

GIL-01

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE A VYBRANÉ FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ METODY VE VÝZKUMU ISOCHINOLINOVÝCH ALKALOIDŮ A JEJICH INTERAKCÍ S DNA

JAN VACEK^{a*}, PAVEL KOSINA^a, EVA VRUBLOVÁ^a,
MARTIN KUBALA^b, JITKA ULRICHOVÁ^a
a VILÉM ŠIMÁNEK^a

^a Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, ^b Katedra experimentální fyziky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, tř. 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc
jan.vacek@upol.cz

Isochinolinové alkaloidy (IA) představují rozsáhlou skupinu rostlinných sekundárních metabolitů, mnohé z nich našly uplatnění v humánní a veterinární medicíně. V přednášce jsou popsány dvě podskupiny IA, kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (KBA, sanguinarin a chelerythrin, Schéma 1) a protopinové alkaloidy (PA, protopin a allokryptopin, Schéma 2)^{1,2}. KBA se vyskytují v závislosti na pH prostředí ve formě pseudobáze **1** a kvartérního kationtu **2**. Podobně je tomu i u PA, u kterých rozlišujeme formu tricyklické báze **3** a tetracyklického kationtu **4**. Rovnováha obou forem úzce souvisí s biologickou aktivitou studovaných alkaloidů³.

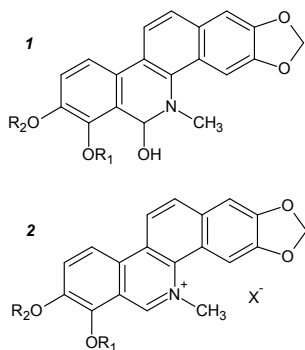


Schéma 1. Chemické struktury benzo[c]fenanthridinových alkaloidů, sanguinarinu ($R_1+R_2=CH_2$) a chelerythrinu ($R_1=R_2=CH_3$), ve formě pseudobáze (**1**) a kvartérního kationtu (**2**)

Výše uvedené alkaloidy podléhají v organismu savců metabolickým přeměnám, které vedou ke snížení jejich toxicity a usnadnění vyloučení z organismu. Ke studiu metabolizace KBA a PA byly navrženy postupy založené na kombinaci vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV-Vis spektrofotometrií a hmotnostní spektrometrií (MS). V případě KBA byly pomocí HPLC/MS identifikovány jejich dihydroderiváty jako jedny z primárních produktů metabolizace⁴. V případě metabolitů PA jsou známy hydroxy a methoxyderiváty⁵. V přednášce jsou zmíněny postupy vedoucí k identifikaci alkaloidů a jejich metabolitů v buněčných systémech. Výklad je zaměřen na analýzu IA po jejich biotransformaci v suspenzích a primárních kulturách potkaních a lidských hepatocytů pomocí elektrosprej MS s iontovou pastí.

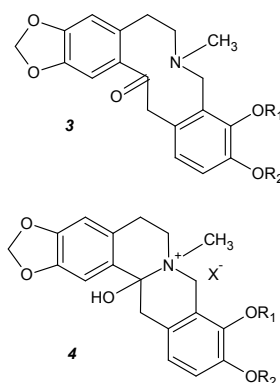


Schéma 2. Chemické struktury protopinových alkaloidů, protopinu ($R_1+R_2=CH_2$) a allokryptopinu ($R_1=R_2=CH_3$), ve formě tricyklické báze (**3**) a tetracyklického kationtu (**4**)

V další části přednášky je věnována pozornost studiu interakcí IA a jejich metabolitů s biomakromolekulami. Diskutovány budou především mechanismy jejich interakce s DNA. K řešení této problematiky jsou vhodné nedestruktivní analytické nástroje (elektroforetické techniky, spektrofotometrie a elektrochemické metody, jako je voltametrie a potenciometrie), pomocí kterých byla např. prokázána interkalace sanguinarinu do struktury DNA v podmínkách *in vitro*.

Současné výsledky nasvědčují tomu, že IA interagují s nukleovými kyselinami či bílkovinami a zasahují do buněčných procesů⁶. Předpokládáme, že za biologické účinky a toxicitu popisovaných IA odpovídají jejich kvartérní kationty. Alkaloidy ve formě volné báze a metabolity alkaloidů vykazují omezenou schopnost interagovat s DNA a enzymy.

Tato práce vznikla za podpory grantů MŠMT ČR (MSM 6198959216) a GA ČR (525/07/0871).

LITERATURA

1. Dvořák Z., Kubáň V., Klejdus B., Hlaváč J., Vičar J., Ulrichová J., Šimánek V.: *Heterocycles* 68, 2403 (2006).
2. Guinaudeau H., Shamma M.: *J. Nat. Prod.* 45, 237 (1982).
3. Dostál J.: *J. Chem. Educ.* 77, 993 (2000).
4. Psotová J., Klejdus B., Večera R., Kosina P., Kubáň V., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J.: *J. Chromatogr., B* 830, 165 (2006).
5. Wynne P. M., Vine J. H., Amiet R. G.: *J. Chromatogr., B* 811, 85 (2004).
6. Zdařilová A., Malíková J., Dvořák Z., Ulrichová J., Šimánek V.: *Chem. Listy* 100, 30 (2006).

GIL-02

FROM STEROIDS TO FUNCTIONAL MOLECULES

ZDENĚK WIMMER

*Institute of Experimental Botany AS CR, v.v.i., Isotope Laboratory, Videňská 1083, 142 20 Prague 4
wimmer@biomed.cas.cz*

Phytosterols are important plant products, which are biogenetic precursors of phytoecdysteroids, often produced by plants as defence natural products against insect pests¹. Numbers of them are known to display pharmacological activity against serious diseases². Despite of this importance, practical applications of phytosterols have not received adequate attention yet. Steroids of animal origin have been studied with higher intensity. If plants are treated with cholic acid, a primary bile acid in animals, their effect resulted in induction and accumulation of antimicrobial compounds (phytoalexins), hypersensitive cell death, pathogenesis related protein synthesis and increased resistance to subsequent infection by virulent pathogens. All these mechanisms result in suppression of plant diseases, and the compounds responsible for this effect are generally named elicitors³.

In our research, steroids of plant and animal origin have been used in construction of synthons convenient for designing functional molecules, which may be applied in different areas, from plant protection against insect pests till designing compounds enabling targeted transport of medicaments to the active sites or designing solvent-assisted self-assembly supramolecular systems with potentially broad spectrum of their application.

Insect pest control agents: In the past years of investigation, we have developed the idea of juvenogens, insect homonogenic compounds. The complex conjugate consists of a biologically active molecule, i.e. an insect juvenile hormone bioanalogue (a juvenoid), conjugated to an auxiliary molecule able to modify physico-chemical properties of the target juvenogen. Based on the insect species to be treated, the auxiliary molecules were either low polar molecules (fatty acids) or highly polar ones (saccharide molecules). Recently, we have selected phytosterols and bile acids as conjugating modifiers of physico-chemical properties of juvenogens. These compounds have been tested on several non-related insect species⁴, but the most promising results have been recently achieved in topical and drinking assays on the red firebug (*Pyrrhocoris apterus*)⁵. The effects of these compounds on plants and on microorganisms living in symbiosis with the insects have currently been under investigation.

Conjugates of phytosterols with aromatic compounds bearing nitrogen containing functionality in their molecules: One of the phytosterols, stigmasterol [(3 β ,22 E)-stigmasta-5,22-dien-3-ol] has been used during this investigation to design its amide conjugates with aromatic amino acids. Several 1, ω -dicarboxylic acids, ω -halocarboxylic acids and related organic molecules bearing different functionalities at the positions C(1) and C(ω) have been used as convenient linkers between stigmasterol and the molecule bearing nitrogen functionality. For example, with an amino acid derivative employed in designing such a conjugate, an amide bond was formed. Ester functionality was formed in other types of con-

jugates designed, which were based on using *N*-acyl derived amino acids for the synthesis. Physico-chemical properties of the prepared amide and ester conjugates were studied. UV spectra of the conjugates were recorded in solutions made from mixtures of acetonitrile / water, in which the ratio of both solvents was changed stepwise from 100 % of acetonitrile to 100 % of water. Changes in the intensity of absorbance maxima of numbers of the prepared conjugates were recorded, which indicate the ability of the compounds to form supramolecular systems through solvent-assisted assembly (Figure 1). Formation of gels or partial gels (less stable supramolecular systems) was observed with several structures prepared. The results of this partial investigation will be presented with several examples shown in details.

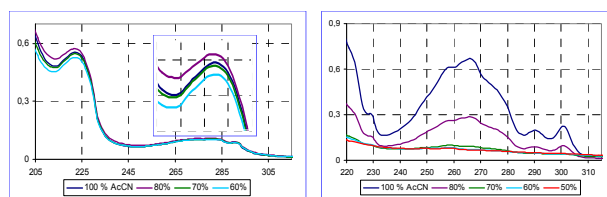


Fig. 1. Examples of the recorded UV spectra

Conjugates of phytosterols with amino acids and other biologically active compounds have also been subjected to the toxicity screening using cell fibroblasts of mouse. Several of these compounds proved their potential to be studied in more details. The toxicity of the tested conjugates towards the cells employed was dependent on the solubility of the tested conjugates in aqueous media.

In summary, it can be stated that conjugates of phytosterols with different molecules display potential to be more intensively studied to get synthons of novel chiral and solvent-assisted supramolecular systems, as well as conjugates with potential pharmacological importance.

This research has been funded by the grants 2B06024, OC09039 and OC10001 (the Ministry of Education, Youth and Sports) and by the Czech-Finnish project M20038090 (Academy of Sciences of the CR).

REFERENCES

1. Dinan L.: *Phytochem.* 57, 325 (2001).
2. Bradford P. G., Awad A. B.: *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 161 (2007).
3. Koga J., Kubota H., Gomi S., Umemura K., Ohnishi M., Kono T.: *Plant Physiol.* 140, 1475 (2006).
4. Jurček O., Wimmer Z., Svobodová H., Bennettová B., Kolehmainen E., Drašar P.: *Steroids* 74, 779 (2009).
5. Svobodová H., Ryšavá H., Pavlík M., Šaman D., Drašar P., Wimmer Z.: *J. Agric. Food Chem.*, in press.