

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Biologická aktivita obsahových látek rostlin XIII. Alkaloidy *Corydalis cava* (L.) SCHWEIGG. & KÖRTE a jejich účinek na acetylcholinesterasu

Biological activity of plant metabolites. XIII. Alkaloids of *Corydalis cava* (L.) SCHWEIGG. & KÖRTE and their activity to acetylcholinesterase

Studijní program: Farmacie

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Hluboká nad Vltavou, srpen 2010

Adam Bárta

PROHLÁŠENÍ

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

Hluboká nad Vltavou, 25. 8. 2010

Adam Bárta

Děkuji

Doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za veškerou pomoc s vypracováním diplomové práce, za poskytnuté materiály a cenné odborné rady,

Ing. Lucii Cahlíkové, PhD. za změření hmotnostních spekter a revizi strukturní části textu,

Ing. Milanu Kurfürstovi, PhD., AV ČR, Ústav chemických procesů, za změření a interpretaci NMR spekter izolované látky (definitivní vyřešení struktury),

Ing. Kateřině Macákové za zásadní pomoc při měření biologické aktivity izolované látky, celé katedře Farmaceutické botaniky a ekologie za velmi příjemné pracovní prostředí.

Tato práce byla podpořena finančními prostředky grantu GAUK č. 122309 (řešitel J. Chlebek) a prostředky projektu Specifického vysokoškolského výzkumu 2010-SVV-2010-261-002.

Obsah

1 ÚVOD	6
2 CÍL PRÁCE.....	10
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	12
3.1 Neurodegenerativní onemocnění a myasthenia gravis	13
3.1.1 Neurodegenerativní onemocnění	13
3.1.1.1 Alzheimerova choroba	13
3.1.1.1.1 Výskyt v populaci.....	13
3.1.1.1.2 Histopatologické změny.....	14
3.1.1.1.3 Neurochemické změny.....	15
3.1.1.1.4 Diagnostika.....	16
3.1.1.1.5 Terapie Alzheimerovy choroby.....	17
3.1.1.1.5.1 Farmakoterapie Alzheimerovy choroby.....	17
3.1.1.1.5.1.1 Náhrada nedostatkových mediátorů.....	17
3.1.1.1.5.1.2 Ovlivnění metabolismu neuronů.....	19
3.1.1.1.5.1.3 Likvidace volných radikálů.....	19
3.1.1.1.5.1.4 Ovlivnění excitotoxicity.....	20
3.1.1.1.5.1.5 Další možnosti terapie.....	20
3.1.2 Myasthenia gravis	21
3.1.2.1 Charakteristika	21
3.1.2.2 Patofyziologie a diagnostika	21
3.1.2.3 Farmakoterapie.....	22
3.1.2.3.1 Imunosupresivní léčba	22
3.1.2.3.2 Symptomatická léčba	23
3.2 Dymnivka dutá, <i>Corydalis cava</i> (<i>Fumariaceae</i>).....	24
3.2.1 Preferované jméno.....	24
3.2.2 Synonyma.....	24
3.2.3 Botanický popis.....	24
3.2.4 Ekologie.....	25
3.2.5 Rozšíření.....	25
3.2.6 Isochinolinové alkaloidy dymnivky duté.....	26
3.2.6.1 Terciární alkaloidy	26
3.2.6.2 Kvartérní alkaloidy.....	31
3.2.6.3 Biologická aktivita alkaloidů dymnivky duté	35
3.2.6.3.1 Acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa a jejich inhibice.....	35
3.2.6.3.2 Inhibice AChE a BuChE alkaloidy z dymnivky duté	36
3.3 Izolace alkaloidů	38
3.3.1 Izolace za použití fyzikálních metod.....	39
3.3.2 Izolace za použití chemických metod	42
3.3.3 Izolace kvartérních alkaloidů	44
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	46
4.1 Všeobecné postupy.....	47

4.1.1 Destilace a odpařování	47
4.1.2 Chromatografie.....	47
4.1.2.1 Tenkovrstvá chromatografie	47
4.1.2.2 Sloupcová chromatografie	47
4.2 Materiál a vybavení	48
4.2.1 Rozpouštědla a chemikálie.....	48
4.2.2 Chemikálie a materiál ke stanovení účinku AChE, BuChE (IC ₅₀)	49
4.2.3 Přístroje	50
4.2.4 Detekční činidla.....	50
4.2.5 Iontoměničová pryskyřice.....	51
4.2.6 Chromatografické adsorbenty	51
4.2.7 Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii.....	51
4.3 Postup při izolaci alkaloidu z dymnivky duté.....	51
4.3.1 Droga.....	51
4.3.2 Extrakce drogy	52
4.3.3 Příprava alkaloidních výtřepků	52
4.3.4 Příprava reinekátů alkaloidů.....	52
4.3.5 Příprava chloridů alkaloidů	53
4.3.6 Sloupcová chromatografie chloridů alkaloidů	53
4.3.7 Zpracování spojených frakcí A3 + A4 preparativní TLC.....	57
4.4 Určení struktury izolované látky.....	57
4.4.1 Měření hmotnostního spektra.....	57
4.4.2 Měření NMR spektra.....	57
4.5 Stanovení účinku alkaloidu na AChE, BuChE (IC ₅₀)	58
4.5.1 Podmínky měření	58
4.5.2 Vlastní stanovení biologické aktivity.....	58
4.5.3 Matematické zpracování experimentálních dat.....	59
5 VÝSLEDKY	60
5.1 Výsledky stanovení struktury	61
5.1.1 Popis	61
5.1.2 MS studie AB-1.....	61
5.1.3 ¹ H-NMR spektrum látky AB-1	62
5.1.4 ¹³ C-NMR spektrum bulbokapninu	63
5.2 Výsledky stanovení biologické aktivity látky AB-1	65
6 DISKUZE.....	66
7 LITERATURA	73
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	80
9 ABSTRAKT.....	83

1 ÚVOD

Lidstvo již od svého pradávného vzniku naráží na fakt neustálé proměnlivosti zdravotního stavu jedinců a společností v průběhu času, což je dáno tím, že člověk je jako živý organismus v neustálém kontaktu s vnějším prostředím, přírodním i sociálním. Lidé se tedy již od nepaměti snažili různými prostředky, zprvu metodou pokusu a omylu, zmírňovat projevy různých nemocí a především je léčit tak, aby byl opětovně dosažen stav zdraví (Broncová, 2003).

Je logické, že za léčiva byly zprvu voleny látky přírodního původu (především rostlinného, ale i živočišného a nerostného), neboť lidé s nimi přicházeli běžně do kontaktu. Těmto se přisuzovala magická účinnost, která v tehdejší pojetí, tak jako nemoc, pocházela od bohů/Boha. Jisté zmínky o rostlinných drogách, které se prakticky využívaly v léčitelství, nalezneme v každé kultuře starověkých civilizací (Egypt, Asýrie, Fénicie, Kréta, Indie, Řecko, Řím)(Broncová, 2003).

Ještě v pozdním středověku se účinnost připisovala celé rostlině, popřípadě droze z ní získané. Za zmínku stojí Paracelsovo iatrochemické pojetí, který již tušil přítomnost „účinných principů“ v rostlinách, které však bylo možné nacházet až s pozdějším rozvojem chemie (Hubík a kol., 1989a).

Byli to právě lékárníci, kteří jako první objevovali jednotlivé účinné látky. V letech 1803–1806 F. A. Sertürner izoloval morfin z opia. Nalezl tak prvního člena do té doby neznámé skupiny organických léčiv izolovaných z rostlin – dusíkatých látek, alkaloidů. Následovaly objevy dalších (chinin, emetin, strychnin,...), což podnítilo v první polovině 19. stol. rozvoj průmyslové výroby léčiv. Teprve s rozvojem chemie v oblasti fosilních paliv se přidává v 80. letech 19. stol. zcela nový směr získávání léčivých látek totální chemickou syntézou, tedy bez přímé předlohy. Posléze se začala uplatňovat i cílená obměna přírodních látek. Jako třetí základní směr získávání léčivých látek (vedle izolace z přírodních zdrojů a chemické syntézy) se ve 40. letech 20. stol. prosazuje i produkce řízenou biosyntézou živými organismy (Broncová, 2003).

Lze tedy říci, že i v současné době je výzkum (základní i aplikovaný) aktivních substancí z přírodních zdrojů vysoce atraktivní záležitostí. Jednou z nejvýznamnějších

skupin obsahových látek rostlin jsou již zmiňované alkaloidy. Tyto dusíkaté sekundární metabolity vznikající z aminokyselin mají velmi často specifické farmakologické účinky. Jejich význam pro vlastní rostlinu není zcela objasněn (ochrana před požírači, odpadní produkt detoxikace)(Hubík a kol., 1989b). Pro nás jsou vhodným objektem výzkumu, zvláště pak při možnosti jejich potenciálního využití v terapii, diagnostice, prevenci a mírnění projevů chorob, u kterých není dostatečně objasněna etiologie a/nebo jejich současná terapie je nedostatečná. Takovou skupinou chorob jsou mimo jiné i neurodegenerativní onemocnění.

Do této skupiny spadají různé choroby s různými projevy, jejichž obecnými patologickými rysy jsou: atrofie neuronů, reaktivní zmnožení glie a výskyt inkluzních tělísek. Tyto choroby nemají často plně objasněnou etiologii, jsou výskytu hereditárního i sporadického, jejich průběh je plíživý, progresivní (Černý, 2010). Takovými nozologickými jednotkami jsou například choroby Parkinsonova, Huntingtonova, Alzheimerova, Pickova, různé typy svalových dystrofií a mnoho dalších. U některých těchto (Alzheimerova, Pickova choroba) našla uplatnění léčiva ze skupiny inhibitorů cholinesteras (Jiráček, 2002; Calatayud-Noguera a kol., 2009).

V souvislosti s vlivem přírodních látek na cholinesterasy mají svůj význam i alkaloidní látky kvartérní povahy, které však díky své nízké biologické dostupnosti do mozku mohou potenciálně najít uplatnění spíše v jiných orgánech organismu. Jednou z takových oblastí může být ovlivnění myasthenia gravis, což je také choroba nervové soustavy, která však nepostihuje CNS, ale nervosvalovou ploténku. Další možná využití kvartérních inhibitorů cholinesteras v medicíně mohou být například: prevence a léčba pooperačních atonií GIT a močových cest nebo jako antidota periferních kompetitivních myorelaxancií (Lincová a Farghali, 2007).

Izolace a studium biologické aktivity kvartérních alkaloidů na lidské cholinesterasy *in vitro* z hlediska ovlivnění neurodegenerativních mozkových procesů, má však také svůj význam, protože tyto látky mohou být vedle terciárních alkaloidních bazí součástí QSAR studií, umožňující odhalení některých procesů v neuronální tkáni.

Jednou z rostlin, která obsahuje v tomto směru potenciálně zajímavé kvartérní alkaloidy je *Corydalis cava* (dymnivka dutá), jejímž alkaloidům (do této doby terciárním) je věnována pozornost na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie, a to právě z hlediska jejich vlivu na neurodegenerativní procesy v mozku (jako příspěvek ke studiu Alzheimerovy choroby).

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce byla:

- 1) Příprava reineckátů kvartérních alkaloidů z primárního extraktu z hlíz *Corydalis cava*, který zbyl po vytřepání terciárních alkaloidů (při pH 9 a 12),
- 2) Získání směsi chloridů těchto alkaloidů převedením reineckátu přes vhodný iontoměnič,
- 3) Pokus o rozdělení směsi chloridů alkaloidů na neutrálním oxidu hlinitém, s případnou preparativní TLC,
- 4) Izolace alespoň jednoho alkaloidu v čisté formě, jeho identifikace a stanovení biologické aktivity na lidskou acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu,
- 5) Vyhodnocení reineckátového postupu z hlediska jeho preparativní využitelnosti pro izolaci kvartérních alkaloidů z rostlin, obsahujících isochinolinové alkaloidy.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Neurodegenerativní onemocnění a myasthenia gravis

3.1.1 Neurodegenerativní onemocnění

Buňky CNS mají velmi omezené kompenzační mechanismy, kterými by mohly nahrazovat ztráty způsobené patologickými procesy, a zároveň současné možnosti exogenního farmakologického ovlivnění jsou zatím malé. Základními histopatologickými znaky neurodegenerativních chorob jsou: atrofie neuronů, reaktivní zmnožení glie a výskyt inkluzních tělísek. Přičemž atrofické změny jsou jak nekrotické (rychlý, katastrofický zánik, uvolnění součástí buňky vně, zánět) tak i apoptické (pomalý programovaný zánik, kondenzace jádra a cytoplazmy, tvorba inkluzních těles, bez zánětu)(Černý, 2010).

Tyto ztráty nervových buněk vedou ke změně řady různých funkcí CNS spojených s demencí, což je stav ireverzibilních a progresivních poruch vyšších kortikálních funkcí, kdy jsou poškozeny učení a paměť, kontrola emocionálních reakcí a kvalita vědomí (Lincová a Farghali, 2007). Demence se dle příčiny dělí na atroficko-degenerativní (Parkinsonova, Alzheimerova, Pickova, korová nemoc s Lewyho tělísky, ...), ischemicko-vaskulární (multiinfarktová demence, vaskulární demence s náhlým začátkem, Binswangerova choroba) a jiné (způsobené intoxikacemi, poraněním, následkem jiných chorob, farmaka...) (Koukolík a Jiráček, 1998).

3.1.1.1 Alzheimerova choroba

3.1.1.1.1 Výskyt v populaci

Alzheimerova choroba je nejčastější příčinou atroficko-degenerativní demence (50–60 % všech demencí), při níž dochází k degeneraci a destrukci neuronů, zejména cholinergního systému (Fialová a Vlček, 2010). Předpokládá se, že tímto onemocněním trpí každý desátý člověk starší 65 let a každý druhý starší 85 let. Presenilní formou se

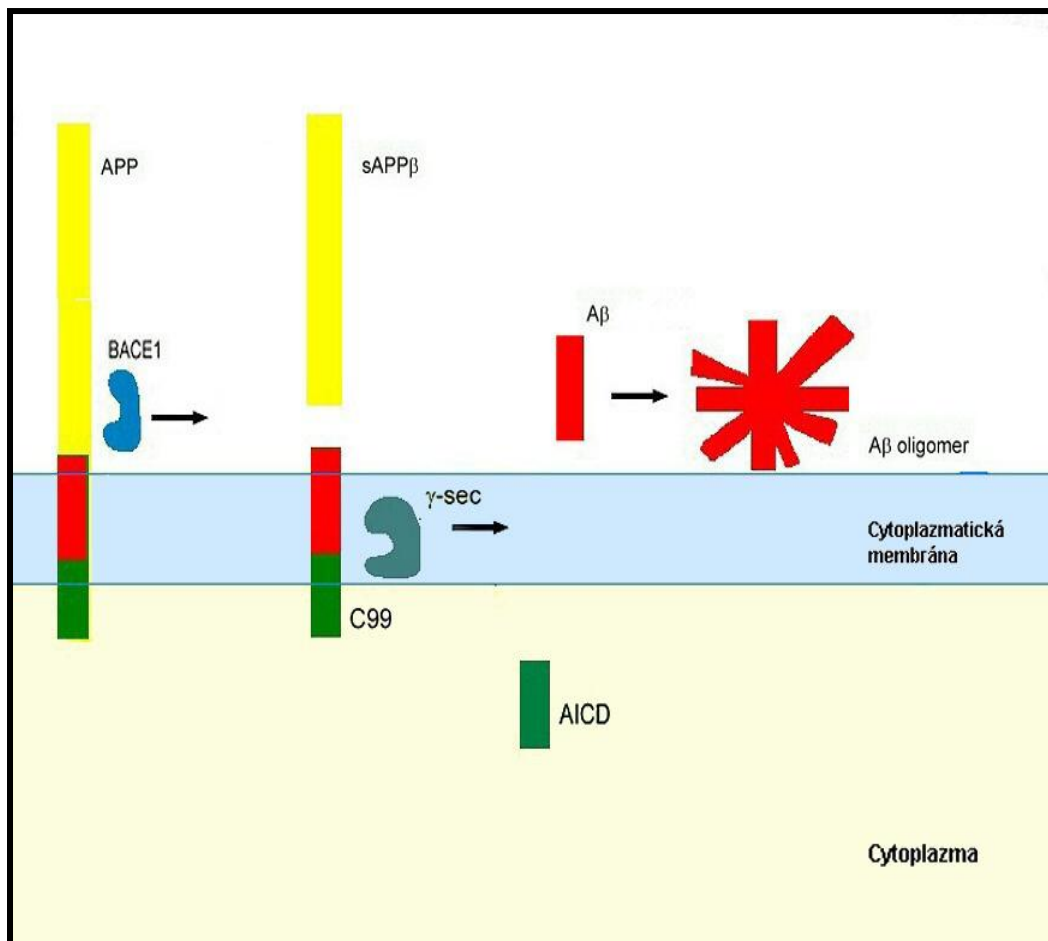
rozumí výskyt prvních příznaků před 65. rokem života, senilní v 65. roce a později (Pydychová, 2002).

3.1.1.1.2 Histopatologické změny

Mezi **makroskopicky** patrné změny patří zúžení mozkových závitů, dilatace mozkových komor, kortikální i subkortikální atrofie některých mozkových struktur – především amygdaly, hippocampu a temporálních laloků (Cibičková a Palička, 2005).

Charakteristickým **mikroskopickým** nálezem jsou extracelulární senilní plaky, které jsou tvořené z převážné části oligomerním β -amyloidem ($A\beta$). Ten vzniká z amyloidového prekurzorového proteinu (APP), který je obsažen v neuronech jako transmembránový protein. Fyziologicky je APP štěpen na rozpustné řetězce pomocí α -sekretasy (neuroprotektivní funkce) a patrně i β -sekretasou. Patologicky pak nalézáme zvýšenou činnost β -sekretasy (BACE1 formy) a další proteasy γ -sekretasy. β -sekretasa štěpí APP na dva řetězce. První, označován jako sAPP β , je volný, rozpustný. Není tedy pravděpodobně významným pro patogenezi Alzheimerovy choroby. Avšak druhý řetězec, označovaný C99, je stále usazen v lipidové membráně a podléhá následnému štěpení γ -sekretasou na dva fragmenty (viz Obr. 1).

Jedním z těchto fragmentů je právě $A\beta$, druhý se nazývá AICD (Small a kol., 2010). Kolem takovýchto shluků $A\beta$ dochází k odumírání neuronů. Intracelulárně pak můžeme také nalézt změny τ -proteinu. Ten je za normálních okolností vázán v mikrotubulech neuronů, ale při Alzheimerově chorobě dochází k jeho uvolňování z této vazby a stává se základem pro vznik nových spirálních vláken (tangles) (Pydychová, 2002).



Obr. 1: Proces tvorby $A\beta$ z APP pomocí β -sekretasy (BACE1) a γ -sekretasy (γ -sec) (volně dle Small a kol., 2010).

3.1.1.1.3 Neurochemické změny

U Alzheimerovy choroby je porušena především presynaptická část acetylcholinergního neuronu. V kůře velkého mozku a v hipokampu je snížena aktivita enzymu cholinacetyltransferasy (CAT) až o 90 % (Silbernagl a Lang, 2001). CAT zabezpečuje syntézu ACh z cholinu a z acetyl-koenzymu A. Cholin není syntetizován v mozku a velmi obtížně přechází HEB. K tvorbě ACh je získáván především z látek, které jej obsahují, jako je fosfatidylcholin. Cholin je pak do neuronů přenášen mechanismem, který se nazývá vysokoafinitní cholinový uptake. Acetyl-koenzym A je vytvářen

v Krebsově cyklu přímo v neuronu (Lincová a Farghali, 2007). Po uvolnění z vazby na receptoru je ACh odbouráván enzymy acetylcholinesterasou (AChE), u Alzheimerovy choroby i butyrylcholinesterasou (BuChE).

AChE má více forem. U zdravého mozku převažuje tetramerní G4 forma, kdežto monomerní G1 forma je naprosto minoritní. U Alzheimerovy choroby roste výrazně podíl formy G1 a klesá podíl G4. Navíc je vystupňována i aktivita BuChE, která má za normálu minimální roli. Předpokládá se, že je produkována gliovými buňkami senilních plaků (Jiráček, 2002).

Tyto gliové buňky však neprodukují pouze BuChE, ale i cytokiny, volné kyslíkové radikály a další látky akutní zánětlivé fáze. Dochází ke zvýšené tvorbě prostaglandinů. Uvolněné zánětlivé mediátory vedou k dalšímu poškození neuronů. Volné kyslíkové radikály způsobují peroxidaci lipidů membrány a rovněž tak poškozují neurony. Při neuronálním poškození dochází dále k uvolnění excitačních aminokyselin (glutamátu, aspartátu) a po jejich vazbě na příslušné receptory, především na *N*-metyl-D-aspartátový receptor (NMDA-receptor), k nadměrnému vzestupu vápenatých iontů v cytoplasmě. To vede k aktivaci kaskády apoptické buněčné smrti (Danysz a kol., 2000).

A β pravděpodobně tyto procesy umožňuje, popřípadě je zesiluje. Dle tzv. „amyloidové hypotézy“ A β přímo aktivuje vnitrobuněčný enzym (glykogensynthasa-kinasa-3 β), který je odpovědný za degeneraci cykloskeletárního τ -proteinu (Patočka, 2009).

3.1.1.1.4 Diagnostika

Diagnostika Alzheimerovy choroby se opírá především o měření změny kognitivních funkcí. K tomuto účelu je využíváno několik testů (dotazníkový typ) s mezinárodním škálováním. Jedním z nejznámějších je **MMSE** (*Mini-Mental State Examination*), kde vyšetřující klade jednoduché otázky pacientovi, který na tyto odpovídá, správná odpověď se boduje. Jinými testy jsou: **ACE-R** (*Addenbrook Cognitive Examination-Revised*), který je značně podrobnější, **CDT** (*Clock Drawing Task*)

jednoduchý, orientační test, spočívá v tom, že se pacient snaží zakreslit zadaný čas na hodinovém ciferníku. Existují i dotazníkové testy, na které odpovídá pacientovi blízká osoba. Takovými testy jsou **FAQ** (*Functional Activities Questionnaire*) a **DAD** (*Disability Assessment in Dementia*). Diagnóza se dále potvrzuje výskytem jistých abnormalit při pomocných vyšetření magnetické rezonance mozku nebo vyšetření mozkomíšního moku (Jiráček a Laňková, 2007).

3.1.1.1.5 Terapie Alzheimerovy choroby

Terapie Alzheimerovy choroby je komplexní. Měla by zahrnovat nebiologickou i biologickou složku. Mezi nebiologické přístupy patří: reedukace nemocného, práce s osobami blízkými a v pokročilejších stádiích nepostradatelná ošetrovatelská péče. Za biologickou léčbu se považuje především farmakoterapie (Jiráček, 2002).

3.1.1.1.5.1 Farmakoterapie Alzheimerovy choroby

Terapie této choroby pomocí farmak má hned několik směrů, z nichž nejdůležitějšími jsou: náhrada nedostatkových mediátorů, ovlivnění metabolismu neuronů, likvidace volných radikálů, ovlivnění excitotoxicity, další... .

3.1.1.1.5.1.1 Náhrada nedostatkových mediátorů

Tento směr spočívá ve dvou přístupech. Prvním je dodávání prekurzorů a druhým podávání inhibitorů cholinesterasových enzymů. Oba mají odstranit nedostatek ACh na synaptické štěrbině, který je způsobený nízkou aktivitou CAT.

Poněvadž podání ACh není pro jeho ultrakrátký poločas možné a ani samotný cholin díky svému náboji neprochází přes HEB, omezuje se podávání prekurzorů na fosfatidylcholin (**lecithin**). Tento je nutno podávat ve vysokých dávkách 10-20 g/den. Ačkoliv neexistuje žádná klinická studie potvrzující přímý přínos takového podávání při

Alzheimerově chorobě (Higgins a Flicker, 2000), může lecithin někdy pomoci, převážně v kombinační terapii.

Hlavní léčiva užívající se v současné terapii Alzheimerovy demence (AD) jsou inhibitory cholinesterasových enzymů (AChE, BuChE). Nutností je, aby inhibovaly především ty formy příslušných enzymů, které se vyskytují v mozku, neboť periferní účinky tuto terapii limitují (Lüllmann a kol., 2007). **Donepezil** je převážně selektivní inhibitor AChE s delším poločasem, což umožňuje podávání 1× denně, perorálně. **Rivastigmin** působí na AChE i BuChE (Jiráček, 2002), navíc preferuje G1 formu AChE (Lincová a Farghali, 2007), podávání 2× denně, perorálně. **Galanthamin** kromě reverzibilní inhibice AChE navíc moduluje nikotinové presynaptické i postsynaptické receptory, užití 2× denně, perorálně (Jiráček, 2004). Galanthamin (benzofenantridinový alkaloid) se získává izolací z *Galanthus woronowii* a *Narcissus sp.*(*Amaryllidaceae*), avšak již existují i četné syntetické postupy, které výrazně snižují jeho cenu. Dalším přírodním alkaloidem je Huperzin A, vyskytující se v *Huperzia serrata* (*Lycopodiaceae*), který se jeví jako velice nadějným léčivem (Zhang a Tang, 2006) pro léčbu AD. Má relativně delší poločas, s minimem periferních NÚ. Prozatím je v některých zemích užíván pouze jako potravní doplněk.

V dnešní době jsou inhibitory cholinesteras považovány za léčiva volby u lehkých a středních forem AD. S léčbou je však třeba započít co nejdříve, neboť prokazatelně zpomalují (nezastavují) progresi choroby přibližně o rok, dle některých studií až o 4 roky (galanthamin) (Rogers a kol., 1998; Rösler a kol., 1999; Scott a Goa, 2000; Fialová a Vlček, 2010).

Používání inhibitorů AChE, BuChE má tedy v této indikaci své nenahraditelné místo a proto i dnes je výzkum v této oblasti stále perspektivní, ačkoliv je znám fakt, že léčba tímto typem léčiv je pouze symptomatická a nedokáže zabránit další progresi.

3.1.1.1.5.1.2 Ovlivnění metabolismu neuronů

U všech demencí, je snížen celkový metabolismus patologické neuronální tkáně, zjistitelný i některými zobrazovacími metodami (PET)(Jirák, 2002). Z tohoto důvodu jsou používány některé látky zlepšující v jistém směru metabolismus nervové tkáně. Sem spadají nootropika. Jejich benefit u této choroby nebyl dosud spolehlivě prokázán. Mírným přínosem se zdají být v těch případech, kdy je demence způsobená spíše vaskulárními příčinami, popřípadě smíšené etiologie (Fialová a Vlček, 2010).

Piracetam, u nás hojně užívaný, kromě mírného zvýšení metabolismů neuronů vykazuje i mírné hemodynamické účinky. Užívá se v dávkách nad 2400 mg/den u počátečních případů AD. **Pyritinol** má navíc i antioxidační aktivitu. Prozatím nejvíce prokazatelný účinek při AD je nalézán u standardizovaného extraktu z *Ginkgo biloba* (**EGb 761**), který má komplexnější efekt (antiagregační, antioxidační, nootropní, mírně vazodilatační a dokonce má schopnost i mírně blokovat NMDA-receptor)(Le Bars a kol., 1997; Jirák, 2002; Fialová a Vlček, 2010). Jisté úspěchy při terapii AD nacházíme i u sympatolytického **nicergolinu** (Pydychová, 2002).

Kromě nootropik, je někdy za účelem ovlivnění metabolismu mozku užíván i **N-Acetyl-L-karnitin** (potravní doplněk), který se účastní metabolismu acetyl-koenzymu A, což rezultuje navíc k zvýšené syntéze ACh.

3.1.1.1.5.1.3 Likvidace volných radikálů

Jak již bylo dříve uvedeno, volné kyslíkové radikály se taktéž významným způsobem zapojují do patogeneze Alzheimerovy choroby. Proto se podpůrně užívají i látky antioxidačního charakteru, popřípadě jako prevence.

Při léčbě se tedy můžeme setkat s vitamínem E (**α -tokoferol**)(Sano a kol., 1997) v dávce nad 2000 UI/den, resveratrolem a dalšími. Podávání **selenu** má význam v souvislosti s enzymem glutathionperoxidasou, likvidujícím volné kyslíkové radikály. Významným je i antioxidační vliv EGb 761 (Pydychová, 2002).

3.1.1.1.5.1.4 Ovlivnění excitotoxicity

Nadměrné působení glutamátu a aspartátu na NMDA-receptoru (Ca^{2+} ionotropní) vede ke zvýšení intracelulárního kalcia v neuronech, což může nakonec vyústit v apoptózu.

Memantin, látka schopná tento receptor blokovat, se používá v terapii především těžších stavů spojených s Alzheimerovou chorobou. Zlepšují se nejen kognitivní funkce, ale i psychické a behaviorální příznaky AD a to v míře nedosažitelné jinou léčbou (Reisberg a kol., 2003). Logická a výhodná je i jeho kombinace s inhibitory cholinesteras (Raina a kol., 2008). Nevýhodou této kombinace je značná ekonomická náročnost.

3.1.1.1.5.1.5 Další možnosti terapie

Další snahou je potlačit prozánětlivou aktivitu gliových buněk senilních plaků pomocí nesteroidních antiflogistik (ibuprofen, flurbiprofen, acetylsalicylová kyselina a jiné), avšak výsledky jsou dodnes nejasné. Observační studie říkají, že užívání těchto vede ke snížení rizika vzniku Alzheimerovy choroby, avšak randomizované toto popírají a nenacházejí ani žádný přínos v léčbě již manifestované AD (Szekely a Zandi, 2010).

Největší naděje je dnes vkládána do léčiv ze třídy inhibitorů γ -sekretasy. Některá jsou již v klinických studiích (**Semagacestat**, konec III. fáze v roce 2012). Přestože mohou způsobit řadu NÚ (hyperplazie střevních pohárkových buněk, atrofii thymu, změnu barvy vlasů a jiné), stále se doufá, že jejich užití povede ke zpomalení nebo zastavení AD (Panza a kol., 2010).

3.1.2 Myasthenia gravis

3.1.2.1 Charakteristika

Myasthenia gravis (MG) je nejdůležitějším onemocněním nervosvalové ploténky (NSP). Tato choroba je charakterizována slabostí a abnormální unavitelností příčně pruhovaného svalstva. K tomuto dochází z důvodu přerušení acetylcholinové neuromediace v postsynaptické části NSP na základě autoimunitní etiologie. Touto chorobou každý rok onemocní více jak 150 obyvatel České republiky (stoupající incidence), prevalence je odhadována mezi 130–150/mil. obyvatel (Piřha a Ambler, 2004). MG i její terapie je již v současné době poměrně dobře prostudována.

3.1.2.2 Patofyziologie a diagnostika

Jak již bylo zmíněno, MG je typickým autoimunitním onemocněním. Asi v 75 % případů nalézáme autoprotilátky proti nikotinovým acetylcholinovým receptorům, 15 % případů má tyto protilátky taktéž a navíc trpí thymomem, 7 % vykazuje autoprotilátky proti specifické svalové kinase (MuSK) a 8 % pacientů nevykazuje ani jeden typ těchto autoprotilátek.

Zajímavou úlohu v patogenezi choroby hraje thymus. Ten obsahuje svalům podobné myoidní buňky, jejichž antigenní epitopy jsou některými T-lymfocyty rozpoznávány jako tělu cizí. Za fyziologického průběhu by tyto T-lymfocyty neměly dosáhnout konečné imunokompetence a měly by být v thymu exterminovány (Piřha a Ambler, 2004).

Protilátky namířené proti nikotinovým receptorům NSP jsou polyklonálního typu, především třídy IgG. Poté, co se protilátka naváže na dva sousední nikotinové receptory, aktivuje komplement, který svou lytickou činností dané receptory zničí. Tímto způsobem je výrazně snížen počet těchto receptorů na NSP. Kromě toho dochází i k uvolňování prozánětlivých mediátorů, které dále stimulují zánětlivou reakci. Pomocí elektronové

mikroskopie bylo prokázáno: simplifikace junkčních záhybů NSP, rozšíření štěrbin NSP, snížení počtu nikotinových receptorů a jejich snížená resyntéza (Špalek, 2008). Tyto procesy tedy vedou k celkové slabosti a abnormální unavitelnosti svalů.

Protože se MG nevyznačuje žádným specifickým příznakovým komplexem, je klinický stav každého pacienta poněkud odlišný podle postižené svalové skupiny (obličejové, šíjové, pletencové, respirační, generalizovaně). Nejčastěji se jako první příznaky objeví poruchy v okohybné motorice, méně únavnost žvýkacích svalů a končetin. Svalová slabost se manifestuje především po fyzickém výkonu, po odpočinku se zlepší. Existují tedy různé zátěžové testy, podle daných postižených svalových skupin. Kupříkladu **Seemanův** test je založen na zvýraznění špatné artikulace po delším hlasitém čtení, **Simpsonův** na neschopnosti udržet oční víčko otevřené po usilovném pohledu vzhůru. Při diagnostické nejasnosti se aplikuje i. v. neostigmin a pozoruje se zlepšení stavu. Další diagnostika se opírá o laboratorní vyšetření séra na výše zmiňované protilátky, popřípadě elektrofyzilogická vyšetření, CT mediastina (Pit'ha a Ambler, 2004).

3.1.2.3 Farmakoterapie

Současná léčba MG je chronickou záležitostí. Vede k značnému ústupu symptomů MG, případě k vymizení veškerých projevů. Můžeme ji rozdělit na imunosupresivní a symptomatickou. Mimo terapie pomocí léčiv se uplatňuje i plazmaferéza a v některých případech MG asociovaných s výskytem auto protilátek vůči acetylcholinovým nikotinovým receptorům i thymektomie.

3.1.2.3.1 Imunosupresivní léčba

Imunosupresivní medikace má směřovat k dlouhodobé remisi projevů. Léky první volby jsou kortikosteroidy (**prednison, methylprednisolon**). Tato terapie s sebou může přinášet řadu NÚ: retence tekutin, hypertenze, abdominální obezita, zvýšená vnímavost

k infekčním onemocněním, ulcerace GIT, osteoporóza, ... (Lincová a Farghali, 2007). Z toho důvodu se někdy vhodně kombinuje s **azathioprinem**, což často umožňuje snížení dávek kortikosteroidů (Špalek, 2008).

3.1.2.3.2 Symptomatická léčba

Symptomatická léčba je uskutečňována výhradně inhibitory AChE. Na rozdíl od Alzheimerovy choroby je v tomto případě vhodné, aby tyto nesly minimum centrálních účinků, tudíž neprocházely skrz HEB. Z tohoto důvodu jsou užívány látky kvartérní povahy.

Pyridostigmin je lékem volby. Jeho účinek přetrvává zhruba 3–5 hodin. Dávkování je odvislé dle stavu pacienta a jeho denní aktivitě, zpravidla je nutno užívat 3× až 4× denně, perorálně. Ambenonium je indikováno méně často. Má i současné agonistické účinky na nikotinové receptory NSP. Je vhodné i pro případy resistantní k léčbě pyridostigminem. Dávkování opět individuální, 3× až 4× denně, perorálně. Léčivem s nejdelším účinkem v této indikaci je distigmin (24–36 hodin). Většinou se kombinuje s předchozími. Naopak neostigmin disponuje nejkratším (2–3 hodiny) a nejrazantnějším účinkem. Užíván je především v diagnostice (Pit'ha a Ambler, 2004).

I léčba pomocí inhibitorů AChE nese svá úskalí. Klasickými NÚ jsou salivace, zvýšená bronchiální sekrece, průjem, křeče v GIT, polakisurie a další. Při předávkování dochází k zajímavému fenoménu, kdy po počátečním zvýšení síly dojde po nadměrném dráždění NSP ke snadnější únavnosti a oslabení kontrakcí v důsledku depolarizační blokády. U myastheniků je tedy nutno pečlivě rozlišit poddávkování od možného předávkování inhibitory AChE (Lincová a Farghali, 2007).

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

3.2.1 Preferované jméno

Corydalis cava (L.) Schweigg. & Körte (Hejný a Slavík, 1988).

3.2.2 Synonyma

Fumaria cava (L.) Miller, *Fumaria bulbosa* (L.) subsp. *cava* (L.) Ehrh., *Capnoides cava* (L.) Moench, *Pistolochia cava* (L.) Bernh., *Capnites cava* (L.) Dumort., *Corydalis bulbosa* subsp. *cava* (L.) Bonnier & Layens (Hejný a Slavík, 2002).

3.2.3 Botanický popis

Dymnivka dutá je vytrvalá bylina dorůstající výšky 15–30 cm. Z duté podzemní hlízy velikosti vlašského ořechu vyrůstá přímá lysá lodyha, bez šupin. Celý prýt počátkem léta usychá a rostlina přečkává zbytek vegetačního období pod zemí. Lodyha nese většinou dva listy sivozelené barvy. Vyrůstají na krátkých řapících, které mají v obrysu tvar široce trojboký. Čepel je 2× trojčetná. Lístky jsou obvejčité, hluboce laločnaté až dělené, tupé nebo špičaté. Oboupohlavní souměrné květy, které vyrůstají v úžlabí celokrajných a vejčitých listenů, se skládají do přímého a bohatého hroznů. 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 s 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 plodolistů. Plodem je podlouhlá jednopouzdrá tobolka o velikosti

do 25 mm s dvěma chlopněmi. Semena jsou leskle černá s bělavým pentlicovitým masitým přívěškem (Pilát a Ušák, 1963; Hejný a Slavík, 1988).

3.2.4 Ekologie

Dymnivka dutá roste většinou ve světlých hájích, lužních lesích a smíšených listnatých lesích, křovinách na kyprých humózních, slabě kyselých až neutrálních půdách, a to jak v nížinách, tak i v podhůří. Rostlina kvete od března do začátku května, obvykle můžeme vidět růžově i žlutavě bíle kvetoucí jedince pohromadě, mnohdy ve velkém množství. Semena jsou myrmekochorní. Hlíza je mrazuvzdorná, vytrvalá (Novák a Svolinský, 1938; Pilát a Ušák, 1963; Hejný a Slavík, 1988).

3.2.5 Rozšíření

V současné době se dymnivka dutá přirozeně vyskytuje v těchto oblastech (USDA, 2001):

- **ASIE**-mírný pás

západní Asie: **Írán** (sever), **Turecko**;

Kavkaz: **Ázerbajdžán**, **Gruzie**, **Ruská federace** – Předkavkazsko;

- **Evropa**

severní Evropa: **Dánsko**, **Švédsko** (jih);

střední Evropa: **Rakousko**, **Belgie**, **Česká rep.**, **Slovensko**, **Německo**, **Maďarsko**, **Polsko**, **Švýcarsko**;

východní Evropa: **Lotyšsko**, **Litva**, **Ruská federace** – evropská část (jih), **Ukrajina** (včetně Krymu);

jihovýchodní Evropa: **Albánie**, **Bulharsko**, **státy dřívější Jugoslávie**, **Řecko**, **Itálie**, **Rumunsko**;

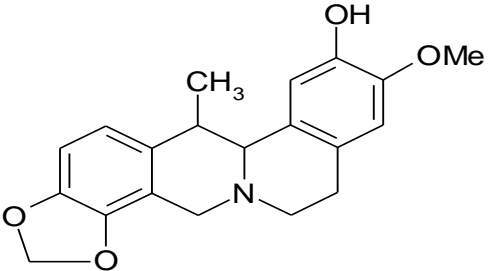
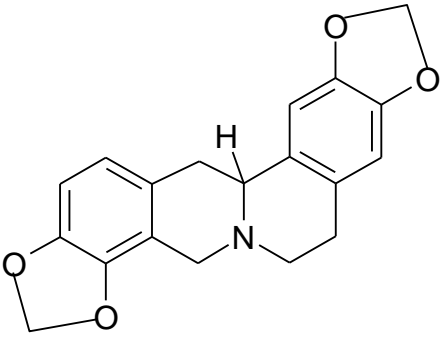
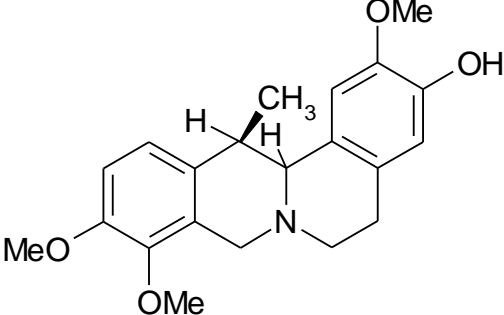
jihozápadní Evropa: **Francie** (jih a východ), **Portugalsko** (severovýchod), **Španělsko**.

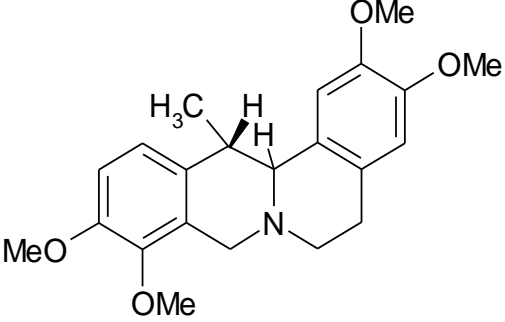
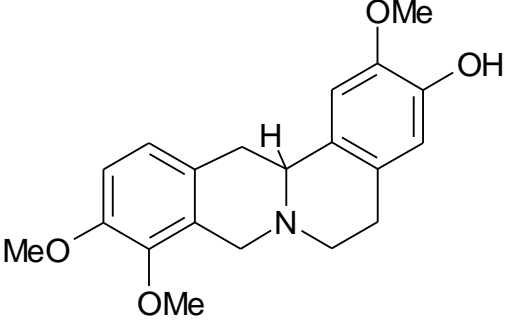
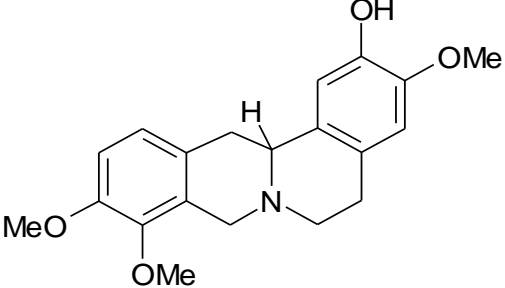
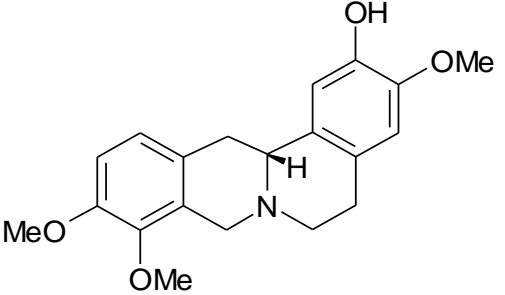
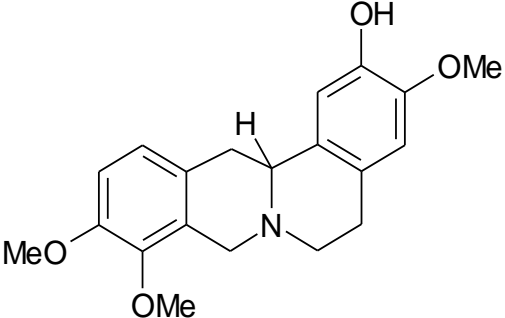
3.2.6 Isochinolinové alkaloidy dymnivky duté

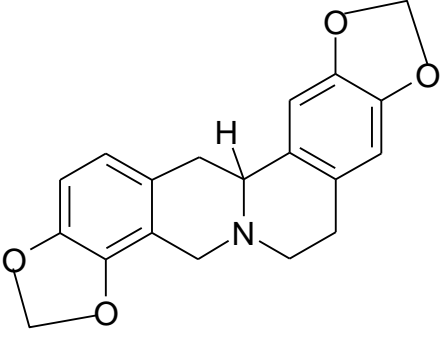
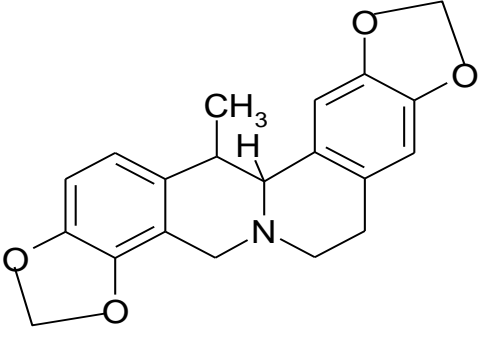
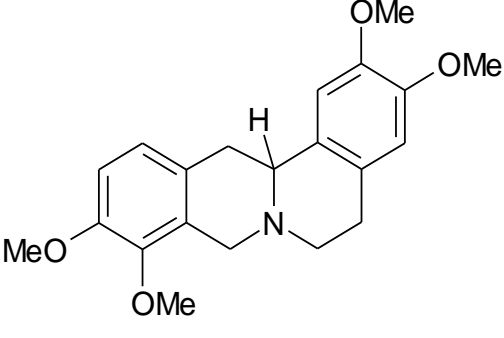
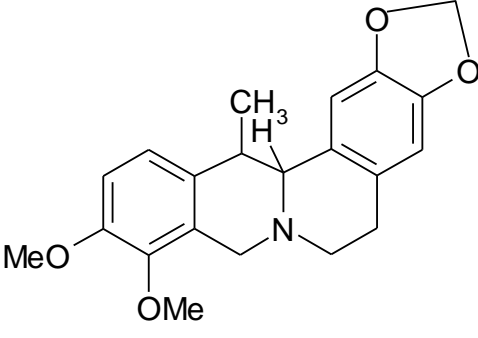
Doposud bylo z podzemní hlízy dymnivky duté izolováno několik typů alkaloidů (tab. 1–6).

3.2.6.1 Terciární alkaloidy

Tab. 1: Terciární alkaloidy z dymnivky duté – protoberberinový typ.

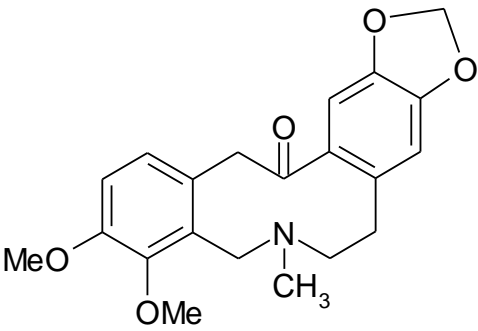
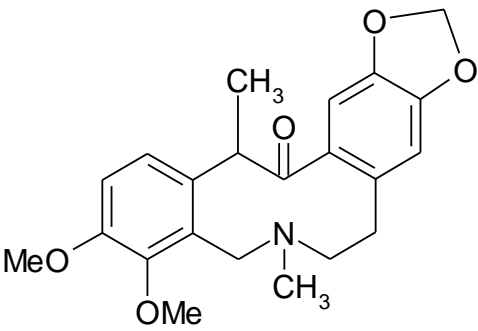
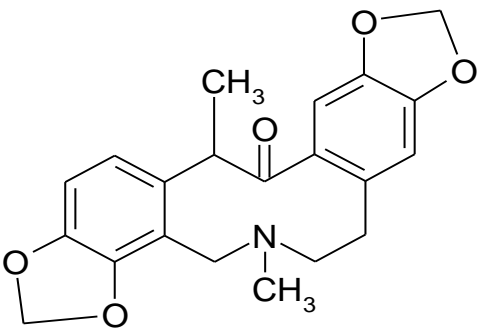
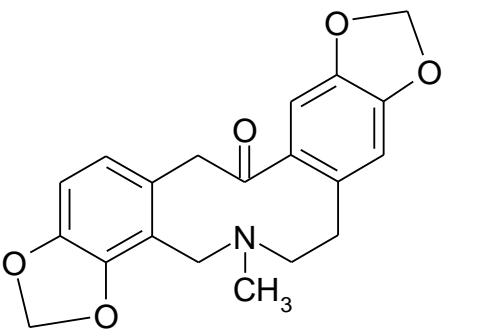
Název	Vzorec	Literatura
apokavidin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)
(+)-kanadin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)
(+)-korybulbin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)

(+) -korydalin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)
(+) -korypalmin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)
(±)- a (+)-isokorypalmin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)
(-) -skoulerin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)
(+) -skoulerin		(Blaschek a kol., 2009)

<p>(+)-stylopin</p>		<p>(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)</p>
<p>(+)-tetrahydrokorisamin</p>		<p>(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)</p>
<p>(±)- a (+)-tetrahydropal- matin</p>		<p>(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)</p>
<p>(±)- a (+)-thaliktrikavin</p>		<p>(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)</p>

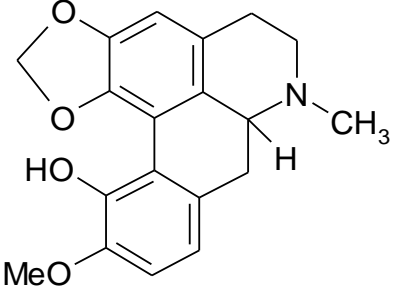
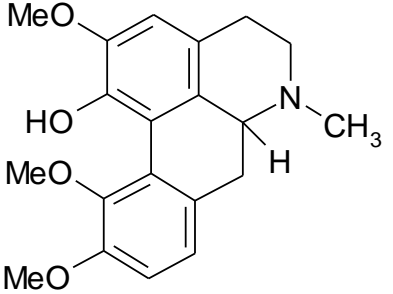
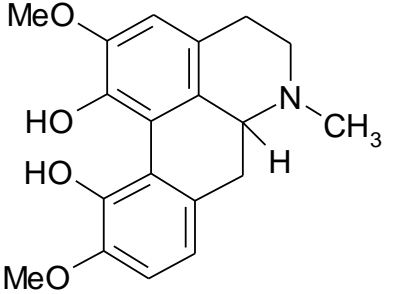
Tab. 2: Terciární alkaloidy z dymnivky duté – protopinový typ.

Název	Vzorec	Literatura
-------	--------	------------

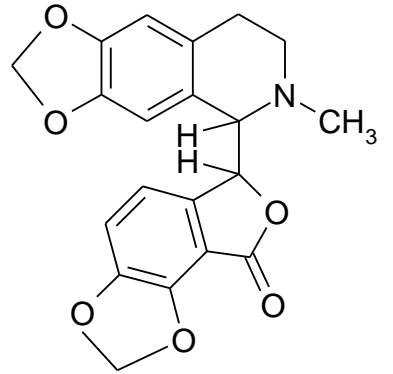
allokryptopin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)
korykavamin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)
(±)- a (+)-korykavidin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)
protopin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)

Tab. 3: Terciární alkaloidy z dymnivky duté – aporfinový typ.

Název	Vzorec	Literatura
-------	--------	------------

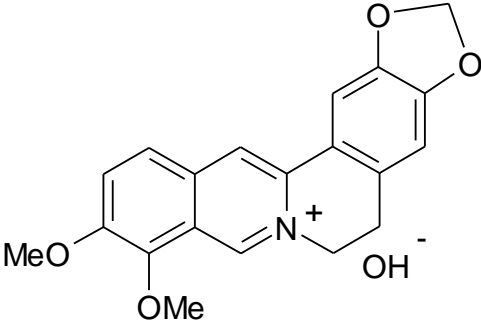
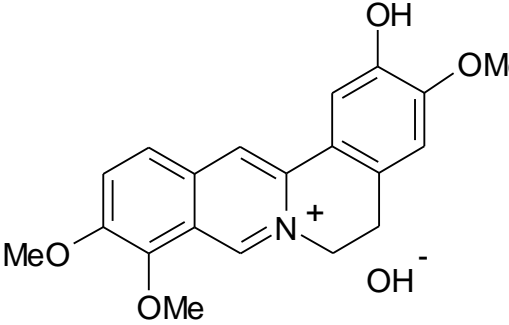
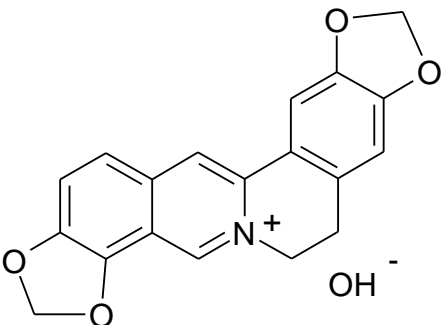
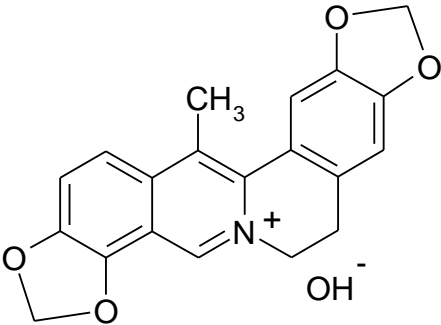
(+) -bulbokapnin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)
(+) -korydin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)
(+) -korytuberin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)

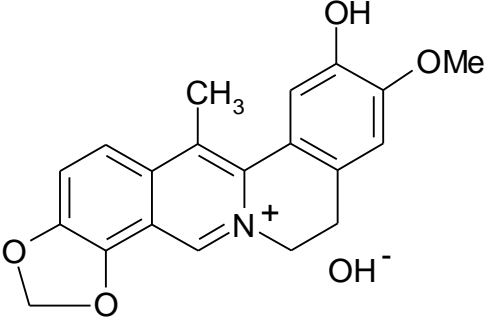
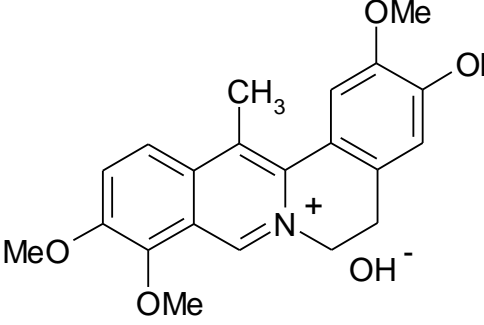
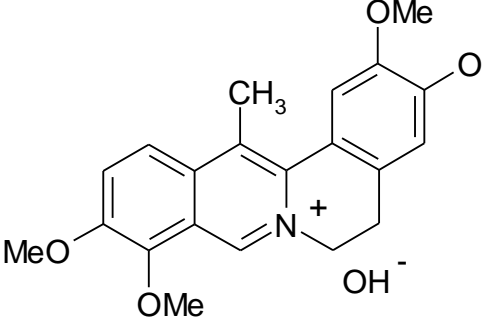
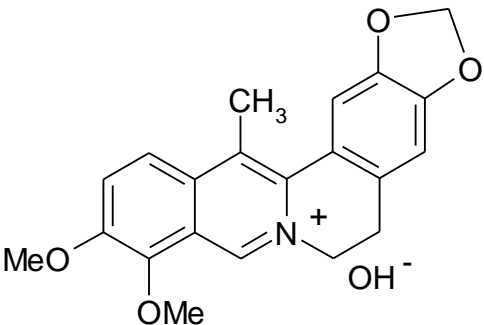
Tab. 4: Terciární alkaloidy z dymnivky duté – ftalylisochinolinový typ.

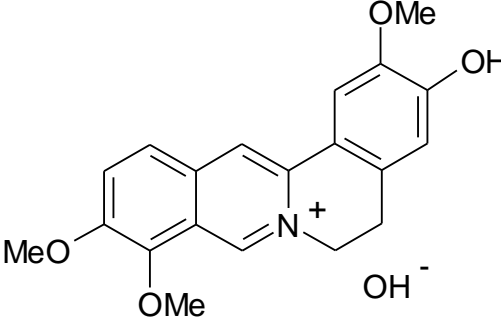
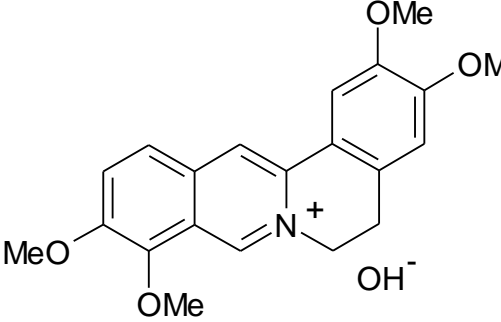
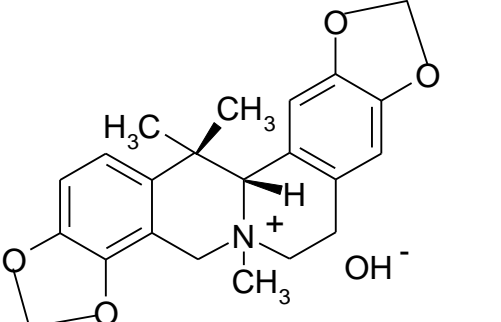
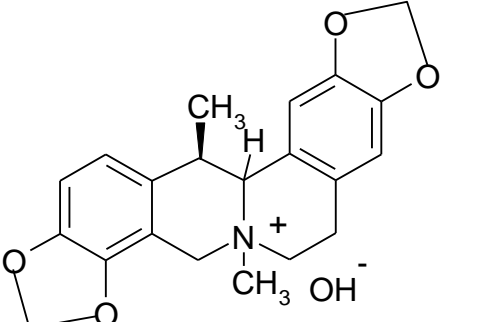
Název	Vzorec	Literatura
kapnoidin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)

3.2.6.2 Kvartérní alkaloidy

Tab. 5: Kvartérní alkaloidy z dymnivky duté – protoberberinový typ.

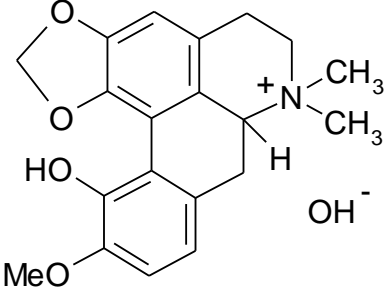
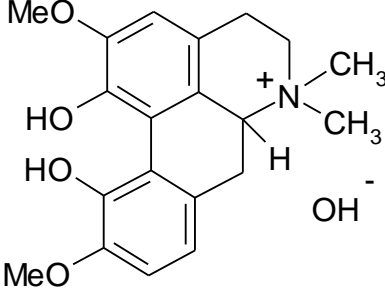
Název	Vzorec	Literatura
berberin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)
kolumbamin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)
koptisin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)
korysamin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)

dehydroapokavidin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)
dehydrokorybulbin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)
dehydrokorydalin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)
dehydrothaliktrikavin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)

jatrorrhizin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)
palmatin		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)
α-tetrahydrokorysamin-methohydroxid		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)
(+)–α-stylopin-methohydroxid		(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)

Tab. 6: Kvartérní alkaloidy z dymnivky duté – aporfinový typ.

Název	Vzorec	Literatura
-------	--------	------------

<p>(+)-bulbokapnin-methohydroxid</p>		<p>(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)</p>
<p>(+)-magnoflorin</p>		<p>(Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009)</p>

3.2.6.3 Biologická aktivita alkaloidů dymnivky duté

3.2.6.3.1 Acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa a jejich inhibice

AChE je vysoce specifický a výkonný enzym, který je zodpovědný za rychlé ukončení účinků ACh v nervové tkáni (do 1 ms). Vyskytuje se především v cholinergních neuronech a v okolí cholinergních synapsí (ve vysokých koncentracích se nachází na nervosvalovém spojení). Hydrolyzuje především ACh uvolněný nervovou stimulací do synaptické štěrby a uvnitř nervových zakončení odpovídá za rozklad cytoplazmatického ACh. Druhým degradačním enzymem je méně substrátově specifická tzv. pseudocholinesterasa (BuChE). Ta je přítomna např. v plazmě, játrech a v omezené míře i v nervové tkáni. Funkce BuChE není pro zdravého člověka plně objasněna. Její role však vystupuje do popředí při odbourávání některých léčiv (suxamethonium, prokain, propanidid). V této souvislosti existují jisté genetické odchylky, které se manifestují především výrazným prodloužením účinku těchto léčiv (Lincová a Farghali, 2007). Další oblastí, kde se BuChE nezanedbatelně uplatňuje je právě Alzheimerova choroba, kde BuChE vykazuje zvýšenou aktivitu v oblastech senilních plaků (Jiráček, 2002).

Inhibicí těchto enzymů (AChE a BuChE), ať už reverzibilní nebo ireverzibilní, dochází k nahromadění endogenního ACh na muskarinových respektive nikotinových receptorech a tím k jejich hyperstimulaci. Inhibitory AChE dnes figurují mimo jiné jako léčiva Alzheimerovy choroby (donepezil, rivastigmin, galantamin) nebo myastenia gravis (neostigmin, pyridostigmin, distigmin) (Lincová a Farghali, 2007). A jak již bylo výše uvedeno dodnes je jejich studium atraktivní.

3.2.6.3.2 Inhibice AChE a BuChE alkaloidy z dymnivky duté

Již v roce 1983 byla studována *in vitro* inhibiční aktivita některých isochinolinových alkaloidů. AChE pocházela z krysího mozkového homogenátu a BuChE z lidského séra. Alkaloidy pocházely z různých zdrojů (Ulrichová a kol., 1983a,b). Získané hodnoty IC₅₀ testovaných látek, vyskytující se současně v dymnivce duté shrnuje tab. 7.

Tab. 7: *In vitro* aktivita vybraných isochinolinových alkaloidů vůči AChE a BuChE (volně dle Ulrichová a kol., 1983a,b).

Alkaloid	IC ₅₀ (μM)	
	AChE	BuChE
berberin	0,98	>100
koptisin	5,8	>100
kolumbamin	0,46	9,0
jatrorrhizin	2,0	96
(+)-bulbokapnin	900	28

Z této tabulky vyplývá, že nejvýznamnější aktivitu vůči AChE vykazuje z těchto alkaloidů berberin, kdežto k BuChE kolumbamin (Ulrichová a kol., 1983a,b).

V roce 2007 byla studována *in vitro* inhibiční aktivita vůči AChE, BuChE tří alkaloidů izolovaných z dymnivky duté (bulbokapnin, korydin, korydalin). AChE, která byla užita pro stanovení inhibice pocházela z elektrického úhoře a zdrojem BuChE bylo koňské sérum (Adsersen a kol., 2007). Výsledky této studie shrnuje tab. 8.

Tab. 8: *In vitro* aktivita alkaloidů z *Corydalis cava* vůči AChE a BuChE (volně dle Adsersen a kol., 2007).

Alkaloid	IC ₅₀ (μM)	
	AChE	BuChE
bulbokapnin	40±2	83±3
korydalin	15±3	>100
korydin	>100	52±4
galanthamin (standard)	1,4±0,2	4,0±1,4

Jak z této studie vyplývá, tak ani jedna z testovaných látek nedosahovala hodnoty standardu. Nejvýznamnější inhibiční aktivitu na acetylcholinesterasu vykazuje korydalin a vůči butyrylcholinesterase korydin. Bulbokapnin byl ale schopen inhibovat obě cholinesterasy v μM množství (Adsersen a kol., 2007).

Inhibiční aktivita byla studována také u dalších alkaloidů identifikovaných v dymnivce duté (*Corydalis cava*). Pro příslušné testy však byly příslušné alkaloidy izolovány z jiných druhů rostlin.

V roce 2008 byla stanovena inhibiční aktivita na AChE alkaloidů izolovaných z *Corydalis turtschaninovii*. AChE pro tento záměr byla získána z mozkové kůry myší. Jako standard byl použit takrin (Hung a kol., 2008). Získané hodnoty IC_{50} testovaných látek, vyskytující se současně v dymnivce duté shrnuje tab. 9.

Tab. 9: *In vitro* aktivita alkaloidů z *Corydalis turtschaninovii* vůči AChE (volně dle Hung a kol., 2008).

Alkaloid	IC_{50} (μM)
korydalin	30,7 \pm 1,5
stylopin	15,8 \pm 1,2
protopin	14,5 \pm 0,5
tetrahydropalmatin	41,3 \pm 2,2
palmatin	10,4 \pm 0,4
berberin	4,7 \pm 0,2
takrin (standard)	0,17 \pm 0,02

Z tabulky plyne, že nejvyšší inhibiční aktivitu na AChE z testovaných látek vykazuje kvartérní alkaloid berberin, nedosáhl ale aktivity standardu (Hung a kol., 2008).

V roce 2009 byla studována inhibiční aktivita vůči AChE i BuChE alkaloidů získaných z oddenku *Coptis chinensis*. Některé z těchto můžeme nalézt rovněž v dymnivce duté. AChE, užitá pro stanovení inhibice pocházela z elektrického úhoře a zdrojem BuChE bylo koňské sérum. Jako standard byl použit fysostigmin (Jung a kol., 2009). Získané hodnoty IC_{50} testovaných látek, vyskytující se současně v dymnivce duté shrnuje tab. 10.

Tab. 10: *In vitro* aktivita alkaloidů z *Coptis chinensis* vůči AChE a BuChE (volně dle Jung a kol., 2009).

Alkaloid	IC ₅₀ (μM)	
	AChE	BuChE
berberin	0,44±0,04	3,44±0,26
palmatin	0,51±0,00	6,84±0,07
jatrorrhizin	0,57±0,03	6,34±0,60
koptisin	0,80±0,01	5,81±0,49
magnoflorin	>100	18,14±3,12
fysostigmin (standard)	0,02±0,00	0,05±0,02

Z tabulky plyne, že nejvyšší inhibiční aktivitu na AChE i BuChE z testovaných látek vykazuje kvartérní alkaloid berberin, nedosáhl však zdaleka aktivity standardu (Jung a kol., 2009).

V roce 2002 byly studovány inhibiční účinky na AChE alkaloidů izolovaných z *Corydalis decumbens* (Xu a kol., 2002), některé alkaloidy se současně vyskytují v *Corydalis cava* (např. (-)-skoulerin), avšak informace o této studii jsou nedostupné z důvodu jazykové bariéry.

Zdroje AChE, BuChE byly v různých studiích mnohdy odlišné. Z tohoto důvodu je nevhodné vzájemně porovnávat zjištěné hodnoty IC₅₀ 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 potenciálně aktivních látek.

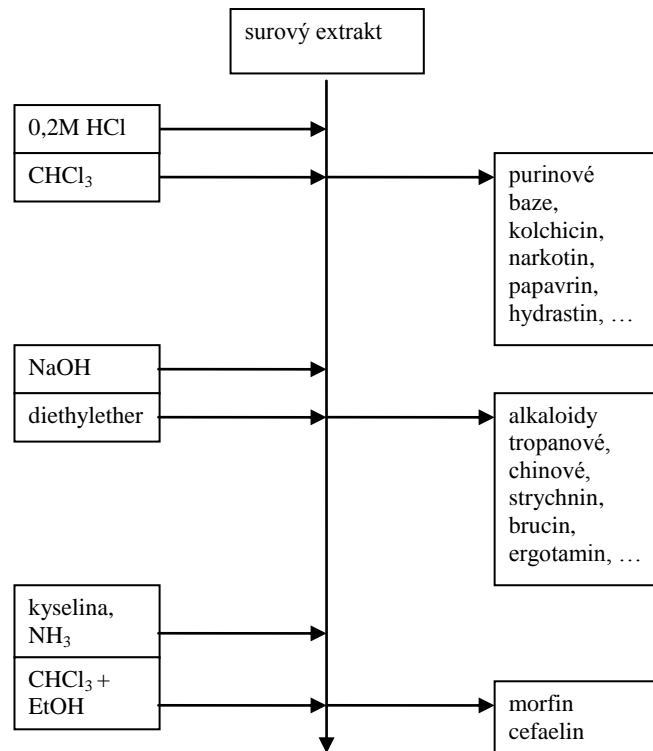
3.3 Izolace alkaloidů

Alkaloidy se obvykle v rostlinném materiálu nacházejí ve formě solí s organickými i anorganickými kyselinami, někdy jako komplexy s taninem. Tyto jsou takřka vždy doprovázeny velkým množstvím látek jiné povahy (balast), což způsobuje obtíže a časovou náročnost při izolaci a čištění alkaloidů přítomných v surovém extraktu. Obvykle se za těmito účely provádí několikanásobné vytřepávání volných bazí alkaloidů z bazické vodné fáze do organického rozpouštědla (chloroform, diethylether) s následnou re-extrakcí do okyselené vodné fáze (alkaloidy jako soli) (Golkiewicz a Gadzikowska, 1999). Poté

následují klasické metody jako krystalizace, sloupcová a tenkovrstvá chromatografie vedoucí až k zisku jednotlivých alkaloidů. Takto se postupuje především při získávání terciárních alkaloidů, kde lze změnami pH prostředí jednoduše měnit jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Avšak separační metody vhodné pro kvartérní alkaloidy jsou poněkud více komplikované (Grycová a kol., 2007).

3.3.1 Izolace za použití fyzikálních metod

Jednou z prvních metod, použitých při systematickém dělení alkaloidů, byla metoda podle Stase-Otta, při které jsou nejprve z mírně kyselého prostředí odstraněny mírně bazické látky (např. purinové baze, kolchicin, narkotin a jiné), zbylá vodná fáze je alkalizována louhem a vytřepána nejprve diethyletherem, vodná fáze pak směsí $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (9 + 1); každá z organických fází v sobě nese alkaloidní terciární baze jiného charakteru (Wichtl, 1971).



Obr. 2: Schéma metody Stase-Otta (volně dle Wichtl, 1971).

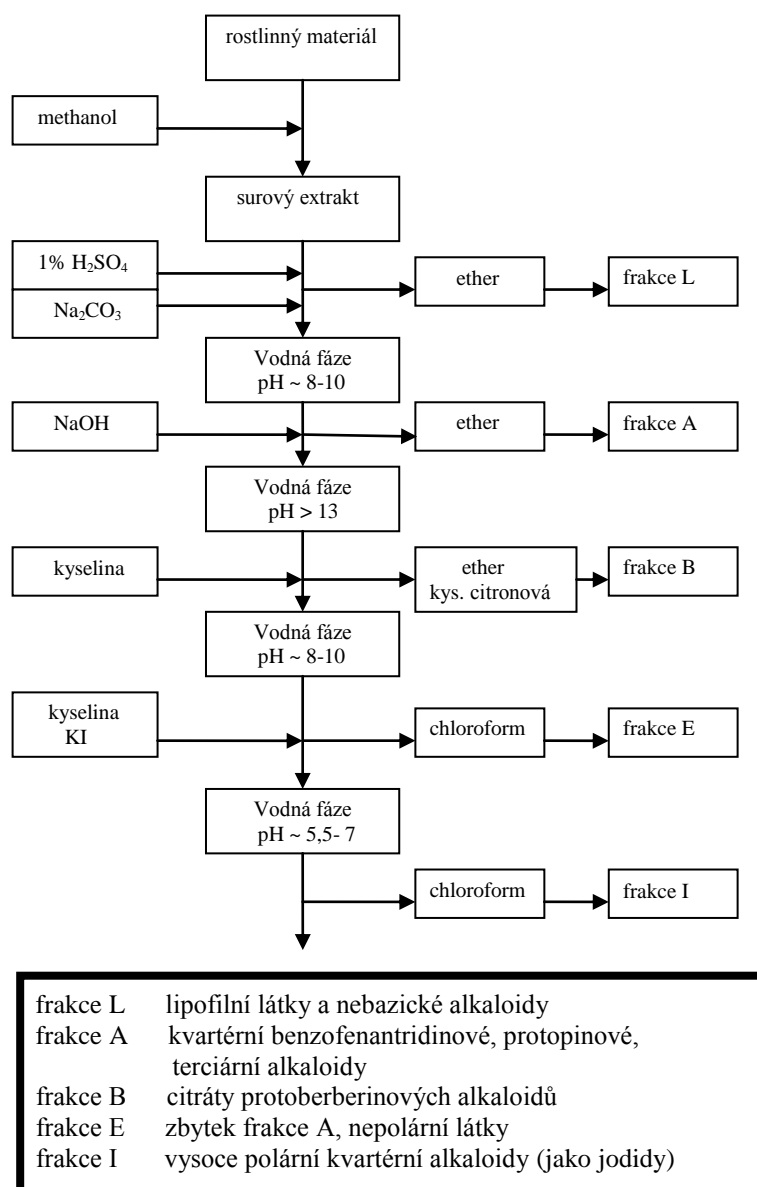
Uvedený postup je však příliš obecný a z preparativního hlediska se výrazně neosvědčil. Velmi sofistikovanou metodu navrhl J. Slavík se svojí pracovní skupinou, v rámci izolace isochinolinových alkaloidů z různých rostlinných taxonů: alkaloidy v extraktu zbaveném etanolu, jsou převedeny do formy solí silnou kyselinou, roztok je dokonale zfiltrován a zalkalizován do dvou stupňů: na pH ~ 8–10 vytřepán diethyletherem (terciární baze slabě bazické) a na pH > 13 (terciární baze silně bazické). V některých případech (např. při izolaci morfinu) je potřebné zařadit po vytřepání diethyletherem ještě vytřepání chloroformem, protože morfin se v diethyletheru jen mizivě rozpouští. Do každého z těchto výtřepků přejde směs terciárních alkaloidů obsahujících fenolické a nefenolické baze: jejich rozdělení je snadné nejprve převedením na fenoláty, posléze okyselením na fenoly a následným vytřepáním. Tímto způsobem lze velmi efektivně rozdělit směs až několika desítek alkaloidů na jednotlivé skupiny, které se poté podstatně

snáze dělí obvyklými preparativními technikami (sloupcovou chromatografií na oxidu hlinitém) (Slavík a kol., 1973, 1976, 1979).

Vodné zbytky primárních extraktů však velmi často obsahují (zejména např. u isochinolinových alkaloidů čeledí *Papaveraceae* a *Fumariaceae*) kvartérní alkaloidy. Jejich dělení je možné provést dvojitým způsobem:

1) Převedením pseudohydroxidů kvartérních bazí na jodidy (přidáním nasyceného roztoku jodidu draselného) do chloroformu, lépe do směsi $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (9 + 1); do roztoku přejde nemalé množství balastních látek, které zředí alkaloidní koncentraci a navodí potřebu dělit tuto směs na neutrálním oxidu hlinitém. Vytřepávání lze provádět při $\text{pH} \sim 3$ (HCl) a $\text{pH} \sim 10$ (NH_3), což je velmi příznivé z hlediska dalšího předběžného dělení často komplikované alkaloidní směsi (Slavík a kol., 1973, 1976, 1979),

2) Oddělením alkaloidů ze směsi změnou pH prostředí a polaritou rozpouštědla: primární extrakt zbavený organického rozpouštědla a mechanických nečistot je při $\text{pH} \sim 2$ vytřepán nejlépe diethyletherem (odstranění kyselých a neutrálních látek, např. zbytku tuků, organických kyselin, N-oxidů některých alkaloidů atd.) (Slavíková a kol., 1960), předčištěná vodná fáze je zalkalizována uhličitanem sodným na $\text{pH} \sim 8-10$ (středně bazické terciární baze) a vytřepán také diethyletherem, v němž je většina alkaloidů rozpustná, popřípadě chloroformem. Po této operaci je roztok zalkalizován hydroxidem sodným na $\text{pH} > 13$ a opět vytřepán diethyletherem; takto jsou získány silně bazické alkaloidy, často kvartérní (např. berberin a mnohé další kvartérní protoberberinové baze) (Slavík a kol., 1979). Po neutralizaci obsahuje roztok teoreticky jen kvartérní baze, které je možné izolovat dvojitým způsobem, jak je uvedeno dále.



Obr. 3: Schéma Slavíkovy metody (volně dle Grycová a kol., 2007); bez dělení na fenolové a nefenolové v závěrečné fázi.

3.3.2 Izolace za použití chemických metod

Alkaloidy, vzhledem ke svojí bazické povaze, mají schopnost tvořit komplexy nebo nerozpustné soli. Tuto vlastnost je možno také využít k jejich izolaci z předčištěných extraktů (List a Hörhammer, 1969; Wichtl, 1971). Tato metoda je vhodná především tam,

kde je obsah alkaloidů v extraktu nízký až stopový (obsah v droze setiny až tisíciný procenta). Po smíchání činidla s extraktem se vyloučí práškový sediment, který se dekantuje a dále zpracovává. Jakkoliv se tato metoda jeví jednoduše, skrývá v sobě určité technické problémy, které si někdy vyžádají významné úsilí k jejich odstranění.

Srážecí činidla alkaloidů můžeme rozdělit podle povahy vznikajícího precipitátu (List a Hörhammer, 1969; Wichtl, 1971):

1) Tvorba nerozpustných solí: bromid draselný, dipikrylamin (2,4,6,2',4',6'-hexanitrodifenylamin), flavianová kyselina (2,4-dinitronaft-1-ol-7-sulfonová kyselina), chloristá kyselina, 5-nirtobarbiturová kyselina, pikrolonová kyselina (3-methyl-4-nitro-1-(4'-nitrofenyl)pyrazol-5-on), pikrová kyselina (2,4,6-trinitrofenol), 2,4,6-trinitrobenzoová kyselina, styfnová kyselina (2,4,6-trinitroresorcinol),

2) Tvorba blíže nedefinovaných aduktů: fofsomolybdenová kyselina (Sonnenscheinovo činidlo), fosfowolframová kyselina (Scheiblerovo činidlo), molybdenát amonný, silikowolframová kyselina (Godeffroyovo činidlo), tanin, tetrabromothalická kyselina, tetrafenylboritan sodný,

3) Tvorba aduktů s koordinačními systémy: tetrathiokyno-diamminochromitan amonný (reineckát), tetrajodortu'natan draselný (Mayerovo činidlo), tetrajodobismutitan draselný (Dragendorffovo činidlo), chlorid rtu'natý, tetrachlorozlatitá kyselina, hexachloroplaticitá kyselina, hexabromoplaticitá kyselina, chlorid platicitý.

Většina těchto činidel se uplatňuje především v důkazových reakcích alkaloidů, pro izolaci alkaloidů mají význam pouze některé ze skupin 1) a 3) srážecích reakcí. Pro tvorbu nerozpustných solí (pikrany, chloristany) je zapotřebí dodržet poměrně přesné fyzikálně-chemické podmínky (určitá prahová koncentrace alkaloidů, pH, absence většího množství balastu). Dále je třeba vzít v úvahu, jsou-li přítomny alkaloidy ve směsi, že vyloučení nerozpustných solí nemusí být vůbec kvantitativní z důvodu možnosti různých rozpustností např. chloristanů daných alkaloidů. Tvorba koordinačních aduktů s komplexními anionty (mayeráty, reineckáty) je výhodnější – sráží všechny alkaloidy bez rozdílu (je-li dodržena určitá hodnota pH a to i při nízkých koncentracích. Tato metoda

není tolik závislá na přítomnosti nečistot v primárním extraktu, alkaloidy lze poté poměrně jednoduchým způsobem získat zpět za použití iontoměniče.

3.3.3 Izolace kvartérních alkaloidů

Z předešlého přehledu vyplývá, že kvartérní alkaloidy lze získat ve formě koncentrátu dvojitým způsobem:

1) S využitím Slavíkovy metody (Slavík a kol., 1966, 1973, 1976, 1979); po odstranění terciárních bazí je vodný zbytek zneutralizován na pH ~ 3, přidán nasycený roztok jodidu draselného a po krátké chvíli provedeno vícenásobné vytřepání chloroformem, případně směsí $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (9 + 1) (jodidy kvartérních bazí jsou v těchto rozpouštědlech rozpustné). Stejný postup je aplikován při pH ~ 10 (po alkalizaci amoniakem). Tímto způsobem jsou kvartérní baze rozděleny podle svých hodnot logP (resp. na alkaloidy fenolové a nefenolové) na dvě velké skupiny. Další dělení spočívá v klasické sloupcové chromatografii zejména na oxidu hlinitém různé polaritě (Cahlíková a kol., 2010),

2) S využitím srážecích činidel, především mayerátu (tetrajodortuřnatanu draselného) (Jordan a Scheuer, 1965; Dwuma Badu a kol., 1980) anebo reineckátu (tetrathiokyno-diamminochromitanu amonného) (Mitcher a kol., 1972; Wu a kol., 1980; Jossang a kol., 1981; Bahadur a Shukla, 1983). Získaný komplex kvartérní alkaloid-koordinační činidlo (precipitát) je oddělen dekantací, filtrací, po promytí vysušen, rozpuštěn ve směsi $\text{ME}_2\text{CO} + \text{MeOH} + \text{H}_2\text{O}$ a zfiltrován přes iontoměnič v chloridovém cyklu (např. Amberlite IRA-401). Po promytí sloupce výše uvedenou soustavou jsou eluovány chloridy kvartérních bazí, jejichž směs je po odpaření dělena stejným způsobem jako v předešlém případě, anebo – pokud je přítomen jen jeden alkaloid – krystalizována z methanolu.

Izolaci kvartérních alkaloidů je věnována řada publikací, z pohledu mojí práce jsou zajímavé přehledové studie týkající se benzo[c]fenantridinových (Dostál a kol., 1990) a protoberberinových bazí (Grycová a kol., 2007).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Destilace a odpařování

Rozpouštědla byla před použitím destilována; nejprve byl zachycen předeček (asi 5 %; většinou s vodným azeotropem), poté bylo 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 N (normálních) komor. Komory byly použity nasycené mobilní fází. V případě užití malých komor (válcových), průměr 10 cm, trvalo sycení asi 30 minut. U klasických komor (18 × 18 cm) pak asi hodinu. Chromatografie byla prováděna vzestupně.

4.1.2.2 Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie byla prováděna systémem stupňovité eluce na oxidu hlinitém neutr., 0,1–0,25 mm, deaktivovaném 5 % vody. Sloupec byl plněn obvyklým způsobem – nalitím suspenze adsorbentu do rozpouštědla. Vzorek byl po vysušení v exsikátoru nanesen ve formě roztěru s malým množstvím adsorbentu.

4.2 Materiál a vybavení

4.2.1 Rozpouštědla a chemikálie

Rozpouštědla:

Aceton, č. (ME_2CO)

Diethylamin, č. (Et_2NH)

Diethylether, č. bez stabilizátoru (Et_2O)

Ethanol 95%, denaturovaný methanolem, č. (EtOH)

Chloroform, č. (CHCl_3)

Methanol, č. (MeOH)

Toluen, č. ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$)

Chemikálie:

Dusičnan bismutitý zásaditý, č.

Hydroxid sodný, č.

Jodid draselný, p. a.

Chlorid rtuťnatý, č.

Kyselina sírová 96%, p. a. (H_2SO_4)

Kyselina vinná, č.

Uhličitan sodný bezvodý, č.

Vodný roztok chlorovodíku 36%, p. a. (HCl)

Reineckát amonný, č.

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

Chemikálie:

10mM acetylcholinjodid (Sigma-Aldrich)

10mM butyrylcholinjodid (Sigma-Aldrich)

0,1M fosfátový pufr pH 7,4

5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina) (DTND) (Sigma-Aldrich)

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, p. a. (Lachema)

Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, p. a. (Lachema)

Eserin (Sigma-Aldrich)

Huperzin A (Tazhonghui Co., Ltd., China)

Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Aldrich)

Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Herb Inc., China)

Materiál:

Erytrocytární hemolyzát

Jako zdroj acetylcholinesterasy byl použit hemolyzát lidských erytrocytů z krve zdravých dobrovolníků. Citrátovaná krev se odstředí a získá se klasicky erytrocytární sediment, který se promyje fosfátovým pufrem pH 7,4, erytrocyty se převedou do 50 ml polykarbonátové kyvety a suspendují přibližně v 5násobném objemu 5 mM fosfátového pufru s obsahem 0,15 M chloridu sodného. Suspenze se centrifuguje 10 minut při 12 000 rpm (centrifuga Sorvall RC2-B s použitím SS34 fixed angle rotor). Promývací procedura se provádí 3× při 0–4 °C, pokud není uvedeno jinak. Erytrocytární stroma se připraví lýzou promytých erytrocytů. Pro zahájení hypotonické hemolýzy se smíchá důkladně 1 ml promyté erytrocytární masy se 40 ml 5 mM fosfátového pufru (fosforečnan sodný) pH 7,4. Hemolýza se provede za míchání 10 minut, potom se erytrocytární stěny sbalí při 20 000 rpm po dobu 10 min. Supernatant a malý tuhý koláč na povrchu se odstraní odtažením. Hmota se promyje 3× fosfátovým pufrem (fosforečnan sodný), pH 7,4. Získají se bělavá oddělená těla erytrocytů. Jako zdroj butyrylcholinesterasy byla použita lidská plazma

(Opletal, dosud nepublikováno). Plastové kyvety DISPOLABKARTELL 1937 PS MICROCUVETTES.

4.2.3 Přístroje

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

pH metr Φ 72 METER (Beckmann, USA)

UV-spektrofotometr UVIKON 942 (Kontron instruments, Švýcarsko)

Mikrovýhřevný stolek Boetius

Přístroj pro měření optické otáčivosti ADP 220 POLARIMETER B+S

4.2.4 Detekční činidla

D 1: Dragendorffovo činidlo modifikované podle Muniera: (Stahl, 1969)

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

- roztok B: se připraví rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody

- zásobní roztok: se připraví smísením roztoků A a B v poměru 1:1. Ten může být uložen několik měsíců v lednici.

- činidlo pro analýzu: se připraví tak, že se k roztoku 5 ml kyseliny vinné rozpuštěné v 50 ml vody přidá 5 ml zásobního roztoku.

D 2: Mayerovo činidlo: (ČsL 4)

- 1,35 g chloridu rtuťnatého a 5 g jodidu draselného se rozpustí ve vodě a doplní se jí do 100 ml.

4.2.5 Iontoměničová pryskyřice

I 1: Amberlite IRA-401 (Sigma-Aldrich)

4.2.6 Chromatografické 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: Oxid hlinitý dle Brockmanna neutrální, (LachNer), 40–250 µm, deaktivovaný 6 % vody

Komerční chromatografické desky byly před použitím vyvinuty v té chromatografické soustavě, která byla posléze použita k separaci, vysušeny pod proudem teplého vzduchu a bezprostředně zpracovány.

4.2.7 Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S 1: $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH} + \text{Et}_2\text{NH}$ (8 + 1 + 1)

S 2: $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 + \text{Et}_2\text{NH}$ (95 + 5)

4.3 Postup při izolaci alkaloidu z dymnivky duté

4.3.1 Droga

Droga pocházela ze sběru 04/2006 z Chorvatska (dodavatel drogy Megafyt s. r. o., Vrané n. Vlt., prostřednictvím fy Jugodrvo, bez udání lokality). Tvořily ji celé hlízy světle hnědé barvy miskovitého až diskového tvaru, charakteristického zápachu velikosti do

15 mm a jejich kousky. Verifikaci provedl L. Opletal. Před extrakcí byla umleta v tříštivém mlýnu na velikost do 3 mm.

4.3.2 Extrakce drogy

11,30 kg sušených hlíz bylo vloženo do perkolátoru, zalito 95% EtOH s MeOH a ponecháno v uzavřené nádobě extrahovat 5 dnů, potom provedena perkolace. Celkem získáno 115 l extraktu. Extrakt byl odpařen do konzistence řídkého sirupu, za stálého míchání bylo přidáno 5 litrů 1,5% kyseliny sírové, roztok byl po zchladnutí zfiltrován přes viskózu, filtrát byl zředěn destilovanou vodou na 8,8 litru (pH 1,4). Tato část byla provedena mimo rámec méj diplomové práce.

4.3.3 Příprava alkaloidních výtřepků

Tento filtrát byl vytřepán při pH ~ 9 (10% Na₂CO₃) nejprve několikrát Et₂O, CHCl₃, potom zalkalizován 50% NaOH na pH ~ 12, vytřepán znova několikrát Et₂O, CHCl₃. Vodný zbytek primárního extraktu vykázal po neutralizaci na pH ~ 3 a přidání Mayerova činidla velmi intenzivní sraženinu. Tato část byla provedena mimo rámec méj diplomové práce.

4.3.4 Příprava reineckátů alkaloidů

Alkalický zbytek primárního extraktu (~ 11,5 litru) po odstranění terciárních bází byl zneutralizován 10% HCl na pH ~ 2, zfiltrován (~ 14 litrů), a přidáno 2100 ml 2% roztoku reineckátu amonného. Nádoba s okrovou sraženinou byla ponechána stát asi 15 hodin, potom byla tmavě hnědá tekutina slita, zbytek zfiltrován přes Büchnerovu nálevku a papírový filtr, hnědá sraženina byla na filtru promyta chladnou vodou a po vylisování byl sediment vysušen v exsikátoru za několikeré výměny sušidla. Vzniklo 87,7 g okrového, postupem tmavě hnědého práškovitého podílu.

4.3.5 Příprava chloridů alkaloidů

44 g práškovitého okrového podílu bylo v třecí misce rozetřeno, rozpuštěno celkem v 1700 ml směsi: $\text{ME}_2\text{CO} + \text{MeOH} + \text{H}_2\text{O}$ (6 + 2 + 1), vlitu na sloupec iontoměniče Amberlite IRA-401 (rozměry: 16 × 4,5 cm, n = 220 g). Po prolití roztoku reineckátů sloupcem byl sloupec dále promýván směsí $\text{ME}_2\text{CO} + \text{MeOH} + \text{H}_2\text{O}$ (6 + 2 + 1). Po každých 250 ml eluátu bylo odebráno 0,5 nahnědlého roztoku do mikrozkušavky, roztok odpařen v proudu vzduchu, přidána 1 kapka 0,1 mol l⁻¹ HCl, 0,5 ml vody a 3 kapky Mayerova činidla. Eluce přestala být prováděna v okamžiku, kdy v průběhu této zkoušky vznikla jen slabá opalescence. Celkem bylo získáno 5750 ml eluátu, který po odpaření poskytl 13,2 g tmavě hnědého, velmi viskózního a nekystalujícího odparku. Alkaloidy v něm obsažené byly dále děleny ve formě chloridů na sloupci neutrálního oxidu hlinitého.

4.3.6 Sloupcová chromatografie chloridů alkaloidů

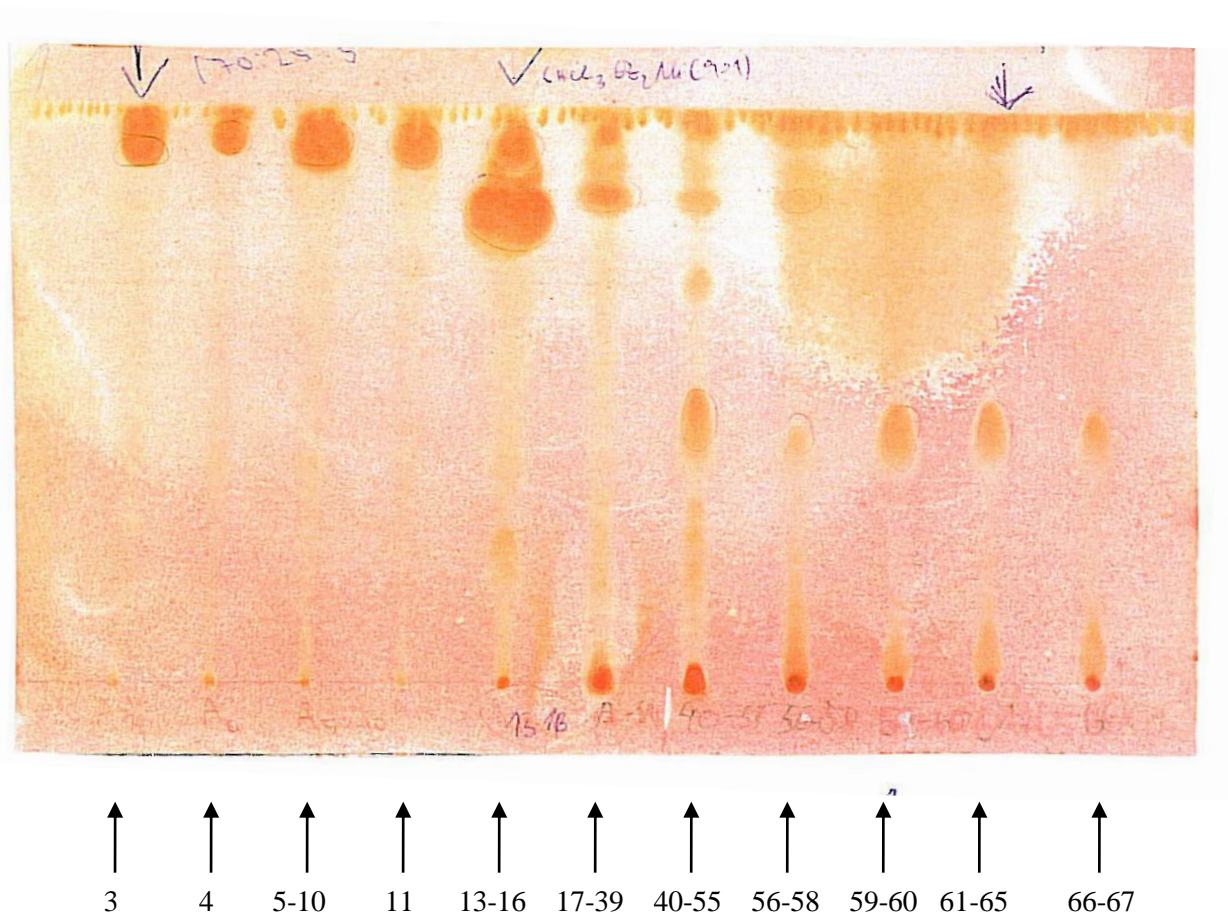
Tab. 11: Podmínky sloupcové chromatografie

Frakce	n = 13,2 g tmavě hnědého velmi viskózního odparku chloridu alkaloidů získaného z iontoměniče Amberlite IRA-401
Adsorbent	Oxid hlinitý dle Brockmanna neutrální, 40-250 μm, deaktivovaný 6 % vody, n = 600 g
Vrstva s frakcí	3,5 × 5,5 cm
Dělicí lože	3,5 × 59 cm
Frakce/doba toku	250 ml/25-30 min.

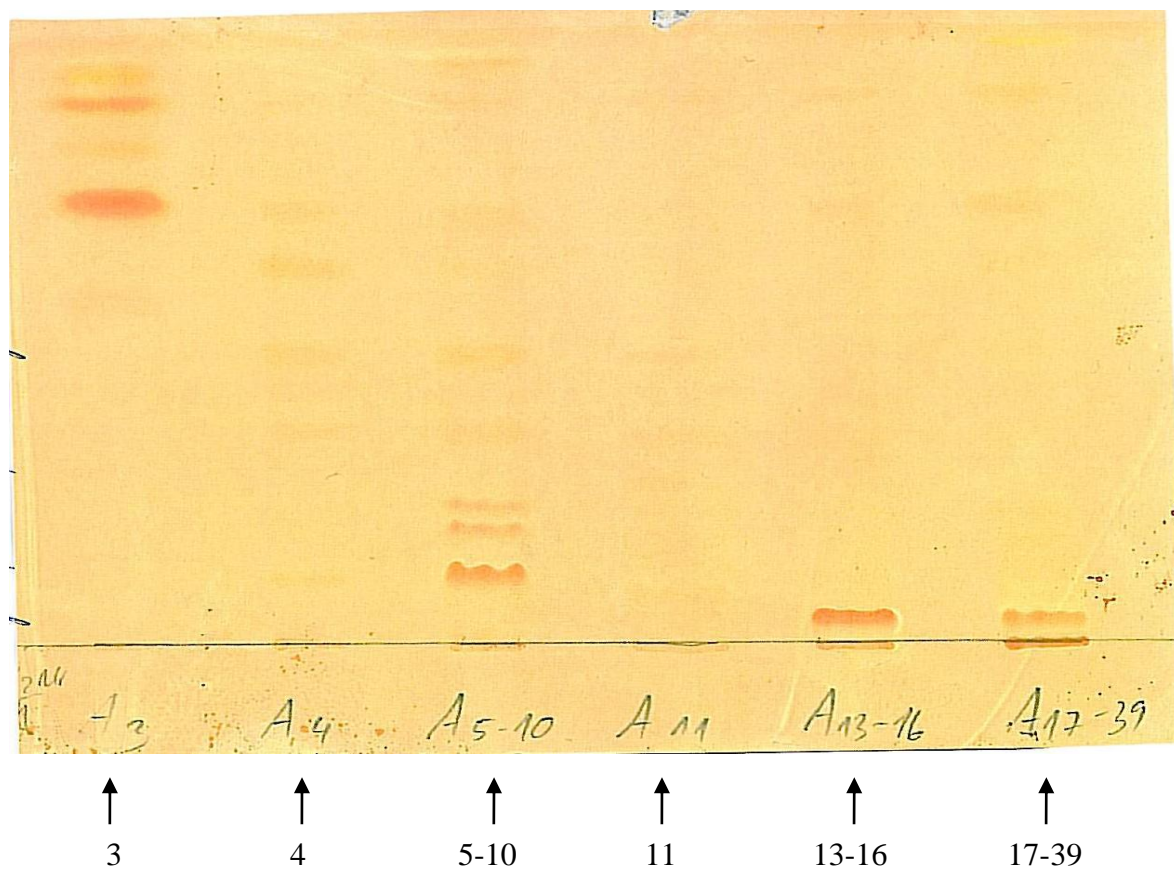
Tab. 12: Výsledky dělení chloridů alkaloidů z *C. cava* (kvartérní báze)

Spojené frakce	Frakce	Eluční systém	Hmotnost (g)	Popis
1-2	1-2	CHCl_3	0	---
3	3	CHCl_3	0,042	Nazelenalý s náznakem krystalizace
4	4	CHCl_3	0,034	Tmavě zelený s náznakem krystalizace
5-10	5-7	CHCl_3	0,238	Tmavě zelený s jemnými krystaly
	8-10	$\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (98 + 2)		
11	11	$\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$	0,048	Hnědozelený, velmi viskózní

		(98 + 2)		
12	12	CHCl ₃ + EtOH (98 + 2)	0	---
13–16	13–14	CHCl ₃ + EtOH (98 + 2)	0,282	Hnědozelený, velmi viskózní
	15–16	CHCl ₃ + EtOH (95 + 5)		
17–39	17–25	CHCl ₃ + EtOH (95 + 5)	0,612	Hnědý s náznakem krystalizace
	26–38	CHCl ₃ + EtOH (90 + 10)		
	39	CHCl ₃ + EtOH (80 + 20)		
40–55	40–52	CHCl ₃ + EtOH (80 + 20)	0,780	Hnědý s náznakem krystalizace
	53–55	CHCl ₃ + EtOH (70 + 30)		
56–58	56–58	CHCl ₃ + EtOH (70 + 30)	0,187	Hnědý, pevný
59–60	59–60	CHCl ₃ + EtOH (70 + 30)	0,185	Hnědý, velmi viskózní
61–65	61–65	CHCl ₃ + EtOH (70 + 30)	0,360	Hnědý, velmi viskózní
66–67	66–67	CHCl ₃ + EtOH (70 + 30)	0,120	Černý
Celkem			2,888	



Obr. 4: Kontrolní TLC sloupcové chromatografie spojených frakcí ze sloupcové chromatografie chloridů alkaloidů (Kieselgel 60F₂₅₄, CHCl₃ + EtOH + Et₂NH (8 + 1 + 1), komora nasycená, detekce Dragendorffovo činidlo).



Obr. 5: Kontrolní TLC sloupcové chromatografie spojených frakcí ze sloupcové chromatografie chloridů alkaloidů (Kieselgel 60F₂₅₄, C₆H₅CH₃ + Et₂NH (95 + 5), komora nasycená, vyvíjení 3×, detekce Dragendorffovo činidlo).

4.3.7 Zpracování spojených frakcí A3 + A4 preparativní TLC

76 mg zelené olejovité frakce s náznakem krystalů bylo rozpuštěno ve 2 ml směsi $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (1 + 1) a zpracováno TLC za podmínek shrnutých v tab. 13.

Tab. 13: Podmínky preparativní TLC spojených frakcí A3 + A4.

Desky	Kieselgel 60F ₂₅₄ , 15 x 10 cm, 6 desek
Dráha vyvíjení	8 cm
Soustava	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 + \text{Et}_2\text{NH}$ (95 + 5)
Vyvíjení	3×, komora nasycená
Detekce	UV, $\lambda = 254 \text{ nm}$

Zhášející zóna s látkou o $R_f \sim 0,72$ byla pod UV označena, adsorbent separován, promíchán se stejným objemovým množstvím křemeliny Celite C 535, promyt celkem 25 ml směsi $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (1 + 1). Po odpaření vzniklo 35 mg šedavého krystalického odparku, který byl rekrystalizován v mikroměřítku Svobodovou krystalizační technikou za vzniku 17 mg bělavé práškovité látky, bez zápachu, označené jako AB-1.

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+). Látka byla rozpuštěna v metanolu.

4.4.2 Měření NMR spektra

Spektra jsou měřena na spektrometru Varian Inova 500 s pracovní frekvencí 499.9 MHz pro ^1H a 125.7 MHz pro ^{13}C jádra. ^{13}C NMR spektra byla měřena v 5 mm SW širokopásmové sondě, ^1H a všechna 2D spektra v inverzní 5mm ID PFG sondě s využitím standardních pulzních sekvencí. Experimenty byly měřeny v CDCl_3 při 25 °C.

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

4.5 Stanovení účinku alkaloidu na AChE, BuChE (IC_{50})

4.5.1 Podmínky měření

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek:

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

4.5.2 Vlastní stanovení biologické aktivity

Pro stanovení aktivity látek byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda, využívající 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoovou kyselinu). Za substráty byly zvoleny estery thiocholinu (acetylthiocholin, butyrylthiocholin), které jsou esterasami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Principem reakce je vazba thiolové skupiny thiocholinu s DTNB za vzniku žlutě zbarveného produktu o $\lambda_{\text{max}} = 436 \text{ nm}$, který je stanoven spektrofotometricky. Při tomto stanovení je sledován nárůst absorbance za 1 minutu.

Slepý vzorek – do kyvety je postupně přidáváno 10–25 μl hemolyzátu nebo plazmy, 200 μl DTNB, 25 μl rozpouštědla, ve kterém jsou rozpuštěny vzorky (DMSO) a doplní se na objem 900 μl puforem. Následně je přidáno 100 μl substrátu (acetylcholin jodid nebo butyrylcholin jodid). Nárůst absorbance je měřen při vlnové délce 436 nm. Měření je prováděno ve třech opakováních. Pro výpočet poklesu nárůstu absorbance byla použita průměrná hodnota.

Měření vzorku - do kyvety je postupně přidáváno 10–25 µl hemolyzátu respektive plazmy, 200 µl DTNB, 25 µl měřeného vzorku v různých koncentracích a doplní se na objem 900 µl pufrem. Následně je přidáno 100 µl substrátu (acetylcholin jodid nebo butyrylcholin jodid). Nárůst absorbance je měřen při vlnové délce 436 nm. Měření je prováděno ve třech opakováních.

4.5.3 Matematické zpracování experimentálních dat

Hodnoty IC_{50} byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterasy nelineární regresí v programu GraphPaD Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph PaD Software, San Diego, CA, USA). Pro výpočet poklesu ΔA se použije vzorec:

$$\% \text{ poklesu } \Delta A = 100 - (\Delta ASA / \Delta ABL \times 100)$$

ΔASA – nárůst absorbance za 1 minutu u měřeného vzorku

ΔABL – nárůst absorbance za 1 minutu u slepého vzorku

5 VÝSLEDKY

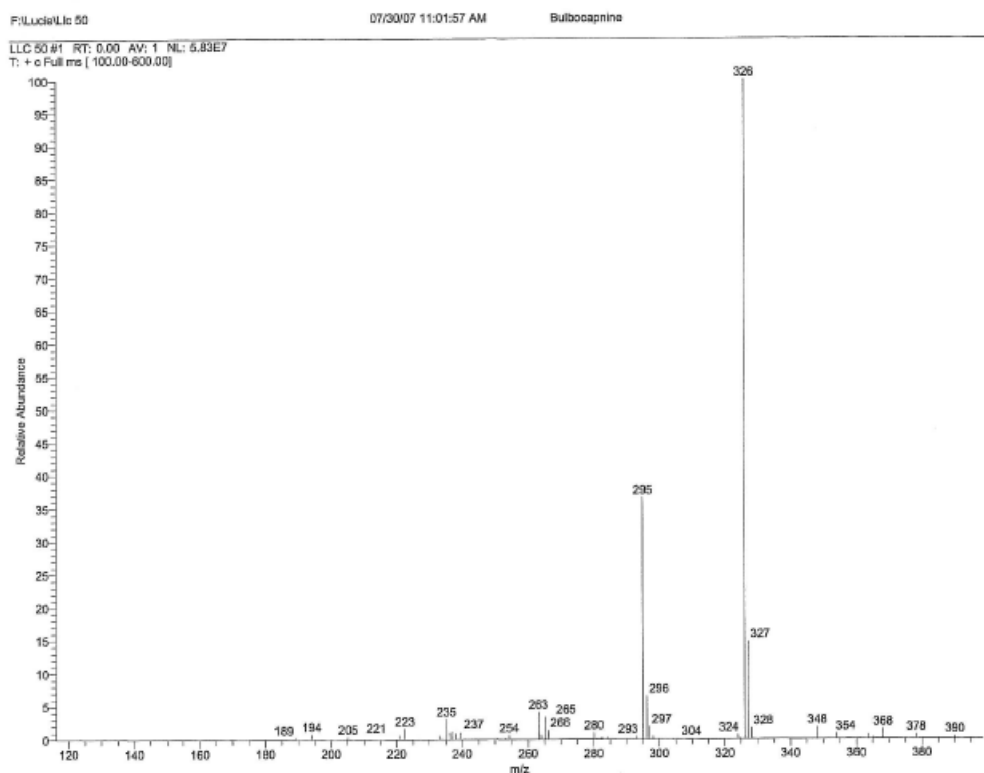
5.1 Výsledky stanovení struktury

5.1.1 Popis

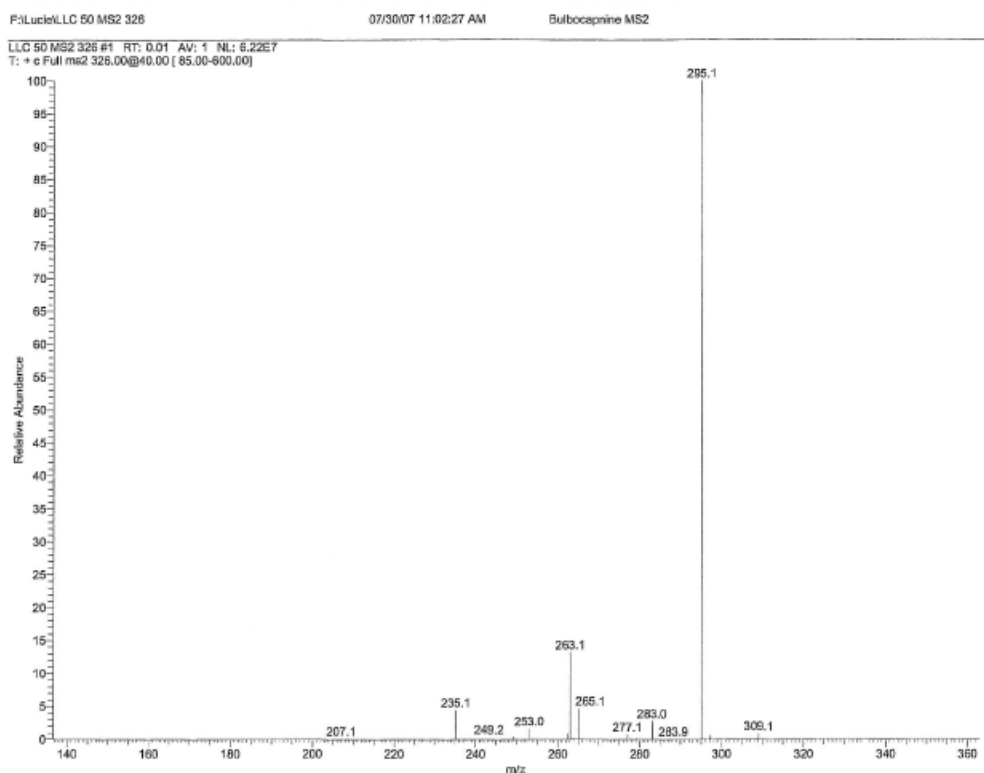
AB-1: bělavá prášková látka bez zápachu, t. tání 199–201 °C, $[\alpha]_{D20} +212^\circ$ (c 0,90, chloroform).

5.1.2 MS studie AB-1

ESI-MS m/z 326,2 $[M+H]^+$ (100). MS/MS m/z 295,1 $[M+H-OCH_3]^+$ (100), 265,1 (5), 263,1 (15), 235,1 (5).



Obr. 6: MS spektrum látky AB-1.

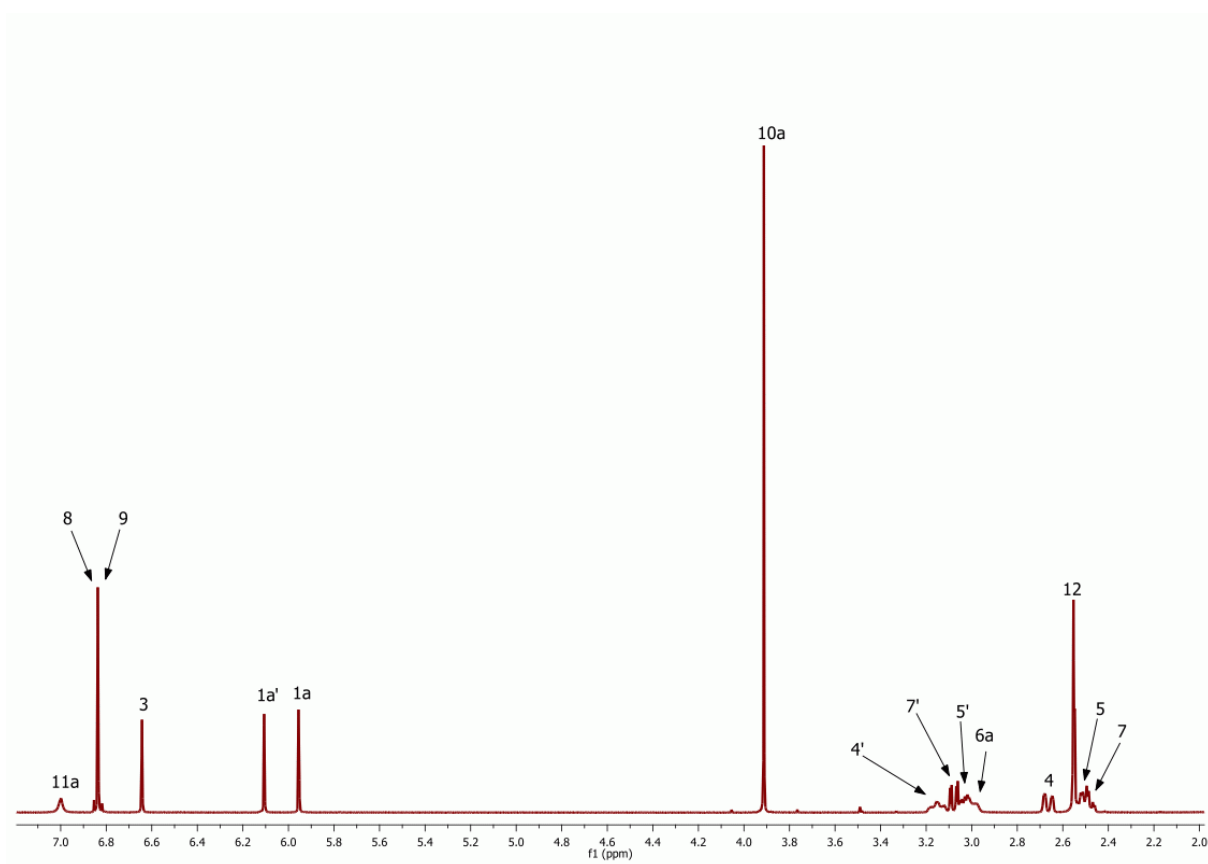


Obr. 7: MS/MS spektrum látky AB-1.

5.1.3 $^1\text{H-NMR}$ spektrum látky AB-1

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 25°C):

2.49 br, 1H, H-7; 2.52 br, 1H, H-5; 2.55 s, 3H, H-12; 2.66 dd ($^1J_{\text{H}}=16.4$ Hz, $^3J_{\text{H}}=3.7$ Hz), 1H, H-4; 3.00 br, 1H, H-6a; 3.02 br, 1H, H-5'; 3.08 dd ($^1J_{\text{H}}=13.5$ Hz, $^3J_{\text{H}}=3.6$ Hz), 1H, H-7'; 3.15 br, 1H, H-4'; 5.95 d ($^1J_{\text{H}}=1.4$ Hz), 1H, H-1a; 6.11 d, 1H, H-1a'; 6.64 s, 1H, H-3; 6.83 d ($^3J_{\text{H}}=8.1$ Hz), 1H, H-9; 6.84 d, 1H, H-8; 7.00 br, 1H, H-11a;



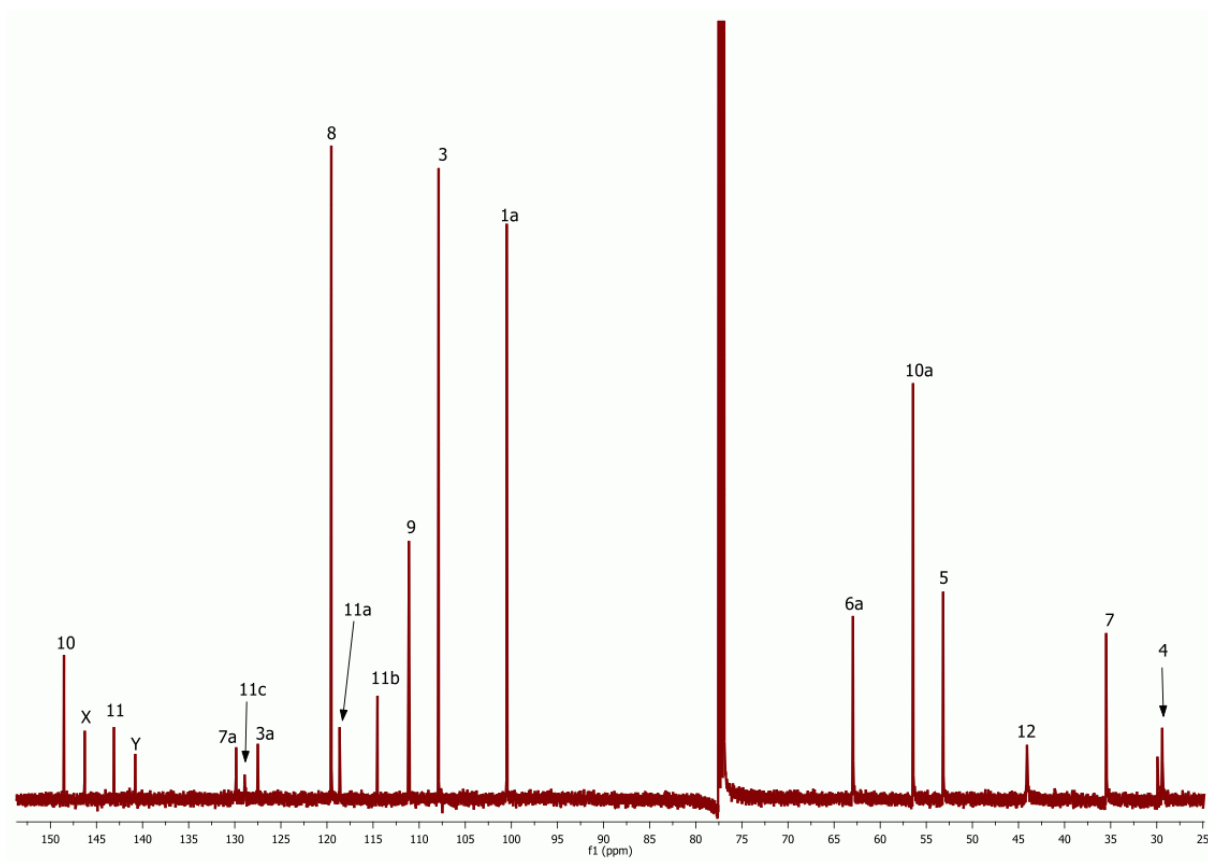
Obr. 8: ^1H -NMR spektrum bulbokapninu

5.1.4 ^{13}C -NMR spektrum bulbokapninu

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 25°C):

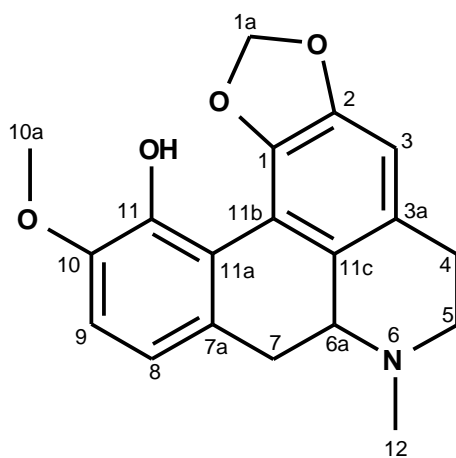
29.42, C-4; 35.50, C-7; 44.01, C-12; 53.18, C-5; 56.44, C-10a; 62.96, C-6a; 100.52, C-1a;
 107.90, C-3; 111.13, C-9; 114.53, C-11b; 118.65, C-11a; 119.54, C-8; 127.51, C-3a;
 128.95, C-11c; 129.87, C-7a; 140.81, C-X; 143.13, C-11; 146.29, C-Y; 148.54, C-10.

Signály označené X, Y náležejí uhlíkům C-1 a C-2, nelze je spolehlivě přiřadit.



Obr. 9: ^{13}C -NMR spektrum bulbokapninu

Struktura izolované látky byla určena na základě MS spekter, ^1H - a ^{13}C -NMR spekter a s přihlédnutím k datům uvedeným v literatuře (Baarschers a kol., 1964; Sener, 1988; Stevigny a kol., 2004; Sturm a kol., 2007) byla látka identifikována jako (*S*)-(+)-bulbokapnin.



(*S*)-(+)-bulbokapnin

5.2 Výsledky stanovení biologické aktivity látky AB-1

Podle použité metodiky stanovení IC_{50} (viz kap 4.5, str. 55) byly u bulbokapninu nalezeny hodnoty, které jsou shrnuty v tab. 14.

Tab. 14: Výsledky stanovení biologické aktivity pro látku AB-1.

vzorek	AChE		BuChE	
	% inhibice c = 1 mM	IC_{50} mM	% inhibice c = 1 mM	IC_{50} mM
Bulbokapnin	23,14±0,62	> 1000	94,96±0,01	67±2,4
Galanthamin	87,39±0,98*	6,9±0,3	79,85±1,33**	156±6,9
Huperzin A	91,71±0,37	0,25±0,01	8,99±2,3	> 1000

*c = 0,5 mM

**c = 0,75 mM

6 DISKUZE

Izolace kvartérních alkaloidů není zpravidla jednoduchou záležitostí. Tyto látky jsou díky svému náboji výrazně bazické, současně také polární, tudíž se vyskytují ve formě solí, nebo pseudobází (OH^-). Ačkoliv se jedná o soli, mají zvláštní vlastnost – lze je vytřepat do CHCl_3 , nebo směsi $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (9 + 1), nejlépe jako jodidy, které velmi dobře krystalují.

V této práci jsem se pokusil jednak metodicky zjistit, do jaké míry je srážecí činidlo – sůl Reineckého – vhodná pro izolaci kvartérních bází, které zůstaly obsaženy v primárním extraktu z hlíz dymnivky duté a také zároveň izolovat jeden kvartérní alkaloid, vyčistit jej a podílet se na určení jeho biologické aktivity na lidskou erytrocytární AChE a lidskou sérovou BuChE.

Kvartérní alkaloidní báze ve formě solí je tedy možné získat v čistém stavu dvěma způsoby:

- 1) vysrážením za použití komplexu s koordinační sloučeninou (Hg, Cr, W, Mo) vznikne sedimentující precipitát, který po promytí, rozpuštění ve směsi $\text{ME}_2\text{CO} + \text{MeOH} + \text{H}_2\text{O}$ (6 + 2 + 1) a následném prolití sloupcem silně bazického anexu v Cl^- formě, odpaření, rozpuštění ve vodném methanolu, přidání aktivního uhlí, filtraci, odpaření a krystalizaci z methanolu, případně další přečištění přes oxid hlinitý neutrální poskytne kvartérní alkaloidy ve formě chloridů (Jordan a Scheuer, 1965; Mitcher a kol., 1972; Wu a kol., 1980; Jossang a kol., 1981; Bahadur a Shukla, 1983), anebo
- 2) přidáním nasyceného roztoku jodidu draselného do primárního extraktu, který byl zbaven terciárních bází vytřepáním diethyletherem (případně chloroformem) při různém pH, po určité době stání vytřepáním vzniklých jodidů do chloroformu nebo směsi $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (9 + 1), odpařením, přečištěním odparku obvyklým způsobem s použitím aktivního uhlí z vodného prostředí a následnou chromatografií na neutrálním oxidu hlinitém a krystalizací získaných jodidů z methanolu (Slavík a kol., 1966, 1973, 1979). Tato metoda má velkou výhodu v tom, že kvartérní soli lze vytřepávat z prostředí jak slabě kyselého (HCl , pH ~ 3) tak i slabě bazického (NH_3 , pH ~ 9) a tím se vlastně alkaloidy již částečně dělí.

Obě metody byly na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie vyzkoušeny a preparativně použity. Za použití tetrajodortuťnatanu draselného (Mayerovo činidlo) byl připraven komplex kvartérních bazí z polárního zbytku extraktu z hlíz *Corydalis yanhusuo* a výše uvedenou metodou byla připravena směs chloridů. Při zpracování vznikla dobře sedimentující a filtrovatelná sraženina; komplexní Hg-anion se výborně zachytil na bazickém anexu (sorpce rtuťnaté koordinační sloučeniny byla dokonce vizuálně na sloupci patrná) a v eluátu byl adekvátní výtěžek chloridů alkaloidů, odpovídající zhruba jejich obsahu v extraktu. Pro získání kvartérních solí z většího množství extraktu (drogy) se však tato metoda ukázala jako nevhodná: jedná se o malý koordinační anion, který se patrně do určité míry disociuje a znečišťuje prostředí rtuťnatými ionty. Po krátké době byla v okolí patrná koroze hliníkové fólie, používaná k zakrývání sloupců. Stopy Hg^{2+} iontů působí jako oxidační katalyzátor, tudíž může docházet k oxidačnímu štěpení izolovaných látek. Dále přítomnost Hg^{2+} iontů v izolované látce může přinést významný problém při biologických testech (otrava enzymů). Navíc nebylo možné zjistit, zda srážení proběhlo stechiometricky (resp. nebyla-li potřeba nadbytku rtuťnaté soli). Důkazová reakce (srážení rtuťnatých kationtů sulfidem amonným v prostředí NH_3) ve zbytku primárního extraktu po vysrážení kvartérních bazí byla významně rušena (extrakt je tmavě hnědý až černý). Prokázat Hg^{2+} se nepodařilo ani ve slepém pokuse, kdy bylo k původnímu extraktu přidáno Mayerovo činidlo ve zjevném nadbytku) (Cahlíková, 2009). Z těchto důvodů bylo od této metody s tetrajodortuťnatanem draselným upuštěno a vznikla potřeba vyzkoušet jiný komplexní iont, zde reineckát amonný.

Použití tohoto chromitého komplexu mělo přinést výraznější výhody: vzniklý komplex s alkaloidy je rovněž dobře filtrovatelný, nadbytek Cr^{3+} iontů lze dobře sledovat srážením sulfidem amonným v prostředí NH_3 (reakce je vysoce citlivá a zdá se, že není rušena). Při preparativní přípravě komplexu se zdálo, že se jedná patrně o stechiometrickou reakci, protože obsah nadbytečného reineckátu byl podle srážecí reakce velmi nízký. Rychlost sedimentace, kvalita sedimentu a schopnost dobré filtrace tohoto komplexu však byla horší než v případě použití rtuťnatého komplexu. Nepříjemnou věcí, která však byla

zjištěna později, je skutečnost, že na tuto sraženinu se při pH ~ 3, které bylo pro vazbu použito, váže daleko větší množství balastních látek než v případě mayerátu, který je jen nahnědlý (tento komplex byl tmavě hnědý; při jeho tvorbě bylo vidět, že je světle okrové barvy, ovšem po několika desítkách minut – sedimentaci – přešlo zbarvení do tmavě hnědé barvy (i když po vysušení byl sediment jen tmavě okrový), což naznačovalo sorpci nečistot na povrch sraženiny). Těchto balastních látek je v primárním extraktu velké množství – vznikají patrně rozkladem sloučenin různého typu, protože extrakt po různých úpravách pH a po určité době stání intenzivně hnědne až černá (dokonce se vylučoval černý práškový sediment). Navázané nealkaloidní látky nebylo možné odstranit v průběhu izolačního postupu promytím vodou, ani jiným polárním rozpouštědlem (např. MeOH nebo Me₂CO – v nich se zčásti rozpouštěl i komplex reineckát-alkaloidy). Tyto sloučeniny se po nalití roztoku alkaloid-reineckát na sloupec Amberlite IRA-401 také na adsorbentu zachytily, po provedení eluce směsí ME₂CO + MeOH + H₂O (6 + 2 + 1) se jen zčásti uvolňovaly, nebylo možné je vymýt při recyklaci 2M HCl, uvolňovaly se velmi pomalu a použitý iontoměnič zcela znehodnotily. Navíc byl výtěžek chloridů alkaloidů nízký (z polovičního množství suchého sedimentu reineckátu – 44 g – bylo získáno 13,2 g směsi chloridů ve formě hnědého, viskózního nekrytalizujícího odparku). Je těžké definovat důvod tohoto nízkého výtěžku. Možná byl obsah alkaloidů ve zbylém extraktu opravdu nízký, anebo sorpce balastních látek byla tak velká, že výrazně komplikovala dělení.

Získaná směs chloridů byla dále dělena na neutrálním oxidu hlinitém st. aktivity III (dle Brockmanna) za vzniku 13 sumárních frakcí (stupňovitá eluce směsí CHCl₃ + EtOH). Celkový výtěžek této chromatografie byl však nízký: ~ 2,9 g. Tento stav potvrzuje dřívější názor, že sorbované znečištěniny tvořily opravdu veliký podíl ve sraženině a dostaly se až do směsi chloridů alkaloidů.

Na základě kontrolní TLC (viz obrázky 4 a 5) se ukázalo, že hlavní obsah alkaloidů se vyskytuje do frakce 39. Profil látek frakcí 40–67 se jeví stejný, jedná se tedy pravděpodobně o 1 sloučeninu. Věnoval jsem dále pozornost frakci č. 3, v níž jsou zřetelně

dvě Dragendorff-pozitivní látky a tato frakce také jevila náznak krystalizace. Rozdíl R_F hodnot oproti dalším frakcím byl markantní – důvod byl později logicky vysvětlen.

Preparativní TLC byla izolována látka s R_F 0,72 (obr. 5, dolní intenzivní). Další výrazná látka o R_F 0,88 získána nebyla, protože po eluci adsorbentu byl odparek o hmotnosti několik miligramů a nebylo možné jej dále zpracovat (resp. výsledek by kromě návrhu struktury pomocí MS nepřinesl žádné další řešení). Po krystalizaci odparku ze zóny o R_F 0,72 bylo získáno 17 mg látky označené AB-1, u níž byla pomocí MS a NMR stanovena struktura. Výsledky měření ukázaly, že se jedná o (*S*)-bulbokapnin. V MS spektru tohoto alkaloidu (fragmenty $[M-H]^+$) je kromě molekulárního píku bulbokapninu (tj. celkem 326, 100 %) ještě další poměrně výrazný pík (celkem 295, 40 %). Na první pohled se tedy může zdát, že jde o významnou znečištěninu – další alkaloid. Významné znečištění se však při měření NMR nepotvrdilo. Navíc byla zjištěna i ostrá t. t. a hodnota optické otáčivosti. Vysvětlení tohoto stavu může být jednoduché a bylo v podstatě prověřeno praxí mnoha jinými měřeními (Opletal, 2010): odezva detektoru MS není u každé z přítomných látek přímo úměrná obsahu látek ve směsi; tato odezva je závislá na molekulové struktuře, případné fragmentaci, podmínkách měření atd.

Získání bulbokapninu bylo určitým překvapením, protože tento terciární aporfinový alkaloid neměl v primárním extraktu už být – předchozím postupem měly být teoreticky všechny terciární alkaloidy vytřepány. Na tomto případě se však potvrdilo, že žádný preparativní postup nepřináší shodu teorie s praxí, malé množství bulbokapninu v extraktu ještě zůstalo a bylo zde izolováno. Tento případ také dokazuje, že s použitím srážecích komplexotvorných metod lze získat nejen alkaloidy kvartérní (u nichž je izolace přes iontoměnič po stránce mechanismu chemické reakce naprosto logická a očekávaná), ale i alkaloidy terciární, které mohou ze sloupce rovněž vyjít jako chloridy. Přítomnost terciárního alkaloidu však bylo možné již tušit na základě kontrolní TLC (obr. 5: Kontrolní TLC sloupcové chromatografie spojených frakcí ze sloupcové chromatografie chloridů alkaloidů (Kieselgel 60F₂₅₄, C₆H₅CH₃ + Et₂NH (95 + 5), komora nasycená, vyvíjení 3x, detekce Dragendorffovo činidlo)); bulbokapnin měl podstatně vyšší R_f hodnotu než

alkaloidy přítomné ve frakcích 5–10, 13–16, 17–39, které s největší pravděpodobností už budou alkaloidy kvartérní. Ověření, zda tomu tak skutečně je, jsem však v rámci své diplomové práce provést nemohl, protože samotné získání reineckátu alkaloidů, jejich dělení a řešení nepředvídaných preparativních komplikací mně tento postup neumožnilo. Jsou však připraveny pro další zpracování. Z těchto látek by se mohlo jednat o látky několika strukturních typů, které byly dosud z hlíz dymnivky duté izolovány, konkrétně alkaloidy protoberberinové (berberin, kolumbamin, koptisin, korysamin, α -tetrahydrokorysaminmethohydroxid, dehydroapokavidin, dehydrokorybulbin, dehydrokorydalin, dehydrothaliktrikavin, jatrorrhizin, palmatin, (+)- α -stylopin-methohydroxid), případně některý z kvartérních aporfinových alkaloidů ((+)-bulbokapnin-methohydroxid, (+)-magnoflorin) (Slavík a kol., 1979; Blaschek a kol., 2009). Zcela jistě se však nejedná o berberin a další výrazně žlutě zbarvené protoberberinové baze, protože zóny s těmito alkaloidy jsou na TLC deskách bezbarvé, nikoliv nažloutlé.

Aktivita bulbokapninu vůči lidské erytrocytární acetylcholinesterase zjištěná v této práci je nevýznamná; dosud existuje jedna práce, která však hovoří o opaku (Adsersen a kol., 2007). V ní autoři popisují, že bulbokapnin má velmi podobnou účinnost vůči AChE ($40 \pm 2 \mu\text{M}$) i butyrylcholinesterase ($83 \pm 3 \mu\text{M}$). Je však nutné uvést, že hlavní testovací systém byl zcela jiný: jako zdroj AChE byl použit preparát z mozku elektrického úhoře a zdrojem BuChE bylo koňské sérum. Prozatím neexistují studie, které by porovnávaly jednotlivé zdroje cholinesteras při studiu aporfinových alkaloidů. V našem případě se významněji jeví jeho aktivita vůči lidské sérové butyrylcholinesterase ($67 \pm 2,4 \mu\text{M}$). Z těchto výsledků však plyne poměrně jednoznačný závěr, že se látka nemůže stát „lead compound“ pro acetylcholinesterasové inhibitory, které by mohly být sledovány z hlediska periferního účinku, tj. při MG. Bylo by to obtížné i z toho důvodu, že bulbokapnin je látkou relativně toxickou. Způsobuje katatonickou „bulbokapninovou ztuhlost,“ zpomaluje kognitivní schopnosti, navozuje bizarní pohyby končetin, vyšší dávky vyvolávají tremor, klonické křeče, poškození cirkulace a postihují respiraci. Stimuluje dělohu, způsobuje zástavu peristaltiky a hyperglykémii. Je antagonistou serotoninu a noradrenalinu v mozku

(Jahodář, 2004). Je tedy patrné, že nemůže být potenciálním léčivem jak na MG, tak v případě Alzheimerovy choroby. Jeho získání je však pro pracovní skupinu ADINACO, zabývající se na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie cenné, protože látka slouží jako jedna ze struktur pro stanovení konvenčních fyzikálně-chemických vlastností v rámci dockingu látek biologicky aktivních z hlediska ovlivnění kognitivních funkcí. Ačkoliv není tato látka atraktivní z hlediska ovlivnění cholinesteras, může přinést zajímavé experimentální výsledky zjištěné při studiu jejího vlivu na β -sekretasu a NMDA-receptory.

Po zhodnocení výsledku experimentální práce, kterou jsem provedl konstatuji, že použití reineckátu amonného pro izolaci isochinolinových kvartérních alkaloidů z primárních extraktů *Corydalis cava*, z nichž byly odstraněny nejprve alkaloidy terciární, není optimální metodou. Na základě srovnání údajů z literatury a především zkušeností z pracovní skupiny ADINACO se ukazuje, že nejvhodnější (i když patrně nejpracnější) je použití vytřepávací metody chloroformem, případně srážení těchto látek mayerátem, což je však nutné potvrdit ještě další studií.

7 LITERATURA

- Baarschers, W. H.; Arndt, R. R.; Pachler, K.; Weisbach, J. A.; Douglas, B.: J. Chem. Soc. 1964, 4778-82.
- Bahadur S., Shukla A.K.: Studies on native medicinal plants, The quaternary alkaloid of *Thalictrum javanicum*. J. Nat. Prod. 46, 454–457 (1983).
- Blaschek W., Ebel, S., Hackenthal E., Holzgrabe U., Kellner K., Reichling J., Schnetz V.: *Corydalis*, str. 8–10. *HagerROM 2009: Hager's Handbuch der Drogen und Arzneistoffe*. Springer & Info II Universität Würzburg, Würzburg 2009.
- Broncová D. (Ed): *Historie farmacie v Českých zemích*. Milpo, Praha 2003.
- Cahlíková L.: osobní sdělení, 2009.
- Cahlíková L., Macáková K., Kuneš J., Kurfürst M., Opletal L., Cvačka J., Chlebek J., Blunden G.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Eschscholzia californica* (Papaveraceae). Nat. Prod. Rep. 5, 1035–1038 (2010).
- Calatayud-Noguera T., Astudillo-González A., Alvarez-Carriles J. C., Temprano-Fernández T., Cortés-Velarde M., Oliva-Nacarino P.: Rivastigmine in a case of autopsy proved frontotemporal dementia (Pick's disease), Rev. Neurol. 48, 582–584 (2009).
- Cibičková Ľ., Palička V.: Alzheimerova choroba, cholesterol a apolipoprotein E– nové souvislosti, Klin. Biochem. Metab. 13, 127– 130 (2005).
- Černý R.: Degenerativní onemocnění nervového systému, *Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů, Portál 2. Lékařské fakulty*, staženo 31. 7. 2010, poslední aktualizace 12 .6. 2010, dostupný z WWW: <http://mefanet-motol.cuni.cz/clanky.php?aid=1090>.
- Československý *lékopis*. Sv. I., vyd. 4., Avicenum. Praha 1987.
- Danisz W., Parsons C. G., Möbius H. J., Stöffler A., Quack G.: Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease – a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. Neurotox. Res. 2, 85–97 (2002).

- Dostál J., Potáček M.: Quarternary benzo[c]phenanthridine alkaloids. Coll. Czech. Chem. Commun. 55, 2840–2873 (1990).
- Dwuma Badu D., Ayim J. S. K., Withers S. F., Agyemang N. O., Atoya A. M., El Azizi M. M., Knapp J. E., Slatkin D. J., Schiff P. L.: Constituents of West African medicinal plants XXVII. Alkaloids of *Rhigiocarya racimifera* and *Stephania dinklagei*. J. Nat. Prod. (Lloydia) 43, 123–129 (1980).
- Fialová D., Vlček J. (Eds): *Klinická farmacie I*. Grada, Praha 2010.
- Golkiewicz W., Gadzikowska M.: Isolation of some quaternary alkaloids from the extract of roots of *Chelidonium majus* L. by column and thin-layer chromatography. Chromatografia 50, 52–60 (1999).
- Hejny S., Slavík B.: *Květena ČSR 1*, str. 497. Academia, Praha 1988.
- Higgins J. P., Flicker L.: Lecithin for dementia and cognitive impairment, Cochrane Database Syst. Rev. 2003, (3):CD001015.
- Hubík J., Dušek J., Spilková J.: *Farmakognosie I. Obecná část a primární látky*, str. 8. Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1989a.
- Hubík J., Dušek J., Spilková J., Šícha J.: *Farmakognosie II. Sekundární látky*, kap. 3. Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1989b.
- Jahodář L.: Rostlinné jedy, v knize: Hrdina V., Hrdina R., Jahodář L., Martinec Z., Měrka V.: *Přírodní toxiny a jedy*, Galén-Karolinum, Praha 2004.
- Jiráček R.: Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby. Neurol. Pro Praxi 2, 101–105 (2002).
- Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. Klin. Farmakol. Farm. 18, 212–214 (2004).
- Jiráček R., Laňková J.: *Demence. Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře*. Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, Praha, 2007.
- Jordan W., Scheuer P. J.: Rapid separation of alkaloids from plant material by anion exchange of Mayer's complex. J. Chromatogr. 19, 175–176 (1965).

- Jossang A., Jacquemin H., Pousset J. L., Cavé A.: Alcaloïdes du *Borreria capitata*. *Planta Med.* 43, 301–304 (1981).
- Koukolík F., Jiráček R.: *Alzheimerova nemoc a další demence*. Praha, Grada 1998.
- Le Bars P. L., Katz M. M., Berman N., Itil T. M., Freedman A. M., Schatzberg A. F.: A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of *Ginkgo biloba* for dementia. *JAMA* 278, 1327–1332 (1997).
- Lincová D., Farghali H. (Eds): *Základní a aplikovaná farmakologie*. Galén, Praha 2007.
- List P. H., Hörhammer L.: *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, sv. 2, str. 1181, Springer Verlag, Berlin 1969.
- Lüllmann H., Mohr K., Hein L.: *Barevný atlas farmakologie*, str. 108. Grada, Praha 2007.
- Mitcher L. A., Wu W.-N., Doskotch R. W., Beal J. L.: Antimicrobial agents from higher plants. II. Alkaloids from *Thalictrum rugosum*. *J. Nat. Prod. (Lloydia)* 35, 167–176 (1972).
- Novák F. A., Svolinský K.: *Naše příroda v obrazech 1. Rostliny I. díl*. Vesmír, Praha 1938.
- Opletal L.: dosud nepublikováno.
- Opletal L.: osobní sdělení, 2010.
- Panza F., Frisardi V., Imbimbo B. P., Capurso C., Logroscino G., Sancarlo D., Seripa D., Vendemiale G., Pilotto A., Solfrizzi V.: Gamma-Secretase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease: The Current State. *CNS Neurosci. Ther.* 16-Jun-2010.
- Patočka J.: Semagacestat-nová cesta v terapii Alzheimerovy nemoci, *Psychiatrie*, 13, 15–17 (2009).
- Pilát A., Ušák O.: *Kapesní atlas rostlin*, str. 38. Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1963.
- Piňha J., Ambler Z.: Nejčastější chyby a omyly v diagnostice a terapii myasthenia gravis. *Neurol. pro praxi* 5, 285–290 (2004).
- Pydychová E.: Alzheimerova nemoc, *Solutio 2002/2003*, 21–28 (2002).

- Raina P., Santaguida P., Ismaila A., Patterson Ch., Cowan D., Levine M., Booker L., Oremus M.: Effectiveness of Cholinesterase Inhibitors and Memantine for Treating Dementia: Evidence Review for a Clinical Practice Guideline. *Ann. Intern. Med.* *148*, 379–397 (2008).
- Reisberg B., Doody R., Stöffler A., Schmitt F., Ferris S., Möbius H. J.: Memantine in Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* *348*, 1333–1341 (2003).
- Rogers S. L., Farlow M. R., Doody R. S., Mohs R., Friedhoff L. T.: A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil study group. *Neurology* *50*, 136–145 (1998).
- Rösler M., Anand R., Cicin-Sain A., Gauthier S., Agid Y., Dal-Bianco P., Stähelin H. B., Hartman R., Gharabawi M.: Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: international randomised controlled trial. *BMJ* *318*, 633–640 (1999).
- Sano M., Ernesto Ch., Thomas R. G., Klauber M. R., Schafer K., Grundman M., Woodbury P., Growdon J., Cotman C. W., Pfeiffer E., Schneider L. S., Thal L. J.: A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's disease cooperative study. *N. Engl. J. Med.* *336*, 1216–1222 (1997).
- Scott L. J., Goa K. L.: Galantamine: A Review of its Use in Alzheimer's Disease. *Drugs* *60*, 1095–1122 (2000).
- Sener B.: Minor alkaloids of *Corydalis rutifolia* (Sibth. and Sm.) D.C. subsp. *kurdica* Cullen and Davis of Turkish origin. *International J. Crude Drug Res.* *26*, 155–159 (1988).
- Silbernag S., Lang F.: *Atlas patofyziologie člověka*, str. 348. Grada, Praha 2001.
- Slavík J., Slavíková L.: Alkaloide der Mohngewächse. Über die Alkaloide von drei Arten der Gattung *Eschscholtzia* und über die Konstitution des neuen Alkaloids Escholamin. *Coll. Czech. Chem. Commun.* *31*, 3362–3372 (1966).

- Slavík J., Slavíková L., Haisová, K.: Alkaloids of the *Papaveraceae*. L. On the quarternary alkaloids from *Argemone platyceras* Link et Otto. Coll. Czech. Chem. Commun. 38, 2513–2517 (1973).
- Slavík J., Slavíková L.: Quaternary alkaloids from the roots of *Agremone platyceras* Link et Otto. Coll. Czech. Chem. Commun. 41, 285–289 (1976).
- Slavík J., Slavíková L.: Alkaloids of *Corydalis cava* (L.) Shweigg. & Koerte. Coll. Czech. Chem. Commun. 44, 2261–2274 (1979).
- Slavíková E., Tschu Shun, Slavík, J.: Alkaloide der Mohngewächse (Papaveraceae). XIV. Alkaloide aus *Argemone alba* Lestib. Coll. Czech. Chem. Commun. 25, 756–760 (1960).
- Small D. H., Klaver D. W., Foa L.: Presenilins and the g-secretase: still a complex problem. *Molecular Brain* 3, 7–12 (2010).
- Stahl E.: *Thin-layer Chromatography, A Laboratory Handbook*, s. 873, SpringerVerlag Berlin, Heidelberg, New York 1969.
- Stevigny C., Habib Jiwan J.-L., Rozenberg R., de Hoffmann E., Quetin-Leclercq, J.: Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. *Rap. Comm. Mass. Spectrom.* 18, 523-528 (2004).
- Sturm S., Seger C., Stuppner H.: Analysis of Central European *Corydalis* species by nonaqueous capillary electrophoresis-electrospray ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1159, 42-50 (2007).
- Szekely C. A., Zandi P. P.: Non-Steroidial Anti-Inflammatory Drugs and Alzheimer's Disease: The Epidemiological Evidence. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9, 132–139 (2010).
- Špalek P.: Miasthénia gravis. *Cesk. Slov. Neurol. N.* 71, 7–24 (2008).
- Ulrichová J., Walterová D., Preininger V., Slavík J., Lenfeld J., Cushman M., Šimánek V.: Inhibition of acetylcholinesterase activity by some isoquinoline alkaloids. *Planta Med.* 48, 111–115 (1983a).

- Ulrichová J., Walterová D., Preininger V., Šimánek V.: Inhibition of butyrylcholinesterase activity by some isoquinoline alkaloids. *Planta Med.* 48, 174–177 (1983b).
- USDA: Taxonomy for Plants, *Germplasm Resources Information Network, Portal United States Department of Agriculture*, staženo: 2. 8. 2010, poslední aktualizace: 28. 11 2001, dostupný z WWW: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?11622>.
- Wichtl M.: Die pharmakognostichs-chemische Analyse. Methoden der Analyse in der Chemie, Bd. 12, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main 1971.
- Wu J., Beal J. L., Wu W.-N., Dostkotch R. W.: Alkaloids of *Thalictrum*. XXXII. Isolation and identification of alkaloids from *Thalictrum revolutum* DC. *Fruit. J. Nat. Prod. (Lloydia)* 43, 270–277 (1980).
- Xu L. H., Gu Z. L., Jiang X. G., Sheng R., Wang X. Q., Xie M. L.: Studies on anticholinesterase active constituents of rhizoma *Corydalis decumbens*. *Yaoxue Xuebao (Act. Pharm. Sin.)* 37, 903–906 (2002).
- Zhang H. Y., Tang X. C.: Neuroprotective effects of huperzine A: new therapeutic targets for neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 619–625 (2006).

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACE-R	<i>Addenbrook Cognitive Examination-Revised</i> , jeden z testů kognitivních vlastností
AD	Alzheimerova demence
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AICD	<i>APP intracellular domain</i> , část původního APP (respektive C99), která po štěpení γ -sekretasou zůstává v cytosolu
APP	<i>amyloid β-precursor protein</i> , původní prekurzorová molekula stojící na počátku vzniku β -amyloidu
A β	β -amyloid, protein figurující v patogenezi Alzheimerovy choroby, vzniká štěpením C99 γ -sekretasou
BACE1	<i>β-site APP cleaving enzyme-1</i> , jedna z forem β -sekretasy
BuChE	butyrylcholinesterasa, pseudocholinesterasa
CAT	cholinacetyltransferasa, enzym tvořící ACh z cholinu a z acetyl- -koenzymu A
CT	centrální tomografie, jedna ze zobrazovacích rentgenových metod
CDT	<i>Clock Drawing Task, hodinový test</i> , jeden z testů kognitivních vlastností
C99	<i>smaller membrane-associated C-terminal stub</i> , menší fragment, který zůstává asociován s membránou po štěpení APP za pomoci β -sekretasy
DAD	<i>Disability Assessment in Dementia</i> , jeden z testů zjišťující kognitivní funkce pacienta dotazováním osoby blízké
DTND	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina)
EGB 761	standardizovaný extrakt získaný z <i>Gingko biloba</i>
FAQ	<i>Functional Activities Questionnaire</i> , jeden z testů zjišťující kognitivní funkce pacienta dotazováním osoby blízké
IC ₅₀	inhibiční koncentrace při které dochází k 50% odezvě testovaného modelu (snížení aktivity enzymu, růstu, ...)
MG	myasthenia gravis

MMSE	<i>Mini-Mental State Examination</i> , jeden z testů kognitivních vlastností
MS	hmotnostní spektrometrie, chemická spektrální metoda
MuSK	specifické svalová kinasa
NMDA-rec.	<i>N</i> -metyl- <i>D</i> -aspartátový receptor, Ca ²⁺ ionotropní receptor glutamátu
NMR	nukleární magnetická rezonance, chemická spektrální metoda
NSP	nervosvalová ploténka
NÚ	nežádoucí účinek, nežádoucí účinky
PET	pozitronová transmisní tomografie, jedna ze zobrazovacích nukleárních metod
QSAR	<i>quantitative structure-activity relationships</i> , kvantitativní vztahy mezi strukturou a aktivitou látky
sAPPβ	<i>large secreted N-terminal fragment of APP</i> , větší fragment, který zůstává volný po štěpení APP za pomoci β-sekretasy
TLC	<i>thin layer chromatography</i> , chromatografie na tenké vrstvě

9 ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Adam Bárta

Školitel: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Název diplomové práce: Biologická aktivita obsahových látek rostlin XIII. Alkaloidy *Corydalis cava* (L.) SCHWEIGG. & KÖRTE a jejich účinek na acetylcholinesterasu.

S podporou: 2010-SVV-2010-261-002

Z primárního ethanolového extraktu připraveného z 11,30 kg suchých hlíz *Corydalis cava* (L.) SCHWEIGG. & KÖRTE, *Fumariaceae*, dymnivky duté, byl po odstranění terciárních alkaloidů obvyklým způsobem proveden pokus o izolaci kvartérních alkaloidů srážecí metodou s využitím reineckátu amonného za vzniku 87,7 g tmavě okrového suchého sedimentu. 44 g komplexu reineckát-alkaloid bylo rozpuštěno v 5 750 ml směsi Me₂CO + MeOH + H₂O (6 + 2 + 1) a hnědý roztok byl zfiltrován přes sloupec anexu Amberlite IRA-401 v chloridovém cyklu za vzniku 12,3 g tmavě hnědého viskózního odparku s obsahem chloridů alkaloidů. Po preparativní sloupcové chromatografii na neutrálním oxidu hlinitém (st. aktivity III, eluce směsí chloroform-ethanol) bylo získáno 13 sumárních frakcí s celkovým výtěžkem 2,888 g. Frakce 3 (76 mg) s náznakem krystalizace byla podrobena preparativní TLC na silikagelu (C₆H₅CH₃ + Et₂NH (95 + 5)) za vzniku 35 mg koncentráту alkaloidu po krystalizaci s výtěžkem 17 mg čisté látky, označení AB-1, u které byla stanovena t. tání, optická otáčivost, MS, ¹H- a ¹³C-NMR spektra. Na základě těchto údajů se ukázalo, že látka je (*S*)-bulbokapnin. Při stanovení biologické aktivity na lidskou erytrocytární acetylcholinesterasu a lidskou sérovou butyrylcholinesterasu byly nalezeny hodnoty IC₅₀ pro AChE > 1000 μM, pro BuCHE 67±2,4 μM. Předpokládá se, že kvartérní alkaloidy jsou obsaženy v dalších frakcích o vyšší polaritě. Po celkovém zhodnocení tohoto preparačního postupu se ukázalo, že použití srážecí metody reineckátem amonným není pro získání kvartérních alkaloidů z vysoce polární frakce extraktu z dymnivky duté vhodné; po zhodnocení literárních údajů a zkušeností pracoviště se zdá být optimální

využití metody vytřepání jodidů kvartérních bazí chloroformem a následné čištění chromatografií na oxidu hlinitém, případně využití dalších chromatografických technik.

Klíčová slova: *Corydalis cava* – dymnivka dutá – hlízy - reineckát amonný – kvartérní alkaloidy – bulbikapnin.

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Adam Bárta

Supervisor: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Title of Diploma Thesis: Biological activity of plant metabolites. XIII. Alkaloids of *Corydalis cava* (L.) SCHWEIGG. & KÖRTE and their activity to acetylcholinesterase

With support of: 2010-SVV-2010-261-002

After tertiary alkaloids removal from primary ethanol extract from 11.3 kg of dried tubers of *Corydalis cava* (L.) SCHWEIGG. & KÖRTE, *Fumariaceae*, by regular manner, the attempt to isolate quaternary alkaloids was implemented. The isolation was implemented by precipitation method with the use of reineckate to get 87.7 g of dark ochre dry sediment. 44 g of reineckate-alkaloid complex was dissolved in 5 750 ml of Me₂CO + MeOH + H₂O (6 + 2 + 1) mixture and brown solution was filtered by column of anex Amberlite IRA-401 in chloride cycle to get 12.3 g of dark brown viscose fraction with the content of alkaloid chlorides. After the preparative column chromatography on neutral aluminium oxide (activity level III, elution by chloroform-ethanol mixture) 13 summary fractions were obtained with the total yield of 2.888 g. Fraction 3 (76 mg) with the indication of crystallization was treated by preparative TLC on silica gel (C₆H₅CH₃ + Et₂NH (95 + 5)) to get 35 mg of alkaloid concentrate. 17 mg of pure substance, signed AB-1, was obtained after crystallization. Melting point, optical rotation, MS, ¹H- and ¹³C-NMR spectra were determined. On the basis of these data, it was proved that this substance was (*S*)-bulbocapnine. The biological activity on human erythrocyte acetylcholinesterase and human plasma butyrylcholinesterase was determined by Ellman's method with IC₅₀ values for AChE > 1000 μM and for BuChE 67±2.4 μM. It is assumed that quaternary alkaloids are contained in other fractions with higher polarity. After the general evaluation of this preparative procedure it was proved that the use of reineckate precipitation method is not suitable for obtaining quaternary alkaloids from highly polar fraction of *C. cava* extract;

after the evaluation of literature data and experience of other researches the use of batch extraction of quaternary bases of iodides by chloroform and subsequent purification by aluminium oxide chromatography appears to be optimal, eventually with the use of other chromatographic techniques.

Key words: *Corydalis cava* - tubers - reineckate - quaternary alkaloids - bulbocapnine.