

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

RIGORÓZNÍ PRÁCE

**Biologicky aktivní metabolity rostlin VIII.
Alkaloidy *Fumaria officinalis* L. a jejich biologická aktivita**



Vedoucí katedry: Prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

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

.

Cheb, duben 2021

Mgr. Marta Mazel Tonarová

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY

RIGOROSUM THESIS

Biologically active metabolites of plants VIII.
Alkaloids of *Fumaria officinalis* L. and their biological activity



Head of the department: Prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Supervisor of the rigorosum thesis: Prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Cheb, April 2021

Mgr. Marta Mazel Tonarová

PROHLÁŠENÍ

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

Cheb, duben 2021

.....
Mgr. Marta Mazel Tonarová

Děkuji prof. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za odborné vedení mé rigorózní práce, cenné rady a připomínky k teoretické i experimentální části práce a všem pracovníkům Katedry farmaceutické botaniky za vytvoření dobrých pracovních podmínek, zejména pak za podporu v laboratoři PharmDr. Jakubu Chlebkovi, Ph.D. a PharmDr. Anně Hošťálkové, Ph.D. Dále pak děkuji doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. z Katedry anorganické a organické chemie za vypracování a interpretaci NMR spekter a Mgr. Martině Hrabínové z Katedry toxikologie a vojenské farmacie Univerzity obrany za změření a interpretaci inhibičních aktivit.

OBSAH

PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK	9
1 ÚVOD	10
2 CÍL PRÁCE	12
3 TEORETICKÁ ČÁST	13
3.1 Demence	13
3.2 Alzheimerova choroba	14
3.2.1 Etiologie	15
3.2.2 Klinický obraz	15
3.2.3 Rizikové faktory	16
3.2.4 Diagnostika.....	17
3.2.5 Farmakoterapie.....	17
3.2.5.1 Inhibitory acetylcholinesterázy (iAChE)	18
3.2.5.1.1 Donepezil.....	18
3.2.5.1.2 Rivastigmin.....	18
3.2.5.1.3 Galantamin.....	18
3.2.5.2 Inhibitory <i>N</i> -methyl-D-aspartátových receptorů (iNMDA).....	19
3.2.5.2.1 Memantin.....	19
3.2.6 Látky přírodního původu vykazující terapeutický potenciál.....	20
3.2.6.1 Galantamin	20
3.2.6.2 Huperzin A	20
3.2.6.3 <i>Ginkgo biloba</i>	20
3.2.6.4 Další látky	21
3.2.7 Výzkum nových léčiv.....	21
3.3 <i>Fumaria officinalis</i> L.	22
3.3.1 Taxonomické zařazení <i>Fumaria officinalis</i>	22
3.3.2 Charakteristika rodu <i>Fumaria</i>	23
3.3.2.1 Morfologický popis <i>Fumaria officinalis</i>	23
3.3.2.2 Rozšíření a výskyt <i>Fumaria officinalis</i>	24
3.3.2.3 Tradiční využití <i>Fumariae herba</i>	25
3.3.2.4 Studované biologické aktivity extraktu <i>Fumaria officinalis</i>	26

Hepatoprotektivní aktivita.....	26
Hypoglykemická aktivita	26
Antibakteriální aktivita.....	26
Dermatologická aplikace.....	26
Vliv na nervový systém.....	26
Antioxidační efekt.....	26
Poruchy žlučových cest.....	26
Efekt na kardiovaskulární systém	27
3.3.3 Obsahové látky rodu <i>Fumaria</i>	27
3.3.3.1 Alkaloidy a jejich biologické účinky	27
3.3.3.1.1 Protopinové alkaloidy.....	27
3.3.3.1.2 Protoberberinové alkaloidy.....	29
3.3.3.1.3 Benzyliisochinolinové alkaloidy	31
3.3.3.1.4 Spirobenzyliisochinolinové alkaloidy	31
3.3.3.1.5 Ftalidisochinolinové alkaloidy	34
3.3.3.1.6 Sekoftalidisochinolinové alkaloidy	36
3.3.3.1.7 Indenobenzazepinové alkaloidy	37
3.3.3.1.8 Benzofenantridinové alkaloidy.....	37
3.3.3.1.9 Aporfinové alkaloidy	38
3.3.3.2 Ostatní obsahové látky	39
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
4.1 Všeobecné postupy práce.....	40
4.1.1 Příprava a čištění rozpouštědel.....	40
4.1.2 Odpařování rozpouštědel, uchování extraktů.....	40
4.1.3 Sušení a skladování frakcí, izolovaných čistých alkaloidů	40
4.1.4 Preparativní TLC.....	40
4.1.5 GC-MS analýza.....	40
4.1.6 NMR analýza.....	41
4.1.7 Optická otáčivost.....	41
4.1.8 Teplota tání.....	41
4.2 Materiál a vybavení.....	41
4.2.1 Materiál a vybavení pro izolaci.....	41
4.2.1.1 Rozpouštědla	41

4.2.1.2	Ostatní chemikálie.....	42
4.2.1.3	Detekční činidla.....	42
4.2.1.4	Vyvíjecí soustavy pro TLC	42
4.2.1.5	Chromatografické adsorbenty	42
4.2.1.6	Přístrojové vybavení.....	42
4.2.1.7	Rostlinný materiál	43
4.2.2	Materiál a vybavení pro stanovení biologické aktivity	43
4.2.2.1	Chemikálie	43
4.2.2.2	Pufry	43
4.2.2.3	Přístrojové vybavení.....	43
4.2.2.4	Biologický materiál	43
4.3	Izolace alkaloidů.....	44
4.3.1	Příprava sumárního alkaloidního extraktu	44
4.3.2	Sloupcová chromatografie.....	44
4.3.3	Zpracování frakce 138-178	46
4.4	Stanovení inhibičních aktivit izolovaných alkaloidů vůči cholinesterázám.....	48
4.4.1	Podmínky měření	48
4.4.2	Příprava erytrocytárních pouzder	48
4.4.3	Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (hodnoty IC ₅₀).....	49
4.5	Stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči prolyloligopeptidáze.....	49
4.5.1	Podmínky měření	49
4.5.2	Stanovení prolyloligopeptidázové inhibiční aktivity (hodnoty IC ₅₀).....	49
5	VÝSLEDKY	50
5.1	Strukturní analýza (-)-fumaritinu	50
5.1.1	MS studie (-)-fumaritinu	50
5.1.2	NMR studie (-)-fumaritinu	50
5.1.2.1	¹ H NMR studie (-)-fumaritinu.....	50
5.1.2.2	¹³ C NMR studie (-)-fumaritinu.....	50
5.1.3	Specifická optická otáčivost (-)-fumaritinu.....	50
5.1.4	Teplota tání (-)-fumaritinu	51
5.2	Strukturní analýza (+)-parfuminu.....	51
5.2.1	MS studie (+)-parfuminu.....	51
5.2.2	NMR studie (+)-parfuminu	51

5.2.2.1	¹ H NMR studie (+)-parfuminu	51
5.2.2.2	¹³ C NMR studie (+)-parfuminu	51
5.2.3	Specifická optická otáčivost (+)-parfuminu	51
5.2.4	Teplota tání (+)-parfuminu	52
5.3	Inhibiční aktivity	52
6	DISKUSE.....	53
	ABSTRAKT	55
	ABSTRACT	56
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	57

PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK

ATC	anatomicko-terapeuticko-chemická klasifikace léčiv
CNS	centrální nervová soustava
CT	počítačový tomograf
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
EEG	elektroencefalografie
FaF UK HK	Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
GABA	gama-aminomáselná kyselina
GDS	global deterioration scale, škála globální deteriorace
GSK-3 β	glykogensynthasa kinasa-3 β
HIV	Human Immunodeficiency Virus
iAChE	inhibitory acetylcholinesterázy
iBuChE	inhibitory butyrylcholinesterázy
iPOP	inhibitory prolyloligopeptidázy
LMTM	leukomethylthioninbishydromethansulfonát
MINCDS-ADRA	National Institute of Neurologic, Communicative Disorders and Stroke- Alzheimer's disease and Related Disorders
NIST	National Institute for Standards and Technology
MMSE	minimal state examination, test kognitivních funkcí
MR	magnetická resonance
MS	hmotnostní spektrometrie
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NMR	nukleární magnetická rezonance
POP	prolyloligopeptidáza
TAU	tubulin-associated unit
TLC	tenkovrstvá kapalinová chromatografie
TSH	thyreotropin

1 ÚVOD

Vědecké a technické objevy nedávné i nynější doby přináší řadu pokroků v medicíně a bezesporu tak mají významný vliv na prodloužení lidských životů. Průměrný věk lidstva, zejména v rozvinutých státech, tak stále stoupá. Tento veskrze pozitivní jev však s sebou přináší i nepopíratelná rizika. Dříve obávané, neléčitelné infekce už dávno nejsou v populaci hlavní příčinnou úmrtí. S vyšším věkem pacientů souvisí rozvoj řady komplikovanějších onemocnění, ať už se jedná o postižení kardiovaskulárního systému, pohybového aparátu nebo tvorbu zhoubných nádorů.

Rozsáhlou kapitolu nemocí souvisejících s vyšším věkem tvoří i tzv. neurodegenerativní onemocnění. Jedná se o neléčitelné stavy, vedoucí k poškození až úplnému zániku nervových buněk – neuronů. Zejména demence představují významného zástupce takto vzniklých onemocnění.

K nejčastěji se vyskytujícím, a tudíž i nejnámějším postižením typu demence patří Alzheimerova choroba [1], která tvoří více než polovinu všech diagnostikovaných případů. Její rozšíření roste se stoupajícím věkem pacientů, zejména pak od 65 let výše. Uvádí se, že v roce 2010 bylo touto nemocí celosvětově postiženo na 35 milionů lidí, z toho 10 milionů Evropanů [2]. Závažnost tohoto onemocnění nespočívá pouze v postupné ztrátě kognitivních a nekognitivních funkcí nemocného, ale i v zátěži, kterou nakonec nesoběstačnost nemocného přináší jeho okolí, na něž je plně odkázán. Terapie Alzheimerovy choroby představuje i problém pro systém veřejného zdravotního pojištění, jedná se totiž o jednu z finančně nejnákladnějších nemocí [3].

Vzhledem k tomu, že samotná příčina onemocnění není doposud plně objasněna, neexistuje v současnosti ani žádný kauzální lék proti Alzheimerově chorobě. Terapie se zaměřuje zejména na zpomalení progresu, a to právě s ohledem na posílení kognitivních funkcí pacienta. Vychází se především z poznatku, že během onemocnění dochází k deficitu neurotransmiteru acetylcholinu. Právě jeho úbytek zapříčiňuje pokles pozornosti, schopnosti zpracovávat získané informace i poruchy chování pacienta.

Na odbourávání acetylcholinu se v těle podílí enzymy acetylcholin- a butyrylcholinesteráza. K účinným inhibitorům těchto enzymů patří donepezil, rivastigmin a galantamin, léčiva, která se používají při terapii mírných a středně těžkých stádií Alzheimerovy choroby.

Mezi vysoce potenciální sekundární metabolity, izolované a zkoumané v posledních letech, které by se mohly uplatnit v terapii Alzheimerovy choroby, lze počítat isochinolinové alkaloidy čeledi *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, *Fumariaceae*, *Amaryllidaceae*, *Berberidaceae* a dalších.

Předmětem této práce byla izolace alkaloidů z druhu *Fumaria officinalis*, česky zemědělný lékařský, a studium jejich inhibičního potenciálu vůči enzymům, které se uplatňují v terapii Alzheimerovy choroby.

2 CÍL PRÁCE

Cílem rigorózní práce bylo:

1. Chromatografické zpracování jedné frakce alkaloidního extraktu *Fumaria officinalis* za účelem izolace alespoň jednoho alkaloidu v čisté formě.
2. Stanovení struktury izolované látky MS a NMR analýzou, dále stanovení jejích základních fyzikálně-chemických charakteristik.
3. Příprava vzorků pro stanovení biologické aktivity izolovaných látek.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Demence

Demenci jako nozologickou jednotku představuje skupina onemocnění, která jsou charakterizována globálním úbytkem intelektových schopností, poruchami osobnosti, chování, společenského začlenění a pracovních aktivit [4]. Toto onemocnění mozku je většinou chronické nebo progradující a projevuje se skrze:

- pokles funkceschopnosti paměti, nejprve při záznamu a reprodukci nových informací (krátkodobá paměť), později ztrátou dříve získaných a důvěrných skutečností (dlouhodobá paměť),
- poruchy myšlenkových schopností, jako jsou např. zpracování informací, schopnost úsudku a rozhodování, tok myšlenek, počítání, vyjadřovací schopnost,
- poruchy časové a prostorové orientace,
- poruchy emoční kontroly, jako je např. porucha sociálního počínání se zvýšenou podrážděností a důrazem na svou osobu, stejně jako tělesné zpomalení kvůli poklesu vnějších podnětů a depresivní rozladění [5].

V rámci klasifikace demencí se objevuje vícero možných kritérií. Některé prameny uvádějí třídění podle lokalizace postižení, další pracují s možnými příčinami, klinickým obrazem nebo různými laboratorními i instrumentálními vyšetřeními.

Podle lokalizace postižení CNS klasifikujeme demence na:

- kortikální demence – zde jsou různým rozsahem a kombinacemi postiženy korové symbolické funkce, zásah frontotemporální oblasti je typický např. u Pickovy choroby a Jakobovy-Creutzfeldovy nemoci, změny v parietotemporální oblasti pak např. u Alzheimerovy nemoci,
- subkortikální demence – zde převažuje postižení bílé hmoty a bazálních ganglií, příkladem je Parkinsonova nemoc, demence s Lewyho tělísky, Huntingtonova nemoc, vaskulární demence při onemocnění malých cév a toxická demence,
- smíšené demence – kombinují se oba typy postižení [4].

Na základě anamnézy, klinického obrazu, pomocných paraklinických vyšetření a platných diagnostických kritérií vzniklo následující dělení demencí:

1. primární degenerativní demence:
 - frontotemporální převaha – tzn. „Pickův komplex“,
 - parietotemporální převaha – Alzheimerova choroba,
2. vaskulární demence:
 - multiinfarktová demence (MID),
 - strategicky umístěné infarkty,
 - onemocnění malých cév s demencí,
 - ischemicko-hypoxická demence,
 - hemorhagická demence,
 - jiné mechanismy, kombinace,
3. sekundární demence:
 - normotenzní hydrocefalus,
 - metabolické poruchy,
 - poruchy výživy,
 - intoxikace,
 - záněty CNS,
 - nádory mozku,
 - úrazy,
4. ostatní – kombinace několika onemocnění způsobujících demenci [6].

Při stanování, zda jde o demenci, případně i o jaký typ demence, je zejména důležité vyloučit možnost deliria, deprese a lékem navozeného stavu připomínající symptomy demenci. V další fázi je třeba vyhodnotit kognitivní deficit – běžným kritériem je test MMSE, eventuálně přihlédnutí ke škále GDS. Následuje určení pravděpodobné diagnózy, tedy typu demence, a to již s výše zmíněným ohledem na samotnou anamnézu, klinický obraz a výsledky vyšetření.

3.2 Alzheimerova choroba

Nejčastější demencí vůbec je Alzheimerova choroba, jak bylo prokázáno řadou studií, u nichž byla diagnóza postižených post mortem verifikována histologicky. Alzheimerovských demencí je minimálně 50 %. Alzheimerova choroba je dělena podle doby objevení prvních příznaků na formu s časným začátkem (do 65 let) a s pozdním začátkem (65 let a výše) [7].

3.2.1 Etiologie

Přesná příčina tohoto onemocnění není známa, což také komplikuje případnou kauzální léčbu. Stejně jako u dalších neurodegenerativních chorob dochází i u Alzheimerovy choroby k poničení a tvorbě patologických proteinů v mozku.

Zjednodušeně lze abnormální děj v CNS u Alzheimerovy choroby shrnout do tří základních oblastí: extracelulárně vznikající senilní plaky, intracelulárně se objevující neuronální klubka a zároveň dochází k úbytku neuronů.

Hlavní roli v celém procesu hraje tzv. beta-amyloid, jedná se o přirozeně se vyskytující dlouhý neuronální transmembránově uložený peptid. Amyloidní prekursorový protein je za normálních podmínek štěpen enzymem alfa-sekretázou na krátké plně solubilní fragmenty, nazývané beta-peptidy. U Alzheimerovy choroby se však uplatňují enzymy beta- a gama-sekretáza, štěpící následně delší fragmenty beta-peptidu o 42 a více aminokyselinách. Takto vzniklý typ beta-peptidu napřed oligomeruje – spojují se dvě částice mezi sebou. Následně pak dochází ke koagulaci těchto peptidů v extracelulárním prostoru mozkové kůry, částice peptidu polymerují, čímž dochází k syntéze patologického proteinu beta-amyloidu. Ten pak tvoří základ ložisek neurodegenerace – plak. V důsledku toxicity beta-amyloidu pak dochází k aktivaci některých proteinkináz (např. GSK-3 β) a k degradaci intraneuronálního tau proteinu. V důsledku popsaných pochodů dochází k tvorbě tzv. neurofibrilárních tangles (uzlíčků, košíčků), a takto postižené neurony pak podléhají apoptóze [1].

U Alzheimerovy choroby je přerušena především presynaptická část acetylcholinergního neuronu. Je snížena aktivita enzymu cholinacetyltransferázy (CAT), syntetizujícího acetylcholin z cholinu a z acetylkoenzymu A. Po uvolnění z vazby na receptory je acetylcholin odbouráván enzymy acetylcholinesterázami, a u Alzheimerovy choroby i butyrylcholinesterázami [8].

Poruchy neurotransmise v mozku pacienta s Alzheimerovou chorobou lze v bodech shrnout tak, že dochází k degradaci neuronů v nucleus basalis Meynerti, k poklesu celkového množství acetylcholinu, samotné korové acetylcholinesterázy a cholinacetyltransferázy. Dále pak k zvýšení butyrylcholinesterázy a ke ztrátě acetylcholinových receptorů N a M2 (nikotinových a muskarinových) [6].

3.2.2 Klinický obraz

Jednotlivé příznaky Alzheimerovy choroby se objevují velmi pomalu, postupně. Zpočátku je obtížné rozlišit mezi projevem normálního stárnutí a nastupující nemoci. Samotné preklinické

období do nástupu prvních klinických příznaků bývá poměrně dlouhé, odhaduje se na jeden až dva roky.

Celkově lze projevy rozdělit do několika oblastí:

- poruchy kognitivních funkcí – paměť, pozornost, vnímání, intelekt,
- poruchy aktivit denního života – schopnost naplánovat aktivity, být motivován, provést je a zpětně zhodnotit,
- behaviorální a psychologické příznaky – poruchy chování, neklid, deprese, úzkost, poruchy spánku,
- postižení hybnosti, motoriky.

Klinický obraz je typický i pro jednotlivá stádia Alzheimerovy choroby.

- V lehkém stádiu nemoci jsou v popředí poruchy kognitivních funkcí. Postižení si uvědomují poruchy paměti. Co se týče běžných denních aktivit, neschopnost vykonávat je jen u těch složitějších. Typická bývá i deprese.
- Ve středním stádiu nemoci progredují poruchy kognitivních funkcí, postižení si neuvědomují, jak moc je choroba ovlivňuje. Objevují se problémy s běžnými denními činnostmi – např. telefonováním, nakládáním s penězi apod. Nastupují behaviorální a psychologické příznaky včetně poruch chování.
- V těžkém stádiu nemoci jsou kognitivní funkce narušeny natolik, že postižení nepoznávají své okolí, příbuzné, jsou místně i časově dezorientovaní. Nemocní jsou plně odkázáni na péči okolí. Poruchy chování vystupují do popředí, často se stávají nejobtížnějším příznakem [9].

Alzheimerova choroba trvá od objevení se prvních příznaků do exitu v průměru sedm až deset let. Někdy postižení přežívají i déle než patnáct let, jindy umírají dříve – i do tří let po objevení se příznaků [1].

3.2.3 Rizikové faktory

Mezi rizikové faktory Alzheimerovy choroby řadíme:

- Věk. Ve skupině lidí 65 let a více je postiženo zhruba 10 % jedinců, nad 85 let se pak Alzheimerova choroba vyskytuje u zhruba poloviny jedinců.
- Pohlaví. Ženy jsou postiženy častěji než muži.
- Familiární agregace. Jedná se o kombinaci vlivů genetiky a zevního prostředí.
- Genové mutace a nosičství alely ϵ -4 genu pro apolipoprotein E.

- K dalším rizikovým faktorům řadíme např. poranění hlavy, nižší úroveň dosaženého vzdělání a kuřáctví [10].

3.2.4 Diagnostika

V roce 2011 byla pravidla pro diagnostiku Alzheimerovy choroby revidována. Důraz je nově kladen na včasné rozpoznání, nejlépe ještě před vznikem demence, případně v preklinické fázi onemocnění [11]. K určení Alzheimerovy choroby se využívají kritéria tzn. MINCDS- ADRDA a DSM-IV. Na jejich základě je vyhodnocena diagnóza pravděpodobné (*probable*), možné (*possible*) a jisté (*definite*) Alzheimerovy choroby. Definitivní diagnózu umožňuje až histologický nálezn. Pravděpodobná diagnóza je přiřazována onemocnění s typickými klinickými příznaky. Možná diagnóza slouží pro případy s atypickými příznaky nebo pacienty s přidruženými systémovými chorobami [9].

Podle platných českých a evropských doporučení je v diagnostice Alzheimerovy choroby potřeba se vždy zaměřit na:

- anamnézu, aktivity denního života, vyšetření poruch chování a nálady,
- komplexní nebo screeningové neuropsychologické vyšetření,
- neurologické vyšetření,
- zobrazovací metody CT/MR mozku k vyloučení léčitelné příčiny demence,
- základní laboratorní vyšetření krve (TSH).

Pouze ve zvláštních případech je potřeba doplnit EEG (atypické případy, podezření na epilepsii nebo prionová onemocnění), podrobnější laboratorní rozbory (vitamin B12, folát, serologie lues, boreliózy a HIV), případně ještě vyšetření mozkomíšního moku (podezření na zánět případně prionové onemocnění CNS) a diagnostiku tripletu (tau, fosfotau, beta-amyloid) [10].

3.2.5 Farmakoterapie

Cílem léčby je zlepšit nebo alespoň stabilizovat kognitivní poruchy způsobené Alzheimerovou chorobou. Léčiva se i proto nazývají kognitiva. V rámci ATC klasifikace jsou k nalezení pod označením antidemencia [4]. V současné době jsou pro farmakoterapii Alzheimerovy choroby schváleny dva typy léků – inhibitory acetylcholinesterázy a nekompetitivní antagonisté glutamátových receptorů [2].

3.2.5.1 Inhibitory acetylcholinesterázy (iAChE)

Mechanismem účinku léčiv této skupiny je blokáda enzymu acetylcholinesterázy a u Alzheimerovy choroby oproti normálním stavům i patologicky zmnožené butyrylcholinesterázy, čímž je způsoben pokles odbourávání acetylcholinu v synaptické štěrbině.

V praxi se objevují tři zástupci účinných látek, a to donepezil, rivastigmin a galantamin. Liší se svým profilem – afinitou k cholinesterázám, farmakodynamickými i farmakokinetickými vlastnostmi. Všechny jsou však indikovány zejména k terapii lehkého a středně těžkého stádia Alzheimerovy choroby.

Před nasazením je potřeba jednak vyhodnocení MMSE, kde skóre musí být mezi 25 až 13 body, dále i vyhodnocení potenciálního rizika. Opatrnosti je třeba dbát u pacientů s astma bronchiale, chronickou obstrukční plicní nemocí, vředovou chorobou, epilepsií, obstrukcí močových cest, poruchou síňokomorových převodů a u pacientů užívajících betablokátory [12].

3.2.5.1.1 Donepezil

Rivastigmin strukturou patří mezi piperidiny. Funguje jako selektivní reverzibilní inhibitor acetylcholinesterázy. Ovlivňuje také nikotinové receptory pro acetylcholin. Má dlouhý poločas eliminace, zhruba 70 hodin. Jeho metabolismus probíhá na cytochromu P450, isoformách 2D6 a 3A4. Velkým uživatelským přínosem je možnost podávání jednou za den a zpravidla velmi dobrá tolerance s nízkými nežádoucími účinky [3, 6].

3.2.5.1.2 Rivastigmin

Po chemické stránce karbamát, jehož mechanismus účinku tkví v pseudoireverzibilní inhibici jak acetylcholinesteráz, tak butyrylcholinesteráz. Díky tomu vykazuje více nežádoucích gastrointestinálních účinků, které však nejsou závažné a často pouze přechodné. Eliminační poločas má 12 hodin. Výhodou je, že není metabolizován na cytochromu P450, tudíž vykazuje skoro nulové lékové interakce. Pro uživatele je atraktivní tím, že existuje nejen v perorální formě, ale i jako transdermální náplast [6, 3].

3.2.5.1.3 Galantamin

Jedná se o alkaloid prvně izolovaný z cibulek *Galanthus woronowii* Losinsk. Do cholinergního systému zasahuje reverzibilní inhibicí acetylcholinesterázy a také alosterickou modulací nikotinových receptorů. Má kratší poločas, proto se využívá i lékových forem s prodlouženým uvolňováním. V jeho odbourávání hrají roli isoformy 2D6 a 3A4 cytochromu P450. Obvykle je dobře snášen, nežádoucích účinků má málo [6, 8, 5].

3.2.5.2 Inhibitory *N*-methyl-D-aspartátových receptorů (iNMDA)

V pozdějších stádiích Alzheimerovy choroby dochází k excitotoxicitě. Tento jev spočívá v tom, že jsou nadměrným uvolňováním excitačních kyselin glutamátu a aspartátu hyperaktivovány NMDA receptory, což umožňuje zvýšenou penetraci vápníkových iontů do neuronů, čímž přes aktivaci některých enzymů, změnu struktur proteinkináz a zvýšenou expresi některých genů dochází až k jejich apoptóze [2, 3].

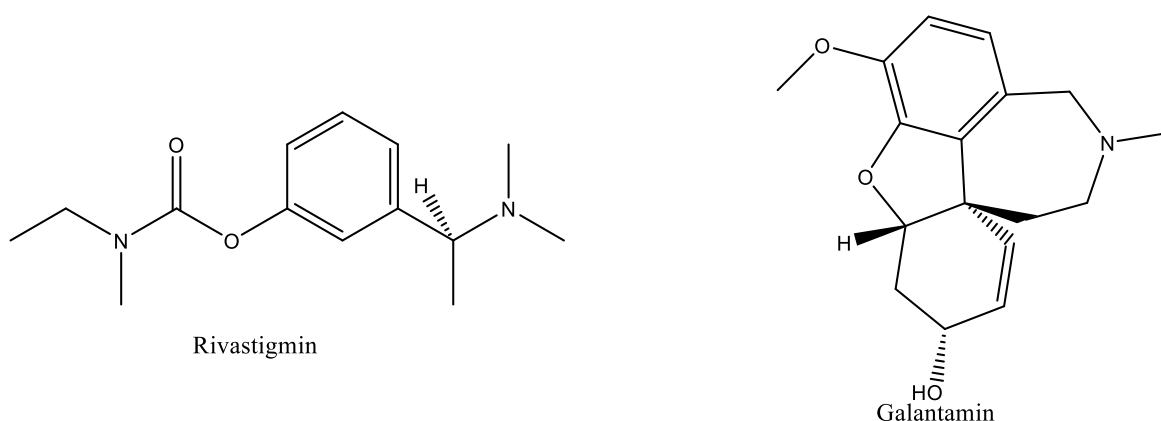
Jediným v praxi používaným zástupcem této skupiny je memantin. Rezervován je zejména pro pacienty se střední (konkrétně pak pro ty s nesnášenlivostí nebo kontraindikací iAChE) a těžkou formou Alzheimerovy choroby. Indikován je v případě MMSE v rozmezí 17 až 6 bodů.

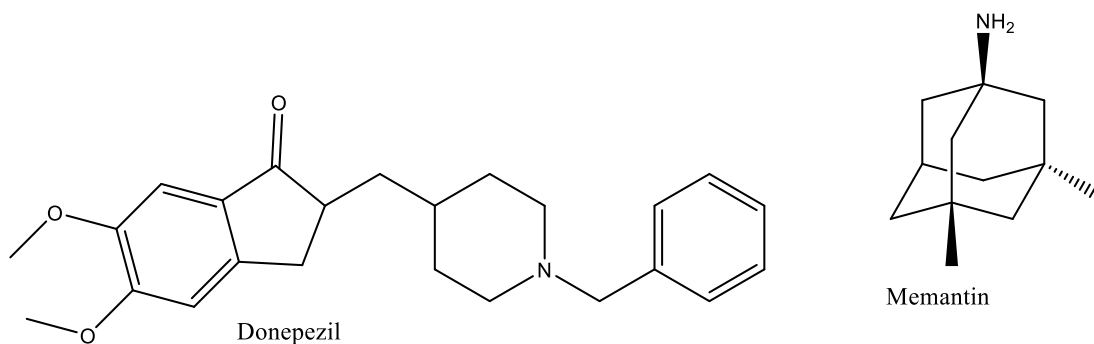
3.2.5.2.1 Memantin

Jeho mechanismus účinku spočívá v tom, že je nekompetitivním antagonistou glutamátových NMDA receptorů, dále pak přímo kompetitivně inhibuje nadměrně stimulované hipokampální NMDA receptory [13]. Jeho biologický poločas leží mezi 60–80 hodinami a prodlužuje se zvýšeným pH moči [14]. Při léčbě je nutná postupná titrace dávky během prvních tří týdnů užívání. Jinak je obecně dobře snášen. Pokud se nežádoucí účinky vyskytují, pak mají především charakter excitace, případně přechodných halucinací a jiných psychotických symptomů [3].

Memantin lze kombinovat i s iAChE. Terapeuticky je tato kombinace přínosná, bohužel je ale také velmi finančně nákladná [14].

Na obrázku číslo 1 jsou zobrazeny struktury všech terapeuticky využívaných léčiv.





Obrázek 1: Struktury látek využívaných v terapii Alzheimerovy choroby

3.2.6 Látky přírodního původu vykazující terapeutický potenciál

3.2.6.1 Galantamin

Výše zmíněný a v praxi běžně používaný iAChE byl prvně izolován ze sněženky *Galanthus woronowii*. Vyskytuje se i v dalších druzích rodu *Galanthus* (v rámci ČR např. u sněženky podsněžník – *Galanthus nivalis*) a v řadě dalších rodů čeledi *Amaryllidaceae*. Prvotně byl využíván ve farmakoterapii myasthenia gravis a paralytické poliomyelitidy [15].

3.2.6.2 Huperzin A

Další z řady alkaloidů byl prvně izolován z plavuně *Huperzia serrata*, u nás se vyskytuje ve vzácném vranci jedlovém – *Huperzia selago*. Patří k reverzibilním iAChE, ve farmakoterapii je využíván v Číně. Oproti ostatním v praxi využívaným léčivům v ČR má delší účinnost, rychlejší vstup přes hematoencefalickou bariéru a lepší biologickou dostupnost po perorálním podání. V současné době je předmětem klinických studií v USA [15].

3.2.6.3 *Ginkgo biloba*

V rámci několika studií byl prokázán terapeutický účinek a dobrá snášenlivost extraktu z *Ginkgo biloba* EGb 761 [12]. Standardizovaný extrakt je doporučován při léčbě Alzheimerovy choroby jen jako alternativa u pacientů s nesnášenlivostí iAChE, případně jako adjuvans [16]. Působí nootropně a vazodilatačně, vychytává volné kyslíkové radikály, je inhibitorem některých typů receptorů NMDA [8].

3.2.6.4 Další látky

Z dalších přírodních látek, které jsou uváděny jako potenciálně účinné proti Alzheimerově chorobě nebo které se staly předlohou pro další syntézy potenciálně účinných sloučenin, je možné uvést např. tyto:

- chinazolinokarbolinový alkaloid rutaecarpin (*Evodia rutaecarpa*),
- alkaloidy piperidinového typu 3-O-acetylspectalin a spectalin (*Senna spectabilis*),
- isaindigoton (*Isatis indigotica*),
- berberin (*Coptis chinensis*) [15].

3.2.7 Výzkum nových léčiv

Doposud ne zcela objasněná příčina vzniku Alzheimerovy choroby a řada patofyziologických dějů na úrovni různých struktur podměnily výzkum potenciálně účinných látek proti Alzheimerově chorobě s rozdílnými místy zásahu a mechanismy účinku. Předmětem současného zkoumání jsou například:

- inhibitory monoaminoxidázy B a odvozené hybridní látky – selegilin, rasagilin,
- látky snižující tvorbu beta-amyloidu – inhibitory beta-sekretáz – pioglitazon a rosiglitazon, inhibitory a modulátory gama-sekretáz a enhancery alfa-sekretáz – bryostatin-1, exebryl-1,
- látky zvyšující clearance beta-amyloidu – solanezumab, crenezumab, gantenerumab, aducanumab,
- látky zaměřené na tau protein – lithium, valproát, tideglusid, LMTM,
- serotonergní látky – idalopirdin,
- agonisté nikotinových receptorů – vareniklin, enceniklin,
- antagonisté receptorů pro konečné produkty pokročilé glykace – azeliragon,
- léčiva interagující s mitochondriálními enzymy – frentizol,
- neutrofíny,
- látky ovlivňující zánětlivé procesy – naproxen, lornoxikam, rofekoxib, ibuprofen v kombinaci s kromolynem,
- další – nilvadipin, statiny, latrepirdin, nootropika, nicergolin, piracetam, omega-3, koenzym Q10 [16].

3.3 *Fumaria officinalis* L.

Fumaria officinalis je známá po staletí, poprvé byla tato rostlina popsána v knihách pocházejících ze středověku [17]. Rod *Fumaria* zahrnuje řadu okrasných rostlin a některé druhy, kterých si Řekové a Římané velmi vážili kvůli řadě léčivých účinků [18]. Označení *Fumaria officinalis*, česky zemědělný lékařský, pochází z latinského slova „*fumus*“, což v překladu znamená kouř [19]. Toto označení je pravděpodobně odvozeno buď od skutečnosti, že jeho bělavá, modrozelená barva mu dodává vzhled doutnajícího kouře [20], nebo podle toho, že šťáva z rostliny může způsobit slzení očí podobné tomu, jaké může vyvolat podráždění očí od kouře, k čemuž se přiklání například Plinius a Olivier de Serres (14. století) [18]. Podle Cartera (1964) [21] je název odvozen z latinského „*fumur terrae*“, což v překladu znamená kouř Země. Je to údajně proto, že lidé ve starověku si mysleli, že tato bylina neroste ze semen, ale z par vycházejících ze země; *Fumaria officinalis* byla používána šamany, kteří věřili, že její kouř má sílu vyhánět zlé duchy.

3.3.1 Taxonomické zařazení *Fumaria officinalis*

Taxonomické zařazení tohoto druhu je poněkud nejednoznačné a literární zdroje se v zařazení liší. *Fumariodeae* byla podle Englera (1936) až do roku 1956 považována za podčeleď čeledi *Papaveraceae* řádu *Rhoeadales* [22]. Později tuto podčeleď Cronquist (1988) označil jako oddělenou čeleď řádu *Papaverales* a název byl změněn na *Fumariaceae* [23]. V roce 2003 Angiosperm Phylogeny Group II. [24] zařadila tento druh do řádu *Ranunculales* a samostatné čeledi *Fumariaceae* společně s čeledí *Papaveraceae*. V této práci je použito fylogenetické taxonomické zařazení podle nejnovější verze Angiosperm Phylogeny Group IV [25], které řadí druh *Fumaria officinalis* do čeledi *Papaveraceae* a řádu *Ranunculales*. Toto taxonomické zařazení je schematicky znázorněno níže.

Doména: *Eukaryota* (Jaderní)

Archaeplastida

Říše: *Plantae* (Rostliny)

Oddělení: *Angiosperms* (Krytosemenné)

Třída: *Eudicots* (Vyšší dvouděložné)

Řád: *Ranunculales* (Pryskyřníkotvaré)

Čeleď: *Papaveraceae* (Makovité)

Rod: *Fumaria* (Zemědým)

Druh: *Fumaria officinalis*, L. (Zemědým lékařský)

3.3.2 Charakteristika rodu *Fumaria*

Zdroje uvádí různý počet druhů rodu *Fumaria* [26, 27], Plant List jich oficiálně udává celkem 72. Tyto rozdíly jsou pravděpodobně způsobeny použitím několika synonym pro rostliny, které mají velmi blízké morfologické vlastnosti. Identifikace rostlin *Fumaria* je tedy velmi subjektivní [26].

Rostliny rodu *Fumaria* mají jemně rozdělené listy a drobné, trubkovité, červené až růžové nebo bělavé květy. Jedná se o rostliny pocházející z Eurasie, které však byly rozšířeny do jiných zemích s mírným podnebím (zejména Severní Ameriky a Austrálie). Mezi nejznámější zástupce tohoto rodu patří *Fumaria officinalis*, *vaillantii*, *kralikii*, *rostellata*, *schleicherii*, *thuretii* [28].

3.3.2.1 Morfologický popis *Fumaria officinalis*

Fumaria officinalis je vzpřímená až rozlehlá, štíhlá bylina, která dosahuje výšky od 30 do 70 cm. Její stonky jsou zelené, hladce pruhované. Měkké, jemně členěné šedozelené listy rostou v téměř přeslenitém uspořádání a jsou rozděleny do lineárních lístků, které jsou střídavé, dlouho stopkaté, až 8 cm dlouhé a hluboce laločnaté. Květenství má 10 až 40 květů, obvykle však více než 20, které jsou uspořádané v dlouhých mnohokvětých hroznech. Nepravidelné masově zbarvené až narůžovělé trubkovité květy jsou u špičky tmavě růžové a jsou od 8 do 10 mm dlouhé. Plodem je zaoblená jednosemenná globulární tobolka podobná ořechu; semena jsou lysá, matná a červenohnědá. Tato bylina kvete přibližně od dubna do září, ale v některých podnebných pásmech může kvést téměř po celý rok, přičemž každá rostlina poskytuje asi 800 semen [23, 29, 30]. Na následujícím obrázku je zobrazen květ, plod a celá bylina *Fumaria officinalis*.

3.3.2.2 Rozšíření a výskyt *Fumaria officinalis*

Allan (1978) [31] uvádí, že *Fumaria officinalis* je indikátorem alkalické půdy. *Fumaria officinalis* se vyskytuje jako plevel orné půdy a odpadních míst ve většině Evropy, západní Sibíře a západní Asie a nově je rozšířený také v Kanadě, Číně, Spojených státech, Jižní Africe a Austrálii [31, 32].

Jedná se o ekonomicky důležitou plevelnou bylinu rostoucí v obilninových plodinách po celém světě. Představuje problém v Austrálii, Finsku, Novém Zélandu, Norsku, Skotsku, Španělsku, Švédsku a USA. Jako běžná plevelnatá bylina se vyskytuje také v Bulharsku, Anglii, Rusku, Chile, Francii, Německu, Řecku, Itálii, Portugalsku, Jižní Africe a bývalé Jugoslávii [33]. Vyskytuje se také v dalších 45 zemích, kde se objevuje u 33 plodin, často upřednostňujících obiloviny, zeleninu a vinice. Je to také vzácný plevel lnu v Argentině a cukrové řepy v Alžírsku, České republice, Anglii a Španělsku [34].



Pl. 24. *Fumeterre officinale*. *Fumaria officinalis* L.

Obrázek 2: *Fumaria officinalis* (květ, plod, celá rostlina) [35]

3.3.2.3 Tradiční využití *Fumariae herba*

Léčivými částmi *Fumaria officinalis* jsou sušená bylina a čerstvá nadzemní část rostliny. Listy nemají žádný zápach, ale hořkou a slanou chuť [22].

Léčivé účinky této byliny jsou známy již od období antického Říma, od té doby až do 18. století si tato bylina zachovala prominentní roli v tradiční bylinné medicíně [17]. Bylinná droga byla monografována ve starých oficiálních lékopisech (např. Pharmacopée Française [36]; Codex Medicamentarius Gallicus Pharmacopée Française 1908 [37]; British Herbal Pharmacopoeia 1976) [38].

Řecký lékař a farmakolog Pedanius Dioscorides (40–90 n. l.) zmiňuje bylinu ve svém „De Materia Medica“ [39], důležitém dokumentu o botanice a léčivech. Jak již bylo zmíněno výše, šťáva z rostliny vyvolává pálení očí, a tudíž se podle Delaveau (1980) [40] údajně používala pro léčbu očních infekcí. Použití této byliny jako krému pro léčbu zánětu spojivek bylo popsáno v British Herbal Pharmacopoeia z roku 1976 [38].

Tradičně byla rostlina používána na podporu trávení a jako diuretikum. Extrakt ze zemědělného lékařského může být použit při léčbě poruch hepatobiliárního traktu, spastických potíží v oblasti žlučnickových žlučovodů a gastrointestinálního traktu. V lidovém léčitelství se bylina používá při kožních onemocněních, zácpě, cystitidě, arterioskleróze, revmatismu, artritidě jako čistič krve, při hypoglykémii a infekcích [41].

V roce 1986 byla *Fumaria officinalis* oficiálně uznána francouzskými zdravotnickými orgány (Bulletins Officiels N° 86/20 bis and N° 90/22 bis 1986) jako bylinný prostředek tradičně používaný při renálních a zažívacích eliminačních funkcích a na podporu trávení [42]. Kromě toho je tato bylina na britském General Sales List (seznamu bylin určených k prodeji) a je schválena německou komisí E Monograph [43]. Používá se v Evropě a na celém světě jako tradiční lék již více než 30 let bez známých zdravotních komplikací [38].

Z květů se vyrábí žluté barvivo na vlnu. *Fumaria officinalis* je uvedena v seznamu Rady Evropy jako přírodní zdroj potravinářských aromat (kategorie N3). Tato kategorie naznačuje, že tuto bylinu lze do potravin přidávat tradičně přijímaným způsobem, i když pro adekvátní posouzení potenciální toxicity není k dispozici dostatek informací [42].

3.3.2.4 Studované biologické aktivity extraktu *Fumaria officinalis*

Hepatoprotektivní aktivita

Testování účinků a cytotoxicity extraktu *Fumaria officinalis* na hepatocytech u potkanů prokázalo hepatoprotektivní účinek celkového extraktu [44].

Hypoglykemická aktivita

Výsledky studie Karim et al. [45] poukazují na potenciální antidiabetickou aktivitu. Extrakt *Fumaria officinalis* fungoval jako inzulinové sekretagogum, v závislosti na dávce docházelo k inhibici alfaamylázy a alfa-glukosidázy.

Antibakteriální aktivita

Studie Preiningera et al. [46] a Dulger et al. [47] uvádí významnou antibakteriální aktivitu proti grampozitivním bakteriím, jako je *Staphylococcus* a *Bacillus anthracis*.

Dermatologická aplikace

Bylina *Fumaria officinalis* se také používá k léčbě chronických ekzémů, kožních vyrážek a jiných dermatologických onemocnění [48]. Estery kyseliny fumarové se používají v léčbě psoriázy. Monomethyl fumarát je nejaktivnějším metabolitem v německém léku proti psoriáze (Fumaderm) [49].

Vliv na nervový systém

Účinky etanolového extraktu *Fumaria officinalis* byly studovány na experimentálních zvířecích modelech a výsledky této studie odhalily významné ($P < 0,001$) a na dávce závislé myorelaxační a sedativní potenciační účinky *Fumaria officinalis* [50].

Antioxidační efekt

Antioxidační aktivita metanolového extraktu nadzemních částí *Fumaria officinalis* byla stanovena měřením inhibice těkavých organických sloučenin a konjugovaných dienhydroperoxidů vznikajících při oxidaci kyseliny linolové. Extrakty vykazovaly vysokou antioxidační kapacitu (78, 93 %) [51].

Poruchy žlučových cest

Reynier [52] ve své studii potvrdil, že extrakt *Fumaria* zvyšuje objem sekrece žluče, když se podává intraduodenálně anestetizovaným krysám s hypocholérií. Dále bylo také prokázáno,

že extrakt *Fumaria officinalis* vykazuje jak antispasmodickou, tak spasmolytickou aktivitu. Rostlina se v Austrálii tradičně používala při dyskinezi žlučových cest, bolesti v případě cholelitiázy, kdy není chirurgický zákrok možný, bolesti v případě cholecystitidy a cholangitidy, postcholecystektomického syndromu a posthepatického syndromu s cholestázou [42]. Extrakt *Fumaria officinalis* také inhiboval tvorbu žlučnickových kamenů u zvířat [53]. Avšak v komplexní studii u pacientů s cholecystopatiemi došlo u aplikace extraktu ke zlepšení u 70 % léčené skupiny [54]. Dvojitě zaslepená placebo klinická studie byla provedena u skupiny 30 pacientů (20 žen, 10 mužů ve věku 26–57 let) s různými biliárními poruchami (dyskineze, cholecystitida, hepatopatie, cholelitiáza, pooperační cholecystektomický syndrom). Pacienti užívali 3 tablety (Fumaria- Nebulisat) (vodní extrakt 4-6: 1) 250 mg denně po dobu 28 dnů. Výsledky byly úspěšné, účinek se projevil zejména proti příznakům plnosti a plynatosti [55].

Efekt na kardiovaskulární systém

Mukhtar et al. prokázali afrodiziakální aktivity vodného / ethanolového extraktu plodů *Fumaria officinalis* u potkanů. Ve srovnání s kontrolní skupinou zvýšil extrakt libidum během první a třetí hodiny [56]. Extrakt obsahující alkaloidy *Fumaria officinalis* vykazoval také antiarytmickou aktivitu [57].

3.3.3 Obsahové látky rodu *Fumaria*

Fytochemické studie odhalily v rodu *Fumaria* přítomnost četného množství alkaloidů, flavonoidů, saponinů a terpenoidů [58].

3.3.3.1 Alkaloidy a jejich biologické účinky

Charakteristickými sekundárními metabolity rodu *Fumaria* jsou alkaloidy. Jedná se o velmi rozmanitou skupinu jak po stránce molekulární struktury, tak i samotné biologické aktivity [59]. V letech 1969 až 2019 bylo izolováno celkem 135 různých zástupců alkaloidů přítomných v druzích *Fumaria* [58]. Ve složení jednotlivých alkaloidů jsou mezi jednotlivými druhy *Fumaria* značné rozdíly, takže by tyto sloučeniny mohly být použity jako případné taxonomické znaky za účelem rozlišení jednotlivých bylin [60].

3.3.3.1.1 Protopinové alkaloidy

Pro tento typ alkaloidů je typický desetičlenný heterocyklus s atomem dusíku v poloze 7 a keto– skupinou na uhlíku C14 [61]. V rodu *Fumaria* bylo doposud popsáno pouze šest zástupců protopinových alkaloidů. Ty byly nalezeny ve většině zkoumaných druhů, což naznačuje, že jsou

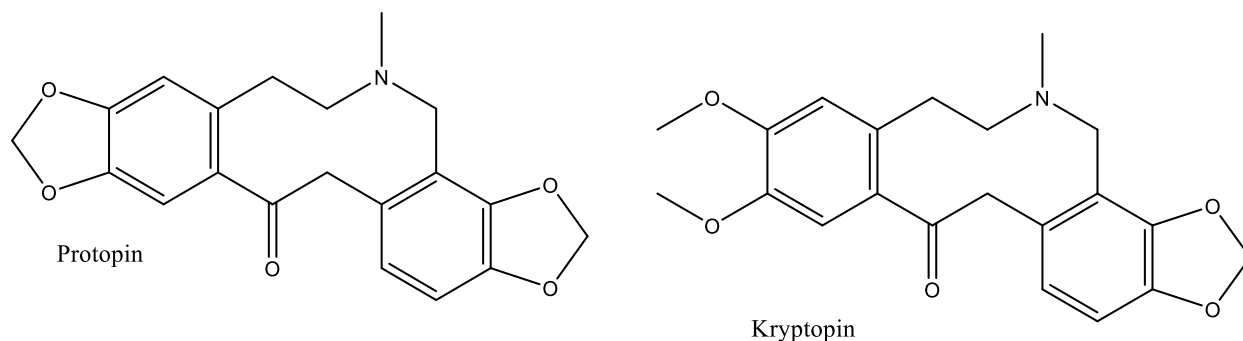
jednou z hlavních skupin obsahových látek tohoto rodu [58]. Přehled druhového zastoupení jednotlivých protopinových alkaloidů je uveden v tabulce číslo 1.

Tabulka 1: Protopinové alkaloidy

Alkaloid	Druh rodu <i>Fumaria</i>	Reference
Protopin	<i>F.agraria, F.asepala, F.barnolae, F.bastardii, F.bracteosa, F.capreolata, F.densiflora, F.faueri, F.gaillardotii, F.indica, F.judaica, F.kralikii, F.macrosepala</i> Boiss, <i>F.muralis, F.officinalis, F.parviflora, F.petteri, F.rostellata, F.schleicherii, F.schrammii, F.sepium, F.thuretii, F.vaillantii</i>	[28, 58, 59, 62]
Kryptopin	<i>F.agraria, F.asepala, F.bracteosa, F.capreolata, F.cilicica, F.densiflora, F.faueri, F.indica, F.kralikii, F.macrocarpa, F.muralis, F.officinalis, F.parviflora, F.petteri, F.rostellata, F.schrammii, F.schleicheri, F.thuretii, F.vaillantii</i>	[28, 58, 59, 62]
Beta-Allokryptopin	<i>F.capreolata, F.judaica</i>	[58, 62]
Izmirin	<i>F.parviflora</i>	[58, 62]
Vaillantín	<i>F.vaillantii</i>	[58]
Pseudopropin	<i>F.indica</i>	[58]

Nejvíce studií bylo věnováno protopinu. Byl prokázán jeho hepatoprotektivní [63], antiagregační [64], hypotenzivní, antiarytmický, antipyretický [65], spasmolytický [52], protizánětlivý [66] a u rakoviny prsu potenciální antiproliferativní [67] účinek. Funguje též jako inhibitor acetylcholin- a butyrylcholinesterázy [68] a GABA transaminázy v mozku [69].

Kryptopin vykazuje účinek antibakteriální [70] a antihelmintický [71]. Oba alkaloidy pak krátkodobě stimulačně ovlivňují dělohu [72].



Obrázek 3: Struktury protopinových alkaloidů

3.3.3.1.2 Protoberberinové alkaloidy

V rámci rodu *Fumaria* se vyskytuje 24 alkaloidů tohoto typu [58]. Strukturně se jedná o tetrahydroprotoberberiny, existující případně ve formě kvartérních solí [73]. Kompletní přehled protoberberinových alkaloidů rodu *Fumaria* je uveden v následující tabulce.

Tabulka 2: Protoberberinové alkaloidy

Alkaloid	Druh rodu <i>Fumaria</i>	Reference
(+)-Stylopin	<i>F.vaillantii</i> Loisel	[58]
(+)-Skulerin	<i>F.officinalis</i>	[58]
(-)-Sinaktin	<i>F.officinalis</i> , <i>F.macrocarpa</i> Parl.	[58, 59, 62]
(+)-Tetrahydropalmin	<i>F.bastardii</i> Boreau	[58, 59]
(-)-Cheilantifolin	<i>F.vaillantii</i> , <i>F.barnalae</i> Sennen & Pau, <i>F.capreolata</i> , <i>F.parviflora</i> Lam.	[58, 59]
(-)-Stylopin (L-tetrahydrokoptisin)	<i>F.agraria</i> Lag., <i>F.asepala</i> Boiss, <i>F.barnolae</i> , <i>F.bastardii</i> , <i>F.capreolata</i> , <i>F.gaillardotii</i> Boiss, <i>F.indica</i> , <i>F.judaica</i> Boiss, <i>F.kralikii</i> Jord., <i>F.parviflora</i> , <i>F.septium</i> Boiss & Reut., <i>F.schrammii</i> Velen, <i>F.vaillantii</i>	[58, 59, 62]
(-)-Skulerin	<i>F.barnolae</i> , <i>F.capreolata</i> , <i>F.judaica</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58, 59]
8-Oxokoptisin	<i>F.indica</i> , <i>F.parviflora</i>	[58]
Dihydrokoptisin	<i>F.indica</i>	[58, 62]
Pseudostylopin 8-beta-Dglukopyranosid	<i>F.indica</i>	[58]
Koptisin	<i>F.agraria</i> , <i>F.capreolata</i> , <i>F.densiflora</i> DC., <i>F.indica</i> , <i>F.judaica</i> , <i>F.kralikii</i> , <i>F.mularis</i> Sond. Ex W.D.J. Koch, <i>F.macrocarpa</i> , <i>F.officinalis</i> , <i>F.parviflora</i> , <i>F.schrammii</i> , <i>F.sepium</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58, 59, 62]

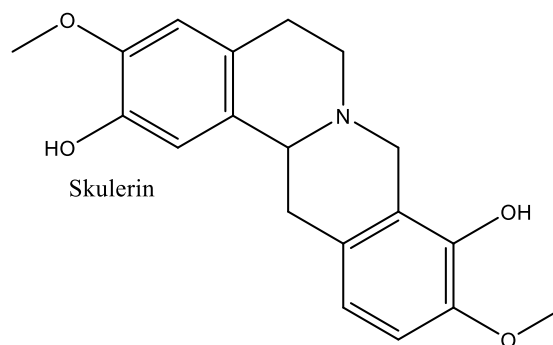
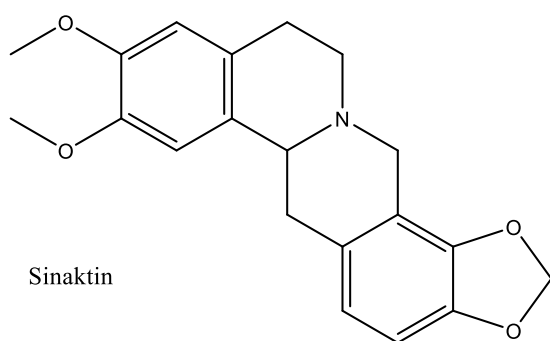
Berberin	<i>F.kralikii, F.indica</i>	[58, 62]
Palmatin	<i>F.densiflora, F.parviflora</i>	[58]
Dehydrocheilantifolin	<i>F.capreolata, F.indica, F.parviflora</i>	[58, 62]
Protoberberin	<i>F.bastardii, F.capreolata</i>	[58]
Koptisin chlorid	<i>F.indica</i>	[58]
Berberin iodid	<i>F.indica</i>	[58]
(-)-Kanadin	<i>F.kralikii</i>	[58, 62]
(S)-cis-N-Methylstylopin	<i>F.agraria, F.capreolata, F.densiflora, F.mularis, F.officinalis, F.parviflora, F.vaillantii</i>	[58]
N-Methylsinaktin	<i>F.officinalis</i>	[58]
Tetrahyrokoptisin hydrochlorid	<i>F.indica</i>	[58]
(+)-N-Methylstylopin iodid	<i>F.densiflora</i>	[58]
(-)-N-Methylstylopin iodid	<i>F.densiflora</i>	[58]
N-Methyl-5-hydroxystylopin chlorid	<i>F.densiflora</i>	[58]
(-)-Korydalin	<i>F.cilicica, F.officinalis</i>	[59]

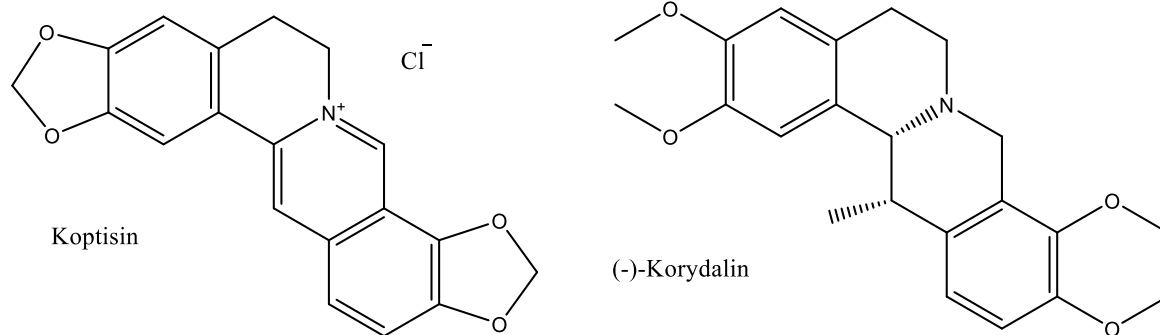
(±)-Skulerin podle studií vykazuje antimalarickou aktivitu [74], u (-)-skulerinu byl zaznamenán i účinek sedativní [75].

U sinaktinu byla v rámci studie Alzheimerovy choroby pozorována potenciální inhibiční aktivita vůči POP [76] a acetylcholinesteráze [77], dále byl u (-)-sinaktinu prokázán antivirotický a antibakteriální účinek [78].

Koptisin jeví nejvíce prozkoumaný biologický účinek, a to sice antipyretický, protizánětlivý, potlačující tvorbu osteoklastů [79], hypoglykemický [80], neuroprotektivní, antioxidační [81] a antifungální [82].

Také korydalin funguje jako iAChE [83] a má rovněž gastroprotektivní a antiulcerózní efekt [84].





Obrázek 4: Struktury protoberberinových alkaloidů

3.3.3.1.3 Benzylisochinolinové alkaloidy

Přehled benzylisochinolinových alkaloidů izolovaných z různých druhů *Fumaria* předkládá tabulka číslo 3.

Tabulka 3: Benzylisochinolinové alkaloidy

Alkaloid	Druh rodu <i>Fumaria</i>	Reference
Fuyuzipin	<i>F.indica</i>	[58]
(+)-Koklaurin	<i>F.indica</i> , <i>F.parviflora</i> , , <i>F.vaillantii</i>	[58]
(-)-Norjuzipin	<i>F.densiflora</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58, 59]
Fumarizin	<i>F.indica</i>	[58]
Ledekorin	<i>F.vaillantii</i>	[58]
(+)-Juzipin	<i>F.bastardii</i> , , <i>F.vaillantii</i>	[58, 59]
(+)-Retikulin	<i>F.capreolata</i> , všechny turecké druhy <i>Fumaria</i>	[58, 59]
<i>N</i> -Methylkoklaurin	<i>F.capreolata</i>	[58]
Fumaflorin	<i>F.densiflora</i>	[58]
Fumaflorin methylester	<i>F.densiflora</i>	[58]

3.3.3.1.4 Spirobenzylisochinolinové alkaloidy

Prekurzory spirobenzylisochinolinových alkaloidů jsou protoberberiny. Typicky se vyskytují v rodech *Fumaria* a *Corydalis*. Spirobenzylisochinoliny izolované z rodu *Fumaria* obvykle nesou pouze jeden kyslíkatý substituent ve formě hydroxyly, acetonu nebo ketonu lokalizovaného do polohy C8 [58], jejich kompletní přehled je uveden v tabulce číslo 4.

Tabulka 4: Spirobenzylisochinolinové alkaloidy

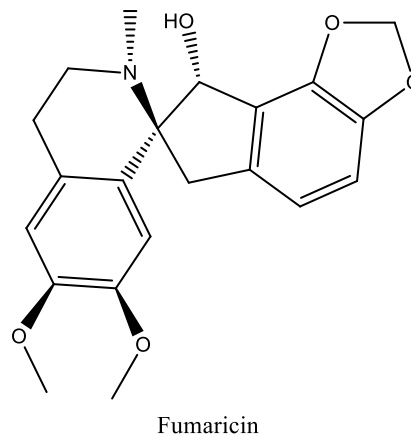
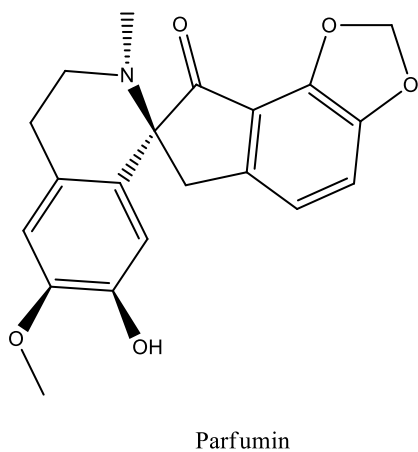
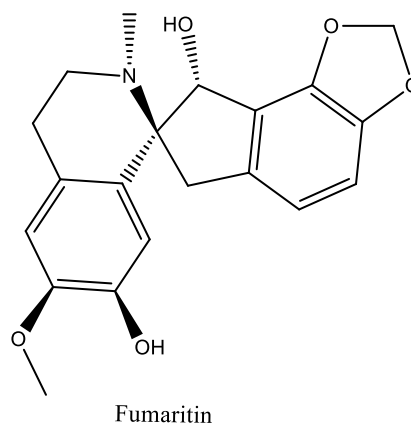
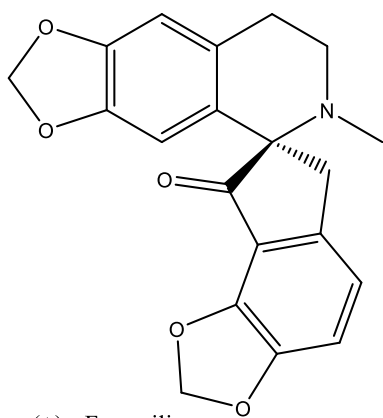
Alkaloid	Druh rodu <i>Fumaria</i>	Reference
(-)-Norfumaritin	<i>F.kralikii</i>	[58, 59]
Densiflorin (Homonym)	<i>F.densiflora</i> , <i>F.sepium</i>	[58, 62]
(+)-Fumarilin	<i>F.agraria</i> , <i>F.bastardii</i> , <i>F.capreolata</i> , <i>F.densiflora</i> , <i>F.faueri</i> (Pugsley) M.Linden, <i>F.macrocarpa</i> , <i>F.muralis</i> , <i>F.officinalis</i> , <i>F.parviflora</i> , <i>F.petteri</i> Rehb., <i>F.rostellata</i> Knaf, <i>F.schrammii</i> , <i>F.sepium</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58, 59]
Dihydrofumarilin	<i>F.bastardii</i> , <i>F.officinalis</i> , <i>F.parviflora</i> , <i>F.petteri</i> , <i>F.schrammii</i>	[28, 58, 62]
(+)-Parfumin (Fumarilicin)	<i>F.agraria</i> , <i>F.barnolae</i> , <i>F.bastardii</i> , <i>F.capreolata</i> , <i>F.densiflora</i> , <i>F.faueri</i> , <i>F.indica</i> , <i>F.judaica</i> , <i>F.kralikii</i> , <i>F.macrocarpa</i> , <i>F.muralis</i> , <i>F.officinalis</i> , <i>F.parviflora</i> , <i>F.petteri</i> , <i>F.rostellata</i> , <i>F.schleicheri</i> Soy.-Will., <i>F.schrammii</i> , <i>F.sepium</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58]
(-)-Parfumidin	<i>F.barnolae</i> , <i>F.densiflora</i> , <i>F.officinalis</i> , <i>F.parviflora</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58, 59]
(+)-Parviflorin	<i>F.parviflora</i>	[58]
(-)-Fumaritin	<i>F.agraria</i> , <i>F.bastardii</i> , <i>F.capreolata</i> , <i>F.densiflora</i> , <i>F.faueri</i> , <i>F.gaillardotii</i> , <i>F.indica</i> , <i>F.judaica</i> , <i>F.kralikii</i> , <i>F.muralis</i> , <i>F.officinalis</i> , <i>F.parviflora</i> , <i>F.schleicheri</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58, 59]
(-)-Fumaricin	<i>F.bastardii</i> , <i>F.capreolata</i> , <i>F.densiflora</i> , <i>F.gaillardotii</i> , <i>F.officinalis</i> , <i>F.petteri</i> ssp. <i>thuretii</i> , <i>F.schrammii</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58, 59]
(-)-Fumarofycin	<i>F.agraria</i> , <i>F.bastardii</i> , <i>F.capreolata</i> , <i>F.densiflora</i> , <i>F.faueri</i> , <i>F.kralikii</i> , <i>F.muralis</i> , <i>F.officinalis</i> , <i>F.parviflora</i> , <i>F.petteri</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58]
(-)-O-Methylfumarofycin	<i>F.bastardii</i> , <i>F.densiflora</i> , <i>F.kralikii</i> , <i>F.muralis</i> , <i>F.officinalis</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58, 59]
Raddeanin	<i>F.indica</i>	[58]
(-)-Fumaritin N-oxid	<i>F.indica</i> , <i>F.sepium</i> , <i>F.kralikii</i> , <i>F.officinalis</i>	[58]
(+)-Papracinin	<i>F.indica</i>	[58]
(-)-Fumaricin N-oxid	<i>F.densiflora</i>	[58]
(-)-Norfumaritin	<i>F.kralikii</i>	[59]

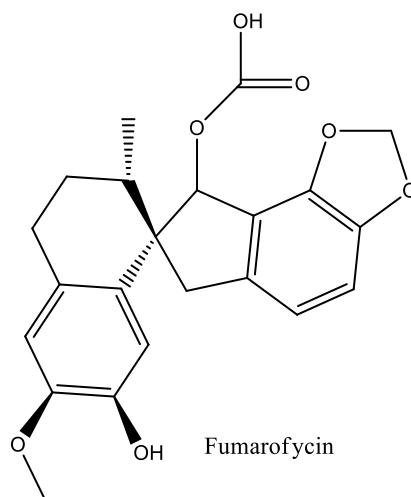
Studie zabývající se alkaloidy jednotlivých druhů rodu *Fumaria*, volně rostoucích v Bulharsku, prokázala výrazný inhibiční efekt vůči acetylcholinesteráze u parfuminu, fumarilinu, fumarofycinu i fumaritinu [77].

Parfumin a fumaritin v rámci studie na krysách vykazovali i relaxační účinek na ileum a snížení jejich srdeční frekvence [85].

Fumarilin sám funguje antikonvulzivně, antinociceptivně [58] a v další studii byl prokázán i jeho fungicidní potenciál [86].

U fumarofycinu byl pozorován antioxidační a antilipoperoxidační efekt [87].





Obrázek 5: Struktury spirobenzylisochinolinových alkaloidů

3.3.3.1.5 Ftalidisochinolinové alkaloidy

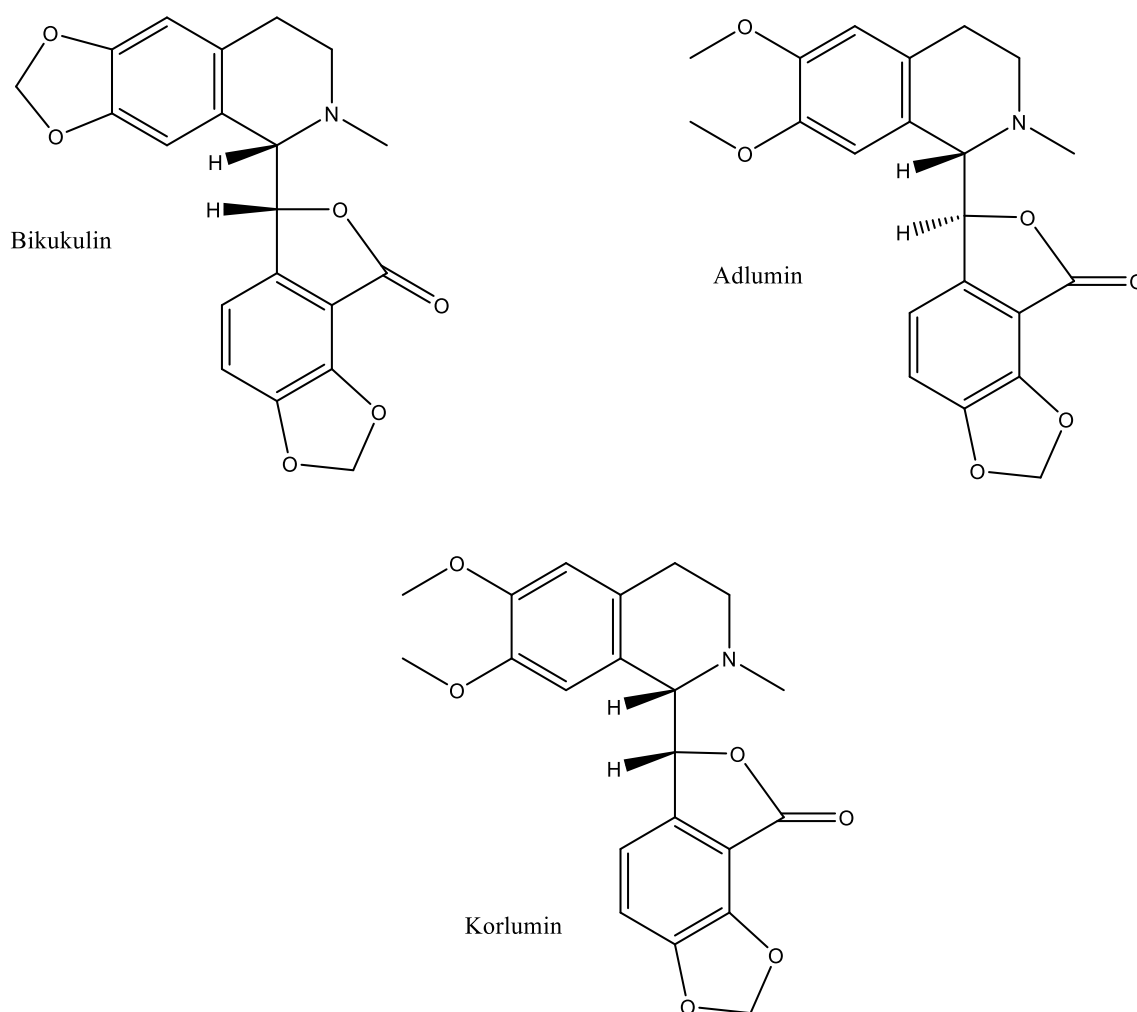
Struktura tohoto podtypu alkaloidů je typicky tvořena jádrem o čtyřech cyklech, z nichž jeden je laktonový. Na rozdíl od většiny protoberberinů s obvyklou S-konfigurací na C1 nevykazují fthalidisochinoliny z druhů rodu *Fumaria* žádné stereochemické preference na C1 ani na C8 [58]. Kompletní přehled fthalidisochinolinových alkaloidů zástupců *Fumaria* je sepsán do tabulky číslo 5.

Tabulka 5: Fthalidisochinolinové alkaloidy

Alkaloid	Druh rodu <i>Fumaria</i>	Reference
(+)-Bikukulin	<i>F.asepala</i> , <i>F.barnolae</i> , <i>F.bastardii</i> , <i>F.bracteosa</i> Pomel, <i>F.capreolata</i> , <i>F.cilicica</i> , <i>F.gaillardotii</i> , <i>F.indica</i> , <i>F.kralikii</i> , <i>F.microcarpata</i> , <i>F.officinalis</i> , <i>F.parviflora</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58, 59]
(+)-Korlumin	<i>F.officinalis</i>	[58]
(+)-Paprain	<i>F.indica</i>	[58]
(+)-Korluminidin	<i>F.parviflora</i>	[58]
(-)-Korledin	<i>F.parviflora</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58, 59]
(+)-Egenin	<i>F.vaillantii</i>	[58]
(-)-Korlumin	<i>F.bastardii</i> , <i>F.parviflora</i>	[58, 59]
(-)-Bikukulin	<i>F.cilicica</i> , <i>F.gaillardotii</i> , <i>F.officinalis</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58, 59]
(-)-beta-Hydrastin	<i>F.bastardii</i>	[58, 59]
(+)-Adlumidin	<i>F.bracteosa</i> , <i>F.indica</i> , <i>F.judaica</i> , <i>F.parviflora</i>	[58, 59, 62]
(+)-alfa-Hydrastin	<i>F.bracteosa</i> , <i>F.densiflora</i> , <i>F.parviflora</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58]

(+)-Adlumin	<i>F.barnolae</i> , <i>F.macrocarpa</i> , <i>F.officinalis</i> , <i>F.parviflora</i> , <i>F.rostellata</i>	[58]
(-)-Adlumin	<i>F.kralikii</i> , <i>F.macrocarpa</i> , <i>F.parviflora</i> , <i>F.schrammii</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58, 59]
(-)-Kapnoidin (L-Adlumidin)	<i>F.capreolata</i> , <i>F.petteri</i> ssp. <i>thuretii</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58, 59]
(-)-alfa-Hydrastin	<i>F.officinalis</i> , <i>F.parviflora</i>	[58]
(-)- <i>N</i> -Methyladlumin	<i>F.parviflora</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58]

Účinky korulminu, bikukulinu a adluminu na kardiovaskulární systém pokusných zvířat byly předmětem zkoumání jedné studie, která prokázala, že v závislosti na dávce vyvolává adlumin pokles krevního tlaku a korulmin prohlubuje dýchání a zvyšuje jeho frekvenci [88]. (+)- Bikukulin vykazuje kompetitivně agonistický účinek na GABA receptory v CNS a jeho enantiomer (-)-bikukulin in vitro antivirotický účinek vůči viru hepatitidy B [58].



Obrázek 6: Struktury ftalidisochinolinových alkaloidů

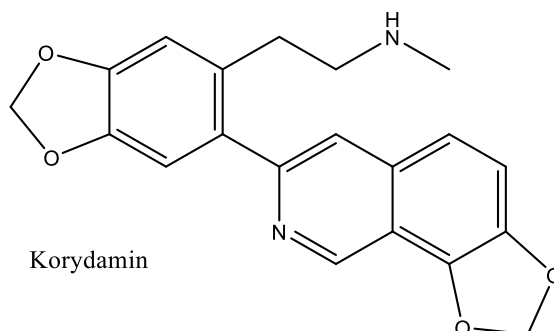
3.3.3.1.6 Sekoftalidisochinolinové alkaloidy

Ve struktuře sekoftalidisochinolinových alkaloidů pocházejících z rodu *Fumaria* se typicky objevuje sekocyklus B s vázaným enol-laktonem, ketokyselinou, diketokyselinou nebo ene-laktámovou skupinou [58], jejich ucelený přehled přináší tabulka číslo 6.

Tabulka 6: Sekoftalidisochinolinové alkaloidy

Alkaloid	Druh rodu <i>Fumaria</i>	Reference
Paprarin	<i>F.indica</i>	[58, 62]
Adlumidicein enol-lakton	<i>F.schrammii</i>	[58]
Adlumicein enol-lakton	<i>F.schrammii</i>	[58]
<i>N</i> -Methylhydrastin	<i>F.densiflora</i> , <i>F.gaillardotii</i> , <i>F.microcarpa</i> , <i>F.officinalis</i> , <i>F.parviflora</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58, 59, 62]
Mikrokarpin	<i>F.schleicheri</i> supsp. <i>Microcarpa</i> (Hauskn.) Lidén, <i>F.parviflora</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58, 59, 62]
Narlumidin	<i>F.indica</i> , <i>F.parviflora</i>	[58]
Narlumicin	<i>F.indica</i>	[58]
Adlumidicein	<i>F.capreolata</i> , <i>F.densiflora</i> , <i>F.kralikii</i> , <i>F.officinalis</i> , <i>F.parviflora</i> , <i>F.schrammii</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58, 59, 62]
Adlumicein	<i>F.agraria</i> , <i>F.capreolata</i> , <i>F.officinalis</i> , <i>F.parviflora</i> , <i>F.schrammii</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58]
<i>N</i> -Methylhydrastein	<i>F.densiflora</i> , <i>F.gaillardotii</i> , <i>F.microcarpa</i> , <i>F.officinalis</i> , <i>F.parviflora</i> , <i>F.petteri</i> ssp. <i>thuretii</i> , <i>F.vaillantii</i>	[58, 59]
Adlumicein methyl ester	<i>F.vaillantii</i>	[58]
<i>N</i> -Methylhydrastein methyl ester	<i>F.vaillantii</i>	[58]
Narceimin	<i>F.indica</i> , <i>F.parviflora</i> , <i>F.schrammii</i>	[58]
Bikukullidin	<i>F.schrammii</i>	[58]
<i>N</i> -Methyloxohyrastein	<i>F.officinalis</i> , <i>F.parviflora</i>	[58]
Narceimicin	<i>F.indica</i>	[58, 62]
Paprafumin	<i>F.indica</i>	[58, 62]
Fumaramin	<i>F.densiflora</i> , <i>F.indica</i> , <i>F.parviflora</i> , <i>F.vaillantii</i>	[28, 58, 59, 62]
Fumaridin (Hydrastinimid)	<i>F.densiflora</i> , <i>F.parviflora</i> , <i>F.schleicheri</i> , <i>F.vaillantii</i>	[28, 58, 62]
Narceinimid	<i>F.parviflora</i>	[58]
Fumaramidin	<i>F.parviflora</i> , <i>F.vaillantii</i>	[28, 58, 59]
(+)-Fum schleicherin	<i>F.schleicheri</i> , <i>F.schrammii</i>	[58]
Fumadensin	<i>F.densiflora</i>	[58]
Korydamin	<i>F.officinalis</i>	[58]

U korydaminu je udávána gastroprotektivní a antiulcerózní aktivita [84].



Obrázek 7: Struktura sekoftalidisochinolinových alkaloidů

3.3.3.1.7 Indenobenzazepinové alkaloidy

Alkaloidy tohoto typu byly prvotně řazeny mezi spirobenzylisochinoliny. Teprve na základě pozdější revize struktury byla vyčleněna samostatná skupina. V tabulce číslo 7 je uveden jejich výčet dle zastoupení v jednotlivých druzích *Fumaria*.

Tabulka 7: Indenobenzazepinové alkaloidy

Alkaloid	Druh rodu <i>Fumaria</i>	Reference
Fumarofin (Fumarostelin)	<i>F.bastardii</i> , <i>F.capreolata</i> , <i>F.cilicica</i> , <i>F.densiflora</i> , <i>F.kralikii</i> , <i>F.officinalis</i> , <i>F.rostellata</i> , <i>F.schleicherii</i> subsp. <i>microcarpata</i> , <i>F.thuretii</i>	[28, 58, 59]
Bulgaramin	<i>F.officinalis</i>	[58]
(+)-Fumaritridin	<i>F.densiflora</i> , <i>F.rostellata</i>	[58]
Fumaritrin	<i>F.officinalis</i> , <i>F.rostellata</i>	[58]
Lahoramin	<i>F.parviflora</i>	[58]
Lahorin	<i>F.parviflora</i>	[58]

3.3.3.1.8 Benzofenantridinové alkaloidy

Jedná se o malou skupinu, v rámci rodu *Fumaria* zastoupenou pouze sedmi doposud objevenými alkaloidy [58], jejichž druhové zastoupení přináší níže tabulka číslo 8.

Tabulka 8: Benzofenantridinové alkaloidy

Alkaloid	Druh rodu <i>Fumaria</i>	Reference
Dihydrosanguinarin	<i>F.agraria</i> , <i>F.bastardii</i> , <i>F.capreolata</i> , <i>F.densiflora</i> , <i>F.faueri</i> , <i>F.kralikii</i> , <i>F.macrosepala</i> , <i>F.officinalis</i>	[28, 58, 59]

	<i>F.parviflora, F.petteri, F. rostelata, F.schleicherii, F.sepium, F. thuretii, FF.vaillantii</i>	
Oxysanguinarin	<i>F.indica, F.parviflora, F.vaillantii</i>	[58, 59, 62]
(-)-8-Methoxydihydrosanguinarin	<i>F.indica, F.vaillantii</i>	[58, 59]
8-Acetyldihydrosanguinarin	<i>F.vaillantii</i>	[58, 59]
Sanguinarin	<i>F.asepala, F.barnolae, F.capreolata, F.indica, F.parviflora, F.schrammii, F.vaillantii</i>	[58, 59, 62]
Chelerytrin	<i>F.schrammii</i>	[58]
Norsanguinarin	<i>F.indica, F.vaillantii</i>	[58, 59, 62]

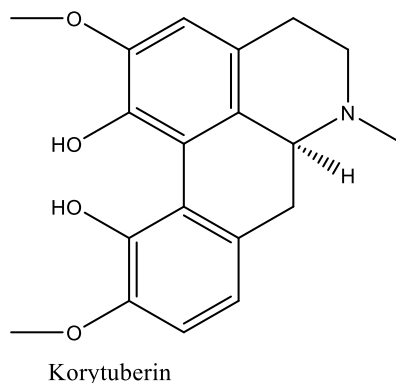
3.3.3.1.9 Aporfinové alkaloidy

Aporfinový typ čítá řadu zástupců benzylisochinolinových alkaloidů, kde je na dusíku typicky vázána methylová skupina, méně častěji pak rovnou dvě skupiny, a tito zástupci tak mají podobu kvartérních solí. Pro pozici C1 a C2 je pak typický hydroxyl, methyl nebo methoxy skupina [89]. Kompletní přehled aporfinových alkaloidů i s výskytem v rámci rodu *Fumaria* se nalézá v tabulce číslo 9.

Tabulka 9: Aporfinové alkaloidy

Alkaloid	Druh rodu <i>Fumaria</i>	Reference
(+)-Isoboldin	<i>F.agraria, F.barnolae, F.capreolata, F.parviflora, F.vaillantii</i>	[58, 59]
(+)-Isokorydin	<i>F.vaillantii</i>	[58, 59]
(+)-Korytuberin	<i>F.agraria, F.capreolata, F.densiflora, F.muralis, F.officinalis, F.vaillantii</i>	[58]
(+)-Lastourvillin	<i>F.indica</i>	[58]
(+)-Domesticin	<i>F.agraria</i>	[58]
(+)-Bulbokapnin	<i>F.agraria</i>	[58]
Magnoflorin	<i>F.capreolata</i>	[58]
(+)-Korytuberin hydroiodin	<i>F.densiflora</i>	[58]
Nandazurin	<i>F.agraria</i>	[58]

(+)-Korytuberin působí zrychlení pulsu, útlum dechové frekvence [90] a vykazuje inhibiční lipooxygenázovou aktivitu [91].



Obrázek 8: *Struktura aporfinových alkaloidů*

3.3.3.2 Ostatní obsahové látky

Pro úplnost lze uvést, že výše popsany přehled alkaloidů není kompletní. Z rostlin rodu *Fumaria* byly izolovány i další alkaloidy rozmanitých chemických struktur.

Fumaria officinalis je také bohatým zdrojem fenolických sloučenin, jejichž účinkům se věnuje v porovnání s alkaloidy minimum studií. Nejznámější z obsažených polyfenolů jsou rutin, hyperosid, kyselina sinapová a ferulová. S velkou pravděpodobností zapříčiňují vysokou pozorovanou antioxidační aktivitu byliny [92, 22].

Za zmínku stojí i některé izolované organické kyseliny, např. kyselina kávová, fumarová, a skořicová [93, 94]. Kyselina kávová inhibuje xantinoxidázy [95], LDL-lipoproteinperoxidázy [96], aktivuje některé enzymy v játrech [97], tudíž působí hepatoprotektivně a má také antispasmolytickou aktivitu [98]. Jako cholagoga účinkují deriváty kyseliny kávové, skořicové, ferulové i p-kumarové [99]. Terapeuticky využívány jsou deriváty kyseliny fumarové, a to při léčbě lupénky [100]. Samotná kyselina fumarová je nyní využívána jako nosič struktur k léčbě roztroušené sklerózy [101].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Všeobecné postupy práce

4.1.1 Příprava a čištění rozpouštědel

Veškerá používaná rozpouštědla byla předem čištěna destilací. 5 % z celkového množství bylo nejprve zachyceno, zbylých cca 90 %, bez odstraněného předku, bylo následně destilováno. V rámci ochrany před světlem byla rozpouštědla uchovávána v hnědých stojátkách ze skla.

4.1.2 Odpařování rozpouštědel, uchování extraktů

Odpařování extraktů a jednotlivých frakcí, získaných sloupcovou nebo preparativní TLC, proběhlo ve vodní lázni za pomoci vakuové odparky Büchi Rotavapor R 114 a to za sníženého tlaku při 40 °C.

4.1.3 Sušení a skladování frakcí, izolovaných čistých alkaloidů

Dosušení frakcí a izolovaných čistých látek bylo prováděno po dobu minimálně 24 hodin nad silikagelem v exsikátoru. Takto získaný materiál byl uskladněn v chladničce o teplotě 2-8 °C.

4.1.4 Preparativní TLC

Chromatografie na tenké vrstvě byla prováděna v systému normálních komor po jejich nasycení zvolenou mobilní fází. Doba sycení trvala v závislosti na charakteru mobilní fáze 20 až 30 minut. TLC byla prováděna vzestupně.

Pro preparativní TLC byly po očištění a odmaštění připraveny skleněné desky, na jejichž povrch byla nalita vodní suspenze komerčního silikagelu. Takto zhotovené desky se před použitím nechaly volně vyschnout po dobu minimálně 24 hodin.

Samotná detekce alkaloidů na deskách probíhala za pomoci UV lampy při vlnových délkách $\delta = 254$ a 366 nm a postřiku Dragendorffovým činidlem. Po postřiku detekčním činidlem se přítomnost alkaloidů projevila tvorbou žlutých, oranžových až hnědých skvrn.

4.1.5 GC-MS analýza

GC-MS spektra byla naměřena na plynovém chromatografu Agilent 7890 A GC 5975 při módu EI při 70 eV. Separace proběhla na koloně DP-5 MS z výroby Agilent Technologies Santa Clara, USA (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Navyšování teploty bylo v teplotním programu docíleno postupně, v rozmezí 100 °C až 180 °C stoupala teplota o 15 °C za minutu, po minutě poté

následovalo stoupaní teploty od 180 °C do 300 °C vždy po 5 °C za minutu. Teplota 300 °C byla udržována po dobu 40 minut. Průtok hélia (nosného plynu) byl stanoven na 0,8 ml za minutu, přičemž teplota injektoru byla 280 °C. Detekční rozmezí bylo m/z 35-600, teplota detektoru 200 °C. 1 µl alkaloidního roztoku (1 mg/l) byl injektován v rámci „split mode“ v poměru 1:10. Identifikace alkaloidů byla provedena na základě porovnání jejich takto získaných MS spekter s již známými MS spektry z knihovny NIST, literatury a spektry referenčních látek izolovaných na Katedře farmaceutické botaniky.

4.1.6 NMR analýza

Měřená NMR spektra byla získána na přístroji Varian Iniova 500 při pracovních frekvencích – 499,9 MHz pro jádra ^1H a 125,7 MHz pro jádra ^{13}C . Pro spektra ^{13}C byla k měření použita 5 mm SW širokopásmová sonda, pro spektra ^1H pak inverzní 5 mm Id PFG sonda. Měření proběhla při 25 °C v deuteriochloroformu.

4.1.7 Optická otáčivost

Optická otáčivost byla měřena na polarimetru ADP 220 BS a to v chloroformu při teplotě 25 °C.

4.1.8 Teplota tání

Bodotávek značky Büchi Melting Point B-540 byl použit pro měření teploty tání. Pracovalo se s rychlostí výhřevnosti 15 °C za minutu do hodnoty 10 °C pod předpokládanou teplotu tání izolovaných látek a poté, za kontinuálního přírůstku 0,5 °C za minutu, až do maximální teploty, která byla stanovena o 10 °C výše, než byla přepokládaná teplota tání zkoušených látek.

4.2 Materiál a vybavení

4.2.1 Materiál a vybavení pro izolaci

4.2.1.1 Rozpouštědla

Chloroform p. a. (Penta) CHCl_3

Cyklohexan p. a. (Penta) C_6H_{12} , cHx

Destilovaná voda H_2O

Diethylamin p. a. (LachNer) Et_2NH

Diethylether p. a. (LachNer) Et_2O

Ethanol 95 %, denaturovaný methanolem, p. a. (Penta) EtOH

Lékařský benzín lékopisné kvality ČL 2009 (Penta) LB

Toluen p. a. (Penta) $C_6H_5CH_3$, To

4.2.1.2 Ostatní chemikálie

Kyselina chlorovodíková 35 % p. a. (Lachema) HCl

Uhličitan sodný bezvodý (Lachema) Na_2CO_3

4.2.1.3 Detekční činidla

Dragendorffovo činidlo se skládá z roztoků A B smíšených v poměru 1:1.

Roztok A: 1,7 g dusičnanu bismutitého zásaditého a 20 g kyseliny vinné se rozpustí v 80 ml destilované vody.

Roztok B: 16 g jodidu draselného se rozpustí ve 40 ml destilované vody.

K detekci se se pak roztok ředí, k jeho 5 ml se přidává 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody.

4.2.1.4 Vyvíjecí soustavy pro TLC

To:EtOH:Et₂NH, 80:15:5

To:Et₂NH, 95:5

To:cHx:Et₂NH 50:45:5

4.2.1.5 Chromatografické adsorbenty

Kiesel SiO₂ 60 F254 od firmy Merck, 20x20 cm, hliníková deska pro TLC o tloušťce vrstvy 0,2 mm

Oxid hlinitý Al₂O₃ desaktivován 6 % H₂O firmy Across pro sloupcovou chromatografii, se stupněm desaktivace Brockmann III a velikostí zrn 40-200 μm.

4.2.1.6 Přístrojové vybavení

ADP 220 BS polarimetr

Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inter MSD plynový chromatograf s hmotnostním detektorem

Büchi Melting Point B-540 bodotávek

Büchi Rotavapor R 114 vakuová odparka

Varian Iniova 500 NMR spektrometr

4.2.1.7 Rostlinný materiál

Drogu v podobě sušené nati *Fumaria officinalis* L. dodala firma Megafyt s.r.o., ověření provedl Prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc. Vzorčky byly uloženy i do herbáře na FaF UK HK.

4.2.2 Materiál a vybavení pro stanovení biologické aktivity

4.2.2.1 Chemikálie

10mM acetylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich)

10mM butyrylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich)

Berberin (Sigma-Aldrich)

Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Aldrich)

1,4-dioxan (Lachema)

5mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich)

Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)

Huperzin A (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

Prolyloligopeptidasa (Sigma-Aldrich)

Z-Gly-Pro-p-nitroanilide (Sigma-Aldrich)

4.2.2.2 Pufry

5mM fosfátový pufr pH 7,4

5mM fosfátový pufr pH 7,4 s obsahem 150 mM chloridu sodného

100mM fosfátový pufr pH 7,4

4.2.2.3 Přístrojové vybavení

Boeco U-32 R, rotor Hettich 1611 centrifuga

Avanti J-301, rotor JA-30.50 centrifuga

Reader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

mikrotitrační destičky

4.2.2.4 Biologický materiál

Zdrojem acetylcholinesterázy byl hemolýzát erytrocytů z lidské krve, jako zdroj butyrylcholinesterázy byla použita lidská plazma.

4.3 Izolace alkaloidů

4.3.1 Příprava sumárního alkaloidního extraktu

Nebyla předmětem mé rigorózní práce. Postup je čerpán od původních autorek, kolegyně Marcely Šafratové a Dominiky Kassemové [102, 103].

Sumární extrakt byl získán z 25,15 kg drogy, suché drobně nařezané nati zemědělu, a to perkolací 95 % ethanolem. Po zahuštění objemu cca na 7 litrů a zahřátí na 70 °C byly přidány 3 l vody a 2 l 2 % kyseliny chlorovodíkové. Před filtrací přes vlizelín došlo k zředění dalšími 5 l vody a ochlazení na 30 °C. Filtr byl následně promyt 3 l 0,1 % kyseliny chlorovodíkové a 2 l vody. Získaný filtrát byl doplněn do 20 l a přidáním 10 % uhličitanu sodného zalkalizován na pH 9,5. Vzniklá suspenze byla na pětkrát vytřepána 5 l diethyletheru. V dělicí nálevce byl výtřepok zbaven vody a organická vrstva odpařena. Tmavohnědý viskózní odparek vážil 99 g. Pro lepší pročištění byl extrakt rozdělen na dvě části (47,6 a 48,2 g) a tyto rozpuštěny v chloroformu. Obě části byly rozpuštěny ve 400 ml 2 % kyseliny chlorovodíkové, doplněny vodou do 1 l a následně filtrovány přes křemelinu. Pro alkalizaci filtrátů na pH 9-10 byl použit 10 % uhličitan vápenatý. Oba díly byly na šestkrát vytřepány 200 ml chloroformu. Na základě zkoušky Mayerovým činidlem se neprokázala přítomnost alkaloidů ve vodné fázi. Po přečištění a spojení obou částí činil zisk sumárního extraktu 87,5 g.

Na základě TLC sumárního etherového výtřepku byla prokázána přítomnost minimálně deseti alkaloidů.

4.3.2 Sloupcová chromatografie

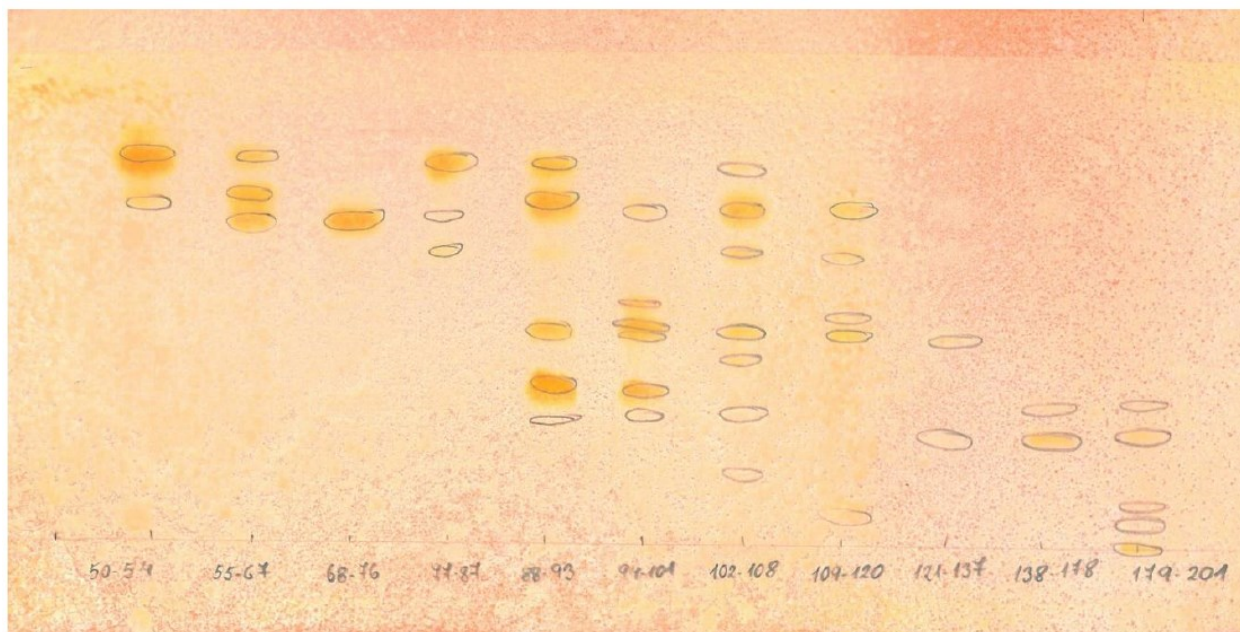
Tuto část přípravy také zpracovaly kolegyně Marcela Šafratová a Dominika Kassemová [102, 103].

Výtřepok byl dále separován sloupcovou chromatografií na jednotlivé frakce, z nichž byly poté izolovány jednotlivé alkaloidy. Prvním krokem byla příprava roztěru. 87,5 g sumárního extraktu rozpuštěného v chloroformu se smíchalo s 350 g oxidu hlinitého deaktivovaného 6 % vody (poměr 4:1). Následovalo odpaření do sucha na vodní lázni a dosušení v exsikátoru. Proběhla eluce stupňovitým způsobem, kde jako stacionární fáze posloužil oxid hlinitý neutrální deaktivovaný 6 % vody v množství 2625 g (poměr 30:1 k množství roztěru). K eluci byla využita směs rozpouštědel, první lékařský benzín s chloroformem (9:1, 17:3, 4:1, 7:3, 3:2, 1:1, 2:3, 1:4), poté chloroform a následně lékařský benzín s ethanolem (3:1, 1:1). Celkem bylo získáno 201 frakcí, u nichž bylo sledováno kontrolní TLC, níže uvedené jako obrázek číslo 9. Na jeho základě

byly eluáty s obsahem stejných alkaloidů spojeny a celkem tak vzniklo 11 frakcí, bližší specifikace v tabulce číslo 10.

Tabulka 10: Výsledky sloupcové chromatografie

Spojené frakce	Mobilní fáze	Hmotnost frakcí (g)
50 – 54	LB + CHCl ₃ (3:2)	0,30
55 – 67		13,89
68 – 76		6,30
77 – 87	LB + CHCl ₃ (3:2, 1:1)	9,60
88 – 93	LB + CHCl ₃ (1:1)	13,59
94 – 101		7,70
102 – 108		1,00
109 – 120		1,46
121 – 137	LB + CHCl ₃ (1:1, 2:3)	2,00
138 – 178	LB + CHCl ₃ (2:3, 1:4), CHCl ₃	8,75
179 – 201	CHCl ₃ , CHCl ₃ + EtOH (3:1, 1:1)	10,90
Celková hmotnost		75.49



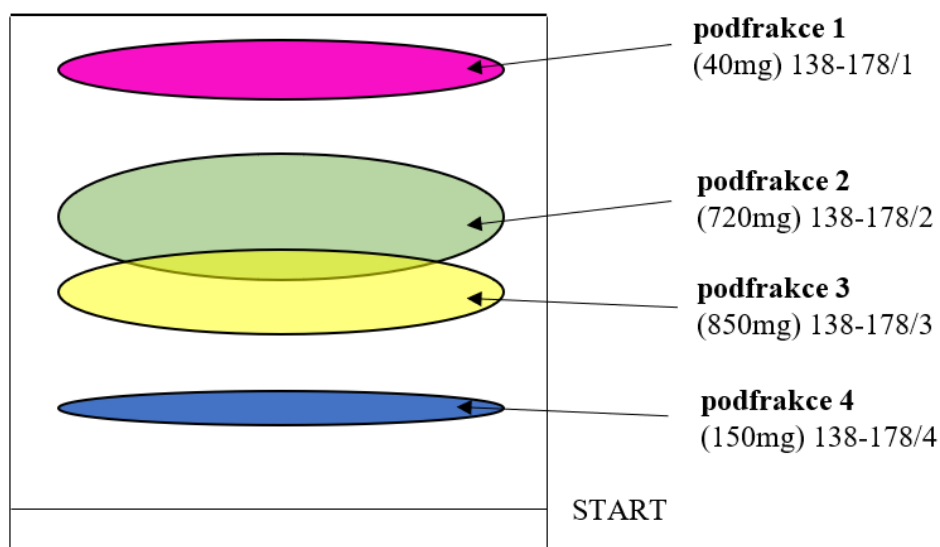
Obrázek 9: Souhrnné TLC získaných frakcí

(adsorbent SiO₂, mobilní fáze – toluen + diethylamin 9:1, 7,5 cm, 1x, UV + Dragendorffovo činidlo)

V rámci mé rigorózní práce byla dále zpracována frakce 138-178.

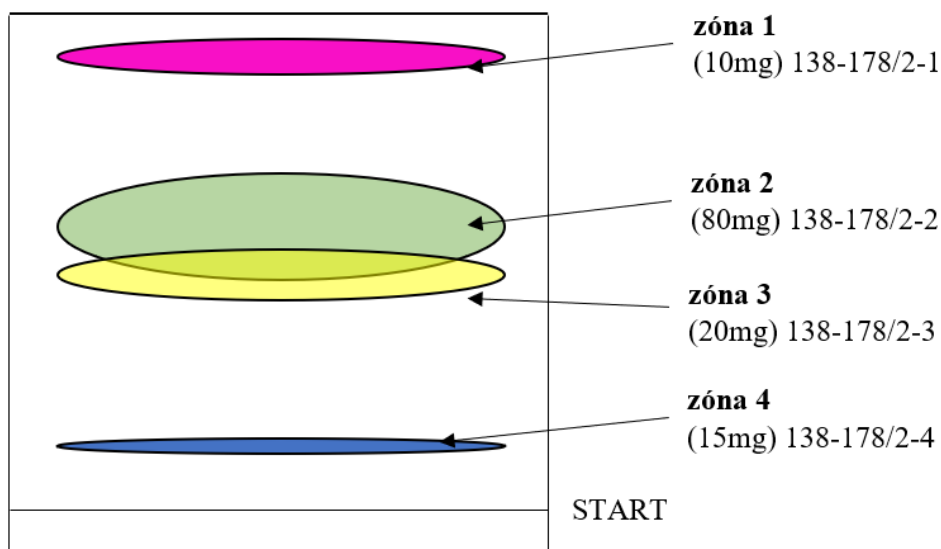
4.3.3 Zpracování frakce 138-178

2 g frakce pod označením 138-178 byly použity pro izolaci alkaloidů v čistém stavu. Pro izolaci byla využita preparativní TLC na litéch vrstvách (hrubé dělení, cca 50 mg směsi děleno na jedné desce) za využití mobilní fáze $To:EtOH:Et_2NH$ (80:15:5, 2x). Byly izolovány čtyři podfrakce označené jako 138-178/1-4. Izolované zóny a izolovaná množství jsou shrnuty na následujícím obrázku číslo 10. Pro další separaci byly vybrány podfrakce 138-178/2 (720 mg) a 138-178/3 (850 mg).



Obrázek 10: Schéma preparativní TLC frakce 138-178
(mobilní fáze – $To:EtOH:Et_2NH$, 80:15:5, 15 x 15 cm, 2 x)

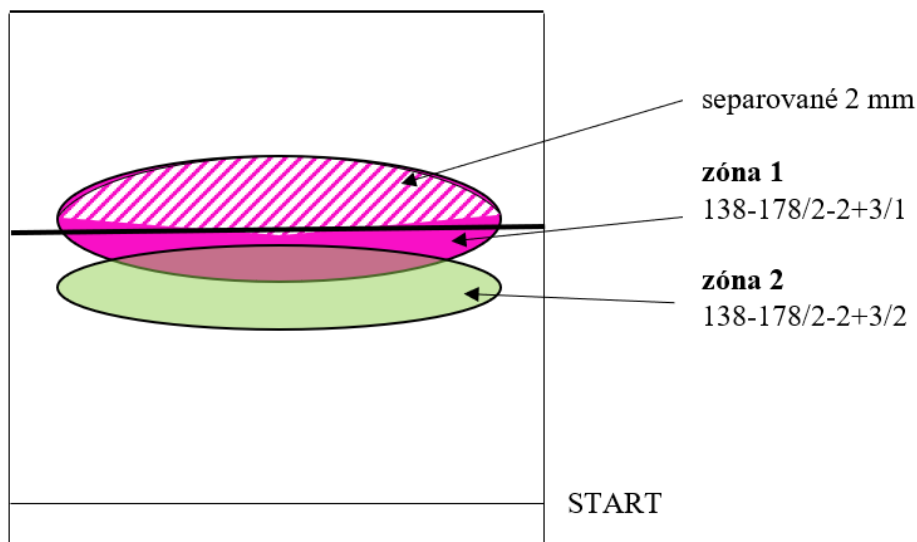
Podfrakce 138-178/2 byla dále separována za využití komerčních desek. Na každou desku bylo nanášeno cca 15 mg dělené směsi. Pro dělení bylo použito 200 mg směsi. Desky byly vyvíjeny v mobilní fázi $To:Et_2NH$ (95:5), každá deska byla vyvinuta 3x. Byly získány čtyři zóny. Izolované zóny a izolovaná množství jsou shrnuty na následujícím obrázku číslo 11.



Obrázek 11: Schéma preparativní TLC zóny 138-178/2

(mobilní fáze – $To:Et_2NH$, 95:5, 10 x 20 cm, 3 x)

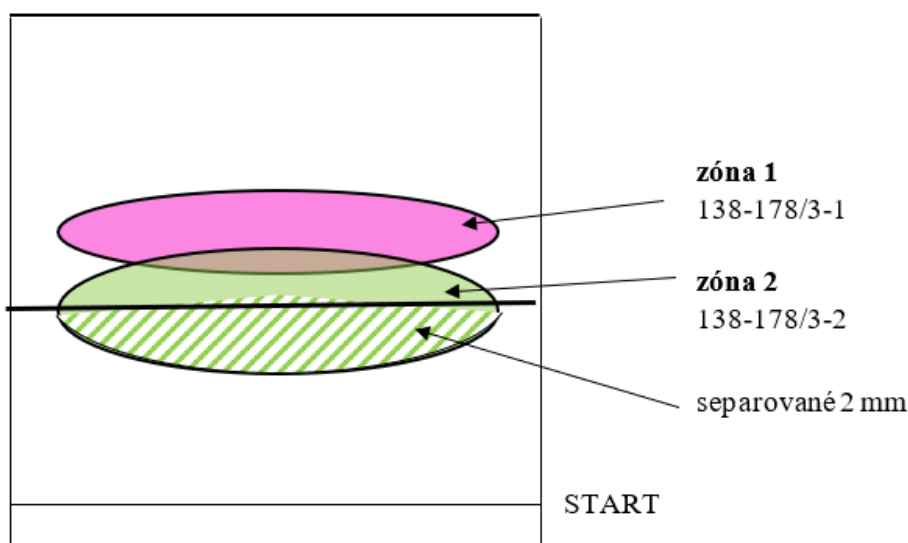
Zóna 138-178/2-2+3 byla dále využita pro izolaci čistého alkaloidu za využití komerčních desek a mobilní fáze $To:cHx:Et_2NH$ (50:45:5, 4x). Vzhledem ke špatné separaci zón 138-178/2-2+3/1+2 byly ze zóny 138-178/2-2+3/1 izolovány pouze horní 2 mm viz obrázek číslo 12, tak aby se podařilo izolovat čistou látku. Po izolaci a promytí směsí $CHCl_3:EtOH$ (1:1) bylo získáno 35 mg bílé amorfni látky označené jako 138-178/A1. Látka byla dále podrobena NMR a MS studiím za účelem identifikace. Látka byla identifikována jako (+)-parfumin.



Obrázek 12: Izolace horních 2 mm zóny 138-178/2-2+3/1

Podfrakce 138-178/3 (850 mg) byla použita pro izolaci druhého alkaloidu v čisté formě za využití komerčních desek a mobilní fáze $To:cHx:Et_2NH$ (50:45:5, 4x). Vzhledem ke špatné separaci zón 138-178/3-1+2 byly ze zóny 138-178/3-2 izolovány pouze spodní 2 mm viz obrázek

číslo 13, tak aby se podařilo izolovat čistou látku. Po izolaci a promytí směsí $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:1) bylo získáno 15 mg bílé amorfni látky označené jako 138-178/A2. Látka byla dále podrobena NMR a MS studiím za účelem identifikace. Látka byla identifikována jako (-)-fumaritin.



Obrázek 13: Izolace spodních 2 mm zóny 138-178/3-2

4.4 Stanovení inhibičních aktivit izolovaných alkaloidů vůči cholinesterázám

4.4.1 Podmínky měření

Byly simulovány podmínky podobné těm v lidském těle. Teplota byla nastavena na 37 °C a využito bylo prostředí fosfátového pufru pH 7,4. Spektrofotometrické měření proběhlo v mikrotitračních destičkách při vlnové délce 436 nm.

4.4.2 Příprava erytrocytárních pouzder

K čerstvě odebrané krvi byl na každých 10 ml přidán vždy 1 ml citrátu sodného. Za použití centrifugy, při rychlosti 4000 otáček za minutu, byla odstředěna plazma s obsahem butyrylcholinesterázy. Erytrocyty přenesené do 50 ml zkumavek byly naříkrát promyty 5mM fosfátovým pufrem s 15mM chloridem sodným při 12000 otáčkách za minutu. Aby došlo k lýze, byly promyté erytrocyty po dobu 10 minut znovu smíchány s 5mM fosfátovým pufrem. Následovala centrifugace po dobu dalších 10 minut při rychlosti 20000 otáček za minutu. Nakonec byly rozložené erytrocyty ještě naříkrát promyty fosfátovým pufrem, a tak byla získána erytrocytární acetylcholinesteráza.

4.4.3 Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (hodnoty IC₅₀)

Ke stanovení IC₅₀ byl využit spektrofotometrický postup dle Ellmana [104]. Estery thiocholinu se používají jako substrát, který je štěpen esterázami na thiocholin a příslušnou kyselinu. Následně, vazbou sulfanylové skupiny thiocholinu na 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinu, vzniká produkt žlutého zbarvení, stanovitelný spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm. Při měření byl sledován nárůst absorpce v průběhu 1 minuty. Pro výpočet hodnot IC₅₀ byla použita nelineární regrese z hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy. Výpočet proběhl v programu GraphPaD (verze 3.02 pro Windows, Graph PaD Software, San Diego, Kalifornie, USA). Výsledky byly porovnány vůči známým hodnotám používaných iAChE – galantaminu a huperzinu A.

4.5 Stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči prolyloligopeptidáze

Tato biologická aktivita byla měřena ve spolupráci s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie Univerzity obrany. Měření prováděla Mgr. Martina Hrabinová, Ph.D.

4.5.1 Podmínky měření

Opět byly simulovány podmínky podobné jako v lidském těle. Teplota byla nastavena na 37 °C a využito bylo prostředí fosfátového pufru pH 7,4. Spektrofotometrické měření proběhlo v mikrotitračních destičkách při vlnové délce 405 nm.

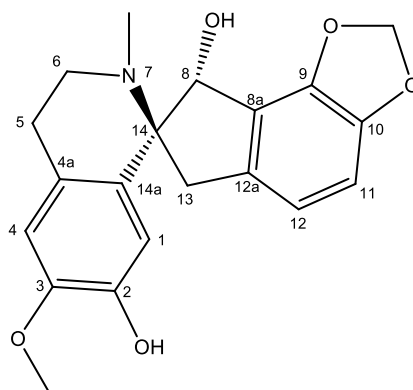
4.5.2 Stanovení prolyloligopeptidázové inhibiční aktivity (hodnoty IC₅₀)

POP, jejíž specifická aktivita byla 0,2 U/ml, byla rozpuštěna v 0,01 M fosfátovém pufru. Zásobní roztoky testovaných látek vznikly jejich rozpuštěním v 10 mM dimethylsulfoxidu. Tyto byly dále dle potřeby ředěny. U slepých vzorků byla použita stejná koncentrace dimethylsulfoxidu. Z-Gly-Pro-p-nitroanilid, který byl rozpuštěn v 40 % 10 mM 1,4-dioxanu, byl použit jako substrát testování inhibiční aktivity. Při každém měření byly nejprve roztoky po dobu 5 minut inkubovány při teplotě 37 °C, teprve poté byl přidán substrát a inkubace probíhala dalších 30 minut. Princip dále spočíval ve spektrofotometrickém určení při inkubaci vzniklého p-nitroanilinu. Jeho množství bylo přímo úměrné aktivitě POP. Inhibiční aktivita testovaných látek (hodnoty IC₅₀) byla stanovena za pomoci programů Microsoft Excel a GraphPaD. Následovalo porovnání získaných hodnot s hodnotou známého inhibitoru POP, přírodního alkaloidu berberinu.

5 VÝSLEDKY

5.1 Strukturní analýza (-)-fumaritinu

Izolovaná látka byla na základě MS a NMR dat a porovnáním dat v literatuře identifikována jako (-)-fumaritin [76].



Obrázek 14: (-)-fumaritin

5.1.1 MS studie (-)-fumaritinu

EI-MS (m/z): 355 (18), 340 (32), 322 (10), 192 (100), 177 (12).

5.1.2 NMR studie (-)-fumaritinu

5.1.2.1 ¹H NMR studie (-)-fumaritinu

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 2.43 (s, H7), 2.59-2.66 (m, H5 β), 3.00-3.07 (m, H5 α , H6 β), 3.25 (d, J = 15.8 Hz, H13 α), 3.37 (d, J = 15.8 Hz, H13 β), 3.73-3.82 (m, H6 α), 3.84 (s, C3-OCH₃), 5.52 (s, H8), 5.93, 5.95 (d, J = 0.9 Hz, N7-CH₃), 6.46 (s, H1), 6.60 (s, H4), 6.68 (d, J = 7.9 Hz, H12), 6.75 (d, J = 7.9 Hz, H11).

5.1.2.2 ¹³C NMR studie (-)-fumaritinu

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 147.4 (C10), 146.1 (C3), 144.1 (C9), 143.9 (C2), 134.2 (C12a), 127.3 (C4a), 126.5 (C14a), 124.3 (C8a), 116.0 (C12), 112.8 (C1), 110.9 (C4), 108.8 (C11), 101.4 (N7-CH₃), 81.8 (C8), 74.5 (C14), 55.8 (C3-OCH₃), 47.2 (C6), 43.4 (C13), 37.8 (N7), 22.9 (C5).

5.1.3 Specifická optická otáčivost (-)-fumaritinu

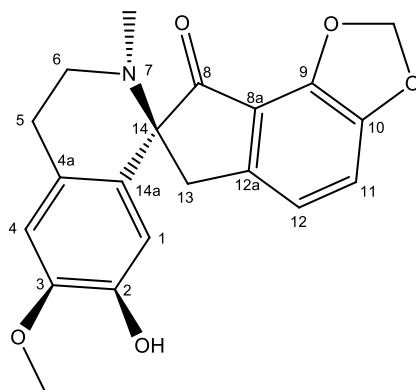
$[\alpha]_D^{25} = -112,6$ ($c = 0,089$, CHCl₃)

5.1.4 Teplota tání (-)-fumaritinu

128-130 °C

5.2 Strukturní analýza (+)-parfuminu

Izolovaná látka byla na základě MS a NMR dat a porovnáním dat v literatuře identifikována jako (+)-parfumin [76, 105].



Obrázek 15: (+)-parfumin

5.2.1 MS studie (+)-parfuminu

EI-MS (m/z): 367 (<1), 353 (14), 338 (25), 324 (100), 294 (12), 266 (13), 250 (14), 177 (13), 135 (12), 103 (12)

5.2.2 NMR studie (+)-parfuminu

5.2.2.1 ¹H NMR studie (+)-parfuminu

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 2.36 (s, H7), 2.82 (m, H6 β), 2.86 (m, H5 α , H5 β), 3.31 (d, J = 17.1 Hz, H13 β), 3.50 (d, J = 17.1 Hz, H13 α), 3.52 (m, H6 α), 3.83 (s, C3-OCH₃), 6.14 (s, -C9-OCH₂O-C10-), 6.29 (s, H1), 6.57 (s, H4), 6.88 (d, J = 7.9 Hz, H12), 7.08 (d, J = 7.9 Hz, H11). ¹³C

5.2.2.2 ¹³C NMR studie (+)-parfuminu

¹³C NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 205.3 (C8)^A, 147.8 (C10), 145.5 (C3), 144.4 (C2), 144.0 (C9), 143.8 (C12a), 130.6 (C14a), 126.3 (C4a), 120.0 (C8a), 118.1 (C12), 114.9 (C11), 110.7 (C1, C4), 103.0 (-C9-OCH₂O-C10-), 70.8 (C14), 55.8 (C3 - OCH₃), 49.2 (C6), 41.3 (C13), 39.3 (N7), 28.8

5.2.3 Specifická optická otáčivost (+)-parfuminu

$[\alpha]_D^{25} = +23,6$ (c = 1,10, CHCl₃)

5.2.4 Teplota tání (+)-parfuminu

118-119 °C

5.3 Inhibiční aktivity

Přehled inhibičních aktivit izolovaných alkaloidů a v praxi používaných standardů jak vůči lidských cholinesterázám, tak vůči POP je uveden níže v tabulce číslo 11 [76, 102, 110].

Tabulka 11: Inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů a standardů

Izolovaný alkaloid	iAChE (IC₅₀ μM)	iBuChE (IC₅₀ μM)	iPOP (IC₅₀ μM)
(-)-Fumaritin	568 ± 57	246 ± 24	250 ± 20
(+)-Parfumin	> 1000	500 ± 57	> 1000
Galantamin*	1.71 ± 0.65	42 ± 1	nestanoveno
Huperzin A*	0.033 ± 0.001	> 1000	nestanoveno
Berberin*	0.72 ± 0.11	31 ± 4	142 ± 21

* standard

6 DISKUSE

Kromě již v terapii Alzheimerovy choroby účinně využívaných inhibitorů acetylcholinesterázy se ukazuje jako slibné zaměřit výzkum budoucích léčivých látek také na možné inhibitory butyrylcholinesterázy a prolylologopeptidázy. Koncentrace butyrylcholinesterázy je především v pozdějších stádiích onemocnění oproti normálnímu stavu výrazně vyšší a tím se také významně podílí na degradaci acetylcholinu [6]. Prolylologopeptidáza se účastní mimo jiné rozkladu některých neuropeptidů, které jsou nezbytné pro procesy učení a paměť. Tím přispívá ke ztrátě kognitivních funkcí [76].

V rámci širšího screeningového studia některých alkaloidních rostlin na Katedře farmaceutické botaniky byl z hlediska inhibičních aktivit vůči acetylcholin- a butyrylcholinesterázám jako perspektivní vytipován i druh *Fumaria officinalis* L. (*Fumariaceae*), zemědělný lékařský. Celkový ethylacetátový alkaloidní extrakt *Fumaria officinalis* vykazoval inhibiční aktivity $IC_{50}^{AChE} = 39.23 \pm 1.96 \mu\text{g/ml}$ a $IC_{50}^{BuChE} = 40.32 \pm 1.08 \mu\text{g/ml}$. Tyto hodnoty se jevily jako zajímavé, z tohoto důvodu byl tento rostlinný druh vybrán pro podrobnou fytochemickou studii, za účelem izolace co nejširšího spektra v čistém stavu.

Cílem této práce bylo zpracovat jednu z frakcí alkaloidního extraktu *Fumaria officinalis*, a to frakci 138-178. Na základě TLC s využitím detekce Dragendorffovým činidlem byla ve zkoumané frakci prokázána přítomnost alkaloidů. Pomocí preparativní TLC a následné krystalizace se podařilo získat dvě látky v čisté formě v takovém množství, které umožnilo jejich strukturní analýzu a následnou identifikaci a zároveň provedení testů jejich biologické aktivity.

Látky byly po porovnání jejich naměřených a dosud publikovaných fyzikálních charakteristik – MS, NMR spekter, specifické optické otáčivosti a teploty tání, identifikovány jako (-)-fumaritin a (+)-parfumin [76, 105].

Oba izolované alkaloidy patří strukturně k spirobenzylisochinolinům. Obsah (-)-fumaritinu byl prokázán řadou dřívějších studií u různých dalších druhů rodu *Fumaria* např. u *F.bastardii* [106], *F.macrosepala* [107], *F.agraria*, *F.carpeolata*, *F.densiflora*, *F.muralis*, *F.parviflora* nebo *F.vaillantii* [93]. Stejně tak se výskyt (+)-parfuminu zdaleka neomezuje jen na druh *F.officinalis*, izolován byl také z extraktů *F.macrosepala* [107], *F.schleicheri* [108], *F.parviflora* [109], *F.agraria*, *F.carpeolata*, *F.densiflora*, *F.muralis* nebo *F.vaillantii* [93]. Oba alkaloidy byly také stanoveny jako obsahové látky některých druhů rodu *Corydalis* (*Papaveraceae*). (-)-Fumaritin se konkrétně nachází u *C.caucasica* [111], (+)-parfumin u *C.solida* [112] a oba pak u *C.rutifolia* [113].

Naměřené hodnoty inhibiční aktivity obou získaných látek vůči cholinesterázám byly vyjádřeny jako IC_{50} (inhibiční koncentrace, při níž klesá aktivita daného enzymu o polovinu) a porovnány se známými hodnotami standardů, zde použitého galantaminu a huperzinu A. Galantamin je selektivním inhibitorem acetylcholinestrázy s $IC_{50 \text{ AChE}} = 1.71 \pm 0,65 \mu\text{M}$, vůči butyrylcholinesteráze vykazuje tato látka nevýraznou inhibiční aktivitu - $IC_{50 \text{ BuChE}} = 42 \pm 1 \mu\text{M}$. Huperzin A neinhibuje butyrylcholinesterázu dokonce vůbec ($IC_{50 \text{ BuChE}} > 1000 \mu\text{M}$), je však velmi silným inhibitorem acetylcholinestrázy - $IC_{50 \text{ AChE}} = 0.033 \pm 0,001 \mu\text{M}$. Ze stanovených hodnot (-)-fumaritinu - $IC_{50 \text{ AChE}} = 568 \pm 57 \mu\text{M}$, $IC_{50 \text{ BuChE}} = 246 \pm 24 \mu\text{M}$ a (+)-parfuminu, který je vůči acetylcholinesteráze neaktivní ($IC_{50 \text{ AChE}} > 1000 \mu\text{M}$), $IC_{50 \text{ BuChE}} = 500 \pm 57 \mu\text{M}$ je zjevné, že ani jeden z alkaloidů nedosahuje aktivit referenčních látek. Izolované struktury tedy nelze považovat za nositele inhibiční aktivity sumárního extraktu.

V rámci studia biologické aktivity byly oba alkaloidy dále podrobeny měření jejich potenciální inhibiční aktivity vůči prolyloligopeptidáze. K porovnání naměřených hodnot $IC_{50 \text{ POP}}$ izolovaných látek byla použita známá hodnota standardu berberinu. (-)-Fumaritin s hodnotou $IC_{50 \text{ POP}} = 250 \pm 20 \mu\text{M}$ vykazovat asi 1,5krát nižší inhibiční potenciál než berberin ($IC_{50 \text{ POP}} = 142 \pm 21 \mu\text{M}$), (+)-parfuminu je vůči POP zcela neaktivní ($IC_{50 \text{ POP}} > 1000 \mu\text{M}$).

Závěrem lze shrnout, že ani jeden z izolovaných alkaloidů není bohužel reálně využitelný jako účinná látka v terapii Alzheimerovy choroby.

ABSTRAKT

Mazel Tonarová M.: Biologicky aktivní metabolity rostlin VIII. Alkaloidy *Fumaria officinalis* L. a jejich biologická aktivita. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky, Hradec Králové, 2021. Rigorózní práce.

Na základě již dříve provedené sloupcové chromatografie diethyletherového extraktu *Fumaria officinalis* L bylo připraveno jedenáct frakcí k dalšímu zpracování. Preparativní TLC frakce 138-178 a následnou krystalizací byly izolovány dva alkaloidy, které se podařilo na základě jejich strukturní analýzy – pomocí MS a NMR spekter, specifické optické otáčivosti a teploty tání identifikovat jako (-)-fumaritin a (+)-parfumin. Alkaloidy byly následně testovány za účelem zjištění jejich inhibičních aktivit vůči prolyloligopeptidáze, acetylcholin- a butyrylcholinesterázám. Získané hodnoty IC_{50} byly porovnány s použitými standardy.

(-)-Fumaritin ani (+)-parfumin nevykazují v porovnání s galantaminem a huperzinem A významné inhibiční aktivity vůči oběma cholinesterázám ($IC_{50} \geq 200 \mu M$). Prolyloligopeptidázu (+)-parfumin neinhibuje vůbec, aktivita (-)-fumaritinu je ve srovnání s berberinem mírná (taktéž $IC_{50} \geq 200 \mu M$).

Klíčová slova: *Fumaria officinalis* L, isochinolinové alkaloidy, (-)-fumaritin, (+)-parfumin, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, prolyloligopeptidáza, izolace, Alzheimerova choroba.

ABSTRACT

Mazel Tonarová M.: Biologically active metabolites of plants VIII. Alkaloids of *Fumaria officinalis* L. and their biological activity. Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové. Department of Pharmaceutical Botany, Hradec Králové, 2021. Rigorosum thesis.

Eleven fractions were prepared for further processing, this was based on previously performed column chromatography of diethyl ether extract of *Fumaria officinalis* L. Two alkaloids were isolated by using preparative TLC of fraction 138-178, followed by crystallization. The alkaloids were identified based on their structural analysis – using MS and MNR spectrum, specific optical rotation and melting point as (-)-fumaritine and (+)-parfumine. Both alkaloids were tested for their inhibitory activities against prolyl oligopeptidase, acetylcholine- and butyrylcholinesterases. The measured IC₅₀ values were compared with the known standard values. Neither (-)-fumaritine nor (+)-parfumine showed more significant inhibitory activities against both cholinesterases compared to galantamine and huperzine A (IC₅₀ ≥ 200 μM). (+)-Parfumine does not inhibit the prolyl oligopeptidase at all, the inhibition activity of (-)-fumaritine is really mild compared to berberine (also IC₅₀ ≥ 200 μM).

Key words: *Fumaria officinalis* L, isoquinoline alkaloids, (-)-fumaritin, (+)-parfumin, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, prolyl oligopeptidase, isolation, Alzheimer's disease.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] JIRÁK R. (2008) Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*, 9(4), 240-244.
- [2] SHEARDOVÁ K. (2010) Alzheimerova nemoc a zapojení pečovatele do boje o kvalitu života. *Neurologie pro praxi*, 11(3), 172-176.
- [3] JIRÁK R. (2009) Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Praktické lékárenství*, 5(4), 176-178.
- [4] VLČEK J, FIALOVA D, VYTRÍŠALOVÁ M. (2010) *Klinická farmacie I*. Praha: Grada.
- [5] LENNECKE K. (2018) *Therapie-Profil Orientiert an den Leitlinien der Fachgesellschaften*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- [6] REKTOROVÁ I. (2002) Terapie demencí. *Neurologie pro praxi*, 4, 260-263.
- [7] JIRÁK R. (2004) Duševní poruchy ve stáří. *Psychiatrie pro praxi*, 6, 336-338.
- [8] JIRÁK R. (2002) Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*, 2, 101-105.
- [9] JIRÁK R. (2007) Poruchy chování u pacientů s Alzheimerovou chorobou. *Neurologie pro praxi*, 8(5), 295-298.
- [10] KOUKOLÍK F, JIRÁK R. (1998) *Alzheimerova nemoc a další demence*. Praha: Grada.
- [11] VYHNÁLEK M, BARTOŠ A, DOSTÁL V, FRANKOVÁ V, HOLMEROVÁ I, LACZÓ J, LÍNEK V, REKTOROVÁ I, RESSNER P, RUSINA R, SHEARDOVÁ K, VALIŠ M, HORT J. (2011) Diagnostikujeme a léčíme demence správně a včas? Výsledky průzkumu ve světle nových doporučení. *Neurologie pro praxi*, 12(5), 352-358.
- [12] FRANKOVÁ V. (2016) Optimalizace léčby Alzheimerovy choroby. *Praktické lékárenství*, 12(2), 50-53.
- [13] SHEARDOVÁ K, HORT J, RUSINA R, BARTOŠ A, LÍNEK V, RESSNER P, REKTOROVÁ I. (2009) Doporučené postupy pro terapii Alzheimerovy nemoci a ostatních demencí. *Nerurologie pro praxi*, 10(1), 28-31.
- [14] SUCHOPÁR J. (2018) *Compenidum. Léčiva používaná v podmínkách ČR*. Praha: Panax Co.
- [15] MARTIN J, KRŠKOVÁ Z, DUŠEK J. (2011) Huperzine A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Praktické lékárenství*, 7(1), 39-41.
- [16] HROUDOVÁ J. (2017) Výzkum nových léčiv u Alzheimerovy choroby. *Praktické lékárenství*, 13(2e).
- [17] KHARE CP. (2007) *Indian Medicinal Plants: An Illustrated Dictionary*. Berlin/Heidelberg: Springer Science-Business Media, LLC.
- [18] SAJJAD S, BABAEIMARZANGOU, AGHAJANSHAKERI S, ANOUSHEH D, MIKAILI P. (2015) Ethno-botanical, Bioactivities and Medicinal Mysteries of *Fumaria officinalis* (Common Funitory). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 5(11).
- [19] OPLETAL L, ŠIMERDA B. (2012) *Rostliny s Antinutričními a Toxickými látkami vyskytující se potenciálně v pícninách v ČR*. Praha-Uhřetěves: Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.
- [20] AKBAR S. (2020) *Springer Cham*, 947-953.

- [21] GILBERT-CARTER H. (1964) *Glossary of the British flora*. místo neznámé: CUP Archive.
- [22] Al-SNAFI AE. (2020) Constituents and pharmacology of *Fumaria officinalis*- A review. *Constituents and Pharmacology of Fumaria Officinalis*, **10**(1), 17-25.
- [23] LINDLEY J, MOORE T. (1870) *The Treasury of Botany: a Popular Dictionary of the Vegetable Kingdom*. *Biodiversity Heritage Library*.
- [24] APG. (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **14**(14), 399-436.
- [25] CHASE MW, CHRISTENHUSZ MJM, FAY MF, BYNG JW, JUDD WS, SOLTIS DE, MABBERLEY DJ, SENNIKOV AN, SOLTIS PS, STEVENS PF. (2016) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **181**(1), 1-20.
- [26] JACKSON BD. (1893) *Index Kewensis 48l*. London: Oxford University Press.
- [27] HEGI G, HANSER C. (1920) *Illustrierte Flora von Mittel-Europa. part IV/1 ed*. München: Lehmann, 49.
- [28] DONCHEVA T, YORDANOVA G, VUTOV V, KOSTOVAN, PHILIPPOV S. (2016) Comparative study of alkaloid pattern of four Bulgarian *Fumaria* species. *Natural Product Communications*, **11**(2), 211-212.
- [29] ES-MAIL A. (2018) *Fumaria Parviflora* - A Review. *Indo American Journal of Medical Sciences*, **30**(3), 1728-1738.
- [30] SAUNDERS JK, BELL RA, CHEN CY, MACLEAN DB. (1968) The structures of three alkaloids from *Fumaria officinalis* L. *Canadian Journal of Chemistry*, **46**(17), 2873-2875.
- [31] Allan M. (1978) *Weeds: The Unbidden Guests in Our Gardens*. New York: Viking Adult.
- [32] HEYWOOD VH, RICHARDSON INK, STEARNS ET. (1978) *Flowering plants of the world*. New York: Oxford university press, 336.
- [33] HOLM L, DOLL J, HOLM E, PANCHO JV, HERBERGER JP. (1997) *World weeds: natural histories and distribution*. New York: John Wiley & Sons.
- [34] MITICH LW. (1991) Intriguing World of Weeds. *Weed Technology*, **5**(4), 913-915.
- [35] MASCLEF A. (1891) *Atlas des plantes de France*.
- [36] RATIER FS. (1827) *Pharmacopée française, ou Code des médicaments*. místo neznámé: Baillière.
- [37] -. (1989) *Codex medicamentarius gallicus*. místo neznámé: Pharmacopée française, rédigé par ordre du Gouvernement.
- [38] -. (1976) *British Herbal Pharmacopoeia-Part One*. British Herbal Medicine Association.
- [39] DIOSCORIDE P. (1829) *De Materia Medica*.
- [40] DELAVEAU P. (1980) Fumeterre. *Les actualités pharmaceutiques*, **172**, 33-34.
- [41] GRUENWALD JT, BRENDLER T, JAENICKE C, LAGOW B. (2007) *PDR for Herbal Medicines*. 4th ed. Thomson PDR, Montvale, 571-572.
- [42] -. (2011) Assessment Report on *Fumaria officinalis* L., herba. *E.M. AGENCY*, 1-16.

- [43] BLUMENTHAL MA, GOLDBERG A, BRINCKMANN J. (1998) The complete German edition E monographs: Therapeutic Guide to Herbal medicine. *Integrative medicines Communication*.
- [44] SOUSEK J, VALESOVA M. (1995) Obsahové látky rodu *Fumaria*. *Chemické listy*, **89**, 489.
- [45] RAAFAT KM, EL-ZAHABY SA. (2020) Niosomes of active *Fumaria officinalis* phytochemicals: antidiabetic, antineuropathic, anti-inflammatory, and possible mechanisms of action. *Chinese Medicine*, **15**(40), 1-22.
- [46] PREININGER VRH, MANSKE F. (1975) *Editor*, 207-61.
- [47] DULGER B, GONUZ A. (2004) Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine. *Asian J Plant Sci*, **3**, 104-7.
- [48] DERMARDEROSIAN A, BEUTLER JA. (2005) *The Review of Natural Products*. United States: Facts & Comparisons, 4th ed. 458-60.
- [49] MROWIETZ U, CHRISTOPHERS E, ALTMAYER P. (1998) Treatment of psoriasis with fumaric acid esters: results of a prospective multicentre study. German Multicentre Study. *Br J Dermatol*, **138**, 456-60.
- [50] SHARMA UR, GOLI D, SURENDRA, UDAY R. (2015) Evaluation of neuropharmacological activity of *Fumaria officinalis* Linn. by study of muscle relaxants activity on experimental animals. *International Journal of Pharmacy and Engineering*, **3**, 543-551.
- [51] PALTINEAN R, MOCAN A, VLASE, GHELDIU AM, CRISAN G, IELCIU I, VOSTINARU O, CRISAN O. (2017) Evaluation of Polyphenolic Content, Antioxidant and Diuretic Activities of Six *Fumaria* Species. *Molecules*, **22**(4).
- [52] REYNIER M. (1977) Effect of *officinalis Fumaria* extract on smooth muscle. *Travaux de la Societe de Pharmacie de Montpellier*, **37**(2), 85-100.
- [53] LAGRANGE E, AUROUSSEAU M. (1973) Effect of spray-dried product of *Fumaria officinalis* on experimental gall bladder lithiasis in mice. *Ann Pharm Fr*, **31**, 357-362.
- [54] FABLET JR, COLUIN, GEFFROY Y. (1968) Action therapeutiques du *Fumaria officinalis* dans le syndrome hepatobiliaires et les migraines. *Actualite Therap*, 3376-3379.
- [55] KOPP H. (1979) Choleretische Wirkung und Verträglichkeit von Chol-Kugeletten bei Cholezystopathien. *Therapiewoche*, **29**, 5645-5655.
- [56] ATTARD E, PACIONI P. (2004) Pharmacological Testing of Maltese Medicinal Plants.
- [57] GORBUNOV NP, MOLOKHOVA LG, SUKHANOV AA. (1977) Preparation and the arrhythmic activity of the total alkaloids of *Fumaria officinalis* L. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*, **11**, 56-58.
- [58] ZHANG R, GUO Q, KENNELLY EJ, LONG CH, CHAI X. (2020) Diverse alkaloids and biological activities of *Fumaria* (*Papaveraceae*): An ethnomedicinal group. *Fitoterapia*, 1-18.
- [59] SENER B. (2002) Molecular diversity in the alkaloids of turkish *Fumaria* L species. *Acta Pharmaceutica Turcica*, 205-212.
- [60] PALTINEAN R, TOIU A, WAUTERS JN, FREDERICH M, TITS M, ANGENOT L, TAMAS M, CRISAN G. (2016) Phytochemical analysis of *Fumaria officinalis* L. (*Fumariaceae*). *Farmacia*, **64**, 3.

- [61] MANSKE RHF, ŠANTAVÝ F. (1970) The Alkaloids. *Academic press*, **12**, 637.
- [62] SIDDIQUI AA, KHAN SA. (1997) Alkaloidal Content of Genus *Fumaria*. *Asian Journal of Chemistry*, **9**(4), 579-582.
- [63] RATHI A, SRIVASTAVA AK, SHIRWAIKAR A, RAWAT AKS, MEHROTRA S. (2008) Hepatoprotective potential of *Fumaria indica* Pugsley whole plant extracts, fractions and an isolated alkaloid protopine. *Phytomedicine*, **15**, 470-477.
- [64] SENER B, TEMIZER H. (1991) New Alkaloids of Some Turkish Medicinal Plants. *Bioorganic Chemistry in Healthcare and Technology*.
- [65] HILAL SH, ABOUTABL EA, YOUSSEF SAH, SHALABY MA, SOKKAR NM. (1989) Alkaloidal content and certain pharmacological activities of *Fumaria parviflora* Lam growing in Egypt. *Plantas Medicinales et Phytoterapie*, **23**(2), 109-123.
- [66] MOLOKHOVA LG, SUSLINA ML, DATSKOVSKII SB, FIGURKIN BA. (1973) Antiinflammatory effect of fumitory alkaloids. *Trudy Permskogo Gosudarstvennogo Meditsinskogo Instituta*, **118**, 26-8.
- [67] BOUGOFFA-SADAoui K, GONTIER E, TELLIEZ MS, LEQUART-PILLON M, OUADID-AHIDOUCH H, MAIZA-BENABDESSELAM F. (2016) Characterization of isoquinolin alkaloids from *Fumaria agraria* and evaluation of their antiproliferative activity against human breast cancer cell lines. *Phytotherapie*, **14**(3), 188-195.
- [68] HUNG TM, THUONG PT, NHAN NT, MAI NTT, QUA TL, CHOI JS, WOO MH, MIN BS, BAE K. (2011) Cholinesterase inhibitory activities of alkaloids from *Corydalis tuber*. *Natural Product Sciences*, **17**, 108-112.
- [69] CHOI SY, BANG MH, LEE EJ, KWON OS, KANG TC, LEE YH, RHO YD, BAEK NI. (2003) Human brain GABA-T (γ -aminobutyric acid transaminase) inhibitory alkaloids from *Corydalis tuber*. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, **46**, 67-72.
- [70] SU Y, LI S, LI N, CHEN L, ZHANG J, WANG J. (2011) Seven alkaloids and their antibacterial activity from *Hypocoum erectum* L. *Journal of Medicinal Plants*, **5**, 5428-5432.
- [71] WANG GX, ZHOU Z, JIANG DX, HAN J, WANG JF, ZHAO LW, LI J. (2010) In vivo anthelmintic activity of five alkaloids from *Macleaya microcarpa* (Maxim) Fedde against *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*. *Veterinary Parasitology*, **171**, 305-313.
- [72] MANSKE RH, MCCAULEY EL, REYNOLDS AK. (1972) The isoquinoline alkaloids. *Academic press*, **5**, 559.
- [73] MANSKE RHF, JEFFS PW. (1967) The Alkaloids. *Academic press*, **9**, 589.
- [74] WANGCHUK P, KELLER PA, PYNE SG, WILLIS AC, KAMCHONWONGPAISAN S. (2012) *Journal of Ethnopharmacology*, **143**(1), 310.
- [75] SADRIDDIN FS, REZHEPOV Z. (1983) Relation between chemical structure and sedative activity of derivatives isoquinoline alkaloids. *Chemical Abstract*, **98**, 83240.
- [76] CHLEBEK J, NOVAK Z, KASSEMOVA D, SAFRATOVA M, KOSTELNIK J, MALY L, LOCAREK M, OPLETAL L, HOSTALKOVA A, HRABINOVA M, KUNES J, NOVOTNA P, URBANOVA M, NOVAKOVA L, MACAKOVA K, HULCOVA D, SOLICH P, CONCEPCION PEREZ M, JUN D, CAHLIKOVA L. (2016) Isoquinoline Alkaloids from *Fumaria officinalis* L. and Their Biological Activities Related to Alzheimer's Disease. *Chemistry and Biodiversity*, **13**(1), 91-99.

- [77] VRANCHEVA R, IVANOV I, ANEVA I, DINCHEVA I, BADJAKOV I, PAVLOV A. (2016) Alkaloid profiles and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Fumaria* species from Bulgaria. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, **71**, (1-2), 9-14.
- [78] ORHAN I, OZCELIK B, KARAOGLU T, SENER B. (2017) Antiviral and antimicrobials profiles of selected isoquinoline alkaloids from *Fumaria* and *Corydalis* species. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, **62**, 19-26.
- [79] LEE JW, IWAHASHI A, HASEGAWA SI, YONEZAWA T, JEON WB, CHA BY, NAGAI K, WOO JT. (2012) Coptisine inhibits RANKL-induced NF- κ B phosphorylation in osteoclast precursors and suppresses function through the regulation of RANKL and OPG gene expression in osteoblastic cells. *Journal of Natural Medicines*, **66**, 8-16.
- [80] ZHU J, CEN X, CHEN X, LI X, CHEN Z, HE F, LI P. (2011) Synergy hypoglycemic activity of berberine alkaloids. . *Shizhen Guoyi Guoyano, Chemical Abstracts*, **156**, 248543.
- [81] JUNG H, YOKOZAWA MB, LEE T, KIM J.H, CHOIY JS. (2009) Anti-Alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis* rhizoma alkaloids. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **32**, 1433-1438.
- [82] KONG WJ, ZHAO YL, XIAO XH, LI ZL, JIN C, LI HB. (2009) Investigation of the anti-fungal activity of coptisine and *Candida albicans* growth by microcalorimetry combined with principal component analysis. *Journal of Applied Microbiology*, **107**, 1072-1080.
- [83] BERKOV S, BASTIDA J, NIKOLOVA M, VILADOMAT F, CODINA C. (2008) Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts. *Phytochemical Analysis*, **19**(5), 411-419.
- [84] DE SOUSA FALCAO H, LEITE JA, BARBOSA-FILHO JM, DE ATHAYDE-FILHO PF, DE OLIVERIA CHAVES MC, MOURA MD, FERREIRA AL, DE ALMEIDA ABA, SOUZA-BRITO ARM, DE FATIMA FORMIG MELO DINIZ M, BATISTA LM. (2008) Gastric and Duodenal Antiulcer Activity of Alkaloids. *Molecules*, **13**, 3198-3223.
- [85] AL-GHAZZAWI A, ABU ZARGA M, ABDALLA S. (2020) Chemical constituents of *Fumaria densiflora* and the effects of some isolated spirobenzylisoquinoline alkaloids on murine isolated ileum and perfused heart. *Natural Product Research*, **34**(8), 1180-1185.
- [86] SINGH RA, SINGH UP, TRIPATHI VK, ROY R, PANDEY VB. (1997) Effect of *Fumaria indica* stem alkaloids on conidial germination of some fungi. *Oriental Journal of Chemistry*, **13**(2), 177-180.
- [87] SOUSEK J, VAVRECKOVA C, PSOTOVA J, ULRICHOVA J, SIMANEK V. (1999) Antioxidant and antilipoperoxidant activities of alkaloid and phenolic extracts of eight *Fumaria* species. *Acta Horticulturae*, **501**, 239-244.
- [88] RICE HV. (1938) Pharmacological actions of corlumine. *Journal of Pharmacology*, **63**, 329-334.
- [89] SHAMMA M. (1972) The isoquinoline alkaloids. *Academic press, London, New York*, 594.
- [90] REYNOLDS AK, RANDALL LO. (1957) Morphine and related drugs. *University of Toronto press*, 393.

- [91] MISÍK V, BEZÁKOVÁ L, MÁLEKOVÁ L, KOSTÁLOVÁ D. (1995) Lipoxygenase inhibition and antioxidant properties of protoberberine and aporphine alkaloids isolated from *Mahonia aquifolium*. *Planta Medica*, **61**(4), str.372-373.
- [92] IVANOV IG, VRANCHEVA RZ, MARCHEV AS, PETKOVA NT, ANEVA IY, DENEV PP, GEORGIEV VG, PAVLOV AI. (2014) Antioxidant activities and phenolic compounds in Bulgarian *Fumaria* species. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **3**(2), 296-306.
- [93] SOUSEK J, GUEDON D, ADAM T, BOCHORAKOVA H, TABORKSA E, VALKA I, SIMANEK V. (1999) Alkaloids and organic acids content of eight *Fumaria* species. *Phytochemical Analysis*, **10**(1), 6-11.
- [94] SOUSEK J, ADAM T, BOCHORAKOVA H, TABORSKA E, SIMANEK V. (1998) HPLC a GC-MS analýza alkaloidů a kyselin v druzích rodu *Fumaria*. *Česká a slovenská farmacie*, **47**(1), 36-39.
- [95] CHANG WS, CHANG YH, LU FJ, CHIANG HC. (1994) Inhibitory effects of phenolics on xanthine oxidase. *Anticancer Research*, **14**(2A), 501-506.
- [96] LARANJINHA LA, ALMEIDA LM, MADEIRA VM. (1994) Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochemical pharmacology*, **48**, 487-494.
- [97] KITTS DD, WIJEWICKREME A. (1994) Effect of dietary caffeine and chlorogenic acids on in vivo xenobiotic enzyme systems. *Plant Foods for Human Nutrition*, **45**, 287-298.
- [98] ORTIZ DE URBINA JJ, MARTIN ML, SEVILLA MA, MONTERO MJ, CARRON IR, SAN ROMAN L. (1990) Antispasmodic activity on rat smooth muscle of polyphenol compounds caffeic and protocatechuic acid. *Phytotherapy Research*, **4**, 71-76.
- [99] CZOK G, MIDANI W, FINKE RI. (1972) Modification of choleresis and intestinal motility by phenols and phenol carbonic acids. *Ernahrung Swiss Suppl*, **14**, 68-77.
- [100] ISMAIL IN, COLLINS P, ROGERS S, KIRBY B, LALLY A. (2014) Drug survival of fumaric acid esters for psoriasis: a retrospective study. *British Journal of Dermatology*, **171**(2), 397-402.
- [101] HAGHIKIA A, LINKER R, GOLD R. (2014) Fumaric acid as therapeutic agent for multiple sclerosis. *Nervenarzt*, **85**(6), 720.
- [102] SAFRATOVA M. (2013) Biologicky aktivní metabolity rostlin. 10. Alkaloidy *Fumaria officinalis* L. a jejich biologická aktivita. *Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova*, 41–45.
- [103] KASSEMOVA D. (2013) Biologicky aktivní metabolity rostlin. 9. Alkaloidy *Fumaria officinalis* L. a jejich biologická aktivita. *Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova*, 32–34.
- [104] ELLMAN GL, COURTNEY KD, ANDRES V, FEATHERSTONE RM. (1961) A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, **7**, 88–95.
- [105] SEGER C, STURM S, STRASSER E-M, ELLMERER E, STUPPNER H. (2004) ¹H and ¹³C NMR signal assignment of benzyloisoquinoline alkaloids from *Fumaria officinalis* L. (Papaveraceae). *Magnetic Resonance in Chemistry*, **42**, 882–886.
- [106] KUCUKBOYACI N, FUNDA B, SENER B, KUTNEY JP, STOYNOV N. (1998) Isoquinoline alkaloids from *Fumaria bastardii*. *Natural Product Sciences*, **4**(4), 257–262
- [107] CASTEDO L, PERALTA A, SAA JM, SUAU R. (1987) Alkaloids from *Fumaria macrosepala*. *Quimica Organica y Bioquimica*, **83**(1), 119–120.

- [108] KIRYAKOV KH, MARDIROSYAN Z, PANOV P. (1980) Alkaloids from *Fumaria schleicheri* Soy-Will. *Doklady Bolgarskoi Akademii Nauk*, **33**(10), 1377–1379.
- [109] HUSSAIN SF, MINARD RD, FREYER AJ, SHAMMA M. (1981) New alkaloids from *Fumaria parviflora*. *Journal of Natural Products*, **44**(2), 169–178.
- [110] KOHELOVA E, MARIKOVA J, KORABECNY J, HULCOVA D, KUCERA T, JUN D, CHLEBEK J, JENCO J, SAFRATOVA M, HRABINOVA M, RITOMSKA A, MALANIK M, PERINOVA R, BREITEROVA K, KUNES J, NOVAKOVA L, OPLETAL L, CAHLIKOVA L. (2021) Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) and their implication to Alzheimer's disease: Isolation, structural elucidation and biological activity. *Bioorganic Chemistry*, **107**, 104567.
- [111] SENNER B. (1989) Spirobenzylisoquinoline Alkaloids from *Corydalis caucasica*. *International Journal of Crude Drug Research*, **27**(3), 161–166.
- [112] SENNER B, TEMIZER H. (1991) Chemical studies on the minor isoquinoline alkaloids from *Corydalis solida* subsp. *Brachyloba*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, **13**(1), 63–66.
- [113] SENNER B. (1988) Minor alkaloids of *Corydalis rutifolia* (Sibth. and Sm.) D.C. subsp. *kurdica* Cullen and Davis of Turkish origin. *International Journal of Crude Drug Research*, **26**(3), 155–159.