

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

ALKALOIDY VYBRANÝCH DRUHŮ ČELEDI AMARYLLIDACEAE, JEJICH  
TOXICITA A BIOLOGICKÁ AKTIVITA (IN VITRO STUDIE) I.

Doktorská disertační práce  
Mgr. Andrea Krejčí, roz. Kulhánková

Školitel: Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Studijní obor: Toxikologie přírodních látek

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji především mým školitelům ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. a prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za vynikající odborné vedení během mého doktorského studia. Děkuji také ing. Kateřině Macákové, Ph.D., Bc. Martině Hrabínové a doc. PharmDr. Danielu Junovi Ph.D. z Centra pokročilých studií Fakulty vojenského lékařství Univerzity Obrany v Hradci Králové, kterým vděčím za stanovení některých biologických aktivit izolovaných látek. Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a Mgr. Zdeňku Novákovi děkuji za měření NMR spekter a jejich interpretaci. Velké poděkování patří také mému manželovi, který mi byl při celém studiu a přípravě této práce nepřekonatelnou oporou.

Disertační práce vznikla za podpory Specifického vědeckého výzkumu UK v Praze, Farmaceutické fakultě v Hradci Králové (SVV-2014-260063).

*Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením svého školitele ing. Lucie Cahlíkové, Ph.D.). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.*

V Hradci Králové, 2014

Mgr. Andrea Krejčí, roz. Kulhánková

**SEZNAM ZKRATEK**

AD	Alzheimerova choroba
ADINACO	Alzheimer's Disease and Natural Compounds
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
AMK	Aminokyselina
APP	Amyloidní prekurzorový protein
A $\beta$	$\beta$ -amyloidní peptid
BACE-1	$\beta$ -sekretasa
BuChE	Butyrylcholinesterasa
CNS	Centrální nervový systém
HuAChE	Lidská erytrocytární acetylcholinesterasa
HuBuChE	Lidská sérová butyrylcholinesterasa
HEB	Hematocefalická bariéra
ChAT	Cholinacetyltransferasa
GSK-3 $\beta$	Glykogen syntáza kinasa 3 $\beta$
NFK	Neurofibrilární klubka
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
ROS	Reaktivní formy kyslíku
sAPP $\alpha$	Rozpustný $\alpha$ amyloidový prekurzorový protein
sAPP $\beta$	Rozpustný $\beta$ amyloidový prekurzorový protein
SP	Senilní plaky

**PŘEDMLUVA K DISERTAČNÍ PRÁCI**

Vzhledem k počtu publikovaných prací na řešené téma je tato disertační práce pojata jako komentář k článkům, které byly publikovány v průběhu doktorského studia.

**Obsah**

1. Úvod .....	5
2. Cíl práce .....	9
3. Literární přehled .....	10
3.1 Cholinergní systém .....	10
3.2 Cholinesterasy a jejich význam .....	11
4. Rostliny čeledi Amaryllidaceae a jejich sekundární metabolity .....	13
4.1 Strukturní rozdělení a biosyntetický původ alkaloidů čeledi Amaryllidaceae .....	14
4.2 Biologická aktivita .....	20
4.2.1 Inhibice cholinesteras .....	24
4.2.2 Inhibice propyloligopeptidasy .....	28
5. Závěr.....	30
6. Abstrakt .....	32
7. Abstract .....	34
8. Přehled publikací autorky.....	36
8.1 Tématické práce předkladatelky .....	36
8.2 Další práce experimentálního charakteru .....	36
8.3 Přehledové práce .....	37
8.4 Abstrakta z konferencí.....	37
9. Literatura .....	38

## 1. ÚVOD

Rostliny produkují téměř nepřeberné množství sekundárních metabolitů se širokým spektrem biologických aktivit. Toto poznání, ač ne přesně v takovéto podobě, je staré snad jako lidstvo samo. Rostliny sloužily od pradávna jako zdroj potravy a tak postupně empiricky byly odhalovány i jejich léčivé, respektive toxické účinky<sup>1</sup>.

Ačkoliv by se dnes na první pohled mohlo zdát, že přírodní látky nejsou rovnou synteticky připraveným léčivům, či nejsou dostatečně účinné, opak je pravdou<sup>1</sup>. Organická chemie dnes sice dokáže syntetizovat většinu přírodních látek o malé molekule, totální syntéza je však často finančně velmi nákladná. Syntetických postupů se dnes využívá spíše pro úpravu přírodních molekul (například úprava námelových alkaloidů na dihydroderiváty z důvodu lepší terapeutické využitelnosti) nebo řešení problémů jiného druhu. Zde je dobrým příkladem syntéza morfinu z thebainu za účelem eliminace pěstování opiového máku v některých oblastech.

Výše zmíněná fakta nejsou jedinými aspekty důležitosti přírodních látek a návratu k jejich takzvanému znovuoobjevení. Globalizace světa, příchod informační doby a neustálý pokrok lékařské vědy přináší mnoho změn ve společnosti, na které je nutno reagovat i na poli nových potenciálních léčiv. Oproti minulým stoletím se výrazným způsobem prodlužuje délka života a charakter onemocnění převládající ve společnosti. Zatímco v 19. století byly největší hrozbou infekční onemocnění, ve 20. století jsou to onemocnění kardiovaskulární a nádorová, ve 21. století jimi budou onemocnění neurodegenerativní<sup>2</sup>.

S rostoucí délkou života se projevují především choroby, které se v minulosti nestačily z hlediska četnosti rozvinout. Jednou z těchto chorob je i Alzheimerova choroba (AD). Jedná se o neurodegenerativní onemocnění, jehož klinickými projevy jsou postupný úpadek kognitivních funkcí, který vede až k naprostému rozkladu osobnosti a neschopnosti se o sebe postarat. Vzhledem k faktu, že v současnosti neexistuje kauzální léčba<sup>3</sup>, a je tak možno pouze zpomalit progresi choroby léčbou symptomatickou, jedná se o velmi závažný problém. Charakter onemocnění navíc představuje velkou zátěž pro pacienty, rodiny nemocných i celou společnost.

Výskyt AD je díky stárnutí populace a delší střední délce života stále častější. Incidence AD je výrazná převážně u starších lidí. Po 65. roce věku se každých 5 let zdvojnásobuje a u lidí nad 85 let věku je postiženo více než 30 % populace<sup>4</sup>. Počet nemocných se navíc stále zvyšuje a očekává se, že do roku 2050 může počet nemocných celosvětově dosáhnout až 114 milionů<sup>5</sup>.

Etiologie AD dosud není plně známa<sup>6</sup>. Z hlediska patofyziologických procesů, které v mozku při AD probíhají, se dá na onemocnění nahlížet ze dvou hlavních úhlů pohledu. Na tomto základě také vznikly dvě hlavní hypotézy vzniku AD. Podle amyloidní hypotézy<sup>7</sup> je primární příčinou vznik tzv.  $\beta$ -amyloidu ( $A\beta$ ), který v mozku vytváří senilní plaky (SP). Ve zdravém mozku dochází ke štěpení membránového amyloidového prekursorového proteinu (APP) enzymem  $\alpha$ -sekretasou a následně  $\gamma$ -sekretasou. Tímto štěpením vznikne  $\alpha$ -prekurzorový protein ( $sAPP\alpha$ ), který je rozpustný a má své důležité fyziologické role, např. při zajišťování neuronální plasticity. V membráně zůstává proteinový zbytek C83, který je štěpen  $\gamma$ -sekretasou za vzniku proteinu P3 cit.<sup>8</sup>. Za patologických podmínek je APP nadměrně štěpen enzymem beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzym 1 (BACE-1,  $\beta$ -sekretasa). To má za následek štěpení APP na jiném místě (tzv.  $\beta$ -místo), a výsledkem tohoto štěpení je kratší fragment - rozpustný  $\beta$ -prekurzorový protein ( $sAPP\beta$ ) - a v membráně zůstává delší zbytek C99. Zbytek C99 je poté štěpen  $\gamma$ -sekretasou za vzniku amyloidních peptidů, které jsou tvořeny 38-43 aminokyselinami<sup>8</sup> a v průběhu nemoci vytváří toxické oligomery, protofibrily, fibrily a v konečné fázi SP.

Dalším patofyziologickým nálezem jsou neurofibrilární klubka (NFK). Ve zdravé tkáni se přirozeně vyskytuje tzv.  $\tau$ -protein. Ten se podílí na stavbě mikrotubulů a vezikulárním transportu. Při patologických procesech ovšem dochází k jeho hyperfosforylaci a takto fosforylovaný protein se stává nerozpustným, přestává se vázat na mikrotubuly a shlukuje se do zdvojených helikálních struktur<sup>9</sup>. Na rozdíl od  $A\beta$  se NFK tvoří uvnitř neuronu. Tyto intraneuronální agregáty vedou ke smrti neuronů a tím k úbytku mozkových buněk. Někteří autoři uvádějí vznik NFK jako důsledek nerovnováhy mezi produkcí a odstraňováním  $A\beta$ <sup>10</sup>.

V důsledku přítomnosti výše popsaných patologických útvarů dochází k dalšímu jevu – tzv. excitotoxicitě. To má za následek nadměrné uvolňování glutamátu a dalších excitačních AMK, v nepostíženějších korových oblastech dochází ke sníženému zpětnému vychytávání glutamátu. Ten se poté nadměrně váže na receptory např. ionotropní receptor typu NMDA (*N*-methyl-D-aspartátový receptor), dochází k nadměrnému otevření vápníkových kanálů a ke zvýšenému vstupu vápenatých iontů do neuronů. Tento proces má za následek aktivaci kaskády dějů, které v konečném důsledku vedou k neuronální apoptóze. NMDA receptory navíc realizují jeden ze základních dějů učení - dlouhodobou potenciaci a právě tento děj je hyperexcitací NMDA receptorů rušen<sup>11,12</sup>.

Cholinergní teorie popisuje především snížení hladiny acetylcholinu (ACh) v centrálním nervovém systému (CNS) jako hlavní příčinu úpadku kognitivních funkcí<sup>13</sup>. Je

popisován úbytek enzymu cholinacetyltransferasy (ChAT), enzymu, který syntetizuje ACh<sup>14</sup> a také snížený vstup prekurzorů (cholin a acetylkoenzym A) pro tvorbu ACh do neuronů. Vzhledem ke snížené tvorbě ACh existuje snaha prodloužit působení existujícího ACh v postiženém mozku. Cílem se stal enzym, který ACh odbourává, a tím je acetylcholinesterasa (AChE). V průběhu onemocnění však dochází také k úbytku tohoto enzymu a v závěrečných stádiích nemoci je převládajícím enzymem butyrylcholinesterasa (BuChE), která štěpí ACh podobným způsobem, jako AChE<sup>15</sup>.

Vzhledem ke komplexnosti a stále ne plně jasné etiologii, je medikamentózní zásah do patofyziologických procesů velmi nesnadný<sup>16</sup>. Z těchto důvodů dnes dostupná a aplikovaná léčiva u pacientů s AD, vycházejí z cholinergní teorie a terapie je zaměřena na co nejdelší udržení kognitivních funkcí.

Historicky prvními používanými léčivy byly inhibitory acetylcholinesterasy a ty i nadále zůstávají nejvýznamnější terapií AD. Centrálně působící inhibitory cholinesteras musí procházet hematocefalickou bariérou, specificky ovlivňovat mozkové cholinesterasy a musejí být také dobře tolerovány. Většina dosud používaných inhibitorů cholinesteras inhibuje AChE, některá inhibují částečně i BuChE.

Inhibice cholinesteras může probíhat reverzibilním nebo pseudoreverzibilním způsobem. Irreverzibilní inhibitory se v praxi nevyužívají z důvodu velkého množství nežádoucích účinků. V ČR jsou dnes prakticky využívány galanthamin, rivastigmin a donepezil. Takrin se pro svou hepatotoxicitu přestal používat<sup>17</sup>. Kromě inhibitorů cholinesteras se k léčbě středních a těžších stádií AD používá inhibitor NMDA receptorů – memantin.

Tato disertační práce je věnována izolaci, identifikaci a především biologické aktivitě alkaloidů rostlin čeledi Amaryllidaceae. Z této čeledi byl izolován již zmíněný terapeuticky využívaný galanthamin. Galanthamin je terciární alkaloid původně izolovaný z cibulí sněženky *Woronowii Galanthus woronowii* Losinsk z čeledi Amaryllidaceae. Později byl izolován také z dalších rostlin této čeledi<sup>18</sup>. Jedná se o selektivní reverzibilní inhibitor acetylcholinesterázy, který zároveň allostericky moduluje acetylcholinové nikotinové receptory.

V rámci pracovní skupiny ADINACO Research Group<sup>19</sup> jsem se na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové věnovala alkaloidům rostlin *Zephyranthes robusta* a *Chlidanthus fragrans*. Protože léčba AD se musí posunout od symptomatické ke kauzální, je třeba u izolovaných látek sledovat více aspektů, než jen inhibici cholinesteras. Skupina ADINACO ve spolupráci s Centrem pokročilých



studii Fakulty vojenského lékařství Univerzity Obrany v Hradci Králové začala u izolovaných látek testovat také inhibici propyloligopeptidázy (POP) a v nejbližší době se plánuje v rámci zavedení nových biologických testů a spolupráce, identifikace i dalších biologických aktivit úzce souvisejících s AD, jako je například inhibice BACE-1 a glykogen syntázy kinázy  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ).

## **2. CÍL PRÁCE**

Cílem této práce bylo:

- 1) příprava alkaloidních extraktů z vybraných rostlin čeledi Amaryllidaceae, stanovení biologických aktivit jednotlivých extraktů a provedení GC-MS analýzy za účelem identifikace jednotlivých složek,
- 2) na základě výsledků screeningové studie provedení výběru vhodných rostlin pro fytochemické studie,
- 3) příprava alkaloidních extraktů z vybraných rostlin, izolace alkaloidů v čistém stavu
- 4) stanovení základních fyzikálně-chemických vlastností izolovaných látek (optická otáčivost) a struktury MS a NMR analýzou,
- 5) provést stanovení vybraných biologických aktivit čistých izolovaných látek (inhibice lidské erytrocytární acetylcholinesterasy a lidské sérové butyrylcholinesterasy, inhibice prolyloliigopeptidasy),
- 6) po výpočtu hodnot  $IC_{50}$  (statistickým programem GraphPad Prism 5.02 software) navrhnout nejúčinnější látky pro hlubší biologické studium z hlediska vlivu na neurodegenerativní onemocnění typu Alzheimerovy choroby.

### **3. LITERÁRNÍ PŘEHLED**

#### **3.1 Cholinergní systém**

Acetylcholin je jeden z hlavních neurotransmiterů v lidském organismu. V periferním nervovém systému hraje roli neurotransmiteru na nervosvalové ploténce, kde se váže k nikotinovým ACh receptorům. Zde zprostředkovává otevření ligandem řízeného sodíkového kanálu. Na svalových vláknech srdečního svalu ovšem přes muskarinové ACh receptory naopak inhibuje kontrakci svalových vláken<sup>20</sup>.

V autonomním nervovém systému funguje jako neurotransmiter jak v pregangliových, tak postgangliových neuronech parasymptiku a také v pregangliových neuronech sympatiku. Modifikovaná gangliová sympatická vlákna v dřeni nadledvin jsou stimulována ACh k produkci noradrenalinu a adrenalinu. Výjimku tvoří na postgangliových synapsích sympatiku pouze v potních žlázách<sup>20</sup>.

Z chemického hlediska je ACh esterem kyseliny octové a cholinu, jedná se o látku s kladným nábojem. Je syntetizován v cytoplazmě cholinergních neuronů z cholinu a acetylkoenzymu A, ve kterých je uchováván uvnitř vezikul. Jeho syntéza probíhá za pomoci enzymu ChAT. Při proběhnutí akčního potenciálu se pomocí exocytózy dostává do synaptické štěrbině, kde se váže na cholinergní receptory. Vazba je pouze krátkodobá, ACh je velmi rychle rozkládán cholinesterasami na acetát a cholin, který je dále využit k opětovné tvorbě ACh. Role těchto enzymů je důležitá pro odstraňování volného ACh a tedy pro správné fungování nervového přenosu<sup>20</sup>.

Z fyziologického hlediska hraje cholinergní systém v CNS velmi důležitou úlohu v mnoha složitých a stále ne zcela jasných procesech. Kromě samotného přenosu akčního potenciálu slouží jako neuromodulátor, je zodpovědný za průtok krve mozkem<sup>21</sup>, za aktivitu mozkové kůry<sup>22</sup>, cyklus bdění a spánku<sup>23</sup>, kognitivní funkce a paměť<sup>24</sup>.

Z anatomického hlediska můžeme cholinergní systém mozku můžeme rozdělit na skupinu takzvaných projekčních neuronů, které se nacházejí především v předním mozku a horní části mozkového kmene (nucleus interpeduncularis a nucleus Maynerti), a interneurony, přítomné v nucleus caudate a v putamen, nucleus acumbens, v hippocampu, mozkové kůře, hypotalamu a míše<sup>25</sup>. Neurony bazálních ganglií projikují axony do celé mozkové kůry, neurony septum verum a axony jader retikulární formace projikují do hippocampu a thalamu<sup>26</sup>.

Je dlouhou dobu známo, že podání tropanových alkaloidů (které blokují muskarinový receptor) způsobuje ztrátu paměti a kognitivní poruchy podobné těm, které se vyskytují u různých typů demencí<sup>27</sup>. Řada studií potvrdila vliv acetylcholinu na vývoj mozkové kůry a jeho důležitost v budování synaptické sítě neuronů, která v dospělosti zajišťuje správné fungování kognitivních funkcí<sup>28,29</sup>. Acetylcholin tak hraje významnou roli ve strukturní a funkční remodelaci korových okrsků a má vliv na vizuální plasticitu mozkové kůry<sup>30,31</sup>.

V průběhu stárnutí dochází k úbytku a atrofii cholinergních neuronů v předním mozku, snížení aktivity ChAT a celkovému chýtrání cholinergního systému, který se dá srovnat s procesem pozorovaným u středně těžkých degenerativních změn<sup>32</sup>. Tyto změny vedou ve vyšším věku často k poruchám paměti<sup>33</sup>. Poruchy kognitivních funkcí však nebývají detekovatelné dříve, než je zničeno kolem 30 % cholinergních neuronů. Cholinergní systém tak vykazuje poměrně velkou kapacitu vůči úbytku neuronů<sup>32</sup>.

Ztráta funkce cholinergního systému je pozorována při mnoha neurodegenerativních onemocněních, jako je Parkinsonova choroba, Downův syndrom, Creutzfeldt-Jakobova nemoc, ale i při alkoholismu či traumatech<sup>34,35</sup>. Při AD se však kromě degenerace cholinergního systému objevují také v mozkové kůře a hippocampu extracelulárně A $\beta$  a v cytoplazmě kortikálních a pyramidových neuronů NFK.

Prvním náznakem souvislosti mezi tvorbou A $\beta$  a cholinergní dysfunkcí byla přítomnost cholinesteras a plaků na stejných místech mozku<sup>36</sup>. I přes značný pokrok v pochopení biochemických procesů tvorby a ukládání  $\beta$ -amyloidových plaků, není stále známa příčina degenerace cholinergních neuronů. V posledních letech se však zdá, že proces tvorby a usazování  $\beta$ -amyloidových plaků a degenerace cholinergních neuronů může mít úzkou souvislost. Nedávná studie zjistila, že dlouhodobé potlačení cholinergní muskarinové transmise může ovlivnit rovnováhu štěpení APP ve prospěch vzniku A $\beta$ <sup>37</sup>.

### **3.2 Cholinesterasy a jejich význam**

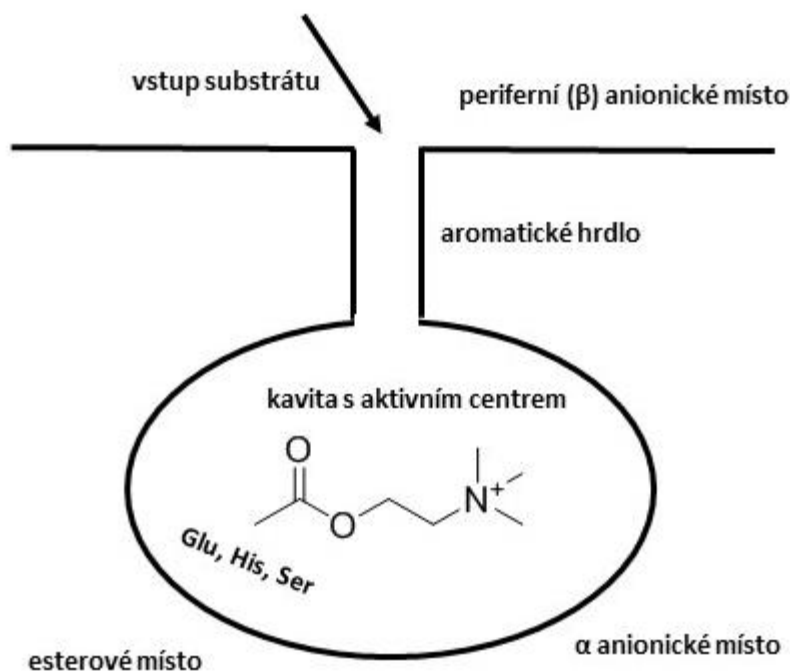
V současné době jsou známy dvě cholinesterasy, v předešlých kapitolách již zmíněné: AChE, v dřívější literatuře označovaná jako krevní cholinesterasa, a BuChE, která bývala označována jako plazmatická cholinesterasa. Názvy vypovídají o skutečnosti, že AChE je přítomna na povrchu erytrocytů a BuChE při zpracování krve zůstává v krevní plazmě či séru. Strukturně obě cholinesterasy náleží do rodiny esteras – lipas<sup>38</sup>.

AChE je základní součástí cholinergních synapsí a nervosvalových spojení, které se podílejí na štěpení ACh. V těle savců se AChE vyskytuje ve třech formách, které mají stejná

katalytická místa, ale liší se v C-terminálních proteinech. Monomerní rozpustná forma (G1) se vyskytuje především během vývoje mozku; dimerní forma (G2) se nachází v erytrocytech a tetramerní forma (G4) v mozku a ve svalech<sup>39</sup>. V mozku zdravého člověka převládá forma G4 a forma G1 je přítomna pouze v nízké koncentraci. U pacientů postižených AD významně roste podíl G1 formy a klesá množství formy G4.

BuChE je substrátově méně specifická a její role v organismu není doposud zcela objasněna<sup>40,41</sup>. Hydrolyzuje butyrylcholin, některá léčiva, mezi něž patří kokain či acetylsalicylová kyselina. Je možné, že se podílí na regulaci proliferujících buněk (např. v mozku). Nachází se v plazmě, játrech a lidském mozku. V lidském mozku se nachází v neuronech a gliových buňkách<sup>41</sup>. Koncentrace a aktivita BuChE se v mozku zvyšuje s věkem a je významně zvýšená u pacientů s AD, zatímco množství a aktivita AChE se snižuje<sup>6</sup>. Na základě různých modelů (a u pacientů s pokročilou AD) se zdá, že BuChE určitou měrou nahrazuje AChE při hydrolyze mozkového ACh a je pro další studium velmi perspektivní<sup>42,43</sup>.

S ohledem na katalytické působení cholinesteras a působení inhibitorů hrají důležitou roli následující části enzymů: aktivní centrum, aromatické hrdlo a periferní místo, též označované jako  $\beta$  anionické místo. Struktura aktivního centra a přilehlých oblastí je zobrazena na následujícím obrázku (Obrázek 1)<sup>44</sup>. Substrát musí při své cestě k aktivnímu centru minout nejprve  $\beta$  anionické místo. Toto místo hraje významnou roli především u AChE. U BuChE je vyvinuté mnohem méně<sup>45</sup>. Aromatické hrdlo obsahuje vyšší procento reziduí aromatických aminokyselin a je opět vyvinutější u AChE, kde je přítomno čtrnáct reziduí aromatických kyselin oproti osmi u BuChE<sup>46</sup>. Toto aromatické hrdlo plní roli jakéhosi molekulového síta determinujícího, které substráty nebo inhibitory proniknou do aktivního centra. Aktivní centra AChE a BuChE jsou velice podobná; jsou tvořena tzv. katalytickou triádou aminokyselin serin 200 – glutamát 327 – histidin 440 a představují tzv. esterové resp. esteratické místo, které je zodpovědné za hydrolytické štěpení esterové vazby substrátu<sup>47</sup>. Nepostradatelnou součástí aktivního centra je  $\alpha$  anionické místo označované také jako aktivní anionické místo, které odpovídá za správnou orientaci substrátu vůči aktivnímu centru<sup>48</sup>. Inhibitory vázající se do  $\alpha$  anionického místa jsou například v současnosti farmakologicky využívaný galanthamin, donepezil a huperzin A, který je v Číně již zaveden do praxe v léčbě AD a v Evropě a USA by měl být v budoucnu zaveden jako dostupný lék<sup>49,50,51</sup>. Cílovým místem účinku další farmakologicky využívané látky, rivastigminu, je esterové místo enzymu<sup>52</sup>.



**Obrázek 1.** Schéma aktivního centra acetylcholinesterázy.

#### 4. ROSTLINY ČELEDI AMARYLLIDACEAE A JEJICH SEKUNDÁRNÍ METABOLITY

Čeď Amaryllidaceae (Amarylkovitě) je poměrně početná čeď čítající asi 75 rodů a 1100 druhů<sup>53</sup>. Jedná se o jednoděložné víceleté cibulovité rostliny, z nichž většina zástupců se vyskytuje v subtropickém a tropickém pásmu. V ČR roste v přírodě volně jen 5 druhů, 3 jsou původní a 2 zplanělé. Z původních jsou jimi *Galanthus nivalis* L. (sněžinka podsněžník), *Leucojum vernum* L. (bledule jarní) a kriticky ohrožená *Leucojum aestivum* L. (bledule letní), která se v ČR nyní vyskytuje už jen v jihomoravských luzích. U nás zplanělé *Narcissus poeticus* L. (narcis bílý) a *Narcissus pseudonarcissus* L. (narcis žlutý) pocházejí původně z jihozápadní Evropy<sup>54,55</sup>. Mnohé ze subtropických zástupců se u nás pěstují jako pokojové rostliny. Příkladem mohou být rody *Clivia*, *Haemanthus*, *Eucharis*, *Crinum* a *Hippeastrum*. Nutno podotknout, že díky vysokému obsahu alkaloidů mohou být tyto rostliny zdrojem otrav.

Díky přítomnosti alkaloidů byly tyto rostliny dlouho využívány v lidovém léčitelství. Přehled využití rostlin v lidovém léčitelství, kterým byla a je po fytochemické stránce věnována pozornost na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie je shrnut v níže uvedené tabulce (Tabulka 1). Kompletní přehled by byl velmi rozsáhlý, a přesahoval by rámec této

kvalifikační práce. V souvislosti s nemocemi CNS je potřeba zmínit také používání odvaru z cibulí sněženek a bledulí v oblasti Východní Evropy k léčbě nemocí jako je poliomyelitida a myastenien gravis<sup>56</sup>. Detailní popis využití těchto rostlin v lidovém léčitelství a tradiční medicíně je možno nalézt v následující literatuře<sup>57,58,59,60</sup>.

**Tabulka 1.** Využití vybraných rostlin čeledi Amaryllidaceae v tradiční medicíně.

Rostlina	Využití	Země	Cit.
<i>Zephyranthes candida</i> Herb.	Diabetes mellitus	Jižní Afrika	61
<i>Zephyranthes parvula</i> Kilip	Zhoubné nádory	Peru	61
<i>Zephyranthes rosea</i> Lindl.	Rakoviny prsu	Čína	62
<i>Zephyranthes flava</i> (Herb.) Baker	Široké využití	Indie	63
<i>Nerine bowdenii</i> Watson	Kašel, nachlazení, neurodegenerativní onemocnění	Jižní Afrika	64
<i>Nerine filifolia</i> Baker	Bolesti zad, kašel a nachlazení, neplodnost, potíže s ledvinami a játry	Jižní Afrika	65
<i>Eucharis grandiflora</i> Planch. & Linden	Rány, nádory	Peru, Chile	66
<i>Galanthus nivalis</i> L.	Žaludeční potíže, léčba ran a otoků	Turecko	67
<i>Hymenocallis</i> Salisb.	Nádory	Portoriko	65

Biologická aktivita těchto látek je značná a široká. K nejvýraznější aktivitě patří především schopnost inhibice cholinesteras<sup>68,69</sup>. Další neopomenutelné biologické aktivity těchto alkaloidů jsou aktivita antivirová, antimalarická, antibakteriální<sup>70</sup> a cytotoxicita indukci apoptózy<sup>71,72</sup>. V dnešní době je popsáno přibližně 500 Amaryllidaceae alkaloidů a jak se zdá, tento počet není zdaleka konečný. Jen za poslední dva roky bylo izolováno a strukturně popsáno 26 nových alkaloidů této čeledi<sup>73</sup>. V průběhu posledních šesti let byly popsány alkaloidy dvou dosud neznámých strukturních typů<sup>74</sup>. Amaryllidaceae alkaloidy jsou do značné míry strukturně jedinečné. Někteří autoři je zařazují do skupiny isochinolinových alkaloidů<sup>75,76</sup>, jelikož isochinolinové jádro se ve většině molekul skutečně vyskytuje.

#### 4.1 Strukturní rozdělení a biosyntetický původ alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

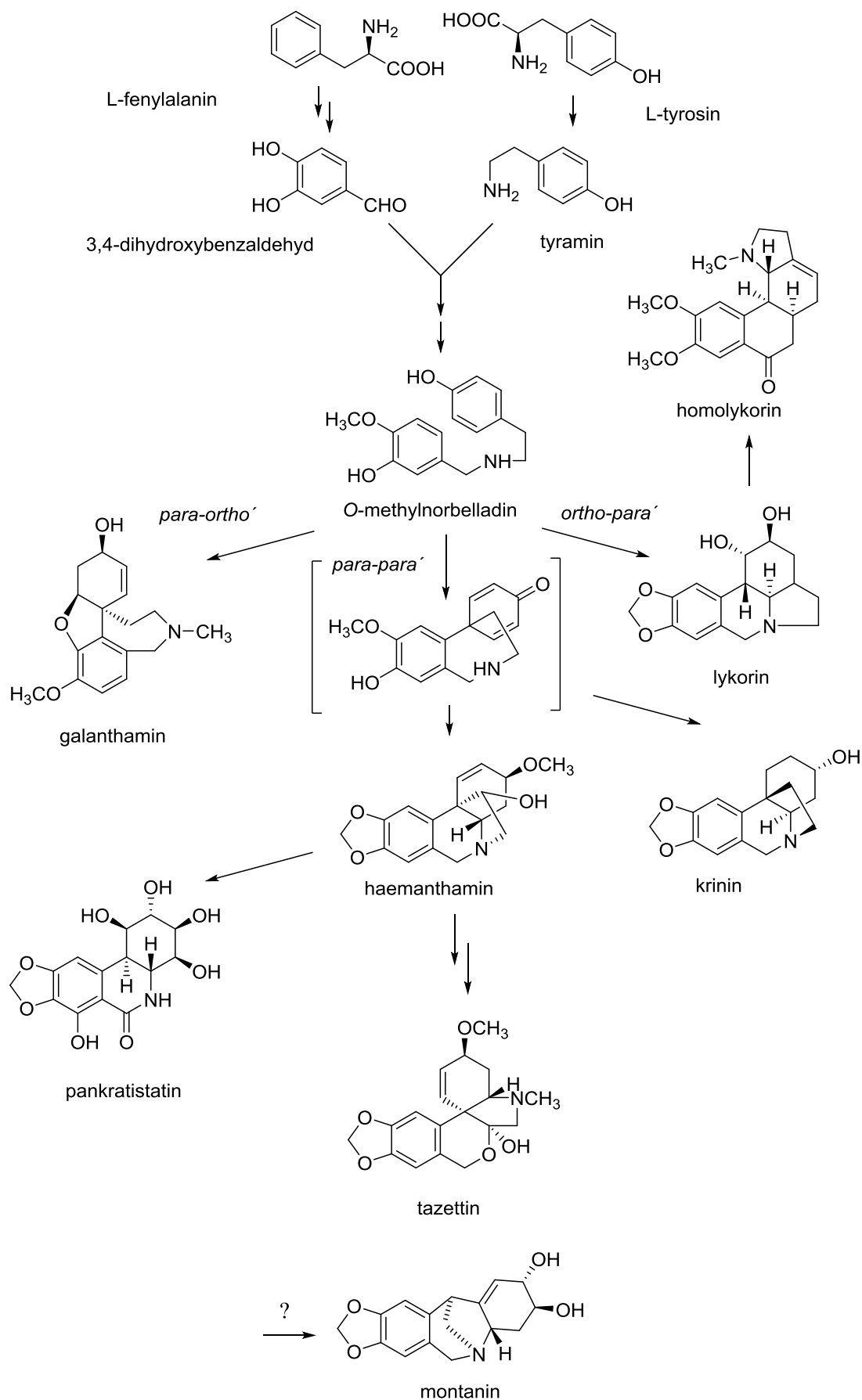
V dnešní době je známo 19 strukturních typů těchto látek. Každoročně jsou ovšem izolovány a strukturně popsány nové alkaloidy ať už stávajících strukturních typů, či strukturních typů zcela nových. Prozatím posledním novým strukturním typem je typ hostasininový, který byl popsán díky izolaci hostasininu A z *Hosta plantaginea* (Lam.) Asch.

(Liliaceae) v roce 2007<sup>77</sup>. V čeledi Amaryllidaceae byl identifikován až v roce 2011, kdy byl izolován z *Lycoris albiflora* Koidz<sup>78</sup>. Zvláštním typem je typ mesembranový. Jedná se o typ široce rozšířený v rostlinách rodu *Sceletium* (Aizoaceae), ale v čeledi Amaryllidaceae byl prozatím popsán jen u dvou zástupců rodu *Narcissus*<sup>79,80</sup>, dále u *Hymenocallis arenicola* Northr.<sup>81</sup> a *Crinum oliganthum* Urb.<sup>82</sup>. Základem molekuly těchto látek není isochinolin, ale indol. Tento strukturní typ se dále dělí na tři podskupiny reprezentované mesembrinem, joubertiaminem a skeletinem A4. U skeletinu A4 ovšem v molekule nacházíme vedle indolu také isochinolinový skelet.

Plikaminový a gracilaminový strukturní typ obsahují v molekule dva dusíkové atomy, všechny ostatní strukturní typy obsahují dusík jeden. Přehled všech strukturních typů, jejich hlavních zástupců a rodů, ze kterých byly izolovány či identifikovány, shrnuje následující tabulka (Tabulka 2).

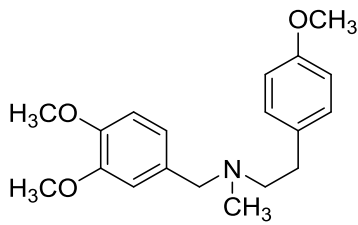
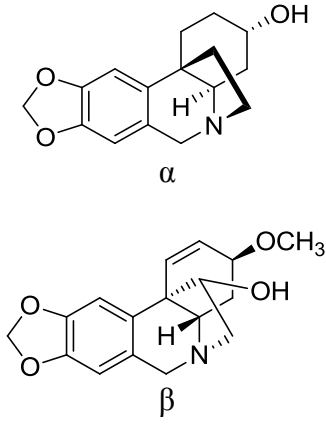
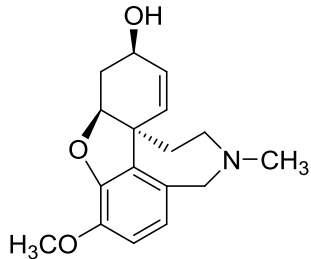
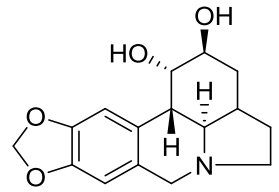
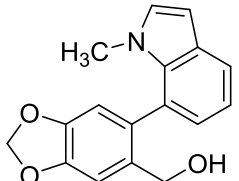
Biosyntéza těchto alkaloidů je svým způsobem specifická. Podle hlavního meziprojektu (který je také jedním ze strukturních typů) se nazývá norbelladinová cesta. Téměř všechny ostatní alkaloidy s isochinolinovým jádrem vznikají buď z molekuly L-fenylalaninu či L-tyrosinu. Na počátku biosyntézy amarylkovitých alkaloidů stojí obě tyto molekuly, které po několika reakčních krocích tvoří 4'-*O*-methylnorbelladin. Podobně začíná syntéza také u kolchicinu, ovšem produkt kondenzace obou molekul je jiný. Z norbelladinu dále podle typu intramolekulového oxidativního spojení („para-ortho“; „para-para“; „ortho-para“) vznikají základní strukturní typy těchto alkaloidů pojmenované vždy podle hlavního zástupce skupiny (Obrázek 2). Jsou jimi galanthaminový, lykorinový,  $\alpha$ - a  $\beta$ -krinanový (krinin a haemanthamin), dále pak méně často se vyskytující buflavinový, cheryllinový a pankratistatinový typ. Z  $\alpha$ - a  $\beta$ -krinanového skeletu dále vznikají tazettinový, pankratistatinový, augustaminový, gracilinový, plikaminový a gracilaminový strukturní typ<sup>83</sup>. Homolykorinový typ je syntetizován ze skeletu lykorinového. Biosyntetická cesta některých, především méně se vyskytujících zástupců není doposud plně objasněna. Schéma biosyntézy základních strukturních typů je znázorněno na následujícím obrázku (Obrázek 2).

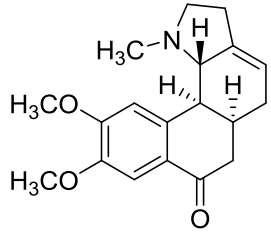
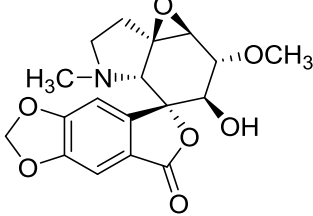
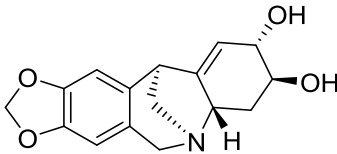
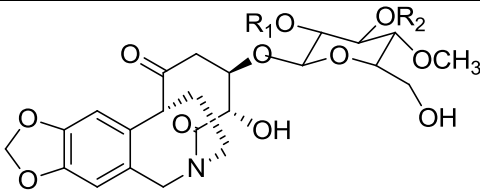
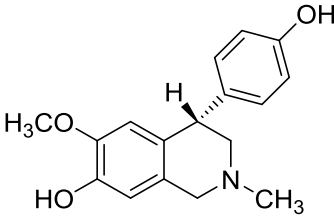
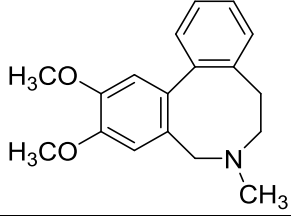
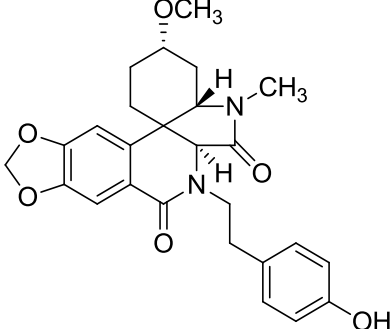
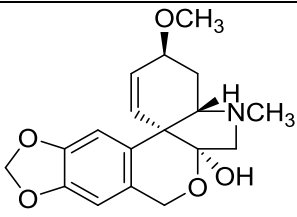


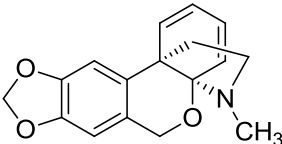
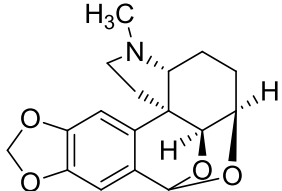
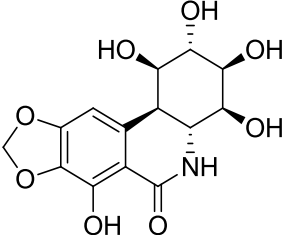
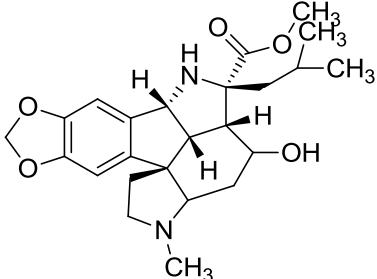
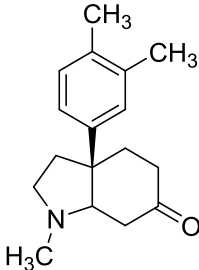
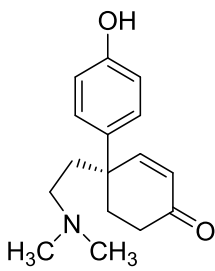
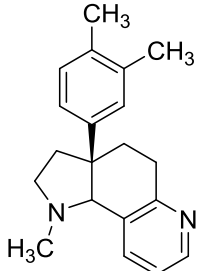


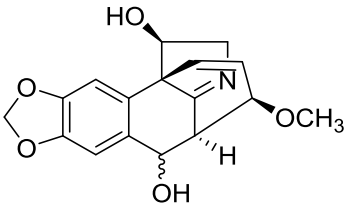
Obrázek 2. Biosyntetická cesta hlavních strukturních typů alkaloidů Amaryllidaceae<sup>84</sup>.

**Tabulka 2.** Přehled strukturních typů alkaloidů čeledi Amaryllidaceae a rody, ze kterých byly izolovány.

	Strukturní typ	Hlavní zástupce		Rod <sup>Cit.</sup>
1	belladinový		belladin	<i>Crinum</i> <sup>85,86</sup> <i>Galanthus</i> <sup>87</sup> <i>Chlidanthus</i> <sup>88,89</sup> <i>Nerine</i> <sup>90</sup>
2	krininový		krinin  haemanthamin	<i>Ammocharis</i> <sup>91</sup> <i>Brunsvigia</i> <sup>92</sup> <i>Clivia</i> <sup>93</sup> <i>Crinum</i> <sup>94</sup> <i>Cyrtanthus</i> <sup>95</sup> <i>Eucharis</i> <sup>96</sup> <i>Galanthus</i> <sup>97</sup> <i>Hippeastrum</i> <sup>98,99</sup> <i>Leucojum</i> <sup>82</sup> <i>Lycoris</i> <sup>100,101</sup> <i>Narcissus</i> <sup>102</sup> <i>Nerine</i> <sup>103</sup> <i>Zephyranthes</i> <sup>104</sup>
3	galanthaminový		galanthamin	<i>Crinum</i> <sup>104</sup> <i>Cyrtanthus</i> <sup>105</sup> <i>Galanthus</i> <sup>110</sup> <i>Leucojum</i> <sup>70</sup> <i>Lycoris</i> <sup>106</sup> <i>Narcissus</i> <sup>90</sup> <i>Zephyranthes</i> <sup>126</sup>
4	lykorinový		lykorin	<i>Ammocharis</i> <sup>91</sup> <i>Brunsvigia</i> <sup>92</sup> <i>Crinum</i> <sup>86</sup> <i>Cyrtanthus</i> <sup>95</sup> <i>Galanthus</i> <sup>107</sup> <i>Hippeastrum</i> <sup>98</sup> <i>Chlidanthus</i> <sup>88</sup> <i>Leucojum</i> <sup>70</sup> <i>Lycoris</i> <sup>108</sup> <i>Narcissus</i> <sup>90</sup> <i>Zephyranthes</i> <sup>126</sup>
5	galanthindolový		galanthindol	<i>Galanthus</i> <sup>107</sup>

6	homolykorinový		homolykorin	<i>Clivia</i> <sup>93</sup> <i>Galanthus</i> <sup>110</sup> <i>Hippeastrum</i> <sup>111</sup> <i>Leucojum</i> <sup>70</sup> <i>Lycoris</i> <sup>108</sup> <i>Narcissus</i> <sup>109</sup>
7	galasinový		galasin	<i>Galanthus</i> <sup>110</sup>
8	montaninový		montanin	<i>Hippeastrum</i> <sup>111</sup> <i>Lycoris</i> <sup>102</sup> <i>Pancreatum</i> <sup>112</sup> <i>Scadoxus</i> <sup>113</sup>
9	kripowellinový		kripowellin A R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> = -CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> - kripowellin B R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =CH <sub>3</sub>	<i>Crinum</i> <sup>114</sup>
10	cheryllinový		cheryllin	<i>Crinum</i> <sup>115</sup> <i>Narcissus</i> <sup>90</sup>
11	buflavinový		buflavin	<i>Boophane</i> <sup>116</sup>
12	plikaminový		plikamin	<i>Galanthus</i> <sup>117</sup>
13	tazettinový		tazettin	<i>Clivia</i> <sup>93</sup> <i>Eucharis</i> <sup>96</sup> <i>Galanthus</i> <sup>85</sup> <i>Hippeastrum</i> <sup>98</sup> <i>Chlidanthus</i> <sup>88</sup> <i>Leucojum</i> <sup>70</sup> <i>Zephyranthes</i> <sup>126</sup>

14	gracilinový		gracilin	<i>Galanthus</i> <sup>100</sup>
15	augustaminový		augustamin	<i>Crinum</i> <sup>86</sup>
16	pankratistatinový		pankratistatin	<i>Boophane</i> <sup>118</sup> <i>Haemanthus</i> <sup>101</sup> <i>Hymenocallis</i> <sup>119</sup> <i>Narcissus</i> <sup>103</sup> <i>Pancratium</i> <sup>120</sup> <i>Zephyranthes</i> <sup>121</sup>
17	gracilaminový		gracilamin	<i>Galanthus</i> <sup>122</sup>
18	mesebranový		mesembrin	<i>Narcissus</i> <sup>79,80</sup>
			joubertiamin	
			skeletin A4	

19	hostasininový		hostasinin A	<i>Lycoris</i> <sup>78</sup>
----	---------------	---	--------------	------------------------------

#### 4.2 Biologická aktivita

Jak již bylo uvedeno v předcházejícím textu, biologická aktivita těchto látek je velice široká. Práce, na které jsem se v rámci mého studia podílela, byla zaměřena na inhibici cholinesteras a propyloligopeptidasy. Z tohoto důvodu budou v této části podrobně rozebrány biologické aktivity Amaryllidaceae alkaloidů, související s jejich potenciálním využitím v terapii AD.

Výzkumu biologické aktivity alkaloidů čeledi Amaryllidaceae je věnováno velké množství prací. Postup je vždy podobný a ne jinak je tomu i v naší laboratoři. Začíná se obvykle přípravou sumárního alkaloidního extraktu a testováním jeho biologické aktivity. Následuje výběr vhodných rostlin pro fytochemické studie na základě výsledků screeningových studií. V rámci fytochemických prací jsou izolovány látky v čistém stavu. Následuje jejich identifikace za využití fyzikálně-chemických metod (především 1D-, 2D-NMR, MS, HiRes-MS apod.). Čisté a identifikované látky jsou poté opět podrobeny biologickým testům. Abychom se vyhnuli izolaci látek, které jsou sice účinné, ale již známé (především galanthamin u inhibice cholinesteras), nebo již byly v naší laboratoři izolovány, screening alkaloidních extraktů na jejich inhibici vůči AChE a BuChE je vždy doprovázen GC-MS analýzou těchto extraktů a identifikací jednotlivých složek. Na základě analýzy všech výsledků (inhibiční aktivita, GC-MS analýza, dostupnost rostlinného materiálu a jeho cena) jsou vybrány rostliny vhodné pro fytochemické studie. V rámci těchto screeningových studií bylo v souvislosti s předloženou dizertační prací studováno 17 různých druhů rostlin této čeledi z hlediska inhibiční aktivity vůči AChE tak BuChE. Výsledky těchto testů jsou shrnuty v následující tabulce s uvedením biologické aktivity alkaloidních extraktů testovaných rostlin (Tabulka 3). Všechny testované extrakty byly podrobeny GC-MS analýzám a pro fytochemické práce byly, na základě zvážení všech experimentálních a literárních údajů, vybrány 2 druhy rostlin čeledi Amaryllidaceae: jmenovitě *Zephyranthes robusta* Baker a *Chlidanthus fragrans* Herb. Důležitou roli při výběru hrála i skutečnost, že jim z hlediska fytochemie nebyla doposud věnována velká pozornost. Pro ilustraci jsou na

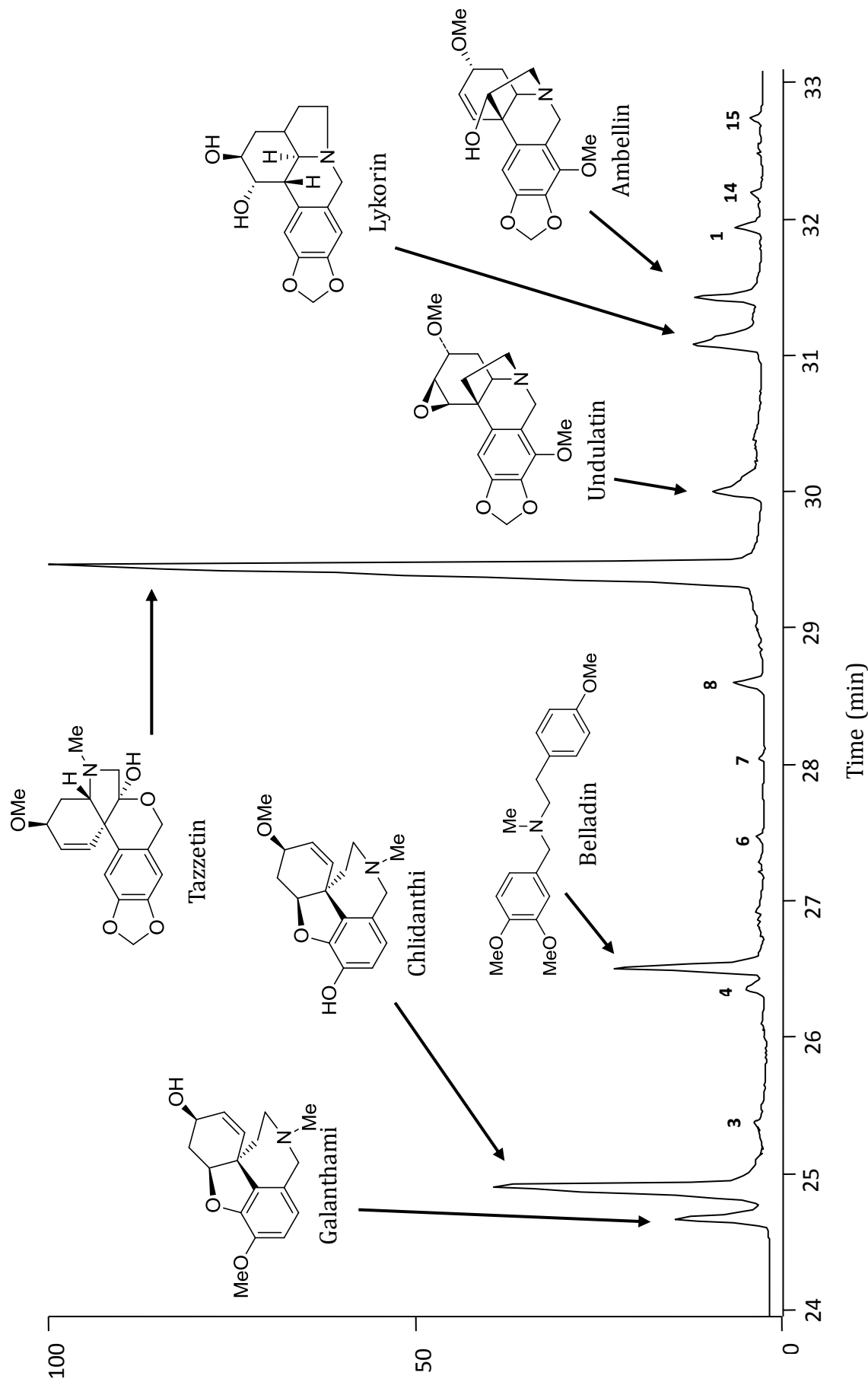
obrázcích (Obrázek 3 a Obrázek 4) uvedeny GC-MS analýzy s identifikací jednotlivých píků u vybraných rostlin pro izolační práce.

**Tabulka 3.** Inhibiční aktivity vybraných alkaloidních extraktů rostlin čeledi Amaryllidaceae vůči lidské erytrocytární acetylcholinesterase (HuAChE) a lidské sérové butyrylcholinesterase (HuBuChE) testovaných v rámci vlastní dizertační práce.

Rostlina	IC <sub>50</sub> , HuAChE (μg.ml <sup>-1</sup> )	IC <sub>50</sub> , HuBuChE (μg.ml <sup>-1</sup> )	Cit.
<i>Chlidanthus fragrans</i> Herb.	20,1 ± 2,9	136,8 ± 6,9	88,89
<i>Narcissus lobularis</i> Schult.	389,5 ± 21,2	280,3 ± 23,1	104
<i>Narcissus nanus</i> Steud.	3,8 ± 0,8	68,0 ± 5,7	104
<i>Narcissus poeticus</i> var. <i>recurvus</i> P. D. Sell	6,0 ± 0,1	23,0 ± 1,0	90
<i>Narcissus pseudonarcissus</i> cv. Sir W. Churchil	23,0 ± 5,2	41,3 ± 6,4	104
<i>Narcissus pseudonarcissus</i> cv. W. P. Milner	2,7 ± 0,5	23,1 ± 2,1	104
<i>Nerine bowdenii</i> Watson	87,9 ± 3,5	14,8 ± 1,1	123
<i>Nerine filamentosa</i> W. F. Barker	21,6 ± 1,1	13,0 ± 0,7	90
<i>Nerine filifolia</i> Baker	18,5 ± 0,8	58,6 ± 1,3	90
<i>Nerine undulata</i> Herb.	14,3 ± 1,2	33,9 ± 1,9	113
<i>Scadoxus multiflorus</i> Raf.	315,5 ± 10,5	54,3 ± 3,1	113
<i>Sprekelia formosissima</i> Herb.	209,7 ± 5,6	> 500	113
<i>Sternbergia lutea</i> Ker Gawl.	469,8 ± 5,2	3,7 ± 0,1	90
<i>Zephyranthes candida</i> Herb.	216,1 ± 8,9	8,9 ± 0,9	124
<i>Zephyranthes citrina</i> Baker	106,8 ± 6,5	104,2 ± 7,5	124
<i>Zephyranthes grandiflora</i> Lindl.	39,2 ± 3,0	356,0 ± 9,3	125
<i>Zephyranthes robusta</i> Baker	35,9 ± 3,5	190,9 ± 8,2	126,127
IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> Galanthamin <sup>b</sup>	1,71 ± 0,06	42,3 ± 1,3	104
IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> Huperzin A <sup>b</sup>	0,03 ± 0,00	> 500	104

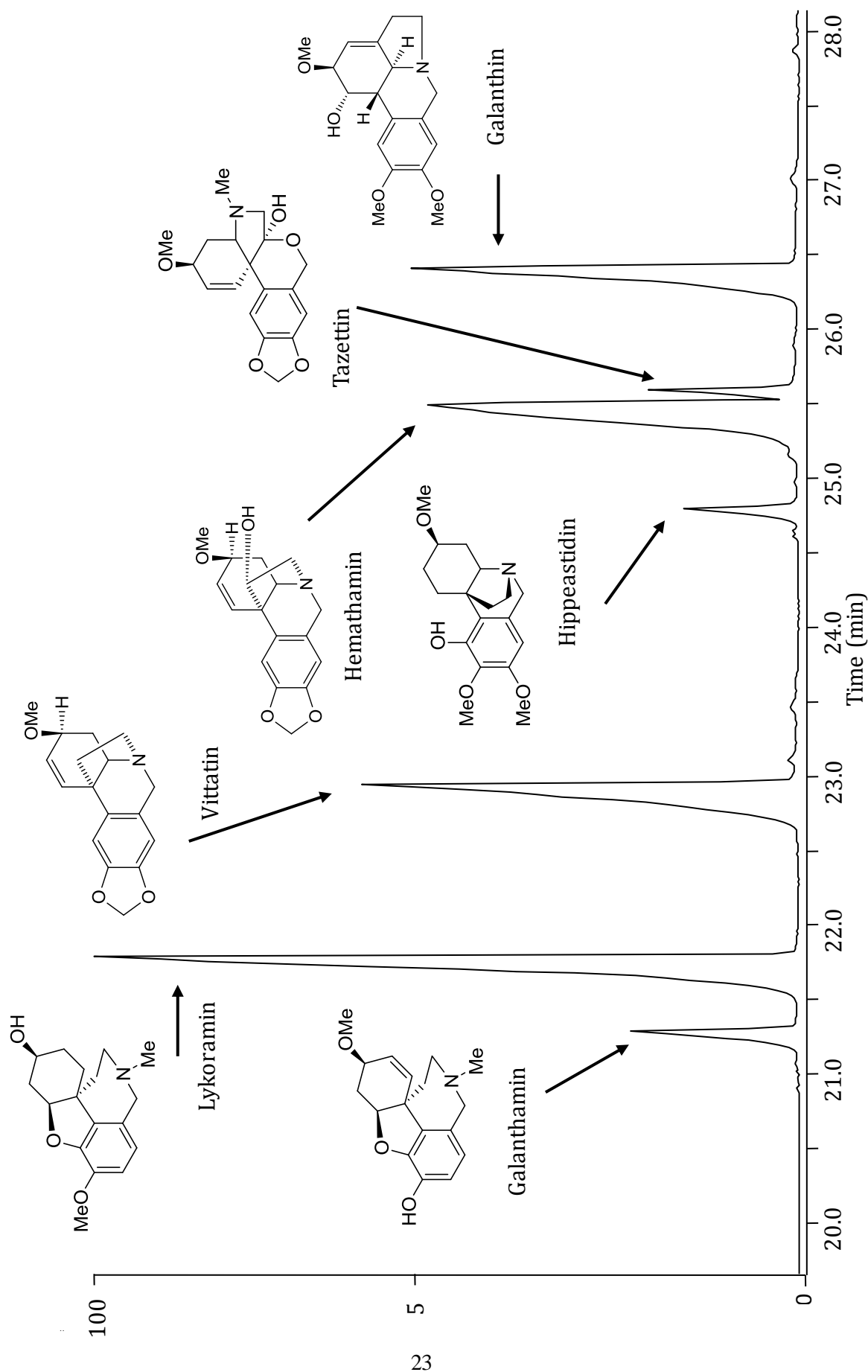
<sup>a</sup>(μM), <sup>b</sup> Referenční látka

# GC/MS alkaloidní frakce *Chlidanthus fragrans*



Obrázek 3. GC-MS analýza alkaloidního extraktu z cibulí rostliny *Chlidanthus fragrans*.

# GC/MS alkaloidní frakce *Zephyranthes robusta*



**Obrázek 4.** GC-MS analýza alkaloidního extraktu z cibule rostliny *Zephyranthes robusta*.



#### **4.2.1 Inhibice cholinesteras**

Uvedení galanthaminu na trh znamenalo pro pacienty významný posun v léčbě AD. Tato látka byla na trh uvedena v roce 2001 pod názvem Reminyl<sup>3</sup>. Galanthamin je selektivním inhibitorem AChE, vůči BuChE nevykazuje příliš velké inhibiční účinky. Vedle inhibice AChE navíc allostericky moduluje některé formy nikotinových receptorů, čímž potencuje cholinergní transmissi. Od zavedení této látky do praxe je věnována vědeckou komunitou zvýšená pozornost i dalším alkaloidům čeledi Amaryllidaceae. Byla izolována řada látek, které byly podrobeny biologickým testům a u některých byly připraveny a testovány i polosyntetické deriváty.

Ve velké části publikovaných studií, byly k biologickému testování použity enzymy nehumánního původu. V případě AChE je používána především komerčně dostupná AChE z elektrického úhoře, nebo izolovaná z myších mozků. BuChE je nejčastěji používaná také komerčně dostupná a to z koňského séra<sup>68,128</sup>. V naší laboratoři jsou v rámci studií využívány lidské enzymy (erytrocytární AChE a sérová BuChE)<sup>89,123,126,127,129</sup>, z důvodu získání co možná nejvyšší vypovídací hodnoty o schopnosti inhibice cholinesteras testovaných látek. Tyto enzymy jsou připravovány přímo na našem pracovišti z krve dobrovolných dárců. Z literatury je patrné, že i výsledky inhibiční aktivity galanthaminu se liší při použití AChE z elektrického úhoře v porovnání s lidským enzymem<sup>68,126</sup>.

Ačkoli Amaryllidaceae alkaloidy mají mnoho zástupců strukturních typů, schopnost inhibice cholinesteras je v literatuře spojována především s galanthaminovým a lykorinovým strukturním typem. Jak bylo zmíněno výše, galanthamin byl poprvé izolován z *Galanthus woronowii* Losinsk. v roce 1952 a později z mnoha dalších rostlin a rodů čeledi Amaryllidaceae. Současně byl izolován z rostlin jiných čeledí, zde ale jeho obsah nepřekračuje 0,01%<sup>130</sup>.

Galanthamin je terciární alkaloid a pro jeho vazebné schopnosti k AChE nacházíme v molekule čtyři klíčová místa - hydroxylová skupina cyklohexenového kruhu, cyklohexenový kruh, terciární aminoskupina a methoxyskupina. Změnou různých aspektů na těchto klíčových místech je možno modulovat účinek molekuly, či pozorovat změnu u jiných alkaloidů téhož strukturního typu<sup>130</sup>.

Obměnou methoxyskupiny a terciární aminoskupiny lze připravit deriváty s mnohem vyšší inhibiční aktivitou. Bohužel, polarita těchto molekul často neumožňuje průnik přes hematocefalickou bariérou (HEB) a tudíž jejich potenciální využitelnost v léčbě neurodegenerativních chorob není vysoká. Vliv záměny methoxyskupiny je dobře

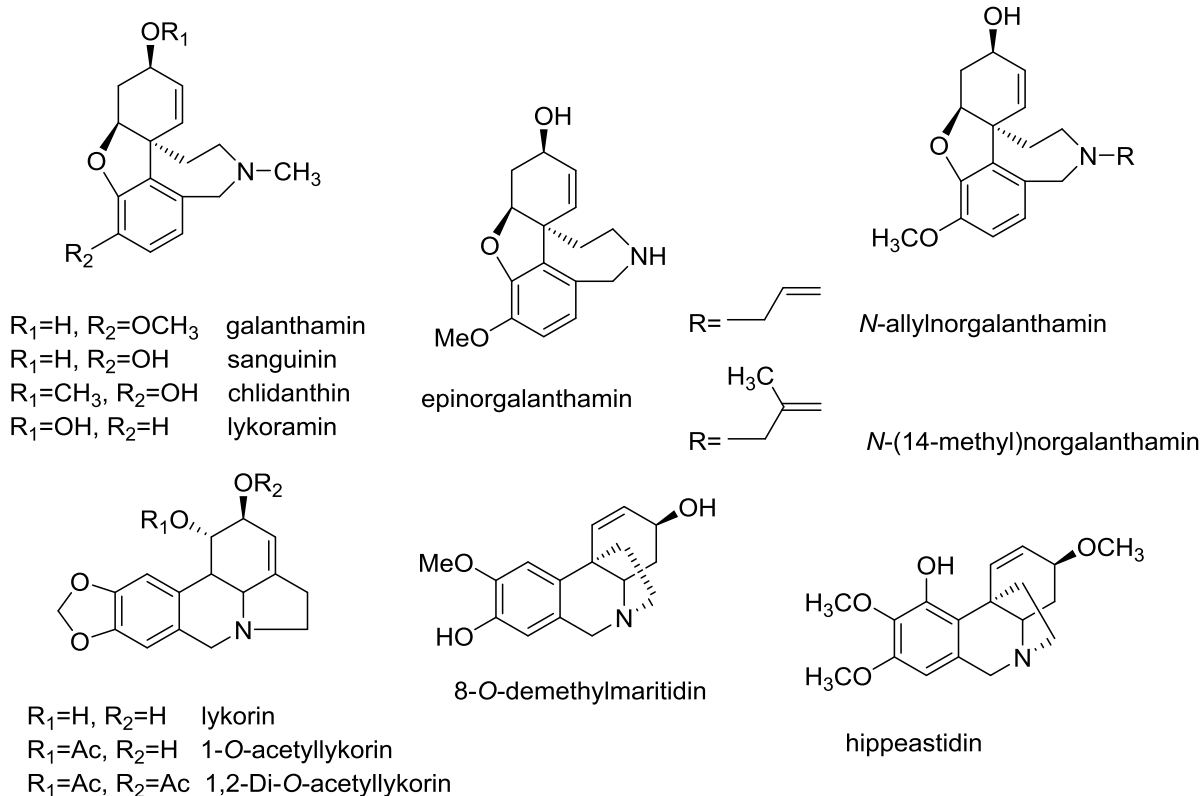
pozorovatelný u jiného alkaloidu galanthaminového typu – sanguininu, izolovaného např. z *Leucojum aestivum*<sup>131</sup>. V molekule nacházíme místo methoxyskupiny hydroxyskupinu. Jeho inhibiční aktivita je 10 krát vyšší v porovnání s galanthaminem<sup>68</sup>. Podobný jev jako u sanguininu, můžeme pozorovat u některých *N*-derivátů galanthaminu, kdy je methylskupina dusíku nahrazena allylem např. *N*-allylnorgalanthamin, *N*-(14-methylallyl)-norgalanthamin<sup>132</sup>. Tyto alkaloidy byly prozatím izolovány pouze z *Leucojum aestivum*<sup>126</sup> a v případě *N*-allylnorgalanthaminu i z *Lycoris Guangxiensis*<sup>133</sup>. Jejich schopnost inhibice AChE je až 5 krát vyšší nežli galanthaminu. Nevýhodou těchto látek a uvedeného sanguininu je, vedle jejich nižšího distribučního koeficientu, také nízká dostupnost v biologickém materiálu ve srovnání s galanthaminem.

Druhým důležitým místem pro vazbu galanthaminu je terciární aminoskupina. Epinorgalanthamin, který terciární aminoskupinu zcela postrádá, vykazuje až 10 krát nižší inhibiční aktivitu<sup>68</sup>. Jako potenciaálně slibné molekuly, v oblasti semisyntetických derivátů přírodních látek, se prozatím ukazují některé *N*-substituované deriváty galanthaminu, kde je nadějným zástupcem *N*-butylkarbamát galanthaminu. Jeho toxicita je nižší, než toxicita galanthaminu, prochází hematocefalickou bariérou a navíc *in vitro* testy na inhibici AChE prokázaly aktivitu v hodnotě 85% inhibice galanthaminu<sup>134</sup>. Další alkaloidy galanthaminového typu potvrzují důležitost výše zmíněných klíčových míst galanthaminového skeletu. Lykoramin i epinorlykoramin postrádají dvojnou vazbu cyklohexenového kruhu, což pravděpodobně také způsobuje ztrátu jejich inhibiční aktivity.

Za zajímavou látku byl z pohledu inhibice AChE považován chlidanthin. V předcházejících fytochemických studiích byl identifikován pomocí GC-MS v cibulích v rostlině *Zephyranthes concolor*<sup>135</sup>, z níž byl také v roce 2011 izolován a detailně popsán z pohledu jeho struktury, absolutní konfigurace a inhibice vůči AChE (elektrický úhoř)<sup>136</sup>. V našich studiích byl identifikován pomocí GC-MS metody v cibulích *Chlidanthus fragrans*<sup>88</sup>. Z této rostliny byl následně i izolován společně s dalšími deseti alkaloidy<sup>89</sup>. Tato látka je polohovým izomerem galanthaminu, v němž jsou vzájemně zaměněny pozice hydroxy- a methoxyskupiny. Bohužel jak naše, tak i studie autorů z roku 2011 shodně ukázaly výrazně nižší schopnost inhibice AChE této látky ve srovnání s galanthaminem<sup>88,135</sup>.

Druhou strukturální skupinou těchto alkaloidů, které prokázaly jistou aktivitu vůči cholinesterasám, jsou alkaloidy lykorinového typu. Je popsáno, že klíčovou roli tohoto strukturálního typu hraje derivatizace na atomech C-1 a C-2, které určují prostorové uspořádání molekuly. Lykorin má na těchto místech hydroxyskupiny a sám o sobě inhibiční aktivitu nevykazuje, ale jeho 1-*O*-acetylderivát je podle literárních údajů 2 krát aktivnější než

galanthamin<sup>128</sup>. V případě acetylace v poloze C-2, stejně jako u dvojnásobné acetylace v polohách C-1 a C-2, dochází ke ztrátě aktivity. Na základě těchto studií, je považována poloha C-1 u lykorinového strukturního typu za důležitou v otázce schopnosti inhibice AChE těchto látek<sup>68,128</sup>. To bylo potvrzeno i přípravou celé řady polosyntetických analog lykorinu<sup>68,137</sup>.



**Obrázek 5.** Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae s inhibiční aktivitou vůči AChE.

Ostatní strukturní typy nevykazují podle literárních údajů významnou aktivitu vůči cholinesterasám. Krininový typ je v některé literatuře dělen na krinanový (resp.  $\alpha$ -krinanový) a hemanthaminový (resp.  $\beta$ -krinanový) podle prostorové orientace 5,10b-ethanového můstku<sup>128</sup>. V inhibiční aktivitě molekul by tento jev neměl hrát roli<sup>126,138</sup>. V naší laboratoři se ale oproti těmto tvrzením podařilo izolovat alkaloidy tohoto strukturního typu se zajímavou, dosud nepopsanou inhibiční aktivitou. Jedná se o 8-O-demethylmaritidin a hippeastidin izolované z cibulí *Zephyranthes robusta*<sup>126</sup>. Další látkou tohoto strukturního typu je undulatin, který byl izolován z cibulí *Chlidanthus fragrans* a vykázal, společně s 8-O-demethylmaritidinem, zajímavou inhibiční aktivitu vůči AChE, která byla sice asi 10 nižší než u galanthaminu, ale ukázalo se, že i tato strukturní skupina alkaloidů je do jisté míry schopna inhibice AChE<sup>89</sup>. Inhibiční aktivity a struktury látek zmíněných v předcházejícím

textu, jsou uvedeny na následujícím obrázku (Obrázek 5) a v tabulce (Tabulka 4). Ostatní izolované a testované látky z rostlin *Zephyranthes robusta* a *Chlidanthus fragrans* (vyjma galanthaminu, který je již využíván v terapii AD) bohužel nevykázaly takovou aktivitu vůči AChE, aby mohly být považovány za potenciálně využitelné v terapii AD či dalších neurodegenerativních onemocnění<sup>89,126</sup>.

Ačkoli inhibice BuChE se zdá být žádanou aktivitou těchto látek, byla testována zatím u malého množství alkaloidů čeledi Amaryllidaceae a tyto studie vycházejí pouze z naší laboratoře<sup>89,126</sup>. Prozatím není možné formulovat vztah mezi strukturou molekuly a její schopností inhibice BuChE, především z důvodu, že se nám zatím nepodařilo izolovat látku z těchto rostlin, která by se vyznačovala výraznou schopností inhibice BuChE i když některé alkaloidní extrakty těchto rostlin vykazovaly velmi slibnou inhibiční aktivitu vůči tomuto enzymu. V literatuře je možno dohledat práce zabývající se inhibiční aktivitou alkaloidů vůči BuChE, vždy se ale jednalo o jiné strukturální typy (především steroidního strukturálního typu z čeledi Buxaceae) a všechny testy byly provedeny na komerčně dostupné BuChE z koňského séra<sup>139,140,141</sup>.

**Tabulka 4.** Inhibiční aktivity vybraných alkaloidů vůči cholinesterázám.

Alkaloid	Strukturální typ	IC <sub>50</sub> AChE (μM)	IC <sub>50</sub> BuChE (μM)	Cit.
sanguinin	galanthaminový	0,10 ± 0,01	-	68
galanthamin*	galanthaminový	1,07 ± 0,18	43,3 ± 1,3	68,126
11-hydroxygalanthamin	galanthaminový	1,61 ± 0,21	-	68
<i>N</i> -allylnorgalanthamin	galanthaminový	0,18	-	132
<i>N</i> -(14-methylallyl)-norgalanthamin	galanthaminový	0,16	-	132
chlidanthin*	galanthaminový	147 ± 6	422 ± 15	89
epinorlykoramin	galanthaminový	> 500	-	68
lykoramin	galanthaminový	> 500	> 500	68,126
lykorin*	lykorinový	> 500	neaktivní	68,89,126
1- <i>O</i> -acetylylorin	lykorinový	0,96 ± 0,04	-	128
1,2-di- <i>O</i> -acetylylorin	lykorinový	211 ± 10	-	128
2- <i>O</i> -acetylylorin	lykorinový	> 500	-	128
8- <i>O</i> -demethylmaritidin*	krininový	28,0 ± 0,9	neaktivní	126
hippeastidin*	krininový	99,7±4,1	900,0±35,0	126
undulatin*	krininový	23,0 ± 1,0	neaktivní	89

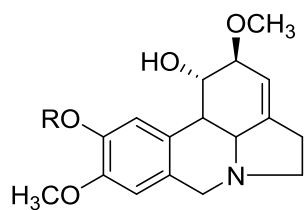
\* izolace v naší laboratoři v rámci řešené dizertační práce

#### **4.2.2 Inhibice propyloligopeptidasy**

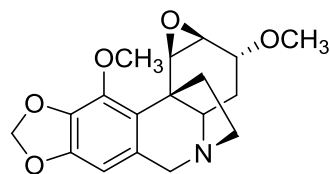
Zajímavým terapeutickým cílem a pomocnou léčbou u pacientů s AD by mohla být inhibice propyloligopeptidasy (POP). POP je cytosolová serinová peptidasa, která štěpí malé peptidy obsahující aminokyselinu prolin. Štěpení probíhá na karboxy-konci prolinových zbytků. Substráty tohoto enzymu jsou například substance P, vazopresin, či některé neuropeptidy. Právě ty jsou známy svou funkcí modulátorů kognitivních funkcí a jejich degradace prostřednictvím POP může urychlovat proces stárnutí a případně hrát roli při neurodegenerativních onemocněních<sup>142</sup>.

V posledních letech inhibice POP přitahuje pozornost při terapii schizofrenie, bipolární afektivní poruchy, či kognitivních poruch. Právě ty se vyskytují u pacientů trpících AD. Některé inhibitory POP se ukázaly efektivními léčivy demencí<sup>143</sup>, a tudíž by mohla být inhibice POP využita jako podpůrná léčba v terapii AD.

Ve spolupráci s Centrem pokročilých studií Fakulty vojenského lékařství v Hradci Králové, Univerzity obrany v Brně byly testovány alkaloidy izolované z *Chlidanthus fragrans*. Zajímavou látkou pro tento typ aktivity se prozatím jeví undulatin ( $IC_{50} = 1,96 \pm 0,12$  mM), (Obrázek 6) který jako jediný z testovaných látek vykázal relativně dobrou aktivitu blízcí se aktivitě použitého standardu baikalinu ( $IC_{50} = 0,61 \pm 0,02$  mM). Terapeuticky užívaný galanthamin tuto aktivitu postrádá<sup>89</sup>. Poslední látky, které byly nejnověji testovány, jsou galanthin a 9-*O*-demethylgalanthin (Obrázek 6), obě izolované z cibulí *Zephyranthes robusta*. Tyto látky v biologických testech na jejich inhibiční schopnost vůči cholinesterasám byly zcela neaktivní ( $IC_{50, AChE, BuChE} > 500$   $\mu$ M), ale v testech vůči POP ( $IC_{50; galanthin} = 1,49 \pm 0,14$  mM;  $IC_{50; 9-O-demethylgalanthin} = 0,15 \pm 0,02$  mM) vykázaly zajímavou aktivitu, především 9-*O*-demethylgalanthin, který byl 4 krát aktivnější inhibitor POP než použitý standard baikalin<sup>129</sup>. Pro formulaci určitého závěru, který strukturní typ těchto látek či strukturní detail molekuly je odpovědný za tuto schopnost, je potřeba otestovat širší spektrum látek. V současnosti jsou ve fázi studií zbývající alkaloidy izolované ze *Zephyranthes robusta* a alkaloidy izolované z dalších rostlin čeledi Amaryllidaceae, kterým je z fytochemického hlediska věnována pozornost na katedře farmaceutické botaniky a ekologie. Jedná se o rostliny *Nerine bowdenii* a *Narcissus pseudonarcissus* cv. Pink Parasol.



R=OCH<sub>3</sub> galanthin  
R=OH 9-O-demethylgalanthin



undulatin

**Obrázek 6.** Alkaloidy izolované z čeledi Amaryllidaceae s inhibiční aktivitou vůči POP.

## 5. ZÁVĚR

Přírodní látky jsou skupinou velmi složitou už proto, že jejich zdrojem je živý organismus. V živých organismech jsou vztahy mezi jednotlivými látkami a ději velmi komplikované a dovolují si říct, že doposud odhalené jen z velmi malé části. Biologická aktivita zkoumána izolovaně bez vztahu k ostatním podmínkám, látkám a aktivitám v organismu je sice velmi důležitým a přínosným zjištěním, slouží ale jen jako jakýsi odrazový můstek pro zjištění charakteru dané látky, která má být nějakým způsobem terapeuticky prospěšná. Je proto důležité stanovit aktivitu v různých oblastech a možné účinky propojit, aby terapeutický užitek mohl být co největší.

Jak již bylo uvedeno, alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jsou strukturně jedinečné a biologicky velmi zajímavé látky. Při svém studiu jsem se zabývala především jejich inhibiční aktivitou vůči lidským cholinesterasám. Tato aktivita, jakkoli se může zdát již prozkoumána a vyčerpána, je velmi důležitá především pro klinické použití při léčbě AD. Především je potřeba rozšířit portfolio látek, které budou otestovány na inhibici BuChE (a tím najít látky s duální aktivitou), a také tyto látky testovat na další biologické aktivity související s neurodegenerativními chorobami. V souvislosti s tímto faktem byly některé izolované látky testovány v rámci spolupráce na jejich inhibiční aktivitu vůči POP. Vzhledem k izolaci některých látek v dostatečném množství, které umožňuje přípravu polosyntetických derivátů je zde další možnost, jak rozšířit portfolio testovaných látek. V případě lykorinu již tyto deriváty byly připraveny a testovány a některé z nich se vyznačovaly zajímavou aktivitou vůči BuChE<sup>144</sup>. V nejbližší době se na katedře farmaceutické botaniky a ekologie plánuje zavedení biologických testů, které by mohly být potenciálně využitelné v terapii AD. Jedná se především o inhibici enzymu GSK-3 $\beta$ , který se uplatňuje v procesu hyperfosforylace  $\tau$ -proteinu a má za následek destabilizaci mikrotubulů, následně tvorbu neurofibrilárních klubek a v konečné fázi apoptózu neuronu<sup>145,146,147,148</sup>. Dále se uvažuje i o zavedení inhibice vůči BACE-1, která má za následek tvorbu alzheimerovských plak, která jsou místem další toxicity a neurodegenerace<sup>149,150,151,152</sup>. O těchto biologických aktivitách alkaloidů čeledi Amaryllidaceae není v literatuře prozatím nic známo.

Vzhledem ke skutečnosti, že tato práce byla z biologického hlediska věnována testům souvisejícím s AD, by byla škoda se alespoň závěrem nezmínit o další biologické aktivitě, kterou se vyznačují tyto alkaloidy. Jedná se o protinádorovou aktivitu indukci apoptózy. Velkou výhodou těchto látek je značná selektivita k nádorovým buňkám a nízká toxicita k buňkám zdravým a klidovým<sup>153</sup>. Tato biologická aktivita, stejně jako v případě inhibice

AChE, je spojena s určitým strukturním typem těchto látek. V tomto případě nejzajímavějšími látkami jsou lykorin (lykorinový typ) a pankratistatin (pankratistatinový typ), jejichž protinádorová aktivita byla prokázána na celé řadě buněčných linií<sup>153</sup>. Ve spolupráci s Katedrou biologických a biochemických věd, Fakulty chemicko-technologické, Univerzity Pardubice byl objasněn mechanismus účinku u alkaloidů haemanthaminu a haemanthidinu v případě T-lymfoblastové leukemie Jurkat, které byly izolovány v rámci této dizertační práce z cibulí *Zephyranthes robusta*. Bylo zjištěno, že dochází k významnému úbytku buněk v S fázi a jejich hromadění v G1 fázi buněčného cyklu. Buňky se nejsou schopné dostat přes vlastní replikaci DNA<sup>154</sup>.

Z uvedených a diskutovaných důvodů alkaloidy čeledi Amaryllidaceae do budoucna určitě zůstanou zajímavým tématem, kde je dostatečný prostor pro další vědeckou práci i když se někdy objevují názory, že tyto látky již byly dostatečně prozkoumány.



## 6. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: **Mgr. Andrea Krejčí, roz. Kulhánková**

Školitel: **Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.**

Název disertační práce: **Alkaloidy vybraných druhů čeledi Amaryllidaceae, jejich toxicita a biologická aktivita (in vitro studie) I.**

Klíčková slova: AD, Amaryllidaceae, AChE, BuChE, POP, *Zephyranthes robusta*, *Chlidanthus fragrans*.

Cibule rostlin *Zephyranthes robusta* a *Chlidanthus fragrans* byly vybrány pro fytochemické práce na základě rozsáhlé bio-guided studie za využití spektrofotometrické Ellmanovy metody a GC-MS analýz alkaloidních extraktů jako zdroj biologicky aktivních Amaryllidaceae alkaloidů. Cibule byly extrahovány ethanolem a sumární extrakt byl separován pomocí sloupcové chromatografie za využití Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> jako stacionární fáze a stupňovité eluce chloroform – ethanol. Sloupcová chromatografie, preparativní TLC a krystalizace vedly k izolaci čistých látek. Chemická struktura těchto látek byla určena na základě MS a 1D- a 2D-NMR analýz.

Z čerstvých cibulí *Chlidanthus fragrans* bylo izolováno 11 alkaloidů, z nichž deoxypretazzetin, belladin, 3-epimakronin, ismin, undulatin, buphanisin a ambellin byly z rodu *Chlidanthus* izolovány poprvé. Látky byly testovány na schopnost inhibovat lidskou AChE, BuChE a POP. Z cibulí *Zephyranthes robusta* bylo izolováno 14 alkaloidů různých strukturních typů. Galanthamin, 3-epimakronin, hippeastidin, lykoramin, galanthin, tazettin, vittatin, 11-hydroxyvittatin, hammayn, 8-*O*-demethylmaritidin a 9-*O*-demethylgalanthin byly izolovány poprvé z tohoto druhu, alkaloidy 3-epimakronin, hippeastidin, 8-*O*-demethylmaritidin a 9-*O*-demethylgalanthin byly získány poprvé z rodu *Zephyranthes*. Látky

byly testovány na jejich schopnost inhibice lidské AChE a BuChE, 9-*O*-demethylgalanthin také na inhibici POP.

Cholinesterázová inhibiční aktivita byla stanovena *in vitro* spektrofotometrickou modifikovanou Ellmanovou metodou. Inhibice POP byla stanovena za využití *Z*-Gly-Pro-*p*-nitroanilidu jako substrátu. Z testovaných látek je možné za zajímavé považovat vedle galanthaminu, který je již v terapii AD využíván, undulatin, 8-*O*-demethylmaritidin, galanthin a 9-*O*-demethylgalanthin. Undulatin, alkaloid krininového strukturního typu, inhiboval AChE v koncentraci  $IC_{50} = 23,2 \pm 1,1 \mu\text{M}$  a 8-*O*-demethylmaritidin, alkaloid stejného strukturního typu, v koncentraci  $IC_{50} = 28,8 \pm 0,9 \mu\text{M}$ . Bohužel, žádný z testovaných alkaloidů nevykazoval zajímavou aktivitu vůči BuChE. Slibné výsledky byly zaznamenány v případě inhibice POP. Neaktivnější byly undulatin ( $IC_{50} = 1,96 \pm 0,12 \text{ mM}$ ) a dva alkaloidy lykorinového strukturního typu: galanthin ( $IC_{50} = 1,49 \pm 0,14 \text{ mM}$ ) a 9-*O*-demethylgalanthin ( $IC_{50} = 0,15 \pm 0,02 \text{ mM}$ ), který vykázal 4x vyšší inhibici, než použitý standard baicalin ( $IC_{50} = 0,61 \pm 0,021 \text{ mM}$ ).

## 7. ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: **Mgr. Andrea Krejčí, née Kulhánková**

Supervisor: **Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.**

Title of Doctoral Thesis: **Alkaloids from selected species of Amaryllidaceae family, their toxicity and biological activity (*in vitro* study) I.**

Keywords: AD, Amaryllidaceae, AChE, BuChE, POP, *Zephyranthes robusta*, *Chlidanthus fragrans*.

*Zephyranthes robusta* and *Chlidanthus fragrans* bulbs were chosen for phytochemical study as biologically active Amaryllidaceae alkaloids source, based on bio-guided study using spectrophotometric Ellman's method and GC-MS analysis of alkaloid extracts. Bulbs were extracted with ethanol and the summary extract was fractionated by column chromatography with the use of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> as a stationary phase and gradient elution chloroform – ethanol. Column chromatography, preparative TLC and crystallisation led to isolation of pure compounds the chemical structure of which was elucidated by MS and D1- and D2-NMR analyses.

From fresh bulbs of *Chlidanthus fragrans* 11 alkaloids were isolated of which deoxypretazzetine, belladine, 3-epimakronine, ismine, undulatine, buphanisine and ambelline were reported for the first time from the genus *Chlidanthus*. Compounds were evaluated for their human AChE, BuChE and POP inhibitory activity. From *Zephyranthes robusta* bulbs 14 alkaloids of several structural types were isolated. Galanthamine, 3-epimakronine, hippeastidine, lykoramine, galanthine, tazettine, vittatine, 11-hydroxyvittatine, hammayne, 8-*O*-demethylmaritidine and 9-*O*-demethylgalanthine were reported for the first time from this species and alkaloids 3-epimakronine, hippeastidine, 8-*O*-demethylmaritidine and 9-*O*-demethylgalanthine were isolated for the first time from the genus *Zephyranthes*. All

compounds were tested for their human AChE and BuChE inhibitory activity, with 9-*O*-demethylgalanthine there was also determined POP inhibitory activity.

The cholinesterase inhibitory activity was determined by *in vitro* spectrophotometric modified Ellman's method. Inhibition of POP was determined with the use of Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilide as a substrate. Besides galanthamine which is already used in therapy of AD undulatine, 8-*O*-demethylmaritidine, galanthine and 9-*O*-demethylgalanthine were considered as promising among the tested compounds. Undulatine – an crinine type alkaloid – inhibited AChE in concentration of  $IC_{50} = 23.2 \pm 1.1 \mu\text{M}$ , 8-*O*-demethylmaritidine – alkaloid of the same structural type – in concentration of  $IC_{50} = 28.8 \pm 0.9 \mu\text{M}$ . Unfortunately none of the tested alkaloids showed significant inhibition of BuChE. Promising activities were, however, achieved in the inhibition of POP study. The most active were undulatine ( $IC_{50} = 1.96 \pm 0.12 \text{ mM}$ ) together with two alkaloids of lycorine structural type: galanthine ( $IC_{50} = 1.49 \pm 0.14 \text{ mM}$ ) and 9-*O*-demethylgalanthine ( $IC_{50} = 0.15 \pm 0.02 \text{ mM}$ ), which showed 4 times higher activity compared to used standard baicaline ( $IC_{50} = 0.61 \pm 0.021 \text{ mM}$ ).

## **8. PŘEHLED PUBLIKACÍ AUTORKY**

### **8.1 Tématické práce předkladatelky**

- Cit. 89 Cahlíková L, Hrabínová M, Kulhánková A, Benešová N, Chlebek J, Jun D, Novák Z, Macáková K, Kuneš J, Opletal L. Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities. *Nat. Prod. Commun.* **2013**, 8, 1541-1544.
- Cit. 123 Cahlíková L, Zavadil S, Macáková K, Valterová I, Kulhánková A, Hošťálková A, Kuneš J, Opletal L. Isolation and cholinesterase activity of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii*. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, 6, 1827-1830.
- Cit. 126 Kulhánková A, Cahlíková L, Novák Z, Macáková K, Kuneš J, Opletal L. Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase- and butyrylcholinesterase-inhibitory activity. *Chem. Biodiv.* **2013**, 10, 1120-1127.
- Cit. 127 Cahlíková L, Kulhánková A, Urbanová K, Valterová I, Macáková K, Kuneš J. Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes robusta* by GC-MS and their cholinesterase activity. *Nat. Prod. Commun.* **2010**, 5, 1201-1204.
- Cit. 129 Šafratová M, Novák Z, Kulhánková A, Kuneš J, Hrabínová M, Jun D, Macáková K, Opletal L, Cahlíková L. Revised NMR data for 9-*O*-Demethylgalanthine: an alkaloid from *Zephyranthes robusta* (Amaryllidaceae) and its biological activity. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, 9, 787-788.

### **8.2 Další práce experimentálního charakteru**

Cahlíková L, Opletal L, Kurfürst M, Macáková K, Kulhánková A, Hošťálková A. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Chelidonium majus* (Papaveraceae). *Nat. Prod. Commun.* **2010**, 5, 1751-1754.

### **8.3 Přehledové práce**

Cahlíková L, Macáková K, Chlebek J, Hošťálková A, Kulhánková A, Opletal L. Ecdysterone and its activity on some degenerative diseases. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, 6, 707-718.

### **8.4 Abstraktra z konferencí**

Kulhánková A, Cahlíková L, Opletal L, Chlebek J, Valterová I. Alkaloidy rostliny *Zephyranthes robusta* a jejich aktivita vůči lidským cholinesterázám. Sborník abstraktů přednášek a plakátových sdělení, XXXIX. Konference Syntéza a analýza léčiv, Modra, Slovensko, 2. – 4. 9. 2010, str. 15, 24 s.

Kulhánková A, Cahlíková L, Macáková K, Kuneš M, Opletal L. Plant biologically active metabolites from Amaryllidaceae family and their cholinesterases and antioxidant activity. 1. Postgraduální vědecká konference FaF UK, 1-2. 2. 2011. *Folia Pharm.* XL-XLI, **2013**, 56-57.

Kulhánková A, Cahlíková L, Macáková K, Opletal L. Biologicky aktivní metabolity rostlin čeledi Amaryllidaceae, jejich cholinesterázová a antioxidační aktivita. XI. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků, 24-26. 5. 2011, Ždár nad Sázavou, *Chem. listy* **2011**, 105, 405-406.

Kulhánková A, Cahlíková L, Macáková K, Kuneš J, Opletal L. Plant biologically active metabolites from Amaryllidaceae family and their neuroprotective activity. 2. Postgraduální vědecká konference FaF UK, 31.1-1. 2. 2012. *Folia Pharm.* XLII, **2014**, s. 58-59.

## 9. LITERATURA

- 
- <sup>1</sup> Opletal L. Prolegomenon české farmakognozie: 21. století. *Česk. Slov. Farm.* **2013**, *62*, 99-102.
- <sup>2</sup> Park SY. Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources. *Arch. Pharmac. Res.* **2010**, *33*, 1589-1609.
- <sup>3</sup> Jiráček J. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klin. Farm. Farmac.* **2004**, *18*, 212-214.
- <sup>4</sup> Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch. Neurol.* **2003**, *60*, 1119-1122.
- <sup>5</sup> Wimo A, Wimblad B, Stoffler A, Wirth Y, Mobius HJ. The magnitude of dementia – occurrence in the world. *Alz. Dis. Assoc. Disor.* **2003**, *17*, 63-67.
- <sup>6</sup> Cahlíková L, Macáková K, Benešová N, Chlebek J, Hošťálková N, Opletal L. Natural compounds (small molecules) as potential and real drugs of Alzheimer's disease: a critical review. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2014**, *42*, 153-194.
- <sup>7</sup> Robbins TW, McAlonan G, Muir JL, Everitt BJ. Cognitive enhancers in theory and practice. *Behav. Brain Res.* **1997**, *83*, 15-23.
- <sup>8</sup> Selkoe DJ. The cell biology of  $\beta$ -amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell. Biol.* **1998**, *8*, 447-453.
- <sup>9</sup> Hernández F, Avila J. Tauopathies. *Cell Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 2219-2233.
- <sup>10</sup> Hardy J, Selkoe J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **2002**, *297*, 353-356.
- <sup>11</sup> Facheris M, Beretta S, Ferrarese C. Peripheral markers of oxidative stress and excitotoxicity in neurodegenerative disorders: tools for diagnosis and therapy? *J. Alzheimer. Dis.* **2004**, *6*, 177-184.
- <sup>12</sup> Lipton, SA. Pathologically-activated therapeutics for neuroprotection: mechanism of NMDA receptor block by memantine and S-nitrosylation. *Curr. Drug Targets* **2007**, *8*, 621-632.
- <sup>13</sup> Terry AV, Buccafusco JJ. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease – related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J. Pharmacol.* **2003**, *306*, 821-827.
- <sup>14</sup> Bowen DM, Neurotransmitters in Alzheimer's disease. *Age* **1988**, *11*, 104-109.
- <sup>15</sup> Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Appl. Neurobiol.* **1978**, *4*, 273-277.
- <sup>16</sup> Sorbera LA, Bozzo J, Serradell N, Alzheimer's disease one century later: The search for effective therapeutic targets continues. *Drugs Fut.* **2007**, *32*, 625-641.
- <sup>17</sup> Summers WK, Majovski LV, Marsh GM, Tachiki K, Kling AN. Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia, Alzheimer type. *Eng. J. Med.* **1986**, *315*, 1241-1245.
- <sup>18</sup> Heinrich M. Galanthamine from *Galanthus* and other Amaryllidaceae – chemistry and biology based on traditional use. *Alkaloids* **2010**, *68*, 157-165.
- <sup>19</sup> <http://portal.faf.cuni.cz/Groups/ADINACO/>
- <sup>20</sup> Lincová D., Farghali H. Základní a aplikovaná farmakologie. 2. vyd. Galén, Praha **2007**, 672 s.
- <sup>21</sup> Biesold D, Inanami O, Sato A, Sato Y. Stimulation of the nucleus basalis of Meynert increases cerebral cortical blood flow in rats. *Neurosci. Lett.* **1989**, *98*, 39-44.
- <sup>22</sup> Lucas-Meunier E, Fossier P, Baux G, Amar M. Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. *Pflugers Arch.* **2003**, *446*, 17-29.

- <sup>23</sup> Lee MG, Hassani OK, Alonso A, Jones BE. Cholinergic basal forebrain neuron burst with theta during waking and paradoxical sleep. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 4365-4369.
- <sup>24</sup> McKinney M. Brain cholinergic vulnerability: relevance to behavior and disease. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 1115-1124.
- <sup>25</sup> Stone TW. CNS Neurotransmitters and neuromodulators: Acetylcholine. CRC Press, Boca Raton **1995**, 272 s.
- <sup>26</sup> Čihák R. Anatomie 3. 2. vydání. Grada Publishing, Praha **2004**, 692 s.
- <sup>27</sup> Drachman DA. Memory and cognitive function in man: does the cholinergic system have a specific role? *Neurology* **1977**, *27*, 783-790.
- <sup>28</sup> Christensen H, Maltby N, Jorm AF, Creasey H, Broe GA. Cholinergic 'blockade' as a model of the cognitive deficits in Alzheimer's disease. *Brain* **1992**, *115*, 1681-1699.
- <sup>29</sup> Molchan SE, Martinez RA, Hill JL, Weingartner HJ, Thompson K, Vitiello B, Sunderland T. Increased cognitive sensitivity to scopolamine with age and a perspective on the scopolamine model. *Brain Res. Rev.* **1992**, *17*, 215-226.
- <sup>30</sup> Roßner S, Kumar A, Witzemann V, Schliebs R. Development of laminar expression of the m2 muscarinic cholinergic receptor gene in rat visual cortex and the effect of monocular visual deprivation. *Dev. Brain Res.* **1994**, *77*, 55-61.
- <sup>31</sup> Schliebs R, Bigl V, Biesold D. Development of muscarinic cholinergic receptor binding in the visual system of monocularly deprived and dark reared rats. *Neurochem. Res.* **1982**, *7*, 1181-1198.
- <sup>32</sup> Förstl H, Bickel H, Kurz A. Alzheimer Demenz, Grundlagen Klinik und Therapie. Springer, Berlin **1999**, 246 s.
- <sup>33</sup> Steriade M, Biesold D. Brain cholinergic systems. Oxford University Press, Oxford, **1991**, 468 s.
- <sup>34</sup> Bohnen NI, Kaufer DI, Ivanco LS, Lopresti B, Koeppe RA, Davis JG, Mathis CA, Moore RY, DeKosky ST. Cortical cholinergic function is more severely affected in Parkinsonian dementia than in Alzheimer's disease: An *in vivo* positron tomography study. *Arch. Neurol.* **2003**, *60*, 1745-1748.
- <sup>35</sup> Terry RD, Buccafusco JJ. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *306*, 821-827.
- <sup>36</sup> Moran MA, Mufson EJ, Gomez-Ramos P, Colocalization of cholinesterases with  $\beta$  amyloid protein in aged and Alzheimer's brain. *Acta Neuropathol.* **1993**, *85*, 362-369.
- <sup>37</sup> Liskowsky W, Schliebs R. Muscarinic acetylcholine receptor inhibition in transgenic Alzheimer-like Tg2576 mice by scopolamine favours the amyloidogenic route of processing of amyloid precursor protein. *Int. J. Devl. Neurosci.* **2006**, *24*, 149-156.
- <sup>38</sup> Cygler M, Schrag JD, Sussman JL, Harel M, Silman I, Gentry MK, Doctor BP. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases and related proteins. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 366-382.
- <sup>39</sup> Massoulié J. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals* **2002**, *11*, 130-143.
- <sup>40</sup> Bartels CF, Jensen FS, Lockridge O, Van der Spek AF, Rubinstein HM, Lubrano T, La Du BN. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *Am. J. Hum. Genet.* **1992**, *50*, 1086-1103.
- <sup>41</sup> Darvesh S, Hopkins DA, Geula C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 131-138.
- <sup>42</sup> Greig NH, Utsuki T, Ingram DK, Wang Y, Pepeu G, Scali C, Yu QS, Mamczarz J, Holloway HW, Giordano T, Chen D, Furukawa K, Sambamurti K, Brossi A, Lahiri DK. Selective



butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer beta-amyloid peptide in rodent. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17213-17218.

<sup>43</sup> Giacobini E. Cholinergic function and Alzheimer's disease. *Int. J. Ger. Psych.* **2003**, *18*, 1-5.

<sup>44</sup> Pohanka M. Cholinesterasy v analýze a diagnostice. Dizertace k získání vědeckého titulu „doktor věd“, AV ČR, **2013**.

<sup>45</sup> Pohanka M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed. Pap.* **2011**, *155*, 219-229.

<sup>46</sup> Saxena A, Redman AM, Jiang X, Lockridge O, Doctor BP. Differences in active site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry* **1997**, *36*, 14642-14651.

<sup>47</sup> Gilson MK, Straatsma TP, McCammon JA, Ripoll DR, Faerman CH, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL. Open „back door“ in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase. *Science* **1994**, *263*, 1276-1278.

<sup>48</sup> Holtje HD, Kjer LB. Nature anionic or alpha-site of cholinesterase. *J. Pharm. Sci.* **1975**, *64*, 418-420.

<sup>49</sup> Bai DL, Tang XC, He XC. Huperzine A, a potential therapeutic agent for treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *11*, 2716-2730.

<sup>50</sup> Lilienfeld S. Galanthamine – a novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease. *CNS Drugs Rev.* **2002**, *8*, 159-176.

<sup>51</sup> Cheewakriengkrai L, Gauthier S. A 10-year perspective on donepezil. *Expert Opin. Pharmacoter.* **2013**, *14*, 331-338.

<sup>52</sup> Tayeb HO, Yang HD, Price BH, Tarazi FI. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **2012**, *134*, 8-25.

<sup>53</sup> Jin Z. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 849-868.

<sup>54</sup> Hejtný S, Slavík B. Květena ČSSR. 2. díl. Academia, Praha **1988**. 783 s.

<sup>55</sup> Kubát K. et al. Klíč ke květeně České republiky, Academia, Praha, **2002**, 928 s.

<sup>56</sup> Fulton B, Benfield P. Galanthamine. *Drug & Aging* **1996**, *9*, 60-65.

<sup>57</sup> Pham LH, Gründemann E, Döpke W. Alkaloids from *Hippeastrum equestre* Herb. (Amaryllidaceae). *Pharmazie* **1997**, *52* 160-162.

<sup>58</sup> Döpke W, Pham LH, Gründemann E, Bartoszek M, Flatau S. Alkaloids from *Hippeastrum equestre*; Part I: phamine, a new phenanthridone alkaloid. *Planta Med.* **1995**, *61*, 564-566.

<sup>59</sup> Schruman da Silva AF, de Andrade JP, Belaqua LRM, de Souza MM, Iyquerdo I, Henriques AT, Zuaznazzi JAS. Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2006**, *85*, 148-154.

<sup>60</sup> Silva AFS, de Andrade JP, Machado KRB, Rocha AB, Apel MA, Sobral MEG, Henriques AT, Zuaznazzi JAS. Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs *Hippeastrum vittatum*. *Phytochemistry* **2008**, *15*, 882-885.

<sup>61</sup> Pettit GR, Gaddamidi V, Cragg GM. Antineoplastic agents, 105. *Zephyranthes grandiflora*, *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 1018-1020.

<sup>62</sup> Ghosal S, Singh SK, Srivastava RS. Chemical constituents of Amaryllidaceae. Part 9. (+)-Epimaritidine, an alkaloid from *Zephyranthes rosea*. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 635-637.

<sup>63</sup> Ghosal S, Singh SK, Srivastava RS. Chemical constituents of Amaryllidaceae. Part 22. Alkaloids from *Zephyranthes flava*, *Phytochemistry* **1986**, *25*, 1975-1978.

- <sup>64</sup> Van Rijn RM, Rhee IK, Verpoorte R. Isolation of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids from *Nerine bowdenii*. *Nat. Prod. Res.* **2010**, *24*, 222-225.
- <sup>65</sup> Nair JJ, Cambell WE, Brun R, Viladomat F, Codina C, Bastida J. Alkaloids from *Nerine filifolia*. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 373-382.
- <sup>66</sup> Kushida N, Atsumi S, Koyano T, Umezawa K. Induction of flat morphology in K-ras-transformed fibroblasts by lycorine, an alkaloid isolated from the tropical plant *Eucharis grandiflora*. *Drug. Exp. Clin. Res.* **1997**, *23*, 151-155.
- <sup>67</sup> Kaya GI, Unver N, Gözler B, Bastida J. (-)-Capnoidine and (+)-bulbocapnine from *Amaryllidaceae* species, *Galanthus nivalis* subsp. *cilicius*. *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 1059-1062.
- <sup>68</sup> López S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some *Amaryllidaceae* alkaloids and *Narcissus* species. *Life Sci.* **2002**, *71*, 2521-2529.
- <sup>69</sup> Nair JJ, Staden JV. Acetylcholinesterase inhibition within the lycorine series of *Amaryllidaceae* alkaloids. *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7*, 959-962.
- <sup>70</sup> Szlávík L, Gyuris Á, Minárovits J, Forgo P, Molnár J, Hohmann J. Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of *Amaryllidaceae* alkaloids. *Planta Med.* **2004**, *70*, 871-873.
- <sup>71</sup> Nair JJ, Bastida J, Valadomat F, Staden JV. Cytotoxic agents of the crinane series of *Amaryllidaceae* alkaloids. *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7*, 1677-1688.
- <sup>72</sup> Li Y, Liu J, Tang L-J, Shi Y-W, Ren W, Hu W-X. Apoptosis induced by lycorine in KM3 cells is associated with the G0/G1 cell cycle arrest. *Oncol. Rep.* **2007**, *17*, 377-384.
- <sup>73</sup> Jin Z. *Amaryllidaceae* and *Sceletium* alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 849-868.
- <sup>74</sup> Jin Z. *Amaryllidaceae* and *Sceletium* alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1126-1142.
- <sup>75</sup> Hrdina V, Hrdina R, Jahodář L, Martinec Z, Měrka V. Přírodní toxiny a jedy. Galén a Karolinum, Praha **2004**, 302 s.
- <sup>76</sup> Bruneton J, Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants, Intercept Ltd. Paris, France, **1999**, 1136 s.
- <sup>77</sup> Wang YH, Gao S, Yang FM, Sun QY, Wang JS, Liu HY, Li CS, Di YT, Li SL, He HP, Hao XJ. Structure elucidation and biomimetic synthesis of hostasinine A, a new benzyphenethylamine alkaloid from *Hosta plantaginea*. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5279-5281.
- <sup>78</sup> Jitsuno M, Yokosuka A, Hashimoto K, Amano O, Sakagami H, Mimaki Y. Chemical constituents of *Lycoris albiflora* and their cytotoxic activities. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, *6*, 187-192.
- <sup>79</sup> Pigni NB, Ríos-Ruiz S, Luque FJ, Viladomat F, Codina C. Wild daffonils of section *Ganymedes* from the Iberian Peninsula as a source of mesembrane alkaloids. *Phytochemistry* **2013**, *95*, 384-393.
- <sup>80</sup> Bastida J, Viladomat F, Llabrés J, Ramiréz G, Codina C. *Narcissus* alkaloids VIII. Mesembrenone: an unexpected alkaloid from *Narcissus pallidus*. *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 478-480.
- <sup>81</sup> Döpke W, Sewerin E, Trimino Z. Zur Struktur des Alkaloids Amisin. *Z. Chem.* **1980**, *20*, 298-299.
- <sup>82</sup> Döpke W, Sewerin E. Isolierung, Struktur und Stereochemie eines neuen Alkaloids aus *Crinum oliganthum*. *Z. Chem.* **1981**, *21*, 358.
- <sup>83</sup> Jin Z. *Amaryllidaceae* and *Sceletium* alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 886-905.
- <sup>84</sup> Berkov S, Pavlov A, Georgiev V, Webr J, Bley T, Viladomat F, Bastida J, Codina C. Changes in apolar metabolites during *in vitro* organogenesis of *Pancreatium maritimum*. *Plant Physiol. Bioch.* **2010**, *48*, 827-835.
- <sup>85</sup> Boit HG, Ehmke H. Alkaloide von *Sprekelia formosissima*, *Galanthus elwesii*, *Zephyranthes candida* and *Crinum powellii* VIII. *Chem. Berichte* **1955**, *88*, 1590-1594.

- <sup>86</sup> Machocho AK, Bastida J, Codina C, Viladomat F, Brun R, Chhabra SC. Augustamine type alkaloids from *Crinum kirkii*. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 3143-3149.
- <sup>87</sup> Kaya GI, Sarikaya B, Onur MA, Somer MA, Viladomat F, Codina C, Bastida J, Launiger IL, Kaiser M, Tasdemir D. Antiprotozoal alkaloids from *Galanthus trojanus*. *Phytochem. Lett.* **2011**, *4*, 301-305.
- <sup>88</sup> Cahlíková L, Macáková K, Zavadil S, Jiroš P, Opletal L, Urbanová K, Jahodář L. Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Chlidanthus fragrans* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, *6*, 603-606.
- <sup>89</sup> Cahlíková L, Hrabínová M, Kulhánková A, Benešová N, Chlebek J, Jun D, Novák Z, Macáková K, Kuneš J, Opletal L. Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities. *Nat. Prod. Commun.* **2013**, *8*, 1541-1544.
- <sup>90</sup> Cahlíková L, Benešová N, Macáková K, Kučera R, Hrstka V, Klimeš J, Jahodář L, Opletal L. Alkaloids from some Amaryllidaceae species and their cholinesterase activity. *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7*, 571-574.
- <sup>91</sup> Koorbanally N, Mulholland DA, Crouch NR. Alkaloids and triterpenoids from *Ammocharis coranica*. *Phytochemistry* **2000**, *54*, 93-97.
- <sup>92</sup> Crouch NR, Chetty J, Mulholland DA, Ndlovu E. Bulb alkaloids reputedly psychoactive *Brunsvigia radulosa* (Amaryllidaceae). *S. Afr. J. Bot.* **2002**, *68*, 86-89.
- <sup>93</sup> Crouch NR, Mulholland DA, Pohl TL, Ndlovu E. The ethnobotany and chemistry of genus *Clivia* (Amaryllidaceae). *S. Afr. J. Bot.* **2003**, *69*, 144-147.
- <sup>94</sup> Berkov S, Romani S, Herrera M, Viladomat F, Codina C, Momekov G, Ionkova I, Bastida J. Antiproliferative alkaloids from *Crinum zeylanicum*. *Phytother. Res.* **2011**, *25*, 1686-1692.
- <sup>95</sup> Herrera MR, Machocho AK, Nair JJ, Campbell WE, Viladomat F, Codina C, Bastida J. Alkaloids from *Cyrtanthus elatus*. *Fitoterapia* **2001**, *72*, 444-448.
- <sup>96</sup> Kushida N, Atsumi S, Koyano T, Umezawa K. Induction of flat morphology in K-ras-transformed fibroblasts by lycorine, an alkaloid isolated from the tropical plant *Eucharis grandiflora*. *Drug. Exp. Clin. Res.* **1997**, *23*, 151-155.
- <sup>97</sup> Kaya GI, Sarikaya B, Onur MA, Somer MA, Viladomat F, Codina C, Bastida J, Launiger IL, Kaiser M, Tasdemir D. Antiprotozoal alkaloids from *Galanthus trojanus*. *Phytochem. Lett.* **2011**, *4*, 301-305.
- <sup>98</sup> de Andrade JP, Pigni NB, Torras-Claveria L, Guo Y, Berkov S, Reys-Chilpa R, El Amrani A, Zuanazzi JAS, Codina C, Viladomat F, Bastida J. Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: chemistry and biological activity. *Rev. Latinoamer. Quím.* **2012**, *40*, 83-98.
- <sup>99</sup> Giordani RB, de Andrade JP, Verli H, Dutilh JH, Henriques AT, Berkov S, Bastida J, Zuanazzi JAS. Alkaloids from *Hippeastrum morelianum* Lem. (Amaryllidaceae). *Magn. Reson. Chem.* **2011**, *49*, 668-672.
- <sup>100</sup> Noyan S, Rentsch GH, Onur MA, Gozler T, Gozler B, Hesse M. The gracilines: a novel subgroup of the Amaryllidaceae alkaloids. *Heterocycles* **1998**, *48*, 1777-1791.
- <sup>101</sup> Ghosal S, Singh S, Kumar Y, Srivastava RS. Chemical constituents of Amaryllidaceae. Part. 29. Isocarbostryl alkaloids from *Haemanthus kalbreyeri*. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 611-613.
- <sup>102</sup> Kitajima M, Kinoshita E, Kogure N, Takayama H. Two new alkaloids from bulbs of *Lycoris squamigera*. *Heterocycles* **2009**, *77*, 1389-1396.
- <sup>103</sup> Pettit GR, Tan R, Bao G-H, Melody N, Doubek DL, Gau S, Chapuis J-C, Williams L. Antineoplastic agents. 587. Isolation and structure of 3-epipancreatistatine from *Narcissus* cv. Ice Follies. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 771-775.

- <sup>104</sup> Cahlíková L, Ločárek M, Benešová N, Kučera R, Chlebek J, Novák Z, Opletal L. Isolation and cholinesterase inhibitory activity of *Narcissus* extracts and Amaryllidaceae alkaloid. *Nat. Prod. Commun.* **2013**, 8, 781-785.
- <sup>105</sup> Labrana J, Machocho AK, Kricsfalusy V, Brun R, Codina C, Viladomat F, Bastida J. Alkaloids from *Narcissus angustifolius* subsp. *transcarpathicus* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry* **2012**, 60, 847-852.
- <sup>106</sup> Feng T, WangYY, Su J, Li Y, Cai X-H, Luo X-D. Amaryllidaceae alkaloids from *Lycoris radiata*. *Helv. Chim. Acta* **2011**, 94, 178-183.
- <sup>107</sup> Berkov S, Sidjimova B, Evstatieva L, Popov S. Intraspecific variability in the alkaloid metabolism of *Galanthus elwesii*. *Phytochemistry* **2004**, 65, 579-586.
- <sup>108</sup> Kihara M, Xu L, Konishi K, Kida K, Nagao Y, Kobayashi S, Shingu T. Isolation and structure elucidation of a novel alkaloid, incartine, a supposed biosynthetic intermediate from flowers of *Lycoris radiata*. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 42, 289-292.
- <sup>109</sup> Pigni NB, Ríos-Ruiz S, Martínez-Francéz V, Nair JJ, Viladomat F, Codina C, Bastida J. Alkaloids from *Narcissus serotinus* L. *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 1643-1647.
- <sup>110</sup> Latvala A, Önür MA, Gözler T, Linden A, Kivcak B, Hesse M. Alkaloids of *Galanthus elwesii*. *Phytochemistry* **1995**, 39, 1229-1240.
- <sup>111</sup> Pagliosa LB, Monteiro SC, Silva KB, de Andrade JP, Dutilh J, Bastida J, Cammarota M, Zuanauzzi JAS. Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on *in vitro* acetylcholinesterase activity. *Phytomedicine* **2010**, 17, 698-701.
- <sup>112</sup> Cedrón JC, Del Arco-Aguilar M, Estevéz-Braun A, Ravelo AG. Chemistry and Biology of *Pancreatium* alkaloids. *Alkaloids* **2010**, 68, 1-37.
- <sup>113</sup> Cahlíková L, Benešová N, Macáková K, Urbanová K, Opletal L. GC/MS analysis of three Amaryllidaceae species and their cholinesterase activity. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, 6, 1255-1258.
- <sup>114</sup> Velten R, Erdelen Ch, Gehling M, Göhrt A, Gondol D, Lenz J, Lockhoff O, Wachendorff U, Wendisch D. Cripowellin A and B, a novel type of Amaryllidaceae alkaloid from *Crinum powellii*. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 1737-1740.
- <sup>115</sup> Elgorashi EE, Drewes SE, van Staden J. Alkaloids from *Crinum macowanii*. *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, 29, 749-750.
- <sup>116</sup> Viladomat F, Bastida J, Codina C, Campbell WE, Mathee S. Alkaloids from *Boophane flava*. *Phytochemistry* **1995**, 40, 307-311.
- <sup>117</sup> Ünver N, Gözler T, Walch N, Gözler B, Hesse M. Two novel dinitrogenous alkaloids from *Galanthus plicatus* subsp. *byzantinus* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry* **1999**, 50, 1255-1261.
- <sup>118</sup> Nair JJ, Manning JC, van Staden J. Distichamine, a chemotaxonomic marker for the genus *Boophane* Herb. (Amaryllidaceae). *S. Afr. J. Bot.* **2012**, 83, 89-91.
- <sup>119</sup> Pettit GR, Groszek G, Backhaus RA, Doubek DL, Barr RJ, Meerow AW. Antineoplastic agents. 301. An investigation of the Amaryllidaceae genus *Hymenocallis*. *J. Nat. Prod.* **1995**, 58, 756-759.
- <sup>120</sup> Pettit GR, Gaddamidi V, Herald DL, Singh SB, Cragg GM, Schmidt JM, Boettner FE, Williams M, Sagawa Y. Antineoplastic agents, 120. *Pancreatium littorale*. *J. Nat. Prod.* **1986**, 49, 995-1002.
- <sup>121</sup> Kojima K, Mutsuga M, Inoue M, Ogihara Y. Two alkaloids from *Zephyranthes carinata*. *Phytochemistry* **1998**, 48, 1199-1202.
- <sup>122</sup> Ünver N, Kaya GI. An unusual pentacyclic dinitrogenous alkaloid from *Galanthus gracilis*. *Turk. J. Chem.* **2005**, 29, 547-553.

- <sup>123</sup> Cahlíková L, Zavadil S, Macáková K, Valterová I, Kulhánková A, Hošťálková A, Kuneš J, Opletal L. Isolation and cholinesterase activity of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii*. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, *6*, 1827-1830.
- <sup>124</sup> Nепublikované výsledky.
- <sup>125</sup> Cahlíková L, Valterová I, Macáková K, Opletal L. Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2011**, *21*, 575-580.
- <sup>126</sup> Kulhánková A, Cahlíková L, Novák Z, Macáková K, Kuneš J, Opletal L. Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. *Chem. Biodiv.* **2013**, *10*, 1120-1127.
- <sup>127</sup> Cahlíková L, Kulhánková A, Urbanová K, Valterová I, Macáková K, Kuneš J. Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes robusta* by GC-MS and their cholinesterase activity. *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5*, 1201-1204.
- <sup>128</sup> Elgorashi EE, Stafford GI, van Staden J. Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med.* **2004**, *70*, 260-262.
- <sup>129</sup> Šafratová M, Novák Z, Kulhánková A, Kuneš J, Hrabínová M, Jun D, Macáková K, Opletal L, Cahlíková L. Revised NMR data for 9-*O*-Demethylgalanthine: an alkaloid from *Zephyranthes robusta* (Amaryllidaceae) and its biological activity. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, *9*, 787-788.
- <sup>130</sup> Krejčová G, Ševelová L. Současné poznatky o galanthaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. *Voj. Zdrav. Listy* **2003**, *72*, 37-44.
- <sup>131</sup> Georgieva L, Berkov S, Kondakova V, Bastida J, Viladomat F, Atanassov A, Codina C. Alkaloid variability in *Leucojum aestivum* from wild populations. *Z. Naturforsch.* **2007**, *62*, 627-635.
- <sup>132</sup> Berkov S, Codina C, Viladomat F, Bastida J. *N*-Alkylated galanthamine derivatives: potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2263-2266.
- <sup>133</sup> Li H-Y, Ma G, Xu Y., Hong S. Studies on the alkaloids of Amaryllidaceae. Part X. Alkaloids of *Lycoris Guangxiensis*. *Planta Med.* **1987**, *53*, 259-261.
- <sup>134</sup> Han SY, Sweeney JE, Bachman ES. Chemical and pharmacological characterization of galanthamine, an acetylcholinesterase inhibitor, and its derivatives. A potential application in Alzheimer's disease? *Eur. J. Med. Chem.* **1992**, *27*, 673-687.
- <sup>135</sup> Reyes-Chilpa R, Berkov S, Hernández-Ortega S, Jankowski ChK, Arseneau S, Clotet-Codina I, Esté JA, Codina C, Viladomat F, Bastida J. Acetylcholinesterase inhibiting alkaloids from *Zephyranthes concolor*. *Molecules* **2011**, *16*, 9520-9533.
- <sup>136</sup> Berkov S, Bastida J, Nikolova M, Viladomat F, Codina C. Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts. *Phytochem. Anal.* **2008**, *19*, 411-419.
- <sup>137</sup> McNulty J, Nair JJ, Little JRL, Brennan JD, Bastida J. Structure-activity studies on acetylcholinesterase inhibition activity in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5290-5294.
- <sup>138</sup> Toriizuka Y, Kinoshita E, Kogure N, Kitajima M, Ishiyama A, Otaguro K, Yamada H, Ōmura S, Takayama H. New lycorine-type alkaloid from *Lycoris traubii* and evaluation of antitrypanosomal and antimalarial activities of lycorine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 10182-10189.
- <sup>139</sup> Tang X, Kindel G, Kozikowski AP, Hanin I. Comparison of the effects of natural and synthetic huperzine A on rat brain cholinergic function in vitro and in vivo. *J. Ethopharmacol.* **1994**, *44*, 147-155.
- <sup>140</sup> Devkota KP, Lenta BN, Fokou PA, Sewald N. Terpenoid alkaloids of the Buxaceae family with potential biological importance. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 512-630.

- <sup>141</sup> Devkota KP, Lenta BN, Choudhary MI, Naz Q, Fekam FB, Rosenthal PJ, Sewald N. Cholinesterase inhibiting and antiplasmodial steroidal alkaloids from *Sarcococca hookeriana*. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 1397-1401.
- <sup>142</sup> Puttonen KA, Lehtonen S, Raasmaja A, Männistö PT. A prolyl oligopeptidase inhibitor Z-Pro-Prolinal, inhibits glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase translocation and production of reactive oxygen species in CV1-P cells exposed to 6-hydroxydopamine. *Tox. Vitro* **2006**, *20*, 1446-1454.
- <sup>143</sup> Toide K, Shinoda M, Fujiwara T, Iwamoto Y. Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on spatial memory and central cholinergic neurons in aged rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1997**, *56*, 427-434.
- <sup>144</sup> Wang Y-H, Wan Q-L, Gu Ch-D, Luo H-R, Long Ch-L. Synthesis and biological evaluation of lycorine derivatives as dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Chem. Centr. J.* **2012**, *6*, 96-101.
- <sup>145</sup> Noble W, Olm V, Takta K, Casey E, Meyerson J, Gaynor K, LaFrancois J, Wang L, Kondo T, Davies P, Burns M, Nixon R, Dickson D, Matsuoka Y, Ahlianian M, Lau L-F, Duff K. Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron* **2003**, *38*, 555-565.
- <sup>146</sup> Ihara Y, Nukina N, Miura R, Ogawara M. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J. Biochem.* **1986**, *99*, 1807-1810.
- <sup>147</sup> Ishiguro K, Omori A, Takamatsu M, Sato K, Arioka M, Uchida T, Imahori K. Phosphorylation sites on tau by tau protein kinase I, a bovine derived kinase generating an epitope of paired helical filaments. *Neurosci. Lett.* **1992**, *148*, 202-206.
- <sup>148</sup> Ryan KA, Pinplikar SW. Activation of GSK-3 and phosphorylation of CRMP2 in transgenic mice expressing APP intracellular domain. *J. Cell Biol.* **2005**, *171*, 327-335.
- <sup>149</sup> Fjell AM, Walhovd KB. Neuroimaging results impose new views on Alzheimer's disease-the role of amyloid: revised. *Mol. Neurobiol.* **2012**, *45*, 153-172.
- <sup>150</sup> Keller J. Age-related neuropathology, cognitive decline, and Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.* **2006**, *5*, 1-13.
- <sup>151</sup> Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 741-766.
- <sup>152</sup> Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H, Greengard P, Relkin NR. Intraneuronal A $\beta$ 42 accumulation in human brain. *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 15-20.
- <sup>153</sup> Dalecká M, Havelek R, Královec K, Brůčková L, Cahlíková L. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chem. Listy* **2013**, *107*, 701-708.
- <sup>154</sup> Havelek R, Seifrtová M, Královec K, Brůčková L, Cahlíková L, Dalecká M, Vávrová J, Řezáčová M, Opletal L, Bílková Z. The effect of *Amaryllidaceae* alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine* **2014**, *21*, 479-490.

## **Přílohy**

Separáty prací týkající se disertační práce

ALKALOIDS FROM *CHLIDANTHUS FRAGRANS*  
AND THEIR ACETYLCHOLINESTERASE,  
BUTYRYLCHOLINESTERASE AND PROLYL  
OLIGOPEPTIDASE ACTIVITIES

Cahlíková L, Hrabínová M, Kulhánková A, Benešová  
N, Chlebek J, Jun D, Novák Z, Macáková K, Kuneš J,  
Opletal L.

*Nat. Prod. Commun.* **2013**, 5, 1201-1204

Cit. 89



## Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Activities

Lucie Cahliková<sup>a</sup>, Martina Hrabínová<sup>b</sup>, Andrea Kulhánková<sup>a</sup>, Nina Benešová<sup>a</sup>, Jakub Chlebek<sup>a</sup>, Daniel Jun<sup>b,c</sup>, Zdeněk Novák<sup>d</sup>, Kateřina Macáková<sup>a</sup>, Jiří Kuneš<sup>d</sup>, Kamil Kuča<sup>b,c</sup> and Lubomír Opletal<sup>a</sup>

<sup>a</sup>ADINACO Research Group, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

<sup>b</sup>Centre of Advanced Studies, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Třebešská 1575, Hradec Králové, 500 01, Czech Republic

<sup>c</sup>Centre for Biomedical Research, University Hospital, Hradec Králové, 500 05, Czech Republic

<sup>d</sup>Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

cahlkova@faf.cuni.cz

Received: August 1<sup>st</sup>, 2013; Accepted: September 5<sup>th</sup>, 2013

Eleven Amaryllidaceae alkaloids (**1-11**) were isolated from fresh bulbs of *Chlidanthus fragrans* Herb. The chemical structures were elucidated by MS, and 1D and 2D NMR spectroscopic experiments. Complete NMR assignments were achieved for deoxypretazettine (**1**). All compounds were evaluated for their erythrocytic acetylcholinesterase and serum butyrylcholinesterase inhibition activity using Ellman's method. In the prolyl oligopeptidase assay, Z-Gly-Pro-p-nitroanilide was used as substrate. In biological assays, only the crinine type Amaryllidaceae alkaloid undulatine showed promising acetylcholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibition activity with IC<sub>50</sub> values of 23.0 ± 1.0 μM and 1.96 ± 0.12 mM, respectively. Other isolated compounds were considered inactive.

**Keywords:** *Chlidanthus fragrans*, Amaryllidaceae, Deoxypretazettine, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, Prolyl oligopeptidase.

Plants of the Amaryllidaceae are known to produce structurally unique alkaloids with a wide range of interesting physiological effects, including antitumor, antiviral, acetylcholinesterase inhibitory and immunostimulatory activities [1a-1d]. These alkaloids are restricted to this family and are best known due to galanthamine, a selective and reversible inhibitor of acetylcholinesterase that increases the levels of acetylcholine (ACh) in the brain, and used, therefore, in the treatment of Alzheimer's disease (AD).

AD is the most predominant cause of dementia in the elderly, affecting more than 20 million people worldwide and it is estimated that this figure will increase to 114 million by 2040 [2a]. AD is the fourth leading cause of death for people over 65 years in Western industrial countries and is becoming more and more common. In other words, increased life expectancy is directly related to the increasing number of elderly people and consequently proportional to the rising number of senile disorders, including neurodegenerative diseases. The etiology of AD is still unknown, but *postmortem* studies have shown two characteristic pathologic hallmarks, senile plaques (SPs) and neurofibrillary tangles (NFTs). SPs are an extracellular accumulation of beta-amyloid (Aβ) surrounded by dystrophic neurites and microglia. Aβ originates from the proteolysis of the amyloid precursor protein (APP) through sequential cleavage by beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE-1, β-secretase) and γ-secretase [2b]. In AD patients, deficit of the neurotransmitter acetylcholine in the cortex results in deterioration of the level of cholinergic functions, and this is responsible for the memory impairments [2c]. The principal role of acetylcholinesterase (AChE) is the termination of nerve impulse transmission at the cholinergic synapses by rapid hydrolysis of ACh. However, not only AChE participates in the cholinergic

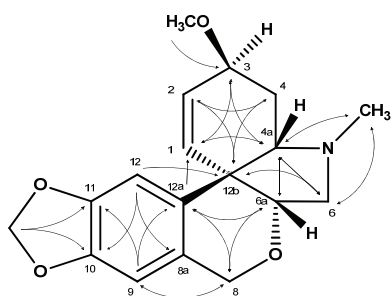
regulation of the central nervous system (CNS) in humans, but also another enzyme, butyrylcholinesterase (BuChE), which is able to hydrolyze ACh, as well as other esters [2d]. BuChE is associated with the NFTs and SPs and its activity increases in the AD brain, where it co-localizes with Aβ fibrils [2e]. In severe AD, levels of AChE and choline acetyltransferase are decreased by as much as 90% compared with normal stage, while the concentration of BuChE increases [2f]. This fact has targeted BuChE as a new approach to affect the progression of AD. Therefore, research into new inhibitors with dual enzymatic activity is required. Currently, acetylcholinesterase inhibition is the most used therapeutic treatment for the symptoms of AD [2g].

Prolyl oligopeptidase (POP) is a cytosolic serine peptidase that hydrolyzes small proline-containing peptides at the carboxy terminus of proline-residues such as vasopressin, substance P, and thyrotropin-releasing hormones that are involved in the process of learning and memory [3a-3b]. These neuropeptides are known to be important modulators in cognitive functions, and degradation of these peptides by POP may accelerate the aging process and possibly be involved in age-related neurodegenerative diseases [3c]. In recent years, POP has gained importance as a target for the treatment of schizophrenia (SZ), bipolar affective disorder (BD) and cognitive disturbances, such as those present in AD, mainly due to its involvement in the metabolism of inositol-1,4,5-P<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>), which is a key molecule in the transduction cascade of neuropeptide signaling. Some inhibitors of POP have been found to be potent antedementia drugs [3d-3e], and, therefore, the inhibition of POP could be an important supporting tool in the treatment of AD.

The genus *Chlidanthus* includes ten species of tender bulbs from tropical South America, mostly native to the Andes. The botanical

name of *Chlidanthus fragrans* comes from the Greek, meaning 'delicate flower' [4a]. Previous phytochemical study resulted in the isolation of four main alkaloids, galanthamine, chlidanthine, lycorine and tazettine [4b-4c]. Our previous GC/MS investigation of the alkaloid extract of this species led to the identification of fifteen alkaloids belonging to five structural-types of Amaryllidaceae alkaloids, and this extract showed interesting acetylcholinesterase inhibition activity, with an  $IC_{50}$  value of  $20.1 \pm 2.9 \mu\text{M}$  [4d].

The important bioactivities of the Amaryllidaceae alkaloids, together with the absence of a current phytochemical study of *Ch. fragrans*, encouraged us to examine this species. Here we report the isolation and identification of eleven Amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of *Ch. fragrans*. Extensive chromatographic purification afforded the previously known alkaloids deoxypretazettine (**1**), belladine (**2**), 3-epimacronine (**3**), ismine (**4**), undulatine (**5**), buphanisine (**6**), tazettine (**7**), galanthamine (**8**), chlidanthine (**9**), ambelline (**10**) and lycorine (**11**). The isolated alkaloids belong to the galanthamine (**8** and **9**), tazettine (**1**, **3** and **7**), crinine (**5**, **6** and **10**), lycorine (**11**), belladine (**2**) and narciclasine (**4**) structure types. The structures were determined by comparison of their MS and NMR spectra, and physical properties with literature values. Alkaloids **1-6** and **10** are reported for the first time for the genus *Chlidanthus*. Lycorine (**11**), tazettine (**7**), ambelline (**10**), galanthamine (**8**), undulatine (**5**), belladine (**2**) and ismine (**4**) are common Amaryllidaceae alkaloids, which are synthesized by a wide range of Amaryllidaceae species [4b, 5, 6]. Opposite to these compounds, chlidanthine and deoxypretazettine are rare. The structure of deoxypretazettine (**1**) was established in 1980, but only limited  $^1\text{H}$  NMR spectroscopic data are available [7]. Here we report the complete NMR assignments for deoxypretazettine (**1**; Figure 1), achieved through the use of two-dimensional NMR techniques (COSY, gHSQC, gHMBC and ROESY). Chlidanthine (**9**) is the second major compound of the studied plant species and its chemotaxonomic marker. In previous phytochemical studies of *Zephyranthes concolor*, *Haemanthus multiflorus* and *Hippeastrum aulicum*, chlidanthine (**9**) was isolated only in small amounts [8a-8c].



**Figure 1:** The structure and key gHMBC correlations of deoxypretazettine (**1**).

The isolated compounds were assayed for their inhibitory activity against erythrocytic acetylcholinesterase (HuAChE), serum butyrylcholinesterase (HuBuChE) and prolyl oligopeptidase (POP) (see Table 1). Galanthamine hydrobromide, huperzine A and eserine were used as the positive controls in the HuAChE and HuBuChE assays, and Z-Pro-prolinal and baicaline in the POP assay. The strongest HuAChE and HuBuChE inhibition activity was demonstrated by galanthamine (**8**), the hydrobromide of which is approved for the treatment of AD as a long acting, selective, reversible and competitive AChE inhibitor [2c, 9]. It is reported that, among plants of the Amaryllidaceae, the AChE (electric eel) inhibition activity *in vitro* is associated mainly with galanthamine and lycorine type skeleta (with the exception of lycorine itself), but

**Table 1:** HuAChE, HuBuChE and POP inhibitory activity of the tested Amaryllidaceae alkaloids expressed as  $IC_{50}$  (n=4).

Alkaloid	$IC_{50}$ , HuAChE ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	$IC_{50}$ , HuBuChE ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	$IC_{50}$ , POP (mM) <sup>a</sup>
Deoxypretazettine ( <b>1</b> )	609 ± 20	628 ± 25	nm <sup>c</sup>
Belladine ( <b>2</b> )	699 ± 19	315 ± 10	>1000
3-Epimacronine ( <b>3</b> )	89 ± 3	425 ± 14	nm <sup>c</sup>
Ismine ( <b>4</b> )	82 ± 4	170 ± 7	>1000
Undulatine ( <b>5</b> )	23 ± 1	>1000	1.96 ± 0.12
Buphanisine ( <b>6</b> )	99 ± 4	>1000	nm <sup>c</sup>
Tazettine ( <b>7</b> )	>1000	>1000	>1000
Galanthamine ( <b>8</b> )	2 ± 0	55 ± 2	>1000
Chlidanthine ( <b>9</b> )	147 ± 6	422 ± 15	>1000
Ambelline ( <b>10</b> )	169 ± 7	985 ± 25	>1000
Lycorine ( <b>11</b> )	>1000	>1000	>1000
Eserine <sup>b</sup>	0.063 ± 0.001	0.13 ± 0.004	nm <sup>c</sup>
Galanthamine <sup>b</sup>	1.71 ± 0.06	42.3 ± 1.3	nm <sup>c</sup>
Huperzine A <sup>b</sup>	0.033 ± 0.001	>1000	>1000
Z-Pro-prolinal <sup>b</sup>	nm <sup>c</sup>	nm <sup>c</sup>	3.27E-6 ± 0.02E-6
Baicaline <sup>b</sup>	nm <sup>c</sup>	nm <sup>c</sup>	0.610 ± 0.021

<sup>a</sup>The data are means ± standard deviations obtained from four independent experiments; <sup>b</sup>Reference compounds, <sup>c</sup>nm: not measured.

not with the haemanthamine, homolycorine and tazettine classes [9, 10]. Lycorine type compounds are less active inhibitors than the galanthamine type and their activity is associated with substitution at positions C-1 and C-2 [9]. Regarding the galanthamine type alkaloids, until now three more potent than galanthamine (**8**) have been found. The loss of the methyl group at C-9, as in sanguinine, leads to about a 10-fold increase of the AChE inhibitory activity [9]. The activity is completely lost in molecules of the galanthamine type with hydrogenated C4-C4a double bonds (lycoramine and epinorlycoramine). The existence of an intramolecular hydrogen bond between the hydroxyl on C-3 and the oxygen of the dihydrofuran ring of galanthamine (**8**) has been considered to play a major role in its acetylcholinesterase inhibitory activity [11]. In the case of chlidanthine (**9**), which is a positional isomer of galanthamine, the ability to inhibit acetylcholinesterase is strongly reduced ( $IC_{50} = 147 \pm 6 \mu\text{M}$ ). Crinine type alkaloids are reported to possess only weak inhibition activity. The haemanthamine and crinine type alkaloids differ only in the position of the 5,10b-ethano bridge, but it appears that the stereochemistry of this bridge has no effect on the inhibition of AChE activity [10]. Contrary to these conclusions, the HuAChE inhibition activity of undulatine (**5**,  $IC_{50} = 23 \pm 1 \mu\text{M}$ ) is interesting and, together with the results of the POP assay, where only undulatine (**5**) possessed inhibition activity ( $IC_{50} = 1.96 \pm 0.12 \text{ mM}$ ), which was comparable with that of the standard baicaline ( $IC_{50} = 0.610 \pm 0.021 \text{ mM}$ ), could make this an important structure in the search and development of new active compounds for the treatment of AD. Of the other crinine type alkaloids, 8-O-demethylmaritide, which we previously isolated from *Zephyranthes robusta* [12], also showed important HuAChE inhibition activity with an  $IC_{50}$  value of  $28.0 \pm 0.9 \mu\text{M}$ . In the current study, 3-epimacronine (**3**), ismine (**4**) and buphanisine (**6**) also showed some HuAChE inhibition activity. According to their  $IC_{50}$  values, they are only weak inhibitors in comparison with the used standards. The other alkaloids were considered inactive. Unfortunately, the obtained amounts of compounds **1**, **3** and **6** were insufficient to determine an  $IC_{50}$  in the POP assay.

As mentioned above, BuChE plays an important role in the late AD stages, but only a limited number of Amaryllidaceae alkaloids have been tested so far for their BuChE inhibition activity. Therefore, it is impossible to draw conclusions on the influence of particular functionalities on the BuChE inhibition activity of Amaryllidaceae alkaloids as yet. In this study, only galanthamine (**8**) and the narciclasine type alkaloid ismine (**4**) showed moderate HuBuChE inhibition activity. A wider range of these compounds must be isolated and tested first.

In conclusion, *Ch. fragrans* is an important source of Amaryllidaceae alkaloids with biological activities. Complete NMR assignments were achieved for deoxypretazettine (**1**), through the use of two-dimensional NMR techniques. Important HuAChE inhibition activity was shown by the crinine type alkaloid undulatine. This alkaloid also possessed POP inhibition activity comparable with that of the used standard, baicaline. Some alkaloids were isolated in amounts that will allow preparation of new derivatives for biological assays. AChE and BuChE continue to be attractive targets for rational drug design and discovery of mechanism-based inhibitors for the treatment of AD. POP has been suggested to play an important role in the biological regulation of peptide hormones and is recognized to be involved in learning and memory.

## Experimental

**Plant materials:** The fresh bulbs of *Ch. fragrans* Herb. were obtained from the herbal dealer Lukon Glads (Sadská, Czech Republic). Botanical identification was performed by Prof. L. Opletal, CSc. A voucher specimen is deposited in the herbarium of the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové.

**Materials:** Acetylthiocholine iodide (ATChI), butyrylthiocholine iodide (BuTChI), eserine, prolyl oligopeptidase (POP) and its substrate, *Z*-Gly-Pro-*p*-nitroanilide, were purchased from Sigma-Aldrich, Czech Republic, galanthamine hydrobromide from Changsha Organic Herb Inc., China, and huperzine A from Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China. The red blood cell ghosts used as a source of acetylcholinesterase (HuAChE), and human plasma as a source of butyrylcholinesterase (HuBuChE) were prepared in our laboratory.

**General experimental procedures:** NMR spectra were recorded for CDCl<sub>3</sub> and THF-d<sub>8</sub> solutions at ambient temperature on a VNMR S500 NMR spectrometer operating at 500 MHz for <sup>1</sup>H and 125 MHz for <sup>13</sup>C. Chemical shifts were recorded as δ values in parts per million (ppm), and were indirectly referenced to tetramethylsilane (TMS) via the solvent signal (7.26 ppm for <sup>1</sup>H and 77.0 ppm for <sup>13</sup>C for CDCl<sub>3</sub>, and 3.30 ppm for <sup>1</sup>H and 49.0 ppm for <sup>13</sup>C for CD<sub>3</sub>OD). Coupling constants (*J*) are given in Hz. For unambiguous assignment of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C signals 2D NMR spectra (COSY, gHSQC, gHMBC and ROESY) were measured using standard parameter sets and pulse programs delivered by the producer of the spectrometer. The EI-MS were obtained on an Agilent 7890A GC 5975 inert MSD operating in EI mode at 70 eV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A DB-5 column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm, Agilent Technologies, USA) was used. The temperature program was: 100 – 180°C at 15°C/min, 1 min hold at 180°C and 180 – 300°C at 5°C/min and 5 min hold at 300°C, detection range *m/z* 40-600. The injector temperature was 280°C. The flow-rate of carrier gas (helium) was 0.8 mL/min. A split ratio of 1:10 was used. Optical rotation was measured on an ADP 220 BS polarimeter, in either CHCl<sub>3</sub> or EtOH solution. TLC was carried out on Merck precoated silica gel F<sub>254</sub> plates, and silica gel 60 (Merck) was used for CC. Compounds on the plate were observed under UV light (254 and 366 nm) and visualized by spraying with Dragendorff's reagent.

**Extraction and isolation of alkaloids:** Fresh bulbs (6 kg) were crushed and exhaustively extracted with EtOH (96% v/v, 2 x) at room temperature for 48 h and the combined macerate was filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The bulb crude extract (350 g) was acidified to pH 2 with 2% HCl, defatted with diethyl ether (4 x 300 mL), and alkalinized to pH 9-10 with 25%

ammonia. Then, the alkaloids were extracted with CHCl<sub>3</sub> (4 x 300 mL). The extract was evaporated under vacuum and tested for alkaloids on TLC (silica gel 60; To: Et<sub>2</sub>NH 95:5, 2 x). The extract (6.5 g), which was Dragendorff positive, was further fractionated by CC (aluminum oxide), eluting with light petrol gradually enriched with CHCl<sub>3</sub>, and then CHCl<sub>3</sub> enriched with EtOH. Fractions of 150 mL were collected and monitored by TLC; 6 main fractions containing alkaloids were obtained (**I-VI**). Fraction **I** (260 mg) was subjected to preparative TLC (To: Et<sub>2</sub>NH, 95:5) to give 2 subfractions **Ia** (50 mg) and **Ib** (120 mg). Both subfraction were again subjected to preparative TLC (cHx: Et<sub>2</sub>NH, 9:1, 3 x) and from **Ia** were isolated compounds **1** (2.6 mg) and **2** (15 mg), and from subfraction **Ib** compounds **3** (5 mg) and **4** (18 mg). From fraction **II** (180 mg) compound **5** (55 mg) was obtained by crystallization from EtOH. The mother liquor was subjected to preparative TLC (To: cHx: Et<sub>2</sub>NH, 65:30:5) and compounds **3** (2 mg) and **6** (3 mg) were isolated. Compound **7** (2.9 g) crystallized spontaneously from fraction **III** (3.25 g). The mother liquors of fractions **III** and **IV** were combined and subjected to preparative TLC (To: Et<sub>2</sub>NH, 9:1, 2 x) and compound **8** (75 mg) was obtained and recrystallized from acetone. From fraction **V** (1.3 g), compound **9** (850 mg) was obtained by crystallization from CHCl<sub>3</sub>: EtOH, 1:1. Fraction **VI** (320 mg) was subjected to preparative TLC (To: CHCl<sub>3</sub>: Et<sub>2</sub>NH, 5:5:1) and compounds **10** (25 mg) and **11** (90 mg) were obtained.

## Deoxypretazettine (1)

White crystals.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.77 (1H, s, H-12), 6.49 (1H, s, H-9), 5.89 (2H, d, *J*=8 Hz, O-CH<sub>2</sub>O), 5.87 (1H, d, *J*=10.5 Hz, H-2), 5.65 (1H, d, *J*=10.5 Hz, H-1), 5.03 (1H, d, *J*=15 Hz, H-8), 4.96 (1H, d, *J*=15 Hz, H-8), 4.17 (1H, bs, H-3), 3.88 (1H, dd, *J*=11 Hz, *J*=7 Hz, H-6a), 3.43 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 2.99-2.92 (2H, m, H-4a, H-6), 2.66 (1H, t, *J*=8 Hz, H-6), 2.54-2.50 (1H, m, H-4), 2.50 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 1.82-1.77 (1H, m, H-4) [7].

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 6.73 (1H, s, H-12), 6.55 (1H, s, H-9), 5.88 (2H, d, *J*=3.8 Hz, O-CH<sub>2</sub>O), 5.81 (1H, d, *J*=10.5 Hz, H-2), 5.63 (1H, d, *J*=10.5 Hz, H-1), 4.99 (1H, d, *J*=15 Hz, H-8), 4.93 (1H, d, *J*=15 Hz, H-8), 4.18-4.14 (1H, m, H-3), 3.91 (1H, dd, *J*=11 Hz, *J*=7 Hz, H-6a), 3.42 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 2.98 (1H, bs, H-4a), 2.86 (1H, dd, *J*=11 Hz, *J*=10 Hz, H-6), 2.66 (1H, dd, *J*=10 Hz, *J*=7.5 Hz, H-6), 2.56-2.50 (1H, m, H-4), 2.49 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 1.83-1.77 (1H, m, H-4).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 146.3 (C10), 146.2 (C11), 133.8 (C12a), 129.3 (C1), 128.2 (C2), 126.5 (C8a), 105.4 (C12), 104.6 (C9), 100.9 (O-CH<sub>2</sub>-O), 79.4 (C6a), 73.1 (C3), 69.8 (C8), 64.4 (C4a), 56.1 (O-CH<sub>3</sub>), 54.4 (C6), 46.0 (C12b), 43.3 (N-CH<sub>3</sub>), 30.2 (C4).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 148.0 (C10), 147.8 (C11), 134.8 (C12a), 131.0 (C1), 128.9 (C2), 128.1 (C8a), 106.1 (C12), 105.8 (C9), 102.3 (O-CH<sub>2</sub>-O), 80.5 (C6a), 74.4 (C3), 70.8 (C8), 66.1 (C4a), 56.3 (O-CH<sub>3</sub>), 55.4 (C6), 47.3 (C12b), 43.9 (N-CH<sub>3</sub>), 31.0 (C4).

EI-MS, (*m/z*): 315 (15), 300 (8), 231 (100), 211 (42), 197 (11), 181 (8), 169 (7), 152 (9).

The other alkaloids were identified by comparison with published data: belladine (**2**) [5]; 3-epimacronine (**3**) [6]; ismine (**4**) [13]; undulatine (**5**) [14]; buphanisine (**6**) [15]; tazzettine (**7**) [16]; galanthamine (**8**) [17]; chlidanthine (**9**) [8a]; ambelline (**10**) [14]; lycorine (**11**) [18]. Copies of the original spectra are obtainable from the author for correspondence.

**Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assay, preparation of red blood cell ghosts:** The same procedures were used as in our previous report [12].

**Prolyl oligopeptidase assay:** POP was dissolved in phosphate buffered saline (PBS: 0.01 M Na/K phosphate buffer, pH 7.4 containing 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl); the specific activity of the enzyme was 0.2 U/mL. The assays were performed in standard polystyrene 96-well microplates with a flat and clear bottom. Stock solutions of tested compounds were prepared in DMSO (10 mM). Dilutions ( $10^{-3}$  M –  $10^{-7}$  M) were prepared from the stock solution with deionized water; the control was performed with the same DMSO concentration. POP substrate, Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilide, was dissolved in 40% 1,4-dioxane (10 mM). For each reaction, PBS (170  $\mu$ L), test compound (5  $\mu$ L) and POP solution (5  $\mu$ L) were incubated for 5 min at 37 °C. Then, substrate (20  $\mu$ L) was added and the microplate was incubated for 30 min at 37°C. The formation of *p*-nitroaniline, directly proportional to the POP activity, was measured spectrophotometrically at 405 nm using a microplate

ELISA reader (EL800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Inhibition potency of the tested compounds was expressed as IC<sub>50</sub> value (concentration of inhibitor, which causes 50% POP inhibition).

**Statistical analysis:** Calculations were performed using Microsoft Excel software (Redmont, WA, USA) and GraphPad Prism version 5.02 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA.

**Acknowledgments** – This work was supported by grants SVV UK 267002, Charles University grant Nr.204026/2012/UNCE, the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic: TEAB Nr. CZ.1.07/2.3.00/20.0235 and the Grant Agency of the Czech Republic Nr. P303/11/1907.

## References

- [1] (a) Szlávik L, Gyuris Á, Minárovits J, Forgo P, Molnár J, Hohmann J. (2004) Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica*, **70**, 871-873; (b) Nair JJ, Bastida J, Viladomat F, van Staden J. (2012) Cytotoxic agents of the crinine series of amaryllidaceae alkaloids. *Natural Product Communications*, **7**, 1677-1688; (c) Nair JJ, van Staden J. (2012) Acetylcholinesterase inhibition within the lycorine series of amaryllidaceae alkaloids. *Natural Product Communications*, **7**, 959-962; (d) Campbell WE, Nair JJ, Gammon DW, Bastida J, Codina C, Viladomat F, Smith PJ, Albrecht CF. (1998) Cytotoxic and antimalarial alkaloids from *Brunsvigia littoralis*. *Planta Medica*, **64**, 91-93.
- [2] (a) Wimo A, Wimblad B, Stoffler A, Wirth Y, Mobius HJ. (2003) The magnitude of dementia occurrence in the world. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, **17**, 63-67; (b) Selkoe DJ. (1998) The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends in Cell Biology*, **8**, 447-453; (c) Lahiri DK, Farlow MR, Greig NH, Sambamurti K. (2002) Current drug targets for Alzheimer's disease treatment. *Drug Development Research*, **56**, 267-281; (d) Nicolet Y, Lockridge O, Masson P, Fontecilla-Camps JC, Nachon F. (2003) Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 41141-41147; (e) Moran MA, Mufson EJ, Gomez-Ramos P. (1993) Colocalization of cholinesterases with beta amyloid protein in aged and Alzheimer's brains. *Acta Neuropathologica*, **85**, 362-369; (f) Giacobini E. (2003) Cholinergic function and Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, **18**, S1-S5; (g) Lleó A. (2007) Current therapeutic options for Alzheimer's disease. *Current Genomics*, **8**, 550-558.
- [3] (a) Polgár L. (2002) The prolyl oligopeptidase family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **59**, 349-362; (b) García-Horsman JA, Männistö PT, Venäläinen JI. (2007) On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides*, **41**, 1-24; (c) Puttonen KA, Lehtonen S, Raasmaja A, Männistö PT. (2006) A prolyl oligopeptidase inhibitor Z-Pro-Proinal, inhibits glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase translocation and production of reactive oxygen species in CV1-P cells exposed to 6-hydroxydopamine. *Toxicology in Vitro*, **20**, 1446-1454; (d) Toide K, Shinoda M, Fujiwara T, Iwamoto Y. (1997) Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on spatial memory and central cholinergic neurons in aged rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **56**, 427-434; (e) Tarragó T, Kichik N, Claasen B, Prades R, Teixidó M, Giral E. (2008) Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**, 7516-7524.
- [4] (a) Grunert C. (1970) *Das grosse Blumenwieselbuch*. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin, 56-57; (b) Boit HG. (1956) Alkaloide von *Chlidanthus fragrans*, *Vallota purpurea*, *Nerine undulata* und *Hippeastrum vittatum* (XI. Mitteil. über Amaryllidaceen-Alkaloide). *Chemische Berichte*, **89**, 1129-1134; (c) Noqueiras C, Döpke W, Lehmann G. (1971) Zur Struktur eines neuen Alkaloids aus *Chlidanthus fragrans*. *Tetrahedron Letters*, **35**, 3249-3250; (d) Cahlíková L, Macáková K, Zavadil S, Jiroš P, Opletal L, Urbanová K, Opletal L. (2011) Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their cholinesterase activity. *Natural Product Communications*, **6**, 603-606.
- [5] Nair JJ, Campbell WE, Brun R, Viladomat F, Codina C, Bastida J. (2005) Alkaloids from *Nerine filifolia*. *Phytochemistry*, **66**, 373-382.
- [6] Viladomat F, Bastida J, Tribo G, Codina C, Rubiralta M. (1990) Alkaloids from *Narcissus bicolor*. *Phytochemistry*, **29**, 1307-1310.
- [7] Kobayashi S, Kihara M, Shingu T, Shingu K. (1980) Transformation of tazettine to pretazettine. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **28**, 2924-2932.
- [8] (a) Reyes-Chilpa R, Berkov S, Hernandez-Ortega S, Jankowski Ch, Arseneau S, Clodet-Codina I, Este JA, Codina C, Viladomat F, Bastida J. (2011) Acetylcholinesterase-inhibiting alkaloids from *Zephyranthes concolor*. *Molecules*, **16**, 9520-9533; (b) Boit HG, Döpke W. (1960) Alkaloids from *Hippeastrum aulicum* var. *robustum*. *Naturwissenschaften*, **47**, 109; (c) Boit HG, Döpke W. (1958) Amaryllidaceous alkaloids. XXIII. Alkaloids of *Haemanthus multiflorus*. *Chemische Berichte*, **91**, 1965-1967.
- [9] López S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. (2002) Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences*, **71**, 2521-2529.
- [10] Elgorashi EE, Stafford GI, van Staden J. (2004) Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica*, **70**, 258-260.
- [11] Carrol P, Furst GT, Han SY, Joullie M. (1990) Spectroscopic studies of galanthamine and galanthamine methiodide. *Bulletin de la Societe Chimique de France*, **127**, 769-780.
- [12] Kulhánková A, Cahlíková L, Novák Z, Macáková K, Kuneš J, Opletal L. (2013) Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition activity. *Chemistry & Biodiversity*, **10**, 1120-1127.
- [13] Cowden CC, Cameron J, Banwell MG, Ho ICS. (1994) Synthesis of the putative structure of 5,6-dihydrobicolorine. *Journal of Natural Products*, **57**, 746-750.
- [14] Pettit GR, Gaddamidi V, Goswami A, Cragg GM. (1984) Antineoplastic agents, 99. *Amaryllis belladonna*. *Journal of Natural Products*, **47**, 796-801.
- [15] Viladomat F, Codina C, Bastida J, Mathee S, Campbell WE. (1995) Further alkaloids from *Brunsvigia josephinae*. *Phytochemistry*, **40**, 961-965.
- [16] Pham LH, Grundemann E, Wagner J, Bartoszek M, Döpke W. (1999) Two novel Amaryllidaceae alkaloids from *Hippeastrum equestre* Herb.: 3-*O*-demethyltazettine and egonine. *Phytochemistry*, **51**, 327-332.
- [17] Kihara M, Konishi LXX, Kida K, Nagao Y, Kobayashi S, Shingu T. (1994) Isolation and structure elucidation of a novel alkaloid, incartine, a supposed biosynthetic intermediate, from flowers of *Lycoris incarnata*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **42**, 289-292.
- [18] Likhitwitayawuid K, Angerhofer CK, Chai H, Pezzuto JM, Cordell GA. (1993) Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. *Journal of Natural Products*, **56**, 1331-1338.

ISOLATION AND CHOLINESTERASE ACTIVITY  
OF AMARYLLIDACEAE ALKALOIDS FROM  
*NERINE BOWDENII*

Cahlíková L, Zavadil S, Macáková K, Valterová I,  
Kulhánková A, Hošťálková A, Kuneš J, Opletal L.

*Nat. Prod. Commun.* **2011**, 6, 1827-1830

Cit. 123

## Isolation and Cholinesterase Activity of Amaryllidaceae Alkaloids from *Nerine bowdenii*

Lucie Cahlíková<sup>a</sup>, Stanislav Zavadil<sup>a</sup>, Kateřina Macáková<sup>a</sup>, Irena Valterová<sup>b</sup>,  
Andrea Kulhánková<sup>a</sup>, Anna Hošťálková<sup>a</sup>, Jiří Kuneš<sup>b</sup> and Lubomír Opletal<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

<sup>b</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the AS CR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Czech Republic

<sup>c</sup>Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

cahlikova@faf.cuni.cz

Received: September 26<sup>th</sup>, 2011; Accepted: October 20<sup>th</sup>, 2011

Amaryllidaceae species are known as ornamental plants. Some contain galanthamine, an acetylcholinesterase inhibitor. The chemical composition of the alkaloid extract of bulbs of *Nerine bowdenii* Watson has been analyzed by means of GC/MS. Twenty-two compounds were detected and nineteen of them identified, one of which was belladine. The alkaloid extract showed promising cholinesterase inhibitory activities against human blood acetylcholinesterase (HuAChE; IC<sub>50</sub> = 87.9 ± 3.5 µg/mL) and human plasma butyrylcholinesterase (HuBuChE; IC<sub>50</sub> = 14.8 ± 1.1 µg/mL). Belladine inhibited HuAChE and HuBuChE in a dose-dependent manner with IC<sub>50</sub> values of 781 ± 12.5 µM and 284.8 ± 4.2 µM, respectively.

**Keywords:** *Nerine bowdenii*, GC/MS, belladine, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase.

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia. Epidemiological data indicate a considerable potential increase in the prevalence of the disease over the next two decades [1]. Although the pathogenesis of AD is complicated and not fully established, two major hypotheses (amyloid cascade and cholinergic) are currently under consideration regarding the molecular mechanism.

In AD patients, deficit of cholinergic functions, which results in decreased levels of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) in the cortex, is responsible for the memory impairments [2a]. The principal role of acetylcholinesterase (AChE) is the termination of nerve impulse transmission at the cholinergic synapses by rapid hydrolysis of ACh. Inhibition of AChE serves as a strategy for the treatment of AD, senile dementia, ataxia, myasthenia gravis, and Parkinson's disease [2b]. In the healthy brain, AChE is the most important enzyme regulating the level of ACh, while another enzyme, butyrylcholinesterase (BuChE) plays only a minor role. Moreover, in late AD stages, levels of AChE have declined by up to 85% and BuChE represents the predominant cholinesterase in the brain. BuChE, primarily associated with glial cells, but also with specific neuronal pathways, cleaves ACh in a manner similar to that of AChE to terminate its physiological action [2c]. Galanthamine, which is used for the treatment of AD, has been shown to

be much less potent against BuChE than AChE [2d]. This fact has targeted BuChE as a new approach to intercede in the progression of AD and requires research into new inhibitors with dual enzymatic activity. Currently, cholinesterase inhibition is the most used therapeutic treatment for the symptoms of AD [2e, f].

Extracts from plants belonging to the Amaryllidaceae family have long been used as herbal remedies. These plants are known to synthesize a particular type of bioactive compound known as Amaryllidaceae alkaloids [3]. Some species of this family contain galanthamine, a long-acting, selective, reversible and competitive acetylcholinesterase inhibitor, as well as other alkaloids with interesting pharmacological activities, such as anticancer, antiviral, antimalarial, anti-inflammatory and antiparasitic [4a-e]. Among the bulbs of Amaryllidaceae plants screened previously for AChE inhibitory activity, *Nerine bowdenii* showed strong inhibition [5a,b].

The genus *Nerine*, the second largest within Amaryllidaceae with ca 30 species, is an autumn-flowering perennial bulbous plant group, whose species inhabit areas with summer rainfall and cool, dry winters [6]. Previous investigations led to the isolation of more than 30 Amaryllidaceae alkaloids. Some of these have been tested for their acetylcholinesterase inhibitory activity, but only ungeremine and undulatine showed interesting inhibition

activity with  $IC_{50}$  values of 0.35  $\mu$ M [7a] and 37  $\mu$ M [7b], respectively. In both studies acetylcholinesterase from electric eel was used.

The ethanolic extract of *N. bowdenii* bulbs exhibited significant HuAChE and HuBuChE inhibition activity ( $61.5\% \pm 4.0\%$  for HuAChE and  $89.8\% \pm 5.2\%$  for HuBuChE, respectively) at a concentration of 500  $\mu$ g/mL, thus indicating the presence of cholinesterase inhibitors in this plant taxon. The crude extract from the bulbs was concentrated into an alkaloid fraction and, as expected, this possessed a promising activity with an  $IC_{50}$  value of  $87.9 \pm 3.5$   $\mu$ g/mL for HuAChE and  $14.8 \pm 1.1$   $\mu$ g/mL for HuBuChE (values for reference compounds: belladine  $781 \pm 12$ , galanthamine  $6.9 \pm 0.3$ , huperzine A  $0.25 \pm 0.01$   $\mu$ g/mL for HuAChE, and  $285 \pm 5$ ,  $156 \pm 2.9$ ,  $> 500$   $\mu$ g/mL, respectively, for HuBuChE).

In order to identify the compounds in the complex alkaloid fraction of *N. bowdenii* bulbs, capillary GC/MS was employed. In the bulb extract, twenty-two alkaloids of the crinine, lycorine, belladine and haemanthamine types were detected by GC (Fig. 1); nineteen of them were identified based on their retention times (RT) and mass spectra as buphanisine (**1,2**), crinine (**3**), belladine (**4**), caranine (**5**), *N*-demethylbelladine (**7**), acetylfalcatine (**8**), buphanidrine (**9**), buphanamine (**10**), crinamine (**11**), powelline (**12**), undulatine (**15**), 11-*O*-acetylbelline (**16**), ambelline (**17**), 3-acetylnerbowdine (**18**), crinamidine (**19**), bowdensine (**20**), and 11-*O*-acetyl-1,2-epoxyambelline (**21**) (Table 1). Compound **2** showed a longer retention time than buphanisine (**1**) by GC-MS, but its MS pattern was the same, indicating that it is an isomer of **1**. Compounds **13**, **14** and **22** remained unidentified. Considering the low concentration of **13** and **14** ( $< 1\%$  of TIC) and the complexity of the alkaloid mixture, their isolation and structural elucidation could be problematic. The mass spectrum of compound **22** was not found either in the databases or in the literature. For the identification of this compound, one of the major components of the alkaloid extract (6.8% of TIC), isolation in larger amount and structure elucidation is needed. The haemanthamine and crinine series of Amaryllidaceae alkaloids only differ in the position of the 5,10*b*-ethano bridge [8a]. The alkaloids of belladine type, which are biosynthetic precursors of Amaryllidaceae alkaloids [8b], have been previously reported only in the genera *Nerine* (*N. filifolia*) and *Crinum* [8c,d]. For *N. bowdenii*, belladine (**4**) and *N*-demethylbelladine (**7**) are reported here for the first time, which is quite surprising when considering their domination of the alkaloid mixture and the number of previous phytochemical investigations of the species. Alkaloids of the lycorine type (**5**, **6** and **8**) were identified only as minor components in the mixture. The relative proportion of each alkaloid was determined as a percentage of the total ion current. The alkaloid pattern of bulbs of *N. bowdenii* was dominated by belladine (**4**; 49.9 % of TIC), ambelline (**17**; 9.1 % of TIC) and *N*-demethylbelladine (**7**; 8.5 % of TIC).

A wide range of Amaryllidaceae alkaloids belonging to various ring types has been evaluated in recent studies for their *in vitro* AChE inhibitory activity with either galanthamine or physostigmine as a positive control [7b, 9a-c]. Results of these studies showed that the AChE inhibitory activity is associated mainly with galanthamine- and lycorine-type alkaloids. The lycorine-type compounds are less active inhibitors than the galanthamine type and their activity is associated with a substitution at positions C-1 and C-2 [9d]. Crinine-type alkaloids have only a weak activity against AChE and it appears that the stereochemistry of the 5,10*b*-ethano bridge has no effect on the inhibition of AChE activity [9c]. In comparison with our previous studies on other Amaryllidaceae plants, such as *Zephyranthes robusta* [9e], *Z. grandiflora* [9f] and *Chlidanthus fragrans* [9g], the alkaloid extract from *N. bowdenii* showed the weakest AChE inhibition activity, which is in agreement with the above mentioned conclusions, because galanthamine-type alkaloids were not detected and the lycorine-type alkaloids represented only a minor fraction (2.9 % of TIC). The alkaloid extracts of *Z. robusta*, *Z. grandiflora* and *Ch. fragrans* were dominated by galanthamine- and lycorine-type alkaloids, and consequently the HuAChE inhibition activity of these extracts was markedly stronger. On the other hand, the extract of *N. bowdenii* showed promising inhibition activity against HuBuChE with an  $IC_{50}$  value of  $14.8 \pm 1.1$   $\mu$ g/mL. As mentioned, BuChE plays an important role in the late AD stages, but only a limited number of alkaloids have been tested for their BuChE inhibitory activity so far. There are no data on BuChE inhibition activity of pure Amaryllidaceae alkaloids.

Relatively surprising was the weak cholinesterase activity of the isolated alkaloid belladine (**4**), previously isolated only from *N. filifolia* [8c], in comparison with the alkaloid extract due to its dominant amount in the mixture (49.9% of TIC) of *N. bowdenii*, and the very good HuBuChE inhibition activity of this extract. It is clear that the BuChE inhibition activity of *N. bowdenii* must be connected to some compound/compounds present in a smaller amount. The isolation and identification of this/these alkaloids will be the next step in searching for new bioactive natural compounds with BuChE inhibition activity.

## Experimental

**Plant materials:** The fresh bulbs of *Nerine bowdenii* were obtained from Lukon Glads (Sadská, Czech Republic). The botanical identification was performed by Prof. Lubomír Opletal, CSc. A voucher specimen is deposited in the Herbarium of the Faculty of Pharmacy at Hradec Králové.

**Extraction of alkaloids:** Fresh bulbs (150 g) were extracted 3 times with EtOH (150 mL) at room temperature for 24 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue dissolved in 50 mL 2% HCl. After removing the neutral compounds with diethyl ether (3 x 50 mL), the extract was basified with 25% ammonia solution and the alkaloids extracted with EtOAc



**Table 1:** Alkaloids identified by GC/MS in bulbs of *Nerine bowdenii*.

Compound	Retention time, <sup>a</sup> (min)	[M <sup>+</sup> ] and characteristic ions <i>m/z</i> (% relative intensity)	% <sup>b</sup>	Reference for MS data
1 Buphanisine, isomer I	25.34	285 (100), 270 (23), 253 (25), 230 (28), 215 (80), 201 (22), 187 (20), 157 (15)	1.4	NIST 08, [10c]
2 Buphanisine, isomer II	25.47	285 (100), 270 (23), 253 (25), 230 (28), 215 (80), 201 (22), 187 (20), 157 (15)	0.7	NIST 08, [10c]
3 Crinine	26.45	271 (100), 254 (8), 242 (8), 228 (25), 216 (14), 199 (48), 187 (43)	1.3	NIST 08, [10c]
4 Belladine	26.65	315 (2), 194 (70), 152 (90), 151 (100), 135 (10), 121 (18), 107 (18)	49.9	NIST 08, [10d], <sup>d</sup>
5 Caranine	27.10	271 (86), 270 (46), 252 (52), 250 (10), 240 (12), 227 (48), 226 (100), 212 (5)	0.2	NIST 08
6 Acetylcaranine	27.24	313 (80), 270 (5), 253 (20), 252 (95), 250 (15), 240 (10), 225 (40), 226 (100)	2.6	NIST 08
7 <i>N</i> -Demethylbelladine	27.64	301 (2), 299 (3), 273 (1), 195 (6), 180 (20), 151 (100), 138 (4), 128 (2), 121 (9), 107 (6)	8.5	[8c]
8 Acetylscatamine	28.49	343 (75), 300 (5), 283 (25), 282 (80), 266 (30), 257 (77), 256 (100), 241 (12)	0.1	NIST 08
9 Buphanidrine	28.82	315 (100), 300 (26), 287 (30), 272 (10), 260 (45), 245 (60), 231 (30), 228 (22)	2.9	NIST 08, [10c]
10 Buphanamine	28.94	301 (100), 286 (12), 284 (14), 272 (14), 256 (18), 231 (25), 218 (18), 204 (18)	1.1	NIST 08
11 Crinamine	29.34	301 (1), 269 (100), 240 (35), 225 (20), 224 (25), 211 (17), 181 (58)	1.9	NIST 08
12 Powelline	29.67	301 (100), 284 (8), 272 (7), 258 (20), 246 (12), 244 (12), 229 (80), 217 (40)	0.3	NIST 08
13 A13 <sup>c</sup>	30.07	331 (22), 313 (10), 299 (28), 287 (100), 284 (14), 282 (10), 270 (20), 255 (45)	0.4	-
14 A14 <sup>c</sup>	30.19	373 (90), 314 (72), 299 (38), 284 (20), 270 (20), 254 (54), 242 (50), 226 (38), 216 (20), 115 (25)	0.3	-
15 Undulatine	31.14	331 (100), 316 (6), 302 (9), 300 (6), 286 (20), 272 (5), 260 (18), 258 (40)	3.6	[10c]
16 11- <i>O</i> -Acetylbellelline	31.24	373 (100), 358 (15), 342 (15), 330 (10), 314 (70), 313 (69), 298 (30), 282 (55), 270 (25)	4.5	[10c]
17 Ambelline	31.49	331 (100), 316 (5), 299 (30), 287 (55), 270 (25), 260 (50), 257 (35), 255 (23), 241 (27)	9.1	NIST 08
18 Acetylnerbowdine	32.10	361 (75), 318 (30), 302 (60), 273 (20), 254 (50), 244 (25), 43 (100)	0.7	NIST 08
19 Crinamidine	32.62	317 (75), 288 (100), 274 (5), 259 (22), 258 (25), 243 (28), 244 (30), 230 (25), 217 (40), 205 (40)	0.4	NIST 08
20 Bowdensine	32.75	403 (82), 344 (80), 288 (75), 284 (50), 272 (40), 230 (40), 217 (42), 189 (28), 173 (50), 43 (100)	2.9	NIST 08
21 11- <i>O</i> -Acetyl-1,2-epoxyambelline	33.52	389 (60), 330 (75), 316 (100), 274 (30), 256 (55), 231 (40), 228 (12), 205 (25), 203 (27), 190 (18)	0.4	[10e]
22 A22 <sup>c</sup>	33.87	329 (100), 314 (18), 300 (8), 286 (12), 270 (6), 231 (28), 218 (15), 204 (20), 190 (10)	6.8	-

<sup>a</sup> For GC conditions see the Experimental section, <sup>b</sup> Values are expressed as a percentage of the total ion current (TIC), <sup>c</sup> not identified, <sup>d</sup> standard.

(3 x 50 mL). The organic solvent was evaporated and 10 mg of alkaloid extract was removed for HuAChE and HuBuChE assay. 10 mg of the dry alkaloid fraction was dissolved in MeOH to a final concentration of 10 mg/mL for further analysis. The rest of the fraction (180 mg) was used for the isolation of pure alkaloids.

**GC/MS analysis and identification of alkaloids:** The GC/MS analysis of alkaloids from *N. bowdenii* was carried out on a gas chromatograph (Focus Thermo Scientific, USA) with a splitless injector (280°C) and a mass detector (200°C, GC-MS MD 800 Fisons, Manchester, UK). A DB-5MS column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm, Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA) and helium gas (constant flow 1 mL/min) were used for separation. The temperature program was: 100 - 180°C at 15°C/min, 1 min held at 180°C, and 180 - 300°C at 5°C/min and 5 min held at 300°C, detection range *m/z* 40-600. The injector temperature was 280°C. The alkaloids were identified by comparison of their MS with those in the NIST library and with those reported in the literature [8c, 9a, 10a-e].

**Isolation and identification of belladine:** The alkaloid extract of *N. bowdenii* was subjected to preparative TLC (silica gel 60, F<sub>254</sub>, Merck) and eluted with toluene:Et<sub>2</sub>NH (95:5, 3 times) to give 4 subfractions A/1-A/4. Subfraction A/1 (35 mg) was further subjected to preparative TLC (cHx: Et<sub>2</sub>NH, 95:5, 3 times), which led to the isolation of compound **4** (20 mg). Because of the small amount of other subfractions, they were not used for the isolation of other alkaloids. The structure of belladine (**4**) was determined by comparison of its spectral data with those

reported in the literature [8c]. NMR spectra were recorded on a Varian VNMR500 spectrometer, operating at 500 MHz (<sup>1</sup>H) and at 125 MHz (<sup>13</sup>C). ESI-MS were measured on a Thermo Finnigan LCQDuo spectrometer.

**Preparation of red blood cell ghosts:** Ghosts were prepared from freshly drawn blood (taken from healthy volunteers), to which 1 mL of sodium citrate per 10 mL of blood was added, according to the method of Steck and Kant [11a], with slight modification. Briefly, plasma (HuBuChE) was removed from the whole blood by centrifugation at 4000 rpm in a Beoco U-32R centrifuge with a Hettich 1611 rotor. Red blood cells were transferred to 50 mL tubes and washed 3 times with 5 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 150 mM sodium chloride (12000 rpm, Avanti J-30I, rotor JA-30.50). The washed erythrocytes were stirred with 5 mM phosphate buffer (pH 7.4) for 10 mins to ensure lysis. The lysed cells were centrifuged at 20,000 rpm for 10 mins and then the ghosts (HuAChE) were washed 3 times with phosphate buffer.

**Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assay:** HuAChE and HuBuChE activities were determined using a modified method of Ellman *et al.* [11b] at concentrations of 0.5, 2.5, 5, 12.5, 25, 50, 125, 250 and 500 μg/mL using acetylthiocholine iodide and butyrylthiocholine iodide as substrates, respectively. Galanthamine and huperzine A were used as positive standards. The % inhibition was calculated according to the formula: %I = 100 - ((ΔA<sub>BL</sub>/ΔA<sub>SA</sub>)\*100), where ΔA<sub>BL</sub> is increase of absorbance of blank sample and ΔA<sub>SA</sub> the increase of absorbance of the measured sample.



**Statistical analysis:** The IC<sub>50</sub> values were calculated with the use of GraphPad Prism 5.02 software.

**Acknowledgments** – This project was supported by grants SVV-2011-263002 and MSM0021620822.

## References

- [1] Johnson N, Davis T, Bosanquet N. (2000) The epidemic of Alzheimer's disease; how can we manage the costs? *Pharmacoeconomics*, **18**, 215-223.
- [2] (a) Lahiri DK, Farlow MR, Greig NH, Sambamurti K. (2002) Current drug targets for Alzheimer's disease treatment. *Drug Development Research*, **56**, 267-281; (b) Rahman AU, Choudhary MI. (2001) Bioactive natural products as a potential source of new pharmacophores a theory of memory. *Pure and Applied Chemistry*, **73**, 555-560; (c) Greig NH, Lahiri DK, Sambamurti K. (2002) Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. *International Psychogeriatrics*, **14**, 77-91; (d) Fulton B, Benfield P. (1996) Galanthamine. *Drugs & Aging*, **9**, 60-65; (e) Lleó A. (2007) Current therapeutic options for Alzheimer's disease. *Current Genomics*, **8**, 550-558; (f) Recanatini M, Valenti P. (2004) Acetylcholinesterase inhibitors as a starting point towards improved Alzheimer's disease therapeutics. *Current Pharmaceutical Design*, **10**, 3157-3166.
- [3] Bastida J, Lavilla R, Viladomat F. (2006) Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. In *The Alkaloids*, Vol. **63**, Cordell GA. (Ed.) Elsevier Scientific: Amsterdam, NL, pp. 87-179.
- [4] (a) Evidente A, Kornienko A. (2009) Anticancer evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives. *Phytochemistry Reviews*, **8**, 449-459; (b) Toriizuka Y, Kinoshita E, Kogure N, Kitajima M, Ishiyama A, Otoguro K, Yamada H, Omura S, Takayama H. (2008) New lycorine-type alkaloid from *Lycoris traubii* and evaluation of antitrypanosomal and antimalarial activities of lycorine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**, 10182-10189; (c) Weniger B, Italiano L, Beck JP, Bastida J, Bergeñon S, Codina C, Lobstein A, Anton R. (1995) Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica*, **61**, 77-79; (d) Zupkó I, Réthy B, Hohmann J, Molnár J, Ocsóvczki I, Falaky G. (2009) Antitumor activity of alkaloids derived from Amaryllidaceae species. *In Vivo*, **23**, 41-48; (e) Lamoral-Theys D, Andolfi A, van Goietsenoven G, Cimmino A, Le Calvé B, Wauthoz N, Mégalizzi V, Gras T, Bruyère C, Dubois C, Mathieu V, Kornienko A, Kiss R, Evidente A. (2009) Lycorine, the main phenanthridine Amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: an investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight. *Journal of Medicinal Chemistry*, **52**, 6244-6256.
- [5] (a) Rhee IK, van de Meent M, Ingkaninan K, Verpoorte R. (2001) Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, **915**, 217-223; (b) Marston A, Kissling J, Hostettmann K. (2002) A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis*, **13**, 51-54.
- [6] Rix M, Phillips R. (1983) *The bulb book: a photographic guide to over 800 hardy bulbs*, Pan Books Ltd., London, GB, pp. 171.
- [7] (a) Rhee IK, Appels N, Hofte B, Karabatak B, Erkelens C, Stark LM, Flippin LA, Verpoorte R. (2004) Isolation of the acetylcholinesterase inhibitor ungeremine from *Nerine bowdenii* by preparative HPLC coupled on-line to a flow assay system. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **27**, 1804-1809; (b) van Rijn RM, Rhee IK, Verpoorte R. (2010) Isolation of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids from *Nerine bowdenii*. *Natural Product Research*, **24**, 222-225.
- [8] (a) De Angelis G, Wildman W. (1969) Identification of Amaryllidaceae alkaloids using ORD and CD spectroscopy. *Tetrahedron Letters*, **9**, 729-732; (b) Eichhorn J, Takada T, Kita Y, Zenk MH. (1998) Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine. *Phytochemistry*, **49**, 1037-1047; (c) Nair JJ, Campbell WE, Brun R, Viladomat F, Codina C, Bastida J. (2005) Alkaloids from *Nerine filifolia*. *Phytochemistry*, **66**, 373-382; (d) Jin Z. (2009) Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Natural Product Reports*, **26**, 363-381.
- [9] (a) López S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. (2002) Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences*, **71**, 2521-2529; (b) Elgorashi EE, Stafford GI, van Staden J. (2004) Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica*, **70**, 258-260; (c) Houghton PJ, Agbedahunsi JM, Adegbulugbe A. (2004) Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species. *Phytochemistry*, **65**, 2893-2896; (d) Houghton PJ, Ren Y, Howes MJ. (2006) Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports*, **23**, 181-189; (e) Cahlíková L, Kulhánková A, Urbanová K, Valterová I, Macáková K, Kuneš J. (2010) Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes robusta* by GC-MS and their cholinesterase activity. *Natural Product Communications*, **5**, 1201-1204; (f) Cahlíková L, Valterová I, Macáková K, Opletal L. (2011) Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC-MS and their cholinesterase activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia/Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **21**, 575-580; (g) Cahlíková L, Macáková K, Zavadil S, Jiroš P, Opletal L, Urbanová K, Jahodář L. (2011) Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Chlidanthus fragrans* by GC-MS and their cholinesterase activity. *Natural Product Communications*, **6**, 603-606.
- [10] (a) Kreh M, Matusch R, Witte L. (1995) Capillary gas chromatography-mass spectrometry of Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry*, **38**, 773-776; (b) Berkov S, Bastida J, Nikolova M, Viladomat F, Codina C. (2008) Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extract. *Phytochemical Analysis*, **19**, 411-419; (c) Viladomat F, Codina C, Bastida J, Mathee S, Campbell WE. (1995) Further alkaloids from *Brunsvigia josephinae*. *Phytochemistry*, **40**, 961-965; (d) Ghosal S, Shanthi A, Singh SK. (1988) Isocraquosidine, an *N*-arylidenephenethylamine from *Crinum asiaticum* and its *E-Z* isomerism. *Phytochemistry*, **27**, 1849-1852; (e) Machocho A, Chhabra SC, Viladomat F, Codina C, Bastida J. (1999) Alkaloids from *Ammocharis tinneana*. *Phytochemistry*, **51**, 1185-1191.
- [11] (a) Steck TL, Kant JA. (1974) Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods in Enzymology*, **31 (Pt A)**, 172-180; (b) Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. (1961) A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, **7**, 88-95.

ALKALOIDS FROM *ZEPHYRANTHES ROBUSTA*  
BAKER AND THEIR ACETYLCHOLINESTERASE  
AND BUTYRYLCHOLINESTERASE-INHIBITORY  
ACTIVITY

Kulhánková A, Cahlíková L, Novák Z, Macáková K,  
Kuneš J, Opletal L

*Chem. Biodiv.* **2013**, *10*, 1120-1127

Cit. 126

## Alkaloids from *Zephyranthes robusta* BAKER and Their Acetylcholinesterase- and Butyrylcholinesterase-Inhibitory Activity

by Andrea Kulhánková<sup>a</sup>), Lucie Cahlíková<sup>\*a</sup>), Zdeněk Novák<sup>b</sup>), Kateřina Macáková<sup>a</sup>), Jiří Kuneš<sup>b</sup>), and Lubomír Opletal<sup>a</sup>)

<sup>a</sup>) ADINACO Research Group, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, CZ-50005 Hradec Králové (phone: +420 495 067 311; fax: +420 495 067 162; e-mail: cahlikova@faf.cuni.cz)

<sup>b</sup>) Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, CZ-50005 Hradec Králové

---

The bulbs of *Zephyranthes robusta* (Amaryllidaceae) have been extensively analyzed for their chemical constituents, resulting in the isolation of 13 alkaloids. The chemical structures of the isolated compounds were elucidated by mass-spectrometric, and 1D- and 2D-NMR spectroscopic experiments. The complete NMR assignments were achieved for hippeastidine. All isolated alkaloids were evaluated for their erythrocytic acetylcholinesterase and serum butyrylcholinesterase inhibitory activities using the *Ellman's* method. Significant acetylcholinesterase inhibition activity was exhibited by 8-*O*-demethylmaritidine ( $IC_{50}(\text{HuAChE}) 28.0 \pm 0.9 \mu\text{M}$ ).

---

**Introduction.** – Plants of the Amaryllidaceae family are known for their ornamental value, but also for the alkaloids they produce. Amaryllidaceae alkaloids, the object of many studies, include a wide range of chemical structures with interesting biological activities, including antimalarial [1], cytotoxic [2][3], anti HIV-1 [4], and acetylcholinesterase inhibition properties [5][6]. Some species of this family contain galanthamine, a long-acting, selective, reversible, and competitive acetylcholinesterase (AChE) inhibitor. The search for more potent and effective AChE inhibitors from natural sources has led to the isolation of further Amaryllidaceae alkaloids, such as sanguinine, habranthine, and 1-*O*-acetyllycorine, which possess either similar or stronger activities than galanthamine [5].

*Alzheimer's* disease (AD) is the most predominant cause of dementia in the elderly, affecting more than 20 million people worldwide [7]. The etiology of AD is still unknown, but *postmortem* studies have shown two characteristic pathologic hallmarks, senile plaques (SPs) and neurofibrillary tangles (NFTs). SPs are an extracellular accumulation of amyloid beta ( $A\beta$ ) surrounded by dystrophic neurites and microglia.  $A\beta$  originates from the proteolysis of the amyloid precursor protein (APP) through sequential cleavage by beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE 1,  $\beta$ -secretase) and  $\gamma$ -secretase [8]. In AD patients, deficit of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) in the cortex results in a deterioration of the level of cholinergic functions, and this is responsible for the memory impairments [9]. The principal role of acetylcholinesterase (AChE) is the termination of nerve impulse transmission at the cholinergic synapses by rapid hydrolysis of acetylcholine (ACh). However, not only AChE participates in the

cholinergic regulation of the central nervous system (CNS) in humans, but also another enzyme, butyrylcholinesterase (BuChE), which is able to hydrolyze ACh, as well as other esters [10]. BuChE is associated with the NFTs and SPs, and its activity increases in the AD brain, where it co-localizes with A $\beta$  fibrils [11]. In severe AD, levels of AChE and choline acetyltransferase are decreased by as much as 90% compared with the normal stage, while the concentration of BuChE increases [12]. This fact has targeted BuChE as a new approach to affect the progression of AD. Therefore, research into new inhibitors with dual enzymatic activity is required. Currently, acetylcholinesterase inhibition is the most used therapeutic treatment for the symptoms of AD [13].

*Zephyranthes* HERB. (Amaryllidaceae) is an American-Antillean genus with ca. 60 species, currently placed in the American tribe Hippeastreae [14]. Several *Zephyranthes* species are widely used as folk medicine in many countries for multiple effects. The decoction of leaves of *Z. candida* has been used in South America as a remedy for diabetes mellitus [15]. *Z. parulla* appears in the history of Peru for treating tumors, and *Z. rosea* has found use in China for breast cancer [16][17]. In a previous phytochemical study of *Z. robusta*, only the three alkaloids lycorine, haemanthamine, and maritidine were isolated [18]. Our GC/MS investigation of the alkaloid extract of this species led to the identification of seven alkaloids belonging to four structural types of Amaryllidaceae alkaloids, and this extract showed interesting AChE- and BuChE-inhibition activities, with  $IC_{50}$  values of  $35.9 \pm 3.5$  and  $190.9 \pm 8.2$   $\mu\text{g/ml}$  for human AChE (HuAChE) and HuBuChE, respectively [19]. The important bioactivities of the Amaryllidaceae alkaloids, together with the absence of phytochemical reports on *Z. robusta*, encouraged us to examine this species.

**Results and Discussion.** – *Isolation, Identification, and Characterization.* We now report the isolation and identification of 13 Amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of *Zephyranthes robusta* BAKER. Extensive chromatographic purification afforded the known alkaloids galanthamine (**1**), 3-epimacronine (**2**), hippeastidine (**3**), lycoramine (**4**), galanthine (**5**), haemanthamine (**6**), tazzetine (**7**), vittatine (**8**), lycorine (**9**), 11-hydroxyvittatine (**10**), haemanthidine (**11**), hamayne (**12**) and 8-*O*-demethylmaritidine (**13**). Their structures were determined by comparison of their mass and NMR spectra, and additional physical properties with literature values (*Fig. 1*). The isolated alkaloids belong to the galanthamine, lycorine, tazzetine, haemanthamine, and crinine types. Other *Zephyranthes* species studied have displayed mainly the presence of lycorine-type alkaloids [15][17][20–23]. Alkaloids **1–5**, **7**, **8** and **10–13** were isolated for the first time from this species, and alkaloids **2**, **3**, **4**, and **13** are reported for the first time for the genus *Zephyranthes*. 3-Epimacronine (**2**), lycoramine (**4**), and 8-*O*-demethylmaritidine (**13**) are biosynthesized by several Amaryllidaceae species [24][25]. Hippeastidine (**3**) has only been reported once previously, in 1978, from one species, namely *Hippeastrum ananuca*, in addition to the present occurrence in *Z. robusta*. Hippeastidine (**3**) is a crinine-type alkaloid with the unusual feature of a OH group at C(10). Its structure has been established, but only limited  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopic data (60 MHz) are available [26]. Here, we report the complete NMR assignments for **3**, achieved through the use of 2D-NMR techniques (COSY, gHSQC, gHMBC, and ROESY). The mass spectrum showed a molecular-ion peak at  $m/z$  319 (100%). The fragmentation was very similar to that of dihydroamaryllisine, a crinine-type alkaloid prepared by

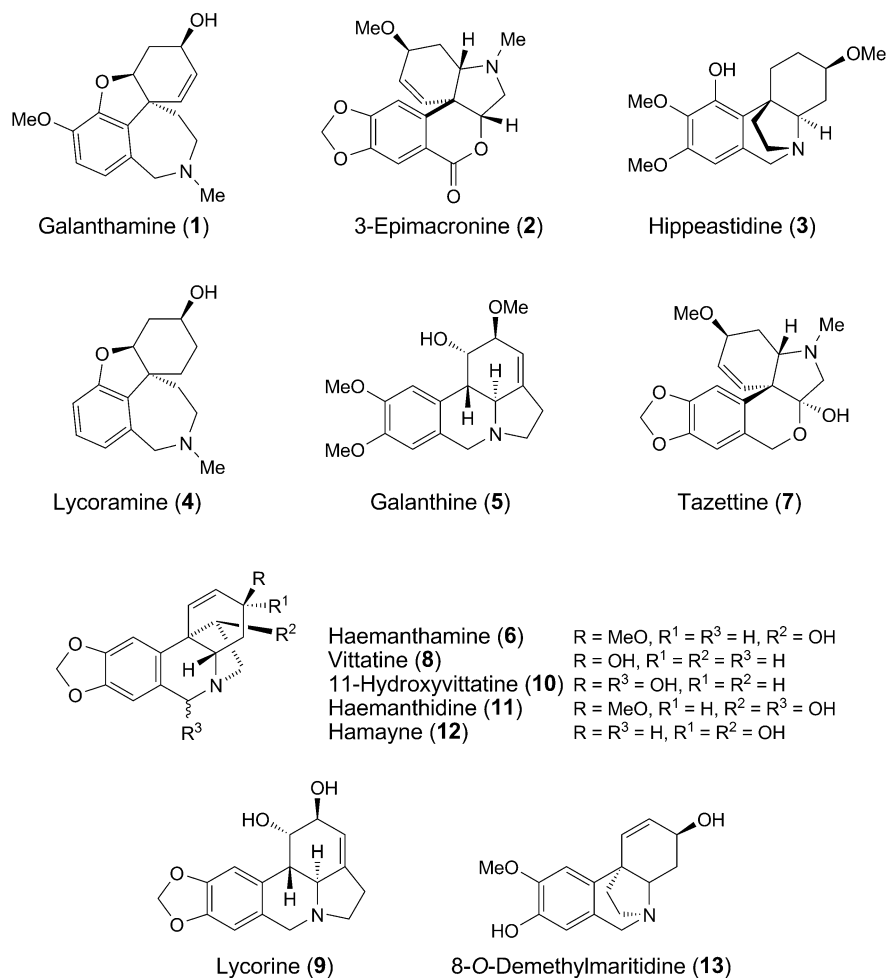


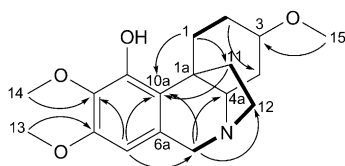
Fig. 1. Structures of isolated compounds from bulbs of *Zephyranthes robusta*

hydrogenation from amaryllisine (isolated from *Amaryllis belladonna* in the same study), and indicated a crinine-type derivative [27]. The presence of 24 H- and 18 C-atoms was confirmed by the <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR experiments (Table 1). The <sup>1</sup>H-NMR spectrum exhibited one *s* of an aromatic H-atom (H-C(7)) ( $\delta$  6.11 ppm) and a broad *s* ( $\delta$  6.24 ppm) of a phenolic OH group. Employing <sup>1</sup>H-NMR and gHSQC experiments, signals corresponding to three MeO, six CH<sub>2</sub>, and two CH groups were observed in the aliphatic range. The structure of **3** was unequivocally corroborated by 2D-NMR (COSY, gHSQC, and gHMBS). All important correlations are shown in Fig. 2. The spectra were recorded in CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD. The assignments of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts in both solvents are compiled in Table 1.

**HuAChE and HuBuChE Inhibitory Activities.** The isolated alkaloids were tested for their HuAChE- and serum HuBuChE-inhibition activities (Table 2). The best Hu-

Table 1.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR Data of *Hippeastidine* (**3**).  $\delta$  in ppm,  $J$  in Hz. Arbitrary atom numbering as indicated in Fig. 2.

Position	$\delta(\text{H})$		$\delta(\text{C})$	
	in $\text{CDCl}_3$	in $\text{CD}_3\text{OD}$	in $\text{CDCl}_3$	in $\text{CD}_3\text{OD}$
1	3.21–3.03 ( <i>m</i> ), 1.78 ( <i>td</i> , $J=14.4, 4.6$ )	3.36–3.19 ( <i>m</i> ), 1.78 ( <i>td</i> , $J=14.4, 4.3$ )	26.4	27.4
1a			43.7	45.4
2	2.09–2.01 ( <i>m</i> ), 1.52–1.40 ( <i>m</i> )	2.09–2.02 ( <i>m</i> ), 1.49–1.37 ( <i>m</i> )	27.7	28.3
3	3.21–3.03 ( <i>m</i> )	3.36–3.19 ( <i>m</i> ),	77.2	78.1
4	2.44–2.25 ( <i>m</i> ), 1.31–1.19 ( <i>m</i> )	2.26–2.18 ( <i>m</i> ), 1.35–1.22 ( <i>m</i> )	32.7	33.2
4a	3.21–3.03 ( <i>m</i> )	3.36–3.19 ( <i>m</i> ),	68.0	69.3
6	4.51 ( <i>d</i> , $J=16.7$ ), 3.86 ( <i>d</i> , $J=16.7$ )	4.57 ( <i>d</i> , $J=16.0$ ), 3.98 ( <i>d</i> , $J=16.0$ )	61.6	61.5
6a			127.6	126.5
7	6.11 ( <i>s</i> )	6.25 ( <i>s</i> )	101.2	102.2
8			150.5	153.0
9			134.2	136.7
10			147.0	149.5
10a			124.8	125.5
11	2.44–2.25 ( <i>m</i> ), 2.01–1.92 ( <i>m</i> )	2.48–2.38 ( <i>m</i> ), 2.02–1.94 ( <i>m</i> )	35.7	35.8
12	3.55 ( <i>t</i> , $J=10.6$ ), 2.93–2.83 ( <i>m</i> )	3.66–3.57 ( <i>m</i> ), 3.14–3.04 ( <i>m</i> )	52.0	53.0
13	3.81 ( <i>s</i> )	3.78 ( <i>s</i> )	55.7	56.2
14	3.88 ( <i>s</i> )	3.74 ( <i>s</i> )	61.0	61.1
15	3.37 ( <i>s</i> )	3.37 ( <i>s</i> )	55.8	56.1
OH	6.24 ( <i>br. s</i> )			

Fig. 2. Key *gHMBC* ( $\text{H} \rightarrow \text{C}$ ) and *COSY* ( $\text{H} \rightarrow \text{H}$ ) features of *hippeastidine* (**3**)

AChE inhibition activity was exhibited by galanthamine (**1**), the hydrobromide of which is approved for the treatment of *Alzheimer's* disease as a long-acting, selective, reversible and competitive AChE inhibitor [13]. It is reported that, among plants of the family Amaryllidaceae, the AChE (electric eel) inhibition activity *in vitro* is associated mainly with the galanthamine- and lycorine-type skeleta (with the exception of lycorine itself), but not with the haemanthamine, homolycorine and tazettine classes [5][28]. Lycorine-type compounds are less active inhibitors than the galanthamine type, and their activity is associated with substitution at C(1) and C(2) [5]. Crinine-type alkaloids are reported to possess only weak inhibition activities. The haemanthamine- and crinine-type alkaloids differ only in the position of the 5,10b-ethano bridge, but it appears that the configuration of this bridge has no effect on the AChE inhibition activity [28]. Contrary to these conclusions, the HuAChE inhibition activity of 8-*O*-demethylmaritidine (**13**;  $IC_{50}(\text{HuAChE}) 28.02 \pm 0.91 \mu\text{M}$ ) is interesting. Compound **13** is a crinine-type alkaloid, the structural analogs of which, maritidine and *O*-methylmaritidine, isolated from *Cyrtanthus falcatus*, showed no inhibition activities

Table 2. *HuAChE and HuBuChE Inhibitory Activities of the Tested Amaryllidaceae Alkaloids*

Alkaloid	$IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ] <sup>a)</sup>	
	HuAChE	HuBuChE
Galanthamine ( <b>1</b> )	2.5 ± 0.1	53.3 ± 1.9
3-Epimacronine ( <b>2</b> )	87.7 ± 3.2	452.0 ± 13.0
Hippeastidine ( <b>3</b> )	99.7 ± 4.1	900.0 ± 35.0
Lycoramine ( <b>4</b> )	55.3 ± 2.8	na
Galanthine ( <b>5</b> )	606.0 ± 15.0	na
Haemanthamine ( <b>6</b> )	na	na
Tazettine ( <b>7</b> )	na	na
Vittatine ( <b>8</b> )	643.0 ± 20.0	na
Lycorine ( <b>9</b> )	na	na
11-Hydroxyvittatine ( <b>10</b> )	na	na
Haemanthidine (2 epimers; <b>11</b> )	na	na
Hamayne ( <b>12</b> )	829.0 ± 19.0	na
8- <i>O</i> -Demethylmaritidine ( <b>13</b> )	28.0 ± 0.9	na
Huperzine A <sup>b)</sup>	0.033 ± 0.001	na
Eserine <sup>b)</sup>	0.063 ± 0.001	0.130 ± 0.004
Galanthamine <sup>c)</sup>	1.710 ± 0.065	42.300 ± 1.300

<sup>a)</sup> Expressed as means ± standard deviations;  $n=3$ ; na, Not active. <sup>b)</sup> Positive control. <sup>c)</sup> Standard.

against AChE (electric eel) in an *in vitro* study [28]. Crinine alkaloids have been shown to exhibit a range of biological activities, primarily cytotoxicity, but not AChE inhibition activity. The cytotoxicity of crinamine to the malaria parasite and to a series of tumor cell lines has been previously described [29], while 6-hydroxycrinamine was shown to be active against mouse melanoma cells [30]. The selective apoptosis-inducing activity of crinine-type alkaloids has also been reported. Crinamine and haemanthamine have been indicated to be potent inducers of apoptosis in tumor cells at  $\mu\text{M}$  concentrations [3]. The explanation of the interesting AChE-inhibition activity of compound **13** may lie in using different types of tested enzymes. All previous studies were performed with AChE from electric eel (*Sigma-Aldrich*). Lycoramine (**4**), hippeastidine (**3**), and 3-epimacronine (**2**) also possessed some inhibition activity. According to their  $IC_{50}$  values, they showed only weak inhibition capacity in comparison with the used standards. Other isolated alkaloids were considered inactive.

As mentioned above, BuChE plays an important role in the late AD stages, but only a limited number of alkaloids have been tested for their BuChE inhibition activity so far. There is no information about the BuChE inhibition activity of the Amaryllidaceae alkaloids, with the exception of belladine, the biosynthetic precursor of the Amaryllidaceae alkaloids, which is considered inactive [31]. In the current study, only galanthamine exhibited moderate HuBuChE inhibition activity with an  $IC_{50}$  value  $42.30 \pm 1.30 \mu\text{M}$ , and, therefore, it is so far impossible to draw conclusions on the influence of particular functionalities on the BuChE inhibition activity of Amaryllidaceae alkaloids. A wider range of these compounds must be isolated and tested first.

*Antioxidant Activity.* Oxidative stress plays a critical role in the pathogenic mechanism of several neurodegenerative disorders, including AD.  $A\beta$ ,  $A\beta$  fibrils, and

$A\beta$  oligomers play very important roles in the pathogenesis of AD [32], and they are well known to induce oxidative stress, which is associated with their cytotoxicity. For this reason, we also investigated the antioxidant activity of the isolated compounds using the DPPH test [33]; unfortunately all the tested alkaloids were inactive ( $EC_{50} > 1$  mM).

**Conclusions.** – In conclusion, *Z. robusta* is a rich source of Amaryllidaceae alkaloids with important biological activities. The complete NMR assignments were achieved for hippeastidine (**3**), by means of 2D-NMR techniques (COSY, gHSQC, gHMBC, and ROESY). Important HuAChE-inhibition activity was exhibited by the crinane-type alkaloid 8-*O*-demethylmaritidine (**13**). Some alkaloids were isolated in amounts that will allow preparation of new derivatives for biological assays. AChE and BuChE continue to be attractive targets for the rational drug design and discovery of mechanism-based inhibitors for the treatment of *Alzheimer's* disease.

### Experimental Part

*General.* TLC: Merck precoated silica gel  $F_{254}$  plates; visualization under UV light (254 and 366 nm) and by spraying with Dragendorff's reagent was used for Column chromatography (CC): silica gel 60 (Merck). GC/MS: a gas chromatograph (Focus Thermo Scientific, USA) with a splitless injector (280°) and a mass detector (200°, GC/MS MD 800 Fisons, Manchester, UK). A DB-5MS column (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) was used for separation. The temp. program was: 100–180° at 15°/min, held 1 min at 180°, 180–300° at 5°/min, and held 5 min at 300°; detection range,  $m/z$  40–600. The injector temp. was 280°. The flow rate of carrier gas (He) was 1 ml/min. A split ratio of 1:10 was used. Optical rotation: ADP 220 BS polarimeter, in either  $CHCl_3$  or EtOH soln. NMR Spectra:  $CDCl_3$  and ( $D_8$ )THF solns. at r.t. on a VNMR S500 NMR spectrometer operating at 500 ( $^1H$ ) and 125 MHz ( $^{13}C$ ); chemical shifts as  $\delta$  values in ppm, indirectly referenced to  $Me_4Si$  (TMS) via the solvent signal (7.26 ( $^1H$ ) and 77.0 ppm ( $^{13}C$ ) for  $CDCl_3$ , and 3.30 ( $^1H$ ) and 49.0 ppm ( $^{13}C$ ) for  $CD_3OD$ ); coupling constants ( $J$ ) given in Hz. For unambiguous assignment of  $^1H$  and  $^{13}C$  signals, 2D-NMR spectra (COSY, gHSQC, gHMBC, and ROESY) were recorded using standard parameter sets and pulse programs delivered by the producer of the spectrometer.

Acetylthiocholine iodide (ATChI), butyrylthiocholine iodide (BuTChI), and eserine were purchased from Sigma-Aldrich, Czech Republic, galanthamine hydrobromide from Changsha Organic Herb Inc., China, and huperzine A from Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China. The red blood cell ghosts used as a source of acetylcholinesterase (HuAChE) and human plasma as a source of butyrylcholinesterase (HuBuChE) were prepared in our laboratory.

*Plant Material.* The fresh bulbs of *Zephyranthes robusta* BAKER (Amaryllidaceae) were obtained from the herbal dealer Lukon Glads (Sadská, Czech Republic). The botanical identification was performed by L. O. A voucher specimen is deposited with the Herbarium of the Faculty of Pharmacy at Hradec Králové.

*Extraction and Isolation of Alkaloids.* Fresh bulbs (12 kg) were crushed and exhaustively extracted with EtOH (96% (v/v), 2  $\times$ ) at r.t. for 48 h, and the combined macerate was filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The bulb crude extract (650 g) was acidified to pH 2 with 2% HCl, defatted with  $Et_2O$  (4  $\times$  500 ml), and alkalinized to pH 9–10 with 25%  $NH_3$ . Then, the alkaloids were extracted with  $CHCl_3$  (4  $\times$  500 ml). The extract was evaporated under vacuum and tested for alkaloids on TLC (silica gel 60; toluene/ $Et_2NH$  95:5; 2  $\times$ ). The extract (10.5 g), which was Dragendorff-positive, was further fractionated by CC (silica gel 60;  $CHCl_3$ , gradually enriched with EtOH). Fractions of 300 ml were collected and monitored by TLC; eight main fractions were obtained, Frs. I–VIII. From Fr. I (260 mg), compound **1** (60 mg) was isolated by crystallization from acetone. Fr. II (150 mg) was subjected to prep. TLC (cyclohexene/ $Et_2NH$  95:5; 3  $\times$ ) to give compounds **2** (5 mg) and **3** (35 mg).



Compound **4** (20 mg) was obtained by prep. TLC from *Fr. III* (cyclohexene/Et<sub>2</sub>NH 9:1; 3 ×). *Fr. IV* (2.8 g) was subjected to repeated CC (silica gel 60; eluting with CHCl<sub>3</sub>/EtOH 9:1, 4:1, 3:2, and 1:4; each 300 ml) to afford compounds **5** (780 mg) and **6** (322 mg), which were further recrystallized from EtOH. Compound **7** (652 mg) crystallized spontaneously from *Fr. V* (1.25 g). Prep. TLC (cyclohexene/toluene/Et<sub>2</sub>NH 5:1:1, 2 ×) of the mother liquor of *Fr. V* (120 mg) led to the isolation of **8** (15 mg). *Fr. VI* (2.5 g) was repeatedly subjected to CC (silica gel 60; CHCl<sub>3</sub>/EtOH 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, each 300 ml), and two subfractions, *Frs. VIa* (1.25 g) and *VIb* (450 mg) were obtained. Compound **9** crystallized from *Fr. VIa* (350 mg). The mother liquor was subjected to prep. TLC (toluene/Et<sub>2</sub>NH; 2 ×) leading to the isolation of compound **10** (16 mg). Compound **11** (205 mg) was crystallized from MeOH from subfraction *Fr. VIb*. Compound **12** (450 mg) was crystallized and recrystallized from *Fr. VII* (820 g). *Fr. VIII* (95 mg) was subjected to prep. TLC (toluene/Et<sub>2</sub>NH; 3 ×), leading to the isolation of compound **13** (22 mg).

*Preparation of Red Blood Cells Ghosts.* Ghosts were prepared from freshly withdrawn blood (taken from healthy volunteers) according to the method of *Steck and Kant* [34], with slight modification. One ml of sodium citrate soln. (3.8%, *Hoechst Biotika*, Slovakia) was added to 10 ml of blood. Then, the plasma (HuBuChE) was obtained by centrifugation at 2500g in a *Boeco U-32R* centrifuge. Red blood cells were transferred into 50-ml tubes and washed 3 times with 5 mM phosphate buffer (pH 7.4; 5 ml buffer/1 ml of erythrocytes) containing 150 mM NaCl (17500g, *Avanti J-301*). The washed erythrocytes were stirred with 5 mM phosphate buffer (pH 7.4) for 10 min to ensure lysis. The lysed cells were centrifuged at 48000g for 10 min. Finally, the ghosts (HuAChE) were washed 3 times with phosphate buffer.

*AChE and BuChE Assay.* HuAChE- and HuBuChE-inhibition activities were determined using a modified *Ellman's* method [35] at concentrations of 0.5, 2.5, 5, 12.5, 25, 50, 125, 250 and 500 µg/ml using ATChI and BuTChI as substrates, resp. Briefly, 8–15 µl of either ghosts or plasma, 215 µl of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), and 8 µl of either the sample or appropriate solvent, as a blank sample, were added to the microplate wells. The reaction was initiated by addition of substrate, either ATChI or BuTChI. The final proportion of DTNB to substrate was 1:1. The increase in absorbance at 436 nm ( $\Delta A$ ) was measured for 1 min using a *Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader* (*BioTek*, USA). Each measurement was repeated 3 times. Galanthamine, huperzine A, and eserine were used as positive standards. The percentage inhibition (%I) was calculated according to the formula: %I = 100 – ( $\Delta A_{BL}/\Delta A_{SA}$ ) · 100, where  $\Delta A_{BL}$  is the increase in absorbance of blank sample, and  $\Delta A_{SA}$  is the increase in absorbance of the measured sample. The *IC*<sub>50</sub> values calculated by GraphPad Prism 5.02 software (*Graph Pad Inc.*, San Diego) are presented as a mean ± standard deviation.

*Identifications of Alkaloids Isolated from the Bulbs of Zephyranthes robusta. Hippeastidine (3).* White crystals. M.p. 202–203° (uncorr.). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +330 (*c* = 0.1, CHCl<sub>3</sub>). NMR: see *Table 1*. EI-MS (*m/z*): 319 (100), 318 (18), 304 (28), 288 (42), 276 (11), 258 (19), 246 (24), 234 (59), 233 (88), 218 (34), 206 (32), 163 (20), 115 (22), 91 (23), 58 (53).

*Galanthamine (1):* [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = –82.1 (*c* = 0.1, CHCl<sub>3</sub>) [36]. *3-Epimacronine (2):* [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +188 (*c* = 0.1, CHCl<sub>3</sub>) [37]. *Lycoramine (4):* [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = –100 (*c* = 0.1, CHCl<sub>3</sub>) [36]. *Galanthine (5):* [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = –84.1 (*c* = 0.1, CHCl<sub>3</sub>) [36]. *Haemanthamine (6):* [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +31 (*c* = 0.1, CHCl<sub>3</sub>) [38]. *Tazzetine (7):* [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +188 (*c* = 0.1, CHCl<sub>3</sub>) [39]. *Vittatine (8):* [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +30 (*c* = 0.1, CHCl<sub>3</sub>) [40]. *Lycorine (9):* [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +188 (*c* = 0.1, CHCl<sub>3</sub>) [29]. *11-Hydroxyvittatine (10):* [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +19 (*c* = 0.1, MeOH) [41]. *Haemanthidine* (two epimers; **11**): [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = –14 (*c* = 0.1, CHCl<sub>3</sub>) [42]. *Hamayne (12):* [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +110.9 (*c* = 0.1, CHCl<sub>3</sub>) [43]. *8-O-Demethylmaritidine (13):* [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +27.5 (*c* = 0.1, CHCl<sub>3</sub>) [41].

Copies of the original spectra may be obtained upon request from the authors.

This project was supported by grants SVV UK 265 002, FRVŠ 664/2011, and Charles University grant Nr.17/2012/UNCE.

## REFERENCES

- [1] B. Sener, I. Orhan, J. Satayavivad, *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 1220.
- [2] B. Weniger, L. Italiano, J.-P. Beck, J. Bastida, C. Codina, A. Lobstein, R. Anton, *Planta Med.* **1995**, *61*, 77.

- [3] J. McNulty, J. J. Nair, C. Codina, J. Bastida, S. Pandey, J. Gerasimoff, C. Griffin, *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1068.
- [4] L. Szlávik, A. Gyuris, J. Minárovits, P. Forgo, J. Molnár, J. Hohmann, *Planta Med.* **2004**, *70*, 871.
- [5] S. López, J. Bastida, F. Viladomat, C. Codina, *Life Sci.* **2002**, *71*, 2521.
- [6] S. Berkov, C. Codina, F. Viladomat, J. Bastida, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2263.
- [7] A. Wimo, B. Winblad, H. Aguero-Torres, E. von Strauss, *Alzheimer Dis. Assoc. Dis.* **2003**, *17*, 63.
- [8] D. J. Selkoe, *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 447.
- [9] D. K. Lahiri, M. R. Farlow, N. H. Greig, K. Sambamurti, *Drug Dev. Res.* **2002**, *56*, 267.
- [10] Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, J. C. Fontecilla-Camps, F. Nachon, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41141.
- [11] M. A. Moran, E. J. Mufson, P. Gomez-Ramos, *Acta Neuropathol.* **1993**, *85*, 362.
- [12] E. Giacobini, *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **2003**, *18*, S1.
- [13] A. Lleó, *Curr. Genomics* **2007**, *8*, 550.
- [14] A. W. Meerow, M. F. Fay, C. L. Guy, Q.-B. Li, F. Q. Zaman, M. W. Chase, *Am. J. Bot.* **1999**, *86*, 1325.
- [15] M. R. Herrera, A. K. Machocho, R. Brun, F. Viladomat, C. Codina, J. Bastida, *Planta Med.* **2001**, *67*, 191.
- [16] Z. Trimiño Ayllón, M. Castillo Rodríguez, I. Spenglers Salabarría, *Rev. Cubana Farm.* **1989**, *23*, 147.
- [17] S. Ghosal, S. K. Singh, R. S. Srivastava, *Phytochemistry* **1985**, *24*, 635.
- [18] K. R. V. Rao, S. J. V. L. N. Rao, *Curr. Sci.* **1978**, *48*, 110.
- [19] L. Cahlíková, A. Kulhánková, K. Urbanová, I. Valterová, K. Macáková, J. Kuneš, *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5*, 1201.
- [20] S. Ghosal, S. K. Shibnath, S. G. Unnikrishnan, *Phytochemistry* **1987**, *26*, 823.
- [21] K. Kojima, M. Mutsuga, M. Inoue, Y. Ogihara, *Phytochemistry* **1998**, *48*, 1199.
- [22] G. R. Pettit, V. Gaddamidi, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 1018.
- [23] G. R. Pettit, G. M. Cragg, S. B. Singh, J. A. Duke, D. J. Doubek, *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 176.
- [24] F. Cabezas, A. Ramírez, F. Viladomat, C. Codina, J. Bastida, *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 315.
- [25] Z. Jin, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1126.
- [26] P. Pacheco, M. Silva, W. Steglich, *Rev. Latinoam. Quím.* **1978**, *9*, 28.
- [27] A. L. Burlingame, H. M. Fales, R. J. Highet, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 4976.
- [28] E. E. Elgorashi, G. I. Stafford, J. van Staden, *Planta Med.* **2004**, *70*, 258.
- [29] K. Likhitwitayawuid, C. K. Angerhofer, H. Chai, J. M. Pezzuto, G. A. Cordell, *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1331.
- [30] J. J. Nair, E. E. Campbell, D. W. Gammon, C. F. Albrecht, F. Viladomat, C. Codina, J. Bastida, *Phytochemistry* **1998**, *49*, 2539.
- [31] L. Cahlíková, S. Zavadil, K. Macáková, I. Valterová, A. Kulhánková, A. Hošťálková, J. Kuneš, L. Opletal, *Nat. Prod. Commun.* **2011**, *6*, 1827.
- [32] Y. S. Shim, J. C. Morris, *J. Clin. Neurol.* **2011**, *7*, 60.
- [33] Z. Cheng, J. Moore, L. Yu, *J. Agric. Food. Chem.* **2006**, *54*, 7429.
- [34] T. L. Steck, J. A. Kant, *Methods Enzymol.* **1974**, *31*, 172.
- [35] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88.
- [36] M. Kihara, L. X. K. Konishi, K. Kida, Y. Nagao, S. Kobayashi, T. Shingu, *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 289.
- [37] F. Viladomat, J. Bastida, G. Tribo, C. Codina, M. Rubiralta, *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1307.
- [38] J. Bastida, F. Viladomat, J. M. Llabres, C. Codina, M. Feliz, M. Rubiralta, *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1519.
- [39] L. H. Pham, E. Gründemann, J. Wagner, M. Bartoszek, W. Döpke, *Phytochemistry* **1999**, *51*, 327.
- [40] M. Bohno, K. Sugie, H. Imase, Y. B. Yusof, T. Oishi, N. Chida, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6977.
- [41] A. H. Abou-Donia, S. M. Toaima, H. M. Hommoda, E. Shawky, E. Kinoshita, H. Takayama, *Chem. Biodiversity* **2008**, *5*, 332.
- [42] J. Hohmann, P. Forfo, J. Molnár, K. Wolfard, A. Malnár, T. Thalhammer, I. Máthé, D. Sharples, *Planta Med.* **2002**, *68*, 454.
- [43] F. Viladomat, J. Bastida, C. Codina, E. E. Cambell, S. Mathee, *Phytochemistry* **1994**, *35*, 809.

Received April 24, 2012

ANALYSIS OF AMARYLLIDACEAE ALKALOIDS  
FROM *ZEPHYRANTHES ROBUSTA* BY GC-MS AND  
THEIR CHOLINESTERASE ACTIVITY

Cahlíková L, Kulhánková A, Urbanová K, Valterová I,  
Macáková K, Kuneš J.

*Nat. Prod. Commun.* **2010**, 5, 1201-1204

Cit. 127

## Analysis of Amaryllidaceae Alkaloids from *Zephyranthes robusta* by GC-MS and Their Cholinesterase Activity

Lucie Cahlíková<sup>a</sup>, Andrea Kulhánková<sup>a</sup>, Klára Urbanová<sup>b</sup>, Irena Valterová<sup>b</sup>,  
Kateřina Macáková<sup>a</sup> and Jiří Kuneš<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

<sup>b</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the AS CR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Czech Republic

<sup>c</sup>Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

cahlikova@faf.cuni.cz

Received: June 1<sup>st</sup> 2010; Accepted: June 21<sup>st</sup>, 2010

From the bulbs of *Zephyranthes robusta* Baker (Amaryllidaceae), seven known compounds, belonging to four structural types of Amaryllidaceae alkaloids, were identified and quantified by GC-MS. The alkaloid extract from the bulbs showed promising acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activities against HuAChE ( $IC_{50} = 35.9 \pm 3.5 \mu\text{g/mL}$ ) and HuBuChE ( $IC_{50} = 190.9 \pm 8.2 \mu\text{g/mL}$ ).

**Keywords:** *Zephyranthes robusta*, Amaryllidaceae, GC/MS, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase.

*Zephyranthes robusta* Baker is a bulbous plant belonging to the family Amaryllidaceae, various species of which are known as ornamental plants. Some species of this family contain galanthamine, an acetylcholinesterase inhibitor approved for the treatment of Alzheimer's disease [1,2], as well as other alkaloids with interesting pharmacological activities (antimalarial, antiviral and antiproliferative) [3-5].

Species of *Zephyranthes* are widely used as a folk medicine in many countries. The decoction of leaves of *Z. candida* has been used in South Africa as a remedy for diabetes mellitus, and *Z. parulla* in Peru as a treatment for tumors [6]. *Z. rosea* and *Z. flava* are used for a variety of therapeutic purposes in India [7,8].

There have been relatively few phytochemical studies of *Zephyranthes* species, and only one GC/MS investigation. From *Z. citrina*, eight alkaloids (galanthine, haemanthamine, lycorine, lycorenine, oxomaritidine, maritidine, vittatine and narcissidine) have been isolated [9,10]. In addition to these, zefbetaine and zeflabetaine were isolated from *Z. flava* [7], and pretazettine and carinatine, along with lycorine, galanthine and haemanthamine from *Z. carinata* [11].

Previous phytochemical analysis of *Z. robusta* led to the isolation of two alkaloids (lycorine and haemanthamine) [12]. GC/MS analysis of extracts of bulbs of *Z. concolor* showed the domination of galanthamine-type Amaryllidaceae alkaloids and this extract possessed promising AChE inhibitory activity [13].

Alkaloids of many different skeleton types (for example, quinolizidine and isoquinoline) can be rapidly identified by GC-EI-MS [14-16]. It has been found that Amaryllidaceae alkaloids can be analyzed by GC without prior derivatization and, with only few exceptions, they show a mass spectral fragmentation pattern very similar to those obtained under direct insertion [15]. Several studies of the distribution of galanthamine in different subspecies and populations of mainly *Galanthus* and *Narcissus* species have been published [17-20]. GC/MS analysis has been successfully applied for the reliable and fast identification of Amaryllidaceae alkaloids and for comparative study of their percentage contribution in the alkaloid mixtures [1].

In the present work we report the GC/MS investigation of the alkaloid extract from the bulbs of *Z. robusta* and

**Table 1:** Alkaloids identified by GC/MS in bulbs of *Z. robusta*.

Compound	RT, <sup>a</sup> min	[M <sup>+</sup> ] and characteristic ions, m/z (% relative intensity)	% <sup>b</sup>
1 Galanthamine	21.24	287(90), 286 (100), 270 (20), 244 (30), 230 (5), 216 (45)	3
2 Lycoramine	21.72	289 (65), 288 (100), 274 (10), 232 (10), 202 (30)	27
3 Vittatine	22.77	271 (100), 252 (30), 199 (90), 187 (95), 173 (30)	5
4 Nerbowdine	24.77	319 (100), 302 (50), 272 (30), 254 (45), 232 (75)	2
5 Haemanthamine	25.39	301 (20), 272 (100), 240 (15), 225 (10), 211 (15)	15
6 Tazettine	25.52	331 (20), 316 (20), 298 (30), 247 (100)	6
7 Galanthine	26.40	317 (30), 298 (15), 284 (15), 268 (15), 243 (100), 242 (95)	42

<sup>a</sup> For GC conditions see Experimental section.

<sup>b</sup> Values are expressed as a percentage of the total ion current (TIC).

the inhibitory effect of this extract on the activity of erythrocytic AChE (HuAChE) and plasma BuChE (HuBuChE) from human blood.

In the bulb extract, seven alkaloids were detected by GC and identified from their retention times (RT) and mass spectra as galanthamine (**1**), lycoramine (**2**), vittatine (**3**), nerbowdine (**4**), haemanthamine (**5**), tazettine (**6**), and galanthine (**7**). Nerbowdine was identified for the first time in the genus *Zephyranthes*. The relative proportion of each alkaloid was determined as a percentage of the total ion current. The major components were lycoramine (**2**; 27% of TIC) and galanthine (**7**; 42% of TIC) (Table 1). The area of the GC/MS peaks depends not only on the corresponding compounds, but also on the intensity of their MS fragmentation, so the data given in the table are not true quantification. However, they can be used for comparison between samples.

The alkaloidal extract of *Z. robusta*, at a concentration of 50 µg/mL, inhibited HuAChE (57.5% ± 3.4%) and HuBuChE (22.2% ± 2.3%), thus indicating the presence of AChE and BuChE inhibitors. It is known, that among species of Amaryllidaceae, AChE inhibitory activity is associated mainly with galanthamine and lycorine type alkaloids [17,21]. Therefore, the presence of the above mentioned compounds explain the AChE inhibitory activity of the extract of *Z. robusta*.

GC/MS analysis of bulbs of *Z. concolor* showed that galanthamine-type alkaloids represented more than 90% of the alkaloid mixture, which inhibited AChE from electric eel by 88% ± 0.2% at a concentration of 10 µg/mL. Galanthamine (64% of TIC) and chlidanthine were identified as the main components (24 % of TIC) [13]. In our study, galanthamine presented only as a minor component (3% of TIC), and chlidanthine was not identified.

**Table 2:** AChE and BuChE inhibitory activity of the alkaloid extract of *Z. robusta*.

Concentration (µg/mL)	AChE <sup>a</sup> inhibition (%)	BuChE <sup>a</sup> inhibition (%)
<b>500</b>	96.9 ± 2.5	70.9 ± 1.5
<b>50</b>	57.4 ± 3.4	22.1 ± 1.8
<b>5</b>	12.3 ± 0.5	4.6 ± 0.5
<b>0.5</b>	2.4 ± 0.5	0
<b>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>	35.9 ± 3.5	190.9 ± 8.2
<b>IC<sub>50</sub><sup>c</sup> Galanthamine<sup>b</sup></b>	6.9 ± 0.3	156 ± 6.9
<b>IC<sub>50</sub><sup>c</sup> Huperzine A<sup>b</sup></b>	0.25 ± 0.01	>1000

<sup>a</sup>Results are the mean of three replications; <sup>b</sup> Reference compound [23]; <sup>c</sup> (µM).

## Experimental

**Plant materials:** The fresh bulbs of *Zephyranthes robusta* Baker were obtained from Lukon Glads (Sadská, Czech Republic). A voucher specimen is deposited in the herbarium of the Faculty of Pharmacy at Hradec Králové.

**Extraction of alkaloids:** Fresh bulbs (3 x 15 g) were extracted 3 times with EtOH (50 mL) at room temperature for 24 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue dissolved in 10 mL 2% HCl. After removing the neutral compounds with diethyl ether (3 x 15 mL), the extract was basified with 25% ammonia solution and the alkaloids extracted with EtOAc (3 x 15 mL). The organic solvent was evaporated and 10 mg of each alkaloid extract removed for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assay. The rest of the dry alkaloid fraction was dissolved in MeOH to a final concentration of 10 mg/mL for further analysis.

**GC/MS analysis:** GC/MS analyses were carried out on a gas chromatograph (CE 8000, Milano, Italy) with a splitless injector (280°C) and a mass detector (200°C, GC-MS MD 800 Fisons, Manchester, UK). A DB-5MS column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA) and helium gas (constant flow 1 mL/min) were used for separation. The temperature program was: 100 - 180°C at 15°C/min, 1 min hold at 180°C and 180 - 300°C at 5°C/min and 5 min hold at 300°C, detection range *m/z* 40-600. The injector temperature was 280°C.

**Identification of alkaloids:** The alkaloids were identified by comparison of their MS with those in the NIST library, with those reported in the literature [13, 15, 17-20], and with commercially available standards (galanthamine, Changsha Organic).

**Preparation of red blood cells ghosts:** Ghosts were prepared from freshly drawn blood (taken from healthy volunteers), to which 1 mL of sodium citrate per 10 mL

of blood was added, according to the method of Steck and Kant [24], with slight modification. Briefly plasma (HuBuChE) was removed from the whole blood by centrifugation at 4000 rpm in a Boeco U-32R centrifuge with a Hettich 1611 rotor. Red blood cells were transferred to 50 mL tubes and washed 3 times with 5 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 150 mM sodium chloride (12000 rpm, Avanti J-30I, rotor JA-30.50). The washed erythrocytes were stirred with 5 mM phosphate buffer (pH 7.4) for 10 mins to ensure lysis. The lysed cells were centrifuged at 20,000 rpm for 10 mins and then the ghosts (HuAChE) were washed 3 times with phosphate buffer.

#### **Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assay:**

HuAChE and HuBuChE activities were determined with a modified method of Ellman *et al.* [22] at concentrations 0.5, 5, 50 and 500  $\mu\text{M/L}$  (Table 2) using acetylthiocholine iodide and butyrylthiocholine iodide as substrates, respectively. Briefly, 25-50  $\mu\text{L}$  of either

ghosts or plasma, 650  $\mu\text{L}$  of DTNB and 25  $\mu\text{L}$  of either the sample or appropriate solvent, as a blank sample, were added to the semi-micro cuvette. The reaction was initiated by addition of substrate (ATChI or BuTChI). The final proportion of DTNB to substrate was 1:1. The increase of absorbance at 436 nm ( $\Delta A$ ) was measured for 1 min using a Shimadzu UV-1611 spectrophotometer. Each measurement was repeated 3 times. Galanthamine and huperzine A were used as positive standards [23]. The % inhibition was calculated according to the formula:  $\%I = 100 - (\Delta A_{\text{BL}} / \Delta A_{\text{SA}}) * 100$ , where  $\Delta A_{\text{BL}}$  is increase of absorbance of blank sample and  $\Delta A_{\text{SA}}$  is increase of absorbance of the measured sample.

**Statistical analysis:** The  $\text{IC}_{50}$  values were calculated with the use of GraphPad Prism 5.02 software.

**Acknowledgments** – This project was supported by the grants SVV-2010-261-002 and GA UK 122309.

#### **References**

- [1] Berkov S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. (2008) Analysis of galanthamine-type alkaloids by capillary gas chromatography-mass spectrometry in plants. *Phytochemical Analysis*, **19**, 285-293.
- [2] Hostettmann K, Borloz A, Urbain A, Marston A. (2006) Natural product inhibitors of acetylcholinesterase. *Current Organic Chemistry*, **10**, 825-847.
- [3] Campbell WE, Nair JJ, Gammon DW, Bastida J, Codina C, Viladomat F, Smith PJ, Albrecht CF. (1988) Cytotoxic and antimalarial alkaloids from *Brunsvigia littoralis*. *Planta Medica*, **64**, 91-93.
- [4] Szlavik L, Gyuris Á, Minárovits J, Forgo P, Molnár J, Hohmann J. (2004) Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica*, **70**, 871-873.
- [5] Hohmann J, Forgo P, Molnár J, Wolfard K, Molnár A, Thalhammer T, Máthé I, Sharples D. (2002) Antiproliferative Amaryllidaceae alkaloids isolated from the bulbs of *Sprekelia formosissima* and *Hymenocallis x festalis*. *Planta Medica*, **68**, 454-457.
- [6] Pettit GR, Gaddamidi V, Cragg GM. (1984) Antineoplastic agents, 105. *Zephyranthes grandiflora*. *Journal of Natural Products*, **47**, 1018-1020.
- [7] Ghosal S, Singh SK, Srivastava RS. (1986) Chemical constituents of Amaryllidaceae. Part 22. Alkaloids from *Zephyranthes flava*. *Phytochemistry*, **25**, 1975-1978.
- [8] Ghosal S, Singh SK, Srivastava RS. (1985) Chemical constituents of Amaryllidaceae. Part 9. (+)-Epimaritidine, an alkaloid from *Zephyranthes rosea*. *Phytochemistry*, **24**, 635-637.
- [9] Boit HG, Döpke W, Stender W. (1957) Alkaloide aus *Crinum*, *Zephyranthes*, *Leucojum* und *Clivia* Arten. *Chemische Berichte*, **90**, 2203-2206.
- [10] Herrera MR, Machocho AK, Brun R, Viladomat F, Codina C, Bastida J. (2001) Crinane and lycorane type alkaloids from *Zephyranthes citrina*. *Planta Medica*, **67**, 191-193.
- [11] Kobayashi S, Ishikawa H, Kihara M, Shingu T, Hashimoto T. (1977) Isolation of carinatine and pretazettine from the bulbs of *Zephyranthes carinata* Herb. (Amaryllidaceae). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **25**, 2244-2248.
- [12] Rao KRV, Rao SJVLN. (1978) Occurrence of the rare alkaloid maritidine in *Zephyranthes robusta* and *Z. sulphurea*. *Current Science*, **48**, 110-111.
- [13] Berkov S, Bastida J, Nikolova M, Viladomat F, Codina C. (2008) Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extract. *Phytochemical Analysis*, **19**, 411-419.
- [14] Wink M, Meisner C, Witte L. (1995) Pattern of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochemistry*, **38**, 139-153.
- [15] Kreh M, Matusch R, Witte L. (1995) Capillary gas chromatography-mass spectrometry of Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry*, **38**, 773-776.
- [16] Suau R, Cabezudo B, Rico R, Najera F, López-Romero J. (2002) Direct determination of alkaloid contents in *Fumaria* species by GC-MS. *Phytochemical Analysis*, **13**, 363-367.

- [17] López S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. (2002) Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences*, **71**, 2521-2529.
- [18] Berkov S, Sidjimova B, Evstatieva L, Popov S. (2004) Intraspecific variability in the alkaloid metabolism of *Galanthus elwesii*. *Phytochemistry*, **65**, 579-586.
- [19] Berkov S, Bastida J, Sidjimova B, Viladomat F, Codina C. (2008) Phytochemical differentiation of *Galanthus nivalis* and *Galanthus elwesii* (Amaryllidaceae): A case study. *Biochemical Systematics and Ecology*, **36**, 638-645.
- [20] Gotti R, Fiori J, Bartolini M, Cavrini V. (2006) Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus* by GC-MS and capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **42**, 17-24.
- [21] Houghton P, Ren Y, Howes MJ. (2006) Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports*, **23**, 181-189.
- [22] Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. (1961) A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, **7**, 88-95.
- [23] Cahlíková L, Macáková K, Kuneš J, Kurfürst M, Opletal L, Cvačka J, Chlebek J, Blunden G. (2010) Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Eschscholzia californica* (Papaveraceae). *Natural Product Communications*, **5**, 1035-1038
- [24] Steck TL, Kant JA. (1974) Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods in Enzymology*, **31 (Pt A)**, 172-180.

REVISED NMR-DATA FOR 9-*O*-  
DEMETHYLGALANTHINE: AN ALKALOID FROM  
*ZEPHYRANTHES ROBUSTA* (AMARYLLIDACEAE)  
AND ITS BIOLOGICAL ACTIVITY

Šafratová M, Novák Z, Kulhánková A, Kuneš J,  
Hrabínová M, Jun D, Macáková K, Opletal L,  
Cahlíková L.

*Nat. Prod. Commun.* **2014**, 9, 787-788

Cit. 129



## Revised NMR Data for 9-*O*-Demethylgalanthine: an Alkaloid from *Zephyranthes robusta* (Amaryllidaceae) and its Biological Activity

Marcela Šafratová<sup>a</sup>, Zdeněk Novák<sup>b</sup>, Andrea Kulhánková<sup>a</sup>, Jiří Kuneš<sup>b</sup>, Martina Hrabínová<sup>c</sup>, Daniel Jun<sup>d</sup>, Kateřina Macáková<sup>a</sup>, Lubomír Opletal<sup>a</sup> and Lucie Cahliková<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>ADINACO Research Group, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, <sup>b</sup>Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic; <sup>c</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the AS CR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Czech Republic; <sup>d</sup>Centre of Advanced Studies, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Třebešská 1575, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

cahlikova@faf.cuni.cz

Received: March 24<sup>th</sup>, 2014; Accepted: April 14<sup>th</sup>, 2014

Ongoing studies of *Zephyranthes robusta* resulted in the isolation of the lycorine-type alkaloid previously called carinatine and 10-*O*-demethylgalanthine. The NMR data given previously for this compound were revised and completed by two-dimensional <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H and <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C chemical shift correlation experiments. The name of the isolated compound was corrected to 9-*O*-demethylgalanthine in accordance with the currently used system of numbering of lycorine-type alkaloids. 9-*O*-Demethylgalanthine and galanthine, a previously isolated alkaloid from *Z. robusta*, were inactive in acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase assays (IC<sub>50</sub> > 500 μM), but showed important prolyl oligopeptidase inhibition activity.

**Keywords:** *Zephyranthes robusta*, Amaryllidaceae, 9-*O*-Demethylgalanthine, Prolyl oligopeptidase inhibition activity.

Our previous phytochemical investigations of *Zephyranthes robusta* led to the identification and isolation of thirteen Amaryllidaceae alkaloids [1a,b]. We now report on the isolation and structural elucidation of compound **2** (9-*O*-demethylgalanthine), which is the demethyl derivative of galanthine (**1**). Compound **2**, was previously isolated from *Z. carinata* in 1977, characterized as its picrate, and named carinatine [1c]. The compound was also reported from *Habranthus brachyandrus* by Jitsuno *et al.* in 2009 and named 10-*O*-demethylgalanthine [2a]. This name is not in agreement with the currently used system of numbering of lycorine-type alkaloids. Jitsuno *et al.* used another system of numbering of the molecule, which does not point to the biosynthetic formation of the ethylene bridge (-C11-C12-). We have revised the NMR spectroscopic data given previously for this compound. Also reported are the complete assignments of the <sup>1</sup>H NMR spectroscopic data for galanthine (**1**).

The complete assignment of the <sup>1</sup>H NMR spectral data of **2**, performed by 2D COSY and NOESY experiments, revealed a compound with a lycorine type structure whose chemical shifts were closely comparable with those of galanthine [1b]. The <sup>1</sup>H NMR spectra of **1** (Table 1) and **2** (Table 2) showed characteristic singlets at δ 6.62 and 6.61, respectively (H7), and δ 6.85 and 6.93, respectively (H10), corresponding to aromatic protons, a multiplet at δ 5.59-5.61 and 5.58-5.60 (H3), respectively, assigned to the vinylic proton, another broad singlet at δ 4.65 and 4.61 (H1), respectively, for an aliphatic deshielded proton, and two doublets at δ 4.15 and 4.11 (H6β) and 3.50 and 3.55 (H6α), respectively. The <sup>1</sup>H NMR spectroscopic data of **2** revealed significant differences from those of **1**, especially the absence of a singlet for a methoxy group at δ 3.89 (C9-OCH<sub>3</sub>). The two remaining singlets of methoxy groups at δ 3.84 and 3.49 were assigned to C8 and C2, respectively, by means of the NOESY and HMBC experiments (Figure 1). The two doublets at δ 2.79 and 2.68 (*J* = 10.6 Hz) were attributed to the two methine protons H4a and H10b, respectively. The large coupling constant supported a *trans*-fusion of the B/C rings. Axial

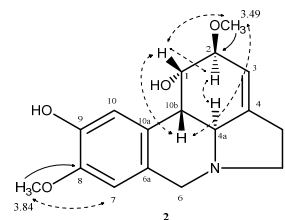


Figure 1: Key HMBC and NOESY (dashed) correlations of **2**.

configuration of the hydroxyl group at C1 was deduced from the COSY and NOESY experiments. The equatorial H1 resonated as a broad singlet (or double doublet with *J* < 1 Hz) and was coupled in the COSY spectrum to H10b and weakly to H2. The near zero value for <sup>3</sup>*J* (H1, H10b) and the strong cross peak H1 with H10b in the NOESY spectrum confirmed their orthogonal relationship. Similarly, the equatorial H2 was coupled in the COSY spectrum to H1 and to H3, and in the NOESY spectrum weakly to H4a. In addition, a weak NOESY correlation between H10b and a methoxy group (C2-OCH<sub>3</sub>) confirmed the previous evidence. Finally, the multiplet at δ 2.65-2.60 was assigned to the aliphatic methylene H11, the multiplet at δ 2.48-2.40 to H12α, and the multiplet at δ 3.34-3.30 to H12β. The NOESY correlations between H12α, H6α and H4a suggest their α-position. Therefore, the multiplet at δ 3.34-3.30 (H12β) and the doublet at δ 4.11 (H6β) were deshielded by the β oriented electron lone pair on the nitrogen atom.

The <sup>13</sup>C NMR spectrum of **2** (Table 2), reported here for the first time, together with the information from the coupled <sup>13</sup>C spectrum, showed the presence of 17 carbon resonances, which could be assigned to two methyl, three methylene, seven methine and five quaternary carbon atoms, and from the HSQC experiment the protonated carbon resonances could be unambiguously assigned. From the HMBC spectrum, three bond correlations were observed for H7 to C9 and to C10a, H10 to C8 and to C6a, and H2 to C4, enabling us to identify the resonances of the quaternary carbons.

**Table 1:** <sup>1</sup>H ((500 MHz)) and <sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz) spectroscopic data of compound 1 in CDCl<sub>3</sub>

Position	<sup>1</sup> H <sup>a</sup> (J in Hz)	COSY	NOESY	<sup>13</sup> C <sup>b</sup>	HMBC <sup>c</sup>
1	4.65, br s	H2, H3, H10b	H2, H10, H10b, C2 - OCH <sub>3</sub>	68.7, d	C3, C4a, C10a; C2, C10b; -
2	3.84-3.82, m	H1, H3, H4a, H11	H1, H3, H4a, C2 - OCH <sub>3</sub>	80.8, d	C4, C2 - OCH <sub>3</sub> ; C1, C3; -
3	5.61-5.59, m	H1, H2, H4a, H11	H2, H4a, H11, C2 - OCH <sub>3</sub>	115.2, d	C1, C4a, C11; -; -
4	-	-	-	144.0, s	-
4a	2.70, br d (10.7)	H2, H3, H10b	H2, H3, H6α, H12α	61.1, d	C1, C6; C10b, C4; -
6α	3.50, d (14.0)	H6β, H7, H10b	H6β, H12α, H4a, H7	56.7, t	C7, C10a, C12; C6a; -
6β	4.15, d (14.0)	H6α, H7	H7, H6α, H12β	56.7, t	C4a, C7, C10a; C6a; -
6a	-	-	-	129.5, s	-
7	6.62, s	H6α, H6β, C8 - OCH <sub>3</sub>	H6α, H6β, C8 - OCH <sub>3</sub>	110.8, d	C6, C9, C10a; C6a; C10, C10b
8	-	-	-	147.7, s	-
9	-	-	-	147.8, s	-
10	6.85, s	H10b, C9 - OCH <sub>3</sub>	H1, H10b, C9 - OCH <sub>3</sub>	107.4, d	C6a, C8, C10b; C10a; C6, C7
10a	-	-	-	126.1, s	-
10b	2.73, br d (10.7)	H1, H4a, H6α, H10	H1, H10	41.7, d	-; C1, C4a, C10a; -
11	2.65-2.60, m, 2H	H2, H3, H12α, H12β	H3, H12β, H12α	28.6, t	C3, C4a; C4, C12; -
12α	2.35, ddd (8.8, 8.7, 8.6)	H11, H12β	H11, H12β, H6α, H4a	53.9, t	C6; C11; -
12β	3.35, ddd (8.7, 6.6, 2.7)	H11, H12α	H6β, H11, H12α	53.9, t	C4, C4a; C11; -
C2-OCH <sub>3</sub>	3.52, s, 3H	-	H1, H2, H3	57.6, q	C2; -; -
C8-OCH <sub>3</sub>	3.84, s, 3H	H7	H7	55.9, q	C8; -; -
C9-OCH <sub>3</sub>	3.89, s, 3H	H10	H10	56.0, q	C9; -; -

<sup>a</sup> δ 500 MHz/CDCl<sub>3</sub>; <sup>b</sup> δ 125.7 MHz/CDCl<sub>3</sub>; <sup>c</sup> <sup>1</sup>J, <sup>2</sup>J, <sup>3</sup>J**Table 2:** <sup>1</sup>H ((500 MHz)) and <sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz) spectroscopic data of compound 2 in CDCl<sub>3</sub>

Position	<sup>1</sup> H <sup>a</sup> (J in Hz)	COSY	NOESY	<sup>13</sup> C <sup>b</sup>	HMBC <sup>c</sup>
1	4.61, br s	H2, H3, H10b	H2, H10, H10b, C2 - OCH <sub>3</sub>	68.1, d	C3, C4a, C10a; C2, C10b; -
2	3.83-3.81, m	H1, H3, H11	H1, H3, H4a, C2 - OCH <sub>3</sub>	80.8, d	C4, C2 - OCH <sub>3</sub> ; C1; -
3	5.60-5.58, m	H1, H2, H4a, H11	H2, H11	115.6, d	C1, C4a; -; -
4	-	-	-	143.8, s	-
4a	2.79, br d (10.6)	H3, H10b	H2, H6α, H12α	60.9, d	-; C10b; -
6α	3.55, d (13.7)	H6β, H7, H10b	H6β, H4a, H7, H12α	56.6, t	C7, C10a, C12; C6a; -
6β	4.11, d (13.7)	H6α, H7	H7, H6α, H10b	56.6, t	C4a, C7, C10a; C6a; -
6a	-	-	-	128.4, s	-
7	6.61, s	H6α, H6β, C8 - OCH <sub>3</sub>	H6β, C8 - OCH <sub>3</sub> , H6α	110.2, d	C6, C9, C10a; C6a, C8; C10b
8	-	-	-	145.4, s	-
9	-	-	-	144.5, s	-
10	6.93, s	H10b	H1, H10b	110.5, d	C6a, C8, C10b; C9, C10a; C6
10a	-	-	-	127.1, s	-
10b	2.68, br d (10.6)	H1, H4a, H6α, H10	H1, H10, H6β, C2 - OCH <sub>3</sub>	41.4, d	-; C1, C4a, C10a; -
11	2.65-2.60, m, 2H	H2, H3, H12α, H12β	H3, H12β, H12α	28.7, t	C4a; C4; -
12α	2.48-2.40, m	H11, H12β	H11, H12β, H6α, H4a	53.9, t	C6; C11; -
12β	3.34-3.30, m	H11, H12α	H11, H12α	53.9, t	C4, C4a; C11; -
C2-OCH <sub>3</sub>	3.49, s, 3H	-	H1, H2, H10b	57.6, q	C2; -; -
C8-OCH <sub>3</sub>	3.84, s, 3H	H7	H7	56.0, q	C8; -; -

<sup>a</sup> δ 500 MHz/CDCl<sub>3</sub>; <sup>b</sup> δ 125.7 MHz/CDCl<sub>3</sub>; <sup>c</sup> <sup>1</sup>J, <sup>2</sup>J, <sup>3</sup>J

The isolated alkaloids were tested for their acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BuChE) and prolyl oligopeptidase

## References

- (a) Cahliková L, Kulhánková A, Urbanová K, Macáková K, Kuneš J. (2010) Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes robusta* and their cholinesterase activity. *Natural Product Communications*, **5**, 1201-1204; (b) Kulhánková A, Cahliková L, Novák Z, Macáková K, Kuneš J, Opletal L. (2013) Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase- and butyrylcholinesterase-inhibitory activity. *Chemistry & Biodiversity*, **10**, 1120-1127; (c) Kobayashi S, Ishikawa H, Kihara M, Shingu T, Hashimoto T. (1977) Isolation of carinatine and pretazettine from the bulbs of *Zephyranthes carinata* Herb. (Amaryllidaceae). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **25**, 2244-2248.
- (a) Jitsuno M, Yokosuka A, Sakagami H, Mimaki Y. (2009) Chemical constituents of the bulbs of *Habranthus brachyandrus* and their cytotoxic activities. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **57**, 1153-1157; (b) Li H, Wang H, Chen JH, Wang LH, Zhang HS, Fan Y. (2003) Determination of amino acid neurotransmitters in cerebral cortex of rats administered with baicalin prior to cerebral ischemia by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, **788**, 93-101; (c) Lee H, Yang LL, Wang CC, Hu SY, Chang SF, Lee YH. (2003) Differential effects of natural polyphenols on neuronal survival in primary cultured central neurons against glutamate- and glucose deprivation-induced neuronal death. *Brain Research*, **986**, 103-113; (d) Toide K, Shinoda M, Fujiwara T, Iwamoto Y. (1997) Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on spatial memory and central cholinergic neurons in aged rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **56**, 427-434.
- (a) Tarragó T, Kichik N, Claasen B, Prades R, Teixidó M, Giralt E. (2008) Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**, 7516-7524; (b) Cahliková L, Hrabínová M, Kulhánková A, Benešová N, Chlebek J, Jun D, Novák Z, Macáková K, Kuneš J, Kuča K, Opletal L. (2013) Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities. *Natural Product Communications*, **8**, 1541-1544.

inhibitory activities (POP). Unfortunately, both compounds were considered inactive in AChE/BuChE assays (IC<sub>50</sub> > 500 μM), but showed important POP inhibition activity with IC<sub>50</sub> values of 1.49 ± 0.14 mM for **1** and 0.15 ± 0.02 mM for **2**. These obtained activities are comparable with that of baicalin (IC<sub>50</sub> = 0.61 ± 0.02 mM), which was used as a standard. Compound **2** is a four times more potent inhibitor of POP than baicalin. Recent studies have demonstrated that baicalin has a protective effect against brain edema and cerebral ischemic damage [2b,c]. Some inhibitors of POP have been found to be potent antedementia drugs [2d,3a], and therefore, the inhibition of POP could be an important supporting tool in the treatment of Alzheimer's disease.

## Experimental

**General:** NMR, Varian Inova VNMR S500 spectrometer; NOESY, with a mixing time of 800 ms; ESI-HRMS, Waters Synapt G2Si with hybrid mass analyzer quadrupole-time-of-flight (Q-TOF), connected to a Waters Acquity I-Class UHPLC system. EI MS were measured on a GC-MS system using an Agilent 7890A GC 5975 inert MSD operating in EI mode at 70 eV.

**Plant material:** Fresh bulbs of *Zephyranthes robusta* Baker, obtained from the herbal dealer Lukon Glads (Sadská, Czech Republic), were identified by Prof. L. Opletal, CSc. A voucher specimen is deposited in the herbarium of the Faculty of Pharmacy at Hradec Králové.

**Isolation of compounds:** For compound **1**, see the experimental part of previous studies [1a,b]. Compound **2** was isolated by prep TLC (To: Et<sub>2</sub>NH, 95:5; 2x) from the mother liquor of fraction VI. The detailed preparation of fraction VI is described in our previous report [1b].

**9-O-Demethylgalanthine (2):** 2,9-Dimethoxy-2,3a<sup>1</sup>,4,5,7,11b-hexahydro-1*H*-pyrrolo[3,2,1-*de*]phenanthridine-1,10-diol.

Orange crystals.

[α]<sub>D</sub>: -32.4 (c 0.22, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Table 2.

MS (EI, 70 eV) *m/z* (%): 303 [M]<sup>+</sup> (23), 284 (10), 270 (12), 254 (17), 238 (5), 322 (8), 229 (90), 228 (100), 214 (8), 147 (9).

HRMS-Q-TOF MS ESI: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> calc. for C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>: 304.1549; found: 304.1559.

**AChE, BuChE and prolyl oligopeptidase assays:** The same procedures were used as in our previous report [3b].

**Acknowledgments** - This project was supported by grants SVV UK 260 063 and 260 062, Charles University grant Nr.17/2012/UNCE and the GA ČR Nr. P303/11/1907.