hlíz³⁸



(+)- nantenin – izolován z hlíz a nadzemních částí rostliny⁴⁰

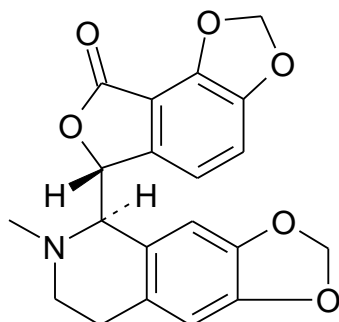


(+)-predicentrin – izolován z nadzemních částí rostliny^{38,39}



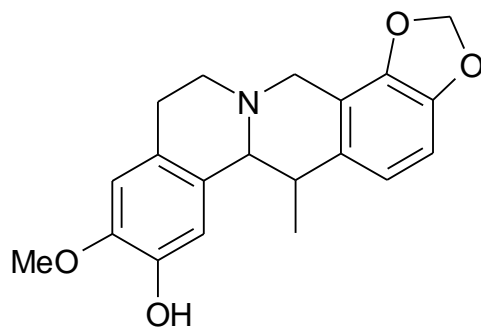
2) ftalylochinolinové alkaloidy:

(-) – kapnoidin – izolován z hlíz a nadzemních částí rostliny^{39,40}

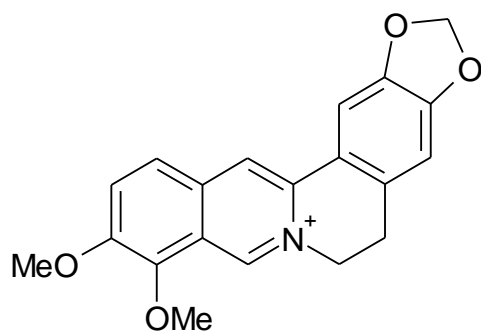


3) protoberberinové a berberinové alkaloidy:

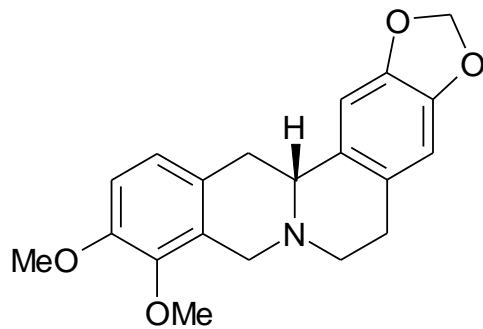
apokavidin – izolován z hlíz³⁸



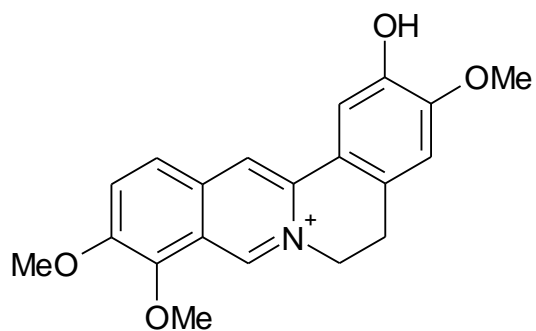
berberin – izolován z hlíz, kořenů i nadzemních částí rostliny³⁸



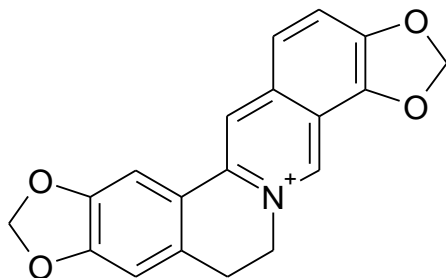
(+)-kanadin - izolován z hlíz³⁸



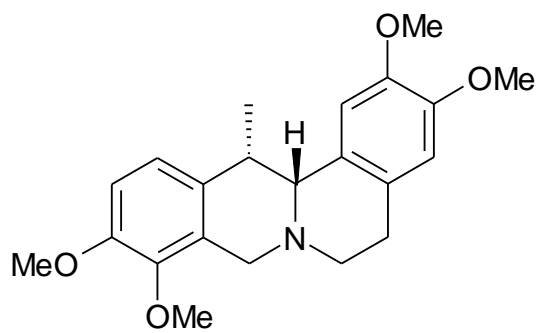
kolumbamin - izolován z hlíz³⁸



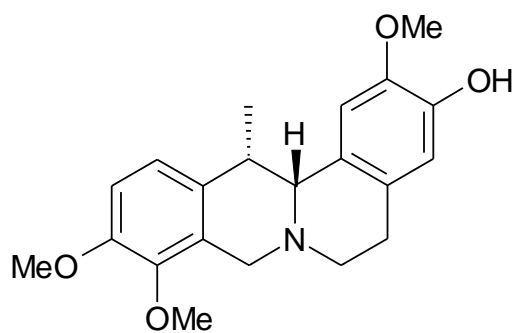
koptisin - - izolován z hlíz a nadzemních částí rostliny^{38,39}



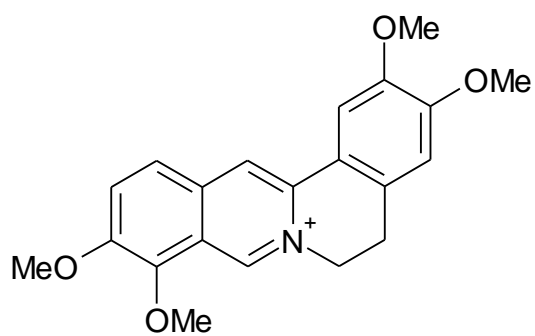
(+)-korydalin - izolován z hlíz³⁸



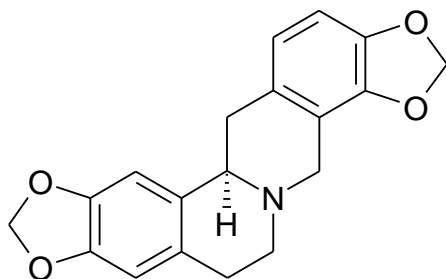
(+)-korybulbin - izolován z hlíz³⁸



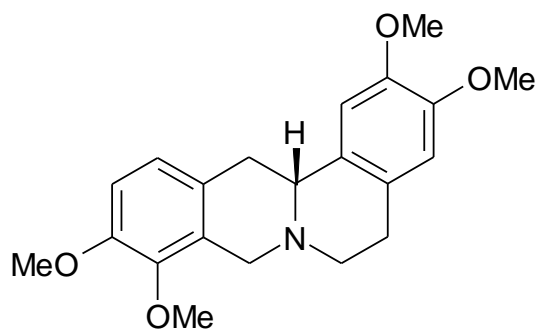
palmatin - izolován z hlíz³⁸



(+)-stylopin - izolován z hlíz a nadzemních částí rostliny^{38,39}

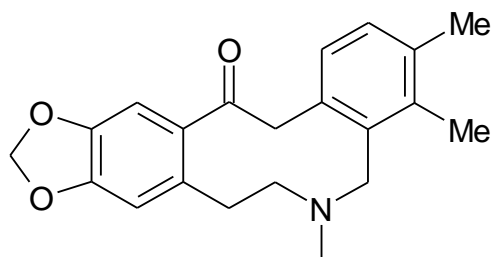


(+)-tetrahydropalmatin - izolován z hlíz³⁸

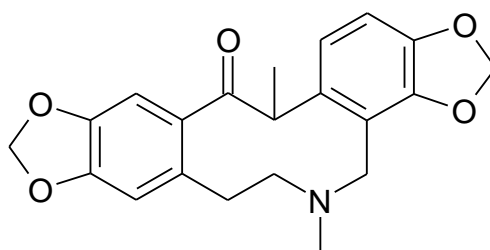


4) protopinové alkaloidy:

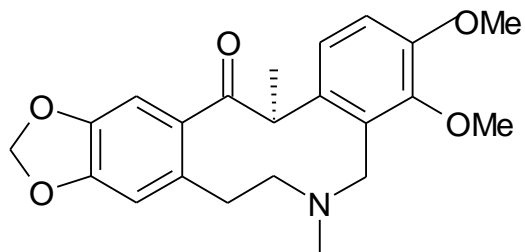
allokryptopin – izolován z hlíz i nadzemních částí rostlin³⁸



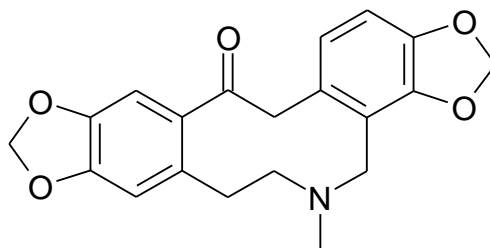
korykavin – izolován z hlíz³⁸



(+)-korykavidin – izolován z hlíz³⁸

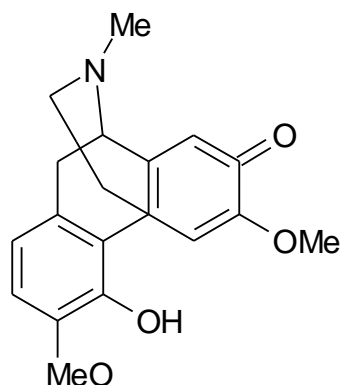


protopin – izolován z hlíz i nadzemních částí^{38,39}



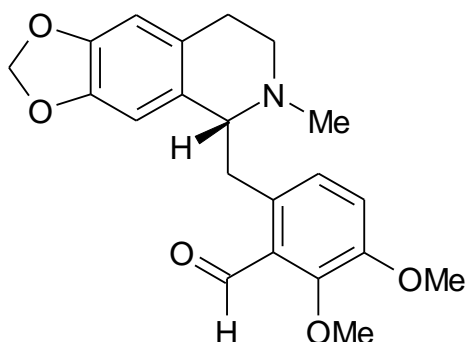
5) morfinanové alkaloidy:

sinoakutin⁴⁰



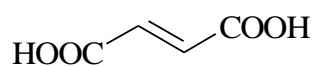
6) sekoberinové alkaloidy:

(-)-kanadalin – izolován z hlíz⁴¹



3.5.2 Ostatní sekundární metabolity izolované z *Corydalis cava* (L.) Schweigg. Et Köerte

Další látka izolovaná z *Corydalis cava* byla kyselina fumarová³⁹. Jiným sekundárním metabolitům přítomným v *Corydalis cava* nebyla doposud věnována významná pozornost.



Obr. 4: Kyselina fumarová

3.6 Biologická aktivita látek izolovaných z *Corydalis cava*

3.6.1 Inhibiční aktivita isochinolinových alkaloidů vůči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze

3.6.1.1 Acetylcholinesteráza a butyrylcholinesteráza a jejich inhibice

Acetylcholinesteráza je vysoce specifický a výkonný enzym vyskytující se především v cholinergních neuronech a v okolí cholinergních synapsí (ve vysokých koncentracích se nachází na nervosvalovém spojení). Hydrolyzuje zejména acetylcholin, uvolněný nervovou stimulací do synaptické štěrbině a uvnitř nervových zakončení zodpovídá za rozklad cytoplazmatického acetylcholinu na cholin a acetát. Jeho inhibicí, ať už reverzibilní nebo ireverzibilní, dochází k nahromadění ACh na muskarinových respektive nikotinových receptorech a tím k jejich hyperstimulaci¹⁵.

Je několik různých forem acetylcholinesteráz. V mozku zdravého člověka převládá tetramerní G4 forma a pouze minoritní je forma monomerní G1. U Alzheimerovy choroby vzrůstá podíl formy G1 a klesá podíl G4⁴².

Důležitou částí AChE, která napomáhá při štěpení ACh, je anionické centrum. ACh se váže k anionickému centru enzymu kvartérním dusíkem a poté je rozložen deprotonizovaným hydroxylem aminokyseliny serinu esteratického centra. Strukturně podobné látky obsahující kvartérní dusík, vykazují rovněž zvýšenou afinitu k AChE. Jejich navázáním k enzymu dochází k reverzibilní, nejčastěji kompetitivní inhibici enzymu⁴³.

Inhibitory AChE jsou v současnosti užívány jako pesticidy (parathion, malathion), léčiva Alzheimerovy choroby (takrin, donepezil, rivastigmin, galantamin), k léčbě myastenia gravis (neostigmin, pyridostigmin), k premedikaci před otravou nervově paralytickými látkami (SAD-128) či v oftalmologii⁴⁴.

Butyrylcholinesteráza (též pseudocholinesteráza, BuChE) je substrátově méně specifický enzym, který přednostně rozkládá jiné substráty než acetylcholin (např. butyrylcholin, prokain,

suxamethonium apod.). Je přítomna např. v plazmě, játrech a pouze v omezeném rozsahu v neuronech periferního a centrálního nervového systému⁴².

Za posledních několik let znalosti o struktuře, vlastnostech či mechanismu inhibice a reaktivace AChE a BuChE, značně pokročily. Rychlý vývoj výkonných počítačů a nových metod teoretické chemie, umožnil studovat chování látek bez toho, aby se uskutečnil jediný experiment⁴⁵.

V současnosti je dostupné velké množství softwarových systémů, s jejichž pomocí je možné objasnit jednotlivé detaily chemických reakcí, vypočítat vlastnosti látek či studovat interakci potencionálních léčiv s receptory nebo jinými makromolekulami⁴⁴.

3.6.1.2 Inhibice AChE a BuChE alkaloidy z *Corydalis cava* a dalších rostlin rodu *Corydalis*

Ve studii publikované v roce 2007 byla stanovována *in vitro* inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE tří látek izolovaných z *Corydalis cava* (bulbokapnin, korydin, korydalin). Acetylcholinesteráza, která byla použita pro stanovení inhibice byla původem z elektrického úhoře (typ VI-S) a zdrojem butyrylcholinesterázy bylo koňské sérum²¹. Výsledky této studie jsou shrnuty společně s hodnotami standartu (galantamin) v následující tabulce (Tab. I).

Tab. I: *In vitro* aktivita alkaloidů z *Corydalis cava* vůči AChE a BuChE

| Alkaloid | IC ₅₀ (10 ⁻⁶ M) | |
|-----------------------|---------------------------------------|-----------|
| | AChE | BuChE |
| Bulbokapnin | 40 ± 2 | 83 ± 3 |
| Korydalin | 15 ± 3 | >100 |
| Korydin | >100 | 52 ± 4 |
| Galantamin (standart) | 1,4 ± 0,2 | 4,0 ± 1,4 |

Nejvýznamnější inhibiční aktivitu vůči acetylcholinesteráze ze tří testovaných látek vykazoval korydalin a vůči butyrylcholinesteráze korydin. Bulbokapnin byl ale schopen inhibovat obě cholinesterazy v μM množství..

Inhibiční aktivita byla studována také u dalších alkaloidů identifikovaných v *Corydalis cava*. Pro příslušné testy byly látky izolovány z jiného druhu *Corydalis*. Zdroje acetylcholinesterázy či butyrylcholinesterázy byly často odlišné v různých studiích. Z tohoto důvodu je nevhodné vzájemně porovnávat zjištěné hodnoty IC_{50} izolovaných látek. Získané hodnoty lze považovat pouze za předběžné a v dalších testech je nutné pracovat pouze na jednom biologickém modelu, z důvodu vzájemného porovnání a vytipování potenciálně aktivních látek.

Protopin, palmatin, berberin a korynoxidin byly v roce 2004 izolovány z *Corydalis speciosa* a podrobeny studii jejich inhibiční activity vůči acetylcholinesteráze⁴⁶. Acetylcholinesteráza pro studii byla získána z myších samců. Jako standart byl použit takrin. Získané hodnoty IC_{50} testovaných látek jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. II)

Tab. II: *In vitro* aktivita alkaloidů z *Corydalis speciosa* vůči AChE

| Alkaloid | IC_{50} (μM) AChE |
|-------------------|---|
| Protopin | 16,1 |
| Korynoxidin | 89,0 |
| Palmatin | 5,8 |
| Berberin | 3,3 |
| Takrin (standart) | 0,2 |

Z tabulky plyne, že nejvyšší inhibiční aktivitu na acetylcholinesterázu z testovaných látek vykázal kvartérní alkaloid berberin, nedosáhl ale aktivity standartu.

Ve studii publikované v roce 2002 byl z *Corydalis incisa* izolován protoberberinový alkaloid korynolin, pro který byla stanovena hodnota IC_{50} pro acetylcholinesterázu $30,6 \mu\text{M}$ ⁴⁷.

V roce 2008 byla provedena rozsáhlá studie obsahových látek z *Corydalis tutschaninovi* a jejich inhibiční aktivity na acetylcholinesterázu. Acetylcholinesteráza pro studii zde byla získána z mozkové kůry myši. Jako standart byl použit takrin. Získané hodnoty IC₅₀ testovaných látek jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. III)

Tab. III: *In vitro* aktivita alkaloidů z *Corydalis tutschaninovi* vůči AChE

| Alkaloid | IC₅₀ (μM) |
|------------------------|-----------------------------|
| Korydalin | 30,7 ± 1,5 |
| Xylopin | 38,1 ± 1,8 |
| Stylopin | 15,8 ± 1,2 |
| Protopin | 14,5 ± 0,5 |
| Oxypseudopalmatin | >50 |
| Tetrahydropalmatin | 41,3 ± 2,2 |
| Epiberberin | 6,5 ± 0,5 |
| Palmatin | 10,4 ± 0,4 |
| Oxoglaucidalin | 27,1 ± 1,8 |
| Korytenchin | >50 |
| Oxoglaucin | 48,7 ± 1,8 |
| Glaucin | >50 |
| Pseudodehydrokorydalin | 8,4 ± 0,5 |
| Berberin | 4,7 ± 0,2 |
| Pseudokoptisin | 4,3 ± 0,3 |
| Pseudoberberin | 4,5 ± 0,2 |
| Takrin (standart) | 0,17 ± 0,02 |

Z tabulky plyne, že nejvyšší inhibiční aktivitu na acetylcholinesterázu z testovaných látek vykázal epiberberin, berberin, pseudokoptisin a pseudoberberin. Žádný z uvedených alkaloidů však nedosáhl inhibiční aktivity standartu. Aporfinový alkaloid oxoglaucidalin a pseudodehydrokorydalin, alkaloid protoberberinového typu, byli v této studii izolováni a popsáni poprvé⁴⁸.

3.6.2 Další biologické aktivity alkaloidů z *Corydalis cava*

Protoberberinové alkaloidy hlíz *Corydalis cava* byly podrobeny studii jejich vlivu na GABA_A receptor. Zatímco terciární protoberberinové alkaloidy isoapokavidin, korydalin, tetrahydropalmatin, skoulerin a isokorypalmin zvyšovaly specifickou afinitu [³H]bikukulin methylchloridu (BMC - GABA_A antagonista) ke GABA_A receptoru v rozsahu 21-49 %, tak kvarterní protoberberinové alkaloidy zahrnující mimo jiné palmatin, koptisin, dehydroapokavidin a dehydrokorydalin žádný účinek na změnu afinity BMC ke GABA_A receptoru neměly⁴⁹.

V odborných publikacích můžeme nalézt také studie, které se zabývají vlivem různých obsahových poměrů extraktů *Corydalis cava* a *Eschscholtzia californica* na CNS. První z nich zkoumala vliv na endorfiny a enkefaliny. Endorfiny a enkefaliny jsou látky peptidové povahy, které jsou všeobecně známé jako endogenní peptidy. Tyto látky jsou u lidí považovány za hlavní fyziologické modulátory bolesti. Tyto endogenní látky se vážou na opiátové receptory a tlumí tím vnímání bolesti. Zajímavé je, že právě výtažky z *Corydalis cava* a *Eschscholtzia californica* prokazatelně zpomalují procesy degradace těchto endogenních peptidů. V rámci této studie bylo zjištěno, že extrakt z *Corydalis cava* má větší vliv na inhibici degradace endogenních peptidů nežli extrakt *Eschscholtzia californica*²⁰.

Kromě inhibičního efektu na degradaci endogenních peptidů, byl u výše zmíněných rostlin prokázán i aditivní účinek obou bylin na udržení zvýšené hladiny katecholaminů v mozku. Studie uvádí, že extrakt *Corydalis cava* spolu s extraktem z *Eschscholtzia californica*, inhibují oxidativní degradaci katecholaminů. Extrakt z *Corydalis cava* měl desetkrát větší aktivitu nežli extrakt *Eschscholtzia californica*. Extrakt z *Eschscholtzia californica* rovněž inhiboval monoaminoxidasu (MAO-B). Výsledky této studie mohou být interpretovány jako společná součinnost dvou rostlinných preparátů pro udržení a ochránění vysoké hladiny katecholaminů, což vysvětluje jejich sedativní, antidepressivní a hypnotickou aktivitu⁵⁰.

Další vědecká studie byla zaměřena na zjištění biologické aktivity protopinu, respektive mechanismu jeho antiagregačního působení. Bylo zjištěno, že protopin inhibuje agregaci

krevních destiček, která je fyziologicky vyvolávána působením adenosindifosfátu (ADP), arachidonové kyseliny, destičky aktivujícího faktoru (PAF) a kolagenu. Ačkoli je proces agregace krevních destiček ovlivňován hlavně trombinem, který protopinem inhibován nebyl, tak proces agregace byl zčásti potlačen. Bylo to způsobeno inhibiční aktivitou protopinu na účinky tromboxanu B₂. Protopin inhiboval taktéž intracelulární uvolňování vápníku způsobeného arachidonovou kyselinou. Studií bylo tedy zjištěno, že antiagregační efekt protopinu je tedy způsobený inhibicí tromboxanu B₂ a také následným snížením intracelulární koncentrace vápníku⁵¹.

3.7 Fytochemické a biologické studie dalších druhů rodu *Corydalis*

V literatuře je z fytochemického i biologického hlediska popsána celá řada dalších druhů z rodu *Corydalis*. V následující je shrnut přehled isochinolinových alkaloidů izolovaných z *Corydalis nobilis* a *intermedia*. Kompletní přehled izolovaných látek a jejich biologických vlastností z různých druhů *Corydalis* by byl velmi rozsáhlý a lze ho nalézt v diplomové práci Kateřiny Salačové (2008)⁵².

Corydalis nobilis

Z oddenků *Corydalis nobilis* byly jako hlavní látky izolovány terciární alkaloidy (+)-tetrahydropalmin, (+)-bicuculin a (+)-korytuberin. Méně zastoupeny byly protopin, (+)-korypalmin a (+)-stylopin. Jako minoritní alkaloidy obsahuje *Corydalis nobilis* (±)-tetrahydropalmin, (+)-korydalin, allokryptopin, kryptopin, (-)-skulerin, (+)-adlumidin, (+)-sinaktin, korlumin, isoboldin, (+)-korybulbin, (±)-stylopin a (-)-isokorypalmin.

Z kvarterních alkaloidů oddenky obsahovaly koptisin, dehydrocorydalin, palmin, korysamin, jatrorhizin a cis-N-methylstylopinium hydroxid⁵³.



Obr. 5: *Corydalis nobilis* (Magnar Aspaker ©)⁵⁴

Corydalis intermedia

Hlízy *Corydalis intermedia* obsahují jako hlavní alkaloidy protopin, tetrahydropalmatin a korydalin. Minoritními alkaloidy jsou v *Corydalis intermedia* allokryptopin, kanadin, (\pm)-stylopin, palmatin, dehydrokorydalin, berberin a koptisin. Hlavními alkaloidy nadzemích částí jsou bulbokapnin, (+)-bikukulin, protopin a (\pm)-stylopin. Isoboldin, (-)-skulerin, allokryptopin, korydalin, kanadin, koptisin, palmatin a berberin se v této rostlině nachází jako alkaloidy minoritní⁵³.



Obr. 6: *Corydalis intermedia* (botanika.wendys.cz ©)⁵⁵

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Destilace a odpařování

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

Odpařování chromatografických frakcí bylo prováděno na vakuové odparce při 40 °C za sníženého tlaku.

4.1.2 Chromatografie

4.1.2.1. Tenkovrstvá chromatografie

Chromatografie na tenké vrstvě byla použita v systému normálních komor. Komory byly nasycené mobilní fází (20 minut). V případě použití malých komor (válcových), průměr 10 cm, sycení trvalo asi 30 minut. U klasických komor pak asi hodinu. Chromatografie byla prováděna vzestupně.

4.1.2.2. Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie byla prováděna systémem gradientové eluce na silikagelu L, 0,1-0,2 mm, deaktivovaném 10 % vody. Sloupec byl plněn obvyklým způsobem – nalitím suspenze adsorbentu v rozpouštědle do sloupce. Vzorek byl po vysušení v exsikátoru nanesen na roztěru s malým množstvím silikagelu.

4.2 Materiál a vybavení

4.2.1 Rozpouštědla a chemikálie

Rozpouštědla:

Benzen, p. a.

Cyklohexan, p.a.

Diethylamin, p. a.

Diethylether, p.a. bez stabilizátoru

Ethanol 95%, denaturovaný methanolem

n-Hexan, p. a.

Chloroform, p. a.

Toluen, p. a.

Chemikálie:

Dusičnan bismutitý zásaditý, p. a.

Hydroxid sodný, p. a.

Kyselina sírová 96%, p. a.

Kyselina vinná, p. a.

Vodný roztok chlorovodíku 36%, p. a.

4.2.2 Chemikálie a materiál ke stanovení účinku AChE a BuChE (IC₅₀)

Chemikálie:

10×10^{-3} M acetylcholin jodid

10×10^{-3} M butyrylcholin jodid

5×10^{-3} M 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina

DMSO použitý pro ředění vzorků

0,1 M fosfátový pufr pH 7,4

fysostigmin (eserin)

galantamin

Materiál:

Hemolyzát lidských erytrocytů, který sloužil jako zdroj acetylcholinesterázy:

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

Jako zdroj butyrylcholinesterázy posloužila lidská plazma

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

4.2.3 Chemikálie ke stanovení antioxidační aktivity

Chemikálie:

2,2'-diphenyl-1-pikrylhydrazyl radikál (DPPH)

4.2.4 Přístroje použité při stanovení biologických účinků izolovaných látek

Centrifuga typ MPW-340 (Mechanika precyzyjna, Polsko)

pH metr Φ 72 METER (Beckmann, USA)

Spektrofotometr UV-1601 CE SHIMADZU

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

USB2000-UV/VIS spektrofotometr se zdrojem světla LS-1 (Ocean Optics, USA)

SMA-Z průtoková cela (1-cm délka)

4.2.5 Detekční činidla

D 1: Dragendorffovo činidlo modifikované podle Muniera⁵⁶

- pro alkaloidy a ostatní sloučeniny obsahující dusík.

- *roztok A*: byl připraven rozpuštěním 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody.

- *roztok B*: byl připraven rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody.

- *zásobní roztok*: byl připraven smísením roztoků A a B v poměru 1:1. Ten může být uložený i několik měsíců v lednici.

- *činidlo pro analýzu*: bylo připravené tak, že se k roztoku 5 ml kyseliny vinné rozpuštěné v 50 ml vody přidalo 5 ml zásobního roztoku.

4.2.6 Chromatografické desky a adsorbenty

A 1: Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, 5×10 cm

Hliníková deska s vrstvou silikagelu pro tenkovrstvou chromatografii. Silikagel 60 F₂₅₄, tloušťka vrstvy 0,2 mm.

A 2: Silufol UV 254, Kavalier Votice, 20×10 cm, hliníková deska s vrstvou SiO₂ 0,1 mm pro tenkovrstvou chromatografii.

A 3: Silikagel L, komerční adsorbent LACHEMA Brno pro chromatografii, zrnitost 0,2-0,4 mm

A 4: Oxid hlinitý neutrální, komerční adsorbent pro chromatografii ACRÓS, zrnitost 0,05-0,2 mm

4.2.7 Vytvájecí soustavy pro analytickou tenkovrstvou chromatografii

S 1: Toluen+CHCl₃+EtOH+Et₂NH 70:20:10:3

S 2: Toluen+Et₂NH 9:1

S 3: Benzen+Et₂NH 9:1

4.2.8 Vytvíjecí soustavy pro preparativní tenkovrstvou chromatografii

S 4: Toluén+n-Hexan+Et₂NH 45:45:10

S 5: Cyklohexan+Et₂NH 9:1

4.3 Zpracování chloroformového výtřepku B z *Corydalis cava*

4.3.1 Původ drogy

Dodavatelem drogy byla firma Megafyt s. r. o., Vrané nad Vltavou, 04/2006, droga (hlízy) pochází ze sběru v Chorvatsku, dodáno firmou Jugodrho.

4.3.2 Příprava a čištění výtřepku *Corydalis cava*/B/CHCl₃

Zpracovávaný extrakt „B-chloroform“ byl získán mimo rámec mé rigorózní práce a byl připraven doc. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. v roce 2007.

Příprava extraktu:

Extrakt byl připraven z 11,3 kg suchých hlíz, které byly nejprve extrahovány 95% etanolem, po běžném čištění byly nejprve odstraněny terciární baze při pH 9-10 (extrakt A-diethylether), dále terciární baze při pH 12 (extrakt B-diethylether). Inkriminovaný výtřepok „B-chloroform“ byl připraven vytřepáním zbylého vodného extraktu; přešly do něho alkaloidy málo rozpustné v diethyletheru (80 g tmavě hnědého, velmi viskózního odparku).

Čištění výtřepku B-chloroform:

80 g odparku bylo rozpuštěno v 800 ml 1% kyseliny sírové, vyloučily se pryskyřičnaté podíly, roztok byl zfiltrován, zalkalizován na pH 12 20% NaOH a vytřepán 11×250 ml chloroformu,

organické výtřepky byly spojeny, vysušeny bezvodým síranem sodným a roztok odpařen. Vzniklo 68,6 g hnědého, velmi viskózního odparku.



Obr. 7: Detekce výtřepků z *Corydalis cava* rhizoma

(Kieselgel UV 254 Merck, 10 cm (dráha 8,5 cm), To+Chf+EtOH+Et₂NH - 70:20:10:3, komora nasycená, vyvíjení 1×, detekce D 1)

- L - výtřepok éterem z kyselého roztoku alkaloidů - primárního extraktu
- A - vyčištěný éterový výtřepok (alkalizace 25% amoniakem, pH ~9),
- B-Et₂O - surový výtřepok éterem (alkalizace 50% louhem, pH ~12)
- B-Chf - surový výtřepok chloroformem (po vytřepání éterem, pH ~12)
- J - kvartérní jodidy po vytřepání silných bazí (okyselení HCl, pH ~3)

4.3.3 Sloupcová chromatografie výtřepku *Corydalis cava*/B/CHCl₃

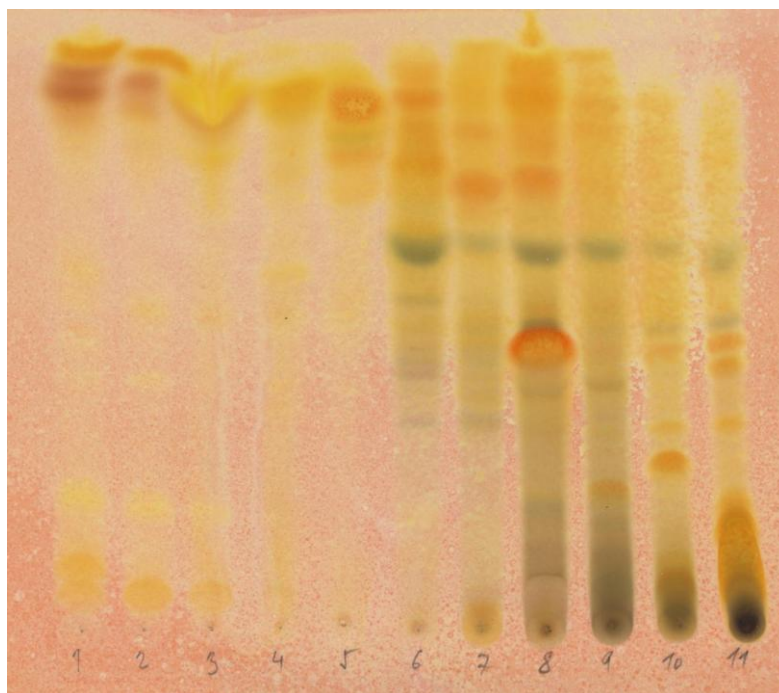
68,6 g výtřepku „B-chloroform“ (viz obr. 5, sloupec 4) bylo rozpuštěno v chloroformu a chromatografováno na sloupci silikagelu za účelem získání čistých alkaloidů. (Bližší popis viz tab. 3 a 4)

Tab. IV: Sloupcová chromatografie výtřepku *Corydalis cava*/B/CHCl₃

| | |
|-----------------------------------|---|
| Označení vzorku | B-Chf, „předčištěný.“ |
| Hmotnost vzorku | 68,0 g, temně hnědý, velmi viskózní |
| Druh a množství adsorbentu | Silikagel L, 0,2-0,4 mm, 1880 g, deaktivovaný 10 % vody |
| Vrstva s extraktem | 7,4×10 cm |
| Dělicí vrstva | 7,4×92 cm |
| Frakce (ml)/doba toku | 500 ml/35-40 minut |

Tab. V: Výsledky sloupcové chromatografie výtřepku *Corydalis cava*/B/CHCl₃

| Spoj. fr. | Frakce | Eluční systém | Označení na TLC | Popis | Hmotn. (g) |
|-----------|--------|-----------------|-----------------|--|------------|
| 1-2 | 1-2 | Chf | 1 | Hnědý, s náznakem krystalů | 0,15 |
| 3-5 | 3-5 | Chf | 2 | Zelenobělavý, práškovitý (drobně kryst.) | 1,88 |
| 6-8 | 6-8 | Chf | 3 | Zelený, velmi viskózní | 0,32 |
| 9-15 | 9-12 | Chf | 4 | Hnědý, krystalický | 0,87 |
| | 13-15 | Chf + 2 % EtOH | | | |
| 16-25 | 16-24 | Chf + 2 % EtOH | 5 | Hnědý, velmi viskózní | 1,98 |
| | 25 | Chf + 5 % EtOH | | | |
| 26-29 | 26-29 | Chf + 5 % EtOH | 6 | Černý, velmi viskózní | 6,74 |
| 30-33 | 30-33 | Chf + 5 % EtOH | 7 | Černý, velmi viskózní | 0,98 |
| 34-53 | 34-37 | Chf + 5 % EtOH | 8 | Černý, velmi viskózní | 9,18 |
| | 38-51 | Chf + 10 % EtOH | | | |
| | 52-53 | Chf + 25 % EtOH | | | |
| 54-58 | 54-58 | Chf + 25 % EtOH | 9 | Černý, velmi viskózní | 0,52 |
| 59-64 | 59-64 | Chf + 25 % EtOH | 10 | Černý, velmi viskózní | 4,4 |
| 65-80 | 66-67 | Chf + 25 % EtOH | 11 | Černý, velmi viskózní | 9,02 |
| | 68-80 | Chf + 50 % EtOH | | | |



Obr. 8: TLC jednotlivých frakcí z *Corydalis cava/B/CHCl₃* (popis viz tab. 4)
(Pozn. Kieselgel UV 254 Merck, 10 cm (dráha 8,5 cm), Toluén+CHCl₃+EtOH+Et₂NH-70:20:10:3, komora nasycená, vyvíjení 2×, detekce D1)

4.3.4 Zpracování spojených frakcí 7 a 8

Spojené frakce 7 a 8 (viz tab. 4 a obr. 6) byly chromatografovány na sloupci s adsorbentem A 2.

Tab. VI: Sloupcová chromatografie odparku *Corydalis cava/B/7+8*

| | |
|-----------------------------------|---|
| Označení vzorku | <i>Corydalis cava/B/7+8</i> |
| Hmotnost vzorku | 10,16 g, temně černý, velmi viskózní |
| Druh a množství adsorbentu | Oxid hlinitý neutrální 0,1-0,2 mm, deaktivovaný 5 % vody, 281 g |
| Vrstva s extraktem | 6,2×3,2 cm |
| Dělicí vrstva | 54,5×3,2 cm |
| Frakce (ml)/doba toku | 100 ml/20 minut |

Tab. VII: Výsledky sloupcové chromatografie výtřepku *Corydalis cava*/B/7+8

| Spoj. fr. | Frakce | Eluční systém | Označení na TLC | Popis | Hmotn. (g) |
|-----------|--------|---------------|-----------------|-----------------------|------------|
| 1-12 | 1-8 | Benzin+70%Chf | F ₁ | Téměř černý, nafouklý | 4,7 |
| | 9-12 | Benzin+90%Chf | | | |
| 13-23 | 13 | Benzin+90%Chf | F ₂ | Černý, práškový | 0,65 |
| | 14-23 | Chf | | | |



Obr. 9: Kontrolní vyvíjení F₁ a F₂ (F₁- levá skvrna, F₂- pravá skvrna)
(Kieselgel UV₂₅₄ Merck, 10 cm (dráha 8,5 cm), Toluén+Et₂NH-9:1, komora nasycená, vyvíjení 2×)

4.3.5 Čištění a separace minoritních alkaloidů z F₁

Na sloupec o průměru 11 cm byl nanesen roztěr frakce F₁ s 25 g Silpearlu. Sloupec byl promývan mobilní fází S 4 a posléze čistým chloroformem. Frakce F₁ byla rozdělena na jednotlivé 3 podfrakce (viz. obrázek).

Tab VIII: Výsledky sloupcové chromatografie frakce F₁

| Hmotn. Vzorku (g) | Hmotn. Adsorbentu (g) | Složení eluentu | Odparek | Označení |
|-------------------|-----------------------|---|------------------------------------|------------------------|
| 4.7 | 315 | Toluén+N-hexan+Et ₂ NH = 45:45:10 (2000ml) CHCl ₃ (2000ml) | 1,765g (červeno-žlutý, olejovitý) | F₁-1 |
| | | | 068g (hnědý, velmi viskózní) | F₁-2 |
| | | | 2,58g (hnědožlutý, velmi viskózní) | F₁-3 |



Obr. 10: Odparek F₁- 1,2,3 a původní vzorek F₁, soustava Benzen+Et₂NH=9:1(Kieselgel UV 254 Merck, 10 cm (dráha 8,5 cm), detekce Dragendorffovým činidlem podle Muniera).

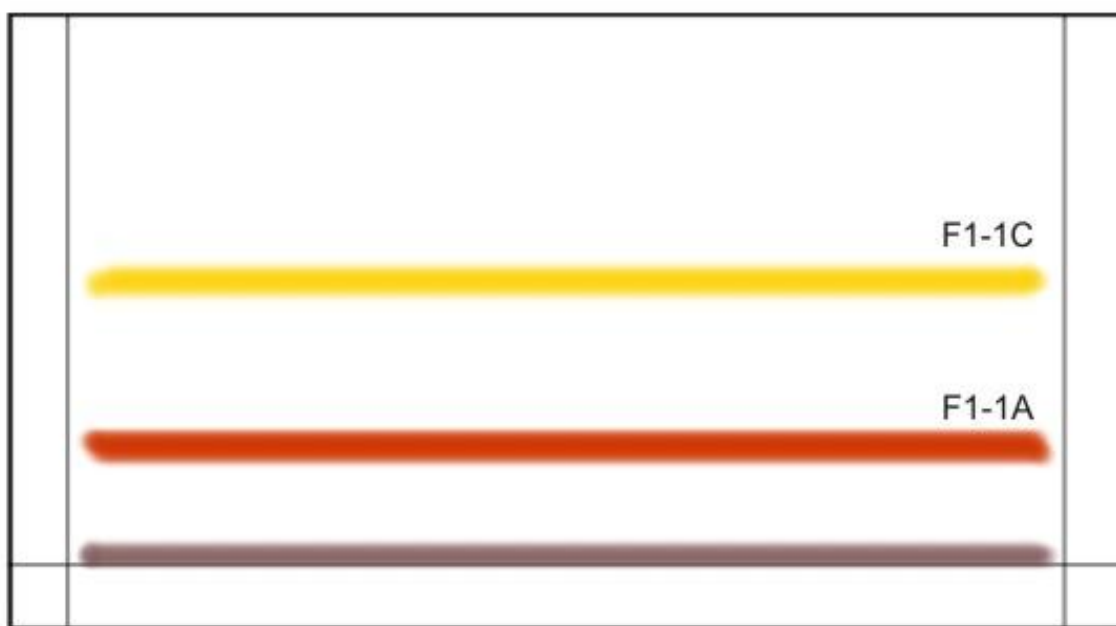
4.3.6 Izolace alkaloidů z podfrakce F₁-1

Podfrakce F₁-1 byla rozpuštěna v chloroformu a po 20 mg nanesena na chromatografické desky Silufol 20x10 cm, tloušťka vrstvy 0,1 mm. Desky byly vyvíjeny v mobilní fázi S 5. Každá deska byla vyvinuta čtyřikrát. Pod UV lampou byly detekovány 3 zóny obsahující alkaloidy. Zóny byly označeny a izolovány společně s adsorbentem z chromatografických desek. Izolované látky byly vymyty z adsorbentu chloroformem a odpařeny. Byly získány tři odparky označené jako F₁-1A (100 mg), F₁-1B (45 mg) a F₁-1C (50 mg). Na základě MS studie bylo zjištěno, že odparky F₁-1B a F₁-1C jsou totožné. Na základě toho byly spojeny a označeny jako F₁-1C (95 mg).

Odpark F₁-1A byl opětovně rozpuštěn a nanesen na chromatografické desky Merck 10x20 cm po 20 mg. Desky byly opět vyvíjeny v mobilní fázi S 5. Každá deska byla vyvinuta pětkrát. Pod UV lampou byla detekována silně fluoreskující zóna, která byla izolována z desek. Po vymytí a odpaření rozpouštědla bylo získáno 50 mg odparku F₁-1A ve formě světle žluté pěny.

Odparek F₁-1C byl rozpuštěn a přefiltrován přes vrstvu Al₂O₃ (5 cm). Vrstva Al₂O₃ byla promyta 50 ml chloroformu a rozpouštědlo bylo odpařeno. Bylo získáno 40 mg odparku ve formě lehce nažloutlé pěny.

Izolované látky byly podrobeny spektroskopickým studiím (IR, MS, NMR) za účelem stanovení jejich struktury. Poté byl proveden screening biologických vlastností. Vzhledem k izolaci doposud nepopsaných struktur byla u izolované látky stanovena specifická optická otáčivost $[\alpha]_D^{20}$.



Obr. 11: Preparativní TLC podfrakce F₁-1, cyklohexan+Et₂NH 9:1, (Kieselgel UV 254 Merck, 10 cm (dráha 8,5 cm), detekce Dragendorffovým činidlem podle Muniera, vyvíjeno 4x).

4.4 Určení struktury izolované látky

4.4.1 Měření hmotnostního spektra

Spektra byla měřena na LC/MS Thermo Finnigan LCQDuo iontová past, ionizace elektrosprejem v kladném módu (ESI+). MS/MS spektra byla měřena při kolizní energii 40 eV.

4.4.2 Měření NMR spektra

NMR spektra byla měřena v roztocích CDCl₃, (CD₃)₂CO nebo CD₃OD při laboratorní teplotě na přístroji VARIAN MERCURY – Vx BB 300 pracujícím při 300 MHz pro ¹H a při 75 MHz pro ¹³C. Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty δ v parts per milion (ppm) a byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita (v protonových spektrech), multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, qd: kvartet dubletů, dd: dublet dubletů, ddd: dublet dubletu dubletů, m: multiplet, bs: široký singlet, bd: široký dublet, bt: široký triplet), interakční konstanty (Hz) a přiřazení (v některých případech).

4.4.3 Měření IR spektra izolované látky

Měření IČ spektra látky bylo provedeno na přístroji NICOLET IMPACT 400 v tabletě KBr (2 mg).

4.4.4 Měření optické aktivity izolovaných látek

Optická otáčivost byla měřena na přístroji ADP-220, BS-Berllingham Stauley Ltd. při vlnové délce D-linie sodíkového světla ($\lambda = 589,3$ nm) při ($20 \pm 0,5$ °C).

4.5 Stanovení biologických aktivit

4.5.1 Stanovení účinku alkaloidu na AChE a BuChE (IC₅₀)

Pro stanovení inhibiční aktivity látek byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Jako substráty se používají estery thiocholinu, které jsou cholinesterasami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB. Výsledkem je žlutě zbarvený produkt, který se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm. Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC₅₀ byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterázy nebo butyrylcholinesterázy nelineární regresí v programu GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly porovnány s hodnotami IC₅₀ známých inhibitorů cholinesteráz: galantaminem (IC₅₀ AChE = 6,898 μM, BuChE = 156 μM), eserinem (IC₅₀ AChE = 2,168 μM, BuChE = 1,616 μM) a huperzinem A (IC₅₀ AChE = 0,252 μM, BuChE >1000 μM).

4.6 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita byla testována *in vitro* DPPH testem. Metoda je založena na reakci stabilního 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH) se vzorkem. Snížení absorbance DPPH měřené při 525 nm je závislé na koncentraci antioxidantu ve sledovaném vzorku. Byly použity FIALab pro Windows software, FIALab 3000 analyser (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA), 2,5-ml syringe pump, USB2000-UV/VIS spektrofotometr se zdrojem světla LS-1 (Ocean Optics, USA) a SMA-Z průtoková cela (1-cm délka). Antiradikálová aktivita vzorků byla vyjádřena jako 50% účinná koncentrace (EC₅₀), která byla vypočítána pomocí programu GraphPad Prism 3.02, a byla porovnána se známými antioxidanty: kvercetinem EC₅₀ = 25,3 μM a troloxem EC₅₀ = 27,8 μM.

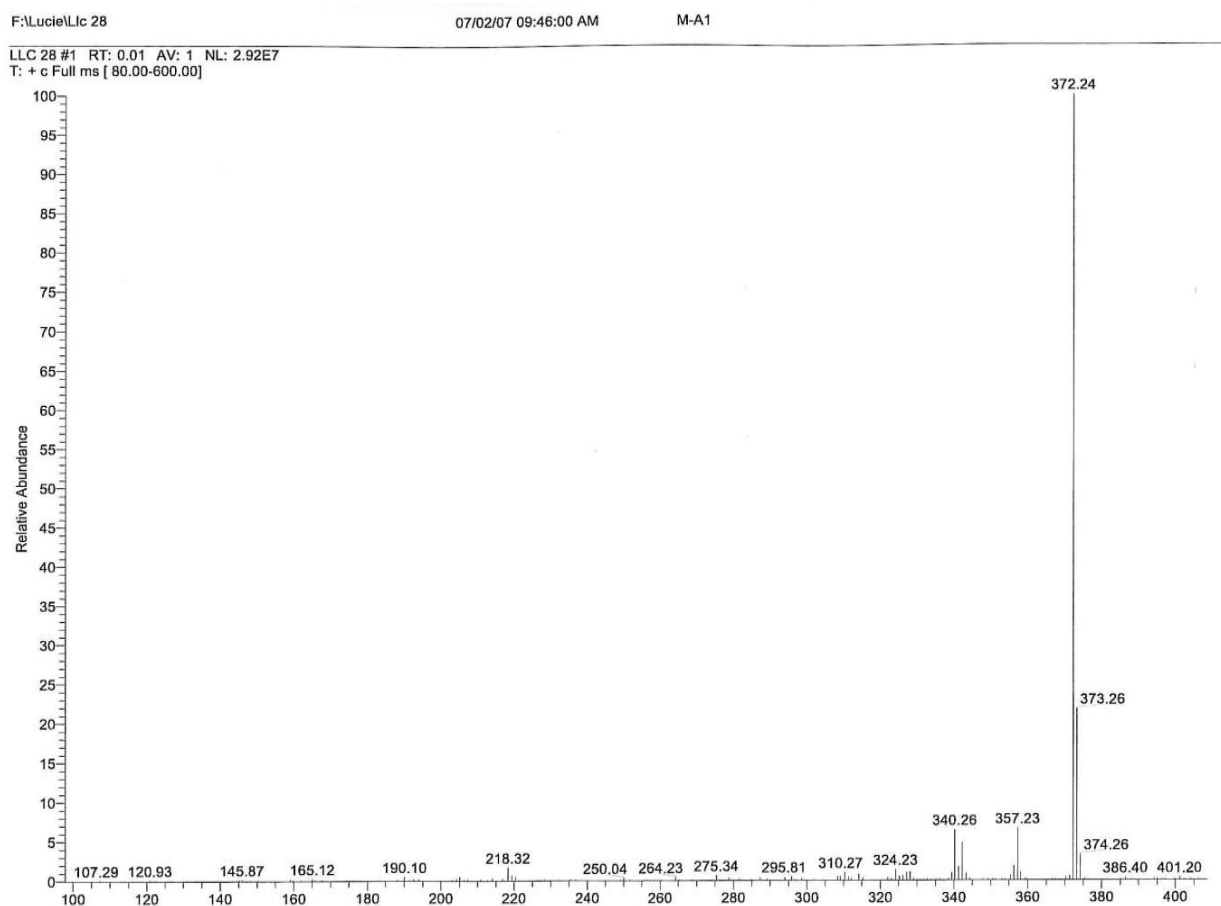
5 VÝSLEDKY

5.1 Strukturní analýza izolované látky F₁-1A

Na základě MS a NMR studií byla izolovaná látka F₁-1A identifikovaná jako 3-(1-(6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-1-yl)ethyl)-2,6-dimethoxy-phenol.

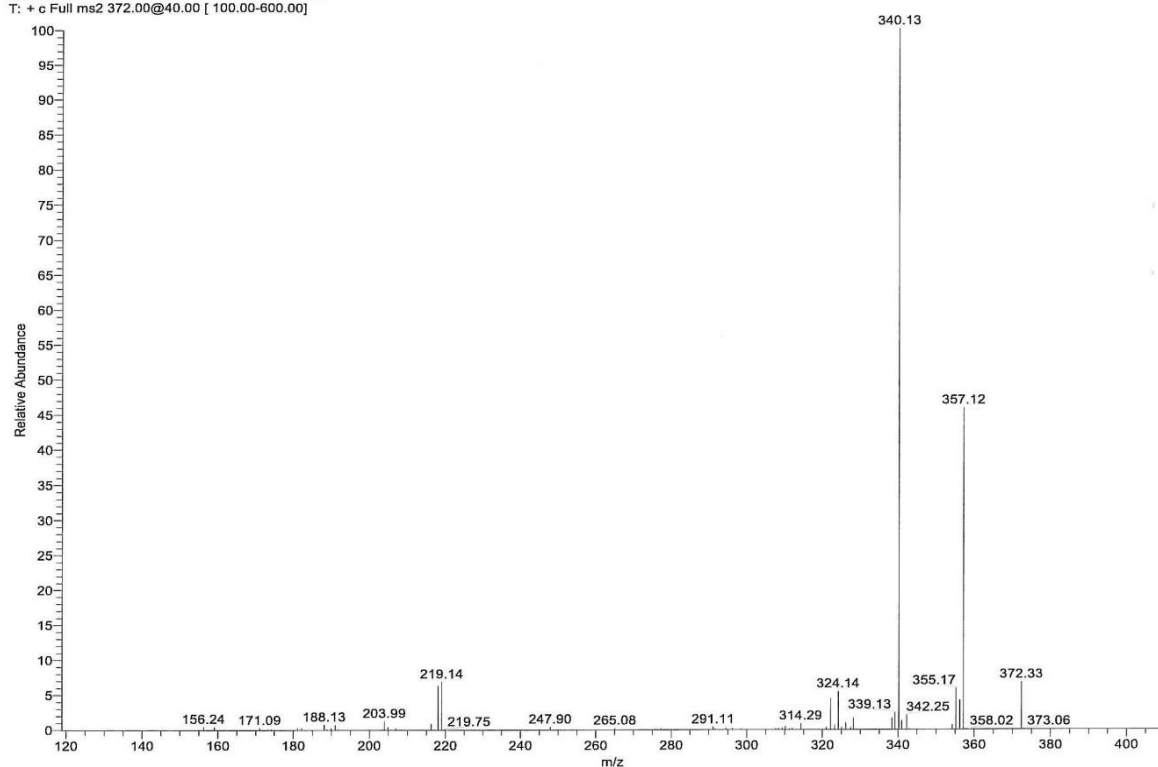
5.1.1 Hmotnostní spektrum

ESI-MS m/z 372,24 $[M+H]^+$ (100). MS/MS m/z 372,33 $[M-H]^+$ (10), 357,12 $[M-CH_3]^+$ (50), 340,13 (100).



Obr. 11: MS spektrum izolované látky

LLC 28 MS2 372 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 1.96E7
T: + c Full ms2 372.00@40.00 [100.00-600.00]



Obr. 12: MS/MS spektrum izolované látky

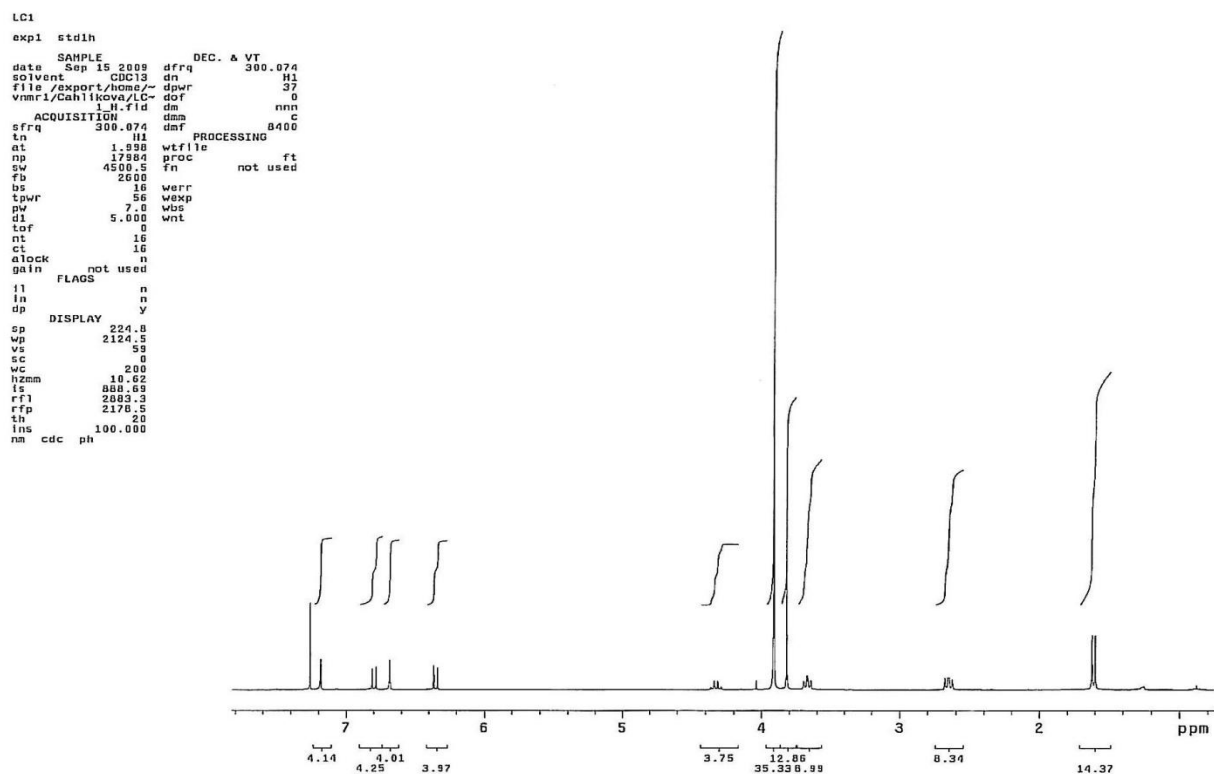
5.1.2 NMR studie izolované látky F₁-A1

Obr. 13: Strukturní vzorec izolované látky

5.1.2.1 ^1H NMR spektrum

^1H NMR (CDCl_3 , 25°C):

δ 7.19 (1H, s, H8), 6.80 (1H, d, $J=8.7$ Hz, H6'), 6.69 (1H, s, H5), 6.35 (1H, d, $J=8.7$ Hz, H5'), 4.33 (1H, q, $J=7.1$ Hz, CH), 3.91 (3H, s OCH_3), 3.91 (6H, s OCH_3), 3.82 (3H, s OCH_3), 3.71-3.63 (2H, m, NCH_2), 2.70-2.61 (2H, m, CH_2), 1.61 (1H, d, $J=7.1$ Hz, CH_3).



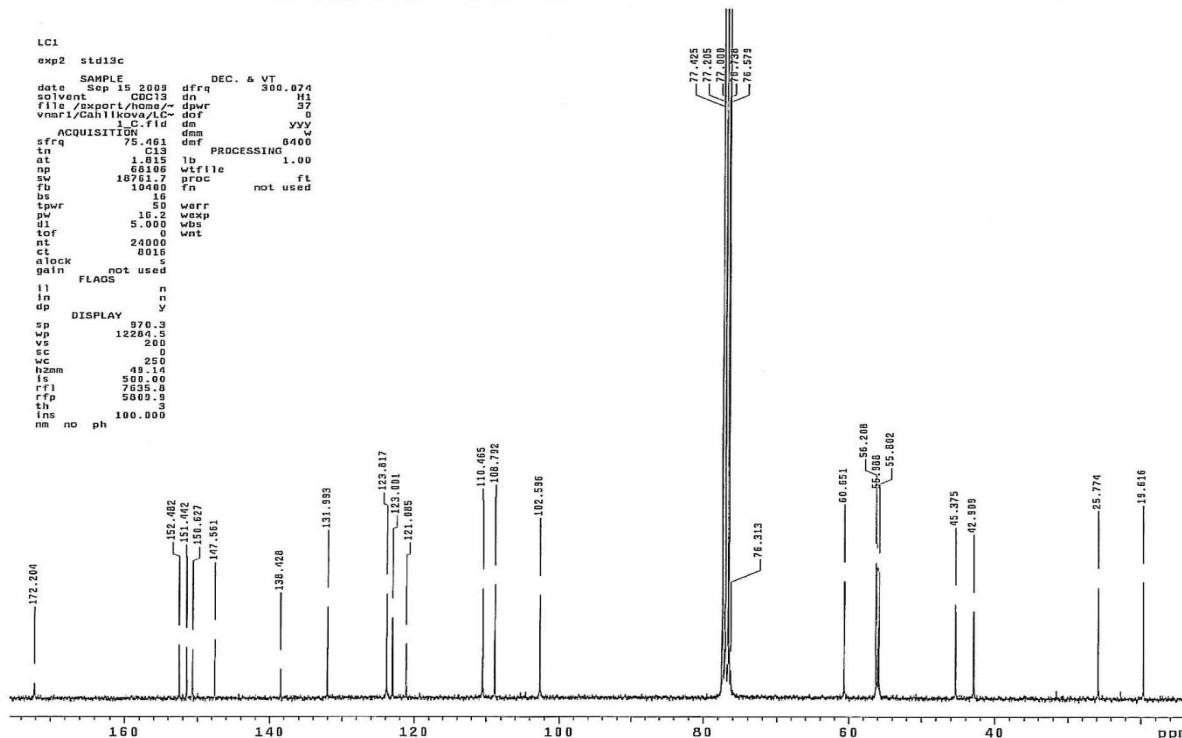
Obr. 14: ^1H -NMR spektrum látky F₁-A1

5.1.2.2 ^{13}C NMR spektrum

Obr. 15: Strukturní vzorec izolované látky

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25°C):

δ 172.2, 152.5, 151.4, 150.6, 147.6, 138.4, 132.0, 123.8, 123.0, 121.1, 110.5, 108.8, 102.6, 60.7, 56.2, 56.0, 55.8, 45.4, 42.9, 25.8, 19.6



Obr. 16: ^{13}C -NMR spektrum látky F₁-A1

5.1.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_{D+47,5^{\circ}C}^{20}$ (*c* 0,2; CHCl₃)

5.1.4 IČ spektrum izolované látky

IČ spektrum izolované látky je uvedeno v příloze I.

5.2 Strukturní analýza izolované látky F₁-1C

Struktura izolované látky F₁-1C se doposud nepodařila určit a je dále v řešení.

5.3 Screening biologických vlastností izolované látky

5.3.1 Antioxidační aktivita alkaloidů

Pro izolovanou látku byla stanovena antioxidační aktivita EC₅₀ > 10 mM

5.3.2 Inhibiční aktivita alkaloidu vůči AChE a BuChE

Inhibiční aktivita látky F₁-A1 byla stanovena pro AChE 127,6 μM a pro BuChE 500,3 μM.

6 DISKUZE

Látka F₁-1A izolovaná z *Corydalis cava* byla na základě MS a NMR studií identifikovaná jako 3-(1-(6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-1-yl)ethyl)-2,6-dimethoxy-phenol. Jedná se o isochinolinový alkaloid benzyloisochinolinového typ. Tento alkaloid byl izolován a popsán vůbec poprvé. Druhá izolovaná látka F₁-1C nebyla doposud identifikována. Na základě prvních výsledků strukturních analýz se z největší pravděpodobností bude jednat o doposud nepopsanou strukturu.

Jelikož látka F₁-1A byla izolovaná poprvé, poprvé proběhlo i testování jejího vlivu na AChE a BuChE. U ostatních alkaloidů, obvykle se vyskytujících v dymnivce duté, testování na AChE a BuChE proběhlo u bulbokapninu, korydalinu, korydinu, palmatinu, berberinu a protopinu.

Pro stanovení inhibiční aktivity látky byla použita modifikovaná Ellmanova kolorimetrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Vzhledem ke skutečnosti, že použitá AChE a BuChE jsou humánního původu, získané hodnoty IC₅₀ jsou pro další využití směrodatnější, nežli výsledky získávané na nehumánních modelech.

Stanovené hodnoty IC₅₀ pro inhibici AChE ($127,6 \times 10^{-6}$ M) a BuChE ($500,3 \times 10^{-6}$ M) byly výrazně vyšší než hodnoty IC₅₀ standardů, které jsou využívány pro inhibici obou zmíněných enzymů (především AChE). Naměřené hodnoty IC₅₀ pro galantamin byly: AChE ($6,898 \times 10^{-6}$ M), BuChE ($0,1560 \times 10^{-3}$ M), a pro eserin byly hodnoty IC₅₀ pro AChE ($2,168 \times 10^{-6}$ M) a BuChE ($1,616 \times 10^{-6}$ M). Z tohoto pohledu není vhodné látku F₁-1A považovat za potencionální AChE či BuChE inhibitor. Jelikož v patogenezi Alzheimerovy choroby hraje významnou roli i vliv volných kyslíkatých radikálů byla u izolované látky stanovena i její antioxidační aktivita. Hodnota EC₅₀ byla větší než 10mM z toho plyne, že tato látka nevykazuje žádnou antioxidační aktivitou.

7 LITERATURA

1. Tang, W., Eisenbrand, G.: Chinese Drugs of plant origin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, Berlin 1992.
2. Huang, K. Ch.: The pharmacology of Chinese herbs, Second edition, CRC Press Boca Raton London New York Washington D.C., 1999.
3. Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H.: Plant secondary metabolites, Blackwell publishing Ltd, 2006.
4. Preininger, V.: Chemotaxonomy of the *Papaveraceae* alkaloids, *Chem. Biol. Isoquinoline Alkaloids*, 23-37, 1970.
5. Wildman, W.C.: Amaryllidaceae alkaloids, *Chem. Alkaloids*, 151-171, 1970.
6. Bentley, K. W.: β -Phenethylamines and the isoquinoline alkaloids, *Nat. Prod. Rep.*, 21, 395-424, 2004.
7. Berkov, S., Bastida, J., Nikolova, M., Viladomat, F. and Codina, C.: Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts, *Phytochem. Anal.*, 19, 411-419, 2008.
8. Hostettmann, K., Borloz, A., Urbain, A. and Marston, A.: Natural product inhibitors of acetylcholinesterase, *Curr. Org. Chem.*, 10, 825-847, 2006.
9. Kiryakov, K., Daskalova, E., Georgieva, A., Kuzmanov B. and Evstatieva, L.: Alkaloids from *Corydalis solida* (L.) Schwarz, *Fol. Med.*, 24 (4), 19-22, 1982.
10. Sekula, M.: Biologická aktivita obsahových látek rostlin XI. Alkaloidy *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Körte (*Fumariaceae*) a jejich účinek na acetylcholinesterasu, *Diplomová práce*, UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hr. Králové, Hr. Králové 2009, 61 s.
11. ---: Pharma News: www.pharmanews.cz/2005_05/alzheimer.htm, vystaveno 23.1.2008.
12. Pydychová, E.: Alzheimerova nemoc, *Solutio* 2002/2003, 21-28, 2002.
13. Lincová, D., Farghali, H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, Druhé, doplněné a přepracované vydání, Galen, 2007.

14. Plevová, J., Boleloucký, Z.: Psychofarmakoterapie vyššího věku. 2., přepracované a aktualizované vydání, Grada Publishing, Praha 2000.
15. Doležal, J.: Biologická aktivita obsahových látek rostlin VIII. Vliv alkaloidů z různých rostlinných taxonů na acetylcholinesterázu, *Diplomová práce*, UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hr. Králové, Hr. Králové 2008, 65 s.
16. Giacobini, E.: Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease, *Neurochem Res.*, 28, 515-22, 2003.
17. Sturm, S., Seger, Ch., Stuppner, H.: Analysis of central european *Corydalis* species by nonaqueous capillary electrophoresis -electrospray ion trap mass spektrometry, *J. Chrom. A*, 1159, 42-50, 2007.
18. Berkov, S., Bastida, J., Nikolovova, M., Viladomat, F., Codina, C.: Rapid TLC/GC-MS Identification of Acetylcholinesterase Inhibitors in Alkaloid Extracts, *Phytochem. Anal.*, 19, 411-419, 2008.
19. Marston, A., Kissling, J., Hostettmann, K.: A rapid TLC bioautographic method for the detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase inhibitors in plants, *Phytochem. Anal.* 13, 51-54, 2002.
20. Reimeier, C., Schneider, I., Schneider, W., Schafer, H.L., Elstner, E.F.: Effects of ethanolic extracts from *Eschscholtzia californica* and *Corydalis cava* on dimerization and oxidation of enkephalins, *Arzneimittelforschung*, 45(2),132 – 6, 1995.
21. Adsersen, A., Kjoelbye, A., Dall, Ole., Jaeger, Anna K.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigg. & Körte, *J.Ethnopharm.*, 113(1), 179-182, 2007.
22. Koul, S., Razdan, T. K., Andotra, C. S., Kalla, A.K., Koul, S., Taneja, S.C.: Benzophenanthridine alkaloids from *Corydalis flabellata*, *Planta Med.*, 68(3), 262-265, 2002.
23. Ito, C., Itoigawa, M., Tokuda, H.,Kuchide, M., Nishino, H., Furukawa, H.: Chemopreventive activity of isoquinoline alkaloids from *Corydalis* plants, *Planta Med.*, 67(5), 473-475, 2001.

24. Kim, D., Eun, J., Shin, T., Eom, D., Lim, J.: Benzo[c]phenanthridine alkaloids from *Corydalis incisa*, *Arch. Pharm. Res.*, 23(6), 589-591, 2000.
25. Xu, R.: Some bioactive natural products from Chinese medicinal plants, *Studies in Natural Products Chemistry*, 21, část 2, 729-772, 2000.
26. Hejný, S., Slavík, B.: *Květena ČSR 1*, Academia, str. 497, Praha 1988 (dotisk 2002).
27. ---: Panoramio.com: www.panoramio.com/photo/8687310, vystaveno 6.12. 2009.
28. ---: rostliny přírodou.cz: http://rostliny.prirodou.cz/?rostlina=corydalis_cava, vystaveno 31.1. 2009.
29. ---: atlasrostlin.cz: <http://kvetiny.atlasrostlin.cz/dymnivka-duta>, vystaveno 6.12. 2009.
30. ---: lokality-rostlin.cz: http://www.lokality-rostlin.cz/?rostlina=corydalis_cava, vystaveno 6.12. 2009.
31. ---: Wikipedia.org: de.wikipedia.org/wiki/Hohler_Lerchensporn, vystaveno 6.12..2009.
32. Gasic, O., Dragutinovic, A., Popovic, M.: Alkaloids from *Corydalis cava*, *Planta Med.*, 42(6), 135, 1981.
33. Marin, P., Sajdl, V., Kapor, S., Tatic, B.: Fatty acid composition of seeds of the *Papaveraceae* and *Fumariaceae*, *Phytochem.*, 28(1), 133-7, 1989.
34. Ding, B., Zhou, T., Fan, G., Hong, Z., Wu, Y.: Qualitative and quantitative determination of ten alkaloids in traditional Chinese medicine *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang by LC-MS/MS and LC-DAD. *J Pharm. Biomed. Anal.*, 45, 219-226, 2007.
35. Meyer, A., Imming, P.: (–)-Canadoline as first secoberbine alkaloid from *Corydalis cava*, *Phytochem. Lett.*, 1(3), 168-170, 2008.
36. Slavík, J., Slavíková, L.: Alkaloide der Mohngewächse (*Papaveraceae*) XXXIII. Über die Alkaloide von drei Arten der Gattung *Escholtzia* und über die Konstitution des neuen Alkaloids Escholamin., *Coll. Czech.Chem. Commun.*, 31, 3362-3371, 1966.
37. Slavík, J., Slavíková, L.: On alkaloids from the aerial parts of three *Escholtzia* species, *Coll. Czech.Chem. Commun.*, 51, 1743-1751, 1986.

38. Slavík, J., Slavíková, L.: Alkaloids of the *Papaveraceae*. LXVII. Alkaloids from *Corydalis cava* (L.) Schw. & Köerte, *Coll. Czech.Chem. Comm.*, 44(7), 2261-2274, 1979.
39. Preininger, V., Thakur, R. S., Šantavý, F.: Isolation and chemistry of alkaloids from plants of the family Papaveraceae LXVII: *Corydalis cava* (L.) Sch. et K. (*C. tuberosa* DC), *J. Pharm. Sci.*, 65(2), 294-6, 1976.
40. Ribar, B.: Molecular Structure of Alkaloids Isolated from *Corydalis* Plants, Bulletin T. CXXIV de l'Academie serbe des sciences et des arts, *Sciences naturelles*, 40, 95-106, 2003.
41. Kiryakov, H. G., Iskrenova, E. S.: Minor Alkaloids of *Corydalis bulbosa*, *Planta Med.*, 50(2), 136-8, 1984.
42. Taylor, P.: Anticholinergic agents, v knize: The Pharmacological Basis of Therapeutics (J.G. Hardman & L.E. Limbird, eds), McGraw Hill, New York 1996.
43. Lullmann, H., Mohr, K., Wehling, M.: Farmakologie und Toxikologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1999.
44. Binder, J., Kuča, K., Jun, D., Opletalová, V.: Studium inhibitorů acetylcholinesterasy, *Chem. Listy*, 102, 2008.
45. Lushington, G. H., Jian-Xin, G., Hurley, M. M.: Acetylcholinesterase – Molecular modeling with the whole toolkit, *Curr. Top. Med. Chem.*, 6(1), 57 – 63, 2006.
46. Kim, K. K., Lee, K. T., Baek, N., Kim, S., Park, H. W., Lim, J. P., Shin, T. Y., Eom, D. O., Yang, J. H., Eun, J. S.: Acetylcholinesterase inhibitors from the aerial parts of *Corydalis speciosa*, *Arch. Pharm. Res.*, 11, 1127-1131, 2004.
47. Kim, D. K.: Inhibitory effect of corynoline isolated from the aerial parts of *Corydalis incisa* on the acetylcholinesterase, *Arch. Pharm. Res.*, 25 (6), 817-9, 2002.
48. Hung, T. M., Na, M., Dat, Ngoc, T. M., Youn, U., Kim, H. J., Min, B., Lee, J., Bae, K.: Cholinesterase inhibitory and anti-amnesic activity of alkaloids from *Corydalis turtschaninovi*, *J. Ethnopham.*, 119, 74-80, 2008.

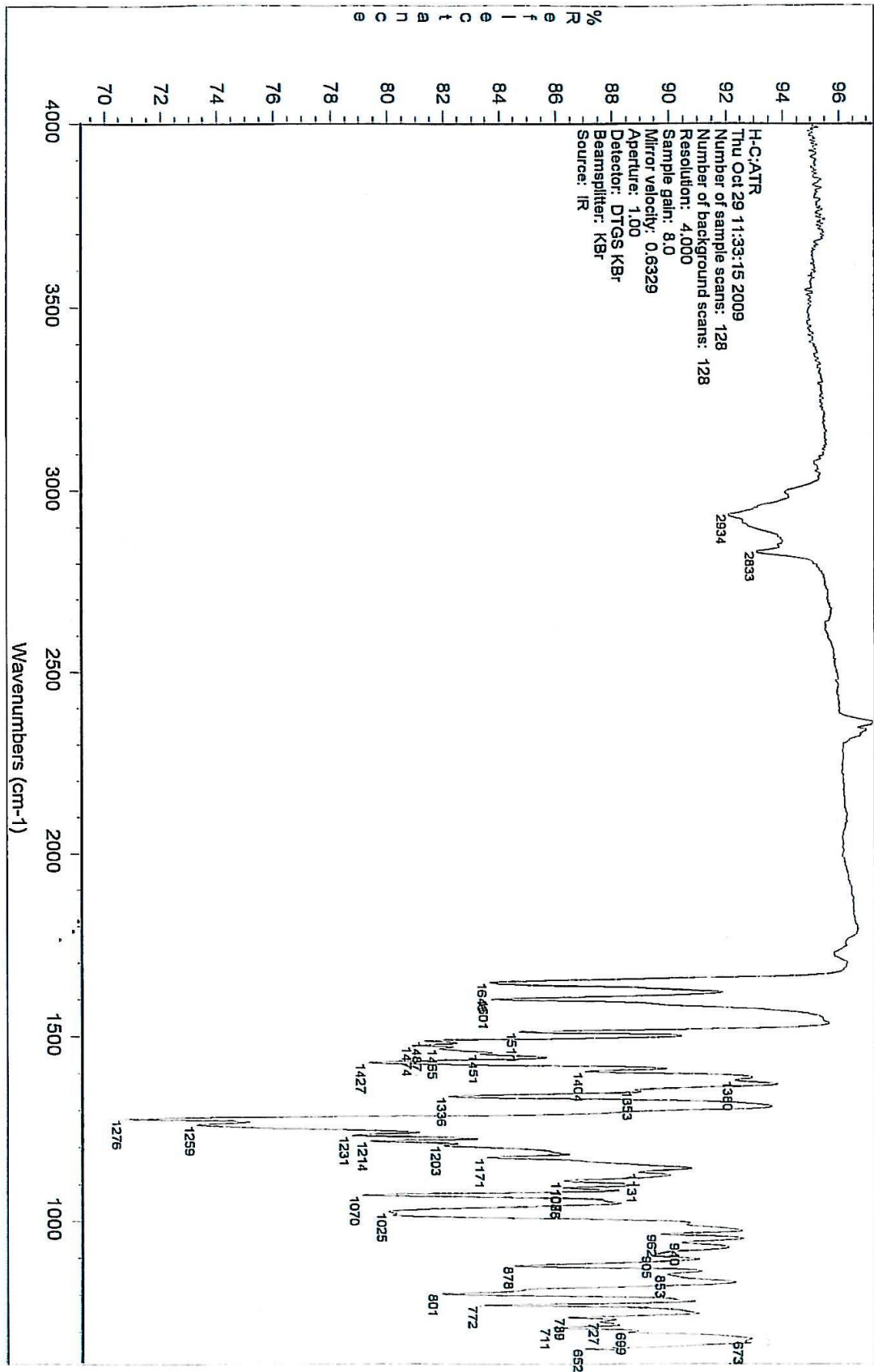
49. Halbsguth, Ch., Meissner, O., Haberlein, H.: Positive cooperation of protoberberine type 2 alkaloids from *Corydalis cava* on the GABA_A binding site, *Planta Med.*, 69(4), 305 – 309, 2003.
50. Kleber, E., Schneider, W., Schafer, H.L., Elstner, E.F.: Modulation of key reactions of the catecholamine metabolism by extracts from *Eschscholtzia californica* and *Corydalis cava*, *Arzneimittelforschung*, 45(2), 127 – 131, 1995.
51. Ko, F.N., Wu, T.S., Lu, S.T., Wu, Y.C., Huang, T.F., Teng, C.M.: Antiplatelet effects of protopine isolated from *Corydalis* tubers, *Tromb. Res.*, 56(2), 289 – 298, 1989.
52. Salačová, K.: Biologická aktivita obsahových látek rostlin XII. Alkaloidy rodu *Corydalis* DC. (*Fumariaceae*) a jejich biologické účinky, *Diplomová práce*, UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hr. Králové, Hr. Králové 2009, 65 s.
53. Slavík, J., Slavíková, L.: Alkaloids from *Corydalis nobilis* (L.) Pers., and *C. intermedia* (L.) Merat., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 54(7), 2009-2020, 1989.
54. ---: magnar.aspaker.no: <http://magnar.aspaker.no/liste.htm>, vystaveno dne 6.12. 2009.
55. ---: botanika.wendys.cz: botanika.wendys.cz/kytky/K515.php, vystaveno dne 6.12. 2009.
56. Stahl, E.: Thin-layer Chromatography, A Laboratory Handbook; Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1969.

8 SEZNAM ZKRATEK

| | |
|-------|---|
| ACh | Acetylcholin |
| AChE | Acetylcholinesteráza |
| ADP | Adenosindifosfát |
| BMC | Bikukulin methylchlorid |
| BuChE | Butyrylcholinesteráza |
| CNS | Centrální nervový systém |
| DTNB | kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová |
| GABA | Kyselina γ -aminomáselná |
| IČ | Infračervená spektroskopie |
| MAO | Monoaminoxidáza |
| MS | Hmotnostní spektrometrie |
| NMR | Nukleární magnetická rezonance |
| PAF | Destičky aktivující faktor |
| TLC | Tenkvrstevná chromatografie |

9 PŘÍLOHA

Příloha I. IČ spektrum izolované látky



ABSTRAKT

Sekula, M.: Biologicky aktivní metabolity rostlin I. Alkaloidy *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Körte (*Fumariaceae*) a screening jejich biologických vlastností. Rigorózní práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2010, 65 s.

V rámci screeningu rostlin s obsahem alkaloidů, které inhibují aktivitu lidské erytrocytární acetylcholinesterázy a lidské sérové butyrylcholinesterázy byla studiu podrobena dymnivka dutá (*Corydalis cava* Schweigg. & Körte, *Fumariaceae*). Tato práce navazuje na vlastní diplomovou práci (2009).

Cílem práce bylo zpracování podfrakce F₁ získané v rámci diplomové práce. Z této směsi byly pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie izolovány dvě látky ve formě volných bází. Na základě MS, NMR a IČ studií byla první izolovaná látka F₁-1A identifikována jako 3-(1-(6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-1-yl)ethyl)-2,6-dimethoxy-phenol. Jedná se o první izolaci a popis této struktury. Látka F₁-1C je stále ve stádiu řešení struktury.

Byla stanovena inhibiční aktivita látky F₁-1A vůči lidské erytrocytární acetylcholinesteráze (IC₅₀ 127,6×10⁻⁶ M) a lidské sérové butyrylcholinesteráze BuChE (IC₅₀ 500,3×10⁻⁶ M). V porovnání s biologickou aktivitou standardních alkaloidních inhibitorů acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy (galantaminu a eserinu) se jedná o látku, která je spíše nezajímavá z hlediska dalšího možného využití jako inhibitoru cholinesteráz. Jelikož v patogenezi Alzheimerovy choroby hraje významnou roli i vliv volných kyslíkatých radikálů byla u izolované látky stanovena také její antioxidační aktivita. Hodnota EC₅₀ byla větší než 10mM z toho plyne, že tato látka nevykazuje žádnou antioxidační aktivitu.

Klíčová slova: Alzheimerova choroba, alkaloidy, *Corydalis cava*, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, antioxidační aktivita.

ABSTRACT

Sekula, M.: Biological Active Plant Metabolites I. Alkaloids of *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Körte (*Fumariaceae*) and Screening of Their Biological Properties. Rigorous thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové 2010, 65 p.

Within the screening of plants that contains alkaloids inhibiting the activity of the human erythrocytic acetylcholinesterase and human serum butyrylcholinesterase *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Körte (*Fumariaceae*) was studied. This work connect to my diploma thesis (2009).

The task was to separate mixture of alkaloids from extract „B-chloroform“ subfraction F₁. This subfraction was prepared within the frame of diploma thesis. From this mixture, using preparative TLC, were isolated two compounds F₁-1A and F₁-1C in the form of free bases. On the basis of MS, NMR and IR spektroskopy the isolated alkaloid F₁-1A was identified as 3-(1-(6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-1-yl)ethyl)-2,6-dimethoxy-phenol. It is the first isolation and description of this compound. Structural analysis of compound F₁-1C is continuing.

The isolated compound F₁-1A inhibited the human erythrocyte acetylcholinesterase and human blood serum butyrylcholinesterase with IC₅₀ for AChE ($127,6 \times 10^{-6}$ M) and with IC₅₀ for BuChE ($500,3 \times 10^{-6}$ M). Comparing its biological activity with that of standard alkaloid inhibitors (galanthamine and eserine) the isolated substance is not very interesting regarding further studies of natural products that could serve as lead compounds for the development of potential drugs against the Alzheimer's disease. In the pathology of Alzheimer disease an important role play free radicals. On this account we determined also antioxidative activity of isolated alkaloid. The radical scavenging activity of compound F₁-1A was >10mM. This compound showed no antioxidative activity.

Keywords: Alzheimer disease, alkaloids, *Corydalis cava*, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, antioxidative activity.