

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

---

RIGORÓZNÍ PRÁCE

**Biologicky aktivní metabolity rostlin V.**  
**Alkaloidy *Eschscholtzia californica* CHAM. a jejich biologická aktivita**

**Biologically Active Metabolites of Plants V.**  
**Alkaloids from *Eschscholtzia californica* CHAM. and their Biological Activity**

Vedoucí katedry: prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Vedoucí rigorózní práce: Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Olomouc, říjen 2012

Mgr. Martin Poruba

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato 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.

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu specifického vysokoškolského výzkumu SVV UK 265 002.

Olomouc, říjen 2012

.....

Podpis

Mé poděkování patří Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za odborné rady při práci v laboratoři, při sepisování práce a za změření hmotnostních spekter izolovaných alkaloidů. Rovněž bych chtěl poděkovat Ing. Kateřině Macákové Ph.D. za změření biologické aktivity látek, Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za změření a interpretaci NMR spekter izolovaných látek. Dále bych chtěl poděkovat Doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi CSc. za udělení odborných rad při mé předchozí práci, které jsem mohl bohatě využít při vypracování této práce. A v neposlední řadě celému kolektivu katedry farmaceutické botaniky a ekologie za příjemné pracovní prostředí a pomoc při řešení různých problému.

## **Obsah**

Obsah .....	4
1 Úvod .....	8
2 Cíl práce.....	11
3 Teoretická část.....	13
3.1 Neurodegenerativní choroby.....	14
3.1.1 Alzheimerova choroba.....	14
3.1.1.1 Klinický obraz .....	14
3.1.1.2 Acetylcholin .....	15
3.1.1.3 Etiopatogeneze AD.....	15
3.1.1.4 Léčba AD.....	16
3.1.1.4.1 Kognitiva .....	17
3.1.1.4.2 Inhibitory NMDA receptorů.....	18
3.1.1.4.3 Nootropika.....	19
3.1.1.4.4 Ostatní léčiva a látky přírodního původu .....	19
3.2 <i>Eschscholtzia californica</i> CHAM. ....	21
3.2.1 Botanický popis .....	21
3.2.2 Droga – <i>Eschscholziae herba</i> – nať sluncovky kalifornské .....	22
3.2.3 Použití v lidovém léčitelství .....	22
3.2.4 Obsahové látky .....	22
3.3 Alkaloidy <i>E. californica</i> .....	23
3.3.1 Pavinanové alkaloidy .....	24
3.3.2 Protopinové alkaloidy .....	25
3.3.3 Benzofenantridinové alkaloidy .....	25
3.3.4 Aporfinové alkaloidy .....	26
3.3.5 Benzylisochinolinové alkaloidy.....	28
3.3.6 Protoberberinové alkaloidy.....	29
3.3.7 Morfinanové alkaloidy.....	30
4 Experimentální část .....	31
4.1 Všeobecné postupy.....	32
4.1.1 Destilace a odpařování.....	32
4.1.2 Tenkovrstvá chromatografie .....	32
4.2 Materiál a vybavení.....	32
4.2.1 Rozpouštědla a chemikálie .....	32
4.2.1.1 Rozpouštědla .....	32
4.2.1.2 Chemikálie.....	32
4.2.2 Chemikálie a materiál ke stanovení účinku erythrocytární AChE a BuChE	

4.2.2.1	Chemikálie.....	33
4.2.2.2	Materiál.....	33
4.2.3	Chemikálie a materiál pro stanovení antioxidační aktivity .....	33
4.2.4	Přístroje použité pro stanovení biologické aktivity látek.....	34
4.2.5	Detekční činidla .....	34
4.2.6	Chromatografické absorbenty.....	34
4.2.7	Chromatografické nalévané desky.....	35
4.2.8	Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii.....	35
4.3	Postup extrakce alkaloidů z <i>Eschscholtzia californica</i> CHAM. ....	35
4.3.1	Původ drogy.....	35
4.3.2	Příprava extraktu a jeho čištění.....	35
4.3.3	Zpracování spojených frakcí 53 - 54: .....	36
4.4	Určení struktury izolovaných látek .....	40
4.4.1	Měření hmotnostního spektra .....	40
4.4.2	Měření NMR spekter .....	40
4.5	Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE.....	40
4.5.1	Podmínky měření.....	40
4.5.2	Příprava erytrocytálních pouzder.....	41
4.5.3	Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů vůči AChE a BuChE.....	41
4.6	Stanovení antioxidační aktivity získaných alkaloidů.....	42
4.7	Matematické zpracování experimentálních dat.....	42
5	Výsledky.....	43
5.1	Strukturní analýza protopinu.....	44
5.1.1	MS studie protopinu.....	44
5.1.2	NMR studie protopinu .....	45
5.1.2.1	<sup>1</sup> H-NMR studie protopinu .....	46
5.1.2.2	<sup>13</sup> C-NMR studie protopinu .....	46
5.2	Strukturní analýza escholtzinu .....	47
5.2.1	MS studie escholtzinu .....	47
5.2.2	NMR studie escholtzinu.....	48
5.2.2.1	<sup>1</sup> H-NMR studie escholtzinu.....	48
5.2.2.2	<sup>13</sup> C-NMR studie escholtzinu.....	49
5.3	Strukturní analýza O-methylkaryachinu .....	50
5.3.1	MS studie O-methylkaryachinu .....	50
5.3.2	NMR studie O-methylkaryachinu.....	52
5.3.2.1	<sup>1</sup> H-NMR studie O-methylkaryachinu.....	52

5.3.2.2	$^{13}\text{C}$ -NMR studie O-methylkaryachinu.....	53
5.4	Inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE.....	55
5.5	Antioxidační aktivita.....	55
6	Diskuze.....	56
7	Seznam zkratk.....	60
8	Literatura.....	62

## **1 Úvod**



V posledních několika desetiletích se stále častěji v populaci vyskytují onemocnění, která se v dřívějších dobách vyskytovala mnohem sporadičtěji. Obecně se nazývají civilizační choroby. Jejich zvýšený výskyt má mnohá odůvodnění: lidé se dožívají vyššího věku, změnil se životní styl, zhoršilo se životní prostředí.

Na příčině těchto nemocí se podílejí mnohé faktory, z nichž některé se řadí mezi ovlivnitelné a jiné mezi neovlivnitelné.

Jako důležitý rizikový faktor bezpochyby vystupuje věk nemocného, protože mnoho nemocí se vyskytuje až ve vyšším věku. A vzhledem k tomu, že došlo k významnému prodloužení délky života, mohou se tyto nemoci naplno rozvinout. Týká se to snad všech tzv. civilizačních chorob. Za prodloužení délky života vděčíme především pokrokům v medicíně, na něž bylo 20. století bouřlivé. Jako další neovlivnitelný rizikový faktor vystupuje pohlaví nemocného, který se významně projevuje u nemocí kardiovaskulárního systému. U mužů je mnohem vyšší pravděpodobnost vzniku aterosklerotických změn na tepnách již ve středním věku a s nimi souvisí další kardiovaskulární komplikace jako akutní infarkt myokardu nebo náhlá cévní mozková příhoda.

Mezi důležité ovlivnitelné rizikové faktory patří bezpochyby životní prostředí. To je převážně odpovědné za vznik mnohých plicních onemocnění, jako je astma bronchiale, chronická obstrukční nemoc, nebo nádory plic. Tyto choroby se většinou vyskytují v oblastech s rozvinutým těžkým hutnickým průmyslem. Mezi hlavní provokující látky patří polyaromatické uhlovodíky a jejich deriváty, převážně prokázaný kancerogen benzo[a]pyren.

Za další významný rizikový faktor je považován životní styl, který mnohdy souvisí s rozvojem civilizace. Lidé se stávají pohodlnější a všemu napomáhají vynálezy, které usnadňují každodenní záležitosti, jako je shánění potravy, doprava.

Veškeré tyto faktory jsou příčinou onemocnění, jako jsou nemoci kardiovaskulární, plicní, nádorová a v neposlední řadě také neurologická. Všechna tato onemocnění šplhají vysoko v řebříčku nejnákladnějších chorob, co se úhrad zdravotních pojišťoven týče.

Mezi významná neurologická onemocnění patří demence. Významně se objevuje u populace starší 60 let. U lidí starších 65 let je riziko onemocnění 5 %, v 75 letech riziko stoupá na 10 %, v 80 na 20 % a nad 90 let se demence vyskytuje u 30 – 50 % seniorů<sup>1</sup>.

Nárůst počtu nemocných demencí do jisté míry kopíruje výše zmíněné demografické změny. Procentuální nárůst populace nad 60 let převyšuje celkový nárůst populace. Populace tedy stárne.

Odhaduje se, že České republice je v současnosti 80 tis. až 100 tis. nemocných a 70 % z nich je starších 70 let, a dokonce 10 % nemocných je mladších 65 let, tento typ demence se označuje jako presenilní demence<sup>2</sup>.

Velmi často se demence vyskytuje u pacientů, kteří trpí Alzheimerovou chorobou (AD). AD je neurodegenerativní onemocnění, které i přes pokroky v medicíně, je stále nevléčitelné, pouze do jisté míry jsme schopni progresi zpomalit. Za zpomalení rozvoje onemocnění vděčíme především léčivům, která zasahují do metabolismu acetylcholinu nebo ovlivňují vápníkové receptory neuronů.

Na trhu se sice vyskytuje spousta dalších látek, ale zatím bez prokázaného prospěchu pro nemocného. Patří sem převážně antioxidačně působící látky, sloučeniny ovlivňující prokrvení, metabolismus nervových buněk nebo látky sloužící jako prekurzory mozkových neuromediátorů. Pro tyto látky dosud nebyly vedeny velké placebem kontrolované klinické studie nebo již provedené studie plně neprokázaly jejich příznivý účinek. Na druhou stranu existuje spousta látek naší medicínou neužívaných, ale užívaných po staletí ethnofarmakologicky, například tradiční čínskou medicínou nebo tradiční indiánskou medicínou.

Mezi užívané taxony patří především rostliny bohaté na alkaloidy a především isochinolinové alkaloidy. Z toho důvodu je potřeba těmto taxonům věnovat zvýšenou pozornost a snažit se důkladně analyzovat jejich metabolity, které pravděpodobně jsou za jejich účinek odpovědné. Je potřeba důkladně prozkoumat vztah mezi jejich strukturou a účinkem, aby bylo možno zjistit jejich přesný mechanismus účinku a případně synteticky připravit látky účinnější nebo s nižší toxicitou pro organismus.

Studiem účinku na některé enzymové systémy lidského CNS se zabývá skupina ADINACO, vzniklá na katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové a tato práce je příspěvkem k uvedenému tématu.

## **2 Cíl práce**

Cílem mojí rigorózní práce bylo:

1. Zpracování alkaloidního výtřepku z rostliny *Eschscholtzia californica* CHAM. a izolace alespoň jednoho alkaloidu v čistém stavu pomocí chromatografických metod.
2. Identifikace získaných alkaloidů za využití fyzikálně-chemických metod.
3. Podíl na stanovení jejich biologické aktivity: inhibice humánní acetylcholinesterasy, bytyrylcholinesterasy a stanovení jejich antioxidační aktivity metodou DPPH.

### **3 Teoretická část**

## **3.1 Neurodegenerativní choroby**

Neurodegenerativní onemocnění (NDO) jsou charakteristické poškozením neuronů, tedy nervových buněk. Buňky se mohou poškodit a ztratit svou fyziologickou úlohu nebo může dojít přímo k jejich zániku. K poškození neuronů vedou nejčastěji patologické procesy: excitotoxicita, oxidační stres a apoptóza. Zánik či poškození buňky vede k zastavení vedení nervového signálu nebo ke vzniku různých šumů. V centrálním nervovém systému (CNS) může mít toto poškození v závislosti na oblasti mozku a nedostatku reparačních prostředků dalekosáhlé důsledky pro nemocného. Mezi nejdůležitější NDO patří Parkinsonova, Huntingtonova a Alzheimerova choroba. Pro Parkinsonovu a Huntingtonovu chorobu je neurodegenerativní proces charakteristický pro oblast bazálních ganglií. U Alzheimerovy choroby je úbytek neuronů a poškození lokalizováno především v předním mozku a hipokampu<sup>3</sup>.

### **3.1.1 Alzheimerova choroba**

Je neurodegenerativní onemocnění z atroficko-degenerativní příčiny. Stává se jedním z největších medicínských problémů 21. století. Tato skutečnost souvisí se stárnutím populace a nárůstem počtu obyvatel starších 65 let.

Charakteristické je poškození neurotransmise již v počátečních fázích nemoci. Nemoc má postupný plíživý nástup a postupně se zhoršují kognitivní funkce pacienta. Choroba je i přes velké pokroky v medicíně stále nevyléčitelná a za úspěch v léčbě je považováno i zpomalení progresu.

#### **3.1.1.1 Klinický obraz**

Charakteristicky je nejdříve poškozena paměť nemocného, postupně dle stupně onemocnění se přidávají poruchy řeči, orientace, prostorové funkce a apraxie. Dle stupně postižení rozeznáváme demenci lehkou, při níž jsou mírně poškozeny převážně funkce tzv. novopaměti, případně mírné poruchy řeči ve smyslu omezení slovní zásoby nebo dysnomie. Pro farmakoterapii je důležitý vznik pacientovi „non-compliance“ (tedy ochoty a schopnosti spolupracovat). U středně těžké demence je pacient dezorientován, zvýrazňují se poruchy paměti, řeči, což pacienta omezuje v sociálních kontaktech. Dochází k potížím se zvládnutím rutinních úkolů. U těžké demence je pacient odkázán na pomoc okolí i v zcela běžných záležitostech, nedokáže se sám najíst, ztrácí schopnost chůze, komunikace s pacientem je omezena na jednoslovné věty nebo několik slov.

Celková délka onemocnění od diagnózy po smrt trvá v průměru 6 - 12 let v závislosti na původu demence. I když samotné onemocnění v důsledku může způsobit smrt nemocného, pacienti nejčastěji umírají na úrazy, infekční onemocnění a další komplikace<sup>2</sup>.

### 3.1.1.2 Acetylcholin

V CNS hraje velice důležitou roli neuromediátor acetylcholin (ACh). Vzniká v těle nervové buňky z acetylkoenzymu A a cholinu za přítomnosti enzymu cholinacetyltransferasy (CAT). Dále je koncentrován do vezikul v počtu asi  $10^4$  molekul a axonálním transportem jsou vzniklé vezikuly dopravovány do presynaptické oblasti neuronu. Takto připravené váčky jsou připravené po přijetí signálu ve formě  $Ca^{2+}$  splynout s plazmatickou membránou neuronu a vypustit celý svůj obsah do synaptické štěrbině, v níž může ACh reagovat se specifickými receptory<sup>4</sup>.

Koncentrace ACh v synaptické štěrbině je přísně kontrolována pomocí enzymu acetylcholinesterasy (AChE). AChE enzymaticky štěpí ACh zpět na výchozí složky. AChE se u člověka vyskytuje ve dvou formách G1 a G4. U zdravých jedinců převažuje tetramerní forma G4, zatímco u nemocných AD převládá monomerní forma G1 a navíc je nadměrně tvořena butyrylcholinesterasou (BuChE), která se rovněž podílí na rozkladu ACh. Ke zvýšené syntéze BuChE dochází především v místech s vyšší akumulací tzv.  $\beta$ -amyloidních plaků o nichž bude pojednáno dále<sup>5</sup>.

### 3.1.1.3 Etiopatogeneze AD

Etiopatogeneze onemocnění není dosud plně objasněna. Předpokládají se určité genetické predispozice především díky nalezení mutací na chromozomech u nemocných AD. Mutace se týkají především genu kontrolujícího tvorbu nerozpustného  $\beta$ -amyloidu, jinak běžné součásti buněčné membrány neuronů.  $\beta$ -amyloid vzniká přeměnou amyloidního prekurzorového proteinu (APP), přirozeného transmembránově uloženého proteinu. Za fyziologických podmínek jsou z APP pomocí enzymu  $\alpha$ -sekretasy odštěpovány dále neškodné a rozpustné peptidy o délce 39 aminokyselin. Zbylý peptid v plazmatické membráně je štěpen pomocí  $\beta$ -sekretasy a  $\gamma$ -sekretasy na neškodné rozpustné fragmenty, jejichž fyziologická úloha dosud nebyla plně objasněna. U AD převažuje aktivita  $\beta$ -sekretasy, která před  $\alpha$ -sekretasou rozštěpí APP na dva řetězce: sAPP $\beta$  a C99. Řetězec C99, který je stále vázaný na plazmatickou membránu, je dále

pomocí  $\gamma$ -sekretasy štěpen na jednotlivé amyloidní beta ( $A\beta$ ) peptidy. Produktem jsou proteiny o různém počtu aminokyselin, 40 nebo 42 a podle jejich počtu se dělí na řadu  $A\beta_{40}$  a řadu  $A\beta_{42}$ . Ve větší míře vzniká  $A\beta_{40}$ , který se často chybně svinuje, ukládá se do cévní stěny a podílí se na vzniku amyloidní angiopatie a může vést až k mozkovému krvácení. Minoritní  $A\beta_{42}$  naopak velmi ochotně polymerizuje za vzniku oligomerů, polymerů a nakonec se agreguje do tzv. senilních plaků, které jsou histologicky prokazatelné v mozku nemocných. Tyto  $A\beta_{42}$  proteiny mají schopnost aktivovat kaskádu oxidačního poškození buněk a je prokázáno, čím delší polymer proteiny vytvoří, tím je poškození rychlejší a vyšší. Oxidační poškození vede k poškození cytoskeletu, jenž hraje důležitou roli v axonálním transportu u neuronů. Tento mechanismus se v konečném důsledku jednak podílí na snižování hladiny ACh v synapsích, jednak na poškození a zániku neuronů<sup>5,6</sup>.

Zvýšenou excitotoxicitu zastupuje zvýšené uvolňování excitačních aminokyselin, které se podílejí na tvorbě dlouhodobé paměti, pomocí tzv. dlouhodobé potenciace - „long term potentiation“ (LTP). Při LTP dochází k dlouhodobému dráždění vždy stejné skupiny neuronů a každé nové podráždění vyvolá silnější odezvu na postsynaptickém potenciálu. Toto dráždění je zprostředkováno pomocí ionotropních N-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů za součinnosti receptorů 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl)propanové kyseliny (AMPA). U AD dochází k přílišnému dráždění NMDA i AMPA receptorů vlivem zvýšeného uvolňování excitačních aminokyselin. Toto zvýšené dráždění způsobuje v přenosu signálu šumy, které brání vzniku účinného postsynaptického potenciálu a v konečném důsledku dochází k poruchám při LTP. Navíc NMDA receptory jsou spojeny s kalciovými kanály a jejich zvýšené dráždění vede k vyššímu influxu vápenatých iontů do nitra buňky. Zvýšení hladiny  $Ca^{2+}$  vede mimo jiné k aktivaci signální kaskády, která vede k odkrytí genu pro apoptózu a buňka hyne<sup>7</sup>.

V neposlední řadě se na zániku nervových buněk podílí také sterilní zánět, který probíhá převážně v oblasti senilních plaků, tvořených amyloidními  $\beta$  peptidy<sup>8</sup>.

#### **3.1.1.4 Léčba AD**

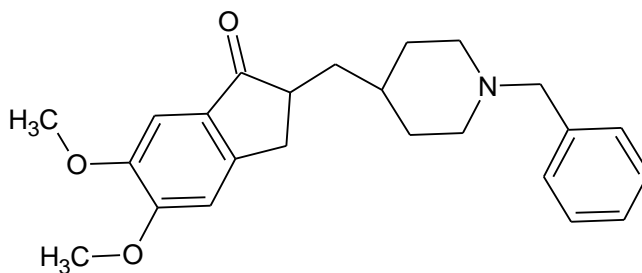
V současné době se pro léčbu AD uplatňuje několik skupin léčiv: kognitiva, látky zlepšující narušenou glutamátergní transmissi, nootropika a léčiva ostatní.



### 3.1.1.4.1 Kognitiva

Kognitiva jsou látky, které mají schopnost zvýšit pozornost a paměťové schopnosti především díky jejich cholinomimetickému účinku, případně i jiným mechanismem účinku. Z látek se nejvíce osvědčily sloučeniny, které nepřímo zvyšují množství ACh v synapsích, inhibicí enzymů odpovědných za jeho rozklad (AChE a BuChE). V současnosti jsou u nás používány pouze tři látky: donepezil (Aricept<sup>®</sup>), galanthamin (Reminyl<sup>®</sup>) a rivastigmin (Exelon<sup>®</sup>). Pro účinek je nezbytné, aby léčiva inhibovala alespoň AChE, i když vzhledem k tomu, že BuChE postupně přebírá katabolické funkce AChE, je výhodná inhibice i BuChE. Všechny uvedené léčivé látky působí reverzibilní inhibicí, pouze rivastigmin vykazuje pseudoreverzibilní účinek, díky tomu, že po navázání na enzym dojde ke zmetabolizování enzymu a dále je tento enzym již neúčinný. Dříve zavedené inhibitory jako physostigmin či takriny se v současnosti především kvůli nežádoucím účinkům neužívají<sup>1,3</sup>.

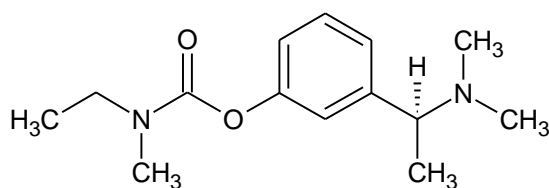
**Donepezil**, je nejdéle užívaný inhibitor, jehož aktivita je omezena pouze na ovlivnění AChE, ale dosahuje významné CNS selektivity, díky níž dosahuje minimálních periferních nežádoucích účinků. Po chemické stránce je donepezil derivátem piperidinu<sup>1</sup>.



Obr. 1: Struktura donepezilu

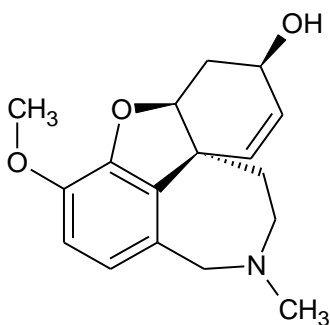
**Rivastigmin**, jediná dostupná látka s dualistickým účinkem na AChE i BuChE. Navíc inhibuje pseudoreversibilně, tedy i po uvolnění inhibitoru z vazby na ChE, zůstává ChE neúčinná, neboť došlo k její metabolizaci. Chemicky se jedná o karbamát<sup>1</sup>.

U této látky bylo navíc zjištěno ovlivnění sekretas, ve smyslu zvýšeného odbourávání APP pomocí  $\alpha$ -sekretasy na sAPP $\alpha$  a snížení tvorby A $\beta$  peptidů<sup>9</sup>.



Obr. 2: Struktura rivastigminu

**Galanthamin**, nejmladší ze tří uvedených inhibitorů AChE. Mimo inhibice AChE se vyznačuje alosterickým modulujícím účinkem na pre- i postsynaptické nikotinové receptory. Tento účinek posiluje cholinergní přenos informací. Látka přírodního původu izolována z některých druhů sněženek a narcisů. Chemicky se jedná o fenantrenový alkaloid<sup>1</sup>.

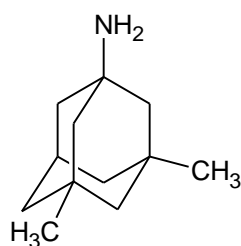


Obr. 3: Struktura galanthaminu

Z ostatních kognitiv jsou někdy používány látky, které přímo uvolňují prekurzory acetylcholinu. Patří zde převážně **sójové lecitiny**, u nichž jejich účinek dosud nebyl kontrolovanými studiemi plně dokázán. Nedostatečný účinek je vysvětlován nízkou prostupností látek přes hematoencefalickou bariéru. Proto patří spíše do kategorie potravních doplňků nebo jako podpůrná léčba při užívání inhibitorů AChE a BuChE<sup>5</sup>.

#### 3.1.1.4.2 Inhibitory NMDA receptorů

Mezi látky ovlivňující glutamátérgní transmisi patří jediné u nás registrované léčivo **memantin**. Látka je užívána u středně těžkých až těžkých fází onemocnění. Memantin inhibuje glutamátové receptory, jejichž aktivace vede ke vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do buňky<sup>5</sup>.



Obr. 4: Struktura memantinu

### 3.1.1.4.3 Nootropika

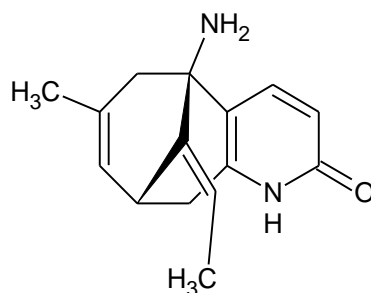
Nootropika, jsou chemicky nesourodou skupinou léčiv, které příznivě působí při poruchách vědomí, pozornosti, či paměti, a to především při akutních stavech, při úrazech, mozkových traumatech, intoxikacích. Další indikací jsou např. mentální vývojové poruchy, dyslexie, Raynaudův syndrom, delirium tremens. Pro tyto látky je společné, že dobře prostupují přes hematoencefalickou bariéru (HEB) a zvyšují v mozkových buňkách obrát kyslíku a glukózy, případně upravují reologické vlastnosti krve. Mezi tyto látky patří **meklofenolat**, **pyritinol**, **piracetam**. Někdy jsou mezi skupinu nootropik, řazeny i vasodilatancia mozkových cév, jako **pentoxifylin**, **naftydrofuryl**, **dihydroergotoxin** nebo **nicergolin**. Všechny tyto látky je potřeba užívat dlouhodobě a i přesto, dosud nebyl u Alzheimerovy choroby jejich účinek plně potvrzen. Navíc pro všechny látky s vasodilatačním působením je nebezpečí vzniku tzv. steal fenoménu, kde krev místo do ischemizované části, proudí do oblasti bez poškození<sup>3</sup>.

### 3.1.1.4.4 Ostatní léčiva a látky přírodního původu

Mezi ostatní léčiva patří látky, které určitým mechanismem mohou příznivě ovlivňovat onemocnění. Patří sem např. **nesteroidní antiflogistika** nebo **statiny**, které mohou snížit nebo zastavit probíhající zánět, ničící nervové buňky<sup>3</sup>.

Zajímavou skupinou látek jsou látky, které vylučují volné kyslíkové radikály, protože volné radikály hrají důležitou roli v patofyziologii AD. Slibně vypadá působení **vitaminu E**, jehož účinek při dávkování 2000 IU denně byl potvrzen studií. Z dalších antioxidantů, zatím bez potvrzeného efektu je možno považovat **vitamin C**, **beta-karoten**, **selen**<sup>5</sup>.

V neposlední řadě se k léčbě užívají látky přírodního původu, k nimž patří již užívaný alkaloid **galanthamin**. Velice slibné se zdá být použití alkaloidu **huperzinu A** izolovaného z čínské rostliny *Huperzia serrata*. Jedná se o reverzibilní inhibitor AChE, který je v Číně již několik let používán k léčbě AD a jiných demencí<sup>10</sup>. Mimo inhibice AChE se alkaloid podílí na odstraňování volných radikálů a zlepšuje mozkové prokrvení<sup>11</sup>.



Obr. 5: Struktura Huperzinu A

Mezi látky přírodního původu a zároveň působící jako kognitiva patří dvě látky izolované z čekanky *Cichorium intibus* **8-deoxylaktucin** a **laktukopikrin**. Obě látky nejsou alkaloidy, ale jedná se o sekviterpenické laktony inhibující AChE<sup>12</sup>.

Dalším slibným inhibitorem AChE i BuChE je alkaloid **hookerianamid-H** izolovaný z keřku *Sacococca hookeriana*<sup>13</sup>. Významnějším inhibitorem AChE je dále **leptomerin**, derivát 4-chinolinonu izolovaný z rostliny *Esenbeckia leicarpa*<sup>14</sup>.

Jako zástupce přírodních alkaloidů s jiným účinkem než inhibicí ChE uvedu alkaloidy **evodiamin** izolovaný z *Evodia rutaecarpa* a **vinkamin** z rostliny *Catharanthus roseus*. **Evodiamin** je látka působící jako inhibitor cox-2 a uvolňování prozánětlivých cytokinů. Tedy mechanismem se podobá účinku nesteroidních antiflogistik a statinů<sup>15</sup>. **Vinkamin** zlepšuje reologické vlastnosti, působí vasodilatačně a byly u něj objeveny také antioxidační účinky<sup>16</sup>.

Zajímavou rostlinou díky svým obsahovým látkám je určitě také *Eschscholtzia californica*, o níž bude pojednáno dále.

## 3.2 *Eschscholtzia californica* CHAM.

Jedná se o rostlinu, která je zajímavá svým obsahem isochinolinových alkaloidů z čeledi Papaveraceae.

### 3.2.1 Botanický popis

Jednoletá až vytrvalá bylina patřící do čeledi Papaveraceae vyrůstá do výšky až 60 cm. Lodyha je vzpřímená a nese šedozelené hluboce členěné listy. Na konci stonku jeden květ žluté až oranžové barvy se čtyřmi okvětními lístky 2 - 6 cm dlouhými a širokými. V domovské krajině vykvétá od února do září. Květy se na noc, v chladu a ve větrném počasí zavírají. Po odkvětu květy přecházejí v štíhlé 3 - 9 cm dlouhé tobolky, které se podélně štěpí na dvě poloviny, aby z nich mohla vypadat spousta malých tmavě hnědých až černých semen. Domovinou rostliny je východní území Spojených Států Amerických od státu Oregon až po Mexiko. V závislosti na klimatických podmínkách je rostlina jednoletá, případně vytrvalá. U nás pěstována především jako dekorativní letnička, která u nás občas zplaňuje<sup>17</sup>.

Rostlina je producentem sekundárních metabolitů, především isochinolinových alkaloidů. O nich bude pojednáno dále.



COMMON CALIFORNIA-POPPY  
*Eschscholtzia californica* Cham.  
POPPY FAMILY

Obr. 6: Kresba rostliny *Eschscholtzia californica*<sup>17</sup>

### 3.2.2 Droga – *Eschscholziae herba* – nat' sluncovky kalifornské

Jako droga jsou používány sušené nadzemní části rostliny *E. californica* CHAM. sbírané v období květu. Složku drogy tvoří převážně duté stonky bělavé nebo nažloutlé barvy s 8 až 12 kolenchymovými žebry. Součástí drogy jsou také lehce opadavé silně ochlupené šedo zelené listy a žluté až oranžové květy<sup>18</sup>.

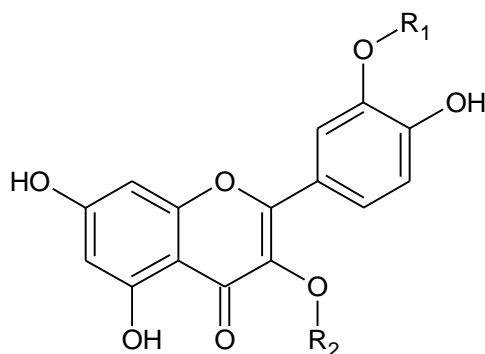
### 3.2.3 Použití v lidovém léčitelství

*E. californica* je tradiční léčivou rostlinou severoamerických indiánů a prvních evropských osadníků. Používána je především pro své hypnotické a analgetické vlastnosti. Nicméně jsou i doklady o jejím užívání proti nočnímu pomočování u dětí a ve formě obkladů byla používána zevně na hojení ran, vředů a různých popálenin. V současnosti je v Americe a Evropě užívána jako mírné sedativum. V několika posledních desetiletích probíhá intenzivní výzkum této rostliny a mnohé jí připisované účinky již byly potvrzeny *in vitro* případně na zvířecích modelech<sup>19</sup>.

### 3.2.4 Obsahové látky

Hlavní obsahové látky *E. californica* jsou izochinolinové alkaloidy, které se ve větší míře vyskytují v podzemních i nadzemních částech kvetoucích rostlin. Vyšší obsah alkaloidů dosahují podzemní části rostliny, ale pro farmaceutické a terapeutické účely se používají části nadzemní. V rostlinách se vyskytuje směs terciárních a kvartérních alkaloidů různého typu<sup>20</sup>. Podrobněji jim bude věnována následující kapitola.

Mimo alkaloidů byly z rostliny izolovány také flavonoidy, především jako glykosidy **kvercetinu** a **isorhamnetinu**. V ethanolickém extraktu nadzemních částí rostliny bylo nalezeno několik flavonol 3-O glykosidů. Zajímavostí je, že z rostliny nebyly získány samotné aglykony<sup>21</sup>. Níže je zobrazena základní struktura flavonolových glykosidů izolovaných z *E. californica*.



$R_1 = \text{H}$  nebo  $\text{CH}_3$ ;  $R_2 =$  sacharidová složka

Obr. 7: Struktura flavonolových glykosidů z rostliny *E. californica*

Samotný aglykon **kvercetin** snižuje permeabilitu kapilár, působí vasodilatačně a ve vyšších dávkách snižuje tonus hladného svalstva a vykazuje celkově spasmolytickou aktivitu<sup>22</sup>.

Z korunních lístků *E. californica* bylo izolováno několik karotenoidů jako:  **$\beta$ -karoten** (1 %), **eschsoltzxanton** (0,5 %), **eschsoltzxantin** (35 %), **lutein** (1 %), **zeaxantin** (2 %), **antheraxantin** (10 %), **mutatoxantin** (6 %), **violoxantin** (10 %), **luteoxantin** (5 %), **auroxantin** (5 %) a **neoxantin** (2 %)<sup>23</sup>.

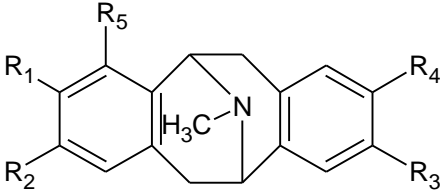
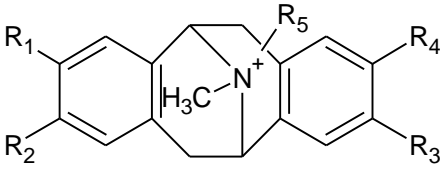
### 3.3 Alkaloidy *E. californica*

Alkaloidy jsou sekundární metabolity rostlin. O jejich významu pro rostlinu zatím mnoho nevíme, ale předpokládáme, že mohou být odpadní formou nepotřebných toxických látek pro rostlinu, nebo to mohou být i látky tvořené kvůli ochraně rostliny před pozřením živočichy. Po chemické stránce se jedná o bazické látky, pro něž je charakteristická přítomnost alespoň jednoho atomu dusíku, který může mít povahu aminu nebo i amidu. Atom dusíku je nejčastěji součástí heterocyklického útvaru, ale může být umístěn i mimo cyklus. Je známo mnoho typů alkaloidů, které se od sebe vzájemně odlišují především typem heterocyklického útvaru. *E. californica* je bohatá na alkaloidy isochinolinového typu, pro které je charakteristická přítomnost isochinolinu v molekule. I tato skupina se dále dělí na jednotlivé typy alkaloidů. Proto budou v následujících odstavcích probrány pouze ty typy, jenž byly izolovány z taxonu *E. californica*.

### 3.3.1 Pavinanové alkaloidy

Nejvíce zastoupenou alkaloidní složkou *E. californica* jsou alkaloidy pavinanového typu. Nositelem bazicity alkaloidů tohoto typu je atom dusíku ve středu molekuly a dle substituce se dělí na alkaloidy terciární a kvarterní. Z nich nejvíce zastoupené je silně polární kvarterní báze **kalifornidin**, který je rozšířený ve všech částech rostliny a **kalifornin (escholtzin)**, který se vyskytuje pouze v nadzemních částech rostliny<sup>18</sup>. Tyto dva alkaloidy jsou pravděpodobně odpovědné za anxiolytický a sedativní efekt alkoholického i vodného extraktu, ovlivněním GABAergního systému<sup>24</sup>. V menší míře jsou zastoupeny terciární alkaloidy **karyachin**, **o-methylkaryachin**, případně **neocharyachin**, který byl poprvé z rostliny izolován v roce 2010<sup>25</sup>.

Tab. 1: Přehled struktur pavinanových alkaloidů izolovaných z *E. californica*

					
Argemonin	R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>5</sub> = H
Bisnorargemonin	R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> = OH	R <sub>3</sub> = OH	R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>5</sub> = H
Escholtzin	R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = OCH <sub>2</sub> O		R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = OCH <sub>2</sub> O		R <sub>5</sub> = H
Isonorargemonin	R <sub>1</sub> = OH	R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>5</sub> = H
Karyachin	R <sub>1</sub> = OH	R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = OCH <sub>2</sub> O		R <sub>5</sub> = H
Neokaryachin	R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> = H	R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = OCH <sub>2</sub> O		R <sub>5</sub> = OH
Norargemonin	R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> = OH	R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>5</sub> = H
O-methylkaryachin	R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = OCH <sub>2</sub> O		R <sub>5</sub> = H
					
Eschsoltzin-N-oxid	R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = OCH <sub>2</sub> O		R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = OCH <sub>2</sub> O		R <sub>5</sub> = O <sup>-</sup>
Kalifornidin	R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = OCH <sub>2</sub> O		R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = OCH <sub>2</sub> O		R <sub>5</sub> = CH <sub>3</sub>
N-methyl-escholtzidin	R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = OCH <sub>2</sub> O		R <sub>5</sub> = CH <sub>3</sub>

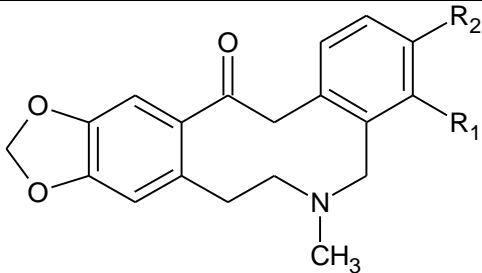


### 3.3.2 Protopinové alkaloidy

Protopinové alkaloidy jsou terciární nebo kvartérní alkaloidy obsažené v mnohých rostlinných čeledích, převážně: Berberidaceae, Fumariaceae a Papaveraceae. Nejvíce je tato skupina zastoupena v kořeni *E. californica*, ale v menší míře se vyskytují i v nadzemních částech rostliny. Nejvíce z nich je zastoupen **allokryptopin**, který tvoří nejdominantnější alkaloidní složku kořene. Jeho obsah v kořenu dosahuje až 1,8 %<sup>18</sup>. U alkaloidu byla objevena významná antifungální<sup>26</sup> a spasmolytická aktivita a ve vyšších dávkách může způsobovat centrální ochrnutí<sup>27</sup>. V menší míře je zastoupen alkaloid **protopin**, který je významný převážně z hlediska své účinnosti. Podobně jako **allokryptopin** působí antifungálně a také spasmolyticky<sup>28</sup>. Navíc u něho byly objeveny inhibiční účinky na agregaci krevních destiček<sup>29</sup>.

Další alkaloid protopinového typu izolovaný z *E. californica* je **hunnemanin**, u kterého byla objevena významná antifungální aktivita<sup>30</sup>.

Tab. 2: Struktura protopinových alkaloidů izolovaných z *E. californica*

		
Allokryptopin	$R_1 = \text{OCH}_3$	$R_2 = \text{OCH}_3$
Hunnemanin	$R_1 = \text{OH}$	$R_2 = \text{OCH}_3$
Protopin	$R_1 = R_2 = \text{OCH}_2\text{O}$	

### 3.3.3 Benzofenantridinové alkaloidy

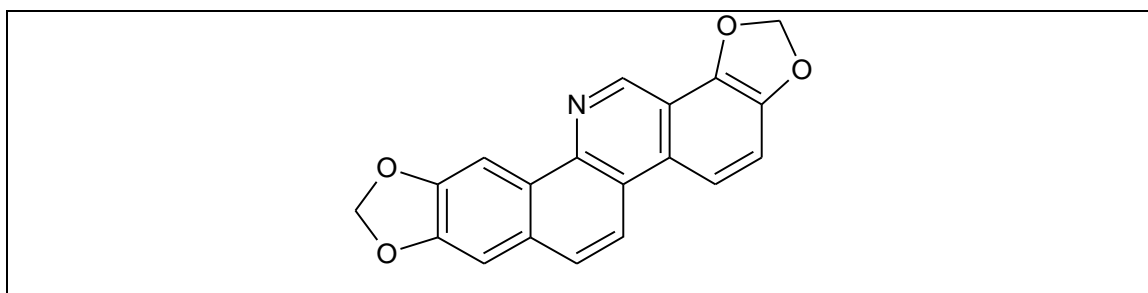
Benzofenantridinové alkaloidy jsou významné sekundární metabolity převážně u čeledi Papaveraceae. Hojně se s nimi setkáme u rostliny *Chelidonium majus*. U *E. californica* najdeme kvartérní alkaloidy jako **sanguinarin** nebo **chelerytrin**. Nositelům náboje u těchto alkaloidů je methylsubstituovaný atom dusíku v molekule.

**Sanguinarin** podle některých prací vypadá jako slibná přírodní látka pro další vývoj v oblasti nádorové léčby<sup>31</sup>, dokáže indukovat apoptózu a působí také antimikrobiálně<sup>32</sup>. A podobně jako protopinový alkaloid protopin působí inhibiči

agregace krevních destiček<sup>33</sup>. **Chelerytrin** je rovněž potenciální protinádorové léčivo, především díky jeho schopnosti selektivně inhibovat protenkinázu C, která má vliv v signální kaskádě buňky<sup>34</sup>.

Z dalších izolovaných alkaloidů zmíním **chelilutin**, **chelirubin**, **makarpin** a terciární **norsanguinarin**, u něhož byla objevena antifungální aktivita<sup>30</sup>. U **chelilutinu** byla rovněž objevena silná antiproliferativní a pro-apoptická aktivita<sup>35</sup>.

Tab. 3: Struktura norsanguinarinu



Tab. 4: Struktura kvartérních benzofenantridinových alkaloidů izolovaných z *E. californica*

Chelerythrin	$R_1 = H$	$R_2 = H$	$R_3 = OCH_3$	$R_4 = OCH_3$
Chelilutin	$R_1 = H$	$R_2 = OCH_3$	$R_3 = OCH_3$	$R_4 = OCH_3$
Chelirubin	$R_1 = H$	$R_2 = OCH_3$	$R_3 = R_4 = OCH_2O$	
Makarpin	$R_1 = OCH_3$	$R_2 = OCH_3$	$R_3 = R_4 = OCH_2O$	
Sanguinarin	$R_1 = H$	$R_2 = H$	$R_3 = R_4 = OCH_2O$	

### 3.3.4 Aporfinové alkaloidy

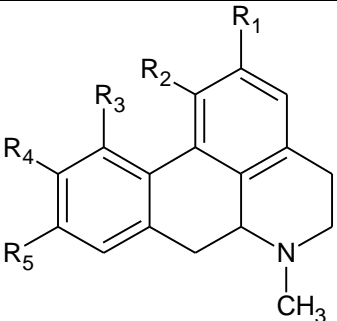
Tento typ isochinolinových alkaloidů se v taxonu *E. californica* vyskytuje převážně v kořenovém systému. V menším množství se najdou také v nadzemních částech rostliny. Jako ostatní isochinolinové alkaloidy se i aporfinové vyskytují převážně v čeledi Papaveraceae. Nejdominantnější je zastoupen jediný kvartérní alkaloid

**magnoflorin**, u něhož byly objeveny účinky snižující krevní tlak, dokáže navodit hypotermii, dokáže vyvolat kontrakce izolované těhotné dělohy a stimuluje peristaltiku izolovaného ilea<sup>36</sup>.

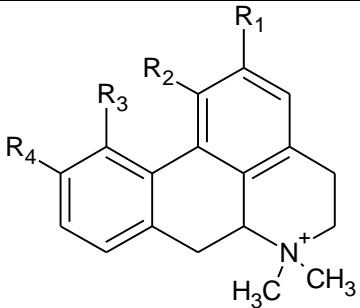
Z terciárních alkaloidů byl izolován alkaloid **glaucin**, který je již terapeuticky používán pro své antitusické účinky<sup>37</sup>. Navíc působí protizánětlivě<sup>38</sup> a vykazuje antifungální účinky<sup>26</sup>.

V nadzemních částech se nachází **lauroscholtzin**, dříve nazýván jako **N-methylaurotetanin** a izolovány dále z rostliny byly alkaloidy **korytuberin**, **isokorydin** a **korydin**.

Tab. 6: Struktura terciárních aporfinových alkaloidů izolovaných z *E.californica*

					
Glaucin	R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>3</sub> = H	R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>5</sub> = OCH <sub>3</sub>
Isokorydin	R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>3</sub> = OH	R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>5</sub> = H
Korydin	R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> = OH	R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>5</sub> = H
Korytuberin	R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> = OH	R <sub>3</sub> = OH	R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>5</sub> = H
Lauroscholtzin	R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>3</sub> = H	R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>5</sub> = OH

Tab. 5: Struktura magnoflorinu

				
Magnoflorin	R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> = OH	R <sub>3</sub> = OH	R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub>

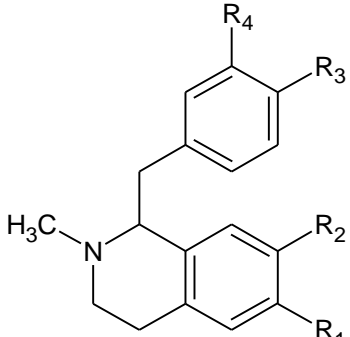
### 3.3.5 Benzylochinolinové alkaloidy

Tyto alkaloidy tvoří v přírodě početnou skupinu alkaloidů, které dosahují velkého farmaceutického významu. Jejich bohaté zastoupení má především čeleď Papaveraceae.

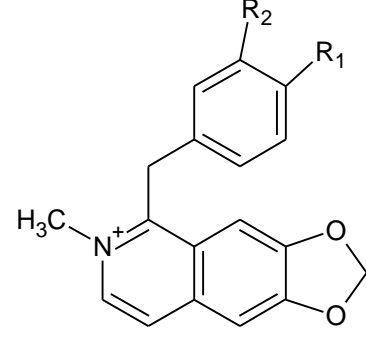
Z *E. californica* byl izolován terciární alkaloid **retikulin**, jehož S-izomer slouží jako mezičlánek při syntéze dalších alkaloidů aporfínového, protoberberinového a benzofenantridinového typu<sup>39</sup>. Při studiu farmakologického účinku byly u látky objeveny účinky centrální stimulace, hypertermie a působení křečí na úrovni míchy<sup>40</sup>. Z dané rostliny byl poprvé izolován roku 2010 a výsledky ukazují na slibný inhibiční potenciál vůči HuBuChE<sup>25</sup>.

Z kvartérních alkaloidů byly z nadzemních částí rostliny izolovány podobné alkaloidy **escholamin** a **escholamidin**<sup>20</sup>.

Tab. 7: Struktura retikulinu

				
Retikulin	$R_1 = \text{OCH}_3$	$R_2 = \text{OH}$	$R_3 = \text{OCH}_3$	$R_4 = \text{OH}$

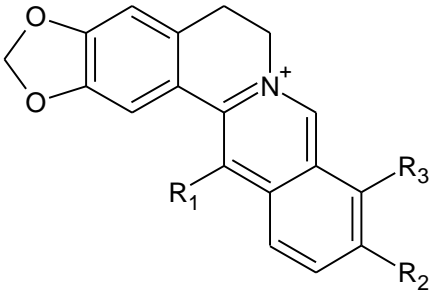
Tab. 8: Struktura benzylochinolinových alkaloidů izolovaných z *E. californica*

		
Eschscholamin	$R_1 = R_2 = \text{OCH}_2\text{O}$	
Eschscholaminid	$R_1 = \text{OH}$	$R_2 = \text{OCH}_3$

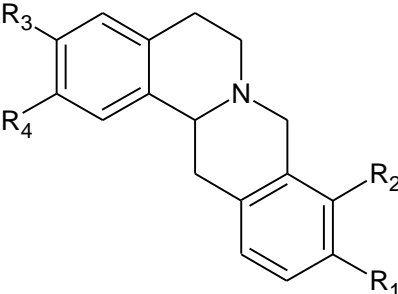
### 3.3.6 Protoberberinové alkaloidy

V přírodě hojná skupina alkaloidů převážně v čeledích Berberidaceae a Fumariaceae. U taxonu *E. californica* tvoří tato skupina minoritněji zastoupené alkaloidy, především kvartérní **berberin**, **koptisin** a **korysamin**. Z terciárních byl izolován **skulerin**, u něhož byly objeveny antiemetické účinky<sup>41</sup>. Alkaloidy nedosahují velkého významu svým obsahem v rostlině, ale především svými farmakologickými účinky. **Berberin** i **koptisin** jsou významnými inhibitory AChE i BuChE<sup>42</sup>, působí rovněž antibakteriálně<sup>43</sup> a byly u nich prokázány také cytotoxické<sup>44</sup> a další účinky.

Tab. 9: Struktura kvartérních protoberberinových alkaloidů izolovaných z *E. californica*

			
Berberin	R <sub>1</sub> = H	R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub>
Koptisin	R <sub>1</sub> = H	R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = OCH <sub>2</sub> O	
Korysamin	R <sub>1</sub> = CH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = OCH <sub>2</sub> O	

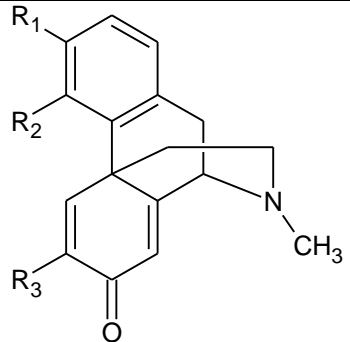
Tab. 10: Struktura skulerinu

				
Skulerin	R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> = OH	R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>4</sub> = OH

### 3.3.7 Morfinanové alkaloidy

Tuto skupinu tvoří jediný zástupce z rostliny poprvé izolovaný roku 2010 alkaloid **salutaridin**<sup>25</sup>.

Tab. 11: Struktura salutaridinu

			
salutaridin	$R_1 = \text{OCH}_3$	$R_2 = \text{OH}$	$R_3 = \text{OCH}_3$

## **4 Experimentální část**

## **4.1 Všeobecné postupy**

### **4.1.1 Destilace a odpařování**

Rozpouštědla byla před použitím destilována; nejprve byl zachycen předek (asi 5 %; většinou s vodním azeotropem), poté bylo vydestilováno zbylých cca 90 % rozpouštědla. Rozpouštědla byla uchovávána v hnědých nádobách. Odpařování chromatografických frakcí bylo na vakuové odparce při 40 °C za sníženého tlaku.

### **4.1.2 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) pak asi hodinu. Chromatografie byla prováděna vzestupně.

## **4.2 Materiál a vybavení**

### **4.2.1 Rozpouštědla a chemikálie**

#### **4.2.1.1 Rozpouštědla**

Cyklohexan, č., PENTA

Diethylamin, č., PENTA

Diethylether, č. bez stabilizátoru, PENTA

Ethanol 95%, denaturovaný methanolem, č., PENTA

Chloroform, č., PENTA

Methanol, č., PENTA

Toluen, č., PENTA

#### **4.2.1.2 Chemikálie**

Dusičnan bismutitý zásaditý, č., PENTA

Hydroxid sodný, č., PENTA



Jodid draselný, č., PENTA  
Kyanid draselný, č., PENTA  
Kyselina octová 99%, p. a., PENTA  
Kyselina sírová 96%, p. a., PENTA  
Kyselina vinná, č., PENTA  
Uhličitan sodný bezvodý, č., PENTA  
Vodný roztok chlorovodíku 36%, p. a., PENTA

## **4.2.2 Chemikálie a materiál ke stanovení účinku erythrocytární AChE a BuChE**

### **4.2.2.1 Chemikálie**

10 mM acetylcholinjodid, Sigma-Aldrich  
10 mM butyrylcholinjodid, Sigma-Aldrich  
0,1 M fosfátový pufr pH 7,4  
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina), 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

### **4.2.2.2 Materiál**

Jako zdroj acetylcholinesterasy byl použit hemolyzát lidských erythrocytů z krve zdravých dobrovolníků. Plná krev byla odstředována 15 minut při 10000 ot./min., získaná erythrocytární masa byla promyta 0,1M fosfátovým pufrem o pH 7,4, aby byly odstraněny zbytky plasmy. 10% (v/v) hemolyzát byl připraven ve vodě.

Jako zdroj butyrylcholinesterasy byla použita lidská plazma.

Plastové kyvety DISPOLABKARTELL 1937 PS MICROCUVETTES.

## **4.2.3 Chemikálie a materiál pro stanovení antioxidační aktivity**

2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazil radikál, Sigma - Aldrich

Kvercetín, Sigma - Aldrich

Trolox, Sigma - Aldrich

#### 4.2.4 Přístroje použité pro stanovení biologické aktivity látek

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

pH metr Φ 72 METER (Beckmann, USA)

UV-spekrofotometr UVICON 942 (Kontron instruments, Švýcarsko)

Mikrovýhřevný stolek Boetius

Přístroj pro měření optické otáčivosti ADP 220 POLARIMETER B+S

#### 4.2.5 Detekční činidla

D 1: Dragendorffovo činidlo modifikované podle Muniera<sup>45</sup>:

- *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<sup>46</sup>:

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

#### 4.2.6 Chromatografické absorbenty

A 1: Kieselgel 60 F254, Merck, 5 × 10 cm 32

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

A 2: Oxid hlinitý neutrální, 0,1 - 0,25 mm (stanovení aktivity III)

A 3: Silufol UV 254, Kavalier Votice, 20 × 10 cm

Chromatografické desky Silufol UV254.

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

#### **4.2.7 Chromatografické nalévané desky**

150 × 150 mm; použito 6,50 g silikagelu a 21,90 ml vody

#### **4.2.8 Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii**

S1: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> + C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> + Et<sub>2</sub>NH 75:20:5 (v/v)

S2: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> + C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> + Et<sub>2</sub>NH 10:10:1 (v/v)

S3: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> + Et<sub>2</sub>NH 95:5 (v/v)

### **4.3 Postup extrakce alkaloidů z *Eschscholtzia californica* CHAM.**

#### **4.3.1 Původ drogy**

Droga (36,54 kg, sušená nať s kořeny) byla získána sběrem z introdukované kultury (komerční osivo) firmou Planta Naturalis (Markvantice u sobotky).

#### **4.3.2 Příprava extraktu a jeho čištění**

Příprava extraktu a jeho čištění nebylo součástí této rigorózní práce. Extrakce a čištění bylo provedeno v roce 2007 Jakubem Doležalem a Doc. RNDr. Lubomírem Opletalem CSc. na katedře farmaceutické botaniky a ekologie. Postup práce je detailně uveden v diplomové práci Jakuba Doležala<sup>47</sup>.

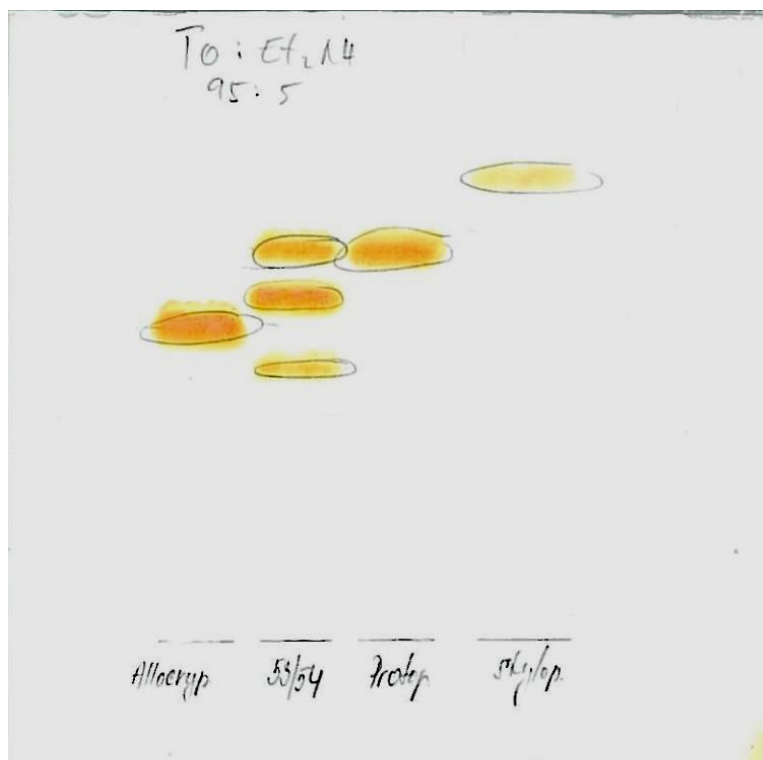
### 4.3.3 Zpracování spojených frakcí 53 - 54:

Vzorek byl dělen pomocí preparativní TLC za následujících podmínek:

Tab. 12: Podmínky preparativního dělení spojené frakce 53 - 54:

Hmotnost frakce	460 mg
Adsorbent	Kieselgel GF <sub>254</sub>
Desky/počet	150 × 150 mm, 16 desek
Soustava	S1
Komora	Nasyčená, 2 hod. po nalití
Vyvíjení	2×

460 mg vzorku bylo rozpuštěno v 2,5 ml směsi EtOH + CHCl<sub>3</sub> (7:3, v/v), roztok byl zfiltrován v Pasteurově pipetě přes malý smotek skelné vaty a nanesen na chromatografické desky (na každou desku vždy v linii ~ 13 cm, tj. ~ 2,25 mg/1 cm nanášecí zóny desky). Po vyvinutí byly všechny tři žluté zóny separovány, odparek z každé zóny smíchán s 1/5 objemu křemeliny Celite 535, promíchán a v malé chromatografické koloně eluován 50 ml EtOH. Eluát ze zóny 1 byl následně odpařen a následně dělen za následujících podmínek. Eluát ze zóny 2 byl odpařen a následně pročištěn. Eluát ze zóny 3 nebyl dále zpracováván pro malé množství.

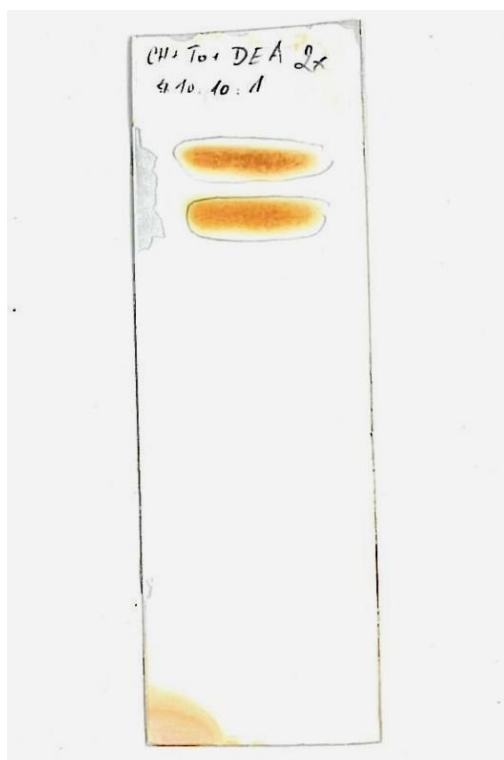


Obr. 8: Vzorek 53/54 v soustavě S3 v porovnání s allokrýptopínem, protopínem a stylopínem

Tab. 13: Podmínky preparativního dělení zóny 1:

Hmotnost odparku	310 mg
Adsorbent	Kieselgel GF <sub>254</sub>
Desky/počet	Analytické, 200 × 100 mm, 16 desek
Soustava	S2
Komora	Nasycená, 2 hod. po nalití
Vyvíjení	2×

310 mg odparku bylo rozpuštěno v 2,0 ml směsi EtOH + CHCl<sub>3</sub> (7:3, v/v), roztok byl zfiltrován v Pasteurově pipetě přes malý smotek skelné vaty a nanesen na chromatografické desky (na každou desku vždy v linii ~ 18 cm, tj. ~ 1 mg/1 cm nanášecí zóny desky). Po vyvinutí byly obě žluté zóny separovány, odparek z každé zóny smíchán s 1/5 objemu křemeliny Celite 535, promíchán a v malé chromatografické koloně eluován 50 ml EtOH. Eluáty byly následně odpařeny a pročištěny za následujících podmínek:



Obr. 9: dělení zóny 1 v soustavě rozpouštědel S2

Tab. 14: Podmínky čištění odparku A ze zóny 1:

Hmotnost odparku	163 mg
Adsorbent	Kieselgel GF <sub>254</sub>
Desky/počet	Analytické, 200 × 100 mm, 9 desek
Soustava	S3
Komora	Nasycená, 2 hod. po nalití
Vyvíjení	2×

Tab. 15: Podmínky čištění odparku B ze zóny 1:

Hmotnost odparku	118 mg
Adsorbent	Kieselgel GF <sub>254</sub>
Desky/počet	Analytické, 200 × 100 mm, 7 desek
Soustava	S3
Komora	Nasycená, 2 hod. po nalití
Vyvíjení	2×

Tab. 16: Podmínky čištění odparku ze zóny 2:

Hmotnost odparku	89 mg
Adsorbent	Kieselgel GF <sub>254</sub>
Desky/počet	Analytické, 200 × 100 mm, 5 desek
Soustava	S3
Komora	Nasycená, 2 hod. po nalití
Vyvíjení	2×

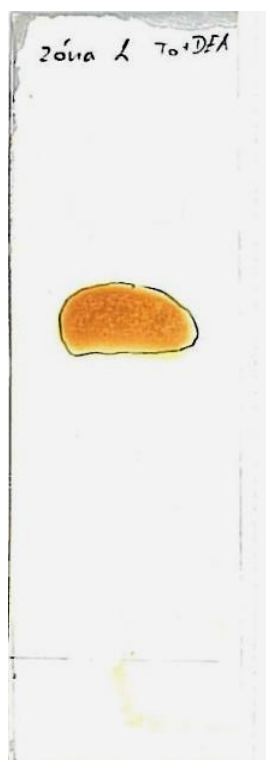
Zóny adsorbentu s látkami byly separovány, každý adsorbent smíchan s malým množstvím křemeliny (max. 1/5 objemu) a v Pasteurových pipetách provedena eluce ethanolem. Po odpaření roztoků byly získány tyto výsledky:

Tab. 17: Výsledky separace frakce 53/54:

Označení látky	Hmotnost
1A	113,3 mg
1B	91,8 mg
2	55,2 mg



Obr. 10: TLC vzorku 1B a jeho porovnání se standardem escholtzinem v soustavě S3



Obr. 11: Kontrolní TLC na čistotu zóny 2 v soustavě S3

## 4.4 Určení struktury izolovaných látek

### 4.4.1 Měření hmotnostního spektra

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

### 4.4.2 Měření NMR spekter

Spektra jsou měřena na spektrometru Varian Inova 500 s pracovní frekvencí 499,9 MHz pro  $^1\text{H}$  a 125,7 MHz pro  $^{13}\text{C}$  jádra.  $^{13}\text{C}$  NMR spektra byla měřena v 5 mm SW širokopásmové sondě,  $^1\text{H}$  a všechna 2D spektra v inverzní 5 mm ID PFG sondě s využitím standardních pulzních sekvencí. Experimenty byly měřeny v deuteriochloroformu při 25 °C.

Hodnoty chemických posunů jsou v ppm a jsou vztaženy k internímu standardu (hexamethyldisilan, 0,04 ppm, v  $^1\text{H}$  spektrech) nebo signálu solventu (76,99 ppm, v  $^{13}\text{C}$  spektrech). (Doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc., Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, UK v Praze).

## 4.5 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů vůči erythrocytární AChE a sérové BuChE

### 4.5.1 Podmínky měření

Experimenty byly prováděny za následujících podmínek:

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



#### 4.5.2 Příprava erythrocytálních pouzder

Pouzdra byla připravena z čerstvě odebrané krve, ke které byl přidán 1 ml citrátu sodného na 10 ml krve podle mírně modifikované metody Stecka a Kanta<sup>48</sup>. Plazma (HuBuChE) byla odstraněna z plné krve pomocí centrifugy při 4000 otáčkách za minutu. Byla použita centrifuga Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Erythrocyty byly přemístěny do 50 ml zkumavky a 3× promyty 5mM fosfátovým pufrem (pH 7,4) obsahující 150 ml chloridu sodného (12000 ot./min., Avanti J-301, rotor JA-30.50). Promyté erythrocyty byly smíchané s 5 mM fosfátovým pufrem (pH 7,4) na dobu 10 minut, aby byl zajištěn jejich rozpad. Desintegrované buňky byly 10 minut centrifugované rychlostí 20000 ot./min. a následně byla pouzdra (HuBuChE) třikrát promyta fosfátovým pufrem (pH 7,4)<sup>25</sup>.

#### 4.5.3 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů vůči AChE a BuChE

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

Slepý vzorek - do kyvety je postupně přidáváno 10-25  $\mu$ l hemolyzátu nebo plazmy, 200  $\mu$ l DTNB, 25  $\mu$ l rozpouštědla, ve kterém jsou rozpuštěny vzorky a doplní se na objem 900  $\mu$ l pufrem. Následně je přidáno 100  $\mu$ l 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  $\mu$ l hemolyzátu nebo plazmy, 200  $\mu$ l DTNB, 25  $\mu$ l měřeného vzorku v různých koncentracích a doplní se na objem 900  $\mu$ l pufrem. Následně je přidáno 100  $\mu$ l substrátu (acetylcholin jodid nebo butyrylcholin jodid). Nárůst absorbance je měřen při vlnové délce 436 nm. Měření probíhala ve třech opakováních<sup>49</sup>.

## 4.6 Stanovení antioxidační aktivity získaných alkaloidů

Antioxidační aktivita byla testována *in vitro* DPPH testem. Metoda je založena na reakci stabilního 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikálu (DPPH) se vzorkem. Snížení absorbance měřené při 525 nm je závislé na koncentraci antioxidantu ve sledovaném vzorku. Pro měření byly použity FIALab pro Windows, FIALab 3000 analyser (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA), 2,5-ml syringe pump, USB2000-UV/VIS spektrofotometr se zdrojem světla LS-1 (Ocean Optics, USA) a SMA-Z průtoková cela (1-cm délka)<sup>49</sup>.

## 4.7 Matematické zpracování experimentálních dat

Hodnoty IC<sub>50</sub> 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  $\Delta A$  se použije vzorec:

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

$\Delta ASA$  - nárůst absorbance za 1 minutu u měřeného vzorku

$\Delta ABL$  - nárůst absorbance za 1 minutu u slepého vzorku

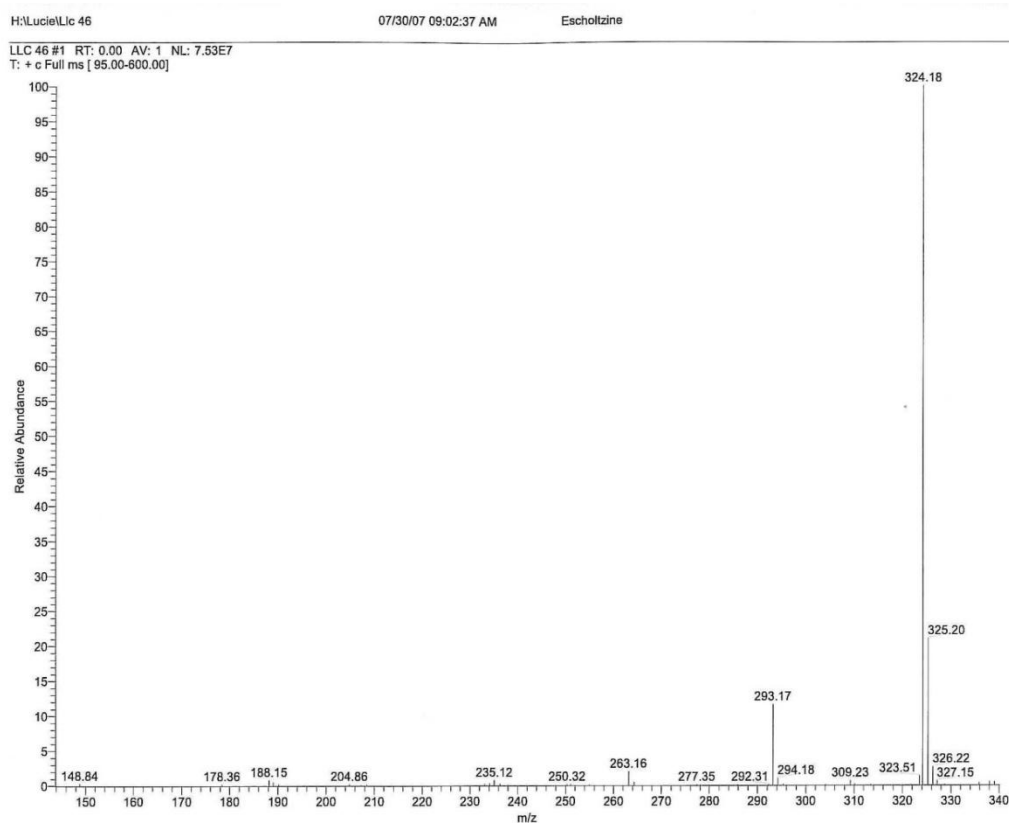
## **5 Výsledky**

Na základě naměřených MS a NMR dat byly izolované látky 1A, 1B a 2 identifikované jako protopin, escholtzin a O-methylkaryachin.

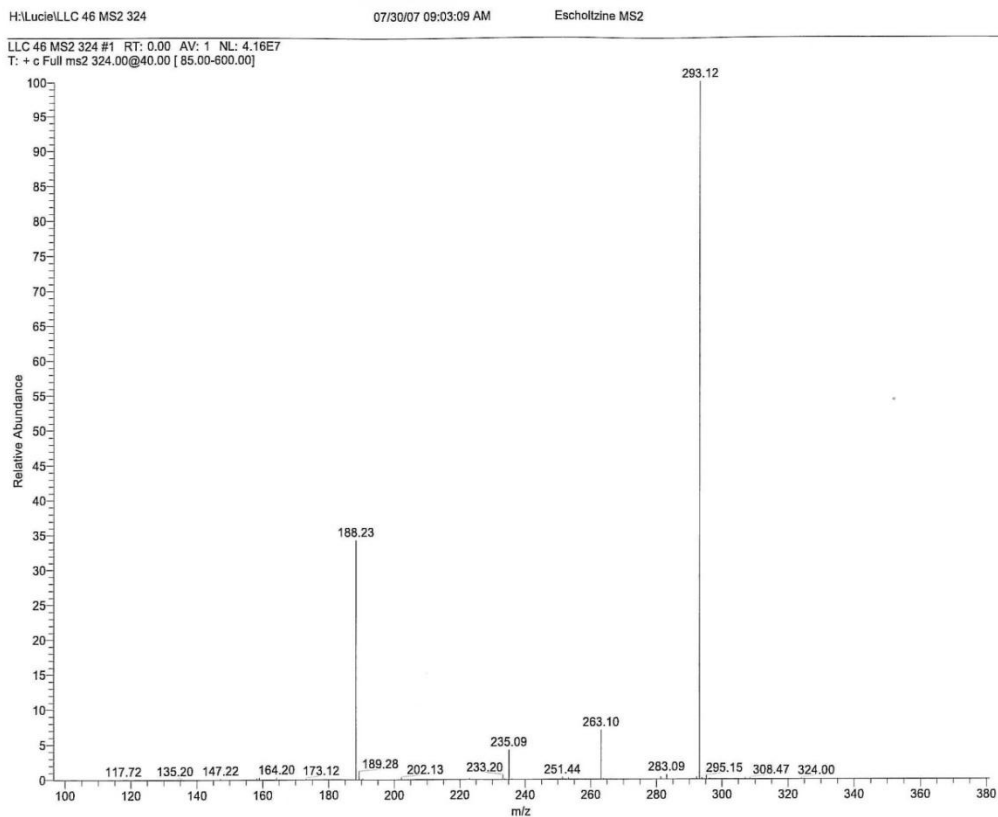
## 5.1 Strukturální analýza protopinu

### 5.1.1 MS studie protopinu

ESI-MS  $m/z$  324,2  $[M+H]^+$  (100). MS2  $m/z$  293,1 (100), 263,1 (8), 235,1 (7), 188,2 (27).



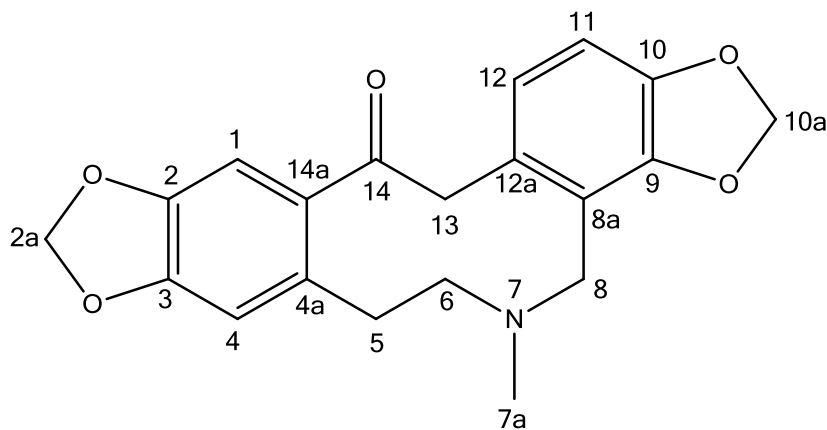
Obr. 12: ESI-MS spektrum protopinu



Obr. 13: ESI-MS/MS spektrum protopinu

### 5.1.2 NMR studie protopinu

Struktura izolované látky byla určena na základě měření  $^1\text{H}$ - a  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter a porovnání naměřených dat s literaturou.

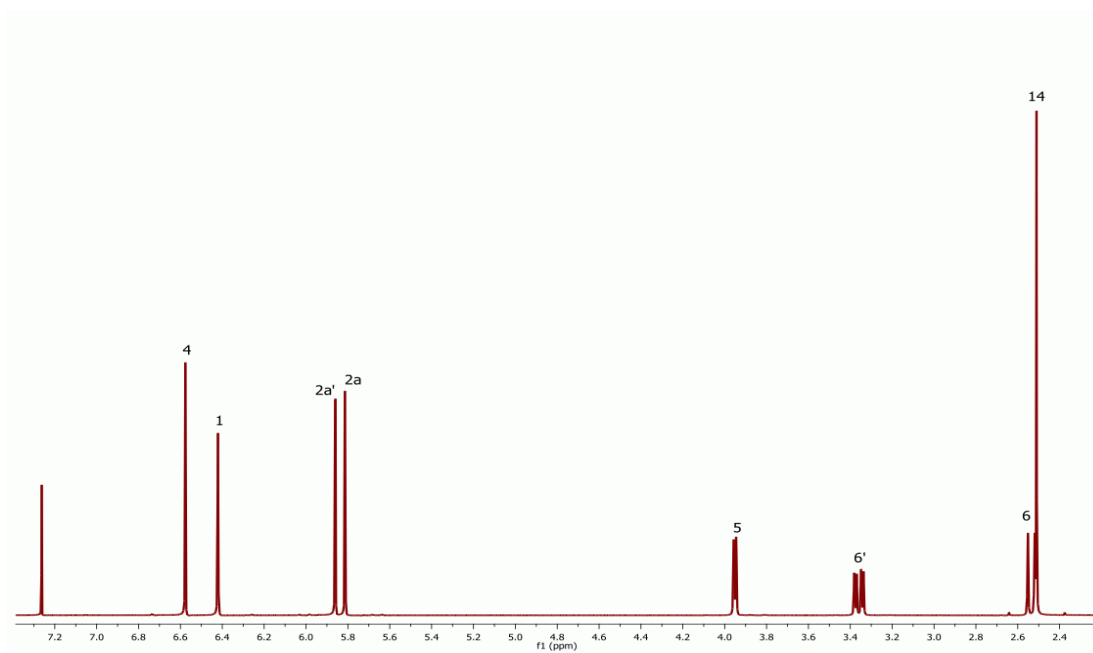


Obr. 14: Struktura protopinu

### 5.1.2.1 $^1\text{H}$ -NMR studie protopinu

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ ):

2.51 s, 3H, H-14; 2.53 d ( $^2J_{\text{H}}=16.3$  Hz), 2H, H-6; 3.39 dd ( $^2J_{\text{H}}=16.3$  Hz,  $^3J_{\text{H}}=5.7$  Hz), 2H, H-6'; 3.95 d ( $^3J_{\text{H}}=5.7$  Hz), 2H, H-5; 5.81 d ( $^2J_{\text{H}}=1.5$  Hz), 2H, H-2a; 5.86 d ( $^2J_{\text{H}}=1.5$  Hz), 2H, H-2a'; 6.42 s, 2H, H-1; 6.58 s, 2H, H-4.

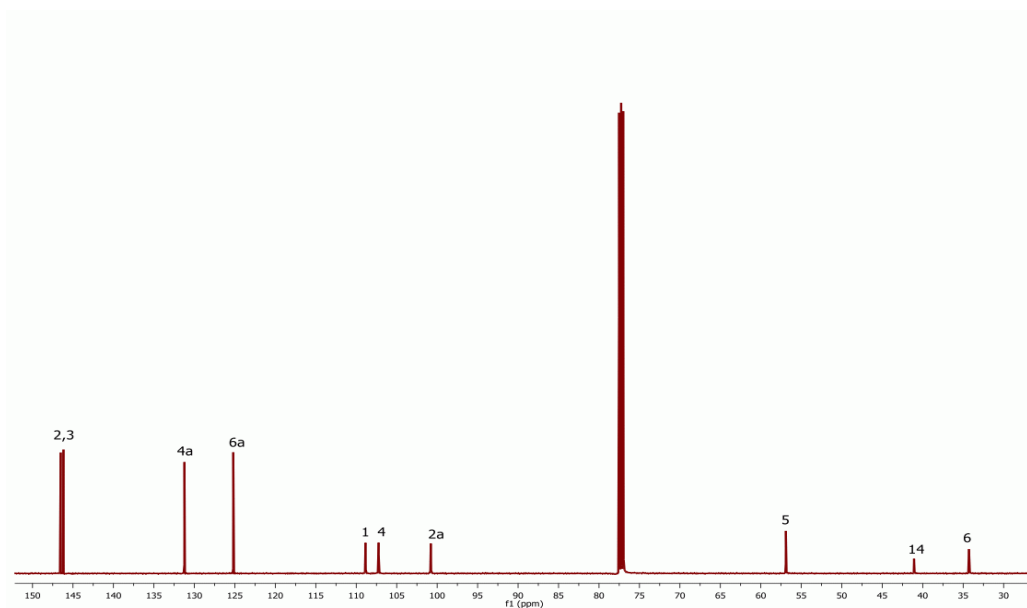


Obr. 15:  $^1\text{H}$ -NMR spektrum protopinu

### 5.1.2.2 $^{13}\text{C}$ -NMR studie protopinu

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ ):

34.28, C-6; 41.07, C-14; 56.92, C-5; 100.08, C-2a; 107.25, C-4; 108.87, C-1; 125.21, C-6a; 131.24, C-4a; 146.19, C-X; 146.53, C-Y; Signály označené X, Y náležejí uhlíkům C-2 a C-3, nelze je spolehlivě přiřadit.

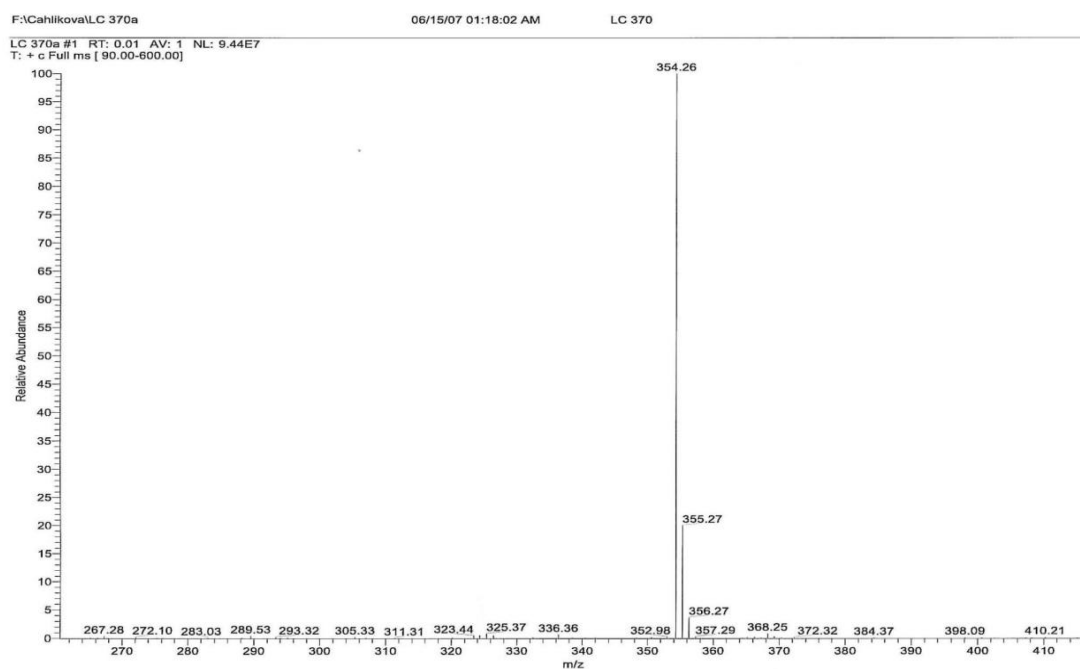


Obr. 16:  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrum protopinu

## 5.2 Strukturní analýza escholtzinu

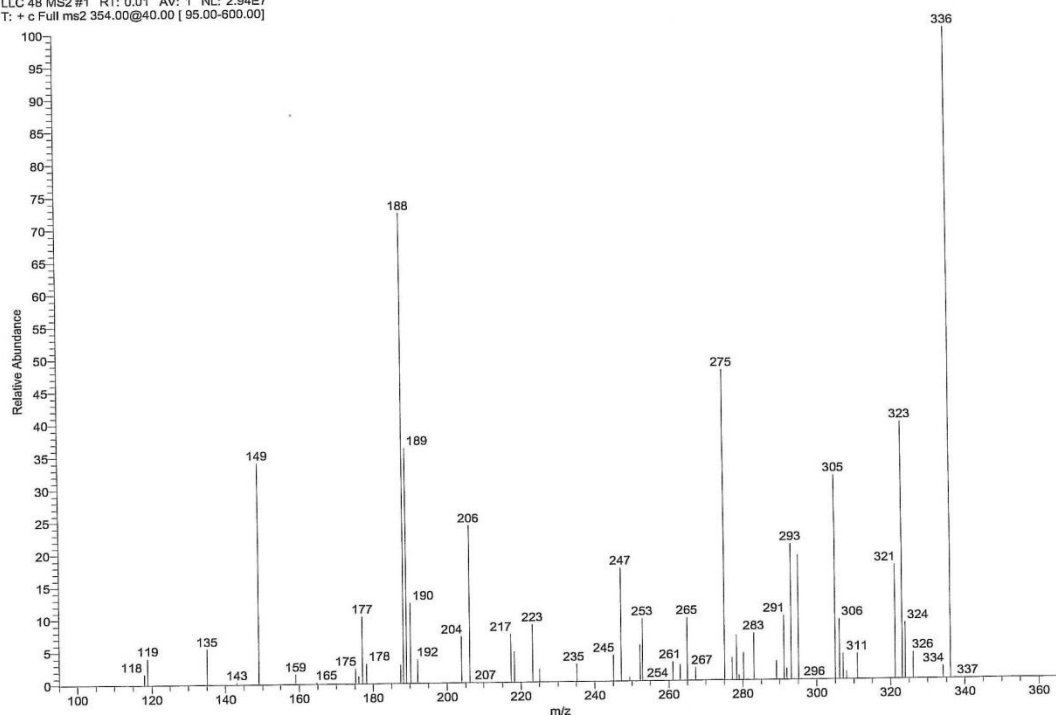
### 5.2.1 MS studie escholtzinu

ESI-MS  $m/z$  354,2  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100). MS/MS  $m/z$  336,2 (100), 323,1 (40), 275,1 (49), 188,2 (73), 149,1 (34).



Obr. 17: ESI-MS studie escholtzinu

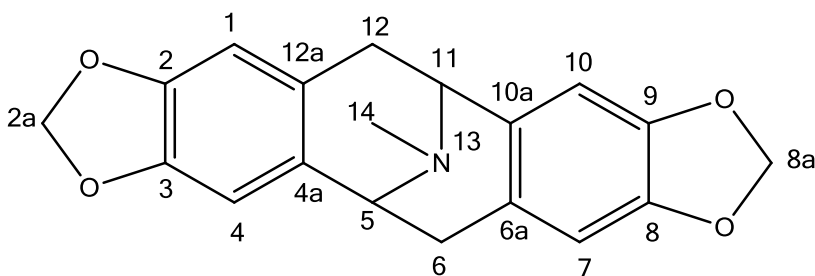
LLC 48 MS2 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 2.94E7  
T: + c Full ms2 354.00@40.00 [ 95.00-600.00]



Obr. 18: ESI-MS/MS studie escholtzinu

## 5.2.2 NMR studie escholtzinu

Struktura izolované látky byla určena na základě měření  $^1\text{H}$ - a  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter a porovnání naměřených dat s literaturou.



Obr. 19: Struktura escholtzinu

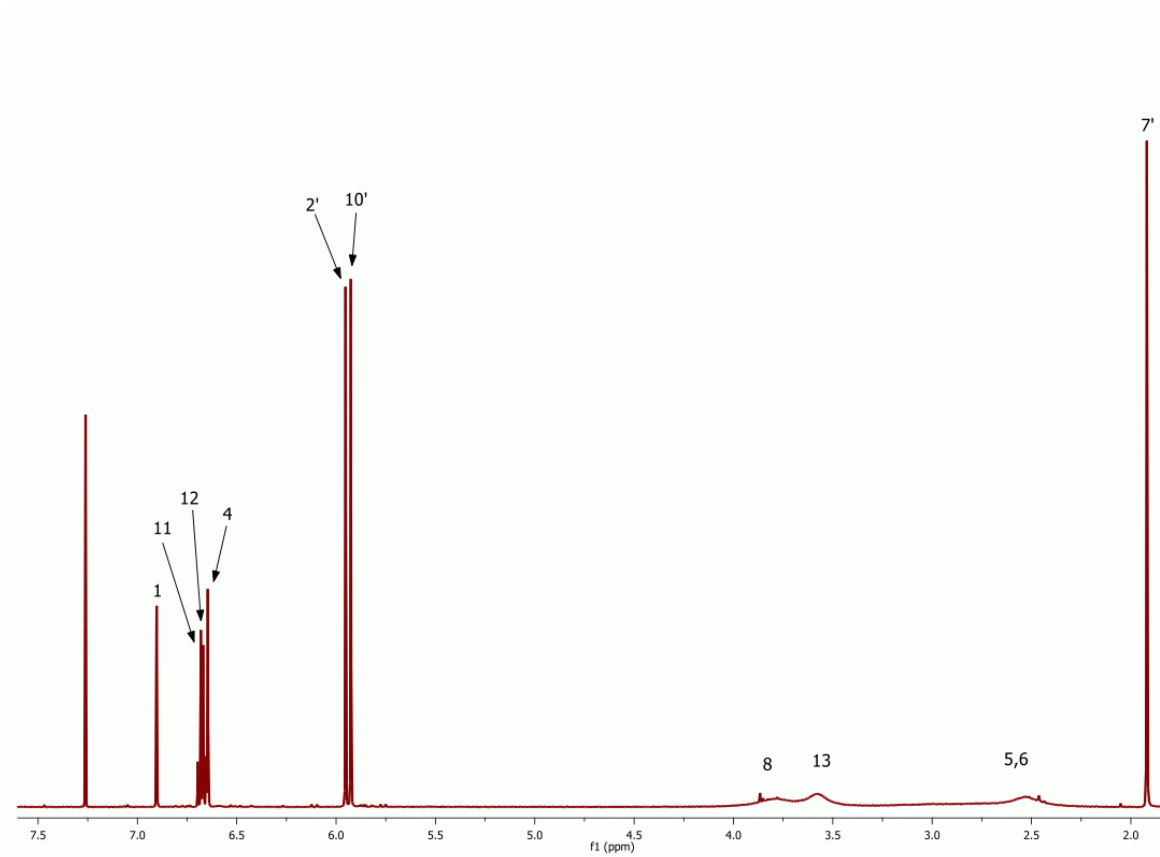
### 5.2.2.1 $^1\text{H}$ -NMR studie escholtzinu

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ ):

1.92 s, 3H, H-7a; 2.40 – 2.85 br, H-5 a H-6, velmi široké signály, nelze spolehlivě přiřadit; 3.50 – 3.65 br, H-13, velmi široké signály, nelze spolehlivě přiřadit; 3.75 – 3.90



br, H-8, velmi široké signály, nelze spolehlivě přiřadit; 3.72 br s 2H, H-8; 5.93 s, 2H, H-10a; 5.95 s, 2H, H-2a; 6.65 s, 1H, H-4; 6.66 d ( $^3J_{\text{H}}=7.8$  Hz), 1H, H-12; 6.69 d, 1H, H-11; 6.90 s, 1H, H-1.

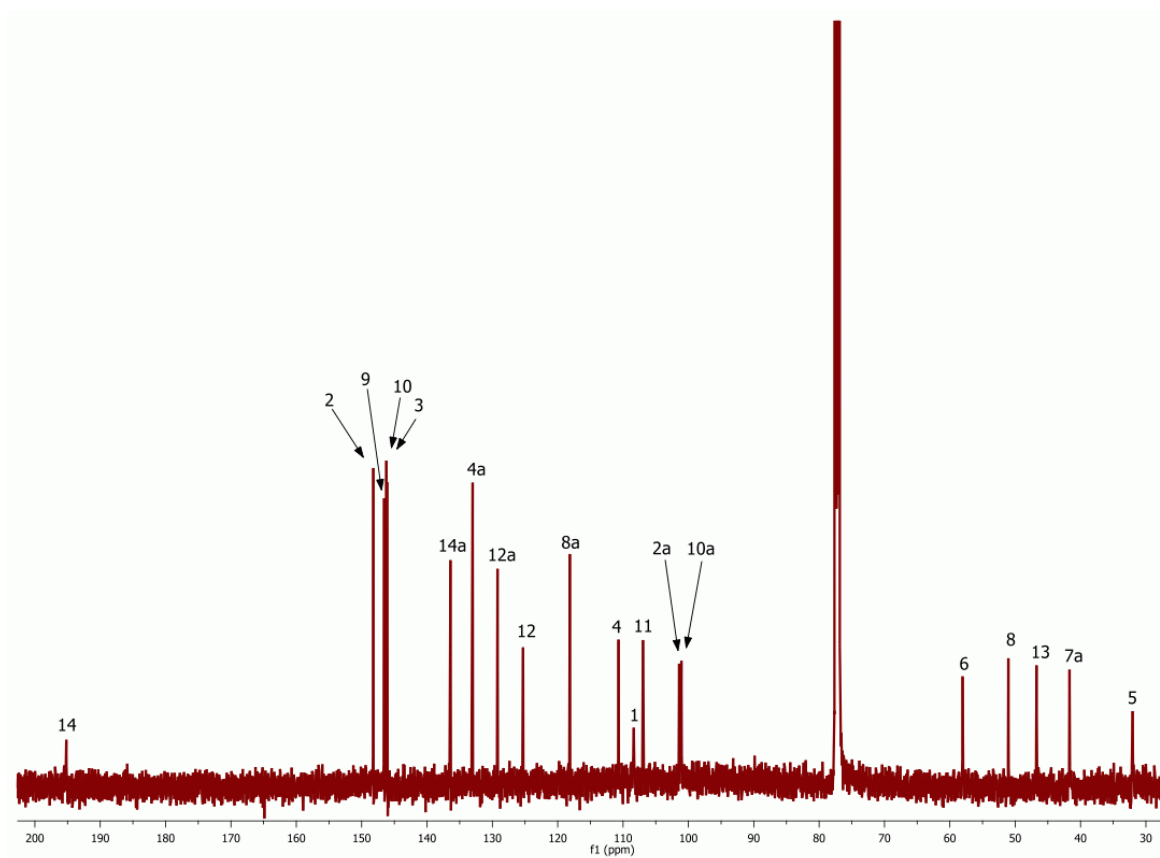


Obr. 20:  $^1\text{H-NMR}$  spektrum escholtzinu

### 5.2.2.2 $^{13}\text{C-NMR}$ studie escholtzinu

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ ):

32.04, C-5; 41.69, C-7a; 46.74, C-13; 51.06, C-8; 58.06, C-6; 101.08, C-10a; 101.42, C-2a; 106.96, C-11; 108.38, C-1; 110.71, C-4; 118.16, C-8a; 125.32, C-12; 129.23, C-12a; 133.03, C-4a; 136.42, C-14a; 146.11, C-3; 146.23, C-10; 146.57, C-9; 148.24, C-2; 195.21, C-14.

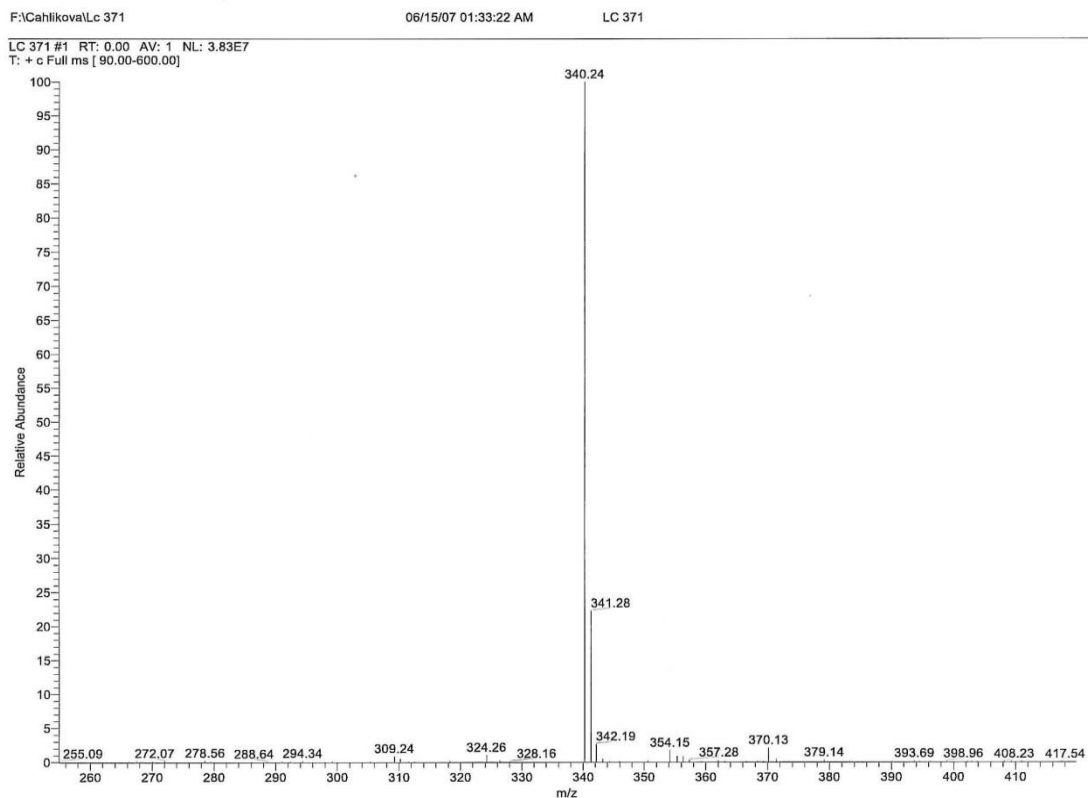


Obr. 21:  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrum escholtzinu

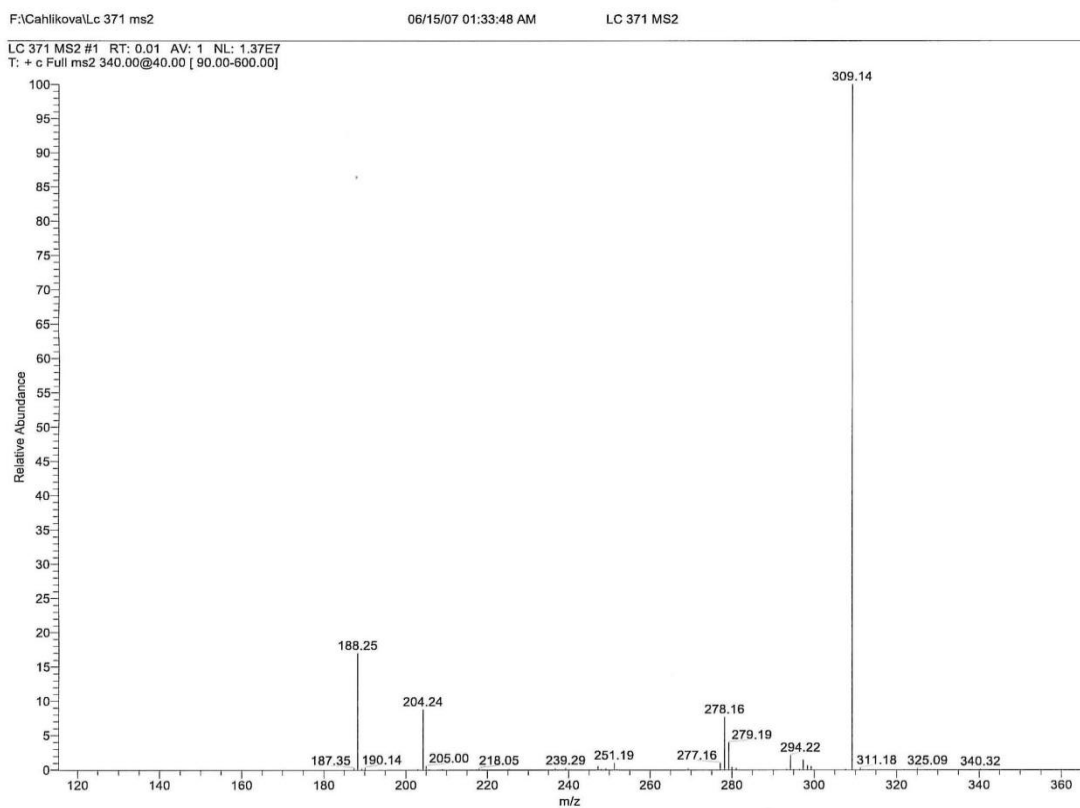
## 5.3 Strukturní analýza O-methylkaryachinu

### 5.3.1 MS studie O-methylkaryachinu

ESI-MS  $m/z$  340,24  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100). MS2  $m/z$  309,14 (100), 278,16 (8), 204,24 (7), 188,24 (17).



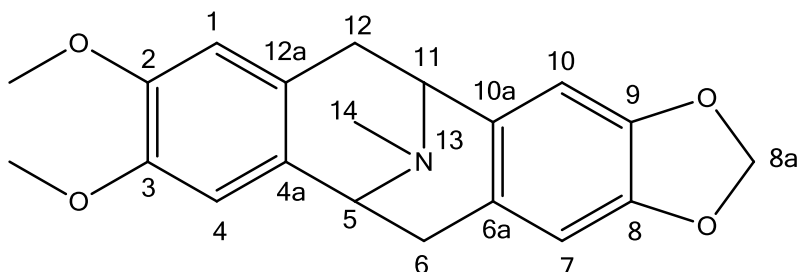
Obr. 22: ESI-MS studie O-methylkarychinu



Obr. 23: ESI-MS/MS studie O-methylkarychinu

### 5.3.2 NMR studie O-methylkaryachinu

Struktura izolované látky byla určena na základě měření  $^1\text{H}$ - a  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter a porovnání naměřených dat s literaturou.



Obr. 24: Struktura O-methylkaryachinu

#### 5.3.2.1 $^1\text{H}$ -NMR studie O-methylkaryachinu

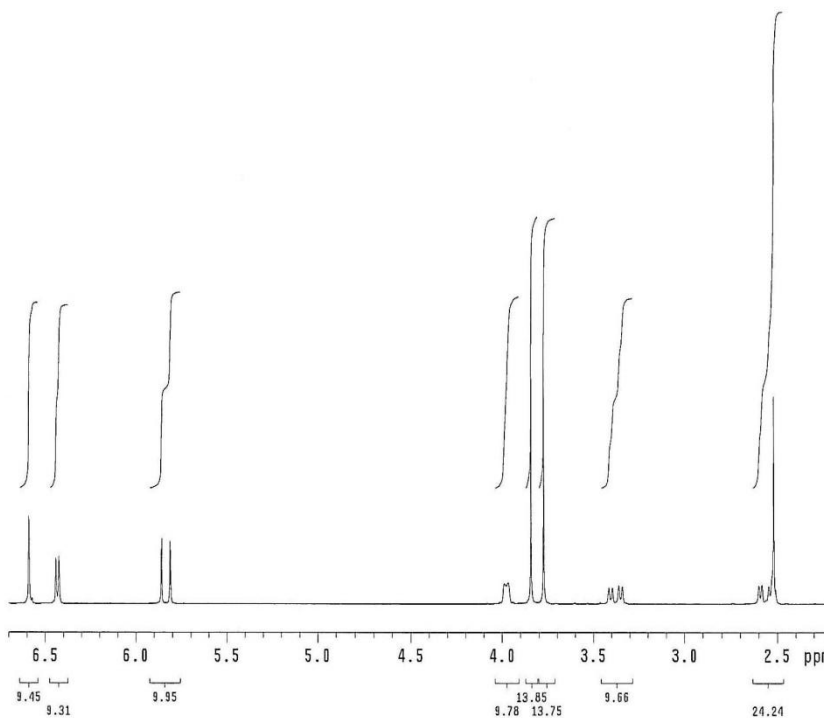
$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ ):

2.52 s, N- $\text{CH}_3$ ; 2.55 d, H- $5\beta$ , ( $^3J_{\text{H}}=15.8$  Hz); 2.6 d, H- $11\beta$ , ( $^3J_{\text{H}}=16.2$  Hz); 3.35 d, H- $11\alpha$ ; 3.4 d, ( $^3J_{\text{H}}=15.8$  Hz); 3.78 s, 9- $\text{OCH}_3$ ; 3.85 s, 8- $\text{OCH}_3$ ; 3.98 d, H-6, ( $^3J_{\text{H}}=12.5$  Hz); 8.82-8.88 d, 2,3- $\text{OCH}_2\text{-O-}$ ; 6.42 s, H-4; 6.6 s, H-1.

```

ZH-2
expl std1h
SAMPLE          DEC. & VT
date    Dec 2 2008   dfrq    300.074
solvent  CDCl3      dn      H1
file     exp      dpwr     37
ACQUISITION    dof      0
sfrq     300.074   dm      nnn
tn       H1      dsm      c
at       1.998    dmf      8400
np       17984    PROCESSING
sw       4500.5   wtfiler
fb       2600    proc      ft
ls       16      fn      not used
tpwr     56
pw       7.0     warr
d1       5.000   wexp
tof      0       wbs
nt       16     wnt
ct       16
alock    n
gain     not used
FLAGS
il       n
in       n
dp       y
DISPLAY
sp       656.4
vp       1354.0
vs       44
sc       0
wc       200
hzmm     6.77
ls       1036.33
rf1     2882.2
rfp     2176.5
th       20
ins     100.000
nm      cdc  ph

```



Obr. 25:  $^1\text{H}$ -NMR spektrum O-methylkaryachinu

### 5.3.2.2 $^{13}\text{C}$ -NMR studie O-methylkaryachinu

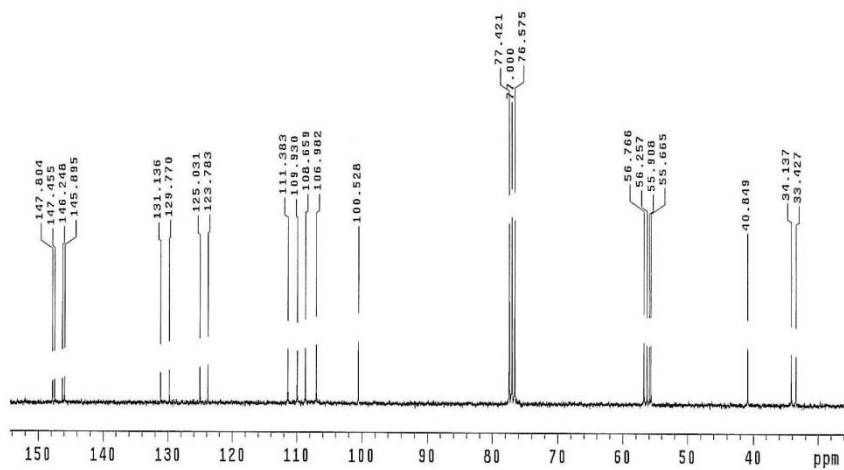
$^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25°C):

33.42; 34.14; 40.85; 55.67; 55.91; 56.26; 56.77; 76.58; 77.00; 77.42; 100.53; 106.98; 108.66; 109.93; 111.38; 123.78; 125.03; 129.77; 131.14; 145.89; 146.45; 147.45; 147.80.

```

ZH-2
exp2 std13c
SAMPLE
date Dec 2 2008 dfrq 300.074
solvent CDCl3 dn H1
file exp dpwr 37
ACQUISITION dof 0
sfrq 75.461 dm yyy
tn C13 dnm w
at 1.815 dmf 8400
np 68106
sw 18761.7 lb 1.00
fb 10400 wtfile
bs 16 proc ft
tpwr 50 fn not used
pw 16.2
d1 5.000 werr
tof 0 wexp
nt 24000 wbs
ct 456 wnt
alock s
gain not used
FLAGS
il n
in n
dp y
DISPLAY
sp 1957.4
wp 9686.2
vs 32
sc 0
wc 200
hzmm 48.44
is 500.00
rf1 7635.5
rfp 5809.9
th 2
ins 100.000
nm no ph

```



Obr. 26:  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrum O-methylkaryachinu

## 5.4 Inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE

Získané alkaloidy byly testovány na inhibiční aktivitu vůči erytrocytární acetylcholinesterase a sérové butyrylcholinesterase. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 18):

Tab. 18: *In vitro* inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů vůči AChE a BuChE

Látky	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	
	AChE	BuChE
Protopin 1A	423 ± 10,5	333 ± 3,3
Eschscholtzin 1B	519 ± 5,8	>1000
O-methylkaryachin 2	498 ± 7,1	>1000
Galanthamin <sup>b</sup>	6,9 ± 0,3	156 ± 6,9
Huperzin <sup>b</sup>	0,25 ± 0,01	>1000

<sup>a</sup> Každé měření bylo opakováno třikrát

<sup>b</sup> Referenční látka

## 5.5 Antioxidační aktivita

Izolované alkaloidy byly podrobeny testování jejich antioxidační aktivity. Výsledky této studie jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 19):

Tab. 19: Antioxidační aktivita izolovaných alkaloidů

Látky	EC <sub>50</sub> (μM)
Protopin 1A	> 1000
Eschscholtzin 1B	> 1000
O-methylkaryachin 2	> 1000
Kvercetin <sup>b</sup>	25,3 ± 1,2
Trolox <sup>b</sup>	33,0 ± 0,8

<sup>a</sup> Každé měření bylo opakováno třikrát

<sup>b</sup> Referenční látka

## **6 Diskuze**



V současnosti jsou za nejúčinnější léčiva Alzheimerovy choroby považována tzv. kognitiva. Jejich účinek je založen na inhibici enzymů acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy, které jsou odpovědné za rozklad klíčového neurotransmiteru acetylcholinu. Dosud užívané látky rivastigmin, galanthamin, donepezil a v některých zemích i huperzin A nejsou dokonalé po všech stránkách. Pro ideální léčivo platí, že bude působit hlavně v místě potřeby, tedy bude velmi ochotně procházet přes hematoencefalickou bariéru (HEB) a bude mít minimální periferní nežádoucí účinky. Z nežádoucích účinků se dají klasicky vypočítat bolesti hlavy, nauzea a obvyklé zažívací potíže, ale také účinky založené na mechanismu působení. Látky zesilují účinek acetylcholinu, působí cholinergně a v konečném důsledku mohou zesílit účinky parasymptatiku. Může se objevit benigní zvýšené pocení, různé sinoatriální nebo atrioventrikulární blokády, ba dokonce i extrapyramidové příznaky.

Tato experimentální práce se proto zaměřila na hledání dalších látek přírodního původu, které by se mohly v budoucnu stát předlohou pro použitelné léčivo s dostatečným účinkem. Úkolem této práce bylo ze směsi alkaloidů za pomoci chromatografických metod získat alespoň jeden alkaloid v čistém stavu. Povedlo se získat tři alkaloidy, které byly podrobeny strukturální analýze a následnému testování jejich biologické aktivity.

První izolovaný alkaloid označený jako 1A byl na základě strukturální analýzy identifikován jako protopin. Jedná se o terciární alkaloid protopinového typu, který se v přírodě vyskytuje běžně v čeledích Papaveraceae (např. *Eschscholtzia* spp<sup>25</sup>., *Macleaya* spp<sup>50</sup>., *Chelidonium* spp<sup>51</sup>.) nebo Fumariaceae (*Corydalis* spp<sup>52</sup>., *Fumaria* spp<sup>53</sup>.).

Protopin byl již podrobně *in vitro* i na animálních modelech studován a bylo u něho objeveno mnoho farmakologických účinků. Mezi důležité bezesporu patří již výše zmíněná schopnost inhibice agregace erytrocytů, protizánětlivé nebo jeho antimykotické účinky. Byl již dokonce dříve testován na inhibici AChE po izolaci z rostliny *Corydalis turtschaninovii*. Výsledky této studie vypadají oproti výsledkům této práce na první pohled slibněji  $IC_{50} = 14,5 \pm 0,5 \mu M$ <sup>54</sup> oproti  $IC_{50} = 423 \pm 10,5 \mu M$  v této práci. Tento rozdíl spočívá pravděpodobně v rozdílnosti použité AChE, kde ve zmiňovaném pokuse byla použita AChE izolovaná z myších mozků, kdežto v této práci byla AChE původu lidského. Vzhledem k tomu, že práce se zabývá vlivem alkaloidů na humánní AChE, jsou naše výsledky v tomto směru přesnější.

Po farmakokinetické stránce se jedná o látku, která by díky své nepolarizované molekule mohla snadno pronikat přes hematoencefalickou bariéru i se dobře vstřebávat po perorálním podání. Z hlediska toxicity alkaloid inhibuje přenos signálů v parasympatických i v sympatických gangliích. LD<sub>50</sub> protopinu byla u myši stanovena na 35,1 mg/kg<sup>55</sup>.

Na základě naměřených hodnot IC<sub>50</sub> protopinu pro AChE a pro BuChE (IC<sub>50</sub>= 423 ± 10,5 μM resp. IC<sub>50</sub>= 333 ± 3,3 μM), které výrazně převyšují hodnoty IC<sub>50</sub> pro AChE a BuChE naměřené u standardu galanthaminu (IC<sub>50</sub>= 6,9 ± 0,3 μM resp. IC<sub>50</sub>= 156 ± 6,9 μM) a pro AChE u huperzinu A (IC<sub>50</sub> = 0,25 ± 0,01 μM), se nedá předpokládat, že by látka byla použitelná pro léčbu AD. Také hodnoty EC<sub>50</sub> antioxidační aktivity protopinu (EC<sub>50</sub> > 1000 μM) výrazně převýšily EC<sub>50</sub> standardů kvercetin (EC<sub>50</sub>= 25,3 ± 1,2 μM) a troloxu (EC<sub>50</sub>= 33,0 ± 0,8 μM).

Druhým izolovaným alkaloidem byl terciární pavinanový alkaloid escholtzin. Tento alkaloid se běžně vyskytuje v nadzemních částech rostliny a je pro *E. californica* charakteristický. Nalézt se dá také v čeledi Lauraceae (izolován byl např. z rostliny *Cryptocaria chinensis*)<sup>56</sup>. U escholtzinu byl objeven vliv na GABA receptory, což je pravděpodobně odpovědné za anxiolytické a sedativní účinky rostlinného extraktu<sup>24</sup>.

Naměřené hodnoty IC<sub>50</sub> inhibice escholtzinu pro AChE i BuChE (IC<sub>50</sub>= 519 ± 5,8 μM resp. IC<sub>50</sub>>1000 μM) výrazně převyšují IC<sub>50</sub> hodnoty pro AChE i BuChE standardu galanthaminu (IC<sub>50</sub>= 6,9 ± 0,3 μM resp. IC<sub>50</sub>= 156 ± 6,9 μM) i pro AChE u huperzinu A (IC<sub>50</sub> = 0,25 ± 0,01 μM). Proto látka není považována ani za potenciálně aktivní v léčbě Alzheimerovy choroby. Podobně dopadly i testy na antioxidační aktivitu, v nichž EC<sub>50</sub> escholtzinu (EC<sub>50</sub> > 1000 μM) výrazně převýšily EC<sub>50</sub> standardů kvercetin (EC<sub>50</sub>= 25,3 ± 1,2 μM) a troloxu (EC<sub>50</sub>= 33,0 ± 0,8 μM).

Posledním izolovaným alkaloidem byl terciární pavinanový alkaloid O-methylkaryachin. Alkaloid se objevuje v čeledi Papaveraceae (izolován byl např. z *Escholtzia* spp<sup>25</sup> nebo *Papaver* spp<sup>57</sup>.)

Vysoké hodnoty IC<sub>50</sub> inhibiční aktivity O-methylkaryachinu vůči AChE i BuChE (IC<sub>50</sub>= 498 ± 7,1 μM resp. IC<sub>50</sub> > 1000 μM) vypovídají o neúčinnosti alkaloidu v tomto směru v porovnání s naměřenými hodnotami IC<sub>50</sub> standardů pro AChE a BuChE galanthaminu (IC<sub>50</sub>= 6,9 ± 0,3 μM resp. IC<sub>50</sub>= 156 ± 6,9 μM) a pro AChE u huperzinu A (IC<sub>50</sub> = 0,25 ± 0,01 μM). Taktéž hodnota EC<sub>50</sub> antioxidační aktivity O-methylkaryachinu (EC<sub>50</sub> > 1000 μM) vysoce převyšuje EC<sub>50</sub> hodnotu standardů kvercetin (EC<sub>50</sub>= 25,3 ± 1,2 μM) a troloxu (EC<sub>50</sub>= 33,0 ± 0,8 μM).

Ani jedna z izolovaných látek se nepřiblížila k účinku již používaných látek pro inhibici AChE a jejich další použití v tomto směru se zdá být neperspektivní. Vzhledem k tomu, že v patofyziologii AD hraje důležitou úlohu oxidační stres, měřila se u všech látek také jejich antioxidační aktivita. Ani tady se žádná ze tří látek nepřiblížila účinku standardů a proto jejich použití i v tomto směru není rovněž perspektivní.

## **7 Seznam zkratek**

AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AMPA	2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl)propanová kys.
APP	amyloidní prekursorový protein
BuChE	butyrylcholinesterasa
CAT	cholinacetyltransferasa
CNS	centrální nervový systém
COX-2	cyklooxygenasa 2
DPPH	2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikál
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
EC	účinná koncentrace
GABA	$\gamma$ -aminomáselná kyselina
HEB	hematoencefalická bariéra
HuAChE	lidská acetylcholinesterasa
HuBuChE	lidská butyrylcholinesterasa
ChE	cholinesterasa
IC	inhibiční koncentrace
LD	letální dávka
LTP	dlouhodobá potenciace
min.	minuta
MS	hmotnostní spektrometrie
NDO	neurodegenerativní onemocnění
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NMR	nukleární magnetická rezonance
ot.	otáčky
TLC	tenkovrstvá chromatografie

## **8 Literatura**

- 
- <sup>1</sup> Bouček, J.; Pidrman, V.: *Psychofarmaka v medicíně*, Grada, Praha 2005.
  - <sup>2</sup> Vlček, J.; Fialová, D. et al.: *Klinická farmacie*, Grada, Praha 2010.
  - <sup>3</sup> Lincová, D.; Farghali, H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. Galen, Praha 2007.
  - <sup>4</sup> Ledvina, M. et al.: *Biochemie pro studující medicíny*, Karolinum, Praha 2006.
  - <sup>5</sup> Jiráček, R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klinická farmakologie a farmacie* 11(4), 212 - 214, 2004.
  - <sup>6</sup> Gandy, S.: The role of cerebral amyloid  $\beta$  accumulation in common forms of Alzheimer disease. *The Journal of Clinical Investigation* 115(5), 1121 - 1129, 2005.
  - <sup>7</sup> Jiráček, R.: Farmakoterapie demencí. *Praktické lékařství* 4(6), 286 - 290, 2008.
  - <sup>8</sup> Rogers, J.; Beach, T.; Li, R.; Liang, Z.; Lue, L. - F.; Roher, A.; Sabbagh, M.; Shen, Y.; Strohmeier, R.; Walker, D.: Inflammatory mechanism in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Chemistry and Molecular Aspects of Drug Design and Action* , 3 - 12, 2008.
  - <sup>9</sup> Bailey, J. A.; Ray, B.; Greig, N. H.; Lahiri, D. K.: Rivastigmine Lowers A $\beta$  and Increases SAPP $\alpha$  Levels, Which Parallel Elevated Synaptic Markers and Metabolic Activity in Degenerating Primary Rat Neurons. *Plos One* 6(7), 1 - 12, 2011.
  - <sup>10</sup> Wang, H. - L.; Liu, W. - H.; Sun, W.: Clinical research status of huperzine A for the treatment of Alzheimer disease. *Zhongguo Xinyao Zazhi* 20(11), 993 - 998, 2011. *Chemical Abstracts* 2011, 986902.
  - <sup>11</sup> Zhang, J.; Zhong, X.: Natural drug in senile dementia treatment: research progress. *Liaoning Zhongyiyao Daxue Xuebao* 11(1), 47-49, 2009; *Chemical Abstracts* 2010, 351558.
  - <sup>12</sup> Rollinger, J. M.; Mock, P.; Zidorn, C.; Ellmerer, E. P.; Langer, T.; Stupper, H.: Application of the combo screening approach for the discovery of non-alkaloid acetylcholinesterase inhibitors from *Cichorium intybus*. *Current Drug Discovery Technologies* 2(3), 185-193, 2005.
  - <sup>13</sup> Devkota, K. P.; Lenta, B. N.; Choudhary, M. I.; Naz, Q.; Fekam, F. B.; Rosenthal, P. J.; Sewald, N.: Cholinesterase Inhibiting and Antiplasmodial Steroidal Alkaloids from *Sarcococca hookeriana*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 55(9), 1397-1401, 2007.
  - <sup>14</sup> Cardano-Lopes, E. M.; Maier, J. A.; Rogerio da Silva, M.; Regasini, L. O.; Simote, S. Y.; Lopes, N. P.; Pirani, J. R.; Bolzani, V. da S.; Young, M. C. M.: Alkaloids from

- 
- stems of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) as potential treatment for Alzheimer disease. *Molecules* 15, 9205-9213, 2010.
- <sup>15</sup> Yuan, S. - M.; Gao, K.; Wang, D. - M.; Quan, X. - Z.; Lui, J. - N.; Ma, Ch. - M.; Qin, Ch.; Zhang, L. - F.: Evodiamin improves cognitive abilities in SAMP8 and APPswe/PS1ΔE9 transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Pharmacologica Sinica* 32(3), 295-302, 2011; Chemical Abstracts 2011, 274025.
- <sup>16</sup> Fayed, A. - H. A.: Brain Trace Element Concentration of Rats Treated with the Plant Alkaloid, Vincamine. *Biological Trace Element Research* 136(3), 314-319, 2010.
- <sup>17</sup> [http://en.wikipedia.org/wiki/California\\_poppy](http://en.wikipedia.org/wiki/California_poppy)
- <sup>18</sup> Blaschek W., Ebel S., Hackenthal E., Holzgrabe U., Keller K., Reichling J., Schulz V.: *Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe*. HagerROM 2006. CD Realisierung: Informatik II. Universität Würzburg. [ Programmversion 6.1 ]. Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2006.
- <sup>19</sup> Cheney, R. H.: Therapeutic Potential of *Eschscholtzia Californicae* Herba. *Pharmaceutical Biology* 3(3), 413 - 416, 1963.
- <sup>20</sup> Slavík, J.; Slavíková, E.: Alkaloids of the Papaveraceae. Part LXXXII. On alkaloids from the aerial parts of three *Eschscholtzia* species. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 51(8). 1743 - 1751, 1986.
- <sup>21</sup> Beck, M. A.; Haberlein, H.: Flavonol glycosides from *Eschscholtzia californica*. *Phytochemistry* 2(50), 329 - 332, 1999.
- <sup>22</sup> Khadzhai, Y. I.; Korolev, V. F.: Pharmacology of quercetin. *Farmakologiya i Toksikologiya* 25, 71 - 77, 1962. Chemical Abstracts 1962, 472278.
- <sup>23</sup> Maoka T.; Fujiwara Y.; Hashimoto K.; Takeda S.; Takaragaki, S.; Ida K.: A New retro-Carotenoid from the Petals of the Californian Yellow Poppy *Eschscholtzia californica*. *Journal of Natural Products* 63(9), 1288 - 1289, 2000.
- <sup>24</sup> Awad, R.; Levac, D.; Cybulska, P.; Merali, Z.; Trudeau, V. L.; Arnason, J. T.: Effects of traditionally used anxiolytic botanicals on enzymes of the  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) system. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 85(9), 933 - 942, 2007.
- <sup>25</sup> Cahlíková, L.; Macáková, K.; Kuneš, J.; Kurfürst, M.; Opletal, L.; Cvačka, J.; Chlebek, J.; Blunden, G.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compound from *Eschscholtzia californica* (Papaveraceae). *Natural Product Communications* 5(7), 1035 - 1038, 2010.



- 
- <sup>26</sup> Morteza-Semnani, K.; Amin, G.; Shidfar, M. R.; Hadizadeh, H.; Shafiee, A.: Antifungal activity of the methanolic extract and alkaloids of *Glaucium oxylobum*. *Fitoterapia* 74(5), 493-6, 2003.
- <sup>27</sup> Abu-Ghalyun, Y.; Masalmen, A.; Al-Khalil, S.: Effects of allocryptopine, an alkaloid isolated from *Glaucium arabicum* on rat isolated ileum and urinary bladder. *General Pharmacology* 29(4), 621-3, 1997.
- <sup>28</sup> Hiller, K. O.; Ghorbani, M.; Schilcher, H.: Antispasmodic and relaxant activity of chelidonine, protopine, coptisine, and *Chelidonium majus* extracts on isolated guinea-pig ileum. *Planta Medica* 64(8), 758-60, 1998.
- <sup>29</sup> By Ko, F. N.; Wu, T. S.; Lu, S. T.; Wu, Y. Ch.; Huang, T. F.; Teng, Ch. M.: Antiplatelet effects of protopine isolated from *Corydalis* tubers. *Trombosis Research* 56(2), 289 - 298, 1989.
- <sup>30</sup> Singh, S.; Jain, L.; Pandey, M. B.; Singh, U. P.; Pandey, V. B.: Antifungal activity of the alkaloids from *Eschscholtzia californica*. *Folia Microbiologica* 54(3), 204 - 206, 2009.
- <sup>31</sup> Ahmad, N.; Gupta, S.; Husain, M. M.; Heiskanen, K. M.; Mukhtar, H.: Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clinical Cancer Research* 6(4), 1524 - 1528, 2000.
- <sup>32</sup> Mackraj, I.; Govender, T.; Gathiram, P.: Sanguinarine. *Cardiovascular therapeutics* 26(1), 75 - 83, 2008.
- <sup>33</sup> Jeng, J.-H.; Wu, H.-L.; Lin, B.-R.; Lan, W.-H.; Chang, H.-H.; Ho, Y.-S.; Lee, P.-H.; Wang, Y.-J.; Wang, J.S.; Chen, Y.-J.; Chang, M.-Ch.: Antiplatelet effect of sanguinarine is correlated to calcium mobilization, tromboxane and cAMP production. *Atherosclerosis* 191(2), 250 - 258, 2007.
- <sup>34</sup> Chmura, S. J.; Dolan, M. E.; Cha, A.; Mauceri, H. J.; Kufe, D. W.; Weichselbaum, R. R.: In vitro and in vivo activity of protein kinase C inhibitor chelerythrine chloride includes tumor cell toxicity and growth in vivo. *Clinical Cancer Research* 6(2), 737 - 742, 2000.
- <sup>35</sup> Slunská, Z.; Gelnarová, E.; Hammerová, J.; Táborská, E.; Slaninová, I.: Effect of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguilutine and chelilutine on normal and cancer cells. *Toxicology in vitro* 24(3), 697 - 706, 2010.

- 
- <sup>36</sup> El, T.; Kamal, E. H.: Pharmacological actions of magnoflorine and aristolochic acid-1 isolated from seeds of *Aristolochia bracteata*. International Journal of Pharmacognosy 29(2), 101 - 110, 1991.
- <sup>37</sup> Donev, N.: Pharmacological properties of glaucine. Farmatsiya (Sofia) 12(4), 17-21, 1962; Chemical Abstracts 1963, 29310.
- <sup>38</sup> Kubo, M.; Matsuda, H.; Tokuoka, K.; Ma, S.; Shiamoto, H.: Anti-inflammatory activities of methanolic extract and alkaloidal components from *Corydalis tuber*. Biological & Pharmaceutical Bulletin 17(2), 262-5, 1994.
- <sup>39</sup> Dewick, P. M.: Medicinal Natural Products, John Wiley & Sons, Ltd, 2002.
- <sup>40</sup> Dasgupta, S.; Ray, A. B.; Bhattacharya, S. K.; Bose, R.: Constituent of *Pachygone ovata* and pharmacological action of its major leaf alkaloid. Journal of Natural Products 42(4), 399 - 406, 1979.
- <sup>41</sup> Khamdamov, I.; Sadritdinov, F. S.: Antiemetic effect of the alkaloid 1-skulerine. Doklady Akademii Nauk UzSSR 7, 39, 1977. Chemical Abstracts 1978, 164330.
- <sup>42</sup> Hung, T. M.; Na, M. K.; Dat, N. T.; Ngoc, T. M.; Youn, U. J.; Kim, H. J.; Min, B.-S.; Lee, J. P.; Bae, K. H.: Cholinesterase inhibitory and anti-amnesic activity of alkaloids from *Corydalis turtschaninovii*. Journal of Ethnopharmacology 119(1), 74-80, 2008.
- <sup>43</sup> Yan, D.; Jin, Ch.; Xiao, X.-H.; Dong, X.-P.: Antimicrobial properties of berberines alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by microcalorimetry. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 70(6), 845-9, 2008.
- <sup>44</sup> Lin, Ch.-Ch.; Ng, L. T.; Hsu, F.-F.; Shieh, D.-E.; Chiang, L.Ch.: Cytotoxic effects of *Coptis chinensis* and *Epimedium sagittatum* extracts and their major constituents (berberine, coptisine and icariin) on hepatoma and leukaemia cell growth. Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology 31(1-2), 65-9, 2004.
- <sup>45</sup> Stahl, E.: Thin-layer Chromatography, A Laboratory Handbook 1969. 873.
- <sup>46</sup> Československý lékopis, Svazek I. Avicenum, vyd. 4., Praha 1987.
- <sup>47</sup> Doležal, J.: Biologická aktivita obsahových látek rostlin VIII. vliv alkaloidů z různých rostlinných taxonů na acetylcholinesterázu. UK v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Hradec Králové, 2008. Diplomová práce. 65 s.
- <sup>48</sup> Steck, T. L.; Kant, J. A.: Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. Method in Enzymology 31, 172 - 180, 1974.

- 
- <sup>49</sup> Cahlíková, L.; Horčíčková, Z.; Opletal, L.; Macákova, K.; Kurfürst, M.: Isochinolinové alkaloidy a jejich biologická aktivita. 38. Konference Syntéza a analýza léčiv, Hradec Králové, září 2009. Sborník abstraktů. S. 73.
- <sup>50</sup> Huang, J.; Zeng, J.; Guo, Y.; Tan, M.; Duan, X.: Separation and purification of protopine alkaloids from *Macleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde fruit by macroreticular resin. *Zhongnan Yaoxue* 9(12), 897 - 901, 2011. Chemical Abstracts 2012, 172489.
- <sup>51</sup> Tamas, M.; Chindris, E.; Roman, L.; Tuia, M.: Alkaloids of *Chelidonium majus* L. *Clujul Medical* 60(3), 256 - 260, 1987. Chemical Abstracts 1988, 420307.
- <sup>52</sup> Xu, X.; Wang, Z.; Yu, G.; Ruan, R.; Li, J.: Alkaloids from *Rhizoma corydalis*. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* 33(6), 483 - 486, 2002. Chemical Abstracts 2004, 168951.
- <sup>53</sup> Amer, M.; Assaad, A.; Mamoud, Z. F.: Alkaloids from *Fumaria densiflora* DC. *Alexandria Journal of Pharmaceutical Sciences* 2(2), 116 - 118, 1988.
- <sup>54</sup> Hung, T. M.; Na, M. K.; Dat, N. T.; Ngoc, T. M.; Youn, U. J.; Kim, H. J.; Min, B.-S.; Lee, J. P.; Bae, K. H.: Cholinesterase inhibitory anti-amnesic activity of alkaloids from *Corydalis turtschaninovii*. *Journal of Ethnopharmacology* 119(1), 74 - 80, 2008.
- <sup>55</sup> Aliev, K. U.; Kamilov, I. K.: Pharmacology of the alkaloid protopine and its derivatives. *Farmakologia Alkaloidov Glikozidov*, 176 - 178, 1967. Chemical Abstracts 1969, 56095.
- <sup>56</sup> Wu, T.-S.; Lin, F.W.: Alkaloids of the wood of *Cryptocarya chinensis*. *Journal of Natural Products* 64(11), 1404 - 1407, 2001.
- <sup>57</sup> Maturová, M.; Hrbek, J.; Šantavý, F.: Isolation and chemistry of alkaloids from plants of the genus *Papaver*. LXXVI. Optical rotation of pavine and isopavine alkaloids and their absolute configuration. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis, Facultatis Medicae* 90, 5 - 14, 1979.

---

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Mgr. Martin Poruba

Konzultant: Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Název rigorózní práce: Biologicky aktivní metabolity rostlin V. Alkaloidy  
*Eschscholtzia californica* CHAM. a jejich biologická  
aktivita

Cílem této rigorózní práce bylo zpracovat výtřeppek terciárních isochinolinových alkaloidů z rostliny *Eschscholtzia californica* CHAM. (Papaveraceae). Za pomoci běžných chromatografických metod byly izolovány tři alkaloidy v čisté formě, které byly následně identifikovány pomocí MS a NMR metod. První izolovanou látkou byl terciární alkaloid protopin, druhou izolovanou látkou byl také terciární alkaloid escholtzin a třetí izolovaná látka byla identifikována jako O-methylkaryachin.

Všechny izolované alkaloidy byly podrobeny testu na jejich inhibiční aktivitu vůči lidské erytrocytární acetylcholinesterase (HuAChE) a lidské sérové butyrylcholinesterase (HuBuChE). Naměřené inhibiční koncentrace pro HuAChE a HuBuChE pro protopin byly  $IC_{50} = 423 \pm 10,5 \mu\text{M}$  resp.  $IC_{50} = 333 \pm 3,3 \mu\text{M}$ . Pro escholtzin byly získány pro HuAChE a HuBuChE hodnoty  $IC_{50} = 519 \pm 5,8 \mu\text{M}$  resp.  $IC_{50} > 1 \text{ mM}$ . A u O-methylkaryachinu byly naměřeny hodnoty pro HuAChE a HuBuChE  $IC_{50} = 498 \pm 7,1 \mu\text{M}$  resp.  $IC_{50} > 1 \text{ mM}$ . Hodnoty  $IC_{50}$  standardů vůči HuAChE a HuBuChE byly naměřeny  $IC_{50} = 6,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$  resp.  $IC_{50} = 156 \pm 6,9 \mu\text{M}$  pro galanthamin a  $IC_{50} = 0,25 \pm 0,01 \mu\text{M}$  resp.  $IC_{50} > 1 \text{ mM}$  pro huperzine A. Vzhledem k naměřeným hodnotám  $IC_{50}$ , izolované alkaloidy vykazují v porovnání se standardy pouze slabý inhibiční potenciál.

Je známo, že oxidační stres hraje v patofyziologii AD důležitou roli. Z tohoto důvodu byla antioxidační aktivita zkoumána u izolovaných látek pomocí DPPH testu; bohužel všechny izolované látky jsou v tomto směru inaktivní  $EC_{50} > 1 \text{ mM}$ .

Klíčová slova: *Eschscholtzia californica* CHAM., isochinolinové alkaloidy, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, Alzheimerova choroba.

---

## ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Mgr. Martin Poruba

Consultant: Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Title of thesis: Biologically Active Metabolites of Plants V. Alkaloids from  
*Eschscholtzia californica* CHAM. and their Biological Activity

The aim of this thesis was to treat the mixture of tertiary isoquinoline alkaloids from the species *Eschscholtzia californica* CHAM. (Papaveraceae). Three pure alkaloids were isolated by using common chromatographic methods. The alkaloids were identified by MS and 1-D and 2-D NMR methods. The first isolated alkaloid was identified as tertiary alkaloid protopine, the second as tertiary alkaloid eschscholtzine and the last one as O-methylcaryachine.

All of the alkaloids were tested on ability to inhibit human erythrocytic acetylcholinesterase (HuAChE) and serum butyrylcholinesterase (HuBuChE). The inhibition activities for protopine were determined  $IC_{50} = 423 \pm 10,5 \mu\text{M}$  (HuAChE) and  $IC_{50} = 333 \pm 3,3 \mu\text{M}$  (HuBuChE). The values of inhibition for alkaloid eschscholtzine were determined  $IC_{50} = 519 \pm 5,8 \mu\text{M}$  (HuAChE) and  $IC_{50} > 1 \text{ mM}$  (HuBuChE). And for O-methylcaryachine the values of inhibition were determined  $IC_{50} = 498 \pm 7,1 \mu\text{M}$  (HuAChE) and  $IC_{50} > 1 \text{ mM}$  (HuBuChE). The values of  $IC_{50}$  for standards were determined  $IC_{50} = 6,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$  (HuAChE) and  $IC_{50} = 156 \pm 6,9 \mu\text{M}$  (HuBuChE) for galanthamine and  $IC_{50} = 0,25 \pm 0,01 \mu\text{M}$  (HuAChE) and  $IC_{50} > 1 \text{ mM}$  (HuBuChE) for huperzine A. According to their  $IC_{50}$  values isolated alkaloids showed only weak inhibition capacity in comparison with the used standards.

It is known, that oxidative stress plays a very important role in the pathogenesis of AD. For this reason we also investigated the antioxidant activity of the isolated compounds using the DPPH test; unfortunately all tested alkaloids were inactive  $EC_{50} > 1 \text{ mM}$ .

Key words: *Eschscholtzia californica* CHAM., isoquinoline alkaloids, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, Alzheimer's disease.