

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Biologická aktivita obsahových látek rostlin XI.

**Alkaloidy *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Körte (Fumariaceae) a jejich
účinek na acetylcholinesterasu.**

Biological Activity of Plant Metabolites XI.

**Alkaloids of *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Körte (Fumariaceae) and
Their Activity on Acetylcholinesterase.**

Školitel: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Hradec Králové, 15. května 2009

Marek Sekula

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové, 15. května

Marek Sekula

.....

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat panu Doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za veškerou pomoc, trpělivost, cenné odborné rady, veškeré poskytnuté materiály a vedení během vypracování mé diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za provedení a pomoc s interpretací MS spekter a poznámky k NMR spektrům. Prof. RNDr. Janu Schramlovi, DrSc., Ing. Milanovi Kurfürstovi, Ph.D. z Ústavu chemických procesů AV ČR v Praze za změření NMR spekter a také Ing. Kateřině Macákové za pomoc se stanovením aktivity AChE a BuChE. Dále kolektivu katedry farmaceutické botaniky a ekologie za příjemné prostředí a pomoc při řešení technických a teoretických problémů. A také svým rodičům a kamarádům, kteří mi byli vždy oporou.

Marek Sekula

OBSAH

Obsah	1
1 Úvod	5
2 Cíl práce	8
3 Teoretická část	10
3.1 Dymnivka dutá, <i>Corydalis cava</i> (Fumariaceae)	11
3.1.1 Preferované jméno	11
3.1.2 Synonyma	11
3.1.3 Botanický popis	12
3.1.4 Ekologie	13
3.1.5 Celkové rozšíření	13
3.1.6 Rozšíření v ČR	13
3.2 Drogy získávané z <i>Corydalis cava</i>	14
3.2.1 <i>Corydalis cava</i> rhizoma (oddenek dymnivky duté)	14
3.3 Obsahové látky <i>Corydalis cava</i>	15
3.3.1 Alkaloidy	15
3.4 Biologické účinky hlavních obsahových látek	22
3.4.1 Biologická aktivita alkaloidů z <i>Corydalis cava</i> vůči AChE a BuChE	25
3.5 Využití v lidovém léčitelství a další oblasti využití	30
4 Experimentální část	32
4.1 Všeobecné postupy	33
4.1.1 Destilace a odpařování	33
4.1.2 Chromatografie	33
4.2 Materiál a vybavení	34
4.2.1 Rozpouštědla a chemikálie	34
4.2.2 Chemikálie a materiál ke stanovení účinku AChE a BuChE (IC ₅₀)	34
4.2.3 Přístroje	35
4.2.4 Detekční činidla	35
4.2.5 Chromatografické adsorbenty	36
4.2.6 Vytvářecí soustavy pro analytickou tenkovrstvou chromatografii	36
4.2.7 Vytvářecí soustavy pro preparativní tenkovrstvou chromatografii	36
4.3 Zpracování chloroformového výtřepku B z <i>Corydalis cava</i>	37
4.3.1 Původ drogy	37
4.3.2 Příprava a čištění výtřepku <i>Corydalis cava</i> /B/CHCl ₃	37
4.3.3 Sloupcová chromatografie výtřepku <i>Corydalis cava</i> /B/CHCl ₃	38
4.3.4 Zpracování spojených frakcí 7 a 8	40
4.3.5 Čištění podfrakce F ₂ na preparativní TLC	41
4.4 Určení struktury izolované látky	42
4.4.1 Měření hmotnostního spektra	42
4.4.2 Měření NMR spektra	42
4.5 Stanovení účinku alkaloidu na AChE a BuChE (IC ₅₀)	42
4.5.1 Podmínky měření	42
4.5.2 Stanovení IC ₅₀	42
4.5.3 Matematické zpracování experimentálních dat	43
5 Výsledky	44
5.1 Hmotnostní spektrum látky	45
5.2 NMR studie izolované látky	47

5.2.1	^1H NMR spektrum izolované látky.....	47
5.2.2	^{13}C NMR spektrum izolované látky.....	48
5.3	Výsledky testu vlivu izolované látky na aktivitu AChE a BuChE	50
6	Diskuse.....	52
7	Seznam literatury	54

Zkratky

ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
ADP	Adenosindifosfát
AFM	Atomová silová mikroskopie
BMC	Bikukulin methylchlorid
BuChE	Butyrylcholinesterasa
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	Kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová
FS	Silová spektra
GABA	Kyselina γ -aminomáselná
Ch	Cholin
MAO	Monoaminoxidasa
PAF	Destičky aktivující faktor
THP	Tetrahydropalmitin
TLC	Tenkvrstvá chromatografie

1 ÚVOD

V současné době stále přetrvává snaha vyvíjet nová účinnější a bezpečnější léčiva jak přírodního, tak chemického původu. V průběhu staletí došlo k obrovskému rozvoji nejen pracovní techniky a lidského poznání o přírodě, ale došlo také ke zvýšení morální odpovědnosti za udržení lidského zdraví a života vůbec. Způsoby, jak získávat nová léčiva, se vyvíjely v lidské společnosti podobně jako výroba různých materiálních statků - v závislosti na postupném a nezbytném přizpůsobování okolní přírody lidským potřebám.¹

První stadium vývoje léčiv je charakteristické používáním přírodních surovin. Léčebné efekty nebo naopak toxicita těchto látek, byly objevovány hlavně v souvislosti s obstaráváním potravy rostlinného, později i živočišného původu. Tímto empirickým způsobem objevilo lidstvo mnoho surovin, jako např. opium, chinovníková kůra, koka, kurare, které se později staly základem pro vývoj moderních léčiv. Výhradní používání přírodních látek a nahodilost jejich výběru vyplývaly z nízkého stavu pracovní techniky a málo rozvinutých znalostí o přírodě. V průběhu doby přibývalo nových léčiv jen pozvolna, přírodní suroviny zůstávaly jejich výhradním zdrojem.¹

Druhé stadium vývoje léčiv bylo charakteristické izolací chemických individuů z přírodních surovin. Z organických látek je to např. kyselina vinná, alkaloidy morfin, kofein, chinin a četné další¹. Tyto izolované látky z přírodních surovin se pak také často staly předlohou pro pozdější syntézy modelových látek, které vytvářejí celé farmakoterapeutické skupiny léčiv.

Nejvydatnější zdroj chemických léčiv byl odhalen teprve v možnosti syntézy organických látek. Vznik a rozvoj syntézy chemických organických léčiv patří do třetího stadia vývoje léčiv. Vliv objevu syntézy se ovšem projevil pozvolna, a to nejprve přípravou jednodušších látek, které nemají předlohy v přírodě - např. chloroformu. Později umožnila chemická syntéza i reprodukci látek složitější struktury, poznaných zprvu jen jako produkty izolace z přírodního materiálu např. alkaloidy, vitaminy, hormony aj. Přispěl k tomu především vliv nových laboratorních i výrobních technik během 20. století, které změnily původní manuální charakter chemické práce na práci strojovou. Byly zavedeny vysoce účinné rozdělovací techniky, např. mnohopatrové kolony, protiproudová extrakce, vakuová a tlaková technika, různé chromatografické techniky, apod. Rovněž kontrola čistoty získaných preparátů je stále citlivější,

přesnější, rychlejší a objektivnější vlivem nových analytických postupů, jako je analýza spektrální, polarografická, chromatografie plynová, kapalinová, na tenkých vrstvách apod., z nichž se mnohé rovněž automatizují, popř. kombinují.¹

Ačkoli v dnešní době převládá vývoj syntetických chemických léčiv, tak izolace obsahových látek z rostlin a jejich využití v terapii je stále otevřená kapitola, protože prozatím byla prozkoumána jen malá část rostlinné říše. Používání fytofarmak, především jako doplňkového léčiva, neustále narůstá. Některé izolované látky, jejichž účinnost (biologická aktivita) byla shledána jakou žádoucí, se staly dokonce vzorem i pro jejich syntézu, popř. byla provedena modifikace pro zlepšení jejich vlastností či posílení účinku a byly vyrobeny jejich modifikované deriváty. S narůstajícím výzkumem a hledáním v bohaté rostlinné říši, se stále rozšiřuje spektrum dalších potenciálních léčiv z rostlin.²

V současné době se řada vědců zabývá výzkumem a hledáním rostlinných látek ovlivňujících osud acetylcholinu a enzymů úzce s ním spojeným, acetylcholinesterasou a butyrylcholinesterasou. Existuje úzká souvislost mezi velmi závažnou Alzheimerovou chorobou a aktivitou acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy. Alzheimerova choroba je v současnosti dosud nevléčitelný neuropatologický stav, u kterého nastává progresivní poškození kognitivních funkcí, obvykle provázené poruchami chování. Základním patologickým obrazem je degenerativní proces, charakterizovaný ztrátou buněk v určité oblasti mozku. Bylo zjištěno, že mozek pacientů trpících Alzheimerovou chorobou obsahuje značně snížený obsah acetylcholinu a ostatních neurotransmiterů. Na základě tohoto zjištění byla navržena hypotéza, že látky omezující aktivitu acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy je možno potencionálně využít pro efektivní terapii této závažné choroby. Tuto hypotézu podporuje skutečnost, že jeden z neznámějších selektivních a reverzibilních inhibitorů acetylcholinesterasy (galanthamin) již byl úspěšně použit v lékařské praxi. Vedle tohoto nejlépe prozkoumaného inhibitoru acetylcholinesterasy byla již objevena také celá řada dalších inhibitorů s podobnými účinky.³

Rod *Corydalis* je zajímavý z hlediska ovlivňování kognitivních funkcí a proto je v současné době věnována pozornost i čistým alkaloidům z *Corydalis cava*.⁴

2 CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo:

1. Provést preparativní sloupcovou chromatografií výtřepku B, získaného vytřepáním upraveného základního vodného extraktu při pH 12, z něhož byly předem odstraněny terciární alkaloidy při pH ~ 9-10.
2. Získání minimálně jedné látky v čistém stavu, určení jejích základních fyzikálně-chemických charakteristik.
3. Podílet se na stanovení inhibiční aktivity vůči lidské erytrocytární acetylcholinesterase a lidské sérové butyrylcholinesterase (stanovení IC_{50}).

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Dymnivka dutá, *Corydalis cava* (Fumariaceae)

3.1.1 Preferované jméno

Corydalis cava (L.) Schweigg. & Körte (1811).⁵

3.1.2 Synonyma

Fumaria cava (L.) Miller (1768), *Fumaria bulbosa* (L.), (1753) subsp. *cava* (L.) Ehrh.(1780), *Capnoides cava* (L.) Moench (1794), *Pistolochia cava* (L.) Bernh. (1800), *Capnites cava* (L.) Dumort. (1829), *Corydalis bulbosa* subsp. *cava* (L.) Bonnier & Layens (1894).⁵

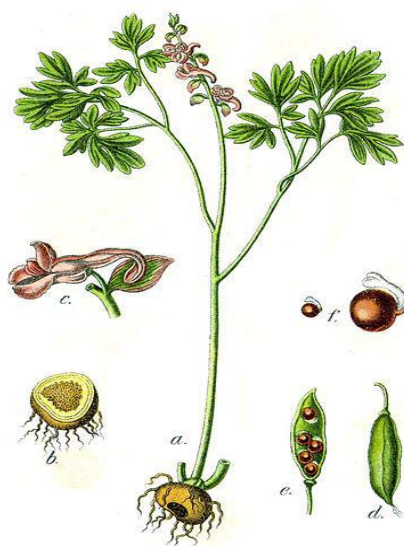


Obr. 1: *Corydalis cava* (Gábor Kurucz ©)⁶

3.1.3 Botanický popis

Vytrvalá bylina dorůstající výšky 10-30 cm. Z velké a duté podzemní hlízy vyrůstá lysá přímá lodyha, která není pokrytá šupinami. Ta u většiny druhů začátkem léta usychá a rostlina přečkává zbytek vegetačního období pod zemí. Silná lodyha nese pouze dva listy, které mají sivozelenou barvu. Vyrůstají na krátkých řapících, v obrysu mají tvar široce trojboký. Listy jsou 2 × trojčetné. Lístky mají v obrysu tvar klínovitě obvejčitý, jsou nepravidelně laločnaté, někdy až dělené do zašpičatělých podlouhlých úkrojků. Oboupohlavné souměrné květy, které vyrůstají v úžlabí celokrajných a vejčitých listenů, se skládají do přímého a bohatého hroznu. Šupinkatý kalich je tvořen dvěma volnými lístky, je prchavý. Koruna je tvořena čtyřmi plátky. Vnější horní plátek se protahuje v ostruhu, ale vnější dolní plátek se na vzniku ostruhy nepodílí. Dva vnitřní plátky mají podlouhlý tvar, v přední části jsou černé. Barva koruny bývá růžová se šedým nádechem nebo žlutavě bílá. Ostruha je dlouhá, na konci dolů ohnutá. Celý květ i s ostruhou pak měří 18-28 mm. V květech se nacházejí pouze dvě tyčinky, svrchní semeník srůstá ze dvou plodolistů.⁷

Plodem je podlouhlá jednopouzdrá tobolka o velikosti až 25 mm s dvěma chlopněmi. Semena jsou černá lesklá s velkým bělavým masitým přívěškem. Semena tohoto druhu jsou myrmekochorní.⁸ Rostlina kvete od března do května, je mrazuvzdorná⁸ a má ostře hořkou chuť.⁷



Obr. 2: Dymnivka dutá⁹

3.1.4 Ekologie

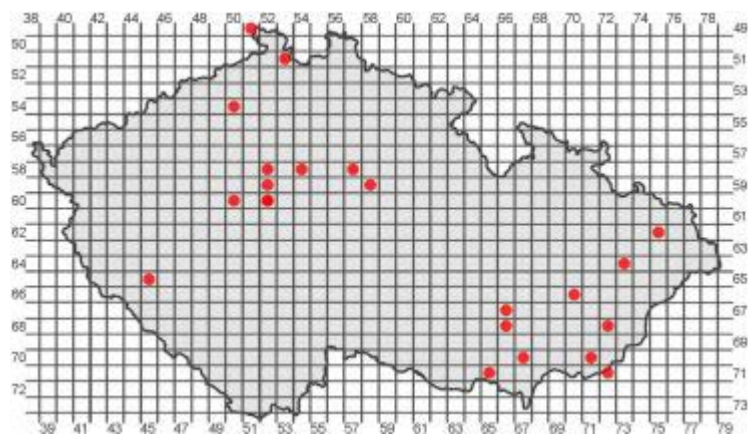
Dymnivku dutou najdeme v křovinách,⁷ ve světlých listnatých lesích a lužních hájích,¹⁰ někdy i na loukách. Roste na vlhčích, humózních, na minerály bohatších, kyprých půdách a to jak v nížinách, tak i v podhůří. Přednost dává teplejším stanovištím.⁷

3.1.5 Celkové rozšíření

Rostlina je rozšířená od nížin do podhůří.⁷ Dymnivka pochází nejčastěji z mírného pásu severní polokoule, především ze severovýchodní Asie.⁸ Vyskytuje se také v Evropě, ale především v Evropě střední. Zavlečená byla do Švédska, Dánska a Anglie.⁷ Na východ a jihovýchod se vyskytuje po povodí Donu a pohoří Kavkaz.⁶ Některé druhy rostou také v oblasti Středozemního moře.⁸

3.1.6 Rozšíření v ČR

Na území České republiky roste hojně.⁷ V termofytiku a teplejších částech mezofytika se nachází obecně. Nejčastěji roste v jižní polovině Čech, ale též v západních Čechách a na jihozápadní a severní Moravě. V oreofytiku roste jen vzácně a většinou jen v nižších polohách.⁶



Obr. 3: Lokality výskytu *Corydalis cava* v ČR¹¹

3.2 Drogy získávané z *Corydalis cava*

3.2.1 *Corydalis cavae* rhizoma (oddenek dymnivky duté)

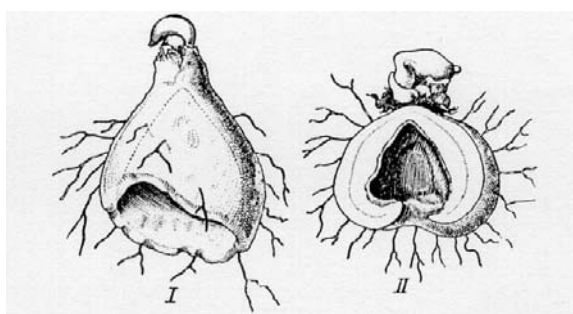
■ **Synonymum:** Aristolochiae cavae radix; Aristolochiae cavae tubera; Radix Corydalis cavae; Rhizoma Aristolochiae cavae; Rhizoma Corydalis; Tubera Aristolochiae cavae.¹²

■ Drogu získáme sběrem v období vegetačního klidu, používají se však také čerstvé oddenky sbírané v období před rozkvetem,¹³ očistí se a rychle ve stínu usuší, umělá teplota při sušení nesmí být vyšší než 40 °C.¹⁴

■ **Makroskopie:** je to sušená kořenová hlíza, hlízy jsou kuželovité až nepravidelně-laločnaté, šedohnědé, nahoře se zbytky stonku, dolní konec s dovnitř zahnutou dutinou opatřené hladkou obrubou, jakoby zalomenou rovinou zelenožluté barvy.¹²

■ Rostlina *Corydalis cava* je jediným známým druhem s hlízou, kde nové pletivo každoročně narůstá vně a staré centrální částí uhnívají, tzn. že hlíza se stává expandující sférou. Tyto růstové charaktery způsobují energetické problémy starším rostlinám. Nicméně, starší hlízy mění svůj tvar způsobem, kterým uchovávají biomasu. Největší hlíza ve studii na záhonu měla objem 60 ml. Kdyby takováto hlíza zachovávala tvar přesné koule, její doba „života“ by byla odhadována na 8 roků. Ve skutečnosti se čtyřleté hlízy stávají dutými a později otevírají svojí bazální část. Navíc, hlízy starší 7 let přecházejí do kónického tvaru. Stáří kónické hlízy s objemem 60ml bylo nakonec odhadnuto na 16 let. Objem a tvar hlízy tudíž může napovídat na stáří jednotlivých rostlin.¹⁵

■ Droga omamně páchne a má ostrou hořkou chuť.¹⁴



Obr. 4: *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Körte –hlíza (Jitka Klimešová a Leoš Klimeš ©)¹⁶

3.3 Obsahové látky *Corydalis cava*

3.3.1 Alkaloidy

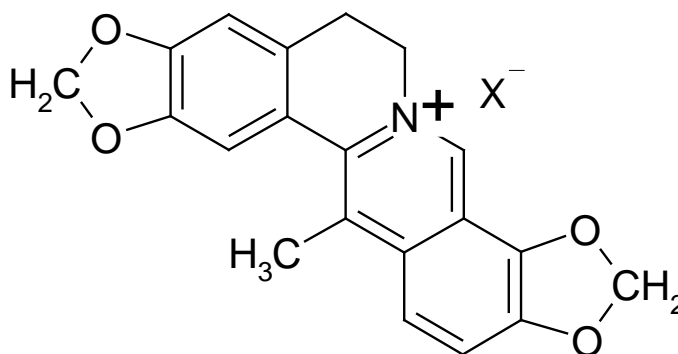
Alkaloidy jsou hlavní obsahovou látkou *Corydalis cava*. Přítomnost alkaloidů v rodu *Corydalis* je velmi dobře zdokumentovaná. Je zajímavé, že můžeme u stejného druhu dymnivky identifikovat jiné alkaloidy v hlíze než v zelené části rostliny. V této rostlině bylo doposud izolováno a strukturně popsáno více než třicet alkaloidů isochinolinového typu. Velkou mírou se k tomuto výsledku přičinil svým výzkumem v 70. a 80. letech minulého století český vědec J. Slavík.

3.3.1.1 Alkaloidy *Corydalis cava* podle chemické struktury

Alkaloidy identifikované v *Corydalis cava* můžeme rozdělit do 3 základních skupin:

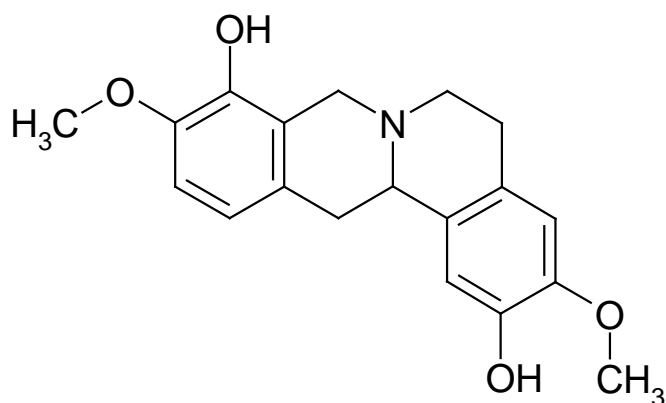
a) protoberberinový typ

- tyto alkaloidy jsou zde zastoupeny :**protoberberiny** (např. dehydrokorydalin)



dehydrokorydalin

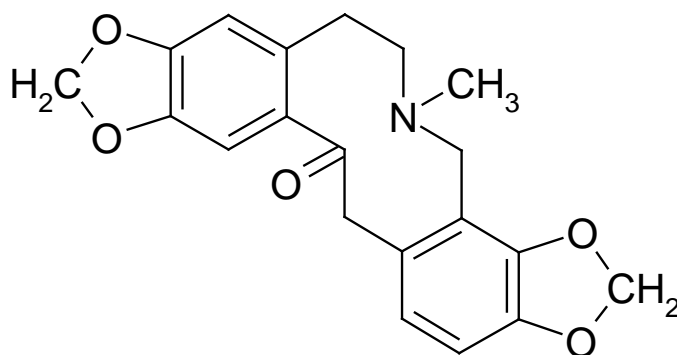
tetrahydroprotoberberiny (např. skulerin)



skulerin

b) protopinový typ

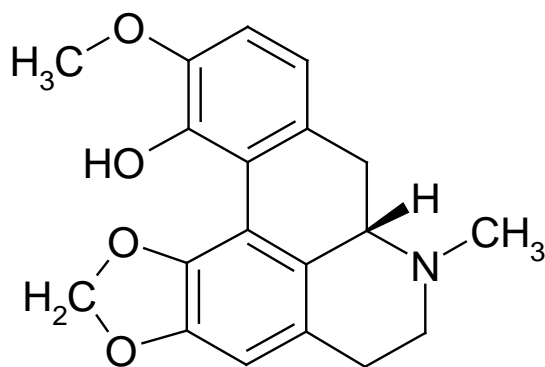
- hlavním představitelem je zde protopin, který patří k nejrozšířenějším alkaloidům v rostlinách, zejména v čeledi makovité (Papaveraceae).¹⁷



Protopin

c) aporfinový typ

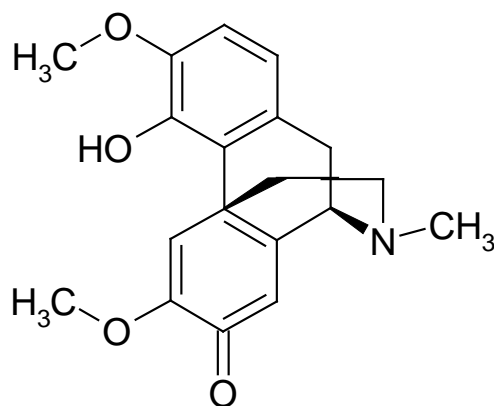
- nejvýznamnější alkaloid této skupiny v *Corydalis cava* je bulbokapnin



Bulbokapnin

d) morfinanový typ

- do této skupiny patří salutaridin (sinoakutin)¹⁸



Salutaridin

Extrakce alkaloidů z *Corydalis cava* byly doposud prováděny různými metodami. Na způsobu extrakce závisí množství účinných látek přecházejících do extraktu. Záleží na zvoleném rozpouštědle i způsobu přípravy. Mezi tradiční lidové způsoby patří příprava čajů, tinktur a odvarů.¹⁹ Komerčně a také ve vědě se však v drtivé většině používá extrakce alkaloidů různými organickými rozpouštědly. V dosud provedených experimentech s *Corydalis cava* byly ke klasické extrakci perkolací použity rozpouštědla ethanol nebo methanol a pro extrakci v ultrazvukové lázni byly použity rozpouštědla voda a methanol v poměru 1:3 anebo čistý methanol. Těmito způsoby byl získán sumární extrakt, ze kterého se pak vhodnou úpravou pH získaly jednotlivé výtřepky podle stoupající pKa.

Následná izolace kvarterních a terciárních alkaloidů z rostlinného extraktu *Corydalis cava* se provádí sloupcovou chromatografií na silikagelu nebo neutrálním oxidu hlinitém za použití gradientové eluce. Krystalizací chloroformem a ethanolem nebo preparativní TLC byly získány čisté isochinolinové alkaloidy.

Distribuce alkaloidů v rostlině je nerovnoměrné. Vyskytují se sice v celé rostlině, ale největší množství je nakumulováno v hlízách. Obsah alkaloidů kolísá podle životního cyklu rostliny a také podle jejích životních podmínek.¹⁴ Výzkumem, který prováděl J. Slavík na *Corydalis cava* pocházející z oblasti Jižní Moravy, byl zjištěn obsah alkaloidů v nadzemní části rostliny (0,46% a 0,84%) a v hlízách (4,82% a 4,21%).²⁰

Tab. 1: Alkaloidy izolované z *Corydalis cava* Schweigg. & Körte²⁰

	Strukturní typ	Alkaloidy
Alkaloidy <i>Corydalis cava</i>	protoberberinový	Terciární alkaloidy Korydalin Korybulbin Korypalmin Isokorypalmin Kanadin Skulerin Stylopin Kapnoidin Tetrahydropalmatin Thaliktrikavin Apokavidin Kvarterní alkaloidy Koptisin Dehydrokorydalin Korysamin Jatrorrhizin Kolumbamin Berberin
	protopinový	Terciární alkaloidy Protopin (Fumarin) Korycavamin (Korykavin) Korycavidin Allokryptopin
	aporphinový	Terciární alkaloidy Bulbokapnin Isokorydin Korytuberin Kvarterní alkaloidy Magnoflorin
	morphinanový	Terciární alkaloid Salutaridin (Sinoakutin)

3.3.1.2 Alkaloidy hlíz

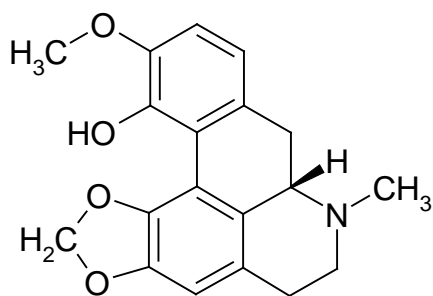
Hlízy této rostliny představují velmi bohatý zdroj směsi alkaloidů, ze které jich bylo doposud izolováno a popsáno více než 30.²⁰ Obsah isochinolinových alkaloidů v hlízách se pohybuje mezi 4-6 %.⁹ Nejvhodnější období pro sběr této drogy je doba vegetačního klidu.¹⁴

Hlavními terciárními alkaloidy hlíz jsou **bulbokapnin** (1,20-1,67%), **korydalin** (0,10-0,57%), **tetrahydropalmatin** (0,23-0,46%) a **korykavin** (0,10-0,20%). Použitím chromatografie

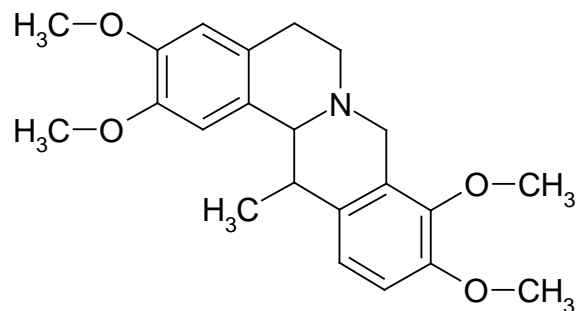
na oxidu hlinitém a přímé krystalizace se podařilo J. Slavíkovi a L. Slavíkové také získat menší množství dalších alkaloidů jako thaliktrikavin, korybulbin, korypalmin, korykavidin, korydin, kanadin, stylopin a kapnoidin. Kromě toho se jim podařilo z hlíz také izolovat protopin, známý tehdy svým výskytem pouze v nadzemních částech rostlin. Jako prvním se podařilo J. Slavíkovi izolovat z *Corydalis cava* allokryptopin a tetrahydrokorysamin.²⁰

Mezi hlavní kvartérní nefenolické alkaloidy, které se nachází v hlízách, patří **dehydrokorydalin a dehydrothaliktrikavin**. V malém množství zde najdeme také korysamin, palmatin, berberin a koptisin. Tyto poslední čtyři jmenované alkaloidy, ve formě chloridů, jako první vyizoloval z hlíz *Corydalis cava* J. Slavík.²⁰

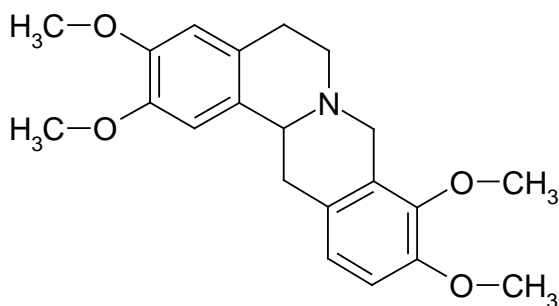
Výše zmíněné alkaloidy byly analyzovány a identifikovány pomocí IČ a UV spekter, základních fyzikálních vlastností (bodu tání) a R_f hodnot. Získaná data byly porovnávány se standardními vzorky a odbornými publikacemi.²⁰



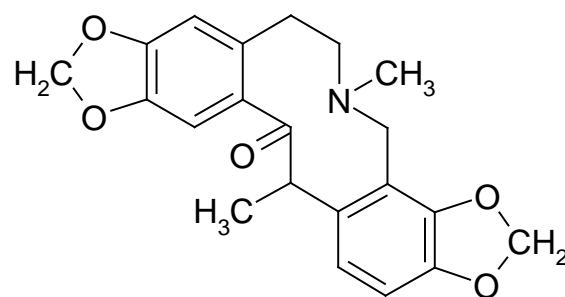
Bulbokapnin



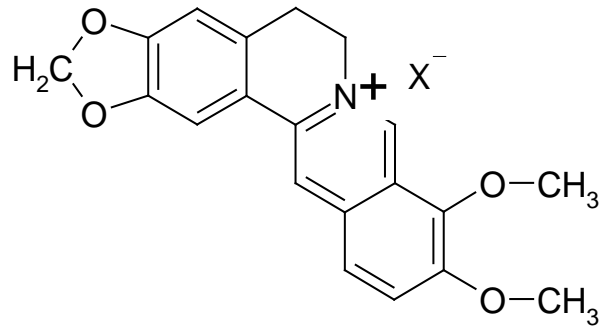
Korydalin



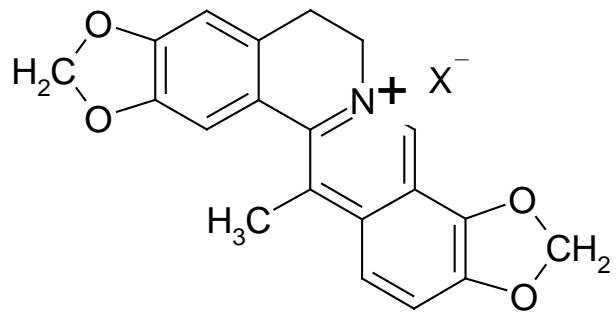
Tetrahydropalmatin



Korykavin



Berberin

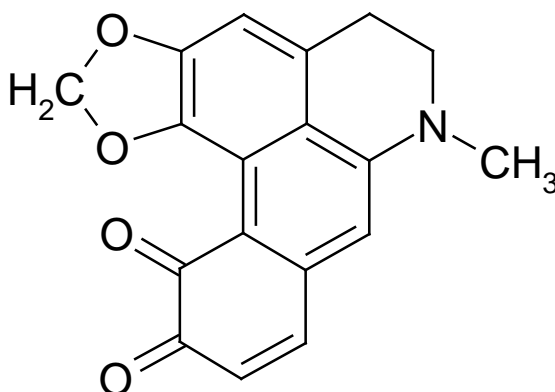


Koptisin

3.3.1.3 Alkaloidy nati

Alkaloidy se v nadzemní části rostliny nacházejí v menším množství. Obsah alkaloidů se pohybuje v rozmezí (0,5 - 1,5 %). Kvalitativně je jejich složení téměř stejné jako spektrum alkaloidů v hlízách. Nalezneme zde bulbokapnin, protopin, stylopin, kapnoidin, isoboldin, koptisin, korysamin. Kromě toho zde bylo objeveno malé množství glaucinu, korydinu, domestinu a predicentrinu.²⁰

V nadzemních částech rostliny, stejně jako v hlízách, můžeme vypořizovat přítomnost 1,2-methylendioxy-6a,7-dehydroaporphin-10,11-chinon, který byl izolován z nadzemních částí *Corydalis cava*. Tato modře zbarvená sloučenina je prokazatelně výsledkem oxidace, způsobené vzdušným kyslíkem.²⁰



1,2-methylendioxy-6a,7-dehydroaporphin-10,11-chinon

3.4 Biologické účinky hlavních obsahových látek

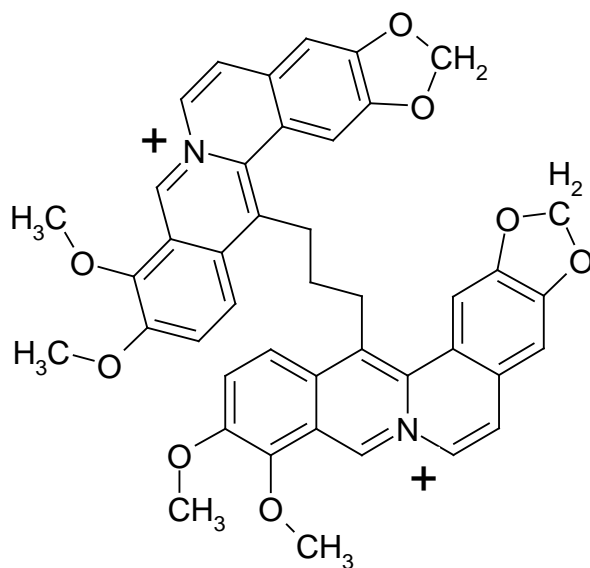
Dymnivka dutá je rostlinou jedovatou. Obsahuje řadu alkaloidů, které mají poměrně silný vliv na nervovou soustavu, některé alkaloidy mohou způsobit ochrnutí míchy, jiné dráždí motorická centra a ovlivňují mozkovou činnost. Celá řada alkaloidů *Corydalis cava* byla podrobena různým farmakologickým studiím.

Toxické účinky: Efekty celkového toxického působení na organismy teplokrevných živočichů byly prováděny s níže uvedenými alkaloidy: bulbokapnin, korydalin, korybulbin, isokorybulbin, korydin, korytuberin, korykavamin. Bulbokapnin vyvolává narkózu, které nejdříve předchází podráždění míchy. U teplokrevných živočichů se to nejčastěji projevuje zvýšením slzení a slinění, katalepsií (stav strnulosti) a ovlivněním funkcí jak samovolných tak reflektorických pohybů. Svalový tonus zůstává zachován. Poté následuje celková obrna míchy, zpomalené dýchání a oslabení všech reakčních schopností srdce vedoucí až k diastolické zástavě. Podle provedených testů bylo zjištěno, že se účinky bulbokapninu stupňují u zvířat, např. opic, od prostého spánku přes katalepsií až po silné křeče.²¹

Korydalin má podobný, ale slabší účinek než bulbokapnin. Teplokrevní živočichové jsou i po velkých dávkách pouze slabě omámení a dýchání není ovlivněno vůbec. Korybulbin a isokorybulbin působí podobně jako korydalin. Účinek korydinu se u teplokrevných živočichů projevuje salivací, nadměrnou strnulostí a ztuhlostí, zpomalením dechu a nakonec zástavou dýchání stupňovanou poklesem tlaku a zpomalením pulzu. Korytuberin vyvolává u teplokrevných živočichů salivaci, dávení a křeče. Poté následuje smrt, která je většinou způsobená útlumem dechu. Korykavamin způsobuje tonicko-klonické křeče, zvýšenou salivaci, slzení a pokles krevního tlaku. Na srdce působí korykavamin stejně jako korydin, avšak silněji.²²

Cytotoxický účinek: Důležitou skupinou alkaloidů nacházejících se v *Corydalis cava* je skupina isocholinových alkaloidů - protoberberiny. Kvartérní protoberberinové alkaloidy a některé jejich příbuzné sloučeniny vykazují značnou biologickou aktivitu a mohly by sloužit v budoucnu jako základ různých terapeuticky účinných látek. Některé publikované studie

ukazují, že kvartérní protoberberiny interagují s nukleovými kyselinami (převážně mechanismem interkalace, nebo vmezeřením do malého žlábků DNA). Z tohoto důvodu je věnována pozornost jejich cytotoxicitě a potenciální genotoxicitě. Výše uvedené účinky jsou zřejmě způsobeny inhibicí syntézy DNA, biosyntézy bílkovin, inhibicí membránové permeability a blokadou oxidativní fosforylace. K těmto poznatkům přispěly hlavně toxické projevy pozorované na bakteriích, houbách, hmyzu a jiných rostlinách. Objevení interakce s DNA a inhibice reverzní transkripce, může být významná hlavně v souvislosti s inhibicí virů. Cytotoxická aktivita byla protoberberinům připsána na základě jejich toxického účinku na Topoisomerasu-I a Topoisomerasu-II. Studie zabývající se modifikací struktury a následnou změnou biologické aktivity u protoberberinových alkaloidů ukázaly, že na uhlíku C-9 je důležité místo určující biologickou aktivitu. Studie dvou kondenzovaných berberinů spojených různě dlouhými uhlíkovými řetězci prokázaly nejvyšší afinitu k DNA u kondenzátu, který byl propojen propylovým řetězcem (viz. obrázek).²³

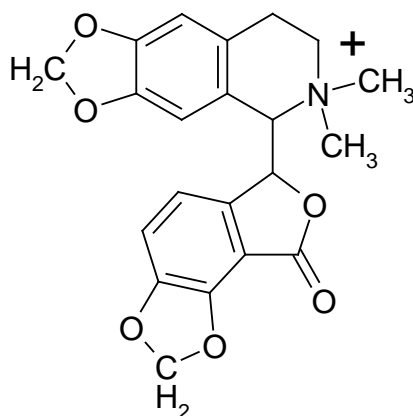


U samotného berberinu byl ve farmakologických studiích popsán také účinek protizánětlivý a výrazná antimalarická aktivita proti *Plasmodium falciparum*. Zato jiný protoberberinový alkaloid - jatrorrhizin by mohl v budoucnu posloužit jako přední složka pro výzkum usilující o vývoj antimykotických látek s vysokou antifungální aktivitou a nízkou toxicitou pro hostitelský organizmus.²³

Účinky na CNS a metabolismus neuromediátorů: V odborných publikacích můžeme nalézt také studie, které se zabývaly kombinací extraktů *Corydalis cava* a *Eschscholtzia californica* a efektem jejich působení na CNS. První z nich zkoumala vliv na endorfiny a enkefaliny. Endorfiny a enkefaliny jsou látky peptidové povahy, které jsou všeobecně známé jako endogenní peptidy. Tyto látky jsou u lidí považovány za hlavní fyziologické modulátory bolesti. Tyto endogenní látky se vážou na opiátové receptory a tlumí tím vnímání bolesti. Zajímavé je, že právě výtažky z *Corydalis* a *Eschscholtzie* prokazatelně zpomalují procesy degradace těchto endogenních peptidů. Tento efekt tedy prodlužuje funkční aktivitu těchto peptidů, čímž se prodlužuje efekt jejich působení. Ve studii této aktivity bylo zjištěno, že extrakt z *Corydalis* má větší vliv na inhibici degradace endogenních peptidů nežli extrakt *Eschscholtzie*.²⁴

Kromě inhibičního efektu na degradaci endogenních peptidů, byl u výše zmíněných rostlin prokázán i aditivní účinek obou bylin na udržení zvýšené hladiny katecholaminů v mozku. Studie uvádí, že extrakt *Corydalis cava* spolu s extraktem z *Eschscholtzia californica*, inhibují oxidativní degradaci katecholaminů. Extrakt z *Corydalis* má desetkrát větší aktivitu nežli extrakt *Eschscholtzie*. Extrakt z *Eschscholtzie* rovněž inhibuje monoaminoxidasu (MAO-B). Výsledky této studie mohou být interpretovány jako společná činnost dvou rostlinných preparátů pro udržení a ochránění vysoké hladiny katecholaminů, což vysvětluje jejich sedativní, antidepresivní a hypnotickou aktivitu.²⁵

Protoberberinové alkaloidy hlíz *Corydalis cava* byly také zkoušeny s ohledem na jejich účinek na GABA_A receptor. Zatímco terciární protoberberinové alkaloidy zahrnující mezi jinými isoapokavidin, korydalin, tetrahydropalmin, skoulerin a isokorypalmin zvyšovaly specifickou afinitu [³H]bikukulin methylchloridu (BMC - GABA_A antagonist) ke GABA_A receptoru v rozsahu 21-49 %, tak kvarterní protoberberinové alkaloidy zahrnující mimo jiné palmin, koptisin, dehydroapokavidin a dehydrokorydalin žádný účinek na změnu afinity BMC ke GABA_A receptoru neměly.²⁶



bikukulin methylchlorid

Antiagregační aktivita: Jedna z vědeckých studií byla pro změnu zaměřena na zjištění biologické aktivity protopinu, respektive mechanismu jeho antiagregačního působení. Bylo zjištěno, že protopin inhibuje agregaci krevních destiček, která je fyziologicky vyvolávána působením ADP, arachidonové kyseliny, PAF a kolagenu. Ačkoli je proces agregace krevních destiček ovlivňován hlavně trombinem, který protopinem inhibován nebyl, tak proces agregace byl zčásti potlačen. Bylo to způsobeno inhibiční aktivitou protopinu na účinky tromboxanu B₂. Protopin inhiboval taktéž intracelulární uvolňování vápníku způsobeného arachidonovou kyselinou. Studií bylo tedy zjištěno, že antiagregační efekt protopinu je tedy způsobený inhibicí tromboxanu B₂ a také následným snížením intracelulární koncentrace vápníku.²⁷

3.4.1 Biologická aktivita alkaloidů z *Corydalis cava* vůči AChE a BuChE

3.4.1.1 Acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa a jejich inhibice

Acetylcholinesterasa (AChE) je vysoce specifický a výkonný enzym vyskytující se především v cholinergních neuronech a v okolí cholinergních synapsí (ve vysokých koncentracích se nachází na nervosvalovém spojení). Hydrolyzuje zejména acetylcholin, uvolněný nervovou stimulací do synaptické štěrbiny a uvnitř nervových zakončení zodpovídá za rozklad cytoplazmatického acetylcholinu na cholin a acetát. Jeho

inhibicí, ať už reverzibilní nebo ireverzibilní, dochází k nahromadění ACh na muskarinových respektive nikotinových receptorech a tím k jejich hyperstimulaci.²⁸

Je několik různých forem acetylcholinesteras. V mozku zdravého člověka převládá tetramerní G4 forma a pouze minoritní je forma monomerní G1. U Alzheimerovy choroby vzrůstá podíl formy G1 a klesá podíl G4.²⁹

Důležitou částí AChE, která napomáhá při štěpení ACh, je anionické centrum. ACh se váže k anionickému centru enzymu kvartérním dusíkem a poté je rozložen deprotonovaným hydroxylem aminokyseliny serinu esteratického centra. Strukturně podobné látky obsahující kvartérní dusík, vykazují rovněž zvýšenou afinitu k AChE. Jejich navázáním k enzymu dochází k reverzibilní, nejčastěji kompetitivní inhibici enzymu.³⁰

Inhibitory AChE jsou v současnosti užívány jako pesticidy (parathion, malathion), léčiva Alzheimerovy choroby (takrin, donepezil, rivastigmin, galantamin), k léčbě myastenia gravis (neostigmin, pyridostigmin), k premedikaci před otravou nervově paralytickými látkami (SAD-128) či v oftalmologii.³¹

Butyrylcholinesterasa (též pseudocholinesterasa, BuChE) je substrátově méně specifický enzym, který přednostně rozkládá jiné substráty než acetylcholin (např. butyrylcholin, prokain, suxamethonium apod.). Je přítomna např. v plazmě, játrech a pouze v omezeném rozsahu v neuronech periferního a centrálního nervového systému.²⁹

Za posledních několik let znalosti o struktuře, vlastnostech či mechanismu inhibice a reaktivace AChE a BuChE, značně pokročily. Rychlý vývoj výkonných počítačů a nových metod teoretické chemie, umožnil studovat chování látek bez toho, aby se uskutečnil jediný experiment.³²

V současnosti je dostupné velké množství softwarových systémů, s jejichž pomocí je možné objasnit jednotlivé detaily chemických reakcí, vypočítat vlastnosti látek či studovat interakci potencionálních léčiv s receptory nebo jinými makromolekulami.³¹

3.4.1.2 Metody studia aktivity rostlinných látek na AChE a BuChE

TLC

Pro screening inhibitorů AChE a BuChE z rostlinných extraktů byla vyvinuta jednoduchá a rychlá bioautografická enzymová zkouška na TLC deskách. Enzymová aktivita byla detekována přeměnou 1-naftyl-acetátu na naftol, která byla doprovázena odpovídající barevnou reakcí fialového diazonia s Fast Blue B solí. Inhibitory cholinesteras zanechávaly bílé zóny na světle fialovém pozadí TLC desek. Jako detektory citlivosti reakce byly použity známé inhibitory AChE alkaloidy galanthamin a fysostigmin.³³

Silová spektra (FS) a mikroskopie atomárních sil (AFM)

Mikroskopie AFM je založena na mapování rozložení atomárních sil na povrchu vzorku. Tyto síly jsou mapovány těsným přiblížením hrotu k povrchu, čímž vzniká přitažlivá nebo odpudivá síla, která způsobí ohnutí nosníku, na němž je upevněn hrot. Toto ohnutí je snímáno citlivým, zpravidla laserovým snímačem a vytváří měronosnou veličinu. Zřejmou výhodou této metody je možnost studovat jak nevodivé, tak i vodivé vzorky.³⁴

FS mezi molekulami AChE a jejím přirozeným substrátem ACh a vliv inhibitorů a reaktivátorů AChE byly zkoumány AFM na molekulární úrovni v reálném čase. AChE a ACh byly kovalentně navázány na pozlacený povrch slídy a špičku (Si_3N_4) atomového silového mikroskopu. Nejprve byla AChE nahrána do obrazového módu AFM a jedna z molekul AChE byla vybrána jako centrum skeningu. Poté byl skenovací mód změněn v silový skenovací mód a FS zaznamenáno při frekvenci $5 \times \text{s}^{-1}$. Roztoky léčivých nebo toxických látek mohou být injektovány v jakýkoli požadovaný čas. FS mezi ideálně navázanou normální, inhibovanou nebo starší AChE a ACh mělo každé své vlastní tvarové rysy. Vliv léčivých nebo toxických látek na tyto rysy být sledovány v reálném čase.³⁵

Měřením FS založeném na obrazu molekul AChE bylo zjištěno, že přitažlivé intermolekulární síly mezi individuálními molekulovými páry ACh a AChE jsou (10 ± 1) pN dokud se konec ACh s kvartérním N (tedy cholinový konec) nestřetne s negativním koncem AChE a vzdálenost, kdy dochází k rozpadu sil je (4 ± 1) nm od povrchu AChE. Adhezivní

síly mezi individuálními molekulovými páry ACh a AChE jsou (25 ± 2) pN. Jejich rozkladné vlastnosti jsou popisovány jako fast-slow-fast. Přitažlivé síly mezi AChE a Ch jsou totožné jako ty mezi AChE a ACh. Adhezivní síly jsou pak o něco slabší. Z výsledků vyplývá, že AChE má řídicí úlohu pro difúzi ACh a brání odcházení Ch klasickou cestou.³⁶

Výsledky tedy ukazují, že AFM může být použita jako nová metoda studia efektu léčivých a toxických látek – tedy i obsahových látek z *Corydalis cava* – na aktivitu enzymu z hlediska farmakologie a toxikologie.³⁵

3.4.1.3 Inhibice AChE a BuChE alkaloidy z *Corydalis cava*

Ve studii, která byla zaměřena na zjištění biologické aktivity některých alkaloidů *Corydalis cava* byly izolovány a zkoušeny následující benzylochinolinové alkaloidy: bulbokapnin, korydalin a korydin. Bulbokapnin a korydin patří mezi isochinolinové alkaloidy s aporfínovým typem skeletu a korydalin do skupiny tetrahydroberberinů. Izolované alkaloidy byly testovány na jejich inhibiční aktivitu vůči AChE a BuChE. Výsledky inhibiční aktivity jednotlivých alkaloidů jsou shrnuty v tabulce 3.³⁷

Tab. 2: In vitro aktivita na AChE a BuChE

alkaloidy	IC ₅₀ (10 ⁻⁶ M) ^a	
	AChE	BuChE
bulbokapnin	40 ± 2	83 ± 3
korydalin	15 ± 3	>100 ^b
korydin	>100 ^b	52 ± 4
Galantamin ^c	1,4 ± 0,2	4,0 ± 1,4

a– výsledky získané po třech měřeních

b– považován za neaktivní

c – referenční látka

Korydalin podle provedené studie inhiboval AChE nejvíce. Jeho IC₅₀ byla $15 \pm 3 \times 10^{-6}$ M. Vůči BuChE byl korydalin považován za neaktivní, jelikož jeho IC₅₀ byla větší než 100×10^{-6} M. Další ze zkoumaných alkaloidů, bulbokapnin, inhiboval AChE při koncentraci (IC₅₀) $40 \pm 2 \times 10^{-6}$ M a BuChE při koncentraci $83 \pm 3 \times 10^{-6}$ M. Posledním zkoušeným alkaloidem byl korydin. Tento alkaloid inhiboval BuChE při koncentraci (IC₅₀) $52 \pm 4 \times 10^{-6}$

M a vůči AChE byl neaktivní. Zároveň k výše uvedeným měřením byla provedena pozitivní kontrola s galanthaminem, jenž inhiboval AChE při koncentraci (IC_{50}) $1,4 \pm 0,2 \times 10^{-6}$ M a BuChE při koncentraci $4 \pm 1,4 \times 10^{-6}$ M. Z výsledků je tedy patrné, že bulbokapnin a korydin prokázaly, v porovnání s galanthaminem, pouze slabou inhibici AChE nebo BuChE.³⁷

V jiných studiích bylo uvedeno, že nejaktivnější alkaloidy z rodu *Corydalis*, co se týče inhibice AChE, jsou ze skupiny benzylisochinolínů obsahující kvarterní dusík. Takovými alkaloidy jsou například palmatin a berberin patřící do skupiny kvarterních protoberberínů. V provedené studii byly izolovány alkaloidy z *Corydalis speciosa* a jejich IC_{50} byla stanovena na $5,8 \times 10^{-6}$ M pro palmatin a $3,3 \times 10^{-6}$ M pro berberin.³⁷

Z hlíz *Corydalis cava* byl mezi jinými izolován i protopin - alkaloid s protopinovým skeletem. Protopin inhiboval AChE při koncentraci (IC_{50}) 50×10^{-6} M, ale u BuChE žádnou inhibici nevykázal.³⁷

Výše zmíněné výzkumy prokázaly, že protoberberinové a protopinové typy alkaloidů, jenž jsou obvyklými obsahovými látkami v rostlinách rodu *Corydalis*, jsou relativně dobrými inhibitory AChE. Extrakty z tuberu měly větší inhibiční aktivitu než extrakty se zelených částí rostlin.

3.5 Využití v lidovém léčitelství a další oblasti využití

Dymnivka je široce užívaná v čínské lidové medicíně. Říká se o ní, že uvolňuje bolest změnou čchi a krvetvorby.³⁸ V tradiční čínské medicíně byla dymnivka nalezena téměř ve všech formulích k léčbě menstruační bolesti a v přípravcích pro zlepšení krevního oběhu.³⁹ Tyto projevy vycházejí z tradičních konceptů zahrnutých v teoriích čínské lidové medicíny. V západní medicíně se někdy používá na menší zevní poranění, menstruační a břišní bolesti. Různé druhy dymnivek se užívají také k léčbě tremoru. Mohou být použity pro léčbu lidí s Parkinsonovou chorobou nebo Méniérovou chorobou. Užívá se kořen, respektive podzemní oddenek.³⁸

Dymnivka je známa svými vedlejšími účinky jako nauzeou a vyčerpaností, protože obsahuje několik aktivních a potenciálně toxických látek ze skupiny alkaloidů, zahrnující například tetrahydropalmin, korydalin, protopin, tetrahydrokoptisin, tetrahydrokolumbamin, korybulbin a bulbokapnin. Z těchto zmíněných alkaloidů je tetrahydropalmin nejaktivnější, ale i nejtoxičtější. Opakované užití produktů obsahujících vyšší koncentrace THP, bylo spojeno s vážným potenciálním rizikem jaterního selhání. Tři zprávy také hovoří o užití THP dětmi, což vedlo k životu ohrožujícímu potlačení CNS funkcí. Pro tyto důvody bylo doporučeno vyloučit užívání dymnivky u dětí, těhotných a kojících žen a pacientů s jaterním selháváním. V současnosti existuje pouze jedna studie týkající se corydalis. Ta testovala THP jako potenciální antiarytmikum, specificky pro supraventrikulární arytmií. Pouze dvojitě slepé, placebem kontrolované studie, nám mohou ukázat jeho léčebný efekt. Prospěch při užívání THP oproti placebo byl významný. Studie byla však provedena v Číně, tudíž jsou někteří vědci k výsledkům skeptičtí. Důkazy naznačující použití dymnivky ke snížení krevní srážlivosti a užití jako léčiva ke snížení krevního tlaku jsou taktéž nedostačující. Žádný z těchto výše uvedených výzkumů se ani vzdáleně nepřiblížil k výsledkům, které by mohly dokázat objektivní účinnost léčby.³⁸

Složky corydalis mohou též ovlivňovat funkci dopaminu a GABA. Tohoto účinku bylo využito k přípravě rostlinného přípravku Phytonoxon N. Indikací tohoto fytofarmaka

je hlavně nespavost, úzkost a neklid. Jedná se o alkoholový extrakt z *Corydalis cava* (20 %) a *Eschscholtzia californica* (80 %). Obě rostliny jsou bohaté na isochinolinové alkaloidy, které různými způsoby ovlivňují metabolismus neuromediátorů v mozku.⁴⁰

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Destilace a odpařování

Rozpouštědla byla před použitím destilována, nejprve byl zachycen předek (asi 5 %; většinou s vodným azeotropem), poté bylo vydestilováno zbylých cca 90 % rozpouštědla. Rozpouštědla byla uchovávána v hnědých nádobách.

Odpařování chromatografických frakcí bylo prováděno na vakuové odparce při 40 °C za sníženého tlaku.

4.1.2 Chromatografie

4.1.2.1. Tenkovrstvá chromatografie

Chromatografie na tenké vrstvě byla použita v systému normálních komor. Komory byly nasycené mobilní fází (20 minut). V případě použití malých komor (válcových), průměr 10 cm, syčení trvalo asi 30 minut. U klasických komor pak asi hodinu. Chromatografie byla prováděná vzestupně.

4.1.2.2. Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie byla prováděna systémem gradientové eluce na silikagelu L, 0,1-0,2 mm, deaktivovaném 10 % vody. Sloupec byl plněn obvyklým způsobem – nalitím suspenze adsorbentu v rozpouštědle do sloupce. Vzorek byl po vysušení v exsikátoru nanesen na roztěru s malým množstvím silikagelu.

4.2 Materiál a vybavení

4.2.1 Rozpouštědla a chemikálie

Rozpouštědla:

Diethylamin, p. a.

Diethylether, p.a. bez stabilizátoru

Ethanol 95%, denaturovaný methanolem

n-Hexan, p. a.

Chloroform, p. a.

Toluen, p. a.

Chemikálie:

Dusičnan bismutitý zásaditý, p. a.

Hydroxid sodný, p. a.

Kyselina sírová 96%, p. a.

Kyselina vinná, p. a.

Vodný roztok chlorovodíku 36%, p. a.

4.2.2 Chemikálie a materiál ke stanovení účinku AChE a BuChE (IC₅₀)

Chemikálie:

10×10^{-3} M acetylcholin jodid

10×10^{-3} M butyrylcholin jodid

5×10^{-3} M 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina

DMSO použitý pro ředění vzorků

0,1 M fosfátový pufr pH 7,4

fysostigmin (eserin)

galanthamin

Materiál:

Hemolyzát lidských erytrocytů, který sloužil jako zdroj acetylcholinesterasy:

- plná krev byla odstředěna po dobu 15 minut při 10000 ot./min, získaná erytrocytární masa byla 3× promyta 0,1 M fosfátovým pufrem, pH 7,4 aby byly odstraněny zbytky plazmy; 10% (v/v) hemolyzát byl připraven ve vodě.⁴¹

Plastové kyvety DISPOLABKARTELL 1937 PS MICROCUVETTES

4.2.3 Přístroje

Centrifuga typ MPW-340 (Mechanika precyzyjna, Polsko)

pH metr Φ 72 METER (Beckmann, USA)

UV-spektrofotometr UVIKON 942 (Kontrol instruments, Švýcarsko)

4.2.4 Detekční činidla

D 1: Dragendorffovo činidlo modifikované podle Muniera⁴¹

- pro alkaloidy a ostatní sloučeniny obsahující dusík.

- *roztok A*: byl připraven rozpuštěním 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody.

- *roztok B*: byl připraven rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody.

- *zásobní roztok*: byl připraven smísením roztoků A a B v poměru 1:1. Ten může být uložený i několik měsíců v lednici.

- *činidlo pro analýzu*: bylo připravené tak, že se k roztoku 5 ml kyseliny vinné rozpuštěné v 50 ml vody přidalo 5 ml zásobního roztoku.

4.2.5 Chromatografické adsorbenty

A 1: Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, 5 × 10 cm

Hliníková deska s vrstvou silikagelu pro tenkovrstvou chromatografii. Silikagel 60 F₂₅₄, tloušťka vrstvy 0,2 mm.

A 2: Oxid hlinitý neutrální, 0,1-0,2 mm

A 3: Silikagel L, 0,2-0,4 mm

Komerční adsorbent, zrnitosti 0,2-0,4 mm, se na suchém sloupci promyje nejprve chloroformem poté destilovaným ethanolem. Po vyjmutí ze sloupce se vyčištěný adsorbent suší několik dní na bezprašném místě. Po vytěkání rozpouštědel se aktivuje na tenké vrstvě (do 2 cm výšky) 4 hodiny při 160 °C. Po zchladnutí na 80 °C se adjustuje do dobře uzavíratelných lahví.

A 4: Silufol UV 254, Kavalier Votice, 20 × 10 cm

4.2.6 Vyvíjecí soustavy pro analytickou tenkovrstvou chromatografii

S 1: Toluén+CHCl₃+EtOH+Et₂NH 70:20:10:3

S 2: Toluén+Et₂NH 9:1

4.2.7 Vyvíjecí soustavy pro preparativní tenkovrstvou chromatografii

S 3: Toluén+n-hexan+Et₂NH 45:45:10

4.3 Zpracování chloroformového výtřepku B z *Corydalis cava*

4.3.1 Původ drogy

Dodavatelem drogy byla firma Megafyt s. r. o., Vrané nad Vltavou, 04/2006, droga (hlízy) pochází ze sběru v Chorvatsku, dodáno firmou Jugodrvo.

4.3.2 Příprava a čištění výtřepku *Corydalis cava*/B/ CHCl_3

Zpracovávaný extrakt „B-chloroform“ byl získán mimo rámec diplomové práce, stejně tak kontrolní TLC.

Příprava extraktu:

Extrakt byl připraven z 11,3 kg suchých hlíz, které byly nejprve extrahovány 95% etanolem, po běžném čištění byly nejprve odstraněny terciární baze při pH 9-10 (extrakt A-diethylether), dále terciární baze při pH 12 (extrakt B-diethylether). Inkriminovaný výtřepok „B-chloroform“ byl připraven vytřepáním zbylého vodného extraktu; přešly do něho alkaloidy málo rozpustné v diethyletheru (80 g tmavě hnědého, velmi viskózního odparku).

Čištění výtřepku B-chloroform:

80 g odparku bylo rozpuštěno v 800 ml 1% kyseliny sírové, vyloučily se pryskyřičnaté podíly, roztok byl zfiltrován, zalkalizován na pH 12 20% NaOH a vytřepán 11 × 250 ml chloroformu, organické výtřepky byly spojeny, vysušeny bezvodým síranem sodným a roztok odpařen. Vzniklo 68,6 g hnědého, velmi viskózního odparku.



Obr. 5: Detekce výtřepků z *Corydalis cava* rhizoma

(Kieselgel UV 254 Merck, 10 cm (dráha 8,5 cm), To+Chf+EtOH+Et₂NH = 70:20:10:3, komora nasycená, vyvíjení 1×, detekce D 1)

- L - výtřepok éterem z kyselého roztoku alkaloidů - primárního extraktu
- A - vyčištěný éterový výtřepok (alkalizace 25% amoniakem, pH ~9),
- B-Et₂O - surový výtřepok éterem (alkalizace 50% louhem, pH ~12)
- B-Chf - surový výtřepok chloroformem (po vytřepání éterem, pH ~12)
- J - kvartérní jodidy po vytřepání silných bazí (okyselení HCl, pH ~3)

4.3.3 Sloupcová chromatografie výtřepku *Corydalis cava*/B/CHCl₃

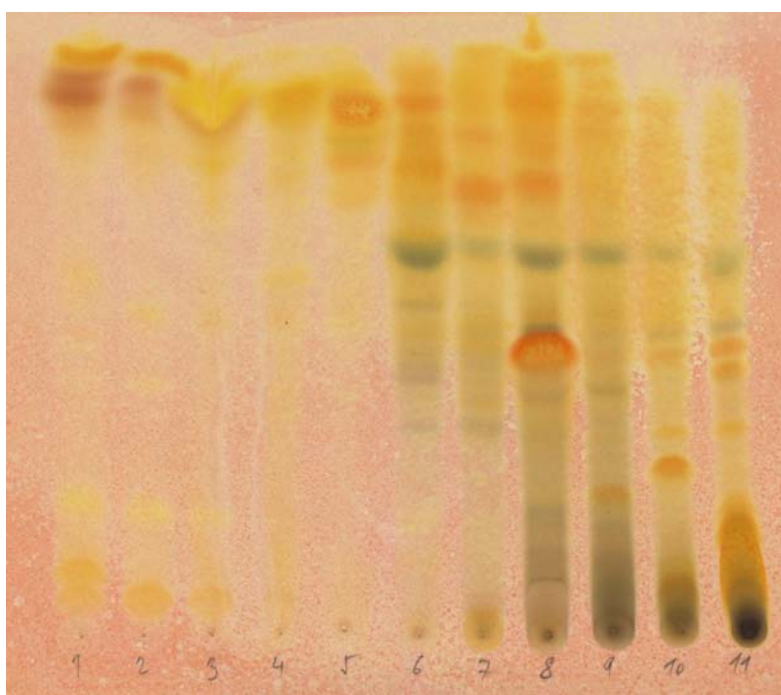
68,6 g výtřepku „B-chloroform“ (viz obr. 5, sloupec 4) bylo rozpuštěno v chloroformu a chromatografováno na sloupci silikagelu za účelem získání čistých alkaloidů. (Bližší popis viz tab. 3 a 4)

Tab. 3: Sloupcová chromatografie výtřepku *Corydalis*/B/CHCl₃

Označení vzorku	B-Chf, „předčištěný.“
Hmotnost vzorku	68,0 g, temně hnědý, velmi viskózní
Druh a množství adsorbentu	Silikagel L, 0,2-0,4 mm, 1880 g, deaktivovaný 10 % vody
Vrstva s extraktem	7,4 × 10 cm
Dělicí vrstva	7,4 × 92 cm
Frakce (ml)/doba toku	500 ml/35-40 minut

Tab. 4: Výsledky sloupcové chromatografie výtřepku *Corydalis/B/CHCl₃*

Spoj. fr.	Frakce	Eluční systém	Označení na TLC	Popis	Hmotn. (g)
1-2	1-2	Chf	1	Hnědý, s náznakem krystalů	0,15
3-5	3-5	Chf	2	Zelenobělavý, práškovitý (drobně kryst.)	1,88
6-8	6-8	Chf	3	Zelený, velmi viskózní	0,32
9-15	9-12	Chf	4	Hnědý, krystalický	0,87
	13-15	Chf + 2 % EtOH			
16-25	16-24	Chf + 2 % EtOH	5	Hnědý, velmi viskózní	1,98
	25	Chf + 5 % EtOH			
26-29	26-29	Chf + 5 % EtOH	6	Černý, velmi viskózní	6,74
30-33	30-33	Chf + 5 % EtOH	7	Černý, velmi viskózní	0,98
34-53	34-37	Chf + 5 % EtOH	8	Černý, velmi viskózní	9,18
	38-51	Chf + 10 % EtOH			
	52-53	Chf + 25 % EtOH			
54-58	54-58	Chf + 25 % EtOH	9	Černý, velmi viskózní	0,52
59-64	59-64	Chf + 25 % EtOH	10	Černý, velmi viskózní	4,4
65-80	66-67	Chf + 25 % EtOH	11	Černý, velmi viskózní	9,02
	68-80	Chf + 50 % EtOH			



Obr. 6: *Corydalis cava* hlízy/B/CHCl₃ (popis viz tab. 4)

(Pozn. Kieselgel UV 254 Merck, 10 cm (dráha 8,5 cm), Toluén+CHCl₃+EtOH+Et₂NH-70:20:10:3, komora nasycená, vyvíjení 2×, detekce D1)

4.3.4 Zpracování spojených frakcí 7 a 8

Spojené frakce 7 a 8 (viz tab. 4 a obr. 6) byly chromatografovány na sloupci s adsorbentem A 2.

Tab. 5: Sloupcová chromatografie odparku Corydalis/B/7+8

Označení vzorku	Corydalis cava/B/7+8
Hmotnost vzorku	10,16 g, temně černý, velmi viskózní
Druh a množství adsorbentu	Oxid hlinitý neutrální 0,1-0,2 mm, deaktivovaný 5 % vody, 281 g
Vrstva s extraktem	6,2 × 3,2 cm
Dělicí vrstva	54,5 × 3,2 cm
Frakce (ml)/doba toku	100 ml/20 minut

Tab. 6: Výsledky sloupcové chromatografie výtřepku Corydalis cava/B/7+8

Spoj. fr.	Frakce	Eluční systém	Označení na TLC	Popis	Hmotn. (g)
1-12	1-8	Benzin+70%Chf	F ₁	Téměř černý, nafouklý	4,7
	9-12	Benzin+90%Chf			
13-23	13	Benzin+90%Chf	F ₂	Černý, práškovitý	0,65
	14-23	Chf			

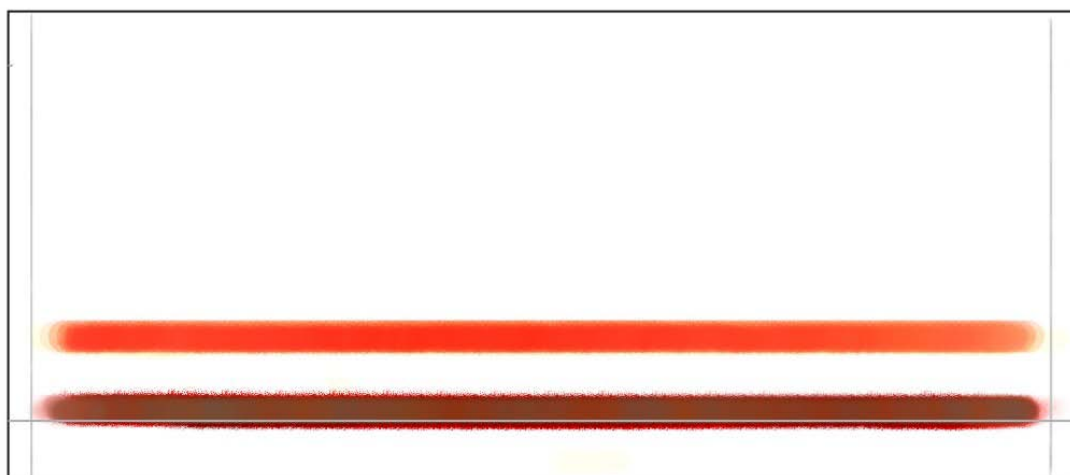


Obr. 7: Kontrolní vyvíjení F₁ a F₂ (F₁- levá skvrna, F₂- pravá skvrna)
(Kieselgel UV 254 Merck, 10 cm (dráha 8,5 cm), Toluén+Et₂NH-9:1, komora nasycená, vyvíjení 2×, detekce

D 1)

4.3.5 Čištění podfrakce F₂ na preparativní TLC

Podfrakce F₂ byla rozpuštěna v 11 ml chloroformu a po cca 20 mg (0,5 ml) nanášena na chromatografické desky (Silufol 10 × 20 cm, tloušťka vrstvy 0,1 mm). Desky byly vyvíjeny v mobilní fázi S 3. Každá deska byla vyvinuta pětkrát. Alkaloid byl detekován pod UV lampou při λ (254 nm), zóna separované čisté látky (viz obr. 8) byla označena a látka byla společně s adsorbentem izolována z chromatografických desek. Izolovaná látka byla vymyta z adsorbentu chloroformem (100 ml). Eluát byl odpařen a bylo získáno 170 mg nazelenalého odparku. Odparek byl překrytalizován z horkého chloroformu. Následně byly provedeny MS a NMR studie za účelem určení struktury izolované látky.



Obr. 8: Preparativní TLC odparku F₂ (horní skvrna-izolovaná látka, spodní skvrna-nečistoty) (Silufol 20 × 10 cm, dráha vyvíjení 9cm, Toluén+n-Hexan+Et₂NH-45:45:10, komora nasycená, vyvíjení 5×)

4.4 Určení struktury izolované látky

4.4.1 Měření hmotnostního spektra

Spektra byla měřena na LC/MS Thermo Finnigan LCQDuo iontová past, ionizace elektrosprejem v kladném módu (ESI+). MS/MS spektra byla měřena při kolizní energii 40 eV.

4.4.2 Měření NMR spektra

Spektra byla měřena na spektrometru Varian Inova 500 s pracovní frekvencí 499.9 MHz pro ^1H a 125.7 MHz pro ^{13}C jádra. ^{13}C NMR spektra byla měřena v 5mm SW širokopásmové sondě, ^1H a všechna 2D spektra v inverzní 5mm ID PFG sondě s využitím standardních pulsních sekvencí. Experimenty byly měřeny v deuteriochloroformu při 25 °C. Hodnoty chemických posunů jsou v ppm a jsou vztaženy k internímu standardu (hexamethyldisilan, 0,04 ppm, v ^1H spektrech) nebo signálu solventu (76,99 ppm, v ^{13}C spektrech) (Dr. M. Kurfürst, Ph.D., Ústav chemických procesů, AV ČR, Praha).

4.5 Stanovení účinku alkaloidu na AChE a BuChE (IC_{50})

4.5.1 Podmínky měření

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek:

- při teplotě 25 °C
- při pH 7,4
- při vlnové délce spektrofotometru 436 nm
- v jednorázových plastových kyvetách o tloušťce 1 cm

4.5.2 Stanovení IC_{50}

Slepý vzorek – do kyvety bylo postupně přidáváno 10-25 μl hemolyzátu nebo plazmy, 200 μl DTNB, 25 μl rozpouštědla, ve kterém byly rozpuštěny vzorky (DMSO) a následně byl slepý vzorek doplněn na objem 900 μl puforem. Následně bylo přidáno 100 μl substrátu

(acetylcholin jodid nebo butyrylcholin jodid). Nárůst absorbance byl měřen při vlnové délce 436 nm. Měření bylo prováděno ve třech opakováních. Pro výpočet poklesu nárůstu absorbance byla použita průměrná hodnota.

Měření vzorku - do kyvety bylo postupně přidáváno 10-25 μ l hemolyzátu nebo plazmy, 200 μ l DTNB, 25 μ l měřeného vzorku v různých koncentracích a následně byl měřený vzorek doplněn na objem 900 μ l pufrem. Následně bylo přidáno 100 μ l substrátu (acetylcholin jodid nebo butyrylcholin jodid). Nárůst absorbance byl měřen při vlnové délce 436 nm. Měření bylo prováděno ve třech opakováních.

4.5.3 Matematické zpracování experimentálních dat

Výpočet poklesu ΔA

$$\% \text{ poklesu } \Delta A = 100 - (\Delta A_{SA} / \Delta A_{BL} \times 100)$$

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

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

Stanovení hodnoty IC_{50}

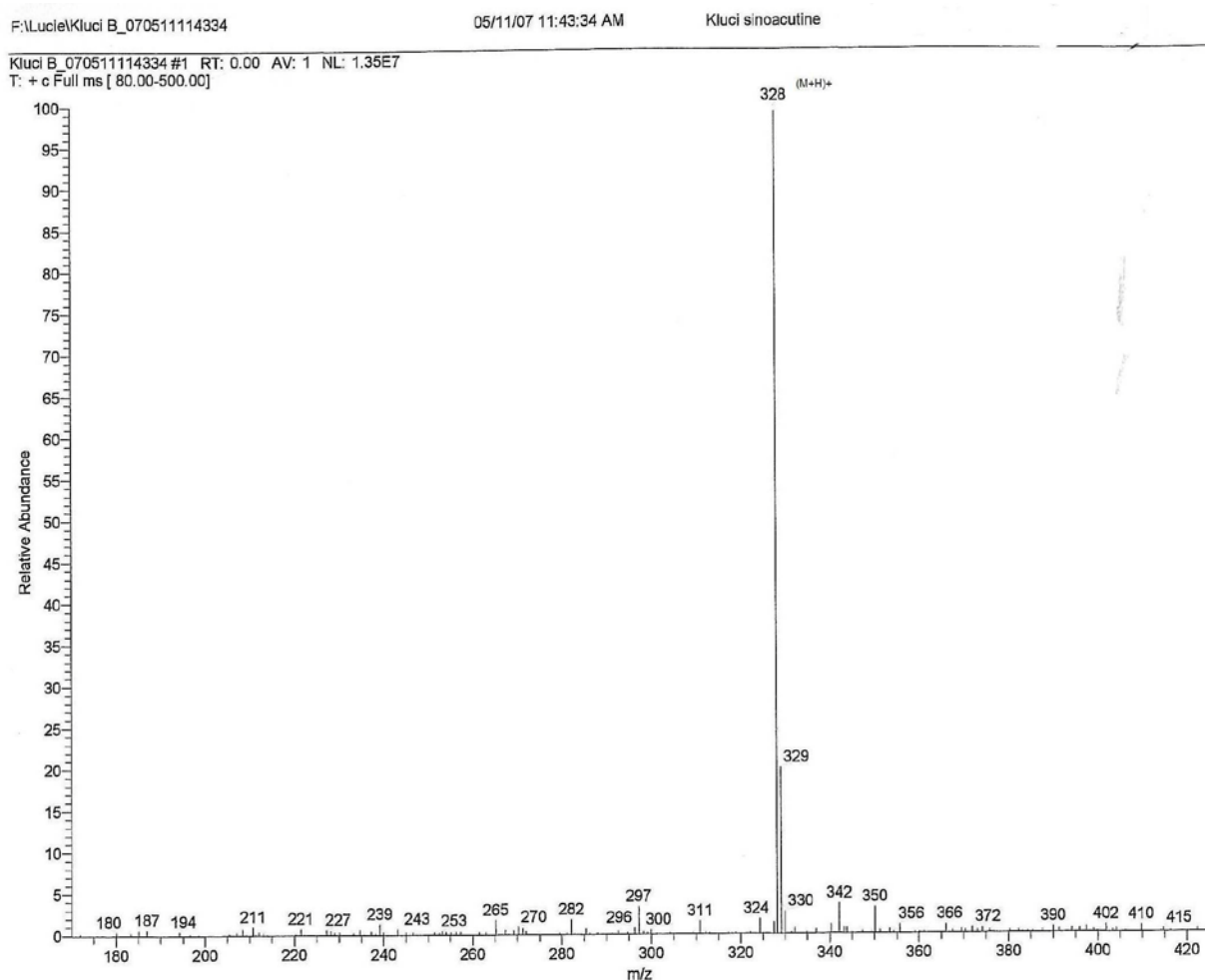
Z vypočítaných hodnot byla pomocí statistického programu GraphPad (verze 3.06 pro Windows; výrobce Graph PaD Software, San Diego, CA, USA) sestrojena křivka, ze které byla odečtena hodnota IC_{50} .

5 VÝSLEDKY

Na základě MS a NMR studií a porovnání dat s literaturou byla izolovaná látka identifikovaná jako sinoakutin (5,6,8,14-tetrahydro-4-hydroxy-3,6-dimethoxy-17-methyl-morfinan-7-on).

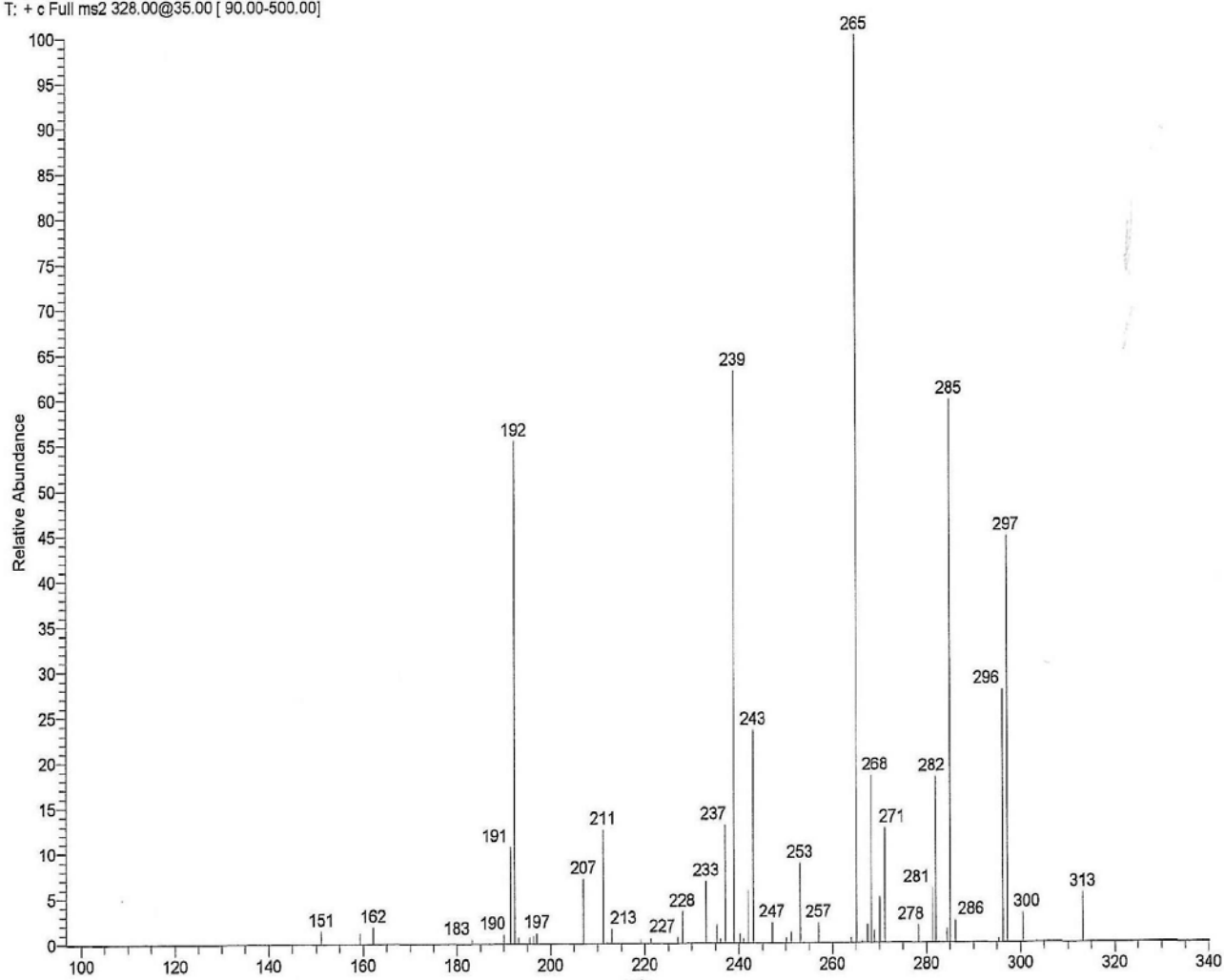
5.1 Hmotnostní spektrum látky

ESI-MS m/z 328,5 $[M+H]^+$ (100), (viz obr. 9). MS/MS m/z 313 $[M-CH_3]^+$ (10), 297 $[M-OCH_3]^+$ (48), 265 (100), 239 (67), (viz obr. 10, str. 46).



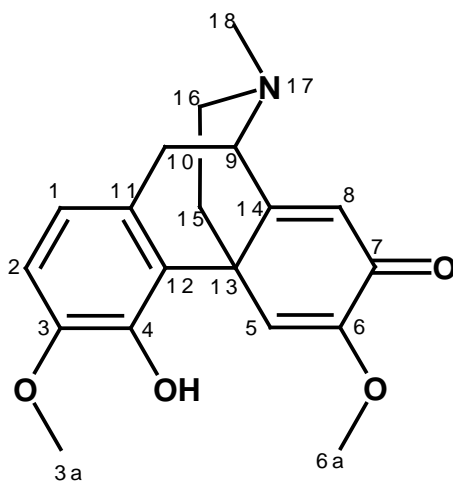
Obr. 9: MS spektrum izolované látky

Kluci Bsihoac MS2 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 3.06E6
T: + c Full ms2 328.00@35.00 [90.00-500.00]



Obr. 10: MS/MS spektrum izolované látky

5.2 NMR studie izolované látky

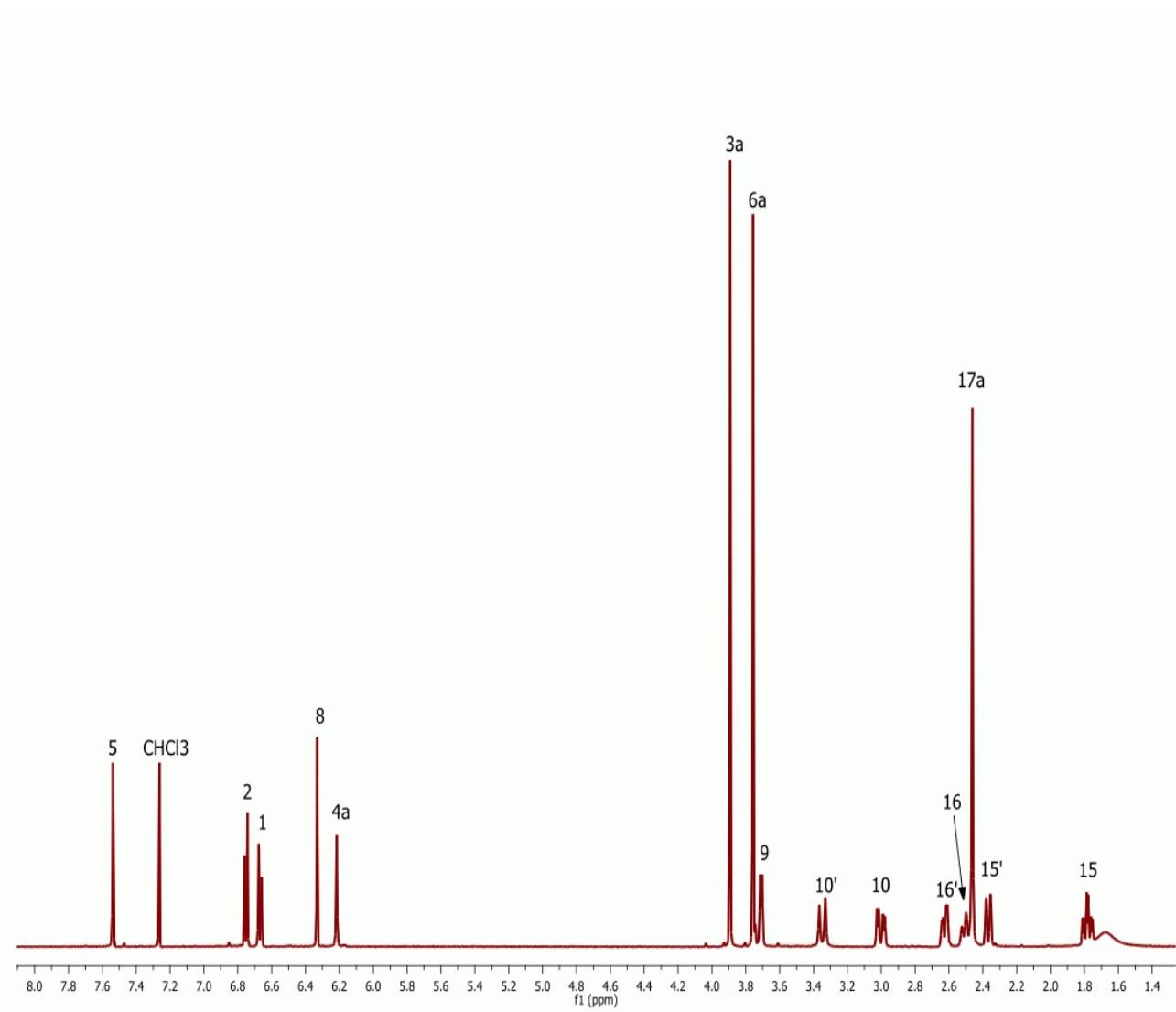


Obr. 11: sinoakutin

5.2.1 ¹H NMR spektrum izolované látky

¹H NMR (CDCl₃, 25°C):

1-H 6,67 d; 2-H 6,76 d; 5-H 7,54 s; 8-H 6,33 s; 9-H 3,71 d; 10'-H 3,35 d; 10-H 3,00 dd; 15'-H 2,37 dd; 15-H 1,78 ddd; 16'-H 2,63 dd; 16-H 2,50 ddd; 18-H 2,46 s; 4a-H (OH) 6,22 s; 3a-H (OCH₃) 3,89 s; 6a-H (OCH₃) 3,76 s. (viz obr. 12, str. 48).

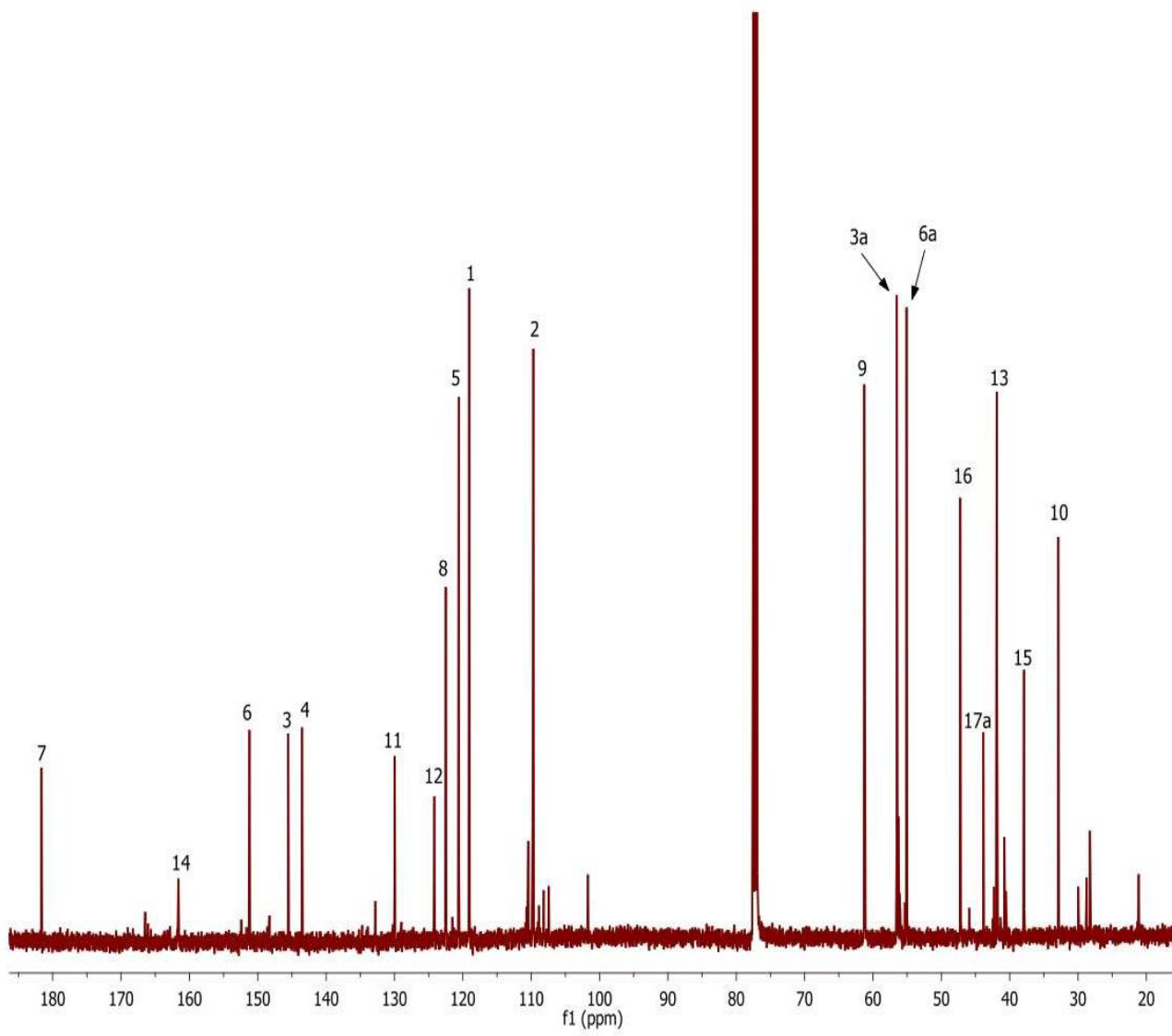


Obr. 12: ^1H -NMR spektrum sinoakutinu

5.2.2 ^{13}C NMR spektrum izolované látky

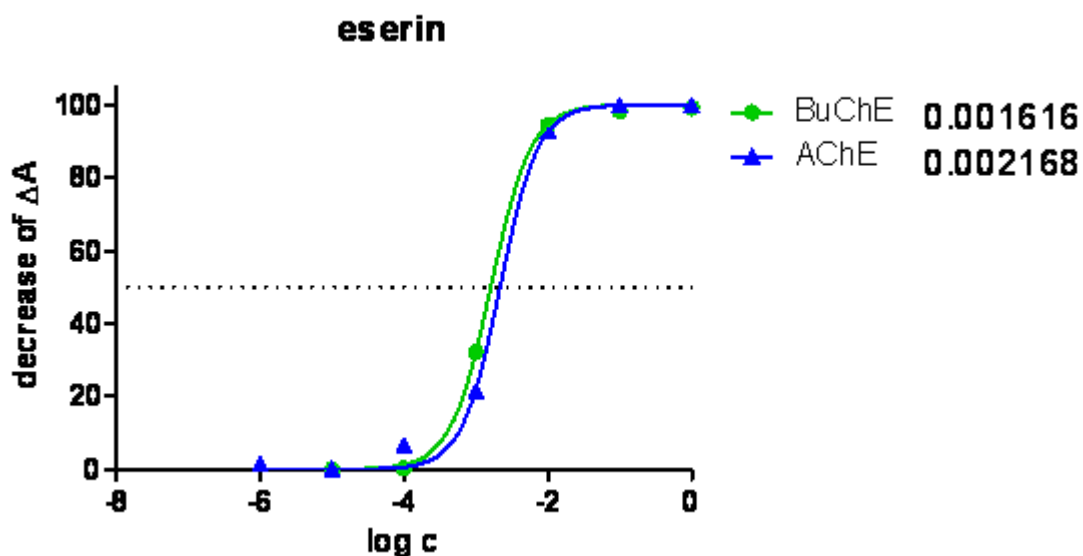
^{13}C NMR (CDCl_3 , 25°C):

1-C 119,22; 2-C 109,80; 3-C 145,60; 3a-C 56,60; 4-C 143,60; 5-C 120,66; 6-C 151,31; 6a-C 55,12; 7-C 181,54; 8-C 122,59; 9-C 61,31; 10-C 33,00; 11-C 129,99; 12-C 124,20; 13-C 43,91; 14-C 161,44; 15-C 37,90; 16-C 47,28; 17a-C 44,94. (viz obr. 13)

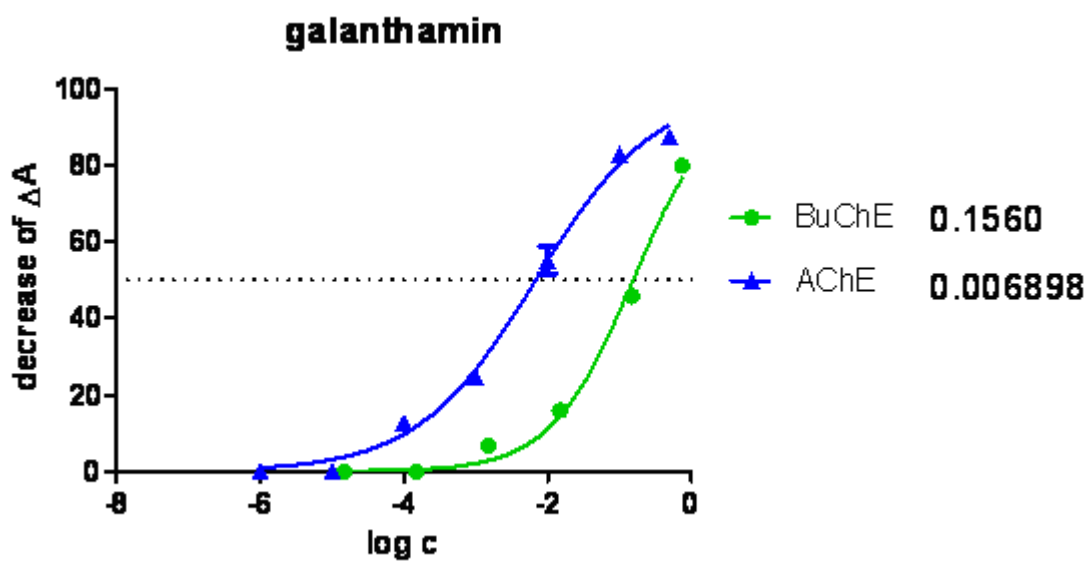


Obr. 13: ^{13}C -NMR spektrum sinoakutinu

5.3 Výsledky testu vlivu izolované látky na aktivitu AChE a BuChE

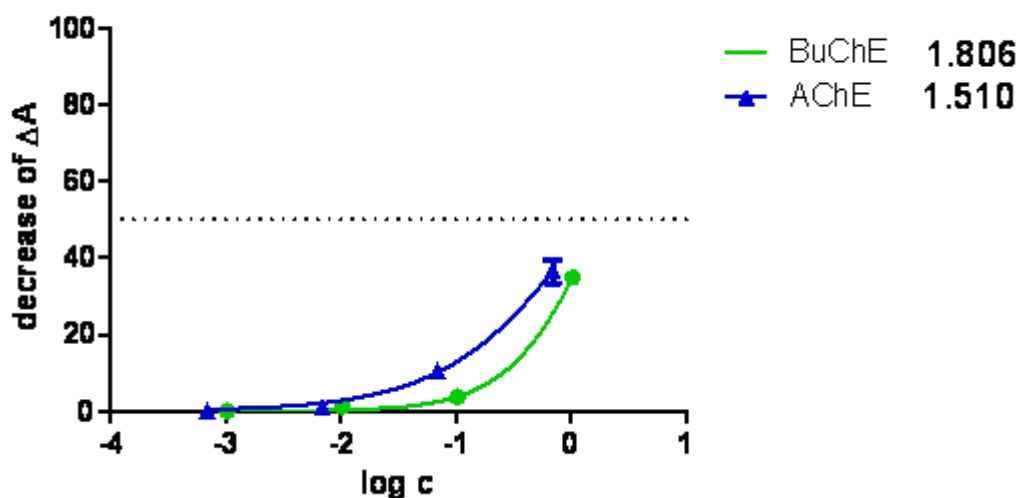


Obr. 14: Aktivita eserinu (standard) u AChE a BuChE (jednotky – 10^{-3} M)



Obr. 15: Aktivita galanthaminu (standard) u AChE a BuChE (jednotky – 10^{-3} M)

SINOAKUTIN



Obr. 16: Aktivita sinoakutinu u AChE a BuChE (jednotky – 10^{-3} M)

Tab. 7: Výsledky měření IC_{50} sinoakutinu u BuChE

sinoakutin+BuChE	$IC_{50} > 1,0375 \cdot 10^{-3}$ M			
c original mM	41,5	4,15	0,415	0,0415
c result mM	1,0375	0,10375	0,010375	0,001038
log c result	0,015988	-0,98401	-1,98401	-2,98401
average decrease of ΔA	34,88773	3,702446	1,211504	0

Tab. 8: Výsledky měření IC_{50} sinoakutinu u AChE

sinoakutin+AChE	$IC_{50} > 0,692 \cdot 10^{-3}$ M			
c original mM	41,5	4,15	0,415	0,0415
c result mM	0,691667	0,069167	0,006917	0,000692
log c result	-0,1601	-1,1601	-2,1601	-3,1601
average decrease of ΔA	36,43159	10,54599	1,299968	0,227494

6 DISKUSE

Látka izolovaná z *Corydalis cava* byla na základě MS, NMR a porovnáním dat v literatuře identifikována jako sinoakutin. Jedná se o isochinolinový alkaloid morfinanového typu (viz obr. 11, str. 48). Tento alkaloid byl izolován a identifikován v celé řadě rostlin patřících do čeledí Fumariaceae (*Corydalis cava*, *Corydalis ochroleuca*, *Corydalis solida*)¹⁸, Papaveraceae (*Glaucium contortuplicatum*)⁴², Menispermaceae (*Sinomenium acutum*)⁴³ a Lauraceae (*Dehaasia longipedicellata*).⁴⁴

U sinoakutinu doposud nebylo provedené testování jeho vlivu na aktivitu AChE nebo BuChE. U ostatních alkaloidů, obvykle se vyskytujících v dymnivce duté, testování na AChE a BuChE proběhlo u bulbokapninu, korydalínu, korydinu, palmatinu, berberinu a protopinu (hodnoty IC₅₀ viz strana 28).

Pro stanovení inhibiční aktivity látky byla použita Ellmanova kolorimetrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) modifikovaná podle Bajgara.⁴⁵ Jako substráty se používají estery thiocholinu, které jsou cholinesterasami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB. Výsledkem je žlutě zbarvený produkt, který se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm. Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu.

Stanovené hodnoty IC₅₀ pro inhibici AChE ($1,510 \times 10^{-3}$ M) a BuChE ($1,806 \times 10^{-3}$ M) byly výrazně vyšší než hodnoty IC₅₀ standardů, které jsou využívány pro inhibici obou zmíněných enzymů (především AChE). Naměřené hodnoty IC₅₀ pro galathamin byly: AChE ($6,898 \times 10^{-6}$ M), BuChE ($0,1560 \times 10^{-3}$ M), a pro eserin byly hodnoty IC₅₀ pro: AChE ($2,168 \times 10^{-6}$ M) a BuChE ($1,616 \times 10^{-6}$ M). Z tohoto pohledu sinoakutin nemůže být považován za potencionální AChE a BuChE inhibitor.

7 SEZNAM LITERATURY

1. ---: eurochem.cz:
http://www.eurochem.cz/polavolt/org/obory/farmacie/uvod/vyvojova_stadia.htm,
vystaveno 25.1. 2009.
2. ---: zdravcentra.cz: http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/77_3720.html,
vystaveno 25.1. 2009.
3. Kopecký, J.: Metody vyhledávání biologicky aktivních látek. Sborník textů přednášek
letního semináře: Sborník chemie, Nové Hrady, srpen 2005.
4. Opletal, L.: ústní sdělení.
5. Hejný, S., Slavík, B.: *Květena ČSR 1*, Academia, str. 497, Praha 1988 (dotisk 2002).
6. ---: Panoramio.com: www.panoramio.com/photo/8687310, vystaveno 25.1. 2009.
7. ---: rostliny přírodou.cz: http://rostliny.prirodou.cz/?rostlina=corydalis_cava, vystaveno
31.1. 2009.
8. ---: atlasrostlin.cz: <http://kvetiny.atlasrostlin.cz/dymnivka-duta>, vystaveno 31.1. 2009.
9. ---: Wikipedia.org: de.wikipedia.org/wiki/Hohler_Lerchensporn, vystaveno 31.1.2009.
10. ---: Botany.cz: <http://botany.cz/cs/corydalis-cava/>, vystaveno 31.1. 2009.
11. ---: lokality-rostlin.cz: http://www.lokalita-rostlin.cz/?rostlina=corydalis_cava, vystaveno
31.1. 2009.
12. Blaschek, W., Ebel, S., Hilgenfeldt, U., Holzgrabe, Reichling, J.: *Corydalis cavae*
rhizoma, *Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*, Springer Medizin Verlag
Heidelberg, Stuttgart, 2008.
13. Blustein, J., Song, L.: *Corydalis roots east and west*,
<http://journals.cambridge.org/action/displayFulltext?type=6&fid=626656&jid=&volumeId=&issueId=&aid=556524>,
vystaveno 3.2. 2009.
14. Korbelař, J., Edris, Z.: *Naše rostliny v lékařství*, Avicenum, str. 134, Praha 1981.

15. Olesen, J.M.: A fatal growth pattern and ways suspected of postponing death: corm dynamics in the perennial herb *Corydalis cava*, *Botanical Journal of the Linnean Society*, **115**(2), 95 – 113, 2008.
16. ---: butbn.cas.cz: <http://www.butbn.cas.cz/clopla/drawing/Corydalis%20cava1B.jpg>, vystaveno 3.2. 2009.
17. Guinaudeau, H., Shamma, M.: The protopine alkaloids, *J. Nat. Prod.*, **45**, 237 – 246, 1982.
18. Bentley, K.W.: b-Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids, *Nat. Prod. Rep.*, **23**, 444 – 463, 2006.
19. Davidson, T.: *Encyclopedia of Alternative Medicine*, <http://www.answers.com/topic/corydalis>, vystaveno 3.2. 2009.
20. Slavík, J., Slavíková, L.: Alkaloids from *corydalis cava*, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **44**, 1979.
21. ---: henriettesherbal.com: <http://www.henriettesherbal.com/eclectic/madaus/corydalis.html>, vystaveno 3.2. 2009.
22. Chen, K.K., Anderson, R.C., Chon, T.Q.: *Chin. J. Physiol.*, **11**, 7 – 11, 1937.
23. Grycová, L., Dostál, J., Radek, M.: Quaternary protoberberine alkaloids, *Phytochemistry*, **68**(2), 150 – 175, 2007.
24. Reimeier, C., Schneider, I., Schneider, W., Schafer, H.L., Elstner, E.F.: Effects of ethanolic extracts from *Eschscholtzia californica* and *Corydalis cava* on dimerization and oxidation of enkephalins, *Arzneimittelforschung*, **45**(2), 132 – 6, 1995.
25. Kleber, E., Schneider, W., Schafer, H.L., Elstner, E.F.: Modulation of key reactions of the catecholamine metabolism by extracts from *Eschscholtzia californica* and *Corydalis cava*, *Arzneimittelforschung*, **45**(2), 127 – 131, 1995.

26. Halbsguth, Ch., Meissner, O., Haberlein, H.: Positive cooperation of protoberberine type 2 alkaloids from *Corydalis cava* on the GABA_A binding site, *Planta medica*, **69**(4), 305 – 309, 2003.
27. Ko, F.N., Wu, T.S., Lu, S.T., Wu, Y.C., Huang, T.F., Teng, C.M.: Antiplatelet effects of protopine isolated from *Corydalis tubers*, *Thromb Res*, **56**(2), 289 – 298, 1989.
28. Doležal, J.: Biologická aktivita obsahových látek rostlin VIII. Vliv alkaloidů z různých rostlinných taxonů na acetylcholinesterázu, *Diplomová práce*, UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hr. Králové, Hr. Králové 2008, 65 s.
29. Taylor, P.: Anticholinergic agents, v knize: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. (J.G. Hardman & L.E. Limbird, eds), McGraw Hill, New York 1996.
30. Lullmann, H., Mohr, K., Wehling, M.: *Farmakologie und Toxikologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1999.
31. Binder, J., Kuča, K., Jun, D., Opletalová, V.: Studium inhibitorů acetylcholinesterasy, *Chem. Listy*, **102**, 179 – 264, 2008.
32. Lushington, G. H., Jian-Xin Guo, Hurley, M.M.: Acetylcholinesterase – Molecular modeling with the whole toolkit, *Curr. Top. Med. Chem.* **6**(1), 57 – 63, 2006.
33. Marston, A., Kissling, J., Hostettmann, K.: A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants, *Phytochemical Analysis*, **13**(1), 51 – 54, 2002.
34. Kubínek, R., Vůjtek, M., Mašláň, M.: Mikroskopie skenující sondou, VUP, <http://atmilab.upol.cz/brozura.html>, vystaveno 3.2. 2009.
35. Yingge, Z., Delu, Z., Chunli, B., Chen, W.: Force spectroscopy between acetylcholinesterase molecule and its natural substrate to study the effects of inhibitors and reactivators on enzyme activity, *Life Sci.*, **65**(21), 1999.

36. Yingee, Z., Chunli, B., Chen, W., Delu, Z., Ming, S., Zhang, L., Fang, T.: Intermolecular forces between acetylcholine and acetylcholinesterases studied with atomic force microscopy, *SCI. China, Ser. B:Chem.*, **42**(5), 449 – 457, 1999.
37. Andersen, A., Kjøbye, A., Dall, O., Jager, A.K.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigg. & Kort, *Journal of Ethnopharmacology*, **113**, 179 – 182, 2007.
38. ---: thirdage.com: <http://www.thirdage.com/healthguide/corydalis>, vystaveno 3.2. 2009.
39. ---: answers.com: <http://www.answers.com/topic/corydalis>, vystaveno 3.2. 2009.
40. Schafer, H.L., Schafer, H., Schneider, W., Elstner, E.F.: Sedative action of extract combinations of *Eschscholtzia californica* and *Corydalis cava*, *Arzneimittelforschung*, **45**(2), 124 – 126, 1995.
41. Stahl, E.: *Thin-layer Chromatography, A Laboratory Handbook*; Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, s. 873, 1969.
42. Tin-Wa, M., Farnsworth, N.R., Zivri, K.A.: Sinoacutine from *Glaucium contortuplicatum* Boiss., *Journal of Pharmaceutical Science*, **65**(5), 755 – 756, 2006.
43. Guan-Hu, B., Guo-Wei, Q., Rui, W., Xi-Can, T.: Morphine alkaloids with cell protective effects from *Sinomenium acutum*, *J. Nat. Prod.*, **68**(7), 1128 – 1130, 2005.
44. Mukhtar, M.R., Hadi, A.H.A., Litaudon, M., Awang, K.: Morphinandienone alkaloids from *Dehaasia longipedicellata*, *Fitoterapia*, **75**, 792 – 794, 2004.
45. Bajgar, J.: Stanovení aktivity cholinesteráz v lidské krvi – možná modifikace pro polní použití, *Voj. Zdrav. Lis.*, **41**(2), 78 – 80, 1972.

ABSTRAKT/ABSTRACT

ABSTRAKT

Sekula, M.: Biologická aktivita obsahových látek rostlin XI. Alkaloidy *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Körte (Fumariaceae) a jejich účinek na acetylcholinesterasu. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2009, 61 s.

V rámci screeningu rostlin s obsahem alkaloidů, které inhibují aktivitu lidské erytrocytární acetylcholinesterasy a lidské sérové butyrylcholinesterasy byla podrobena studiu dymnivka dutá (*Corydalis cava* Schweigg. & Körte, Fumariaceae). K izolaci alkaloidů bylo použito 11,3 kg sušené drogy (hlízy); z vyčištěného ethanolového extraktu byl získán výtřepok „B-chloroform“, obsahující terciární alkaloidy těžce rozpustné v diethyletheru.

Cílem práce bylo dělení směsí alkaloidů z výtřepku „B-chloroform“. Z této směsi byl kombinací sloupcové a tenkovrstvé chromatografie izolován sinoakutin ve formě base (porovnáním fyzikálně-chemických charakteristik izolované látky s údaji v literatuře).

Biologická aktivita sinoakutinu (inhibice lidské erytrocytární acetylcholinesterasy a lidské sérové butyrylcholinesterasy) byla stanovena u AChE ($IC_{50} 1,510 \times 10^{-3} M$) a u BuChE ($IC_{50} 1,806 \times 10^{-3} M$). V porovnání s biologickou aktivitou standardních alkaloidních inhibitorů acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy (galanthaminu a eserinu) se jedná o látku, která je spíše nezajímavá z hlediska dalšího studia přírodních látek, které by se mohly uplatnit jako výchozí struktury pro studium potencionálních léčiv vůči Alzheimerově chorobě.

Klíčová slova: Alzheimerova choroba, alkaloidy, *Corydalis cava*, acetylcholinesterasa, biologická aktivita.

ABSTRACT

Sekula, M.: Biological activity of plant metabolites XI.; Alkaloids of *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Körte (Fumariaceae) and their activity on acetylcholinesterase. Diploma thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové 2009, 61 p.

Within the screening of plants that contains alkaloids inhibiting the activity of the human erythrocytic acetylcholinesterase and human serum butyrylcholinesterase Turkey Corn (*Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Körte, Fumariaceae) was studied. 11,3 kg of the dry roots served for the isolation of alkaloids. Extrakt „B-chloroform“ which contain mixture of tertiary alkaloids but diethylether-insoluble were obtained from the purified ethanolic extract.

The task was to separate mixture of alkaloids from extrakt „B-chloroform“. Using both column and thin layer chromatography sinoacutine as a base was isolated. The identity of the isolated alkaloid as determined by means of comparing its physico-chemical characteristics with the published data.

The isolated sinoacutine inhibited the human erythrocytic acetylcholinesterase and human serum butyrylcholinesterase with IC_{50} for AChE ($1,510 \times 10^{-3}$ M) and with IC_{50} for BuChE ($1,806 \times 10^{-3}$ M). Comparing its biological activity with that of standard alkaloid inhibitors (galanthamine and eserine) the isolated substance is not very interesting regarding further studies of natural products that could serve as lead compounds for the development of potential drugs against the Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer disease, alkaloids, *Corydalis cava*, acetylcholinesterase, biological activity.