

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOLOGIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

IZOLACE ALKALOIDŮ DRUHU *GEISSOSPERMUM VELLOSI* ALLEMÃO A
STUDIUM JEJICH BIOLOGICKÉ AKTIVITY IX.

Autor: Tereza Brtníková

Vedoucí práce: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Hradec Králové, 2024

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOLOGIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



DIPLOMA THESIS

**ISOLATION OF ALKALOIDS OF THE SPECIES *GEISSOSPERMUM*
VELLOSII ALLEMÃO AND STUDY OF THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY IX.**

Autor: Tereza Brtníková

Vedoucí práce: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Hradec Králové, 2024

PROHLÁŠENÍ

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

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce PharmDr. Marcele Šafratové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost a trpělivost při práci na experimentální části v laboratoři a následně při zpracování diplomové práce za cenné rady a poznámky. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Štefanovi Kosturkovi za velkou pomoc, čas a ochotu při práci jak v laboratoři, tak při psaní diplomové práce. Děkuji RNDr. Jaroslavu Jenčovi, Ph.D. za asistenci při flash chromatografii a také ostatním pracovníkům katedry Farmakognozie a farmaceutické botaniky za jejich příležitostnou pomoc.

Obsah

1	ÚVOD	10
2	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	12
3	TEORETICKÁ ČÁST	13
3.1	<i>Geissospermum vellosii</i> Allemão	13
3.1.1	Botanická charakteristika	13
3.1.2	Rozšíření.....	14
3.1.3	Tradiční využití	14
3.1.4	Obsahové látky	14
3.1.5	Biologická aktivita	22
3.2	Chromatografie.....	27
3.2.1	Rozdělení chromatografických metod dle principu vzniku interakce k jednotlivým fázím	28
3.2.2	Rozdělení chromatografických metod dle použité mobilní fáze	30
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	35
4.1	Používané materiály a laboratorní vybavení.....	35
4.1.1	Rozpouštědla	35
4.1.2	Chemikálie	35
4.1.3	Rostlinný materiál	35
4.1.4	Chromatografické sorbenty	36
4.1.5	Pomocný materiál	36
4.1.6	Mobilní soustavy pro tenkovrstvou chromatografii	36
4.1.7	Detekční činidla.....	36
4.1.8	Použité přístroje	37
4.2	Obecné postupy	37
4.2.1	Příprava rozpouštědel a jejich skladování.....	37
4.2.2	Tenkovrstvá chromatografie	38

4.2.3	Eluce alkaloidů	39
4.2.4	Odpařování rozpouštědel	39
4.2.5	Extrakce kapaliny-kapalinou	39
4.2.6	Uchování a skladování vzorku	40
4.2.7	Flash chromatografie	40
4.2.8	Strukturní analýza	41
4.3	Samotná izolace alkaloidů	42
4.3.1	Frakce GV-6	42
4.3.2	Zpracování podfrakce GV-6-A	43
4.3.3	Zpracování podfrakce GV-6-B	44
4.3.4	Zpracování podfrakce GV-6-C	46
4.3.5	Zpracování podfrakce GV-6-D	46
4.3.6	Zpracování podfrakce GV-6-E	48
5	VÝSLEDKY	52
5.1	Stanovení biologické aktivity	52
6	DISKUSE A ZÁVĚR	53
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	55
8	ABSTRAKT	61
9	ABSTRACT	62

PŘEHLED OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Geissospermum vellosii – Botanická zahrada Rio de Janeiro, Brazílie..	13
Obrázek 2: Prekurzor indolových alkaloidů L-tryptofan	15
Obrázek 3: První krok syntézy indolových alkaloidů [9].....	15
Obrázek 4: Indolalkylaminový typ [13]	16
Obrázek 5: Fysostigminový typ [13].....	16
Obrázek 6: Karbolinový typ [13].....	17
Obrázek 7: Ergolinový typ [13].....	17
Obrázek 8: Strychninový typ [13].....	18
Obrázek 9: Kondenzace tryptaminu a sekologaninu [25].....	19
Obrázek 10: Biosyntéza terpenových indolových alkaloidů [8]	19
Obrázek 11: Nejdůležitější alkaloidy izolované z GV [1]	21
Obrázek 12: Eluotopní řada [65].....	29
Obrázek 13: TLC chromatogram	31
Obrázek 14: Používaný flash chromatograf.....	32
Obrázek 15: Litá deska s frakcí GV-6 vyvíjená v S ₁ postříkaná Dragendorffovým čínidlem	42
Obrázek 16: Litá deska s frakcí GV-6 vyvíjená v S ₁ zobrazena pod UV světlem.....	42
Obrázek 17: Záznam z flash chromatografie podfrakce GV-6-A.....	43
Obrázek 18: TLC podfrakce GV-6-B.....	44
Obrázek 19: TLC podfrakce GV-6-B-1	45
Obrázek 20: TLC podfrakce GV-6-C.....	46
Obrázek 21: TLC podfrakce GV-6-D.....	46
Obrázek 22: TLC podfrakce GV-6-D-3.....	47
Obrázek 23: Záznam z flash chromatografie podfrakce GV-6-E.....	48
Obrázek 24: Záznam z flash chromatografie podfrakce GV-6-E-5	49
Obrázek 25: Záznam z flash chromatografie podfrakce GV-6-E-0	50
Obrázek 26: TLC podfrakce GV-6-E-0-G pod UV světlem.....	51
Obrázek 27: TLC podfrakce GV-6-E-0-G po důkazu Dragendorffovým čínidlem	51

PŘEHLED TABULEK

Tabulka 1: Použité mobilní fáze	36
Tabulka 2: Podfrakce GV-6-A až GV-6-E a jejich hmotnosti.....	42
Tabulka 3: Podfrakce GV-6-A-0A až GV-6-A-4	43
Tabulka 4: Podfrakce GV-6-A-1-A až GV-6-A-1-E a jejich hmotnosti	44
Tabulka 5: Podfrakce GV-6-B-1 a GV-6-B-2 a jejich hmotnosti.....	45
Tabulka 6: Podfrakce GV-6-B-1-A a GV-6-B-1-B a jejich hmotnosti.....	45
Tabulka 7: Podfrakce GV-6-C-1 až GV-6-C-3 a jejich hmotnosti.....	46
Tabulka 8: Podfrakce GV-6-D-1 až GV-6-D-3 a jejich hmotnosti.....	47
Tabulka 9: Podfrakce GV-6-D-3-A a GV-D-3-B a jejich hmotnosti.....	47
Tabulka 10: Podfrakce GV-6-E-1 až GV-6-0 a jejich hmotnosti.....	48
Tabulka 11: Podfrakce GV-6-E-5-A až GV-6-E-5-E a jejich hmotnosti	49
Tabulka 12: Podfrakce GV-6-E-0-A až GV-6-E-0-G a jejich hmotnosti.....	50
Tabulka 13: Podfrakce GV-6-E-O-G-1 až GV-6-E-O-G-6 a jejich hmotnosti	51

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

5-HT	5-hydroxytryptamin, serotonin
Ach	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
BHP	Benigní hyperplazie prostaty
BChE	Butyrylcholinesterasa
CDK	Cyklin dependentní kinasa 5
CNS	Centrální nervová soustava
CRPC	Kastračně refrakterní karcinom prostaty
DMT	Dimethyltryptamin
GABA	γ -aminomáselná kyselina
GLC	Rozdělovací plynová chromatografie
GSC	Plynová adsorpční chromatografie
GV	<i>Geissospermum vellosii</i>
HCC	Hepatocelulárnímu karcinomu
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPTLC	Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
IL	Interleukiny
IPP	Isopentyldifosfát
LLC	Kapalinová rozdělovací chromatografie
LSC	Kapalinová adsorpční chromatografie
MAO-A	Monoaminoxidasa A
MS	Hmotnostní spektrometr
NF κ B	Nukleární faktor kappa B
NO	Oxid dusnatý
OSCC	Dlaždicobuněčný karcinom dutiny ústní
PC	Papírová chromatografie
R _F	Retenční faktor
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
TNF	Tumor nekrotizující faktor
U-HPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV/VIS	Ultrafialové/viditelné světlo
WFO	The World Flora Online

1 ÚVOD

Znalost léčivých rostlin a jejich použití sahá až do dávných dob. S rozvojem farmaceutického průmyslu mohou být v dnešní době tradiční rostlinná léčiva opomíjená, existuje však mnoho zemí, kultur a jedinců, kteří na ně nedají dopustit.

Vědci se snaží hledat stále nové a nové léčivé látky vzhledem ke zvyšujícím se nárokům na léčiva, novým nemocem, rozvoji rezistence, pochopení patofyziologických aspektů chorob, objevování cílových struktur v lidském těle, které je možno léčivými ovlivnit, rozvoji technologií a mnoho dalšího. Jednou z metod vývoje nových léčiv je využívání poznatků o léčebných účincích rostlin. Základem je izolace jejich obsahových látek a stanovení biologické aktivity. Některé látky jsou využívány dodnes, jiné se kvůli svým nevyhovujícím vlastnostem přestaly používat. U látek, které nemají vhodné vlastnosti pro přímé použití, je potřeba hledat jejich deriváty, které mají méně nežádoucích účinků, delší nebo naopak kratší biologický poločas, vystupňovaný žádoucí účinek, lepší farmakokinetické vlastnosti a další aspekty ovlivňující bezpečnost a účinnost léčivých přípravků.

Významnou skupinu přírodních látek s širokou škálou biologických aktivit představují alkaloidy. Jejich účinky mohou být analgetické, protinádorové, protizánětlivé, protimikrobiální, sedativní, psychoaktivní, neurotoxicke, antioxidantní, ovlivňují kardiovaskulární systém, vegetativní nervový systém atd. Mezi alkaloidní léčiva používaná dodnes můžeme zmínit galantamin, morfin, kolchicin, vinkristin, vinblastin nebo pilokarpin.

Na katedře Farmakognozie a farmaceutické botaniky byla provedena screeningová studie na stanovení aktivity vůči cholinesterásám AChE a BChE. Výsledky sumárního extraktu GV prokázaly inhibiční aktivitu na tyto enzymy (AChE: $IC_{50} = 15,19 \pm 0,96 \mu\text{g/ml}$, BChE: $IC_{50} = 0,37 \pm 0,049 \mu\text{g/ml}$). Na základě dosažení těchto hodnot byla vybrána rostlina *Geissospermum vellosii* Allemão (GV) pro tuto diplomovou práci, jejímž cílem je izolovat alkaloidy obsažené v GV a určit jejich biologickou aktivitu vůči cholinesterásám.

Geissospermum vellosii Allemão je jihoamerický strom, obsahující velké množství indolových alkaloidů. Stejně jako alkaloidy obecně i tyto alkaloidy mají široké spektrum účinku. Za zmínku stojí především anticholinesterasová a protinádorová aktivita, díky

čemuž se jeví jako potencionální léčiva nebo předlohové struktury ve vývoji léčiv na Alzheimerovu chorobu a různé druhy karcinomů (karcinom prostaty, prsu, pankreatu, kolorektální a ovariální karcinom) [1].

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

- a)** Zpracování literární rešerše na zadané téma.
- b)** Použití standardních chromatografických metod pro izolaci alkaloidů z vybrané frakce.
- c)** Stanovení struktury a biologické aktivity izolovaných alkaloidů.
- d)** Vypracování diplomové práce.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 *Geissospermum vellosii* Allemão

Geissospermum Allemão je rod, který řadíme do čeledi Apocynaceae (toješťovité). Databáze The World Flora Online (WFO) uznává šest druhů *Geissospermum* Allemão, nejznámější je však pravděpodobně popisovaný druh *Geissospermum vellosii* Allemão. Jedná se o tropický strom rostoucí ve Střední a Jižní Americe. Pro druh GV se můžeme setkat s názvy: *Geissospermum leave* Miers, *Geissospermum martianum* Miers, *Tabernaemontana leavis* Vell., je znám také pod lidovým názvem Pao Pereira [1] [2].

Název rostliny a její rod byly stanovené v roce 1845 brazilským lékařem a botanikem Francisco Freire Allemão de Cysneiros (*1797 – †1874) po několika předchozích chybných klasifikacích. Rostlinu pojmenoval *Geissospermum vellosii* Allemão a do názvu zakomponoval na počest i jméno prvního botanika, který rostlinu popsal, Frei José Mariano da Conceição Velloso (*1741 – †1811) [3].

3.1.1 Botanická charakteristika

Geissospermum vellosii Allemão je strom střední velikosti dorůstající až do výšky 20-30 metrů. Kmen má průměr okolo 1 metru a je světle hnědý až nažloutlý s lehce rýhovanou strukturou kůry. Listy jsou jednoduché, střídavě postavené. Květenství patří mezi vrcholičnaté s bílými květy. Plody má trubkovité, které jsou po dozrání žluté s plochými a bílými semeny. Plody a konce větví produkují latex [4].



Obrázek 1: *Geissospermum vellosii* – Botanická zahrada Rio de Janeiro, Brazílie
(osobní sbírka M. R. Almeida) [30]

3.1.2 Rozšíření

Geissospermum vellosii Allemão se vyskytuje ve vlhkých oblastech naší planety, konkrétně v oblasti Amazonie, v deštných pralesech. Dnes je hojně rozšířen do mnoha zemí Amazonského deštného pralesa jako: Brazílie, Bolívie, Ekvádor, Francouzská Guiana, Peru a Venezuela [5].

3.1.3 Tradiční využití

Pro léčebně účely se zpracovává zejména kůra stromu. Gustav Peckolt (*1861 – †1923), německý farmaceut a přírodovědec, který se zabýval brazilskou flórou, a především léčebnými účinky těchto rostlin, označil GV za jednu z deseti nejdůležitějších brazilských léčivých rostlin [1].

V tradiční medicíně se kůra využívá zejména pro svou hořkost a léčivé účinky, které se uplatňují při léčbě bolestí, horečky, závratí, zácpy, onemocnění jater, ztrátě chuti k jídlu, špatném trávení a malárii [6].

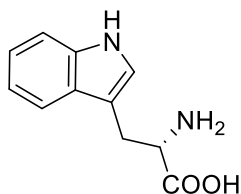
Při výzkumu bylo objeveno, že alkaloidy GV působí jako neuromuskulární blokátory, mají anticholinesterásovou aktivitu, antinociceptivní a hypotenzní účinky [7]. Díky svým účinkům mohou působit léčebně na určité typy karcinomů, AIDS a Alzheimerovu chorobu [1].

3.1.4 Obsahové látky

Obsahové látky GV se začaly zkoumat v 19. století v Brazílii a Evropě. GV byl prvním druhem svého rodu, u kterého začala studie chemického složení. U tohoto druhu bylo objeveno mnoho alkaloidů. Zbývající druhy tohoto rodu nebyly tolik studovány. GV obsahuje terpenové a β -karbolinové indolové alkaloidy [1].

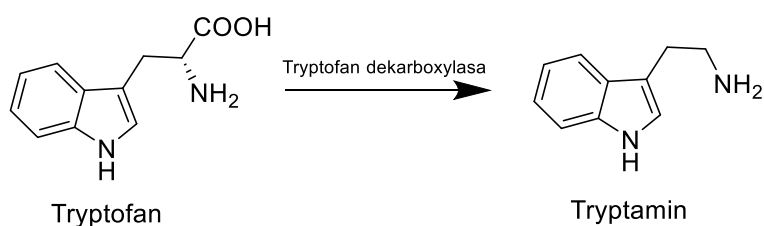
3.1.4.1 Indolové alkaloidy

Alkaloidy jsou sekundární metabolity produkované rostlinami, houby, živočichy a různými mikroorganismy. Ve své struktuře obsahují dusík. Indolové alkaloidy jsou odvozené od aminokyseliny **tryptofan**. Tato aminokyselina ve své struktuře obsahuje aromatický indolový kruh, který pochází ze šikimátové biosyntetické dráhy [8].



Obrázek 2: Prekurzor indolových alkaloidů L-tryptofan

Prvním krokem syntézy indolových alkaloidů je přeměna tryptofanu na tryptamin za účasti enzymu tryptofan dekarboxylasa [9].



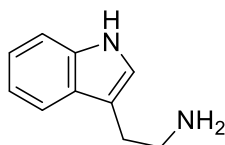
Obrázek 3: První krok syntézy indolových alkaloidů [9]

Patří sem jednoduché a složené alkaloidy, které navíc obsahují v molekule monoterpenoidní nebo diterpenoidní jednotky [10]. Vyskytují se zejména v čeledích Apocynaceae, Rubiaceae, Annonaceae a Loganiaceae [11]. Mají velké využití a rozpětí biologických aktivit, kam se řadí účinek protizánětlivý, analgetický, protirakovinný, protimikrobiální, proti HIV, malárii, leishmanióze, antihypertenzní, antidiabetický, antihistaminový, antikonvulzivní a mohou také inhibovat některé enzymy [12].

Rozdělení indolových alkaloidů

1. Indolalkylaminový typ

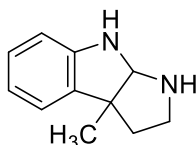
Patří sem např. alkaloidy butofenin, gramin, psilocin a psilocybin [13]. Ze struktury tryptofanu také vychází 5-hydroxytryptamin (5-HT, serotonin) a dimethyltryptamin (DMT). Serotonin je neuromediátor, který způsobuje vazokonstrikci, ovlivňuje náladu, spánek, paměť, bolest a mnoho dalšího. Léčivé látky, které ovlivňují serotoninový systém se používají při léčbě migrény a duševních poruch [8]. Alkaloidy, vyskytující se v houbách rodu *Psilocybe*, dále butofenin a DMT, mají své halucinogenní účinky právě díky strukturní podobnosti se serotoninem, konkrétně působí jako agonisté 5-HT_{2A} receptoru [14].



Obrázek 4: Indolalkylaminový typ [13]

2. Fysostigminový typ

Alkaloid fysostigmin je cholinomimetikum díky reverzibilní inhibici acetylcholinesterasy (AChE). Jeho účinky se dají využít při léčbě glaukomu, při intoxikaci anticholinergními látkami (atropin) a díky prostupu do centrální nervové soustavy (CNS) zvrátí periferní i centrální příznaky [15]. Z karbamátové struktury fysostigminu vychází rivastigmin, který má výhodnější vlastnosti a využívá se tak na léčbu Alzheimerovy choroby [16].

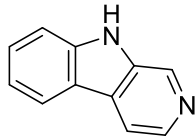


Obrázek 5: Fysostigminový typ [13]

3. β -karbolinový typ

Do této skupiny se řadí jednoduché alkaloidy harmin, harman a jejich příbuzné alkaloidy. Působí především inhibičně na monoaminoxidasu A (MAO-A), díky čemuž mu antidepresivní účinky [17]. Z Jižní Ameriky pochází tzv. ayahuasca, která se tradičně využívá k léčbě psychických a fyzických obtíží. Je to kombinace rostlinných drog ve formě nápoje s psychoaktivními účinky. Hlavní složky ayahuascy jsou DMT a harmala alkaloidy [18]. Dále se sem řadí složené

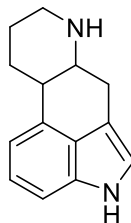
alkaloidy, které vznikají spojením tryptaminu a monoterpenického prekurzoru sekologaninu. Takto vznikají alkaloidy typu reserpinu, yohimbinu a ajmalinu [13]. Reserpin inhibuje ukládání katecholaminu do vezikul, tím snižuje aktivaci sympatiku a působí antihypertenzivně. Pro velké množství vedlejších účinků se už téměř nepoužívá. Yohimbin je selektivní antagonist α_2 receptorů, rozšiřuje periferní cévy a snižuje tak krevní tlak. Ajmalin působí jako antiarytmikum díky blokádě sodíkových kanálů [19].



Obrázek 6: Karbolinový typ [13]

4. Ergolinový typ

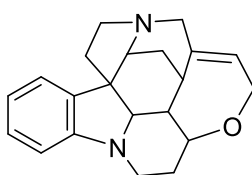
Od základního skeletu 3-methyl-2-butenyldifosfátu (DAPP) se odvozují jednoduché deriváty 6,8-dimethylergolinu a terapeuticky účinné amidy a peptidy kyseliny lysergové. Jedná se o námelové alkaloidy se zástupci typu ergotaminu, ergometrinu a ergokristinu [13]. Působí na řadu receptorů, především na dopamin, noradrenalin a serotonin. Inhibicí D_1 receptoru, aktivací α_1 a 5-HT receptoru působí vazokonstrikci. Aktivací D_2 receptorů zvyšují hladiny dopaminu a tím snižují uvolňování prolaktinu. Těchto účinků lze využít při léčbě migrény, Parkinsonovy choroby, periferních vaskulárních poruch a poporodního krvácení. Diethylamid kyseliny lysergové (LSD) je zneužíván pro své halucinogenní účinky, které vznikají působením na serotoninové a dopaminové receptory v CNS [20].



Obrázek 7: Ergolinový typ [13]

5. Strychninový typ

Strychnin, brucin a další alkaloidy obsažené v droze kurare (toxiferin, tubokurarin) patří mezi složené terpenové alkaloidy. Tyto alkaloidy jsou silně toxické a připravují se z nich šípové jedy [13]. Strychnin jako inhibitor glycinových receptorů zvyšuje tonus svalstva, který ve vyšších dávkách přechází v křeče a může skončit selháním dechu [21]. Začátkem 20. let minulého století se strychnin využíval jako analeptikum při otravě barbituráty [22]. Tubokurarin působí opačným účinkem jako svalový relaxans. Antagonizuje nikotinové receptory v kosterním svalstvu a způsobuje až svalovou paralýzu [23].



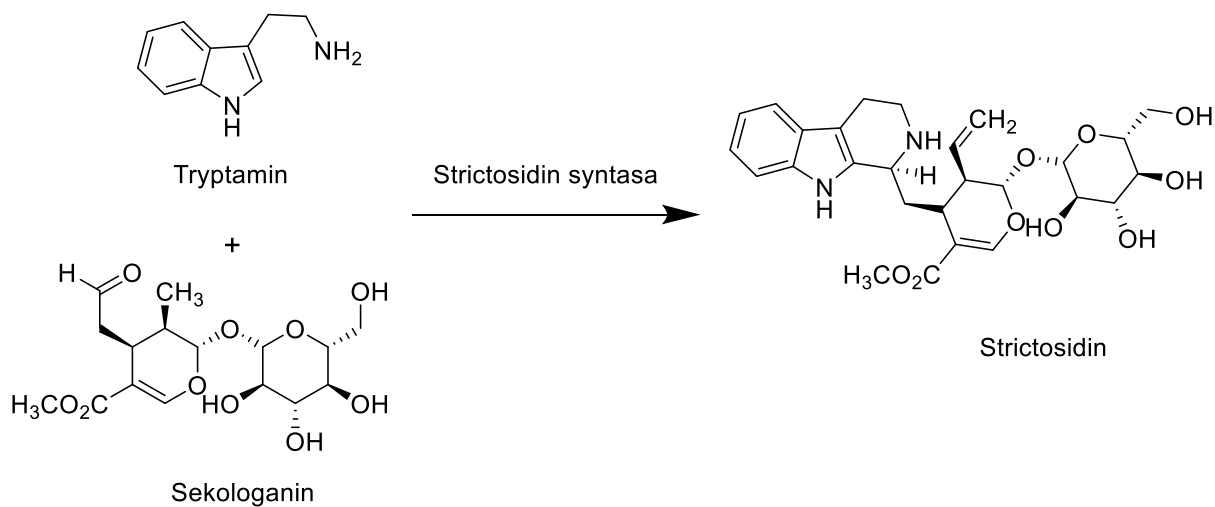
Obrázek 8: Strychninový typ [13]

Mezi indolové alkaloidy lze také zařadit alkaloidy, nacházející se v rostlinách *Vinca minor* L. a *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, vinkristin a vinblastin známé pro svůj antineoplastický účinek [13]. Jejich mechanismus účinku spočívá v depolymerizaci mikrotubulů, čímž zastavují buněčné dělení. Vinblastin je účinný zejména na karcinom plic, varlat, prsu, mozku a Hodgkinův lymfom. Vinkristin se využívá při léčbě lymfomů, akutní leukémie, karcinomu prsu, vaječníku a také na Hodgkinův lymfom [24].

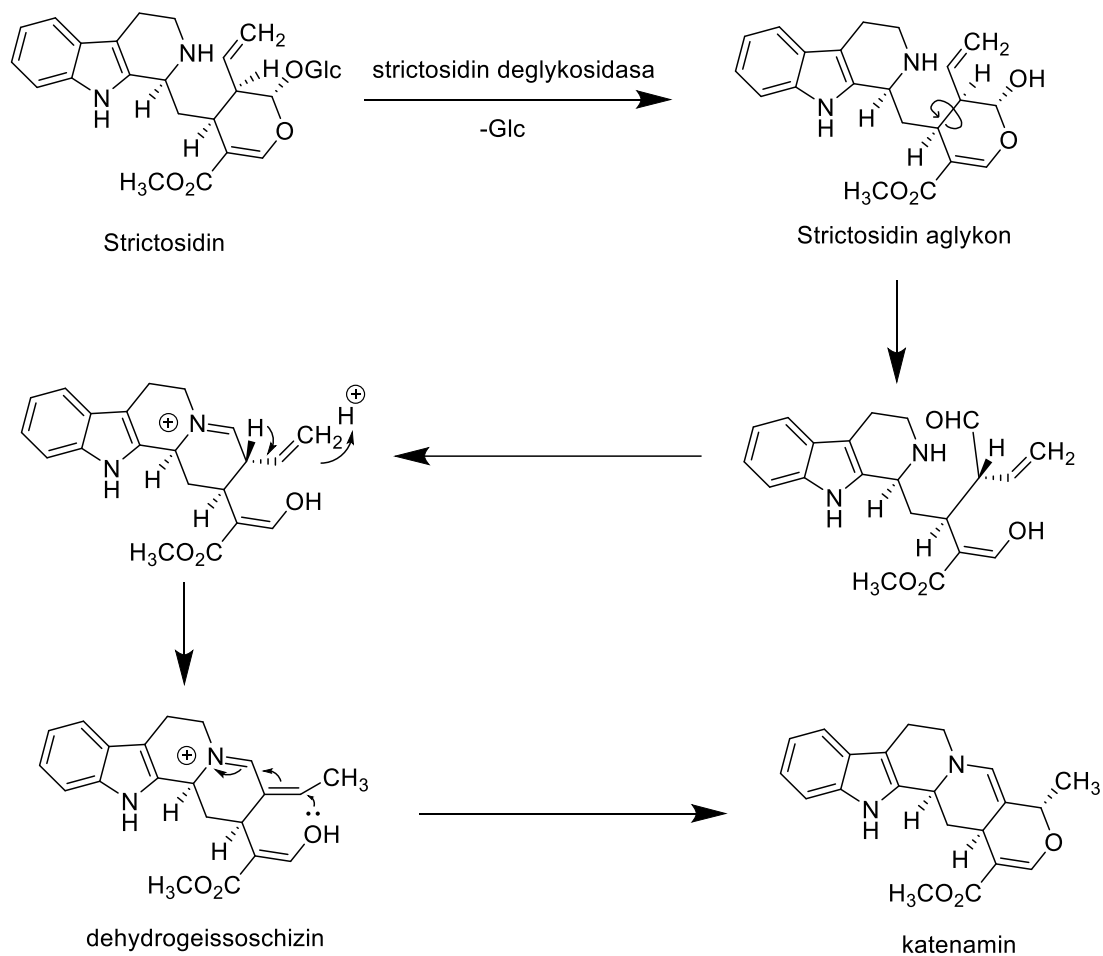
Terpenové indolové alkaloidy

Tento typ alkaloidů tvoří velkou skupinu alkaloidů obsahující více než 3000 látek [8]. Jedná se o složené indolové alkaloidy vycházející ze struktury tryptofanu a monoterpenického prekurzoru sekologaninu. Prekurzorem sekologaninu je isopentenylidifosfát (IPP), který je prekurzorem všech terpenoidů a pochází buď z triosofosfátové/pyruvátové nebo nemevalonátové biosyntetické dráhy. Po přeměně tryptofanu na tryptamin dochází k stereoselektivní kondenzaci se sekologaninem pomocí enzymu strictosidin syntasa a vzniká strictosidin [25]. Ten je následně deglykolyzován pomocí enzymu strictosidin deglykosidasa, otevírá se hemiacetal a odhalí se aldehydová skupina, která je schopna reagovat se sekundární aminoskupinou za vytvoření kvarterního iminiového iontu. Vytvoří se

dehydrogeissoschizin, který cyklizací přechází na katenamin, z něhož vznikají rozličné struktury alkaloidů [8].



Obrázek 9: Kondenzace tryptaminu a sekologaninu [25]



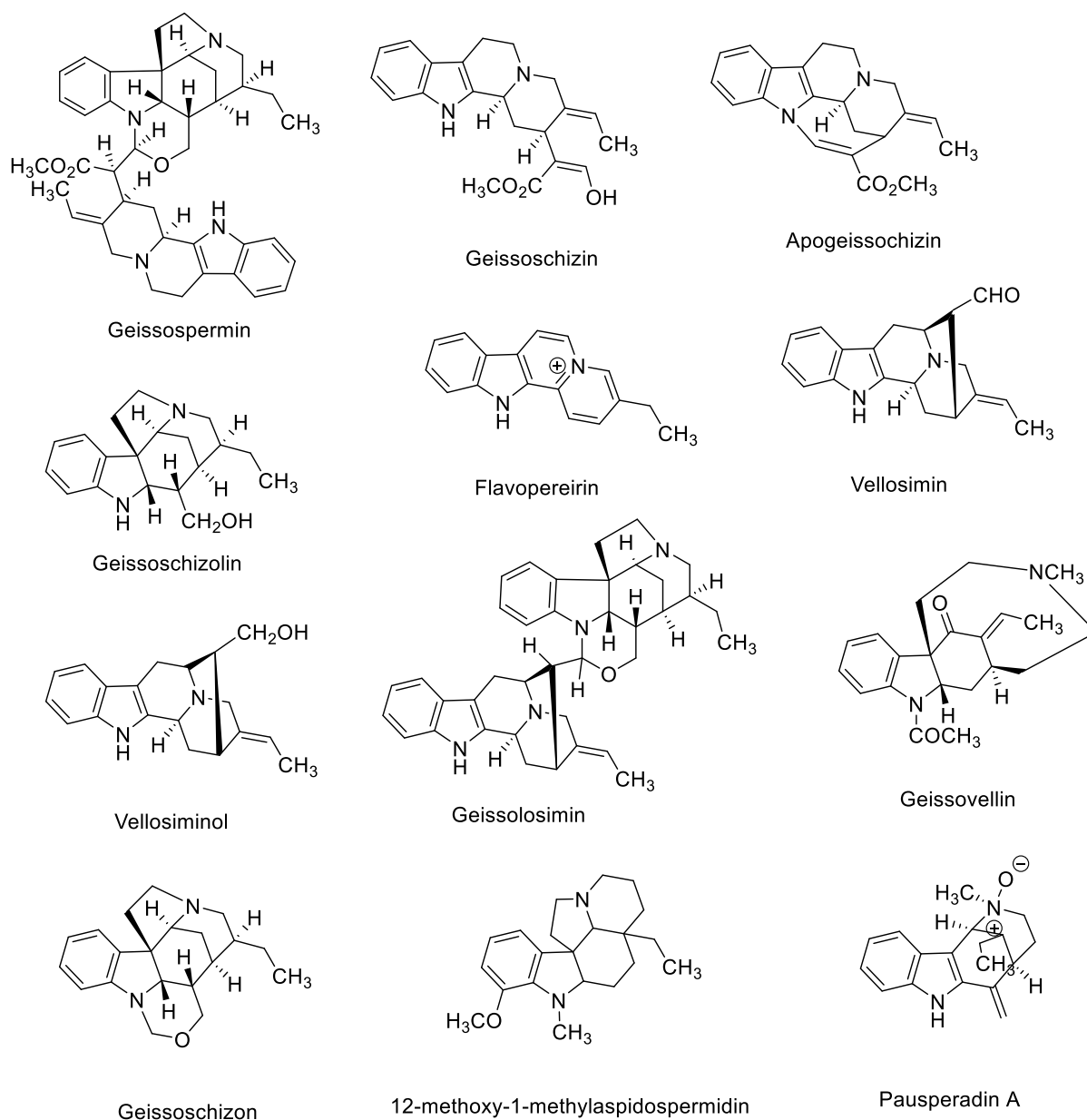
Obrázek 10: Biosyntéza terpenových indolových alkaloidů [8]

Ze struktury sekologaninu vychází korynanthový typ (alkaloidy ajmalicin, akuammicin) a jeho přeskupením v terpenové části molekuly vznikají typy aspidosperma (alkaloid tabersonin) a iboga (alkaloidy katharanthin, iboganin) [26].

3.1.4.2 Alkaloidy izolované z *Geissospermum vellosii* Allemão

Alkaloidy nacházející se v GV lze zařadit do strychninového, korynanthového, aspidosperma a β -karbolinového typu [27].

V roce 1838 brazilský farmaceut Ezequiel Corrêa dos Santos poprvé izoloval alkaloid, který nazval **pereirin**. O názvu a zda byl Santos opravdu prvním, kdo alkaloid izoloval, se vedly diskuse, faktem ale je, že se jednalo o úplně první izolovaný alkaloid v Brazílii. Vědci si mysleli, že se jedná o jediný alkaloid přítomný v GV, ve skutečnosti to byla pravděpodobně pouze směs několika alkaloidů a v roce 1877 v Německu O. Hesse izoloval další alkaloid a pojmenoval ho **geissospermin**. V roce 1893 byl dále objeven alkaloid **vellosin** [3] a v roce 1958 β -karbolinový alkaloid **flavopereirin** [28]. V roce 1960 jako produkty kyselého štěpení geissosperminu byly objeveny alkaloidy **geissoschizin**, **apogeissoschizin** a **geissoschizolin** [29]. Alkaloid pereirin je podle některých vědců dle vzorce, který představil pro pereirin O. Hesse, stejná látka jako alkaloid geissoschizolin [30]. Následně byly v roce 1962 izolovány tři nové alkaloidy **vellosimin**, **vellosiminol** a **geissolosimin**. Posledně jmenovaný geissolosimin je dimerický alkaloid, který se kyselým štěpením rozkládá na vellosimin a geissoschizolin [31]. Další alkaloid objevený v kůře GV byl v roce 1973 **geissovellin** [32]. V roce 2005 byl objeven alkaloid **pausperadin A** [33]. Při studiu antinociceptivního účinku kůry GV byl v roce 2009 izolován alkaloid **12-methoxy-1-methylaspidospermidin** [34]. Až v roce 2012 byl poprvé izolován alkaloid **geissoschizon** při zkoumání antiplazmodiální aktivity indolových alkaloidů GV [35].



Obrázek 11: Nejdůležitější alkaloidy izolované z GV [1]

Nejčastěji a v největším množství byl v kůře GV nalezen alkaloid geissospermin [36]. Některé z nalezených alkaloidů byly zkoumány pro jejich biologické účinky, které by mohly vést v budoucnu k vývoji nových léků, sloužit jako prevence onemocnění nebo jako doplňky stravy. U flavopereirinu byla zjištěna protinádorová, antiplazmodiální, antileishmaniální aktivita a účinky na benigní hyperplazii prostaty (BHP) [37]. Dále má antivirotické účinky, zejména proti viru HIV [38]. Na anticholinesterásovou aktivitu byly testovány alkaloidy geissospermin, geissoschizolin, geissoschizon a 3',4',5',6'-tetrahydrogeissospermin a všechny čtyři určitou inhibiční aktivitu vůči

enzymu AChE vykazují [39]. Geissolosimin, geissospermin, geissoschizolin a geissoschizon jsou alkaloidy, které jsou účinné na malárii [35]. U geissoschizolinu byl kromě anticholinesterásového a antimalarického účinku potvrzen ještě účinek protizánětlivý [39].

3.1.4.3 Nealkaloidní látky izolované z *Geissospermum vellosii* Allemão

Mezi další látky, které se dají v menší míře v GV nelézt se řadí **lupeol** a **sesamin** [28]. Sesamin je lignan, u kterého byly zjištěny účinky antioxidační, protizánětlivé, protinádorové, antihypertenzní, antihyperlipidemické a chrání před neurodegenerativními procesy [40]. Lupeol patří mezi triterpeny a jeho hlavní účinky jsou protizánětlivé a protinádorové [41].

3.1.5 Biologická aktivita

3.1.5.1 Anticholinesterásová aktivita

Léčba Alzheimerovy choroby vychází z cholinergní hypotézy. Poškození mozku a zhoršení kognitivních vlastností u starších osob a osob s Alzheimerovou chorobou je pravděpodobně způsobeno nedostatkem centrální cholinergní aktivity. Na zvýšení této aktivity se využívá inhibice enzymu AChE, která sníží štěpení acetylcholinu (ACh), a tak zvýší jeho hladiny [42].

V roce 2009 Lima et al. prováděli *in vitro* a *in vivo* studie AChE mozku myší, AChE z elektrického úhoře a butyrylcholinesterasy (BChE) z koňského séra. Byly stanovené průměrné hodnoty IC₅₀ pro AChE mozku myší (39,3 µg/ml), AChE z elektrického úhoře (2,9 µg/ml) a BChE z koňského séra (1,6 µg/ml). Z výsledku jde vidět již známá mezidruhová variabilita citlivosti AChE. Dále byl zjištěn pozitivní efekt ethanolového extraktu GV na zlepšení paměti u myší po podání skopolaminu a zmírnění příznaků s premedikací alkaloidním extraktem a poté až podání skopolaminu. Jako u jiných látek s anticholinestrásovou aktivitou se při vyšších dávkách snižoval účinek. Nejvyšší účinná dávka 60 mg/kg nezpůsobila výrazné vedlejší účinky, avšak při dávce 200 mg/kg byly u myší přítomny křeče s následnou smrtí. Inhibiční aktivita na AChE je v této studii připisována alkaloidu **geissospermin** [43].

Po této práci následovala další studie z roku 2010 prováděna Lima et al. s cílem odhalit způsob vazby geissosperminu do aktivního místa AChE. Díky srovnávací molekulární dokingové simulaci se odhalily čtyři vodíkové vazby, hydrofobní a π - π interakce. Tato zjištění vycházející ze studie slouží jako základ pro strukturální obměny molekuly geissosperminu, která by mohla vést k potencionálním novým léčivům na Alzheimerovou chorobu [44].

Další studie v roce 2020 opět od skupiny Lima et al. porovnává čtyři alkaloidy izolované z GV (geissospermin, geissoschizolin, geissoschizon a 3',4',5',6'-tetrahydrogeissospermin). Jediný geissospermin inhibuje AChE pouze z 25 %, zbylé alkaloidy jsou hodnoceny jako neselektivní inhibitory BChE a AChE. Při testování životaschopnosti myších mikrogliových buněk vůči několika GV alkaloidům byl za nejvíc bezpečný alkaloid označen **geissoschizolin**, který byl následně vybrán pro další testování protizánětlivého účinku, který byl již zjištěn v dřívější studii v roce 2016 [39]. Novější poznatky poukazují na neurozánětlivý proces v CNS při Alzheimerově chorobě. Účastní se ho aktivované astrocyty a mikroglie, které uvolňují prozánětlivé cytokiny (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-18, NO, ...) a vedou společně k destrukci neuronů, stimulaci syntézy amyloidních plaků, uvolňování γ -aminomáselné kyseliny (GABA) a glutamátu a dalším dějům [45]. Geissoschizolin při testech výrazně snížil produkci tumor nekrotizujícího faktoru (TNF) a oxidu dusnatého (NO) aktivované mikrogliovými buňkami. Při molekulárním dokování také inhiboval kromě aktivního místa také periferní aniontové místo (PAS) enzymů AChE a BChE, čímž brání tvorbě neurotoxického komplexu AChE - β -amyloid. Geissoschizolin má tedy neuroprotektivní, protizánětlivé účinky a podporuje synaptický přenos zvýšením hladiny ACh. Tyto vlastnosti mu dávají předpoklad pro vývoj nových léčiv [39].

3.1.5.2 Protinádorová aktivita

Karcinom prostaty

Bemis a jeho spolupracovníci v roce 2009 zkoumali *in vitro* a *in vivo* vliv alkaloidů GV na nádorové buňky LNCap, které jsou přítomny u karcinomu prostaty. Extrakt z kůry obohacený o β -karbolinové alkaloidy (celkový obsah β -karbolinových alkaloidů byl 54 %) podávali myším, kterým byly implantovány právě tyto nádorové buňky. Aplikovali jej orálně po dobu 6 týdnů. Výsledkem práce bylo zjištění, že u některých skupin došlo k zastavení růstu až o 80 % ve srovnání s kontrolními skupinami. *In vivo* byly účinnější nižší dávky o velikosti 10 nebo 20 mg/kg/den při indukci apoptózy a inhibici proliferace nádorových buněk než dávky vyšší (50 mg/kg/den) [46].

Nositelem účinku je **flavopereirin**. Přesný mechanismus účinku není znám, ale předpokládá se vliv β -karbolinových alkaloidů na potlačení aktivity cyklin dependentní kinasy 5 (CDK5) s vysokou selektivitou na nádorové buňky, stejně jako u ostatních rostlin s obsahem β -karbolinových alkaloidů jako je, např. *Rauwolfia vomitoria* Afzel. Jejich mechanismy účinku se částečně liší, a tak se dá výhodně použít spojení GV a *Rauwolfia vomitoria* Afzel, která také zmírňuje příznaky BHP [1] [46].

Když se nádor prostaty stane rezistentní na hormonální léčbu, hovoří se o tzv. **kastračně refrakterním karcinomu prostaty** (CRPC). Nádor roste i přes nízké hladiny testosteronu [47]. Tím, zda i na tento typ karcinomu prostaty je účinný stejný extrakt z GV jako v předchozí studii, se zabývali Chang et al. v roce 2014. Testovali *in vitro* účinky extraktu na lidské PC3 buňky vyskytující se u CRPC. V závislosti na dávce a času dochází extraktem z GV k potlačení růstu těchto buněk. Dávky 125, 250 a 500 μ g/ml inhibovaly růst PC3 buněk ve srovnání s kontrolní skupinou o 52,65 %, 79,13 % a 100 %. Při dávce 125 mg/ml docházelo k zástavě buněčného dělení, při vyšších dávkách se přidával také účinek na apoptózu. Stejně tak snižují schopnost buněk migrovat, a tak snižují jejich metastazující schopnost. Hlavním mechanismem účinku je ovlivnění signální dráhy NF κ B (nukleární faktor kappa B) [48]. NF κ B jsou transkripční faktory ovlivňující expresi genů zapojených do imunitních a zánětlivých odpovědí a řídí buněčnou smrt a proliferaci. Snižením aktivity NF κ B dochází k potlačení nádorových buněk [49].

V návaznosti na kladné výsledky studie na účinky proti rakovině prostaty, provedli vědci také testování účinku proti BHP. Výsledek práce je slibný a naznačuje, že GV by

mohl být vhodným bylinným prostředkem na léčbu BHP, avšak je zapotřebí ještě další testování [50].

Ovariální karcinom

Po předešlých zjištěních protinádorové aktivity GV se prováděl v roce 2014 další výzkum tohoto účinku. *In vitro* byly sledovány účinky ethanolického extraktu GV, obsahující flavopereirin, na rakovinové buňky vaječníků. K nádorovým buňkám vykazoval vyšší selektivitu než k buňkám zdravým. Hodnota IC_{50} extraktu působící na buňky rakoviny je 180 až 235 $\mu\text{g/ml}$, zatímco u zdravých buněk činí hodnota IC_{50} až 537 $\mu\text{g/ml}$. Dále se testovala kombinace ethanolického extraktu GV s karboplatinou a výsledkem bylo zvýšení účinku karboplatiny, což umožňuje redukci její dávky, a tudíž snížení nežádoucích účinků [51].

Pro potvrzení *in vitro* studie se následně dělalo *in vivo* testování. Myším byly intraperitoneálně aplikovány nádorové buňky (SHIN-3). Extrakt GV při dávkách 20 a 50 mg/kg/den snížil hmotnost nádoru o 58 % a 79 %, karboplatina o 45 % při dávce 15 mg/kg/týden. Při kombinaci obou došlo k výraznému zvýšení účinku karboplatiny, dohromady došlo k poklesu hmotnosti o 89 % při dávce 20 mg/kg extraktu GV a 97 % při dávce 50 mg/kg. Také došlo ke snížení obsahu ascitické tekutiny, dokonce až k jejímu úplnému vymizení při kombinaci s karboplatinou. Na konci studie byly pozorovány hlavní orgány myši jako játra, ledviny a slezina, které nejevily významné poškození vůči kontrolní skupině [51].

Karcinom pankreatu

Byly prováděné *in vitro* a *in vivo* studie nejen samostatného extraktu z GV, ale také v kombinaci s cytostatikem gemcitabinem. Studie probíhala obdobně jako předchozí popisovaná. Při *in vitro* testování byl účinek závislý na dávce a hodnota IC_{50} se stanovila na 75–215 $\mu\text{g/ml}$. Při testování na myších gemcitabin působil pouze na rané fáze nádoru, kdy byl nádor ještě malý, postupem času se však efekt vytrácel. Extrakt GV vykazoval účinek po celou dobu podávání. Na rozdíl od *in vitro* byl efekt nezávislý na dávce, dokonce lehce zvýšený účinek měly nižší dávky, podobně jako u rakoviny prostaty. Při dávce 20 mg/kg/den došlo ke snížení hmotnosti nádoru o 72 % a při dávce 50 mg/kg/den o 70 %. V kombinaci s gemcitabinem byl efekt podobný jako

u samotného extraktu z GV a to 82 % a 78 %. Stejně tak inhibiční vliv na schopnost rakovinových buněk tvořit metastázy se při vyšší dávce snižuje [52].

Při pozorování mechanismu působení bylo detekováno štěpení kaspasy-3 a PARP v nádorových buňkách. Výsledný efekt je indukce apoptózy se selektivitou k poškozeným buňkám. Po konci experimentu byly sledovány orgány myší, které nevykazovaly poškození ve srovnání s kontrolní skupinou [52].

Flavopereirin byl dále testován na aktivitu vůči **kolorektálnímu karcinomu** [53], **karcinomu prsu** [54], **dlaždicobuněčnému karcinomu dutiny ústní (OSCC)** [55], **hepatocelulárnímu karcinomu (HCC)** [56] a v nové studii z roku 2024 na **karcinomu štítné žlázy** [37].

3.1.5.3 Antinociceptivní a antiflogistická aktivita

Studie od Werner et al. z roku 2009 a Lima et al. z roku 2016 prokázaly účinnost obsahových látek v GV při pokusech na snížení abdominálních křečí vyvolané kyselinou octovou a inhibici bolesti indukovanou formalinem [34] [57].

Studie z roku 2016 pojednává příčinu analgetické a protizánětlivé aktivity GV v souvislosti s ovlivněním cholinergního systému inhibicí AChE a další návazností na léčbu Alzheimerovy choroby [57]. V druhé studii z roku 2009 se přisuzuje antinociceptivní aktivita vlivu na serotoninergní systém, a to konkrétně stimulací 5-HT_{1A} receptorů, za kterou je zodpovědný alkaloid **12-methoxy-1-methyl-aspidospermin** [34].

3.1.5.4 Antimalarická aktivita

Druhům rodu *Geissospermum* Allemão je obecně připisován účinek na malárii. Při různých studiích se setkáváme s lehce odlišnými výsledky. Brandão et al. v roce 1992 odhalili, že v oblastech brazilské Amazonie se na tyto účely využívá *Geissospermum sericeum* Miers [58]. V Bolívii v roce 2000 Muñoz et al. hodnotili *in vitro* a *in vivo* rostliny, používané indiánským kmenem Chacobo, na malárii, mezi kterými byl GV a vykazoval dobré výsledky [59]. Ve Francouzské Guyaně se používá více druhů včetně GV a jsou účinné spíše jako prevence proti malárii než na samotné propuknutí nemoci [60].

Mbeunkui et al. v roce 2012 zkoumali *in vitro* antiplazmodiální aktivitu GV vůči *Plasmodium falciparum* citlivý na chlorochin a zároveň zjišťovali cytotoxicitu na vaječnicích čínského křečka. Bylo izolováno pět alkaloidů geissolosimin, geissospermin, geissoschizolin, geissoschizon a vellosiminol. Poslední nevykazoval žádnou antimalarickou aktivitu. Nejvyšší aktivitu vykazoval první alkaloid geissolosimin (IC₅₀ 0,55 g/ml), který však měl vysokou toxicitu. Zbylé tři alkaloidy měly hodnoty IC₅₀ okolo 3–4 g/ml, ale vyšly lépe v testu cytotoxicity. Všechny čtyři alkaloidy lze tedy považovat za potenciální strukturální základy pro nová léčiva [35].

3.2 Chromatografie

Chromatografie je skupina fyzikálně-chemických separačních analytických metod založených na různé interakci dělených látek (analytů) k stacionární a mobilní fázi. Můžeme díky ní rozdělovat směsi látek na jednotlivé analyty a určovat u nich jak kvalitativní, tak i kvantitativní vlastnosti. Principem metody je rozdělování směsi látek mezi 2 fáze: **stacionární fáze** (nepohyblivá) a **mobilní fáze** (pohyblivá). K rozdělování dochází na základě různé afinity separovaných látek ke stacionární a mobilní fázi [61].

Distribuce analytů mezi stacionární a mobilní fází se hodnotí distribuční (rozdělovací) konstantou K_D , kde c_s označuje koncentraci látky ve stacionární fázi, c_m koncentraci látky v mobilní fázi, n je látkové množství a V je objem analytu, opět v mobilní a ve stacionární fázi.

$$K_D = \frac{c_s}{c_m} = \frac{n_s}{n_m} \cdot \frac{V_m}{V_s}$$

Rovnice 1: Výpočet distribuční konstanty

Se vzrůstající hodnotou K_D roste zadržování analytu ve stacionární fázi a tím pádem i retence v chromatografickém systému, která je popisována retenčními faktory (k). Pro ideální separaci látek ve směsi jsou zapotřebí rozdílné hodnoty retenčních faktorů jednotlivých látek [62].

$$k = K_D \cdot \frac{V_s}{V_m}$$

Rovnice 2: Výpočet retenčního faktoru

Na základně chromatografického módu použitého pro separaci, rozdělujeme stacionární fáze na: normální, reverzní, iontově výměnné, fáze pro hydrofilní interakční chromatografii (HILIC), fáze pro hydrofobní interakční chromatografii (HIC), gely a molekulová síta (např. pro rozměrově-vylučovací chromatografii – SEC), fáze pro chirální a fáze pro afinitní chromatografii. Při normálním chromatografickém módu je stacionární fáze polární (např. silikagel anebo silikagel modifikovaný propylkyano, propylamino nebo diolovým ligandem). Příkladem stacionární fáze v reverzním módu je silikagel s navázanými alkylovými (např. C₁₈, C₈), halogenalkylovými (C₈F₁₈, lineární nebo větvený C₆F₁₃), arylovými nebo halogenarylovými ligandy (fenyl, propylfenyl, pentafluorofenyl nebo bifenyl) [62]. V normálním módu chromatografie se jako mobilní fáze většinou používá binární směs rozpouštědel různé polarity. Majoritně zastoupená, méně polární složka je většinou alifatický uhlovodík (pentan, hexan). Polárnější složku s vyšší eluční silou může tvořit například propan-2-ol, chloroform, dichlormethan, ethylacetát nebo tetrahydrofuran. V reverzním módu chromatografie je to přesně naopak. Majoritní, víc polární složka je nejčastěji voda, resp. voda s přidavkem aditiva (kyselina mravenčí, kyselina octová, kyselina fosforečná nebo trifluorocetová, amoniak anebo anorganické nebo organické pufrů o různém pH). Roli méně polární složky s vyšší eluční silou zde zastává například acetonitril, methanol, ethanol nebo propan-2-ol [63].

3.2.1 Rozdělení chromatografických metod dle principu vzniku interakce k jednotlivým fázím

a) Adsorpční chromatografie

Dělí se na: liquid-solid chromatography, česky kapalinovou adsorpční chromatografii (LSC) a gas-solid chromatography, česky plynovou adsorpční chromatografii (GSC). Rozhoduje různá adsorbovatelnost směsi na stacionární fázi podle polarity obou fází a jednotlivých látek směsi. Látky, které jsou silněji vázány sorpčními silami jsou stacionární fází více zadržovány než látky, které jsou mobilní fází rychleji unášeny. Mezi nejčastější polární sorbenty patří silikagel (hydratovaný oxid křemičitý) a hydratovaný oxid hlinitý a hořečnatý. Rozpouštědla vhodná pro použití jako mobilní fáze jsou podle vzrůstající polarity uspořádána v tzv. **eluotropní řadě** [64].

Polarity Index	Solvent	Viskosita η [mPa.s; 20 °C]	Hustota ρ [g.cm ⁻³ ; 20 °C]	Teplota varu [101.325 kPa; °C]	Index lomu n	ϵ (Al ₂ O ₃)	UV Cutoff (nm)
0,0	Heptan	0,42	0,684	98,3	1,388	0,01	200
0,0	Hexan	0,31	0,664	68,7	1,375	0,01	200
0,0	Cyklohexan	0,98	0,779	80,7	1,426	0,04	200
0,0	n-Pentan	0,23	0,626	36,2	1,358	0,00	190
0,3	n-Decan	0,92	0,730	174,1	1,412	0,04	200
0,4	Oktan	0,50	0,703	99,2	1,397	0,01	215
1,7	Dibutylether	0,70	0,768	142,2	1,400		
1,8	Triethylamin	0,38	0,728	89,5	1,400		235
2,2	Di-n-propylether	0,33	0,724	68,3	1,368	0,28	220
2,3	Toluen	0,59	0,867	101,6	1,496	0,29	285
2,4	p-Xylen	0,70	0,861	138,0	1,500	0,26	290
2,9	Diethylether	0,23	0,714	34,6	1,353	0,38	202
3,0	Benzen	0,65	0,879	80,1	1,501	0,32	280
3,2	i-Oktanol	10,6 ⁽¹⁵⁾	0,827	194,5	1,429		
3,3	Dibenzylether	5,33	1,043	288,3			
3,4	Dichlormethan	0,44	1,326	39,8	1,424	0,42	233
3,4	Chloroform	0,57	1,483	61,2	1,443	0,40	245
3,7	1,2-dichlorethan	0,79	1,253	83,5	1,445	0,49	230
3,9	n-Butylalkohol	3,00	0,803	117,7	1,400		
4,2	Tetrahydrofuran	0,55	0,899	66,0	1,407	0,45	230
4,3	Ethylacetát	0,47	0,901	77,1	1,370	0,58	256
4,3	1-Propanol	2,30	0,804	97,2	1,380	0,82	210
4,3	2-Propanol	2,35	0,785	117,7	1,380	0,82	205
4,5	Methylethylketon	0,43	0,800	80,0	1,379	0,51	330
4,5	Cyklohexanon	2,24	0,998	155,7	1,451		
4,5	Nitrobenzen	2,03	1,208	210,8	1,556		
4,6	Benzonitril	1,22	1,005	191,1	1,529		
4,8	1,4-Dioxan	1,54	1,034	101,3	1,422	0,56	215
5,2	Ethanol	1,20	0,789	78,3	1,361	0,88	210
5,3	Pyridin	0,94	0,982	115,3	1,510	0,71	330
5,3	Nitroethan	0,68	1,051	114,0	1,392		
5,4	Aceton	0,32	0,791	56,3	1,359	0,56	330
5,4	Ethylenglykol	2,10	1,113	198	1,432	1,11	210
5,5	Benzylalkohol	5,80	1,046	205,5	1,540		
5,7	2-Methoxyethanol	1,72	0,966	124,6	1,402		
6,2	Acetonitril	0,37	0,783	81,6	1,344	0,65	190
6,2	Kyselina octová	1,26	1,049	117,9	1,372		230 ¹⁾
6,4	N,N-dimethylformamid	0,90	0,945	153,0	1,435		310
6,5	Dimethylsulfoxid	2,24	1,101	189,0	1,477	0,60	
6,6	Methanol	0,60	0,796	64,7	1,329	0,95	205
6,8	Nitromethan	0,67	1,138	101,2	1,382	0,64	380
7,3	Formamid	3,76	1,133	210,5	1,448		210
9,0	Voda	1,00	1,000	100,0	1,333		180

Obrázek 12: Eluotropní řada [65]

b) Rozdělovací chromatografie

Rozhoduje odlišná rozpustnost analyzovaných látek ve stacionární (kapalná) a mobilní (podle ní rozlišujeme liquid-liquid chromatography, česky kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC) a gas-liquid chromatography, česky plynová rozdělovací chromatografie (GLC)) fázi. Látky, které jsou více rozpustné ve stacionární fázi, jsou v ní také více zadržovány, a tedy pomaleji unášeny mobilní fází [64].

c) Iontově výměnná chromatografie

Základem je přitahování iontů s opačnými náboji. Důležitou roli hraje při analýze pH použité mobilní fáze. Materiály pro stacionární fázi se označují jako iontoměniče. Mají-li kladný náboj, nazývají se anexy a dělí se na SAX (Strong Anion Exchange) a WAX (Weak Anion Exchange). Na anexech se dělí záporně nabitě látky jako proteiny, peptidy, nukleové kyseliny nebo karboxylové kyseliny. Mají-li záporný náboj, jsou to katexy a dělí se na SCX (Strong Cation Exchange) a WCX (Weak Cation Exchange). Na katexech se dělí kladně nabitě proteiny, monoklonální protilátky nebo alkaloidy [64] [66] [67].

d) Gelová chromatografie

K separaci dochází na základě velikosti molekul. Stacionární fází je porézní materiál (gel), který obsahuje póry naplněné rozpouštědlem. Do pórů pronikají látky s malými molekulami a velké molekuly jsou mobilní fází unášeny dál [64].

e) Afinity chromatografie

Založena se specifických interakcích typu ligand-protilátka. Využívá se pro látky jako enzymy, protilátky, hormony a nukleové kyseliny [68].

3.2.2 Rozdělení chromatografických metod dle použité mobilní fáze

Na základě povahy mobilní fáze dělíme chromatografické metody na kapalinovou a plynovou chromatografii.

a) Kapalinová chromatografie

Mobilní fází je kapalina a stacionární fází může být pevná látka nebo i kapalina. Patří sem **tenkovrstvá chromatografie** (TLC), **vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie** (HPTLC) a dneska již tolik nepoužívaná **papírová chromatografie** (PC). Jejich společným znakem je, že se provádí v plošném uspořádání. Dále se sem řadí **vysokoúčinná kapalinová chromatografie** (HPLC), **ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie** (UHPLC) a **flash chromatografie**, která se provádí v koloně.

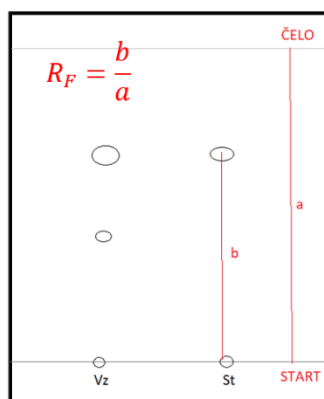
3.2.2.1 Tenkovrstvá chromatografie

U TLC je stacionární fáze nanášena na vhodný nosič (hliníková destička, skleněná destička). Jako stacionární fáze se nejčastěji používá silikagel a oxid hlinitý. Jako mobilní fáze se používají organická rozpouštědla. Analyzovaný vzorek se nanese na startovní čáru 1–2 cm od spodního okraje a nechá se vyvíjet v nasycené komoře s vhodnou mobilní fází [64]. Mobilní fáze vzlíná nahoru po stacionární fázi na základě kapilárních sil [68].

Skvrny jsou poté detekovány nejčastěji pomocí UV záření a detekčních činidel. Některé látky jako například kumariny svítí pod UV zářením samy o sobě. U jiných

látek je třeba použít stacionární fáze s příměsí fluoreskující látky s maximem při 254 nm [64].

Slouží ke **kvalitativnímu stanovení**, při kterém je rozhodujícím ukazatelem retenční faktor (R_F), který udává poměr mezi vzdáleností skvrny od startu ku vzdálenosti startu od čela desky. Porovnává se poté R_F zkoušené látky s R_F standardu při analýze za stejných podmínek. Dalším ukazatelem může být charakteristické zbarvení skvrn po postřiku detekčními činidly.



Obrázek 13: TLC chromatogram

Může se také použít ke **kvantitativní analýze**. Využívá se metody s fotodenzitometrem, který z jednotlivých skvrn vytvoří píky, které jsou přímo úměrné množství analytu ve vzorku. Druhý způsob je preparativní TLC, při kterém se vyextrahuje analyt z chromatogramu a následně se určí množství analytu vhodnou metodou [69].

3.2.2.2 Flash chromatografie

Jedná se o sloupcovou chromatografii, při které je v koloně (sloupci) umístěna stacionární fáze a nad ní se nachází analyzovaný vzorek. Kolonou protéká mobilní fáze, která unáší vzorek na základě vzájemných interakcí. Na konci kolony jsou jednotlivé separované části sbírány.

Flash chromatografie vychází z původní sloupcové chromatografie, při které mobilní fáze protéká kolonou pouze na základě gravitační síly. Tento typ je časově velice náročný. Proto u flash chromatografie proudí mobilní fáze pod tlakem vzduchu nebo pod vakuem, a tak je výsledný čas mnohem kratší [70].

Tlak, pod kterým kapalina při flash chromatografii proudí do kolony, je mnohem menší než při HPLC. Obvykle se pracuje s 0,1–5(10) bary nebo u chromatografie při středním tlaku s 5(10)–50 bary [71].

Pro nastavení chromatografických podmínek se prvně provádí TLC s analyzovaným vzorkem. Hledá se vhodná volba mobilní fáze. R_F látek by se měl pohybovat okolo 0,15–2. Výhodné je použití gradientové eluce, při které se zvyšuje eluční síla a analyty, jsou tak rychleji vymývány z kolony a rychleji separovány [70].

Stacionární fáze je umístěna v koloně, která může být skleněná a musí se ručně plnit nebo jsou na trhu již připravené komerční kartridže. Některé mohou mít odnímatelný vršek, kam se aplikuje vzorek nad stacionární fází. U ostatních je potřeba zapojit „předkolonu“ se vzorkem, stejně tomu je tak i u klasických skleněných kolon. Vzorek se může plnit v suché formě, při které se udělá tzv. roztěr s 2–10násobným množstvím sorbentu podle množství analyzovaného vzorku. U komerčních sloupců se dá vzorek rozpustit ve vhodném rozpouštědle a nanést do vrchní části sloupce [72].



Obrázek 14: Používaný flash chromatograf

3.2.2.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

HPLC se vyvinula z klasické sloupcové chromatografie a je dnes důležitým analytickým nástrojem. Slouží k separaci, identifikaci i kvantifikaci látek [73].

Mobilní fáze je pumpována do kolony pod vysokým tlakem. Směs je mobilní fází separována na jednotlivé části, které jsou detektorem převedeny na odpovídající píky na chromatogramu. Jako stacionární fáze může být použita pevná nebo také kapalná látka, která je zakotvená nebo chemicky vázaná na nosič v koloně. Mezi používané

stacionárními fáze patří silikagel, oxid zirkoničitý, oxid hlinitý, chemicky modifikovaný silikagel, polymery (polystyrendivinybenzen, polyvinyl alkohol), polymery navázané na silikagel [62].

Existuje několik detektorů, které se dají u HPLC použít, jako např.: detektory ultrafialové/viditelné (UV/VIS), hmotnostní spektrometrické (MS), refraktometrické, konduktometrické, elektrochemické, fluorescenční a infračervené [74].

V případě, že jsou vlastnosti látek příliš odlišné a jejich retenční časy jsou za stejných podmínek nadměru vzdáleny, využívá se gradientová eluce, která zkrátí dobu trvání separace. Během ní dochází ke změně složení mobilní fáze se zvyšujícím se poměrem té složky, která má vyšší eluční sílu. Opačným typem je isokratická eluce, při které je mobilní fáze konstantního složení [62].

b) Plynová chromatografie

Jedná se o analytickou metodu, která separuje jednotlivé složky vzorku za účelem určení jejich kvalitativních ale i kvantitativních vlastností. Mobilní fází je plyn (vodík, dusík, helium). Stacionární fáze může být pevná nebo kapalná, podle toho rozeznáváme GSC a GLC. Podmínky, za kterých analýza běží, mohou být neměnné, tj. isotermická a isobarická eluce, anebo se teplota a tlak v čase mění [75].

Mezi nejčastěji používané detektory patří hmotnostní spektrometr (MS), tepelně vodivostní detektor, detektor elektronového záchytu, termoionizační, fotoionizační, plamenoionizační a plamenofotometrický detektor [64].

Plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem (GC-MS)

MS funguje na principu ionizace molekuly a vzniklé ionty jsou separovány a následně detekovány. Rozdělení jednotlivých iontů se provádí na základě poměru m/z (hmotnost iontu/náboj iontu) [76]. Každý MS obsahuje tři základní části: iontový zdroj, analyzátor a detektor. V iontovém zdroji vznikají ionty několika možnými typy ionizace, jako např. elektronová, chemická, ionizace elektrosprejem, UV zářením nebo laserem. V analyzátoru se vzniklé ionty separují podle již zmíněného poměru m/z . Existuje mnoho analyzátorů, které se mohou také mezi sebou kombinovat a vytvářet

tandemové uspořádání. Mezi nejčastější patří kvadrupól, iontová past, elektrostatická iontová past a průletový analyzátor [77]. Jednotlivé separované ionty poté dopadají na detektor, který vygeneruje signál k odpovídajícímu iontu. Jako detektor u MS bývá elektronový násobič, fotonásobič, Faradayova klec a další [78].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Používané materiály a laboratorní vybavení

4.1.1 Rozpouštědla

- Methanol (MeOH) (Penta, Praha)
- Ethanol 96% (EtOH) (VWR chemicals)
- Amoniak (NH₃) (Penta, Praha)
- Ethylacetát (EtOAc) (Lach-Ner, Neratovice)
- Diethylamin (DEA) (Penta, Praha)
- Cyklohexan (CH_x) (Penta, Praha)
- Dichlormethan (CH₂Cl₂) (Penta, Praha)
- Isopropylalkohol (IPA) (Lach-Ner, Neratovice)
- Acetonitril (ACN) (Fischer chemical)
- Aceton (Ace) (Penta, Praha)

4.1.2 Chemikálie

- Kyselina chlorovodíková 36% (Penta, Praha)
- Kyselina mravenčí 98% (FA) (Penta, Praha)
- Kyselina mravenčí LC-MS 99% (VWR chemicals)
- Kyselina trifluoroctová (TFA) (Acros Organics)
- Síran sodný bezvodý (Penta, Praha)
- Dusičnan bismutitý (Penta, Praha)
- Kyselina vinná (Penta, Praha)
- Jodid draselný (Penta, Praha)

4.1.3 Rostlinný materiál

V rámci předchozích diplomových prací bylo zpracováno 43 kg sušené kůry GV [79]. Etherový extrakt byl rozdělen na 272 podfrakcí a v rámci této diplomové práce byla zpracována podfrakce GV-6 o hmotnosti 1,5764 g.

4.1.4 Chromatografické sorbenty

Komerční TLC desky TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck Millipore, Praha)

Lité desky se silikagelem Silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck Millipore, Praha)

4.1.5 Pomocný materiál

- Křemelina (Celite 545) (Sigma Aldrich, Praha)
- Silikagel (Silica gel 60 GF₂₅₄) (Merck, Praha)
- Vata

4.1.6 Mobilní soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

	Rozpouštědla	Poměr
S ₁	EtOAc+MeOH (0,1% NH ₃)	75:15
S ₂	CHx+EtOAc+Ace+DEA	45:20:30:5
S ₃	Ace+MeOH (0,1% NH ₃)	75:15
S ₄	CHx+EtOAc+Ace+DEA	40:40:15:5
S ₅	ACN+H ₂ O	60:20
S ₆	CHx+EtOAc+Ace+DEA	25:20:50:5
S ₇	H ₂ O+Ace+EtOAc+IPA	6:1:1:2
S ₈	MeOH (0,1% TFA)	1

Tabulka 1: Použité mobilní fáze

4.1.7 Detekční činidla

Dragendorffovo činidlo (jodidbismutitan draselný – K[BiI₄])

Využívá se pro detekci alkaloidů, kdy společnou reakcí vzniká oranžová až oranžovočervená sraženina.

- **Zásobní roztok činidla** připravíme smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 1:1.
 - Roztok A: 1,7 g Bi(NO₃)₃ (bazický dusičnan bismutitý) a 20 g C₄H₆O₆ (kyselina vinná) se rozpustí v 80 ml destilované vody.
 - Roztok B: 16 g KI (jodid draselný) se rozpustí ve 40 ml destilované vody.

- **Detekční roztok** připravíme přidáním $C_4H_6O_6$ (10 g) a destilované vody (50 ml) k 5 ml zásobního roztoku.

4.1.8 Použité přístroje

- **Rotační vakuová odparka** Heidolph Hei-VAP Advantages (Heidolph Instruments GmbH & Co)
- **UV lampa**
- **Analytické váhy** KERN ABJ-NM/ABS-N (KERN & SOHN GmbH)
- **Váhy** (Heidolph)
- **Magnetická míchačka** Heidolph MR3001 K (Heidolph Instruments GmbH & CO)
- **Flash chromatograf** puriFlash 535XL (puriFlash)
- **Exsikátor**
- **Ultrazvuková lázeň** Sonorex Super 10P (Bandelin Sonorex)
- **Magnetická míchačka s ohřevem** Heidolph MR Hei-standard (Heidolph Instruments GmbH & Co)
- **Preparativní HPLC systém** (Waters)
- **NMR spektrometr** Varian Iniova 500 (Varian, USA)
- **GC-MS systém** Agilent Technologies 7890A s hmotnostním detektorem Agilent Technologies 5975 (Agilent Technologies Santa Clara, California USA)

4.2 Obecné postupy

4.2.1 Příprava rozpouštědel a jejich skladování

Používaná rozpouštědla se před používáním přečistila procesem destilace. Při skladování je třeba pro zachování kvality rozpouštědel je skladovat ve tmavých skleněných láhvích, které je chrání před působením světla. Láhve se potom uchovávají při laboratorní teplotě na tmavém místě.

4.2.2 Tenkovrstvá chromatografie

4.2.2.1 Příprava litých desek pro preparativní tenkovrstvou chromatografii

Skleněná deska o velikosti 15 × 15 cm se důkladně očistí od nečistot za použití chloroformu. Poté se připraví suspenze silikagelu, smícháním 6,5 g silikagelu a 20,5 ml destilované vody. Připravená suspenze se rovnoměrně v tenké vrstvě rozetře pomocí skleněné tyčinky ve tvaru hokejky po celé ploše skleněné desky. Ty se následně nechají minimálně 24 hodin sušit při laboratorní teplotě a poté jsou připraveny k použití.

4.2.2.2 Preparativní tenkovrstvá chromatografie

Vzorek se rozpustí v malém množství rozpouštědla (v závislosti na množství vzorku ml až desítky ml) (CH_2Cl_2 a MeOH 1:1) a nanese se na lité desky nebo komerčně připravené chromatografické desky. Pro nanášení vzorku se používá pero připravené ze skleněné trubice a malého množství vaty. Do pera se postupně přidává roztok vzorku za současného nanášení vzorku na desku v několika vrstvách ve vodorovné linii, 1-2 cm od spodního kraje desky. Na jednu litou desku se může nanést maximálně 35 až 40 mg vzorku a na komerční desky se může nanést až 15 mg vzorku.

Po nanesení se nechá deska chvilku uschnout a poté se vloží do chromatografické komory, která je předem nasycená mobilní fází. Nechá se vyvíjet do doby, než mobilní fáze dosáhne čela desky, vyjme se a vysuší v digestoři pomocí fénu.

Vyvíjení se může provádět i opakovaně ve stejné či jiné mobilní fázi k zajištění co nejlepší separace jednotlivých zón.

Po detekci alkaloidů se seškrábou a spojí do kádinek jednotlivé zóny se shodným retenčním faktorem.

4.2.2.3 Detekce alkaloidů

Detekce alkaloidů se provádí na chromatografické desce po odpaření mobilní fáze pod UV lampou při vlnové délce 254 nm. Alkaloidy zpravidla představují tmavé skvrny, protože jimi dochází k překrytí fluoreskujícího sorbentu.

Zda se jedná o alkaloidy se dokazuje detekcí pomocí Dragendorffova činidla. Skvrny s alkaloidy se zbarvují do oranžova.

4.2.3 Eluce alkaloidů

Slouží k uvolnění alkaloidů ze silikagelu po seškrábání z desky. Nejprve se získaná frakce smísí v poměru 1:1 s křemelinou. Do připravené skleněné eluční kolonky s kouskem vaty ve zúžení se nasype směs s křemelinou a promývá se MeOH do doby, než jsou všechny alkaloidy z kolonky eluovány. Kontrola probíhá odebráním vzorku při odkapávání z kolonky pomocí kapiláry a nanesením na malý kousek komerční TLC desky s následnou detekcí pomocí Dragendorffova činidla.

Po kompletní eluci je třeba zbavit frakci rozpouštědla odpařením za pomoci rotační vakuové odparky a následně vysušit v exsikátoru pod vakuem po dobu 24 hodin.

4.2.4 Odpařování rozpouštědel

K odpařování rozpouštědel se používá rotační vakuová odparka. V prostředí vakua dochází ke snížení teploty varu jednotlivých rozpouštědel, což umožňuje zvolit nižší teplotu vodní lázně v porovnání s konvenčním procesem odpařování na vodní lázni. Vodní lázeň bývá vytemperovaná na teplotu 30–40 °C v závislosti na typu použitého rozpouštědla.

Menší objemy rozpouštědel, zejména ve vialkách, se odpařují zahřátím na vodní lázni a odfoukáním rozpouštědla za pomoci proudu vzduchu.

4.2.5 Extrakce kapaliny-kapalinou

Extrakce kapaliny-kapalinou (LLE, „vytřepávání“) slouží k odstranění nežádoucího kyselého a neutrálního balastu nealkaloidního charakteru. Extrakce probíhá v dělicí nálevce za použití soustavy dvou nemísitelných kapalin. Extrahovaná látka přechází do jedné fáze, zatímco nečistoty zůstávají v druhé.

Pro vyextrahování alkaloidů (bází) se alkaloidní frakce rozpustí v 2% HCl a odtuční se pomocí lipofilního rozpouštědla nemísitelného s vodou. Poté se zbylá vodní fáze

zalkalizuje na pH 9–11 pomocí 2% NH_3 a následuje vytřepávání pomocí CH_2Cl_2 ev. jiného rozpouštědla nemísitelného s vodou. Alkaloidy přechází do vrstvy s CH_2Cl_2 , která se následně vysuší pomocí síranu sodného a prefiltruje se přes filtrační papír.

4.2.6 Uchování a skladování vzorku

Vzniklá frakce s alkaloidy se přenesse do vialky nebo malé baňky a uchovává se při teplotě 2–8 °C v lednici.

4.2.7 Flash chromatografie

4.2.7.1 Příprava roztěru pro flash chromatografie

Vzorek se rozpustí v CH_2Cl_2 a smísí se v odpařovací misce se silikagelem nebo křemelinou. Za soustavného míchání se nechá odpařit na vodní lázni do sucha, aby vznikl sypký světle hnědý prášek.

4.2.7.2 Samotný postup flash chromatografie

Skleněný kolonový hardware se naplní silikagelem (lze použít komerční, předem naplněný hardware) a „předkolona“ se naplní roztěrem se vzorkem. Mobilní fáze (kapalina) je přiváděna kvarterní pumpou na kolonu. Nejprve se provede ekvilibrace kolony (v našem případě 15 min) a poté se připojí na kolonu „předkolona“ se vzorkem. Programem je řízena koncentrace jednotlivých složek mobilní fáze, která se v průběhu analýzy mění, tzv. gradientová eluce. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 15 ml/min. Detekce pomocí UV/UV–VIS detektoru (200–800 nm).

Výsledné frakce se sbírají do jednotlivých zkumavek, které se poté spojují do společných baněk na základě shodných R_F z provedeného TLC nebo podle chromatografického záznamu.

4.2.8 Strukturní analýza

4.2.8.1 Plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem

Pro analýzu látek ve vzorku byl použit plynový chromatograf Agilent 7890A GC 5975 s hmotnostním detektorem při elektronové ionizaci 70 eV. Analýza se prováděla při teplotním programu: 100–180 °C (7 min), 180 °C (1 min) a 180–300 °C (24 min). Pro separaci látek byla použita kolona Hp-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Agilent Technologies, USA). Jako nosný plyn (mobilní fáze) bylo použito helium o průtokové rychlosti 1 ml/min. Nástřik vzorku probíhal za teploty 180 °C o objemu 1 µl methanolického roztoku o koncentraci 1 mg/ml ve „split mode“ v poměru 1:10.

Výsledná spektra slouží k identifikaci alkaloidů, která se provádí porovnáním s dostupnými spektry v komerční knihovně NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA), s daty publikovanými v odborné literatuře a se spektry látek izolovanými dříve na pracovišti.

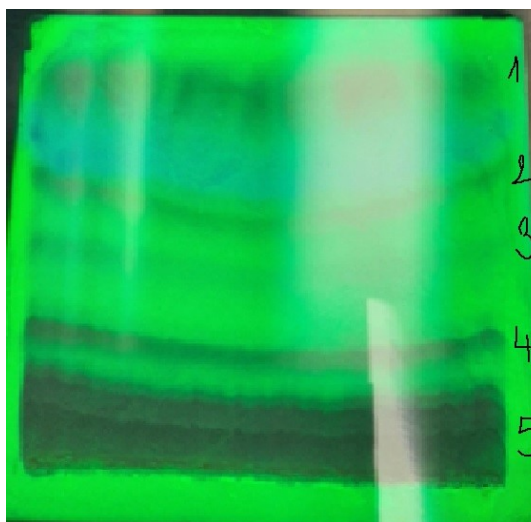
4.3 Samotná izolace alkaloidů

4.3.1 Frakce GV-6

Frakce GV-6 byla rozpuštěna v chloroformu a nanesena na lité desky se silikagelem. Vzhledem k maximálnímu možnému nánosu vzorku 40 mg na jednu desku bylo použito 31 desek. V nejhodnější nalezené mobilní soustavě S_1 byly poté desky jednou vyvíjené.



Obrázek 16: Litá deska s frakcí GV-6 vyvíjená v S_1 postříkaná Dragendorffovým činidlem



Obrázek 15: Litá deska s frakcí GV-6 vyvíjená v S_1 zobrazena pod UV světlem

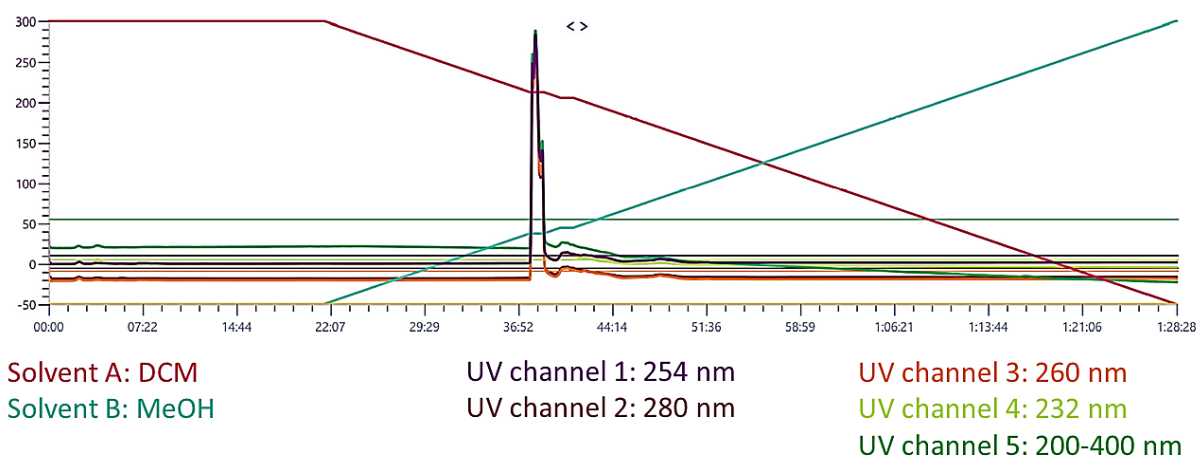
Na obrázcích (Obrázek 16 a Obrázek 15) vidíme, že došlo k rozdělení frakce do pěti zón. Ty byly následně seškrábány a eluovány methanolem, který byl poté odpařen na vakuové odparce a jednotlivé frakce byly zvážené (Tabulka 2).

Podfrakce	Výtěžek
GV-6-A	121,4 mg
GV-6-B	40,8 mg
GV-6-C	31,0 mg
GV-6-D	63,7 mg
GV-6-E	820,5 mg

Tabulka 2: Podfrakce GV-6-A až GV-6-E a jejich hmotnosti

4.3.2 Zpracování podfrakce GV-6-A

Na zpracování podfrakce GV-6-A byla použita flash chromatografie. Udělal se roztěr s dvojnásobným množstvím křemeliny. Po ekvilibraci se mohla spustit samotná separace. Jako mobilní fáze byl použit CH₂Cl₂ (A) a MeOH (B). Eluční program byl naprogramován následovně: prvních 21 minut isokratická eluce pomocí složky A; následovala gradientová eluce z 0 % složky B na 100 % B za 67 minut (Obrázek 17). Podle píků na záznamu se rozdělily zkumavky na 7 podfrakcí, odpařily a zvažily (Tabulka 3).



Obrázek 17: Záznam z flash chromatografie podfrakce GV-6-A

Podfrakce	Výtěžek
GV-6-A-0A	2,6 mg
GV-6-A-0B	0,7 mg
GV-6-A-0C	0,9 mg
GV-6-A-1	19,2 mg
GV-6-A-2	5,6 mg
GV-6-A-3	4,2 mg
GV-6-A-4	2,2 mg

Tabulka 3: Podfrakce GV-6-A-0A až GV-6-A-4

4.3.2.1 Podfrakce GV-6-A-1

Na preparativní HPLC se rozdělila podfrakce GV-6-A-1, která obsahovala hlavní pík na záznamu z Flash chromatografie GV-6-A. Získalo se pět dalších podfrakcí (Tabulka 4).

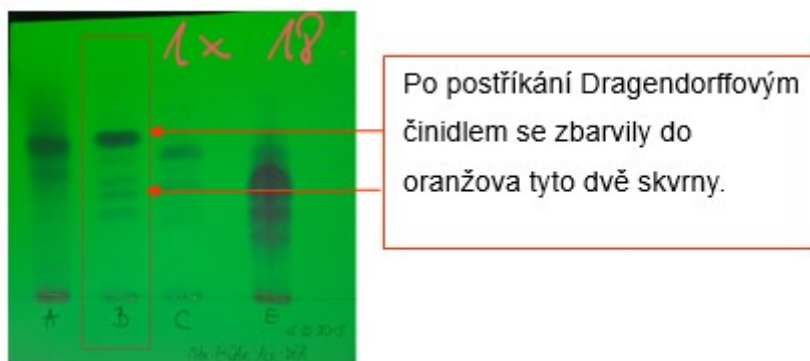
Podfrakce	Výtěžek
GV-6-A-1-A	1,6 mg
GV-6-A-1-B	0,8 mg
GV-6-A-1-C	4,7 mg
GV-6-A-1-D	7,3 mg
GV-6-A-1-E	5,1 mg

Tabulka 4: Podfrakce GV-6-A-1-A až GV-6-A-1-E a jejich hmotnosti

Podfrakce **GV-6-A-1-E** se dala přečistit na preparativní HPLC a získala se frakce o hmotnosti 3,8 mg. Na GC-MS stále byly přítomny nealkaloidní nečistoty. Z frakce se následně pomocí vytrpávání s CH_2Cl_2 odstranily balastní látky nealkaloidního charakteru. Hmotnost výsledné frakce byla 1,8 mg. Po kontrole na GC-MS bylo znovu vidět více látek.

4.3.3 Zpracování podfrakce GV-6-B

Podfrakce se rozdělila na jedné skleněné desce se silikagelem. Jako mobilní soustava byla použita soustava S_2 . Po vyvinutí bylo vidět na chromatogramu pět skvrn, po postříkání Dragendorffovým činidlem však pozitivně reagovali pouze dvě skvrny (Obrázek 18). Tyto dvě zóny byly vyškrábnuté, eluované a po odpaření rozpouštědla se výsledné frakce zvažily (Tabulka 5).



Obrázek 18: TLC podfrakce GV-6-B

Podfrakce	Výtěžek
GV-6-B-1	12,6 mg
GV-6-B-2	4,1 mg

Tabulka 5: Podfrakce GV-6-B-1 a GV-6-B-2 a jejich hmotnosti

4.3.3.1 Podfrakce GV-6-B-1

Podfrakce GV-6-B-1 se vyvíjela na jedné komerční desce se silikagelem o rozměrech 10 × 20 cm mobilní soustavou S₃ (Obrázek 19). Výsledné podfrakce byly zváženy a zaznamenány (Tabulka 6).



Obrázek 19: TLC podfrakce GV-6-B-1

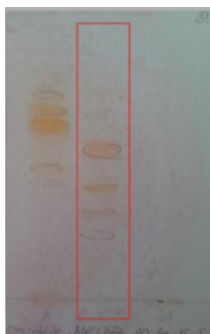
Podfrakce	Výtěžek
GV-6-B-1-A	3,9 mg
GV-6-B-1-B	6,9 mg

Tabulka 6: Podfrakce GV-6-B-1-A a GV-6-B-1-B a jejich hmotnosti

U obou podfrakcí byla provedena GC-MS analýza. V podfrakci GV-6-B-1-A se nejevila žádná zásadní látka. Podfrakce GV-6-B-1-B svým záznamem odpovídala mateřské podfrakci GV-6-B-1. Dále se tato podfrakce už nezpracovávala.

4.3.4 Zpracování podfrakce GV-6-C

Podfrakce se dala vyvíjet na čtyři komerční desky se silikagelem o rozměrech 10 × 20 cm (Obrázek 20). Mobilní fází byla soustava S₄. Tři vzniklé podfrakce byly zváženy a zaznamenány (Tabulka 7).



Obrázek 20: TLC podfrakce GV-6-C

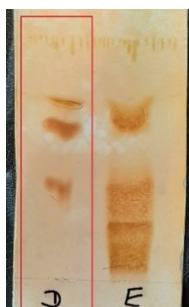
Podfrakce	Výtěžek
GV-6-C-1	5,3 mg
GV-6-C-2	5,7 mg
GV-6-C-3	3,5 mg

Tabulka 7: Podfrakce GV-6-C-1 až GV-6-C-3 a jejich hmotnosti

Všechny tři podfrakce se daly na analýzu GC-MS a vzhledem k výsledku, který ukázal, že obsahují stále více látek a menším hmotnostem se s nimi dále nepracovalo.

4.3.5 Zpracování podfrakce GV-6-D

Na rozdělení podfrakce GV-6-D byla použita mobilní soustava S₅ (Obrázek 21). Vzhledem k množství 63,7 mg byla frakce nanášena na 2 lité desky se silikagelem a rozdělena na tři podfrakce (Tabulka 8).



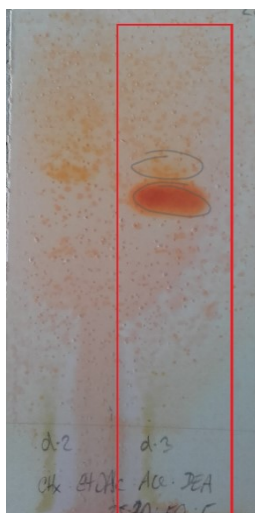
Obrázek 21: TLC podfrakce GV-6-D

Podfrakce	Výtěžek
GV-6-D-1	10,9 mg
GV-6-D-2	4,0 mg
GV-6-D-3	26,9 mg

Tabulka 8: Podfrakce GV-6-D-1 až GV-6-D-3 a jejich hmotnosti

4.3.5.1 Podfrakce GV-6-D-3

Z podfrakce GV-6-D bylo dále pracováno s podfrakcí GV-6-D-3. Na komerčních deskách o rozměru 10 × 20 cm byla rozdělena na dvě zóny, jednu hlavní a druhou vedlejší, pomocí mobilní soustavy S₅ (Obrázek 22). Podfrakce byly seškrábány, eluovány, odpařeny a zváženy (Tabulka 9).



Obrázek 22: TLC podfrakce GV-6-D-3

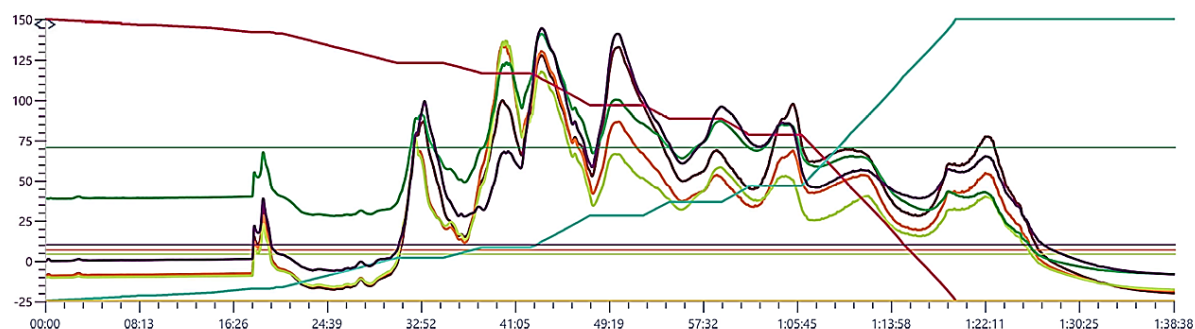
Podfrakce	Výtěžek
GV-6-D-3-A	2 mg
GV-6-D-3-B	19 mg

Tabulka 9: Podfrakce GV-6-D-3-A a GV-D-3-B a jejich hmotnosti

Po GC-MS analýze podfrakce GV-6-D-3 byl na chromatogramu přítomen jeden velký pík a jeden malý pík. Po rozdělení na dvě podfrakce se udělalo kontrolní TLC podfrakce GV-6-D-3-B, které ale ukázalo více alkaloidních skvrn. S podfrakcí se dále nepracovalo.

4.3.6 Zpracování podfrakce GV-6-E

Celá podfrakce se dala rozdělit na flash chromatografii. Rozpustila se v CH₂Cl₂ a udělal se roztěr s trojnásobným množstvím silikagelu. Poté probíhala ekvibrace kolony a samotná separace frakce. Byla použita gradientová eluce, kdy jako mobilní fáze byl použit CH₂Cl₂ (A) a 0,1% FA v MeOH (B). Gradientová eluce byla naprogramována z 0 % B na 100 % B za 89 minut (Obrázek 23). Průtok mobilní fáze byl 15 ml/min. Po skončení analýzy se spojily zkumavky, odpařily se rozpouštědla a frakce se zvažily (Tabulka 10).



Solvent A: DCM

Solvent B: 0.1% FA v methanolu

UV channel 1: 254 nm

UV channel 2: 270 nm

UV channel 3: 280 nm

UV channel 4: 290 nm

UV channel 5: 200-400 nm

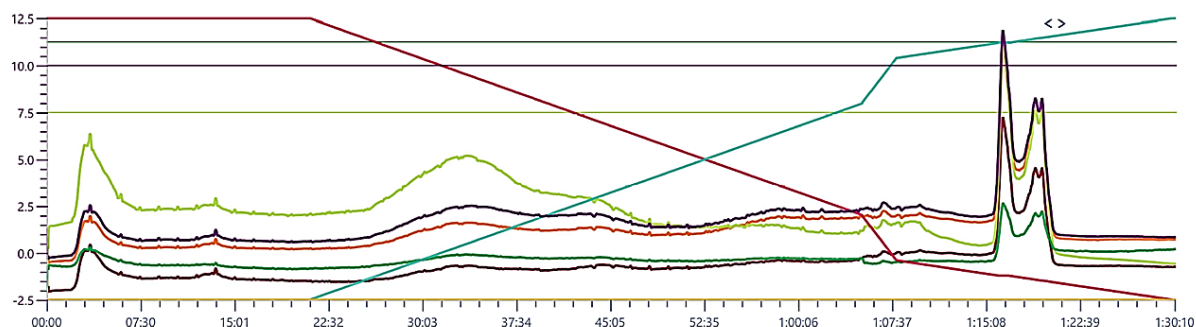
Obrázek 23: Záznam z flash chromatografie podfrakce GV-6-E

Podfrakce	Výtěžek
GV-6-E-1	0,20 mg
GV-6-E-2	14,10 mg
GV-6-E-3	12,30 mg
GV-6-E-4	16,60 mg
GV-6-E-5	61,00 mg
GV-6-E-6	70,30 mg
GV-6-E-7	180,20 mg
GV-6-E-0	80,64 mg

Tabulka 10: Podfrakce GV-6-E-1 až GV-6-0 a jejich hmotnosti

4.3.6.1 Podfrakce GV-6-E-5

Dále se izolovaly alkaloidy z podfrakce GV-6-E-5 opět pomocí flash chromatografie. Roztěr se udělal s dvojnásobným množstvím křemeliny. Jako mobilní fáze byl použit IPA (A) a 0,1% DEA v MeOH (B). Eluční program byl naprogramován následovně: prvních 21 minut isokratická eluce pomocí složky A; následovala gradientová eluce z 0 % složky B na 100 % B za 85 minut (Obrázek 24). Pět vzniklých podfrakcí bylo zváženo a zaznamenáno (Tabulka 11).



Solvent A: IPA

UV channel 1: 254 nm

UV channel 3: 280 nm

Solvent B: 0.1% DEA v methanolu

UV channel 2: 270 nm

UV channel 4: 290 nm

UV channel 5: 200-400 nm

Obrázek 24: Záznam z flash chromatografie podfrakce GV-6-E-5

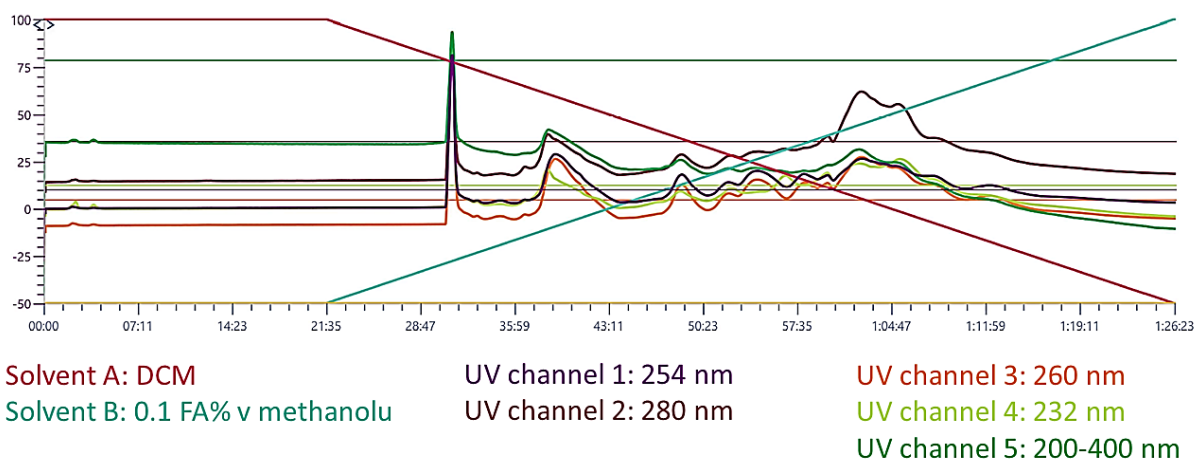
Podfrakce	Výtěžek
GV-6-E-5-A	4,6 mg
GV-6-E-5-B	2,0 mg
GV-6-E-5-C	6,6 mg
GV-6-E-5-D	8,3 mg
GV-6-E-5-E	3,6 mg

Tabulka 11: Podfrakce GV-6-E-5-A až GV-6-E-5-E a jejich hmotnosti

Dále se s žádnou z podfrakcí již nepracovalo.

4.3.6.2 Frakce GV-6-E-0

Frakce se dala rozdělit na flash chromatografii. Na roztěr bylo použito dvojnásobné množství křemeliny. Jako mobilní fáze byl použit CH₂Cl₂ (A) a 0,1% FA v MeOH (B). Eluční program byl naprogramován následovně: prvních 21 minut isokratická eluce pomocí složky A; následovala gradientová eluce z 0 % složky B na 100 % B za 67 minut (Obrázek 25). Celá podfrakce byla rozdělena na sedm dalších podfrakcí (Tabulka 12)



Obrázek 25: Záznam z flash chromatografie podfrakce GV-6-E-0

Podfrakce	Výtěžek
GV-6-E-0-A	0,9 mg
GV-6-E-0-B	12,0 mg
GV-6-E-0-C	3,2 mg
GV-6-E-0-D	6,8 mg
GV-6-E-0-E	1,0 mg
GV-6-E-0-F	4,8 mg
GV-6-E-0-G	59,1 mg

Tabulka 12: Podfrakce GV-6-E-0-A až GV-6-E-0-G a jejich hmotnosti

Z této podfrakce se dále pracovalo s podfrakci GV-6-E-0-B a GV-6-E-0-G.

Podfrakce **GV-6-E-0-B** se dala rekrystalizovat. Nejdříve se zahřívala pod zpětným chladičem, poté se dala zchladit do mrazáku. Z roztoku vypadly bílé krystaly o výsledné hmotnosti 3 mg. Před NMR analýzou se provedla ještě kontrolní GC-MS,

kteřá ukázala, že podfrakce není čistá a pravděpodobně došlo k rozkladu alkaloidu, a tak se už NMR neprováděla.

Podfrakce **GV-6-E-0-G** se nanasla na čtyři hliníkové desky, které se vyvíjely v komoře s mobilní soustavou S₇. Po vysušení se desky daly znova vyvíjet, tentokrát do mobilní fáze S₈ (Obrázek 26 a Obrázek 27). Jednotlivé zóny se vyškrábly a spojily do šesti podfrakcí (Tabulka 13).



Obrázek 26: TLC podfrakce GV-6-E-0-G pod UV světlem



Obrázek 27: TLC podfrakce GV-6-E-0-G po důkazu Dragendorffovým činidlem

Podfrakce	Výtěžek
GV-6-E-O-G-1	8,0 mg
GV-6-E-O-G-2	0,8 mg
GV-6-E-O-G-3	0,3 mg
GV-6-E-O-G-4	2,8 mg
GV-6-E-O-G-5	9,8 mg
GV-6-E-O-G-6	11,6 mg

Tabulka 13: Podfrakce GV-6-E-O-G-1 až GV-6-E-O-G-6 a jejich hmotnosti

Z podfrakcemi se dále již vzhledem k výtěžkům nepracovalo.

5 VÝSLEDKY

Při práci na experimentální části diplomové práce se nepodařilo vyizolovat žádný alkaloid z frakce GV-6, která pochází z kůry stromu GV. Dvě podfrakce GV-6-A-1-E a GV-6-E-0-B se jevily slibně, ale bohužel u nich došlo pravděpodobně v závěrečné části před měřením na NMR k rozkladu alkaloidů.

Podfrakce **GV-6-A-1-E** vznikla po preparativním HPLC a na chromatografickém záznamu představovala jeden hlavní pík. Podfrakce se dala znova přečistit na preparativní HPLC. Po analýze na GC-MS byly stále vidět nealkaloidní nečistoty, které se vytřepáním s CH₂Cl₂ odstranily a podfrakce GV-6-A-1-E následně měla 1,8 mg. Před NMR analýzou se dala podfrakce ještě zkontrolovat na GC-MS, které ukázalo více píků, což znamená, že původní alkaloid vlivem různých faktorů podlehl degradačním reakcím.

V podfrakci **GV-6-E-0-B** byly vidět po flash chromatografii krystaly. Podfrakce se dala rekrystalizovat a z roztoku následně vypadly bílé krystaly o hmotnosti 3 mg. Před NMR analýzou se provedla kontrola na GC-MS, které ukázalo pravděpodobný rozklad alkaloidu.

5.1 Stanovení biologické aktivity

Jedním z cílů diplomové práce bylo změřit biologickou aktivitu alkaloidů vůči cholineserásám. Nepodařilo se však izolovat žádný alkaloid v čisté formě, u kterého by se mohla jeho aktivita změřit. Měření biologické aktivity tedy nemohlo proběhnout.

6 DISKUSE A ZÁVĚR

I přes to, že je GV využívána v tradičním léčitelství v oblastech Jižní Ameriky, pro zbytek světa není tolik známá a prostudovaná jako jiné rostliny. Zájem o ní ale postupně stoupá. Byly provedeny studie biologické aktivity rostliny GV, u které byly zjištěny významné anticholinesterasové, protinádorové, protizánětlivé, antinociceptivní, antiplazmodiální, antileishmaniální a antivirotické účinky. Tyto studie ve většině případů zatím pouze informují o základních parametrech jejich biologické aktivity. Nejnadějnější účinky mohou být anticholinesterasové a protinádorové, které budou vyžadovat další studie k dosažení kompletních informací o alkaloidech a jejich možných derivátech.

Bylo pracováno s frakcí GV-6, která vznikla po zpracování kůry GV. Na izolaci alkaloidů bylo použito několik chromatografických metod (TLC, preparativní TLC, flash chromatografie, preparativní HPLC a GC-MS). Získaly se čisté podfrakce GV-6-A-1-E a GV-6-E-0-B, u kterých ale došlo k rozkladu alkaloidů a nebylo dále možné u nich vykonat analýzu pomocí NMR a změřit jejich biologickou aktivitu.

Faktorů, které mohou vést k rozkladu indolových alkaloidů je celá řada. Abychom zabránili degradaci těchto látek je třeba zvážit a zajistit stabilitu několik faktorů prostředí, jako je teplo, světlo, přístup kyslíku a hodnotu pH. Při zajištění stability a určitých hodnot těchto fyzikálně-chemických vlastností minimalizuje možnost rozložení alkaloidních látek.

Teplota je důležitým bodem při uchování alkaloidů, jelikož vyšší teplota může urychlit jejich degradaci. Alkaloidy uchováváme v nízkých teplotách, typicky se pro uchování používá chladnička (2–8 °C) nebo při delších skladování mrazák (-18 °C). Proto se pro vysušení může využít neobvyklého postupu lyofilizace.

Stejně tak by se měly chránit před světlem a působením vzdušného kyslíku, aby se předešlo jejich nechtěné oxidaci. Skladovaný vzorek je potřeba řádně vysušit v exsikátoru, aby se eliminovala vlhkost, která by mohla vést k hydrolytickým reakcím. Jedním ze způsobů, jak ochránit vzorek před oxidací, může být jeho uchování pod inertními plyny, jako jsou dusík nebo argon. Tyto plyny vytěsní nechtěný kyslík ze skladovací vialky a tím zabrání jeho oxidaci.

Rostlinné extrakty není vhodné uchovávat v rozpouštědle déle než den nebo dva. Před uchováním by se mělo rozpouštědlo vždy nechat odpařit, aby se předešlo zvýšenému riziku nechtěného rozkladu látek. Je potřeba dát si pozor na teplotu, při které k odpařování dochází, aby nedošlo k rozkladu termolabilních látek. K tomu lze efektivně použít například rotační vakuovou odparku [80]. Při práci se musela u podfrakce GV-6-A-1-E odpařovat směs rozpouštědel obsahující vodu po preparativní HPLC. Při odpařování se využilo použití ethanolu pro rychlejší proces, ale i tak přesahovala teplota přes 40 °C, což může vést k rozkladu nestabilních alkaloidů. Bylo by výhodnější použít jiná rozpouštědla s nižší teplotou varu.

Rozpouštědla mohou narušovat a rozkládat alkaloidy svými nečistoty. U ethanolu, chloroformu, dichlormethanu, ethylacetátu a diethyletheru se mohou vlivem oxidace vyskytovat nečistoty v podobě formaldehydu a acetaldehydu, které jsou schopny reagovat s aminoskupinami alkaloidů [81]. Rozpouštědla je nutno uchovávat v tmavých lahvích, chráněná před světlem a při laboratorní teplotě.

Během experimentální části bylo zjištěno, že některé alkaloidy se rozkládají v přítomnosti chloroformu, který byl posléze nahrazován dichlormethanem. Obecně pro halogenované rozpouštědla platí, že látky v jejich přítomnosti nemusí být dostatečně stabilní. CHCl_3 může s alkaloidy reagovat sám o sobě jako v případě berberinu nebo u indolového alkaloidu reserpinu dochází k jeho fotooxidaci v případě vystavení CHCl_3 světlu. Při použití CH_2Cl_2 mohou vznikat z terciárních aminoskupin alkaloidů prostřednictvím alkylace kvartérní aminy, takový rozklad byl zaznamenán např. u alkaloidů strychnin, brucin a atropin [82]. Ve studii z roku 2024 byl porovnáván CH_2Cl_2 při izolaci harminu metodou LLE s rozpouštědly ethylacetátem a tert-amyl methyl etherem, které dopadly v extrakční účinnosti, selektivitě, ale také v environmentálních aspektech lépe než CH_2Cl_2 [83]. Při experimentální části se na LLE používal CH_2Cl_2 , bylo by vhodné zvážit použití jiného rozpouštědla, např. již zmíněný ethylacetát.

Alkaloidy obsažené v GV představují zajímavou možnost pro vývoj nových léčiv. Zejména pro léčbu Alzheimerovy choroby a terapii nádorů mohou být nadějnou strukturou, která by mohla vést k objevení nové léčivé látky.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Camargo, M. R. M., Amorim, R. C. D. N., Silva, L. F. R. E., Carneiro, A. L. B., Vital, M. J. S., & Pohlit, A. M. (2013). Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of *Geissospermum* Allemão species (Apocynaceae Juss.). *Revista Fitos*, 8(2). <https://doi.org/10.5935/1808-9569.20130002>
- [2] *Geissospermum* Allemão. (b.r.). Získáno 28. srpen 2024, z <https://worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000015453#feedbackModal>
- [3] Almeida, M. R., Lima, J. A., Santos, N. P. D., & Pinto, A. C. (2009). Pereirina: O primeiro alcaloide isolado no Brasil? *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(4), 942–952. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000600026>
- [4] *GEISSOSPERMUM VELLOSI* (PAO PEREIRA) TREE - TROPILAB. (b.r.). Získáno 11. prosince 2023, z <https://tropilab.com/bergibita.html>
- [5] *Geissospermum laeve* (Vell.) Miers | Plants of the World Online | Kew Science. (b.r.). Získáno 10. prosince 2023, z <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:79123-1>
- [6] Marques, D. D. A., Zanchi, F. B., & Evaristo, G. P. C. (2023). Ethnopharmacological review, phytochemistry and bioactivity of the genus *Geissospermum* (Apocynaceae). *Research, Society and Development*, 12(2). <https://doi.org/10.33448/rsd-v12i2.40047>
- [7] Souza Brito, A. R. M., & Souza Brito, A. A. (1993). Forty years of Brazilian medicinal plant research. *Journal of Ethnopharmacology*, 39(1), 53–67. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(93\)90050-F](https://doi.org/10.1016/0378-8741(93)90050-F)
- [8] Dewick, P. M. (2009). *Medicinal natural products: A biosynthetic approach* (3rd ed). Chichester: J. Wiley.
- [9] O'Connor, S. E. (2010). *Alkaloids*. In *Comprehensive Natural Products II* 977-1007. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00013-7>
- [10] Buckingham, J., Baggaley, K. H., Roberts, A. D., & Szabo, L. F. (Ed.). (2010). *Dictionary of Alkaloids with CD-ROM* (2nd ed). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/EBK1420077698>
- [11] Rosales, P. F., Bordin, G. S., Gower, A. E., & Moura, S. (2020). Indole alkaloids: 2012 until now, highlighting the new chemical structures and biological activities. *Fitoterapia*, 143. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104558>
- [12] Singh, T. P., & Singh, O. M. (2017). Recent Progress in Biological Activities of Indole and Indole Alkaloids. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 18(1). <https://doi.org/10.2174/1389557517666170807123201>
- [13] Spilková, J., Martin, J., Siatka, T., Tůmová, L., & Kašparová, M. (2023). *Farmakognozie*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum.
- [14] Duan, W., Cao, D., Wang, S., & Cheng, J. (2024). Serotonin 2A Receptor (5-HT_{2A} R) Agonists: Psychedelics and Non-Hallucinogenic Analogues as Emerging Antidepressants. *Chemical Reviews*, 124(1), 124–163. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.3c00375>

- [15] Katzung, B.G., Masters, S.B. and Trevor, A.J., Eds. (2012) *Basic and Clinical Pharmacology*. 12th Edition, McGraw-Hill Medical, New York
- [16] Polinsky, R. J. (1998). Clinical pharmacology of rivastigmine: A new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of alzheimer's disease. *Clinical Therapeutics*, 20(4), 634–647. [https://doi.org/10.1016/S0149-2918\(98\)80127-6](https://doi.org/10.1016/S0149-2918(98)80127-6)
- [17] Patel, K., Gadewar, M., Tripathi, R., Prasad, S. K., & Patel, D. K. (2012). A review on medicinal importance, pharmacological activity and bioanalytical aspects of beta-carboline alkaloid „Harmine“. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(8), 660–664. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60116-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60116-6)
- [18] Ruffell, S., Netzband, N., Bird, C., Young, A. H., & Juruena, M. F. (2020). The pharmacological interaction of compounds in ayahuasca: A systematic review. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 42(6), 646–656. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2020-0884>
- [19] Monasky, M. M., Micaglio, E., D'Imperio, S., & Pappone, C. (2021). The Mechanism of Ajmaline and Thus Brugada Syndrome: Not Only the Sodium Channel! *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.782596>
- [20] Sharma, N., Sharma, V., Manikyam, H., & Krishna, A. (2016). Ergot Alkaloids: A Review on Therapeutic Applications. *European Journal of Medicinal Plants*, 14(3). <https://doi.org/10.9734/EJMP/2016/25975>
- [21] Patocka, J. (2020). Strychnine. In *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. Elsevier, 239–247. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819090-6.00016-7>
- [22] Wax, P. M. (1997). Analeptic Use in Clinical Toxicology: A Historical Appraisal. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 35(2), 203–209. <https://doi.org/10.3109/15563659709001195>
- [23] Rahman, Md. M., Basta, T., Teng, J., Lee, M., Worrell, B. T., Stowell, M. H. B., & Hibbs, R. E. (2022). Structural mechanism of muscle nicotinic receptor desensitization and block by curare. *Nature Structural & Molecular Biology*, 29(4), 386–394. <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00737-3>
- [24] Banyal, A., Tiwari, S., Sharma, A., Chanana, I., Patel, S. K. S., Kulshrestha, S., & Kumar, P. (2023). Vinca alkaloids as a potential cancer therapeutics: Recent update and future challenges. *3 Biotech*, 13(6). <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03636-6>
- [25] O'Connor, S. E., & Maresh, J. J. (2006). Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Natural Product Reports*, 23(4). <https://doi.org/10.1039/b512615>
- [26] Aniszewski, T. (2007). *Alkaloids—Secrets of Life*. Burlington: Elsevier.
- [27] Fox Ramos, A. E., Alcover, C., Evanno, L., Maciuk, A., Litaudon, M., Duplais, C., ... Beniddir, M. A. (2017). Revisiting Previously Investigated Plants: A Molecular Networking-Based Study of *Geissospermum laeve*. *Journal of Natural Products*, 80(4), 1007–1014. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01013>
- [28] Da Silva E Silva, J. V., Cordovil Brigido, H. P., Oliveira De Albuquerque, K. C., Miranda Carvalho, J., Ferreira Reis, J., Vinhal Faria, L., ... Dolabela, M. F. (2019). Flavopereirine—An Alkaloid Derived from *Geissospermum vellosii*—Presents Leishmanicidal Activity In Vitro. *Molecules*, 24(4). <https://doi.org/10.3390/molecules24040785>

- [29] Rapoport, H., Windgassen, R. J., Hughes, N. A., & Onak, T. P. (1960). Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. Further Studies on Geissospermine and the Structures of the Indolic Cleavage Products, Geissoschizine ¹ and Apogeissoschizine. *Journal of the American Chemical Society*, 82(16), 4404–4414. <https://doi.org/10.1021/ja01501a069>
- [30] Almeida, M. R., Martinez, S. T., & Pinto, A. C. (2017). Química de produtos naturais: plantas que testemunham histórias. *Revista Virtual de Química*, 9(3), 1117-1153. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170068>
- [31] Rapoport, H., & Moore, R. E. (1962). Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. Isolation and Structure Determinations of Vellosimine, Vellosiminol, and Geissolosimine. *The Journal of Organic Chemistry*, 27(9), 2981–2985. <https://doi.org/10.1021/jo01056a004>
- [32] Moore, R. E., & Rapoport, H. (1973). Geissovelline, a new alkaloid from *Geissospermum vellosii*. *The Journal of Organic Chemistry*, 38(2), 215–230. <https://doi.org/10.1021/jo00942a007>
- [33] Ishiyama, H., Matsumoto, M., Sekiguchi, M., Shigemori, H., Ohsaki, A., & Kobayashi, J. I. (2006). Two new indole alkaloids from *Aspidosperma subincanum* and *Geissospermum vellosii*. *Heterocycles*, 66, 651-658.
- [34] Werner, J. A. T., Oliveira, S. M., Martins, D. F., Mazzardo, L., Dias, J. D. F. G., Lordello, A. L. L., ... Santos, A. R. S. (2009). Evidence for a role of 5-HT_{1A} receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(1), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.026>
- [35] Mbeunkui, F., Grace, M. H., Lategan, C., Smith, P. J., Raskin, I., & Lila, M. A. (2012). In vitro antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stem bark of *Geissospermum vellosii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), 471–477. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.036>
- [36] Rapoport, H., Onak, T. P., Hughes, N. A., & Reinecke, M. G. (1958). Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. *Journal of the American Chemical Society*, 80(7), 1601–1604. <https://doi.org/10.1021/ja01540a023>
- [37] Wu, J.-J. (2024). Flavopereirine exerts anti-cancer activities in various human thyroid cancer cells. *American Journal of Cancer Research*, 14(7), 3317–3334. <https://doi.org/10.62347/MINX1330>
- [38] Beljanski, M. (2005). Flavopereirine-based pharmaceutical composition and use thereof for treating HIV., No. 002120001A.
- [39] Lima, J. A., R. Costa, T. W., Da Fonseca, A. C. C., Do Amaral, R. F., Nascimento, M. D. D. S. B., Santos-Filho, O. A., ... Tinoco, L. W. (2020). Geissoschizoline, a promising alkaloid for Alzheimer's disease: Inhibition of human cholinesterases, anti-inflammatory effects and molecular docking. *Bioorganic Chemistry*, 104. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104215>
- [40] Dossou, S. S. K., Xu, F., Dossa, K., Zhou, R., Zhao, Y., & Wang, L. (2023). Antioxidant lignans sesamin and sesamol in sesame (*Sesamum indicum* L.): A comprehensive review and future prospects. *Journal of Integrative Agriculture*, 22(1), 14–30. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2022.08.097>

- [41] Gallo, M. B., & Sarachine, M. J. (2009). Biological activities of lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 46-66.
- [42] Huang, L.-K., Kuan, Y.-C., Lin, H.-W., & Hu, C.-J. (2023). Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease: A 2020–2023 update. *Journal of Biomedical Science*, 30(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s12929-023-00976-6>
- [43] Lima, J. A., Costa, R. S., Epifânio, R. A., Castro, N. G., Rocha, M. S., & Pinto, A. C. (2009). *Geissospermum vellosii* stem bark: anticholinesterase activity and improvement of Scopolamine induced memory deficits. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(3), 508-513. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.01.024>
- [44] Araújo, J. Q., Lima, J. A., Pinto, A. D. C., De Alencastro, R. B., & Albuquerque, M. G. (2011). Docking of the alkaloid geissospermine into acetylcholinesterase: A natural scaffold targeting the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Modeling*, 17(6), 1401–1412. <https://doi.org/10.1007/s00894-010-0841-2>
- [45] Leng, F., & Edison, P. (2021). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: Where do we go from here? *Nature Reviews Neurology*, 17(3), 157–172. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>
- [46] Bemis, D. L., Capodice, J. L., Desai, M., Katz, A. E., & Buttyan, R. (2009). Beta-carboline alkaloid-enriched extract from the amazonian rain forest tree pao pereira suppresses prostate cancer cells. *Journal of the Society for Integrative Oncology*, 7(2), 59–65.
- [47] Matoušková, M., & Hanuš, M. (2014). Hormonální léčba kastročně refrakterního karcinomu prostaty (CRPC), existují linie léčby?. *Onkologie*, 8(2), 75-79.
- [48] Chang, C., Zhao, W., Xie, B., Deng, Y., Han, T., Cui, Y., ... Yan, J. (2014). Pao Pereira Extract Suppresses Castration-Resistant Prostate Cancer Cell Growth, Survival, and Invasion Through Inhibition of NFκB Signaling. *Integrative Cancer Therapies*, 13(3), 249–258. <https://doi.org/10.1177/1534735413510557>
- [49] Gaptulbarova, K. A., Tsyganov, M. M., Pevzner, A. M., Ibragimova, M. K., & Litviakov, N. V. (2023). NF-κB as a potential prognostic marker and a candidate for targeted therapy of cancer. *Experimental Oncology*, 42(4), 263–269. <https://doi.org/10.32471/exponcology.2312-8852.vol-42-no-4.15414>
- [50] Liu, J., Fang, T., Li, M., Song, Y., Li, J., Xue, Z., ... Yan, J. (2019). Pao Pereira Extract Attenuates Testosterone-Induced Benign Prostatic Hyperplasia in Rats by inhibiting 5α-Reductase. *Scientific Reports*, 9(1), 19703. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56145-z>
- [51] Yu, J., & Chen, Q. (2014). The plant extract of Pao pereira potentiates carboplatin effects against ovarian cancer. *Pharmaceutical Biology*, 52(1), 36–43. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.808232>
- [52] Yu, J., Drisko, J., & Chen, Q. (2013). Inhibition of pancreatic cancer and potentiation of gemcitabine effects by the extract of Pao Pereira. *Oncology Reports*, 30(1), 149–156. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2461>
- [53] Li, J.-M., Huang, Y.-C., Kuo, Y.-H., Cheng, C.-C., Kuan, F.-C., Chang, S.-F., ... Shi, C.-S. (2019). Flavopereirine Suppresses the Growth of Colorectal Cancer Cells through P53 Signaling Dependence. *Cancers*, 11(7), 1034. <https://doi.org/10.3390/cancers11071034>

- [54] Yeh, H.-T., Tsai, Y.-S., Chen, M.-S., Li, Y.-Z., Lin, W.-C., Lee, Y.-R., ... Sheu, S.-M. (2019). Flavopereirine induces cell cycle arrest and apoptosis via the AKT/p38 MAPK/ERK1/2 signaling pathway in human breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 863, 172658. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172658>
- [55] Xu, J., Wu, Z., & Huang, J. (2021). Flavopereirine Suppresses the Progression of Human Oral Cancer by Inhibiting the JAK-STAT Signaling Pathway via Targeting LASP1. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 15, 1705–1716. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S284213>
- [56] Chen, S.-Y., Chao, C.-N., Huang, H.-Y., & Fang, C.-Y. (2020). Flavopereirine Inhibits Hepatocellular Carcinoma Cell Growth by Inducing Cell-cycle Arrest, Apoptosis, and Autophagy-related Protein Expression. *Anticancer Research*, 40(12), 6907–6914. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.14714>
- [57] Lima, J. A., Costa, T. W. R., Silva, L. L., Miranda, A. L. P., & Pinto, A. C. (2016). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a *Geissospermum vellosii* stem bark fraction. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88(1), 237–248. <https://doi.org/10.1590/00013765201520140374>
- [58] Brandão, M. G. L., Grandi, T. S. M., Rocha, E. M. M., Sawyer, D. R., & Krettli, A. U. (1992). Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 36(2), 175–182. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90018-M](https://doi.org/10.1016/0378-8741(92)90018-M)
- [59] Muñoz, V., Sauvain, M., Bourdy, G., Callapa, J., Bergeron, S., Rojas, I., ... Deharo, E. (2000). A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 69(2), 127–137. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00148-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00148-8)
- [60] Bertania, S., Bourdyb, G., Landaua, I., Robinsonc, J. C., Esterred, Ph., & Deharo, E. (2005). Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 98(1–2), 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.12.020>
- [61] Ohannesian, L., & Streeter, A. J. (Ed.). (2002). *Handbook of pharmaceutical analysis*. New York: Marcel Dekker.
- [62] NOVÁKOVÁ, L., & DOUŠA, M. (2013). *Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 1. vyd. Praha: Europrint.*
- [63] Nováková, L., Douša, M., & Česla, P. (2021). *Moderní HPLC separace v teorii a praxi (2. přepracované a rozšířené vydání)*. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek.
- [64] Klimeš, J., Sochor, J., Mokřý, M., Kastner, P., & Pilářová, P. (2015). *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. Hradec Králové: Jiří Klimeš, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy.
- [65] Vlastnosti rozpouštědel. (b.r.). Získáno 29. srpen 2024, http://www.hplc.cz/Tabs/1_solvents.htm
- [66] Boone, C., & Adamec, J. (2016). Top-Down Proteomics. In *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*, 175–191. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-636881.00010-0>
- [67] Petruczynik, A., & Waksmundzka-Hajnos, M. (2013). High performance liquid chromatography of selected alkaloids in ion-exchange systems. *Journal of Chromatography A*, 1311, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.036>

- [68] Coskun, O. (2016). Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. *Northern Clinics of Istanbul*. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
- [69] TLC a PC. (b.r.). Získáno 30. srpen 2024, z <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/tlcpc.html>
- [70] Roge, A. B., Firke, S. N., Kawade, R. M., Sarje, S. K., & Vadvalkar, S. M. (2011). Brief review on: flash chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(8).
- [71] Weber, P., Hamburger, M., Schafroth, N., & Potterat, O. (2011). Flash chromatography on cartridges for the separation of plant extracts: Rules for the selection of chromatographic conditions and comparison with medium pressure liquid chromatography. *Fitoterapia*, 82(2), 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.08.013>
- [72] Stevens, W. C., & Hill, D. C. (2009). General methods for flash chromatography using disposable columns. *Molecular Diversity*, 13(2). <https://doi.org/10.1007/s11030-008-9104->
- [73] Bhardwaj, S. K., Dwivedia, K., & Agarwala, D. D. (2015). A review: HPLC method development and validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 5(4), 76-81.
- [74] Sunil, A. (2018). HPLC Detectors, Their Types and Use: A Review. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 6(5). <https://doi.org/10.19080/OMCIJ.2018.06.555700>
- [75] Poole, C. F. (Ed.). (2021). *Gas chromatography* (2nd ed). Amsterdam, Netherlands ; Cambridge, MA: Elsevier.
- [76] Hoffmann, E. de, & Stroobant, V. (2007). *Mass spectrometry: Principles and applications* (3rd ed). Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ, J. Wiley.
- [77] Friedecký, D., & Lemr, K. (2012). Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*, 20(41), 152-157.
- [78] Dass, C. (2007). *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry* (1st ed). Wiley. <https://doi.org/10.1002/0470118490>
- [79] Buláková, A. (2020). *Izolácia alkaloidov druhu Geissospermum vellosii Allemão a štúdium ich biologickej aktivity I.* (Baklářská práce), Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta.
- [80] Jones, W. P., & Kinghorn, A. D. (2012). Extraction of Plant Secondary Metabolites. In S. D. Sarker & L. Nahar (Ed.), *Natural Products Isolation*, 341–366. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_13
- [81] Maltese, F., Van Der Kooy, F., & Verpoorte, R. (2009). Solvent Derived Artifacts in Natural Products Chemistry. *Natural Product Communications*, 4(3). <https://doi.org/10.1177/1934578X0900400326>
- [82] Verpoorte, R., Kim, H. K., & Choi, Y. H. (2022). Trivialities in metabolomics: Artifacts in extraction and analysis. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.972190>
- [83] Chibli, L. A., De Lima, B. R., Carneiro, A. M., Figueiró, H. C., Cicek, S. S., Spiegler, V., & Funari, C. S. (2024). Toward a More Sustainable Sample Preparation in Phytochemistry: Case Studies in Four Subclasses of Alkaloids. *Journal of Natural Products*, 87(3), 470–479. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.3c01048>

8 ABSTRAKT

Brtníková, T., Izolace alkaloidů druhu *Geissospermum vellosii* Allemão a studium jejich biologické aktivity IX., Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky, Hradec Králové 2024.

Klíčová slova: *Geissospermum vellosii*, kůra, alkaloidní extrakty, izolace alkaloidů, GC/MS analýza, biologická aktivita, enzymová aktivita

V této diplomové práci byly zkoumány alkaloidy stromu *Geissospermum vellosii* Allemão, pocházejícího z Jižní Ameriky. Jeho kůra se tradičně využívá zejména proti bolestem, horečkám, malárii a špatnému trávení. Později byly z kůry izolované alkaloidy, u kterých byly zjištěny zajímavé účinky (anticholinesterasové, protinádorové, protizánětlivé, antinociceptivní, antiplazmodiální, antileishmaniální a antivirotické). Cílem práce byla izolace alkaloidů z kůry stromu a určení jejich biologické aktivity vůči cholinesterásám. Inhibiční aktivita alkaloidů vůči acetylcholinesteráse a butyrylcholinesteráse je předpoklad pro účinek při terapii Alzheimerovy choroby. V dřívějších studiích tato aktivita již byla potvrzena u některých alkaloidů, pocházejících z kůry tohoto stromu [1] [2]. Díky tomu mohou alkaloidy s těmito účinky sloužit pro vývoj nových léčiv na Alzheimerovu chorobu.

Pracovalo se s frakcí GV-6, ze které byly alkaloidy izolovány pomocí chromatografických metod. Používalo se TLC, preparativní TLC, flash chromatografie, preparativní HPLC a GC-MS.

Při práci nedošlo ke konečnému získání čistého alkaloidu, u kterého by se mohla změřit jeho struktura pomocí NMR a jeho biologická aktivita. Příčinou nevyizolování čistého alkaloidu byl jeho rozklad.

Citovaná literatura

- [1] Lima, J. A., R. Costa, T. W., Da Fonseca, A. C. C., Do Amaral, R. F., Nascimento, M. D. D. S. B., Santos-Filho, O. A., ... Tinoco, L. W. (2020). Geissoschizoline, a promising alkaloid for Alzheimer's disease: Inhibition of human cholinesterases, anti-inflammatory effects and molecular docking. *Bioorganic Chemistry*, 104. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104215>
- [2] Huang, L.-K., Kuan, Y.-C., Lin, H.-W., & Hu, C.-J. (2023). Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease: A 2020–2023 update. *Journal of Biomedical Science*, 30(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s12929-023-00976-6>

9 ABSTRACT

Brtníková, T., Isolation of alkaloids of the species *Geissospermum vellosii* Allemão and study of their biological activity IX., Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of pharmacognosy and pharmaceutical botany, Hradec Králové 2024.

Key words: *Geissospermum vellosii*, bark, alkaloidal extracts, isolation of alkaloids, GC/MS analysis, biological activity, enzyme activity

In this thesis, the alkaloids from the tree *Geissospermum vellosii* Allemão, native to South America, were investigated. Its bark is traditionally used against pain, fever, malaria and digestive problems. Later, alkaloids isolated from the bark have shown interesting effects, including anticholinesterase, anticancer, anti-inflammatory, antinociceptive, antiplasmodial, antileishmanial, and antiviral effects. The aim of this work was to isolate alkaloids from the bark of the tree and determine their biological activity against cholinesterases. The inhibitory activity of alkaloids against acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase is a precondition for the effect in the therapy of Alzheimer's disease. In earlier studies, this activity was already confirmed for some alkaloids, originating from the bark of this tree [1] [2]. Thanks to this, alkaloids with these effects can be used for the development of new drugs for Alzheimer's disease.

We worked with the fraction GV-6, from which alkaloids were isolated using chromatographic methods. TLC, preparative TLC, flash chromatography, preparative HPLC and GC-MS were used.

During the work, we did not achieve a final pure alkaloid that could be analyzed for its structure using NMR and its biological activity. The reason for not isolating a pure alkaloid was its degradation.

Citovaná literatura

- [1] Lima, J. A., R. Costa, T. W., Da Fonseca, A. C. C., Do Amaral, R. F., Nascimento, M. D. D. S. B., Santos-Filho, O. A., ... Tinoco, L. W. (2020). Geissoschizoline, a promising alkaloid for Alzheimer's disease: Inhibition of human cholinesterases, anti-inflammatory effects and molecular docking. *Bioorganic Chemistry*, 104. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104215>
- [2] Huang, L.-K., Kuan, Y.-C., Lin, H.-W., & Hu, C.-J. (2023). Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease: A 2020–2023 update. *Journal of Biomedical Science*, 30(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s12929-023-00976-6>