

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



VYUŽITÍ SEPARAČNÍCH TECHNIK VE
FYTOCHEMICKÉ ANALÝZE

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce RNDr. Jaroslav Jenčo, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové, dne 26. 8. 2021

.....

Simona Víchová

PODĚKOVÁNÍ

Velmi ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli RNDr. Jaroslavovi Jenčovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, cenné rady, poskytnuté materiály, vynaložený čas a trpělivost. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Elišce Kohelové za obětavou pomoc a praktické rady během práce v laboratoři. Dále bych ráda poděkovala doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a PharmDr. Janě Křoustkové, Ph.D. za analýzu a interpretaci NMR spekter a PharmDr. Daniele Hulcové, Ph.D. za stanovení inhibičních aktivit vůči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze. Zároveň bych chtěla poděkovat celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky za vytvoření příjemného pracovního prostředí a možnosti zde diplomovou práci vypracovat. V neposlední řadě děkuji celé své rodině za její podporu.

Tato práce vznikla za podpory projektu SVV UK 260 548 a OPVVV 02_16_017:CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002682: Modernizace laboratoře buněčných interakcí s látkami přírodního původu (MOLABI), MŠMT ČR/Univerzita Karlova v Praze.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické botaniky

Kandidát: Simona Víchová

Školitel: RNDr. Jaroslav Jenčo, Ph.D.

Název diplomové práce: Využití separačních technik ve fytochemické analýze

Alkaloidní extrakt získaný z nati s nezralými tobolkami z rostliny *Papaver rhoeas* L. byl podroben fytochemické studii. Sumární extrakt byl rozdělen na jednotlivé frakce pomocí Flash chromatografie. Po provedení biologických testů inhibičních aktivit vůči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze byla vybrána frakce PPR-11 a PPR-12, která vykazovala nejvyšší aktivitu vůči butyrylcholinesteráze ($95,55 \pm 0,96$ a $97,03 \pm 0,79$ % inhibice butyrylcholinesterázy při 50 $\mu\text{g/ml}$). Spojená frakce PPR 11-12 byla purifikována pomocí preparativní chromatografie na jednotlivé podfrakce, které byly přečištěny pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie. Z podfrakce PPR 11-12Fr#8-A byla získána monokomponentní krystalická látka alkaloidního charakteru.

Na základě instrumentálních metod byl analyt identifikován jako alkaloid aporfinového typu (+)-kaaverin. U (+)-kaaverinu byly stanovené inhibiční aktivity vůči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze, a porovnány s rutinně využívanými fytofarmaky k léčbě Alzheimerovy choroby. Naměřené hodnoty byly vyjádřeny jako IC_{50} .

Klíčová slova: kapalinová chromatografie, přírodní látky, hmotnostní spektrometrie, *Papaver rhoeas* L., Alzheimerova choroba

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Pharmaceutical Botany

Candidate: Simona Víchová

Supervisor: RNDr. Jaroslav Jenčo, Ph.D.

Title of dissertation thesis: The use of separation techniques in phytochemical analysis

The alkaloid extract obtained from stems with immature capsules from *Papaver rhoeas* L. was subjected to a phytochemical study. The summary extract was separated into individual fractions by Flash chromatography. After performing biological tests for inhibitory activities of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, the fraction PPR-11 and PPR-12 was selected. The fraction showed the highest activity against butyrylcholinesterase (95.55 ± 0.96 and $97.03 \pm 0.79\%$ inhibition of butyrylcholinesterase at 50 /g / ml). The combined PPR 11-12 fractions were purified by preparative chromatography to individual subfractions, which were purified by preparative thin layer chromatography. A monocomponent crystalline substance of alkaloid origin was obtained from the subfraction named PPR 11-12Fr # 8-A.

Based on instrumental analysis, the analyte was identified as an alkaloid of the aporphine type (+)-caaverine. The inhibitory activities against acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase for (+)-caaverine, were determined and compared with routinely used phytopharmaceuticals for the treatment of Alzheimer's disease. The assessed values were expressed as IC₅₀.

Key words: liquid chromatography, natural substances, mass spectrometry, *Papaver rhoeas* L., Alzheimer's disease

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍL PRÁCE	3
3	TEORETICKÁ ČÁST	4
3.1	Alzheimerova choroba	4
3.1.1	Epidemiologie	4
3.1.2	Formy AD	5
3.1.3	Rizikové faktory	5
3.1.4	Protektivní faktory AD.....	6
3.1.5	Stádia a klinický obraz AD	6
3.1.6	Neuropatologické znaky AD	7
3.1.7	Makroskopické znaky	8
3.1.8	Mikroskopické znaky	8
3.1.8.1	Amyloid a amyloidní plaky	8
3.1.8.2	Tau protein a neurofibrilární klubka.....	9
3.1.8.3	Poškození mitochondriálního metabolismu.....	10
3.1.8.4	Zánětlivá reakce.....	10
3.1.8.5	Apolipoprotein E	11
3.1.8.6	Oxidační stres	12
3.1.9	Léčba	12
3.1.9.1	Acetylcholin.....	13
3.1.9.2	Cholinesterázy	13
3.1.9.3	Inhibitory cholinesterázy	14
3.1.9.4	Antagonisté NMDA receptorů.....	17
3.1.9.5	Doplňková léčiva.....	18
3.2	<i>Papaver rhoeas</i> L. (Papaveraceae)	22
3.2.1	Taxonomické zařazení.....	22
3.2.2	Charakteristika čeledi Papaveraceae	22
3.2.3	Morfologický popis <i>Papaver rhoeas</i> L.	22
3.2.4	Sběr a sušení.....	23
3.2.5	Účinky a použití <i>Papaver rhoeas</i> L.	24
3.2.6	Obsahové látky	24
3.2.6.1	Isochinolinové alkaloidy.....	25

3.2.6.2	Protoberberinový typ	25
3.2.6.3	Aporfinový typ	27
3.2.6.4	Protopinový typ	28
3.2.6.5	Rhoeadinový typ.....	29
3.2.6.6	Další obsahové látky.....	30
3.3	Izolace z rostlinného materiálu.....	30
3.3.1	Rostlinný materiál	31
3.3.2	Extrakce.....	31
3.3.3	Extrakce rozpouštědlem	32
3.3.4	Macerace	33
3.3.5	Digesce	33
3.3.6	Perkolace	33
3.3.7	Soxhletova extrakce	33
3.3.8	Extrakce kapalina-kapalina	34
3.3.9	Instrumentální separační metody	34
3.4	Chromatografické metody	34
3.4.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	35
3.4.1.1	Stacionární fáze	36
3.4.1.1.1	Silikagel	36
3.4.1.1.2	Chemicky vázané fáze na bázi silikagelu	36
3.4.1.1.3	Polymerní stacionární fáze.....	37
3.4.1.1.4	Hybridní stacionární fáze.....	37
3.4.1.2	Detektory	37
3.4.1.3	Izokratická a gradientová eluce	39
3.4.2	Vybrané retenční charakteristiky	39
3.4.2.1	Retenční čas t_R nebo retenční objem V_R	39
3.4.2.2	Účinnost chromatografické kolony	39
3.4.3	Chromatografická separace a její ovlivnění	40
3.4.3.1	Optimalizace metody	40
3.4.4	Plynová chromatografie (GC)	41
3.4.5	Flash chromatografie.....	42
3.4.6	Tenkovrstvá chromatografie	43
3.5	Izolace a separace alkaloidů.....	44

3.5.1	Příprava vzorku	45
3.5.2	Uvolnění alkaloidové báze	45
3.5.3	Extrakce.....	45
3.5.4	Čištění extraktu	46
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	47
4.1	Chemikálie, materiál a instrumentální vybavení pro izolaci alkaloidů.....	47
4.1.1	Rozpouštědla a chemikálie.....	47
4.1.2	Detekční činidla.....	48
4.1.2.1	Mayerovo činidlo.....	48
4.1.2.2	Dragendorffovo činidlo (dle Muniera)	48
4.1.3	Pomocný materiál.....	48
4.1.4	Chromatografické adsorbenty	48
4.1.4.1	Adsorbenty pro tenkovrstvou chromatografii.....	48
4.1.4.2	Soustavy k vyvíjení pro TLC.....	49
4.1.4.3	Adsorbenty pro Flash chromatografii.....	49
4.1.4.4	Stacionární fáze pro Preparativní/analytickou chromatografii.....	49
4.1.5	Přístrojové vybavení.....	49
4.2	Rostlinný materiál.....	50
4.2.1	Příprava sumárního alkaloidního extraktu	50
4.2.2	Příprava jednotlivých alkaloidních výtřepků	51
4.3	Izolace frakcí pomocí instrumentálních metod.....	52
4.3.1	Flash chromatografie.....	52
4.3.2	Tenkovrstvá chromatografie	54
4.3.3	Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí.....	55
4.3.4	Preparativní kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí	57
4.3.5	Preparativní chromatografie na tenké vrstvě.....	59
4.4	Stanovení biologické aktivity	59
4.4.1	Chemikálie a látky použité na stanovení biologické aktivity.....	59
4.4.2	Použité pufrы a činidla.....	60
4.4.3	Materiál a přístrojové vybavení.....	60
4.4.4	Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity.....	60
5	VÝSLEDKY.....	62
5.1	Alkaloidy izolované z <i>Papaver rhoeas</i> a jejich strukturní analýza.....	62

5.1.1	PPR 11-12 – Fr#8-A (+)-Kaaverin.....	62
5.1.1.1	GC/MS analýza.....	62
5.1.1.2	LC/MS analýza	64
5.1.1.3	NMR analýza.....	66
5.2	Biologický screening izolovaných frakcí.....	67
6	DISKUZE	69
7	ZÁVĚR.....	71
8	POUŽITÁ LITERATURA.....	72

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer disease)
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AMK	aminokyseliny
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidový prekurzorový protein
BuChE	butyrylcholinesteráza
CNS	centrální nervový systém
COX	cyklooxygenáza
CRP	C-reaktivní protein
CYP 450	cytochrom P450
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GC	plynová chromatografie
GIT	gastrointestinální trakt
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ChE	cholinesterázy
ICHE	inhibitor cholinesterázy
IL-1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6
MAO	monoaminoxidáza
MAP	protein spojený s mikrotubuly
MS	hmotnostní spektrometrie
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NSAID	nesteroidní antiflogistika
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
UV	ultrafialové záření

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Protoberberinové alkaloidy	27
Obrázek 2 Aporfinové alkaloidy	28
Obrázek 3 Protopinové alkaloidy	29
Obrázek 4 Rhoeadinové alkaloidy	30
Obrázek 5 Sběr frakcí pomocí Flash chromatografie.....	52
Obrázek 6 Chromatografický záznam první eluce pomocí dichlormetanu a etyl-acetátu	53
Obrázek 7 Chromatografický záznam druhé eluce pomocí etyl-acetátu a metanolu.....	53
Obrázek 8 Záznam TLC vybraných frakcí při vlnové délce 366 nm.....	54
Obrázek 9 Preparativní chromatograf Waters Autopurification system	55
Obrázek 10 Příklad porovnání složení jednotlivých frakcí pomocí LC/MS	57
Obrázek 11 Příklad preparativní separace a sběru jednotlivých frakcí	58
Obrázek 12 struktura kaaverinu	62
Obrázek 13 GC/MS Chromatogram purifikovaného kaaverinu.....	62
Obrázek 14 GC/MS spektrum kaaverinu	63
Obrázek 15 Záznam spektra z NIST knihovny	63
Obrázek 16 LC/MS chromatogram purifikovaného kaaverinu.....	64
Obrázek 17 MS-ESI spektrum kaaverinu.....	64
Obrázek 18 LC/UV chromatogram kaaverinu	65
Obrázek 19 UV spektrum kaaverinu	65
Obrázek 20 ¹ H NMR spektrum kaaverin formiátu.....	66
Obrázek 21 ¹³ C NMR spektrum kaaverin formiátu	66

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Přehled používaných mobilních fází pro TLC	49
Tabulka 2 Seznam frakcí zachycených pomocí Flash chromatografie	55
Tabulka 3 Procentuální inhibice cholinesteráz.....	67
Tabulka 4 Procentuální inhibice eluátu získaných pomocí Flash chromatografie.....	67
Tabulka 5 Porovnání IC50 izolované látky (+)-kaaverinu s jinými léčivami	68

1 ÚVOD

Rostliny se k léčbě onemocnění používají již od nepaměti. Nejstarší záznamy o užívání rostlin k léčebným účelům byly dochovány na hliněných destičkách, které jsou přibližně datovány do roku 5000 př. n. l., do období Sumerské říše. Další dochované prameny vypovídají o jejich využití také ve starověkém Řecku a během Trojské války. Do tohoto období spadá i první popsané používání máku. Až do 19. století byla fytoterapie nezbytná pro medicínu a až s 20. stoletím docházelo k velkému rozvoji průmyslově vyráběných léčiv [1].

V současné době je přibližně třetina léků na světě přírodními látkami nebo jejich deriváty. Přírodní produkty jsou často levnější, snadno dostupné, bezpečné a jsou uznávány pro širokou škálu farmakologických aktivit. Přesto se odhaduje, že až 85-90 % z vyšších rostlin nebylo zkoumáno pro biologicky aktivní látky. Proto mají rostliny vysoký potenciál při hledání nových účinných látek [2, 3].

Nová fytofarmaka by mohla být využita také pro léčbu Alzheimerovy choroby (AD), která patří celosvětově mezi nejzávažnější onemocnění. Jedná se o závažnou progresivní a ireverzibilní neurodegenerativní chorobu, která byla (společně s dalšími druhy demencí) v roce 2019 podle statistik Světové zdravotnické organizace 7. nejčastější příčinou úmrtí. Odhaduje se, že AD trpí 1 % populace a její prevalence se v posledních letech zvyšuje také díky účinné prevenci a intervenci kardiovaskulárních a nádorových chorob a prodlužování průměrné délky života. Nepříznivá je jak prognóza AD, postižení kvality života pacientů, vysoký tlak na pečovatele i ekonomická náročnost nemoci. Největším problémem AD je, že patogeneze nemoci není plně objasněna a stále se jedná o nevléčitelnou nemoc, kterou lze dostupnou léčbou pouze zpomalit [4, 5].

V souvislosti s AD je studována řada sekundárních metabolitů rostlin, které podle jejich biosyntézy je možné zařadit do několika skupin. Jsou to izoprenoidy, fenolické sloučeniny a alkaloidy. Právě alkaloidy díky jejich zajímavé biologické aktivitě související s AD jsou v posledním období zkoumány nejčastěji. Jedná se o druhově specifickou skupinu látek, kterou tvoří rostliny z čeledě: Apocynaceae, Asclepiadaceae, Berberidaceae, Loganiaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rubiaceae a Solanaceae. Některé alkaloidy jsou již standardně zavedenými léčivy, které se používají k léčbě nádorových onemocnění a AD. Při hledání potenciálně vhodných látek mají separační metody nenahraditelnou pozici

ve fytochemickém výzkumu. Jejich pomocí lze relativně rychle, snadno a levně identifikovat a oddělit biologicky aktivní látky od ostatních přirozeně se vyskytujících látek.

2 CÍL PRÁCE

1. Cílená izolace biologicky nejaktivnější látky ze sumárního alkaloidního extraktu *Papaver rhoeas* L.
2. Identifikace a strukturní analýza izolovaného alkaloidu.
3. Stanovení biologické aktivity izolované látky v porovnání s rutinně používanými fytofarmaky.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Alzheimerova choroba

AD je závažné progresivní a ireverzibilní neurodegenerativní onemocnění, které postihuje především starší populaci. Jedná se o atroficko-degenerativní demenci, která je nejčastější formou demence. Postihuje desítky milionů lidí na celém světě a počty mají tendenci k růstu. Proto se také stává jedním z nejzávažnějších zdravotních problémů. Jedná se o nemoc nejasné etiologie, kde kauzální terapie neexistuje a včasnou léčbou lze její průběh pouze zpomalit [6, 7].

Jako první tuto nemoc popsal v roce 1906 německý psychiatr Alois Alzheimer, po kterém byla v roce 1910 nemoc pojmenována. Prvním popsáním případem byla žena jménem Auguste D., kterou A. Alzheimer sledoval 5 let až do její smrti. Pozoroval u ní paranoii, poruchy spánku a paměti, agresivitu a zmatenost. Po její smrti zaznamenal i histologické plaky a neurofibrilární spletnice v mozku [6, 8].

Ve stejném roce jako A. Alzheimer vydal svou práci i Oskar Fischer, psychiatr a neuropatolog působící v pražské psychiatrické klinice. Ve své podobné práci popsal sedm případů pacientů. Prvenství je však prisuzováno A. Alzheimerovi [6].

3.1.1 *Epidemiologie*

Ve věku 65 let trpí klinicky vyjádřenou formou AD 2-5 % populace. Prevalence se dále zvyšuje s věkem, kdy se počet případů každých 5 let přibližně zdvojnásobí [9].

U věkové skupiny 80-85 let je postiženo přibližně 10 % populace a z celkového počtu tvoří přibližně dvě třetiny nemocných ženy [6].

V roce 2005 žilo na světě s diagnostikovanou AD zhruba 24,2 milionu lidí a nejvyšší procento nemocných vykazovala Severní Amerika a západní Evropa, kde byla prevalence mezi 5,4 – 6,4 % populace nad 60 let [10].

Prevalence AD v České republice se odhadovala k roku 2015 na 155,9 tisíc lidí. Jedná se však spíše o odhad než o přesné číslo, protože i v nejvyspělejších státech je diagnostikována pouze přibližná polovina případů [11].

Ve světovém měřítku je Střední Evropa v porovnání se světovými regiony s prevalencí 4,7 % osob starších 60 let průměrná. V evropském srovnání činí průměr prevalence Evropské unie 1,55 % a Česká republika je se svými 1,36 % podprůměrná. Nejvíce diagnostikovaných případů hlásí Itálie s 2,09 % a Německo s 1,92 % [6].

Předpokládá se také nárůst incidence. Podle studie jen v roce 2020 přibude v USA ve věku nad 65 let 491 000 lidí s diagnostikovanou AD a předpokládá se, že roční výskyt nových případů se může do roku 2050 zdvojnásobit. Odhaduje se tedy, že by v roce 2050 mohlo v České republice žít okolo 383 tisíc obyvatel s diagnostikovanou AD [6, 12].

3.1.2 Formy AD

Podle začátku onemocnění se nemoc se dělí na formu s časným začátkem a formu s pozdním začátkem, kdy se příznaky projeví až po 65. roce života. Forma s časným začátkem je poměrně vzácná a nejčastěji se jedná o familiárně podmíněné onemocnění [9].

Podle dědičnosti dělíme AD na formu familiární a sporadickou. O familiární formě lze hovořit, pokud se vyskytla AD minimálně ve dvou po sobě jdoucích generacích. Sporadická je pak forma bez rodinné anamnézy výskytu AD, u které nejsou zjištěny žádné genetické mutace [6].

U méně než 5 % pacientů se jedná o formu s časným začátkem a familiárním výskytem, u 15-25 % se vyskytuje forma s pozdním začátkem a familiárním výskytem. Zbytek trpí formou sporadickou s pozdním začátkem [6].

U familiárně podmíněné formy existují vzácné mutace na genech, které se většinou dědí autozomálně dominantním způsobem a onemocnění pak může začínat již 4. až 5. dekádě života. Jedná se o presenilin 2 lokalizovaný na 1. chromozomu, presenilin 1 lokalizovaný na 14. chromozomu, amyloidový prekurzorový protein (APP) na 21. chromozomu a gen pro τ – protein lokalizovaný na 17. chromozomu [6, 10].

3.1.3 Rizikové faktory

U AD se jedná o multifaktoriální etiologii, na které se podílejí jak faktory genetické, tak enviromentální [10]. Nejvýznamnějším a neovlivnitelným rizikovým faktorem je věk. Dalším významným faktorem je výskyt AD nebo Downova syndromu v rodině. Podstatou Downova syndromu je totiž trizomie na 21. chromozomu a 21. chromozom je také místo, kde se nachází gen pro tvorbu apolipoproteinu. Proto se produkuje vyšší množství β -amyloidu [6].

Krom dříve zmíněných se mezi genetické faktory řadí i izoforma apolipoproteinu E (ApoE), který se vyskytuje ve 3 izoformách. Bylo zjištěno, že alela E4 je vysoce riziková a odhadované riziko vzniku AD je o 20 % vyšší. Zato alela E3 je

považována za neutrální, E2 dokonce za protektivní. Bylo poukázáno, že alela E4 způsobuje formu s pozdním začátkem [6, 10].

Vyšší riziko je také spojeno s ženským pohlavím [12]. Zvýšené riziko je také spojeno s onemocněními, jako jsou cerebrovaskulární onemocnění, diabetes mellitus II. typu, hypertenze, obezita, dyslipidémie a traumatické poranění hlavy. Vyšší riziko bylo popsáno také u kuřáků. Dále AD mohou způsobovat příčiny jako krvácení do mozku, kortikální změny způsobené hypoperfuzí, vaskulopatie či kortikální infarkt. Třikrát zvýšené riziko je také spojováno s nadměrnou konzumací trans-nenasycených a nasycených tuků [10].

3.1.4 Protektivní faktory AD

Naopak mezi protektivní faktory patří vzdělávání, vyšší IQ a pravidelná fyzická aktivita přizpůsobená věku. Lidé zapojení do sociálních, mentálních či jiných volnočasových aktivit mají nižší výskyt AD. Základem je také zdravá a vyvážená strava. Mononenasycené a n-6 polynenasycené mastné kyseliny snižují riziko AD. Důležité v jídelníčku jsou ryby obsahující Ω -3 mastné kyseliny a dostatečný příjem vitamínu D ve stravě [10].

Důležité je také zvládání stresových situací, které by mohly zhoršit psychický stav pacienta. Existují studie, které potvrzují pozitivní vliv meditace a náboženských aktivit na kognitivní funkce člověka [13].

3.1.5 Stádia a klinický obraz AD

Pro popis demence je možné použít ABC koncept, ve které A označuje „Activities of daily living“, B „Behaviour“ a C „Cognition“. Jedná se tedy o narušení aktivit denního života, poruch chování a nálad a v poslední řadě přítomnost kognitivního deficitu [14].

Patologické a patofyziologické změny začínají již několik desítek let před vznikem demence. Rozlišuje se preklinické, lehké, střední a těžké stádium [6, 15]. Preklinické stádium je charakteristické přítomností patologických známek AD na mozku, ale pacient nevykazuje žádné objektivní ani subjektivní příznaky. V tomto stádiu se může pacient nacházet řadu let a jeho nástup začíná nejčastěji v páté dekádě života. Diagnostikovat preklinické stádium lze na základě některých biomarkerů [15, 16]. Lehké stádium demence je často zaměňováno s projevy stárnutí. Je spojeno s poruchami kognitivních funkcí, kdy na počátku nejvíce postihuje krátkodobou

paměť. Dochází zejména k narušení složitějších aktivit, pro které je nutné udržení pozornosti. Pacient je stále plně soběstačný a svou nemoc si uvědomuje [6, 15, 16].

Ve středním stádiu dochází k prohlubování úbytku kognitivních funkcí. Nemocní si přestávají svou chorobu uvědomovat. Dochází k progresi poruch denních aktivit. Nemocní přestávají obsluhovat jednoduché domácí přístroje jako jsou televize či pračky. Dochází ke ztrátě úsudku a vznikají nepřesnosti při běžné práci. Rozvíjejí se poruchy řeči, věci jsou pojmenovávány opisem a řeč je obsahově chudá, věty ztrácejí smysl. Nemocný ztrácí schopnost abstraktního myšlení. Netěší ho činnosti, které ho v minulosti bavily, začíná mít problém racionálně nakládat s penězi. Obvykle se objevují behaviorální a psychologické příznaky demence, není to však podmínkou [6, 16, 17, 18].

V těžkém stádiu se přidává časově prostorová dezorientace, prohlubuje se kognitivní dysfunkce a dochází k úplné ztrátě nezávislosti. Nemocný není schopný se ani sám najíst, nedodržuje hygienické návyky a mění se jeho osobnost a chování. Pacienti nepoznávají své blízké ani své okolí. Psychologické příznaky, především poruchy chování, vystupují do popředí a často bývají nejobtížnějším aspektem pro pečovatele [6, 16, 17, 18].

AD může být často kombinována s dalšími psychiatrickými onemocněními. Jedná se nejčastěji o depresi, ale mohou být přítomny také paranoidní bludy či epileptické záchvaty. Někteří nemocní vykazují neklid, jiní dokonce agresivitu [16, 18]. Postupně dochází k celkovému rozpadu osobnosti a nemocní umírají většinou 7-10 let po stanovení diagnózy [16]. Jako nejčastější příčina úmrtí pacientů s AD jsou uváděny nemoci dýchacího a oběhového systému. Přesněji řečeno byla nejčastější příčinou bronchopneumonie, druhou nejčastější ischemická choroba srdeční [19].

3.1.6 Neuropatologické znaky AD

U AD dochází jak k úbytku neuronů, tak ke snížení synaptické plasticity. Doposud zůstávají mechanismy odpovědné za selektivní neuronální smrt a dysfunkci při AD nejasné. Bylo navrženo několik nezávislých hypotéz, avšak ani jedna z těchto teorií sama nestačí k vysvětlení abnormalit AD [17, 20].

Mezi hlavní hypotézy vzniku AD patří hypotéza cholinergní, kdy dochází ke snížení syntézy acetylcholinu (Ach), amyloidová s abnormální akumulací β -amyloidu a τ hypotéza s patologickou agregací τ proteinu [21].

Vyskytují se i faktory jako oxidační stres, zánět, akumulace kovových iontů, nesprávné skládání proteinů, dyshomeostáza neurotransmiterů a genové mutace [22].

3.1.7 Makroskopické znaky

Při AD dochází k makroskopickým změnám podobným jako při procesu stárnutí. Mozek pacientů s AD je obvykle atrofický a klesá jeho hmotnost a objem. Hmotnost mozku zdravého jedince stejného věku při porovnání s nemocným může dosahovat rozdílu až 200-300 g. Atrofie postihuje především frontální, temporální a parietální lalok. Mozkové rýhy jsou rozšířené, gyry jsou zúžené. Atrofie kůry může dosahovat až okolo 14 %, atrofie bíle hmoty mozkové okolo 12 % [23, 24].

3.1.8 Mikroskopické znaky

3.1.8.1 Amyloid a amyloidní plaký

β -amyloid vzniká z tělu vlastního transmembránového APP, který je trvale přítomen v buněčné membráně a hraje fyziologickou roli v transmembránových procesech. Je při normálních funkcích štěpen extracelulárně α -sekretázou na krátké segmenty o 39, 40 nebo výjimečně 42 aminokyselinách (AMK). Ty jsou pak plně solubilní, působí pravděpodobně neuroprotektivně a ovlivňují neuroplasticitu mozkové tkáně [6, 25].

Za patologický stav se považuje štěpení APP β – a γ – sekretázou na fragmenty o 42, 43 či více AMK. Tyto fragmenty již nejsou solubilní a navzájem se spojují v silně neurotoxické oligomery, které poté tvoří delší fibrily. Z těch se koagulací a polymerací nakonec stává v extracelulárních prostorech kortexu β -amyloid [6].

β -amyloid je normální součástí séra a mozkomíšního moku. Nejedná se o jednotnou látku, protože se liší v závislosti od prekursorového proteinu, typu, počtu a sekvencí AMK. Existují dvě hlavní izoformy – $A\beta_{40}$, která převažuje, je rozpustná a z těla se vylučuje, a $A\beta_{42}$, která rychle agreguje a je dominující formou β -amyloidních plaků. Pro průkaz AD je důležitý průkaz fibrilárního β -amyloidu [25].

Ten tvoří útvary zvané amyloidní plaký. Jedná se o extracelulární agregáty fibrilárního β -amyloidu, v jehož okolí je spuštěna zánětlivá reakce s patrnými dystrofickými neurity, mikroglie a reaktivními astrocyty. Uvolňují se cytokiny a volné radikály. Nejvíce se hromadí ve II. a III. vrstvě šedé hmoty mozkové. Existují ve dvou podobách. Jako méně škodlivá varianta jsou označovány plaký difúzní, škodlivější jsou plaký neuritické. Difúzní plaký jsou vločkovitá depozita bílkovin

bez centrálního jádra. Jsou to ložiska, která nedeformují neurony ani neurity ložiskem procházející. Plaky neuritické se vyznačují denzním jádrem. Neurity, které jimi procházejí, jsou ztlustělé a pokroucené [25]. Platí přímá úměra mezi tíží demence a počtem amyloidních plaků [26].

3.1.8.2 *Tau protein a neurofibrilární klubka*

Nejzávažnější intraneuronální změnou, na kterou se přišlo v 70. letech 20. století, je akumulace τ proteinu. Jedná se o rozpustný, tepelně stabilní fosfoprotein, který je ovlivňován stupněm fosforylace [6]. τ -protein je hlavní bílkovina spojená s mikrotubuly (MAP) normálního zralého neuronu. τ -protein se v lidském mozku vyskytuje v 6 molekulárních izoformách, které jsou kódovány jediným genem na 17. chromozomu [27].

Normální lidský mozek obsahuje 2-3 moly fosfátu na 1 mol τ -proteinu, což je optimální. τ -protein fyziologicky interaguje s tubulinem a stabilizuje síť mikrotubulů. Při AD je τ -protein nejméně 3x více fosforylován, jeho vazba k mikrotubulům je narušena a dochází k zvýšenému počtu volného nevázaného τ -proteinu. Zvýšená hladina volného τ -proteinu vede k vyšší pravděpodobnosti patologických změn a k agregaci a fibrilaci τ -proteinu. Hyperfosforylovaná forma je polymerována na párovitá spirálová vlákna, která jsou někdy smíchána společně s přímými vlákny, a tvoří neurofibrilární klubíčka. Takto polymerovaný protein neplní fyziologické funkce τ -proteinu, tedy se neváže na tubulin, ani nepodporuje jeho shromažďování do mikrotubulů. Místo toho inhibuje sestavení a narušuje mikrotubuly [6, 27].

Neurofibrilární klubka jsou přítomny jak v případech sporadické, tak familiární formy AD a jejich tvorba úzce souvisí s neuronální dysfunkcí a demencí [28]. Zvýšená hladina hyperfosforylovaného τ -proteinu je pravděpodobně závislá na zvýšené aktivitě kináz, které zvyšují translaci τ -proteinu, a také z důvodu, že hyperfosforylovaná forma je rezistentní na proteolýzu neutrálními proteázami [28].

U pacientů postižených AD se vyskytuje τ -protein ve všech třech hlavních stavech – rozpustný, oligomerní a fibrilizovaný. U AD je tolik normálního cytosolického τ -proteinu jako u zdravých jedinců. Celková hladina τ -proteinu je však 4x-8x vyšší, kdy zbytek tvoří hyperfosforylovaný τ -protein. Zdá se, že toxické chování τ -proteinu u AD je způsobeno pouze abnormální hyperfosforylací, protože defosforylace τ -proteinu jej převádí na normální funkční bílkovinu [27].

τ -protein je přechodně hyperfosforylovaný také během vývoje, anestézie a hypotermie, ale není ve stejném stavu jako u pacientů s AD. Abnormálně hyperfosforylovaný protein se odlišuje od přechodně hyperfosforylovaného schopností izolovat normální τ -protein a narušit mikrotubuly. Díky oligomeraci hyperfosforylovaného τ -proteinu je schopný sedimentovat a samovolně se sestavit do párovitých spirálových vláken a ztrácí schopnost izolovat normální MAP [27]. Bylo zjištěno, že gen pro mikrotubulární τ -protein zvyšuje riziko rozvoje AD [6].

Zkoumána byla také provázanost amyloidních plaků a neurofibrilárních klubek. Fibrilární formace τ -proteinu se objevují mnohem dříve, někdy už před 30. rokem věku a s věkem jejich hustota narůstá. Časně vznikají především v limbickém systému. Amyloidní plaky se dostávají později a jsou lokalizovány především v neokortexu. Proto je pravděpodobné, že se jedná o dva nesouvisející děje [25].

3.1.8.3 Poškození mitochondriálního metabolismu

Mitochondrie zaujímají hlavní místo toxicity intracelulárního β -amyloidu, což je spojeno s poškozením mitochondrií, změnami velikosti i počtu. Snižuje se energetický metabolismus mitochondrií, zvyšuje se oxidační stres, vznikají poruchy homeostázy vápníku a mění se i mitochondriální deoxyribonukleová kyselina. Přestože nebylo zatím potvrzeno, jakou cestou se β -amyloid do mitochondrií dostává, bylo prokázáno, že β -amyloid působí poškození dýchacího řetězce, snížení membránového potenciálu, únik cytochromu C či zvýšenou tvorbu volných radikálů. Existuje několik mitochondriálních enzymů, které přímo interagují s β -amyloidem a ovlivňují tak své fyziologické funkce. Jedná se např. o amyloid vázající alkoholdehydrogenázu, cyklofilin D a glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázu [29].

3.1.8.4 Zánětlivá reakce

Aktivace imunitního systému u AD se označuje jako tzv. „neurozáněť“. Je řízen převážně gliovými buňkami, jako jsou mikroglie či astrocyty, a stupňuje se s progresí onemocnění. Předpokládá se, že záněť přispívá k patologii AD a zhoršuje ji [30].

Mikroglie jsou rezistentní imunitní buňky centrálního nervového systému (CNS), které jsou ve zdravém mozku neaktivní a v klidovém stavu. Přechod do aktivovaného stavu může být spuštěn poraněním nebo nemocí, kdy dojde ke zvětšení buněk a jejich migraci. Předpokládá se, že u AD je primárním faktorem aktivace právě β -amyloid. Po aktivaci mikroglíí dochází k fagocytóze β -amyloidu [31].

Zánětlivá reakce má pravděpodobně dvě role. V akutní fázi působí neuroprotektivně, ale stává se škodlivou při fázi chronické. Dochází k trvalé aktivaci mikroglíí, postupně se zvětšují a nejsou již schopny zpracovávat další β -amyloid. Takto chronicky aktivované mikroglie uvolňují řadu prozánětlivých a toxických produktů, včetně cytokinů a reaktivních forem kyslíku. Trvalá aktivace vede ke snížení účinnosti mikroglíí a snížení aktivity enzymu degradujícímu β -amyloid. Další uvolňování prozánětlivých cytokinů vede k exacerbaci neuronálního zánětu, což vede k aktivaci dalších mikroglíí [31].

Posmrtné studie mozku dále u pacientů s AD ukazují přítomnost reaktantů v akutní fázi včetně C-reaktivního proteinu (CRP) a prozánětlivých cytokinů. Byly zjištěny zvýšené hladiny interleukinu 1 (IL-1), interleukinu 6 (IL-6) a nádorového nekrotického faktoru- α . Zvýšené hladiny IL-1 jsou zodpovědné za zvýšenou produkci APP, β -amyloidu a také zvyšují fosforylaci τ -proteinu a aktivují astrocyty. Zvýšené hladiny IL-1 β zvyšují produkci dalších cytokinů včetně IL-6. IL-6 mimo jiné stimuluje aktivaci cyklin dependentní kinázy 5, což je kináza hyperfosforylující τ -protein [31, 32]. Vysoké plazmatické hladiny CRP a IL-6 byly v některých studiích spojovány s horší kognitivní výkonností na počátku onemocnění a s vyšším rizikem kognitivního poklesu během následujících 2 let [32].

3.1.8.5 Apolipoprotein E

Apolipoproteiny jsou molekuly zajišťující vazbu lipoproteinu na specifické receptory na povrchu buněk [33]. ApoE má klíčovou roli v transportu lipidů v plazmě i CNS a hraje důležitou roli v regulaci hladin, ukládání i odstraňování β -amyloidu. ApoE je převládajícím apolipoproteinem v mozku a je vylučován hlavně astrocyty [34, 35]. Gen pro ApoE se nachází na 19. chromozomu a má tři alely. Přítomnost ApoE2 se považuje za protektivní. ApoE3 se vyskytuje v populaci nejčastěji a nemá vyhraněný vztah k AD. ApoE4 je hlavním genetickým rizikovým faktorem pro rozvoj AD. Podporuje ukládání β -amyloidu, neurotoxicitu, oxidativní stres a zvyšuje hladinu cholesterolu v mozkové tkáni. ApoE4 je nezanedbatelným faktorem jak v homozygotní, tak heterozygotní formě. Je však možné, že choroba nastane i u pacientů bez alely ApoE4 a také je možné, že u nositelů ApoE4 nemusí nemoc propuknout. Přítomnost ApoE4 však zvyšuje pravděpodobnost propuknutí nemoci. U lidí bez alel pro ApoE4 je riziko rozvoje AD 9 %, při heterozygotní ApoE4 se

pravděpodobnost ztrojnásobí, u homozygotní formy může dokonce dojít ke zvýšení pravděpodobnosti vzniku až patnáctkrát [33].

3.1.8.6 Oxidační stres

Oxidační stres je důsledkem mnohých biochemických a bioenergetických pochodů. Podílí se na přirozeném stárnutí organismu a má významnou úlohu v imunologické odpovědi. Oxidačním stresem se rozumí stav, kdy je rovnováha mezi oxidanty a antioxidanty posunuta ve prospěch oxidantů. Volné radikály, které jsou produkovány, mohou napadat sacharidy, tuky, lipidy i DNA, což může vézt k poškození funkce buněk i tkání. Proto je v těle rozvinut i komplexní systém antioxidační ochrany [36].

Pro AD, jako i pro mnoho dalších onemocnění, je typická nadprodukce volných radikálů a oxidační stres. Volné radikály se vyznačují jedním nebo více nepárovými elektrony ve vnějších molekulových orbitalech a jsou velmi reaktivní. Rychlé interagují s okolím se tvoří sekundární reaktivní sloučeniny. Ty pak mohou způsobovat apoptózu či vytvoření nekrotických ložisek. Nejčastěji vznikají radikály odvozené od kyslíku – superoxidový radikál a hydroxylový radikál. Mozková tkáň je náchylnější k oxidačnímu poškození díky nižším hladinám antioxidačních enzymů v porovnání s jinými tkáněmi. V neuronech se oxidační poškození kumuluje v průběhu celého života, což může vysvětlovat postupně progredující onemocnění i propuknutí až v pokročilém věku [36].

V současné době není možné jednoznačně říct, zda je oxidační stres primární příčinou AD, nebo zda se jedná až o sekundární odezvu na patologické změny mozku [36].

3.1.9 Léčba

Navzdory zvyšujícímu se chápání patogeneze AD se vývoj léků ukázal poněkud obtížným. Zatím neexistuje léčivo, které by AD vyléčilo a dosavadní přístupy jsou pouze symptomatické či nemoc modifikující. Mezi léčiva používané podle medicíny založené na důkazech se řadí inhibitory mozkových cholinesteráz (ChE) – donepezil, rivastigmin a galantamin; a memantin, inhibitor glutamátergních receptorů N-methyl-D-aspartátu (NMDA) [37].

3.1.9.1 Acetylcholin

ACh je neuromediátorem s širokou škálou funkcí v CNS, somatickém nervovém systému a autonomním nervovém systému. Je to endogenní agonista muskarinových a nikotinových cholinergních receptorů [38].

Vzniká z cholinu a acetylkoenzymu A v cytoplazmě nervového zakončení syntetickou reakcí katalyzovanou enzymem cholinacetyltransferáza. Vzniká tak ACh a koenzym A [39].

ACh je pak následně transportován do zásobních vezikul v presynaptické části neuronu. Z něj je uvolněn po depolarizaci neuronu a působením extracelulárního Ca^{2+} přes napětově řízené vápníkové kanály typu N nebo P. Obsah je uvolňován exocytózou. V synaptické štěrbině se ACh spojí s postjunktčními či prejunktčními receptory. Krom toho je rychle hydrolyzován působením ChE na cholin a acetát. Více než polovina takto vytvořeného cholinu je znovu přijata nervovým zakončením a znovu použita pro tvorbu neurotransmiterů [39].

Krom amyloidových plaků a neurofibrilních klubek je jedním z hlavních patogenetických znaků AD také progredující ztráta cholinergních neuronů. Cholinerní deficit přispívá ke kognitivním poruchám, poklesu pozornosti a koncentrace. Klesá také rychlost zpracování informací a dochází k poruchám chování. Je snížena hladina cholinacetyltransferázy, která vede ke snížení syntézy ACh, a je porušeno i zpětné vychytávání cholinu [40, 41].

3.1.9.2 Cholinesterázy

Jsou hydrolázy, které štěpí estery cholinu na cholin a kyselinu octovou. Jedná se o acetylcholinesterázu (AChE), která selektivně štěpí ACh, a butyrylcholinesterázu (BuChE), která je také známá jako nespecifická cholinesteráza či pseudocholinesteráza. BuChE přednostně hydrolyzuje butyrylcholin a propionylcholin [42].

AChE má v mozku hlavní funkci, zatímco BuChE plní pouze funkci podpůrnou. AChE je soustředěna v neuronech a axonech, zatímco BuChE se nachází v oblastech glie a endoteliálních buněk. Neurony obsahující AChE jsou v mozku hojně rozšířené, ale obzvláště v hipokampu, thalamu a amygdale se mohou vyskytovat BuChE-imunopozitivní neurony. AChE existuje ve třech formách – monomerní G1, dimerní G2 a tetramerní G4. V lidském mozku se vyskytují pouze formy G1 a G4 [40]. BuChE má také molekulární formy, kdy v dospělém mozku převládá izoforma G4. Při AD se

patologicky tvoří hojný počet molekul BuChE, čímž se ACh odbourává ve vyšší míře. Tvorba BuChE roste s délkou a závažností demence [40, 41].

Dále se mění jednotlivé poměry izoform ChE. U AChE zůstávají hladiny G1 téměř nezměněné, zatímco hladina G4 je snížena až o 90 %. U BuChE hladina izoformy G4 klesá a G1 o 30-60 % vzrůstá [40].

3.1.9.3 Inhibitory cholinesterázy

Při AD je aktivace cholinergního systému nedostatečná. Mechanismem účinků inhibitorů cholinesteráz (IChE) je inhibice ChE, které brání rozkládání ACh a vede k jeho akumulaci v synaptické štěrbině a zvýšené stimulaci postsynaptických cholinergních receptorů. Zvyšování nabídky ACh v synapsích může alespoň částečně působit proti deficitu způsobeného AD [43].

Tato hypotéza cholinergní transmise byla základem pro vývoj léčby k udržení a posílení aktivity cholinergního systému. Inhibice ChE je oproti přímé terapii agonisty receptorů mnohem lépe snášena a je výhodnější z důvodu zesilování přirozeného uvolňování ACh [40]. IChE oddalují progresi symptomů AD, zlepšují denní aktivity a neuropsychiatrické symptomy. Z klinických studií vyplývá, že stabilizují pacienty s mírnou až středně těžkou formou AD na dobu minimálně 6 měsíců. Jsou indikovány při výsledku testu „Mini-Mental State Examination“ v rozmezí 25-13 bodů při vyloučení jiné příčiny demence. Krom AD je možno je využít i u Parkinsonovy demence či demence s Lewyho tělísky. Pokud nedojde ke zlepšení v průběhu 6-8 týdnů od nasazení léčby, nemá cenu v ní dále pokračovat [40, 44, 45].

Léčba IChE probíhá ve dvou fázích:

- 1. fáze zvyšování dávky až do dosažení klinického účinku,
- 2. dlouhodobá udržovací fáze [40].

Pro 1. fázi jsou nejčastější nežádoucí účinky spojené s rozvojem akutních účinků gastrointestinálního traktu (GIT). Jedná se především o nauzeu, zvracení, průjemy či sníženou chuť k jídlu. Jsou spojovány s rychlým zvýšením hladiny ACh a následným kompenzačním zvýšením dopaminu v area postrema. Tyto vedlejší účinky se minimalizují pomalejším zvyšováním dávky a podáváním současně s jídlem. V udržovací fázi pak nežádoucí účinky tvoří celé spektrum neurologických, svalových a kardiorespiračních účinků, ale GIT nežádoucí účinky nejsou už tak časté [40].

IChE mají mírný vagotonický účinek na srdeční frekvenci, kdy může docházet k bradykardii. Proto je nutná opatrnost při stavech spojených s poruchami

supraventrikulárního vedení, jako jsou atrioventrikulární nebo sinoatriální bloky. Dále je vhodné pozorovat pacienty se zvýšeným rizikem tvorby vředů nebo ty, kteří se léčí nesteroidními antirevmatiky. IChE mohou také způsobit obstrukci výtokové části močového měchýře a vést k poruchám močení. IChE se vylučují převážně močí [44].

V současné době jsou na trhu 3 IChE. Jedná se o donepezil, rivastigmin a galantamin. Jednotlivé léky ze skupiny IChE mohou mít rozdílnou efektivitu u pacientů díky rozdílnému působení na ChE. Proto platí, že pacient neprofitující z léčby jedním IChE může zaznamenat pozitivní efekt při léčbě jiným z této skupiny [40].

DONEPEZIL

Donepezil je centrálně aktivní, reverzibilní a nekompetitivní IChE. Řadí se mezi piperidinové deriváty. Pro donepezil je typická poměrně vysoká selektivita k AChE, oproti tomu účinek na BuChE je poměrně slabý. Jedná se o dispergované či potahované tablety, léčba se zahajuje dávkou 5 mg/den a při dobré toleranci se po 4-8 týdnech může dávka zvýšit až na 10 mg/den [40, 46, 47, 48].

Může se akumulovat v plazmě, je vysoce vázán na plazmatické proteiny (96 %) a má plazmatický poločas 3 dny. Je metabolizován přes jaterní cytochromy a díky tomu může interagovat se stejně metabolizovanými léčivy. Jedná se o interakce na cytochromu P450 (CYP 450) izoformem 3A4 a 2D6, kdy induktory jako rifampicin či karbamazepin mohou redukovat hladinu donepezilu a inhibitory jako chinidin, ketokonazol, fluvoxamin či fluoxetin mohou inhibovat metabolismus donepezilu. Donepezil má nejméně GIT nežádoucích účinků z IChE [40, 46, 49].

Donepezil je kontraindikován u aktivní vředové choroby a těžší poruchy srdeční se zpomalením síňokomorového převodu. U vředové choroby by mohly dojít ke zhoršení spojenému s krvácením až perforací vředu. Díky periferním cholinergním účinkům může dojít ke zpomalení síňokomorového vedení a k prodloužení QT intervalu, proto musí být s opatrností aplikován u pacientů se sinusovou bradykardií [40, 46, 49].

GALANTAMIN

Galantamin je reverzibilní, kompetitivní inhibitor AChE, který také allostericky moduluje nikotinové acetylcholinové receptory. Jedná se o terciální alkaloid a podobně jako donepezil vykazuje relativní selektivitu vůči AChE. Vazba na plazmatické proteiny

je malá (okolo 20 %) a plazmatický poločas je 4-6 hodin, což značí malý potenciál k akumulaci v organismu. Metabolizuje se přes jaterní CYP 450 izoformem 3A4 a 2D6 a vykazuje podobné možnosti lékových interakcí jako u donepezilu. Galantamin má biologicky aktivní metabolit norgalantamin [40, 44, 45].

Užívá se v podobě tablet s prodlouženým uvolňováním. Jeho dávka se zahajuje na 8 mg/den a při dobré toleranci se zvyšuje po 4 týdnech na 16 mg/den a následně na 24 mg/den [47].

Galantamin patří mezi přirozeně se vyskytující alkaloidy v čeledi Amaryllidaceae a k izolaci se používá druh *Galanthus woronowii* L., popř. *Leucojum aestivum* L. [50].

RIVASTIGMIN

Rivastigmin koinhibuje jak AChE, tak BuChE, jedná se tudíž o duální inhibitor. Strukturálně se jedná o karbamát, který přednostně interaguje s AChE izoformou G1 [40, 45].

Působí selektivněji v mozku než oproti periferním tkáním a jedná se o velmi pomalu reverzibilní inhibitor, kdy se ChE obnoví až po 6-8 hodinách. Plazmatický poločas je 1-2 hod a vazba na proteiny je zhruba 40 %, proto má malý potenciál k akumulaci. Výhodou je, že není metabolizován v játrech a neinteraguje s cytochromovým systémem, proto má nízký potenciál k lékovým interakcím [40].

Rivastigmin je přístupný buď v perorálních formách jako tvrdá tobolka, tableta dispergovatelná v ústech či perorální roztok o různých silách nebo jako transdermální náplast. Při perorální formě se terapie iniciuje dávkou 2x1,5 mg/den, při dobré toleranci se po 4 týdnech může dávka zvýšit na 2x3 mg/den, poté 2x4,5 mg/den a 2x6 mg/den. Při transdermální formě se začíná dávkou 4,6 mg/den a po 4-8 týdnech se může zvednout na 9,5 mg/den [47].

TAKRIN

Jednalo se o nekompetitivní IChE, jehož distribuce byla zastavena pro zjištění hepatotoxicity [51].

HUPERZIN A

Jedná se o lykodinový alkaloid nacházející se v čeledích Huperzinaceae, Lycopodiaceae a rodu *Selaginella*. Huperzin A vykazuje vysokou specifitu k inhibici

AChE a selektivně inhibuje G4 formu. Krom toho působí také jako antagonist NMDA receptorů. Popsány jsou účinky antioxidační, ochranné před volnými radikály či regenerační po hypoxii či mozkové ischemii. V Číně se řadí mezi léčiva první volby pro léčbu AD, pro použití v Evropě však není schválen [52].

3.1.9.4 Antagonisté NMDA receptorů

Glutamát je primárním excitačním neuromediátorem v mozku, který působí na ionotropní a metabotropní glutamátové receptory. NMDA receptory patří mezi ionotropní glutamátové receptory a mají vyšší permeabilitu pro ionty vápníku ve srovnání s jinými ionotropními glutamátovými receptory. NMDA receptor hraje klíčovou roli v synaptickém přenosu a synaptické plasticitě, která je pravděpodobně ústřední pro učení a paměť [53].

Při AD dochází k nadměrnému uvolňování excitačních AMK jako glutamát a aspartát, což má za následek hyperexcitaci NMDA receptorů. Vzniká nadměrný přenosový šum, který brání přenosu adekvátních podnětů. Taky dochází k nadměrnému vstupu vápenatých iontů do neuronů, což vede k aktivaci řady enzymů, hlavně proteinkináz a fosfatáz, a dochází ke změnám neuronálních proteinů a aktivaci genu pro apoptózu [54].

Nadměrná aktivita NMDA receptorů způsobuje excitotoxicitu a podporuje buněčnou smrt, což vede k neurodegeneraci. Ta je spojena se záchvaty, ischemickou cévní mozkovou příhodou a neurodegenerativními poruchami jako je AD, Huntingtonova choroba a Parkinsonova choroba [53].

MEMANTIN

Memantin je nekompetitivní, středně afinitní, na napětí závislý antagonist NMDA receptorů, který příznivě modifikuje progresivní pokles poznávání a chování u středně těžké až těžké AD. Působí na NMDA receptory, které jsou aktivované zvýšenou hladinou glutamátu. Má pouze velmi malý vliv na receptory aktivované synapticky, a proto blokuje pouze patologickou aktivitu. Dovoluje ale udržovat fyziologickou aktivitu NMDA receptorů [44].

Memantin chrání před dalším poškozením a odumíráním neuronových buněk vyvolaných excitotoxicitou. Krom působení na NMDA receptorech také antagonisticky působí na serotoninové 5-HT₃ a nikotinové acetylcholinové receptory [55].

Léčba se zahajuje dávkou 5 mg/den a zvyšuje se v týdenních intervalech na 10, 15 a 20 mg/den rozdělených do jedné nebo dvou denních dávek. U těžké poruchy renálních funkcí (5-29 ml moči/min.) se doporučuje cílová dávka 5 mg 2x denně. Na trhu je ve formě tablet a perorálního roztoku. Ve středním stádiu demence se může používat i kombinovaná léčba memantinu s IChE [47, 56].

Memantin se vylučuje močí většinou jako nemetabolizované léčivo a jeho eliminační poločas je 60-80 hodin. Nejčastějšími nežádoucími účinky jsou nauzea, bolest hlavy, závratě, poruchy rovnováhy a somnolence [47].

3.1.9.5 Doplnková léčiva

Následující léčiva spadají do kategorie s nižšími nebo pochybnými důkazy účinku a nespádají do léčiv odpovídající tzv. medicíně založené na důkazech [57].

NOOTROPNÍ FARMAKA

Nootropika jsou látky používané pro léčbu kognitivních deficitů. Pravděpodobně působí změnou neurotransmiterů, hormonů a enzymů v mozku a stimulují nervový růst. Zvyšují průtok krve do mozku a tím zvyšují přísun kyslíku a živin. Také zmírňují zánětlivé reakce v mozku. Mezi nootropika se řadí synteticky vyrobená léčiva jako piracetam, pyritinol, ale také rostliny jako *Ginkgo biloba* či *Panax quinquefolius* [58, 59].

Podle studií však podávání nootropik nepřineslo u AD očekávaný efekt, proto je nelze při léčbě doporučit [59].

PIRACETAM

Jedná se o cyklický derivát kyseliny γ -aminomáselné (GABA) a v *in vivo* animálních studiích vedl ke zvýšenému metabolismu v mozku, stimulací oxidativní glykolýzy pentózofosfátovou drahou, zvýšením rychlosti přeměny adenosintrifosfátu, zvýšením cyklického adenosinmonofosfátu v neuronech a stimulací biosyntézy proteinů [44].

Lze jej používat v podpůrné léčbě mozkové ischemie, u postkomočních syndromů či léčby dyslexie u dětí. Dostupné důkazy však nedoporučují užívání u kognitivních poruch [44].

PYRITINOL

Jedná se o disulfidickou sloučeninu dvou molekul pyridoxinu. V *in vivo* animálních studiích zlepšoval snížené metabolické děje v CNS, zvyšoval příjem a utilizaci glukózy, zvyšoval metabolismus nukleových kyselin a uvolňování ACh v kortikálních oblastech mozku. Bylo zjištěno zlepšení krevního průtoku i využití kyslíku v ischemických oblastech mozku. Vedl ke zlepšení krátkodobé paměti a měl ochranný vliv proti hypoxii mozku [44].

Používá se při poruchách mozkových funkcí při organickém postižení, např. po cévní mozkové příhodě či kraniocerebrálním traumatu. Při AD nemá prokázanou účinnost [44].

GINKGO BILOBA L.

Standardizovaný extrakt EGb761 obsahuje řadu aktivních látek. Skládá se z flavonových i neflavonových glykosidů, karboxylových kyselin, terpenových laktonů, proantocyanidinů, atd. Hlavní nositelé farmakologické aktivity jsou flavonové glykosidy a terpenové laktony [60].

Extrakt vykazuje antioxidační účinky, ochranné působení na mitochondrie, nepřímo snižuje tvorbu β -amyloidu, má protizánětlivý, antiapoptický a neuroprotektivní účinek. Byla zjištěna i inhibice monoaminoxidáz (MAO) A a B, proto lze předpokládat mírný anxiolytický a protistresový efekt [60]. Extrakt není doporučeno užívat s léky ovlivňující srážlivost krve, protože může vést k vyššímu riziku krvácivých stavů [61].

Ze studií vychází výsledky, které připisují extraktu EGb761 mírné až střední zlepšení kognitivních funkcí u mírné kognitivní poruchy. Nedosahuje však účinnosti IChE či memantinu. Dobré výsledky vykazují zejména pacienti s demencí trpící zároveň behaviorálními či psychickými příznaky [60].

ANTIOXIDANTY

„Scavangery“, neboli lapače volných radikálů nacházejí uplatnění při AD díky podílu oxidačního stresu v patogenezi. Mezi antioxidanty patří α - tokoferol (vitamín E), kyselina askorbová (vitamin C), melatonin, flavonoidy, karotenoidy či extrakt EGb761. Studie ukazují, že scavangery inhibují toxický účinek β -amyloidu a superoxidu a nemají žádné významné vedlejší účinky [62].

Ve studii zahrnující vitamín E bylo pozorováno, že nedochází ke zlepšení kognitivních funkcí, ale docházelo ke zpoždění progresu demence a smrti. Užívání kombinace vitamínů E a C je spojena s nižší prevalencí a výskytem AD, proto příjem antioxidantů může mít neuroprotektivní efekt [62, 63].

NESTEROIDNÍ ANTIFLOGISTIKA (NSAID)

NSAID byly zkoumány v souvislosti s hypotézou chronického zánětu. Při neuropatologii AD lze pozorovat velké množství faktorů, které se vyskytují při zánětlivých procesech. Patří mezi ně proteiny aktivovaného komplementu, cytokiny, chemokiny, proteoglykany, proteázy a jejich inhibitory a další [62, 64].

NSAID působí inhibicí cyklooxygenáz (COX) COX-1 a COX-2, které vedou k výraznému snížení syntézy prostaglandinů. Předpokládá se, že NSAID mohou snižovat zánětlivé procesy v mozku díky inhibičním účinkům na aktivitu COX. Některé NSAID jako indometacin či ibuprofen mohou selektivně snižovat produkci β A42. Několik studií naznačuje i ochranné účinky NSAID u pacientů s alelami ApoE4 před vznikem AD. Přesný mechanismus ovlivňující AD je však nejasný [65].

Studie ukazují rozdílnou aktivitu jednotlivých NSAID, a přestože *in vivo* studie na zvířecích modelech potvrzovaly myšlenku potencionálního ovlivnění AD, velké prospektivní a randomizované studie nepřinesly stejné výsledky [62, 64, 65].

NICERGOLIN

Jedná se o derivát námelového alkaloidu a působí jako antagonist α -adrenoreceptoru, čímž indukuje vazodilataci a zvyšuje průtok krve. Dále zvyšuje cholinergní a katecholaminergní funkci, inhibuje agregaci krevních destiček, podporuje metabolickou aktivitu a má neurotrofické a antioxidantní vlastnosti. Pro jeho použití je zapotřebí více studií ohledně účinnosti a bezpečnosti [66].

INHIBITORY MAO TYPU B (SELEGILIN)

MAO jsou enzymy odpovědné za deaminaci monoaminů. Vysoká aktivita MAO-B může vést ke zvýšené tvorbě kyslíkových radikálů [67].

Převládající formou MAO v mozku je MAO-B. Při inhibici MAO-B selegilinem dochází ke zvýšení hladiny centrálních monoaminů, což je výhodné při AD, kdy dochází ke snížení hladin dopaminu, noradrenalinu a serotoninu. Dále působí jako antagonist NMDA receptorů, má antiapoptickou aktivitu a indukuje antioxidantní

enzymy, jako jsou superoxid dismutáza a kataláza. Krom toho vykazuje ochranné účinky proti neuronové apoptóze a snižuje sekreci neurotoxických produktů [68, 69].

HORMONÁLNÍ SUBSTITUCE U ŽEN

Estrogeny mají částečnou antioxidační aktivitu a bylo prokázáno, že 17 β -estradiol potlačuje membránovou oxidaci v hipokampálních neuronech, která byla indikována β -amyloidem [62].

Data však naznačují, že je nutno zahájit substituci brzy po menopauze, když jsou neurony ještě v normálním stavu, protože u rozvinuté nemoci substituce již není prospěšná. Neuroprotektivní jsou pravděpodobně také hormony jako progesteron či 19-norprogesteron použity buď samostatně, nebo v kombinaci s estradiolem. Výhodou je, že zvyšují expresi antiapoptického proteinu Bcl-2 [70].

3.2 *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae)

3.2.1 Taxonomické zařazení

Říše:	Plantae
Podříše:	Viridiplantae
Nadkmen:	Embryophyta
Kmen:	Tracheophyta
Podkmen:	Spermatophytina
Třída:	Magnoliopsida
Podtřída:	Ranunculanae
Řád:	Ranunculales
Čeleď:	Papaveraceae
Rod:	<i>Papaver</i> L.
Druh:	<i>Papaver rhoeas</i> L. – mák vlčí [71].

3.2.2 Charakteristika čeledi Papaveraceae

V čeledi Papaveraceae jsou zastoupené jednoleté až vytrvalé byliny, vzácně i vřdyzelené keře nebo malé stromy. Pro čeleď je typický výskyt mléčného nebo někdy i vodnatého latexu, který se vyskytuje v mléčnicích ve všech částech rostliny s výjimkou semen. Postavení listů bývá nejčastěji střídavé, někdy také vstřícné nebo přeslenité. Nejsou přítomny palisty a listy mohou být jak řapíkaté, tak přisedlé. Listová čepel je většinou pérovitě žilkovaná. Květy jsou oboupohlavné, jednotlivé nebo uspořádané do mnohokvětých hroznů. Okvětní lístky bývají uspořádány obvykle do dvou přeslenů po dvou nebo třech listech. Plodem je nejčastěji suchá tobolka. Semena mohou být jak s, tak i bez míšku, endosperm bývá olejovitý, embryo poněkud rudimentární [72].

Čeleď je zastoupena prakticky po celém území severní polokoule až na pár výjimek – nejméně je zastoupena v severozápadní Evropě, kde se vyskytuje pouze 7 z 42 rodů [73].

3.2.3 Morfologický popis *Papaver rhoeas* L.

Papaver rhoeas L je jednoletá bylina dorůstající 25–90 cm. Lodyha je přímá, jednoduchá, zřídka i větvená, odstávavě štětinato-chlupatá. Má podlouhle kopinaté listy, štětinatě chlupaté, nedělené a až dvakrát peřenodílné s protáhlou čepelí. Spodní listy

jsou řapíkaté, zatímco horní listy jsou přisedlé. Květy jsou jednotlivé, v mládí mírně převislé, mají dvoučetné volné obaly a vyrůstají na dlouhých stopkách, které bývají v průměru až 10 cm dlouhé. Rostlina má 2 kališní lístky, kdy kalich záhy opadá. Korunní lístky jsou 4, mají okrouhlý tvar a v průměru 2–4 cm. Zbarvení květu bývá nejčastěji nachově červené, zřídka mohou být i bílé nebo fialové květní lupeny. Na bázi se může vyskytovat lesklá černá skvrna, ale není to pravidlem. Tyčinky jsou četné a mají tenké nitky a modravé prašníky. Semeník je svrchní, synkarpický, tvořen z 8-12 plodolistů. Blizna je přisedlá, paprscitá s mělkými laloky, které počtem odpovídají počtu plodolistů. Plodem je široce obvejcovitá a dole zaoblená, slabě žebnatá a lysá tobolka, která je známá jako makovice. V době zralosti se v ní pod bliznou otevírají otvory mezi jednotlivými laloky. Semena jsou četná, ledvinovitého tvaru s tmavohnědým oseměním a olejnatým endospermem [74, 75, 76].

3.2.4 Sběr a sušení

O *Papaver rhoeas* je známo, že je to plevelnatá rostlina, která inklinuje k suboceánským klimatickým polohám. Do střední Evropy byl pravděpodobně zavlečen už v době neolitu z východního Středomoří. Zdomácněl téměř po celém světě a jako nitrofilní druh proniká do všech rumišť a člověkem ovlivněných stanovišť, které se nacházejí v nížinách, pahorkatinách až podhorských polohách. Jeho obvyklým stanovištěm jsou pole, meze, hráze, násypy či navážky. Je také odolný vůči exhalátům, zejména proti výfukovým plynům [75, 76].

Jako droga se sbírají korunní lístky z plně nakvetlých rostlin (Flos rhoeados). Ty obvykle kvetou od května do července. Ideálním je považován sběr za suchého počasí. Korunní lístky jiných červenokvětých planých druhů máku se považují za nezávadnou, ale nežádoucí příměs. Nejlepší technikou sběru je považováno uchopení všech korunních plátků v horní části a vyškubnutí směrem nahoru. Měly by se pro sušení uložit volně, protože jinak mohou být náchylné k zapaření. Sušení probíhá v tenké vrstvě ve stínu do teploty 35 °C. Droga si musí i po usušení zachovat původní barvu, která bude změněna pouze do lehce tmavšího odstínu, a také charakteristický pach i chuť. Nežádoucí jsou zčernalé části. Droga se skladuje v dobře uzavřených nádobách, které jsou chráněny před světlem [76, 77].

3.2.5 Účinky a použití *Papaver rhoeas* L.

Léčebné účinky drogy jsou známy již od středověku, kdy byla rostlina velmi ceněna, v dnešní době je však její použití obsoletní a o biologické aktivitě obsahových látek *Papaver rhoeas* L. není příliš informací [76].

Nejčastěji se vlčí mák používá jako korigens barvy při barvení sirupů či jako přísada do čajových směsí, kde slouží na úpravu vzhledu. Podobné použití je možné i v potravinářském průmyslu, kdy se používá jako zdroj přírodního barviva pro obarvení ovocných či masových trestů nebo k přibarvování červeného vína [76].

V lidovém léčení se používá pro své tišící schopnosti při zánětech horních cest dýchacích. Oblíbená je hlavně pro použití u dětí a bývá často součástí sirupů proti nachlazení, chrapotu či expektoračních směsí. Jako expektorans se používá ve směsi se stejnými díly proskurníku, divizny, lékořice a slézu. Dále může být použita jako sedativum při nespavosti. Zevně se nálevy doporučují k výplachu očí při zánětu spojivek či jako vlasové tonikum [76, 78].

Vlčí mák vykazuje antibakteriální aktivitu, která je vyšší vůči Gram-pozitivním bakteriím a projevuje aktivitu i vůči *Staphylococcus aureus*. Vysoká je i aktivita vůči *Candida albicans*. Dále byla zjištěna antioxidační aktivita extraktů z vlčího máku a byly potvrzeny i antiulcerózní účinky kořenového extraktu [78, 79, 80].

Semena jsou bohaté na bílkoviny a olej, dají se používat jak ozdobně, tak jako nutriční doplněk. Z listů lze připravovat polévky a omelety, nadměrná konzumace však může být spojena s intoxikací. V čínské medicíně se rostlina používá k léčbě žloutenky a nadzemní části rostliny byly použity jako infuze k léčbě revmatismu [80]. I přes známé tlumivé účinky na dýchací centrum a protikřečové působení rhoeadinu prokázané na pokusných zvířatech není droga v tomto směru uplatňována [76].

3.2.6 Obsahové látky

U *Papaver rhoeas* L. se můžeme setkat s alkaloidy aporfinového, protopinového, protoberberinového a rhoeadinového typu [81].

Hlavním alkaloidem je (+)-rhoeadin, který je příbuzný narkotinu. Mezi další obsahové alkaloidy patří protopin, koulteropin, allokryptopin, berberin, koptisin, sinaktin, (+)-isokorydin, (+)-roemerin a (+)-rhoeagenin [77, 82].

Nedávné studie dále uvádí přítomnost mekambrinu, sanguinarinu, kanadinu, kryptopinu, salutaridinu, glaukaminu, glaudinu, epiglaukaminu, isorhoeadinu,

isorhoeageninu, papaverrubinu A, B, C, D a E [80]. Na rozdíl od *Papaver somniferum* L. či *Papaver glaucum* zde není přítomen morfin. Kodein, papaverin či noskapin se mohou vyskytnout pouze ve stopovém množství [83].

Zdá se, že *Papaver rhoeas* L. je proměnlivý v obsahu alkaloidů a pravděpodobně existují různé chemotypy. Kvalitativní a kvantitativní rozdíly ovlivňují faktory jako klima, životní prostředí, složení půdy či vegetativní období [80, 84].

3.2.6.1 Isochinolinové alkaloidy

Isochinolinové alkaloidy tvoří jednu z největších skupin sekundárních metabolitů. Prekurzory pro jejich vznik jsou tyrosin a fenylalanin a v jejich struktuře je obsažen tetrahydroisochinolinový či isochinolinový kruh [85]. Díky intramolekulárním přesmykům, přítomnosti dalších kruhů či jiných obměn je můžeme rozdělit do 8 typů:

- benzyliisochinolinový typ
- aporfinový typ
- protoberberinový typ
- benzo[c]fenanthridinový typ
- protopinový typ
- ftalidisochinolinový typ
- morfinanový typ
- emetinový typ [85].

Největší podskupinou je typ protoberberinový, kde se nachází až 25 % všech objasněných struktur. Isochinolinové alkaloidy jsou široce distribuovány v rostlinné říši a nejvíce se vyskytují v čeledích Papaveraceae, Berberidaceae, Fumariaceae, Menispermaceae, Ranunculaceae, Rutaceae a Annonaceae [85].

3.2.6.2 Protoberberinový typ

Jedná se o tetracyklické alkaloidy, které jsou odvozeny od tyrosinu a vznikly z benzyliisochinolinů pomocí fenolické oxidace a kondenzace. Nejvíce se vyskytují v čeledích Papaveraceae, Berberidaceae, Menispermaceae, Ranunculaceae, Rutaceae, Fumariaceae a Annonaceae. Mezi nejčastěji zastoupené alkaloidy vyskytující se u *Papaver rhoeas* L. patří berberin, koptisin a sinaktin [81, 84, 86].

Některé z protoberberinových alkaloidů vykazují účinky antiparazitické, analgetické, antikonvulzivní, antiarytmické, antioxidační, protizánětlivé, antiulcerózní, hypotenzní a další [86].

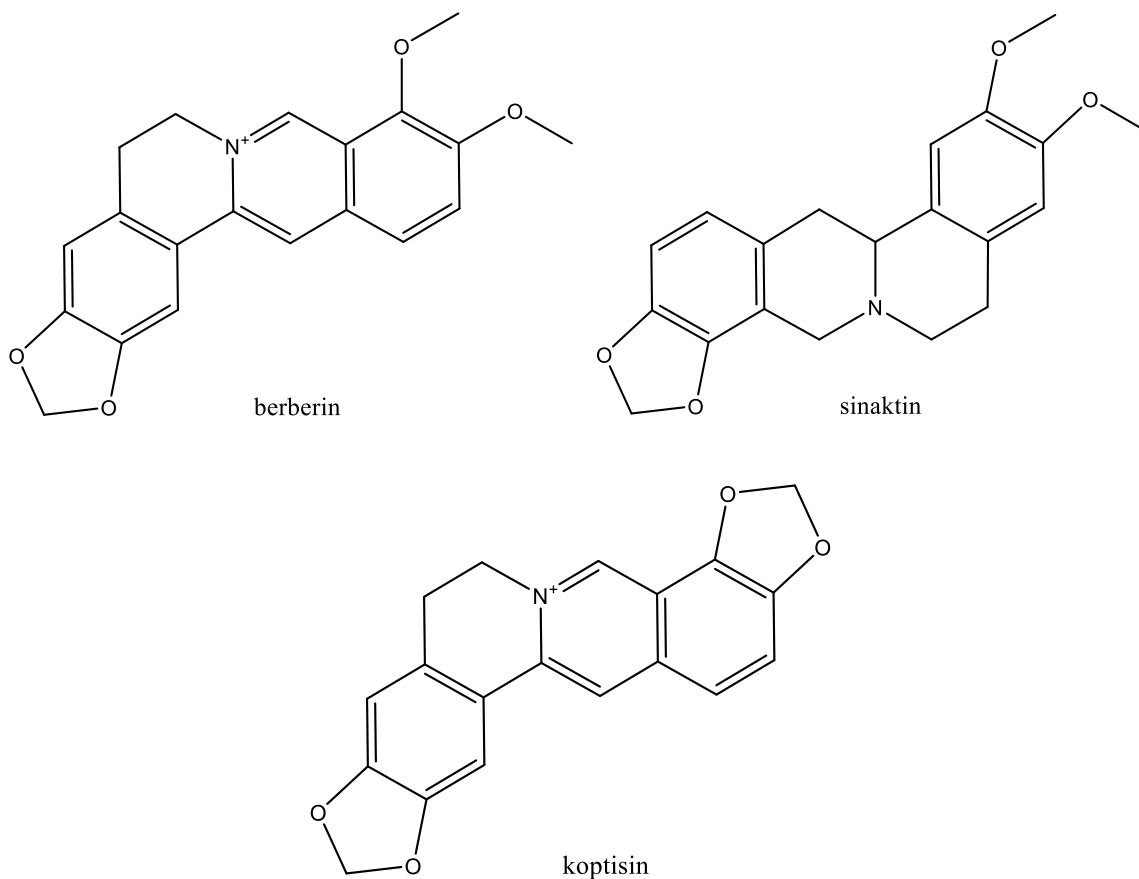
Hlavní zástupcem skupiny a pravděpodobně nejrozšířenějším z alkaloidů je berberin, jež se používal již v tradiční čínské medicíně při gastrointestinálních poruchách a infekcích. Je prokázána jeho protinádorová aktivita proti nádorům tlustého střeva, močového měchýře, dělohy, malobuněčnému karcinomu plic, hepatocelulárního nádoru, myeloidní a myelomonocytové leukémie. Mechanismus účinku závisí na indukci apoptózy a výhodou je i jeho nízká toxicita vůči zdravým buňkám [87].

Působí také vůči obezitě a může ovlivňovat metabolický syndrom. Snižuje hladinu celkového cholesterolu a triglyceridů v krvi a působí hypoglykemicky. Snižuje jak glykémii na lačno, postprandiální glykémii, tak i glykovaný hemoglobin a zvyšuje citlivost na inzulín [87, 88].

Bylo prokázáno, že berberin má také antimikrobiální aktivitu proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, houbám a prvokům [89].

Má ochranný efekt na CNS, což může příznivě ovlivnit onemocnění, jako je AD, mozková ischemie, deprese, úzkost či schizofrenie. Výhodou je, že berberin snadno prochází po systémovém podání přes hematoencefalickou bariéru, což zvyšuje jeho potenciál při léčbě těchto onemocnění. Slibné aplikace jsou bohužel omezeny špatnou farmakokinetikou berberinu [87].

Dalším zástupcem skupiny je koptisin, který má také protinádorové účinky prokázané u rakovinných buněk jater, pankreatu, plic a kosti. Vykazuje i protizánětlivé, antimalarické a antibakteriální působení. Má potenciál snižovat hladinu glukózy v krvi a působit proti oxidačnímu stresu [90].



Obrázek 1 Protoberberinové alkaloidy

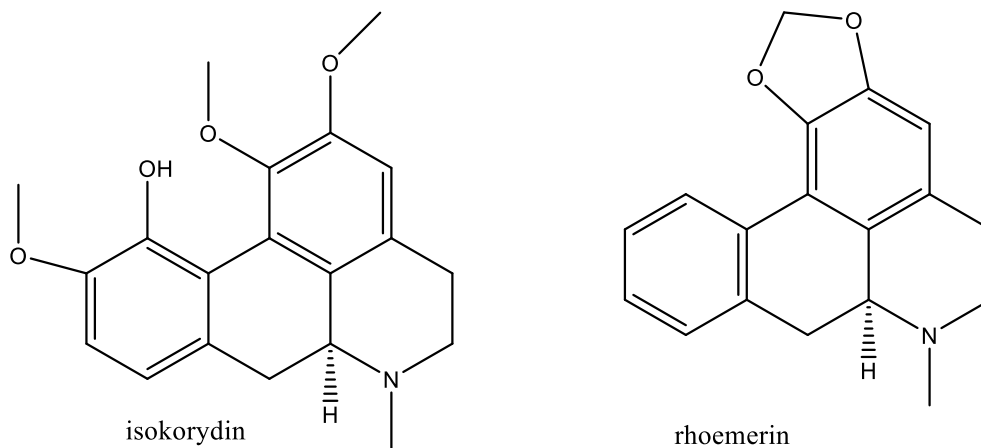
3.2.6.3 Aporfinový typ

Alkaloidy aporfinového typu lze kromě čeledi Papaveraceae nelézt také v čeledích Annonaceae, Berberidaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Monimiaceae, Ranunculaceae a Rhamnaceae. V současné době je izolováno přibližně 500 alkaloidů této skupiny [91]. Některé aporfinové alkaloidy vykazují aktivitu antiagregační, antioxidační a cytotoxickou [92]. Dále působí na dopaminových D_1 a D_2 receptorech. Proto mohou hrát potenciální roli v léčbě Parkinsonovy choroby, schizofrenie, ADHD či deprese. Působí i na serotoninových receptorech $5-HT_{1A}$, kdy mohou být využity k léčbě úzkosti, schizofrenie a deprese. Selektivní ligandy na $5-HT_{2A}$ mají pak slibné použití při drogových závislostech či proti nespavosti [93].

U aporfinového typu alkaloidů jsou uváděny také inhibiční schopnosti vůči AChE či antagonistické schopnosti vůči α_1 -adrenergním receptorům. Proto mají potenciální využití v léčbě AD a hypertenze [93].

Z *Papaver rhoeas* L. byly v nejvyšší míře extrahovány alkaloidy roemerin a isokorydin. U isokorydinu byla zjištěna inhibice buněčné proliferace

hepatocelulárního karcinomu tím, že indukuje zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi. Roemerin má slibný potenciál díky své antibakteriální aktivitě na *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* a *Salmonella typhimurium*. Také vykazuje protinádorovou aktivitu u karcinomu prostaty a vasorelaxační působení [81, 92, 94, 95, 96].



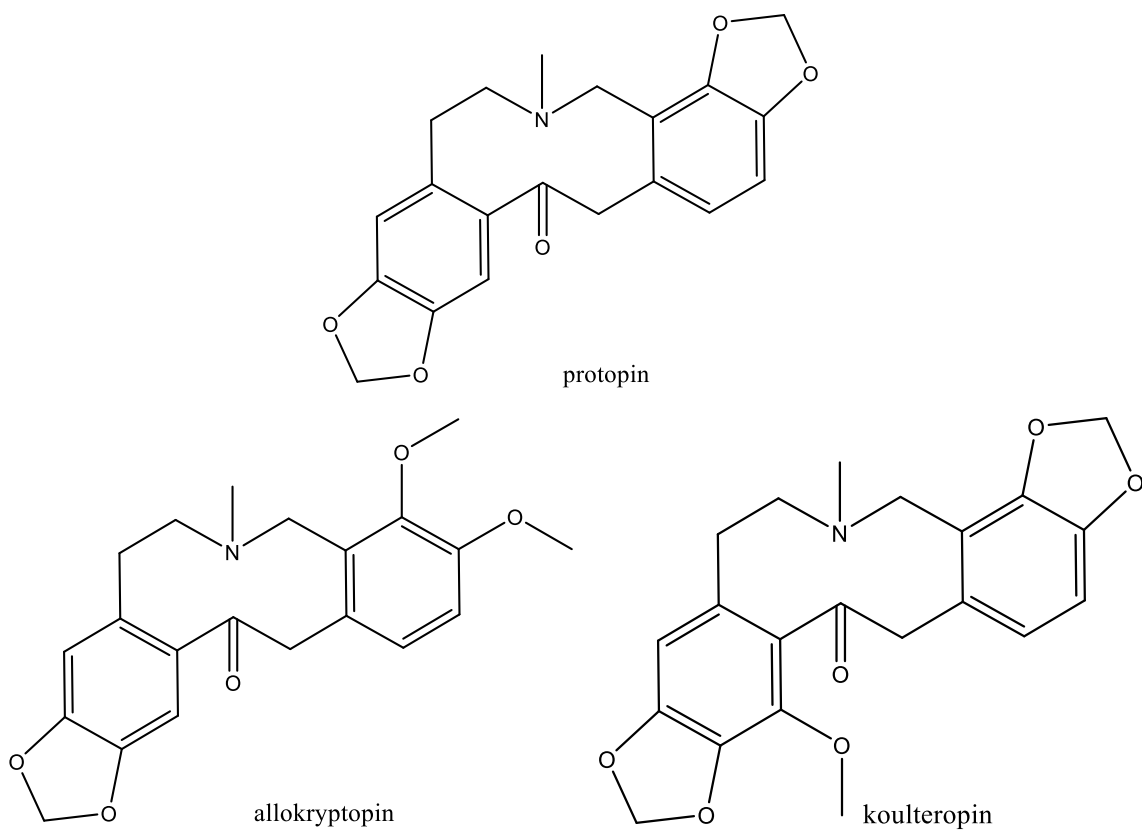
Obrázek 2 Aporfinové alkaloidy

3.2.6.4 Protopinový typ

Mezi protopinové alkaloidy vyskytující se v *Papaver rhoeas* L. můžeme zařadit protopin, allokryptopin a kouleteropin. Jsou to alkaloidy rozšířené v čeledích Berberidaceae, Fumariaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae a Rutaceae. Charakteristická je jejich optická inaktivita a nízký počet zástupců, kdy skupina čítá pouze 16 přirozeně se vyskytujících alkaloidů [81, 97, 98].

Protopin a allokryptopin vykazují aktivitu protizánětlivou, antitrombotickou, protikřečovou a mají relaxační účinek na hladké svalstvo. Působí také antibakteriálně, antivirově, antiparaziticky a protiplísňově. Dále alostericky modulují GABA_A receptory, inhibují transportéry serotoninu a noradrenalinu, inhibují AChE, glutamátdehydrogenázu a fosfodiesterázu, potlačují oxidační stres a apoptózu neuronů. Jejich působení na CNS by mohlo mít účinky i při AD. Mimo jiné protopin vykazuje hepatoprotektivní účinky. Snižuje hladiny aspartátaminotransferázy, alaninaminotransferázy, alkalické fosfatázy a bilirubinu a zvyšuje hladiny sníženého glutathionu. Má také mírný cytotoxický efekt [99].

Allokryptopin vykazuje antiarytmický účinek. Byl také patentován jako potencionální přípravek pro léčbu HIV-1 a HIV-2 virů [97, 99].

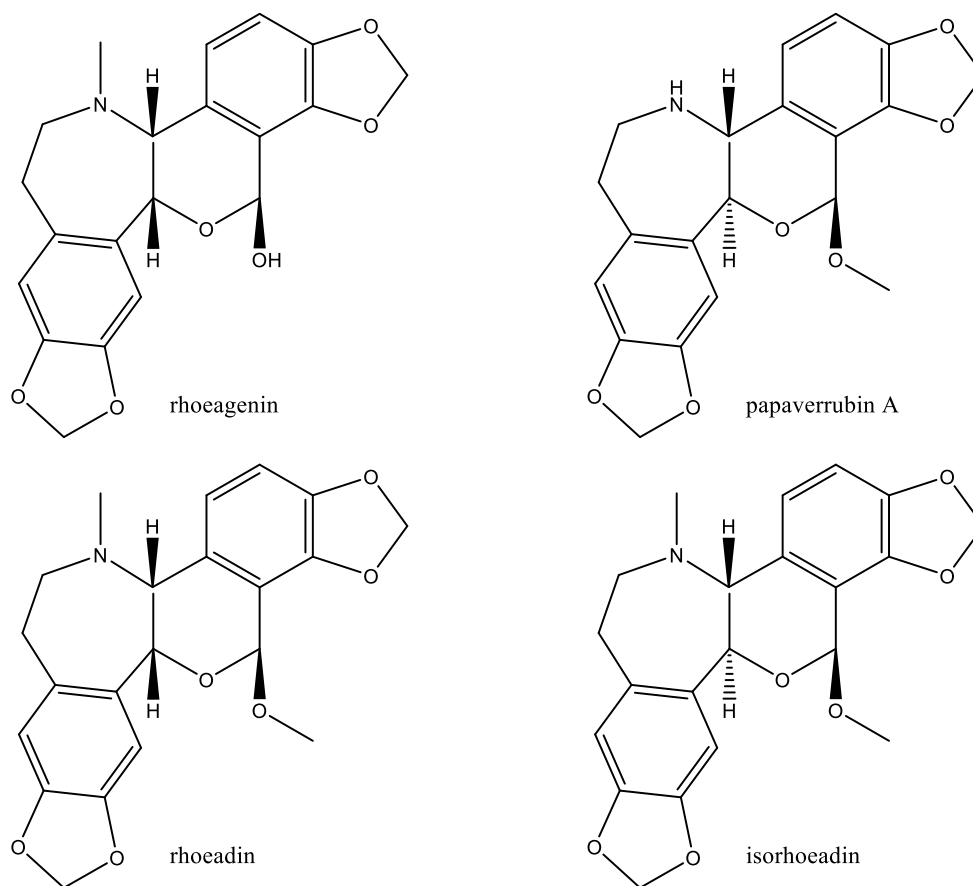


Obrázek 3 Protopinové alkaloidy

3.2.6.5 Rhoeadinový typ

Rhoeadinové alkaloidy jsou obsaženy pouze v čeledi Papaveraceae a to v rodech *Papaver*, *Meronopsis* a *Bocconia*. Jsou to cyklické acetály nebo poloacetály, biogenetické deriváty protopinových alkaloidů. Existuje přibližně 25 přirozeně se vyskytujících alkaloidů této skupiny [100, 101]. Mezi alkaloidy *Papaver rhoeas* L. patří rhoeadin, rhoeagenin, isorhoeadin, isorhoeagenin, glaukamin, glaudin, epiglaudín a papaverrubin A, B, C, D a E [80].

Rhoeadin byl izolován jako první alkaloid této skupiny již v 19. století a vykazuje mírné antitusické a sedativní působení [100, 102].



Obrázek 4 Rhoeadinové alkaloidy

3.2.6.6 Další obsahové látky

Krom alkaloidů obsahuje rostlina také antokyanová barviva cyanin a mekocyanin s vynikajícími barvicími vlastnostmi. Droga také obsahuje malé množství slizu. Jako nejzastoupenější minerály byly analyzovány vápník a draslík, v menší míře také sodík, hořčík a fosfor. Mimo jiné obsahuje také saponiny, flavonoidy a taniny. Z vitamínů je zastoupen vitamin E, β -karoten a vitamin C. Z lipidů zde nalezneme především nenasycené mastné kyseliny jako kyselinu α -linolenovou, linolovou a olejovou [77, 80]. Nepochární extrakty obsahují kyseliny olejovou, stearovou a palmitovou. Polární extrakty pak vykazují přítomnost organických kyselin a cukrů společně s AMK, flavonoidy a nukleotidy. V rostlinném extraktu bylo detekováno velké množství kyseliny glycerové [80].

3.3 Izolace z rostlinného materiálu

Přírodní produkty z léčivých rostlin, ať už jako čisté sloučeniny nebo standardizované extrakty, poskytují neomezené možnosti pro nové léčebné potenciály.

Může za to hlavně jejich chemická rozmanitost, která je vhodná pro použití ve screeningových programech při hledání terapeutických léčiv [103].

3.3.1 Rostlinný materiál

Pro fytochemickou analýzu by měl být použit čerstvý rostlinný materiál, nebo mohou být rostliny před extrakcí sušeny. Pokud jsou sušeny, je nezbytné, aby se sušení provádělo za kontrolovaných podmínek, tedy za dobrého tahu vzduchu a vyvarování se vysokých teplot. Díky sušení mohou být rostliny skladovány delší dobu. Při sběru je nutné se vyvarovat kontaminaci jinými rostlinami a vybírat si rostliny bez známek virové, bakteriální či houbové infekce. Takové rostliny mohou mít pozměněný metabolismus rostlin a tvořit neočekávané produkty. Vhodné je, aby byla ověřena botanická identita uznávanou autoritou. Důležité je zabránit vzniku enzymatické oxidace či hydrolýzy. Vhodným postupem je ponoření čerstvé tkáně do vroucího ethanolu. Ethanol je také dobrým univerzálním rozpouštědlem pro předběžnou extrakci [104].

3.3.2 Extrakce

Extrakce je prvním krokem, při kterém se získávají požadované složky z rostlinného materiálu pro další separaci a charakterizaci. Před samotnou extrakcí se často provádí mletí, kterým se získá homogenní vzorek a zlepší se kinetika extrakce díky zvýšení kontaktu povrchu vzorku s rozpouštědlem. Před extrakcí musí být přijata správná opatření, aby se zajistilo, že potenciální aktivní složky nebudou ztraceny, zkresleny nebo zničeny [103].

Extraktory se mohou připravovat extrakcí s rozpouštědlem, macerací, perkolací čerstvých zelených rostlin nebo sušeného práškového rostlinného materiálu v systémech rozpouštědel. Po zvážení vhodnosti se mohou použít také sonikace, zahřívání pod zpětným chladičem, Soxhletův extraktor a další [103].

Moderní extrakční techniky dokážou snížit spotřeby organických rozpouštědel, mohou zlepšit účinnost a selektivitu extrakce či odstranit kroky čištění a koncentrace. Mezi moderní metody patří například extrakce superkritickou tekutinou, extrakce tlakovou kapalinou, extrakce pomocí mikrovln a mikroextrakce na pevné fázi [103].

3.3.3 *Extrakce rozpouštědlem*

Mechanismus zahrnuje zvlhčení pevného povrchu rozpouštědlem, penetraci rozpouštědla do pevné látky, rozpuštění extrahovaných látek, transport rozpuštěných látek z pevných částic na jejich povrch a disperzi rozpuštěných látek v rozpouštědle [105].

Jedná se o metodu, která může být ovlivněna vlastnostmi extrakčního rozpouštědla, velikosti částic původního materiálu, teplotou a poměrem rozpouštědla k pevné látce. Účinnost extrakce lze zvýšit použitím jemnějších částic, při kterých se dosahuje lepšího výtěžku. Při příliš jemných částicích však budou problémy s následnou filtrací. Vyšší teplota zvyšuje rozpustnost a difúzi, příliš vysoké teploty však mohou vézt k rozkladu termolabilních složek a extraktům nežádoucích nečistot. Účinnost extrakce se také zvyšuje s prodloužováním doby extrakce, ale pouze do určité doby, kdy nastane rovnováha rozpuštěné látky uvnitř i vně pevného materiálu. Následné prodloužení doby extrakce již nemá efekt. Také vyšší poměr rozpouštědla ku pevné látce přináší vyšší výtěžek extrakce. Při použití nadměrného množství dochází k prodloužení doby zakoncentrování [106].

Při výběru rozpouštědla je důležité vzít v úvahu selektivitu, rozpustnost, náklady a bezpečnost. Rozpouštědla se vybírají na základě zákona o podobnosti a vzájemné mísitelnosti, kdy podobné se rozpouští v podobném. Proto bude vhodné použít rozpouštědlo o podobné polaritě. Jako univerzální rozpouštědla při fytochemické extrakci jsou považovány ethanol a methanol [106].

Klasický chemický postup pro získání organických složek ze sušené rostlinné tkáně je kontinuální extrakce s řadou rozpouštědel. Prvně se k oddělení lipidů a terpenoidů používá např. ether a chloroform, poté se k extrakci polárnějších sloučenin používá např. ethanol a ethyl-acetát. Tímto způsobem se však jen zřídka dosáhne i separace složek, proto se získané sloučeniny vyskytují zpravidla ve více frakcích. Získané extrakty se filtrují přes křemelinu a poté se koncentrují nejčastěji na vakuové odparce. Pokud se v koncentrovaném extraktu tvoří krystaly, měla by se jejich homogenita testovat pomocí chromatografických technik. Koncentrované extrakty by měly být uchovávány v lednici [104].

3.3.4 Macerace

Při maceraci se k mleté droze přidá vhodné rozpouštědlo. Časté míchání během macerace usnadňuje extrakci díky podpoře difúze a oddělování koncentrovaného roztoku od povrchu vzorku. Poté se rozpouštědlo odfiltruje a pevný zbytek z extrakčního procesu se lisuje. Procedura se několikrát opakuje. Získaná vyliisovaná kapalina i filtrát se smíchají dohromady a následně se znovu filtrují [107].

3.3.5 Digesce

Tato extrakční metoda používá zvýšenou teplotu během extrakčního procesu, aby se snížila viskozita extrakčního rozpouštědla a zlepšila extrakce. Směs se umístí na vodní lázeň nebo do sušárny při teplotě okolo 50 °C [108].

3.3.6 Perkolace

Při perkolaci se používá přístroj zvaný perkolátor. Jedná se o skleněnou nádobu ve tvaru úzkého kužele s otvorem na obou koncích. V čisté nádobě se práškový rostlinný materiál navlhčí extrakčním rozpouštědlem. Po 4 hodinách stání se obsah přenesení do perkolátoru se zavřeným dolním koncem a nechá se stát po dobu 24 hodin. Extrakční rozpouštědlo se pak nalije shora, dokud není materiál zcela nasycen, poté se otevře spodní část perkolátoru a kapalina se nechá pomalu odkapávat. Průběžně se přidává určité množství rozpouštědla a extrakce probíhá gravitační silou [108].

3.3.7 Soxhletova extrakce

Jedná se o kontinuální extrakci za tepla. Soxhletův extraktor je vyroben ze skla, skládá se z baňky s kulatým dnem, extrakční komory, sifonové trubice a horního kondenzátoru. Práškový rostlinný materiál je umístěn do porézního sáčku vyrobeného z čistého hadříku nebo silného filtračního papíru a těsně uzavřen. Extrakční rozpouštědlo se nalije do spodní baňky a porézní sáček se vloží do extrakční komory. Rozpouštědlo se zahřívá ze spodní baňky a prochází kondenzátorem, kde kondenzuje a proudí dolů do extrakční komory. Tímto kontaktem se extrahuje léčivo a spolu s rozpouštědlem proudí zpět do baňky. Celý proces se opakuje, dokud nedojde k úplné extrakci [108].

3.3.8 *Extrakce kapalina-kapalina*

Jedná se o metodu, při které dochází k přenosu rozpuštěné látky z jednoho rozpouštědla do druhého. Použité rozpouštědla jsou buď navzájem nemísitelná nebo mísitelná pouze částečně. Jedním z rozpouštědel často bývá voda či vodná směs a druhým nepolární organická kapalina. Extrakce zahrnuje krok kontaktu, kdy pomocí míchání mohou látky přestupovat z jednoho rozpouštědla do druhého, a následný krok separace jednotlivých fází [105].

$$\text{Prakticky platí, že: } K = \frac{c_1}{c_2}$$

kde c_1 a c_2 jsou rovnovážné koncentrace rozpuštěné látky ve dvou fázích. Distribuční koeficient K je výrazem relativní preference rozpuštěné látky pro rozpouštědla. Distribuční koeficient je při dané teplotě nezávislý na koncentraci. Při příliš rychlém míchání dochází sice ke zlepšení přenosu mezi fázemi, ale může taky vézt k tvorbě emulze, která může narušit snadnou separaci [105].

3.3.9 *Instrumentální separační metody*

Při extrakci jsou získávány složité a různorodé produkty, které vyžadují další separaci a čištění, aby byla získána aktivní frakce nebo čisté produkty. Separace využívá rozdílných fyzikálních nebo chemických vlastností daných látek [106]. Separace se provádí převážně pomocí některé z chromatografických technik, popř. jejich vzájemné kombinace. Volba metody závisí do značné míry na rozpustnosti a těkavosti sloučenin, které mají být separovány [104]. Preparativní chromatografické metody jsou použity s cílem izolovat sloučeniny s určitou čistotou, ve vhodných množstvích pro strukturální objasnění, biologické nebo senzorické hodnocení či pro použití jako analytických standardů [109].

3.4 **Chromatografické metody**

Chromatografické metody patří mezi separační metody, kterými lze hodnotit kvalitativní a často také kvantitativní vlastnosti separovaných složek směsi. Pro hodnocení využívá dělení analyzovaných látek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je stacionární – nepohyblivá, která je umístěna v koloně či plošné vrstvě, a druhá mobilní – pohyblivá, která unáší separované látky. V průběhu chromatografického procesu dochází k mnohokrát opakovanému vytvoření rovnovážných stavů dělených látek.

K separaci tedy dochází na základě různé afinity dělených látek k stacionární a mobilní fázi [110].

Distribuci složek mezi dvěma fázemi lze popsat distribuční konstantou K_D :

$$K_D = \frac{c_s}{c_m}$$

kde c_s je koncentrace složky ve stacionární fázi a c_m v mobilní fázi. Čím je vyšší hodnota K_D pro danou látku, tím delší dobu setrvají její molekuly ve stacionární fázi a tím je větší retence. Pro dělení jednotlivých látek je důležité, aby se lišily svými distribučními konstantami [111].

Podle podstaty separačního procesu lze rozlišit chromatografie:

- adsorbční
- rozdělovací
- iontově výměnná
- gelová
- afinitní [110].

Chromatografie v závislosti na uspořádání může být preparativní a analytická. Účelem preparativní chromatografie je oddělení jednotlivých složek směsi pro další použití, proto by se dala považovat i za formu čištění analytu. Analytická chromatografie slouží k měření relativních podílů analytů ve směsi [112]. Hlavním rozdílem je, že při analytické chromatografii je možné vzorek různě upravovat včetně degradace, značení, ad. Při preparativní chromatografii musí vzorek zůstat v nezměněném stavu [113].

3.4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Jedná se o jednu z nejprogresivnějších metod, která nachází vysoké uplatnění díky rychlosti analýzy, citlivosti a možnosti automatizace [110].

Chromatograf se skládá obvykle z:

- zásobníku či zásobníků mobilní fáze
- odplyňovače
- vysokotlakého čerpadla
- dávkovače vzorku

- chromatografické kolony
- detektoru
- datové stanice

Dále může být přítomny:

- směšovač při používání více zásobníků, který je nutný pro gradientovou eluci
- sběrač jednotlivých fází za detektorem [111].

3.4.1.1 Stacionární fáze

Jedná se o nepohyblivou složku chromatografického systému, kde dochází k vlastnímu separačnímu procesu. Stacionární fáze jsou děleny na tuhé a kapalné, které jsou zakotveny nebo chemicky vázány na tuhou matici. Krom tohoto dělení je lze dělit na fáze polární, nepolární a amfoterní. Podle chromatografického módu je můžeme dělit na normální fázi, reverzní fázi, ionexy, hydrofilní interakční chromatografii (HILIC), hydrofobní interakční chromatografii a gely.

Stacionární fáze musí být chemicky a tepelně stabilní, nesmí docházet k jejich reakci s mobilní fází a nesmí se v ní rozpouštět. Obecně platí, že je lepší úzká distribuce velikosti částic, které by měly mít sférický tvar [111].

3.4.1.1.1 Silikagel

Silikagel je obecně nejrozšířenější polární anorganický sorbent. Samotný se používá pro separaci na normálních fázích a v módu HILIC. Má vysokou mechanickou odolnost i specifický povrch, který se pohybuje mezi 5–500 m²/g. Aktivními centry na povrchu silikagelu jsou silanolové skupiny, které udělují silikagelu polární vlastnosti a jsou využívány k přípravě chemicky vázaných fází. Hlavní nevýhodou silikagelu je jeho rozpouštění při pH vyšším než 8, proto je určen pro použití pouze do pH 7. Existuje však tzv. hydrosilovaný silikagel, který je stabilní v širokém rozsahu pH [111].

3.4.1.1.2 Chemicky vázané fáze na bázi silikagelu

Jedná se o stacionární fáze, kde je jako nosič použit silikagel, který má modifikované silanolové skupiny díky chemické reakci s vhodnými organickými sloučeninami. Mezi nejčastěji používané fáze patří fáze modifikované C₁₈, propylaminová fáze, propylkvanová fáze, diolová fáze, fenylová fáze, pentafluorofenyl, propylfenyl a propylnitrofenyl.

Ze sterických důvodů může takto reagovat asi polovina volných silanolových skupin. Nezareagované silanolové skupiny jsou pak stíněny sousedními ligandy. Díky tomu by měla být nepolární stacionární fáze zcela hydrofobní a neměla by obsahovat žádné volné silanolové skupiny přístupné molekulám vzorku [111].

3.4.1.1.3 Polymerní stacionární fáze

Polymerní stacionární fáze jsou většinou stabilní v celém rozsahu pH i při vysokých teplotách. Jsou tvořeny sítí malých mikrosfér, které vytváří porézní strukturu. Mají však omezen maximální tlak na koloně do 20 MPa. Nevýhodou může být i bobtnání či srážení polymerní fáze při vysokém obsahu organické složky v mobilních fázích. Pro separaci na reverzních fázích se nejčastěji využívá polystyrendivynylbenzen, polyvinylalkohol a metakryláty [111].

3.4.1.1.4 Hybridní stacionární fáze

Jedná se o sorbenty, jejíž základ vznikl kombinací anorganického silikagelu a organického organosilanu – polymeru. Tyto stacionární fáze by v sobě měly spojit výhody silikagelu jako vysokou účinnost a mechanickou odolnost a výhody polymeru, kterými jsou vysoká chemická a teplotní stabilita a eliminace zbytkových silanolových skupin [111].

3.4.1.2 Detektory

Detektory jsou v HPLC systému umístěny za chromatografickou kolonou a zaznamenávají rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyt. Lze je rozdělit na nedestrukční, v nichž nedochází k chemické změně detekované komponenty, a destrukční, kdy dochází k ireverzibilní změně detekovaných komponent. Citlivost a selektivita HPLC analýzy závisí na použitém detektoru [110, 111].

Ideálně by měl být detektor vysoce citlivý, s předvídatelnou odezvou, univerzální, spolehlivý, specifický, nedestruktivní, schopný gradientové eluce a linearity. Žádný z detektorů nemá všechny tyto vlastnosti, proto se v praxi používá vícero typů detektorů [111]. V následujících kapitolách se budeme zabírat pouze detektory, které byly v diplomové práci využity.

SPEKTROFOTOMETRICKÉ DETEKTORY

Spektrofotometrické detektory proměřují absorbanci elektromagnetického záření určité vlnové délky. Mohou se využívat vlnové délky jak ultrafialového (UV) spektra, tak viditelné oblasti. Existují detektory s fixní nebo proměnnou vlnovou délkou, scanning UV detektor či detektor s diodovým polem.

Vyznačují se značnou citlivostí (10^{-9} - 10^{-10} g/ml) a lze je využívat při gradientové eluci [110].

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (MS)

MS detektory patří do skupiny spojených technik, které krom údajů o detekci analytu poskytují i spektrální údaje o identitě látky. Proces detekce probíhá ve třech krocích. Prvně je nutné látku ionizovat, poté se ionty rozdělí podle poměru m/z (hmotnost/náboj) a urychlí se v analyzátoru. Následně dochází k detekci a zesílení signálu detektoru. Techniky ionizace se řadí v závislosti na síle ionizační energie na elektronovou ionizaci a chemickou ionizaci a na techniky měkké jakou je například ionizace elektrosprejem a fotoionizace. Mezi nejčastější uspořádání hmotnostního spektrometru patří jednoduchý kvadrupól, trojitý kvadrupól, iontová past, orbitální past, analyzátor doby letu, magnetický analyzátor a iontová cyklotronová rezonance [111].

Spojení MS s HPLC jsou klíčové pro analýzu reálných vzorků, jako jsou biologické či enviromentální matrice. Ty jsou obvykle tvořeny velkým množstvím látek o různé koncentraci. Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí je schopná provést potvrzení identity analytu na základě molekulové hmotnosti a strukturně specifických fragmentů a do určité míry i kvantitu stanovovaných látek [111].

UNIVERZÁLNÍ DETEKTORY NA BÁZI AEROSOLU

Do této skupiny patří takové detektory, které jsou schopny detekovat jakékoliv analyty bez ohledu na jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Všechny mají společnou fázi zmlžování, kdy je eluent jemně zmlžen pomocí proudu dusíku, a fázi odpaření mobilní fáze ve vyhřívané části před detekční celou. Liší se v jednotlivých typech detekce. Rozdělují se na odpařovací detektor rozptylu světla, detektor nabitého aerosolu a detektor využívající tzv. nukleační technologii [111].

3.4.1.3 Izokratická a gradientová eluce

V průběhu izokratické eluce zůstává po celou dobu složení mobilní fáze stejné. Rozdílná je gradientová eluce, kdy se v průběhu času mění složení mobilní fáze ve prospěch složky s větší eluční silou. Zatímco při izokratické eluci dochází k postupnému rozšiřování píků, při gradientové eluci by měla šířka píků být konstantní pro všechny látky [111].

3.4.2 Vybrané retenční charakteristiky

3.4.2.1 Retenční čas t_R nebo retenční objem V_R

Retenční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky, retenční objem je objem mobilní fáze, která proteče za tuto dobu. t_R je kvalitativní charakteristikou látky. Parametry mohou být vyjádřeny pomocí následujících rovnic:

$$V_R = V_0(1 + k)$$

$$t_R = t_0(1 + k)$$

kde t_0 je mrtvý retenční čas a V_0 mrtvý retenční objem složky, která se pohybuje stejnou rychlostí jako mobilní fáze, protože není na koloně zadržována. k vyjadřuje retenční faktor. Všechny látky tedy stráví stejný čas v mobilní fázi, liší se pouze dobou, kterou stráví ve stacionární fázi. Tato doba se nazývá redukovaný retenční čas t'_R . Jedná se o retenční čas snížený o mrtvý retenční čas [111].

$$t'_R = t_R - t_0$$

3.4.2.2 Účinnost chromatografické kolony

Parametr účinnosti charakterizuje míru rozšíření elučních zón dělených na koloně. Jedná se tedy o ukazatel kvality separace. Míra účinnosti je bezrozměrná veličina N , která se nazývá počet teoretických pater a pro kterou platí:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_R}{w_{50}} \right)^2$$

kde w_{50} je hodnota šířky píky v 50 % jeho výšky. Při udávání účinnosti je vždy nutné uvádět také délku kolony. Pro porovnání kolon různých délek je používán výškový ekvivalent teoretického patra H :

$$H = \frac{L}{N}$$

kde L je délka kolony a N počet teoretických pater [111].

3.4.3 Chromatografická separace a její ovlivnění

Hlavním cílem chromatografické separace je dosažení přijatelného rozdělení analytů v přijatelném čase. Rozdělení analytů může být dokonalé i nedokonalé a je vhodné tento stupeň kvantitativně vyjádřit. Míru kvality separace dvou sousedních píků charakterizuje parametr rozlišení ($R_{1,2}$), což je bezrozměrná veličina, jejíž vyšší hodnota znamená lepší separaci. Lze vyjádřit následující rovnicí:

$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{1 + k} \right)$$

kde N je počet teoretických pater, α je selektivita a k je retenční faktor [111].

Z rovnice vyplývá, že rozlišení je ovlivněno třemi do značné míry nezávislými faktory. Faktorem kinetickým je účinnost, která udává, že rozlišení je přímo úměrné druhé odmocnině z počtu teoretických pater. Faktorem termodynamickým je selektivita, jež udává, že rozlišení se bude blížit nule, pokud se selektivita bude blížit jedné. Pokud se selektivita blíží k jedné, nelze látky v daném systému rozdělit ani na nejúčinnějších kolonách. Třetím faktorem je kapacitní faktor, který udává, že rozlišení roste s rostoucí hodnotou retenčního faktoru. Pokud se bude blížit nule, tak i retence se bude blížit nule [111].

Selektivita je nejúčinnějším nástrojem, jak ovlivnit rozlišení. Zvýšení selektivity umožní navíc použít kratší kolonu, tedy kolonu o nižší účinnosti, a tím zkrátit dobu analýzy [111].

3.4.3.1 Optimalizace metody

Cílem optimalizace je dosažení potřebné separace pro všechny látky ve směsi a dosažení dostatečného limitu detekce. Separaci látek lze ovlivnit zásahem do chromatografického systému, který změní sílu interakce mezi analytem a sorbentem, nebo zásahem do systému, který ovlivní účinnost chromatografického systému. Optimalizace je prováděna ideálně tak, aby bylo dosaženo dostatečného rozlišení $R_{1,2}$ a to nejlíp v co nejkratším čase a při nejmenším tlakovém spádu na koloně [114].

Optimalizace metody lze provádět mnoha různými způsoby ovlivnění některého ze tří členů rovnice pro rozlišení [114].

Účinnost lze ovlivnit:

- rychlostí průtoku mobilní fáze
- délkou kolony
- velikosti částic
- změnou teploty.

Selektivitu ovlivňuje:

- volba stacionární fáze
- volba mobilní fáze
- rychlost průtoku mobilní fáze
- změna teploty
- strmost gradientu.

Kapacitu ovlivňuje:

- změna stacionární nebo mobilní fáze
- změna teploty
- množství stacionární fáze
- strmost gradientu [114].

3.4.4 Plynová chromatografie (GC)

GC je metoda určená k dělení a stanovení plynů, kapalin a pevných látek s bodem varu do cca 400 °C. Metoda je založena na rozdělování složek mezi dvě fáze – pohyblivou mobilní a nepohyblivou stacionární. Při GC je mobilní fází nosný plyn. Stacionární fáze je umístěna v chromatografické koloně. Kolony se dělí na náplňové a kapilární. U náplňových kolon může být stacionární fází pevná látka jako silikagel, oxid hlinitý, aktivní uhlí, polymerní sorbenty, nebo vysokovroucí kapalina nanosená v tenké vrstvě na pevném, inertním nosiči. U kapilárních kolon je stacionární fáze nanosená v tenké vrstvě přímo na upravenou vnitřní stěnu křemenné kapiláry. Jako mobilní fáze se používá vodík, helium či dusík [115, 116].

Nosný plyn je odebírán z tlakové lahve nebo generátoru nosného plynu přes redukční ventil. Dále pokračuje do injektoru, kam se nastříkuje vzorek pro separaci

pomocí speciální mikrostříkačky. Injektor je vyhříván na takovou teplotu, aby došlo k okamžitému zplynění vzorku. Obvyklá teplota je v rozmezí 150-350 °C. Vzorek je ve formě par unášen nosným plynem na kolonu, která je umístěna v termostatu. Složky ze vzorku se sorbují ve stacionární fázi a desorbují nosným plynem, kdy se dělicí proces neustále opakuje. Tímto způsobem dojde k separaci jednotlivých složek. Látky postupně vycházejí z kolony v pořadí rostoucích hodnot distribučních konstant a vstupují do detektoru, který indukuje okamžitou koncentraci separovaných látek v nosném plynu. Nejrozšířenějším detektorem je plamenově ionizační detektor. Signál je veden na zesilovač a výsledek je zachycen na chromatogramu, kde by po rozdělení měla každá látka mít svůj samostatný pík [115].

Při preparativní GC se využívá přepínacího zařízení, které je za normálního provozu nasměrováno na detektor. To umožňuje výběr komponent, které mají být přeneseny do záchytného systému tak, že se přepne tok do záchytného kanálu. Nejčastěji se využívá pro zachycování frakcí vybraná sběrná zařízení nebo kapilární zkumavky. Alternativou mohou být lapače sorbentu či lapače kapalin. Systémy mohou obsahovat další chladicí systém, který může zvýšit účinnost regenerace těkavých složek [116].

3.4.5 Flash chromatografie

Jedná se o preparativní sloupcovou kapalinovou chromatografii. Na rozdíl od gravitační sloupcové chromatografie, kdy mobilní fáze prochází kolonou pouze pomocí gravitační síly, je při flash chromatografii využit tlak kapaliny, plynu nebo stlačeného vzduchu. Díky využití tlaku mobilní fáze se zkracuje čas nutný k separaci látek. Flash chromatografii je možné využít jak na reverzních, tak normálních fázích. Před samotným naplněním stacionární fázi se prvně vytvoří vrstva přes 1 cm široká z čistého písku či skelné vaty, následuje vlastní plnění kolony, která by měla být plněna stacionární fází o určité velikosti částic. Nejčastěji se jako stacionární fáze využívá silikagel 40–63 μm , ale kromě silikagelu se běžně využívá i oxid hlinitý nebo silikagel s navázanou oktadecilsilanolovou skupinou pro reverzní uspořádání. Po naplnění kolony se kolona proplachuje rozpouštědlem, dokud její struktura není homogenní. Horní část kolony přitom nesmí vyschnout [117].

Poté se vzorek, který má být separován, umístí na horní část kolony v podobě cartridge, nebo může být injektován. Obecně platí, že na 1 g vzorku by se mělo použít 30–100 g silikagelu jako stacionární fáze. Použitím většího množství silikagelu se

prodlouží doba potřebná pro chromatografii. Vzorek může být umístěn na kolonu buď pomocí mokrého plnění, kdy se rozpustí v malém množství rozpouštědla, nebo pomocí suchého plnění, kdy se vzorek rozpustí rozpouštědlem a přidá se určité množství silikagelu. Postupně se rozpouštědlo odpaří a vznikne suchý prášek, který se převede na kolonu. Kolona se naplní elučním rozpouštědlem a pomocí tlaku rozpouštědlo prochází kolonou. Při použití gradientové pumpy je možná i gradientová eluce. Různé složky vzorku pak procházejí kolonou různými rychlostmi a je možné je po průchodu kolonou postupně sbírat do frakcí. Sloučenina, která má být získána, by měla mít retenční faktor na chromatografii na tenké vrstvě (TLC) se zvoleným rozpouštědlem okolo 0,15 – 0,20. Jednotlivé frakce se obvykle analyzují pomocí TLC, a pokud obsahující požadovanou sloučeninu, tak se následně mohou spojovat [117].

3.4.6 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie je druh kapalinové chromatografie, kdy mobilní fáze je kapalina a stacionární fáze je v tenké vrstvě umístěna na ploché desce. Pohyb látek na TLC je výsledkem dvou protichůdných pohybů – hnací síly mobilní fáze, která pohybuje látkami ve směru pohybu mobilní fáze, a retenčního působení sorbentu, které brání v pohybu látek s mobilní fází. Látky s vyšší afinitou ke stacionární fázi se pohybují pomaleji než látky s vyšší afinitou k mobilní fázi [118].

Preparativní TLC se používá pro oddělení většího množství materiálu – obvyklé je množství 10–500 mg. Nejčastěji se používají desky potažené vrstvou silikagelu, kdy na destičku 20 x 20 cm lze nanést až 15 mg vzorku. Mohou se však použít i desky s vrstvou oxidu hlinitého, celulózy, aj. Jedná se buď o ručně připravené vrstvy, pro které se obvykle používá skleněná deska, nebo komerční, předem připravené desky, které poskytují přesnější výsledky [118].

Vzorek by měl být rozpuštěn v těkavém rozpouštědle, které je co nejvíce nepolární. Množství potřebného rozpouštědla musí být dostatečné, aby se netvořily krystaly, které by mohly silně zkreslit výsledný chromatogram. Typická bývá koncentrace 2-10 %. Vzorky se obvykle nanášejí jako úzký pruh, který by měl být co nejrovnější a nejužší a měl by končit 1-3 cm od kraje desky. Před vývojem je důležité odstranit rozpouštědlo vzorku. Vývoj je prováděn pomocí optimální mobilní fáze obvyklým vzestupným způsobem v nasycené komoře. Rozlišení složitých směsí lze zlepšit vícenásobným vývojem s méně polárními rozpouštědly, které po vyvinutí mají

nízké retenční faktory. Obecně platí, že ideální retenční faktory mají hodnoty 0,2-0,8 [118].

Rozpouštědla pro výběr mobilní fáze lze seskupit do eluotropních řad podle jejich eluční síly. Síla rozpouštědla, která se měří semiempirickým parametrem ϵ , se zvyšuje s polaritou rozpouštědla. K přípravě TLC se rozpouštědla z eluotropních řad mísí po dvou či třech do směsí, kdy síla směsi je mezi silami jednotlivých složek směsi. Krom správné síly směsi je důležitá i adekvátní selektivita k dosažení požadovaného oddělení složek [118].

Při detekci, pokud jsou komponenty zabarvené nebo fluoreskují, lze jejich polohu získat pohledem za denního světla či pod UV lampou. Pokud ne, je možné použít desku obsahující fluorescenční fosfor, na kterém budou viditelné tmavé zóny, které pohlcují UV záření, pod UV zářením 254 nebo 366 nm. Mohou být použity i jodové páry, které vizualizují mnohé sloučeniny jako hnědé zóny, a jejichž páry mohou být po vyznačení zón následně odpařeny a sloučeniny zůstanou nezměněny. Pokud je potřeba využít nevratné či destruktivní činidlo, je použito pouze na tenký pruh boku desky a zbytek desky je chráněn. Kraje pak slouží jako vodičko pro rýsování vodorovných čar deskou v místech, kde není použito detekční činidlo [118].

Vyznačené plochy se stěrkou či škrabkou čistě seškrábnou dolů na sklo či jinou podložku. Následně se látka eluuje z adsorbentu organickým rozpouštědlem, které je přiměřeně polární a je dobrým rozpouštědlem pro danou složku. Nejčastěji se používá ethanol, aceton, chloroform nebo mobilní fáze pro původní TLC. Methanol není doporučován, protože je v něm rozpustný silikagel i některé jeho nečistoty a mohl by se tak vzorek kontaminovat. Eluce může například probíhat z trubice pomocí vakua. Jako ucpávku lze použít skelnou vatu, která by měla zachytit prakticky veškerý silikagel. Rozpouštědlo se následně odpaří do sucha při teplotě, při které se vzorek nerozkládá [118].

Výhodou je snadné odstranění oddělených zón z destičky a přímá detekce ve vrstvě. Nevýhodou je možnost rozkladu labilních látek [118].

3.5 Izolace a separace alkaloidů

Při obecných metodách extrakce a izolace alkaloidů z rostlinných zdrojů je potřeba prvně oddělit alkaloidy od hlavního objemu nealkaloidních látek, pak oddělit jednotlivé blízké chemické struktury alkaloidů a separovat jednotlivé alkaloidy. Izolace alkaloidů využívá zásaditý charakter většiny alkaloidů, schopnosti tvorby alkaloidních

solí s kyselinami a relativní rozpustnosti alkaloidních solí v polárních rozpouštědlech nebo ve vodném médiu [119].

3.5.1 Příprava vzorku

Příprava vzorku probíhá pomocí mlýnů a sít, kterými se velikost tkáně redukuje na středně hrubý prášek, aby se zajistil maximální kontakt rozpouštědla s tkáněmi nesoucími alkaloidy. V případě semen a jader, která jsou bohatá na oleje a tuky, musí být tyto nealkaloidní chemické látky odstraněny extrakcí vhodným nepolárním rozpouštědlem, jako je n-hexan či petrolether. Vždy je ale vhodné frakci petroletheru či n-hexanu protřepat zředěnou minerální kyselinou a následně kyselý roztok otestovat na přítomnost alkaloidů [119].

3.5.2 Uvolnění alkaloidové báze

Alkaloidy se v rostlinných tkáních vyskytují ve formě solí kyselin. Pokud jsou vystaveny zásaditému prostředí, snadno se přemění na volné alkaloidové báze. Volba alkálií závisí na přirozeném stavu alkaloidů. Sůl silně zásaditého alkaloidu s minerální kyselinou se obvykle štěpí pod vlivem silnější báze než soli slabě zásaditého alkaloidu a relativně slabé organické kyseliny, kdy bude potřeba spíše slabší báze. Při použití silné alkálie jako hydroxid sodný nebo hydroxid draselný mohou některé alkaloidy při dlouhodobém kontaktu podléhat hydrolyze a podobně nevhodné je jejich použití u rostlinných materiálů obsahující tuk kvůli tvorbě zmýdelněných produktů, které způsobují problematické emulze. Nejčastěji se pro uvolnění alkaloidů používá vodný roztok hydroxidu amonného. Má totiž adekvátní zásaditost k uvolnění většiny běžných alkaloidů a může být odstraněn odpařením. Pro štěpení alkaloidů, které se vyskytují přirozeně jako tanátové soli, je vhodné použít hydroxid sodný nebo draselný [119].

3.5.3 Extrakce

Extrakce alkaloidové báze lze následně provést třemi typy rozpouštědel. Jedná se o extrakci s vodou mísitelnými rozpouštědly, kdy mnoho alkaloidů je rozpustných v alkoholech jako methanol, ethanol, isopropanol. Alkoholy ovlivňují rozpouštění nejen alkaloidních solí, ale také zásad obsažených v rostlinných látkách, proto je možné vynechat předchozí krok. Pro provedení dostatečné extrakce je potřeba minimálně čtyř po sobě následujících extrakcí alkoholem. Druhým typem je extrakce rozpouštědly

nemísitelnými s vodou, kdy mezi nejpoužívanější patří chloroform, diethylether a isopropylether. Chloroform je považován za nejvhodnější rozpouštědlo z této kategorie pro široké spektrum alkaloidů krom kvartérních alkaloidů [119].

Třetím typem je extrakce vodou, která je předem okyselená zředěným roztokem kyseliny chlorovodíkové, kyseliny sírové nebo kyseliny octové, která se následně zalkalizuje, nejlépe zředěným roztokem hydroxidu amonného, a nakonec se extrahuje rozpouštědlem nemísitelným s vodou. Problém je, že voda s sebou nese velké množství nečistot, jako jsou cukry, škroby, třísloviny, ad. [119].

3.5.4 Čištění extraktu

Surový alkaloidní extrakt je nutno podrobit dalšímu čištění. K tomu slouží extrakce kyselým roztokem. Nejčastěji se používá zředěná kyselina sírová, následně se kyselý roztok zalkalizuje zředěným hydroxidem amonným, aby se uvolnily alkaloidy, které se poté extrahují organickým rozpouštědlem. Rozpouštědlo se následně odstraní za sníženého tlaku [119].

Možné je také využití precipitace alkaloidů s vhodným precipitačním činidlem. Výsledný alkaloidní komplex se dále čistí filtrací, rekrystalizací, a nakonec se rozkládá, čímž se získá volný alkaloid. Čištění alkaloidů může být také provedeno vytvořením krystalizované alkaloidní soli pomocí vhodné minerální nebo organické kyseliny (kyseliny chlorovodíkové, sírové, chloristé, vinné, šřavelové). K čištění lze také použít různé separační techniky, např. sloupcovou chromatografií. Bylo pozorováno, že většina rostlinných materiálů obsahuje směs blízké příbuzných alkaloidů. Proto je nezbytné provést frakcionaci. Nejnovějšími metodami používanými pro separaci alkaloidů jsou preparativní HPLC, vysoce účinná tenkovrstvá chromatografie, radiální chromatografie a další chromatografické techniky včetně sloupcové a iontomeřičové chromatografie [119].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie, materiál a instrumentální vybavení pro izolaci alkaloidů

4.1.1 *Rozpouštědla a chemikálie*

- Ethanol 96 % (Lihovar Chrudim, Chrudim) (C_2H_5OH)
- Kyselina chlorovodíková 35 % p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (HCl)
- Chloroform č. (Ing. Švec – Penta, Praha) ($CHCl_3$)
- Uhličitan sodný bezvodý č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na_2CO_3)
- Chlorid rtuťnatý p. a. (Fisher Scientific, Pardubice) ($HgCl_2$)
- Jodid draselný č. (Lach-Ner, Neratovice) (KI)
- Destilovaná voda
- $18\ M\Omega\cdot cm^{-1}$ voda
- Diethylether p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ($DEE, C_4H_{10}O$)
- Etyl-acetát (Ing. Švec – Penta, Praha) ($EtOAc, C_4H_8O_2$)
- Methanol LC-MS (VWR Chemicals, Stříbrná Skalice) (CH_3OH)
- Dichlormetan (Ing. Švec – Penta, Praha) (CH_2Cl_2)
- Síran sodný bezvodý p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na_2SO_4)
- Methanol HPLC (J. T. Baker, Denver, Netherlands) (CH_3OH)
- Methanol p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (CH_3OH)
- Kyselina octová pro HPLC (Sigma Aldrich, Praha) (CH_3COOH)
- Cyklohexan č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (C_6H_{12})
- Aceton p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (C_2H_6CO)
- Vodný roztok amoniaku 22-25 % p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (NH_4OH)
- Dusičnan bismutitý zásaditý (Lachema, Brno) ($BiNO_3(OH)_2\cdot BiO(OH)$)
- Kyselina vinná p. a. (Balex, Pardubice) ($C_4H_6O_6$)
- Kyselina mravenčí ≥ 99 , pro LC-MS (VWR Chemicals, Stříbrná Skalice)
- Acetonitril HPLC gradient (Lach-Ner, Neratovice) (CH_3CN)
- Acetonitril LC-MS (VWR Chemicals, Stříbrná Skalice) (CH_3CN)
- Hydroxid sodný č. (Ing. Švec – Penta, Praha) ($NaOH$)
- Kyselina mravenčí 98 % p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (CH_2O_2)
- Chloroform deuterizovaný pro NMR analýzu – Chloroform-d 99,8 atom % D (Sigma Aldrich, Praha) ($CDCl_3$)

- Methanol deuterizovaný pro NMR analýzu – Methanol-d4 99,8 atom % D (Sigma Aldrich, Praha) (CD₃OD)

4.1.2 Detekční činidla

4.1.2.1 Mayerovo činidlo

Mayerovo činidlo se používá ke zjištění obsahu alkaloidů přítomných v organickém rozpouštědle. Jedná se o směs 1,36 g HgCl₂, 5 g KI a 100 ml vody. Při přítomnosti alkaloidů vzniká krémově zbarvená sraženina.

4.1.2.2 Dragendorffovo činidlo (dle Muniera)

Dragendorffovo činidlo se používá pro detekci sloučenin, které ve své struktuře obsahují dusík, kam se řadí také alkaloidy. Zásobní roztok byl složen z roztoků A a B v poměru 1:1. Roztok A vzniká rozpuštěním 1,7 g BiNO₃(OH)₂, BiO (OH) a 20 g C₄H₆O₆ v 80 ml destilované vody. Roztok B vzniká rozpuštěním 32 g KI ve 40 ml vody. Pro detekci bylo postřikové činidlo připraveno smísením 10 g C₄H₆O₆ rozpuštěné v 50 ml destilované vody s 5 ml zásobního roztoku. Při pozitivní reakci vzniká oranžová až oranžovočervená sraženina. Oba roztoky byly uchovávány v chladu při 4 °C.

4.1.3 Pomocný materiál

- Křemelina Celite C 535 (Sigma Aldrich, Praha)
- Sušící perly silikagelu (Ing. Švec – Penta, Praha)

4.1.4 Chromatografické adsorbenty

4.1.4.1 Adsorbenty pro tenkovrstvou chromatografii

- Analytické TLC desky Silica gel 60 GF₂₅₄ for TLC (Merck Millipore, Praha) o rozměrech 20 × 20 cm.

4.1.4.2 *Soustavy k vyvíjení pro TLC*

Tabulka 1 Přehled používaných mobilních fází pro TLC

Mobilní fáze	Složení
S1	C ₆ H ₁₂ : C ₂ H ₆ CO: NH ₄ OH (50: 50: 0,1)
S2	CH ₂ Cl ₂ : MeOH: NH ₄ OH (60: 30: 0,2)
S3	CH ₃ CN: MeOH: EtOAc: NH ₄ OH (80: 80: 80: 0,6)
S4	CH ₃ CN: MeOH: EtOAc: NH ₄ OH (80: 80: 80: 0,2)

4.1.4.3 *Adsorbenty pro Flash chromatografii*

- Silica gel pro flash chromatografii, 40-63 μm, porozita 60 Å (Sigma Aldrich, Praha).

4.1.4.4 *Stacionární fáze pro Preparativní/analytickou chromatografii*

- XSelect® CSH™ Prep C18 5μm OBD™ (19×100 mm),
- XSelect® CSH™ Prep Fluoro-Phenyl 5μm OBD™ (19×100 mm),
- XSelect® CSH™ C18 5μm (4,6×100 mm),
- XSelect® CSH™ Fluoro-Phenyl 5μm (4,6×100 mm).

4.1.5 *Přístrojové vybavení*

- Merck Millipore MilliQ, systém reverzní osmózy (Praha, Česká republika)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Germany)
- Vakuová odparka Heidolph G1 (Heidolph, Schwabach, Germany)
- Vakuová odparka pro poloprovozní použití Laborota 20 Heidolph (Heidolph, Schwabach, Germany)
- Flash chromatografický systém BÜCHI Sepacore flash system X10 opatřený kontrolní jednotkou BÜCHI C-620, sběračem frakcí BÜCHI C-660, detektorem UV C-640 a pumpou BÜCHI C-605
- preparativní / analytický kapalinový chromatograf Waters Autopurification system (Waters Corporation, Milford, USA). Přístroj se skládal z automatického dávkovacího zařízení připojeného ke sběrači frakcí Waters Sample Manager 2767, kolonového selektora System Fluidics Organizer, binární gradientové pumpy Waters 2545, detektora s diodovým polem Waters 2998 a hmotnostního spektrometru Waters Acquity qDa s ionizací elektro-sprejem. V preparativním režimu jsou jako

doplňkové pumpy pro make-up zařazeny ještě dvě pumpy Waters 515 a rozdělovač toku Waters flow splitter, s dělicím poměrem 1 000: 1.

- plynový chromatograf s hmotnostní detekcí Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Systém GC-EI-MS byl vybaven plynovým chromatografem Agilent 7890 A, spolu s hmotnostním detektorem Agilent 5975 C MSD pracujícím v režimu elektronové ionizace při 70 eV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). K analýze byla použita kolona HP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Agilent Technologies, USA). Všechny analyty byly následně porovnávány s knihovnou EI-MS spekter NIST Virtual Library 2017 (NIST, Gaithersburg, Maryland, USA).
- Spektrometr Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA)
- Polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Germany)

4.2 Rostlinný materiál

Rostlinný materiál byl sbírán 25. 7. 2018 u města Sezemice v místech plánované výstavby dálnice. Jednalo se o nať *Papaver rhoeas* L. s nezralými tobolkami, která při sběru vážila 180 kg. Následně byla sušena po dobu 3 dnů při 40 °C v sušárně na Zahradě léčivých rostlin, kdy po sušení vážila droga 41 kg.

4.2.1 Příprava sumárního alkaloidního extraktu

Na přípravu sumárního alkaloidního extraktu bylo použito 41 kg sušené rozdrobené drogy *Papaver rhoeas* L. Droga byla po 350 g extrahovaná ve 3,5 litrech vroucího C₂H₅OH 96 % po dobu 30 minut. Jednotlivé ethanolové extrakty byly následně spojeny a přefiltrovány přes vlizelín. Spojené ethanolové extrakty byly odpařeny na poloprovodní vakuové odparce za sníženého vakua při 60 °C a celkově takto bylo získáno přibližně 3,5 kg sumárního ethanolového extraktu. Ten byl poté zahříván na 70 °C, aby došlo ke ztekucení, a byla k němu přidána 2 % HCl v množství 5 litrů, aby se dosáhlo pH vodné fáze zhruba 1-2.

Vzniklá suspenze byla 2x filtrována přes vlizelín a zachycený podíl na filtru byl následně ještě promyt 2 % HCl. Filtrát byl přefiltrován přes čistou křemelinu a byl doplněn destilovanou vodou na 25 litrů.

Následně bylo ke každému 1 litru filtrátu přidáno 300 ml CHCl₃ a byla provedena alkalizace vodné fáze přidáním 10 % Na₂CO₃. Vznikl tak chloroformový výtěpek s hodnotou pH přibližně 9-10. Vytřepání vodné fáze chloroformem bylo provedeno vždy 4x na každý litr a vždy byla vodná fáze kontrolována Mayerovým

čínidlem na přítomnost alkaloidů. Při zjištění negativní reakce byla vodná fáze prosta alkaloidů, tudíž byly všechny alkaloidy kvantitativně převedeny do CHCl_3 . Po odpaření CHCl_3 za sníženého tlaku při $40\text{ }^\circ\text{C}$ bylo získáno 26,62 g alkaloidního viskózního chloroformového extraktu.

4.2.2 Příprava jednotlivých alkaloidních výtřepků

Viskózní alkaloidní chloroformový extrakt byl rozpuštěn v 350 ml 2 % HCl pro získání pH 1, přefiltrován přes křemelinu a doplněn destilovanou vodou na 600 ml. Okyselený roztok ve formě chloridů byl 4x vytřepán 200 ml DEE, čímž došlo k odstranění neutrálních a kyselých sloučenin rozpustných v etheru.

Vodná fáze byla pak alkalizována 10 % Na_2CO_3 na pH přibližně 9-10 a vytřepávala se 4x pomocí 200 ml DEE. Následně byla vodná fáze vytřepána 4x pomocí 200 ml CHCl_3 , pak 4x pomocí 200 ml EtOAc. Tímto způsobem byly získány 3 výtřepky – etherový, chloroformový a ethylacetátový.

Vodná fáze však nadále byla pozitivní při reakci s Mayerovým činidlem, což značilo přítomnost alkaloidů, proto bylo k 1 litru vodné fáze přidáno 10 g KI, který byl rozpuštěný v 10 ml vody. Tímto krokem byly převedeny kvarterní alkaloidy do formy jodidů. Vodná fáze se nechala přes noc stát a poté byly kvartérní jodidy 4x vytřepány 200 ml CHCl_3 . Tímto byl získán 4. výtřepok. Poté už byla reakce vodné fáze s Mayerovým činidlem negativní, což značilo nepřítomnost dalších alkaloidů. Všechny 4 výtřepky byly odpařeny do sucha a zváženy. Byly získány výtřepky:

- Alkaloidní diethyletherový (získán při pH 9-10) = 6,00 g
- Alkaloidní chloroformový (získán při pH 9-10) = 7,62 g
- Alkaloidní ethylacetátový (získán při pH 9-10) = 1,90 g
- Chloroformový s kvartérními alkaloidy ve formě jodidů (získán při pH přibližně 9-10) = 0,45 g

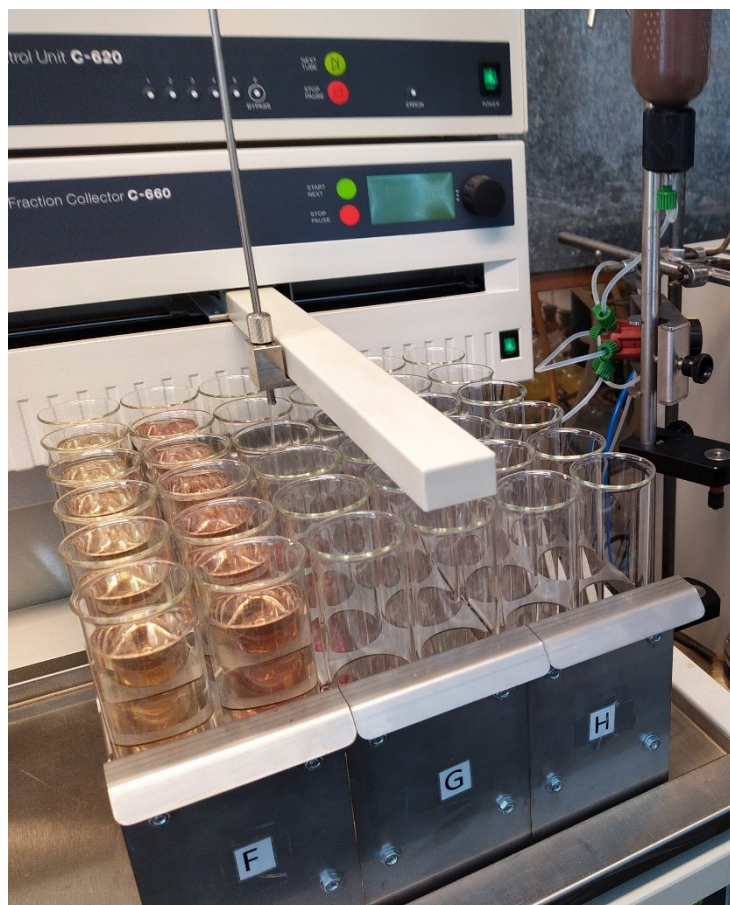
Z každého alkaloidního výtřepku bylo odebráno množství 0,2 mg, které bylo následně rozpuštěno v 1 ml MeOH. Tyto vzorky byly použity pro získání informace o kvalitativním složení jednotlivých extraktů pomocí LC-MS s UV detekcí, aby bylo možné určit jednotlivá UV maxima pro Flash chromatografii.

4.3 Izolace frakcí pomocí instrumentálních metod

4.3.1 Flash chromatografie

Pro Flash chromatografii bylo nutné prvně připravit vzorek roztěrem. Diethyletherový alkaloidní extrakt se rozpustil v dostatečném množství CHCl_3 a přidalo se k němu 30 g aktivního silikagelu 40-63 μm (přibližně 1: vzorek: silikagel). Při stálém míchání na vodní lázni byl odpařován CHCl_3 do sucha a byla vytvořena směs podobná písku. Ta se následně převedla do cartridge.

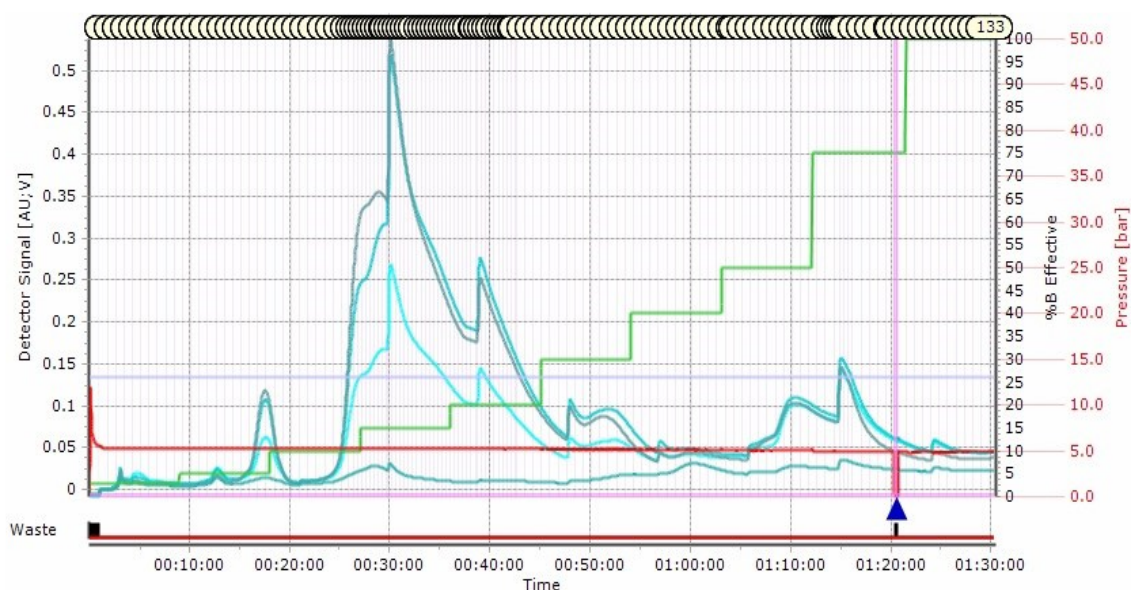
K Flash chromatografii byla použita kolona Sepacore 120 g s objemem cartridge 160 ml a průměrem 36,1 mm a výškou 211 mm. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 60 ml/min, jako stacionární fáze byl použit silikagel aktivní hrubší 40-63 μm . Detekce byla provedena pomocí 4 UV detektorů při vlnových délkách 270 nm, 280 nm, 296 nm a 315 nm. Frakce se sbíraly po 25 ml.



Obrázek 5 Sběr frakcí pomocí Flash chromatografie

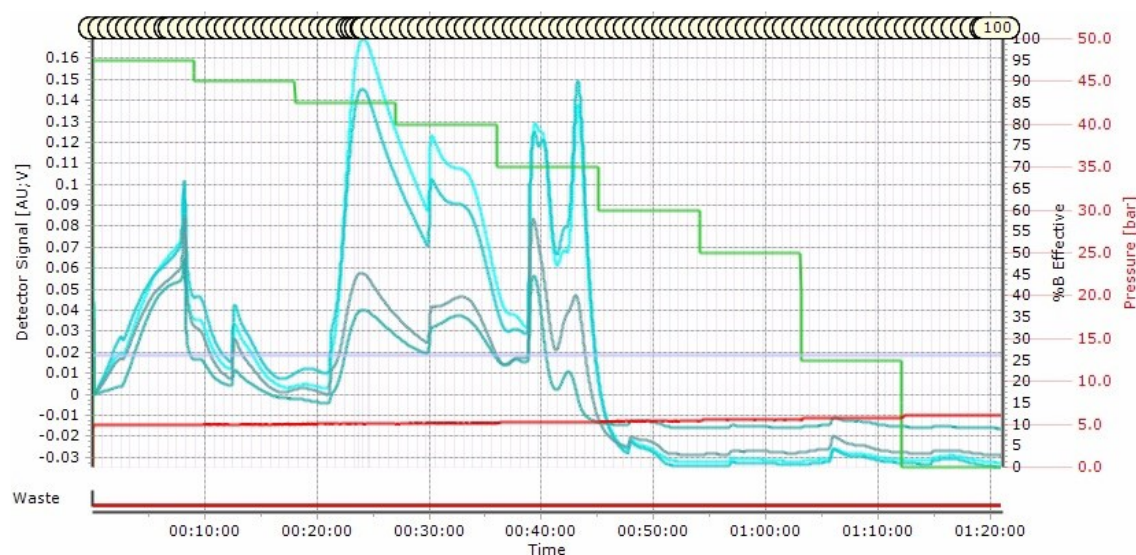
Separace probíhala gradientovou elucí, kdy docházelo k postupnému zvyšování polarity mobilní fáze v jednotlivých stupních. Prvně byla jako mobilní fáze použita směs CH_2Cl_2 a EtOAc od 2 % EtOAc ve směsi se jeho podíl postupně zvyšoval

přes 3 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 75 % a 100 % EtOAc v 10minutových intervalech, kde přechod z jedné koncentrace na druhou trval 1 minutu. Celkový čas separace byl 1hodina 30 minut a 9 vteřin.



Obrázek 6 Chromatografický záznam první eluce pomocí dichlormetanu a etyl-acetátu

Poté byl použit pro zvýšení polaroty CH_3OH , u kterého jsme zvyšovali analogicky jeho podíl v poměru s EtOAc (0 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 65 % a 100 %). Následně byla ještě kolona promyta CH_3COOH v 10minutových intervalech, kde přechod z jedné koncentrace na druhou trval 1 minutu. Celkový čas separace byl 1hodina 21 minut a 8 vteřin.



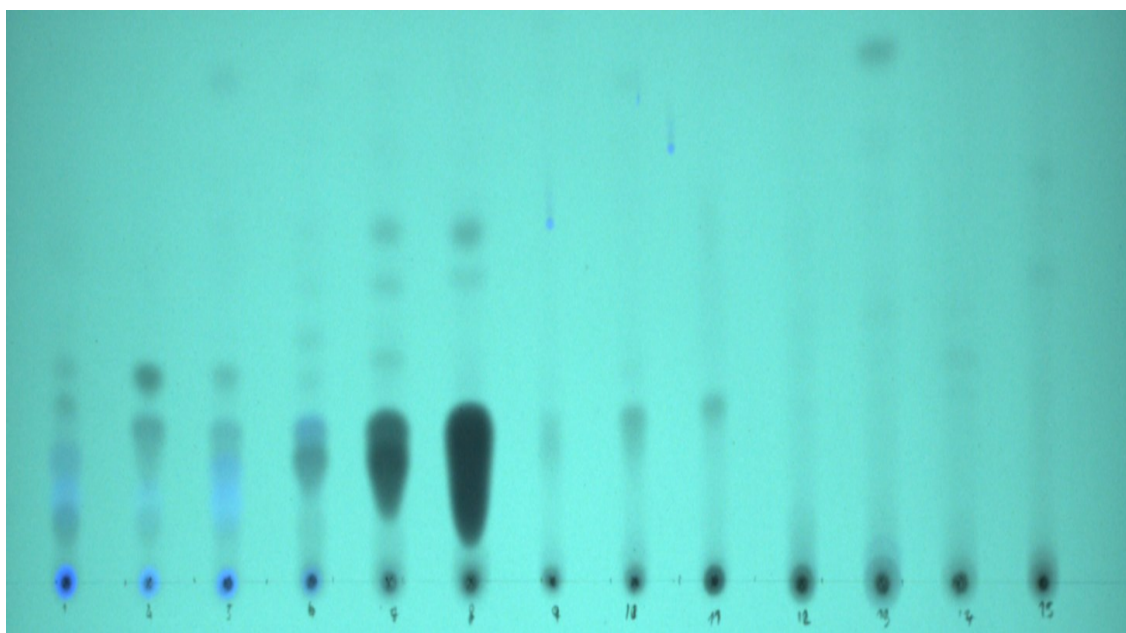
Obrázek 7 Chromatografický záznam druhé eluce pomocí etyl-acetátu a metanolu

Tímto způsobem bylo získáno celkem 233 frakcí, které byly prvotně spojeny do 38 frakcí podle výsledků z tenkovrstvé chromatografie.

Z 38 spojených frakcí bylo prvních 20 získáno spojením frakcí za použití mobilní fáze složené z CH_2Cl_2 a EtOAc, dalších 18 pak při mobilní fázi z EtOAc a CH_3OH . Poslední frakce je pak získána z promytí CH_3COOH . Všechny 38 frakcí bylo následně monitorováno pomocí TLC a LC-MS. Na základě výsledků z kapalinové chromatografie byly dále spojeny do celkem 18 frakcí.

4.3.2 Tenkovrstvá chromatografie

Pro vyvíjení na TLC byly jako stacionární fáze použity komerční destičky (20 x 10 cm) se silikagelem 60. Prvních 20 frakcí se vyvíjelo na TLC s mobilní fází S1. Dalších 18 vzorků se vyvíjelo ve směsi S2. Obě vyvíjení byla provedena v komorách nasycených parami mobilních fází. Po vyvinutí byly na obou chromatogramech pozorovány skvrny pod UV lampou při 254 nm a 366 nm.



Obrázek 8 Záznam TLC vybraných frakcí při vlnové délce 366 nm

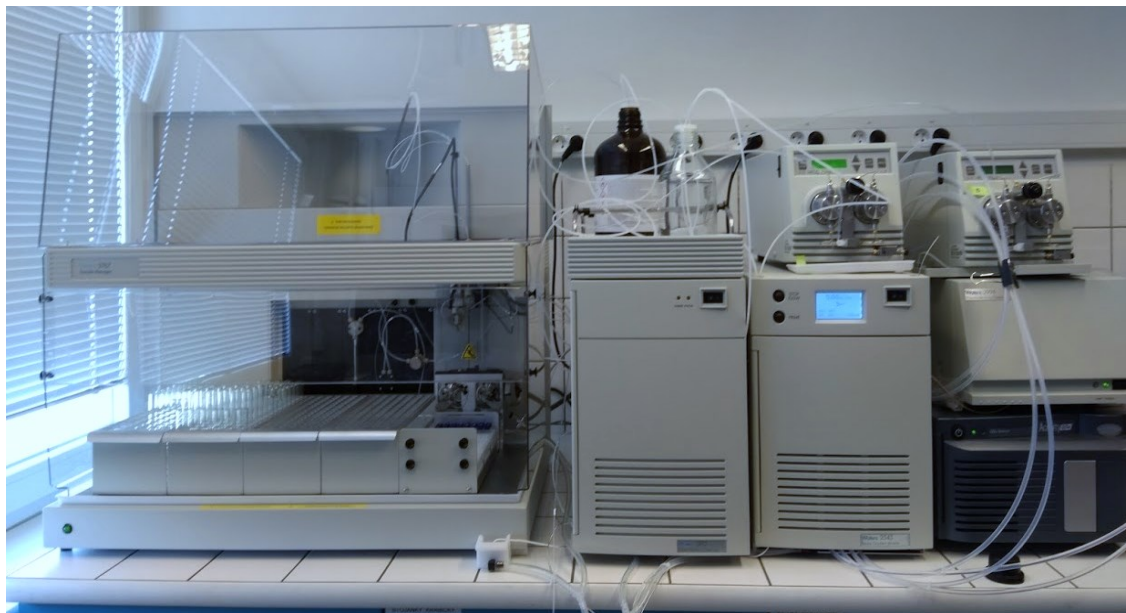
Dále byly postříkány detekčním Dragendorffovým činidlem pro důkaz alkaloidů. Následně byly jednotlivé frakce mezi sebou porovnány a podle výsledků buď vyloučeny, zachovány, nebo spojeny s frakcemi se stejným výsledkem na chromatogramu. Tímto způsobem bylo získáno 17 výsledných frakcí. Pro výběr frakcí, se kterými je příznivější pracovat bylo využito HPLC chromatogramů a testů stanovení biologických aktivit.

Tabulka 2 Seznam frakcí zachycených pomocí Flash chromatografie

Frakce	Rozmezí frakcí	Mobilní fáze	Hmotnost odparku (g)
PR1	17-28	CH ₂ Cl ₂ + EtOAc (97:3)	0,2041
PR2	29-61	CH ₂ Cl ₂ + EtOAc (19:1), (9:1)	2,1157
PR3	62-81	CH ₂ Cl ₂ + EtOAc (17:3), (4:1)	0,8049
PR4	82-89	CH ₂ Cl ₂ + EtOAc (3:1)	0,3440
PR5	90-100	CH ₂ Cl ₂ + EtOAc (3:1)	0,2141
PR6	101-103	CH ₂ Cl ₂ + EtOAc (1:1)	0,0779
PR7	104-120	CH ₂ Cl ₂ + EtOAc (1:1), (1:3)	0,4550
PR8	121-133	EtOAc	0,1398
PR9	134-136	EtOAc + MeOH (99:1)	0,0574
PR10	137-158	EtOAc + MeOH (49:1), (24:1)	0,3738
PR11	160-180	EtOAc + MeOH (22:4), (41:9)	0,4709
PR12	181-183	EtOAc + MeOH (41:9)	0,0873
PR13	184-185	EtOAc + MeOH (3:1)	0,4933
PR14	186-193	EtOAc + MeOH (3:1)	0,3578
PR15	194-214	EtOAc + MeOH (1:1), (1:3)	0,1207
PR16	215-233	EtOAc + MeOH (1:3), MeOH	0,0178
PR17-18	Promytí 0,1 % CH ₃ COOH	0,1 % CH ₃ COOH v MeOH	0,0124

4.3.3 Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

Po odebrání 0,2 - 0,3 mg odpařených částí jednotlivých frakcí byly vzorky rozpuštěny v 1 ml CH₃OH čistoty LC-MS a měřeny pomocí systému Waters Autopurification™ HPLC-MS (Milford, USA). Vzorky byly analyzovány při laboratorní teplotě. Objem nástřiku na kolonu byl 5μl.



Obrázek 9 Preparativní chromatograf Waters Autopurification system

K analýze byla použita kolona s reverzní fází XSelect® CSH™ C18 OBD™ (100 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm) (Waters Corporation, Milford, USA). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml/min. Mobilní fáze se skládala ze dvou složek:

Složka A – voda s 0,1 % CH₂O₂,

Složka B – CH₃OH s 0,1 % CH₂O₂.

Eluční program gradientu mobilní fáze byl naprogramován následovně (v / v):

0 min 5 % B,

5 min 100 % B (konkávní typ gradientu č. 7),

8,5 min 5 % B (lineární typ gradientu č. 6),

poté 1,5 minuty v počátečních podmínkách pro ekvilibraci.

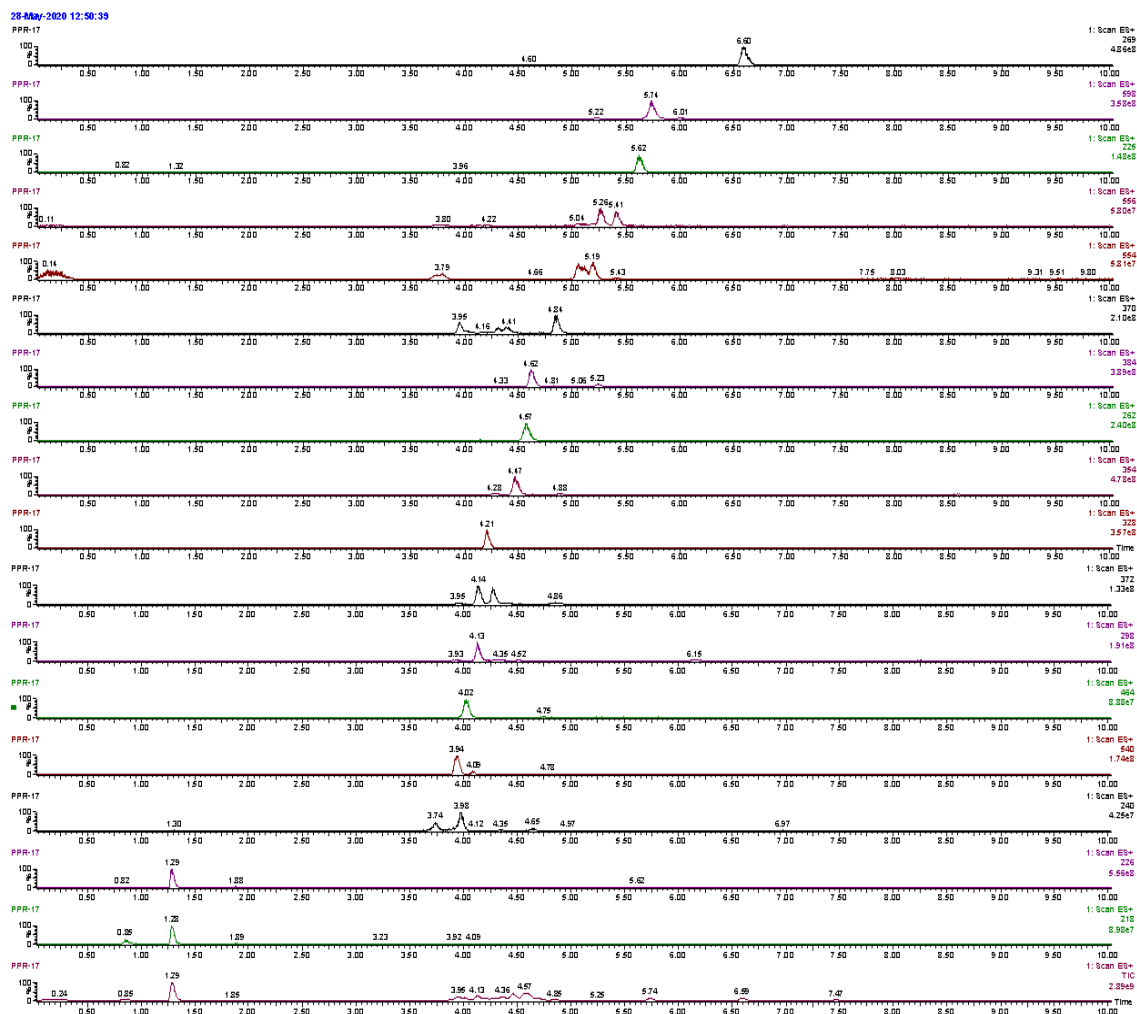
Pro detekci absorbance byl rozsah PDA detektoru nastaven od 190 do 700 nm se sběrnou frekvencí 20 Hz. LC ESI-MS analýzy byly provedeny v pozitivním iontovém režimu. Optimální hodnoty parametrů ESI-MS byly:

kapilární napětí - 0,8 kV,

teplota sondy - 600 ° C;

kuželové napětí – 15 V.

Hmotnostní spektra byla zaznamenána v rozmezí od 100–1250 m/z. Eluce sloučenin nastává v pořadí od více polárních k méně polárním, s narůstající eluční silou mobilní fáze.



Obrázek 10 Příklad porovnání složení jednotlivých frakcí pomocí LC/MS

Získané chromatogramy byly porovnány mezi sebou a frakce s podobným chromatografickým profilem byly spojené do 15 frakcí. Frakce s nejvyšší biologickou aktivitou podstoupily preparativní chromatografii jako první.

4.3.4 Preparativní kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

Prospektivní frakce s vysokou inhibiční aktivitou BuChE (PPR-7+PPR-8 = A, PPR-9+PPR10 = B, PPR11+PPR12 = C a PPR-16+PPR-17 = D), byly podrobeny preparativní chromatografii. Odparky jednotlivých frakcí byly v CH₃OH čistoty LC-MS rozpuštěny, tak aby byly kompletně rozpuštěny a purifikovány pomocí systému Waters Autopurification™ HPLC-MS (Waters Corporation, Milford, USA). Vzorky byly analyzovány při laboratorní teplotě. Objem nástřiku na kolonu byl 1000μl.

K purifikaci byly použité kolony v tandemovém uspořádání: XSelect® CSH™ C18 OBD™ (100 mm x 19 mm i.d., 5 μm) a kolona XSelect® CSH™ Prep Fluoro-

Phenyl 5 μ m OBD™ (19 \times 100 mm) (Waters Corporation, Milford, USA). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 17,06 ml/min. Mobilní fáze se skládala ze dvou složek:

Složka A – voda s 0,1 % CH₂O₂,

Složka B – CH₃OH s 0,1 % CH₂O₂.

Eluční program gradientu mobilní fáze byl naprogramován následovně (v / v):

0–3 min 5 % B,

3–26 min 5 % B, 100 % B (lineární typ gradientu č. 6),

26 min 5 % B

poté 7 minut v počátečních podmínkách pro ekvilibraci.

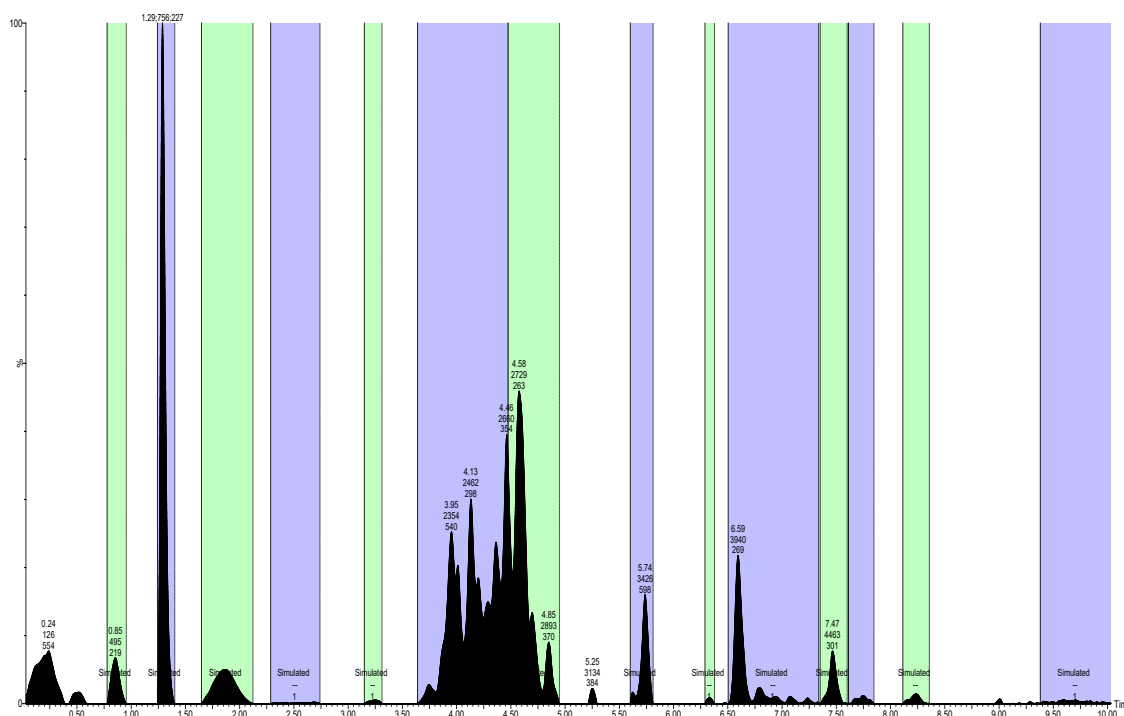
Pro detekci absorbance byl rozsah PDA detektoru nastaven od 200 do 400 nm se sběrnou frekvencí 20 Hz. LC ESI-MS analýzy byly provedeny v pozitivním iontovém režimu. Optimální hodnoty parametrů ESI-MS byly:

kapilární napětí - 0,8 kV,

teplota sondy - 600 ° C;

kuželové napětí – 15 V.

Hmotnostní spektra byla zaznamenána v rozmezí od 100–600 m/z. Získané chromatogramy byly porovnány mezi sebou a frakce s podobnými chromatografickými profily byly spojené do 15 frakcí (14 frakcí s analyty + 15 frakce odpad).



Obrázek 11 Příklad preparativní separace a sběru jednotlivých frakcí

4.3.5 *Preparativní chromatografie na tenké vrstvě*

Pro další čištění byla provedena preparativní TLC. Pro TLC byly vybrány podfrakce 7 a 8 podle chromatogramů z HPLC. Preparativní TLC podfrakce 7 byla provedena na 12 komerčních deskách o rozměrech 20 x 10 cm, kde adsorbentem byl silikagel. Desky se vyvíjely v komorách nasycených parami mobilní fáze S3, délka vyvíjení byla 8,5 cm. Na TLC došlo k rozdělení na 4 zóny, které se označily a následně byly zeškrábány. Látky ze zón byly společně se seškrábaným silikagelem převedeny do skleněné kolony, která měla na dně vatu pro zachycení silikagelu. Seškrábaný vzorek byl pak promýván CH₃OH, díky čemuž se z něj eluovaly látky adsorbované na TLC. Eluát se následně zakoncentroval na vakuové odparce.

Preparativní TLC podfrakce 8 byla provedena na 12 komerčních deskách o rozměrech 20 x 10 cm, kde adsorbentem byl silikagel. Desky se vyvíjely v komorách nasycených parami mobilní fáze S4, délka vyvíjení byla 8,5 cm. Na TLC došlo k rozdělení na 4 zóny, které se označily a následně byly zeškrábány. Látky ze zón byly společně se seškrábaným silikagelem převedeny do skleněné kolony, která měla na dně vatu pro zachycení silikagelu. Seškrábaný vzorek byl pak promýván CH₃OH, díky čemuž se z něj eluovaly látky adsorbované na TLC. Eluát se následně zakoncentroval na vakuové odparce. Výsledkem byl vznik mírně narůžovělých krystalů, které byly podrobené GC-MS analýze, LC-MS analýze a NMR spektroskopii.

4.4 Stanovení biologické aktivity

4.4.1 *Chemikálie a látky použité na stanovení biologické aktivity*

- Acetylthiocholin jodid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (ATChI)
- Butyrylthiocholin jodid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (BuTChI)
- Dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý p. a. (Lach-Ner, Neratovice) (KH₂PO₄)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (NaH₂PO₄ * 2H₂O)
- Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma Aldrich, Německo) (C₂H₆OS)
- 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina ≥ 98 % (Sigma Aldrich, Praha) (C₁₄H₈N₂O₈S₂)
- Hydrogenfosforečnan disodný bezvodý p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na₂HPO₄)

- Chlorid sodný p. a. (Lachema, Brno) (NaCl)

4.4.2 *Použité pufrы a činidla*

Zásobní 10 mM roztok NaH₂PO₄ - 1,20 g NaH₂PO₄ na 1 litr roztoku.

Zásobní 200 mM roztok NaH₂PO₄ - 24,0 g NaH₂PO₄ na 1 litr roztoku.

Zásobní 10 mM roztok Na₂HPO₄ 1,42 g NaH₂PO₄ na 1 litr roztoku.

Zásobní 200 mM roztok Na₂HPO₄ 28,4 g Na₂HPO₄ na 1 litr roztoku.

5mM Fosfátový pufr o pH 7,4 byl připraven smísením 57 ml 10mM roztoku NaH₂PO₄ a 283 ml 10 mM roztoku Na₂HPO₄ s 300 ml vody.

5mM Fosfátový pufr o pH 7,4 obsahující 150 mM chloridu sodného byl připraven rozpouštěním 8,766 g chloridu sodného p. a. v 5mM fosfátovém pufru pH 7,4 a doplněním do 1000 ml).

100mM Fosfátový pufr o pH 7,4 byl připraven smísením 57 ml 200 mM roztoku NaH₂PO₄ a 243 ml roztoku Na₂HPO₄ s 300 ml vody.

Roztok 5mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny byl připraven rozpouštěním daného množství DTNB v 100 mM fosfátovém pufru pH 7,4.

Roztok 10mM ATChI byl připraven rozpouštěním příslušného množství látky ve vodě.

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

4.4.3 *Materiál a přístrojové vybavení*

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

4.4.4 *Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity*

Stanovení inhibiční aktivity bylo vykonáno pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody s využitím rekombinantních enzymů. Jako substrát jsou

v ní využívány estery thiocholinu, ze kterých vzniká cholin a příslušné kyseliny po enzymatickém štěpení cholinesterasami. Thio skupina thiocholinu se pak naváže na DTNB. Při reakci vzniká žlutě zbarvený produkt. Ten lze spektrofotometricky stanovit při vlnové délce $\lambda = 412$ nm. Během samotné analýzy je sledován nárůst absorbance za určený časový úsek.

Hodnoty IC_{50} jsou přepočteny z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE v programu GraphPaD Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce GraphPaD Software, San Diego, CA, USA) pomocí nelineární regrese. Výsledky jsou pak porovnány s hodnotami IC_{50} známých inhibitorů cholinesteras – galanthaminem, rivastigminem a berberinem. Procenta inhibice (% I) jsou počítána podle vzorce:

$$\% I = 100 - \left(100 \times \frac{\Delta A_{BL}}{\Delta A_{SA}} \right)$$

% I – procento inhibice

ΔA_{BL} = nárůst absorbance u slepého vzorku za 1 minutu

ΔA_{SA} = nárůst absorbance u měřeného vzorku za 1 minutu

Pro přípravu vzorků bylo použito přibližně 5 mg z každé získané frakce a naředěno na 20 mg/ml s DMSO, následně ještě zředěno 1:9 s DMSO na výslednou koncentraci.

Do jamek mikrotitrační destičky se napipetovalo 8,3 μ l plazmy nebo hemolyzátu, 283 μ l 5 mM DTNB a 8,3 μ l roztoku vzorku o příslušné koncentraci. Při přípravě slepého vzorku je místo vzorku použito 8,3 μ l DMSO.

Vzorky se nechaly 1 minutu třepat a poté se 5 minut inkubovaly při 37 °C. Po inkubaci se přidá ke každému vzorku 33,3 μ l acetylthiocholinjodidu nebo butyrylthiocholinjodidu (podle určované inhibiční aktivity) a změří se absorbance vzorků při vlnové délce $\lambda = 412$ nm. Naměřené hodnoty se zanesou do vzorce, je vypočten rozdíl a stanovena průměrná hodnota inhibice se směrodatnou odchylkou.

5 VÝSLEDKY

5.1 Alkaloidy izolované z *Papaver rhoeas* a jejich strukturní analýza

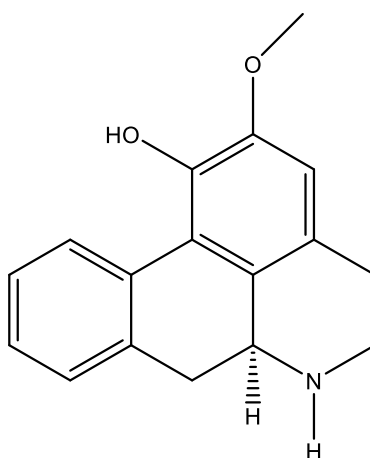
5.1.1 PPR 11-12 – Fr#8-A (+)-Kaaverin

Sumární vzorec: C₁₇H₁₇NO₂

CAS: 6899-64-5

Synonymum: (+)-5,6,6a,7-tetrahydro-2-metoxy-4H-dibenzo[de,g]chinolin-1-ol

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid aporfinového strukturního typu, (+)-kaaverin.



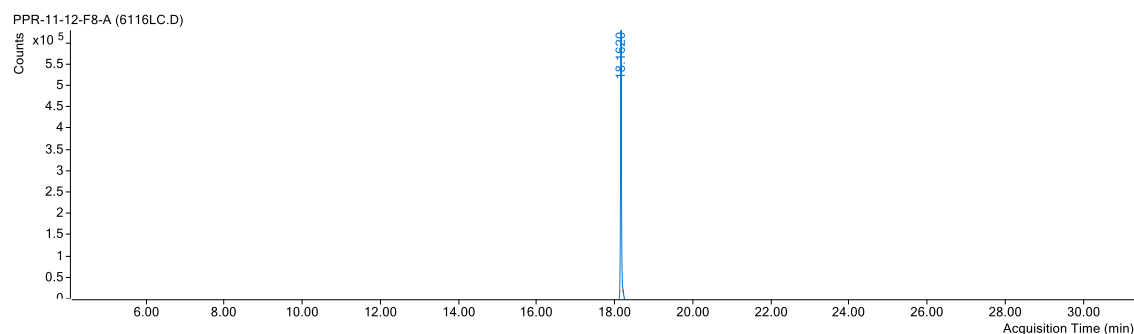
Obrázek 12 struktura kaaverinu

Molekulová hmotnost

Mr = 267,32

5.1.1.1 GC/MS analýza

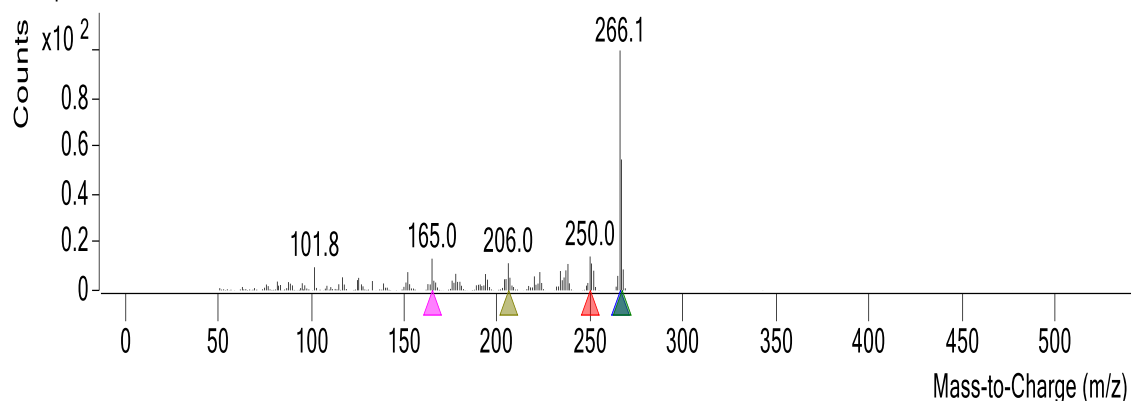
Analýzou pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí byl u dané látky zaznamenán odpovídající chromatogram:



Obrázek 13 GC/MS Chromatogram purifikovaného kaaverinu

Danému píku bylo naměřeno příslušné spektrum:

Component RT: 18.1620

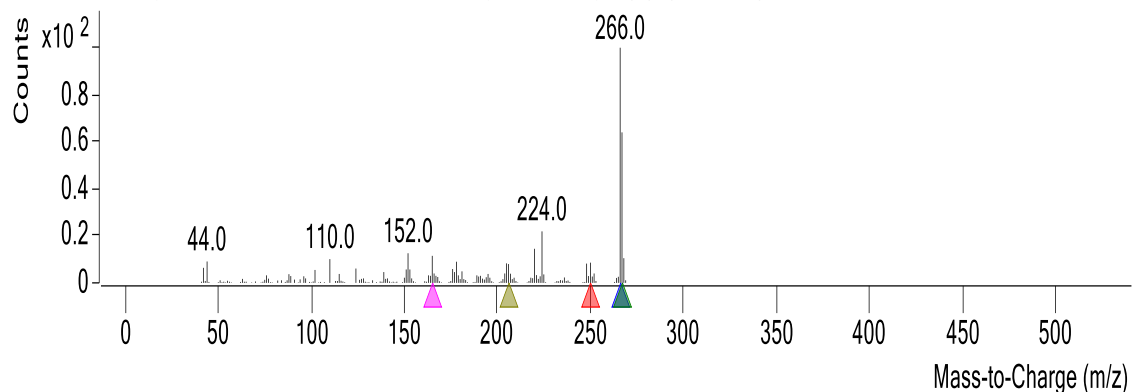


Obrázek 14 GC/MS spektrum kaaverinu

MS (EI): m/z (%) = 268,1(8,43), 267,1(58,82), 266,1 (100), 251,1(11,33), 250,0(14,27), 238,1(10,03), 165,0(13,52), 207,0(10,61), 206,0(11,03), 101,8(9,24)

Porovnáním s knihovnou spekter byl přiřazen aporfinový alkaloid s nejbližší shodou spektra, u kterého byl match factor: 56,4%.

4H-Dibenzo[de,g]quinoline-10,11-diol, 5,6,6a,7-tetrahydro-6-methyl-, (R)- (NIST11.L)

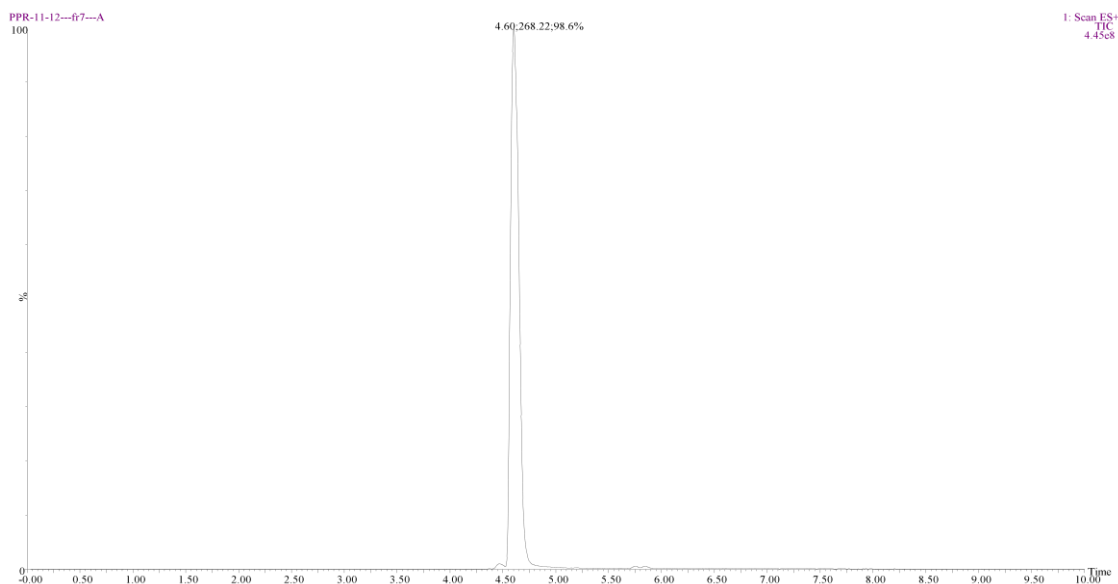


Obrázek 15 Záznam spektra z NIST knihovny

Je zřejmé, že se nejedná o námi izolovaný alkaloid, ačkoliv je přiřazené spektrum látky podobného strukturního typu (apomorfin). Důvodem pro nesprávné přiřazení je fakt, že se daná látka v knihovně nenachází.

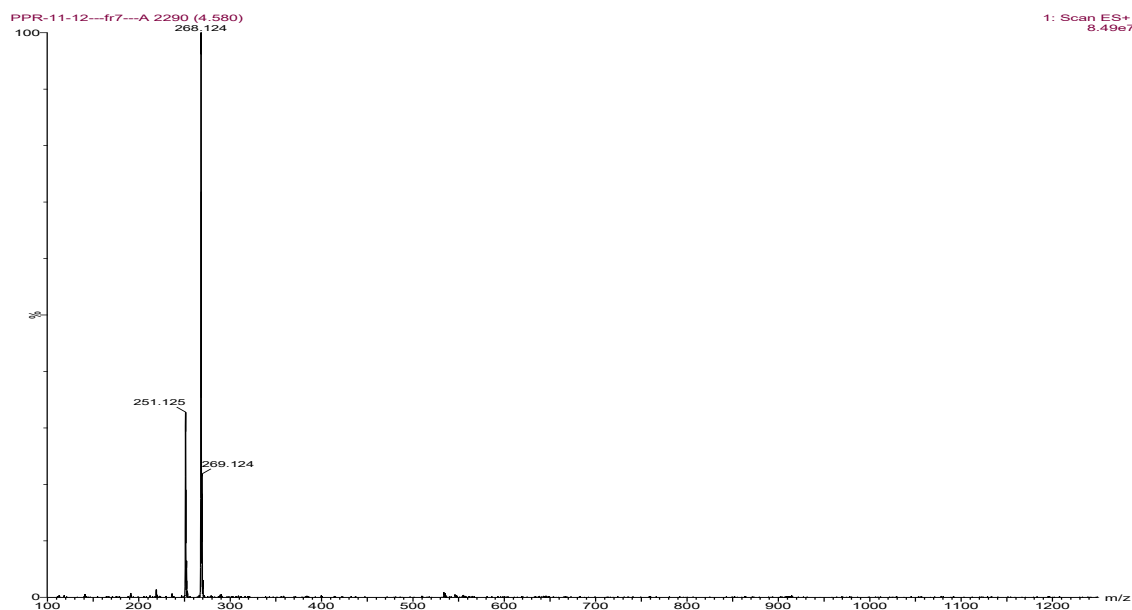
5.1.1.2 LC/MS analýza

Protože při GC/MS analýze může kvůli silné ionizační energii docházet k nepřítomnosti mateřského iontu a celá řada látek se při analýze, kvůli nízké volatilitě nemusí splýnit, pro potvrzení byla vybrána analýza pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.



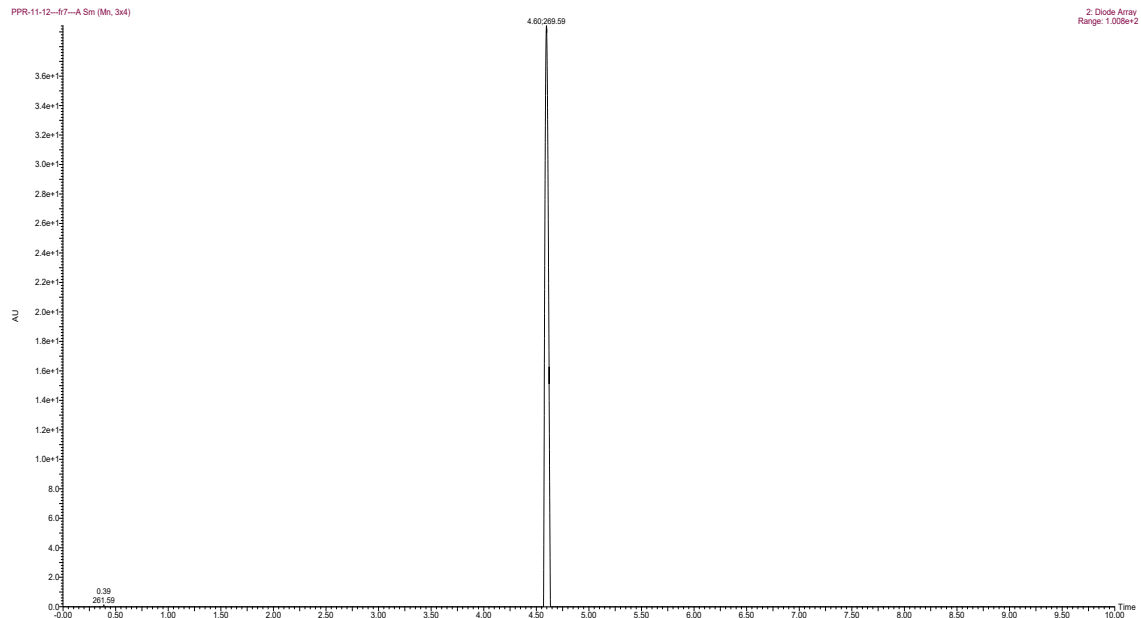
Obrázek 16 LC/MS chromatogram purifikovaného kaaverinu

Analýzou vzorku bylo zjištěno, že se jedná o monokomponentní vzorek, v kterém je přítomna hlavní látka s molekulovou hmotností $[M+H^+]$ 268,124



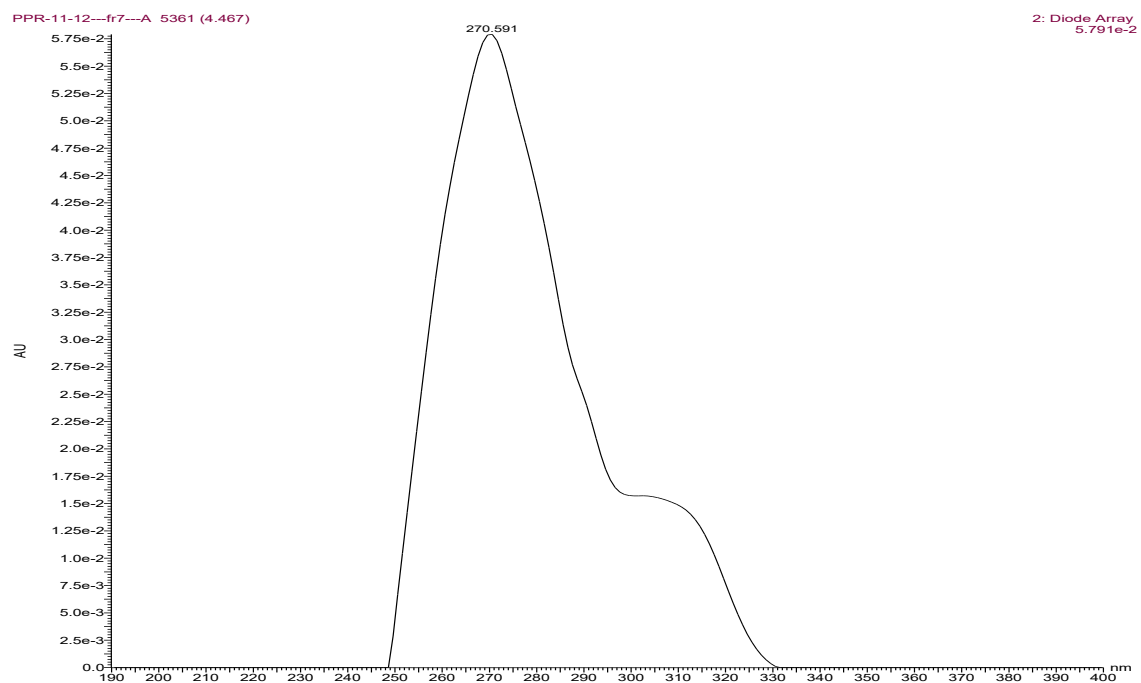
Obrázek 17 MS-ESI spektrum kaaverinu

Přístroj je vybaven detektorem s diodovým polem, proto bylo možné analyzovat také UV spektrum dané látky a vypočítat spektrální čistotu, kterou udává tzv. peak purity index: 98,6%.



Obrázek 18 LC/UV chromatogram kaaverinu

Daná látka vykazuje maximum absorpce při vlnové délce $\lambda=270,591$ nm.

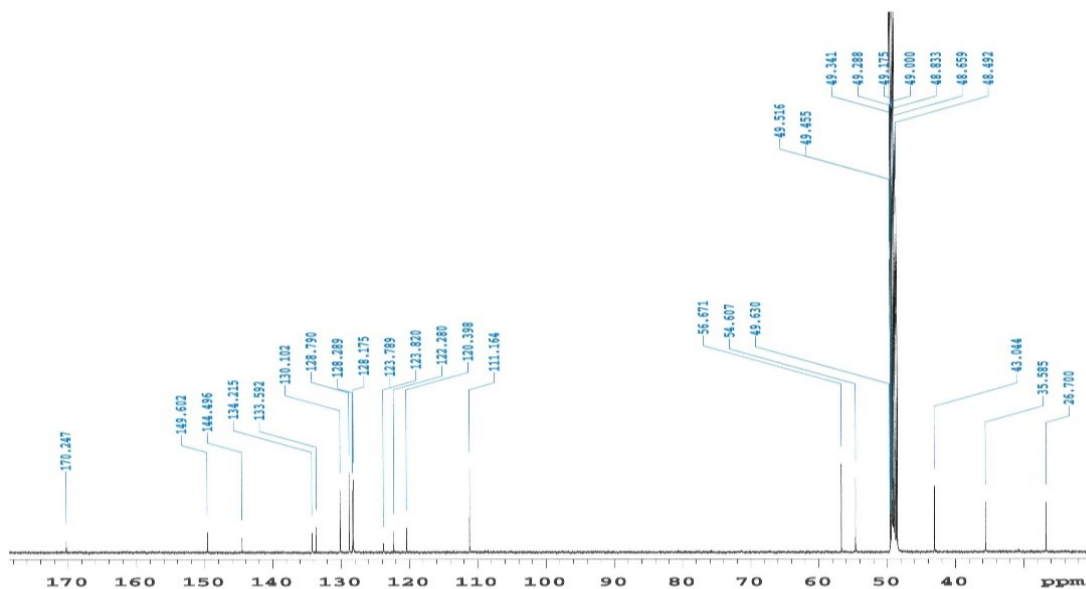


Obrázek 19 UV spektrum kaaverinu

5.1.1.3 NMR analýza

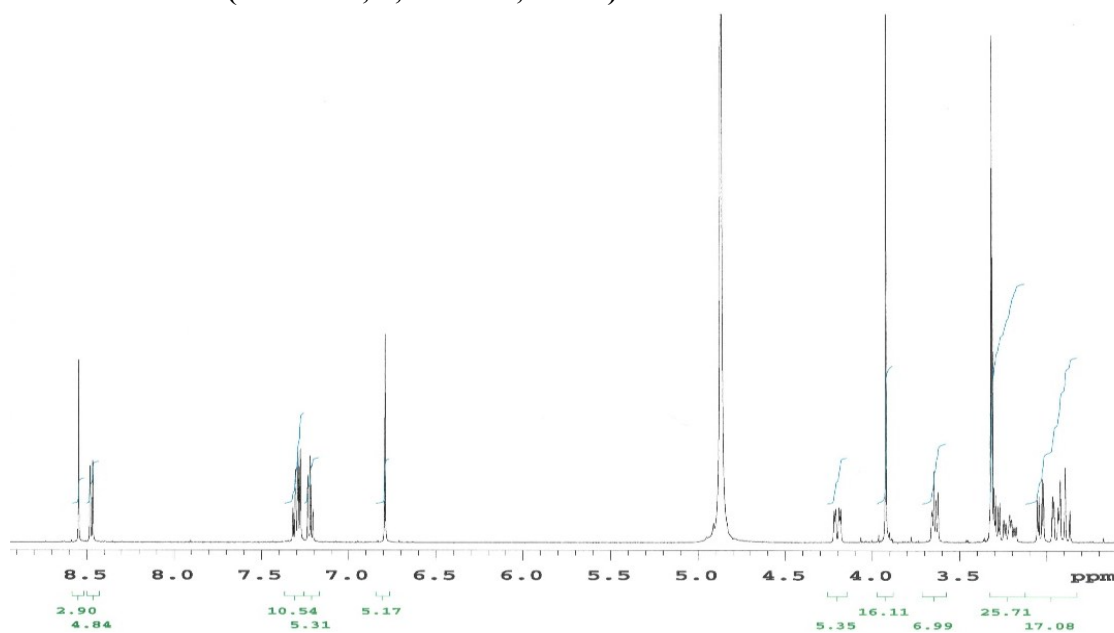
NMR analýza probíhala po převedení alkaloidu na příslušnou sůl. Analýza potvrdila, že se jedná o alkaloid (+)-kaaverin formiát.

^1H NMR (500 MHz, δ , CD_3OD , 25 °C):



Obrázek 20 ^1H NMR spektrum kaaverin formiátu

^{13}C NMR (125 MHz, δ , CD_3OD , 25 °C):



Obrázek 21 ^{13}C NMR spektrum kaaverin formiátu

Optická otáčivost

Pomocí měření optické otáčivosti bylo zjištěno, že se jedná o + formu kaaverinu.

$[\alpha]_D^{25} = +35,1^\circ$ ($c=0,057\text{mg/ml}$; MeOH), $[\alpha]_D^{25} = +79,6^\circ$ ($c=0,106\text{mg/ml}$; CHCl_3)

5.2 Biologický screening izolovaných frakcí

Po LLE extrakci sumárního alkaloidního extraktu byly výtažky podrobeny screeningu se záměrem cílené purifikace nejaktivnější frakce. Výsledky inhibiční aktivity jsou sumarizované v Tabulce 3. Protože oba výtažky měly podobnou aktivitu, bylo rozhodnuto purifikovat výtažek s extrakcí dietyléterem.

Tabulka 3 Procentuální inhibice cholinesteráz

Analyzované extrakty	% inhibice AChE (50 µg/ml)	IC ₅₀ AChE (µg/ml)	% inhibice BuChE (50 µg/ml)
<i>P.Rhoeas</i> Et ₂ O	31,48 ± 1,22	> 20	93,84 ± 0,63
<i>P.Rhoeas</i> CHCl ₃ +EtOAc+KI	41,16 ± 1,52	> 20	93,79 ± 0,41

Po Flash chromatografii podstoupili jednotlivé eluáty analogicky další biologický screening, ve kterém byly vybrány prospektivní frakce. Ty jsou sumarizované v Tabulce 4 ve které jsou nejvyšší aktivity označené červenou barvou. Další potencionálně zajímavé hodnoty inhibice byly označeny oranžovou barvou.

Tabulka 4 Procentuální inhibice eluátu získaných pomocí Flash chromatografie

Analyzované frakce	% inhibice AChE (50 µg/ml)	% inhibice BuChE (50 µg/ml)	Hmotnost frakce
PPR-1	23,66 ± 0,72	71,35 ± 1,11	
PPR-2	3,90 ± 0,84	54,98 ± 4,22	
PPR-3	13,50 ± 0,45	65,91 ± 0,30	
PPR-4	35,39 ± 1,34	60,46 ± 1,30	
PPR-5	37,46 ± 0,23	56,48 ± 1,90	
PPR-6	13,63 ± 0,55	74,02 ± 2,45	
PPR-7	30,00 ± 1,22	92,47 ± 0,79	563,2 mg
PPR-8	58,88 ± 0,18	94,07 ± 0,53	
PPR-9	33,49 ± 0,01	92,50 ± 0,53	613,7 mg
PPR-10	24,45 ± 1,43	91,26 ± 1,40	
PPR-11	42,99 ± 0,25	95,55 ± 0,96	414,9 mg
PPR-12	43,77 ± 1,73	97,03 ± 0,79	
PPR-13	34,42 ± 1,69	88,47 ± 1,64	
PPR-14	22,74 ± 0,10	77,85 ± 0,58	
PPR-15	34,63 ± 0,40	83,82 ± 3,29	
PPR-16	30,82 ± 0,44	96,52 ± 0,60	30,6 mg
PPR-17	24,06 ± 0,22	95,45 ± 0,30	
PPR-18	1,54 ± 0,04	60,31 ± 0,95	

Spojená Frakce PPR-16+PPR17 bohužel po izolaci jednotlivých látek (15 látek) nebyla schopna poskytnout dostatečné množství pro instrumentální analýzu a biologický screening izolovaných látek. Proto se izolace zaměřila na frakci PPR-11 a PPR-12. Pomocí preparativní chromatografie a po TLC přečištění byla izolována majoritní látka, která tvořila přibližně čtvrtinu celkové spojené složky. Po přečištění byla izolovaná látka po identifikaci jako (+)-kaaverin podrobena porovnání s látkami standardně používanými k terapii AD. Porovnání výsledků je uvedeno v Tabulce 5.

Tabulka 5 Porovnání IC₅₀ izolované látky (+)-kaaverinu s jinými léčivami

Testovaná látka:	IC ₅₀ (μM)	
	AChE	BuChE
(+)-kaaverin	296,7 ± 6,0	4,09 ± 0,5
galanthamin	1,71 ± 0,065	42,30 ± 1,30
huperzin A	0,033 ± 0,001	>1000
rivastigmin	0,037 ± 0,001	0,0033 ± 0,0003
berberin	0,705 ± 0,104	30,721 ± 3,492

Alkaloid (+)-kaaverin, byl ještě otestován vzhledem k permeabilitě přes hematoencefalickou bariéru. Pomocí dat ze stránky <http://www.way2drug.com/geb/> a na základě struktury byla vypočtena hodnota logBB = 0,372. Hodnota logBB je jednou z nejběžnějších hodnot udávajících permeabilitu látky přes hematoencefalickou bariéru. Je definována jako logaritmický poměr mezi koncentrací v krvi a mozku [120]. Molekuly s logBB >0,3 jsou snadno transportovány, zatímco látky s hodnotou logBB < -1,0 jsou jen ztěží schopny dostat se do mozku. Tato molekula by měla relativně snadno procházet skrz bariéru pasivní difúzí.

6 DISKUZE

Rostlina *Papaver rhoeas* L. byla pro fytochemickou studii vybrána na základě podrobné literární rešerše a screeningové studie biologických aktivit, která byla provedena na katedře farmaceutické botaniky. Přešlé pokusy indikovaly velmi dobrou inhibiční aktivitu vůči BuChE ($IC_{50} = 3,94 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$ [121]). Vzhledem k velkému množství látek nebylo možné určit, která látka má nejvyšší biologickou aktivitu. Většina alkaloidů vyskytujících se v dané rostlině zatím nebyla zkoumána pro svou inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterázám.

Cílem této diplomové práce byl ověřit proveditelnost izolace aktivních alkaloidů z rostliny *Papaver rhoeas* L. Pomocí cílené separace a purifikace biologicky aktivní frakce s využitím separačních technik a následnou identifikací látky pomocí GC/MS, LC/MS a NMR analýzy bylo zjištěno, že se jedná o látku (+)-kaaverin. Doposud nebyla daná látka zkoumaná, jako potenciální fytofarmakum, vzhledem k AD.

Alkaloidní extrakt byl pomocí Flash chromatografie rozdělen na frakce, ze kterých se pomocí dalších instrumentálních metod (preparativní HPLC, preparativní TLC) extrahoval přecháštěný alkaloid (Peak purity index: 98,6 %). Původní frakce PPR 11-12, ze které byla získána výsledná podfrakce PPR 11-12 – Fr-8-A a následně čistý alkaloid (+)-kaaverin, vykazovala slibnou inhibiční aktivitu vůči BuChE (% inhibice $95,55 \pm 0,96$, pro PPR-11 a $97,03 \pm 0,79$, pro PPR-12 při $50 \mu\text{g/ml}$). Inhibiční aktivita vůči AChE byla relativně nízká (% inhibice $42,99 \pm 0,25$, pro PPR-11 a $43,77 \pm 1,73$, pro PPR-12 při $50 \mu\text{g/ml}$). Inhibiční aktivity byly zjištěny pomocí Ellmanovy metody. Látka byla izolována z podfrakce PPR 11-12 – Fr-8. Byla podrobena instrumentálním analýzám a analýze optické otáčivosti. Pomocí těchto experimentů byla látka identifikována jako alkaloid (+)-kaaverin, který patří do skupiny alkaloidů aporfínového typu. I když přešlé experimentální práce naznačovaly přítomnost látek, které mají schopnost inhibice cholinesteráz, jako alkaloidy berberin, protopin a další, ale také flavonoidy jako luteolin, u dané rostliny zatím jejich aktivita nebyla zkoumána. Proto byl i výsledný alkaloid podroben biologickým testům pro zjištění inhibičních aktivit vůči lidským cholinesterázám. Izolovaný alkaloid (+)-kaaverin vykazoval jen mírnou inhibiční aktivitu vůči AChE ($297,6 \pm 6,0 \mu\text{g/ml}$). Jeho aktivita vůči BuChE je ale velmi slibná BuChE ($4,09 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$).

Získané hodnoty IC_{50} se porovnály s hodnotami přírodních látek – galantaminem, huperzinem A a rivastigminem, které jsou používány jako standardy

inhibičních aktivit cholinesteráz. Galantamin vykazuje silnou aktivitu vůči AChE ($1,71 \pm 0,065 \mu\text{g/ml}$), ale pouze středně silnou aktivitu vůči BuChE ($42,30 \pm 1,30 \mu\text{g/ml}$), huperzin A je látka selektivně působící vůči AChE ($0,033 \pm 0,001 \mu\text{g/ml}$), přičemž vůči BuChE je neaktivní ($>1000 \mu\text{g/ml}$), rivastigmin vykazuje aktivitu jak vůči AChE ($0,705 \pm 0,104 \mu\text{g/ml}$), tak vůči BuChE ($3,3 \pm 0,3 \text{ ng/ml}$).

Na základě výsledků lze říct, že (+)-kaaverin vykazuje slibnou inhibiční aktivitu vůči BuChE a v porovnání se standardy vykazuje lepší inhibiční aktivitu než většina použitých standardů. Vzhledem k relativně velkému izolovanému množství (62,4 mg) bude do budoucna provedena také řada testů, které by mohly odhalit cytotoxicitu, objasnit inkorporaci látky do enzymatických struktur a rozšířit tak znalosti o alkaloidech z čeledi *Papaveraceae*. Do budoucna by bylo vhodné experimentálně ověřit také aktivitu polosyntetických derivátů kaaverinu, které by mohly vykazovat daleko lepší inhibiční aktivity.

7 ZÁVĚR

Rostlina *Papaver rhoeas* L. lidově nazývaná „Vlčí mák“ je všeobecně známou plevelnou rostlinou, která se široce vyskytuje v biotopu polních kultur napříč severní polokoulí. Z fytochemického hlediska představuje zajímavý zdroj potenciálně biologicky aktivních látek. Doposud ještě nebyla publikována rozsáhlejší studie zaměřená na složení a aktivitu alkaloidních látek v souvislosti s jejich biologickou aktivitou vůči lidské cholinesteráze a AD.

Z předešlých prací katedry farmaceutické botaniky byla zřejmá aktivita alkaloidního extraktu vůči lidské butyrylcholinesteráze. Byly izolovány některé alkaloidy, které ale vykazovaly jen mírnou inhibici. S využitím moderních separačních technik a cílenou „bioguided“ analýzou bylo možné zaměřit se na potenciálně nejperspektivnější látky. Z alkaloidního extraktu *Papaver rhoeas* L. byl izolován alkaloid aporfínového strukturního typu (+)-kaaverin. Pomocí preparativní chromatografie a Flash chromatografie došlo k značnému zkrácení času izolace a minimalizaci množství organického odpadu. Předběžné výsledky naznačují jeho zajímavou inhibiční účinnost. Jeví se jako perspektivní látka pro další fytochemickou studii jako vhodný inhibitor butyrylcholinesterázy a přípravu polosyntetických derivátů.

8 POUŽITÁ LITERATURA

1. Ferreira T. S., et al.: Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2014, 16(2), 290-298. ISSN 1983-084X.
2. Raaman N.: *Phytochemical techniques*. New India Publishing, Nové Dillí 2006. ISBN 81-89422-30-8.
3. Yadav R. N. S., Agarwala M.: Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of phytology*, 2011, 3(12), 10-14. ISSN 2075-6240
4. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>, 2. 3. 2021.
5. Jiráček R., a kol.: *Demence a jiné poruchy paměti*. Grada, Praha 2009. ISBN 978-80-247-2454-6
6. Zvěřová M.: *Alzheimerova demence*. Grada, Praha 2017. ISBN 978-80-271-0561-8.
7. Orel M.: *Psychopatologie: nauka o nemocech duše*. 2. vyd., Grada, Praha 2016. ISBN 978-80-247-5516-8.
8. Hippus H., Neundörfer G.: The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2003, 5(1), 101-108. ISSN 1294-8322.
9. Jiráček R.: Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*, 2008, 9(4), 240-244. ISSN 1803-5280.
10. Mayeux R, Stern Y.: Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2012, 2(8), a006239. ISSN 2157-1422.
11. Mátl O., Mátlková M., Holmerová I.: *Zpráva o stavu demence 2016*, Česká alzheimerovská společnost, Praha 2016. ISBN 978-80-86541-50-1.
12. Gaugler J., James B., Johnson T., Marin A., Weuve J., et al.: 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 2020, 16, 391-460. ISSN 1552-5260.
13. Fertařová T., Ondřiová I.: *Demence: nefarmakologické aktivizační postupy*. Grada, Praha 2020. ISBN 978-80-271-2479-4.
14. Čechová L., a kol.: Alzheimerova nemoc a mírná kognitivní porucha: diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi*, 2011, 12(3): 175-180. ISSN 1803-5280.

15. Vyhnálek M., a kol.: Časná diagnostika Alzheimerovy nemoci ve světle nových diagnostických kritérií. *Neurologie pro praxi*, 2012, 13(6), 325-329. ISSN 1803-5280.
16. Seidl Z., Obenberger J.: *Neurologie pro studium i praxi*. 1. vyd., Grada, Praha 2004. ISBN 978-80-247-5247-1.
17. Raboch J., Pavlovský P. a kol.: *Psychiatrie*. 1. vyd. Karolinum, Praha 2013. ISBN 978-80-246-1985-9.
18. <https://www.pfizer.cz/va%C5%A1e-zdrav%C3%AD/alzheimerova-nemoc/p%C5%99%C3%AD%C4%8Diny-rizikov%C3%A9-faktory/v%C3%BDvoj-p%C5%99%C3%ADznaky-komplikace-alzheimerovy>, 18. 1. 2021.
19. Brunnström H. R., Englund E. M.: Cause of death in patients with dementia disorders. *European journal of neurology*, 2009, 16(4), 488-492. ISSN 1468-1331.
20. Zhu X., Lee H. G., Perry G., Smith M. A.: Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2007, 1772(4), 494-502. ISSN 0925-4439.
21. Zvěřová M.: Přehled známých fluidních biomarkerů neurodegenerativních změn v mozku u Alzheimerovy choroby a možnosti jejich využití, *Česká a Slovenská Psychiatrie*, 2019, 115(2). 77-80. ISSN 1212-0383.
22. Geldenhuys W. J., Darvesh A. S.: Pharmacotherapy of Alzheimer's disease: current and future trends. *Expert review of neurotherapeutics*, 2015, 15(1), 3-5. ISSN 1473-7175.
23. Mačák J., Mačáková J., Dvoráčková J.: *Patologie*. 2. dopl. vyd., Grada, Praha 2012. ISBN 978-80-247-3530-6
24. Koukolík F., Jiráček R.: *Alzheimerova nemoc a další demence*. Grada, Praha 1998. ISBN 80-7169-615-3.
25. Kalvach P., Kupka K., Vogner M.: Je amyloid podstatný pro senilní demenci?. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2018, 81(2), 164-170. ISSN 1803-6597.
26. Pidrman V.: *Demence*. Grada, Praha 2007. ISBN 978-80-247-1490-5.
27. Iqbal K., Liu, F., Gong, C. X., & Grundke-Iqbal, I.: Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Current Alzheimer Research*, 2010, 7(8), 656-664. ISSN 1567-2050.

28. Brion J.-P.: Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease. *European neurology*, 1998, 40(3), 130-140. ISSN 0014-3022.
29. Benek O., Musílek K., Kuřa K.: Mitochondriální enzym AβAD a jeho role v rozvoji a léčbu Alzheimerovy nemoci. *Česká a slovenská farmacie*, 2012, 61, 144-149. ISSN 1805-4439.
30. Heppner F. L., Ransohoff R. M., Becher B.: Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 2015, 16(6), 358-372. ISSN 1471-003X
31. Kinney J. W., Bemiller S. M., Murtishaw A. S., Leisgang A. M., Salazar A. M., Lamb B. T.: Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 2018, 4, 575-590. ISSN 2352-8737.
32. Tan Z. S., et al.: Inflammatory markers and the risk of Alzheimer disease: the Framingham Study. *Neurology*, 2007, 68(22), 1902-1908. ISSN 0028-3878.
33. Fenclová E. Albrecht J., Harsa P., Jiráček R.: Rizikové faktory Alzheimerovy nemoci. *Česká a Slovenská Psychiatrie*, 2020, 116(2), 59-65. ISSN 1212-0383.
34. Jiang Q. et al.: ApoE promotes the proteolytic degradation of Aβ. *Neuron*, 2008, 58(5), 681-693. ISSN 0896-6273.
35. Hatters D. M., Peters-Libeu C. A., Weisgraber K. H.: Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends in biochemical sciences*, 2006, 31(8), 445-454. ISSN 0968-0004.
36. Chmátalová Z., Skoumalová, A.: Oxidační stres u Alzheimerovy choroby a jeho důsledky. *Klinická biochemie a metabolismus*, 2014, 22(4), 189-195. ISSN 1803-6597.
37. Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2004, 18, 212-214. ISSN 1803-5353.
38. Bylund D. B.: Acetylcholine, v knize: *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (Enna S. J., Bylund, D. B.), kap. 1, Elsevier, Amsterdam 2007. ISBN 978-0-08-055232-3.
39. Zaagsma J., Meurs H.: Acetylcholine, v knize: *Encyclopedia of Respiratory Medicine* (Laurent G. J., Shapiro S. D., ed.), kap. 1, Academic Press, 2006, ISBN 978-0-12-370879-3.
40. Brunovský M.: Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurologie pro praxi*, 2007, 2, 112-117. ISSN 1803-5280.

41. Vnoučková K., Jiráček R.: Rivastigminum. *Remedia*, 2003, 13(6), 372-378. ISSN 2336-3541.
42. Barry W. W.: Cholinesterases, v knize: *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, (Krieger R., ed.), 3. vyd., kap. 68, Academic Press, 2010, ISBN 9780123743671.
43. Pope C., Karanth S., Liu J.: Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. *Environmental toxicology and pharmacology*, 2005, 19(3), 433-446. ISSN 1382-6689.
44. Švihovec J. a kol.: *Farmakologie*. Grada, Praha 2018. ISBN 978-80-247-5558-8.
45. Winslow B. T., Onysko M., Stob C. M., Hazlewood K. A.: Treatment of Alzheimer disease. *American family physician*, 2011, 83(12), 1403-1412. ISSN 0002-838X
46. Slíva J., Jiráček R.: Donepezilum. *Remedia*, 2004, 14(6), 464-469. ISSN 2336-3541.
47. Suchopár J., Valentová Š. a kol.: *Compendium: léčiva používaná v podmínkách ČR*. 5. vyd. Panax, Praha 2018, ISBN 978-80-902806-7-0.
48. Franková V.: Optimalizace léčby Alzheimerovy choroby. *Interní medicína pro praxi*, 2016, 18(2), 87-90. ISSN 1803-5256.
49. <https://www.medsafe.govt.nz/profs/PUArticles/December2017/Donepezil.htm>, 2. 2. 2021.
50. Jahodář L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Karolinum, Praha 2011. ISBN 978-80-246-2015-2.
51. Vališ M., Caisberger F., Šimůnek L., Linková H.: Farmakoterapie demencí – pokroky v léčbě a aktuální doporučení. *Remedia*, 2013, 23(6), 396-399. ISSN 2336-3541.
52. Drtinová L., Pohanka M.: Možnosti využití huperzinu A v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Chemické listy*, 2013, 107(1), 12-15. ISSN 1213-7103.
53. Liu J., Chang L., Song Y., Li H., Wu Y.: The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease, *Frontiers in Neuroscience*, 2019, 13, 43. ISSN 1662-453X.
54. Jiráček R.: Současné trendy v biologické terapii Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi*, 2006, 7(1), 8-11. ISSN 1803-5272.
55. Kuns B., Rosani A., Varghese D.: Memantine, v knize: *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL) 2021.
56. Hort J.: *Alzheimerova choroba a jiné demence aneb co v učebnicích 20. století nebylo*. MediMedia Information, Praha 2007. ISBN 978-80-863336-07-7.

57. Jirák R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia*, 2009, 19(5), 342-345. ISSN 2336-3541.
58. Srivastava, A., Srivastava P., Pandey A., Khanna V. K., Pant A. B.: Phytomedicine: A Potential Alternative Medicine in Controlling Neurological Disorders, v knize: *New Look to Phytomedicine* (Khan M. S. A., Ahmad I., Chattopadhyay D., ed.), kap. 24, Academic Press, 2019, ISBN 9780128146194.
59. Jirák R., Obenberger J., Preiss M.: *Alzheimerova choroba*. Maxdorf, Praha 1998. ISBN 80-85800-88-8.
60. Jirák R.: Extractum Ginkgo biloba EGb761 a jeho využití v psychiatrii. *Medicina pro praxi*, 2018, 15(Suppl. 1), 15-18. ISSN 1803-5310.
61. Vranová V.: Fytofarmakologie standardizovaného extraktu z listů Ginkgo biloba EGb 761. *Medicina pro praxi*, 2018, 15(Suppl.1), 19-21. ISSN 1803-5310.
62. Christen Y.: Oxidative stress and Alzheimer disease. *The American journal of clinical nutrition*, 2000, 71(2), 621S-629S. ISSN 1938-3207.
63. Zandi P. P., et al.: Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study. *Archives of neurology*, 2004, 61(1), 82-88. ISSN 1538-3687.
64. Townsend K. P., Praticò D.: Novel therapeutic opportunities for Alzheimer's disease: focus on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *The FASEB Journal*, 2005, 19(12), 1592-1601. ISSN 1530-6860.
65. Imbimbo B. P., Solfrizzi V., Panza F.: Are NSAIDs useful to treat Alzheimer's disease or mild cognitive impairment?. *Frontiers in aging neuroscience*, 2010, 2, 19. ISSN 1663-4365.
66. Winbland B., Fioravanti M., Dolezal T., Logina I., Milanov I. G., Popescu D. C., Solomon A.: Therapeutic use of nicergoline. *Clinical drug investigation*, 2008, 28(9), 533-552. ISSN 1179-1918.
67. Hroudová J.: Výzkum nových léčiv u Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi*, 2017, 18(1), 7-10. ISSN 1803-5272.
68. Thomas T.: Monoamine oxidase-B inhibitors in the treatment of Alzheimers disease. *Neurobiology of aging*, 2000, 21(2), 343-348. ISSN 1558-1497.
69. Gökhan-Kelekçi N., et al.: A new therapeutic approach in Alzheimer disease: some novel pyrazole derivatives as dual MAO-B inhibitors and antiinflammatory analgesics. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2007, 15(17) 5775-5786. ISSN 0968-0896.

70. Brinton R. D.: Impact of estrogen therapy on Alzheimer's disease. *CNS drugs*, 2004, 18(7), 405-422. ISSN 1179-1934.
71. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=18893#null, 3. 12. 2020
72. Kadereit J. W.: Papaveraceae, v knize: *Flowering Plants· Dicotyledons* (Kubitzki K., Rohwer J., Bittrich V, ed.), kap. 58, Springer, Berlin, Heidelberg 1993. ISBN 978-3-662-02899-5.
73. Kalis A. J.: Papaveraceae. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 1979, 28(3-4), A209-A260. ISSN 0034-6667.
74. Križo M.: *Atlas rostlin*. 1. vyd. Česká zemědělská univerzita, Praha 1996, ISBN 80-213-0279-8.
75. Randuška D.: *Barevný atlas rostlin*, 2. vyd. Obzor, Bratislava 1983. ISBN 65-027-83.
76. Jirásek V., Starý F., Severa F.: *Kapesní Atlas Léčivých Rostlin*. 2. vyd. Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1989. ISBN 14-321-89.
77. Rubcov V. G., Beneš, K.: *Zelená lékárna*. Lidové nakladatelství, Praha 1990. ISBN 80-7022-004-X.
78. Jahodář L.: *Léčivé rostliny v současné medicíně*. Havlíček Brain Team, Praha 2010. ISBN 978-80-87109-22-9.
79. Ünsal Ç., Özbek B., Sarıyar G., Mat A.: Antimicrobial activity of four annual Papaver species growing in Turkey. *Pharmaceutical biology*, 2009, 47(1), 4-6. ISSN 1744-5116.
80. Grauso L., de Falco B., Motti R., Lanzotti V.: Corn poppy, *Papaver rhoeas* L.: a critical review of its botany, phytochemistry and pharmacology. *Phytochemistry Reviews*, 2021, 20, 227-248. ISSN 1572-980X.
81. Sarıyar G., Mat A., Ünsal Ç., Özhatay N.: Biodiversity in the Alkaloids of 7 Annual Papaver Species of Turkish Origin. *ACTA Pharmaceutica Scientia*, 2002, 44(3), 159-168. ISSN 1307-2080.
82. Kalav Y. N., Sarıyar G.: Alkaloids from Turkish *Papaver rhoeas*. *Planta medica*, 1989, 55(5), 488. ISSN 1439-0221.
83. Almousawi U. M. N., Alwan A. A.: The significance of opium alkaloids in the classification of Papaveraceae in Iraq. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2017, 6(1), 430-437. ISSN 2278-4136.

84. Grycová L., Dostál J., Marek R.: Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry*, 2007, 68(2), 150-175. ISSN 0031-9422.
85. Kukulka-Koch, W. A., Widelski, J.: Alkaloids, v knize: *Pharmacognosy* (McCreath S. B., Delgoda R., ed.), kap. 7. Academic Press, Lodnyn 2017, ISBN 9780128021040
86. Da-Cunha E. V. L., Fachine I. M., Guedes D. N., Barbosa-Filho J. M., da Silva M. S.: Protoberberine Alkaloids, v knize: *The Alkaloids: Chemistry and Biology* (Cordell G A., ed.), sv. 62, kap. 1, Academic Press, 2005. ISBN 978-0-12-469562-7.
87. Och A., Podgórski R., Nowak R.: Biological Activity of Berberine—A Summary Update. *Toxins*, 2020, 12(11), 713. ISSN 2072-6651.
88. Yin J., Xing H., Ye J.: Efficacy of berberine in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2008, 57(5), 712-717. ISSN 0026-0495.
89. Amin A. H., Subbaiah T. V., K. M. Abbasi K. M.: Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. *Canadian Journal of Microbiology*, 1969, 15(9), 1067-1076. ISSN 1480-3275.
90. Wu J., et al.: Coptisine from *Coptis chinensis* exerts diverse beneficial properties: A concise review. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2019, 23(12), 7946-7960. ISSN 1582-4934.
91. Teles M. M. R. S., Pinheiro A. A. V., Dias C. D. S., Tavares J. F., Barbosa Filho J. M., Da Cunha E. V. L.: Alkaloids of the Lauraceae, v knize: *The Alkaloids: Chemistry and Biology* (Knölker H.-J., ed.), sv. 82, kap. 3. Academic Press, Cambridge 2019, ISBN 978-01-28174-81-4
92. Zhong M., Liu Y., Liu J., Di D., Xu M., Yang Y., Li W., Chen Y., Liu J.: Isocorydine Derivatives and Their Anticancer Activities. *Molecules*, 2014, 19(8), 12099-12115. ISSN 1420-3049.
93. Kapadia N, Harding W.: Aporphine alkaloids as ligands for serotonin receptors. *Medicinal chemistry*, 2016, 6, 241-249. ISSN 2161-0444.
94. Gokgoz N. B., Akbulut B. S.: Proteomics evidence for the activity of the putative antibacterial plant alkaloid (-)-roemerine: mainstreaming omics-guided drug discovery. *Omics: a journal of integrative biology*, 2015, 19(8), 478-489. ISSN 1557-8100.

95. Ma H. B., Tian Z. S., Gui S. L., Cui W. G., Li W.: Anti-prostate cancer effect of roemerine: An experimental study. *Zhonghua nan ke xue = National Journal of Andrology*. 2017, 23(1), 27-33. ISSN 1009-3591.
96. Chulia S., Ivorra M. D., Cavé A., Cortes D., Noguera M. A., D'ocon M. P.: Relaxant activity of three aporphine alkaloids from *Annona cherimolia* on isolated aorta of rat. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 1995, 47(8), 647-650. ISSN 2042-7158.
97. Onda M., Takahashi H.: Protopine Alkaloids, v knize: *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology* (Arnold Brossi, ed.), sv. 34, kap. 4, Academic Press, Orlando 1989, ISBN 9780124695344.
98. Guinaudeau H., Shamma M.: The Protopine Alkaloids, *Journal of Natural Products*, 1982, 45(3), 237-246. ISSN 1520-6025.
99. Vacek J., Walterova D., Vrublova E., Simanek V.: The chemical and biological properties of protopine and allocryptopine. *Heterocycles*, 2010, 81(8), 1773-1789. ISSN 0385-5414.
100. Montgomery C. T., Cassels B. K., Shamma M.: The rhoeadine alkaloids. *Journal of Natural Products*, 1983, 46(4), 441-453. ISSN 1520-6025.
101. Rönsch H.: Rhoeadine alkaloids, v knize: *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology* (Brossi A., ed.), sv. 28, kap. 1, Academic Press, 1986. ISBN 978-0-12-469528-3.
102. Dogan G., Bagci E.: Essential oil composition of *Papaver rhoeas* L. Corn poppy *Papaveraceae* from Turkey. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 2014, 42(4), 545-549. ISSN 1303-5002.
103. Sasidharan S., Chen Y., Saravanan D., Sundram K. M., Yoga Latha L.: Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African journal of traditional, complementary and alternative medicines*, 2011, 8(1), 1-10. ISSN 2505-0044.
104. Harborne A. J.: *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer Science & Business Media, Heidelberg 1998. ISBN 978-0-412-57260-9.
105. Berk Z.: *Food Process Engineering and Technology*. Academic Press, 2013. ISBN 9780124159860.

106. Zhang Q. W., Lin L. G., Ye W. C.: Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese medicine*, 2018, 13(1), 1-26. ISSN 2542-5641.
107. Srivastava N., et al.: Advances in extraction technologies: isolation and purification of bioactive compounds from biological materials, v knize: *Natural Bioactive Compounds* (p. Sinha R, Häder D-P., ed.), kap. 21, Academic Press, 2021. ISBN 978-0-12-820655-3.
108. Abubakar A. R., Haque M.: Preparation of medicinal plants: basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 2020, 12(1), 1-10. ISSN 0976-4879.
109. Sciarrone D., et al.: Evolution and status of preparative gas chromatography as a green sample-preparation technique. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015, 71, 65-73. ISSN 0165-9936.
110. Klimeš J. a kol.: *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 2. vyd. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové 2015. ISBN 978-80-260-8175-3.
111. Nováková, L., Douša, M. a kol.: *Moderní HPLC Separace v Teorii a Praxi I*. Europrint, Praha 2013. ISBN 978-80-260-4243-3
112. Quintin, T. J. (ed.): *Chromatography: Types, Techniques and Methods*. Nova Science Publishers; New York 2010. ISBN 978-1-60876-316-0.
113. Schmidt-Traub, H., Schulte, M., Seidel-Morgenstern, A., (eds): *Preparative chromatography*. John Wiley & Sons, Weinheim 2020. ISBN 978-3-527-81631-6.
114. Nováková, L., Douša, M. a kol.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Europrint, Praha 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
115. <http://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>, 25. 7. 2021.
116. Poole, C.: *Gas Chromatography*. 1. vyd. Elsevier, Oxford 2012. ISBN 978-0-12-385540-4.
117. Roge, A. B., et al.: Brief review on: Flash chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2011, 2(8), 1930-1937. ISSN 0975-8232.
118. Fried, B., Sherma, J.: *Thin-Layer Chromatography, Revised And Expanded*. 4. vyd. CRC Press, 1999. ISBN 9780824702229.
119. Kar, A.: *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. New Age International, Nové Dillí 2003. ISBN 81-224-1501-6.

120. Chlebek J., Korábečný J., Doležal R., Štěpánková Š., Pérez D. I., Hošťálková A., Opletal L., Cáhliková L., Macáková K., Kučera T., Hrabínová M., Jun D.: In Vitro and In Silico acetylcholinesterase inhibitory activity of thalictricavine and canadine and their predicted penetration across the blood-brain barrier. *Molecules*, 2019, 24(7), 1340. ISSN 1420-3049.
121. Čakurdová M.: Alkaloidy *Papaver rhoeas* L.(Papaveraceae) a jejich biologická aktivita vztažená k Alzheimerově chorobě II, *diplomová práce*, Univerzita Karlova, Praha 2017.