UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

STUDIUM INHIBIČNÍHO (TOXICKÉHO) VLIVU ALKALOIDŮ VYBRANÝCH DRUHŮ ROSTLIN Z ČELEDI AMARYLLIDACEAE NA NĚKTERÉ LIDSKÉ ENZYMOVÉ SYSTÉMY (*IN VITRO* STUDIE) III

Doktorská disertační práce

Mgr. Marcela Šafratová

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

Studijní obor: Farmakognosie a toxikologie přírodních látek

PROHLÁŠENÍ

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

Hradec Králové, listopad 2016 Mgr. Marcela Šafratová

PODĚKOVÁNÍ

Disertační práce vznikla za podpory Specifického vědeckého výzkumu Univerzity Karlovy, Farmaceutické Fakulty v Hradci Králové (SVV 260 292), byla spolufinancována Evropským projektem TEAB (registrační číslo: CZ.1.07/2.3.00/20.0235) a celofakultním výzkumným programem PRVOUK, který je řešený v rámci Programů rozvoje výzkumných oblastí na Univerzitě Karlově.

Ráda bych poděkovala za spolupráci pracovní skupině ADINACO, především Doc. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za vedení v průběhu mého celého doktorského studia a Prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za jeho rady a odbornou pomoc. Samozřejmě bych ráda vyjádřila své díky i celé katedře botaniky a ekologie za příjemné pracovní prostředí a přátelský kolektiv.

Za spolupráci při měření biologických aktivit a fyzikálně-chemických vlastností alkaloidů bych chtěla poděkovat Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D. za měření a interpretaci NMR spekter alkaloidů, Doc. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za měření HRMS spekter nově izolovaných alkaloidů, Doc. PharmDr. Danielu Junovi, Ph.D. a Mgr. Martině Hrabinové za stanovení inhibiční POP aktivity, RNDr. Radimu Havelkovi Ph.D. a Ing. Ivo Doskočilovi za měření cytotoxické aktivity a Doc. Ing. Pavlu Kloučkovi, Ph.D. za měření antimikrobiální a antifungální aktivity.

OBSAH

OBSAH 4
SEZNAM ZKRATEK 7
PŘEHLED OBRÁZKŮ A TABULEK 8
1. ÚVOD 10
2. CÍL PRÁCE 12
3. TEORETICKÁ ČÁST 13
3.1 Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae 13
3.1.1 Biosyntéza a rozdělení strukturních typů amarylkovitých alkaloidů 15
3.2 Biologická aktivita alkaloidů čeledi Amaryllidaceae 23
3.2.1 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jako látky využitelné v terapii Alzheimerovy choroby 23
3.2.2 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jako látky využitelné v terapii nádorových onemocnění 30
3.2.3 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jako látky využitelné v terapii protozoálních onemocnění 37
3.3 Botanická charakteristika rostliny *Narcissus poeticus* L. – narcis bílý 39
3.3.1 Alkaloidy izolované z *Narcissus poeticus* L. 40
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 44
4.1 Materiální a instrumentální vybavení pro izolaci alkaloidů 44
4.1.1 Chemikálie pro izolaci alkaloidů 44
4.1.2 Rozpouštědla 44
4.1.3 Adsorbenty pro chromatografii 45
4.1.4 Vyvíjecí soustavy použité při izolaci alkaloidů 45
4.1.5 Činidla pro detekci alkaloidů 46
4.1.6 Pomocný materiál 46
4.1.7 Přístroje 46
4.1.8 Databáze používané pro vyhodnocování výsledků 47
4.2 Materiál a instrumentální vybavení pro stanovení biologických aktivit 48
4.2.1 Chemikálie pro stanovení biologických aktivit 48
4.2.2 Pufry 48
4.2.3 Přístroje 49

4.2.4 Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE 50
4.2.5 Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči POP 50
4.3 Metody 51
4.3.1 Obecné postupy 51
4.3.2 Metody použité pro strukturní identifikaci izolovaných alkaloidů 53
4.3.3 Testování biologické aktivity izolovaných alkaloidů 55
4.4 GC/MS analýza alkaloidního extraktu z čerstvých cibulí *N. poeticus* cv. Pink Parasol 59
4.5 Izolace alkaloidů 60
4.5.1 Zpracování jednotlivých frakcí 62
5. VÝSLEDKY 65
5.1 Přehled izolovaných alkaloidů a jejich strukturní analýza 65
5.1.1 NP-B-2: Narwedin 65
5.1.2 NP-B-3: Homolykorin 66
5.1.3 NP-B-4/3: Masonin 67
5.1.4 NP-C-1/2: Lykoramin 68
5.1.5 NP-C-4/3: Narcipavlin 69
5.1.6 NP-C-4/4: Narcikachnin 70
5.1.7 NP-C-G/2: 8-*O*-Demethylhomolykorin 72
5.1.8 NP-C-I: Galanthamin 73
5.1.9 NP-D-4/3: Seko-isopowellaminon 74
5.1.10 NP-E2-D2: Odulin 75
5.1.11 NP-F2/1: Galanthindol 77
5.1.12 NP-F-2/2: Inkartin 78
5.1.13 NP-F-3/1: Norlykoramin 79
5.1.14 NP-F-3/5: Haemanthamin 80
5.1.15 NP-J-5: Hippeastrin 81
5.2 Výsledky provedených biologických testů izolovaných alkaloidů 82
5.2.1 Biologická aktivita izolovaných alkaloidů ve vztahu k Alzheimerově demenci 82
5.2.2 Antimikrobiální a antifungální aktivita izolovaných alkaloidů 83
5.2.3 Výsledky inhibiční aktivity aldo-keto reduktasy AKR1C3 izolovaných alkaloidů 84

5.2.4 Výsledky single dose screeningové studie izolovaných alkaloidů na leukemických nádorových liniích 85
5.2.5 Výsledky cytotoxické aktivity na nádorových liniích kolorektálního karcinomu 86
6. DISKUZE 87
7. ABSTRAKT 91
8. ABSTRACT 93
9. PŘEHLED PUBLIKACÍ 95
9.1 Původní práce 95
9.2 Konference 96
9.2.1 Přednášky 96
9.2.2 Plakátové sdělení 96
10. LITERATURA 97

SEZNAM ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AMK	aminokyselina
APP	amyloidní prekurzorový protein
Aβ	β-amyloid
BACE1	enzym sekretasa štěpící APP v místě β
BuChE	butyrylcholinesterasa
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CDK5	cyklin-dependentní kinasa 5
cv.	pěstovaná odrůda (kultivar)
DPPH	difenylpikrylhydrazyl radikál
DRP1	dynamin-related protein 1
GABA	γ-aminomáselná kyselina
GC	plynová chromatografie
GSK-3β	glykogensynthasa kinasa 3β
HEB	hematoencefalická bariéra
HuAChE	lidská acetylcholinesterasa
HuBuChE	lidská butyrylcholinesterasa
MS	hmotnostní spektrometrie
NFTs	neurofibrilární klubka
NMDA	*N*-methyl-D-aspartát
NMR	nukleární magnetická rezonance
POP	prolyl oligopeptidasa (prolyl endopeptidasa)

PŘEHLED OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. 1 a – *Narcissus pseudonarcissus* L., b – *Galanthus nivalis* L., c – *Leucojum aestivum* L. 13
Obr. 2 Struktury galanthaminu, lykorinu, pankratistatinu a haemanthaminu 15
Obr. 3 Syntéza klíčového meziproduktu 4-*O*-methylnorbellladinu..... 16
Obr. 4 Biosyntéza základních strukturních typů Amaryllidaceae alkaloidů 17
Obr. 5 Vznik fibril β-amyloidu..... 24
Obr. 6 Vznik neurofibrilárních klubek..... 25
Obr. 7 Alkaloidy galanthaminového strukturního typu s acetylcholinesterasovou inhibiční aktivitou 27
Obr. 8 Amaryllidaceae alkaloidy ostatních strukturních typů s AChE inhibiční aktivitou 28
Obr. 9 Struktura 4´-*O*-demethylbelladinu 28
Obr. 10 Struktura vybraných Amaryllidaceae alkaloidů s POP inhibiční aktivitou..... 29
Obr. 11 Alkaloidy lykorinového strukturního typu se zajímavou cytotoxickou aktivitou 32
Obr. 12 Alkaloidy pankratistatinového typu se zajímavou cytotoxickou aktivitou..... 33
Obr. 13 Struktura haemanthaminu a haemanthidinu 34
Obr. 14 Alkaloidy haemanthaminového a krininového typu s cytotoxickou aktivitou..... 35
Obr. 15 *Narcissus poeticus* L..... 39
Obr. 16 GC/MS analýza alkaloidního sumárního extraktu z cibulí *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol..... 59
Obr. 17 TLC sumárního alkaloidního extraktu a frakcí A-F..... 62
Obr. 18 Narwedin 65
Obr. 19 Homolykorin 66
Obr. 20 Masonin..... 67
Obr. 21 Lykoramin 68
Obr. 22 Narcipavlin..... 69
Obr. 23 Narcikachnin..... 71
Obr. 24 8-*O*-Demethylhomolykorin..... 72
Obr. 25 Galanthamin 73
Obr. 26 Seko-isopowellaminon 75
Obr. 27 Odulin 76
Obr. 28 Galanthindol..... 77

Obr. 29 Inkartin 78
Obr. 30 Norlykoramin 79
Obr. 31 Haemanthamin 80
Obr. 32 Hippeastrin 81
Obr. 33 Screening aldo-keto reduktasové inhibiční aktivity Amaryllidaceae alkaloidů 84
Obr. 34 Výsledky single dose screeningové studie alkaloidů izolovaných z *N. poeticus* cv. Pink Parasol na leukemických nádorových liniích JURKAT a MOLT-4 85

Tab. 1 Všechny strukturní typy alkaloidů dosud izolovaných z čeledi Amaryllidaceae, jejich hlavní zástupci a rody, ze kterých byly izolovány 18
Tab. 2 Inhibiční aktivity vybraných alkaloidů čeledi Amaryllidaceae vůči AChE, BuChE a POP 29
Tab. 3 Inhibiční aktivity růstu některých studovaných Amaryllidaceae alkaloidů lykorinového strukturního typu vůči vybraným nádorovým liniím 32
Tab. 4 Protinádorová aktivita lykorinu, haemanthaminu a haemanthidinu 35
Tab. 5 Význam zkratek buněčných linií používaných pro testování cytotoxicity 36
Tab. 6 Strukturní typy alkaloidů izolovaných z *Narcissus poeticus* L. a jeho pěstovaných odrůd 40
Tab. 7 Vyvíjecí soustavy pro preparativní a analytickou tenkovrstvou chromatografii 45
Tab. 8 Podmínky sloupcové chromatografie alkaloidního výtřepku 60
Tab. 9 Výsledek sloupcové chromatografie alkaloidního extraktu 61
Tab. 10 Biologická aktivita izolovaných alkaloidů vůči HuAChE, HuBuChE a POP 82
Tab. 11 Výsledky antimikrobiální aktivity testovaných alkaloidů z *N. poeticus* cv. Pink Parasol 83
Tab. 12 Výsledky cytotoxické aktivity na nádorových liniích kolorektálního karcinomu 86

1. ÚVOD

Rostliny a jejich obsahové látky jsou nedílnou součástí lidského života. Již od nepaměti jsou využívány v různých formách jednak jako zdroj potravy, ale také pro své léčebné, respektive toxické účinky.[1] Lidové léčitelství vychází po staletí z prostých zkušeností, které se tradicí nebo záznamy přenesly do současnosti. Jak se společnost postupně vyvíjela, odkrývaly se nové poznatky léčivého charakteru rostlin, části rostlin, které byly využívány, se nejrůznějším způsobem konzervovaly a s dalším vývojem se objevovala potřeba podrobnějšího zkoumání jednotlivých složek, což vedlo v 19. století k prvním izolacím tzv. sekundárních metabolitů rostlin v čistém stavu. Struktura těchto látek byla často objasněna až o mnoho let později.

Široká biologická aktivita sekundárních metabolitů rostlin jde ruku v ruce s jejich nepřeberným množstvím chemických struktur a celá řada přírodních látek je i v dnešní době využívána v terapii nejrůznějších chronických onemocnění. Jednou z nejzajímavějších skupin těchto metabolitů jsou alkaloidy. Jedná se o organické dusíkaté sloučeniny, které se vyskytují v určitých druzích rostlin a jsou syntetizovány z aminokyselin, případně z meziproduktů vznikajících v průběhu biosyntézy terpenoidů, steroidů, některých kyselin a purinů. Význam alkaloidů pro rostlinu není doposud zcela objasněn, ale nejspíše poskytují rostlinám ochranu před škůdci a uplatňují se v biosyntetických pochodech.[2]

Významnou a výrazně biologicky aktivní skupinou alkaloidů jsou alkaloidy amarylkovitých rostlin. Tyto sloučeniny jsou produkovány výhradně rostlinami čeledi Amaryllidaceae a vyznačují se rozmanitostí struktur a vlastností.[3] Obecně jsou řazeny k isochinolinovým alkaloidům z důvodu jejich stejného biosyntetického prekurzoru tyrosinu. Isochinolinové alkaloidy jsou na rozdíl od alkaloidů amarylkovitých produkovány mnohem širším spektrem rostlinných čeledí např. Papaveraceae, Fumariaceae, Rutaceae, Berberidaceae a dalších. Z rostlin čeledi Amaryllidaceae bylo do dnešní doby izolováno a strukturně popsáno přes 500 alkaloidů patřících do různých strukturních typů. Řada těchto látek byla testována na nejrůznější účinky a je zajímavé, že často je určitá biologická aktivita spojena s určitým strukturním typem. V současné době jsou tyto látky známé především díky galanthaminu, který se klinicky využívá pod komerčním názvem Reminyl jako selektivní, reverzibilní inhibitor acetylcholinesterasy (AChE) v symptomatické léčbě Alzheimerovy choroby (AD). Choroba se klinicky projevuje jako demence a je to také jedna z primárních

příčin úmrtí a v současné době se stává také velkým sociálním problémem. Další zajímavou látkou je lykorin, který se vyznačuje širokým spektrem biologických aktivit, z nichž je v dnešní době intenzivně studována protinádorová aktivita indukcí apoptózy. [4] Výhodou této látky je jeho selektivita pro nádorové buňky a relativně nízká toxicita k zástupcům buněk zdravých nebo buněk klidových. [5] Nemalou výhodou lykorinu je jeho dostupnost z přírodních zdrojů, jedná se o nejrozšířenější amarylkovitý alkaloid, což umožňuje izolaci v dostatečném množství pro biologické studie a zároveň i pro přípravu případných derivátů.

Tato doktorská disertační práce se zabývá izolací, identifikací a biologickou aktivitou alkaloidů izolovaných z cibulí rostliny *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol. Jmenovaná rostlina byla pro fytochemickou studii vybrána na základě GC/MS screeningové studie cca 80 různých pěstovaných odrůd rostlin rodu *Narcissus* L. Záměrem bylo vybrat pro fytochemickou studii takovou rostlinu, která bude zdrojem co možná nejširšího spektra alkaloidů, dále alkaloidů doposud nepopsaných, a to v takových množstvích, která budou umožňovat provedení co nejširšího spektra biologických testů. Záměrem bylo na základě výsledků provedených experimentů vytipovat látky pro podrobnější biologické studie nebo pro přípravu derivátů těchto látek.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce byla izolace a sledování alkaloidů z cibulí taxonu *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol z čeledi Amaryllidaceae za účelem testování jejich biologických aktivit.

Dílčí cíle byly:

- detailní zpracování literární rešerše týkající se výskytu alkaloidů v rodu *Narcissus* L. a jejich biologické aktivity,
- izolace co nejširšího spektra alkaloidů z extraktu cibulí *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol,
- určení struktury na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností (NMR, MS, optická otáčivost),
- stanovení biologických aktivit jednotlivých alkaloidů (inhibiční aktivita vůči lidským cholinesterasám, prolyl oligopeptidase a aldo-keto reduktase a dalších v rámci navázaných spoluprací),
- výběr perspektivních alkaloidů vhodných pro další podrobnější biologické studie, resp. pro přípravu derivátů za účelem rozšíření portfolia testovaných látek.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae

Rostliny produkují velké množství sekundárních metabolitů se širokým spektrem biologických aktivit. Mezi takovéto rostliny patří čeleď Amaryllidaceae (amarylkovité), která zahrnuje okolo 1100 druhů jednoděložných víceletých cibulovitých rostlin a ty jsou klasifikovány asi do 75 rodů.[6] Mezi nejvýznamnější rody, z pohledu počtu zástupců, tak i jejich využití v lidovém léčitelství, patří *Narcissus* L.*, Nerine* Herb.*, Crinum* L.[7] Rostliny čeledi Amaryllidaceae jsou rozšířené především v tropických a subtropických oblastech světa, zřídka zasahují i do mírného až subalpínského podnebného pásma.[8] Celá řada těchto rostlin je pěstována pro jejich krásné květy, za tímto účelem bylo vyšlechtěno velké množství jejich zahradnických a okrasných pěstovaných odrůd, přičemž mezi nejcennější patří např. rody *Amaryllis* L., *Clivia* Lindl., *Narcissus* L.[9] U nás je možné ve volné přírodě nalézt zástupce tří rodů, jmenovitě narcis (*Narcissus* L.)[10], bledule (*Leucojum* L.)[11] a sněženka (*Galanthus* L.)[12], které jsou vyobrazené na následujícím obrázku (Obr. 1).

a b c

Obr. 1 a – *Narcissus pseudonarcissus* L., b – *Galanthus nivalis* L., c – *Leucojum aestivum* L.

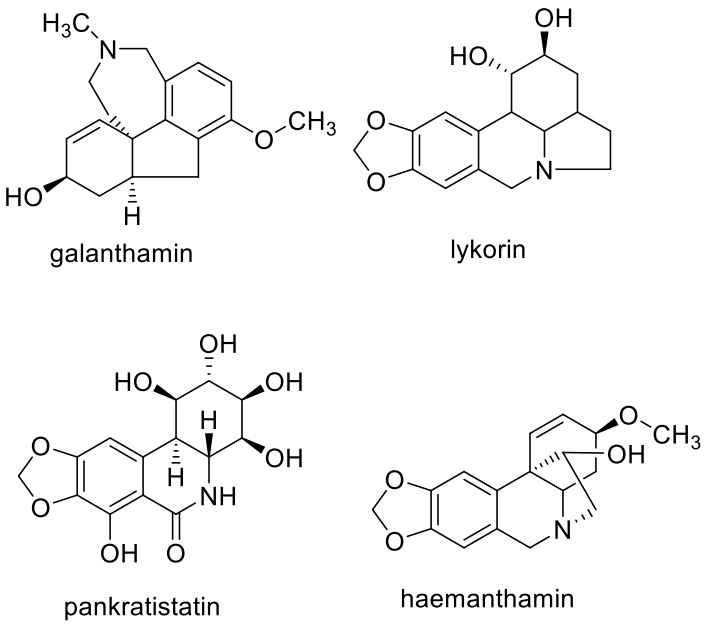
Rostliny čeledi Amaryllidaceae jsou po staletí využívané v lidovém léčitelství, první dokumentované použití bylo zaznamenáno již ve 4. století př. n. l. Hippokratem z Kósu, který doporučoval extrakt ve formě olejové emulze z cibulí narcisů při léčbě rakoviny dělohy.[13] Ve Francii se vyráběl ethanolový odvar z narcisů, který byl podáván při astmatických potížích.[14]

Další hojně využívanou rostlinou v lidovém léčitelství byla a je *Lycoris radiata* Herb., která má svoje zastoupení především v tradiční čínské medicíně.[15] K tradiční čínské medicíně také neodmyslitelně patří *Narcissus tazetta* L., který se používal k léčbě kožních nádorů. V Jižní Americe byla starými Mayi v tradičním léčitelství využívána rostlina *Hymenocallis littoralis* Jacq. k léčbě neoplastických onemocnění.[16] Antineoplastických účinků si v Jižní Africe všimly kmeny Zuluů, kteří používaly cibule *Amaryllis belladonna* L., *Boophone disticha* Herb. a *Crinum delagoense* I. Verd.[17] Na Arabském poloostrově byly cibule *N*. *tazetta* L. využívány jako kontraceptivum. V některých lékařských knihách můžeme najít záznamy o užívání narcisů jako antiepileptik či jejich využití k léčbě infekčních kožních onemocnění.[14]

Biologická aktivita rostlin je často spojena s obsahem určitého typu sekundárních metabolitů. V případě čeledi Amaryllidaceae jsou nejvýznamnějšími sekundárními metabolity isochinolinové alkaloidy, které tvoří samostatnou skupinu a jsou označovány jako amarylkovité alkaloidy. Biologická aktivita těchto látek je velmi široká, v literatuře je uváděna protinádorová, antimalarická, antimikrobiální, antivirová, dále schopnost inhibice acetylcholinesterasy (AChE) a další.[4] Ostatním typům sekundárních metabolitů byla u těchto rostlin věnována pouze okrajová pozornost, jejich biologická aktivita většinou nebyla ani testována. Do dnešní doby bylo izolováno a identifikováno několik stovek těchto sloučenin, které jsou klasifikovány do různých strukturních typů.[6] Z pohledu jejich biosyntetického původu jsou tyto látky řazeny mezi isochinolinové alkaloidy, neboť vycházejí ze stejného prekurzoru tyrosinu. Prvním izolovaným Amaryllidaceae alkaloidem byl lykorin (Obr. 2), ten se podařilo získat již v roce 1877, struktura však byla podrobněji popsána až o 80 let později.[13]

Nejvýznamnější látkou, která byla izolována z amarylkovitých rostlin je v dnešní době bezesporu galanthamin (Obr. 2), jehož uvedení na trh v roce 2000 pod komerčním názvem Reminyl, znamenalo pro pacienty s AD velký posun v léčbě. Galanthamin působí jako selektivní, reverzibilní inhibitor AChE, oproti ostatním používaným inhibitorům v terapii AD se vyznačuje také schopností alostericky modulovat nikotinové receptory, čímž brání v desenzitizaci těchto receptorů a zvyšuje účinnost podávaných léčiv (agonistů nikotinových receptorů), která zlepšují symptomatologii onemocnění.[18] Galanthamin byl původně izolován z cibulí kavkazské sněženky *Galanthus woronowii* Losinsk., později i z celé řady rodů čeledi Amaryllidaceae; např. *Narcissus* L., *Zephyranthes* Herb., *Leucojum* L., *Lycoris* Herb. další.[19] Od uvedení galanthaminu do praxe byla zpočátku věnována velká pozornost i dalším amarylkovitým alkaloidům jako potenciálním inhibitorům AChE. V dnešní době jsou tyto látky

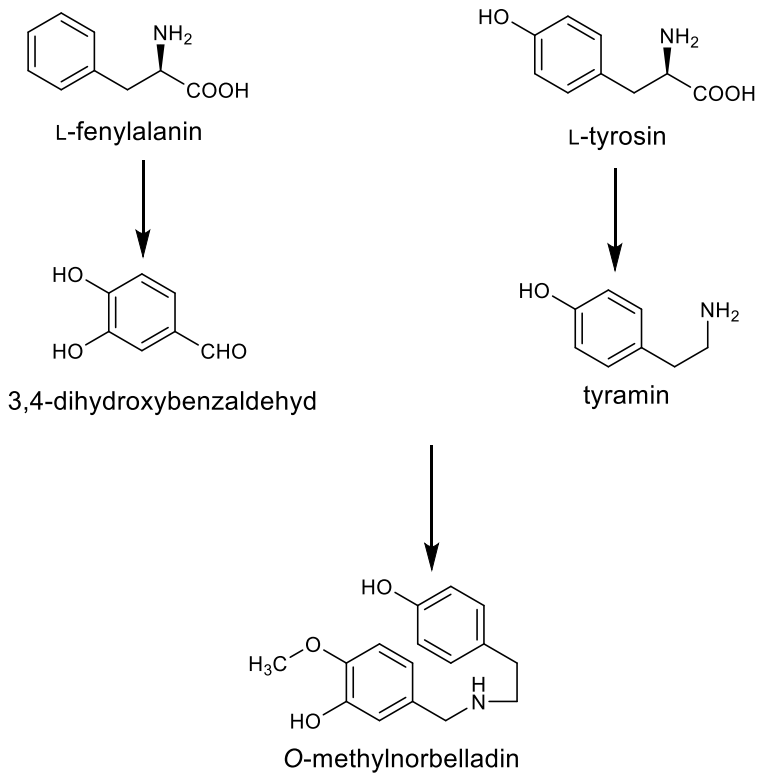
intenzivně studovány z pohledu jejich protinádorové aktivity, kde mezi nejvíce zkoumané látky patří již zmíněný lykorin, dále pankratistatin, haemanthamin a narciklasin (Obr. 2). Vzhledem k poměrně dobré dostupnosti alkaloidů lykorinu a haemanthaminu z rostlinného materiálu jsou v současnosti studovány i různé semisyntetické deriváty těchto přírodních látek.[20]



Obr. 2 Struktury galanthaminu, lykorinu, pankratistatinu a haemanthaminu

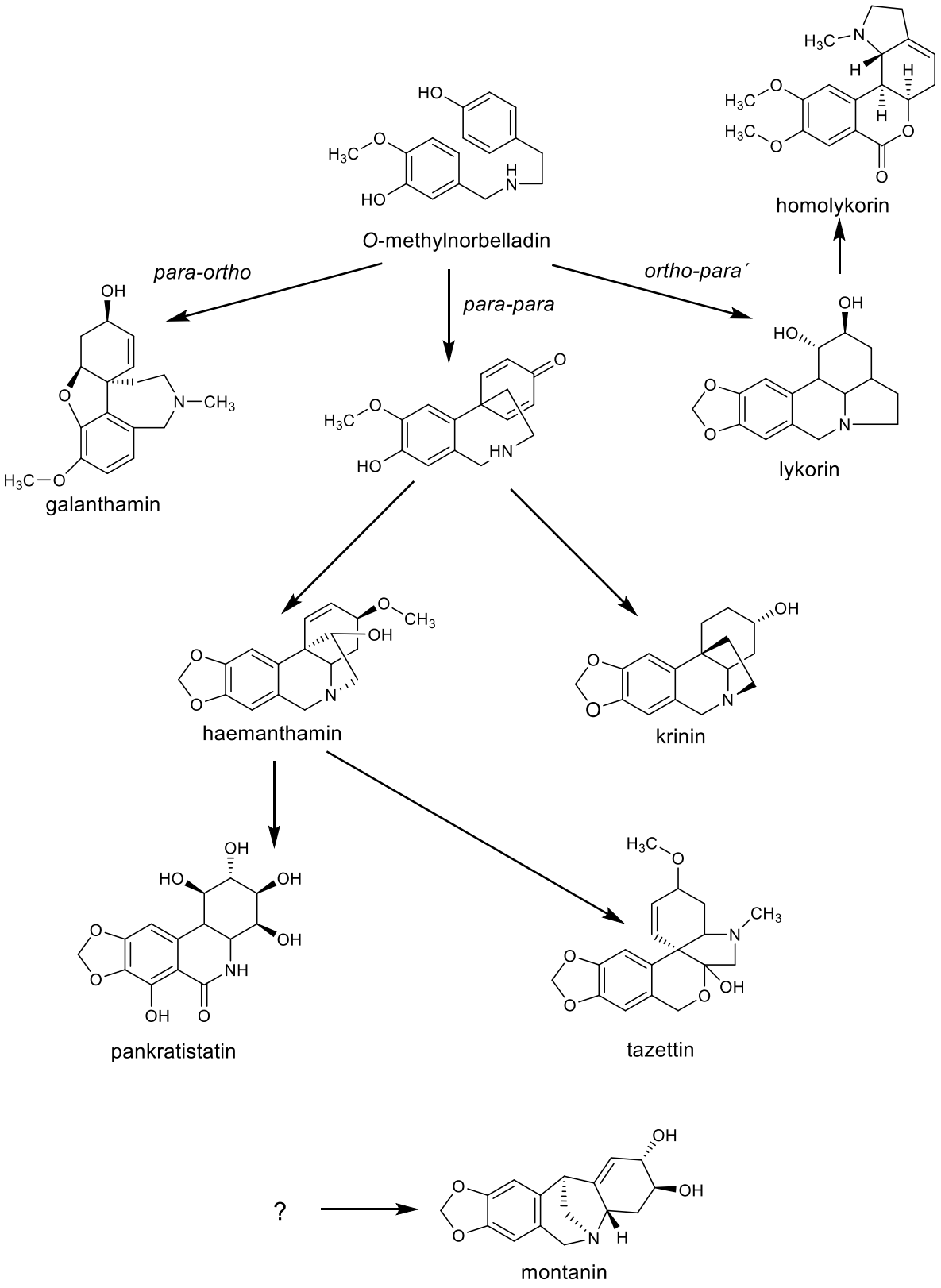
3.1.1 Biosyntéza a rozdělení strukturních typů amarylkovitých alkaloidů

Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jsou syntetizovány v rámci biosyntetické cesty, která je pojmenována podle klíčového meziproduktu norbelladinu jako tzv. norbelladinová cesta. Syntéza vychází z L-tyrosinu, který se mění na tyramin a L-fenylalaninu, ten je přeměňován na 3,4-dihydroxybenzaldehyd a jejich spojením vzniká 4-*O*-methylnorbelladin (Obr. 3).[6]



Obr. 3 Syntéza klíčového meziproduktu 4-*O*-methylnorbellladinu

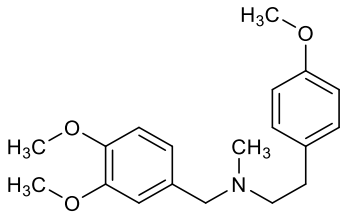
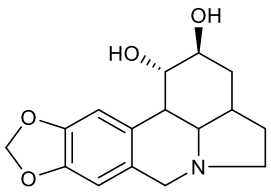
Podle způsobu intramolekulárního oxidativního spojení výše zmíněného klíčového meziproduktu vzniká 9 základních strukturních typů, které jsou pojmenované podle hlavního zástupce (Obr. 4). Mezi hlavní typy patří: norbelladinový (belladin), galanthaminový (galanthamin), haemanthaminový (haemanthamin), homolykorinový (homolykorin), krininový (krinin), lykorinový (lykorin), pankratistatinový (narciklasin) a tazettinový (tazettin). Jak je vidět na následujícím obrázku (Obr. 4) haemanthaminový a krininový typ se liší pouze v prostorové orientaci 5,10*b*-ethanového můstku. Mezi hlavní strukturní typy je řazen i montaninový skelet, zastoupený hlavním alkaloidem montaninem, biosyntetická cesta vedoucí k tomuto strukturnímu typu, ale nebyla doposud zcela objasněna.



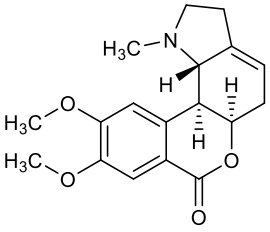
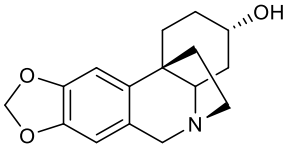
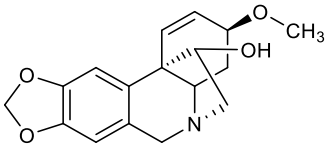
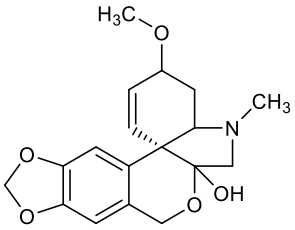
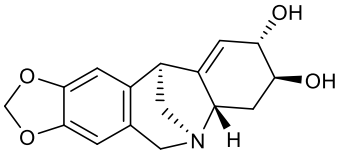
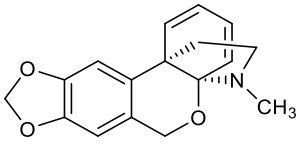
Obr. 4 Biosyntéza základních strukturních typů Amaryllidaceae alkaloidů

V rámci velkého množství fytochemických studií byla izolována a identifikována řada látek patřících do dalších strukturních typů. Tyto strukturní typy jsou často zastoupeny pouze jednou popsanou látkou, nebo byly nalezeny pouze v jediném rodu či rostlinném druhu. Častou se jedná o látky izolované v množství jednotek miligramů, které umožňovalo pouze strukturní analýzu a o jejich biologické aktivitě není ve většině případů nic známo. Jedná se např. o následující strukturní typy: gracilinový typ (gracilin), augustaminový typ (augustamin), gracilaminový typ (gracilamin).[22] Kompletní přehled všech strukturních typů s výčtem hlavních alkaloidů a jejich rostlinných zdrojů je shrnut v následující tabulce (Tab. 1). Zvláštní skupinou jsou alkaloidy patřící do mesembranového strukturního typu, které byly identifikovány a izolovány pouze u dvou druhů narcisů, jmenovitě *Narcissus triandrus* L. a *Narcissus pallidus* Garells.[21] Tyto alkaloidy jsou strukturně podobné alkaloidům krininového typu, a proto se předpokládalo, že budou mít stejný biosyntetický původ. Další studie zabývající se biosyntézou amarylkovitých alkaloidů však ukázaly jinou biosyntetickou cestu, i když ze stejných prekurzorů. Významným zdrojem těchto alkaloidů je rod *Sceletium* L. (Aizoaceae).[22]

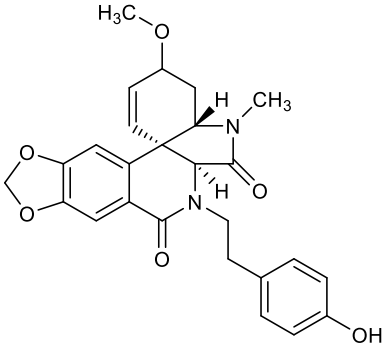
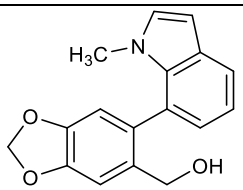
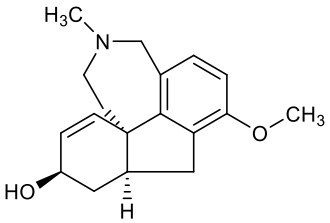
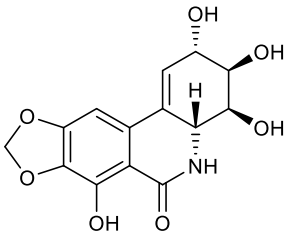
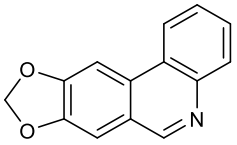
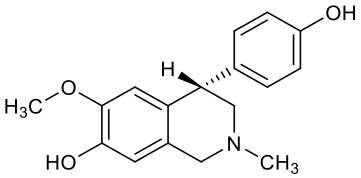
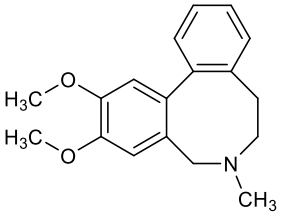
Tab. 1 Všechny strukturní typy alkaloidů dosud izolovaných z čeledi Amaryllidaceae, jejich hlavní zástupci a rody, ze kterých byly izolovány

Strukturní typ	Hlavní zástupce	Rod
Norbelladinový	 Belladin	*Crinum* L.[23] *Lycoris* Herb.[24] *Nerine Herb.*[25]
Lykorinový	 Lykorin	*Amaryllis* L.[26] *Ammocharis* Herb.[27] *Brunsvigia* Heist.[22] *Crinum* L.[28] *Eucharis* Planch.[29] *Hippeastrum* Herb.[22] *Hymenocalis* Salisb.[29] *Leucojum* L.[22] *Narcissus* L.[22] *Zephyranthes* Herb.[30]

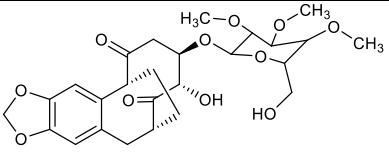
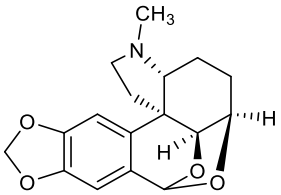
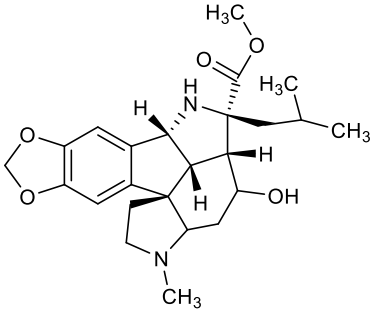
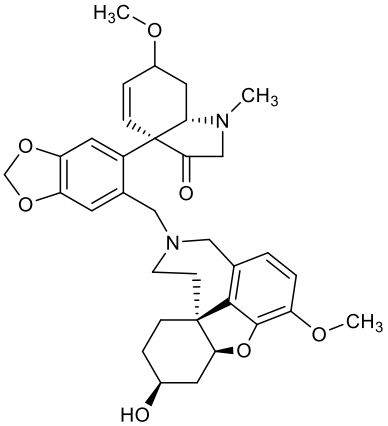
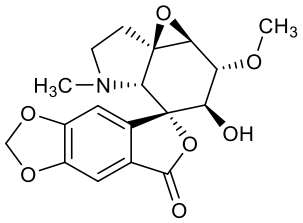
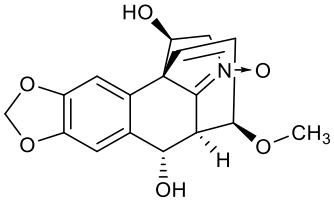
Tab. 1 Všechny strukturní typy alkaloidů dosud izolovaných z čeledi Amaryllidaceae, jejich hlavní zástupci a rody, ze kterých byly izolovány

Homolykorinový		Homolykorin	*Clivia* Lindl.[22] *Galanthus* L.[31,32] *Haemanthus* L.[33] *Lycoris Herb.*[34] *Narcissus* L.[31]
Krininový		Krinin	*Ammocharis* Herb.[22] *Brunsvigia* Heist.[22] *Crinum* L.[28] *Eucharis* Planch.[35] *Narcissus* L.[22] *Nerine* Herb.[25] *Hymenocallis* Salisb.[36]
Haemanthaminový		Haemanthamin	*Ammocharis* Herb.[22] *Brunsvigia* Heist.[22] *Crinum* L.[28] *Eucharis* Planch.[35] *Narcissus* L.[22] *Nerine* Herb.[25] *Hymenocallis* Salisb.[36]
Tazettinový		Tazettin	*Crinum* L.[28] *Galanthus* L.[37] *Hippeastrum* Herb.[22] *Hymenocallis* Salisb.[38]
Montaninový		Montanin	*Boophone* Herb.[22] *Haemanthus* L.[33] *Hymenocalis* Salisb.[39] *Narcissus* L.[40]
Gracilinový		Gracilin	*Galanthus* L.[37]

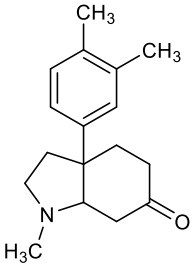
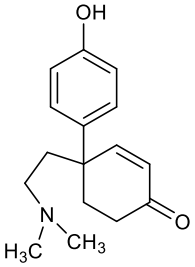
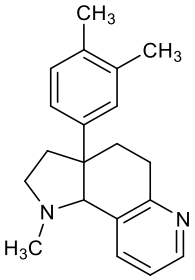
Tab. 1 Všechny strukturní typy alkaloidů dosud izolovaných z čeledi Amaryllidaceae, jejich hlavní zástupci a rody, ze kterých byly izolovány

Plikaminový		Plikamin	*Cyrtanthus* Aiton[41] *Galanthus* L.[37]
Galanthindolový		Galanthindol	*Galanthus* L.[42] *Lycoris* Herb.[34]
Galanthaminový		Galanthamin	*Crinum* L.[23] *Hymenocallis* Salisb.[43] *Leucojum* L.[44] *Lycoris* Herb.[34] *Narcissus* L.[22]
Pankratistatinový		Narciklasin	*Hymenocallis* Salisb.[45] *Brachystola* Girard[46] *Lycoris* Herb.[34]
Phenantridinový		Trisphaeridin	*Crinum* L.[41] *Cyrtanthus* Aiton[41] *Hymenocallis* Salisb.[45]
Cheryllinový		Cheryllin	*Crinum* L.[47]
Buflavinový		Buflavin	*Boophone* Herb.[48]

Tab. 1 Všechny strukturní typy alkaloidů dosud izolovaných z čeledi Amaryllidaceae, jejich hlavní zástupci a rody, ze kterých byly izolovány

Kripowellinový		Kripowellin B	*Crinum* L.[49]
Augustaminový		Augustamin	*Crinum* L.[23]
Gracilaminový		Gracilamin	*Galanthus* L.[50]
Pallidiflorinový		Pallidiflorin	*Narcissus* L.[51]
Galasinový		Galasin	*Galanthus* L.[22]
Hostasininový		Hostasinin	*Lycoris* Herb.[52]

Tab. 1 Všechny strukturní typy alkaloidů dosud izolovaných z čeledi Amaryllidaceae, jejich hlavní zástupci a rody, ze kterých byly izolovány

Mesembranový		Mesembrin	*Narcissus* L.[21,53]
		Joubertiamin	
		Skeletin A4	

3.2 Biologická aktivita alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

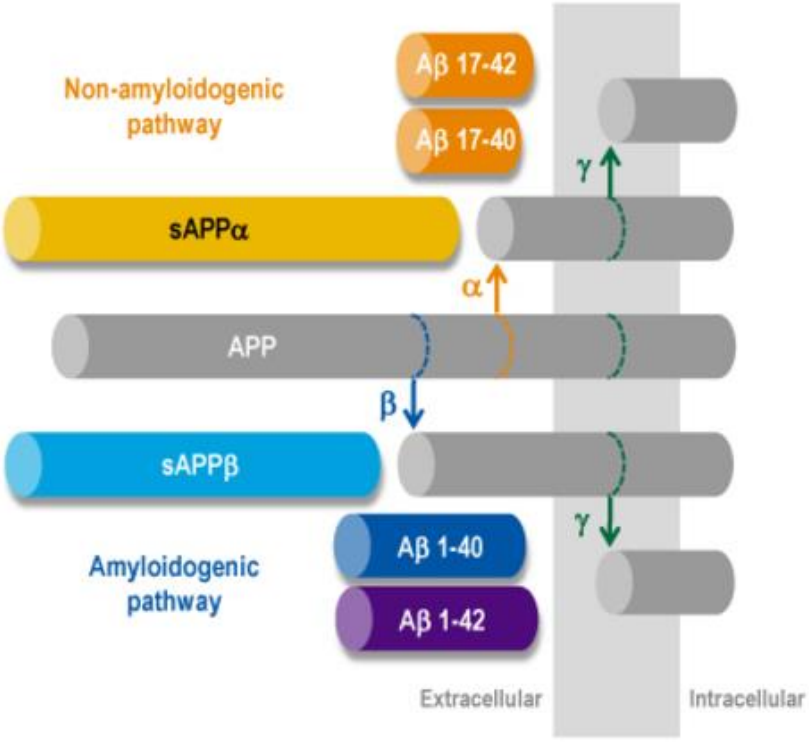
Jak již bylo uvedeno v úvodu alkaloidy čeledi Amaryllidaceae se vyznačují širokým spektrem biologických aktivit, celá řada látek i jejich připravených analog byla podrobena velkému množství studií. Mezi nejvýznamnější aktivity patří jejich protinádorová aktivita indukcí apoptózy[54,55,56] a inhibiční aktivita vůči AChE.[57]

3.2.1 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jako látky využitelné v terapii Alzheimerovy choroby

Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění spojené se stárnutím populace, které se projevuje poruchou paměti a kognitivních funkcí. Rozlišujeme dvě formy AD a to časnou a pozdní, způsob léčby se neliší.[18] Onemocnění lze rozdělit do několika stádií, dle samostatnosti postiženého a úrovně ztráty paměti. Počáteční stadium je charakteristické poruchou učení se novým informacím, pacient hledá odložené předměty a zapomíná vykonávat běžné úkony, ale stále je soběstačný. Ve druhém stadiu dochází k prohloubení deficitu paměti a pacienti si vybavují pouze hluboce vštípené informace. V průběhu tohoto stadia nemoci nastupuje období dezorientace, kdy si pacienti nevybavují místa svého bydliště ani jména svých blízkých. V posledním třetím stadiu dochází k úplné ztrátě paměti, postižení si vybavují pouze útržky informací a nedokážou se naučit žádným novým věcem. Pacienti nepoznávají své blízké a jsou nesoběstační.[58] Vzhledem k tomu, že doposud není objasněna vlastní příčina tohoto závažného onemocnění, léčba je stále pouze symptomatická. Etiopatogeneze onemocnění není sice dostatečně vysvětlena, ale je známa celá řada možných teorií. Hlavní teorie vzniku AD jsou cholinergní a amyloidní hypotézy.[59]

Podle cholinergní teorie v mozku dochází ke snížení hladin neurotransmiteru acetylcholinu a degeneraci cholinergních neuronů. Jedním ze způsobů jak tuto ztrátu částečně kompenzovat jsou inhibitory AChE. Prostřednictvím AChE je u nemocných pacientů modulován metabolismus amyloidového prekurzorového proteinu (APP), který se přirozeně vyskytuje v neuronech. U zdravého člověka je APP štěpen α-sekretasou na fragmenty, které dosahují délky do 40 aminokyselin (AMK). Takto velké fragmenty jsou rozpustné a mají dvě další fyziologické funkce: jednak neuroprotektivní a dále se podílí na tvorbě nových synapsí. Za patologických podmínek u pacientů postižených AD dochází ke štěpení APP

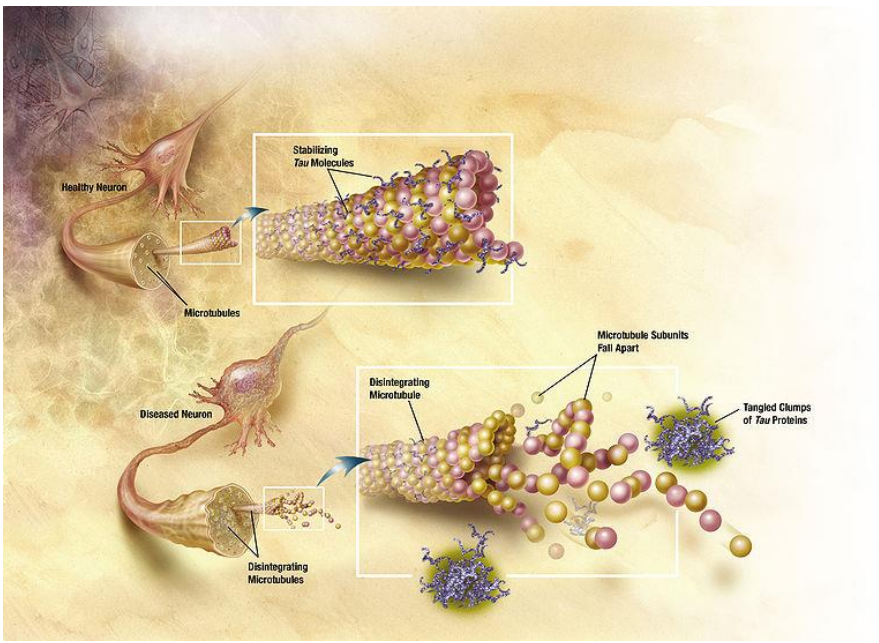
prostřednictvím β- a γ-sekretasy, takto vznikají fragmenty delší než 40 AMK. Tyto fragmenty extracelulárně koagulují, polymerizují a dávají tak vzniku β-amyloidu ve formě fibril (Obr. 5), které se nazývají amyloidní plaky. Komplex takto vzniklých fibril je mnohem toxičtější než fibrily samotné. V místě vzniku plaků dochází k oxidačnímu stresu, k narušení hladin Ca^{2+}, k poruše funkce mitochondrií a k produkci volných kyslíkových radikálů a cytokinů, k aktivaci cyklooxygenasy II a následně k apoptóze.[59]



Obr. 5 Vznik fibril β-amyloidu[60]

Amyloidní teorie se přiklání k vysvětlení, že důvodem ukládání Aβ do fibril je porucha metabolismu APP. Zároveň dochází i k poruše metabolismu τ-proteinu. U zdravého jedince τ-protein ovlivňuje axonální transport a zpevňuje neuronální mikrotubuly tím, že se podílí na inkorporaci tubulinu do mikrotubulů a jejich stabilizaci. U nemocného AD je tento protein ve větší míře fosforylován a místo výstavby mikrotubulů dochází k tvorbě párově helikálních filament, která se shlukují do neurofibrilárních klubek (NFTs) (Obr. 6). Takto postižené neurony ihned zanikají.[58] Mezi významné enzymy, které ovlivňují vznik τ-proteinu patří cyklin-dependentní kinasa 5 (CDK5), která ovlivňuje funkci synapsí a procesy paměti. V patologickém stavu dochází k její hyperaktivaci a následné zvýšené tvorbě APP.[61] Druhým enzymem je glykogensynthasa kinasa (GSK-3β),[62] která hraje důležitou roli v prozánětlivých procesech.

Inhibitory GSK-3β mohou snížit neuronální zánět, toxicitu plaků a mohou ovlivnit plasticitu nervových synapsí.[63]



Obr. 6 Vznik neurofibrilárních klubek[64]

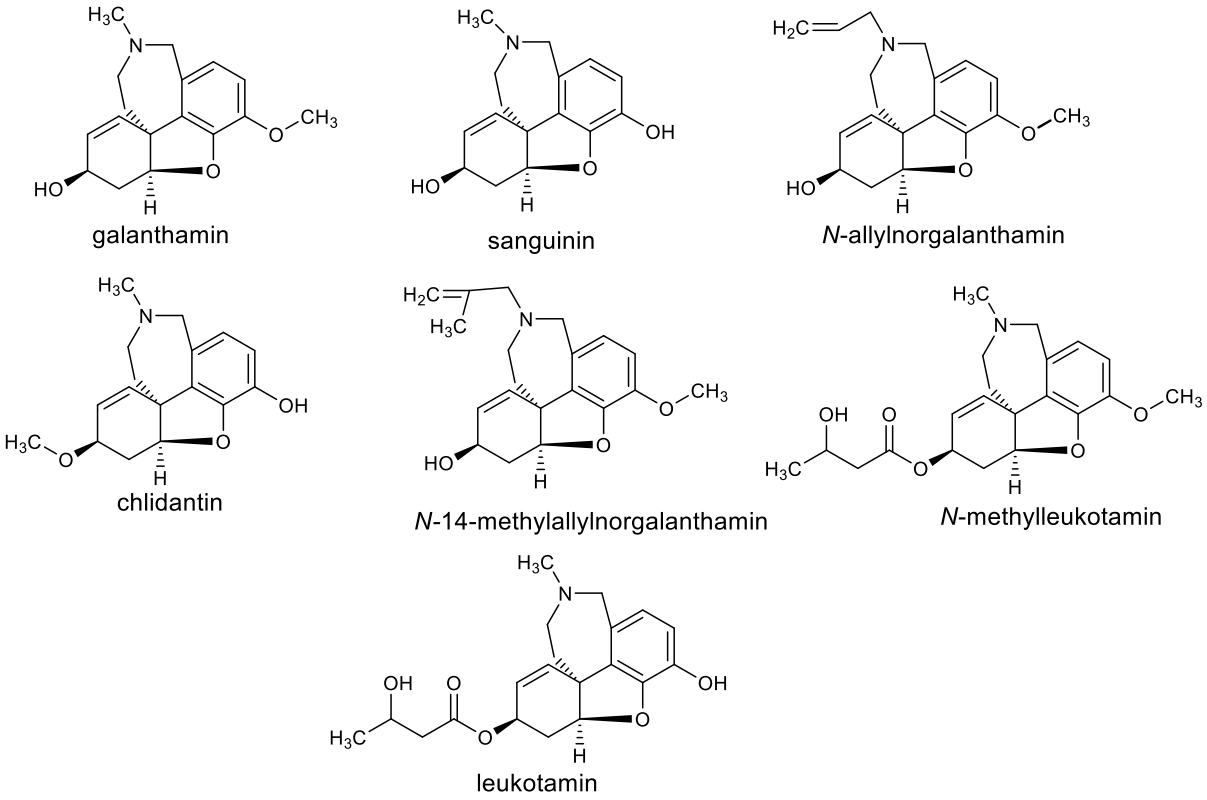
V terapii AD se dnes využívá biologických ale i dalších podpůrných metod. Velmi důležitá je základní péče o pacienta, k níž náleží reedukace denních aktivit, konfrontace s realitou a různé počítačové techniky.[58] K biologickým metodám patří především farmakoterapie; tu lze rozdělit na kognitivní a nekognitivní. V rámci kognitivní farmakoterapie dochází k ovlivnění acetylcholinergního systému. Nejúčinnějším způsobem je podávání inhibitorů acetylcholinesteras – donepezilu, rivastigminu a galanthaminu.[65] Jako méně účinné se jeví podávání prekurzorů acetylcholinu; nedostatečný efekt těchto látek je vysvětlován malou prostupností přes hematoencefalickou bariéru. Dalším způsobem léčby, který se využívá především v pokročilém stadiu choroby, je zlepšení glutamátergní transmise pomocí inhibice *N*-methyl-D-aspartátových receptorů (NMDA receptory), které jsou důležité pro mechanismy učení a paměti. V terapii se využívá pouze jediná látka, kterou je parciální inhibitor memantin.[66]

Jednou z nejvýznamnějších látek s inhibiční AChE aktivitou je právě alkaloid izolovaný z Amaryllidaceae rostlin galanthamin (IC_{50} = 1,07 μM).[67] Poprvé byl izolován z cibulí sněženky *Galanthus woronowii* Losinsk. a později i z dalších rostlin čeledi Amaryllidaceae. Dříve se využíval k antagonizaci účinků látek vyvolávajících neuromuskulární blokádu a pro terapii paralytické poliomyelitidy nebo myasthenia gravis. Dá se využít i jako antagonista dechového

útlumu, který je navozený opioidy, dále antagonizuje centrální cholinergní syndrom vyvolaný droperidolem a diazepamem.[67] Nežádoucí účinky jsou spojené s jeho cholinergními vlastnostmi a patří sem nevolnost, zvracení, bolesti břicha, průjem a poruchy spánku. Významným nežádoucím účinkem je i úbytek hmotnosti a chuti k jídlu.[68] Pro vazebný účinek galanthaminu na enzym jsou důležité následující strukturní detaily: hydroxylová skupina cyklohexenového kruhu, cyklohexenový kruh, terciární aminoskupina a methoxyskupina (Obr. 2).[69]

Od zavedení galanthaminu do praxe léčby AD je věnována velká pozornost i dalším amarylkovitým alkaloidům jako potenciálním inhibitorům cholinesteras. V rámci různých studií bylo připraveno a testováno velké množství alkaloidních extraktů z rostlin této čeledi. Tyto screeningové studie slouží především k výběru rostlinných druhů vhodných pro fytochemické práce za účelem izolace aktivních látek s cholinesterasovou inhibiční aktivitou. Bohužel, ne vždy aktivita alkaloidního extraktu rostliny koreluje s izolací aktivních látek. Příkladem takovéto skutečnosti je aktivita alkaloidního extraktu z cibulí *Nerine bowdenii* Watson, který byl připraven v naší laboratoři, analyzován pomocí GC/MS a testován na inhibiční aktivitu vůči AChE i BuChE. Vzhledem k zajímavé aktivitě vůči BuChE (IC_{50} = 14,8 ± 1,1 $\mu g \cdot ml^{-1}$)[70] byla tato rostlina podrobena fytochemické studii, během které se podařilo izolovat 22 alkaloidů různých strukturních typů. Bohužel ani jedna z látek nevykázala výraznou inhibiční aktivitu vůči BuChE.[71]

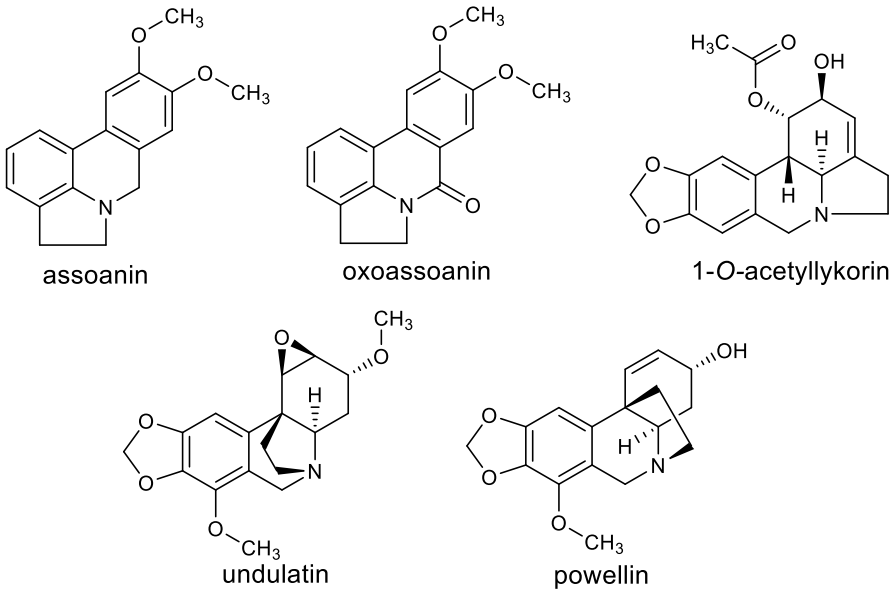
Vedle galanthaminu byly z rostlin čeledi Amaryllidaceae izolovány další sloučeniny s vyšší nebo srovnatelnou AChE inhibiční aktivitou. Většina těchto látek patří do galanthaminového nebo lykorinového strukturního typu. Z rostlin *Galanthus elwesii* Hook[72], *Lycoris sanguinea* Maxim.[73] a několika málo dalších byl izolován alkaloid galanthaminového strukturního typu sanguinin (Obr. 7), který má ve své struktuře místo methoxyskupiny hydroxyskupinu (zbytek molekuly je totožný se strukturou galanthaminu). Tato malá změna má za následek až desetinásobné zvýšení inhibiční aktivity oproti galathaminu[74] (Tab. 2). Stejný efekt byl popsán i u látek s allylovou skupinou na atomu dusíku, jako je *N*-allylnorgalanthamin a *N*-(14-methylallylnorgalanthamin) (Obr. 7).[44] Oproti tomu záměna pozice methoxyskupiny s hydroxyskupinou, jak je tomu v molekule chlidanthinu (Obr. 7), měla zcela opačný efekt[75] a došlo ke ztrátě aktivity (Tab. 2). Další alkaloidy se zajímavou inhibiční aktivitou galanthaminového strukturního typu jsou leukotamin (IC_{50} = 5,3 µM) a *O*-methylleukotamin (IC_{50} = 6,0 µM) (Obr. 7). [76]



Obr. 7 Alkaloidy galanthaminového strukturního typu s acetylcholinesterasovou inhibiční aktivitou

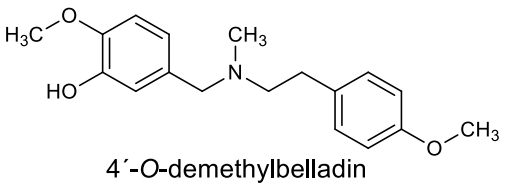
Některé Amaryllidaceae alkaloidy patřící do lykorinového strukturního typu jsou v literatuře uváděny jako zajímavé AChE inhibitory. Asi nejvýraznější látkou je 1-*O*-acetyllykorin (Obr. 8), pro který se udává, že je až 2x aktivnější než galanthamin.[74] Tato látka byla izolována v rámci fytochemické studie *Nerine bowdenii* Watson a byla testována v naší laboratoři na inhibici vůči erytrocytární AChE. Bohužel v provedených studiích se tato látka jevila jako zcela neaktivní.[71] Na základě zcela rozdílných výsledků byla látka podrobena studii na inhibiční aktivitu vůči komerčně dostupné AChE z elektrického úhoře, tak jak tomu bylo ve starších studiích, ve kterých byl 1-*O*-acetyllykorin uveden jako silný inhibitor AChE. V rámci této studie byla získaná mnohem zajímavější hodnota IC_{50} (IC_{50} = 28,40 ± 0,35 μM) oproti inhibici erytrocytární AChE (IC_{50} > 1000 μM), ale i tak nedosahuje hodnot uváděných ve starší literatuře (IC_{50} = 0,96 ± 0,04 μM).[77] Mezi další alkaloidy lykorinového typu se zajímavou inhibiční aktivitou patří assoanin (IC_{50} = 3,87 μM) a oxoassoanin (IC_{50} = 47,21 μM)[74] (Obr. 8). Vyšší inhibiční aktivita těchto alkaloidů oproti alkaloidům lykorinového strukturního typu je vysvětlována postavením kruhu C, který do molekuly přináší určitou planaritu.

Alkaloidy krininového typu byly v literatuře uváděny jako velmi slabé inhibitory AChE. V rámci fytochemických prací na rostlině *Chlidanthus fragrans* Herb. byl izolován alkaloid undulatin (Obr. 8), který byl podroben studii na jeho inhibiční aktivitu a zároveň byl studován typ inhibice a schopnost této látky přestupovat přes hematoencefalickou membránu.[78] Na základě výsledků se tato látka jeví jako poměrně zajímavá i s ohledem na schopnost inhibice prolyl oligopeptidasy (POP), o které bude pojednáno dále. Z rostliny *Nerine bowdenii* Watson byl izolován společně s undulatinem i další alkaloid krininového typu powellin (Obr. 8), který se také vyznačoval zajímavou inhibiční AChE aktivitou srovnatelnou s undulatinem (Tab. 2).[71]



Obr. 8 Amaryllidaceae alkaloidy ostatních strukturních typů s AChE inhibiční aktivitou

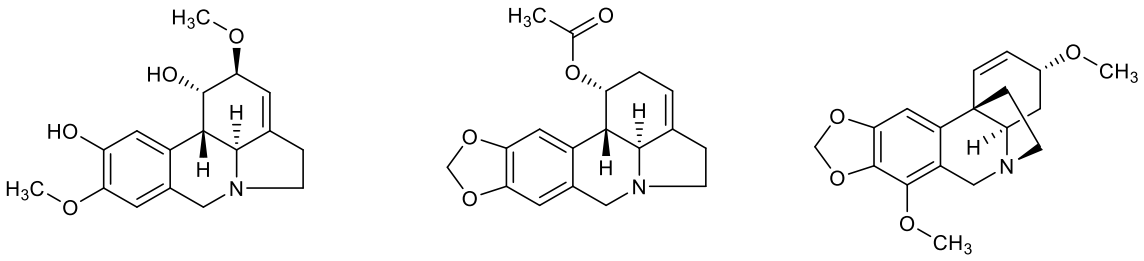
Co se týká inhibice BuChE, je v literatuře prozatím omezené množství informací, prakticky všechny studie zabývající se inhibiční aktivitou Amaryllidaceae alkaloidů pocházejí pouze z naší laboratoře. Zatím nejzajímavější látkou je 4´-*O*-demethylbelladin (IC_{50} = 30,7 ± 4,2 µM), jehož aktivita je srovnatelná s aktivitou galanthaminu (IC_{50} = 43,3 ± 1,3 µM) (Tab. 2).



Obr. 9 Struktura 4´-*O*-demethylbelladinu

Zajímavým terapeutickým cílem a podpůrnou léčbou u pacientů s AD by mohla být inhibice POP. Prolyl oligopeptidasa je cytosolová serinová peptidasa štěpící malé peptidy obsahující aminokyselinu prolin. Substráty tohoto enzymu jsou například substance P, vazopresin a některé peptidy. Tyto substráty plní funkci modulátorů kognitivních funkcí a jejich degradace prostřednictvím POP může urychlovat proces stárnutí, případně hrát roli při neurodegenerativních onemocněních.[79] V posledních letech inhibice poutá pozornost pro terapii schizofrenie, bipolární afektivní poruchy a kognitivních poruch, které se vyskytují i u pacientů s AD.

Stejně jako u inhibice BuChE veškeré literární údaje týkající se POP inhibice Amaryllidaceae alkaloidů pochází z našeho pracoviště. Prozatím bylo testováno cca 25 těchto látek patřících do různých strukturních typů, z nichž mezi nejzajímavější patří 9-*O*-demethylgalanthin izolovaný ze *Zephyranthes robusta* (Herb. Ex Sweet) Baker.[60], jehož inhibiční aktivita POP je srovnatelná s aktivitou isochinolinového alkaloidu berberinu (IC_{50} = 0,14 ± 0,02 mM), který je považován za standardní inhibitor POP. Další alkaloidy se zajímavou POP inhibiční aktivitou jsou 1-*O*-acetyllykorin, powellin (Obr. 8), bufanidrin a acetylkaranin (Obr. 10, Tab. 2).



Obr. 10 Struktura vybraných Amaryllidaceae alkaloidů s POP inhibiční aktivitou

Tab. 2 Inhibiční aktivity vybraných alkaloidů čeledi Amaryllidaceae vůči AChE, BuChE a POP

Alkaloid	IC_{50} AChE (μM)	IC_{50} BuChE (μM)	IC_{50} POP (mM)
Sanguinin[a,74]	0,10 ± 0,01	NT	NT
Galanthamin[a,74]	1,07 ± 0,18	43,3 ± 1,3	> 100
N-Allylnorgalanthamin[a,44]	0,18	NT	NT
N-(14-Methylallyl)norgalanthamin[a,44]	0,16	NT	NT
Chlidanthin[a,75]	147 ± 6	422 ± 15	NT
Leukotamin[a,76]	5,3	NT	NT
O-Methylleukotamin[a, 76]	6,0	NT	NT

Tab. 2 Inhibiční aktivity vybraných alkaloidů čeledi Amaryllidaceae vůči AChE, BuChE a POP

Oxoassoanin[b,74]	47,21 ± 1,13	NT	NT
Assoanin[b,74]	3,87 ± 0,24	NT	NT
Lykorin[b,74]	> 500	>1000	NT
1-*O*-Acetyllykorin[b,71]	0,96 ± 0,04	176,2 ± 14,2	0,45 ± 0,05
Undulatin[c,78]	23,0 ± 1,0	>1000	1,96 ± 0,12
Powellin[c, 71]	29,1 ± 1,6	394,0 ± 4,8	0,77 ± 0,02
4´-*O*-Demethylbelladin[d, 71]	606,8 ± 74,2	30,7 ± 4,0	0,37 ± 0,03
Bufanidrin[c, 71]	72,6 ± 8,2	>1000	0,37 ± 0,04
Acetylkaranin[b, 71]	443,7 ± 62,4	141,2 ± 12,6	0,65 ± 0,04

a – galanthaminový typ, b – lykorinový typ, c – krininový typ, d – norbelladinový typ, NT – nebylo testováno

3.2.2 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jako látky využitelné v terapii nádorových onemocnění

Onkologická onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve světě. V Evropě patří onemocnění rakovinou k druhé nejčastější příčině úmrtí hned po kardiovaskulárních chorobách.[80] Nejčastěji se objevují nádory plic, prsu, tlustého střeva, žaludku a prostaty. Většina postižených umírá v důsledku rozšíření metastáz a zasažení životně důležitých orgánů. Standardní léčba se skládá z chirurgických zákroků, ozařování a chemoterapie. Chemoterapeutická léčba však může poškodit i zdravé tkáně, což má za následek celou řadu vedlejších účinků. Závažnou komplikací léčby onkologických onemocnění je také rezistence nádorových buněk vůči použitému chemoterapeutiku.[81] V některých případech může dokonce dojít k rozvoji rezistence i na chemoterapeutika lišící se jak strukturně tak i mechanismem účinku. V takových případech pak mluvíme o mnohočetné lékové rezistenci.[82] V současné době tak nabývá na významu hledání nových látek s cytostatickým účinkem, které by jednak selektivně ničily nádorové buňky a zároveň nepoškozovaly buňky zdravé.

Mezi takové sloučeniny patří alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae[83], které se vyznačují protinádorovou aktivitou indukcí apoptózy. Výhodou je navíc jejich vysoká selektivita vůči nádorovým buňkám a relativně nízká toxicita pro zdravé a klidové buňky. Stejně jako v případě schopnosti inhibice cholinesteras je i v tomto případě aktivita spojená s určitým strukturním typem. Z doposud publikovaných studií je možné konstatovat,

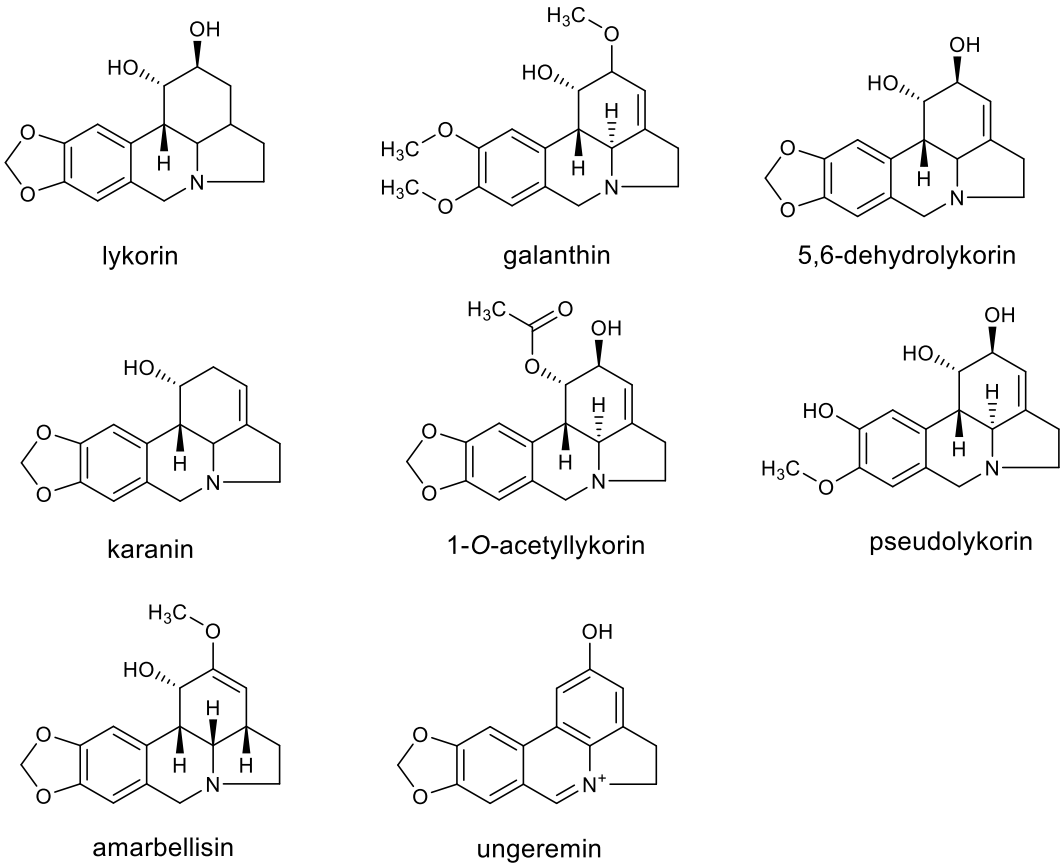
že nejzajímavější protinádorovou aktivitu vykazují alkaloidy lykorinového, pankratistatinového, haemanthaminového a krininového strukturního typu.[83]

Mezi zajímavé Amaryllidaceae alkaloidy, které jsou v poslední době studovány z pohledu protinádorové aktivity, patří lykorin (Obr. 11). Tato látka se vyznačuje širokým spektrem biologických účinků; spolu s dalším alkaloidem lykorinového typu galanthinem (Obr. 11) mají schopnost inhibovat syntézu kyseliny askorbové v jejím posledním kroku, inhibicí L-galaktono-γ-lakton dehydrogenasy, která se nachází na mitochondriální membráně, čímž dochází k indukci apoptózy. Lykorin interaguje s mitochondriální DNA,[84] dále působí proti celé řadě virů, jako je poliovirus, virus pravých neštovic a SARS-asociovaný koronavirus.[85,86,87] Lykorin byl také testován na antimykotickou aktivitu, kde byla zjištěna aktivita vůči *Saccharomyces cerevisiae*[88], *Candida albicans* a *Lodderomyces elongisporus*.[89]

Protinádorová aktivita lykorinu byla *in vitro* testována na širokém spektru nádorových a zdravých linií. Přehledový článek z roku 2014[90] uvádí 42 testovaných linií, získané IC_{50} se pohybovaly mezi hodnotami od 0,3 $\mu g \cdot ml^{-1}$ pro linii KB (IC_{50} = 0,3 $\mu g \cdot ml^{-1}$), U373 (IC_{50} = 0,3 $\mu g \cdot ml^{-1}$)[91], LMTK (IC_{50} = 0,3 $\mu g \cdot ml^{-1}$)[92] až po jednotky $\mu g \cdot ml^{-1}$, například pro linie HeLa (IC_{50} = 6,33 $\mu g \cdot ml^{-1}$), BCA-1 (IC_{50} = 1,6 $\mu g \cdot ml^{-1}$), a celou řadu dalších (Tab. 3). Hodnoty IC_{50} pro zdravé a klidové linie jako W138, WS1, a NHDFZ byly vyšší jak > 100 μM.[90] Protinádorová aktivita lykorinu byla prokázána i v *in vivo* studiích u myšího melanomu BL6 a Lewisova plicního karcinomu.[93] V nedávné době bylo zjištěno, že lykorin vykazuje cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým buňkám, které jsou rezistentní k apoptóze.[94] Tohoto zjištění se může využít při léčbě metastazujících nádorů, které jsou rezistentní k léčivům indukujícím apoptózu. Bylo provedeno i několik studií zabývajících se analýzou buněčného cyklu. Při testování lykorinu na p-53 negativní linii lidských promyelocytů HL-60 *in vitro* byla pozorována zástava buněčného cyklu v G2/M fázi a následná indukce apoptózy, která byla doprovázená zvýšenou aktivitou kaspas-3, -8, -9.[95] Další studie byly provedeny na buňkách lidského mnohočetného myelomu KM-3, kde u buněk vystavených účinku lykorinu došlo k akumulaci v G0/G1 fázi buněčného cyklu.[96]

Mezi další lykorinové alkaloidy s cytotoxickou aktivitou můžeme zařadit 5,6-dehydrolykorin, karanin, 1-*O*-acetyllykorin, pseudolykorin a amarbellisin (Obr. 11, Tab. 3). U 5,6-dehydrolykorinu byl zjištěn cytotoxický účinek při testování na nádorových liniích HL-60, CHG-5, SHG-44, U251, W480 (Tab. 3).[97] 1-*O*-Acetyllykorin vyvolává apoptózu u leukemických buněčných linií Jurkat.[112] Pseudolykorin inhibuje proteosyntézu ve stadiu tvorby peptidové

vazby, ale na jiném místě než je tomu u lykorinu.[98] Ungeremin, metabolit lykorinu, má vliv na inhibici buněčného růstu leukemických linií (Obr. 11).[99]



Obr. 11 Alkaloidy lykorinového strukturního typu se zajímavou cytotoxickou aktivitou

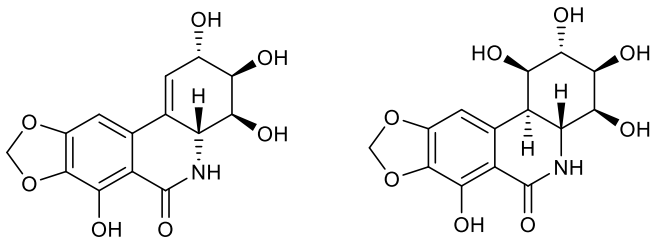
Tab. 3 Inhibiční aktivity růstu některých studovaných Amaryllidaceae alkaloidů lykorinového strukturního typu vůči vybraným nádorovým liniím

Alkaloid	Buněčné linie *in vitro* IC_{50} (μM) inhibice růstu					
	HL-60	A549	OE21	Hs683	U373	HSC-2
Lykorin[90,107]	1,1 ± 0,1	4,3 ± 0,3	4,5 ± 0,7	6,9 ± 0,5	7,6 ± 0,4	5,1 ± 0,1
Pseudolykorin[90,97,112]	NT	7,4 ± 0,2	7,9 ± 0,3	7,9 ± 0,1	7,8 ± 0,1	NT
Galanthin[90]	NT	>10	>10	>10	>10	NT
Amarbellisin[90,97]	NT	7,2 ± 0,3	6,7 ± 0,2	8,3 ± 0,3	7,3 ± 0,2	NT
Karanin[90]	NT	>10	>10	>10	>10	NT
Ungeremin[99]	NT	>10	>10	>10	83 ± 1	NT
	HL-60	CHG5	SHG-44	U251	W480	U251
5,6-Dehydrolykorin[90]	10,8 ± 1,6	10,2 ± 1,6	9,4 ± 1,3	11,8 ± 0,7	11,6 ± 1,1	11,8 ± 0,7

NT – netestováno

Druhým strukturním typem, který se vyznačuje protinádorovou aktivitou, je typ pankratistatinový, kde nejzajímavějšími sloučeninami jsou pankratistatin a narciklasin (Obr. 12). Pankratistatin působí inhibičně na mnoho typů rakovinných buněk např. na leukemické, buňky rakoviny prsu, tlustého střeva, osteosarkom a další. Aktivita pankratistatinu je patrná už při nízkých koncentracích a minimálně ovlivňuje buňky zdravé. Selektivita pankratistatinu byla potvrzena u dvou typů kolorektálního karcinomu: p-53 mutovaný HT-29 a p-53 wild type HCT 116 v porovnání se zdravými fibroblasty CCD-18Co. Pankratistatin indukuje apoptózu v nádorových buňkách, přesný biochemický mechanismus tohoto účinku ale stále není zcela objasněn. Předpokládá se, že působí v mitochondriích na úrovni mitochondriální membrány.[100] Nevýhodou této látky je její poměrně problematická dostupnost z rostlinného materiálu, v němž je tato látka zastoupena pouze v minoritních množstvích. Tento alkaloid byl poprvé izolován v roce 1984 z *Pancratium littorale* Jacq.[101] Příkladem dalších zdrojů je *Hippeastrum vittatum* Herb.[102], kde byl izolován z květů a *Pancratium maritimum* L.[103] Z důvodů potřeby většího množství této látky pro podrobnější biologické studie byla vypracována řada syntetických postupů, které jsou ale poměrně náročné. Totální syntézy zahrnují vždy minimálně 13 kroků[104] a výtěžek pankratistatinu se pohybuje u všech postupů do 10 %. Syntéza vycházející z narciklasinu, který je z přírodních zdrojů dostupnější, zahrnovala 10 kroků[104] a byla vypracována a publikována v roce 2001 Pettitem a kol.[105]

Narciklasin je antimitoticky a protinádorově působící alkaloid, který ovlivňuje buněčné dělení v metafázi a inhibuje syntézu proteinů v eukaryotických buňkách interakcí s ribozomální podjednotkou 60S, čímž inhibuje činnost peptidyltransferasy, která se podílí na vzniku peptidové vazby.[106] Dále může vytvářet komplexy s DNA nebo interagovat s mikrotubuly dělícího vřeténka.[107] Studie prokázaly cytotoxické působení na buňky adenokarcinomu MCF-7 a buňky karcinomu prostaty PC-3.[108]

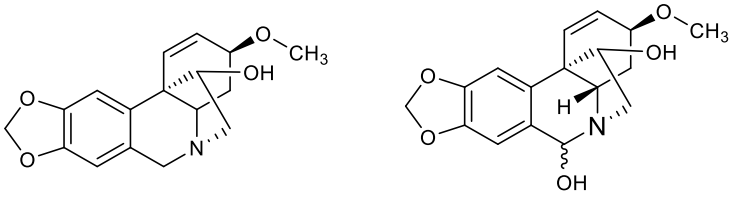


narciklasin pankratistatin

Obr. 12 Alkaloidy pankratistatinového typu se zajímavou cytotoxickou aktivitou

Dalším zajímavým strukturním typem, který stojí z pohledu protinádorové aktivity za zmínku je haemanthaminový, resp. β-krininový typ, jak je v literatuře někdy označován. Alkaloidy krininového a haemanthaminového typu se liší pouze v prostorové orientaci 5,10*b*-ethanového můstku a je zajímavé, že tento fakt hraje klíčovou roli, co se týká protinádorové aktivity těchto látek. Ta je spojena především s haemanthaminovým strukturním typem, kde bylo identifikováno více látek disponujících touto aktivitou (např. haemanthamin, haemanthidin, krinamin); z alkaloidů krininového resp. α-krininového typu je tato aktivita popisována pouze u vzácného alkaloidu distichaminu, který byl prozatím izolován v miligramovém množství z cibulí *Boophone disticha* Herb. a je chemotaxonomickým znakem této rostliny.[109]

Protinádorová aktivita haemanthaminu a haemanthidinu (Obr. 13) byla zjištěna při testování na nádorových buněčných liniích A549, OE21, U373, Hs683, SKMEL a B16F10 (Tab. 4). [110,111] V této studii vykazoval haemanthidin vyšší cytotoxickou aktivitu než lykorin.[111] Významným poznatkem získaným u obou alkaloidů je jejich protinádorový účinek i u linií rezistentních vůči apoptóze.[111] Další testované linie byly HL-60, HSC-2 a leukemická linie Jurkat[112], u kterých obě látky indukovaly apoptózu. Oba dva alkaloidy způsobují změny exprese některých proteinů ovlivňujících apoptózu a zastavovaly buněčný cyklus v G1 a G2/M fázi. Haemanthamin navíc selektivně inhibuje růst nádorových buněk, aniž by poškozoval buňky zdravé. Tato schopnost byla prokázána při studiích na nádorových buňkách hepatocelulárního karcinomu u potkanů, kdy došlo k indukci apoptózy u nádorových buněk a naopak nedošlo k poškození lidských embryonálních buněk.[56]



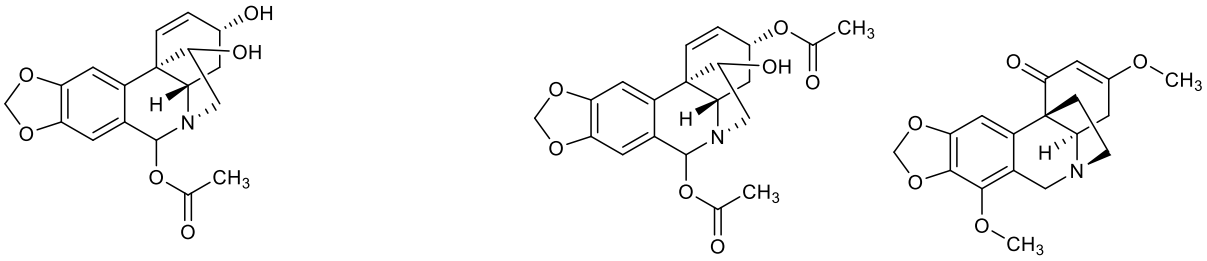
Obr. 13 Struktura haemanthaminu a haemanthidinu

Tab. 4 Protinádorová aktivita lykorinu, haemanthaminu a haemanthidinu

Alkaloid	Buněčné linie *in vitro* IC_{50} (μM) inhibice růstu						
	SKMEL	A549	OE21	Hs683	U373	B16F10	HT-29
Lykorin	8,4 ± 0,2	4,3 ± 0,3	5,1 ± 0,4	6,7 ± 0,3	7,6 ± 0,2	6,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1
Haemanthamin	8,5 ± 0,2	4,5 ± 0,6	6,8 ± 0,7	7,0 ± 0,3	7,7 ± 0,5	6,8 ± 0,2	0,59 ± 0,01
Haemanthidin	4,2 ± 0,2	4,0 ± 0,4	3,7 ± 0,2	4,3 ± 0,2	3,8 ± 0,2	3,1 ± 0,2	1,7 ± 0,1

Distichamin (Obr. 14) vykázal ve studiích cytotoxicitu k nádorovým buňkám MCF-7 (IC_{50} = 2,3 ± 0,8 μM), HeLa (IC_{50} = 2,2 ± 0,1 μM), G-361 (IC_{50} = 14,7 ± 0,1 μM), K562 (IC_{50} = 4,1 ± 0,9 μM) a CEM (IC_{50} = 4,5 ± 1,6 μM), ale není selektivní pouze k nádorovým buňkám a působí i na buňky zdravé.[113] Mechanismem účinku je redukce buněčného cyklu v G0/G1 fázi a S fázi a následuje zástava v G2/M fázi, která je závislá na dávce a aktivitě kaspas.[114]

Mezi další studované alkaloidy tohoto typu patří vittatin, který byl testován na buněčných liniích HT-29 (IC_{50} = 21,91 μM), H460 (IC_{50} = 15,88 μM) a RFX393 (IC_{50} = 29,57 μM), bohužel nedosahoval takových hodnot IC_{50} jako haemanthamin a haemanthidin.[115] Testovány byly i 3α,6β-diacetylbulbispermin a 3α-hydroxy-6β-acetylbulbispermin (Obr. 14); u těchto látek byla zjištěna aktivita na nádorové linie HL-60 a mírně působily i na CCF-STTG1, CHG-5 a U251.[4]



Obr. 14 Alkaloidy haemanthaminového a krininového typu s cytotoxickou aktivitou

Poslední zajímavou látkou je pretazettin, patřící do tazettinového strukturního typu, který byl testován na buňkách myšího i lidského lymfomu se zajímavými výsledky. Největší účinek byl prokázán na T-lymfoidní buňky MOLT-4, buňky Rauschnerovy leukémie a buňky Lewisova karcinomu. Pretazettin inhibuje aktivitu Pg-P, HeLa buněk a potencuje aktivitu

doxorubicinu vůči myším lymfoidním buňkám. Mechanismem účinku pretazettinu je inhibice proteosyntézy ve fázi formování peptidové vazby.[83]

Tab. 5 Význam zkratek buněčných linií používaných pro testování cytotoxicity

A549	Karcinom plic
B16F10	Myší melanom
BCA-1	Karcinom prsu
CCD-18CO	Lidský střevní fibroblast
CCF-STTG1	Astrocytom
CEM	Lymfoblastická leukémie
G-361	Melanom
H460	Karcinom plic
HCT 116	Kolorektální karcinom
HeLa	Adenokarcinom děložního čípku
HL-60	Promyelocytární leukémie
Hs683	Gliom
HSC-2	Dlaždicobuněčný karcinom
HT-29	Kolorektální adenokarcinom
CHG-5	Gliom
K562	Myelogenní leukémie
KB	Epidermální karcinom úst
LMTK	Myší fibroblasty
MCF-7	Karcinom prsu
MOLT-4	Akutní lymfoblastická leukémie
NHDFZ	Lidské kožní fibroblasty
OE21	Nádor dlaždicobuněčného epitelu jícnu
RFX393	Adenokarcinom ledvin
SHG-44	Gliom
SKMEL	Melanom
U251	Gliom
U373	Glioblastom astrocytom
W138	Lidské plicní fibroblasty
W480	Kolorektální karcinom
WS1	Lidské kožní fibroblasty

3.2.3 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jako látky využitelné v terapii protozoálních onemocnění

Malárie je jedno z nejzávažnějších parazitárních onemocnění na světě s primárním výskytem v tropickém a subtropickém pásmu. Patří mezi tzv. transmisivní nákazy, tedy nákazy, které jsou přenášeny pomocí vektorů, v tomto případě prostřednictvím komára rodu *Anopheles*. Malárie je způsobena prvoky rodu *Plasmodium*, mezi nejznámější patří *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*.[116] Nejrozšířenějším druhem je *P. falciparum*, které bývá zároveň rezistentní na stávající léčbu chlorochinem.[121] Mezi příznaky malárie patří horečka, zimnice, bolest kloubů a pocení. V některých případech může způsobit chudokrevnost či žloutenku, zapříčiněnou ztrátou červených krvinek. K léčbě tohoto typu malárie se využívá artemisinin (*Artemisia annua* L.), který je přírodního původu, a to je důvodem pozornosti, která je věnována přírodním látkám při hledání nových léčiv. [117]

Antimalarická aktivita vůči chlorochin-rezistentním kmenům D10 a FAC8 *P. falciparum* byla studována a zjištěna u lykorinu a 1,2-di-*O*-acetyllykorinu. Dalším testovaným alkaloidem lykorinového typu byl 5,6-dehydrolykorin, který byl účinný proti *P. falciparum* D-6 a W-2.[4] Studiím byly podrobeny krinin, 11-*O*-acetylambellin a ambellin, které vykazovaly menší antimalarickou aktivitu proti uvedeným chlorochin-rezistentním kmenům. Aktivita vůči rezistentním kmenům FCR3 byla zjištěna také u derivátů lykorinu, 1,2-di-*O*-butanoyllykorinu a 1-*O*-propanoyllykorinu.[118] Mezi alkaloidy haemanthaminového a krininového typu vykazující antimalarickou aktivitu patří haemanthamin a krinamin.[119,120]

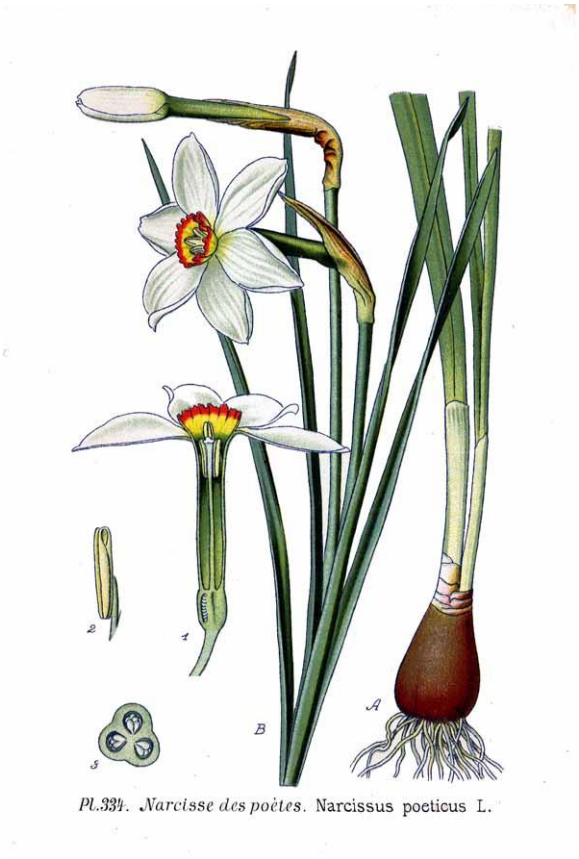
Závažným protozoálním onemocněním je i leishmanióza, která je způsobená prvoky rodu *Leischmania*. Klinicky se projevuje pomalu se hojícími vředy, které jsou u některých forem pouze na kůži, u závažnějších případů se mohou vyskytovat i v nosohltanu, na sliznicích úst a chrupavčitých tkáních obličeje. Někdy toto onemocnění může skončit i smrtelně.[121]

Trypanosomóza, která je způsobena prvokem *Trypanosoma brucei,* je příčinou spavé nemoci. Toto onemocnění se projevuje zduřením uzlin, anémií, kardiologickými problémy a onemocněním ledvin. Poslední stadium nemoci je neurologické, kdy dochází k napadení nervového systému projevující se zmateností, únavou a těžkou malátností. Chagasova nemoc, kterou způsobuje *Trypanosoma cruzi*, , se projevuje horečkou, otoky víček, zduřením mízních uzlin, hepatosplenomegalií až selháním srdeční svaloviny.[121]

Určitou aktivitu vůči *T. brucei* vykazoval pankracin, který disponoval i slabou antimalarickou aktivitou. Antiparazitická aktivita proti oběma kmenům rodu *Trypanosoma* byla zjištěna u nangustinu, ungereminu, 3-*O*-acetylsanguininu. Pankracin i nangustin byly aktivní i proti prvoku *Leischmania*.[122]

Další pozornost je v literatuře věnována Amaryllidaceae alkaloidům i z pohledu jejich anxiolytické, protizánětlivé i antivirové aktivity, prozatím je těchto studií malé množství[123, 124], z tohoto důvodu zde nebudou rozebrány podrobněji.

3.3 Botanická charakteristika rostliny *Narcissus poeticus* L. – narcis bílý



Obr. 15 *Narcissus poeticus* L.[125]

Název „Narcissus“ pochází z řeckého slova „narkao“, což znamená strnulý a pochází z narkotických účinků rostliny. Přirozeným výskytem této rostliny je oblast střední a jižní Evropy od Španělska přes Francii, Švýcarsko, Rakousko, Chorvatsko, Řecko až po Ukrajinu. [127] Na jiných místech došlo ke zplanění jeho kultur. Pěstován však může být po celém světě.

Jedná se o vytrvalou bylinu dorůstající výšky 20-40 cm, která má cibuli vejcovitého tvaru o průměru asi 20 mm. Listy jsou celokrajné, čárkovité, široké až 1 cm se souběžnou žilnatinou, přisedlé s listovými pochvami a vytvářejí přízemní růžici. Květy jsou oboupohlavné a na vrcholu stonku se nachází pouze jeden květ. Pod květem se nalézá toulcovitý listen. Okvětí je složeno ze 6 bílých okvětních lístků ve 2 přeslenech, které v dolní části srůstají v trubku. V ústí trubky se nachází pakorunka vytvářející úzký límeček, která je žlutá s červeně zbarveným vroubkovaným okrajem. Tyčinek je 6, gyneceum je složeno ze 3 pestíků. Plodem je tobolka.[126]

Přirozená prostředí výskytu jsou rozmanitá, převážně se vyskytují na otevřených prostranstvích na horských pastvinách a na březích řek. Rostliny rostou převážně v kyselých

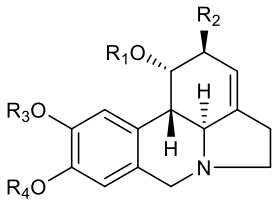
půdách. Divoce rostoucí populace narcisů dnes z divoké přírody z mnoha míst vymizely, někde se mohou objevovat zplanělé pěstované odrůdy těchto rostlin.[127]

3.3.1 Alkaloidy izolované z *Narcissus poeticus* L.

Do dnešní doby bylo provedeno několik fytochemických studií a bylo izolováno nebo identifikováno (nejčastěji GC/MS technikou) 16 alkaloidů, které patří do následujících strukturních typů: lykorinového (lykorin, galanthin, poetaminin, narrcissidin), haemanthaminového (haemanthamin), homolykorinového (homolykorin, lykorenin, poetinatin), tazettinového (tazettin), narciklasinového (narciklasin) a galanthaminového (galanthamin). V následující tabulce jsou shrnuty a uvedeny struktury všech alkaloidů izolovaných z *Narcissus poeticus* L., jeho variet a pěstovaných odrůd (Tab. 6).[128]

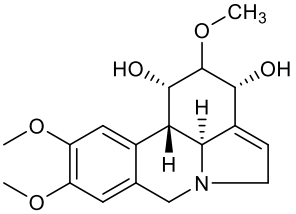
Tab. 6 Strukturní typy alkaloidů izolovaných z *Narcissus poeticus* L. a jeho pěstovaných odrůd

Lykorinový typ

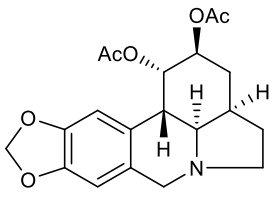


Alkaloid	R_1	R_2	R_3	R_4	Výskyt
Lykorin	H	OH	CH_2		*Narcissus poeticus* L.[129] var. *ornatus*[130] cv. Actea[131] cv. Daphne[132] cv. Sarchedon[129]
Galanthin	H	OMe	Me	Me	*Narcissus poeticus* L.[129] var. *ornatus*[130] cv. Actea[131] cv. Sarchedon[129]
Poetaminin	Ac	OH	CH_2		*Narcissus poeticus* L.[129] var. *ornatus*[130]
9-*O*-Methylpseudolykorin	H	OH	Me	Me	*Narcissus poeticus* L.[129]
Pluviin	H	H	Me	Me	*Narcissus poeticus* L.[129]

Tab. 6 Strukturní typy alkaloidů izolovaných z *Narcissus poeticus* L. a jeho pěstovaných odrůd



A

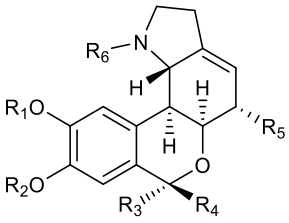


B

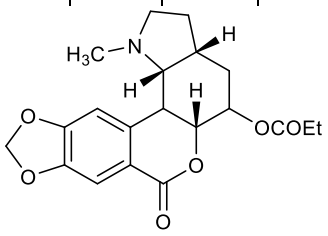
A – Narcissidin – *Narcissus poeticus* L.[129], *N. poeticus.* cv. Actea[131], *N. poeticus* cv. Sarchedon[129]

B – Nartazin – *Narcissus poeticus* L.[129]

Homolykorinový typ



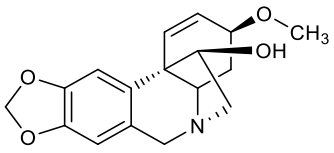
Alkaloid	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	Výskyt
Homolykorin	Me	Me	O		H	Me	*Narcissus poeticus* L.[129] var. *ornatus*[130] cv. Daphne[132]
Lykorenin	Me	Me	OH	H	Me	Me	*Narcissus poeticus* L.[129] var. *ornatus*[130] cv. Actea[131] cv. Daphne[132] cv. Sarchedon[129]



Poetinatin – *Narcissus poeticus* var. *ornatus*[130]

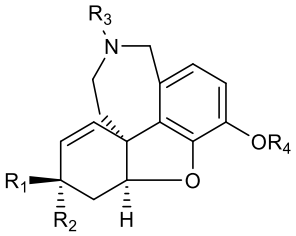
Tab. 6 Strukturní typy alkaloidů izolovaných z *Narcissus poeticus* L. a jeho pěstovaných odrůd

Haemanthaminový typ



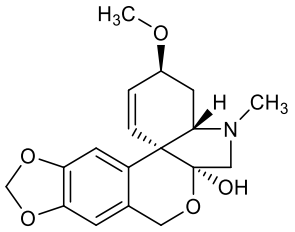
Haemanthamin – *Narcissus poeticus* var. *ornatus*[130]

Galanthaminový typ



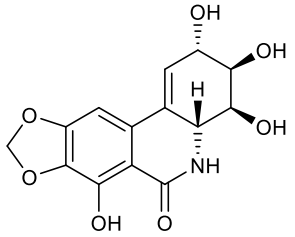
Alkaloid	R_1	R_2	R_3	R_4	Výskyt
Galanthamin	OH	H	Me	Me	*Narcissus poeticus* L.[129] var. *ornatus*[130] cv. Actea[131] cv. Daphne[132] cv. Sarchedon[129]
Epinorgalanthamin	H	OH	Me	Me	*Narcissus poeticus* L.[129]

Tazettinový typ



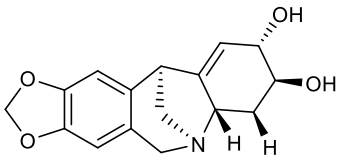
Tazettin – *Narcissus poeticus* var. *ornatus*[130]

Narciklasinový typ



Narciklasin – *Narcissus poeticus* cv. Actea[131]

Tab. 6 Strukturní typy alkaloidů izolovaných z *Narcissus poeticus* L. a jeho pěstovaných odrůd

Montaninový typ

Pankracin – *Narcissus poeticus* L.[129]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiální a instrumentální vybavení pro izolaci alkaloidů

4.1.1 Chemikálie pro izolaci alkaloidů

- Vodný roztok amoniaku 22-25% p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (NH_4OH)
- Diethylamin p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Et_2NH)
- Dusičnan bismutitý zásaditý (Lachema, Brno) ($BiNO_3(OH)_2$. $BiO(OH)$)
- Hydroxid sodný č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (NaOH)
- Chlorid rtuťnatý p. a. (Fisher Scientific, Pardubice) ($HgCl_2$)
- Jodid draselný č. (Lach-Ner, Neratovice) (KI)
- Kyselina chlorovodíková 35% p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (HCl)
- Kyselina L-vinná p. a. (Balex, Pardubice) ($C_4H_6O_6$)
- Kyselina sírová 96% p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (H_2SO_4)
- Uhličitan sodný bezvodý č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na_2CO_3)

4.1.2 Rozpouštědla

- Aceton p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Me_2CO)
- Acetonitril HPLC gradient (Lach-Ner, Neratovice) (MeCN)
- Benzin lékařský RN vyhovující ČL a ČSN 656544 (Ing. Švec – Penta, Praha) (Bz)
- Cyklohexan č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (C_6H_{12})
- Diethylether p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Et_2O)
- Dioxan p. a. (Lach-Ner, Neratovice) ($C_4H_8O_2$)
- Ethanol 95% (Lihovar Chrudim, Chrudim) (EtOH)
- Ethylester kyseliny octové č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (EtOAc)
- Chloroform č. (Ing. Švec – Penta, Praha) ($CHCl_3$)
- Chloroform deuterizovaný pro NMR analýzu – Chloroform-d 99,8 atom % D (Sigma Aldrich, Praha) ($CDCl_3$)
- Methanol p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (MeOH)
- Methanol deuterizovaný pro NMR analýzu – Methanol-d_4 99,8 atom % D (Sigma Aldrich, Praha) (CD_3OD)

- Methanol HPLC (J. T. Baker, Denver, Netherlands) (MeOH)
- n-Hexan (Carlo Erba Reagents, Val-de-Reuil, France) (C_6H_{14})
- Toluen p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ($C_6H_5CH_3$)
- Voda superčistá

4.1.3 Adsorbenty pro chromatografii

- Oxid hlinitý (Al_2O_3) neutrální, pro chromatografii, 63 – 200 µm; Across (Lach-Ner, Neratovice) před použitím byl promyt směsí $CHCl_3$: EtOH a vysušen. Aktivace probíhala při teplotě 200 °C po dobu 8 hodin. Aktivní Al_2O_3 byl po vychladnutí deaktivován přídavkem 6 % vody a míchán v uzavřené nádobě po dobu 1 hodiny
- Komerční analytické TLC desky Silica gel 60 GF_{254} for TLC (Merck Millipore, Praha) desky o rozměrech 20 × 20 cm, pro kontrolní účely se používaly desky o výšce 10 cm a šířka závisela na počtu analyzovaných vzorků

Pro přípravu litých vrstev byl použit silikagel: Silica gel 60 GF_{254} (Merck Millipore, Praha)

4.1.4 Vyvíjecí soustavy použité při izolaci alkaloidů

Během izolačních prací bylo použito celkem 10 různých mobilních soustav. Jejich přehled je uveden v následující tabulce (Tab. 7).

Tab. 7 Vyvíjecí soustavy pro preparativní a analytickou tenkovrstvou chromatografii

Směs	Složení
S1	cHx[a] : To[b] : Et_2NH[c] 24 : 24 : 2
S2	To : Et_2NH 9 : 1
S3	To : Et_2NH 97 : 3
S4	To : EtOAc[d] : Et_2NH 50 : 20 : 3
S5	cHx : Benzin : Et_2NH : EtOAc 45 : 45 : 6 : 4
S6	To : Et_2NH 95 : 5
S7	EtOAc : MeOH[e] 9 : 1
S8	EtOAc : MeOH 95 : 5
S9	cHx : Me_2CO[g] : NH_3[f] 50 : 50 : 1
S10	cHx : Me_2CO : NH_3 20 : 70 : 1

[a] cyklohexan, [b] toluen, [c] diethylamin, [d] ethylacetát, [e] methanol, [f] amoniak, [g] aceton

4.1.5 Činidla pro detekci alkaloidů

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 v 50 ml vody a 5 ml zásobního roztoku. Činidlo pro postřik i zásobní roztok byly uchovávány v chladničce při teplotě 4°C.

Mayerovo činidlo bylo připraveno rozpuštěním 5 g KI ve 30 ml vody a do vzniklého roztoku bylo přidáno 1,35 g chloridu rtuťnatého v prášku. Vzniklá sraženina byla míchána do rozpuštění, vzniklý roztok je bezbarvý nebo světle žlutý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4°C.

4.1.6 Pomocný materiál

- Křemelina Celite C 535 John´s Manville (Sigma Aldrich, Praha)
- Silikagel sušící perly (Ing. Švec – Penta, Praha)
- Síran sodný bezvodý p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na_2SO_4)

4.1.7 Přístroje

- Spektrometr EI/MS na GC/MS systému Agilent 7890A GC 5975 inertní MSD; EI mód 70 eV; kolona HP-5 MS (30m x 0.25 mm x 0.25µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)
- Spektrometr ESI/MS Thermo Finnigan LCQDuo (GenTech Scientific, Arcade, New York, USA)
- Spektrometr ESI/HRMS, Waters Synapt G2Si s hybridním analyzátorem quadrupole-time-of-flight (Q-TOF) připojený na Waters Acquity I-Class UHPLC Systém (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA)
- Spektrometr Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Germany)
- Vakuová odparka pro poloprovozní použití Laborota 20 Heidolph (Heidolph, Schwabach, Germany)

- Vakuová odparka Buchi Rotavapor R-114 (Buchi Labortechnik AG, Switzerland)

4.1.8 Databáze používané pro vyhodnocování výsledků

- Knihovna EI-MS spekter NIST Virtual Library 2011 (NIST, Gaithersburg, Maryland, USA)

4.2 Materiál a instrumentální vybavení pro stanovení biologických aktivit

4.2.1 Chemikálie pro stanovení biologických aktivit

- Acetylthiocholin jodid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (ATChI)
- Berberin hydrochlorid (Sigma Aldrich, Praha) ($C_{20}H_{18}NO_4Cl$)
- Butyrylthiocholin jodid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (BuTChI)
- Diethylether p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Et_2O)
- Dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý p. a. (Lach-Ner, Neratovice) (KH_2PO_4)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ($NaH_2PO_4 . 2H_2O$)
- Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma Aldrich, Německo) (DMSO)
- 5,5´-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina ≥ 98% (Sigma Aldrich, Praha) (DTNB)
- Ethylester kyseliny octové p. a. (Sigma Aldrich, Německo)
- Galanthamin hydrobromid > 98% (Changsha Organic Herb Inc., People Republic of China) ($C_{17}H_{21}NO_3$)
- Glukosa-6-fosfát (Sigma Aldrich, Německo) ($C_6H_{13}O_9P$)
- Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (Roche, Německo)
- Hydrogenfosforečnan disodný bezvodý p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na_2HPO_4)
- Huperzin A 98% (Tai´an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., People Republic of China)
- Chlorid draselný p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (KCl)
- Chlorid sodný p. a. (Lachema, Brno) (NaCl)
- NADPH (Sigma Aldrich, Německo)
- Oracin (Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, Česká republika)
- Rekombinantní AKR1C3 (Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové)
- *Z*-Gly-Pro-*p*-nitroanilid ≥ 99% (Sigma Aldrich, Praha) ($C_{13}H_{16}N_4O_4$)
- *Z*-Pro-prolinal ≥ 98% (Sigma Aldrich, Praha) ($C_{18}H_{22}N_2O_4$)

4.2.2 Pufry

- 5mM Fosfátový pufr pH 7,4 se připraví smísením 57 ml roztoku A a 283 ml roztoku B a 300 ml vody. Zásobní roztok A je 10 mM roztok NaH_2PO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo

1,20 g NaH_2PO_4). Zásobní roztok B je 10 mM roztok Na_2HPO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 1,42 g NaH_2PO_4).

- 5mM Fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM chloridu sodného 8,766 g chloridu sodného p. a. se rozpustí v 5mM fosfátovém pufru pH 7,4 a doplní se jím do 1000 ml.
- 100mM Fosfátový pufr, pH 7,4 se připraví smísením 57 ml roztoku A a 243 ml roztoku B a 300 ml vody. Zásobní roztok A je 200 mM roztok NaH_2PO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 24,0 g NaH_2PO_4). Zásobní roztok B je 200 mM roztok Na_2HPO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 28,4 g Na_2HPO_4).
- PBS: 100mM Na/K fosfátového pufru pH 7,4 obsahující 137 mM NaCl a 2,7 mM KCl – roztok A byl připraven smísením 0,68 g KH_2PO_4 a 1,5 g NaCl a rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. Roztok B se připravil rozpuštěním 0,89 g $NaH_2PO_4 \cdot 2 \cdot H_2O$ a 1,5 g NaCl ve 100 ml destilované vody. Následně bylo smícháno 20 ml roztoku a 100 ml roztoku B.

Hodnoty pH byly kontrolovány u všech pufrů na kalibrovaném pH metru PHM 220.

4.2.3 Přístroje

- Microplate ELISA reader EL800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- Mikrotitrační destičky 96 jamek (Fisher Scientific, Pardubice)
- Odstředivka AVANTI J-301 s rotorem JA-30.50 (Beckman Coulter, Brea, California, USA)
- Odstředivka Boeco U-32R (Boeco, Hamburg, Germany) s rotorem Hettich 1611 (Hettich, Tuttlingen, Germany)
- pH metr PHM 220 (Radiometer, Copenhagen, Denmark)
- Polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Germany)
- Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- Statistický program GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2006)

4.2.4 Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE

Roztok 5mM DTNB byl připraven přímým rozpouštěním příslušného množství DTNB v 100 mM fosfátovém pufru pH 7,4. Roztok smí být jen slabě nažloutlý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4°C po dobu maximálně 1 týden.

Roztok 10mM ATChI byl připraven rozpuštěním příslušného množství látky ve vodě. Roztok musel být čirý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4°C po dobu maximálně 1 týdne.

Roztok 10mM BuTChI byl připraven stejným postupem jako roztok ATChI.

4.2.5 Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči POP

Roztok 10mM Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilidu byl připraven rozpuštěním příslušného množství látky v 40% 1,4-dioxanu. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4°C.

4.3 Metody

4.3.1 Obecné postupy

Příprava rozpouštědel

Komerční rozpouštědla (všechna kromě rozpouštědel deklarovaných pro HPLC a NMR) byla před použitím destilována dle standardního postupu a destilát byl jímán podle tabelárních teplot varu příslušných rozpouštědel.

Odpařování a zahušťování extraktů a frakcí

Sumární ethanolové extrakty pro izolaci alkaloidů byly odpařovány na poloprovozní vakuové odparce Laborota 20 Heidolph na vodní lázni při teplotě 50 °C a tlaku 1,33 kPa.

Frakce získané ze sloupcové chromatografie elucí směsí benzin : $CHCl_3$ byly odpařeny na vakuové odparce Laborota 4000 Heidolph na vodní lázni při 35 °C. Frakce ze sloupcové chromatografie získané elucí $CHCl_3$: EtOH a eluáty získané při preparativním TLC byly odpařovány stejným způsobem při teplotě vodní lázně 40 °C.

Detekce alkaloidů v roztoku

Během vytřepávání alkaloidního extraktu z vodné fáze byla přítomnost alkaloidů ve vodné fázi prokazována pomocí Mayerova činidla.

Roztok zkoumaného vzorku byl po odstranění organických rozpouštědel okyselen pomocí 2% HCl (pH 3) a tento roztok byl smíchán s několika kapkami činidla. Pokud roztok obsahuje bazické látky (alkaloidy) dojde ke vzniku výrazné bělavé sraženiny.[133]

Sušení extraktů a frakcí, izolovaných látek a jejich skladování

Alkaloidní extrakty, frakce i chemicky čisté látky byly vysušeny ve vakuovém exsikátoru (vakuum cca 1,33 kPa) nad sušícími perlami silikagelu minimálně 24 hodin. Po vysušení byly zavřené baňky skladovány v chladničce při teplotě 2-8 °C, v případě extraktů a frakcí v atmosféře argonu.

Sloupcová chromatografie

Chromatografický sloupec byl připraven nalitím Al_2O_3 ve směsi rozpouštědel, která byla použita pro zahájení eluce. Dělený alkaloidní extrakt byl nanesen na sloupec v podobě roztěru s adsorbentem v poměru 1 : 4 (w/w), který byl připraven rozpuštěním extraktu v malém množství $CHCl_3$ a přidáním adsorbentu a následně míchán na vodní lázni do odpaření

rozpouštědla. Vzniklý roztěr byl následně vysušen v exsikátoru po dobu 24 hodin. Chromatografie probíhala formou stupňovité eluce.

Vakuová sloupcová chromatografie

Chromatografický sloupec byl připraven za použití 7 g silikagelu, který byl navrstven do kolony o průměru 2,5 cm do výšky přibližně 4,5 cm. Extrakt byl na sloupec nanesen ve formě roztěru, jehož příprava byla popsána výše. Chromatografie probíhala formou stupňovité eluce začínající n-hexanem, který byl obohacován o ethylacetát (0 – 100 %) a následně byl ethylacetát obohacován methanolem (0 – 100 %). Frakce byly jímány po 100 ml a obsah alkaloidů byl detekován pomocí TLC a následně postřikem Dragendorffovým činidlem.

Příprava litých vrstev pro preparativní tenkovrstvou chromatografii

Preparativní TLC desky s litou vrstvou byly připraveny nalitím suspenze komerčního silikagelu Silikagel 60 GF_{254} (6,5 g) a vody (20,5 ml) na skleněné desky (rozměr 15 x 15 cm). Před použitím byly desky sušeny za pokojové teploty po dobu 24 hodin.

Preparativní tenkovrstvá chromatografie (prep TLC)

Směs alkaloidů určená k dělení byla rozpuštěna ve směsi $CHCl_3$: EtOH (1 : 1) a nanesena na chromatografickou desku v linii startu 1 cm od okrajů a 1,5 cm od spodní hrany desky tak, aby množství dělené směsi nepřesahovalo 3 $mg \cdot cm^{-1}$ u litých vrstev nebo 1 $mg \cdot cm^{-1}$ u komerčních Merck desek. Po odpaření rozpouštědel z nanášené směsi alkaloidů byly desky vyvíjeny v nasycených komorách (25 min) zvolenými vyvíjecími směsmi rozpouštědel. Jednotlivé desky mohly být po vysušení vyvíjeny opakovaně za využití stejné nebo odlišné mobilní fáze. Po jednonásobném nebo několikanásobném vyvíjení byly chromatografické desky vysušeny a analyzovány za využití UV detekce (λ = 254 a 366 nm), separované zóny byly označeny preparativní jehlou a izolovány mechanickou separací z jednotlivých zón z chromatografické desky. Zóny s totožným Rf ze všech vyvíjených desek byly spojeny. Separovaný adsorbent byl smíchán s křemelinou Celite 535 a eluován v chromatografické trubici 15násobným množstvím směsi $CHCl_3$: EtOH (1 : 1).

Detekce alkaloidů po tenkovrstvé chromatografii

Po TLC frakcí ze sloupcové chromatografie, při kontrole čistoty izolovaných látek či při hledání vhodných vyvíjecích směsí byly chromatogramy detekovány vizuálně pomocí UV

světla při dvou různých vlnových délkách $\lambda = 254$ nm a $\lambda = 366$ nm. Chromatogramy s označenými zónami byly následně detekovány postřikem Dragendorffovým činidlem. Činidlo bylo použito k postřiku suchých desek. V přítomnosti alkaloidů se na chromatografické desce objevily intenzivně oranžové skvrny.

4.3.2 Metody použité pro strukturní identifikaci izolovaných alkaloidů

GC/MS analýza

Analýza izolovaných alkaloidů byla provedena pomocí plynového chromatografu Agilent 7890A GC 5975 pracujícího s hmotnostním detektorem při elektronové ionizaci 70 eV. Separace byla prováděna na koloně HP-5. Byl použit následující teplotní program: 100 °C – 180 °C (15 °C·min^{-1}), 180 °C (1 min), 180 – 300 °C (5 °C·min^{-1}), 300 °C (15 min). Jako nosný plyn bylo použito helium o průtokové rychlosti 0,8 ml/min. Nástřik vzorku byl proveden při teplotě 280 °C. Byl nastříknut 1 µl methanolického roztoku sumárního extraktu (koncentrace 1 mg·µl^{-1}) při splitu 1:10. Alkaloidy byly identifikovány porovnáváním jejich spekter se spektry dostupnými v komerční knihovně spekter NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA), s daty publikovanými v literatuře a se standardy látek, které byly v naší laboratoři již izolovány.

Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem

MS (ESI) spektra byla měřena pro látky neionizující pomocí elektronové ionizace. Spektra byla získána pomocí spektrometru LC/MS Thermo Finnigan LCQDuo s ionizací elektrosprejem v kladném módu a analyzátorem byla iontová past. MS^n byla prováděna při kolizní energii 40 eV. Alkaloidní roztok v MeOH (1 mg·ml^{-1}) byl zaváděn přímo na sondu.

Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS-Q-TOF MS (ESI))

Tato metoda byla využívána v případě izolace látek nových, doposud nepopsaných, a pro originálně připravené deriváty hippeastrinu. Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru s vysokým hmotnostním rozlišením Waters Synapt G2Si s ionizací elektrosprejem v kladném módu a kombinovaným analyzátorem – kvadrupól s analyzátorem doby letu. Vzorky byly měřeny v roztoku MeCN a bylo porovnáváno teoretické *m/z* s experimentálně zjištěným.

Analýza pomocí nukleární magnetické rezonance

NMR spektra byla měřena v roztocích $CDCl_3$ při teplotě 25 °C na spektrometru VNMR S500 pracujícím při 499,87 MHz pro jádra ^{1}H a 125,70 pro jádra ^{13}C. K ozařování a detekci signálu byla použita sonda OneNMR, širokopásmová dvoukanálová gradientová sonda s regulací teploty. Chemické posuny byly měřeny jako hodnoty δ pars per milion (ppm) a byly nepřímo vztaženy k TMS jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Hodnoty chemického posunu pro $CDCl_3$ jsou u atomů 1H δ = 7,26 ppm a u atomů 13C δ = 77,0 ppm. Měřením získaná data jsou uváděna v následujícím pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita spekter 1H NMR, multiplicita (s: singlet, d: dublet, dd: dublet dubletu, t: triplet, q: kvartet, m:multiplet) a interakční konstanta J (Hz).

Dvoudimenzionální (2D) NMR experimenty (gCOSY, gHSQC, gHMBC, NOESY) byly měřeny standardními sekvencemi dodanými firmou Varian. Parametry měření byly stanoveny zejména podle množství vzorku, čistoty a molekulové hmotnosti. Pro upřesnění jsou v následujícím odstavci uvedeny stručné popisy metod.

gCOSY (**g**radient **co**relation **s**pectroscop**y**): 2D NMR technika, kde se crosspeak objevuje mezi protony, které mají přímé spojení proton-proton přes tři vazby, $^{3}J_{HH}$.

gHSQC (**g**radient **h**eteronuclear **s**ingle **q**uantum **c**oherence): 2D NMR technika, kde jedna osa představuje ^{1}H a druhá ^{13}C. Tato spektra představují korelace mezi H a C přes jednu vazbu.

gHMBC (**g**radient **h**eteronuclear **m**ultiple **b**ond **c**oherence): 2D NMR technika, která pomáhá určit korelace C s H přes 3 vazby (v některých případech i 2 nebo 4 vazby).

NOESY (**n**uclear **o**verhauser **e**ffect **s**pectroscop**y**): 2D NMR technika, kde se crosspeak objevuje mezi protony od sebe vzdálenými do 6 Å; intenzita crosspeaku klesá se zvyšující se vzdáleností protonů v prostoru.

Měření optické otáčivosti

Optická otáčivost alkaloidů byla měřena v jejich chloroformových roztocích na polarimetru P3000 a specifická otáčivost byla dopočítána podle vzorce:

$$[\alpha]_D^t = \frac{100 \times \alpha}{c \times l}$$

t – teplota měření; D – sodíková čára λ = 589,3 nm; α – naměřená otáčivost [°]; c – koncentrace měřeného alkaloidu [g·100 ml^{-1}]; l – délka kyvety [dm].

4.3.3 Testování biologické aktivity izolovaných alkaloidů

Příprava hemolyzátu a plazmy

Jako zdroj acetylcholinesterasy (HuAChE) je použit hemolyzát lidských erytrocytů. Zdrojem butyrylcholinesterasy (HuBuChE) je lidská plazma.

Erytrocyty se získají z čerstvě odebrané citrátované krve zdravých dobrovolníků (18 ml krve + 2 ml 3,4% roztoku citrátu). Bezprostředně po odběru se krev rozdělí stejnoměrně po 5 ml do šroubovacích zkumavek a provede se centrifugace při rychlosti 4000 rpm při 4 °C po dobu 10 minut. Po první centrifugaci se plazma odsaje tak, aby v ní nebyly erytrocyty, a uchovává se do doby stanovení aktivity BuChE v chladničce při 4 °C (nejdéle však 6 hodin).

Zbytek plazmy z erytrocytárního sedimentu se opatrně odsaje bezpopelným filtračním papírem s hlazeným povrchem, jehož špička je sestřižena, odečte se objem erytrocytární masy a tento sediment se zředí takovým množstvím 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 obsahujícím 150 mM NaCl, aby byl objem suspenze 13 ml. Obsah se dobře promíchá a provede se centrifugace stejným způsobem, jak je uvedeno výše při oddělování plazmy. Promytí tímto způsobem se provede celkem 3x a promývací kapalina se dokonale odstraní. Po tomto promytí se přidá takové množství 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 bez obsahu chloridu sodného, aby byl objemový poměr erytrocyty : pufr 1 + 8 – 9, směs se opět homogenizuje, přelije do Erlenmeyerovy baňky a erytrocyty se ponechají spontánně hemolyzovat za míchání teflonovým míchadlem při 300 rpm. Ihned po skončení této řízené hemolýzy se u suspenze stanoví acetylcholinesterasová aktivita, případně se 5mM fosfátovým pufrem upraví absorbance (hodnota absorbance musí být 0,08 – 0,15) a naředěný hemolyzát se uchovává do doby použití při -22 °C.

Butyrylcholinesterasová aktivita plazmy se stanoví stejným způsobem (hodnota absorbance musí být 0,15 – 0,20), uchovává se stejným způsobem jako hemolyzát.

Vlastní stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů

Pro stanovení hodnoty IC_{50} se použije Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)[1] [λ = 436 nm (AChE), nebo λ = 412 nm (BuChE)]. Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC_{50} jsou vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterasy nebo butyrylcholinesterasy nelineární regresí v programu GraphPaD Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce GraphPaD

Software, San Diego, CA, USA). Výsledky jsou porovnány s hodnotami IC_{50} známých inhibitorů cholinesteras: galanthaminem a huperzinem A. Procenta inhibice (% I) jsou počítána podle vzorce:

$$\%\, I \;= 100 - \left(100 \times \frac{\Delta A_{Bl}}{\Delta A_{Sa}}\right)$$

% I – procento inhibice; ΔA_{Bl} – pokles absorbance slepého vzorku během 1 min; ΔA_{Sa} – absorbance testovaného vzorku během 1 min.

Stanovení aktivity enzymů: do 6 jamek mikrotitračních destiček se napipetuje 8,3 µl plazmy nebo hemolyzátu, přidá se 283 µl 5 mM DTNB, 8,3 µl DMSO, po 1minutovém promíchání na mikrotřepačce se směs inkubuje v komoře readeru při 37 °C po dobu 5 minut, potom se přidá 33,3 µl roztoku substrátu (10 mM acetylthiocholinjodidu nebo 10 mM butyrylthio-cholinjodidu) a zjistí se při příslušné vlnové délce absorbance (AChE-hemolyzát: 436 nm; BuChE-plazma: 412 nm). Obvyklým způsobem se vypočte rozdíl a stanoví průměr se směrodatnou odchylkou.

Stanovení aktivity látek: použijí se stejné objemy činidel a roztoku substrátu (6 řad po 3 jamkách), stejný postup měření, a použijí se koncentrace látky: 40 mM, 10, 4, 1, 0,4, případně další série koncentrací v tomto početním modu, je-li aktivita vysoká. Do poslední 6. řady se pipetuje DMSO jako slepý vzorek.

Získané inhibiční aktivity $IC_{50\ HuAChE}$ a $IC_{50\ HuBuChE}$ pro jednotlivé látky byly porovnávány s inhibičními aktivitami referenčních látek – galanthaminem ($IC_{50,HuAChE}$ = 1,710 ± 0,065 µM, $IC_{50,HuBuChE}$ = 42,301 ± 0,065 µM), huperzinem A ($IC_{50,HuBuChE}$ = 0,033 ± 0,001 µM, $IC_{50,HuBuChE}$ > 1000 µM) a berberinem ($IC_{50,HuAChE}$ = 0,705 ± 0,104 µM, $IC_{50,HuBuChE}$ = 30,721 ± 3,492 µM).

Stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči prolyl oligopeptidase

POP byla rozpuštěna v pufrovaném fyziologickém roztoku PBS, specifická aktivita enzymu byla 0,2 $U \cdot ml^{-1}$. Testování aktivit bylo provedeno na polystyrenové mikrotitrační destičce s rovným a průhledným dnem. Zásobní roztoky testovaných látek byly připraveny jejich rozpuštěním v DMSO (10 mM). Roztoky pro testování (10^{-3} – 10^{-7} M) byly připraveny ředěním zásobních roztoků superčistou vodou, slepé vzorky byly použity o stejné koncentraci DMSO. Jako substrát pro testování inhibiční aktivity byl použit *Z*-Gly-Pro-*p*-nitroanilid, který byl rozpuštěn v 40% 1,4-dioxanu (10 mM). V jamce mikrotitrační destičky bylo smícháno

170 µl PBS, 5 µl roztoku testované látky o určité koncentraci a 5 µl roztoku POP, následně došlo k inkubaci po dobu 5 min při teplotě 37 °C. Po uplynutí inkubační doby bylo přidáno do každé jamky 20 µl substrátu a směs byla znovu inkubována po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Sleduje se vznik *p*-nitroanilinu, který je přímo úměrný aktivitě POP, a je měřen spektrofotometricky při λ = 405 nm na microplate ELISA readeru EL800. Inhibiční aktivita testovaných látek byla vyjádřena jako IC_{50}. Získané inhibiční aktivity testovaných látek byly porovnány s hodnotami IC_{50} referenčních látek berberinu (IC_{50} = 142,3 ± 21,1 mM) a *Z*-Pro-prolinalu (IC_{50} = 3,269 ± 0,021 mM).

Stanovení inhibiční aktivity vůči AKR1C3 izolovanými alkaloidy

Nejdříve byla stanovena redukční aktivita rekombinantní AKR1C3 inkubací s oracinem za přítomnosti NADPH-generujícího systému. Standardní inkubace byly provedeny v mikrozkumavkách Eppendorff, směsi se skládaly vždy z 10 µl AKR1C3 (odpovídající 1,76 µg v inkubační směsi), 40 µl NADPH-generujícího systému a v 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7,4. Protože se inhibitory rozpouštěly v methanolu, bylo ještě do kontrolních inkubačních směsí přidáno 5 % methanolu, aby bylo vyloučeno ovlivnění následné inhibice alkaloidy methanolem. Reakce byly vždy nastartovány přidáním 20 µl roztoku oracinu (výsledná koncentrace 0,5 mM). Celkový objem inkubačních směsí byl 200 µl. Čas inkubace byl 30 min a inkubovalo se při 37 °C. Složení používaného NADPH-generujícího systému - 0,8 mM $NADP^+$, 6 mM glukosa-6-fosfátu, 35 UI glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, 3 mM $MgCl_2$ v 0,1 mM fosfátovém pufru, pH 7,4. Po uplynutí doby inkubace byly reakce zastaveny přidáním 80 µl 26% NH_4OH a inkubační směs byla ochlazena na 0 °C na ledové tříšti. Metabolit 11-dihydrooracin (DHO) byl extrahován do 600 µl oethylesteru kyseliny octové při 10 s intenzivním míchaní na třepačce. Vzorky byly následně centrifugovány 2 min v mikrocentrifuze. Organické fáze byly pak přeneseny do nových mikrozkumavek a extrakty byly odpařeny při sníženém tlaku a teplotě. Odparky byly následně rozpuštěny v 250 µl mobilní fáze a připraveny pro HPLC analýzu. Jednotlivé inkubace byly provedeny ve čtyřech paralelních stanoveních.

První sada inhibičních experimentů byla provedena pro vybrané alkaloidy, jichž bylo dostatečné množství k dispozici tak, že jejich výsledná koncentrace v inkubační směsi byla 20 µM. Všechny látky byly rozpuštěny v methanolu na zásobní roztoky o koncentraci 1 mM, ty byly pak zředěny směsí methanol : voda 1 : 1 (v/v) na 0,2 mM roztoky. Pro zjištění míry inhibice

jednotlivých látek byly provedeny inkubace a zastavení tak že do inkubační směsi bylo přidáno 20 µl 0,2 mM roztoků jednotlivých alkaloidů a byla tak získána jejich výsledná koncentrace v inkubační směsi 20 µM.

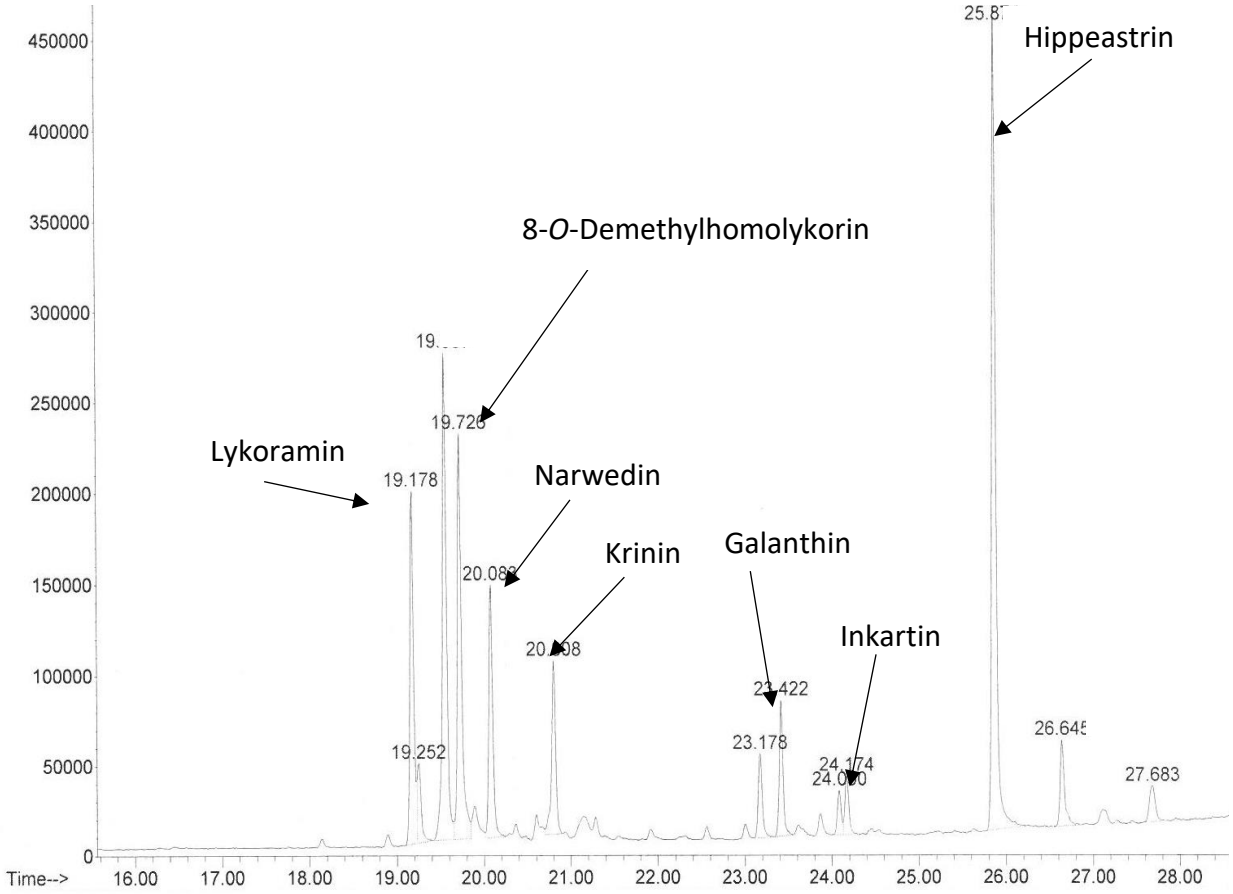
Stanovení cytotoxicity, antimikrobiální a antifungální aktivity

Všechny studie týkající se cytotoxicity izolovaných látek byly provedeny ve spolupráci s katedrou mikrobiologie, výživy a dietetiky na České zemědělské univerzitě v Praze, s katedrou biologických a biochemických věd Univerzity Pardubice a ústavem lékařské biochemie na Lékařské fakultě v Hradci Králové. Podrobný soupis použitých chemikálií a vysvětlení postupů je možné nalézt v následujících publikacích Doskočil et al. (2015)[110] Havelek et al. (2014)[112].

Antimikrobiální a antifungální aktivita vybraných alkaloidů byla testována ve spolupráci s katedrou kvality zemědělských produktů na České zemědělské univerzitě v Praze. Podrobný popis experimentů je možné nalézt v následující literatuře Opletal et al. (2014)[134] a Ločárek et al. (2015)[89].

4.4 GC/MS analýza alkaloidního extraktu z čerstvých cibulí *N. poeticus* cv. Pink Parasol

V rámci screeningové studie 80 pěstovaných odrůd rostlin rodu *Narcissus* L. byly provedeny GC/MS analýzy připravených alkaloidních extraktů. Tato rozsáhlá studie vedla k výběru rostliny *N. poeticus* cv. Pink Parasol pro podrobnou fytochemickou práci za účelem izolace alkaloidů v čistém stavu pro další biologické studie. Na následujícím obrázku je zachycen chromatogram společně s některými identifikovanými alkaloidy (vzorce identifikovaných látek možno nalézt v kapitole 5).



Obr. 16 GC/MS analýza alkaloidního sumárního extraktu z cibulí *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol

4.5 Izolace alkaloidů

18,5 kg čerstvých cibulí *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol bylo rozemleto v mlýnku a následně rozmixováno ručním mixérem na velikost částic menší než 5 mm. Rozemletá rostlinná část byla 3x extrahována 2násobným objemovým množstvím 95% EtOH 30 minut za varu. Spojené extrakty byly zahuštěny na hnědý viskózní odparek, ke kterému bylo po zahřátí po částech přidáváno 200 ml 2% HCl (pH ~ 1,5). Suspenze byla krátce sonikována a následně zfiltrována přes vrstvu křemeliny Celite 535, filtrační vrstva byla následně promyta 0,5 litrem vody. Kyselý vodný extrakt byl vytřepán 3 x 250ml Et_2O (hnědý viskózní nealkaloidní výtřepek), vodná fáze byla po vytřepání Et_2O alkalizována pomocí 10% Na_2CO_3 (pH ~ 9,5) a vzniklá suspenze byla vytřepávána 4 x 250 ml $CHCl_3$. Chloroformový výtřepek byl zahuštěn za vzniku hnědého viskózního odparku (18 g). Alkaloidní extrakt byl ještě jednou přečištěn přetřepáním. K odparku bylo přidáno 100 ml 2% HCl, směs byla zahřáta ve vodní lázni a roztok byl zředěn vodou na objem 500ml a po zchladnutí byl vytřepán 3 x 200 ml Et_2O. Vodná fáze byla alkalizována 10% Na_2CO_3 (pH ~ 9,5) a vytřepána 5 x 200 ml $CHCl_3$. Chloroformový výtřepek byl vysušen Na_2SO_4 a po zfiltrování a odpaření rozpouštědla byl vysušen v exikátoru za vzniku hnědého alkaloidního odparku (13 g). Alkaloidní výtřepek byl následně zpracován za využití sloupcové chromatografie na Al_2O_3 (Tab. 8).

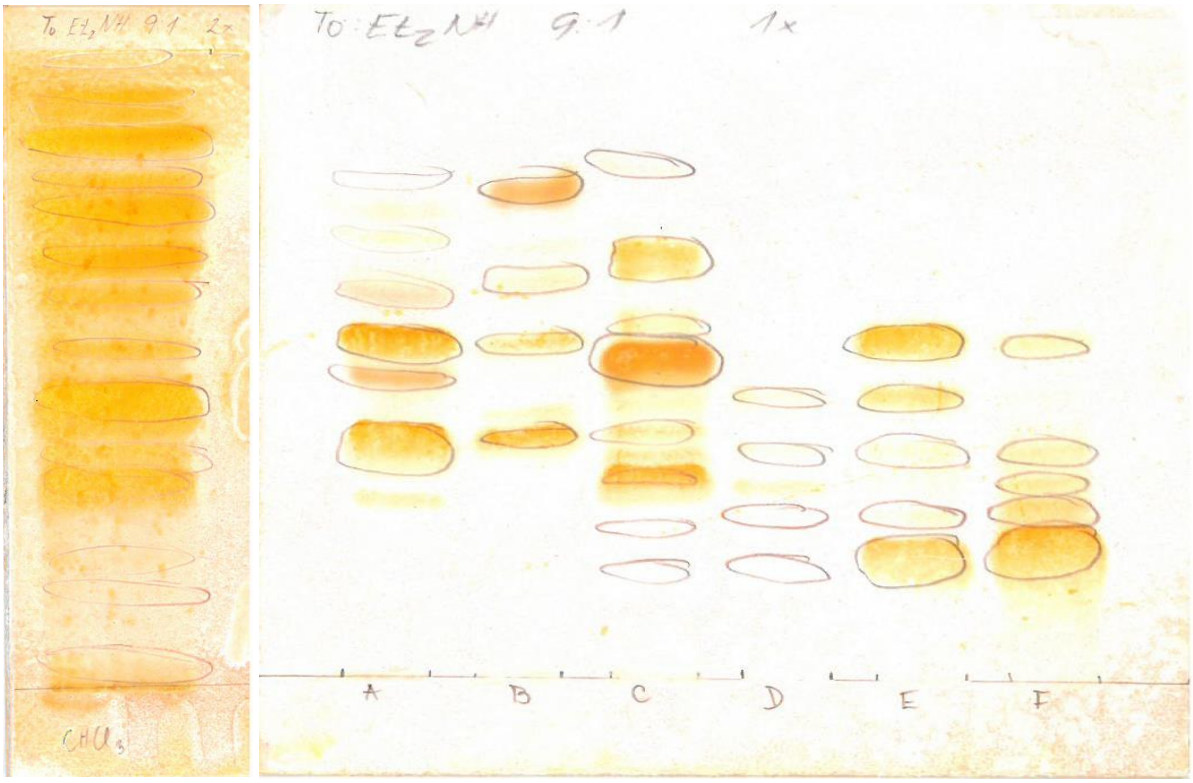
Tab. 8 Podmínky sloupcové chromatografie alkaloidního výtřepku

Hmotnost odparku	13 g
Adsorbent na roztěr	65 g
Adsorbent	840 g
Dělící vrstva ve sloupci	46,5 cm
Vrstva s alkaloidní frakcí	3,5 cm
Frakce	500 ml (fr 1-15), 200 ml (fr16-180)

Podrobný průběh vlastní sloupcové chromatografie je shrnut v následující tabulce (Tab. 9) a na obrázku je zachycena TLC analýza jednotlivých frakcí (Obr. 17).

Tab. 9 Výsledek sloupcové chromatografie alkaloidního extraktu

Označení	Spojené frakce	Složení eluční směsi	Hmotnost (g)	Popis
-	1 – 21	Bz : $CHCl_3$ (75 : 25)		bez obsahu alkaloidů
A	22 – 27	Bz : $CHCl_3$ (65 : 35)	0,027	hnědý, viskózní
B	31 – 50	Bz : $CHCl_3$ (65 : 35) Bz : $CHCl_3$ (60 : 40) Bz : $CHCl_3$ (55 : 45)	0,296	světlehnědý, krystalizující
C	51 – 64	Bz : $CHCl_3$ (55 : 45) Bz : $CHCl_3$ (50 : 50)	1,220	hnědý, krystalizující
D	65 – 82	Bz : $CHCl_3$ (50 : 50) Bz : $CHCl_3$ (45 : 55)	2,007	hnědý, viskózní
E	83 – 92	Bz : $CHCl_3$ (40 : 60) Bz : $CHCl_3$ (35 : 65)	1,239	hnědý, viskózní
F	93 – 108	Bz : $CHCl_3$ (35 : 65) Bz : $CHCl_3$ (15 : 85)	0,210	hnědý, viskózní
G	109 – 115	Bz : $CHCl_3$ (15 : 85)	0,068	hnědý, viskózní
H	116 – 122	Bz : $CHCl_3$ (10 : 90)	0,017	hnědý, viskózní
I	126 – 123	Bz : $CHCl_3$ (10 : 90) $CHCl_3$ (100)	0,018	hnědý viskózní
J	127 – 157	$CHCl_3$ (100) $CHCl_3$: EtOH (98 : 2) $CHCl_3$: EtOH (95 : 5) $CHCl_3$: EtOH (90 : 10)	1,746	hnědý, viskózní
K	158 – 180	$CHCl_3$: EtOH (90 : 10) $CHCl_3$: EtOH (50 : 50) EtOH (100)	2,646	hnědý, krystalizující



Obr. 17 TLC sumárního alkaloidního extraktu a frakcí A-F

4.5.1 Zpracování jednotlivých frakcí

Frakce A (27 mg) na základě TLC a GC/MS analýzy nebyla zpracována z důvodu jejího malého množství a velkého množství přítomných alkaloidů.

Frakce B (296 mg) byla zpracována pomocí preparativní TLC na litých deskách pomocí soustavy **S1**. Desky byly vyvíjeny 1x a bylo separováno sedm zón označených jako **B1 – B7**. Zóna **B2** byla následně dvakrát krystalizována ze směsi $CHCl_3$: EtOH (1 : 1) a bylo získáno 53 mg látky označené **NP-B-2**, látka byla identifikována jako alkaloid galanthaminového strukturního typu. Ze zóny **B3** bylo po odpaření získána čistá látka ve formě bílých krystalů. Látka byla označena jako **NP-B-3** a po strukturní analýze byla látka identifikována jako alkaloid homolykorinového strukturního typu (2 mg). Zóna **B4** byla opětovně podrobena preparativní TLC na komerčních deskách Merck za využití mobilní směsi **S2**. Zóna byla separována do pěti dalších zón označených jako **B4/1 – B4/5**. Ze zóny **NP-B4/3** byla po překrystalizování získána látka **NP-B-4/3** (19 mg). Látka byla identifikována jako alkaloid homolykorinového strukturního typu. Zbylé podfrakce byly z důvodů komplexních směsí a malého množství odpařeny a uloženy pro případné další zpracování.

Frakce C (1,2 g) byla zpracována preparativní TLC na litých deskách soustavou **S3**, kdy desky byly vyvíjeny 1x. Bylo separováno pět zón označených jako **C1 – C5.** Frakce **C1** byla dále podrobena preparativní TLC na komerčních deskách Merck mobilní směsí **S4**. takto byly získány 4 zóny označené jako **C1/1 – C1/4**. Ze zóny **NP-C1/2** byla opakovanou krystalizací ze směsi $CHCl_3$: EtOH (1 : 1) získána látka **NP-C-1/2** (93 mg), látka byla později identifikována jako alkaloid galanthaminového typu. Frakce **C4** byla dále podrobena preparativnímu TLC a rozdělena soustavou **S5** na čtyři podfrakce označené jako **C4/1 – C4/4**. Ze třetí zóny byly krystalizací ze směsi $CHCl_3$: EtOH (1:1) získány oranžové krystaly **NP-C-4/3** (7,5 mg). Ze zóny C4/4 byla získána nahnědlá mazlavá látka označená jako **NP-C-4/4** (5 mg). Ostatní podfrakce byly spojeny z důvodu přítomnosti velkého množství minoritních látek a byly uloženy pro další zpracování. V rámci studijního pobytu ve Španělsku na Universitat de Barcelona byl pomocí vakuové chromatografie zpracován zbytek frakce **C**. Frakce byla rozdělena na 9 podfrakcí označených **1-9**. Podfrakce **6** byla nanesena na komerční litou desku a vyvíjena soustavou **S7**, byly získány tři zóny, krystalizací zóny 2 byla získána látka **NP-C-6/2** (2 mg). Z podfrakce **8** byla krystalizací ze směsi $CHCl_3$: EtOH (1 : 1) získána látka **NP-C-8** (3 mg).

Frakce D (2 g) byla pomocí preparativní TLC na litých deskách rozdělena soustavou **S6** na čtyři zóny označené jako **D1 – D4**, pro další izolaci alkaloidů byla použita pouze zóna **D4**. Tato zóna byla dále podrobena dělení na komerčních deskách pomocí soustavy **S2** a byly získány čtyři zóny označené jako **D4/1 – D4/4**. Ze třetí zóny byla krystalizací ze směsi $CHCl_3$: EtOH (1 : 1) získána látka **NP-D-4/3** (13 mg). Zbylé podfrakce byly spojeny a byly uloženy pro případné pozdější zpracování.

Frakce E (1,2 g) byla rozdělena pomocí litých desek mobilní směsí **S9** a bylo získáno 6 podfrakcí označených jako **E1 – E6**. Zóna **E6** byla následně odpařena a podrobena krystalizaci ze směsi $CHCl_3$: EtOH (1 : 1). Z podfrakce 6 byly získány bílé krystaly látky **NP-E-6** (85 mg). Ostatní podfrakce byly z důvodu komplikovanosti směsi uchovány pro pozdější zpracování.

Frakce F (210 mg) byla podrobena vakuové sloupcové chromatografii v rámci studijního pobytu ve Španělsku na Universitat de Barcelona a bylo získáno sedm podfrakcí **F1 – F7**, kde první neobsahovala žádné alkaloidní látky a pro další zpracování byla vybrána podfrakce **F3**, ze které bylo zpracováno 20 mg na komerčních litých deskách a vyvíjení probíhalo v soustavě **S7**. Z této podfrakce byl krystalizací získán ze směsi **NP-F-3/1** (10 mg) a **NP-F-3/5** (1 mg). Podfrakce **F2** byla nanesena na desky a vyvíjena v soustavě **S7**. Po vyvinutí byly získány

dvě zóny, které byly následně separovány a eluovány směsí $CHCl_3$: EtOH (1 : 1), krystalizací byly získány dvě látky **NP-F2/1** (1 mg) a **NP-F2/2** (2 mg).

Frakce G (68 mg), **Frakce H** (17 mg), **Frakce I** (18 mg) nebyly na základě TLC a GC/MS analýzy zpracovány z důvodu přítomnosti velkého množství alkaloidů, především v minoritním množství. Proto byla frakce ponechána pro případné pozdější zpracování.

Frakce J (1,7 g) byla rozdělena pomocí preparativního TLC soustavou **S10**. Bylo získáno 5 zón, označených jako **J1 – J5.** Pro další zpracování byla použita zóna J5, po odpaření elační směsi byla podrobena krystalizaci směsí $CHCl_3$: EtOH (1 : 1), získána bílá krystalická látka označená jako **NP-J5** (180 mg). Zbylé zóny nebyly zpracovány pro vysoký podíl minoritních alkaloidů a byly spojeny pro případné pozdější zpracování.

Frakce K (2,6 g) bylo zpracována za využití 300 mg. Směs alkaloidů byla vyvíjena v soustavě **S10** na preparativních litých deskách. Byly získány 4 zón, které byly označeny **K1 – K2.** Ze zóny **K2** byly získány krystalizací ze směsi $CHCl_3$: EtOH (1 : 1) bílé krystaly (120 mg), které byly identifikovány jako již dříve nalezený alkaloid **NP-J5** a byly následně využity pro přípravu analog. Zbytek frakce spolu s ostatními zónami, byl spojen a bude zpracován později.

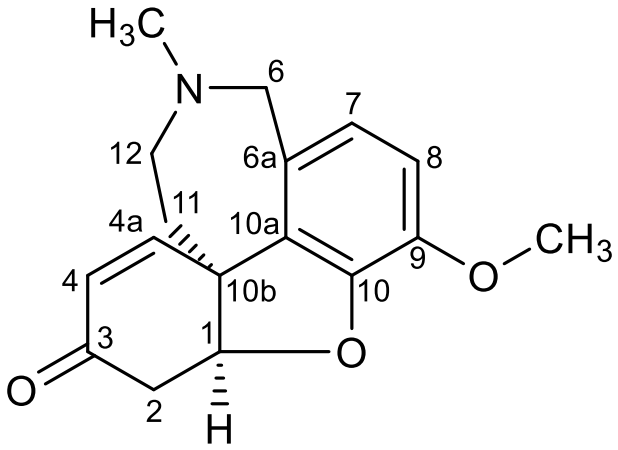
5. VÝSLEDKY

5.1 Přehled izolovaných alkaloidů a jejich strukturní analýza

5.1.1 NP-B-2: Narwedin

Sumární vzorec: $C_{17}H_{19}NO_3$

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid galanthaminového typu narwedin. [135]



Obr. 18 Narwedin

MS analýza

EIMS *m/z* (%): 285(M^+, 84), 284(100), 242(18), 216(20), 199(18), 174(31)

NMR analýza

^{1}H NMR (500 MHz, δ, $CDCl_3$, 25 °C)

6,9 (1H, d, *J* = 10,4 Hz6,H-4a), 6,7 (1H, d, *J* = 8,1 Hz, H-8), 6,6 (1H, d, *J* = 8,1 Hz, H-7), 6,0 (1H, d, *J* = 10,4 Hz, H-4), 4,7 (1H, M, H-1), 4,1 (1H, d, *J* = 10,3 Hz, H-6a), 3,8 (3H, s, OMe), 3,8 (1H, d, *J* = 14,9 Hz, H-6), 3,3 (1H, t, H-12), 3,1 (2H, m, H-2, H-12), 2,7 (1H, dd, *J* =13,9 Hz, *J* = 2,5 Hz, H-2), 2,5 (3H, s, NMe), 2,3 (1H, dt, H-11), 1,9 (1H, d, *J* =13,8 Hz, H-11).

^{13}C NMR (125 MHz, δ ,$CDCl_3$, 25 °C)

194,4 (C-3), 147,0 (C-9), 144,3 (C-4a), 144,0 (C-10), 130,5 (C-10a), 129,4 (C-6a), 127,1 (C-4), 122,0 (C-7), 111,8 (C-8), 88,0 (C-1), 60,7 (C-6), 56,0 (OMe), 54,1 (C-12), 49,0 (C-10b), 42,4 (NMe), 37,3 (C-2), 33,2 (C-11).

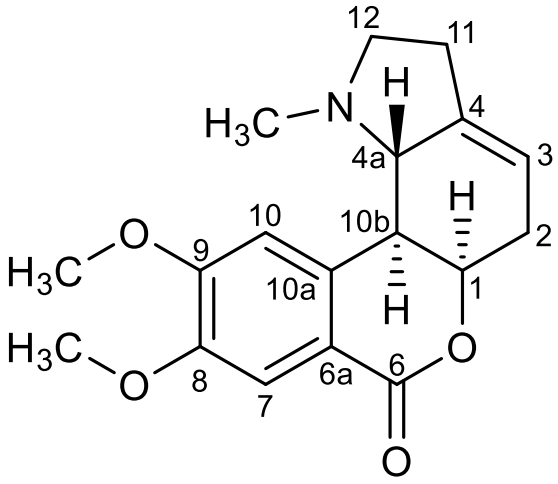
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25}$= -27,3° (c = 0,22; $CHCl_3$)

5.1.2 NP-B-3: Homolykorin

Sumární vzorec: $C_{18}H_{21}NO_4$

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid homolykorinového typu homolykorin.[136]



Obr. 19 Homolykorin

MS analýza

EIMS *m/z* (%): 206(<1), 178(2), 109(100), 150(1), 108(22), 94(3), 82(3)

NMR analýza

^{1}H NMR (500 MHz, δ, $CDCl_3$, 25 °C)

7,56 (1H, s, H-7), 6,96 (1H, s, H-10), 5,50 (1H, d, *J* = 2,3 Hz, H-3), 4,80 (1H, t, H-1), 3,95 (3H, s, OMe), 3,94 (3H, s, OMe), 2,71 (1H, m, H-4a), 2,63 (3H, m, H-2, H-10b), 2,50 (2H, m, H-11), 3,12 (1H, ddd, *J* = 9,8, 3,3, 7,2 Hz, H-12), 2,39 (2H, m, H-2), 2,23 (1H, q, *J* = 9,8 Hz, H-12), 2,00 (3H, s, NMe).

^{13}C NMR (125 MHz, δ ,$CDCl_3$, 25 °C)

165,9 (C-6), 153,1 (C-9), 148,9 (C-8), 140,9 (C-4), 137,8 (C-10a), 116,9 (C-6a), 115,2 (C-3), 111,9 (C-7), 110,8 (C-10), 77,7 (C-1), 66,6 (C-4a), 56,6 (C12), 56,4 (OMe), 56,2 (OMe), 44,2 (NMe), 43,8 (C-10b), 31,3 (C-2), 28,1 (C-11).

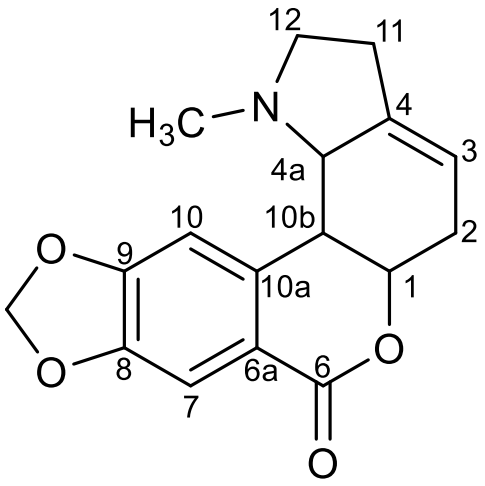
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25}$= +80° (c = 0,02; $CHCl_3$)

5.1.3 NP-B-4/3: Masonin

Sumární vzorec: $C_{17}H_{17}NO_3$

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid homolykorinového typu masonin.[137]



Obr. 20 Masonin

MS analýza

EIMS *m/z* (%): 299(M^+, 1), 190(2), 162(4), 134(1), 109(100), 108(25), 94(3), 82(3)

NMR analýza

^{1}H NMR (500 MHz, δ, $CDCl_3$, 25 °C)

7,49 (1H, s, H-7), 6,96 (1H, s, H-10), 6,07 (2H, dd, *J* = 4,7, 0,9 Hz, OCH_2O), 5,50 (1H, d, *J* = 2,2 Hz, H-3), 4,75 (1H, m, H-1), 3,18 (1H, ddd, *J* = 7,4, 6,3, 4,2 Hz, H-12), 2,72-2,76 (2H, m, H-4a), 2,58-2,62 (2H, m, H-2), 2,48-2,52 (2H, m, H-11), 2,27 (1H, dd, *J* = 18,7, 9,2 Hz, H-12), 2,06 (3H, s, NMe).

^{13}C NMR (125 MHz, δ ,$CDCl_3$, 25 °C)

165,4 (C-6), 151,8 (C-8), 147,8 (C-9), 140,2 (C-4), 139,7 (C-10a), 118,5 (C-6a), 115,6 (C-3), 109,7 (C-10), 102,0 (OCH_2O), 77,3 (C-1), 66,8 (C-4a), 56,3 (C-12), 43,8 (C-10b), 43,5 (NMe), 31,1 (C-2), 27,9 (C-11).

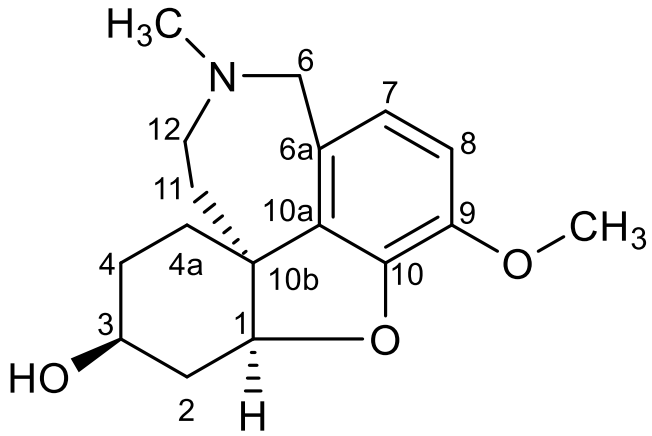
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25}$= +100° (c = 0,15; $CHCl_3$)

5.1.4 NP-C-1/2: Lykoramin

Sumární vzorec: $C_{17}H_{17}NO_3$

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid galanthaminového typu lykoramin.[138]



Obr. 21 Lykoramin

MS analýza

EIMS *m/z* (%): 289(57), 288(100)

NMR analýza

^{1}H NMR (500 MHz, δ, $CDCl_3$, 25 °C)

6,57 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H-8), 6,51 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H-7), 4,28 (1H, m, H-1), 3,98 (1H, m, H-3), 3,92 (1H, d, *J* = 15Hz, H-6a), 3,76 (3H, s, OMe), 3,54 (1H, d, *J* = 15Hz, H-6), 3,12 (1H, t, H-12), 2,96 (1H, t, H-12), 2,4 (1H, d, *J* = 16 Hz, H-2), 2,29 (3H, s, NMe), 1,4 – 1,9 (1H, m, H-2), 1,4 – 1,9 (2H, m, H-4), 1,4 – 1,9 (2H, m, H-4a), 1,4 – 1,9 (2H, m, H-11).

^{13}C NMR (125 MHz, δ ,$CDCl_3$, 25 °C)

146,2 (C-9), 144,0 (C-10), 136,3 (C-10a), 129,1 (C-6a), 121,6 (C-7), 111,3 (C-8), 89,8 (C-1), 65,2 (C-3), 60,4 (C-6), 55,9 (OMe), 54,1 (C-12), 46,7 (C-10b), 41,9 (NMe), 31,7 (C-4a), 31,5 (C-2), 27,6 (C-4), 23,9 (C-11).

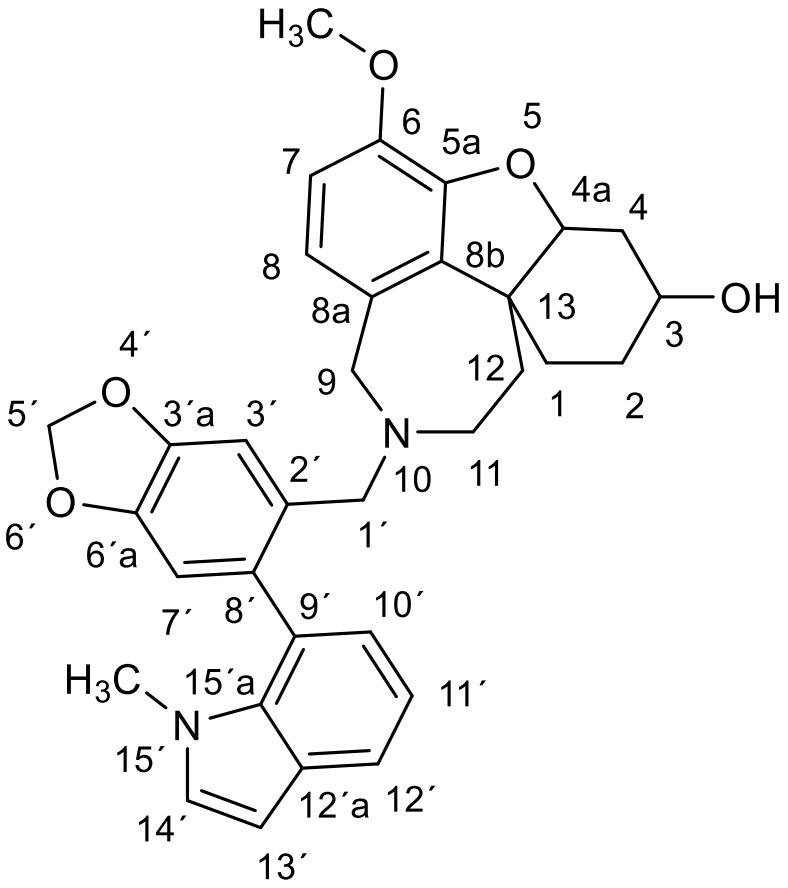
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25}$= +66,9° (c = 0,269; $CHCl_3$)

5.1.5 NP-C-4/3: Narcipavlin

Sumární vzorec: $C_{33}H_{34}N_2O_5$

V případě této látky se jedná o zcela novou doposud nepopsanou strukturu, která je pojmenována narcipavlin, systematický název této látky je: 3-methoxy-11-((6-(1-methyl-1H-indol-7-yl)-benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)methyl)-4a,5,7,8,9,10,11,12-octahydro-6H-benzo[2,3]-benzofuro[4,3-cd]azepin-6-ol. Jedná se o alkaloid, v jehož struktuře je spojen galanthaminový a galanthindolový strukturní typ.



Obr. 22 Narcipavlin

MS analýza

HRMS-QTOF MS (ESI): *m/z* $[M+H]^+$ teoreticky pro $C_{33}H_{34}N_2O_5$ 539,2541; experimentálně: 539,2542.

NMR analýza

Na základě NMR analýzy se jedná o směs diastereomerů v poměru cca 1 : 1

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD)

δ 7,48 dd (*J* = 7,7, 1,0 Hz) + 7,46 dd (*J* = 7,7, 1,0 Hz) (1H, H12´), 7,03-6,96 m + 6,94-6,92 m (1H, H14´), 7,03 s 7,01 s (1H, H3´), 7,03-6,96 m + 6,89 t (*J* = 7,4 Hz) (1H, H11´), 6,83 dd (*J* = 7,4, 1,0 Hz) + 6,66-6,63 m (1H, H10´), 6,76 s + 6,74 s (1H, H7´), 6,66-6,63 m + 6,56 d (*J* = 8,2 Hz) (1H, H7), 6,43 d (*J* = 2,9 Hz) + 6,39 d (*J* = 2,9 Hz) (1H, H13´), 6,34 d (*J* = 8,2 Hz) + 6,29 d (*J* = 8,2 Hz) (1H, H8), 6,01-5,99 m (2H, H5´), 4,02-3,93 m + 3,87-3,80 m (1H, H4a), 4,02-3,93 m (1H, H3), 3,87-3,80 m + 3,78-3,72 m + 3,54-3,45 m (2H, H9), 3,80 s + 3,77 s (3H, OMe), 3,36-3,24 m + 3,24-3,11 m (2H, H1´), 3,27 s + 3,16 s (3H, NMe), 2,96 -2,87 m + 2,71-2,64 m (2H, H11), 2,25 – 2,15 m + 1,91-1,77 m (2H, H4), 1,72-1,53 m (2H, H1), 1,72-1,53 m + 1,42-1,23 m (2H, H2), 1,42-1,23 m (2H, H12).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD)

δ 148,8 a 148,8 (C3´a), 147,8, 147,8 (C5a), 147,5 a 147,3 (C6´a), 145,3 a 145,1 (C6), 137,4 a 137,2 (C8b), 135,9 a 135,8 (C15´a), 135,0 a 134,7 (C8´), 133,1 a 132,9 (C2´), 131,8 a 131,7 (C14´), 131,2 a 131,1 (C12´a), 130,3 (C8a), 126,0 a 125,8 (C9´), 124,9 (C10´), 122,6 a 122,3 (C8), 121,0 a 120,9 (C12´), 119,7 a 119,6 (C11´), 112,7 a 112,6 (C7), 111,9 a 111,8 (C7´), 110,1 a 109,9 (C3´), 102,6 a 102,5 (C5´), 101,8 a 101,8 (C13´), 90,4 a 90,4 (C4a), 65,9 a 69,9 (C3), 59,3 a 58,7 (C9), 56,7 a 56,7 (OMe), 55,4 a 54,2 (C1´), 52,6 a 52,5 (C11), 48,0 a 47,9 (C13), 36,0 a 35,8 (NMe), 33,1 a 32,3 (C12), 32,8 a 32,7 (C4), 27,9 a 27,8 (C2), 25,3 a 25,2 (C1).

Optická otáčivost

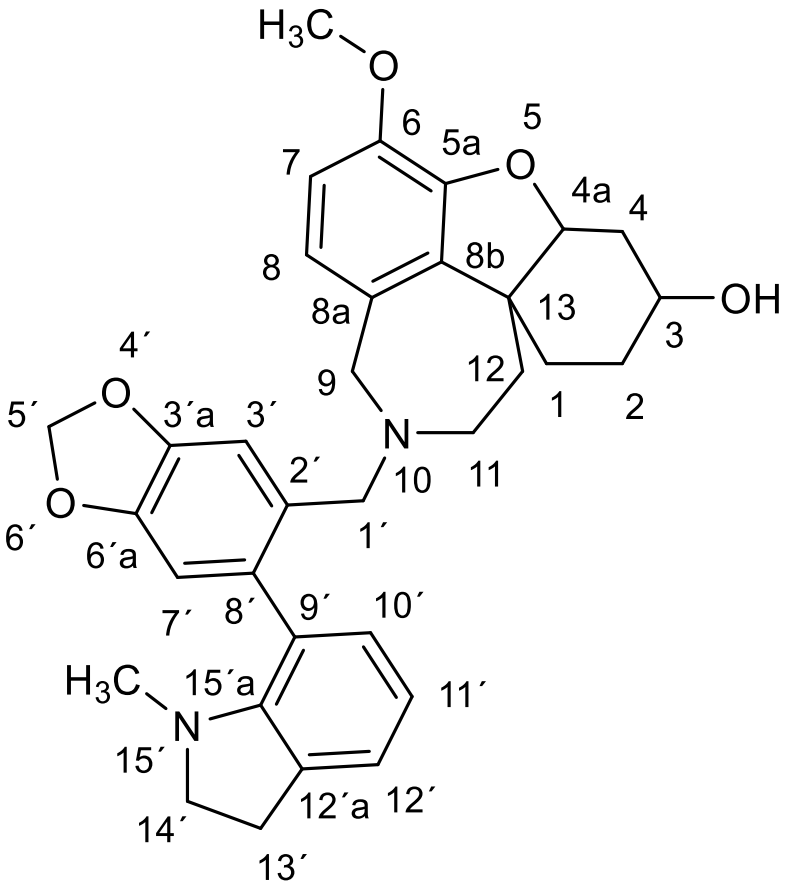
$[\alpha]_D^{25}$= +77,7° (c = 0,0011; $CHCl_3$)

5.1.6 NP-C-4/4: Narcikachnin

Sumární vzorec: $C_{33}H_{36}N_2O_5$

V případě této látky se jedná o zcela novou doposud nepopsanou strukturu, která je pojmenována narcikachnin, systematický název této látky je: 3-methoxy-11-((6-(1-methylindolin-7-yl)benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)methyl)-4a,5,7,8,9,10,11,12-octahydro-6H-benzo[2,3]benzofuro[4,3-cd]azepin-6-ol. Jedná se o alkaloid, v jehož struktuře je spojen

galanthaminový a galanthindolový strukturní typ. Tato látka se od předchozí struktury liší pouze přítomností jednoduché vazby v poloze C-13´a C-14´oproti dvojné vazbě u narcipavlinu.



Obr. 23 Narcikachnin

MS analýza

Neměřeno, látka se rozkládala.

NMR analýza

Na základě NMR analýzy se jedná o směs diastereomerů v poměru cca 1:1,2

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$)

δ 7,06 s + 7,04-6,99 m (1H, H3´), 7,04-6,99 m (1H, H12´), 6,82 d (*J* = 7,1 Hz) + 6,68-6,62 m (1H, H10´), 6,75 s + 6,72 s (1H, H7´), 6,66 t (*J* = 7,1 Hz) + 6,62-6,57 m (1H, H11´), 6,62-6,57 m (1H, H7), 6,51 d (*J* = 8,3 Hz) + 6,40 d (*J* = 8,3 Hz) (1H, H8), 5,98-5,96 m (2H, H5´), 4,28-4,25 m + 4,14-4,11 m (1H, H4a), 4,04 bs (1H, H3), 3,89 d (*J* = 15,0 Hz) + 3,88 d (*J* = 15,0 Hz) + 3,65 d (*J* = 15,0 Hz) + 3,52-3,43 m (2H, H9), 3,85 s (3H, OMe), 3,52-3,42 m + 3,39-3,32 m (2H, H1´),

3,31-3,21 m + 3,17 dd (*J* = 9,1 Hz, *J* = 9,1 Hz) + 3,08 dd (*J* = 9,1, 9,1 Hz) (2H, H14´), 3,05-2,85 m + 2,83-2,72 m (2H, H11), 3,05-2,85 m + 2,83-2,72 m (2H, H13´), 2,46 t (*J* = 14,7 Hz) + 1,88-1,47 m (2H, H4), 2,23 s + 2,18 s (3H, NMe), 1,88-1,47 m (2H, H1), 1,88-1,47 m (2H, H2), 1,88-1,47 m + 1,44-1,37 m (2H, H12).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$)

δ 150,5 a 150,4 (C15´a), 146,9 (C3´a), 146,0 (C5a), 145,9 a 145,7 (C6´a), 143,9 (C6), 136,6 (C8b), 133,6 a 133,4 (C8´), 131,9 (C9´), 131,0 (C12´a), 130,4 + 130,2 (C10´), 130,1 (C8a), 123,2 (C12´), 122,8 a 122,8 (C2´), 121,7 a 121,7 (C8), 118,0 + 117,9 (C11´), 110,6 + 110,5 (C7), 110,4 a 110,3 (C7´), 108,7 a 108,5 (C3´), 100,9 a 100,9 (C5´), 90,0 a 89,9 (C4a), 65,5 a 65,5 (C3), 58,6 a 58,3 (C9), 57,1 a 56,9 (C14´), 55,9 a 55,9 (OMe), 54,9 a 53,7 (C1´), 52,3 a 51,2 (C11), 46,7 a 46,7 (C13), 38,7 a 38,7 (NMe), 32,1 a 31,2 (C12), 31,5 a 31,4 (C4), 28,6 a 28,6 (C13´), 27,7 (C2), 23,8 a 23,7 (C1).

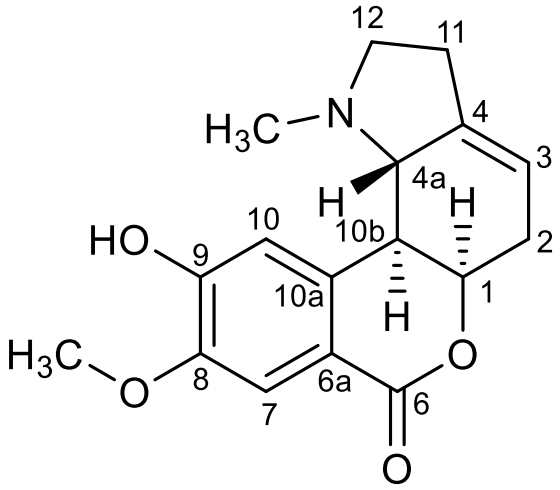
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25}$= +103,8° (c = 0,001; $CHCl_3$)

5.1.7 NP-C-G/2: 8-*O*-Demethylhomolykorin

Sumární vzorec: $C_{16}H_{21}NO_3$

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid 8-*O*-demethylhomolykorin. [136,139]



Obr. 24 8-*O*-Demethylhomolykorin

MS analýza

EIMS *m/z* (%): 192(1), 164(2), 110(8), 109(100), 108(23), 94(3), 82(3)

NMR analýza

^{1}H NMR (500 MHz, δ, $CDCl_3$, 25 °C)

7,59 (1H, s, H-7), 7,08 (1H, s, H-10), 6,07 (2H, s, OCH_2O), 5,53 (1H, s, H-3), 4,77 (1H, s, H-1), 4,38 (1H, s, H-2), 3,97 (3H, s, OMe), 3,26 (1H, m, H-4a), 3,25 (1H, m, H-12), 3,04 (1H, d, *J* = 9,4 Hz, H-10b), 2,54 (2H, m, H-11), 2,31 (1H, dd, *J* = 17,2, 8,5 Hz, H-12), 2,06 (3H, s, NMe).

^{13}C NMR (125 MHz, δ ,$CDCl_3$, 25 °C)

165,4 (C-6), 150,9 (C-9), 145,7 (C-8), 139,6 (C-4), 117,6 (C-6a), 136,2 (C-10a), 116,1(C-3), 115,9 (C-7), 110,5 (C-10), 77,2 (C-1), 66,7 (C-4a), 56,4 (OMe), 56,2 (C-12), 55,9(C-12), 43,1 (NMe), 43,1 (C-10b), 31,2 (C-2), 27,8 (C-11).

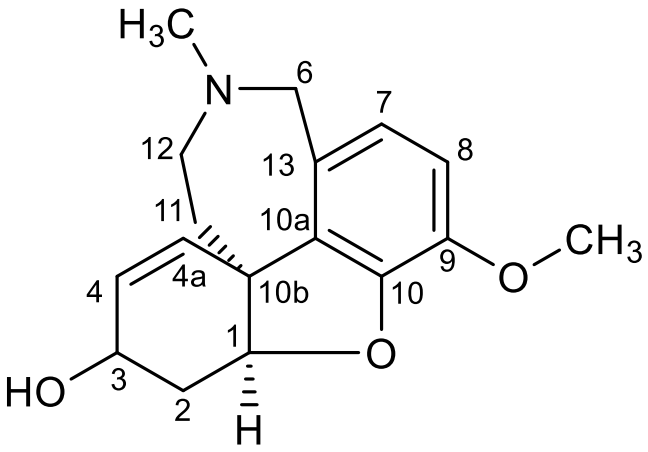
Optická otáčivost

Z důvodů izolace malého množství látky nebyla měřena optická otáčivost.

5.1.8 NP-C-I: Galanthamin

Sumární vzorec: $C_{17}H_{21}NO_3$

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid galanthamin.[135]



Obr. 25 Galanthamin

MS analýza

EIMS *m/z* (%): 287(83), 286(100), 270(15), 256(2), 244(30), 230(15), 216(39), 174(37), 128(9), 115(15)

NMR analýza

^{1}H NMR (500 MHz, δ, $CDCl_3$, 25 °C)

6,65 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H-8), 6,60 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H-7), 6,05 (1H, dd, *J* = 10,4, 1,6 Hz, H-4a), 5,98 (1H, ddd, *J* = 10,4, 5,0, 1,3 Hz, H-4), 4,59 (1H, m, H-1), 4,12 (1H, m, H-3), 4,07 (1H, d, *J* = 15 Hz, H-6), 3,81 (3H, s, OMe), 3,66 (1H, dd, *J* = 15, 1,2 Hz, H-6), 3,25 (1H, ddd, *J* = 14,4, 12,8, 1,9 Hz, H-12), 3,03 (1H, ddd, *J* = 14,4, 4,0, 3,2 Hz, H-12), 2,6 – 2,8 (1H, m, H-2), 2,39 (3H, s, NMe), 2,07 (1H, ddd, *J* = 13,7, 12,8,0, 3,2 Hz, H-11), 1,99 (1H, ddd, *J* = 15,7, 5,0, 2,5 Hz,H-2), 1,56 (1H, ddd, *J* = 13,7, 4,0, 1,9 Hz, H-11).

^{13}C NMR (125 MHz, δ ,$CDCl_3$, 25 °C)

145,7 (C-10), 143,8 (C-9), 132,8 (C-10a), 129,2 (C-6a), 127,3 (C-4), 126,6 (C-4a), 121,7 (C-7), 111,1 (C-8), 88,4 (C-1), 61,7 (C-3), 60,3 (C-6), 55,7 (OMe), 53,6 (C-12), 47,9 (C-10b), 41,9 (NMe), 33,6 (C-11), 29,8 (C-2).

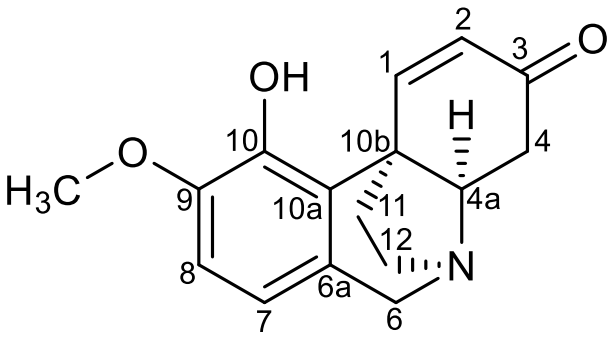
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25}$= -98° (c = 0,15; $CHCl_3$)

5.1.9 NP-D-4/3: Seko-isopowellaminon

Sumární vzorec: $C_{16}H_{17}NO_3$

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid haemanthaminového typu seko-isopowellaminon.[140]



Obr. 26 Seko-isopowellaminon

MS analýza

EIMS *m/z* (%): 271(100), 221(24), 187(45)

NMR analýza

^{1}H NMR (500 MHz, δ, $CDCl_3$, 25 °C)

7,93 (1H, d, *J* = 9,8 Hz, H-1), 6,72 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H-8), 6,53 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H-7), 5,98 (1H, d, *J* = 9,8 Hz, H-2), 4,24 (1H, d, *J* = 17,6 Hz, H-6b), 3,86 (3H, s, OMe), 3,70 (1H, d, *J* = 17,6 Hz, H-6a), 3,44 (1H, ddd, *J* = 13,0, 10,2, 3,1 Hz, H-12), 3,17 (1H, dd, *J* = 14,4, 4,1 Hz, H-4a), 2,92 (1H, ddd, *J* = 15,2, 8,4, 6,8 Hz, H-12), 2,85 (1H, dd, *J* = 16,7, 3,8 Hz, H-4), 2,53 (1H, dd, *J* = 16,4, 14,2 Hz, H-4), 2,35 (1H, ddd, *J* = 11,7, 8,4, 4,3 Hz, H-11), 1,99 (1H, ddd, *J* = 10,8, 10,8, 6,8 Hz, H-11).

^{13}C NMR (125 MHz, δ ,$CDCl_3$, 25 °C)

198,9 (C-3), 154,8 (C-1), 145,6 (C-9), 142,8 (C-10), 128,2 (C-2), 126,0 (C-10a), 125,1 (C-6a), 116,9 (C-7), 109,4 (C-8), 65,2 (C-4a), 56,2 (OMe), 54,7 (C-6), 53,5 (C-12), 43,6 (C-10b), 40,3 (C-11), 38,8, (C-4).

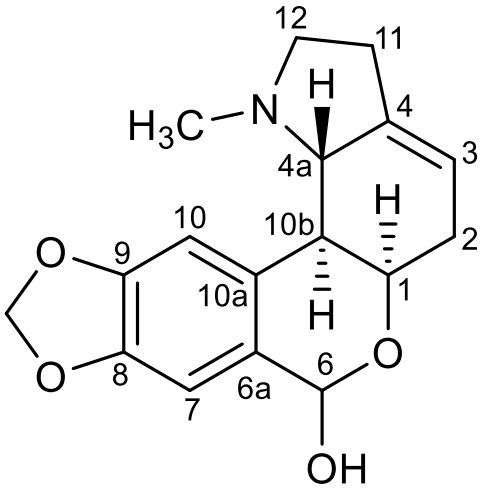
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25}$= +20° (c = 0,03; $CHCl_3$)

5.1.10 NP-E2-D2: Odulin

Sumární vzorec: $C_{17}H_{19}NO_4$

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid homolykorinového typu odulin.[136]



Obr. 27 Odulin

MS analýza

EIMS *m/z* (%): 283(3), 222(2), 175(3), 109(100)

NMR analýza

^{1}H NMR (500 MHz, δ, $CDCl_3$, 25 °C)

6,90 (1H, s, H-10), 6,85 (1H, s, H-7), 5,99 (1H, s, H-6), 5,97 (2H, d, *J* = 14,7 Hz, OCH_2O), 5,46 (1H, dd, *J* = 4,5, 2,9 Hz, H-3), 4,35 (1H, d, *J* = 6,0 Hz, H-5a), 3,14 (1H, ddd, *J* = 9,2, 6,3, 3,8 Hz, H-12), 2,72 (1H, dd, *J* = 11,1, 9,5, H-4a), 2,62 (1H, d, *J* = 19,3 Hz, H-2), 2,43 – 2,50 (3H, m, H-11, H-10b), 2,31 (1H, d, *J* = 19,0 Hz, H-2), 2,25 (1H, dd, *J* = 18,7, 9,5 Hz, H-12), 2,11 (3H, s, NMe).

^{13}C NMR (125 MHz, δ ,$CDCl_3$, 25 °C)

147,0 (C-8), 147,0 (C-9), 140,6 (C-4), 132,0 (C-6a), 128,2 (C-10a), 115,7(C-3), 109,8 (C-10), 107,4 (C-7), 101,0 (OCH_2O), 91,8 (C-6), 67,5 (C-4a), 66,7 (C-1), 56,7(C-12), 44,3 (NMe), 44,2 (C-10b), 31,7 (C-2), 28,1 (C-11).

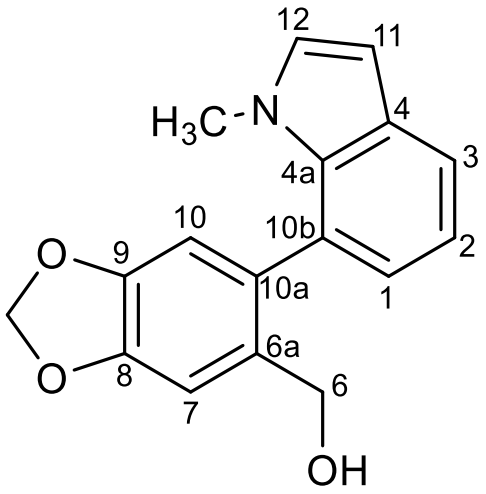
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25}$= +105° (c = 0,2; $CHCl_3$)

5.1.11 NP-F2/1: Galanthindol

Sumární vzorec: $C_{17}H_{19}NO_4$

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid galanthindol. [42]



Obr. 28 Galanthindol

MS analýza

EIMS *m/z* (%): 281(100), 263(16), 238(49), 191(6), 149(6), 107(5), 75(3)

NMR analýza

^{1}H NMR (500 MHz, δ, $CDCl_3$, 25 °C)

7,62 (1H, dd, *J* = 7,9, 1,0 Hz, H-3), 7,09 (1H, t, H-2), 7,04 (1H, s, H-7), 6,95 (2H, d, *J* = 3,1 Hz, H-12), 6,93 (1H, dd, *J* = 7,1, 1,2 Hz, H-1), 6,82 (1H, s, H-10), 6,52 (1H, d, *J* = 3,1 Hz, H-11), 6,04 (1H, d, *J* = 1,2 Hz, OCH_2O), 6,03 (1H, d, *J* = 1,2 Hz, OCH_2O), 4,30 (2H, s, CH_2OH), 3,29 (3H, s, NMe).

^{13}C NMR (125 MHz, δ ,$CDCl_3$, 25 °C)

δ 147,5 (C-8), 146,5 (C-9), 134,1 (C-4a), 133,6 (C-6a), 132,1 (C-10a), 130,9(C-12), 129,7 (C-4), 123,8 (C-1), 123,7 (C-10b), 120,6 (C-3), 119,1 (C-2), 110,9 (C-10), 107,9(C-7), 101,2 (OCH_2O), 101,1 (C-11), 63,2 (CH_2OH), 35,8 (NMe).

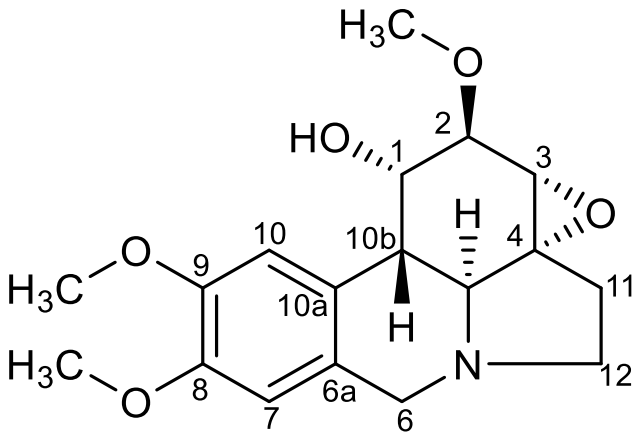
Optická otáčivost

Nebyla měřena z důvodu izolace malého množství látky.

5.1.12 NP-F-2/2: Inkartin

Sumární vzorec: $C_{18}H_{23}NO_5$

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid inkartin.[32]



Obr. 29 Inkartin

MS analýza

EIMS *m/z* (%): 333(58), 332(100), 296(10), 259(80), 258(82), 244(12), 214(6), 162(4)

NMR analýza

^{1}H NMR (500 MHz, δ, $CDCl_3$, 25 °C)

6,78 (1H, s, H-10), 6,57 (1H, s, H-7), 4,46 (1H, s, H1), 4,07 (1H, d, *J* = 14,0 Hz, H-6), 3,85 (1H, s, H-2), 3,65 (1H, dd, *J* = 14,0, 1,0 Hz, H-6), 3,84 (3H, s, OMe), 3,80 (3H, s, OMe), 3,54 (3H, s, OMe), 3,48 (1H, d, *J* = 1,0 Hz, H-3), 3,20 (1H, ddd, *J* = 9,0, 7,5, 2,0 Hz, H-12), 2,82 (1H, d, *J* = 11,2 Hz, H-10b), 2,59 (1H, ddd, *J* = 10,3, 9,0, 6,5 Hz, H-12), 2,56 (1H, d, *J* = 11,2 Hz, H-4a), 2,39 (1H, ddd, *J* = 14,5, 10,3, 7,5 Hz, H-11), 2,00 (1H, ddd, *J* = 14,5, 6,5, 2,0 Hz, H-11).

^{13}C NMR (125 MHz, δ ,$CDCl_3$, 25 °C)

147,9 (C-9), 147,8 (C-8), 128,5 (C-6a), 127,9 (C10a), 110,7 (C-7), 107,6 (C-10), 78,2 (C-2), 67,7 (C-1), 66,9 (C-4), 61,3 (C-4a), 59,2 (OMe), 59,0 (C-3), 56,7 (C-6), 56,2 (OMe), 56,1 (OMe), 53,0 (C-12), 40,1 (C-10b), 30,1 (C-11).

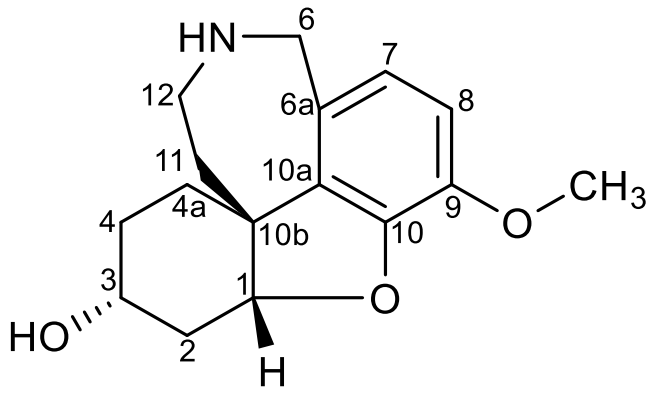
Optická otáčivost

Nebyla měřena z důvodu izolace malého množství látky.

5.1.13 NP-F-3/1: Norlykoramin

Sumární vzorec: $C_{16}H_{21}NO_3$

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid galanthaminového typu norlykoramin.[141]



Obr. 30 Norlykoramin

MS analýza

EIMS *m/z* (%): 275(M^+, 77), 274(100), 202(11), 188(17), 178(10)

NMR analýza

^{1}H NMR (500 MHz, δ, $CDCl_3$, 25 °C)

6,61 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H-8), 6,51 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H-7), 4,32 (1H, m, H-1), 4,04 (1H, m, H-3), 3,90 (1H, d, *J* = 15Hz, H-6a), 3,80 (3H, s, OMe), 3,54 (1H, d, *J* = 15Hz, H-6), 3,12 (1H, t, H-12), 2,96 (1H, t, H-12), 2,4 (1H, d, *J* =16 Hz, H-2), 1,4 – 1,9 (1H, m, H-2), 1,4 – 1,9 (2H, m, H-4), 1,4 – 1,9 (2H, m, H-4a), 1,4 – 1,9 (2H, m, H-11).

^{13}C NMR (125 MHz, δ ,$CDCl_3$, 25 °C)

146,2 (C-9), 144,0 (C-10), 136,3 (C-10a), 129,1 (C-6a), 121,6 (C-7), 111,3 (C-8), 89,8 (C-1), 65,2 (C-3), 60,4 (C-6), 55,9 (OMe), 54,1 (C-12), 46,7 (C-10b), 31,7 (C-4a), 31,5 (C-2), 27,6 (C-4), 23,9 (C-11).

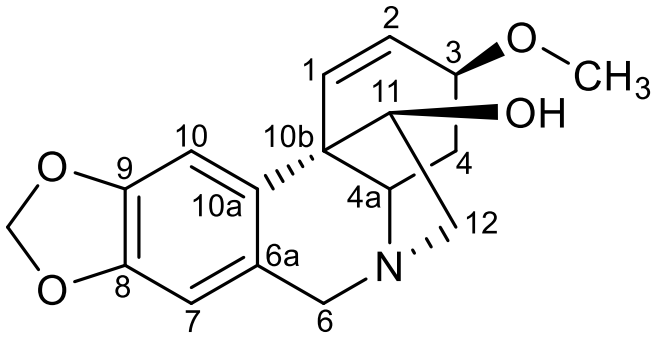
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25}$= -41° (c = 0,5; $CHCl_3$)

5.1.14 NP-F-3/5: Haemanthamin

Sumární vzorec: $C_{17}H_{19}NO_4$

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid haemanthaminového typu haemanthamin.[141]



Obr. 31 Haemanthamin

MS analýza

EIMS *m/z* (%): 301(M^+, 15), 272(100), 240(18), 257(20), 211(16), 181(23)

NMR analýza

^{1}H NMR (500 MHz, δ, $CDCl_3$, 25 °C)

6,74 (1H, s, H-10), 6,41 (1H, s, H-7), 6,36 (1H, d, *J* = 10,2 Hz, H-1), 6,25 (1H, dd, *J* = 10,2, 4,7 Hz, H-2), 5,81 (1H, s, OCH_2O), 5,76 (1H, s, OCH_2O), 4,25(1H, d, *J* = 17,1 Hz, H-6), 3,96 (1H, dd, *J* = 6,7, 3,3 Hz, H-11), 3,82 (1H, m, H-3), 3,72 (1H, d, *J* = 17,1 Hz, H-6), 3,36(3H, s, OMe), 3,25 – 3,30 (2H, m, H-12, H-4a), 3,19 (1H, dd, *J* = 14,1, 3,3 Hz, H-12), 2,11 (1H, ddd, *J* = 13,8, 5,4, 1,8 Hz, H-4), 1,96 (1H, m, H-4).

^{13}C NMR (125 MHz, δ ,$CDCl_3$, 25 °C)

146,5 (C-8), 147,0 (C-9), 135,0 (C-10a), 128,0 (C-1), 127,2 (C-2), 126,9(C-6a), 106,9 (C-7), 103,3 (C-10), 101,0 (OCH_2O), 80,0 (C-11), 73 (C-3), 63,3 (C-6), 62,7(C-4a), 61,5 (C-12), 56,0 (OMe), 50,0 (C-10b), 29,5 (C-4).

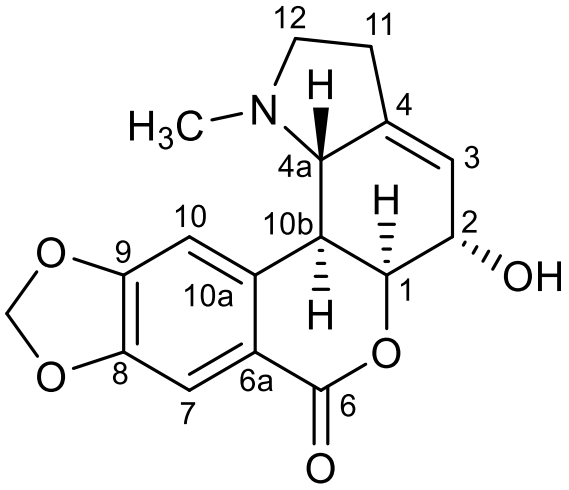
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25}$= +37° (c = 0,29; $CHCl_3$)

5.1.15 NP-J-5: Hippeastrin

Sumární vzorec: $C_{16}H_{21}NO_3$

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid hippeastrin.[139]



Obr. 32 Hippeastrin

MS analýza

EIMS *m/z* (%): 297(10), 279(9), 190(28), 126(84), 125(100), 124(84), 96(99)

NMR analýza

^{1}H NMR (500 MHz, δ, $CDCl_3$, 25 °C)

7,48 (1H, s, H-10), 6,98 (1H, s, H-7), 6,08 (1H, s, OCH_2O), 6,07 (2H, s, OCH_2O), 5,70 (1H, s, H-3), 4,61 (1H, s, H-1), 4,38 (1H, s, H-2), 3,25 (1H, m, H-12), 3,04 (1H, d, *J* = 9,4 Hz, H-10b), 2,73 (1H, d, *J* = 9,4 Hz, H-4a), 2,54 (2H, m, H-11), 2,31 (1H, dd, *J* = 17,2, 8,5 Hz, H-12), 2,10 (3H, s, NMe).

^{13}C NMR (125 MHz, δ ,$CDCl_3$, 25 °C)

165,0 (C-6), 151,9 (C-9), 148,0 (C-8), 142,4 (C-4), 118,0 (C-6a), 138,8 (C-10a), 119,4(C-3), 109,8 (C-7), 108,5 (C-10), 102,1 (OCH_2O), 82,2 (C-1), 67,1 (C-4a), 66,2 (C-2), 55,9(C-12), 42,9 (NMe), 38,4 (C-10b), 27,3 (C-11).

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25}$= + 130° (c = 0,3; $CHCl_3$)

5.2 Výsledky provedených biologických testů izolovaných alkaloidů

5.2.1 Biologická aktivita izolovaných alkaloidů ve vztahu k Alzheimerově demenci

Alkaloidy byly testované na in inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterasám a POP, inhibiční aktivity jsou shrnuty v tabulce (Tab. 10), červeně jsou vyznačeny látky s nejzajímavější aktivitou.

Tab. 10 Biologická aktivita izolovaných alkaloidů vůči HuAChE, HuBuChE a POP

Alkaloid	IC_{50} HuAChE (µM)	IC_{50} HuBuChE (µM)	IC_{50} POP (mM)
8-*O*-Demethylhomolykorin	NT	NT	NT
Galanthindol	NT	NT	NT
Haemanthamin	> 1000	> 1000	> 10000
Hippeastrin	> 1000	> 1000	> 1000
Homolykorin	63,7 ± 4,3	151 ± 19	40,6 ± 1,3
Inkartin	208 ± 14	943 ± 140	907 ± 87
Lykoramin	456 ± 57	> 1000	> 1000
Masonin	304 ± 34	229 ± 24	314 ± 33
Narcikachnin	NT	NT	NT
Narcipavlin	208 ± 37	24,4 ± 1,2	NT
Narwedin	281 ± 33	911 ± 68	945 ± 115
Norlykoramin	> 1000	> 1000	0,21 ± 0,01
Odulin	> 1000	> 1000	252 ± 27
Seko-isopowellaminon	293 ± 33	581 ± 47	> 1000
Galanthamin	1,71 ± 0,07	42,3 ± 1,3	> 1000
Huperzin A	0,033 ± 0,001	> 1000	> 1000
Berberin	0,71 ± 0,01	30,7 ± 3,5	0,14 ± 0,02
Z-Pro-prolinal	NT	NT	3,27 ± 0,02

NT – netestováno

5.2.2 Antimikrobiální a antifungální aktivita izolovaných alkaloidů

Testované látky nevykázaly významnou aktivitu vůči Gram-pozitivním (kmeny *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus hyicus*) a Gram-negativním bakteriím (kmeny *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* a *Pseudomonas aeruginosa*).[89] Antifungální aktivita byla zjištěna u dvou izolovaných alkaloidů, výsledky jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 11).

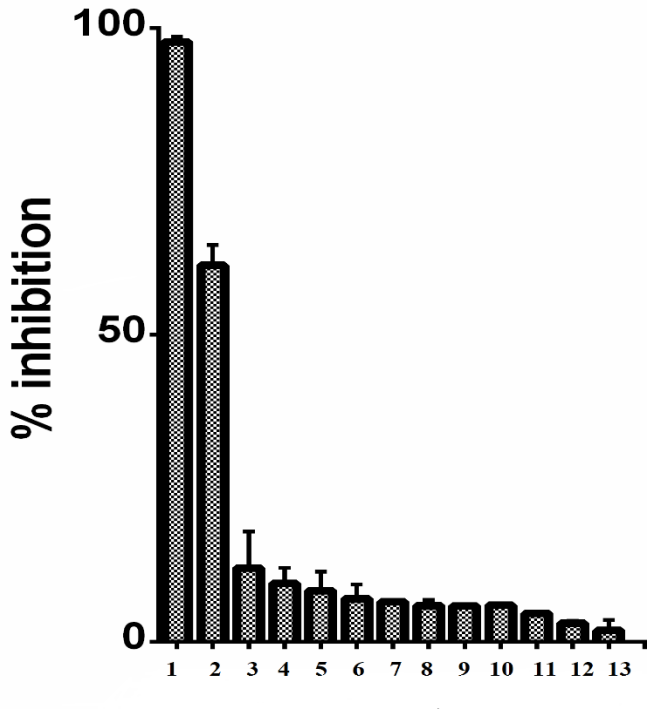
Tab. 11 Výsledky antimikrobiální aktivity testovaných alkaloidů z *N. poeticus* cv. Pink Parasol

Látky	MIC_{80}/MFC ($\mu g \cdot ml^{-1}$)		
	Candida albicans	*Candida dubliniensis*	*Lodderomyces elengiosporus*
Haemanthamin	512	512	256
Lykoramin	NT	512	512
Thiokonazol	0,06	≤ 0,03	≤ 0,03

NT – netestováno

5.2.3 Výsledky inhibiční aktivity aldo-keto reduktasy AKR1C3 izolovaných alkaloidů

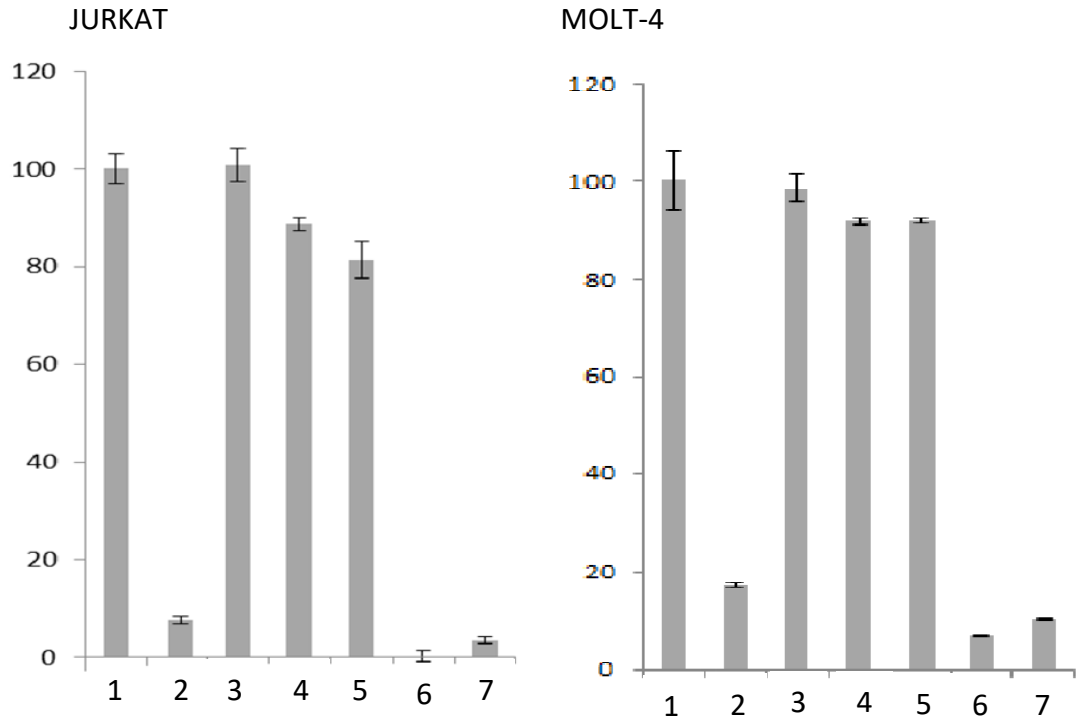
Některé izolované alkaloidy byly testovány na AKR1C3 (zeleně označeny jsou alkaloidy izolované z *N. poeticus* cv. Pink Parasol).



Obr. 33 Screening aldo-keto reduktasové inhibiční aktivity Amaryllidaceae alkaloidů
1 – indometacin (pozitivní standard), 2 – tazettin, 3 – galanthamin, 4 – undulatin, 5 – hamayn, 6 – 1-*O*-acetylbulbisin, 7 – lykorin, 8 – homolykorin, 9 – masonin, 10 – lykorenin, 11 – 9-*O*-demethylgalanthin, 12 – belladin, 13 – tetrahydromasonin

5.2.4 Výsledky single dose screeningové studie izolovaných alkaloidů na leukemických nádorových liniích

Alkaloidy homolykorinového typu společně s haemanthaminem byly formou screeningu testovány na dvě leukemické nádorové linie (Obr. 34).



Obr. 34 Výsledky single dose screeningové studie alkaloidů izolovaných z *N. poeticus* cv. Pink Parasol na leukemických nádorových liniích JURKAT a MOLT-4

1 – DMSO (slepý vzorek), 2 – hippeastrin, 3 – homolykorin, 4 – masonin, 5 – odulin, 6 – cisplatina, 7 – haemanthamin

5.2.5 Výsledky cytotoxické aktivity na nádorových liniích kolorektálního karcinomu

Z izolovaných alkaloidů byly vzhledem k omezenému množství testovány pouze dva alkaloidy; jejich aktivita je shrnuta v následující tabulce (Tab. 12).[110]

Tab. 12 Výsledky cytotoxické aktivity na nádorových liniích kolorektálního karcinomu

Alkaloid	Buněčné linie *in vitro* IC_{50} (μM) inhibice růstu		
	Caco-2	HT-29	FHs 74
Haemanthamin	0,99 ± 0,14	0,59 ± 0,01	19,5 ± 8,9
Galanthamin	61,43 ± 1,56	49,27 ± 2,38	67,63 ± 7,70
Vinorelbin	0,03 ± 0,01	NT	4,0 ± 0,3

6. DISKUZE

V úvodu a v průběhu celé doktorské práce byly představeny alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jako látky s velkým potenciálem při hledání nových léčiv použitelných v terapii různých chronických onemocnění. V dnešní době se výzkum zmíněných sloučenin zaměřuje na oblast hledání látek využitelných v protinádorové terapii, především z důvodu jejich vysoce selektivního účinku na nádorové buňky a také relativně snadné izolace některých alkaloidů z přírodního materiálu. Nadále je také věnována pozornost studiu jejich inhibiční aktivity vůči cholinesterasám a nově se výzkum zaměřuje i na jejich antimalarickou aktivitu. V neposlední řadě byla připravena i řada derivátů (především od lykorinu), které byly studovány z pohledu nejrůznějších biologických aktivit.

Po fytochemické stránce byla rostlinám rodu *Narcissus* L. věnována velká pozornost jak v oblasti analytické tak izolační.[142] Z rostlin tohoto rodu bylo identifikováno pomocí různých metod (především GC/MS), a izolováno velké množství alkaloidů nejrůznějších strukturních typů od miligramových množství až po gramová. Rostlina *Narcissus poeticus* L., zároveň její variety a pěstované odrůdy po fytochemické stránce již byly studovány, pěstovaná odrůda Pink Parasol doposud nikoliv.[128-132] Tato odrůda byla pro fytochemickou studii vybrána na základě GC/MS screeningu 80 různých komerčně dostupných pěstovaných kultivarů rodu *Narcissus* L. GC/MS analýza ukázala přítomnost širokého spektra alkaloidů, přičemž některé z nich se podařilo identifikovat pomocí hmotnostní spektrometrie, u některých se podařilo určit o jaký strukturní typ Amaryllidaceae alkaloidu se mohlo jednat, ostatní se nepodařilo identifikovat vůbec. S velkou pravděpodobností se jednalo o látky nové doposud nepopsané. Tato rostlina byla vybrána i na základě vysokého obsahu alkaloidů homolykorinového strukturního typu, kterých nebylo doposud izolováno mnoho, a v naší laboratoři prozatím izolovány nebyly. O biologické aktivitě těchto látek bylo v literatuře pouze malé množství informací. Alkaloidní extrakt byl také podroben studiu na jeho HuAChE a HuBuChE inhibiční aktivitu ($IC_{50,AChE}$ = 191,3 ± 20,2 μM a $IC_{50,BuChE}$ = 3,3 ± 0,5 μM). Získané hodnoty $IC_{50,AChE}$ tohoto extraktu byly relativně nezajímavé a pro výběr rostliny nebyly rozhodující. Oproti tomu inhibice vůči HuBuChE byla velice slibná.

V rámci vlastní fytochemické studie rostliny *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol bylo izolováno 15 alkaloidů, z nichž 13 bylo již popsáno dříve, dva alkaloidy byly zcela nové doposud

nepopsané struktury. Izolované alkaloidy patří do následujících strukturních typů: galanthaminový (narwedin, lykoramin, galanthamin, norlykoramin), lykorinový (inkartin), homolykorinový (homolykorin, masonin, 8-*O*-demethylhomolykorin, odulin, hippeastrin), haemanthaminový (seko-isopowellaminon, haemanthamin) a galanthindolový typ (galanthindol). Alkaloidy odulin a norlykoramin zatím nebyly z žádné další rostliny kromě rodu *Narcissus* L. izolovány. Dalším zdrojem homolykorinu, haemanthaminu, galanthaminu je např. *Hippeastrum aulicum* Herb.[143], *H. vittatum* L.[128], *Lycoris sprengeri* Herb.[144], narwedinu *Hippeastrum papilio* Van Scheepen[145], lykoraminu a inkartinu *Lycoris incarnata* Comes ex Sprenger[73,146], masoninu *Nerine masonorum* L. Bolus[147], 8-*O*-demethyl-homolykorinu *Lycoris radiata* Herb.[136], hippeastrinu *Amaryllis beladona* L.[26], seko-isopowellaminonu *Crinum asiaticum* L.[140] a galanthindolu *Crinum angustum* Steud.[148]. Alkaloidy narcipavlin a narcikachnin v sobě kombinují galanthaminový a galanthindolový strukturní typ a jsou podobné pallidiflorinovému strukturnímu typu. Tyto dvě nové doposud nepopsané látky se vzájemně liší pouze přítomností dvojné vazby v poloze C13´-C14´ v narcipavlinu oproti jednoduché vazbě v narcikachninu. Sloučenina narcipavlin byla izolována v množství umožňující i studium některých biologických aktivit, bohužel látky narcikachninu se podařilo izolovat v množství dovolující provedení studií strukturní analýzy za účelem její identifikace.

Alkaloidy byly testovány na různé biologické aktivity. Na Katedře farmaceutické botaniky je dlouhodobě studována HuAChE a HuBuChE inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů jako látek potenciálně využitelných v terapii AD. Význam inhibice cholinesteras v terapii je podrobně popsán v kapitole pojednávající o látkách využitelných v terapii Alzheimerovy choroby. Z testovaných látek byla získána zajímavá inhibiční aktivita pouze vůči butyrylcholinesterase u nově izolované látky narcipavlinu ($IC_{50,HuBuChE}$ = 24,4 ± 1,2 μM). Ostatní studované látky, kromě galanthaminu, který je již využíván v terapii AD, byly bohužel neaktivní. Látky byly dále studovány z pohledu jejich POP inhibiční aktivity. Tato cytosolická serinová endopeptidasa se uplatňuje při biosyntéze a degradaci peptidových hormonů a neuropeptidů přítomných v mozku, které jsou zapojeny do procesu učení a paměti. Přesné působení a role POP v AD není zcela objasněna, ale má se za to, že její inhibice může vést ke zlepšení kognitivních funkcí.[149] Z izolovaných látek byla získána velmi zajímavá POP inhibice u norlykoraminu (IC_{50} = 0,21 ± 0,01 mM), jehož schopnost inhibice POP je nezajímavější z doposud testovaných Amaryllidaceae alkaloidů a jeho aktivita je srovnatelná s inhibiční

aktivitou berberinu (IC_{50} = 0,14 ± 0,02 mM), který je v literatuře považován za standardní POP inhibitor. Hodnoty IC_{50} pro POP u ostatních alkaloidů dosahovaly hodnot desítek až stovek mM.

V teoretické části byl podrobně popsán potenciál těchto sloučenin při hledání nových látek využitelných v terapii nádorových onemocnění. Velkou výhodou Amaryllidaceae alkaloidů je jejich selektivita vůči nádorovým buňkám a nízká toxicita pro buňky zdravé nebo klidové. V rámci spolupráce s Lékařskou fakultou v Hradci Králové a katedrou biologických a biochemických věd Univerzity Pardubice byly prozatím formou screeningu testovány alkaloidy homolykorinového typu společně s haemanthaminem při koncentraci 10 µM na dvou leukemických nádorových liniích: Jurkat a MOLT-4. Zajímavé výsledky této screeningové studie byly získány pro alkaloid haemanthaminového strukturního typu haemanthamin a společně s ním i hippeastrin. Další studie vedoucí k výpočtu IC_{50} probíhají.

Hippeastrin se od ostatních prozatím izolovaných a testovaných alkaloidů homolykorinového typu odlišuje přítomností hydroxylové skupiny v poloze C-2. Zda je tento strukturní detail klíčový pro cytotoxickou aktivitu hippeastrinu, bude muset být ověřeno otestováním dalších alkaloidů homolykorinového typu, případně přípravou semisyntetických derivátů hippeastrinu, který byl izolován v množství umožňující jak podrobnější biologické studie, tak i zmíněnou přípravu derivátů.

Cytotoxicita haemanthaminu je v literatuře dobře známá a byla shrnuta v teoretické části.[112] Haemanthamin byl v rámci provedené fytochemické studie izolován v miligramovém množství, ale v laboratoři již máme z jiné odrůdy rodu *Narcissus* L. izolováno cca 10 g této sloučeniny a v současné době se pracuje na přípravě různých derivátů, které by mohly disponovat ještě zajímavější aktivitou. Galanthamin a haemanthamin byly izolovány jako první a byly zahrnuty do studie, v rámci které bylo testováno celkem 21 Amaryllidaceae alkaloidů, izolovaných na našem pracovišti z různých Amaryllidaceae rostlin, na dvě nádorové linie kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT-29 a zároveň na linii zdravých střevních fibroblastů FHs-74. Ze všech testovaných látek byl haemanthamin nejzajímavější sloučeninou, hodnoty IC_{50} proti nádorovým buňkám se pohybovaly do 1 µM ($IC_{50,Caco-2}$ = 0,99 ± 0,14 µM, $IC_{50,HT-29}$ = 0,59 ± 0,01 µM), zatímco cytotoxicita haemanthaminu na linii zdravých fibroblastů byla výrazně nižší ($IC_{50,FHs-74}$ = 19,5 ± 8,9 µM).[110]

Látky byly v rámci spolupráce s katedrou biochemických věd Farmaceutické fakulty také testovány na inhibici aldo-keto reduktasy AKR1C3, která dle literárních údajů hraje roli

v rozvoji některých onemocnění (např. hormon-dependentní nádory). Bohužel žádný z alkaloidů izolovaných z rostliny *N. poeticus* cv. Pink Parasol nevykázal v testech slibnou inhibiční aktivitu AKR1C3.

V literatuře je věnována pozornost i antimalarické aktivitě Amaryllidaceae alkaloidů. Mezi nejzajímavější látky z tohoto pohledu patří lykorin[4] a jeho deriváty[118]. Vzhledem k nedávno uzavřené spolupráci s laboratoří „Prudêncio Lab – Plasmodium infection and anti-malarial strategies“ na Univerzitě v Lisabonu, jsou látky izolované v rámci této práce v současné době testovány a výsledky budou k dispozici v blízké době.

Závěrem lze konstatovat, že alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae zůstávají slibnou skupinou látek s širokým spektrem biologických aktivit a mohou také sloužit jako tzv. lead-structures pro přípravu semisyntetických derivátů při vývoji léčiv použitelných v terapiích rozličných onemocnění a jejich studium je stále atraktivní.

7. ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: **Mgr. Marcela Šafratová**

Školitel: **Doc. Ing. Lucie Cahlíková PhD.**

Název disertační práce: **Studium inhibičního (toxického) vlivu alkaloidů vybraných druhů rostlin z čeledi Amaryllidaceae na některé lidské enzymové systémy (*in vitro* studie) III**

Klíčová slova: *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol, Amaryllidaceae, alkaloidy, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, prolyl oligopeptidasa, cytotoxicita

Jako zdroj Amaryllidaceae alkaloidů pro studium jejich biologické aktivity byly vybrány cibule rostliny *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol. Koncentrovaný alkaloidní extrakt byl připraven standardními extrakčními postupy a separován sloupcovou chromatografií na oxidu hlinitém za použití stupňovité eluce benzinem, chloroformem a ethanolem. Sloupcová chromatografie, vakuová sloupcová chromatografie, preparativní TLC a krystalizace vedly k izolaci 15 alkaloidů, z nichž 2 sloučeniny byly identifikovány jako nové struktury. Identifikace všech izolovaných látek byla provedena na základě spektrometrických technik (NMR, MS, optická otáčivost) a porovnáním získaných dat s literaturou. Alkaloidy izolované v dostatečném množství byly testovány na schopnost inhibovat erytrocytární AChE a sérovou BuChE, POP (byla stanovena IC_{50}), cytotoxicitu, inhibici AKR3C1 a antimikrobiální aktivitu.

Cholinesterasová inhibiční aktivita byla stanovena *in vitro* modifikovanou spektrofotometrickou Ellmanovou metodou. V rámci testování inhibiční aktivity AChE byly všechny testované alkaloidy kromě galanthaminu neaktivní. Nejúčinnějším inhibitorem BuChE byla nově izolovaná látka narcipavlin, která měla inhibiční aktivitu IC_{50} = 24,4 ± 1,2 μM. Další izolované alkaloidy byly vzhledem k jejich vysoké butyrylcholinesterasové aktivitě považovány za neaktivní (IC_{50} > 40 μM).

Inhibiční aktivita vůči POP byla stanovena spektrofotometrickou metodou, jako substrát byl použit *Z*-Gly-Pro-*p*-nitroanilid. Nejúčinnějším POP inhibitorem v rámci studie byl norlykoramin (IC_{50} = 0,21 ± 0,01 mM), jehož aktivita byla srovnatelná se standardem berberinem (IC_{50} = 0,14 ± 0,02 mM), a vykázal tak nejsilnější POP inhibici v rámci doposud

testovaných Amaryllidaceae alkaloidů. Další izolované alkaloidy byly považovány za neaktivní (IC_{50} > 20 mM).

Z izolovaných alkaloidů, které byly testovány na cytotoxicitu, byl nejvýznamnější haemanthamin, který se vyznačoval selektivním účinkem na nádorové buňky. Testovanými nádorovými liniemi byly Caco-2 (IC_{50} = 0,99 ± 0,14 µM), HT-29 (IC_{50} = 0,59 ± 0,0,01 µM) a zdravá linie buněk FHs 74 (IC_{50} = 19,5 ± 8,9 µM).

Některé alkaloidy byly v rámci výzkumu testovány na inhibici enzymu AKR1C3, byly shledány jako neaktivní.

Antimikrobiální a antifungální studie, která byla provedena na vybraných alkaloidech, neprokázala žádný významný inhibiční efekt na růst vybraných bakteriálních kmenů a kvasinek.

8. ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: **Mgr. Marcela Šafratová**

Supervisor: **Doc. Ing. Lucie Cahlíková PhD.**

Title of Doctoral Thesis: **Study of inhibition (toxicity) activity of alkaloids from selected plant species of Amaryllidaceae family on human enzyme systems (*in vitro* study) III**

Key words: *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol, Amaryllidaceae, alkaloids, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, prolyl oligopeptidase, cytotoxicity

Bulbs of *Narcissus poeticus.* cv. Pink Parasol were selected as a source of Amaryllidaceae alkaloids for study of their biological activity. Concentrated alkaloid extract has been prepared were prepared by standard extraction and fractionated in aluminium oxide column chromatography column using step gradient elution with petrol, chloroform and ethanol. Column chromatography, vacuum liquid column chromatography, preparative TLC and crystallizations resulted in the isolation of 15 alkaloids, 2 of them were identified as new structures. The chemical structures of isolated compounds were determined on the basis of spectrometric techniques (NMR, MS, optical rotation) and by comparison with literature. Alkaloids isolated in sufficient amounts were tested on their inhibitory ability of human erythrocyte AChE and serum BuChE, POP (IC_{50} was ascertained), cytotoxicity, inhibition AKR3C1 and antimicrobial activity.

The cholinesterase inhibitory activity was determined *in vitro* by modified spectrophotometric Ellman's method. Within testing the inhibitory activity of AChE all the tested alkaloids proved negative activity except of galanthamine. The most potent inhibitor of BuChE was narcipavline with IC_{50} value of 24,4 ± 1,2 µM. Other isolated alkaloids were considered to be inactive in these terms given their high butyrylcholinesterase activity (IC_{50} > 40 µM).

The POP inhibition activity was determined spectrophotometric method using *Z*-Gly-Pro-*p*-nitroanilid as substrate. The strongest inhibition activity was shown by norlycoramine (IC_{50} = 0,21 ± 0,01 mM) was comparable to the standard berberine (IC_{50} = 0,14 ± 0,21 mM). Norlycoramine demonstrated strongest POP activity from till the date

tested Amaryllidaceae alkaloids. Other isolated alkaloids were considered to be inactive (IC_{50} > 20 mM).

Haemanthamine was chosen as most potent structure from the isolated alkaloids that were tested on their cytotoxicity, because its selectivity on cancer cell lines. Tested cell lines were Caco-2 (IC_{50} = 0,99 ± 0,14 µM), HT-29 (IC_{50} = 0,59 ± 0,0,01 µM) and healthy cell line FHs 74 (IC_{50} = 19,5 ± 8,9 µM).

Some of the isolated alkaloids were tested on their inhibition activity of AKR1C3 enzyme and were considered as inactive.

Antimicrobial and antifungal studies carried out on chosen alkaloids did not prove any significant inhibitory effect on growth of selected bacterial strains and yeast cells.

9. PŘEHLED PUBLIKACÍ

9.1 Původní práce

Vaněčková, N.; Hošťálková, A.; Šafratová, M.; Kuneš, J.; Hulcová, D.; Hrabinová, M.; Doskočil, I.; Štěpánková, Š.; Opletal, L.; Nováková, L.; Jun, D.; Chlebek, J.; Cahlíková L.: Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii* and their biological activities. RSC Advances, 2016, 6,80114-80120. (IF_{2014} = 3,29)

Havelek, R.; Seifrtová, M.; Královec, K.; Krocová, E.; Tejkalová, V.; Novotný, I.; Cahlíková, L.; Šafratová, M.; Opletal, L.; Bílková, Z.; Vávrová, J.; Řezáčová, M.: Comparative cytotoxicity of chelidonine and homochelidonine, the dimethoxy analogues isolated from *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae), against human leukemic and lung carcinoma cells. Phytomedicine, 2016, 253-266. (IF_{2014} = 3,13)

Chlebek, J.; Novák, Z.; Kassemová, D.; Šafratová, M.; Kostelník, J.; Malý, L.; Ločárek, M.; Opletal, L.; Hošťálková, A.; Hrabinová, M.; Kuneš, J.; Novotná, P.; Urbanová, M.; Nováková, L.; Hulcová, D.; Solich, P.; Martín, C. P.; Jun, D.; Cahlíková, L.; Macáková, K.: Isoquinoline alkaloids from *Fumaria officinalis* L. and their biological activities related to Alzheimer ´s disease. Chemistry & Biodiversity, 2016, 13, 91-99. (IF_{2014} = 1,52)

Ločárek, M.; Nováková, J.; Klouček, P.; Hošťálková, A.; Kokoška, l.; Gabrlová, L.; Šafratová, M.; Opletal, L.; Cahlíková, L.: Antifungal and Antibacterial Activity of Extracts and Alkaloids of Selected Amaryllidaceae Species. Natural Product Communications, 2015, 1537-1540. (IF_{2014} = 0,91)

Doskočil, I.; Hošťálková, A.; Šafratová, M.; Benešová, N.; Havlík, J.; Havelek, R.; Kuneš, J.; Královec, K.; Chlebek, J.; Cahlíková, L.: Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. Phytochemistry Letters, 2015, 394-398. (IF_{2014} = 1,45)

Cahlíková, L.; Pérez, D. I.; Štěpánková, Š.; Chlebek, J.; Šafratová, M.; Hošťálková, A.; Opletal, L.: *In vitro* inhibitory effects of 8-*O*-demethylmaritidine and undulatine on acetylcholinesterase, and their predicted penetration across the blood-brain barrier. Journal of Natural Products, 2015, 78, 1189-1192. (IF_{2014} = 3,80)

Cahlíková, L.; Hulová, L.; Hrabinová, M.; Chlebek, J.; Hošťálková, A.; Adamcová, M.; Šafratová, M.; Jun, D.; Opletal, L.; Ločárek, M.; Macáková, K.: Isoquinoline alkaloids as potential prolyl oligopeptidase inhibitors. Fitoterapia, 2015, 103, 192-196. (IF_{2014} = 2,35)

Opletal, L.; Ločárek, M.; Fraňková, A.; Chlebek, J.; Šmíd, J.; Hošťálková, A.; Šafratová, M.; Hulcová, D.; Klouček, P.; Rozkot, M.; Cahlíková, L.: Antimicrobial activity of extracts

and isoquinoline alkaloids of selected Papaveraceae plants. Natural Product Communications, 2014, 9, 1709-1712. (IF_{2014} = 0,91)

Šafratová, M.; Novák, Z.; Kulhánková, A.; Kuneš, J.; Hrabinová, 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. Natural Product Communications,2014, 9, 787-788 (2014). (IF_{2014} = 0,91)

Havlasová, J.; Šafratová, M.; Siatka, T.; Štěpánková, Š.; Ločárek, M.; Opletal, L.; Hrabinová, M.; Jun, D.; Benešová, N.; Novák, Z.; Kuneš, J.; Cahlíková, L.: Chemical composition of bioactive alkaloid extracts from some *Narcissus* species and varieties and their biological activity. Natural Product Communications, 2014, 9, 1151-1155 (2014). (IF_{2014} = 0,91)

9.2 Konference

9.2.1 Přednášky

Šafratová, M.; Opletal, L.; Benešová, N.; Novák, Z.; Cahlíková, L.: Alkaloids of some *Narcissus* species and their biological activity. Book of abstracts, 4. Postgraduální a 2. postdoktorandská vědecká konference FaF UK, Hradec Králové, ČR, 28.-29.1.2014, 173.

Šafratová, M.; Opletal, L.; Benešová, N.; Novák, Z.; Hrabinová, M.; Cahlíková L.: Alkaloids of some *Narcissus* species and their biological activity. 5. Postgraduální a 3. postdoktorandská vědecká konference FaF UK, Hradec Králové, ČR, 3.-4.2.2015

9.2.2 Plakátové sdělení

Šafratová, M.; Opletal, L.; Benešová, N.; Novák, Z.; Hrabinová, M.; Cahlíková L.: Alkaloids of some *Narcissus* species and their biological aktivity. Natural Product and Drug Discovery – Future Perspectives, Vídeň, Rakousko 13.-15.11.2014.

Šafratová, M.; Hošťálková, A.; Opletal, L.; Kuneš, J.; Hrabinová, M.; Cahlíková L.: Alkaloids of some *Narcissus* species and their biological aktivity. 9th Joint Natural Product Conference 2016, Kodaň, Dánsko 24.-28.7.2016.

10. LITERATURA

1. Opletal L.: Prolegomenon české farmakognozie: 21. století. Česká a Slovenská Farmacie, 2013, 62, 99-102.

2. Bala, K. M.; Sri, P. A.; Shiva, K. R.; Ramu, V.; Satyanarayana, D.; Madhu, P.: Drug interaction: principles, methodology and applications (general aspects). International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, 2011, 2, 1-4.

3. Takos, A. M.; Rook, F.: Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. International Journal of Molecular Sciences 2013, 14, 11713-11741.

4. Hao, B.; Shen, S. F.; Zhao, Q. J.: Cytotoxic and antimalarial Amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of *Lycoris radiata*. Molecules, 2013, 18, 2458-2468.

5. Lamoral-Theys, D.; Andolfi, A.; Van Goietsenoven, G.; Cimmino, A.; Le Calvé, B.; Wauthoz, N.; Mégalizzi, V.; Gras, T.; Bruyère, C.; Dubois, J.; Mathieu, V.; Kornienko, A.; Kiss, R.; Evidente, A.: 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, 2009, 52, 6244-6256.

6. Jin, Z.; Xu, X. H.: Amaryllidaceae alkaloids: *Natural Products* (Ramawat, K. G.; Mérillon, J. M.), Chapter 17, Springer: Berlin Heidelberg 2013, 479-522.

7. Louw, C. A. M.; Regnier, T. J. C.; Korsten, L.: Medicinal bulbous plants of South Africa and their traditional relevance in control infectious diseases. Journal of Ethnophramacology, 2002, 82, 147-154.

8. to, M.; Kawamoto, A.; Kita, Y.; Yukawa, T.; Kurita, S.: Phylogenetic relationship of Amaryllidaceae based on *mat*K sequence data. Journal of Plant Research, 1999, 112, 207-216.

9. Meerow, A. W.; Fay, M. F.; Guy, C. L.; Li, Q.; Zaman, F. Q.; Chase, M. W.: Systematics of Amaryllidaceae base on cladistis analysis of plastid RBCL and TRNL-F sequence data. American Journal of Botany, 1999, 86, 1325-1345.

10. Kops, A.: Flora Batava, 1822, 4(246): http://plantillustrations.org/illustration.php?id_illustration=136238; staženo dne 3. 10. 2016.

11 Kops, A.: Flora Batava, 1822, 1(14): http://plantgenera.org/illustration.php?id_illustration=136006; staženo dne 3. 10. 2016.

12. Kops, A.: Flora Batava, 1822, 9(644): http://plantgenera.org/illustration.php?id_illustration=136636; staženo dne 3. 10. 2016.

13. Kornienko, A.; Evidente, A.: Chemistry, biology and medicinal potential of narciclasine and its congerens. Chemical Reviews, 2008, 108, 1982-2014.

14. Dweck, C. A.: The folklore of *Narcissus. Narcissus* and Daffodils (Gordon R. Hanks), Chapter 2, Medicinal and Aromatic Plants, Taylor and Francis, London and New York, 2002, 21, 19-29.

15. Graham, J. G.; Quinn, M. L.; Fabricant, D. S.; Farnsworth, N. R: Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. Journal of Ethnopharmacology, 2000, 73, 347-377.

16. Caamal-Fuentes, E.; Torress-Tapia, L. W.; Simá-Polanco, P.; Pereza-Sanchéz, S. R.; Moo-Puc, R.: Screening of plants used in Mayen traditional medicine to treat cancer-like symptoms. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 135, 19-24.

17. Nair, J. J.; Staden, J.: Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae. Food and Chemical Toxicology, 2013, 62, 262-275.

18. Dušek, K.; Večeřová-Procházková, A.: Diagnostika a terapie duševních poruch. Praha: Grada Publishing, 2015, 648 s, 471s.

19. Heinrich, M.: Galanthamine from *Galanthus* and other Amaryllidaceae – Chemistry and biology based on traditional use. Alkaloids, 2010, 68, 157-165.

20. Wang, Y. H.; Wan, Q. L.; Gu, C. D.; Luo, H. R.; Long, C. L: Synthesis and biological evaluation of lycorine derivatives as dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Chemistry Central Journal, 2012, 6, 96-101.

21. Pigni, N. B.; Ríos-Ruiz, S.; Luque, F. J.; Viladomat, F.; Codina, C.: Wild daffodils of section Ganymedes from the Iberian Peninsula as a source of mesembrinealkaloids. Phytochemistry, 2013, 95, 384-393.

22. Jin, Z.: Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. Natural Products Reports, 2009, 26, 363-381.

23. Machocho, A. K.; Bastida, J.; Codina, C.; Viladomat, F.; Brun, R.; Chhabra, S. C.: Augustamine type alkaloids from *Crinum kirkii*. Phytochemistry, 2004, 65, 3143-3149.

24. Kitajima, M.; Kinoshita, E.; Kogure, N.; Takayama, H.: Two new alkaloids from bulbs of *Lycoris squamigera.* Heterocycles, 2009, 77, 1389-1396.

25. Nair, J. J.; Campbell, W. E.; Brun, R.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J.: Alkaloids from *Nerine filifolia*. Phytochemistry, 2005, 66, 373-382.

26. Evidente, A.; Andolfi, A.; Abou-Donia, A. H.; Touema, S. M.; Hammoda, H. M.; Shawky, E.; Motta, A.: (-)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. Phytochemistry, 2004, 65, 2113-2118.

27. Koorbanally, N.; Mulholland, D. A.; Crouch, N.: Alkaloids and triterpenoids from *Ammocharis coranica* (Amaryllidaceae). Phytochemistry, 2000, 54, 93-97.

28. Sun, Q.; Shen, Y.; Tian, J.; Tang., Su, J.; Liu, R.; Li, H.; Xu, X.; Zhang, W.: Chemical constituents of *Crinum asiaticum* L. var. s*inicum* Baker and their cytotoxic activities. Chemistry & Biodiversity, 2009, 68, 1751-1757.

29. Rivero, N.; Gomez, M.; Medina, J. D.: Search for bioactive alkaloids in *Hymenocallis* species. Pharmaceutical Biology, 2004, 42, 280-285.

30. Herrera, M. R.; Machocho, A. K.; Nair, J. J.; Campbell, W. E.; Brun, R.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J.: Alkaloids from *Cyranthus elatus.* Fitoterapia, 2001, 72, 444-448.

31. Mroczek, T.; Glowniak, K.: Highly efficient, sensitive and selective molecular screening of acetylcholinesterase inhibitors of natural origin by SPE-LC/ESI-TOF-MS and novel TLC-based bioautography. Planta Medica, 2009, 75, SL64

32. Berkov, S.; Reyes-Chilpa, R.; Codina, C.; Viladomat, F.; Bastida, J.: Revised NMR data for incartine: an alkaloid from *Galanthus elwesii*. Molecules, 2007, 12, 1430-1435.

33. Crouch, N. R.; pohl, T. L.; Mulholland, D. A.; Ndlovu, E.: Alkaloids from three ethnomedicinal *Haemanthus* species: *H. albiflos, H. deformis* and *H. pauculifolius* (Amaryllidaceae). South African Journal of Botany, 2005, 71, 49-52.

34. Yang, Y.; Huang, S. X.; Zhao, Y. M.; Zhao, Q. S.; Sun, H. D.: Alkaloids from the bulbs of *Lycoris aurea*. Helvetica Chimica Acta, 2005, 88, 2550-2553.

35. Cabezas, F.; Ramirez, A.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J.: Alkaloids from *Eucharis amazonica* (Amaryllidaceae). Chemical & Pharmaceutical Bulletine, 2003, 51, 315-317.

36. Toaima, S. M. M.: Alkaloidal constituents of *Pancratium tortuosum*. Alexandria Journal of Pharmaceutical Science, 2007, 21, 63-65.

37. Unver, N.; Noyan, S.; Gozler, T.; Werner, C.; Hesse, M.: Four new Amaryllidaceae alkaloids from *Galanthus plicatus* subsp. *byzanthinus.* Heterocycles, 2001, 55, 641-645.

38. Hohmann, J.; Forgo, P.; Molnar, J.; Wolfard, K.; Thalhammer, T.; Mathe, I.; Sharples, D.; Antiproliferative Amaryllidaceae alkaloids isolated from the bulbs of *Sprekelia formosissima* and *Hymenocallis* x *festalis.* Planta Medica, 2002, 454-457.

39. Berkov, S.; Evstatieva, L.; Popov, S.: Alkaloids from Bulgarian *Pancratium maritimum* L. Zeitschrift für Naturforschung, 2004, 59, 65-69.

40. Ilkay, O.; Bilge, S.: Sustainable use of various Amaryllidaceae plants against Alzheimer´s disease. Acta Horticulture, 2005, 678, 59-64.

41. Brine, N. D.; Campbell, W. E.; Bastida, J.; Herrera, M. R.; Viladomat, F.; Codina, C.; Smith, P. J.: A dinitrogenous alkaloid from *Cyranthus obliquus.* Phytochemistry, 2002, 61, 443-447.

42. Unver, N.; Kaya, I.; Werner, Ch.; Verpoorte, R.; Gözler, B.: Galanthindole: a new indole alkaloid from *Galanthus plicatus* ssp. *byzantinus*. Planta Medica, 2003, 69, 869-871.

43. Torras-Claverua, L.; Berkov, S.; Jauregui, O.; Caujape, J.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J.: Metabolic profiling of bioactive *Pancratium canariense* extracts by GC-MS. Phytochemical Analysis, 2010, 21, 80-88.

44. Berkov, S.; Codina, C.; Viladomat, F.; Bastida, J.: N-Alkylated galanthamine derivatives: potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2008, 18, 2263-2266.

45. Pettit, G: R.; Melody, N.: Antineoplastic agents. 527. Synthesis of 7-deoxynarcistatin, 7-deoxy-trans-dihydronarcistatin, and trans-dihydronarcistatin. Journal of Natural Products, 2005, 68, 207-211.

46. Pettit, G. R.; Meng, Y.; Herald. D. L.; Knight, J. C.; Day, J. F.: Antineoplasticagents. 553. The Texas grasshopper *Brachystola magna.* Journal of Natural Products, 2005, 68, 1256-1258.

47. Elgorashii, E. E.; Drewes, S. E.; Staden, J.: Alkaloids of *Crinum moorei*. Phytochemistry, 2001, 56, 637-640.

48. Cheesman, L; Nair, J. J.; Standen, J.: Antibacterial activity of crinane alkaloids from *Boophane distacha* (Amaryllidaceae). Journal of Ethnopharmacology, 2012, 140, 405-408.

49. Velten, R.; Erdelen C.; Gehling, M.; Gohrt, A.; Gondol, D.; Lenz, J.; Lockhoff, O.; Wachendorff, U.; Wendish, D.: Cripowellin A and B, anovel type of Amaryllidaceae alkaloid from *Crinum powelii*. Tetrahedron Letters, 1998, 39, 1737-1740.

50. Unver, N.; Kaya, G.I.: An unusual pentacyclic dinitrogenous alkaloid from *Galanthus gracilis*. Turkish Journal of Chemistry, 2005, 29, 547-553.

51. Codina, C.; Viladomat, F.; Bastida, J.; Rubiralta, M.; Quirion, J. C.: A heterodimer alkaloid from *Narcissus pallidiflorus.* Phytochemistry, 1990, 29, 2685-2687.

52. Jitsuno, M.; Yokosuka, A.; Hashimoto, K.; Amano, O.; Sakagami, H.; Mimaki. Y.: Chemical constituents of *Lycoris albiflora* and their cytotoxic effects. Natural Product Communications, 2011, 6, 187-192.

53. Bastida, J.; Viladomat, F.; Llabrés, J. M.; Ramiréz, G.; Codina, C.: Narcissus alkaloids VIII. Mesembrenone: an unexpected alkaloid from *Narcissus pallidus.* Journal of Natural Products, 1989, 52, 478-480.

54. Goietsenoven, G.; Andolfi, A.; Lallemand, B.; Cimmino, A.; Lamoral-Theys, D.; Gras, T.; Abou-Donia, A.; Dubois, J.; Lefranc, F.; Mathieu, V.; Kornienko, A.; Kiss, R.; Evidente, A.: Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells. Journal of Natural Products, 2010, 73, 1223-1227.

55. Evidente, A.; Kireev, A. S.; Jenkins, A. R.; Romero, A. E.; Steelant, W. F. A.; Slambrouck, S.; Kornienko, A.: Biological evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: discovery of novel leads for anticancer drug design. Planta Medica, 2009, 75, 501-507.

56. McNulty, J.; Nair, J. J.; Codina, C.; Bastida, J.; Pandey, S.; Gerasimoff, J.; Grifffin, C.: Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type Amaryllidaceae alkaloids. Phytochemistry, 2007, 68, 1068-1074

57. Nair, J. J.; Standen, J.; Bastida J.: Cytotoxic alkaloid constituents of the Amaryllidaceae. Studies in Natural Product Chemistry (Atta-ur-Rahman, ed.), Chapter 3, Elsevier: Amsterdam 2016, 49, 107-156.

58. Raboch, J.: Duševní poruchy, Alzheimerova chorova. Psychiatrie. Praha: Galén, 2001, 149-154.

59. Cahlíková, L.; Macáková, K.; Benešová, N.; Chlebek, J.; Hošťálková, A.; Opletal L.: Natural compounds (Small Molecules) as potential and Real Drugs of Alzheimer´s disease: A Critical Review, in: Studies in Natural Product Chemistry (Atta-ur-Rahman, ed.), Chapter 6, Elsevier: Amsterdam 2014, 42, 153-194.

60. Fjell, A. M.; Walhovd, K. B.: Neuroimaging results impose new views on Alzheimer's disease-the role of amyloid: revised. Molecular Neurobiology, 2012, 45, 153-172.

61. Liu, S. L.; Wang, C.; Jiang, T.; Tan, L.; Xing, A.; Yu, J. T.: The role of CDK-5 in Alzheimer's disease. Molecular Neurobiology, 2016, 53, 4328-4342.

62. Noble, W.; Olm, V.; Takata, K.; Casey, E.; Mary, O.; Mayerson, J.; Gayron, K.; LaFrancois, J.; Wang, L.; Kondo, T.; Davies, P.; Burns, M.; Veerana; Nixon, R.; Dickson, D.; Matsuoka, Y.; Ahlijana, M; Lau, L. F.; Duff, K.: CDK5 is a key factor in Tau aggregation and Tangle formation *in vivo*. Neuron, 2003, 38, 555-565.

63. Medina, M.; Avila, J.: Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors for treatment of Alzheimer´s disease. Current Pharmaceutical Design, 2010, 16, 2790-2798.

64. Ryan, K A.; Pimplikar, S. W.: Activation of GSK-3 and phosphorylation of CRMP2 in transgenic mice expressing APP intracellular domain. Journal of Cell Biology, 2005, 171, 327-335.

65. Jirák, R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. Klinická Farmakologie a Farmacie, 2004, 18, 212-214.

66. Zöeller, B.; Hock, C.; Kull, H.: Rational therapy of Alzheimer's dementia based on current clinical studies. Praxis, 2001, 90, 827-834.

67. Fulton, B.; Benfield, P.: Galanthamin. Drugs Aging, 1996, 9, 60-65.

68. Šrámek, J. J.; Frackiewicz, J. E.; Cutler, R. N.: Review of acetylcholinesterase inhibitor galanthamine. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2000, 9, 2393-2402.

69. Krejčová, G.; Ševelová, L.: Současné poznatky o galanthaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. Vojenské Zdravotnické Listy, 2003, 22, 37-44.

70. 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 bowdeni*. Natural Product Communications, 2011, 6, 1827-1830.

71. Vaněčková, N.; Hošťálková, A.; Šafratová, M.; Kuneš, J.; Hulcová, D.; Hrabinová, M.; Doskočil, I.; Štěpánková, Š.; Opletal, L.; Nováková, L.; Jun, D.; Chlebek, J.; Cahlíková, L.: Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdeni* W. Watson and their biological activities. RSC Advances, 2016, 6, 80114-80120.

72. Abdallah, O. M.: Minor alkaloids from *Lycoris sanguinea*. Phytochemistry, 1995, 39, 477-478.

73. Kobayashi, S.; Satoh, K.; Numsts, A.; Shingu, T.; Kihara, M.: Alkaloid *N*-oxides from *Lycoris sanguinea*. Phytochemistry, 1991, 30, 675-677.

74. López, S.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C.: Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. Life Sciences, 2002, 71, 2521-2529.

75. Reyes-Chilpa, R.; Berkov, S.; Hernandéz-Ortega, S.; Jankowski, Ch. K.; Arsenau, S.; Clotet-Codina, I.; Esté, J. A.; Codina, C.; Viladomat, F.; Bastida, J.: Acetylcholinesterase-inhibiting alklaoids from *Zephyranthes concolor*. Molecules, 2011, 16, 9520-9533.

76. Ding, Y.; Qu, D.; Zhang, K.; Cang, X.; Kou, Z.; Xiao, W.; Zhu, J.: Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. Journal of Asian Natural Product Reasearch, 2016, DOI: 10.1080/10286020.2016.1198332, in press.

77. Elgorashi, E. E.; Stafford, G. I.; Staden, J.: Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. Planta Medica, 2004, 70, 260-262.

78. Cahlíková, L.; Peréz, D. I.; Štěpánková, Š.; Chlebek, J.; Šafratová, M.; Hošťálková, A.; Opletal, L.: In vitro inhibitory effects of 8-*O*-demethylmaritidine and undulatine on acetylcholinesterase and their predicted penetration across blood-brain barrier. Journal of Natural Products, 2015, 78, 1189-1192.

79. Puttonen, K. A.; Lehtonen, S.; Raasmaja, A.; Männistö, P. T.: 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. Toxicology *in Vitro*, 2006, 20, 1446-1454.

80. Dalecká. M.: Vliv vybraných alkaloidů čeledi Amaryllidaceae na viabilitu a indukci apoptózy u nádorových buněčných linií.Univerzita Pardubice, Diplomová práce, 2014, 108 s.

81. Mellor, H. R.; Callaghan, R.: Resistance to chemotherapy in cancer: a complex and integrated cellular response. Pharmacology, 2008, 8, 275-300.

82. Ozben, T.: Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. FEBS Letters, 2006, 580, 2903-2909

83. Dalecká, M.; Havelek, R.; Královec, K.; Brůčková, L.; Cahlíková, L.: Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potencionální léčiva v terapii nádorových onemocnění. Chemické Listy, 2013, 107, 701-708.

84. Bastida, J.; Berkov, S.; Torras, L.; Pigni, L. B.; Andrade, J. P.; Martinez, V.; Codina, C.; Viladomat, F.: Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. Recent Advances in Pharmaceutical Sciences, 2011, 2, 65-100.

85. Hwang, Y. C.; Chu, J. J.; Yang, P. L.; Chen, W.; Yates, M. V.: Rapid identification of inhibitors that interfere with poliovirus replication using a cell-based assay. Antiviral Research, 2008, 77, 232-236.

86. Deng, L.; Dai, P.; Ciro, A.; Smee, D. F.; Djaballah, H.; Shuman, S.: Identification of novel antipoxviral agents: mitoxantrone inhibits vaccinia virus replication by blocking virion assembly. Journal of Virology, 2007, 81, 13392-13402.

87. 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. Oncology Reports, 2007, 17, 377-384.

88. Giudice, L.; Massardo, D. R.; Pontieri, P.; Wolf, K.: Interaction between yeast mitochondrial and nuclear genomes: null allels of RTG genes affect resistance to the alkaloid lycorine in rho0 petites of *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2005, 354, 9-14.

89. Ločárek, M.; Nováková, J.; Klouček, P.; Hošťálková, A.; Kokoška, L.; Gábrlová, L.; Šafratová, M.; Opletal, L.; Cahlíková, L.: Antifungal and antibacterial activity of extracts and alkaloids of selected Amaryllidaceae species. Natural Product Communications, 2015, 10, 1537-1540.

90. Nair, J. J.; Staden, J.: Cytotoxicity studies of lycorine alkaloids of the Amaryllidaceae. Natural Product Communications, 2014, 9, 1193-1210.

91. Jimenez, A.; Santos, A.; Alonso, G.; Vazquez, D.: Inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells. Comparative effects of some Amaryllidaceae alkaloids. Biochimica et Biophysica Acta, 1976, 425, 342-348.

92. Evidente, A.; Kornienko, A.: Anticancer evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives. Phytochemistry Reviews, 2009, 8, 449-459.

93. Thi Ngoc Tram, N.; Titorenkova, T. V.; Bankova, V.; Handjieva, N. V.; Popov, S. S.: *Crinum* L. (Amaryllidaceae). Fitoterapia, 2002, 73, 183-208.

94. Lamoral-Theys, D.; Andolfi, A.; Van Goietsenoven, G.; Cimmino, A.; Le Calvé, B.; Wauthoz, N.; Mégalizzi, V.; Gras, T.; Bruyère, C.; Dubois, J.; Mathieu, V.; Kornienko, A.; Kiss, R.; Evidente, A.: 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, 2009, 52, 6244-6256.

95. Liu, J.; Hu, W. X.; He, L. F.; Ye, M.; Li, Y.: Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis. FEBS Letters, 2004, 578, 245-250.

96. Liu, J.; Li, Y.; Tang, L. J.; Zhang, G. P.; Hu, W. X.: Treatment of lycorine on SCID mice model with human APL cells. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2007, 61, 229-234.

97. Hao, B.; Shen, S. F.; Zhao, Q. J.: Cytotoxic and antimalarial Amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of *Lycoris radiata*. Molecules, 2013, 18, 2458-2468.

98. Cheesman, L; Nair, J. J.; Standen, J.: Antibacterial activity of crinane alkaloids from *Boophone disticha* (Amaryllidaceae). Journal of Ethnopharmacology, 2012, 140, 405-408.

99. Ghosal, S.; Singh, S. K.; Kumar, Y.; Unnikrishnan, S.; Chattopadhyay S.: The role of ungeremine in the growth-inhibiting and cytotoxic effects of lycorine: evidence and speculation. Planta Medica, 1988, 54, 114-116.

100. McLachlan, A.; Kekre, N.; McNulty, J.; Pandey, S.: Pancratistatine: A natural anti-cancer compound that targets mitochondria specifically in cancer cells to induce apoptosis. Apoptosis, 2005, 10, 619-630.

101. Pettit, G. R.; Gaddamidi, V.; Cragg, G. M.; Herald, D. L.; Sagawa, Y.: Isolation and structure of pancratistatine. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1984, 1693-1694.

102. Youssef, D. T.A.: Cytotoxic phenolics from flowers of *Hippeastrum vittatum*. Bulletin of Pharmaceutical Science, 2005, 28, 143-148.

103. Youssef, D. T. A.: Bioactive principles of the flowers of *Pancratium maritimum.* Bulletin of Pharmaceutical Science, 2003, 26, 171-177.

104. Ghavre, M.; Froese, J.; Pour, M.; Hudlický, T.: Synthesis of Amaryllidaceae constituents and unnatural derivatives. Angewandte Chemie, 2016, 55, 5642-5691.

105. Pettit, G. R.; Melody, N.; Herald, D. L.: Antineoplastic agents. 450. Synthesis of (+)-pancratistaine from (+)-narciclasine as relay. Journal of Organic Chemistry, 2001, 66, 2583-2587.

106. Nair, J. J.; Rárová, L.; Strnad, M.; Bastida, J.; Staden, J.: Mechanistic insight to the cytotoxicity of Amaryllidaceae alkaloids. Natural Product Communications, 2015, 10, 171-182.

107. Jin, Z.: Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. Natural Product Report, 2013, 30, 849-868.

108. Dumont, P.; Ingarssia, L.; Rouzeau, S.; Ribaucour, F.;Thomas, S.; Roland, I.; Darro, F.; Lefranc, F.; Kiss, R.: The Amaryllidaceae isocarbostril narciclasine induces apoptosis

by activation of death receptor and/or mitochondrial pathway in cancer cells but not in normal fibroblasts. Neoplasia, 2007, 9, 766-776.

109. Nair, J. J.; Manning, J. C.; Staden, J.: Distichamine, a chemotaxonomic marker for the genus *Boophone* Herb. (Amaryllidaceae). South African Journal of Botany, 2012, 83, 89-91.

110. Doskočil, I.; Hošťálková, A.; Šafratová, M.; Benešová, N.; Havlík, J.; Havelek, R.; Kuneš, J.; Chlebek, J.; Cahlíková L.: Cytotoxic activites of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. Phytochemistry Letters, 2015, 13, 394-398.

111. Goietsenoven, G.; Andolfi, A.; Lallemand, B.; Cimmino, A.; Lamoral-Theys, D.; Gras, T.; Abou-Donia, A.; Dubois, J.; Lefranc, F.; Mathieu, V.; Kornienko, A.; Kiss, R.; Evidente, A.: Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgrounds display activity against apoptosis-resistant cancer cells. Journal of Natural Products, 2010, 73, 1223-1227.

112. Havelek, R.; Seifrtová, M.; Královec, K.; Bručková, 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.

113. Nair, J. J.; Rárová, L.; Strnad, M.; Bastida, J.; Staden, J.: Apoptosis-inducing effects of distichamine and narciprimine, rare alkaloids of the plant family Amaryllidaceae. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012, 26, 6195-6199.

114. Inuzuka, H. C.; Shaik, S.; Onoyama, I.; Gao, D.; Tseng, A.; Mase, R. S.; Zhai, B.; Wan, L.; Gutierrez, A.; Lau, A. W.; Xiao, Y.; Christie, A. L.; Aster, J.; Settleman, J.; Gygi, S. P.; Kung, A. L.; Look, T.; Nakayama, K. I.; DePinho, R. A.; Wei, W.: SCF^{FBW7} regulates cellular apoptosis by targeting MCL-1 for ubiquitylation and destruction. Nature, 2011, 471, 104-109.

115. Silva, A. F. S.; Andrare, J. P.; Machado, K. R. B.; Rocha, A. B.; Apel, M. A; Sobral, M. E. G.; Henriques, A. T.; Zuanazzi, J. A. S.: Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. Phytomedicine, 2008, 15, 882-885.

116. Likhitwitayawuid, K.; Angerhofer, C. K.; Chai, H.; Pezzuto, J. M.; Cordell, A. G.; Ruangrungsi, N.: Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. Journal of Natural Products, 1993, 56, 1331-1338.

117. Nosten, F.; White, N. J.: Artemisinine-based combination treatment of falciparum malaria. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2007, 77, 181-192.

118 Omura, S.; Takayama, H.: New lycorine-type alkaloid from *Lycoris traubii* and evaluation of antitrypanosomal and antimalarial activities of lycorine derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 16, 10182–10189.

119. Machocho, A. K.; Bastida, J.; Codina, C.; Viladomat, F.; Brun, R.; Chhabra, S. C.: Augustamine type alkaloids from *Crinum kirkii*. Phytochemistry, 2004, 65, 3143-3149.

120. Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J.; Mathee, S.; Campbell, W. E.: Further alkaloids from *Brunsvigia josephiane*. Phytochemistry, 1995, 40, 961-965.

121. Jíra, J.; Vařeka, I.: Lékařská protozoologie: protozoální nemoci. Galén: Praha 2001, 567.

122. Osorio, E. J.; Berkov, S.; Brun, R.; Codina, C.; Viladomat, F.; Cabezas, F.; Bastida, J.: *In vitro* antiprotozoal activity of alkaloids from *Phaedranassa dubia* (Amarylliadaceae). Phytochemistry Letters, 2010, 3, 161-163.

123. Pryce, Ch.; Feldon, J.: Long-term neurobehavioral impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. Neuroscience and Behavioral Reviews, 2003, 27, 57-71.

124. Silva, A. F. S.; Andrade, J. P.; Bevilaqua, L, R. M.; Souza, M. M.; Izquierdo, I.; Henriques, A. T.; Zuanazzi, J. A. S.: Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid monatanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. Pharmacology, Biochemistry and Behaviour, 2006, 85, 148-154.

125. Maclef, A.: Atlas des Plantes de France 1891, 3(334): http://plantgenera.org/illustration.php?id_illustration=266848; dne 3. 10. 2016.

126. Fernandes, A.: Keys to the identification of native and naturalized taxa of the genus *Narcissus* L. Daffodil and Tulip Year Book, The Royal Horticultural Society: London 1968, 37-66.

127. Graham, S. W.; Barrett, S. C. H.: Phylogenetic reconstruction of the evolution of stylar polymorphism in *Narcissus* (Amaryllidaceae). American Journal of Botany, 2004, 91, 1007-1021.

128. Boit, H. G.; Döpke, W.: Alkaloide von *Chlidanthus fragrans, Vallota purpurea, Nerine undulata* und *Hippeastrum vitatum (*XI. Mitteil. Über Amaryllidaceen-alkaloide). European Journal of Inorganic Chemistry, 1956, 89, 1129-1134.

129. Boit, H. G.; Döpke, W.: Alkaloide von *Narcissus tazetta* und *N. poeticus* (XII. Über Amaryllidaceen-alkaloide). Chemische Berichte, 1956, 89, 2462-2465.

130. Boit, H. G.: Über die alkaloide von *Leucojum vernum* und von *Narcissus poeticus* var. ornatus (II. Über Amaryllidaceen-alkaloide) Chemische Berichte, 1954, 87, 681-683.

131. Piozzi, F.; Marino, M. L.; Fuganti, C.; Martino, A.: Occurrence of non-basic metabolites in Amaryllidaceae. Phytochemistry, 1969, 8, 1745-1748.

132. Boit, H. G.; Döpke, W.; Beitner, A.: Alkaloide aus Trompeten-Tarcissen, Schalen-Narcissen, und gefüllten Narcissen. Chemische Berichte, 1957, 90, 2197-2202.

133. Československý lékopis, díl I., vyd. 3., Avicenum: Praha 1971.

134 Opletal, L.; Ločárek, M.; Fraňková, A.; Chlebek, J.; Šmíd, J.; Hošťálková, A.; Šafratová, M.; Hulcová, D.; Klouček, P.; Rozkot, M.; Cahlíková, L.: Antimicrobial activity of extracts

and isoquinoline alkaloids of selected Papaveraceae plants. Natural Product Communications, 2014, 9, 1709-1712.

135. Jegorov, A.; Buchta, M.; Sedmera, P.; Kuzma, M.; Havlíček, V.: Accurate product ion mass spectra of galanthamine derivatives. Journal of Mass Spectrometry, 2006, 41, 544-548.

136. Huang, S.; Zhang,Y.; He, H.; Li, S.; Tang, G.; Chen, D.; Cao, M.; Di, Y.; Hao.: A new Amaryllidaceae alkaloid from bulbs of *Lycoris radiata.* Chinese Journal of Natural Medicines, 2003, 11, 406-410.

137. Pigni, N.B.; Ríos-Ruiz, S.; Martiínez-Francés, V.; Nair, J.J.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J.: Alkaloids from *Narcissu serotinus*. Journal of Natural Products, 2012, 75, 1643-1647.

138. Chen, J.; Xie, J.; Bao, D.; Liu, S.; Zhou, Q.: Total synthesis of (-)-galanthamin and (-)-lycoramin via catalytic asymetric hydrogenation and intramolecular reductive heck cyclization. Organic Letters, 2012, 14, 2714-2717.

139. Jeffs, P. W.; Abou-Donia, A.; Campau, D: Structures of 9-*O*-Demethylhomolycorine and 5α-Hydroxyhomolycorine. Alkaloids of *Crinum defixum, C. scabrum,* and *C. latifolium.* Assignment of aromatic substitution patterns from ^{1}H-coupled ^{13}C spectra. The Journal of Organic Chemistry, 1985, 50, 1732-1737.

140. Kogure, N.; Katsuta, N.; Kitajima, M.; Takayama, H.: Two new alkaloids from *Crinum asiaticum* var. *sinicum*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2011, 59, 1545-1548.

141. Bastida, J.; Lavilla, R.; Viladomat, F.: The Alkaloids: Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. Chapter 3, The Alkaloids: Chemistry and Biology, Elsevier: Amsterdam 2006, 63, 87-179.

142. Gordon, R. H.: *Narcissus* and Daffodils. Taylor and Francis: London and New York, 2002, 21, 452.

143. Andrare, J. P.; Guo, Y.; Font-Bardia, M.; Calvet, T.; Dutilh, J.; Viladomat, F.; Codina, C.; Nair, J. J.; Zuanazzi, J. A. S:; Bastida, J.: Crinine- type alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calytratum.* Phytochemistry, 2014, 103, 188-195.

144. Wu, W. M.; Zhu, Y. Y.; Li, H. R.; Yu, H. Y.; Zhang, P.; Pi, H. F.; Ruan, H. L.: Two new alkaloids from the bulbs of *Lycoris sprengeri*. Journal of Asian Natural Products Research. 2014, 16, 192-199.

145. Guo, Y.; Andrare, J. P.; Pigni, N. B.; Torras-Claveria, L.; Tallini, L. R.; Borges, W. S.; Viladomat, F.; Nair, J. J.; Zuanazzi. A. S.; Bastida, J.: New alkaloid from *Hippeastrum papilio* (Ravenna) van Scheepen. Helvetica Chimica Acta, 2016, 99, 143-147.

146 Kihara, M.; Xu, L.; Konishi, K.; Nagao, Y.; Kobayashi, S.; Shingu, T.: Isolation and structure elucidation of novel alkaloid, incartine, a supposed biosynthetic intermediate, from flowers of *Lycoris incarnata*. Chemical ans Pharmaceutical Bulletin, 1994, 42, 289-292.

147 Boit, H. G.; Döpke, W.: Isolierung aus zwibeln von Nerine masonorum. Naturwissenschaften, 1958, 45,85.

148. Iannello, C.; Bastida, J.; Bonvicini, F.; Antognoni, F.; Gentilomi, G. A.; Poli, F.: Chemical composition, and in vitro antibacterial and antifungal aktivity of an alkaloid extract from Crinum angustum Steud. Natural Product Research, 2014, 28, 704-710.

149 Rossner, S.; Schulz, I.; Zeitschel, U.; Schliebs, R.; Bigl, V.; Demuth, H. U.: Brain prolyl endopeptidase expression in aging, APP transgenic mice and Alzheimer‘s disease. Neurochemical Research, 2005, 30(6-7), 695-702.