



Středoškolská technika 2023

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

IZOLACE ALKALOIDŮ *ZEPHYRANTES CANDIDA* (LINDL.) HERB. A JEJICH NEUROPROTEKTIVNÍ AKTIVITA

Štěpán Boudyš

První soukromé jazykové gymnázium

Brandlova 875, Hradec Králové

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracoval samostatně a použil jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Hradci Králové dne 25. února 2023

.....
Štěpán Boudyš

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval svému odbornému konzultantovi doc. PharmDr. Jakubu Chlebkovi za uvedení do problematiky, nesmírné množství cenných rad, trpělivosti a času, který mi věnoval jak v laboratořích, tak i při psaní práce.

Poté bych rád poděkoval akademickým pracovníkům Katedry farmakognozie a farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za přátelské prostředí, které zde v průběhu mých laboratorních prací probíhalo.

Dále chci poděkovat RNDr. Michalu Hruškovi, který mi pomohl s finální korekturou práce a za pomoc při vybírání tématu.

V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině za podporu při psaní práce.

Anotace

Tato práce se zabývá izolací sekundárních metabolitů rostlin (alkaloidů) z rostliny *Zephyrantes candida* (Lindl.) Herb. Teoretická část se zabývá fytochemií druhu *Zephyrantes candida* (Lindl.) Herb. a následnému využití těchto alkaloidů při farmakoterapii Alzheimerovy choroby. Praktická část se zabývá izolací těchto alkaloidů a následně testováním na potenciální neuroprotektivní aktivitu. Alkaloidy byly izolovány z frakce ZC EE 39-45, která byla pomocí flash chromatografie separována na 101 frakcí. Pomocí TLC analýzy byl následně určen postup další separace, kdy byly jednotlivé frakce slity do 11 podfrakcí. Tento proces byl opakován, až bylo získáno 7 konečných frakcí. Pomocí GC-MS a NMR analýzy byly stanoveny 3 frakce s téměř čistými alkaloidy. Izolovanými alkaloidy byly lykorin, tazettin a nortazettin. Alkaloidy lykorin a tazettin již byly dříve na biologickou aktivitu testovány, proto byla změřena neuroprotektivní aktivita pouze u nortazettinu. Alkaloid nortazettin byl následně otestován na biologickou aktivitu, kdy se ukázala jeho neaktivita vůči lidským cholinesterázám a prolyloligopeptidáze.

Klíčová slova

Zephyrantes candida, *Amaryllidaceae*, izolace, Flash chromatografie, Alzheimerova choroba, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, prolyloligopeptidáza.

Annotation

This work deals with the isolation of secondary plant metabolites (alkaloids) from the plant *Zephyrantes candida* (Lindl.) Herb. The theoretical part deals with the phytochemistry of *Zephyrantes candida* (Lindl.) Herb. and the subsequent use of these alkaloids in the pharmacotherapy of Alzheimer's disease. The practical part deals with the isolation of these alkaloids and subsequent testing for potential neuroprotective activity. The alkaloids were isolated from the ZC EE 39-45 fraction, which was separated into 101 fractions by flash chromatography. A further separation procedure was subsequently determined using TLC analysis, where individual fractions were lysed into 11 subfractions. This process was repeated until 7 final fractions were obtained. Using GC-MS and NMR analysis, 3 fractions with nearly pure alkaloids were determined. The alkaloids isolated were lycorine, tazettine and nortazettine. The alkaloids lycorine and tazettine have been previously tested for biological activity, therefore neuroprotective activity was measured only for nortazettine. The alkaloid nortazettin was subsequently tested for biological activity, showing its inactivity against human cholinesterases and prolyl oligopeptidase.

Keywords

Zephyrantes candida, *Amaryllidaceae*, isolation, Flash chromatography, Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, prolyl oligopeptidase.

Seznam zkratk

| | |
|---------------|--|
| AAs | amarylkovité alkaloidy |
| TLC | tenkovrstvá chromatografie |
| GC | plynová chromatografie |
| MS | hmotnostní spektrometrie |
| NMR | nukleární magnetická rezonance |
| WHO | Světová zdravotnická organizace |
| AD | Alzheimerova choroba |
| ACh | acetylcholin |
| CNS | centrální nervová soustava |
| ChAT | cholinacetyltransferáza |
| AChE | acetylcholinesteráza |
| BuChE | butyrylcholinesteráza |
| FDA | Úřad pro kontrolu potravin a léčiv |
| A β | β -amyloid |
| APP | amyloidní prekurzorový protein |
| sAPP α | solubilní fragment APP po štěpení α -sekretázou |
| CTF | C-terminální fragment APP |
| GSK-3 β | glykogen syntáza kináza-3 β |
| BACE | β -sekretáza |
| POP | prolyloligopeptidáza |
| NFTs | neurofibrilární klubka |
| CDK5 | cyklin-dependentní kináza 5 |
| ATChI | acetylthiocholin jodid |
| BTChI | butyryllthiocholin jodid |
| NFTs | neurofibrilární klubka |

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Úvod..... | 9 |
| 2 | Cíle práce..... | 10 |
| 3 | Teoretická část..... | 11 |
| 3.1 | Rostliny čeledi amarylkovité (<i>Amaryllidaceae</i>)..... | 11 |
| 3.1.1 | Taxonomické řazení a klasifikace..... | 11 |
| 3.1.2 | Botanická charakteristika čeledi..... | 11 |
| 3.1.3 | Amarylkovité alkaloidy a jejich biosyntéza..... | 11 |
| 3.2 | Rod <i>Zephyrantes</i> Herb..... | 14 |
| 3.2.1 | Botanická charakteristika..... | 14 |
| 3.2.2 | <i>Zephyrantes candida</i> (Lindl.) Herb..... | 14 |
| 3.3 | Fytochemie rodu <i>Zephyrantes</i> Herb..... | 15 |
| 3.3.1 | Lykorinový typ..... | 15 |
| 3.3.1 | Haemanthaminový typ..... | 16 |
| 3.3.2 | Krininový typ..... | 17 |
| 3.3.3 | Pankratistatinový typ..... | 17 |
| 3.3.4 | Galanthaminový typ..... | 18 |
| 3.3.5 | Homolykorinový typ..... | 19 |
| 3.3.6 | Plikaminový typ..... | 19 |
| 3.3.7 | Sekoplikaminový strukturní typ..... | 20 |
| 3.3.8 | Další strukturní typy..... | 20 |
| 3.4 | Amarylkovité alkaloidy a jejich aktivita vztažená k Alzheimerově chorobě..... | 21 |
| 3.4.1 | Inhibice cholinesteráz..... | 21 |
| 3.4.2 | Produkce β -amyloidu..... | 22 |
| 3.4.3 | Prolyloligopeptidáza (POP)..... | 23 |
| 3.4.4 | Glykogen syntáza kináza-3 β (GSK-3 β)..... | 24 |
| 4 | Experimentální část..... | 25 |
| 4.1 | Chemikálie a rozpouštědla, přístrojové vybavení..... | 25 |
| 4.1.1 | Seznam chemikálií a rozpouštědel..... | 25 |
| 4.1.2 | Adsorbenty pro chromatografii..... | 25 |
| 4.1.3 | Detekční činidlo..... | 25 |
| 4.1.4 | Vyvíjecí soustava pro tenkovrstevnou chromatografii..... | 25 |
| 4.1.5 | Pomocný materiál..... | 25 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.1.6 | Přístroje a programy pro izolaci a strukturní analýzu | 26 |
| 4.2 | Metodika | 26 |
| 4.2.1 | Odpařování frakcí, extraktu | 26 |
| 4.2.2 | Tenkvrstevná chromatografie (TLC) | 26 |
| 4.2.3 | Flash chromatografie | 27 |
| 4.2.4 | Krystalizace | 27 |
| 4.2.5 | GC-MS stanovení | 27 |
| 4.2.6 | NMR stanovení | 28 |
| 4.2.7 | Stanovení optické otáčivosti | 28 |
| 4.3 | Stanovení biologické aktivity | 28 |
| 4.3.1 | Chemikálie pro stanovení biologických aktivit, enzymy | 28 |
| 4.3.2 | Přístroje | 29 |
| 4.3.3 | Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity | 29 |
| 4.3.4 | Stanovení prolyloligopeptidasové inhibiční aktivity | 29 |
| 4.4 | Izolace alkaloidů | 30 |
| 4.4.1 | Flash chromatografie frakce ZC EE 39-45 | 31 |
| 4.4.2 | Izolace alkaloidů z frakce 19-26, 43-53 a 54-101 | 35 |
| 4.4.3 | Krystalizace přečištěných frakcí | 37 |
| 5 | Výsledky | 38 |
| 5.1 | Strukturní analýza studovaných molekul | 38 |
| 5.1.1 | Alkaloid SB-1 (tazetin) | 38 |
| 5.1.2 | Alkaloid SB-2 (nortazetin) | 39 |
| 5.1.3 | Alkaloid SB-3 (lykorin) | 40 |
| 5.2 | Výsledky biologické aktivity studovaných molekul | 41 |
| | Tabulkové výsledky aktivity AChE, BChE, POP | 41 |
| 6 | Diskuse | 42 |
| 7 | Závěr | 43 |
| 8 | Seznam obrázků a tabulek | 44 |
| 9 | Přehled použitých zdrojů | 45 |
| 10 | Přílohy práce | 47 |

1 ÚVOD

Rostliny doprovázejí lidstvo již od nepaměti. Lidé již od dávných dob hledají látky, které by jim pomohly. Rostliny našly uplatnění nejen z hlediska potravinářského jako zdroj plodin, ale i pro jejich léčivé účinky, které byly postupně objevovány. S poznáváním biologických aktivit obsahových látek rostlin souvisí i rozvoj metod umožňující izolace čistých, biologicky aktivních substancí. Pouze 30 % všech nových molekul uvedených na trh v období mezi lety 1981-2006 byly čistě syntetického původu, všechny ostatní byly látky přírodního původu nebo se jednalo o substance, které jsou od látek přírodního původu odvozené. Tyto statistiky dále ukazují, že počet nových chemických sloučenin uváděných na trh každoročně klesá. Vysoké náklady a dlouhá doba trvání uvedení nových léčiv na trh, jakož i skutečnost, že pro většinu závažných onemocnění jsou již k dispozici kvalitní léky, brání farmaceutickému průmyslu ve vývoji nových léčiv. Nicméně s rostoucími požadavky lidstva stoupá i úsilí ve vývoji nových, kvalitnějších léků. Je zřejmé, že přírodní látky jsou stále nejvýznamnějším zdrojem pro vývoj nových léčiv.^{1,2} Jejich bohatá strukturní a početní rozmanitost zodpovídá za biologickou aktivitu. Sekundární metabolity rostlin představují velmi významnou skupinu obsahových látek rostlin. Mezi nejvíce zastoupené metabolity rostlin patří alkaloidy, které představují sloučeniny velice atraktivních pro farmaceutický průmysl.³

Tato práce se zabývá izolací amarylkovitých alkaloidů, tj. alkaloidů rostlin čeledi *Amaryllidaceae* (AAs), které zahrnují látky s velice rozmanitou strukturou. První zmínky o využití rostlin z této čeledě se datují do doby působení Hippokrata z Kóu, který již ve 4. století př. n. l. použil extrakt z narcisu *Narcissus poeticus* na bázi olejové emulze na léčbu nádorů v oblasti dělohy. Do dnešní doby je známo kolem 500 alkaloidů z této čeledi a stále se objevují nové, dosud neobjevené látky. Tyto alkaloidy se vyskytují v celé rostlině, nicméně největší koncentrace těchto látek se nachází v cibulích rostlin. AAs vykazují antibakteriální i antivirotické účinky a ovlivňují důležité enzymy. Dále vykazují cytotoxickou aktivitu vůči nenádorovým eukaryotickým buňkám, tak i nádorově transformovaným.⁴ Nejvýznamnějším alkaloidem z čeledi Amarylkovité je alkaloid galanthamin, který je selektivní a reverzibilní inhibitor acetylcholinesterázy, který zvyšuje hladinu acetylcholinu v krvi a mozku, a proto se používá při léčbě Alzheimerovy choroby. Používáním galanthaminu vzrostl zájem o výzkum nových potenciálních sloučenin, které by vykazovaly podobné účinky jako právě galanthamin. Studie prokázaly, že alkaloidy narciklasinového, lykorinového, krininového a haemanthaminového strukturního typu mají významné cytotoxické účinky a představují zdroj potenciálních nových léčiv s protinádorovým účinkem.^{4,5}

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce byla izolace alespoň jednoho alkaloidu v čisté formě z extraktu druhu *Zephyranthes candida* (Lindl.) Herb. (Amaryllidaceae) za účelem jeho strukturní analýzy a případně testování na vybranou neuroprotektivní aktivitu.

1. Izolace alkaloidu běžnými chromatografickými metodami (TLC, flash chromatografie, krystalizací)
2. Podíl na strukturní analýze izolovaných látek (příprava analytu pro GC-MS, NMR analýzu)
3. Podíl na stanovení biologické aktivity izolované sloučeniny (vážení vzorků na testování inhibice lidských cholinesteráz)
4. Sběr, analýza a vyhodnocení dosažených výsledků

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Rostliny čeledi amarylkovité (*Amaryllidaceae*)

3.1.1 Taxonomické řazení a klasifikace

Říše: rostliny (*Plantae*)

Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheophyta*)

Oddělení: krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: jednoděložné (*Liliopsida*)

Řád: chřestotvaré (*Asparagales*)

Čeleď: amarylkovité (*Amaryllidaceae*)⁶

3.1.2 Botanická charakteristika čeledi

Amarylkovité jsou čeledí cibulovitých jednoděložných rostlin *Liliopsida*, řádu *Asparagales* pojmenována po rostlině rodu *Amaryllis*⁷ a zahrnuje přibližně 1100 druhů rostlin celkově klasifikovaných do 75 rodů.⁸ Rostliny z této čeledi jsou vytrvalé pozemní byliny převážně s cibulí, málokdy s oddenkem. Jsou rozšířené po celém světě, nicméně nejvíce se nachází v tropech a subtropích, hlavně v oblasti Jižní Ameriky.⁹

Tato čeleď má mnoho využití. Zejména je pěstována pro svoje okrasné účely. Nejčastěji se v ČR setkáváme s druhy rodu sněženka (*Galanthus*), bledule (*Leucojum*) a narcis (*Narcissus*) i např. s mnoha druhy česneků rodu *Allium*.⁹

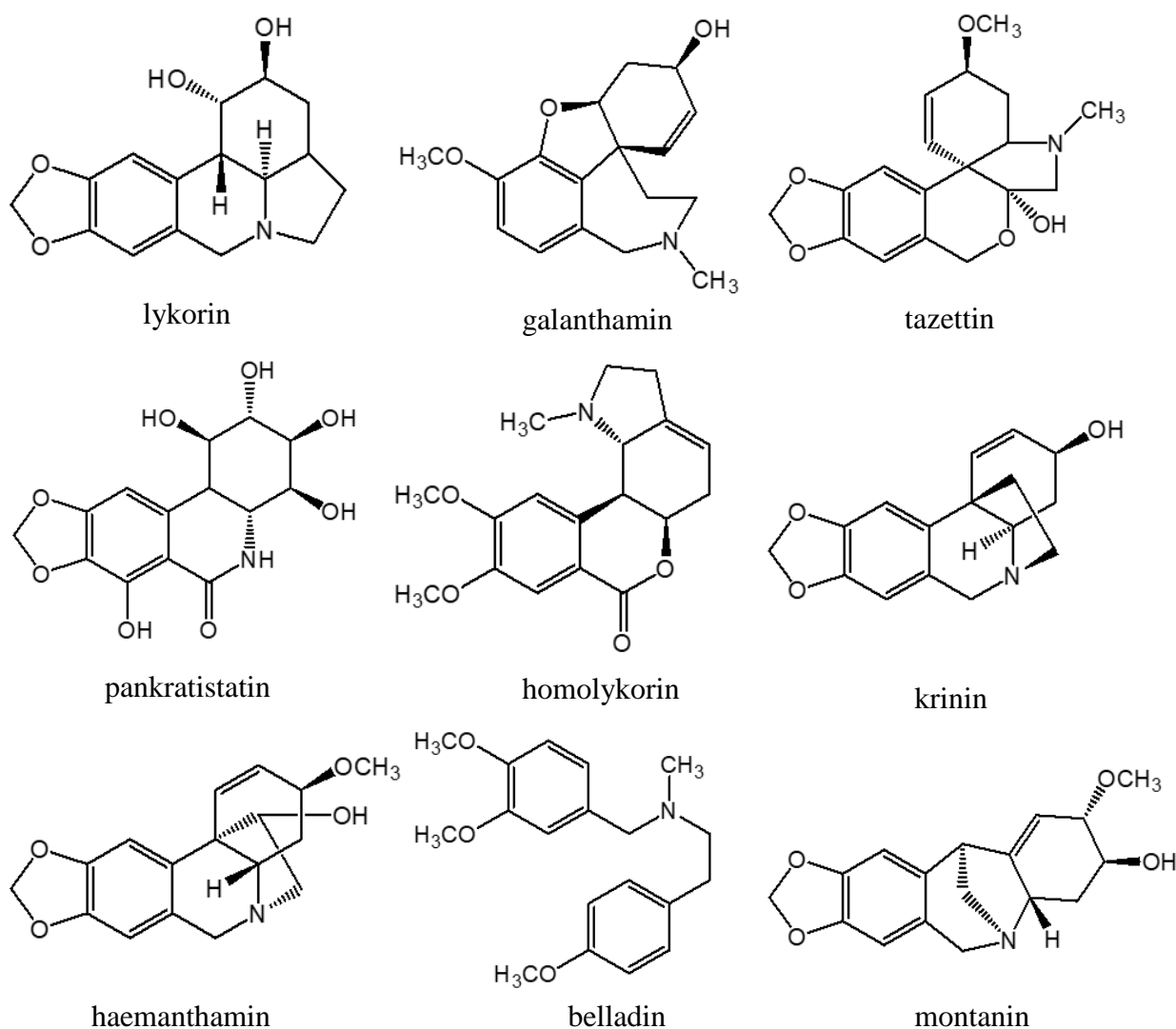
Rostliny této čeledi jsou atraktivní pro vědeckou činnost především díky svým obsahovým látkám s biologickými aktivitami, které byly dosud izolovány z rostlin všech rodů podčeledi *Amaryllidoideae*. Především jsou zkoumány pro obsah isochinolinových alkaloidů tzv. AAs, jak již bylo uvedeno dříve. Literatura popisuje významné biologické aktivity (inhibice cholinesteráz, cytotoxické, antifungální, antiprotozoální a další).⁸

3.1.3 Amarylkovité alkaloidy a jejich biosyntéza

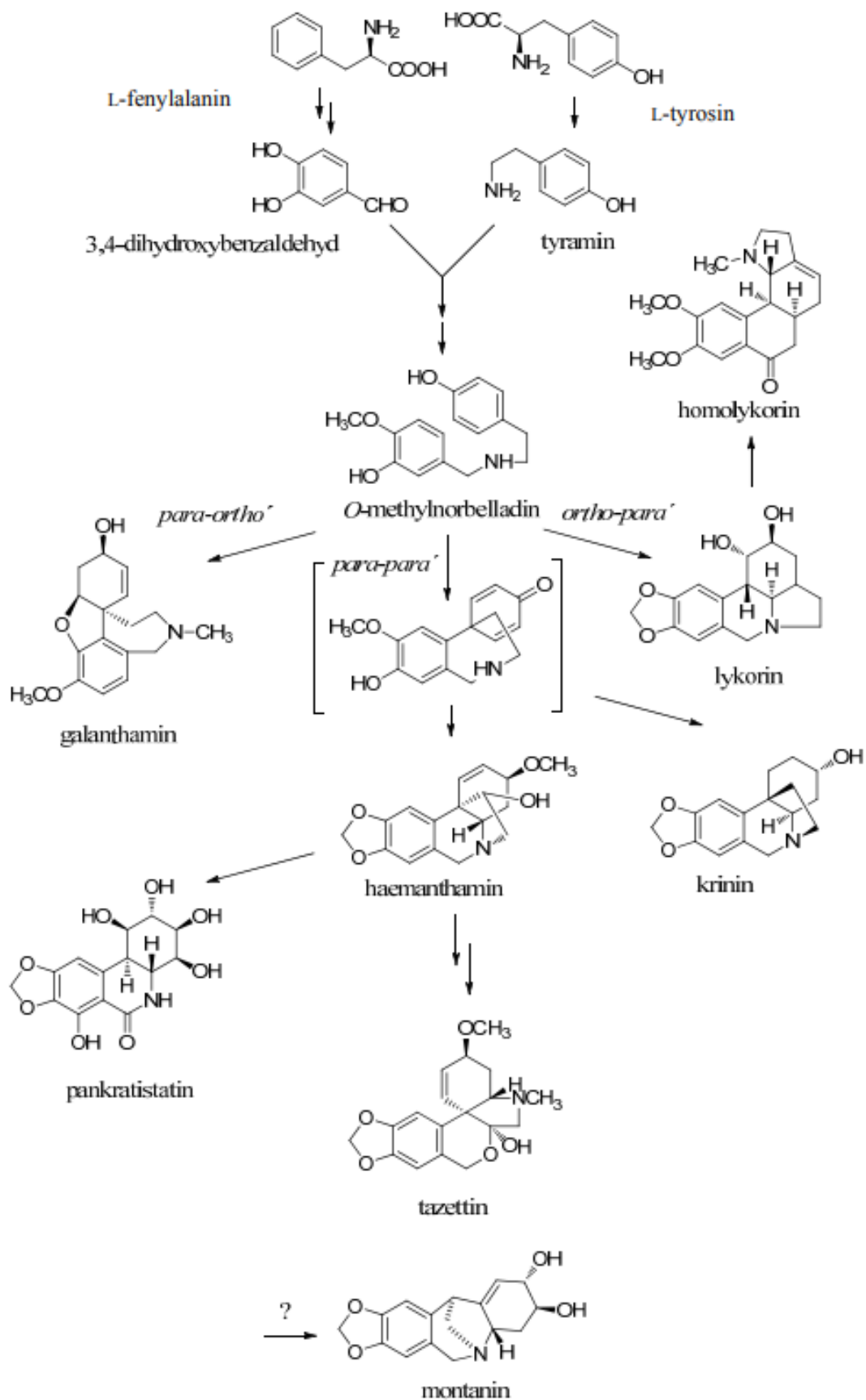
Obecně můžeme říct, že biosyntéza alkaloidů v rostlinách často začíná u kondenzace dvou derivátů aminokyselin za vzniku prekurzorového skeletu, který je vstupním bodem do komplexní biosyntetické dráhy. Po ní často následuje řada reakcí, jako jsou tvorba vazeb, přeskupení, zlomy, přidávání funkčních skupin a další modifikace, čímž vzniká široká škála rozmanitých alkaloidů. Biosyntéza AAs se řídí tímto obecným pořadím kroků. Ačkoli jsou AAs strukturně velmi rozmanité, má se za to, že mají společný biosyntetický původ v norbelladinu, který původně vznikl kondenzací derivátů aromatických aminokyselin L-fenylalaninu a L-

lysinu.¹⁰ Biosyntéza AAs se označuje jako tzv. norbelladinová cesta, při které vznikají alkaloidy z již zmíněných L-fenylalaninu a L-tyrosinu. L-tyrosin se poté mění na tyramin a L-fenylalanin na 3,4-dihydroxybenzaldehyd. Z tyraminu a 3,4-hydroxybenzaldehydu po několika reakčních stupních vzniká 4'-O-methylnorbelladin. Dále podle způsobu intramolekulárního oxidativního spojení vzniká sedm základních skeletů, jež jsou vždy pojmenovány po svém hlavním reprezentantovi. Nicméně dle strukturálních odlišností můžeme rozlišit alkaloidy až do devíti základních skupin: lykorinový (lykorin), galanthaminový (galanthamin), tazettinový (tazettin), pankratistatinový (pankratistatin), homolykorinový (homolykorin), krininový (krinin), haemanthaminový (haemanthamin) a belladinový (belladin) a montaninový (montanin) strukturální typ.⁴

U každého typu si uvedeme i příklad hlavního zástupce, po kterém je skupina pojmenována.



Obrázek 1 Zástupci jednotlivých strukturálních typů alkaloidů čeledi Amaryllidaceae¹⁴



Obrázek 2 Biosyntetická cesta alkaloidů do jednotlivých strukturních typů⁴

3.2 Rod *Zephyrantes* Herb.

3.2.1 Botanická charakteristika

Zephyrantes je rod cibulovitých trvalek z čeledi *Amaryllidaceae* a je jedním z 75 rodů této čeledi. Celkově tento rod tvoří až 90 druhů rostlin, nicméně pouze málo z nich bylo více studováno na přítomnost chemických složek. Bližší fytochemické studie rostlin tohoto rodu odhalily velkou rozmanitost sloučenin, zejména alkaloidů. Název rodu *Zephyrantes* je odvozen od slova *Zephyrus*, což z řečtiny znamená bůh západního větru a *Anthos* znamenající květinu. Běžná jména pro rostliny tedy mohou být: fairy lily (čarovná lilie), rain flower (květ deště), zephyr lily (lilie vánku), magic lily (kouzelná lilie) a rain lily (dešťová lilie).¹¹

Rod *Zephyrantes* je původem z oblastí ve vyšších nadmořských výškách, např. v Mexiku a Argentině, kde se vyskytují druhy s největší mrazuvzdorností. Rod *Zephyrantes* zdomácněl v různých oblastech světa, nyní se pěstuje jako okrasná rostlina např. v Indii, na Havaji, v Indonésii, Thajsku atd. Některé druhy tohoto rodu jsou široce rozšířené, zatímco některé jsou omezeny na malou zeměpisnou oblast. Obecně jsou tyto rostliny rozšířeny v mírných až tropických oblastech světa.¹¹

Cibule *Zephyrantes* jsou kulaté nebo vejčité, pokryté hnědou či černou tunikou. V závislosti na druhu jsou cibule velké od 2,5 cm do více než 5 cm v průměru. Listy jsou čárkovité, tvoří světlé travnaté zelené až šedivé listy, jejich velikost je opět závislá na druhu rostliny. Stvol je štíhlý, dutý a bez listů s jedním (zřídka šesti) květy na vrcholu. Květy jsou nálevkovité a mají šest okvětních lístků, jenž mají tendenci kvést po silných deštích zejména na jaře a v létě, proto jsou pojmenovány jako rain lily (dešťové lilie). Nejčastěji jsou bílé, růžové nebo žluté – u hybridních druhů se můžeme setkat i s červenými, oranžovými a mnohobarevnými květy. Často jsou květy tohoto rodu osamělé, skloněné, rovné, vztyčené vzhůru a mají stejně dlouhé tyčinky. Semena jsou klínovitého tvaru či tvaru písmene D^{11,12}

3.2.2 *Zephyrantes candida* (Lindl.) Herb.

Tato rostlina (obr. 3) původem z Jižní Ameriky se vyskytuje v severní Argentině, Uruguayi, Paraguayi a jižní Brazílii. V těchto oblastech se pěstuje jako okrasná rostlina, odkud se rozšiřovala do okolní krajiny. Takto se tento druh dostal i do jihovýchodních USA, o jižní Číny, do Japonska, a dokonce až na Nový Zéland. Dnes patří k nejrozšířenějším druhům rodu *Zephyrantes*.

Většinou roste v pobřežních oblastech, na písčitých půdách, často se s ní můžeme setkat v okolí lidských sídel, roste až do nadmořských výšek 500 m n. m. Doba kvetení je v letních až podzimních měsících, na severní polokouli od července do listopadu.

Cibule *Zephyrantes candida* jsou v průměru velké až 2,5 cm. Listy má čárkovité, zkroucené, dlouhé 15-35 cm a široké 0,2-0,4 cm. Stvol je 10-25 cm dlouhý, kde na jeho vrcholu vyrůstá

jediný vzpřímený květ; toulec je blanitý, červenohnědý, přibližně 2,5 cm dlouhý; okvěti je nálevkovité, trubka je až 1,4 cm dlouhá, zelená, kratší než toulec, okvětní cípy jsou vejčité, bílé, někdy vně narůžovělé, dlouhé 3-5 cm. Tyčinek je 6, jsou stejné, nitky jsou 10-15 mm dlouhé, prašníky dlouhé 4,5-8 mm. Čnělka je štíhlá, blizna trojlaločná. Plodem je tobolka, která může dosahovat až 10 mm v průměru.¹³



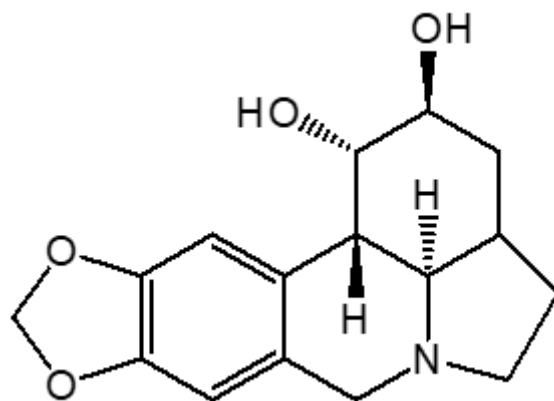
Obrázek 3 *Zephyrantes candida* (Lindl.) Herb.¹³

3.3 Fytochemie rodu *Zephyrantes* Herb.

Z fytochemického hlediska uvádím 4 strukturní typy alkaloidů rodu *Zephyrantes* Herb., které jsou pro rozvoj potenciálních nových léčiv nejpodstatnější. U dalších typů si uvedeme pouze zástupce.

3.3.1 Lykorinový typ

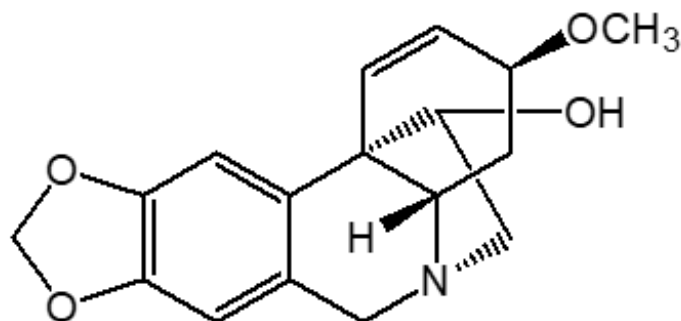
Hlavním představitelem této skupiny je lykorin, který byl izolován z narcisu žlutého (*Narcissus pseudonarcissus*) v roce 1877 jako vůbec první alkaloid rostlin čeledi Amaryllidaceae. Struktura lykorinu byla poprvé popsána až o několik desítek let později (1956). Lykorin je znám pro své biologické vlastnosti. V rostlinách má schopnost inhibovat syntézu kyseliny askorbové za potlačení aktivity terminálního enzymu galaktodehydrogenasy, který přeměňuje L-galaktono- γ -lakton na kyselinu askorbovou. Vykazuje významnou cytotoxickou aktivitu.⁴



Obrázek 4 Struktura molekuly lykorinu¹⁴

3.3.1 Haemanthaminový typ

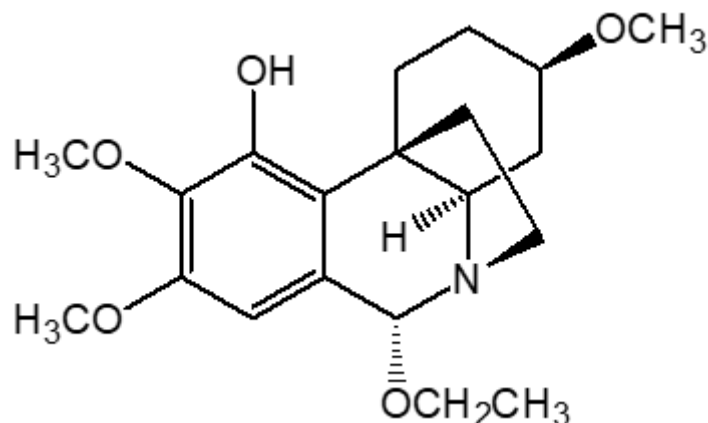
Do této skupiny patří např. haemanthamin, haemathidin, krinamin, maritidin a papyramin. Všechny tyto zmíněné alkaloidy mají jinou schopnost inhibovat růst nádorových buněk. Z hlediska protinádorové aktivity je hemanthamin považován za nejúčinnější látku s cytotoxickou aktivitou vůči nádorovým buňkám. Ze studií vyplývá, že haemanthamin má schopnost iniciovat apoptózu (jeden z typů buněčné smrti) u nádorových buněk potkaního hepatocelulárního karcinomu 5123tc, nicméně nepůsobí cytotoxicky vůči liniím lidských embryonálních buněk ledvin HEK 293T ve stejných koncentracích.⁴



Obrázek 5 Struktura molekuly haemanthaminu¹⁴

3.3.2 Krininový typ

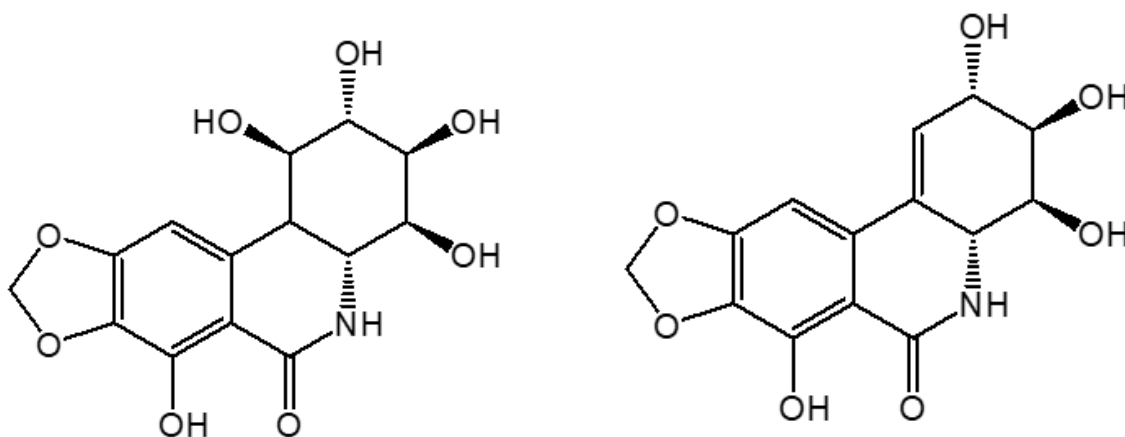
Příkladem alkaloidu krininového typu, který byl v rodu *Zephyrantes* izolován, je 6 α -hydroxyhippeastidin.¹⁴



Obrázek 6 Struktura molekuly 6 α -hydroxyhippeastidinu¹⁴

3.3.3 Pankratistatinový typ

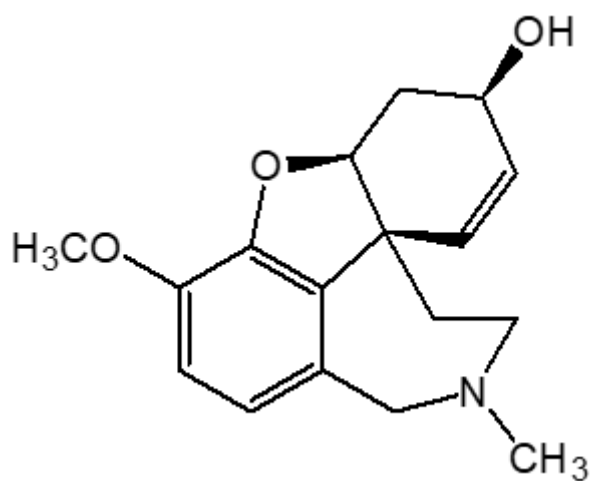
Alkaloidy z této skupiny jsou deriváty odvozené od molekuly fenanthridinu. Látky, které upoutaly pozornost z hlediska jejich cytotoxické aktivity jsou alkaloidy narciklasin a pankratistatin. Alkaloid narciklasin byl poprvé izolován v roce 1967 z cibule narcisu rodu *Narcissus*. Hlavním účinkem, který byl nalezen u narciklasinu, je jeho antimitotické působení – zabraňuje dalšímu dělení buněk s účinkem na buňky eukaryotních organismů srovnatelným s působením kolchicinu, vysoce toxického alkaloidu.⁴



Obrázek 7 Struktura alkaloidů, vlevo narciklasin. vpravo pankratistatin¹⁴

3.3.4 Galanthaminový typ

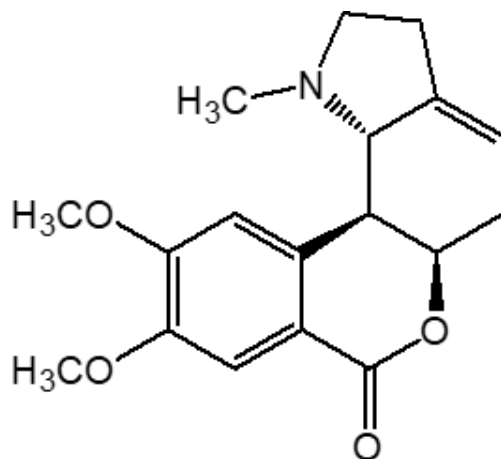
Všechny alkaloidy tohoto typu mají jako základní strukturní molekulu dibenzofuran. Nejpodstatnějším alkaloidem z této skupiny jakožto léčivo je alkaloid galanthamin. Galanthamin byl poprvé získán z cibule sněženky *Galanthus woronowii* a později i s dalších rostlin rodu *Galanthus*. Fyziologicky a biologicky významná aktivita tohoto alkaloidu byla poprvé objevena bulharskými farmakology na počátku 50. let minulého století. Od té doby se látka začala podrobně studovat a využívat k terapii neurologických poruch jako myasthenia gravis, dětská obrna nebo různé typy demence. Nicméně v dnešní době je ho nejvíce využíváno při léčbě Alzheimerovy choroby. Bylo zjištěno, že při terapii tímto alkaloidem dochází ke zlepšení kognitivních, funkčních i behaviorálních symptomů. Velkou výhodou galanthaminu je jeho selektivní inhibice AChE. Butyrylcholinesterázu (BChE) inhibuje 53× slaběji než AChE.⁴



Obrázek 8 Struktura molekuly galanthaminu¹⁴

3.3.5 Homolykorinový typ

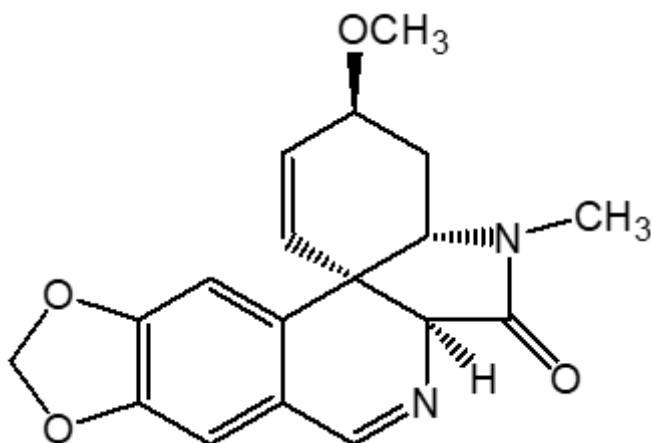
Pro tento typ si uvedeme hlavního představitele, alkaloid homolykorin.



Obrázek 9 Struktura molekuly homolykorinu¹⁴

3.3.6 Plikaminový typ

Pro tuto skupinu si uvedeme vybraného zástupce – plikan. Alkaloid vychází z molekuly tazettinu, kde je nahrazen kyslík v poloze 7 za atom dusíku.¹⁴



Obrázek 10 Struktura molekuly plikanu¹⁴

3.4 Amarylkovité alkaloidy a jejich aktivita vztažená k Alzheimerově chorobě

Alzheimerova choroba (AD) je chronické, progresivní a nevratné neurodegenerativní onemocnění mozku, které je považováno za nejčastější typ demence. K roku 2020 postihovala AD více než 36 milionů pacientů na celém světě a její prevalence se stále zvyšuje v důsledku stárnutí populace. Světová zdravotnická organizace (WHO) odhaduje, že bude více než 131 milionů případů lidí trpících Alzheimerovou chorobou do roku 2050; zdá se tedy, že AD je jedním z největších zdravotních problémů v nadcházející budoucnosti a hledání nové a účinné terapie AD je v současné době naléhavě zapotřebí.¹⁵

Ačkoli v současné době není etiologie AD plně objasněna, objevilo se velké množství potenciálních terapeutických zásahů, které jsou určeny k nápravě ztráty presynaptické cholinergní funkce. Několik z těchto látek potvrdilo účinnost při oddálení zhoršování příznaků nemoci Alzheimerovy choroby, což je cenná léčba vzhledem k progresivní povaze této nemoci je to velmi důležitý dílčí cíl léčení tohoto onemocnění.¹⁶

3.4.1 Inhibice cholinesteráz

Acetylcholin (ACh) je ester cholinu a kyseliny octové, který slouží jako přenašeč nervových vzruchů v centrální nervové soustavě (CNS). Acetylcholin je hlavním neurotransmiterem např. parasympatického nervového systému, části autonomního nervového systému (větve periferního nervového systému), která stahuje hladké svaly, rozšiřuje cévy, zvyšuje tělesnou sekreci a zpomaluje srdeční tep. Může stimulovat reakci nebo blokovat reakci, vykazuje tedy excitační nebo inhibiční účinky.¹⁷

Mezi nejstarší teorie objasňující vznik AD se řadí cholinergní hypotéza. U AD je porušen metabolismus ACh, kdy dochází ke snížení hladiny cholinacetyltransferázy (ChAT), enzymu zodpovědného za syntézu ACh. Dále je sníženo zpětné vychytávání cholinu a tvorba ACh.¹⁶ U zdravého člověka převažuje acetylcholinesteráza (AChE), která postupně odbourává ACh, přičemž butyrylcholinesteráza (BuChE) hraje v regulaci mozkového acetylcholinu podružnou roli. Aktivita BuChE u pacientů s AD se však postupně zvyšuje, zatímco aktivita AChE zůstává nezměněna nebo klesá. Oba enzymy proto představují legitimní terapeutické cíle pro zmírnění cholinergního deficitu, který je považován za závažný.¹⁸ Z tohoto hlediska by bylo vhodné najít látku, která by byla inhibítoem jak AChE, tak i BuChE.¹⁹

Hlavní metodou při navrhování léčiv je inhibice enzymové aktivity. Schopnost přesně změřit koncentraci inhibitoru, která je potřebná k inhibici dané biologické nebo biochemické funkce na polovinu, je při řazení sloučenin velmi důležitá. Vzhledem k tomu, že koncept poloviční maximální inhibiční koncentrace (IC_{50}) je hojně používán pro studium reverzibilních inhibičních enzymatických reakcí, je důležité pochopit plán experimentu a jeho výsledky.²⁰ Hodnota IC_{50} udává koncentraci, která je potřebná k inhibici dané biologické nebo jiné

koncentrace biochemickou funkci na polovinu. Jinými slovy, velké hodnoty IC_{50} označují inhibitory, které s enzymem interagují méně účinně než inhibitory, které mají malé hodnoty IC_{50} .²⁰

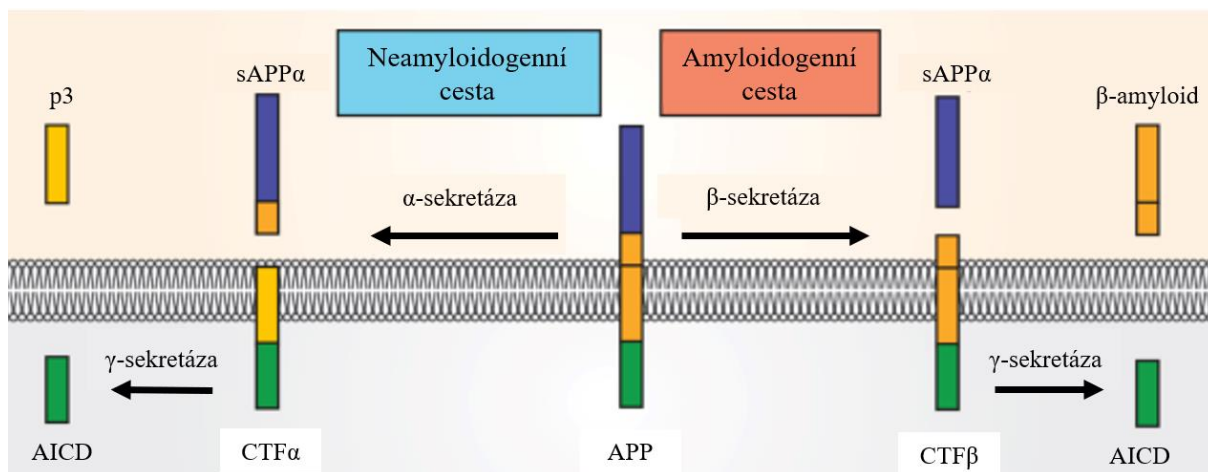
Pro symptomatickou léčbu AD jsou v současnosti v Evropě a USA schválená léčiva (inhibitory cholinesteráz) donepezil, rivastigmin a galantamin ve formě hydrobromidu (léčivý přípravek Reminyl), který byl schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) jako lék na předpis díky své vysoké inhibiční účinnosti a reverzibilní i selektivní aktivitě vůči AChE. V porovnání s většinou alkaloidů z čeledi *Amaryllidaceae* vykazuje galanthamin hodnotu $IC_{50} = 1,5 \mu M$, což více než 20krát převyšuje inhibiční účinnost ostatních alkaloidů. Ovšem existují i nějaké výjimky, kdy sanguinin (9-hydroxyderivát galanthaminu) vykazuje 10krát vyšší aktivitu, než galanthamin.⁸ Na druhou stranu ztráta methylové skupiny na atomu dusíku u alkaloidu epinorgalanthaminu vede k téměř desetinásobnému snížení aktivity.⁵

3.4.2 Produkce β -amyloidu

Další hypotézou, která napomáhá k vysvětlení AD je tzv. hypotéza amyloidní kaskády, podle které je ukládání β -amyloidu ($A\beta$) jedním z klíčových patogenetických faktorů vzniku AD. $A\beta$ vzniká postupným štěpením transmembránového amyloidního prekurzorového proteinu (APP) prostřednictvím skupin enzymů označovaných jako α -, β -nebo γ -sekretáza. Při štěpení proteinu APP α -sekretázou se uvolňuje sAPP α (solubilní fragment APP po štěpení α -sekretázou) a C-terminální fragmenty (CTF). Tím je znemožněna tvorba $A\beta$ v důsledku štěpení, ke kterému dochází uvnitř oblasti $A\beta$. Proto je tato cesta známá jako neamyloidogenní. Při amyloidogenní cestě vzniká $A\beta$, když se prekurzovaný protein štěpí pomocí β -sekretázy (BACE: enzym štěpící APP v místě β) v N-terminální doméně, čímž se uvolní rozpustný N-terminální fragment (sAPP β) a zbývající C-terminální fragment (β -CTF) štěpený BACE. Následuje ještě poslední štěpení pomocí γ -sekretázy, které probíhá v poloze 40 nebo 42 proteinu čímž vzniká amyloid- β 40 ($A\beta$ 40) nebo amyloid- β 42 ($A\beta$ 42)²¹

$A\beta$ 42 je však považován za toxickejší formu a snáze agreguje. Proto je $A\beta$ 42 nejhojnější izoformou v amyloidních placích. Kromě parenchymového ukládání $A\beta$ v mozku se depozita $A\beta$ nacházejí také v mozkových cévách. K ukládání amyloidu dochází nejprve v arteriolách pia mater (omozečnice) obklopujících mozek a následně se šíří do kortikálních arteriol, kapilár a cév v dalších oblastech mozku. Toto postupné hromadění $A\beta$ v cévách vede k mozkové amyloidové angiopatii (CAA), ačkoli její rozsah se může u jednotlivých mozků s AD lišit a její patofyziologický podíl na vzniku a rozvoji progresi onemocnění zůstává nejasný.²¹

Z uvedených informací vyplývá, že β - a γ -sekretáza se zdají jakožto potenciální cíle pro vývoj nových léčiv, které by se uplatnily při terapii AD. Nutno zmínit, že se γ -sekretáza účastní mnoha pochodů a při její inhibici dochází k velkému počtu závažných vedlejších účinků, a proto je vhodné hledat zejména inhibitory BACE.²²



Obrázek 13 Produkce beta-amyloidu²¹

3.4.3 Prolyloligopeptidáza (POP)

Prolyloligopeptidáza (POP) je hojně zastoupená proteáza v mozku a na periférii, kde štěpí molekuly, které obsahují prolin. Fyziologické funkce POP jsou dosud z velké části neznámé. Dříve byla POP spojována s procesy učení a paměti díky své poměrně unikátní substrátové specifitě vůči určitým bioaktivním peptidům obsahujícím prolin, které se podílejí na učení a paměti, a byly syntetizovány četné farmakologické inhibitory POP s hlavním cílem vyvinout antiemetické léky (látky tlumící zvracení). Avšak navzdory některým slibným výsledkům i v klinických studiích se inhibitory POP dosud nedostaly na trh, pravděpodobně kvůli nedostatečné účinnosti a také neúplnému pochopení fyziologických funkcí tohoto enzymu.²³

POP je také spojována s neurodegenerativními procesy, protože *post mortem* byla pozorována změna aktivity POP v mozku u několika neurodegenerativních onemocnění, včetně AD, Parkinsonovy choroby, Huntingtonovy choroby a roztroušené sklerózy.²³ U pacientů s těmito onemocněními bylo nalezeno, že se tento enzym nachází společně s amyloidními plaky a fosforylovaným τ -proteinem, nicméně stále se nepodařilo plně objasnit, jakou roli má POP při tvorbě $A\beta$. Při jedné studii byl proveden screening proteáz, které jsou schopné produkovat $A\beta$ z APP, kdy POP byla zahrnuta také. Vzhledem k omezení velikosti spojené se substrátem POP je nepravděpodobné, že by POP mohl štěpit APP *in vivo*, ale byl prokázán významný pokles fragmentů $A\beta$ (1-16) po léčbě inhibitorem POP, Y-29794, v myším mozku akcelerovaném senescencí. Ačkoli se výsledky projeví jako nadějně, mechanismus zůstal nejasný a další studie nebyly provedeny. Dalo by se uvažovat, že již rozštěpené krátké peptidy pocházející z APP by mohly být potenciálními substráty POP.²⁴

Ačkoliv byla POP široce studována, co by možný terapeutický cíl v léčbě AD, stále nebylo plně objasněno, zdali existuje souvislost mezi τ -proteinem a POP. Některé nedávné studie ovšem tvrdí, že u vzorků mozkové tkáně pacientů s AD *post-mortem* je možnost, že by mohla POP napomáhat k agregaci τ -proteinu.²⁴

3.4.4 Glykogen syntáza kináza-3 β (GSK-3 β)

Pro širší pochopení neuropatologie AD je důležité zmínit i přítomnost neurofibrilárních klubek (NFTs), jenž jsou tvořeny zejména proteinem cytoskeletu známý jako τ -protein, který se zde nachází v hyperfosforylované formě. Protein τ je neuronální fosfoprotein který je zodpovědný za mikrotubulou stabilizaci neuronů. Fosforylace τ -proteinů je primárně závislá na GSK-3 β a cyklin-dependentní kináze 5 (CDK5). Genetické a epidemiologické studie naznačují, že GSK-3 β je u AD deregulována prostřednictvím změn v předřazených meziproduktech Wnt a inzulínové signální dráhy. Jinými slovy je tento jev příčinou hyperfosforylace proteinu τ , a tedy vznikají NFTs, které narušují axonální transport a blokují normální metabolismus neuronů, což vede k jejich odumírání. Poprvé byly alkaloidy izolovány z mořských hub a bylo zjištěno, že výrazně inhibují GSK-3 β . Je známo, že i některé AAs mají středně silnou schopnost inhibovat tento enzym, proto se hledají potenciální látky, které by mohly přispět na léčbu AD. Nutno dodat, že aktivita GSK-3 β v mozku pacientů s AD a jeho patologická aktivace usnadňuje tvorbu A β , který se zde hromadí.²⁵⁻²⁷

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie a rozpouštědla, přístrojové vybavení

4.1.1 Seznam chemikálií a rozpouštědel

- toluen p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha; To)
- ethyl-acetát p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha; EtOAc)
- methanol p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha; MeOH)
- dichlormethan p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha; DCM)
- hydroxid amonný (Ing. Švec – Penta, Praha; NH₄OH)
- kyselina chlorovodíková 35 % p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha; HCl)
- uhličitan sodný p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha; Na₂CO₃)

4.1.2 Adsorbenty pro chromatografii

- komerční analytické TLC desky Silica gel 60 GF₂₅₄ for TLC (Merck Millipore, Praha) o rozměrech 20 × 20 cm. Pro analytické účely byly použity desky o výšce 10 cm a variabilní šířce podle počtu analyzovaných vzorků a pro preparativní TLC byly použity desky o rozměru 10 × 20 cm.
- kartridž (PP kolona) naplněná sférickým silikagelem, částice 15 μm, 25 g (Interchim, Praha)
- polypropylenová předkolona (12×150 mm, Büchi, Švýcarsko)

4.1.3 Detekční činidlo

Dragendorffovo činidlo (podle Muniera) bylo připraveno jako zásobní roztok smísením roztoku A (1,7 g bazického dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné rozpuštěné v 80 ml vody) a roztoku B (roztok 32 g KI v 80 ml vody) v objemovém poměru 1:1. Detekční roztok byl připraven smísením 10 g kyseliny vinné rozpuštěné v 50 ml vody s 5 ml zásobního roztoku. Zásobní roztok i postřikové činidlo byly uchovávány v chladničce při teplotě 4 °C.

4.1.4 Vytvářející soustava pro tenkovrstevnou chromatografii

S1: To+EtAOac+MeOH (5:3:2)

4.1.5 Pomocný materiál

- křemelina Celite C 535 John's Manville (Sigma Aldrich, Praha), pro preparativní práci byla extrahována vodou a vysušena.
- sušící perly silikagelu (Ing. Švec – Penta, Praha)
- síran sodný bezvodý p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na₂SO₄)

4.1.6 Přístroje a programy pro izolaci a strukturní analýzu

- flash chromatografický systém Sepacore® obsahující 2 pumpy C 605, řídicí jednotku C 620, C 635 UV detektor a frakční kolektor C 660. Tento systém je řízen programem SepacoreControl 1.0 (Büchi Labortechnik, Flawil, Švýcarsko)
- spektrometr EI/MS na GC/MS systému Agilent 7890A GC 5975 inertní MSD; EI mód 70 eV; kolona HP-5 MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)
- spektrometr Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA)
- ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Germany)
- polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Germany)
- vakuová odparka Buchi Rotavapor R-114 (Buchi Labortechnik AG, Switzerland).
- statistický program GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2006)

4.2 Metodika

Výzkum se odehrával na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové, katedře Farmakognozie a farmaceutické botaniky. Experimentální část byla zpracována pod odborným dohledem doc. PharmDr. Jakuba Chlebka, PhD. Metody, které byly používány jsou všeobecně známy a používají se v chemických laboratořích pro izolaci čistých alkaloidních látek a poté na určení biologické aktivity izolovaných alkaloidů.

Následující kapitoly shrnují podrobný průběh všech metod, které byly po dobu experimentální části využívány. Autor práce se v průběhu experimentální části věnoval určení optické otáčivosti a všem separačním metodám, které jsou uvedené níže. Alkaloidy na GC-MS a NMR analýzu byly poslány na příslušné místo, kde byly látky následně identifikovány.

4.2.1 Odpařování frakcí, extraktu

Pro odpaření organických rozpouštědel z frakcí získaných Flash chromatografií nebo výtřepků byla použita poloprovozní vakuová odparka Laborota 20 Heidolph s teplotou vodní lázně 40–50 °C, podle použitého rozpouštědla, a tlakem 1,33 kPa.

4.2.2 Tenkovrstevná chromatografie (TLC)

Analýza probíhala v nasycených komorách na komerčních analytických deskách se silikagelem vzestupným provedením. Analyzované vzorky rozpuštěné v organickém rozpouštědle (analyty) se nejprve nanasely skleněnou kapilárou na start desky, rozpouštědla byla odstraněna zahříváním fénem a po ochladnutí byly TLC desky umístěny do uzavřené nasycené vyvíjející komory. Po dosažení vyvíjející soustavy čela desky byly chromatogramy po všech TLC analýzách vždy nejprve vysušeny a následně detekovány vizuálně pod UV lampou za použití dvou vlnových délek ($\lambda = 254 \text{ nm}$ a $\lambda = 366 \text{ nm}$). Všechny viditelné zóny byly označeny tužkou. Chromatogramy s takto označenými zónami byly následně detekovány postříkem

Dragendorffovým činidlem. Postřik TLC desek probíhal po jejich vysušení a v přítomnosti alkaloidů se na chromatografické desce objevily intenzivně oranžové skvrny v případě pozitivní reakce s Dragendorffovým činidlem.

4.2.3 Flash chromatografie

Alkaloidy byly separovány Flash chromatografií metodou eluce látek z tzv. pevného vzorku, který se musel nejprve připravit. Příprava pevného vzorku (navázání látek na adsorbent) probíhala následujícím způsobem. Nejprve se frakce rozpustila ve směsi MeOH a DCM. Tento roztok se umístil na odpařovací misku spolu s 2násobným množstvím silikagelu v poměru 2:1 k hmotnosti frakce. Odpařování rozpouštědla probíhalo za stálého míchání skleněnou tyčinkou na vodní lázni při teplotě 50 °C. Stopy rozpouštědla v suchém pevném vzorku byly odstraněny v exsikatoru nad sušícími perlami silikagelu za sníženého tlaku po dobu několik hodin.

Flash chromatografie probíhala elucí alkaloidů mobilní fází z pevného vzorku umístěného ve polypropylenové předkoloně (12×150 mm, Büchi) a následné separaci na polypropylenové koloně (kartridži 25 g) plněnou aktivním silikagelem (15 µm).

4.2.4 Krystalizace

Krystalizace alkaloidu probíhala za horka rozpuštěním dané frakce v příslušném rozpouštědle (MeOH) a zahříváním na vodní lázni (ca 90 °C) pod zpětným chladičem. Nasycený roztok obsahující rozpuštěnou látku po ochlazení vedl ke tvorbě krystalů, které byly pomocí pipety přeneseny na skleněnou fritu a promyty čistým MeOH. Vysušení krystalů probíhal v exikatoru za sníženého tlaku po dobu 24 hodin.

4.2.5 GC-MS stanovení

Pro identifikaci alkaloidů v extraktu byla použita GC-MS analýza. Tato analýza probíhala za pomoci plynového chromatografu Agilent 7890A GC s hmotnostním detektorem Agilent 5975. Kolonou byla DP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µ) od výrobce Agilent Technologies Santa Clara, Kalifornie, USA. Teplotní program byl následující: nejprve se nastavila teplota 100 °C po dobu 1 minuty, která se postupně zvyšovala o 15 °C za minutu, dokud nebyla dosažena teplota 180 °C, tato teplota se udržovala 1 minutu. Pak se rychlost zvyšování teploty zpomalila na 10 °C za minutu do dosažení teploty 300 °C, tato teplota se udržovala 12 minut. Jako nosný plyn bylo použito Helium 5.0 s rychlostí průtoku 1 ml za minutu. Nástrík byl proveden při teplotě injektoru 270 °C a splitu v poměru 1:10. Objem vzorku (MeOH roztoku alkaloidního extraktu) byl 1 µl s koncentrací 0,2 mg/ml. Detekční rozmezí bylo m/z 50-500 (hmotnost iontu lomeno jeho náboj) při teplotě detektoru 305 °C a elektronové ionizaci 70 eV. Analýza struktur alkaloidů se porovnávala s dostupnými spektry v komerční knihovně spekter NIST11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA) a s daty v literatuře. Pomocí GC-MS analýzy byla zjišťována i molekulová hmotnost vzorků, která je důležitá pro další objasnění struktury izolovaných látek. K analýze byl použit plynový 42 chromatograf s hmotnostní detekcí (GC-MS) Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Systém obsahuje

chromatograf Agilent 7890 A s hmotnostním detektorem Agilent 5975 C MSD pracujícím v režimu elektronové ionizace při 70 eV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

4.2.6 NMR stanovení

Pro verifikaci připravených derivátů harminu byla na Katedře organické a bioorganické chemie provedena NMR strukturní analýza jednotlivých vzorků. NMR spektra byla měřena v roztocích deuterovaného chloroformu (CDCl₃) při teplotě 25 °C. Měření probíhalo na přístroji Varian Inova 500, který pro ¹H jádra pracuje při frekvenci 499,87 MHz a pro ¹³C jádra při frekvenci 125,70 MHz. K ozařování a detekci signálu byla použita širokopásmová dvoukanálová gradientová One NMR sonda s regulací teploty. Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty δ pars per milion (ppm) a pomocí zbytkového signálu rozpouštědla byly nepřímě vztaženy k TMS jako standardu. Hodnoty chemického posunu pro CDCl₃ jsou pro atomy ¹H δ = 7,26 ppm a pro atomy ¹³C δ = 77,0 ppm. Získaná data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita ¹H NMR spekter, multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, dd: dublet dubletů, m: multiplet, bs: široký singlet) a integrační konstanta (Hz).

4.2.7 Stanovení optické otáčivosti

Optická otáčivost rozpuštěného alkaloidu v methanolu byla měřena na polarimetru P3000, a specifická otáčivost jednotlivých látek byla vypočítána podle vzorce: $[\alpha]_D^{20} = 100 \times \alpha / c \times l$,

kde t – teplota měření [°C] (v našem případě 20 °C); D – sodíková čára λ = 589 nm; α – naměřená otáčivost [°]; c – koncentrace zkoušené látky [g/100 ml]; l – délka kyvety [dm].

4.3 Stanovení biologické aktivity

4.3.1 Chemikálie pro stanovení biologických aktivit, enzymy

- Acetylthiocholin jodid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (ATChI)
- Butyrylthiocholin jodid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (BuTChI)
- Berberin hydrochlorid (Sigma Aldrich, Praha)
- Dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý p. a. (Lach-Ner, Neratovice) (KH₂PO₄)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (NaH₂PO₄ * 2H₂O)
- Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma Aldrich, Německo) (C₂H₆OS)
- 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina ≥ 98% (Sigma Aldrich, Praha) (C₁₄H₈N₂O₈S₂)
- Galanthamin hydrobromid > 98% (Changsha Organic Herb Inc., People Republic of China)
- Hydrogenfosforečnan disodný bezvodý p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na₂HPO₄)

- Huperzin A 98 % (Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., People Republic of China)
- Chlorid draselný p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (KCl)
- Z-Gly-Pro-p-nitroanilid ≥ 99 % (Sigma Aldrich, Praha) (C₁₃H₁₆N₄O₄)
- Z-Pro-prolinal ≥ 98 % (Sigma Aldrich, Praha) (C₁₈H₂₂N₂O₄)
- Rekombinantní lidská acetylcholinesterasa (Sigma Aldrich, Praha) (AChE)
- Rekombinantní lidská butyrylcholinesterasa (Sigma Aldrich, Praha)
- Prolyloligopeptidasa (Sigma Aldrich, Praha)

4.3.2 Přístroje

- Microplate ELISA reader EL800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, USA)
- Reader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- pH metr PHM 220 (Radiometer, Copenhagen, Denmark)
- Statistický program GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2006)

4.3.3 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity

Aktivita hAChE a hBuChE byla stanovena pomocí modifikované Ellmanovy metody s acetylthiocholin jodidem (ATChI), resp. butyrylthiocholin jodidem (BuTChI) jako substráty. Stručně řečeno, 8,3 μ l buď lyzátu krevních buněk, nebo ředění plazmy (nejméně šest různých koncentrací), 283 μ l 5 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) a 8,3 μ l 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). 3 μ l ředění vzorku v dimethylsulfoxidu (DMSO) (40 mM, 10 mM, 4 mM, 1 mM, 0,4 mM a 0 mM) byly přidány do semi mikrokivety. Reakce byla zahájena přidáním 33,3 μ l 10 mM substrátu (ATChI nebo BuTChI). Konečný poměr DTNB a substrátu byl 1:1. Nárůst absorbance (ΔA) při 436 nm pro AChE a 412 nm pro BuChE byl měřen po dobu jedné minuty při 37 °C pomocí spektrofotometru (SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader). Každé měření bylo opakováno šestkrát pro každou koncentraci enzymového přípravku. Procento inhibice bylo vypočteno podle následujícího vzorce: $\% I = 100 - (100 \times (\Delta A_{BI}) / (\Delta A_{Sa}))$, kde ΔA_{BI} je zvýšení absorbance slepého vzorku a ΔA_{Sa} je zvýšení absorbance měřeného vzorku. Inhibiční účinnost testovaných sloučenin byla vyjádřena jako hodnota IC₅₀ (koncentrace inhibitoru, která způsobí 50 % inhibici cholinesterasy).

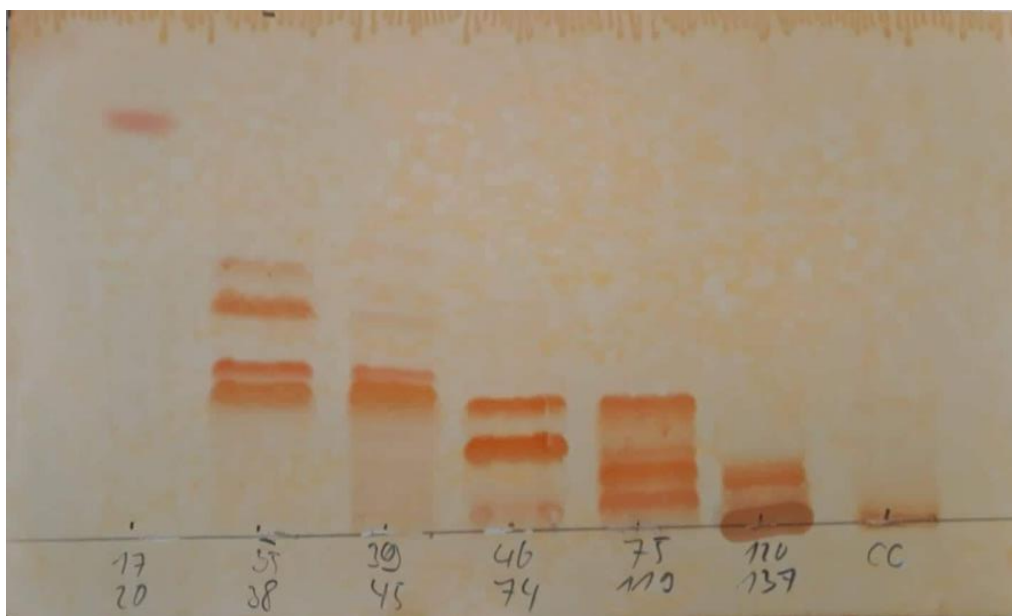
4.3.4 Stanovení prolyloligopeptidasové inhibiční aktivity

POP (EC 3.4.21.26) byl rozpuštěn ve fosfátovém pufru (PBS; 0,01 M Na/K fosfátový pufr, pH 7,4, obsahující 137 mM NaCl a 2,7 mM KCl); specifická aktivita enzymu byla 0,2 U/ml. Test se prováděl ve standardních polystyrenových 96jamkových mikrotitračních destičkách s plochým a průhledným dnem. Zásobní roztoky testovaných sloučenin byly připraveny v DMSO (10 mM). Ze zásobního roztoku byly připraveny roztoky (10⁻³ až 10⁻⁷ M) s deionizovanou H₂O; kontrola byla provedena se stejnou koncentrací DMSO. Substrát POP, (Z)-Gly-Pro-p-nitroanilid, byl rozpuštěn v 50 % 1,4-dioxanu (5 mM). Pro každou reakci se PBS (170 μ l),

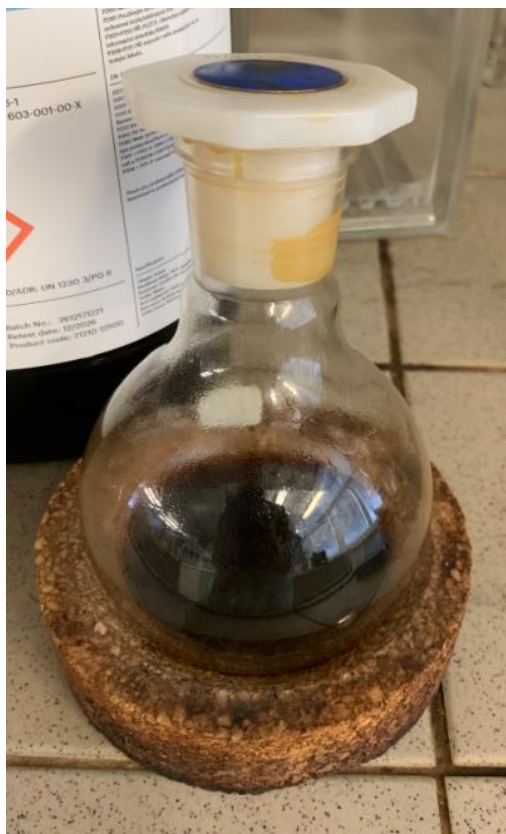
testovaná sloučenina (5 μ l) a PEP (5 μ l) inkubovaly pět minut při 37 °C. Poté byl přidán substrát (20 μ l) a mikrodestička byla inkubována 30 min při 37 °C. Tvorba p-nitroanilidu, přímo úměrná aktivitě POP, byla měřena spektrofotometricky při 405 nm pomocí mikrotitrační čtečky ELISA (Multimode microplate reader Synergy 2, BioTek Instruments, Winooski, VT). Inhibiční účinnost testovaných sloučenin byla vypočtena nelineární regresní analýzou a byla vyjádřena jako hodnota IC₅₀ (koncentrace inhibitoru, která způsobí 50 % inhibici POP). Všechny výpočty byly provedeny pomocí softwaru GraphPad Prism verze 6.07 pro Windows (GraphPad Software).

4.4 Izolace alkaloidů

Rostlina *Zephyrantes candida* byla na základě literární rešerše vybrána pro fytochemickou práci s úmyslem získat alespoň jednoho alkaloidu. Cílem této práce se stala vybraná frakce ZC EE 39-45 (1,82 g), která byla získána frakcionací alkaloidního EtOAc výtřepku rostliny *Zephyrantes candida*, který byl připraven a separován Flash chromatografií na Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky doc. PharmDr. Jakubem Chlebkem, PhD. Jednotlivé frakce získané Flash chromatografickou separací jsou znázorněné na chromatogramu na TLC (TLC deska se silikagelem, vyvíjející směs S1, počet vyvinutí 1x, dráha 8,5 cm, detekce UV a Dragendorffovo činidlo). Podle pozitivní reakce s Dragendorffovým činidlem (oranžové skvrny na chromatogramu), který selektivně reaguje s alkaloidy, je zřejmé, že vybraná frakce 39-45 obsahuje alespoň 2 alkaloidy (obr. 16)



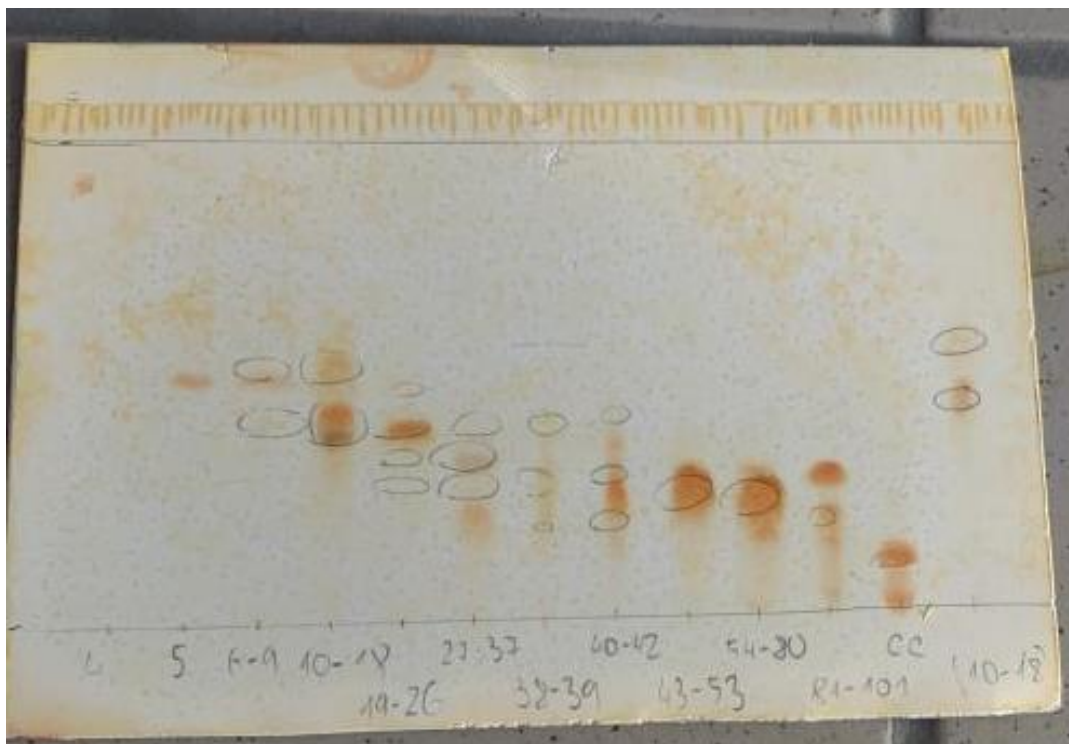
Obrázek 14 Frakce získané Flash chromatografickou separací alkaloidního extraktu *Zephyrantes candida*



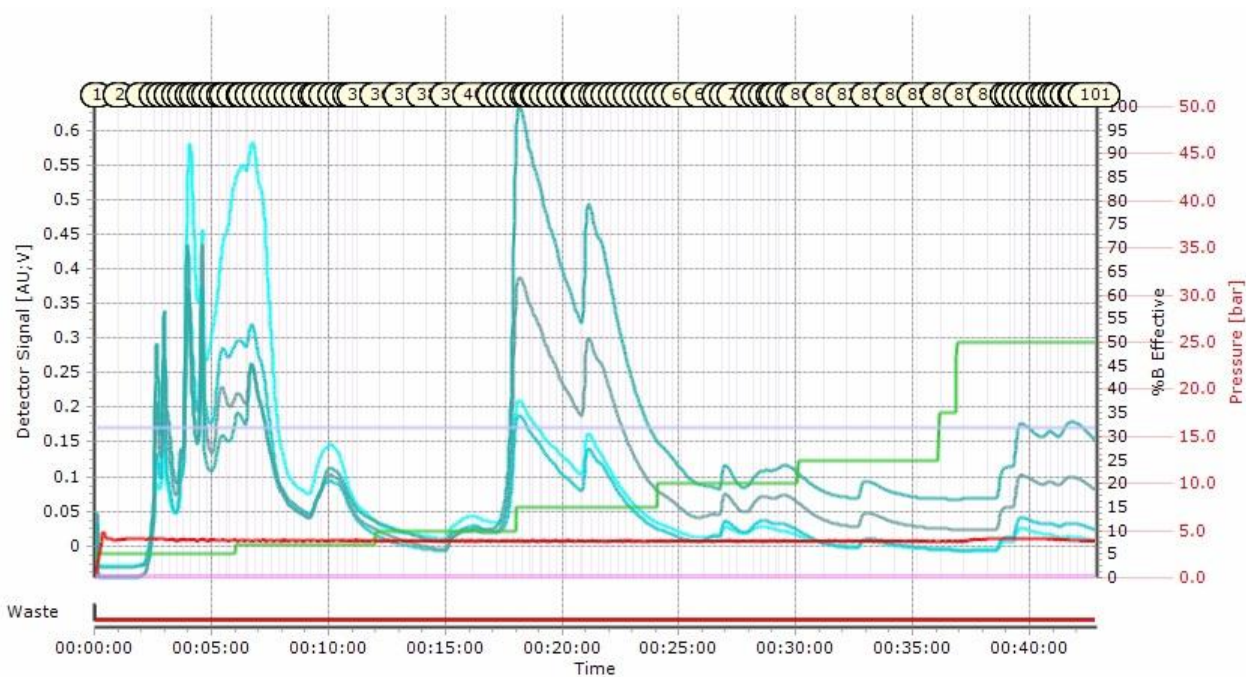
Obrázek 15 Frakce ZC EE 39-45 připravená k separaci

4.4.1 Flash chromatografie frakce ZC EE 39-45

Pro separaci alkaloidů frakce byla použita flash chromatografie, konkrétně systém Sepacore®. Jako adsorbent byl použita kartridž se sférickým silikagelem (15 μm), který byl použit i pro přípravu pevného vzorku. Mobilní fáze se skládala z rozpouštědla EtOAc (pumpa A) a MeOH obsahující 0,1 % NH_4OH (pumpa B). Eluce alkaloidů probíhala stupňovitou elucí po časových intervalech. Začínalo se čistých EtOAc a postupně se přidával MeOH až do 50 %. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 15 ml/minutu, sbírání frakcí na 5 ml a 15 ml (objem sbíraných frakcí v minimu a maximu píku). UV detekce látek byla nastavena na vlnové délky 254, 270, 280 a 290 nm. Celková separace trvala 48 min. Kolona byla eluována čistým MeOH, aby se případné zachycené alkaloidy z adsorbentu vymyly (označení CC – column cleaning) Celkově bylo jímáno 101 frakcí. Ty podle pravděpodobného výskytu samostatných látek byly slity do 11 podfrakcí, které byly nanесeny kapilárou na TLC desku a poté vyvíjeny pomocí S1 směsi na TLC desce se silikagelem. Výsledek TLC testu je zobrazen níže na (obr. 18). Průběh separace, včetně stupňovitého gradientu, detekce při 4 vlnových délkách je zaznamenána na chromatogramu (obr. 19).



Obrázek 16 TLC analýza 11 podfrakcí vyvíjených pomocí směsi S1



Obrázek 17 Průběh separace frakce ZC EE 39-45 na chromatogramu

Method 10274.2: **ZC EE 39-45**

Separation

Flowrate [ml/min] **15**
Rack **FC30 (30x50ml)**
Column **Sepacore 25g**

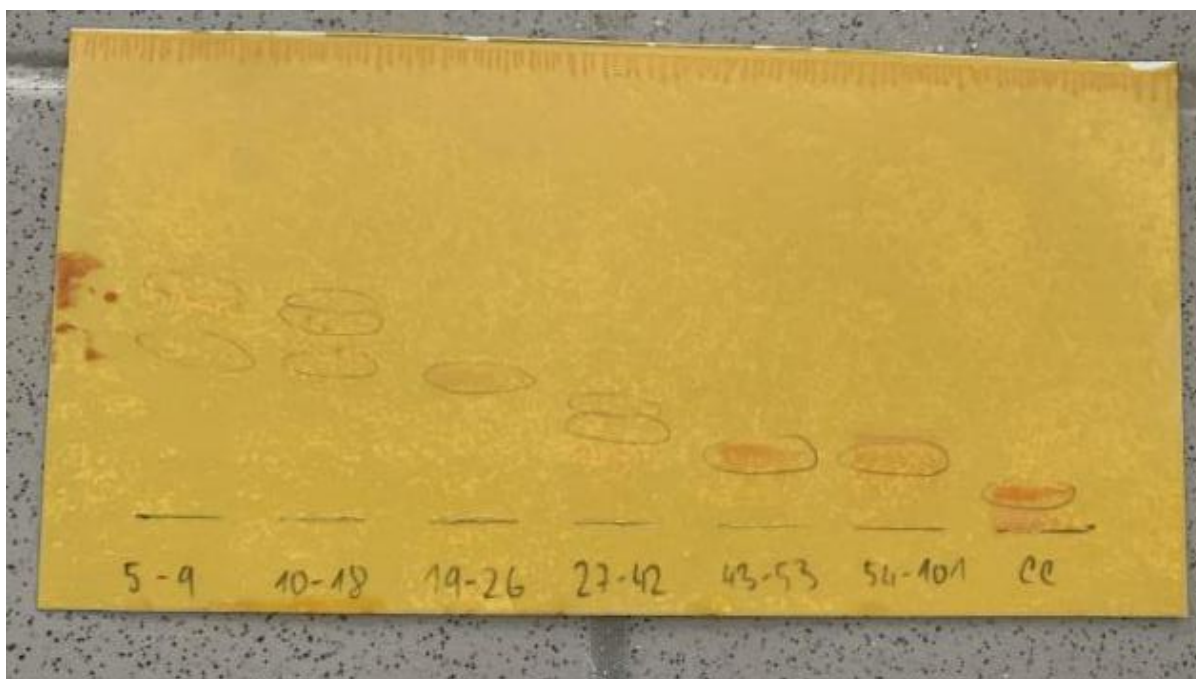
Pressure [bar] min: **0**
Pressure [bar] max: **16**
Tube Volume [ml] **50**
Solvent Setup:
Solvent A Ethyl acetate
Solvent B Methanol+NH₃ 100:01

| Start %B | End %B | min | s |
|----------|--------|-----|---|
| 5 | 5 | 6 | 0 |
| 5 | 7 | 0 | 1 |
| 7 | 7 | 6 | 0 |
| 7 | 10 | 0 | 1 |
| 10 | 10 | 6 | 0 |
| 10 | 15 | 0 | 1 |
| 15 | 15 | 6 | 0 |
| 15 | 20 | 0 | 1 |
| 20 | 20 | 6 | 0 |
| 20 | 25 | 0 | 1 |
| 25 | 25 | 6 | 0 |
| 25 | 35 | 0 | 1 |
| 35 | 35 | 6 | 0 |
| 35 | 50 | 0 | 1 |
| 50 | 50 | 6 | 0 |

Total Time: 00:48:07

Obrázek 18 Parametry gradientu flash chromatografické separace frakce

Následně byly podfrakce znovu slity do spojených větších frakcí, aby se docílilo nejvyšší možné koncentrace alkaloidů v daných vzorcích. Jednotlivé jímání frakce byly opět monitorovány pomocí TLC, kdy se z jednotlivých frakcí kapilárou odebíralo malé množství, které se nanese na start TLC desky se silikagelem a po následném vyvinutí ve vyvíjecí směsi S1, detekci UV a Dragendorffovým č. bylo získáno 7 spojených frakcí (obr. 21), které byly odpařeny na vakuové odparce dosucha, jejich hmotnost je uvedena níže (tabulka 1).

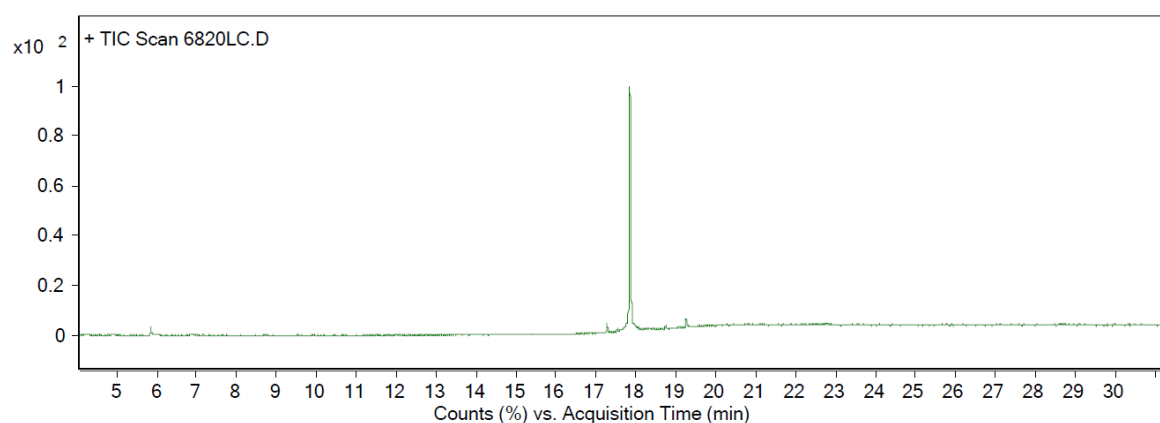


Obrázek 19 TLC analýza 7 spojených frakcí pomocí směsi S1

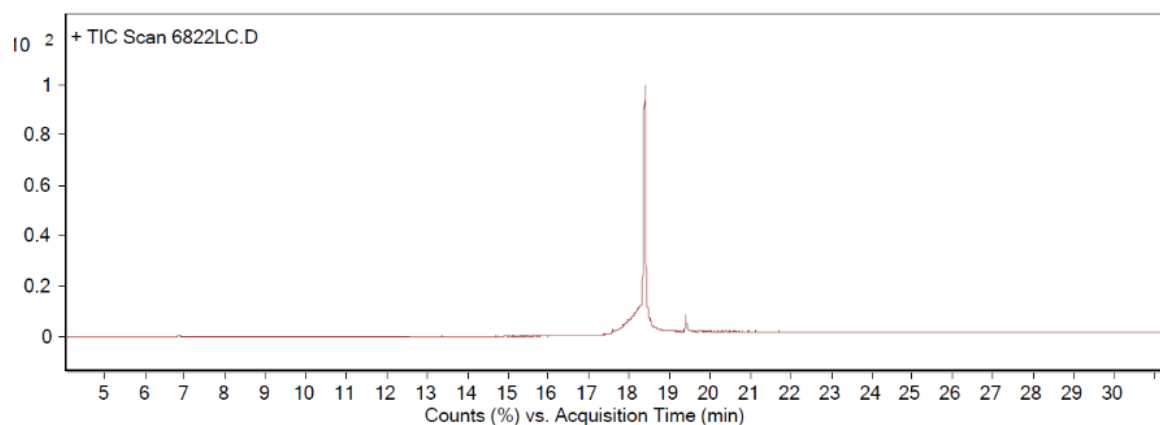
Tabulka 1 Hmotnost jednotlivých frakcí

| Frakce | Spojené frakce | Hmotnost (mg) |
|--------|-------------------|---------------|
| 1 | 5-9 | 38 |
| 2 | 10-18 | 78 |
| 3 | 19-26 | 56 |
| 4 | 27-42 | 94 |
| 5 | 43-53 | 219 |
| 6 | 54-101 | 572 |
| 7 | CC (eluce kolony) | 287 |

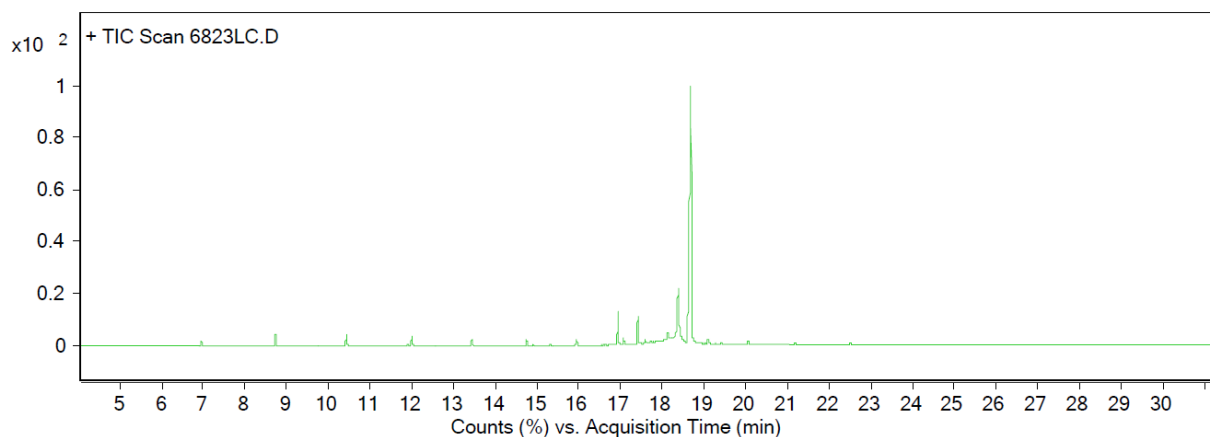
Všech 7 spojených frakcí bylo podrobena analýze plynovou chromatografií (GC) s hmotnostní detektorem (MS), aby se zjistilo, jaké je složení alkaloidů v jednotlivých frakcích. Pro následnou izolaci alkaloidů byly vybrané frakce 19-26, 43-53 a 54-101. Výběr byl stanoven na základě TLC a GC-MS analýzy, neboť obsahovaly téměř čisté alkaloidy. Chromatogramy těchto 3 frakcí, spolu s detekcí látek, jsou uvedeny níže (obr. 20,21,22).



Obrázek 20 GC-MS analýza frakce 19-26



Obrázek 21 GC-MS analýza frakce 43-53



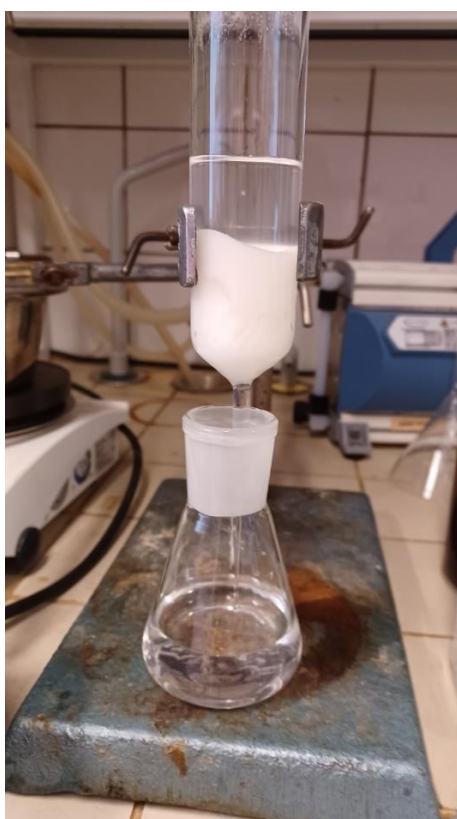
Obrázek 22 GC-MS analýza frakce 54-101

4.4.2 Izolace alkaloidů z frakce 19-26, 43-53 a 54-101

Pro izolaci čistých alkaloidů byla zvolena metoda krystalizace z MeOH. Před krystalizací byly jednotlivé frakce přečištěné vytřepáváním kapalina-kapalina („liquid-liquid extraction“, LLE). Alkaloidní frakce se rozpustili v 10-15 ml 2 % HCl a rozpuštěné frakce se přenesly do dělicí nálevky, ke které se přidalo stejné množství EtOAc a krátce se s dělicí nálevkou zatřepalo (vodná fáze se s EtOAc nemísí, alkaloidy zůstávají ve formě solí ve vodné fázi – spodní vrstva, EtOAc má nižší hustotu než voda – vrchní vrstva; obr. 23). Celkově se vodná fáze protřepala ještě 2x (odstranění nealkaloidních látek). Následně se upravilo pH vodné fáze 10 % Na₂CO₃ na 9-10 (vytěsnění alkaloidů ve vodné fázi ze solí na volné báze – alkaloidy jsou poté rozpustné v lipofilních rozpouštědlech) a přidal se EtOAc (15 ml) a proběhlo postupné vytřepávání (celkem 3x). Jednotlivé spojené EtOAc výtřepky, jímané do 250 ml Erlenmeyerovy baňky byly vysušené přidávkem bezvodého síranu Na₂SO₄ (cca 3 g) po dobu 15 minut, který byl pak odstraněn filtrací přes čistou vatu. Jednotlivé frakce byly odpařeny do sucha a dosušené v exsikátoru po dobu několika hodin.



Obrázek 23 Extrakce kapalina-kapalina vodné okyselené fáze s EtOAc (vrchní vrstva).



Obrázek 24 Filtrace přečištěné frakce se síranem sodným zachycený na vatě.

Po zvážení jednotlivých vysušených frakcí byla změřena hmotnost jednotlivých frakcí uvedená v tabulce 2 níže:

Tabulka 2 vyjádření hmotností jednotlivých frakcí

| Frakce | Spojené frakce | Hmotnost (mg) |
|---------------|-----------------------|----------------------|
| 1 | 19-26 | 15,9 |
| 2 | 43-53 | 116 |
| 3 | 54-101 | 236 |

4.4.3 Krystalizace přečištěných frakcí

Pro přečištění a izolaci alkaloidů byl použit princip krystalizace látky. Frakce se rozpustily za horka v MeOH pod zpětným chladičem na vodní lázni – příprava nasyceného roztoku.

Po ochlazení vpadly z roztoků bílé drobné krystaly, které byly přeneseny upravenou skleněnou Pasteurovou pipetou na skleněnou fritu, matečný louh byl odsáván sníženým tlakem (vodní vývěvou) a následně byly krystaly promyty malým množstvím čistého MeOH (opláchnutí krystalů). Po odsátí MeOH z frity byly krystaly přeneseny do porcelánové lodičky a dosušeny v exsikátoru po dobu 24 hodin za sníženého tlaku nad sušícími perlami silikagelu. Po zvážení bylo získáno 7 mg čistého bílého alkaloidu SB-1 (frakce 19-26), 71 mg bílých krystalů alkaloidu SB-2 (frakce 43-53) a 206 mg bílých drobných krystalů alkaloidu SB-3 (frakce 54-101).



Obrázek 25 Bílé krystaly alkaloidu získaného z frakce 43-53

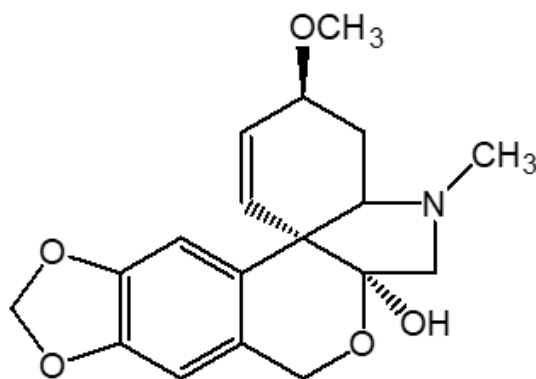
Všechny tyto 3 alkaloidy byly podrobeny GC-MS, NMR analýze a následně u nich byla stanovena optická otáčivost.

5 VÝSLEDKY

5.1 Strukturní analýza studovaných molekul

5.1.1 Alkaloid SB-1 (tazettin)

Sumární vzorec: $C_{18}H_{21}NO_5$

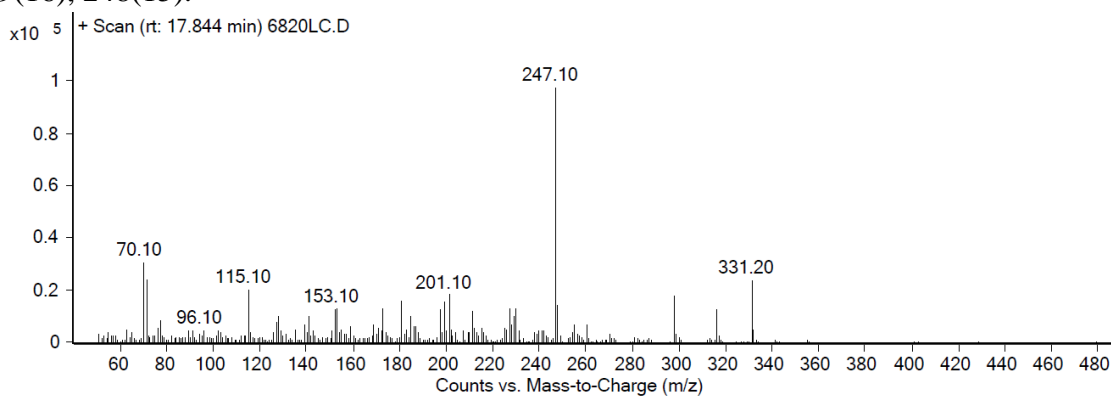


Obrázek 26 Izolovaná molekula tazettinu

Molekulová hmotnost: $M_r = 331,36$

MS analýza

EI-MS M^+m/z (%) = 247(100), 70(31), 71(25), 331(24), 115(20), 201(18), 298(18), 181(16), 199(16), 248(15).



Obrázek 27 EI-MS spektrum tazettin získané z GC-MS analýzy

NMR analýza

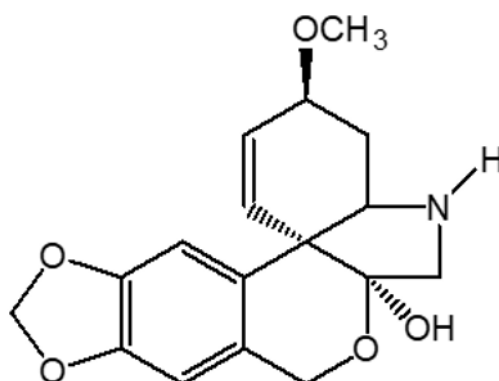
Naměřená NMR spektra izolovaného alkaloidu se shodovala s údaji v literatuře.²⁷

Optická otáčivost

$$[\alpha]_{20}^D = -76^\circ (c = 0,1; \text{MeOH})$$

5.1.2 Alkaloid SB-2 (nortazettin)

Sumární vzorec: C₁₇H₁₉NO₅

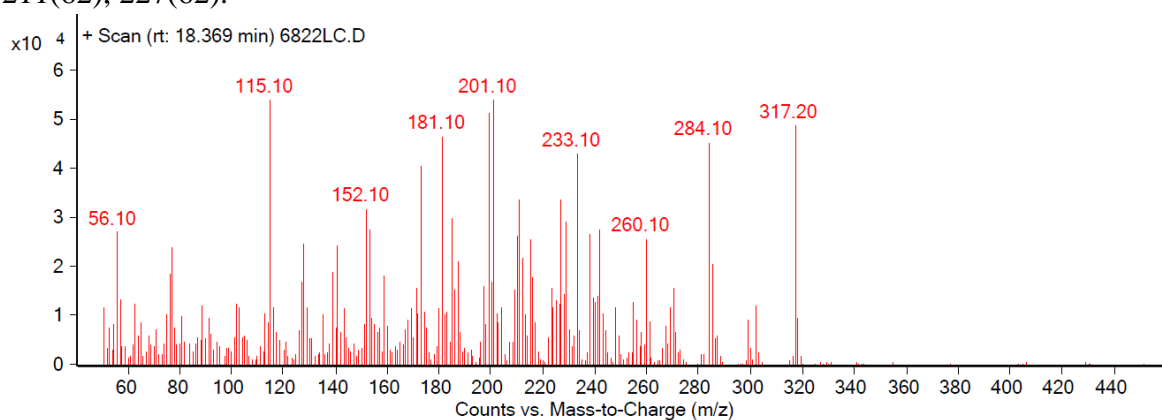


Obrázek 28 Izolovaná molekula nortazettinu

Molekulová hmotnost: $M_r = 317,34$

MS analýza

EI-MS M^+m/z (%) = 115(100), 201(100), 199(95), 317(90), 181(86), 284(84), 233(80), 211(62), 227(62).



Obrázek 29 EI-MS spektrum nortazettinu získané z GC-MS analýzy

NMR analýza

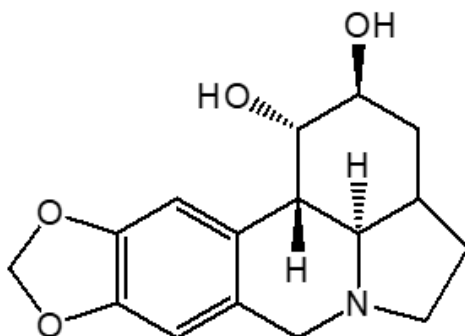
Naměřená NMR spektra izolovaného alkaloidu se shodovala s údaji v literatuře.²⁸

Optická otáčivost

$[\alpha]_{20}^D = -66^\circ$ (c = 0,15; MeOH)

5.1.3 Alkaloid SB-3 (lykorin)

Sumární vzorec: C₁₆H₁₇NO₄

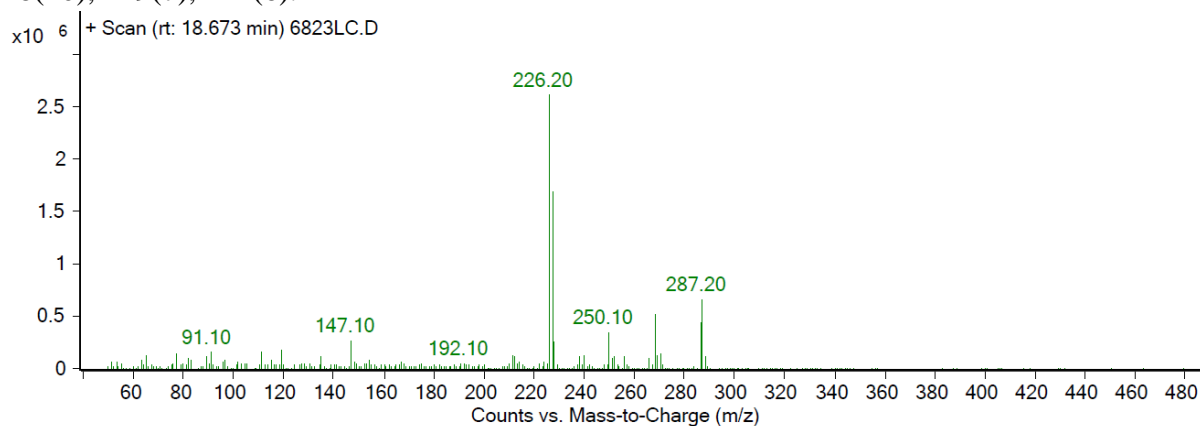


Obrázek 30 Izolovaná molekula lykorinu

Molekulová hmotnost $M_r = 287,32$

MS analýza

EI-MS M^+m/z (%) = 226(100), 227(64), 287(25), 268((20), 286(17), 250(13), 147(10), 228(10), 119(7), 111(6).



Obrázek 31 EI-MS spektrum lykorinu získané z GC-MS analýzy

NMR analýza

Naměřená NMR spektra izolovaného alkaloidu se shodovala s údaji v literatuře.^{7,8}

Optická otáčivost

$[\alpha]_{20}^D = -66^\circ$ (c = 0,15; MeOH)

5.2 Výsledky biologické aktivity studovaných molekul

Tabulkové výsledky aktivity AChE, BChE, POP

Vzhledem k tomu, že alkaloidy lykorin a tazettin byly již na biologickou alkaloidy testovány, byla změřena biologická aktivita pouze u tazettinu.

Cholinesterázová aktivita nortazettinu byla naměřena PharmDr. Danielou Suchánkovou, Ph.D. na katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky. Prolyloligopeptidázová aktivita tohoto alkaloidu byla změřena RNDr. Martinou Hrabovou, Ph.D. na centru biomedicínského výzkumu v Hradci Králové

Tabulka 3 Cholinesterázová a prolyloligopeptidázová inhibiční aktivita nortazettinu

| Látka | AChE (IC ₅₀ μM) | BChE (IC ₅₀ μM) | POP (IC ₅₀ μM) |
|----------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| nortazettin | >100 | >100 | >500 |
| huperzin A | 0,033 ± 0,001 | >500 | - |
| galanthamin | 1,70 ± 0,10 | 42,3 ± 1,3 | - |
| berberin | - | - | 142 ± 21 |
| Z-pro-prolinal | - | - | 2,75 × 10 ⁻³ |

Výsledky jsou uvedené jako průměr se směrodatnou odchylkou vypočtenou ze 3 nezávislých měření.

V tabulce jsou uvedeny referenční látky, které vykazují vhodné biologické aktivity. Huperzin A a galanthamin jakožto referenční látka pro inhibici cholinesteráz. Berberin a Z-pro-prolinal jakožto referenční látka pro inhibici prolyloligopeptidázy

Z výsledků je zřejmé, že nortazettin je vůči všem třem enzymům neaktivní a neodpovídá referenčním látkám.

6 DISKUSE

V této práci byly studovány amarylkovité alkaloidy rostliny *Zephyrantes candida* (Lindl.) Herb. Z vybrané frakce ZC EE 39-45 byly pomocí flash chromatografie a následnou krystalizací z MeOH získány 3 chemicky čisté alkaloidy. Na základě běžných spektrometrických (GC-MS) a spektroskopických metod (NMR, optická otáčivost) byla alkaloidy identifikovány jako tazetzin, nortazettin a lykorin. Lykorin a tazettin se hojně vyskytují v rostlinách čeledi *Amaryllidaceae* a byly izolovány a identifikovány i u *Zephyrantes candida*.²⁹ Nortazettin nebyl dosud ze *Zephyrantes candida* izolován. Přítomnost tohoto alkaloidu byla např. potvrzena z *Ungernia victoris* podle jiné studie²⁸. Zvolené separační metody se jeví jako velice efektivní. Flash chromatografie představuje automatickou metodu separace sloučenin, vhodnou i pro dělení přírodního původu.³⁰ Purifikace látek krystalizací je jednoduchá metoda založená na rozdílné rozpustnosti látek za horka a chladu a pokud frakce nebo extrakt obsahuje jednu látku, která krystalizuje a je v dané směsi v nadbytku, tak je vhodné se o krystalizaci pokusit. Na biologickou neuroprotektivní aktivitu byl testován pouze nortazettin, protože zbylé dva alkaloidy již byly otestovány na cholinesterázovou a prolyloligopeptidázovou inhibiční aktivitu zkoumány a jedná se o neaktivní látky ($IC_{50} \text{ AChE BChE} > 100 \mu\text{M}$), ($IC_{50} \text{ POP} > 500 \mu\text{M}$)^{14,27}. Testovaný alkaloid nortazettin byl shledán vůči AChE, BChE a POP neaktivní (tab. 2). Na inhibici POP byl nortazettin testován vůbec poprvé. Neaktivita těchto alkaloidů ovšem neznamená, že by se neměly hledat stále nové, účinnější látky. Ačkoliv lykorin nevykazuje neuroprotektivní aktivitu, podle jiných studií⁸ byla nalezena jeho silná cytotoxická aktivita. V publikaci¹⁵ bylo zjištěno, že tazettin vykazoval perspektivní inhibiční aktivitu při inhibici GSK-3 β , kterou inhiboval při 10 μM koncentraci téměř z 50 % (49 %). Tudíž se zdá, že nortazettin a jeho deriváty mohou být zajímavou výchozí molekulou pro inhibici GSK-3 β , která hraje klíčovou roli v patogenezi AD. V průběhu řešení tohoto projektu bylo potvrzeno, že rostlina *Zephyrantes candida* obsahuje ještě dosud neobjevené látky, které mohou v budoucnosti ovlivnit vývoj farmakoterapie AD. Jak bylo již zmíněno výše, alkaloid nortazettin nevykazoval neuroprotektivní aktivitu vůči lidským cholinesterázám ani prolyloligopeptidáze, nicméně bude v budoucnosti ještě testován na inhibici GSK-3 β ve spolupráci s Boloňskou univerzitou pod vedením prof. Vincenza Andrisano.

Vzhledem k tomu, že je izolace alkaloidů z rostlin poměrně časově náročná, nebylo izolováno širší spektrum alkaloidů z každé jednotlivé frakce. Při pokračování ve výzkumu bychom mohli izolovat více látek, které jsou strukturou odlišné a mohly by potenciálně vykazovat užitečnou biologickou aktivitu, právě díky své strukturní rozmanitosti. Stále s jistotou existují látky, které dosud nebyly chemicky popsány a mohou vykazovat lepší biologickou aktivitu než látky, které se používají v dnešní době.

7 ZÁVĚR

Cílem této práce byla izolace alkaloidů z extraktu druhu *Zephyrantes candida* pomocí chromatografických metod a krystalizace za účelem jejich strukturní analýzy a testování na neuroprotektivní aktivitu. Celkově z vybrané frakce ZC EE 39-45 byly izolovány 3 čisté alkaloidy pomocí flash chromatografie, kdy bylo nejdříve jímáno 101 frakcí, které byly postupně slévány a oddělovány. Na základě TLC a GC-MS analýzy byly stanoveny 3 frakce, které byly poté identifikovány jako téměř čisté alkaloidy. Izolovanými alkaloidy byl lykorin, tazetzin a nortazetzin. Obzvláště u nortazetzinu byla nově objevena jeho přítomnost v *Zephyrantes candida* a vzhledem k jeho neprozkoumané biologické aktivitě byl otestován na neuroprotektivní aktivitu. Nortazetzin se jeví jako neaktivní vůči lidským cholinesterázám a prolyloligopeptidáze stejně jako lykorin a tazettin, které byly otestovány již dříve. Všechny tyto poznatky mohou mít v budoucnu využití při hledání nových potenciálních látek z jiných rostlin s významnou biologickou aktivitou.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

| | |
|---|----|
| <i>Obrázek 1 Zástupci jednotlivých strukturních typů alkaloidů čeledi Amaryllidaceae¹⁴</i> | 12 |
| <i>Obrázek 2 Biosyntetická cesta alkaloidů do jednotlivých strukturních typů⁴</i> | 13 |
| <i>Obrázek 3 Zephyrantes candida (Lindl.) Herb.¹³</i> | 15 |
| <i>Obrázek 4 Struktura molekuly lykorinu¹⁴</i> | 16 |
| <i>Obrázek 5 Struktura molekuly haemanthaminu¹⁴</i> | 16 |
| <i>Obrázek 6 Struktura molekuly 6α-hydroxyhippeastidinu¹⁴</i> | 17 |
| <i>Obrázek 7 Struktura alkaloidů, vlevo narciklasin. vpravo pankratistatin¹⁴</i> | 17 |
| <i>Obrázek 8 Struktura molekuly galanthaminu¹⁴</i> | 18 |
| <i>Obrázek 9 Struktura molekuly homolykorinu¹⁴</i> | 19 |
| <i>Obrázek 10 Struktura molekuly plikanu¹⁴</i> | 19 |
| <i>Obrázek 11 Struktura molekuly sekoplikaminu¹⁴</i> | 20 |
| <i>Obrázek 12 Struktura molekuly nigragillinu¹⁴</i> | 20 |
| <i>Obrázek 13 Produkce beta-amyloidu²¹</i> | 23 |
| <i>Obrázek 14 Frakce získané Flash chromatografickou separací alkaloidního extraktu Zephyrantes candida</i> | 30 |
| <i>Obrázek 15 Frakce ZC EE 39-45 připravená k separaci</i> | 31 |
| <i>Obrázek 16 TLC analýza 11 podfrakcí vyvíjených pomocí směsi S1</i> | 32 |
| <i>Obrázek 17 Průběh separace frakce ZC EE 39-45 na chromatogramu</i> | 32 |
| <i>Obrázek 18 Parametry gradientu flash chromatografické separace frakce</i> | 33 |
| <i>Obrázek 19 TLC analýza 7 spojených frakcí pomocí směsi S1</i> | 33 |
| <i>Obrázek 20 GC-MS analýza frakce 19-26</i> | 34 |
| <i>Obrázek 21 GC-MS analýza frakce 43-53</i> | 34 |
| <i>Obrázek 22 GC-MS analýza frakce 54-101</i> | 35 |
| <i>Obrázek 23 Extrakce kapalina-kapalina vodné okyselené fáze s EtOAc (vrchní vrstva)</i> | 36 |
| <i>Obrázek 24 Filtrace přečištěné frakce se síranem sodným zachycený na vatě</i> | 36 |
| <i>Obrázek 25 Bílé krystaly alkaloidu získaného z frakce 43-53</i> | 37 |
| <i>Obrázek 26 Izolovaná molekula tazettinu</i> | 38 |
| <i>Obrázek 27 EI-MS spektrum tazettinu získané z GC-MS analýzy</i> | 38 |
| <i>Obrázek 28 Izolovaná molekula nortazettinu</i> | 39 |
| <i>Obrázek 29 EI-MS spektrum nortazettinu získané z GC-MS analýzy</i> | 39 |
| <i>Obrázek 30 Izolovaná molekula lykorinu</i> | 40 |
| <i>Obrázek 31 EI-MS spektrum lykorinu získané z GC-MS analýzy</i> | 40 |
| <i>Obrázek 32 chromatograf s Flash systémem Sepacore Control 1.0</i> | 47 |
| <i>Obrázek 33 polarimetr P3000</i> | 47 |
| | |
| <i>Tabulka 1 Hmotnost jednotlivých frakcí</i> | 34 |
| <i>Tabulka 2 vyjádření hmotností jednotlivých frakcí</i> | 37 |
| <i>Tabulka 3 Cholinesterázová a prolyloligopeptidázová inhibiční aktivita nortazettinu</i> | 41 |

9 PŘEHLED POUŽITÝCH ZDROJŮ

- 1 K. G. Ramawat, Ed., *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine*, Springer, Berlin, 2009.
- 2 D. J. Newman and G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.*, 2016, **79**, 629–661.
- 3 E. L. Konrath, C. dos S. Passos, L. C. Klein-Júnior and A. T. Henriques, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2013, **65**, 1701–1725.
- 4 M. Dalecká, R. Havelek, K. Královec, L. Brůčková and L. Cahlíková, *Chemické listy*, 2013, **107**, 701–708.
- 5 R. Reyes-Chilpa, S. Berkov, S. Hernández-Ortega, C. K. Jankowski, S. Arseneau, I. Clotet-Codina, J. A. Esté, C. Codina, F. Viladomat and J. Bastida, *Molecules*, 2011, **16**, 9520–9533.
- 6 ITIS - Report: Amaryllidaceae, https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=182703#null, (accessed October 25, 2022).
- 7 A. Takos and F. Rook, *IJMS*, 2013, **14**, 11713–11741.
- 8 M. He, C. Qu, O. Gao, X. Hu and X. Hong, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 16562–16574.
- 9 AMARYLLIDACEAE J. St.-Hil. – amarylkovité | BOTANY.cz, <https://botany.cz/cs/amaryllidaceae/>, (accessed November 7, 2022).
- 10 I. Desgagné-Penix, *Phytochem Rev*, 2021, **20**, 409–431.
- 11 K. D. Singh B, *Med Aromat Plants*, , DOI:10.4172/2167-0412.1000212.
- 12 E. Tapia-Campos and J. M. Rodriguez-Dominguez, 11.
- 13 ZEPHYRANTHES CANDIDA (Lindl.) Herb. | BOTANY.cz, <https://botany.cz/cs/zephyranthes-candida/>, (accessed November 12, 2022).
- 14 E. Kohelová, 2021. Alkaloidy *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae): izolace, strukturní identifikace, biologická aktivita. Disertační práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2021
- 15 E. Kohelová, J. Maříková, J. Korábečný, D. Hulcová, T. Kučera, D. Jun, J. Chlebek, J. Jenčo, M. Šafratová, M. Hrabínová, A. Ritomská, M. Malaník, R. Peřinová, K. Breiterová, J. Kuneš, L. Nováková, L. Opletal and L. Cahlíková, *Bioorganic Chemistry*, 2021, **107**, 104567.
- 16 P. T. Francis, A. M. Palmer, M. Snape and G. K. Wilcock, *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 1999, **66**, 137–147.
- 17 Acetylcholine | Definition, Function, & Facts | Britannica, <https://www.britannica.com/science/acetylcholine>, (accessed November 19, 2022).
- 18 N. H. Greig, D. K. Lahiri and K. Sambamurti, *Int. Psychogeriatr.*, 2002, **14**, 77–91.

- 19 J. Maříková, A. Ritomská, J. Korábečný, R. Peřinová, A. Al Mamun, T. Kučera, E. Kohelová, D. Hulcová, T. Kobrlová, J. Kuneš, L. Nováková and L. Cahlíková, *J. Nat. Prod.*, 2020, **83**, 1359–1367.
- 20 G. W. Caldwell, Z. Yan, W. Lang and J. A. Masucci, *CTMC*, 2012, **12**, 1282–1290.
- 21 H. Amiri, K. Saeidi, P. Borhani, A. Manafirad, M. Ghavami and V. Zerbi, *ACS Chem. Neurosci.*, 2013, **4**, 1417–1429.
- 22 B. De Strooper and L. Chávez Gutiérrez, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2015, **55**, 419–437.
- 23 T. A. Natunen, M. Gynther, H. Rostalski, K. Jaako and A. J. Jalkanen, *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2019, **124**, 40–49.
- 24 R. Svarcbašs, U. Julku, T. Kilpeläinen, M. Kyyrö, M. Jäntti and T. T. Myöhänen, *Biochemical Pharmacology*, 2019, **161**, 113–120.
- 25 F. Hernández, E. Gómez de Barreda, A. Fuster-Matanzo, J. J. Lucas and J. Avila, *Experimental Neurology*, 2010, **223**, 322–325.
- 26 D. Hulcová, K. Breiterová, T. Siatka, K. Klímová, L. Davani, M. Šafratová, A. Hošťálková, A. De Simone, V. Andrisano and L. Cahlíková, *Molecules*, 2018, **23**, 719.
- 27 D. Hulcová, J. Maříková, J. Korábečný, A. Hošťálková, D. Jun, J. Kuneš, J. Chlebek, L. Opletal, A. De Simone, L. Nováková, V. Andrisano, A. Růžička and L. Cahlíková, *Phytochemistry*, 2019, **165**, 112055.
- 28 A. Abdusatamov, A. Abduazimov and S. Yunusov, Isolation of lycorine, galanthamin, hordenine and tezettine, 1962, (dostupné z databáze Scifinder)
- 29 M. Roy, L. Liang, X. Xiao, P. Feng, M. Ye and J. Liu, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, **107**, 615–624.
- 30 O. Potterat, P. Weber, N. Schafroth and M. Hamburger, *Planta Med*, 2010, **76**, s-0030-1264816.

10 PŘÍLOHY PRÁCE



Obrázek 32 chromatograf s Flash systémem Sepacore Control 1.0



Obrázek 33 polarimetr P3000