

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Biologická aktivita obsahových látek rostlin II.;
Vliv alkaloidů z *Chelidonium majus* L. na acetylcholinesterázu.

Biological activity of plant metabolites II.;
Influence of alkaloids from *Chelidonium majus* L. on acetylcholinesterase.

Školitel : doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Hradec Králové, 15. května 2006

Eva Vítková

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat panu doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za jeho trpělivost, cenné odborné rady, poskytnuté materiály a vedení během práce na mé diplomové práci. Dále panu Mgr. Danielu Junovi, Ph.D. a panu Ing. Kamilu Kučovi, Ph.D. z Univerzity obrany v Brně, fakulty vojenského zdravotnictví v HK za provedení testu vlivu mojí izolované látky na aktivitu AChE a vypracování metodiky k tomuto testu. Potom ještě mému příteli Járovi Holcovi za psychickou podporu i pomoc s německými překlady a v neposlední řadě pak kolektivitu katedry farmaceutické botaniky a ekologie za příjemné prostředí a pomoc při řešení technických problémů.

Věnováno mým rodičům Marii Vítkové a Ladislavu Vítkovi.

OBSAH

1.	ÚVOD.....	8
2.	CÍL PRÁCE.....	12
3.	TEORETICKÁ ČÁST.....	14
3.1.	Alzheimerova choroba a její terapie.....	15
3.1.1.	Alzheimerova choroba.....	15
3.1.2.	Terapie AD.....	16
3.1.2.1.	Inhibitory mozkových cholinesteras.....	16
3.1.2.2.	Inhibitory NMDA receptorů.....	18
3.1.3.	Fytoterapie AD.....	18
3.1.3.1.	Látky ovlivňující osud ACh a AChE.....	18
3.1.3.2.	Inhibitory ACAT.....	19
3.1.3.3.	Látky ovlivňující produkci amyloidu.....	19
3.1.3.4.	Neuroprotektiva.....	19
3.1.3.5.	Inhibitory propylendopeptidasy (PEPI).....	20
3.2.	<i>Chelidonium majus</i> L. (vlastovičník větší).....	21
3.2.1.	Synonyma.....	22
3.2.2.	Systematika.....	22
3.2.3.	Botanický popis.....	22
3.2.4.	Ekologie a cenologie.....	23
3.2.5.	Celkové rozšíření.....	23
3.2.6.	Rozšíření v ČR.....	23
3.3.	Drogy získávané z <i>Chelidonium majus</i> L.	24
3.3.1.	Chelidonii radix (kořen vlastovičníku většího).....	24
3.3.2.	Chelidonii herba (nať vlastovičníku většího).....	24

3.4.	Obsahové látky <i>Chelidonium majus</i> L.	24
3.4.1.	Alkaloidy.....	24
3.4.1.1.	Alkaloidy podle chemické struktury.....	24
3.4.1.2.	Alkaloidy kořene.....	26
3.4.1.3.	Alkaloidy nati.....	28
3.4.1.4.	Alkaloidy plodu.....	29
3.4.1.5.	Alkaloidy semen.....	29
3.4.2.	Ostatní látky.....	32
3.4.2.1.	Rostlinné kyseliny.....	32
3.4.2.2.	Minoritní složky.....	32
3.5.	Biologická aktivita obsahových látek.....	33
3.6.	Farmakologické účinky rostliny <i>Chelidonium majus</i> L.	35
3.6.1.	Protinádorové a antivirové působení.....	35
3.6.2.	Hepatotropní spasmolytické účinky.....	36
3.6.3.	Biologické účinky hlavních obsahových látek.....	38
3.7.	Využití <i>Chelidonium majus</i> L.	41
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY.....	42
4.1.	Všeobecné postupy.....	43
4.1.1.	Destilace a odpařování rozpouštědel.....	43
4.1.2.	Chromatografie.....	43
4.1.2.1.	Tenkvrstvá chromatografie.....	43
4.1.2.2.	Sloupcová chromatografie.....	43
4.2.	Materiál a vybavení.....	43
4.2.1.	Rozpouštědla a chemikálie.....	43
4.2.2.	Detekční činidla.....	44
4.2.3.	Chromatografické adsorbenty.....	45
4.2.4.	Vyvíjecí soustavy pro tenkvrstvou chromatografií.....	45

4.3.	Stanovení inhibice aktivity AChE.....	45
4.3.1.	Přístroje.....	45
4.3.2.	Materiál.....	45
4.3.3.	Příprava homogenátu.....	46
4.3.4.	Inhibice cholinesteráz.....	46
4.3.5.	Matematické zpracování experimentálních dat.....	46
4.4.	Izolace.....	47
4.4.1.	Postup extrakce alkaloidů z <i>Chelidonium majus</i> L.	47
4.4.1.1.	Původ drogy.....	47
4.4.1.2.	Příprava extraktu a jeho čištění.....	47
4.4.2.	Výtřepok A z primárního extraktu.....	48
4.4.3.	Výtřepok B z primárního extraktu.....	48
4.4.4.	Výtřepok J z primárního extraktu.....	48
4.4.5.	Výtřepok E z primárního extraktu.....	48
4.4.6.	Zbýlý vodný extrakt.....	48
4.5.	<i>Chelidonium majus</i> – dělení surového výtřepku A.....	49
4.6.	Chromatografie výtřepku A (AC₁ – alkaloidy z chloridů rozpustných).....	51
4.6.1.	Dělení frakce 12.....	53
4.6.1.1.	Čištění frakce 12.....	53
4.6.1.2.	Čištění frakce 27.....	54
4.7.	Charakteristika látky CH-M/A-3.....	58
4.8.	Výsledky testu vlivu látky na aktivitu AChE.....	59
5.	DISKUSE.....	60
6.	SOUHRN.....	65
7.	LITERATURA.....	67

Zkratky

ACAT	Acetylkoenzym A-cholesterol acyltransferasa
AD	Alzheimerova choroba
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
ATP	Adenosintrifosfát
BuChE	Butyrylcholinesterasa
CAT	Cholinacetyltransferasa
COX-2	Cyklooxygenasa-2
CT	Počítačová tomografie
GABA	Kyselina γ -aminomáselná
HPLC	Vysokokapacitní kapalinová chromatografie
ICP	Inductively coupled plasma
IL-1b	Interleukin-1b
IL-6	Interleukin-6
KBA	Kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy
MRI	Magnetická rezonance
NGF	Nervový růstový faktor
NMDA-receptor	N-methyl-D-aspártátový receptor
PAF	Destičkový aktivační faktor
PEP	Serinové peptidasy
PET	Pozitronová emisní tomografie
PG-E2	Prostaglandin-E2
SFE	Supercritical fluid extraction
TNF α	Tumor necrosis faktor alfa
TRH	Thyrotropin-releasing hormon

1. ÚVOD

Zvyšování standardů zdravotnické péče a zlepšení přežívání dříve smrtících chorob spolu se zvyšujícím se průměrným věkem populace vede v současnosti k zvýšené manifestaci chorob, které ještě před několika desetiletími byly označovány za vzácné až raritní. Jedná se především o skupiny podle etiologie označované jako civilizační a primárně idiopatické.

Jako civilizační označujeme ta onemocnění, u kterých lze vysledovat závislost výskytu na změněných, moderních podmínkách života, charakterizovatelné snížením fyzické zátěže, vyšší spotřebou energeticky bohaté stravy s narůstajícím podílem jednoduchých cukrů a tuků, růstem dlouhodobého psychického zatížení s oblibou označované jako chronický stres a v neposlední řadě vyšší výskyt toxických látek v životním prostředí. Lze bezesporu hovořit o epidemii celosvětově vázanou na popsanou formu životního stylu manifestující se onemocněními kardiovaskulárního systému (chronická ischemická choroba srdeční ve všech formách, hypertenze, aterosklerosa a chronické ischemické choroby končetin), gastrointestinálního systému (peptická vředová choroba, funkční obstrukce, kolorektální karcinom, nealkoholická steatohepatitida, alkoholická cirhosa), respiračního systému (pneumokoniosy, bronchogenní karcinom, chronická obstrukční plicní nemoc) a celého tkáňového metabolismu (hyperlipidemie, hypercholesterolemie, diabetes mellitus).

Primárně idiopatické choroby jsou sice po vyloučení všech ostatních možností bez známého etiologického činitele, nicméně kupříkladu průběh a tíži astmatu prokazatelně ovlivňuje kvalita ovzduší. Důležitým faktorem je potlačení přirozené selekce populace a následná změna jejího genofondu, který spolu s familiárním výskytem řady chorob, zvyšuje incidenci této skupiny chorob. Jsou to změny neovlivnitelné a proto nezbyvá pohlízet na ně jinak než jako na dlouhodobé vývojové trendy. Jako charakteristické zástupce můžeme označit astma bronchiale, idiopatické střevní záněty typu Crohnovy choroby a ulcerosní kolitidy nebo právě neurodegenerativní onemocnění. Zvyšování průměrně dosahovaného věku potom činí z dříve minoritního, ba často tabuisovaného, okruhu neurodegenerativních chorob příčinu vysoké nemocnosti a úmrtnosti v seniu. Dopustím-li se antropomorfisace, lze říci, že zrádnost těchto onemocnění tkví především ve snížení kvality života geriatrických pacientů, alteraci jejich kognitivních funkcí a celkové degradaci dříve zralé a soběstačné osobnosti.

Neurodegenerativní onemocnění:

a) **Parkinsonova choroba**, označována také jako hypertonicko-hypokinetický syndrom, je onemocněním substantia nigra, která ovlivňuje pomocí dopaminergních drah GABAergní buňky striata.

Častou příčinou této choroby je dědičná zátěž, která v období mezi středním a vysokým věkem vede k degeneraci dopaminergních neuronů. Dalšími příčinami jsou traumata, záněty (encefalitida), porucha krevního zásobení (ateroskleróza), nádory a otravy. V důsledku toho dochází k zániku buněk substantia nigra, zčásti pravděpodobně apoptosou připisovanou často volným, reaktivním formám kyslíku. K projevení symptomů musí ale dojít k výpadku více než 70 % neuronů substantia nigra. Dochází ke značnému snížení odpovídající dopaminergní inervace a následnými pochody k nadměrné inhibici thalamu.

Hlavními příznaky vzniklého nedostatku dopaminu je potlačení volní motoriky, hypokineze, rigor, nekonstantní klidový třes, ohnuté držení těla, zvýšená vagotonie (slinění, pocení, slzení), mimická strnulost, tichá, monotónní a smazaná řeč, mikrografie a nakonec dochází i k dalším poruchám jako např. deprese a demence, které jsou vyvolány dalšími lézemi. Mnoho pacientů umírá cca po 10 letech na bronchopneumonii.

b) Alzheimerova choroba (AD)

Tato choroba byla poprvé popsána na začátku 20. století psychiatrem Aloisem Alzheimerem, který objevil zvláštní formu demence u 51-leté pacientky a sledoval ji 5 let.

Jedná se o nejrozšířenější formu demence vůbec (až 70 %). Náleží mezi několik nejzávažnějších a také nejnákladnějších chorob. Je to progresivně se zhoršující a irreversibilní onemocnění mozku.

Nejde o onemocnění geneticky jednotné. Zvláště těžká forma AD je autozomálně dominantně dědičná. Je prokázáno, že dochází k defektům na chromozomech 1, 12, 14, 19 nebo 21. Dochází k degeneraci zejména (predisponovaných) cholinergních neuronů (poškození ascendentních cholinergních traktů z nucleus basalis Meynerti do kůry) v neokortexu a hippocampu, přičemž jsou postiženy i jiné systémy související s učením a pamětí (CRF = Corticotropin Releasing Factor, somatostatinový, neurotenzinový, noradrenolinový a serotoninový). Systém obsahující CRF je přitom postižen první (v časně fázi nemoci), kdežto pokles ACh (acetylcholinu) je zjišťován až v terminálních stádiích nemoci. Dále vznikají senilní plaky (primární léze), tvoří se neurofibrilární smotky narušující cytoskelet a tím i činnost neuronů a snižuje se počet synapsí v CNS. Je zde také patrná zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku a oxidační stres.

Příčiny AD mohou být genetické, virové, zánětlivé, zhoršení činnosti mozku nebo snížená funkce neurotransmiterů. Můžeme ji rozdělit na onemocnění familiární, tedy dědičné, a na sporadické onemocnění vyššího věku, které představuje asi 80% výskytu AD.

AD se projevuje ve 3 stádiích: 1. stádium je mírná forma trvající 2-4 roky, pacient často ztrácí věci, zabloudí na známých místech, dochází ke změnám osobnosti, dezorientaci a obtížnému hledání slov; 2. stádium je forma středně těžká trvající 5-10 let, zhoršují se mentální funkce, dochází k výrazným výpadkům paměti, poruchám chování, nesnášenlivosti, hašteřivosti, zhoršení řečové schopnosti a halucinacím. Tento stav vyžaduje trvalý dohled. 3. stádium už je těžkou formou, která trvá 1-3 roky, kdy je pacient plně závislý na pečovateli, dochází k rozkladu celé osobnosti, člověk není schopen poznat ani členy rodiny, trpí inkontinencí, má sklon k podvýživě, infekcím a dekubitům.

V terapii AD se uplatňují v současnosti hlavně látky ovlivňující osud ACh a AChE. Prakticky užívané jsou: takrin (Cognex[®]), donepezil (Aricept[®]), galanthamin (Reminyl[®]) a rivastigmin (Exelon[®]). Terapie je pak vhodně doplněna i antioxidanty (vit. E, C), popř. estrogeny, protizánětlivými látkami, kortikoidy, inhibitory amylooxidasy, nootropiky, neuroleptiky a hypnotiky. Pacienti se nejčastěji léčí na psychiatrii, chirurgii a interním oddělení.

Ale i v oblasti přírodních látek se provádí výzkum látek ovlivňujících osud ACh, AChE (jako stimulatory nikotinových receptorů – např. arekolin; M₂ agonisté – např. himbacin; nebo acetylkarnitin); ACAT - pyripyropen A; produkci amyloidu - tanshinon I; dále přírodních neuroprotektiv - ginkgolid B a inhibitorů propylendopeptidasy - PEP.

Jednou z rostlin, kterou se vědci zabývají v souvislosti s jejím inhibičním účinkem na AChE je také *Chelidonium majus* L.. Má se zato, že by některé látky v ní obsažené mohly mít pozitivní vliv na průběh AD. Účinnost je zatím zkoušena na homogenátu mozku.

2. CÍL PRÁCE

Cílem mojí diplomové práce bylo společně s diplomantkami Šárkou Brožovou, Dagmar Kubincovou a Janou Nagyovou:

1. provést extrakci 41,8 kg suché nati s kořeny pomocí perkolátoru. Poté tento získaný primární extrakt vyčistit a to filtrací a následným oddestilováním rozpouštědla na vakuové odparce. Dále bylo nutno připravit sekvenčním postupem výtřepky s jednotlivými typy alkaloidů: šlo o dva diethyletherové výtřepky (získané po předchozí alkalizaci primárního extraktu uhličitanem sodným a hydroxidem draselným), které byly následně okyseleny kyselinou chlorovodíkovou, vzniklé kvartérní jodidy byly po přidání jodidu draselného vytřepány chloroformem a po následné alkalizaci extraktu amoniakem získány další kvartérní jodidy vytřepáním do směsi chloroform + ethanol 8,5:1,5.
2. zpracovat část diethyletherového výtřepku připraveného vytřepáním primárního extraktu roztokem uhličitanu sodného s cílem izolovat jeden alkaloid v čisté formě, stanovit jeho základní fyzikálně-chemické charakteristiky.
3. podílet se na stanovení aktivity vůči AChE (z homogenátu mozku) in vitro.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Alzheimerova choroba a její terapie

3.1.1. Alzheimerova choroba

AD je nejčastější příčina demence vůbec. Náleží mezi několik nejzávažnějších a také nejnákladnějších chorob. Závažnost spočívá v četnosti, míře postižení kvality života nemocných i v tom, že AD představuje jednu z nejčastějších primárních příčin smrti.¹ Jedná se o progresivní neurodegenerativní onemocnění charakterizované postupnou ztrátou paměti a schopnosti učit se (demenci) a poruchami chování. Prevalence tohoto onemocnění vzrůstá s věkem (ve věku 65 let se odhaduje na 10 %, ve věku 85 let na 50 %)

Etiologie AD je neznámá. Klinicky se AD diagnostikuje obtížně na základě sledování kognitivních funkcí a změn v chování; pro odlišení od jiných typů demence se začínají používat moderní zobrazovací metody (CT, MRI, PET) a sledování biochemických markerů. Histopatologické změny v mozku pacientů s AD jsou prokazatelné většinou až *post mortem* a patří k nim:

- extracelulární β -amyloidní plaky a intraneuronální neurofibrilární uzlíky
- snížené množství ACh a CAT
- změny vyvolané nadbytečnou tvorbou reaktivních forem kyslíku a oxidačním stresem

Molekulární mechanismy vedoucí k těmto změnám jsou do značné míry objasněny, ale vzájemné vztahy mezi nimi nikoliv.²

Je tedy známo, že vlivem různých faktorů jako jsou genetické predispozice, defektní prekursor β -amyloidu, faktory životního prostředí, toxiny nebo zánět dochází k tomu, že fibrily β -amyloidu mohou reagovat s receptory na povrchu buněk, jako je RAGE (receptor for advanced glycation end products) a scavenger receptor (RA). Následně se tvoří volné kyslíkové radikály, které mohou – pravděpodobně prostřednictvím depolarizace buněčné membrány a aktivace NMDA-receptorů – zvyšovat neuronální intracelulární koncentraci Ca^{2+} . Kyslíkové radikály a Ca^{2+} podporují buněčnou smrt neuronů. V mikroglialních buňkách stimuluje aktivace RAGE a RA tvorbu popř. uvolňování oxidu dusnatého, prostaglandinů, excitotoxinů, cytokinů, TNF α , tumor growth faktoru (TGF β) a růstového faktoru pro fibroblasty (b-FGF). Vzniká zánět, který rovněž postihuje neurony. Zánik neuronů může být urychlen nedostatkem NGF nebo NGF-receptorů. Zánik neuronů jde ruku v ruce se sníženou tvorbou a koncentrací neurotransmiterů v mozku. Obzvláště výrazně se to týká ACh. V kůře

velkého mozku a v hippocampu se nachází až o 90 % snížená koncentrace CAT, enzymu, který je potřebný pro tvorbu ACh. Klesají ale také koncentrace dalších neurotransmiterů jako noradrenalinu, somatotropinu, serotoninu, neuropeptidu Y, substance P a kortikoliberinu (CRH).³

3.1.2. Terapie AD

Protože víme, že etiologie AD ještě není plně objasněna, vychází se ve farmakoterapii ze známých etiologických řetězců. Nejrozšířenějším typem biologické terapie AD je farmakoterapie, zaměřená především na ovlivnění poznávacích a výkonných funkcí. V současné době jsou založeny na důkazech 2 farmakoterapeutické postupy:

- užití inhibitorů acetylcholinesteras
- užití parciálních nekompetitivních inhibitorů NMDA receptorů excitačních aminokyselin (memantin)

3.1.2.1. Inhibitory mozkových cholinesteras

Užití **inhibitorů mozkových cholinesteras** je nejužívanější postup v terapii AD, především lehkých až středních forem. Tyto látky náležejí do skupiny kognitiv, tedy farmak ovlivňujících příznivě centrální acetylcholinergní transmisi. Předpokládá se, že acetylcholinergní neurony tvoří substrát pro reverberační okruhy, které zprostředkují krátkodobou paměť a paměťovou konsolidaci.

U AD je porušena především presynaptická část acetylcholinergního neuronu. Je snížena aktivita enzymu CAT, syntetizujícího Ach z cholinu a z acetyl-koenzymu A. Pre- i postsynaptické muskarinové i nikotinové receptory zůstávají relativně dobře zachovány. Po uvolnění z vazby na receptory je ACh odbouráván acetylcholinesterasami a u AD i butyrylcholinesterasami. U AD je sníženo uvolnění ACh z presynaptických zakončení. Toto uvolnění je facilitováno stimulací nikotinových presynaptických receptorů. Acetylcholinesterasy mají několik různých forem. V mozku zdravého člověka převládá tetramerní forma G4 a pouze minoritní je monomerní forma G1. U AD roste podíl G1 a klesá G4. Navíc se u AD uplatňuje další enzym, který je za normálních podmínek naprosto minoritní – BuChE. Ta je novotvořena aktivovanými gliovými elementy v oblasti alzheimerovských plaků a podílí se na odbourání ACh. Dochází k situaci, kdy klesá počet molekul AChE a stoupá počet molekul BuChE.¹ Obě formy jsou rozlišeny geneticky, strukturně a také reakční kinetikou. V lidském mozku se BuChE nachází v neuronech, gliových buňkách, stejně tak jako v neuritovém plaku a tangles u pacientů s AD. Zatímco

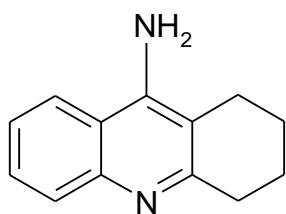
acetylcholinová aktivita snižuje progresivitu AD v mozku nemocných pacientů, BuChE aktivita může zvýšit progresivitu, záleží však na dalších faktorech. Na základě různých modelů (a u pacientů s pokročilou AD) se však zdá, že BuChE může určitou měrou nahradit AChE při hydrolýze mozkového ACh.⁴ BuChE se ukázala skutečně novým cílem v terapii AD.⁵

Inhibitory acetylcholinesteras představují chemicky nejednotnou skupinu, jednotlivé preparáty se také liší v typu inhibice a v tom, zda podstatně odbourávají či neodbourávají molekuly BuChE. Existují 3 typy inhibice acetylcholinesteras: Reverzibilní, irreverzibilní a pseudoirverzibilní.¹

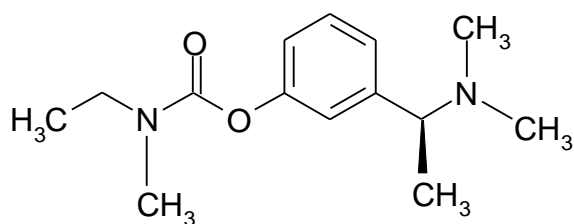
V současnosti je spektrum klinicky použitelných látek relativně úzké.^{6,7} Např. donepezil a ikopezil jsou selektivní vůči AChE, zatímco takrin a heptylfysostigmin má vysokou aktivitu k BuChE; všechny čtyři sloučeniny zvyšují hladinu ACh v myším mozku. Donepezil a ikopezil mají však výhodnější terapeutický index než neselektivní inhibitory takrin a heptylfysostigmin (z hlediska posouzení centrálních a periferních účinků).⁸

V naší republice jsou používány 3 inhibitory AChE: rivastigmin, donepezil a galanthamin.¹

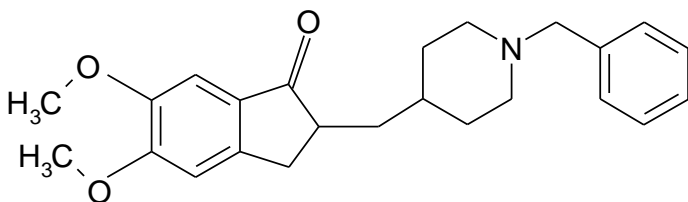
- reverzibilní AChEI – takrin (Cognex[®]), donepezil (Aricept[®]), galanthamin (Reminyl[®])
- pseudoirverzibilní – rivastigmin (Exelon[®])
- irreverzibilní - metrifonát (dichlorvos), který se v praxi ale nevyužívá.²



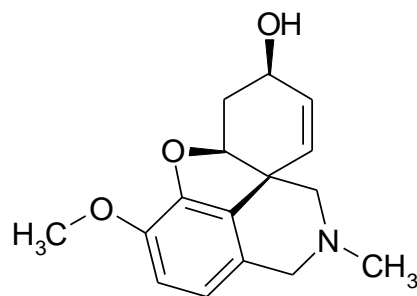
takrin



rivastigmin



donepezil



galanthamin

3.1.2.2. Inhibitory NMDA receptorů

Nekompetitivní inhibitory NMDA receptorů excitačních aminokyselin: také tento postup je založen na důkazech (evidence-based). Zatím je klinicky používaná pouze jediná látka – memantin (Exiba).

Kombinace memantinu a inhibitorů AChE je racionální, používá se u středních Alzheimerových demencí, avšak je finančně velmi náročná.¹

3.1.3. Fytoterapie AD

Ve farmakoterapii AD jsou v současné době perspektivní i některé přírodní látky.

3.1.3.1. Látky ovlivňující osud ACh a AChE

- stimulatory nikotinových receptorů (nAChRs): galanthamin (*Galanthus woronovii*, *Narcissus sp.*); duální inhibitor, dobře snášen, určité periferní cholinergní účinky, podstatně účinnější než takrin; některé analogy arekolinu (studie *in vitro*),
- M₂ antagonisté muskarinu: himbacin
- látky jiného působení: acetylkarnitin – působí proti úbytku glukokortikoidních receptorů
- inhibitory AChE:

a) huperzin - Cerebra[®] (*Huperzia serrata*, Lycopodiaceae), dlouze působící inhibitor, neuroprotektivní aktivita, kognitivní efekt, splňuje ideální kritéria pro symptomatickou léčbu AD.

b) saligenamid C (*Sarcococca saligna*, Buxaceae) výraznější zásah do BuChE.

c) zeatin (*Fiatoua villosa*, Orchidaceae; *Zea mays*, Poaceae), potravinářské rostliny, IC₅₀ 1,9.10⁻⁴ M, také inhibice tvorby β-amyloidu. Přírodní cytokinin, široce rozšířen.

d) dekursinol (*Angelica gigas*, Apiaceae), vysoká inhibiční aktivita vůči AChE *in vitro*.

e) ursolová kyselina (*Majorana hortensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, Lamiaceae), vysoký inhibiční efekt vůči AChE.

f) arisugaciny: meroterpenoidy

- arisugacin A, (*Penicillium* sp., IC_{50} $1 \cdot 10^{-6}$ M); provedena totální syntéza.

- arisugacin B (IC_{50} $25,8 \cdot 10^{-6}$ M).

- cyklofostin (*Penicillium* WK-4164 a FO-4259) – ovlivnění také BuChE.

g) dehydroevodiamin (*Evodia rutaecarpa*, Rutaceae) – inhibice AChE, anti-amnestický efekt. Silnější než takrin, kombinace úč.: inhibice AChE a zvýšení vasodilatace.

h) (+)-homomoenjodaramin, moenjodaramin (*Buxus hircana*, Buxaceae).

ch) cykloprotobuxin C, cyklovirobuxein A, cyklomikrofilin A (*Buxus papillosa*, Buxaceae).

i) α -onocerin (*Ononis spinosa*, Fabaceae).

j) α -viniferin (*Caragana chamlague*, Fabaceae). Aktivita specifická, reverzibilní a nekompetitivní.

k) cynatrosidy A, B, C (*Cynanchum atratum*, Ranunculaceae), významná inhibice

- A- β -D-oleandropyranosid.

- B-cymaropyranosyl-digitoxopyranosyl- β -D-oleandropyranosid; nejaktivnější.

- C-cymaropyranosyl-digitoxopyranosyl- α -D-oleandropyranosid.

3.1.3.2. Inhibitory ACAT

- pyripyropen A (*Aspergillus fumigatus*).

3.1.3.3. Látky ovlivňující produkci amyloidu

- tanshinon I (*Salvia miltiorrhiza*, Lamiaceae).

3.1.3.4. Neuroprotektiva

- ginkgolid B (BN-520121, *Ginkgo biloba*, Ginkgoaceae; Ipsen-Beaufour), antagonist PAF (také léčba septického šoku). Ochrana neuronů při mozkové hypoxii (potřeba nižší tenze kyslíku), snížení viskozity krve.

3.1.3.5. Inhibitory propylendopeptidasy (PEPI)

- PEP - jsou široce rozšířeny v různých tkáních, také v lidském mozku, kde hydrolyzují neuropeptidy s obsahem prolinu, které participují na učení a paměťových procesech (vasopresin, substance P, TRH). Jejich zvýšená hladina je pozorována u neurodegenerativních chorob jako výrazná deprese, manie, demence Alzheimerova typu; patrně zodpovědná za metabolismus C-terminální části amyloidního prekurzorového proteinu, zodpovědného za degeneraci neuronů; navozuje imunoreaktivitu zodpovědnou za procesy rychlejšího stárnutí mozku. Inhibitory PEP mají anti-amnestický efekt.

a) fenantrenové deriváty (*Salvia deserta*, Lamiaceae).⁹

Velmi významnou roli hraje studium přírodních látek, protože struktura těchto poměrně složitých molekul významně modifikuje účinek nejen ve smyslu vlastního efektu, ale především vedlejších účinků. Inhibice AChE byla pozorována např. u obsahových látek z Tea Tree Oil¹⁰, steroidních alkaloidů ze *Sarcococca saligna*¹¹, α -onocerinu z *Lycopodium clavatum*¹². Velmi významné je však studium (resp. použití) alkaloidů především isochinolinového typu, vyskytujících se v různých zdrojích: zástupcích čeledi Amaryllidaceae: galanthaminu a jeho současných derivátů^{13,14,15,16} a chinolinové báze z čeledi Lycopodiaceae, jako je huperzin A a jeho deriváty^{17,18,19,20}. U některých přírodních látek byla pozorována spřažená aktivita: inhibují jak AChE tak BuChE^{11,21}. Při syntéze nových léčiv tohoto typu je velmi zásadní stereochemie: terapeuticky významně aktivní jsou pouze některé stereoizomery²² (a tento stav se uplatňuje i z hlediska ovlivnění AChE a BuChE, jak je to vidět např. u stereoizomerů huperzinu A²¹). Tento faktor musí být významně zohledněn, protože jinak dochází v řadě případů k výraznému vzestupu nežádoucích účinků.²³

Jednou z rostlin, která je v současné době zkoumána je také *Chelidonium majus* L.

3.2. *Chelidonium majus* L. (vlaštovičník větší)

Obr. 1: *Chelidonium majus*²⁴



Obr. 2: *Chelidonium majus*²⁵



3.2.1. Synonyma

Chelidonium grandiflorum DC.; *Chelidonium haematodes* MOENCH; *Chelidonium japonicum* THUNB.; *Chelidonium laciniatum* MILL.; *Chelidonium luteum* GILIB.; *Chelidonium maius* L.; *Chelidonium murale* REN.; *Chelidonium ruderae* SALISB.; *Chelidonium umbelliferum* STOCK.²⁶

3.2.2. Systematika

Vlaštovičník větší (*Chelidonium majus* L.) je rostlinný druh z čeledi makovitých (Papaveraceae).²⁷

3.2.3. Botanický popis

Jde o vytrvalé byliny; lodyhy 30 – 90 (-100) cm vysoké, větvené, roztroušeně chlupaté²⁸ s krátkým a rozvětveným oddenkem. Celá rostlina je proniknuta mléčnicemi se žlutým až oranžovým mlékem. Listy střídavé, přízemní i stonkové stejnotvaré, dolní řapíkaté, horní přisedlé.²⁷ Čepel jednoduše až přetrhovaně lichozpeřená, na líci sytě, na rubu sivě zelená, tenká. Lístky vejčité, laločnatě vroubkované, terminální 3laločný. Květy v chudém okolíku – květenství tvoří 2-6květý okolík; květy 1-2 cm v průměru.²⁸ Jsou oboupohlavné, zdánlivě pravidelné.²⁷ Kalich žlutý, prchavý; kališní lístky 2, volné; korunní lístky 4, obvykle celokrajné. Blizna dvoulaločná, čnělka velmi krátká; tyčinky žluté, s kyjovitě ztlustlými nitkami.²⁸ Plody jsou tobolky, kostrbaté, čárkovité, otevírající se dvěma chlopněmi od base k vrcholku.²⁷ Tobolky jsou 3-8 cm dlouhé, tvarem připomínající šešuli.²⁸ Semena až 1,5 mm dlouhá, černá, vejčitá²⁷ s masitým hřebenitým výběžkem.²⁸ Kveté v květnu až září.²⁷

Jde o jediný druh se 3-4 poddruhy, někdy považovanými za samostatné druhy:²⁸

- var. *crenatum* FRIES: korunní lístky vroubkované; blizna dlouhá, otáčivá; u této variety musíme vzít v úvahu křížení mezi var. *maius* a var. *tenuifolium*.
- var. *fumariifolium* (DC.) KOCH (Syn. *Chelidonium laciniatum* MILL. var. *fumariaefolium* DC.): vzrůst menší, listy se zkrácenými řapíky.
- var. *maius*: listy poměrně pevné, čepele jen málo řezané, vroubkované, matné, všechny směřující dolů, nanejvýš ty nejspodnější postavené. Korunní lístky celookrajové. Podle toho může být *Chelidonium* označeno: - f. *grandiflorum* WEIN; - f. *latipelatum* MOLL.; - f. *loehrianum* (ORTH) MGF. (syn. *Chelidonium majus* L. var. *laciniatum* (MILL.) KOCH f. *serrata* (ORTH) FAST, *Chelidonium majus* L. var. *loehriana* ORTH, *Chelidonium majus* var. *serrata* ORTH); - f. *pleniflorum* CHRISTIANSEN (Syn.

Chelidonium majus L. var. *pleniflorum* LAW.); - f. *semiplenum* DOMIN. Ačkoli je rozdělení var. *maius* do různých forem duchaplné, stále ale zůstává sporné.

- var. *tenuifolium* LILJ. (syn. *Chelidonium laciniatum* MILL., *Chelidonium majus* L. var. *laciniatum* (MILL.) KOCH, *Chelidonium majus* L. var. *quercifolium* T HUILL)²⁶: rostliny s dřípenými listy a s dřípenými nebo vroubkovanými (vzácně jen špičatými) korunními lístky. U nás je tato varieta doložena pouze z botanických zahrad nebo zplanělá v jejich okolí.

Odchylky ve vzrůstu, velikosti květů a odění stopek a kalichů mají nepatrnou taxonomickou hodnotu.²⁸

Také existují různé karyotypy: v Evropě a Asii jsou diploidní (mají 12 chromozomů – $2n = 12$); v Japonsku a ve východní Evropě $2n = 10$; $2n = 20$ v Japonsku. V Polsku se vyskytuje tetraploidní vyšlechtěná kultura ($2n = 24$). Pěstuje se zde jako *Chelidonium majus* L. „Cynober“. Optimální čas výsevu je na podzim. Obsah alkaloidů nezávisí na době sběru rostliny, ale jenom na výnosu drogy.²⁶

3.2.4. Ekologie a cenologie

Návsi, zahrady, rumišťe, okraje cest, akátiny, humózní háje a sutě, na mírně zastíněných, vlhkých a dusíkem bohatých půdách. Diagnostický druh řádu Chelidonio-Robinetelata, častý též ve společenstvech svazu Galio-Alliarion, Sambuco-Salicioncapreae, popř. *Aegopodium podagrariae*.

3.2.5. Celkové rozšíření

Jižní a střední Evropa, jižní Skandinávie; mírné až subarktické pásmo Asie včetně Japonska a střední Číny. Zavlečen do Severní Ameriky. - Protandr. Entomogam. Myrmekochor.

3.2.6. Rozšíření v ČR

V termofytiku a mezofytiku obecný až roztroušený, v oreofytiku vzácný. Těžiště výskytu v planárním a kolinním stupni, vzácně zasahuje až do stupně submontánního (max. Krkonoše, Obří důl, 850 m).²⁸

3.3. Drogy získávané z *Chelidonium majus* L.

3.3.1. *Chelidonii radix* (kořen vlaštovičnicku většího)

- drogu získáváme sběrem volně rostoucích rostlin, pěstováním; v Polsku pěstováním druhu „Cynober“ a z vysoko výnosových sazenic.
- droga se užívá sušená.

3.3.2. *Chelidonii herba* (nat' vlaštovičnicku většího)

- drogu získáváme sběrem volně rostoucích rostlin a v Polsku pěstováním odrůdy „Cynober“.
- dnes se upřednostňuje používání sušené nati rostliny (*Chelidonii herba*), přičemž je nutno brát v potaz, že obsah alkaloidů může kolísat dle podmínek sušení. Vhodné se jeví krátké zahřátí na 105 °C s následným sušením při pokojové teplotě, či při 60 °C. Zřetelně nižší obsah alkaloidů je získáván, pokud se suší jen při pokojové teplotě, či při 60 °C bez předchozího zahřátí na 105 °C. Základem pro tento poznatek je, že zahřátí přes 100 °C inaktivuje enzymy odbourávající alkaloidy. Vedle podmínek sušení ovlivňuje obsah a spektrum alkaloidů i původ a vegetační perioda rostliny.²⁶

3.4. Obsahové látky *Chelidonium majus* L.

3.4.1. Alkaloidy

Alkaloidy jsou hlavními obsahovými látkami vlaštovičnicku. V rostlině jich bylo popsáno již více než 30. Za zmínku stojí, že z tohoto počtu jich 15 poprvé izoloval a převážně i strukturně určil J. Slavík.²⁷

3.4.1.1. Alkaloidy podle chemické struktury:

a) benzofenanthridinový typ (α - naftofenanthridinový typ):

- alkaloidy jsou charakteristické svým tetracyklickým kruhovým systémem, který v podstatě představuje naftalenové jádro s navázanou isochinolinovou strukturou. Tato skupina se dá rozdělit na 2 podskupiny:
 1. obsahuje terciární dusík (např. chelidonin) : **terciární alkaloidy**
 2. obsahuje kvartérní dusík s 2 centrálními aromatickými prstencovými systémy (např. sanguinarin) : **kvartérní alkaloidy**

- b) protoberberinový typ
 - tyto alkaloidy jsou zde zastoupeny: tetrahydroprotoberberiny (např. stylopin) : protoberberiny (např. berberin)
- c) protopinový typ
 - sem náleží protopin, alkaloid typický pro čeleď Papaveraceae
- d) ostatní
 - deriváty benzylochinolinu – 3 typy, které jsou zde zastoupeny jen v menším množství : chinolizidin, spartein (v *Chelidonium herba*); a aporfinový alkaloid magnoflorin (*Chelidonium radix*)²⁶

KBA jsou relativně malou skupinou přírodních produktů. Tyto deriváty isochinolinových alkaloidů jsou nápadné pro jejich jasné barvy. V současné době jich je známo 18. KBA alkaloidy jsou nejčastěji rozšířeny v mnoha druzích čeledí Papaveraceae, Fumariaceae a Rutaceae. Nejhojnějšími zdroji KBA kromě *Chelidonium majus* jsou také *Sanguinaria canadensis*, *Dicranostigma lactuoides*, *Macleaya cordata*, *M. microcarpa* a některé druhy *Bocconia* a *Zanthoxylum*. Sanguinarin a chelerythrin, které byly objeveny už v 19. století, jsou 2 nejznámější a nejběžněji dostupné z KBA. KBA vykazují vysokou citlivost proti nukleofilním činidlům. Specifická a velmi zajímavá kapitola v chemii KBA je uspořádání volných basí. V alkalickém prostředí se KBA změní na bimolekulární aminoacetalový derivát propojený můstkem s kyslíkovým atomem.²⁹

Novým alkaloidem izolovaným z *Chelidonium majus* je (-)-turkiyenin.³⁰ Chemickou strukturou patří mezi kvartérní aporfíny.²⁷

Výzkumy mléčné šťávy získané z lodyhy *Chelidonium majus* ukázaly, že čerstvá, ještě nezoxidovaná mléčná šťáva obsahuje větší množství dihydrokoptisinu, sanguinarinu, chelerythrinu, berberinu a koptisinu. Pokud necháme mléčnou šťávu stát několik dní na vzduchu nebo provádíme chromatografii bez použití redukčního činidla (jako např. 0,4% roztok merkaptoethanolu), dochází k oxidaci a už nelze prokázat žádný dihydrokoptisin, pouze koptisin. Lze předpokládat, že v čerstvém, neoxidovaném latexu z vlašovičnicku se vyskytují i jiné, lehce oxidovatelné alkaloidy jako např. dihydroberberin. Tyto se ale oxidují stejně jako dihydrokoptisin při zpracovávání rostliny, např. při sušení.

Zajímavé se zdá být i **rozdělení obsahových látek čerstvého vlašovičnickového latexu**: všech 5 prozkoumaných alkaloidů, jmenovitě berberin, chelerythrin, koptisin, dihydrokoptisin a sanguinarin, je obsaženo ve vakuolách spolu s chelidonovou kyselinou a enzymy jako jsou

hydrolasy a blíže nespecifikované fenolické sloučeniny. Sanguinarin a chelerythrin mají přitom větší afinitu k vakuolovému obsahu než berberin, koptisin a dihydrokoptisin a proto mohou být z vakuol uvolněny do mléčné šťávy až naposled. Sanguinarin a chelerythrin při volném stání roztoku způsobují rozklad tonoplastu, což je asi základ přesné izolace. Enzym fenoloxidas je obsažen v mléčné šťávě, ne ve vakuolách. Přítomnost enzymů v rostlině, získávaných společně s aktivními účinnými látkami, je možná základem pro dříve často popisované „nejisté působení“ preparátu vlašovičníku – přítomnost enzymů může vést k přeměnám či vzniku méně aktivních účinných látek.²⁶

Byly provedeny extrakce alkaloidů *Chelidonium majus* L. různými metodami (tradiční vymačkávání a příprava čaje, mikrovlnná extrakce a SFE). Extrakty byly vodné a propylenglykolové. Pro srovnání extrakčních metod byl výtěžek ohodnocován podle celkového obsahu alkaloidů zjištěného spektroskopicky. Nejvyšší výtěžek alkaloidů byl získán mikrovlnovou extrakcí a klasickou infuzí. Distribuce alkaloidů v rostlině byla zkoumána tenkovrstvou chromatografií s densitometrií. Koncentrace alkaloidů v extraktu je značně rozdílná v závislosti na extrakční metodě. Roztok získaný SFE obsahuje koptisin a chelidonin, ale berberin může být získán pouze mikrovlnnou extrakcí. Extrakt s vysokým obsahem koptisinu můžeme získat jedině SFE následovanou mikrovlnnou extrakcí.³¹

Distribuce alkaloidů v rostlině je nerovnoměrná, mění se v průběhu vegetace, v závislosti na klimatických podmínkách a stáří rostliny. Nejbohatším orgánem je kořen, obsah alkaloidů v něm často dosahuje až 2-3 %, kulminuje na konci vegetačního období, zatímco při kvetení rostliny klesá. U víceletých rostlin je obsah alkaloidů v kořeni výrazně vyšší než v prvním roce vegetace.²⁷

3.4.1.2. Alkaloidy kořene

Obsah alkaloidů v droze **Chelidonii radix** závisí na původu a podmínkách sušení drogy a dosahuje – 0,8 až 2 %.²⁶

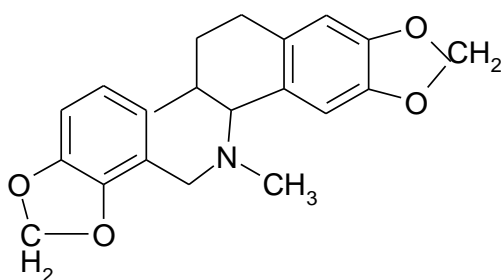
Hlavními alkaloidy kořene jsou **koptisin** (0,15-0,57 %) a **chelidonin** (0,5-1,02 %)²⁶, významný je i obsah **sanguinarinu**, **chelerythrinu**, **berberinu** a kvartérního aporfínového alkaloidu **magnoflorinu**.²⁷

Jako **vedlejší alkaloidy** se tu nacházejí 6-methoxydihydrochelerythrin, 6-methoxydihydrosanquinarin, dihydrosanquinarin, oxysanquinarin, dihydrochelerythrin, homochelidonin, β -allocryptopin, chelilutin, chelamin a korysamin.²⁶ Mezi nové alkaloidy kořene, které byly popsány pouze zřídka kdy, patří chelamin $C_{20}H_{19}NO_6$ a chelamidin $C_{21}H_{23}NO_6$. Podle spektrální analýzy jim náleží struktura 10-hydroxychelidoninu a 10-

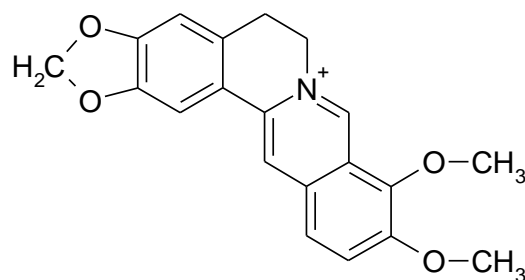
hydroxyhomochelidoninu. Pouze občas byl izolován také alkaloid chelimerin (meso-forma 1,3-bis(hydrosanguinarinyl)acetonu).³²

Z kořene také byly izolovány 2 aporfinové alkaloidy: korydin a norkorydin. Identifikovány byly pomocí IR, UV, ¹H-NMR a mass spektrálního srovnání.³³

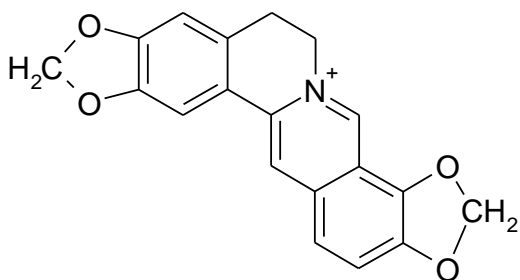
Chelidonin



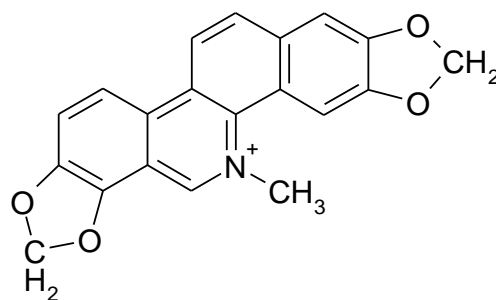
Koptisin



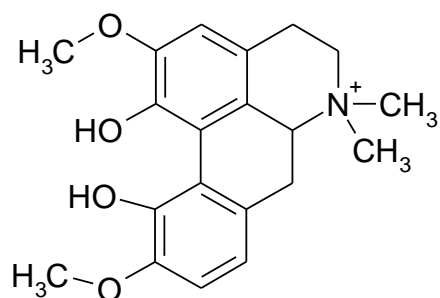
Berberin



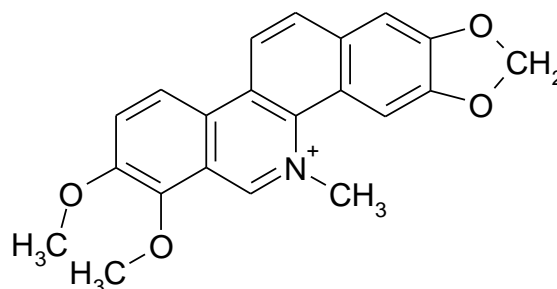
Sanguinarin



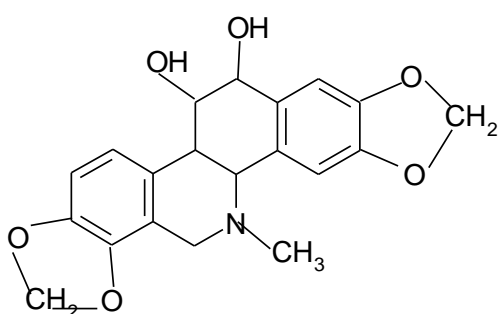
Magnoflorin



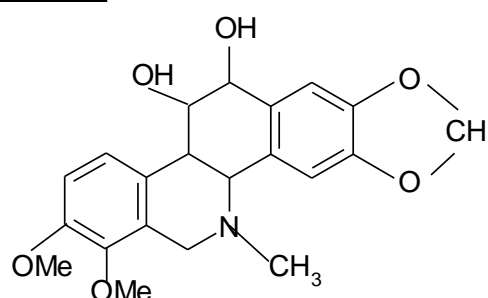
Chelerythrin



Chelanin



Chelamidin

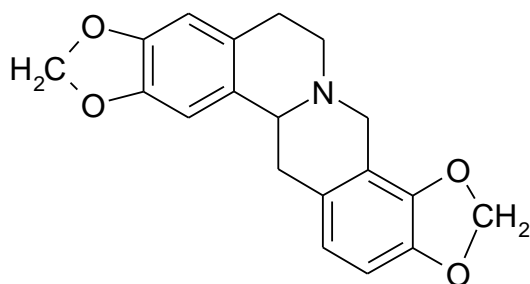


3.4.1.3. Alkaloidy nati

V nadzemních částech rostliny je zastoupení alkaloidů nižší (0,5-1,5 %) a podléhá v průměru vegetace významným kvalitativním změnám.²⁷ Podle jiné práce se obsah alkaloidů v nati pohybuje podle původu a podmínek sušení od 0,01 do 1 %. Jde především o benzyloisochinolinové deriváty benzophenanthridinového, protoberberinového a protopinového typu.²⁶ Jako **hlavní alkaloidy** jsou uváděny **chelidonin**, **koptisin**, **stylopin**, **sanguinarin**, **chelerythrin**^{26,27}, **berberin** a **protopin**. V mnohem nepatrnějším množství zde nalezneme ještě asi 20 alkaloidů. Ve velmi nepatrném množství (0,3 mg/kg) je v droze obsažen chinolizidinový alkaloid spartein (jediný není benzyloisochinolinového typu).²⁶ Byly sledovány změny v obsahu alkaloidů v nadzemní části rostliny v období duben až říjen pomocí HPLC a bylo zjištěno, že hlavním alkaloidem po celé vegetační období je koptisin. Obsah v nadzemních částech činil 0,4-0,8 %. Tento fakt není všeobecně znám, poněvadž většina kvantitativních údajů o složení drogy byla získána na základě izolačních postupů, při kterých bývá separace tohoto kvartérního alkaloidu neúplná. Na počátku vegetačního období byl jako druhý hlavní alkaloid nadzemních částí stanoven stylopin, přičemž obsah chelidoninu, sanguinarinu a chelerythrinu byl relativně nízký. Po odkvětu rostliny však obsah

tří posledně jmenovaných alkaloidů narůstal a ke konci vegetačního období již patřily k hlavním, zatímco obsah stylopinu značně poklesl. Rovněž bylo prokázáno, že hlavní alkaloidní látkou nálevu z usušené nadzemní části sbírané v květnu (1 g sušené drogy přelit 250 ml vařící vody, ponecháno 10 min) je koptisin (0,1-0,2 %), zastoupení ostatních alkaloidů je nepatrné (<0,001 %).²⁷

Stylopin



3.4.1.4. Alkaloidy plodu

Byly izolovány 2 protoberberinové alkaloidy a 1 benzofenanthridinový alkaloid. Na základě chemických a spektroskopických důkazů pak byla určena struktura těchto sloučenin jako **chelidoninu**, **koptisinu** a **berberinu**.³⁴

3.4.1.5. Alkaloidy semen

V semenech převažuje **koptisin**.²⁷

Přestože se výzkumem alkaloidů *Chelidonium majus* L. zabýval větší počet autorů, nebyla dosud věnována pozornost přítomnosti těch kvartérních alkaloidů, které na rozdíl od kvartérních alkaloidů benzofenanthridinového a protoberberinového typu nemohou být extrahovány nepolárním rozpouštědlem z alkalického roztoku. Protože je známo, že kořen a nadzemní část rostliny zásadně liší jak v obsahu, tak ve složení alkaloidů, byly zkoumány obě části odděleně. V obou případech byl postup stejný: nejdříve byl okyselený vodný extrakt vytřepáván etherem, aby byly odděleny nebazické nebo velmi slabě bazické látky (*frakce L*). Potom byl vodný roztok slabě alkalizován a znovu vytřepáván s etherem a byla získána *frakce A*. A nakonec silná alkalizace a vytřepávání s etherem dala *frakci B*. Další alkaloidy byly získány po jejich převedení na jodidy extrakcí chloroformem. Kvartérní frakce z kořene obsahovala jako hlavní alkaloid magnoflorin jodid v relativně vysokém množství (0,19 %),

přičemž nadzemní část obsahuje znatelně nižší množství kvartérních alkaloidů. Z nati byl izolován (-)- α -stylopin methyljodid a (-)- β -stylopin methyljodid. Oba tyto alkaloidy byly detekovány také v kořeni, ale pouze ve stopovém množství. Z *frakce L* z kořene byly získány v závislosti na oxysanguinarinu, který byl izolován už dříve, dihydrosanguinarin, dihydrochelerythrin a dihydrochelirubin, také byla upřesněna přítomnost menšího množství dihydrochelilutinu. V nadzemní části byly detekovány pouze stopová množství dihydrosanguinarinu a dihydrochelerythrinu. Nález dihydrochelirubinu a dihydrochelilutinu v *Chelidonium majus L.* je vůbec prvním důkazem výskytu těchto 2 látek v přírodě.³²

Tab. 1: Alkaloidy izolované z *Chelidonium majus* L.

Alkaloid	Kořen	Nadzemní část
<i>Kvarterní benzo[c]fenanthridiny</i>		
Sanguinarin	+++	+++
Chelerythrin	+++	+++
Chelirubin	+	+
Chelilutin	+	+
Makarpin	+	+
<i>Terciární benzo[c]fenanthridiny</i>		
Chelidonin	+++	+++
Homochelidonin	++	+
Chelamin	+	-
Chelamidin	+	-
Dihydrosanguinarin	+	+
Dihydrochelerythrin	+	+
Dihydrochelirubin	+	-
Dihydrochelilutin	+	-
N-Demethyl-9,10-Dihydro-oxysanguinarin	+	-
Chelidimerin	?	?
Norchelidonin	+	+
Isochelidonin	-	+
Oxysanguinarin	+	-
„Methoxychelidonin“*	-	-
<i>Terciární protoberberiny</i>		
Stylopin	++	++ až +++
<i>Kvarterní protoberberiny</i>		
Methylstylopin	+	+
Berberin	++	+++
Koptisin	+++	+++
Korysamin	+	+
<i>Protopiny</i>		
Protopin	++	+
Allokryptopin	++	+
<i>Kvarterní aporfíny</i>		
Magnoflorin	+++	-
Turkiyenin	+	+
Sparteín	?	?

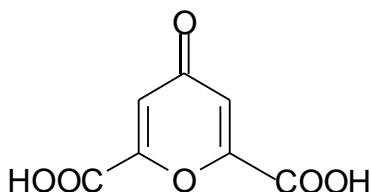
*Methoxychelidonin není individuální alkaloid, ale směs homochelidoninu, chelaminu a chelamidinu.²⁷

3.4.2. Ostatní látky

3.4.2.1. Rostlinné kyseliny

Jako protiklad k bazickým alkaloidům najdeme v droze organické kyseliny a to především **kyselinu chelidonovou** vedle citronové, jablečné a jantarové.²⁶

Kyselina chelidonová



V jedné z novějších prací nalezneme také deriváty kyseliny kávové: 2-(-)-kaffeoyl-D-glycerová kyselina, 4-(-)-kaffeoyltrihydroxymáselná kyselina, kaffeoyl-L-jablečná kyselina a kaffeoyltrihydroxybutyrolakton.^{26,27} Hydrolýzou vodně-methanolového extraktu drogy získáme 0,4 % *kávové kyseliny* a asi 0,1 % p-kumarové, ferulové, gentisinové a p-hydroxybenzoové kyseliny.²⁶ Ve vlašovičnicku byla také nalezena snad i kyselina mravenčí.³⁵ Dřívější práce uvádějí i přítomnost alkoholu chelidonolu²⁷, ve šťávě z natě hojně fosforečnanu vápenatého a hořečnato-amonného, v semenech olej a velmi účinná lipasa. Dále byla v rostlině prokázána proteasa, peroxydasa, glukóza a fruktóza, třísloviny, kaučuk³⁵, vysoký obsah karotenů a kyseliny askorbové^{35,27} a flavonoidů rutinu a kvercetin.²⁷ Glykosidy ani saponiny nebyly nalezeny.³⁵ V novějších pracích už byly dokázány jako minoritní složky²⁶. V celé rostlině je obsaženo hojně pryskyřičnatých látek, z nichž jedna – žlutě zbarvená – se uvádí v souvislost s toxicitou čerstvé rostliny.³⁵

3.4.2.2. Minoritní složky

Byly prokázány nespecifikované triterpenoidy, silice a saponiny, kyselina nikotinová²⁷, cholin a biogenní aminy – histamin, methylamin a tyramin (bez udání množství).^{27,26}

Minerální prvky: Chelidonii herba obsahuje 24 prvků: Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Ti, V, Zn v čerstvé droze (kořeni i nati), v jejím vodném roztoku a alkalickém extraktu.³⁶ Obsah prvků byl zkoumán pomocí ICP^{36,31} a emisní spektrometrií. Obsah Ca, Na a Fe byl nejvyšší v mikrovlnném poli.³¹ Rozdíly v obsahu prvků v extraktu (vyjma Cu, Mn a Na) jsou značné. Bylo zjištěno, že kořeny obsahují vyšší množství minerálních prvků až na B, Cu, P a S. Ve vodném extraktu je množství minerálů

nejčastěji v rozmezí 10-65 %, to platí hlavně pro K (65 %) a P (54 %). Koncentrace roztoku minerálů v případě tinktury klesá se stoupající koncentrací alkaloidů.³⁶ Obsah Mg se liší podle části rostliny.³⁷ Byly zkoumány korelace mezi obsahem alkaloidů a minerálními a stopovými prvky v rostlině. Byl ustanoven vztah mezi obsahem Mg, Cr, Al, Co a Sr a protoberberinovými alkaloidy; stejně tak vztah mezi Mg, Cr, Al a Zn a benzofenanthridinovými alkaloidy byl evidentní.³⁸

Můžeme říci, že obsah makro-, ale i mikroelementů v extraktu značně přispívá k jeho terapeutické hodnotě.³⁶

3.5. Biologická aktivita obsahových látek

Byla studována také inhibice BuChE lidském séru protoberberinovými, benzofenanthridinovými a aporfinovými alkaloidy v porovnání se 4 modelovými sloučeninami. Mechanismus inhibice je vysvětlován na základě rozdílných typů interakce těchto sloučenin s BuChE a AChE.

Některé sloučeniny s kvartérním dusíkovým atomem v molekule fungují jako inhibitory BuChE. Jejich efekt na BuChE aktivitu a následně na AChE se liší jejich inhibiční schopností a mechanismem indukce s enzymy. Bylo zjištěno, že kvartérní protoberberinové a benzofenanthridinové alkaloidy inhibují AChE prostřednictvím vazby na tzv. γ -anionickou stranu enzymu umístěného mimo aktivní centrum enzymu.

Tab. 2: Inhibice cholinesteras

Sloučenina	I_{50} (mol/l) BuChE	I_{50} (mol/l) AChE	% inhibice BuChE ^b
Berberin	$> 1.0 \times 10^{-4}$	9.8×10^{-7}	25 ^c
Koptisin	$> 1.0 \times 10^{-4}$	5.8×10^{-7}	36 ^c
Sanguinarin	2.4×10^{-5}	3.5×10^{-5}	85
Chelerythrin	1.4×10^{-5}	9.4×10^{-6}	90
N-Methyl- isochinolin	$> 1.0 \times 10^{-4}$	2.5×10^{-5}	21 ^c
Protoberberin	$> 1.0 \times 10^{-4}$	3.4×10^{-5}	28 ^c
N-Methyl- fenanthridin	1.0×10^{-5}	4.8×10^{-6}	95

c.... slabé inhibitory

b.... pro koncentraci inhibitorů 1.0×10^{-4}

Pozn.: Hodnota I_{50} byla určena ze závislosti koncentrace alkaloidů vs. procento inhibice.

Protoberberinové alkaloidy jsou pouze slabé inhibitory BuChE. Inhibiční efekt benzofenanthridinových alkaloidů (sanguinarinu, chelerythrinu) a indenoisochinolinového derivátu na BuChE je daleko nižší než na AChE. U všech studovaných alkaloidů se jedná o kompetitivní mechanismus inhibice. Kinetika dvou současně působících inhibitorů na aktivitu BuChE prozrazuje podobnost kompetitivního mechanismu působení v páru N-methylfenanthridin a chelerythrin. Kinetická měření ukazují, že všechny studované typy alkaloidů jsou vázány na aktivní centrum BuChE. Hydroxylem substituované protoberberinové alkaloidy (kolumbamin a jatrorrhizin) a aporfinové alkaloidy se pravděpodobně váží na stejnou vazebnou stranu, která se ale liší od místa vazby benzofenanthridinových alkaloidů. Aktivní centrum BuChE se skládá stejně jako aktivní centrum AChE ze dvou funkčních jednotek – esterické a anionické. Enzymy se ale navzájem liší anionickou jednotkou, přičemž esterická je stejná. Anionická jednotka BuChE je stericky omezena a vazba inhibitorů je tedy ovlivněna jejich tvarem a velikostí. Při interakci aktivního centra BuChE s inhibitorem hraje řetězec anionického centra daleko menší roli než je tomu u AChE. Nejvíce se zde na interakci podílejí Van der Waalsovi síly a hydrofóbní interakce. Je také zřejmé, že BuChE pravděpodobně nemá své anionické centrum umístěné na okraji. Na rozdíl od AChE se u BuChE všechny studované sloučeniny váží na aktivní centrum enzymu. Benzofenanthridinové alkaloidy (sanguinarin a chelerythrin) stejně jako slabé inhibitory berberin a koptisin se váží na anionické centrum. Rozdílná schopnost inhibice může být vysvětlena jejich rozdílnou hydrofobicitou a stereochemií molekuly.²³

Všechny alkaloidní inhibitory AChE jsou terciární baze; ukázalo se však, že také kvartérní amoniové baze alkaloidního²³ i nealkaloidního typu³⁹ mají aktivitu vůči mozkové AChE a BuChE a mohou přecházet přes hematoencefalickou bariéru (HEB), ačkoliv se to zdá paradoxní.

3.6. Farmakologické účinky rostliny *Chelidonium majus* L.

Pro posouzení výzkumů výtažků z vlašovičnicku provedených až k roku 1970 je důležité to, že byla zkoumána výlučně čerstvá droga : „Herba Chelidonii recens – čerstvá, na začátku doby květu, sbíraná nať s kořeny“. Převládlo mínění, že droga při sušení ztrácí své účinné látky, což se může doopravdy může stát i při nejlepších podmínkách sušení. Většina farmakologických výzkumů byla tudíž provedena s extrakty z čerstvé rostliny, vzácněji pak se sušenou celou rostlinou nebo s výtažky z čerstvé rostliny (čerstvá nať nebo kořen), případně s alkaloidy izolovanými z celé rostliny. Ale stabilita látek obsažených v čerstvé droze také nebyla optimální, proto se často popisoval nejistý účinek získaných preparátů. Výsledky těchto studií jsou tudíž jen obtížně převeditelné na sušený vzorek drogy. A proto jsou v podstatě nepoužitelné (nejsou stejné podmínky experimentů), přesto ale objasňují, kde spočívá základní působení drogy.²⁶

3.6.1. Protinádorové a antivirové působení

Klinické použití vlašovičnicku při léčbě nádorů se datuje již od minulého století. Botkin popsal dva případy karcinomu léčené extrakty z vlašovičnicku. Další klinické údaje z tohoto období popisují užití chelidoninsulfátu při rakovině žaludku, extraktu z vlašovičnicku při karcinomu prsu a dalších orgánů. Dále má droga dlouhou historii při léčbě bradavic, papilomů a kondylomat.²⁷ Později při testování rostlinných extraktů na antitumorovou aktivitu byl pozorován inhibiční účinek extraktů z vlašovičnicku na sarkom 180 a Ehrlichův myší sarkom.^{26,27} Při intenzivním výzkumu antitumorové aktivity v šedesátých letech byly popsány inhibiční účinky extraktů z vlašovičnicku na některé typy nádorů, současně však byla prokázána výrazná cytotoxicita alkaloidů sanguinarinu, chelerythrinu, chelidimerinu, chelidoninu, protopinu a koptisinu. V roce 1968 bylo v experimentech s tkáňovými kulturami zjištěno, že extrakty z rostliny vykazují slabou aktivitu proti viru Herpes simplex. Rovněž v pozdější práci byl potvrzen inhibiční efekt extraktu na virus Herpes simplex a některé adenoviry *in vitro*. Nejsilnější inhibiční účinek však vykazovala frakce neobsahující žádný z typických alkaloidů tohoto druhu.

V nedávné době opět vzrostl zájem o využití vlašovičnicku při terapii karcinomů, a to v souvislosti s přípravkem **Ukrain** vyvinutým a patentovaným rakouskými autory. Tento preparát obsahuje alkaloidy *Chelidonium majus* L. konjugované s kyselinou thiofosforečnou a vyznačuje se imunomodulační aktivitou. Působí zvýšení počtu T-lymfocytů a normalizaci poměru T-helper/T-supresorových lymfocytů, bez ovlivnění hladiny imunoglobulinů.

Přípravek byl aplikován pacientům s různými typy karcinomů. Byl pacienty dobře snášen, navodil obnovení buněčné imunity, provázené objektivním zlepšením stavu pacientů a v několika případech i regresi tumorů. V *in vivo* studiích na myších tumorech bylo prokázáno, že intravenózní podávání **Ukrainu** snižuje rychlost růstu tumoru. V pokusech *in vitro* bylo doloženo, že preparát obnovuje porušenou schopnost makrofágů lyticky štěpit tumorové buňky prostřednictvím stimulace LPS (lipopolysacharid, endotoxin). Obnovená cytolytická aktivita je nezávislá na TNF- α , což naznačuje, že **Ukrain** aktivuje alternativní cytolytický mechanismus u makrofágů. Studiu dalších vlastností uvedeného přípravku je nadále věnována značná pozornost.

3.6.2. Hepatotropní spasmolytické účinky

Tradiční použití vlašovičnicku při onemocněních žlučových cest a jater je zcela odlišnou oblastí indikace vlašovičnicku. Droga je v současných přehledech fytoterapie doporučována jako spasmolytikum a cholagogum, názory na její účinnost jsou však nejednoznačné. Údaje o pozitivních účincích drogy na sekreci žluči, aktivitu α -amylasy i spasmu hladké svaloviny pochází vesměs ze starších prací. Významné zvýšení sekrece bilirubinu, cholesterolu a zvýšení aktivity pankreatických enzymů lipasy a α -amylasy po aplikaci 100 mg suchého extraktu je uvedeno zase v jiné práci. Příznivé účinky preparátu **Panchelidon** obsahujícího extrakt z čerstvých rostlin s obsahem 20 % alkaloidů při léčbě chronické cholangitidy, cholelithiasy a diskinezí popsal v roce 1977 Neumann-Mangoldt. Preparát vykazoval spasmolytický a středně analgetický účinek, výrazně omezoval diarrhoeu, vyvolanou léčbou antibiotiky.²⁷ Zpomalení střevní pasáže je zapříčiněno centrálním sympatomimetickým působením alkaloidů vlašovičnicku.²⁶ Weiss hodnotí účinky vlašovičnicku jako nekonstantní. S odvoláním na vlastní zkušenost uvádí, že účinnost drogy klesá delším uchováváním a je tedy nutné užívat extrakty vždy z čerstvé drogy. (Oproti tomu dle poznatků E. Táborské a kol. se obsah alkaloidů v usušené droze uchováváním nemění, stejně jako se nemění alkaloidní složení tinktury uchovávané několik měsíců v chladu). I při podávání čerstvé šťávy však pozoroval, že zatímco v první polovině roku byl efekt jeho působení zřetelný a pacientům přinášel úlevu, po uplynutí této doby začal slábnout, až prakticky v krátké době vymizel. Je pravděpodobné, že uvedené poznatky souvisejí s nestandardním složením drogy.²⁷ Existuje řada klinických studií provedených především v 30-tých letech hlavně na pacientech s chorobami žaludku, střeva a jater (také s chronickým měštnáním žluči či zánětem žlučníku). Pacienti byli léčeni preparáty z čerstvé rostliny (vylisované šťávy nebo rozetřena celá rostlina s mléčným cukrem) p.o.. Bylo pozorováno snížení bolesti a vymizení křečí (zlepšení

subjektivních obtíží). Na podkladě těchto preklinických a klinických výzkumů (převážně na celé rostlině nebo na celkových alkaloidech → výsledky nejsou převoditelné) bylo vlašovičnicku přiřazeno spasmolytické působení na GIT a žlučové cesty. Působení bylo přičítáno především chelidoninu. Také v monografii *Chelidonii herba* se udává: „Dostatečně jisté je papaverinu podobné, lehce spasmolytické působení na horní část GIT.“; jak je už předesláno, nenacházejí se v literatuře žádné dostatečné podklady. K otázce zda má vlašovičnick cholagogní působení, či zda se jedná jen o efekt choloretický nebo cholekinetický, neexistují žádné dostačující důkazy. Podle klinických studií, provedených hlavně ve 30-tých letech, mají mít preparáty celé čerstvé rostliny podávané p.o. u pacientů s cholestasou cholagogní působení. U psů se žlučnickovým vývodem má extrakt z čerstvé natě zvyšovat sekreci žluči na dvojnásobek. Naproti tomu nebylo během pokusů na králících s vývodem ze žlučovodu ani po i.v. nebo intraduodenálním podání preparátu čerstvé nati zaznamenáno zvýšení žlučového průtoku. V jedné z novějších prací bylo zkoumáno působení alkoholického suchého extraktu ze sušené nati na sekreci žluče a pankreatické šťávy u pacientů se smíšenými hepatopatiemi (část pacientů měla zřetelně znatelný syndrom cholestasy). U 8 pacientů byla zavedena duodenální sonda k odsávání duodenální šťávy a žaludeční sonda určená k odsávání žaludeční sekrece a podání extraktu látky. 30 minut po zavedení sond byla zachycena klidová sekrece žluče a pankreatické šťávy v duodenu (v 10 minutových periodách) a stanoven objem i koncentrace bilirubinu, cholesterolu, lipasy a α -amylasy. Nápadné je, že průměrná bazální hodnota 10 min. klidové sekrece u hepatopatických pacientů se odchyluje od průměrných bazálních hodnot 22 zdravých dobrovolníků.

Tab. 3: Průměrné bazální hodnoty klidové sekrece žluče a pankreatické šťávy

Látka	Hepatopatici (mg)	Zdraví pacienti (mg)
bilirubin	0,086	0,583
cholesterol	4,58	10,65
Lipasa	0,267 E	2,52 E
α -amylasa	4166 E	1633 E

Po podání extraktu drogy (100 mg suchého extraktu s 1,5 mg celkových alkaloidů přepočítáno na chelidonin suspendováno v 10 ml vody) byla získávána v 10 min periodách duodenální šťáva. Celková délka pokusu byla 100 min. Skutečné působení drogy bylo pozorováno až v posledních 30 min. Max. hodnoty byly dosaženy v posledních 10 min.: bilirubin 1,008 mg, cholesterol 26,94 mg, lipasa 4982 E, α -amylasa 14569 E (hodnoty jsou oproti bazálním hodnotám signifikantně zvýšené). Pomalé, ale kontinuální zvyšování

žlučového proudu bylo autorem označeno jako choleretický účinek. Zda cholagogní působení drogy pro terapii nemocí žluč. cest vůbec praktické uplatnění, zůstává otázkou.²⁶

Větší uplatnění mezi galeniky používanými v současnosti v západoevropských zemích nacházejí směsné extrakty, obsahující vedle vlašovičnicku výtažky dalších drog. Např. preparát **Chelidonium-Strath** (Strath-Labor) obsahuje směs extraktů z *Chelidonii herba*, *Agrimoniae herba*, *Salviae folium* a *Hyperici herba*, přípravek **Hepatofalk Planta** (Falk) je směsí extraktů ze *Silybum marianum*, *Chelidonium majus* a *Curcuma xantorrhiza*. Preparát obdobného složení **Aristochol** (Steiber and Co.) byl hodnocen Baumanem, který uvádí, že přípravek zvyšuje vylučování žluči, sekreci lipasy a amylasy. Pozitivní účinky preparátu **Hepaticum-Medice** (Medice) na metabolismus žlučových kyselin popsal Matzekis.

3.6.3. Biologické účinky hlavních obsahových látek

Hlavními alkaloidy rostliny jsou koptisin a chelidonin. Přestože koptisin se strukturně jen málo liší od berberinu, jehož biologické účinky byly předmětem řady studií, o účincích samotného koptisinu je známo jen velmi málo. Ze starších prací pocházejí údaje o jeho cytotoxickém působení. Jsou popsány jeho antimikrobiální a protizánětlivé účinky. Podobně jako berberin inhiboval v dávkách 195 mg/kg/den srážení trombocytů u krys. Má též spasmolytickou a uterotonickou aktivitu. Lze očekávat, že koptisin vykazuje i řadu dalších efektů analogických berberinu.

Druhý hlavní alkaloid chelidonin má významné spasmolytické účinky. Působí na spasmy GIT a bronchů, snižuje tonus hladkého svalstva dělohy, uretry a cév. Jeho spasmolytický účinek je poloviční ve srovnání s papaverinem. Chelidonin též snižuje krevní tlak a zpomaluje srdeční aktivitu působením přes *nervus vagus*. Polští autoři uvádí, že chelidonin vykazuje inhibiční účinek na dopaminergní struktury u krys v dávkách 50-200 mg/kg. Snižuje spontánní motorickou aktivitu a tělesnou teplotu. Potencuje aktivitu hypnotik, zvyšuje tlumivý účinek reserpinu. Má cholagogický a choleretický účinek a ve žlučových cestách působí antisepticky. Má také antimitotické účinky.

Značná pozornost byla věnována biologickým účinkům benzofenanthridinovým alkaloidům sanguinarinu a chelerythrinu, které byly izolovány i z jiných rostlinných druhů, přičemž kořen vlašovičnicku patří k jejich nejvýznamnějším zdrojům. Již dlouho jsou známy v praxi využívány protizánětlivé a antimikrobiální účinky těchto alkaloidů. V zemích bývalého Sovětského svazu je vyráběn preparát **Sangviritrin**, obsahující směs sanguinarinu a chelerythrinu. V Severní Americe jsou benzofenanthridinové alkaloidy součástí některých přípravků užívaných v ústní hygieně. Byly popsány inhibiční účinky sanguinarinu a

chelerythrinu na celou řadu enzymů např. na cholinesterasy, alaninaminotransferasu, Na^+/K^+ -ATPasu, Ca^{2+} -ATPasu. Oba alkaloidy působí též jako rozpojovače respirace a oxidační fosforylace. S nativní dvouspirálovou DNA vytváří komplexy typu interkalace, inhibují syntézu RNA na DNA matrici a enzymovou hydrolýzu DNA. Nedávno byla popsána inhibice proteinkinasy C chelerythrinem. Většina těchto inhibičních účinků je připisována interakci benzofenanthridinů s SH-skupinami enzymů. Oba alkaloidy mohou reagovat v závislosti na pH buď ve formě kvartérního kationtu, nebo terciární base. Sanguinarin rovněž zvyšuje vodivost lipidové dvouvrstvy. Chelerythrin, sanguinarin a chelidonin mají též prokazatelné antimitotické účinky. Zdá se, že mechanismus jejich působení naznačuje nedávné zjištění, že uvedené tři alkaloidy inhibují polymeraci tubulinu. Lze předpokládat, že antimikrobiální i cytostatická aktivita těchto alkaloidů je podmíněna výše uvedenými účinky na řadu klíčových enzymů buněčného metabolismu.

Řada významných fyziologických účinků byla popsána u kvartérního alkaloidu berberinu, jehož zastoupení v kořeni je srovnatelné se sanguinarinem. Tento alkaloid, jehož hlavním zdrojem jsou druhy rodu *Berberis*, má některé účinky podobné chelidoninu. V Evropě a na Dálném východě je po mnoho staletí užíván jako prostředek proti průjmům, žloutence a chronické dysenterii. Stimuluje sekreci žluče a má rovněž hypotenzivní, vazodilatační a sedativní účinky. V *in vitro* pokusech bylo popsáno, že působí jako antagonist α -2-adrenoreceptorů lidských krevních destiček. Působí inhibičně na některé enzymy a má antibakteriální účinky. Řada prací se zabývá účinkem berberinu na srdeční aktivitu. V pokusech na zvířatech byly zjištěny jeho pozitivní ionotropní a dromotropní a negativní chronotropní efekty.²⁷

Stylopin je hlavním alkaloidem nadzemní části rostliny, která byla užívána v orientálních státech na odstranění bradavic, papilomat a kondylomat, stejně jako na léčbu jaterních onemocnění. Stylopin nemá cytotoxický efekt na nestimulované buňky RAW 264.7, ale v závislosti na koncentraci redukuje produkci NO, PG-E2, TNF- α a interleukinů – IL-1b a IL-6 a aktivitu COX-2. Výzkumy prokázaly, že stylopin potlačuje produkci oxidu dusnatého a PG-E2 v makrofázích inhibicí induktibilní NO-synthasy a COX-2. Tato biologická aktivita stylopinu pravděpodobně podporuje protizánětlivý účinek celé rostliny.⁴⁰

Ačkoliv je často popisováno antimikrobiální působení jednotlivých alkaloidů *Chelidonium majus* L., je na toto téma provedeno jen minimum pokusů. Vysušený, 70% ethanolem upravený extrakt ze sušené drogy *Chelidonii herba* vykazuje na agarovém kultivačním testu (400 μg /misku) slabé antibakteriální působení proti *Staphylococcus aureus* 209, *St. aureus* 617, *Escherichia coli* 12,835 (lac.+sach.), *E. „crim“* 2584 a *Shigella sonnei* 3c (Minimální

inhibiční zóny : méně než 10mm v průměru). Ethanolický tekutý extrakt ze sušené celé rostliny (nerozlišuje se, jestli z celé rostliny nebo jen z nati) ukazuje v agarovém difuzním testu od slabého až po silné antimykotické působení proti různým druhům : Candida, Trichophyton, Microsporum, a Epidermaphyten (Inhibiční průměr 12-30 mm, bez udání dávky). Inhibiční působení extraktu se liší také podle doby sběru drogy (inhibiční průměr extraktu u Candida albicans : doba sběru červenec = 12-13 mm; září = 24-30 mm).²⁶

Rovněž některé z nealkaloidních látek prokázaných v *Chelidonium majus* mají výrazné fyziologické účinky. Kyselina kávová i její estery mají spasmolytickou, cholagogickou a antibakteriální aktivitu. Nebylo dosud zkoumáno, do jaké míry se na terapeutických efektech vlaštovičnicku mohou podílet tyto látky.

3.7. Využití *Chelidonium majus* L.

Využití rostliny má bohatou historii v lidovém léčitelství. Není téměř choroby, proti které vlašovičnick v průběhu staletí nebyl použit. Léčivá moc jí byla přisuzována již za starověku a od té doby byla v léčitelství hojně používána. Byla doporučována proti chorobám jater, zimnici a vodnatelnosti, na zlepšení zraku, k odstranění bradavic a léčbě tumorů.

V novější době je vlašovičnick užíván ve fytoterapii jako droga s účinkem spasmolytickým, analgetickým, cholagogickým, popř. jako dermatologikum, antihistaminikum a antiseptikum. Chelidonii herba i Chelidonii radix jsou popsány v řadě lékopisů. Na přípravu odvaru se doporučuje použít 0,5-1,0 g drogy z natě nebo 0,5 g drogy z kořene. Tinctura chelidonii s obsahem alkaloidů 4-5 % se podává jako spasmolytikum v průměrných dávkách 1 g denně.

Extrakty z vlašovičnicku jsou součástí řady galenik, produkovaných zejména v západní Evropě. Jsou indikovány při hepatopatiích, poruchách funkce žlučníku a po jeho operacích. V Číně se extrakty z *Chelidonium majus* užívají při léčbě chronické bronchitidy, dávivého kašle a jako analgetikum. Vlašovičnick je součástí řady homeopatik. V lidovém léčitelství se stále traduje použití rostliny, zejména čerstvé šťávy, jako prostředku k odstranění bradavic.²⁷

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

4.1. Všeobecné postupy

4.1.1. Destilace a odpařování

Rozpouštědla byla před použitím destilována; nejprve byl zachycen předeček (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 N (normálních) komor. Komory byly použity nasycené mobilní fází. V případě užití malých komor (válcových) trvalo sycení asi 30 minut. U klasických komor pak asi hodinu. Chromatografie byla prováděna vzestupně.

4.1.2.2. Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie byla prováděna systémem stupňovité eluce na neutrálním oxidu hlinitém. Sloupec byl plněn obvyklým způsobem – nalitím suspenze adsorbentu do rozpouštědla. Vzorek byl po vysušení v exsikátoru nanesen na roztěru s malým množstvím neutrálního oxidu hlinitého.

4.2. Materiál a vybavení

4.2.1. Rozpouštědla a chemikálie

Rozpouštědla:

Benzín, lékopisný, ČsL 4

Cyklohexan; C₆H₁₂, č.

Diethylamin; Et₂NH₂, č.

Diethylether, č.

Ethanol 95%; EtOH, denaturovaný 5% methanolem

Chloroform; CHCl₃, č.

Kyselina octová bezvodá, č.

Chemikálie:

Acetylcholin jodid, p. a.

Amoniak 25%, č.

Dusík 5.0

Chlorid sodný, p. a.

Jodid draselný, č.

Kyanid draselný, č.

Hydroxid sodný, č.

Hydroxid sodný, p. a.

Kyselina chlorovodíková 36%, HCl, p. a.

Kyselina sírová 98%, č.

Síran sodný bezvodý, č.

Uhličitan sodný bezvodý, č.

4.2.2. Detekční činidla

D 1: Dragendorff činidlo modifikované podle Muniera: ⁴¹

- pro alkaloidy a ostatní sloučeniny obsahující dusík

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

- *roztok B*: se připraví rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody

- *zásobní roztok*: připravíme smísením roztoků A a B v poměru 1:1. Ta může být uložena několik měsíců v lednici.

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

Pozn.: Vlastní zásobní roztok se používá pro detekci vitamínu B₁.

D 2: Mayerovo činidlo: ⁴²

- roztok se připraví rozpuštěním 1,35 g chloridu rtuťnatého a 5 g jodidu draselného ve vodě a doplní se jí do 100 ml.

4.2.3. Chromatografické adsorbenty

A 1: Oxid hlinitý neutrální, stupně aktivity ~III (Brockmann-Schodder):

Komerční neutrální oxid hlinitý (Reanal, Hungary) 60-200 µm byl přesítován přes síto 200 µm a poté vysušen v sušárně ve vrstvě ne vyšší než 2 cm při teplotě 230 °C po dobu 3 hodin. Po zchladnutí (v exsikátoru) se deaktivoval přidavkem 6 % vody (ekvilibrace za protřepávání po dobu 30 minut).

A 2: Kieselgel 60 F₂₅₄, (Merck)

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

A 3: Silifol UV 254, (Kavalír, Votice)

Hotové desky pro chromatografii na tenké vrstvě. Hliníková fólie; sorbent: Silpearl – širokoporézní silikagel podle Pitry s luminiscenčním indikátorem pro UV 254.

4.2.4. Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S 1: C₆H₁₂ – Et₂NH₂ 9:1

4.3. Stanovení inhibice aktivity AChE

Kvartérní inhibitory cholinesteras izolovány v této práci z *Chelidonium majus* L. byly testovány pro jejich inhibiční schopnost standardním *in vitro* inhibiční testem.⁴³

4.2. 4.3.1. Přístroje

Automatický titrátor RTS 822, Radiometer, Dánsko

Homogenizátor Ultra-Turrax , Janke–Kunkel, Německo

Ultratermostat typ U3, VEB Prufgerate-werk Mendingen, Německo

Průtokoměr plynový, typ PF/PG, trubice č. PG03, VEB Prufgerate-werk Mendingen, Německo

4.3.2. Materiál

Homogenát mozkové tkáně.

5.2. 4.3.3. Příprava homogenátů

Homogenát mozkové tkáně: mozky byly odebrány od experimentálních objektů. Z mozků byla odpreparován nucleus caudatus. Preparáty byly opláchnuty fyziologickým roztokem a po té homogenizovány přístrojem Ultra – Turrax jednu minutu při dvaceti tisíci otáčkách za minutu v poměru 1 : 10 s destilovanou vodou. Po té byl homogenát rozplněn do zkumavek po dvou mililitrech a zmrazen na – 35 °C.

4.1. 4.3.4. Inhibice cholinesteras

Cholinesterasy jsou kompetitivně inhibovány kvartérními látkami. Pokles aktivity je úměrný použité koncentraci inhibitoru. Stanovení aktivity enzymu je založeno na jeho reakci s nativním substrátem, kdy je tento štěpen na alkohol cholin a kyselinu octovou. Tato je při použití pH-statové instrumentace neutralizována kontinuálními přídávky roztoku hydroxidu sodného, tak aby bylo udrženo statované pH 8.

0,5 ml homogenátu bylo smíseno s 2,5 ml 3 M roztoku chloridu sodného, 0,2 ml roztoku testované látky a objem doplněn destilovanou vodou na 23 ml. Reakční směs byla vytemperována na 25 °C, oddělena od okolní atmosféry protékajícím dusíkem a pH bylo nastaveno na hodnotu 8 a spuštěn titrátor. Po té bylo k reakční směsi přidáno 2 ml 0,01 M roztoku substrátu – acetylcholin jodidu. Plotterem titrátoru byla následně zaznamenávána spotřeba 0,01 M roztoku hydroxidu sodného nutná k udržení statovaného pH reakční směsi. Koncentrace testované látky byly zvoleny tak, aby oblast aktivit enzymu byla rovnoměrně pokryta měřicími body od stoprocentní po nulovou aktivitu. Měření byla opakována pro každou koncentraci testované látky nejméně třikrát.

4.1. 4.3.5. Matematické zpracování experimentálních dat

Hodnoty IC_{50} byly vypočítány z naměřených hodnot nelineární regrese v programu GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4.4. Izolace

4.1. 4.4.1. Postup extrakce alkaloidů z *Chelidonium majus* L.

4.4.1.1. Původ drogy

Droga (sušená nať s kořeny) byla získána sběrem fy JUGODRVO AD v Chorvatsku v období července - září 2004 a po očištění sušena za normálních podmínek.

Makroskopickou, mikroskopickou a chemickou identifikaci provedl L. Opletal.

Metodou podle ČL 2002 bylo stanoveno:

Cizí příměsi (2.8.2.):	12,2 %
Ztráta sušením (2.2.32.):	8,68 %
Celkový popel (2.4.16.):	16,8 %
Stanovení obsahu (alkaloidy jako chelidonin):	1,02 %

4.4.1.2. Příprava extraktu a jeho čištění

41,8 kg suché nati s kořeny bylo perkolováno 95% ethanolem (celkem získáno 480 l extraktu), extrakt byl zahuštěn na vakuové odparce při 60 °C do maximálního odstranění alkoholu, byly přidány asi 2 litry vody. Vznikl temně hnědý, dehtovitý, sirupovitý odparek. Při oddestilování lihu ze zahuštěného koncentrátu tékala nějaká látka do vakuové odparky ve formě nahnědlého náletu, nebyla však analyzována.

Tento extrakt byl rotací rozehrát na vodní lázni asi na 40 °C, bylo přidáno 8 litrů 1,5% kyseliny sírové (zahřáté na 40 °C) a směs byla tyčinkou dokonale promíchávána po dobu několika minut, potom byl oranžový roztok po zchlazení dokonale slit (dehtovité podíly plavaly jen málo na hladině, seděly více u dna), dehet byl seškrabán, umístěn do velké kádinky, přidáno 500 ml bezvodé kyseliny octové a na vodní lázni byla směs dokonale rozpuštěna na viskózní roztok. K tomuto roztoku bylo přidáváno po částech 7,5 l vody a promícháno; kalný oranžový roztok byl slit, černý pryskyřičnatý podíl rozpuštěn znova ve 200 ml octové kyseliny, zase rozehrát a srážen 4 litry vody. Oba dekantáty byly spojeny, ponechány přes noc stát, poté byl tento oranžový roztok zfiltrován přes skládaný polyamidový filtr (filtr 1), ten byl promyt vodou a ponechán vykapat; vyloučil se práškovitý sediment hnědo-oranžové barvy. Oba kyselé filtráty (z kyseliny sírové i octové) byly spojeny; vyloučila se bělavá sraženina, která na sebe adsorbovala oranžové soli alkaloidů; suspenze byla zfiltrována přes polyamidovou plachetku (filtr 2), filtr promyt vodou. Filtr 1 a filtr 2 byly

roztrženy a suspendovány v 1,5 l 1,5% kyselině sírové, suspenze zfiltrována; oranžový filtrát byl přidán ke kyselému roztoku extraktu (celkem 37 litrů filtrátu).

4.4.2. Výtřeppek A z primárního extraktu

Kyselý roztok síranů (37 litrů) byl neutralizován nejprve pevným práškovým bezvodým uhličitanem sodným na pH cca 9; tekutina se výrazně zakalila a nabyla vzhledu světlého kakaa. Tento roztok byl vytřepán 5 x 15 litry etheru, etherové vrstvy byly spojeny, odděleny od zbytku vodné fáze a rozpouštědlo oddestilováno. Hned po prvním vytřepání se roztok vyčeřil (vodná fáze byla oranžová a čistá, čirá), vyloučil se však práškovitý, šedočerný podíl (PP), který byl z etheru oddělen, nakonec vytřepán v baňce 2 x 400 ml etheru, ether přidán k etherovým výtřepkům.

4.4.3. Výtřeppek B z primárního extraktu

Sodový extrakt byl zalkalizován 50% hydroxidem sodným na pH 12-12,5 a tento roztok vytřepán 5 x 15 litry etheru, etherové vrstvy byly spojeny, ostře odděleny od zbytku vodné fáze a rozpouštědlo oddestilováno.

4.4.4. Vý⁴⁴třeppek J z primárního extraktu

Vodná bazická (louhová) vrstva byla okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (1:1, tj. asi 17%) na pH 3-3,5. K 16 litrům tohoto roztoku se přidá roztok 320 g jodidu draselného ve 480 ml vody, promíchá se za občasného třepání ponechá 3 hodiny v klidu. Potom se extrakt vytřepe 5 x 8,4 l CHCl₃.

4.4.5. Výtřeppek E z primárního extraktu

Okyselená vodná fáze poskytovala ještě pozitivní reakci na Mayerovo činidlo, byla proto zalkalizována 25% amoniakem na pH 10 (na 1 litr cca 800 ml 25% amoniaku) a vytřepána 5 x 8,4 l směsi CHCl₃ + EtOH 8,5:1,5 nasycené vodou. Organická vrstva byla po ostrém oddělení zahuštěna k suchu.

4.4.6. Zbýlý vodný extrakt

Tento vodný extrakt obsahoval už jen stopy alkaloidů (srážení - Mayerova reakce), nebyl dále použit.

Tab. 4: Výsledky separace základního extraktu

Typ výtřepku	Hmotnost	Popis
A (diethylether, pH ~10)	182,0 g	Světlé medové barvy, vysoce viskózní, nekrytalující
B (diethylether, pH ~12)	10,06g	Temně hnědý, velmi viskózní s náznakem krystalů
J (CHCl ₃ ; pH ~3,5)	14,26 g 4,70 g	Tmavě hnědý, velmi viskózní Žlutý práškový sediment
E (CHCl ₃ +EtOH 8.5:1.5, pH ~10)	12,45 g	Téměř černý, velmi viskózní

6.2.4.5. *Chelidonium majus* – dělení surového výtřepku A

31 g hnědého viskózního odparku bylo rozpuštěno v kádince za stálého míchání tyčinkou v 0,84 l 0,3 M kyseliny sírové (komerční 3M kyselina sírová se zředila v poměru 1 ml kyseliny sírové + 9 ml vody); rozpouštění se provádělo po částech, šlo snadno, vznikl intenzívně oranžový roztok, na stěnách kádinky zůstaly nerozpuštěné hnědočervené drobky a na povrchu kapaliny zůstala jakási olejová šmouha. Tento kyselý roztok se zfiltraval skládaným papírovým filtrem, baňka se vymyla 20 ml 0,3 M kyseliny sírové a kyselý roztok se vytřepal 5 x 220 ml etheru. Spojené etherové výtřepky se promyly 1 x 20 ml 0,15 M kyseliny sírové, potom 1 x 250 ml 4% uhličitanu sodného (oba vytřepávací roztoky se použily ochlazené na cca 10 °C), etherová vrstva se oddělila a oddestilovala (**výtřepok L**).

Kyselý oranžový roztok se zneutralizoval 10% uhličitanem sodným za vzniku 1,4 l suspenze s šedými vyloučenými alkaloidy (amorfní fáze); tato suspenze se vytřepala celkem 4 x 750 ml etheru, etherová vrstva oddělila a rozpouštědlo oddestilovalo. Vyloučené alkaloidy se prakticky všechny rozpustily v první dávce etheru i s nečistotami (**výtřepok A**).

Medový krystalizující odparek s alkaloidy se znovu rozpustil ve 300 ml 0,3 M kyseliny sírové, zbylá baňka se vymyla postupně 0,2 ml vody (v baňce zbyl oranžový prášek, který se nerozpustil v kyselině sírové, ale pouze ve vodě) a k tomuto roztoku bylo přidáno 25 g kyanidu draselného (do alkalické reakce); přitom se vyloučily prakticky všechny alkaloidy; vyloučená pevná fáze byla velmi hutná, roztok zešedl a nabyl velmi vysoké viskozity. Tato suspenze se okyselila 1M kyselinou sírovou na pH cca 4 (baze se rozpustily, nerozpuštěné zůstaly pouze ps-kyanidy, suspenze opět zřídla), ponechaly se klesnou ke dnu, tekutina nad sedlinou se opatrně odlila, zfiltrovala přes Büchnerovu nálevku přes papírový filtr, posléze se nalila na filtr hutná suspenze pseudokyanidů, promyly se vodou a vysušily ve vakuu. Po vysušení se ps-kyanidy rozetřely (**ps-kyanidy**).

1,46 g vzniklých suchých rozetřených ps-kyanidů se ve varné baňce přelilo 36 ml směsí $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (objemový poměr 1:2) a směs se suspendoval až k rozpuštění, resp. k stálému jemnému zákalu. Potom se přidalo 12 ml 36% kyseliny chlorovodíkové a směs se vařila na vodní lázni 1 hodinu. Po této době se zneutralizovala 10% uhličitanem sodným na pH cca 7, odpařila se CHCl_3 , EtOH a část vody, přidala se 250 ml vody, provedla se alkalizace 10% uhličitanem sodným na pH ~ 9 (vyloučí se sraženina) a nafialovělá suspenze se vytřepala 4 x 150 ml etheru. Organické fáze se spojily, ostře oddělily voda, vysušily síranem sodným a rozpouštědlo oddestilovalo (**kvartérní base z ps-kyanidů**).

1 l slabě kyselého filtrátu po oddělení ps-kyanidů se zalkalizovalo 10% uhličitanem sodným na pH ~ 9 a vytřepalo se 5 x 250 ml etheru; Odparek alkaloidů žlutavý, hrubě krystalický se rozpustil v 550 ml CHCl_3 , chloroformový roztok se vytřepal 3 x 75 ml 5% hydroxidu sodného a 1 x 75 ml vody o teplotě ~ 10 °C. V CHCl_3 zůstaly base nefenolické, do vodné fáze přešly base fenolické. Chloroformová fáze byla ostře oddělena od vody, vysušena síranem sodným a rozpouštědlo oddestilováno (**AC**).

Tento odparek **AC** se za mírného zahřátí rozpustil ve 130 ml 0,3M kyseliny sírové a po zchladnutí se přidalo 130 ml 36% kyseliny chlorovodíkové; asi do 3 minut se vyloučila sraženina nerozpustných chloridů. Po 1,5denním stání v lednici se chloridy odsály na fritě, promyly vodou, vysušily nejprve na vzduchu a potom ve vakuovém exsikátoru. 10,67 g suchých, světle okrových chloridů nerozpustných ve vodě bylo za tepla (60-70 °C) rozpuštěno v 1,1 l 0,3 M kyselině sírové, roztok byl ochlazen a nejprve zneutralizován opatrně pevným práškovým uhličitanem sodným do pH cca 7, potom 10% roztokem uhličitanu sodného do pH 9; po zchladnutí pod tekoucí vodou byl vytřepán 4 x 350 ml etheru, etherové vrstvy odpařeny a odparek vysušen (**AC₁ z chloridů nR v HCl**).

1 l filtrátu po oddělení nerozpustných chloridů alkaloidů se nejprve zfiltraval přes vrstvu křemeliny (1 cm) pro odstranění zákalu nR chloridů, zalkalizoval 10% uhličitanem sodným na pH cca 9 (vyloučí se šedavá vločkovitá sraženina), vytřepal se 4 x 250 ml etheru a rozpouštědlo se odpařilo (**AC₁ z chloridů R v kyselině chlorovodíkové**).

Louhový roztok a promývací voda s fenoláty alkaloidů se spojily, okyselily 1M kyselinou sírovou na pH cca 5, roztok se zalkalizoval 10% uhličitanem sodným na pH ~ 9; šedavá suspenze (cca 0,5 l) se vytřepala 4 x 150 ml etheru. Etherové vrstvy se spojily, ostře oddělily od vody a po vysušení síranem sodným odpařily (**AC₂**).

Tab. 5: Výsledky separace extraktu A

Označení výtřepku	Hmotnost (g)	Popis
L	0,1561	Tmavě hnědý, olejovitý, s práškovitým výpadkem
ps-kyanidy	1,46	Světle okrové, nepáchnoucí
kvarť.b. z ps-CN	0,8587	Hnědý, nekystalický
AC	Nevážen	Světle hnědý, medovitý
AC ₁ z chloridů nR	9,4562	Světle okrový, krystalický
AC ₁ z chloridů R	5,0737	Světle nažloutlý, hrubě krystalický
AC ₂	0,1411	Tmavě hnědý, velmi viskózní

Pozn.: nR = nerozpustné

R = rozpustné

4.6. Chromatografie výtřepku A (AC₁ – alkaloidy z chloridů rozpustných)

Tento odparek obsahoval alkaloidy, jejichž chloridy jsou ve vodě (v roztoku kyseliny chlorovodíkové) rozpustné.

Tab. 6: Sloupcová chromatografie výtřepku AC₁

Navážka:	5,07 g suché směsi (3 látky)
Adsorbent:	A 1, stupeň aktivity III, 60-200 μm, 200 g
Vrstva s nanáškou fr.:	2,5 x 5 cm
Dělicí lože:	2,5 x 54 cm; sloupec byl nalit v soustavě benzín + CHCl ₃ 9:1
Mrtvý objem:	0,2 l
Frakce:	0,1 l
Doba toku frakce:	15-20 min.

Tab. 7: Výsledek primární chromatografie alkaloidních bazí AC₁ na oxidu hlinitém

Frakce	Spojené fr.	Eluční systém	Popis
0		Benzín+ chloroform 9+1	0
1-8	1-10	Benzín+chloroform 8,5+1,5	0
9-10		Benzín+chloroform 8+2	
11	11	Benzín+chloroform 8+2	Žlutý s krystalky
12	12	Benzín+chloroform 8+2	Žlutý s krystalky
13	13-14	Benzín+chloroform 8+2	Téměř bílý, krystal.
14		Benzín+chloroform 8+2	
15	15-17	Benzín+chloroform 8+2	Téměř bílý, krystal.
16		Benzín+chloroform 8+2	
17		Benzín+chloroform 8+2	
18	18	Benzín+chloroform 8+2	Bílý, krystalický
19	19-26	Benzín+chloroform 8+2	Bílý, krystalický
20		Benzín+chloroform 8+2	
21		Benzín+chloroform 8+2	
22		Benzín+chloroform 7+3	
23		Benzín+chloroform 7+3	
24		Benzín+chloroform 7+3	
25		Benzín+chloroform 7+3	
26		Benzín+chloroform 7+3	
27	27	Benzín+chloroform 7+3	Nahnědlý, olejovitý

V dalším postupu jsem zpracovávala preparativní tenkovrstvou chromatografií frakci 12, protože její odparek byl pěkně nažloutlý a olejovitý. Tato frakce obsahovala dva alkaloidy - „nižší“ o $R_f \sim 0,62$ a „vyšší“ o $R_f \sim 0,45$; látka o $R_f \sim 0,62$ („nižší“) byla přítomna také ve frakci 27. Ta však byla tvořena tmavým nevzhledným odparem. Rhomboidní nahnědlé krystalky látky CH-M/A-3, které z frakce 27 vykristalizovaly až po izolaci látky CH-M/A-3 z frakce 12 nemohly být zpracovány.

Tab. 8: Výsledky sloupcové chromatografie na oxidu hlinitém pro CH-M/A-3

Frakce	Hmotnost	Popis
Fr. 12: CH-M/A-3 „A nižší“	odparek čisté látky 0,0494 g	Nažloutlý olejovitý odparek s 1 alkaloidem
Fr. 27: CH-M/A-3	0,0777 g	Rhomboidní nahnědlé krystalky, dosud neizolované

4.6.1. Dělení frakce 12

4.6.1.1. Čištění frakce 12

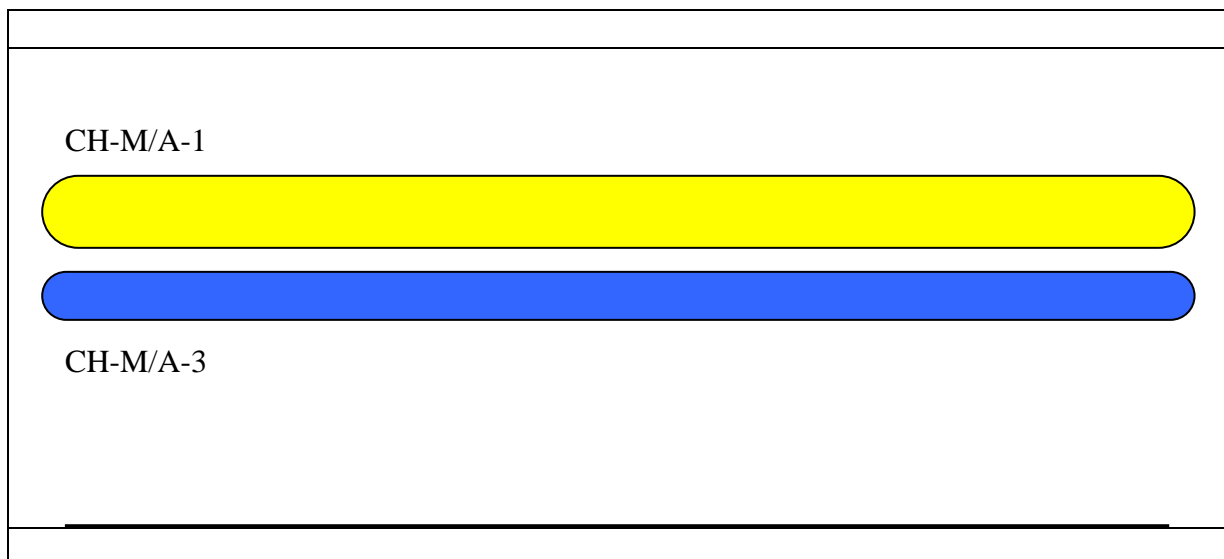
Po rozpuštění 0,27 g odparku ve směsi $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ 1:1 se po 3 hodinách vyloučil drobně krystalický téměř bílý podíl, byl odsát, promyt 2x směsí $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ 1:1 a vysušen v exsikátoru nad silikagelem ($n = 0,0292 \text{ g}$) a matečný loup zpracován preparativní tenkovrstvou chromatografií.

Vyloučené krystaly z fr. 11 a 12 byly identické (CH-M/A-1) a byly k nim přidány i krystaly z preparativní TLC frakce 12, označené jako „A vyšší“

Tab. 9: Preparativní TLC matečného louhu z fr. 12

Hmotnost frakce:	0,212 g žlutého odparku bylo rozpuštěno ve 0,0035 l směsi $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ 1:1
TLC desky	A 3, 15x7,5 cm, nanášeno v pruhu 13 cm
Počet desek	34
Soustava:	S 1, 9+1, komora nasycená, vyvíjení 2x

Obr. 3: Preparativní tenkovrstvá chromatografie frakce 12
desky 15 x 7,5 cm, A 3, vyvíjení 1x, detekce D 1



CH-M/A-3 („A vyšší“): $R_f \sim 0,45$

CH-M/A-1 („A nižší“): $R_f \sim 0,62$

Byly detekovány dvě zóny: *A nižší* ($R_f \sim 0,45$) – látky CH-M/A-3, *A vyšší* ($R_f \sim 0,62$) – látky CH-M/A-1. Zóny s adsorbentem byly vyškrabány, dále zpracovány.

Tab. 10: Výsledky preparativní chromatografie frakce 12

Zóna	Rozpouštědlo použité k vymytí látek z adsorbentu	Vzhled	Hmotnost
<i>A nižší</i> CH-M/A-3	0,05 l CHCl ₃ 0,05 l CHCl ₃ + EtOH 1:1	Olejevité, nahnědlý	0,0777 g, nejprve nekystalující, až po několika týdnech
<i>A vyšší</i> CH-M/A-1	0,05 l CHCl ₃ 0,05 l CHCl ₃ + EtOH 1:1	Žlutavý s krystaly	0,0705 g, po krystalizaci 0,0148 g bělavý, krystal.

Olejovité odparky byly rozpuštěny v malém množství CHCl₃, byl přidán EtOH do zákalu a ponechány krystalizovat.

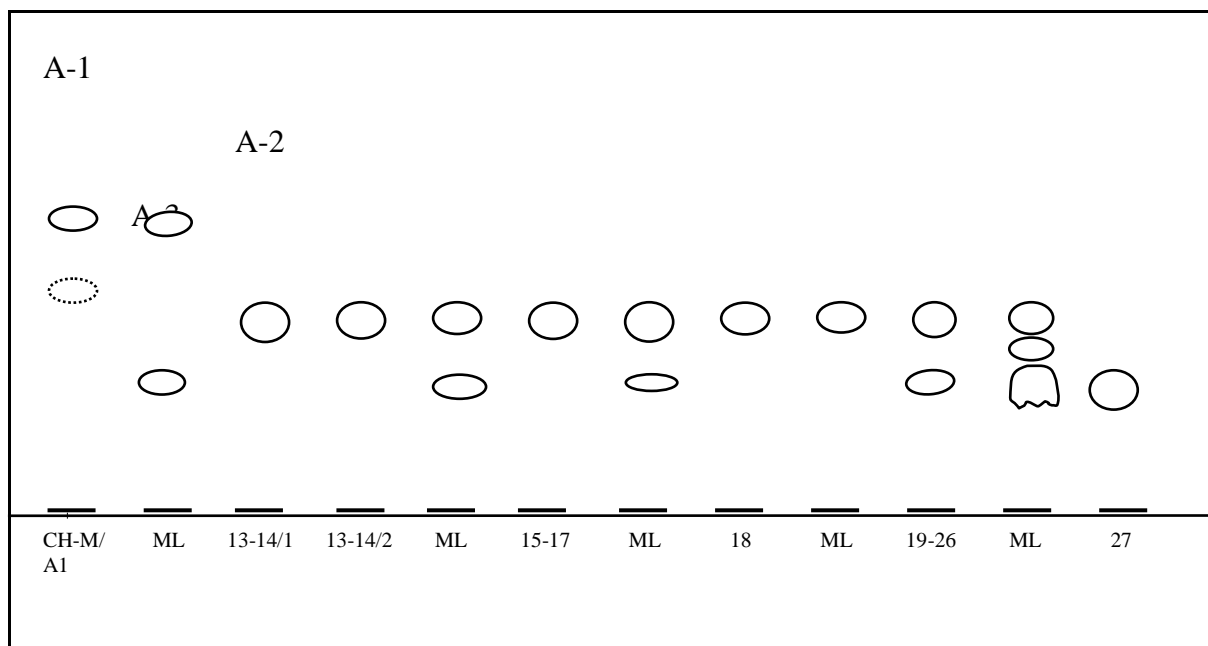
A vyšší

Po několika dnech se vyloučily shluky drobných krystalků, suspenze byla odsáta, krystalky na fritě promyty 2 x směsí CHCl₃ + EtOH 1:1 a krystaly vysušeny ve vakuu. Vzniklo 0,0148 g bělavých krystalků.

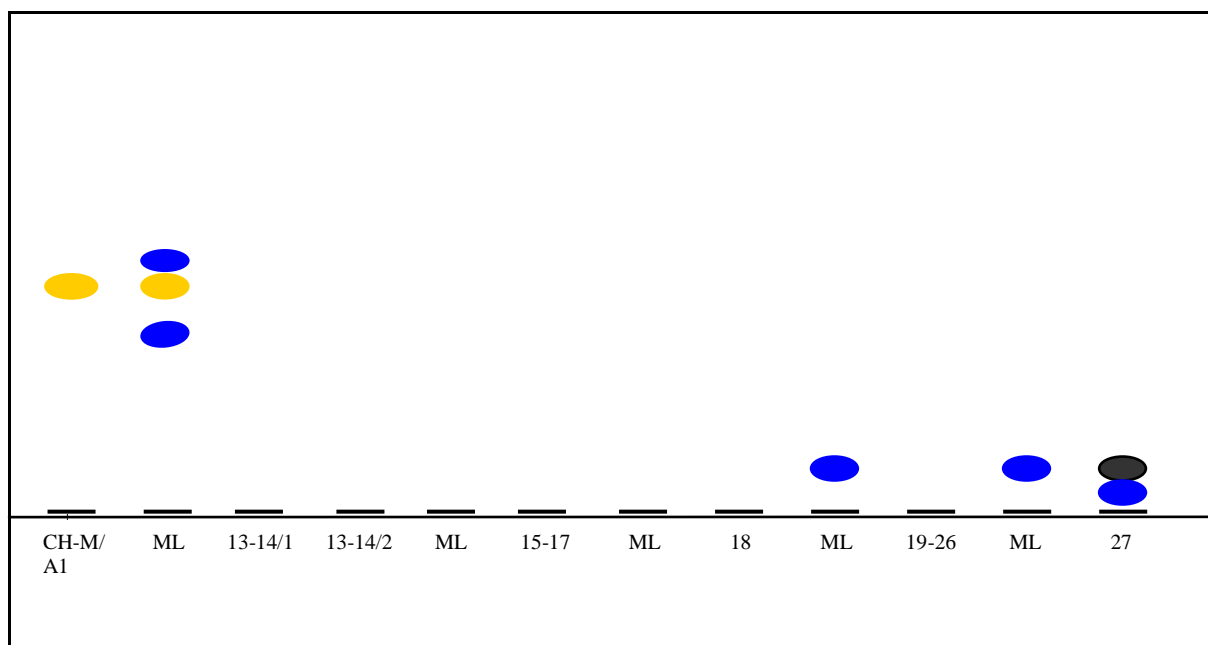
4.6.1.2. Čištění frakce 27

Dosud nebylo provedeno, protože se počítá s tím, že budou na preparativní tenkovrstvé chromatografie přidány zóny o stejné kvalitě z frakcí 13-26 (viz obrázky: detekce v UV 254 nm). Frakce po několika týdnech uskladnění zakrystalovala, krystalů je však málo, a proto tato látka, označená jako CH-M/A-3, a to z fr. 12 jako „*A nižší*“.

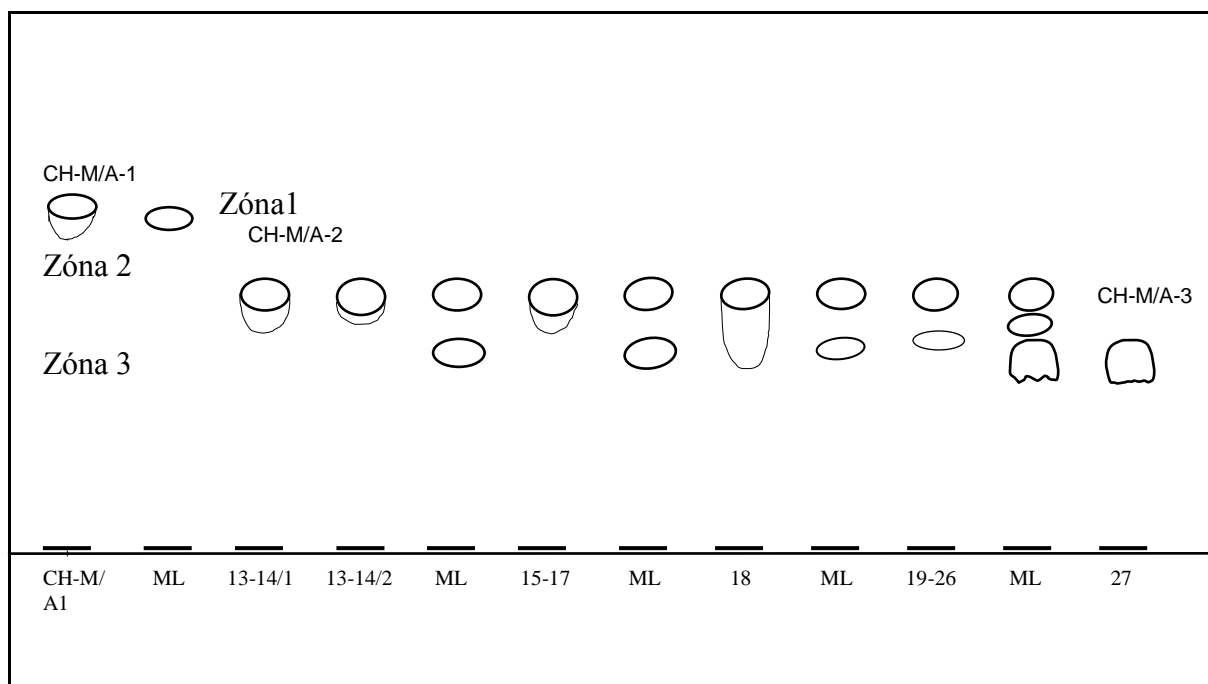
**Obr. 4: Tenkovrstvá chromatografie všech frakcí – detekce UV 254,
desky 5 x 10 cm, A 2, vyvíjení 2x, S 1**



**Obr. 5: Tenkovrstvá chromatografie všech frakcí – detekce UV 366
desky 5 x 10 cm, A 2, vyvíjení 2x, S 1**



Obr. 6: Tenkovrstvá chromatografie – detekce D 1
desky 5 x 10 cm, A 2, vyvíjení 2x, S 1



Pozn.: U čistých látek z frakcí 13-14/1 a 19-26 vzniká skvrna po detekci D 1 až po chvíli, ne hned na začátku. Pod UV pak skvrna není patrná vůbec.

Tab. 11: R_f hodnoty po detekci UV 254:

Zóna	fr. 12	ML	fr. 13-14/1	fr. 13-14/2	ML	fr. 15-17	ML	fr. 18	ML	fr. 19-26	ML	fr. 27
1	0,64	0,63	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2	0,47	-----	0,42	0,42	0,41	0,41	0,40	0,41	0,40	0,40	0,41	-----
3	-----	-----	-----	-----	0,28	-----	0,28	-----	-----	0,28	0,24	0,24

Pozn.: V ML před fr. 27 se nachází ještě jedna skvrna mimo vyznačené zóny s $R_f \sim 0,32$.

Tab. 12: R_f hodnoty po detekci UV 366

Zóna	fr. 12	ML	fr. 13-14/1	fr. 13-14/2	ML	fr. 15-17	ML	fr. 18	ML	fr. 19-26	ML	fr. 27
1	0,63	0,63	-----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----
2	-----	0,51	-----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----
3	-----	-----	-----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----

Pozn.: V ML látky CH-M/A-1 se nachází ještě jedna skvrna mimo vyznačené zóny s $R_f \sim 0,66$. Dále se zde vyskytují látky s $R_f \sim 0,08$ v ML fr. 18 a fr. 19-26 a ve fr. 27 a látka s $R_f \sim 0,03$.

Tab. 13: R_f hodnoty po detekci D 1

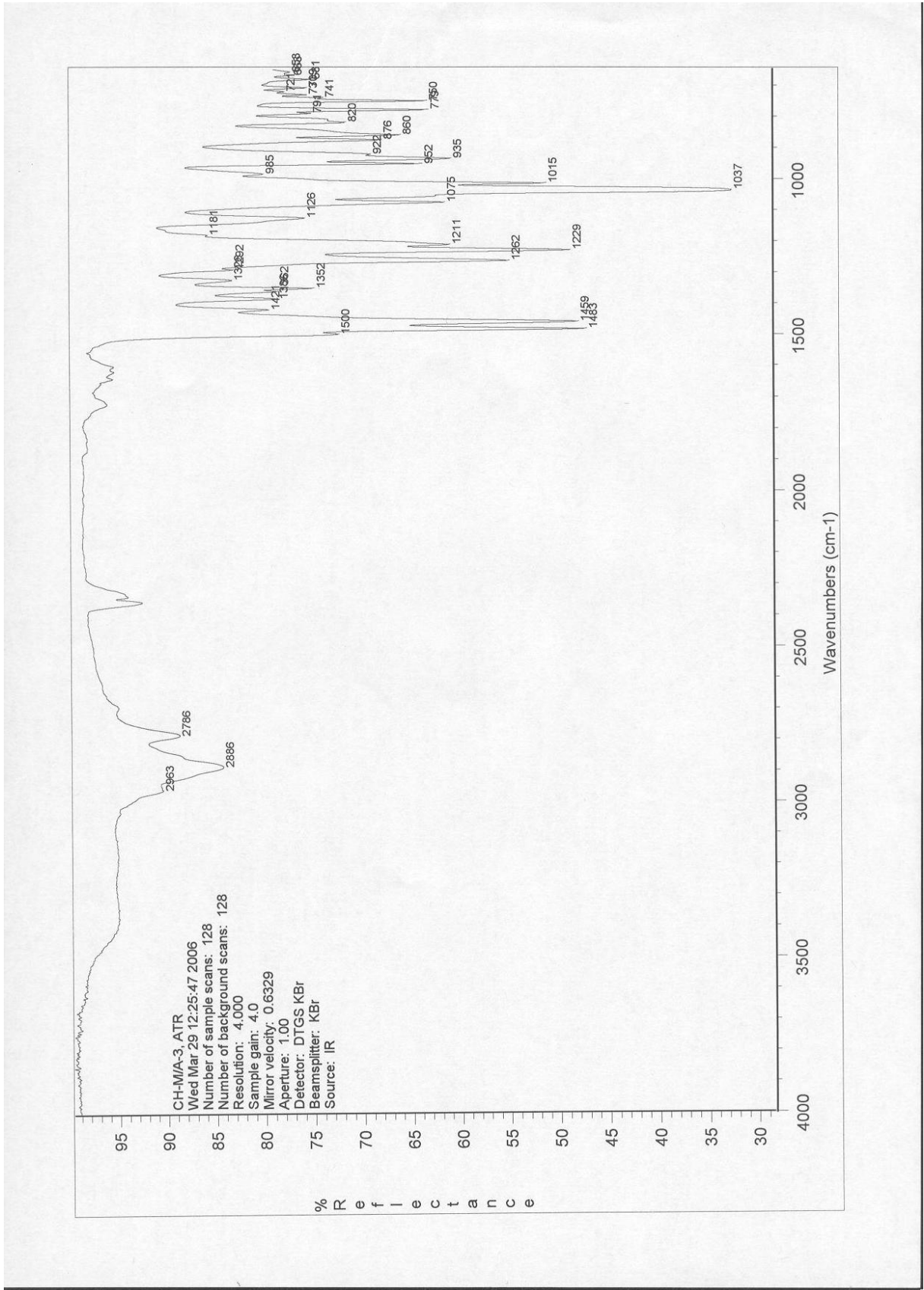
Zóna	fr.12	ML	fr. 13-14/1	fr. 13-14/2	ML	fr. 15-17	ML	fr. 18	ML	fr. 19-26	ML	fr. 27
1	0,64	0,62	-----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----
2	-----	-----	0,46	0,43	0,43	0,42	0,42	0,41	0,42	0,42	0,41	-----
3	-----	-----	-----	-----	0,30	-----	0,30	-----	0,29	0,29	0,26	0,24

Pozn.: V ML před fr. 27 se nachází ještě jedna skvrna mimo vyznačené zóny s $R_f \sim 0,34$.

Látku CH-M/A-1 izolovala Šárka Brožová, látku CH-M/A-2 izolovala Jana Nagyová, já jsem pracovala s látkou CH-M/A-3.

4.7. Charakteristika látky CH-M/A-3

Obr. 7 IČ spektrum látky CH-M/A-3



4.9. Výsledky testu vlivu látky na aktivitu AChE

Tab. 14: Biologická aktivita CH-M/A-3

Látka	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ [mg/l]	95% konfidenční interval [μM]	95% konfidenční interval [mg/l]	Směrnice
CH-M/A-3	x	2.86	x	2.12 - 3.87	0.743

Pozn.:

- hodnoty se udávají např: 0.221 (0.177 - 0.277), čísla v závorce znamenají rozpětí hodnoty IC₅₀ které je tím větší, čím byla měření zatížena větší chybou
- hodnota směrnice znázorňuje „strmost“ lineární části průběhu křivky IC₅₀ a poskytuje tak podrobnější informaci o průběhu inhibice; tato hodnota nahrazuje hodnoty IC₂₅ a IC₇₅ (popř. jiné), které bývají pro tento účel obvykle používány

5. DISKUSE

Léčba AD je záležitostí svízelnou a problémovou; tato choroba je totiž komplexem řady patofyziologických procesů, z nichž některé na sebe navazují a některé působí zcela samostatně. Ve výsledku jde o progresivně se zhoršující chronické onemocnění mozku; dochází k celkovému zhoršení mozkové činnosti a zejména paměti, funkcí sensorických a motorických. V současné době je hlavním terapeutickým postupem zásah do aktivity mozkové AChE. Řada sloučenin má cholinomimetické účinky velmi příznivé, ale prakticky bohužel naprosto nevyužitelné; tyto účinky jsou nejen centrální, ale i periferní a právě látky, které mají výrazné periferní účinky jsou nepoužitelné. Z přírodních látek přichází v úvahu jen několik málo sloučenin; v současné době začíná být prakticky využívám pouze galanthamin (Reminyl®). Velmi intenzivně se pracuje na různých galanthaminových derivátech.⁴⁵ Fysostigmin, který je významným cholinomimetikem, je těžko použitelný, protože má výrazné vedlejší účinky.

Další velmi perspektivní přírodní látkou je alkaloid izolovaný z některých zástupců čeledi Lycopodiaceae – huperzin A. Podává se v podstatně nižších dávkách než galanthamin; jeho dosažitelnost je však v současné době poněkud obtížnější než u jiných přírodních látek. Nicméně rozsáhlé syntetické studie dokazují, že tato látka bude přístupná totální syntéze.⁴⁶ Tato látka je velkou nadějí, protože syntetické látky v současnosti používané (dopenezil, takrin) nenaplňují terapeutické potřeby podle našich představ; takrin je v současnosti v podstatě léčivem už prakticky nevyužitelným.

Z těchto důvodů probíhá intenzivní výzkum jak syntetických, tak přírodních léčiv s ohledem na jejich schopnost reverzibilně zastavovat rozklad mozkové AChE. Jako velmi nadějně se kromě různých syntetických látek ukazují i některé přírodní látky; např.: už dříve zmiňovaný huperzin A (*Huperzia serrata*, Lycopodiaceae), dále saligenamid C (*Sarcococca saligna*, Buxaceae) s výraznějším zásahem do aktivity BuChE, zeatin (*Fiatoua villosa*, Orchidaceae; *Zea mays*, Poaceae) s IC_{50} $1,9 \cdot 10^{-4}$ M, dekursinol (*Angelica gigas*, Apiaceae), který má vysokou inhibiční aktivitu vůči AChE *in vitro* a ursolová kyselina (*Majorana hortensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, Lamiaceae) s vysokým inhibičním efektem vůči AChE. Patří sem ale i látky jako arisugaciny, kam můžeme zařadit meroterpenoidy - arisugacin A, arisugacin B a cyklofostin, dále dehydroevodiamin (*Evodia rutaecarpa*, Rutaceae) s IC_{50} $37,8 \cdot 10^{-3}$ M, (+)-homomoenjodaramin, moenjodaramin (*Buxus hyrcana*, Buxaceae), cykloprotobuxin C, cyklovirobuxein A, cyklomikrofilin A (*Buxus papillosa*, Buxaceae), α -onocerin (*Ononis spinosa*, Fabaceae), který vykazuje IC_{50} $5,2 \cdot 10^{-6}$ M, α -viniferin (*Caragana chamlague*, Fabaceae) a cynatrosidy A, B, C (*Cynanchum atratum*, Ranunculaceae).⁹

Z hlediska preparativního jsou alkaloidy atraktivní také tím, že se s nimi podstatně lépe pracuje než s neutrálními sloučeninami (lze je rychleji a méně nákladně čistit). Jednou z rostlin, u kterých se vyskytly alkaloidy biologicky aktivní vůči AChE je vlaštovičník větší (*Chelidonium majus*).

Jak nať tak kořeny obsahují 4 základní skupiny alkaloidů:

- a) benzofenanthridinový typ (α - naftofenanthridinový typ):
 - Tato skupina se dá rozdělit na 2 podskupiny:
 1. obsahuje terciární dusík (např. chelidonin) : **terciární alkaloidy**.
 2. obsahuje kvartérní dusík s 2 centrálními aromatickými prstencovými systémy (např. sanguinarin) : **kvartérní alkaloidy**.
- b) protoberberinový typ
 - tyto alkaloidy jsou zde zastoupeny: tetrahydroprotoberberiny (např. stylopin), protoberberiny (např. berberin).
- c) protopinový typ
 - sem náleží protopin, alkaloid typický pro čeleď Papaveraceae.
- d) ostatní
 - deriváty benzylochinolinu – 3 typy, které jsou zde zastoupeny jen v menším množství : chinolizidin, spartein (v *Chelidonii herba*); a aporfínový alkaloid magnoflorin (*Chelidonii radix*).²⁶

Výzkum vlaštovičníku většího se v posledních letech poměrně rozšiřuje, patrně z důvodu studia antineoplastického účinku alkaloidní látky nazvané **Ukrain**. **Ukrain** obsahuje alkaloidy *Chelidonium majus* L. konjugované s kyselinou thiofosforečnou.²⁷ V souvislosti se studiem antineoplastické aktivity je studována také řada ostatních alkaloidů i ohledně odlišných účinků – např. efekt benzofenanthridinových alkaloidů na lidské keratinocyty⁴⁷, inhibice 5- a 12-lipooxygenasy neredoxním mechanismem, atd..⁴⁸

V poslední době je také věnována pozornost vlivu vlaštovičnickových alkaloidů na hydrolyzu acetylthiocholinu a AChE (také podobných alkaloidů izolovaných z *Bocconia cordata*, Papaveraceae), a to zejména chelidoninu, sanguinarinu, chelerythrinu a také preparátu **Ukrainu**. Ukázalo se, že benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (sanguinarin, chelerythrin) jsou poměrně účinné (IC_{50} = 0,2-0,3 mM). Zajímavý účinek vykazuje také chelidonin a **Ukrain** (IC_{50} = 2-2,5 mM).⁴⁹

V souvislosti se screeningem přírodních látek alkaloidního charakteru z čeledi Papaveraceae a Fumariaceae, který je prováděn na katedře farmaceutické botaniky a ekologie, byl proveden pokus o izolaci alkaloidů s cílem podrobit tyto látky testování vlivu na mozkovou AChE a později i na prolylendopeptidasu. K této izolaci bylo použito 41,8 kg celé sušené rostliny (nať a kořeny). Izolační postup byl použit jak je uvedeno v literatuře profesorem Slavíkem.^{32,35} Jeho pracovní skupina se zabývala alkaloidy z čeledi Papaveraceae od 50.-70.tých let 20. století. Pro tyto izolace používala pracovní skupina sofistikovanou a velice logickou metodu: rostlinná část byla extrahována methanolem nebo EtOH. Po odstranění rozpouštědla byl odparek roztrpán ve slabém roztoku kyseliny sírové a zfiltrován. Prakticky neutrální alkaloidy a neutrální znečištěniny byly odstraněny vytřepáváním tohoto roztoku etherem. Vodná vrstva byla zalkalizována uhličitánem sodným na pH ~ 9-10. Vyloučené alkaloidy byly vytřepány diethyletherem. Zbylá vodná vrstva byla znovu zalkalizována hydroxidem sodným na pH ~ 12 – 12,5 a silné baze vytřepány opět do etheru. Po okyselení vodného extraktu kyselinou chlorovodíkovou a přidavku jodidu draselného byly vytvořené jodidy kvartérních bazí vytřepány CHCl₃ („jodidy kyselé“) a kyselý vodný roztok byl opět zalkalizován amoniakem a vytřepán CHCl₃, do něhož přešly „jodidy bazické“. Etherový výtřepok, který byl získán alkalizací uhličitánem sodným, obsahoval středně bazické alkaloidy. Poté byl dále separován přípravou pseudokyanidů (sanguinarinové baze vytvářející nerozpustné pseudokyanidy). Zbylý roztok po pseudokyanidech byl zpracován s koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na chloridy rozpustné ve vodě a chloridy ve vodě nerozpustné. Nakonec byly z těchto frakcí odděleny alkaloidy fenolické od nefenolických. Postup je patrně i historicky osvědčený. Bohužel se však ukázalo, že v našich podmínkách nepřináší vůbec tak snadné výsledky jako je popisuje Slavíkova skupina (jednoduchým vytřepáváním a frakční krystalizací tato skupina rozdělila látky až do čistého stavu). Zjistili jsme, že při použití naší drogy a opakování tohoto pokusu, je výsledek nereálný. Po odstranění málo bazických alkaloidů a ostatních znečištěnin z kyselého roztoku alkaloidů (31 g výtřepku A) byly připraveny pseudokyanidy (1,46 g). Byly připraveny chloridy alkaloidů ve vodě rozpustných a nerozpustných.

Já jsem se dále věnovala dělení alkaloidů, jejichž chloridy jsou ve vodě rozpustné. Zjistila jsem, že Slavíkem popisovaný postup nepřinesl tak výborné výsledky.³⁵ Autor krystalizoval baze různým způsobem z chloroform-methanolu, přičemž získal racemát stylopinu (t. t. = 221-222 °C), dále z nati (-)-stylopin (t. t. = 201-202 °C), chelidonin (t. t. = 135-136 °C) a protopin (t. t. = 203-204 °C). Řadu dalších alkaloidů odlišné struktury získal stejným postupem z kořenů. V mém případě byla situace zkomplikována tím, že jsem nepoužila

odděleně kořen a nať, ale celou rostlinu, protože nám byla výhodně nabídnuta zahraniční firmou. Předpokládala jsem, že se mi podaří relativně snadno rozdělit větší spektrum alkaloidů. Můj předpoklad se ale bohužel ukázal jako mylný a z tohoto důvodu musím čekat na výsledky spektrální analýzy, která teprve potvrdí strukturu izolované látky – CH-M/A-3. Jde o látku v této chvíli tekutou, která nevykrytalizovala, proto nebylo možné teplotu tání stanovit a jen velmi obtížně mohu odhadovat předpokládanou strukturu látky. Tenkovrstvá chromatografie v soustavě cyklohexan – diethylamin (9+1) ukázala, že alkaloid izolovaný mým způsobem (sloupcová chromatografie na oxidu hlinitém a následná izolace látky z frakce 12) je čistý. Na další výsledky a tedy konečné určení struktury látky musím počkat až po provedení spektrální analýzy.

Dále pak byl proveden test vlivu izolované látky na biologickou aktivitu AChE – látka byla testována pro její inhibiční schopnost standardním *in vitro* inhibiční testem. Je známo, že cholinesterasy jsou kompetitivně inhibovány kvartérními látkami. Pokles aktivity je úměrný použité koncentraci inhibitoru. Stanovení aktivity enzymu je založeno na jeho reakci s nativním substrátem, kdy je tento štěpen na alkohol cholin a kyselinu octovou. Tato je při použití pH-statové instrumentace neutralizována kontinuálními přídávky roztoku hydroxidu sodného, tak aby bylo udrženo statované pH 8.

0,5 ml homogenátu bylo smíseno s 2,5 ml 3 M roztoku chloridu sodného, 0,2 ml roztoku testované látky CH-M/A-3 a objem doplněn destilovanou vodou na 23 ml. Reakční směs byla vytemperována na 25 °C, oddělena od okolní atmosféry protékajícím dusíkem a pH bylo nastaveno na hodnotu 8 a spuštěn titrátor. Po té bylo k reakční směsi přidáno 2 ml 0,01 M roztoku substrátu – acetylcholin jodidu. Plotterem titrátoru byla následně zaznamenávána spotřeba 0,01 M roztoku hydroxidu sodného nutná k udržení statovaného pH reakční směsi. Koncentrace testované látky byly zvoleny tak, aby oblast aktivit enzymu byla rovnoměrně pokryta měřícími body od stoprocentní po nulovou aktivitu. Měření byla opakována pro každou koncentraci testované látky nejméně třikrát.

Stanovená biologická aktivita látky CH-M/A-3 je: $IC_{50} = 2,86 \text{ mg/l}$; 95% konfidenční interval = 2,12 – 3,87 mg/l. Výsledek je ale zatím pouze předběžný, protože nebylo možno stanovit IC_{50} v mM z důvodu neznámé struktury a tedy molekulové hmotnosti látky. Bude použita pozitivní kontrola galanthaminem nebo neostigminem, což provedeno nebylo, protože metoda je teprve rozpracována a je nutné ještě některé její kroky upravit. Z dostupných výsledků biologického testu vyplývá, že látka CH-M/A-3 je relativně účinná.

6. SOUHRN

Spolu s ostatními diplomantkami (Dagmar Kubincovou, Janou Nagyovou a Šárkou Brožovou) jsme provedly extrakci 41,8 kg suché nati s kořeny. Poté jsme tento získaný primární extrakt vyčistily a to filtrací a následným oddestilováním rozpouštědla. Dále jsme připravily sekvenčním postupem výtřepky s jednotlivými typy alkaloidů: šlo o dva diethyletherové výtřepky, které byly následně okyseleny, vzniklé kvartérní jodidy po přidání jodidu draselného vytřepány chloroformem a po následné alkalizaci extraktu byly získány další kvartérní jodidy vytřepáním do směsi chloroform + ethanol 8,5:1,5.

Dále jsem zpracovávala výtřepku A. Provedla jsem separaci látek z výtřepku A pomocí sloupcové chromatografie. Poté jsem použila frakci 12, kde se podle výsledků tenkovrstvé chromatografie nacházely 2 čisté látky („A vyšší“ a „A nižší“). Preparativní tenkovrstvou chromatografií jsem „A vyšší“ a „A nižší“ oddělila a pro další práci pak použila pouze „A nižší“, tj. čistou látku CH-M/A-3 (0,0494 g). Rhomboidní nahnědlé krystalky látky CH-M/A-3 z frakce 27 vykrytalizovaly až po izolaci látky CH-M/A-3 z frakce 12 (0,0777 g), nebyly proto vyčištěny a dále zpracovány. Další izolaci látky z frakce 27 jsem neprováděla, protože se ukázalo, že látka CH-M/A-3 z frakce 27 je identická s látkami označovanými jako „A nižší“ z frakce 12.

Jde o látku tekutou, která nevykrytalizovala, proto nebylo možné stanovit teplotu tání a jen velmi obtížně mohu odhadovat předpokládanou strukturu látky.

V závěru práce byl proveden test vlivu látky CH-M/A-3 na aktivitu AChE. Z naměřené hodnoty IC_{50} (= 2,86 mg/l) vyplývá, že izolovaná látka CH-M/A-3 pravděpodobně bude aktivní. Výsledek je zatím pouze předběžný, protože nebylo možno stanovit IC_{50} v mM z důvodu neznámé struktury a tedy molekulové hmotnosti látky. Bude použita pozitivní kontrola galanthaminem nebo neostigminem, což provedeno nebylo, protože metoda je teprve rozpracována a je nutné ještě některé její kroky upravit.

7. LITERATURA

-
- ¹ Jiráček, R.: Současné trendy v biologické terapii Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi*, 1, 2006, s. 8-11.
- ² Opletalová, V., Opletal, L., Kuča, K., Jun, D.: Pokroky ve vývoji cholinergik pro léčbu Alzheimerovy choroby. Sborník abstraktů z 34. konference: Syntéza a analýza léčiv; s. 27, Brno 12. – 14.9.2005.
- ³ Silbernagl, S., Lang, F.: Atlas patofyziologie člověka; Grada Publishing, spol. s.r.o., s.348-349, Praha 2001.
- ⁴ Giacobini, E.: Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease.: *Neurochem Res.* 28(3-4):515-22, 2003.
- ⁵ Greig, N. H., Lahiri, D. K., Sambamurti, K.: Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. *Int Psychogeriatr.* 14 Suppl 1,77-91, 2002.
- ⁶ Ibach, B., Haen, E.: Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's Disease. *Curr Pharm Des.* 10(3):231-51, 2004.
- ⁷ Gauthier, S., Emire, M., Farlow, M. R., Bullock, R., Grossberg, G. T., Potkin, S. G.: Strategies for continued successful treatment of Alzheimer's disease: switching cholinesterase inhibitors. *Curr Med Res Opin.* 19(8):707-14, 2003.
- ⁸ Liston, D. R., Nielsen, J. A., Villalobos, A., Chapin, D., Jones, S. B., Hubbard, S. T., Shalaby, I. A., Ramirez, A., Nason D., White, W. F.: Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 486(1):9-17, 2004.
- ⁹ Opletal, L., Opletalová, V.; Současné uplatnění některých přírodních látek v terapii demencí Alzheimerova typu; Sborník abstraktů z 34. konference: Syntéza a analýza léčiv; Brno 12. – 14.9.2005, s. 26.
- ¹⁰ Mills, C., Clary, B.,J., Gilmer, J.,F., Walsh, J.,J.: Inhibition of acetylcholinesterase by Tea Tree oil. *J Pharm Pharmacol.* 56(3):375-9, 2004.
- ¹¹ Zaheer-Ul-Haq, Z. U., Wellenzohn, B., Riedl, K. R., Rode, B. M.: Molecular docking studies of natural cholinesterase-inhibiting steroidal alkaloids from *Sarcococca saligna*. *J Med Chem.* No 6, 46(23):5087-90, 2003.
- ¹² Orhan, I., Terzioglu, S., Sener, B.: Alpha-onocerin: an acetylcholinesterase inhibitor from *Lycopodium clavatum*. *Planta Med.* 69(3):265-7, 2003.
- ¹³ Lamirault, L., Guillou, C., Thal, C., Simon, H.: (-)-9-Dehydrogalanthaminium bromide, a new cholinesterase inhibitor, enhances place and object recognition memory in young and old rats. *Neurobiol Learn Mem.* 80(2):113-22, 2003.

-
- ¹⁴ Piotrovsky, V., Van Peer, A., Van Osselaer, N., Armstrong, M., Aerssens, J.: Galantamine population pharmacokinetics in patients with Alzheimer's disease: modeling and simulations. *J Clin Pharmacol.* 43(5):514-23, 2003.
- ¹⁵ Corey-Bloom, J.: Galanthamine: a review of its use in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Int J Clin Pract.* 57(3):219-23, 2003.
- ¹⁶ Simon, B. B., Knuckley, B., Powell, D. A.: Galantamine facilitates acquisition of a trace-conditioned eyeblink response in healthy, young rabbits. *Learn Mem.* 11(1):116-22, 2004.
- ¹⁷ Wang, L. S., Zhou, J., Shao, X. M., Tang, X. C.: Huperzine A attenuates cognitive deficits and brain injury after hypoxia-ischemic brain damage in neonatal rats. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 41(1):42-5, 2003.
- ¹⁸ Zangara, A.: The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav.* 75(3):675-86, 2003.
- ¹⁹ Kelly, S. A., Foricher, Y., Mann, J., Bentley, J. M.: A convergent approach to huperzine A and analogues. *Org Biomol Chem.* 21;1(16):2865-76, 2003.
- ²⁰ Jin, G., Luo, X., He, X., Juany, H., Zhang, H., Bai, D.: Synthesis and docking studies of alkylene-linked dimers of (-)-huperzine A. *Arzneimittelforschung* 53(11):753-7, 2003.
- ²¹ Darvesh, S., Walsh, R., Martin, E.: Enantiomer effects of huperzine A on the aryl acylamidase activity of human cholinesterases. *Cell Mol Neurobiol.* 23(1):93-100, 2003.
- ²² Cordato, D. J., Mater, L. E., Herkes, G. K.: Stereochemistry in clinical medicine: a neurological perspective. *J Clin Neurosci* 10(6):649-54, 2003.
- ²³ Ulrichová, J., Walterová, D., Preininger, V., Šimánek, D.: Inhibition of Butyrylcholinesterase Activity by Some Isoquinoline Alkaloids. *Planta Med.* 48, 174 – 177, 1983.
- ²⁴ www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=158
- ²⁵ www.sk2.goo.cz/fotogalerie/fotografie/rostliny/bylinky/vlastovicnik
- ²⁶ Blaschek, W., Ebel, S., Hackenthal, E., Holtzgrave, U., Kellner, K., Reichling, J., Schnetz, V. et al.: Hager ROM 2004: Hager's Handbuch der Drogen und Arzneistoffe. Springer & Info II Uni. Würzburg, Würzburg, 2005.

-
- ²⁷ Tábořská, E., Bochořáková, H., Dostál, J., Paulová, H.: Vlačstovičník většší (*Chelidonium majus* L.) – přehled současného stavu poznatků; Čes. a Slov. Farm. 44 (2), 1995.
- ²⁸ Hejný, S., Slavík, B.: Květena České republiky 1, 2.vydání, Academica, Praha 1997, s. 493.
- ²⁹ Dostal, J., Slavik, J.: Some aspects of the chemistry of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids. *Studies in Natural Products Chemistry*, 27. Bioactive Natural Products (Part H), 155-184, 2002.
- ³⁰ Kadan, G., Gozler, T., Shamma, M.; (-)-Turkiyenine, a new alkaloid from *Chelidonium majus*. *J. Nat. Prod.*, 53(2), 531-2, 1990.
- ³¹ Then, M., Szentmihályi, K., Sarkozi, A., Illes, V., Forgacs, E.; Effect of sample handling on alkaloid and mineral content of aqueous extracts of greater celandine (*Chelidonium majus* L.). *J. Chromatogr., A* 889(1+2), 69-74; 2000.
- ³² Slavík, J., Slavíková, L.: Minor alkaloids from *Chelidonium majus* L.: Collection Czechoslov. Chem. Commun. 42, 2686 – 2693, 1977.
- ³³ Shafiee, A., Jafarabadi, A. H.: Corydine and norcorydine from the roots of *Chelidonium majus*. *Planta Med.* 64(5), 489, 1998.
- ³⁴ Kim, M. S., Hwang, B. Y., Choe, S. G., Lee, M. K., Ro, J. S., Lee, K. S.; Alkaloidal components of *Chelidonium fructus*. *Saengyak Hakhoechi* 31(4), 390-393, 2000.
- ³⁵ Slavík, J.: Alkaloidy rostlin makovitých (Papaveraceae) I.; Látky z vlačstovičníku (*Chelidonium majus* L.). *Českosl. Farm.* 1, 15 – 17, 1954.
- ³⁶ Sarkozi, A., Then, M., Szentmihályi, K.: Mineral element content of greater celandine (*Chelidonium majus* L.). *Acta Alimentaria* 34(2), 113-120, 2005.
- ³⁷ Szentmihályi, K., Sarkozi, A., Then, M.: Variations in macro- and microelements content as well as in alkaloids in *Chelidonium majus* L. plant and its extract. *Olaj, Szappan, Kosmetika* 51(1), 33-37, 2002.
- ³⁸ Buzyk, G. N., Lovkova, M., Ya., Sokolova, S. M., Tyutekin, Yu. V.; Determination of correlations between the content of alkaloids and the content of mineral and trace elements with the help of mathematical modeling. *Doklady Akademii Nauk* 376(5), 690-693, 2001.
- ³⁹ Opletal, L., ústní sdělení.

-
- ⁴⁰ Jang, Seon, II; Kim, Byung Hee; Lee, Woo-Yiel; An, Sang Jin; Choi, Han Gil; Jeon, Byung Hun; Chung, Hun-Taeg; Rho, Jung-Rae; Kim, Young-Jun; Chai, Kyu-Yun; Stylopine from *Chelidonium majus* inhibits LPS-induced inflammatory mediators in RAW 264.7 cells. *Archives of Pharmacal Research* 27(9), 923-929, 2004.
- ⁴¹ Stahl, E.: *Thin-layer Chromatography, A Laboratory Handbook*; Springer – Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1969; s. 873.
- ⁴² ČsL 4, vydání čtvrté, díl 1.: Avicenum – Zdravotnické nakladatelství, n.p.; Praha 1987; s. 361.
- ⁴³ Kuča, K., Cabal, J., Patočka, J., Dohnal, V.: Quaternary heteroarenium salts as the competitive inhibitors of the brain acetylcholinesterase. *Letters in drug design and discovery*, 1, 97-100, 2004.
- ⁴⁴ Bores, G. M., Kosley, R. W., Jr.; Galanthamine derivatives for treatment of Alzheimer's disease. *Drugs Fut.* 21 (6), 621-635, 1996.
- ⁴⁵ Tang, X. C., He, X. C., Bai, D. L.; Huperzin A: a novel acetylcholinesterase inhibitor. *Drugs Fut.* 24 (6), 647-663, 1999.
- ⁴⁶ Vavrecková, C., Gawlik, I., Mueller, K.; Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*. Part 2. Potent inhibitory action against the growth of human keratinocytes. *Planta Med.* 62 (6), 491-494, 1996.
- ⁴⁷ Vavrecková, C., Gawlik, I., Mueller, K.; Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*. Part 1. Inhibition of 5- and 12-lipoxygenase by a non-redox mechanism. *Planta Med.* 62 (5), 397-401, 1996.
- ⁴⁸ Kuznetsova, L. P., Nikol'skaya, E. B., Solichina, E. E., Fadeeva, M. D.; Inhibition of enzymatic hydrolysis of acetylthiocholine with acetylcholinesterase by principal alkaloids isolated from *Chelidonium majus* and *Macleya* and by derivative drugs. *Tsitologiya* 43 (11), 1046-1050, 2001.