

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**  
**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

**ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ BERBERINU  
NA ELEKTRODÁCH UHLÍKOVÉHO TYPU**

Bc. Petra Warzechová

Diplomová práce

**2018**

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**  
**FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**  
**DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY**

**THE ELECTROCHEMICAL DETERMINATION  
OF BERBERINE AT CARBON BASED ELECTRODES**

Bc. Petra Warzechová

Thesis

**2018**

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra Warzechová**  
Osobní číslo: **C16552**  
Studijní program: **N1407 Chemie**  
Studijní obor: **Analytická chemie**  
Název tématu: **Elektrochemické stanovení berberinu na elektrodách uhlíkového typu**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Seznamte se s principy voltametrické analýzy a proveďte literární rešerši týkající se klasifikace alkaloidů a možností jejich stanovení s důrazem na elektroanalytické metody.
2. V experimentální části proveďte, pomocí square-wave a diferenčně pulzní voltametrie, optimalizaci stanovení berberinu s využitím vybrané elektrody uhlíkového typu.
3. Navržené metody následně otestujte na modelových a reálných vzorcích.
4. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:  
Rozsah pracovní zprávy:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:  
**Podle pokynů vedoucího práce.**

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Tomáš Mikysek, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie  
Konzultant diplomové práce: **Ing. Milan Sýs, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **20. února 2018**  
Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalendá, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

## **Prohlašuji:**

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Pardubice.

V Pardubicích dne 3. 5. 2018

Bc. Petra Warzechová

## **Poděkování:**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu diplomové práce Ing. Tomáši Mikyskovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, vstřícnost a připomínky v průběhu celé práce. Dále bych chtěla také poděkovat konzultantovi Ing. Milanovi Sýsovi, Ph.D. za cenné rady.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a příteli za podporu po celou dobu mého vysokoškolského studia.

## **Anotace**

Předložená diplomová práce se zabývá elektrochemickým stanovením alkaloidu berberin, který se běžně vyskytuje v přírodě. Teoretická část je zaměřena na alkaloidy z hlediska jejich historie, rozdělení, výskytu a vlastností. Dále pak práce pojednává o konkrétních vlastnostech berberinu, jeho stanovení z hlediska elektrochemie a dalších metod. V části výsledky a diskuze jsou detailně popsány experimenty, které vedou k výběru nejvhodnějších podmínek pro měření. Tato část také zahrnuje ověření metody pomocí modelového vzorku a vzorků reálných.

## **Klíčová slova**

berberin, alkaloidy, voltametrie, uhlíková pastová elektroda

## **Annotation**

This diploma thesis is about electrochemical determination of alkaloid berberin, which naturally occurs in nature. The theoretical part is focused on alkaloids in terms of their history, distribution, occurrence and properties. Also the thesis deals with the specific properties of berberine and its determination from the point of the view of electrochemistry and other methods. In the section of results and discussion, the experiments are described in a detail which lead to the selection of the most suitable measurement conditions. It also includes verifying the method using model and real samples in the section.

## **Key words**

berberine, alkaloids, voltammetry, carbon paste electrode



## OBSAH

Seznam zkratek .....	11
1. ÚVOD .....	12
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	13
2.1. Historie alkaloidů.....	13
2.2. Vlastnosti a využití alkaloidů .....	14
2.3. Klasifikace alkaloidů .....	15
3. BERBERIN.....	20
3.1. Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti berberinu.....	21
3.2. Biologické vlastnosti berberinu .....	22
3.3. Biosyntéza berberinu .....	22
3.4. Strukturně podobné alkaloidy .....	23
3.5. Možnosti extrakce berberinu .....	26
3.6. Možnosti stanovení berberinu.....	29
Elektrochemické stanovení berberinu.....	30
Elektrochemické stanovení vybraných alkaloidů .....	34
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	35
4.1. Chemikálie a materiály .....	35
Příprava standardního roztoku .....	35
Příprava pufrů a kyselin.....	36
Příprava modelového vzorku .....	36
Příprava reálných vzorků .....	37
4.2. Příprava pracovních elektrod .....	38
Uhlíková pastová elektroda s parafínovým /silikonovým olejem .....	38
Uhlíková pastová elektroda ze skelného uhlíku .....	38

	Měření ohmického odporu elektrod.....	38
4.3.	Použité přístroje a pomůcky k měření .....	39
4.4.	Voltametrické techniky .....	41
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	43
5.1.	Úvodní elektrochemické experimenty .....	43
5.2.	Výběr měřicí techniky .....	46
5.3.	Průvodní experimenty v borátovém pufru .....	47
5.4.	Optimalizace podmínek DPV techniky .....	51
5.5.	Optimální podmínky .....	55
5.6.	Kalibrační závislost.....	59
5.7.	Modelový vzorek a reálné vzorky .....	61
6.	ZÁVĚR .....	65
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	67
8.	PŘÍLOHY .....	73

## Seznam zkratek

<b>AMK</b>	Aminokyselina
<b>B – R</b>	Britton – Robinsonův pufr
<b>CV</b>	Cyklická voltametrie
<b>CZE</b>	Kapilární zónová elektroforéza
<b>CPE</b>	Uhlíková pastová elektroda
<b>DAD</b>	Detektor s diodovým polem
<b>DPP</b>	Diferenčně pulzní polarografie
<b>DPV</b>	Diferenčně pulzní voltametrie
<b>GCE</b>	Elektroda ze skelného uhlíku
<b>HDME</b>	Rtuťová kapková elektroda
<b>HPLC</b>	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<b>LSV</b>	Lineární voltametrie
<b>NMR</b>	Nukleární magnetická rezonance
<b>SCE</b>	Nasyčená kalomelová elektroda
<b>SWP</b>	Polarografie čtvercových vln
<b>SWV</b>	Voltametrie čtvercových vln
<b>UPE</b>	Ultratlaková extrakce

# 1. ÚVOD

Jedním z témat, kterému se dlouhodobě věnuje elektroanalytická skupina katedry analytické chemie Univerzity Pardubice je výzkum v oblasti uhlíkových pastových elektrod (CPE). V počátcích byl tento výzkum zaměřen na vývoj, testování a modifikace CPE v oblasti elektrochemických měření, například při stanovení anorganických iontů, či organických látek. Současným trendem je příprava a testování těchto elektrod s využitím moderních uhlíkových materiálů jako jsou např. uhlíkové nanotrubičky nebo grafen, a z poživ pak např. iontové kapaliny.

Poměrně nedávno bylo otevřeno další z mnoha témat řešených v rámci elektroanalytické skupiny, a to téma týkající se voltametrických stanovení různých alkaloidů jako např. myristicin, kapsicin, piperin, synferin a v neposlední řadě i berberin, který je také předmětem této práce. S tímto alkaloidem se můžeme setkat ve volné přírodě, jelikož je součástí mnoha rostlin a jeho popularita v současnosti stoupá v důsledku jeho léčivých účinků.

I když bylo elektrochemické chování tohoto alkaloidu popsáno již dříve v odborné literatuře, nicméně v doposud provedených experimentech nebyly testovány uhlíkové pastové elektrody. Jedním z cílů této práce tedy bylo zkoumání elektrochemického chování berberinu na uhlíkových pastových elektrodách různého typu.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Historie alkaloidů

S termínem „alkaloid“ se poprvé setkáváme roku 1819, kdy byl použit německým chemikem C. F. W. Meißnerem. Ten alkaloidy definoval jako zásadité látky, jež jsou produkovány rostlinami a obsahují minimálně jeden atom dusíku, který je buď součástí heterocyklického kruhu, či součástí alifatického řetězce [1]. Avšak zcela první zmínka o alkaloidech samotných, především jejich účincích a užití, sahá až do druhého tisíciletí před naším letopočtem a to konkrétně do Mezopotámie a Číny. Zde byly hojně využívány kmenovými léčiteli či šamany jako součást léčebných úkonů. Alkaloidy byly bohatě využívány k bojům mezi jednotlivými kmeny, k lovu zvěře, a to především alkaloid kurare čili šípový jed. Ten při průchodu do krevního oběhu podnítil ochabnutí svalstva zvířete natolik, že došlo k zástavě dechu a následné smrti [2,3].

Nicméně úplně první izolace alkaloidů z rostlin, byla provedena na počátku 19. století a zásluha patří němcovi F. Sertürnerovi. Tento lékárník se pokusil jako první izolovat morfium z opia, konkrétně máku setého (*Papaver somniferum*) a následně použít výše uvedený alkaloid při experimentech na psech, později i na sobě, za účelem pozorování narkotických a analgetických vlastností této drogy. V důsledku toho považujeme Sertürnera za otce morfia, který jako první popsal základní zákonitosti tohoto alkaloidu [3,4].

Alkaloidy jsou tedy přírodní látky, které jsou z velké míry obsaženy v krytosemenných dvouděložných rostlinách, dále se objevují i u zvířat, hmyzu, mořských organismů a mikroorganismů. U rostlin jsou tyto dusíkaté sloučeniny převážně využívány k ochraně před predátory a ke komunikaci rostliny s okolím [5]. Alkaloidy jsou i pro své širokospektré působení a výskyt hojně využívány jako součást lidské potravy – např. čaje, koření, masti nebo oleje [6].

## 2.2. Vlastnosti a využití alkaloidů

Alkaloidy jsou látky alkalického charakteru, což znamená, že mohou vytvářet spolu s kyselinami ve vodném prostředí dobře rozpustné soli daných kyselin. Pouze některé alkaloidy se ochotně rozpouští ve vodném prostředí, ostatní se naopak ochotně rozpouští v alkoholu, etheru a chloroformu. Díky této skutečnosti můžeme alkaloidy oddělit extrakcí od dalších navázaných látek organickými rozpouštědly [7]. Jedná se o látky, které jsou z velké většiny v pevném stavu, ale mohou se vyskytovat i jako kapaliny a to především při pokojových teplotách, např. nikotin. Ty jsou ale oproti tuhému stavu charakteristické svým zápachem a vyznačují se tím, že se mohou destilovat. Většina alkaloidů se vyskytuje ve formě bezbarvých látek, avšak najdou se i alkaloidy, které jsou typické svým zbarvením. Žluté zbarvení je charakteristické pro berberin, červené pro betanin a žlutohnědé pro nikotin. Mezi další charakteristické znaky typické pro přírodní alkaloidy je schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla, vyznačují se tedy tím, že jsou opticky aktivní [8].

Valná většina alkaloidů má biosyntetický původ z aminokyselin, například fenylalaninu, lysinu nebo tryptofanu. Obsahují tedy ve svých strukturách nejen dusík, ale i atomy uhlíku či kyslíku, výjimečně síru a vodík [9]. Tyto látky bazického charakteru mohou rovněž vznikat jako meziprodukty biosyntézy purinů, které jsou součástí nukleových kyselin nebo steroidů či amoniaku [7].

Alkaloidy mají širokospektré využití, kdy se především využívají v medicíně jakožto prostředky k tlumení bolesti – morfin, ke snižování dušnosti – kodein, ke snížení krevního tlaku – atropin, zvýšení srdečního rytmu – kofein, léčba astmatu – efedrin. Dále je můžeme nalézt jako součást potravinových doplňků povzbuzujících soustředění či eliminaci únavy [10]. Využití alkaloidů jakožto terapeutika vede při delším užívání k toleranci organismu vůči těmto jedům a tělo se tak stane závislým na této látce [11].

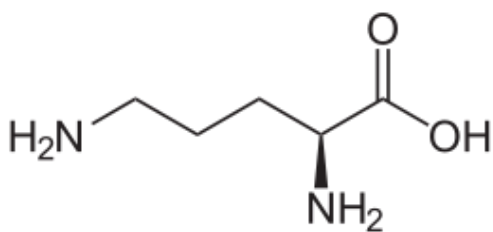
### 2.3. Klasifikace alkaloidů

Jak už bylo uvedeno výše, alkaloidy jsou přírodní organické látky, kde důležitým aspektem k jejich klasifikaci je přítomnost jednoho nebo více zásaditých dusíků, vázaných buď to v heterocyklech, nebo jako součást alifatického řetězce. Na základě umístění dusíku můžeme alkaloidy rozdělit do několika skupin, viz níže [12].

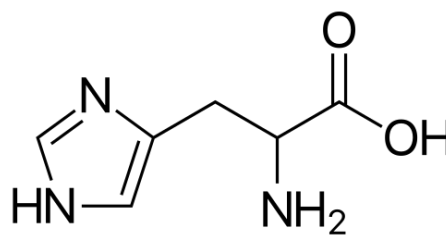
Základním a nejstarším rozdělením alkaloidů je na: pravé alkaloidy, pseudoalkaloidy a protoalkaloidy. Dále se běžně klasifikují na základě heterocyklu přítomného v molekule na: pyridinové, tropanové, chinolinové, indolové nebo purinové alkaloidy (tabulka 2, obrázek 3) [13].

- **Pravé alkaloidy**

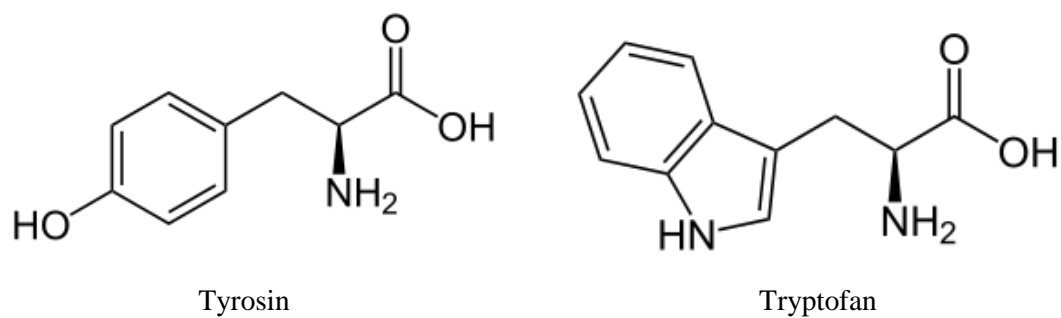
Tyto alkaloidy jsou odvozené od aminokyselin, ve své struktuře mají začleněný atom dusíku a jsou to látky, které jsou vysoce reaktivní i v malém množství. Valná většina těchto dusíkatých heterocyklických látek má hořkou chuť a vyskytuje se ve formě bílých krystalických látek, avšak kromě nikotinu, ten se přirozeně vyskytuje jako žlutohnědá kapalina. Do této skupiny zahrnujeme alkaloidy, které jsou odvozené od aminokyselin ornithinu, histidinu, lysinu, tyrosinu a tryptofanu (obrázek 1). Mezi pravé alkaloidy tedy patří například nikotin – součást tabáku (obrázek 2), piperin - v pepři, chinin v kůře chininovníku, kokain - z kokainovníku, morfin a kodein - z opia [9,14]. Přehled výskytu pravých alkaloidů a jejich zástupců tabulka 1.



Ornithin



Histidin



Obrázek 1: Přehled aminokyselin, od kterých jsou odvozeny alkaloidy [15].

Tabulka 1: Přehled vybraných pravých alkaloidů s příkladem jejich výskytů [16,17].

Aminokyselina	Skupina alkaloidů	Výchozí sloučenina	Příklad	Výskyt
Ornitin	Pyrolidinové	Pyrolidin	Hygrin	Listy koky
	Tropanové	Tropin	Atropin Kokain	Rulík zlomocný Koka pravá
	Pyrolizidinové	Pyrolizidin	Meteloidin Retronecin	Durmanovec Starček
Lysin	Piperdinové	Piperdin	Piperin Lobelin	Pepř černý Lobelka nadmutá
	Chinolizidinové	Chinolizidin	Cytisin Laburnin	Štědřenec odvislý
	Indolizinové	Indolizidin	Kastanospermin	Australský kaštan
Tyrosin	Fenylthylaminové	Fenylthylamin	Adrenalin Dopamin	Hormon Hormon
	Tetrahydroisochinolínové	Benzyltetrahydroisochinolin	Kodein Morfin	Mák setý Opium
Tryptofan	Indolové	Tryptamin	Psilocin	Lysohlávka

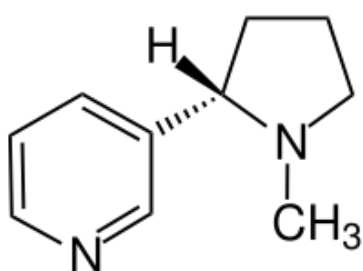


- **Pseudoalkaloidy**

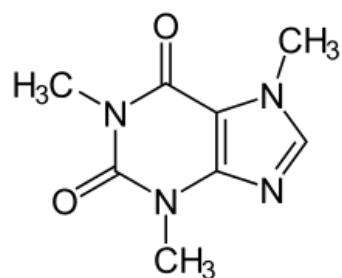
Tyto bazické látky nemají základní skelet, který by byl odvozen od konkrétní aminokyseliny, avšak jejich společnou vlastností je to, že mohou vznikat z intermediátů při biosyntéze některých kyselin, steroidů či působením aminů. Do této skupiny řadíme steroidní a trepenické alkaloidy, například kofein (obrázek 2), kapsicin nebo theobromin [14,18].

- **Protoalkaloidy**

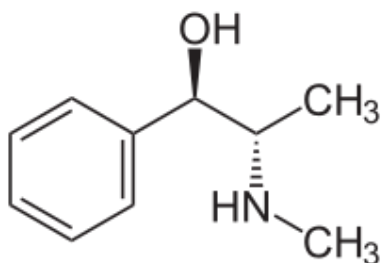
Jedná se o sloučeniny, ve kterých atom dusíku není součástí heterocyklické vazby, nýbrž je navázán v postranním řetězci. Tyto bazické látky jsou známy svou jednoduchou strukturou, přičemž výchozí látkou k jejich syntéze jsou aminokyseliny tyrosin a tryptofan. Mezi protoalkaloidy řadíme například efedrin (obrázek 2), meskalin, stachydrin a berberin [14].



Nikotin – pravé alkaloidy



Kofein – pseudoalkaloidy

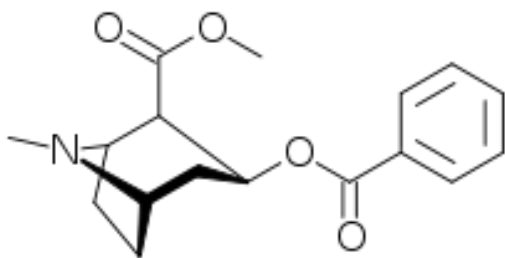


Efedrin – protoalkaloidy

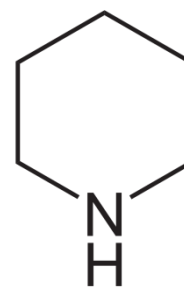
Obrázek 2: Přehled strukturních vzorců vybraných alkaloidů [19].

Tabulka 2: Rozdělení alkaloidů dle přítomnosti heterocyklu:

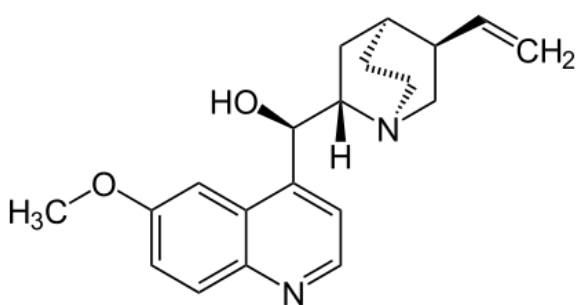
Alkaloidy	Zástupce	Výskyt	Mr [ g/mol ]	Účinek
Tropanové	Kokain	Koka	303,35	Lokální anestetikum
Pyridinové	Nikotin	Tabák	162,23	Toxický – během spalování se mění na kyselinu nikotinovou – již není toxická
Piperidinové	Piperdin	Pepř	85,15	Snižuje krevní tlak a rychlost dýchání
Cholinové	Chinin	Chininovník lékařský	324,42	Funguje jako antimalarikum, snižuje horečku, obsažen v toniku
Isocholinové	Berberin	Dřišťál	336,36	Působí proti chorobám srdce a průjmovým onemocněním
Indolové	Strychnin	Kulčiba	334,41	Křeče hladkého svalstva, jed na hlodavce
Purinové	Kofein	Kávovník arabský	194,19	Povzbuzuje centrální nervovou soustavu, močopudný
Steroidní	Solanidin	Klíčky brambor	175,63	Neurotoxin



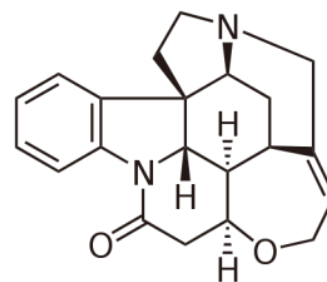
Kokain



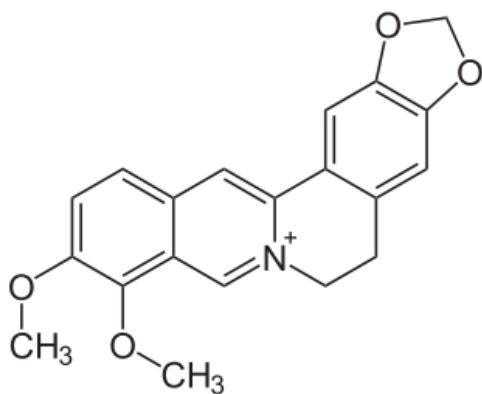
Piperidin



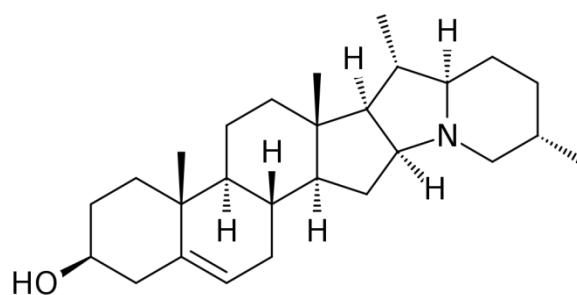
Chinin



Strychnin



Berberin



Solanidin

Obrázek 3: Přehled vybraných strukturních vzorců heterocyklických alkaloidů [20].

### 3. BERBERIN

Berberin je alkaloid, který má řadu léčivých účinků, avšak pouze v dávkách do 2 g/kg což odpovídá asi 20-30 bobulovitým plodům, při vyšších dávkách může docházet ke křečovitým bolestem v oblasti břicha a průjmům. Úplně první záznamy o využití a výskytu tohoto léčiva sahají až do roku 3000 př.n.l. do Číny [21]. Čistou formu této látky můžeme najít ve spoustě rostlin a to především u bylin čeledi dřišťálovitých, odkud pochází samotný název rostliny zvané Dřišťál obecný, tj. latinsky *Berberis vulgaris* (obrázek 4). Nejvyšší obsah berberinu u této rostliny se vyskytuje v kořeni, který se sbírá na podzim. Kořen rostliny obsahuje okolo 1% berberinu, dále obsahuje další alkaloidy jako je kolumbamin, palmatin či jatrimonihizin. Červeným plodům Dřišťálu obecného se říká tzv. dřišťalky. Léčivé účinky *Berberis vulgaris* jsou využívány k léčbě žlučníku, jater, revmatismu, ale také i ke snížení horečky [22].

Dále ho můžeme nalézt v rostlině, která se nazývá Vodilka kanadská (*Hydrastis canadensis*). I zde se berberin vyskytuje v největším množství v kořeni a jeho obsah je mezi 1 až 6%. Hlavním alkaloidem této rostliny je hydrastin, který v kombinaci s berberinem působí pozitivně při zánětech sliznice urogenitálního traktu [22].

Berberin také můžeme najít v Opuncii (*Opuntia*) (obrázek 4), což je rostlina, která spadá do čeledi kaktusovitých, a v hojné míře se z ní vyrábí olej s vysokým obsahem berberinu [23].

Dalším příkladem výskytu tohoto aminu je například v Mahonii cesminolisté (*Mahonia aquifolium*) nebo Vlaštovičnicku větším (*Chelidonium majus*), které byly použity ke stanovení berberinu v experimentální části, obrázek 4 [24].

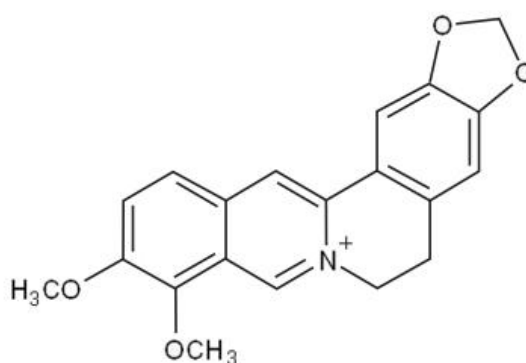




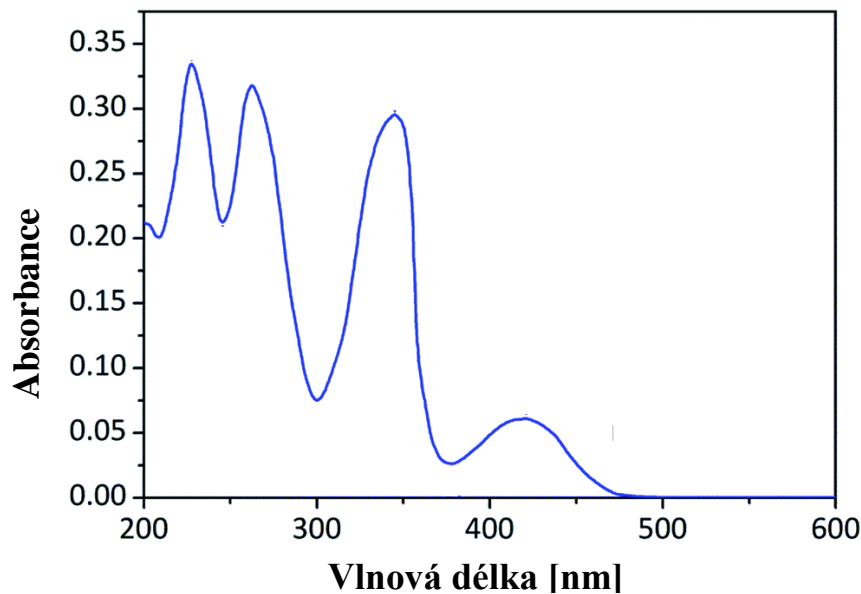
Obrázek 4: Nahoře vlevo – *Berberis vulgaris*, nahoře vpravo – Opuncie, dole vlevo – Mahónie cesminolistá, dole vpravo – Vlačstovičník větší [25,26,27].

### 3.1. Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti berberinu

Tento amin, jehož systematický název je 2,3-methylendioxy-9,10-dimethoxyprotoberberine (obrázek 5) a stechiometrický vzorec  $C_{20}H_{18}NO_4^+$  se vyskytuje jako žlutá krystalická látka [28]. Molární hmotnost tohoto alkaloidu je 336,37 g/mol s bodem tání  $145^{\circ}\text{C}$ . Ochoťně se rozpouští v 96% ethanolu, méně ve vodě. V přírodě se nejčastěji vyskytuje ve formě solí a jedná se o středně toxický alkaloid. [29]. Absorpční maximum dosahuje hodnot 230, 258, 344 a 420 nm, obrázek 6. Vyniká svou stabilitou při různém pH a teplotě, kdy nedochází k výraznému ovlivnění absorpčního spektra [30]. V berberinovém iontu je kladný náboj sdílen dusíkem a dvěma sousedními atomy uhlíku [31].



Obrázek 5: Strukturní vzorec berberinu [32].



Obrázek 6: UV-VIS spektrum berberinu [33].

### 3.2. Biologické vlastnosti berberinu

Berberin je jedovatá látka, jako řada dalších alkaloidů, pozorovaná letální dávka u myši byla 329 mg/kg při perorálním užití, podkožně okolo 18 mg/kg. Což znamená, že při požití vyššího množství tohoto alkaloidu dochází k utlumení dýchací a nervové činnosti, které způsobují ochrnutí až smrt [34].

Avšak byly prokázány i pozitivní účinky, kdy tento bazický alkaloid umožňuje eliminaci růstu nádorových buněk u žen s onemocněním rakoviny prsu, u mužů s onemocněním prostaty či pomáhá při leukémii. Má kladné účinky i na metabolismus cholesterolu, napomáhá udržovat správnou hladinu cukru v krvi a považuje se za jeden z nejsilnějších přírodních antibiotik [35,36]. Berberin se hůře vstřebává, příčinou je nízká absorpce střešní stěny a po podání perorální cestou je více než polovina tohoto alkaloidu vyloučena stolicí, proto by měl být užíván v menších dávkách, ale častěji. Také bylo vědecky ověřeno, že 1,5 g berberinu podávaného třikrát po 500 mg má stejné účinky jako léky, které jsou běžně předepisovány na diabetes typu II [29].

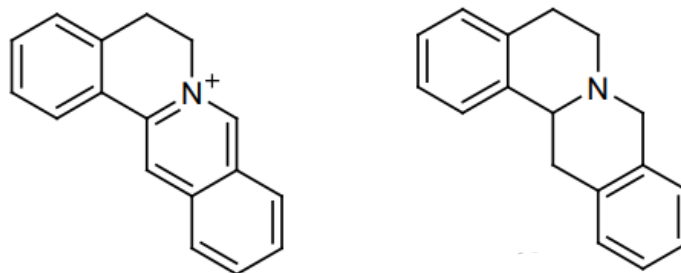
Berberin se také vyskytuje v přírodní kosmetice, kde zabraňuje šíření bakterií, které způsobují akné, a napomáhá k přirozenému vzhledu pokožky. Působí antimykoticky a zklidňuje podráždění pokožky, které vzniká vlivem např. ekzémů. Obecně napomáhá k obnově nejsvrchnější vrstvy kůže tzv. epidermis [37].

### 3.3. Biosyntéza berberinu

Při biosyntéze berberinu (obrázek 7) nejprve dochází k oxidaci AMK tyrosinu pomocí enzymu tyrosinhydroxylázy a ke vzniku AMK dihydroxyfenylalaninu, tyto aminokyseliny jsou přeměněny na tyramin a dopamin. Dále dochází k reakci dopaminu s 4-hydroxyfenylacetaldehydem za současné dehydratace a vzniku norkoklaurinu. Norkoklaurin je významný prekurzor potřebný k syntéze valné většiny benzylochinolinových alkaloidů [38]. Ten dále reaguje obdobným mechanismem Mannichovy reakce, kdy dojde k adici nukleofilu z karbonylové sloučeniny na iminiovou sůl [39]. Po oxidaci a methylaci pomocí S-adenosylmethioninu (SAM) vznikne retikulin. Tento alkaloid, se řadí mezi benzylochinolinový typ, izoluje se z rostliny zvané Láhevník síťovaný (*Annona reticulata*), avšak lze ho izolovat i z Máku setého (*Papaver somniferum*), jakožto vedlejší látku, což znamená, že některé látky mohou být jako hlavní látka v jednom alkaloidu zatímco v jiném se mohou vyskytovat jako přechodný metabolit [22]. Oxidací terciálního aminu retikulinu vznikne iminový ion, kde je v důsledku Mannichovy reakce orto poloha nukleofilní, elektrony jsou tlačeny za následného vzniku produktu č. 6. Tento produkt je dále podroben keto-enolové tautomerizaci a methylaci SAM za vzniku tetrahydrokolumbaminu. Vzniklý alkaloid je oxidován za vzniku kanadinu, ten je znovu podroben oxidaci a přechází na alkaloid berberin [40,41].

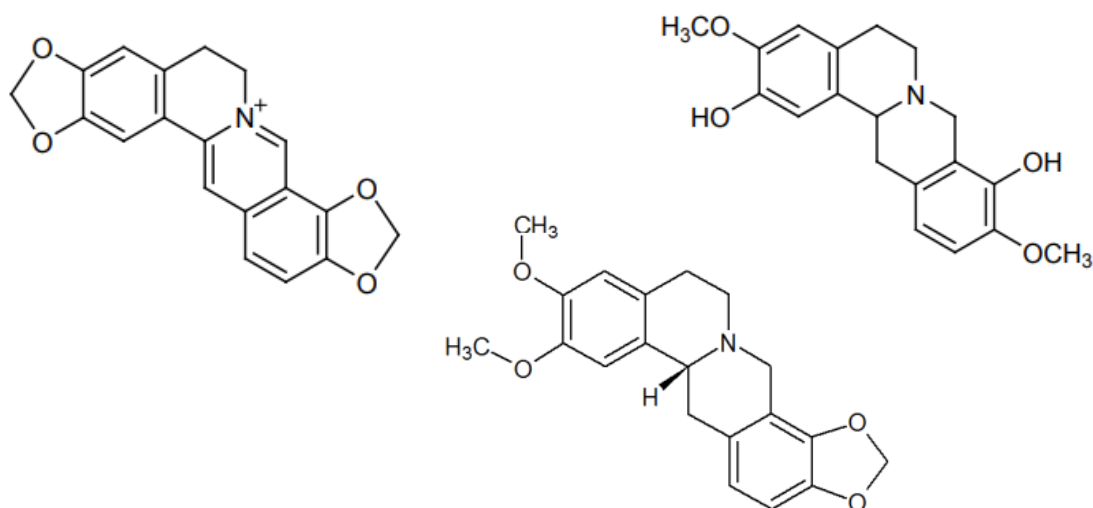
### 3.4. Strukturně podobné alkaloidy

Berberin zařazujeme mezi alkaloidy s isochinolinovou strukturou, konkrétně se jedná o protoberberinový typ alkaloidu. S tímto protoberberinovým typem alkaloidů se můžeme setkat v mnoha rostlinách, jako je např. Růžkatec (*Ceratophyllum*), Žluťucha orlíčkolistá (*Thalictrum Aquilegiifolium*), či výše zmíněný Dřišťál obecný (*Berberis vulgaris*). Z chemického hlediska můžeme tyto alkaloidy nalézt pouze ve dvou formách a to, tetrahydroprotoberberinová forma či forma kvartérních amoniových solí (obrázek 8) [42].



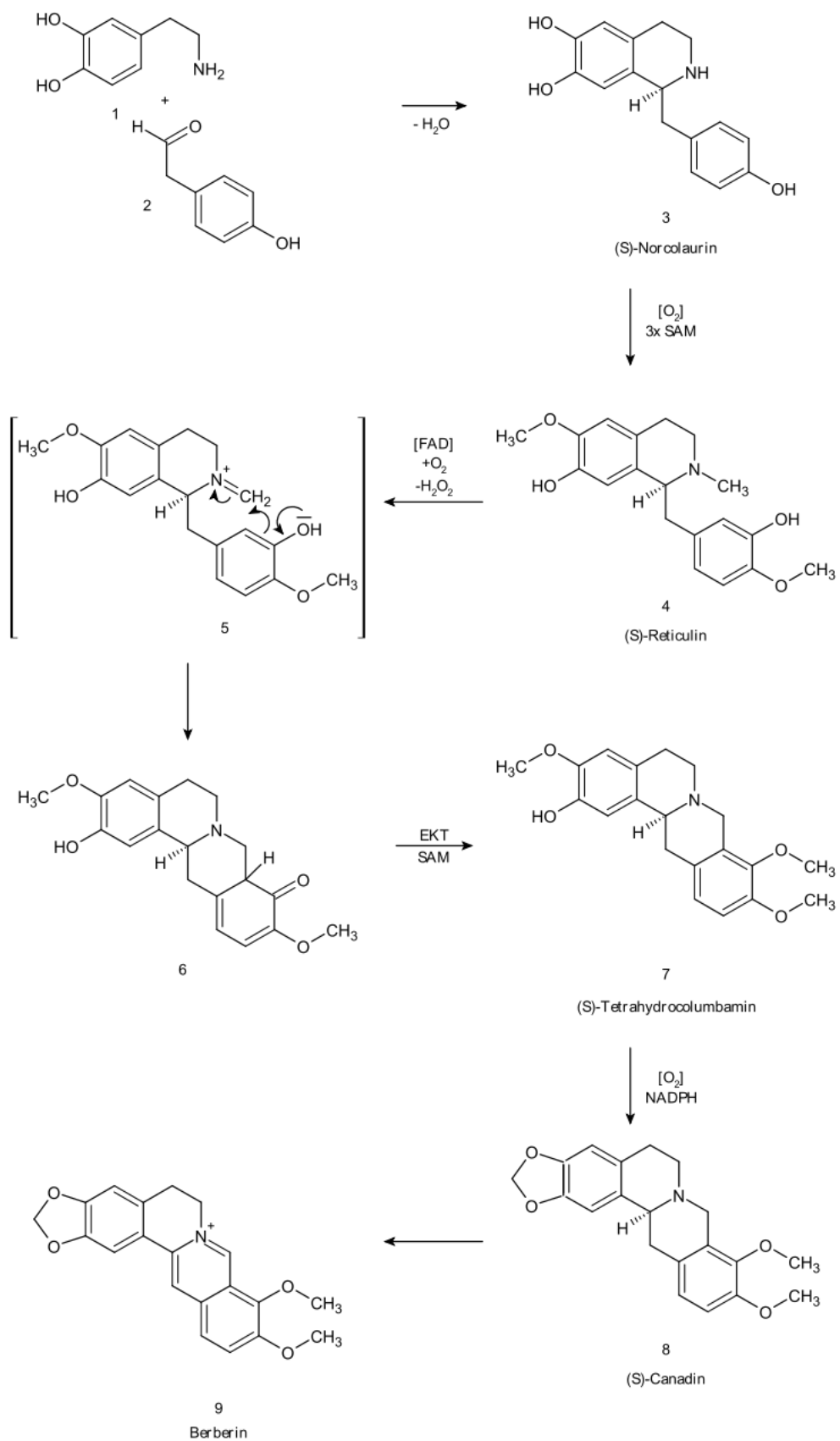
Obrázek 8: Vlevo – kvartérní forma, vpravo - tetrahydroforma [42].

Mezi alkaloidy, které mají strukturu podobnou berberinu můžeme tedy zařadit např. Koptisin (obrázek 9), jeho sumární vzorec je  $[C_{19}H_{14}NO_4]^{+21}$  a molekulová hmotnost 320,32 g/mol se vyskytuje v rostlině známé pod názvem Koptis čínský (*Coptis chinensis*) a slouží ke snížení bolesti srdce, krvácení z nosu nebo při popáleninách [43]. Dále je tato struktura známá svým výskytem v alkaloidu, který nese název skoulerin (obrázek 9). Sumární vzorec toho alkaloidu je  $C_{19}H_{21}NO_4$  a vyskytuje se především v rostlině, která se nazývá Rohatec růžkatý (*Glaucium corniculatum*), molekulová hmotnost 327,37 g/mol a vyznačuje se svými sedativními účinky [44]. Dalším zástupcem této skupiny je sinaktin (obrázek 9), který můžeme nalézt v Máku vlčím (*Papaver rhoeas*), jeho sumární vzorec  $C_{20}H_{19}NO_4$ , molekulová hmotnost 339,391 g/mol, a je významný svými antibakteriálními účinky [44].



Obrázek 9: Vlevo – koptisin, vpravo – skoulerin, uprostřed – sinaktin [44].





Obrázek 7: Schéma biosyntézy berberinu [45].

### 3.5. Možnosti extrakce berberinu

Pro extrakci všech alkaloidů je důležitý zisk vzorků ve formě semen, listů nebo kořene rostliny, v němž se příslušný alkaloid vyskytuje. Dalším krokem je vyluhování získaného materiálu v alkoholovém roztoku a následná alkalizace uhličitanem sodným nebo amoniakem. Takto získaný bazický roztok se extrahuje organickým rozpouštědlem, zpravidla chloroformem či ethyl-acetátem. Roztok obsahující alkaloidy se vysuší síranem sodným, zfiltruje se a destiluje se za sníženého tlaku, čímž se získá alkaloidní zbytek [46].

Móricz a kolektiv provedli extrakci berberinu z Vlastovičnicku většího (*Chelidonium majus*). 0,25 g vzorku ve formě prášku (dříve namleté kořeny a listy), bylo vyluhováno v 50 ml 15% kyseliny octové po dobu 20 minut. Takto připravený roztok byl umístěn do ultrazvukové lázně. Dále se provedla filtrace a vzniklý filtrát byl extrahován 50 ml dichlormethanu. Vzniklá organická fáze byla vysušena bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , odpaření nadbytečného  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  bylo provedeno pomocí rotační vakuové odparky a takto získaný materiál byl dále rozpuštěn v 1,5 ml methanolu. Získaná koncentrace berberinu z celého kořene byla kolem 3 mg/1ml, z prášku okolo 1,6 mg/1ml [47].

Další izolaci berberinu provedl Jong Lee z rostliny, která se nazývá Dýmivka (*Corydalis cava*). K extrakci byly použity 3 kg této vysušené rostliny. Získaný materiál byl luhován po dobu 12 hodin v 80% methanolu za pokojové teploty. Vzniklý extrakt byl následně přefiltrován přes filtrační papír, odpařen ve vakuu, přičemž byl získán tmavě hnědý methanolicový extrakt. Takto vzniklý roztok byl smísen s roztokem 30% HCl a octanem ethylnatým o konečném pH 2,5. Dále byl podroben chromatografii, obsah berebrinu byl stanoven na  $82 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{ml}$  [48].

Izolace berberinu z Mahónie cesmínolisté (*Mahonia aquifolium*) a Koptisti čínské (*Coptis chinensis*) metodou vysokotlaké extrakce rozpouštědlem (PSE). K identifikaci berberinu v rostlinách byla použita kapilární zónová elektroforéza s UV detekcí v oblasti 245 nm. Pro CZE byl použit jako pufr octan amonný o pH 3,1. Jako extrakční činidlo byl použit methanol a teplota byla nastavena na hodnotu 120°C. Při srovnání Soxhletovy extrakce a PSE bylo zjištěno, že při vysokotlaké extrakci rozpouštědlem dochází k zisku většího množství berberinu z důvodu lepší rozpustnosti

analytu. Protože vyšší teplota ochotně narušuje vazby v matici. Výsledná reprodukovatelnost dosahovala hodnoty 2,4 – 10,7% (n = 5) [49].

Mikroextrakce berberinu, koptisinu a palmatinu z Koptisti čínské (*Coptis chinensis*). Zásobní roztoky jednotlivých standardů byly připraveny rozpuštěním v methanolu o koncentraci 2 mg/ml. Reálný vzorek – kořeny Koptisti čínské byly ponořeny na 24 hodin v roztoku 100 ml methanolu a 1 ml kyseliny chlorovodíkové. Získaná směs se umístila do ultrazvuku po dobu 50 minut, vzniklý supernatant byl umístěn do lednice a použit k chromatografické analýze. Získané množství 3 µg/ml [50].

Další extrakce byla provedena z rostliny zvané Bauhinie (*Bauhinia*) jež byla nasbírána v pohoří Íránu. Získané kořeny (2 kg) byly vysušeny na vzduchu, pomlety elektrickým mlýnkem a extrahovány methanolem za použití Soxhletova extraktoru. Vzniklý perkolovaný extrakt byl zfiltrován a vakuově odpařen. K takto získanému koncentrovanému extraktu o hmotnosti 85 g byla přidána HCl a dichlormethan. Tyto tři fáze se spojily do jedné organické. Do vodné části, která byla zalkalizována amoniakem na konečné pH 9, se přidal dichlormethan, organická vrstva byla odpařena a vznikla další frakce. Opět došlo k upravení vodné fáze, avšak v tomto případě byla okyselena kyselinou chlorovodíkovou na pH 7 a po odpaření vznikla poslední frakce, která měla hmotnost 4 g. Tato složka byla využita k analýze pomocí NMR. Výsledné množství získané touto extrakcí bylo 180 mg [51,52].

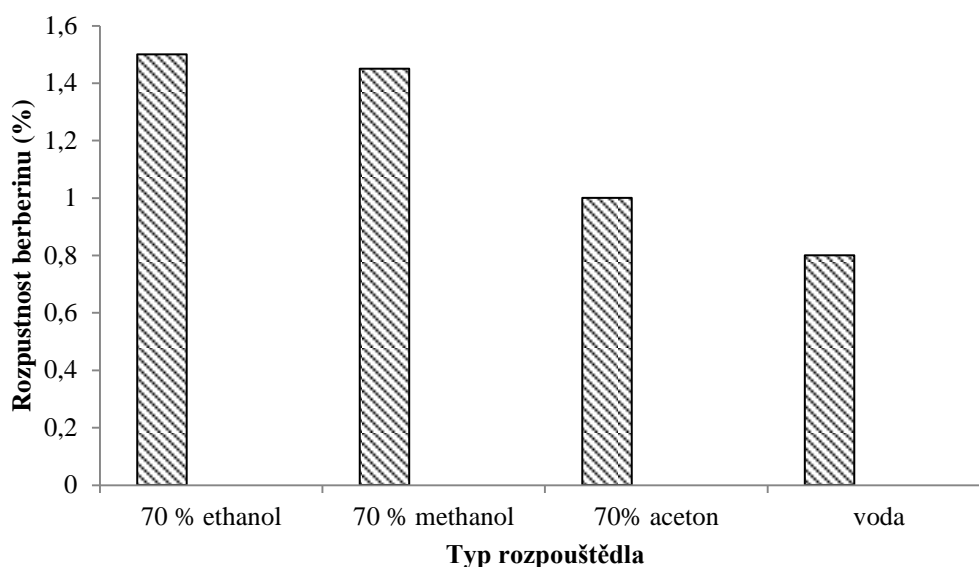
Liu se svým týmem vyvinuli novou metodu ultratlakové extrakce (UPE). Tato metoda se osvědčila k efektivní extrakci berberinu z kořenů Korkovníku amurského (*Phellodendron amurense*). Izolace tohoto alkaloidu byla provedena po dobu 4 min za tlaku 400 MPa při teplotě 40°C. Vzorek byl smíchán se 40 ml 70% ethanolu, následně umístěn do sterilního polyethylenového vaku po dobu 24 hodin. Při porovnání ostatních extrakčních technik jako je refluxní technika, ultrazvuk či Soxhletova extrakce, bylo zjištěno, že technika UPE oproti nim vykazuje vyšší výtěžek a zároveň se výrazně snižuje doba extrakce, výsledky shrnuty v tabulce 3 [53].

K izolaci berberinu v ultrazvuku (UE) byl použit 1g Korkovníku amurského (*Phellodendron amurense*), ten byl ponořen ve 250 ml lahvičce, která obsahovala 40 ml 70% ethanolu. Po uplynutí 24 hodinové eluce byla lahvička se vzorkem umístěna do sonické lázně na 1 hodinu. Na závěr byly extrakty stanoveny dle postupu UPE, výtěžnost uvedena v tabulce 3 [53].

Extrakce horkým rozpouštědlem (*ultrahigh pressure extraction*), 1 g vzorku vysušeného korkovníku byl umístěn v tříhrdlé baňce, která obsahovala 40 ml 70% extrakčního činidla, v tomto případě opět ethanol. Látka byla extrahována 24 hodin a po vyluhování byl roztok v baňce zahřát na teplotu varu. V tomto stavu byl eluát udržován po dobu 4 hodin a po ukončení následovalo stanovení extraktů metodou UPE, výtěžnost tabulka 3 [53].

Obdobně byla provedena i extrakce dle Soxhleta (SE), kdy byl opět použit 1 g sušeného vzorku stromu, následně se přidalo 40 ml 70% roztoku ethanolu. Vzorek byl opět namočen v ethanolu na 24 hodin a poté zahříván na teplotu varu za použití zpětného chladiče. Výtěžnost dosahovala hodnoty uvedené v tabulce 3, obrázek 10 [53].

Z příložených výsledků v tabulce 3. byla extrakce UPE jednoznačně nejlepší metoda k izolaci berberinu [53].



Obrázek 10: Účinek rozpouštědel v UPE – extrakční podmínky 400 MPa, 30°C, poměr kapaliny a pevné fáze 40:1, 30 min [53].

Tabulka 3: Výtěžnost získaná různými druhy extrakce [53].

Druh extrakce	Podmínky extrakce	Výtěžnost [%]
UPE	300 MPa, 40 °C, 4 min	1,93 ± 0,06
UE	250 W, 30 °C, 60 min	1,49 ± 0,03
HRE	80 °C, 4 hod	1,28 ± 0,02
SE	90 °C, 6 hod	1,51 ± 0,03

### 3.6. Možnosti stanovení berberinu

Ke stanovení berberinu a dalších osmi alkaloidů např. koptisinu v krvi, byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Analýza berberinu byla provedena z krve potkanů, kterým byl podán doplněk stravy zvaný Banxia xiexin (BXD). Každému potkanovi bylo podáno 20 g/kg BXD, což odpovídá 11,56 mg/kg berberinu. Po 12 hodinách došlo k odběru 250 µl krve do ependorffovy zkumavky, která byla centrifugována při 6000 otáčkách po dobu 8 minut. Vzniklá plazma se analyzovala metodou HPLC-MS/MS. Použitá analytická kolona Intersil ODS-SP o rozměrech 2,1x100 mm a průměru 5 µm byla spojena s ochrannou kolonou Agilent C18. Použitá mobilní fáze, jejíž průtok byl 0,3 ml/min, se skládala ze složky A – 0,1% kyseliny mravenčí a ze složky B- methanolu. K izolaci berberinu byla využita extrakce kapalina-kapalina methanolu v kombinaci s ethylacetátem. Získaná koncentrace berberinu odpovídala hodnotě 1 ng/ml v plazmě [54].

Analýza alkaloidu berberinu pomocí HPLC s detekcí DAD (detektor s diodovým polem) byla provedena na koloně s označením Daisopak SP-120-5-ODS-BP (5 µm, 4,6x250 mm) společnosti Daisocompany. Mobilní fáze použitá pro separaci analytů obsahovala acetonitril, vodu a kyselinu fosforečnou v poměru 0,7:100. Mez stanovení berberinu metodou HPLC-DAD v kůře Korkovníku amurského (*Phellodendron amurense*) byla 6,6 mg/g [48].

Metoda chemiluminiscence ke stanovení berberinu byla vybrána na základě toho, že oproti jiným luminscenčním metodám má vyšší citlivost, je jednodušší a má velmi nízké pozadí. Jako analyt byly použity komerčně dostupné farmaceutické vzorky, kde bylo deklarované množství berberinu 200 mg, které, jak bylo zjištěno později, odpovídalo výtěžnosti 99% [53].

Jana Skopalová (viz elektrochemické stanovení berberinu) stanovili berberin vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotností spektrometrií. Po ukončení elektrochemické elektrolýzy se 2 µl vzorku naředily přídatkem 200 µl mobilní fáze – jednalo se o 1% kyselinu octovou rozpuštěnou v 10 % roztoku methanolu a provedla se HPLC/MS analýza. Byla použita chromatografická kolona

o rozměrech 150x2,1 mm s průměrem 5  $\mu\text{m}$  Eclipse XDB-CN. Mobilní fáze-složka A byla složena z 1% kyseliny octové rozpuštěné v 10 % vodném roztoku methanolu, složka B čistý methanol. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min a nastavená teplota autosampleru 10°C. K ionizaci byla použita ionizace elektrosprejem. Získán výtěžek o koncentraci 8 mg/g [55].

## Elektrochemické stanovení berberinu

Jana Skopalová, z Olomoucké univerzity, spolu se svým týmem ověřovali možnost elektrochemické oxidace isochinolinového alkaloidu, berberinu. Měření bylo prováděno pomocí cyklické a diferenčně pulzní voltametrie za použití elektrody ze skelného uhlíku, která posloužila jako pracovní elektroda. Vzorek, v němž byl stanovován berberin byl zakoupen u společnosti Sigma Aldrich a jednalo se o hemisulfátovou sůl berberinu. K měření byl použit B-R a 0,1 mol/l fosfátový pufr, jako rozpouštědlo posloužil methanol. Měřicí nádobka byla naplněná B-R nebo fosfátovým pufrem do kterého byl přidán 1 mmol/l berberinu. Měření probíhalo po dobu 30 s za konstantního potenciálu 0,4 V a 1,4 V v B-R pufru a ve fosfátovém pufru při potenciálu 0,4 až 1,3. Podmínky použité DPV – rychlost skenu 20 mV/s, amplituda -50 mV, čas pulzu 80 ms. Výsledkem bylo, potvrzení, že k oxidaci berberinu docházelo při potenciálu 0,5 V v případě cyklické voltametrie a 1,2 V v případě DPV [55].

Geto, Pita a jejich tým také využili elektrodu ze skelného uhlíku, avšak modifikovanou vícečetnými uhlíkovými nanotrubičkami (MWCNT). Modifikace elektrody byla provedena z důvodu, že takto upravená elektroda měla vyšší elektrokatalytickou aktivitu při oxidaci berberinu než čistá elektroda ze skelného uhlíku. Ke stanovení berberinu byla použita Pleskanka mexická (*Argemone mexicana*), konkrétně její semena. Jako pracovní elektroda použita modifikovaná GCE o průměru 3 mm, dále byl připraven zásobní roztok berberinu o koncentraci  $25 \cdot 10^{-3}$  mol/l. Modifikovaná GCE byla připravena rozpuštěním 2 mg MWCNT ve 2 ml dimethylformamidu a ponořena do ultrazvukové lázně na půl hodiny. Před samotnou modifikací byla elektroda ze skelného uhlíku leštěna suspenzí oxidu hlinitého. Takto naleštěná elektroda, byla potažená 10  $\mu\text{l}$  suspenze MWCNT a nechala se uschnout při pokojové teplotě. Rozdíl mezi leštěnou GCE a MWCNT-GCE je takový,

že uhlíkové nanotrubičky mají silnou afinitu k polyaromatickým molekulám, což vede ke zvýšení rychlosti přenosu elektronů. 1,5 g vzorku Pleskanky mexické bylo rozpuštěno ve 20 ml methanolu a ultrazvukováno jednu hodinu. Po ukončení sonikace byla provedena filtrace, přes filtrační papír a zbytek byl rozpuštěn v DMSO. Z takto vzniklého roztoku bylo odebráno 25  $\mu$ l do 10 ml baňky a zředěno Britton – Robinsonovým pufrům o koncentraci 0,04 mol/l, pH 7. K měření byl použit program cyklické voltametrie a oxidační pík byl viditelný v oblasti 1,15-1,2 V. Celkový obsah berberinu stanovený v semenech byl  $8,85 \cdot 10^{-4}$  g. Pro porovnání byl použit i program SWV kde byla nastavena frekvence 10-30 Hz, amplituda 10-30 mV a potenciálový přírůstek 2-8 mV. Při těchto podmínkách dosahoval pík v případě MWCNT – GCE osmkrát vyššího signálu než ve srovnání s GCE. Během prvních 30 sekund byl pozorován značný nárůst proudu, který se následně zhoršoval, což svědčí o nasycení povrchu elektrody. Detekční limit ( $3\sigma$ ,  $n=10$ ) 0,14  $\mu$ M [56].

Diculescu se spolu se svým týmem zabývali elektrochemickým chováním berberinu. Ve své studii použili elektrodu ze skelného uhlíku, měření provedli pomocí diferenčně pulzní a SW voltametrie. Při oxidaci berberinu dochází k tzv. quasi reversibilnímu ději, při kterém je redukce řízená difuzí a anodický proces je řízen adsorpcí. Tato oxidace probíhá kaskádovitým mechanismem za vzniku několika dalších oxidačních produktů adsorbovaných na povrchu GCE. Jako standardní roztok byl použit berberin chlorid zakoupený od společnosti Sigma. Tento zásobní roztok o koncentraci 50 mmol/l byl připraven s dimethylsulfoxidem a skladován v lednici při teplotě - 4°C. V této práci byla opět použita jako pracovní elektroda, elektroda ze skelného uhlíku. Nastavené experimentální podmínky pro DPV byly – amplituda pulzu 50 mV, šířka pulzu 70 ms, rychlost snímání 5 mV/s. Podmínky nastavené pro SWV – frekvence 25 Hz, potenciálový přírůstek 2 mV, což odpovídá rychlosti skenování 50 mV/s. Povrch elektrody ze skelného uhlíku byl před každou analýzou leštěn pomocí diamantového spreje, s velikostí částic 1 mm, aby se vyvarovali případným problémům při adsorpci berberinových oxidačních produktů na povrch GCE. Po vyleštění, byla GCE opláchnuta destilovanou vodou. Jako pufovací roztok byl použit 0,1 mol/l fosfátový pufr o pH 7, 0,1 M acetátový pufr o pH 3,3, B-R pufr pH 1,2 – 9,6. Z předložených výsledků bylo zřejmé, že v kyselém pufru, dochází ke třem přenosům náboje, zatímco v neutrálním a alkalickém prostředí, v důsledku homogenních reakcí v roztoku, docházelo pouze ke

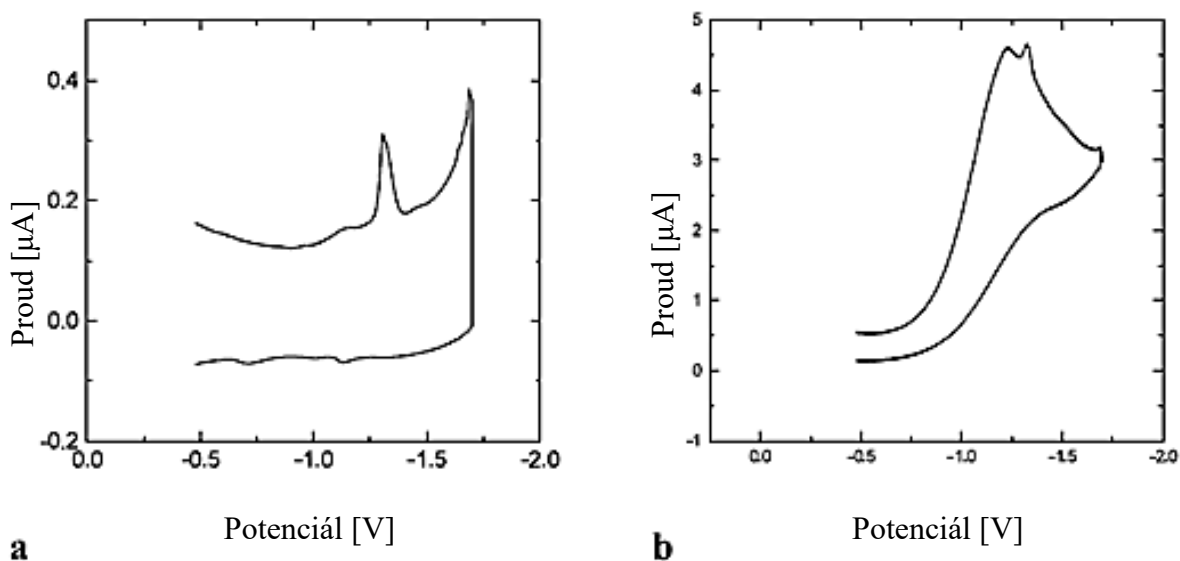
dvěma oxidačním procesům. Mez detekce vypočtený z voltametrie čtvercových vln byl  $1,69 \cdot 10^{-6}$  mol/l [57].

Šebojka Komorsky – Lovrić stanovili berberin ve vzorcích dymnivky kaprad'olisté (*Corydalis cheilanthifolia*) metodou pulzní polarografie a cyklické SW voltametrie. Jako pracovní elektrodu využil rtuťovou kapkovou elektrodu, Použité nosné roztoky byly o koncentraci 0,1 mol/l a jednalo se o NaCl pH 4, NaOH pH 14. Dále byly 10 x ředěny vodou na příslušné pH. Roztoky byly před samotným experimentem ošetřeny čistým dusíkem po dobu dvaceti minut. Během měření byla nad roztoky udržována inertní atmosféra kontinuálním tokem dusíku. Elektrická redukce berberinu probíhala mezi -0,95 a -1,35 V. Použité podmínky pro pulzní polarografii – frekvence 100 Hz, amplituda 10 mV, rychlost skenování 5 mV/s, elektroda HDME. Použité podmínky pro SW voltametrii – frekvence 100 Hz, amplituda 30 mV, potenciálový přírůstek 2 mV, akumulací potenciál -0,4 V, akumulací čas 180 s. Výsledná koncentrace  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l [58].

Stankovic, Samphao a Kalcher se pokusili stanovit tento isochinolinový alkaloid ze semene Pleskanky mexické (*Argemone mexicana*) metodou voltametrie čtvercových vln za použití borem dopované diamantové elektrody jako elektrody pracovní. 0,5682 g nadrcených semen bylo extrahováno v 10 ml methanolu, dále umístěno do sonické lázně po dobu jedné hodiny. Takto vzniklý extrakt byl zfiltrován, rozpouštědlo bylo odpařeno a zbytek rozpuštěn ve 3 ml dimethylsulfoxidu. Z takto vzniklého roztoku bylo odebráno 25 ml baňky a zředěno s B-R pufrem na výsledné pH 5 a použito k analýze. Měření se provádělo v Britton-Robinsonově pufru o pH 5, kdy berberin při takto nastavených podmínkách vykazoval tři oxidační píky (+0,63; +1,14; +1,34 V) a jeden redukční pík (+0,15 V). Výhodou SWV je široká optimalizace různých parametrů, jako je frekvence nebo pulzní amplituda, které mohou poskytnout lepší detekční limit, selektivitu anebo urychlit navrhovanou metodu. Na základě těchto skutečností byl jeden parametr udržován konstantní, zatímco vliv druhého parametru byl sledován. Nastavené parametry – amplituda pulzu 60 mV, frekvence 40 a 210 Hz, rychlost skenování 1,05 V/s . Získaná návratnost 102,0 – 102,6% [59].



Song a jeho tým ze Severozápadní univerzity v Číně stanovili polarograficky berberin za přítomnosti peroxidu vodíku v léčivých bylinách. Z dosavadních pokusů o stanovení berberinu byly využívány metody DP polarografie a SW polarografie, u kterých byla detekovatelná nejnižší koncentrace berberinu  $5 \cdot 10^{-7}$  mol/l pro DPP a  $2 \cdot 10^{-7}$  mol/l pro SWP. Nicméně Song se pokusil stanovit tento isochinolinový alkaloid cyklickou voltametrií. Měření se provádělo v tříelektrodovém uspořádání, kde jako pracovní elektroda byla použita rtuťová kapková elektroda pro CV, rtuťová pool katodická elektroda v podobě rtuťového dna pro coulometrii. Použité chemikálie - peroxid vodíku o koncentraci 0,1 mol/l byl standardizován pomocí  $\text{KMnO}_4$ , pufr o koncentraci 0,08 mol/l při pH 9,4  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 - \text{Na}_2\text{CO}_3$  a 0,06 mol/l  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$  o pH 8,6. Jako vzorek bylo použito 0,1792 gramů rozmlévané Koptisti čínské (*Coptis chinensis*), která byla po dobu 24 hodin ponořena ve vodě, dále převedena do 100 ml odměrné baňky, 100 krát zředěna a použita ke stanovení. Ve srovnání s doposud známých polarografických metod, byla metoda katalytických vln CV vyhodnocena jako pohodlnější a citlivější, obrázek 11. Získaná návratnost dosahovala 97,5 – 100,8 % [60].



Obrázek 11: Cyklická voltametrie berberinu (0,1  $\mu\text{mol/l}$ ) v  $\text{Na}_4\text{B}_2\text{O}_7 - \text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,08 mol/l, pH 9,4) pufru, (a) bez  $\text{H}_2\text{O}_2$  (b) v přítomnosti  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mmol/l), rychlost skenu 0.25 V/s [60].

## Elektrochemické stanovení vybraných alkaloidů

Lochmann a jeho kolektiv se pokusili stanovit alkaloidy vyskytující se v tabáku (nikotin, anabasin, nornikotin). Ke stanovení byla použita metoda kapilární elektroforézy s využitím UV detekce. Separace byla prováděna na křemenné kapiláře o délce 70 cm, vložené napětí 23 kV a proud 114  $\mu\text{A}$ . Jako základní elektrolyt byl použit citrátový pufr o koncentraci 150 mmol/l a pH 3,6. U této metody byl stanoven limit detekce 2  $\mu\text{mol/l}$  [61]

Analýzou kapsicinu na elektrodě ze skelného uhlíku se zabýval Mania. K tomuto stanovení byl použit kapsicin zakoupený u společnosti Sigma-Aldrich. Měření se provádělo v širokém rozmezí pH od 1,3 do 12. Nastavené podmínky pro diferenčně pulzní voltametrii byly – amplituda pulzu 50 mV, rychlost skenu 5 mV/s, pro SW voltametrii – pulz 50 mV, frekvence 10 Hz a potenciálový přírůstek 2 mV, což odpovídá rychlosti skenu 20 mV/s. Z výsledků vyplývá, že při režimu DPV je oxidace kapsicinu závislá na pH a docházelo tak k lineárnímu klesání potenciálu spolu s rostoucím pH [62].

Další elektrochemické stanovení alkaloidu, konkrétně efedrinu provedl Mersal. K měření byla použita vysoce selektivní pseudo-uhlíková pastová elektroda modifikovaná polyakrylovou kyselinou (PCPE-PAA). Program měření cyklická voltametrie a měření probíhalo v alkalickém prostředí B-R pufru o pH 9. Mez detekce dosahovala  $3,5 \cdot 10^{-7}$  mol/l. Tato metoda byla dále využita ke stanovení efedrinu v moči [63].

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Chemikálie a materiály

Všechny chemikálie, použité k měření byly buď zakoupeny od různých dodavatelů, nebo byly připraveny přímo v laboratoři. K přípravě roztoků byla použita demi voda, která pocházela z demistanice Milli-Q.

Seznam použitých chemikálií:

Kyselina fosforečná	LACHEMA-CHEMOPOL
Kyselina octová	LACHEMA-CHEMOPOL
Kyselina boritá	LACHEMA-CHEMOPOL
Kyselina sírová	PENTA CHRUDIM
Kyselina chlorovodíková	MERCK
Hydroxid sodný	PENTA CHRUDIM
Chlorid draselný	LANCHEMA-CHEMOPOL
Octan sodný	LANCHEMA-CHEMOPOL
Dihydrogenfosforečnan sodný	PENTA CHRUDIM
Hydrogenfosforečnan sodný	PENTA CHRUDIM
Tetraboritan sodný	PENTA CHRUDIM
Berberin chlorid	SIGMA ALDRICH
Ethanol	PENTA CHRUDIM

### Příprava standardního roztoku

K přípravě standardního roztoku byl použit berberin chlorid od společnosti Sigma Aldrich, s molekulovou hmotností 371,81 g/mol. Nejprve byl připraven zásobní roztok navážením 0,02 g berberinu do 10 ml odměrné baňky, žlutý prášek byl rozpuštěn v ethanolu a doplněn demi vodou po rysku, dále byl umístěn do ultrazvuku na dobu cca 3 minut. Výsledná koncentrace připraveného roztoku byla  $5,38 \cdot 10^{-3}$  mol/l. Takto připravený roztok byl zajištěn zátkou, parafilmem a uchováván v lednici.

## Příprava pufrů a kyselin

Zásobní roztoky pufrů a kyselin byly připraveny do 100 ml odměrné baňky o předem zvolené koncentraci – 0,1 mol/l a doplněny demi vodou po rysku. U všech roztoků bylo postupně proměřeno pH. Pro rychlejší rozpouštění byly některé baňky umístěny do ultrazvuku.

Acetátový pufr o pH 4,26 byl připraven navážením 0,12 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  rozpuštěného v 0,57 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , doplněn destilovanou vodou po rysku. Fosfátový pufr o pH 7,02 se připravil navážením 0,45 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 2,38 g  $\text{NaHPO}_4$ . K přípravě borátového pufru o naměřeném pH 9,89 bylo použito 0,77 g  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  a 0,12 g  $\text{NaOH}$ .

Dále byl připraven Britton – Robinsonův pufr, který se skládá ze dvou složek A a B. Složka A, zásaditá, byla připravena navážením 4 g hydroxidu sodného rozpuštěného v 500 ml destilované vody, naměřené pH roztoku 11,89. Složka B, která odpovídá pH 1,98 byla připravena smísením 1,35 ml 60% kyseliny fosforečné s 1,5 ml 99% kyseliny octové a 1,4 g kyseliny borité. Tato směs byla převedena do 500 ml odměrné baňky a doplněná destilovanou vodou po rysku. Pufr o dané hodnotě pH se připravil přidávkem složky A.

Zásobní roztoky kyselin o koncentraci 0,1 mol/l byly připraveny odměřením 0,55 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0,86 ml  $\text{HClO}_4$ , 0,85 ml  $\text{HCl}$  a 0,75 g  $\text{KCl}$  doplněny destilovanou vodou do 100 ml baňky.

## Příprava modelového vzorku

Modelový vzorek byl připraven naředěním standardního roztoku berberinu, jehož výchozí koncentrace byla  $5,34 \cdot 10^{-3}$  mol/l, ethanolem na koncentraci  $8,9 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Reálná koncentrace modelového vzorku byla zjištěna stanovením metody kalibrační křivky a standardního přídávku. Do voltametrické měřicí nádoby, bylo pipetováno tolik borátového pufru o pH 9,89, aby byl celkový objem voltametrické nádoby 15 ml.

## Příprava reálných vzorků

Jako reálné vzorky byly použity dva zakoupené vzorky od různých dodavatelů, jeden vzorek pocházející z vlastní zahrady – Mahónie cesminolistá a jeden posbíran v lese – Vlastovičnick větší. Tyto vzorky byly extrahovány v ethanolu a uchovávány v lednici.

Koncentrace reálných vzorků byla stanovena jak metodou kalibrační křivky, tak i metodou standardního přídávku. Stejně jako u modelového vzorku, tak i zde byl do voltametrické nádoby pipetován borátový pufr o pH 9,89 o konečném objemu 15 ml.

- **Reálný vzorek č. 1:** extrakt z kořene Koptisti čínské (*Coptis chinensis*), zakoupený v e-shopu Vinaturae, byl připraven stejným způsobem jako modelový vzorek. 0,0222 g extraktu bylo rozpuštěno v 10 ml ethanolu a použito k měření.
- **Reálný vzorek č. 2:** regenerační olej značky YBE zakoupen v e-shopu Pragon. 10  $\mu$ l oleje bylo rozpuštěno v 10 ml ethanolu a použito k měření.
- **Reálný vzorek č. 3:** kořen a listy Mahónie cesminolisté pocházející z vlastní zahrady. K měření byly použity jak bobule, kořen, tak i větvičky a listy tohoto keře (obrázek 12). Takto získané vzorky byly pomlety na nožovém mlýnku Retsch 200, dále byly zality ethanolem a přes noc luhovány. Získaný výluh byl přefiltrován a filtrát byl použit k měření.



Obrázek 12: Zleva listy a větvičky, nastříhaný kořen, bobule a kořen Mahónie cesminolisté.

## **4.2. Příprava pracovních elektrod**

K měření byly použity uhlíkové pastové elektrody, které byly připraveny za použití CR5 uhlíku a uhlíku označovaného názvem Sigradur G, jako pojivo posloužil buď to parafínový, nebo silikonový olej.

### **Uhlíková pastová elektroda s parafínovým /silikonovým olejem**

Tyto CPE elektrody byly připraveny navážením CR5 uhlíku jednak s parafínovým olejem, a ve druhém případě za použití silikonového oleje v poměru 75:25%. Na analytických váhách bylo tedy naváženo 0,15 g práškového uhlíku v třecí misce, pomocí mikropipety bylo přidáno takové množství pojiva, dokud analytické váhy neukazovaly celkovou hmotnost směsi 0,2 g. Takto získaná směs byla homogenizována keramickým tloučkem v třecí misce, do vzniku pasty, která byla pomocí špachtle převedena do předem vyčištěného elektrodového těla o průměru 2 mm, obrázek 13.

### **Uhlíková pastová elektroda ze skelného uhlíku**

Další variantou uhlíkové pastové elektrody, která byla použita k měření, byla elektroda ze skelného uhlíku. V tomto případě byl použit uhlík Sigradur-G, jako pojivo opět silikonový a parafínový olej. Jednotlivé složky byly naváženy v poměru 80:20 %, množství uhlíku tedy bylo 0,16 g a 0,04 g oleje přidaného mikropipetou. Postupovalo se identicky, jako v případě CPE elektrod. Elektrody měly stejný průměr, a to 2 mm. V tomto případě došlo k naplnění pasty do 1 cm z důvodu zatuhnutí pasty v těle elektrody, obrázek 13.

### **Měření ohmického odporu elektrod**

Správnost měření připravené uhlíkové pastové elektrody byla ověřena pomocí multimetru, který umožňuje změření ohmického odporu pro daný obvod. Ověření probíhalo tak, že jedna z koncovek, které jsou nerezové, byla přiložena k ústí elektrody

s obnoveným povrchem, zatímco druhá koncovka byla přiložena k vrcholu elektrody. Naměřený odpor se pohyboval v rozmezí 10-20  $\Omega$ .



Obrázek 13: Pomůcky k přípravě CPE a GCPE.

### 4.3. Použité přístroje a pomůcky k měření

K měření byl použit elektrochemický analyzátor PGSTAT 128N od společnosti Metrohm-Autolab z Nizozemska, obrázek 14. Dále byl použit software s označením NOVA 1.11. Ke zjištění hodnoty pH posloužil přenosný pH metr CPH 52 společnosti Elteca Turnov, ke kterému byla připojena skleněná pH elektroda. K navažování všech chemikálií byly použity analytické váhy BBI-32 a běžné laboratorní sklo.

Uvnitř kovové Faradayovy klece byl umístěn laboratorní stojan, na kterém byly připevněny elektrody spolu s tzv. voltametrickou nádobkou. Dále klec obsahovala magnetickou míchačku s nastavitelnou dobou míchání, obrázek 15.

Elektrochemické měření probíhalo v tříelektrodovém systému, který obsahoval pracovní elektrodu :

- GC a BBDE
- CPE/PO a CPE/SO
- GCPE/PO a GCPE/SO

referentní elektrodu :

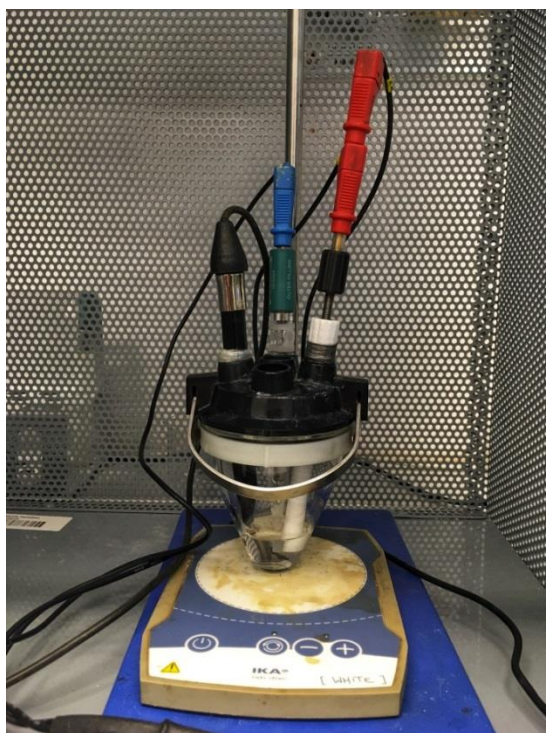
Ag/AgCl/ 3M KCl

pomocnou elektrodu :

platinový plíšek



Obrázek 14: Elektrochemický analyzátor PGSTAT 128N.



Obrázek 15: Měrná cela s tříelektrodovým zapojením a magnetickou míchačkou.



## 4.4. Voltametrické techniky

### Voltametrie s lineárním skenem (LSV)

Metoda voltametrie s lineárním skenem byla použita pro prvotní měření, zkoušky oxidace berberinu, výběr optimálního prostředí a elektrody. Povrch uhlíkových pastových elektrod byl před každým měřením obnoven tak, že došlo k malému vytlačení pasty oproti vlhkému filtračnímu papíru na pevné podložce a následnému otření o tento navlhčený papír. Povrch ostatních elektrod byl obnoven otřením o vlhký filtrační papír.

Přístrojové podmínky:

Počáteční potenciál: 0 V

Koncový potenciál: 1,4 V

Rychlost skenu: 0,05 V/s

Přírůstek potenciálu: 0,00244 V

### Diferenčně pulzní voltametrie (DPV)

Metoda diferenčně pulzní voltametrie posloužila pro většinu měření, při kterém docházelo jak k výběru optimálních podmínek, tak i k samotnému měření modelového a reálných vzorků. Povrch elektrody byl obnovován stejným způsobem jako u LSV.

Přístrojové podmínky původní:

Počáteční potenciál: 0 V

Konečný potenciál: 1,3 V

Přírůstek potenciálu: 0,005 V

Amplituda pulzu: 0,05 V

Délka pulzu: 0,05 s

Rychlost skenu: 0,05 V/s

## **Square wave voltametrie (SWV)**

Měření touto metodou čtvercových vln posloužilo pro porovnání citlivosti s metodou diferenčně pulzní voltametrie. Obnovování povrchu probíhalo identicky jako v případě LSV.

Přístrojové podmínky:

Počáteční potenciál: 0 V

Konečný potenciál: 1,4 V

Přírůstek potenciálu: 0,005 V

Amplituda: 0,02 V

Frekvence: 10 Hz

Rychlost skenu: 0,05 V/s

## **Cyklická voltametrie (CV)**

Měření metodou cyklické voltametrie bylo použito k charakterizaci alkaloidu berberinu v modelovém vzorku, záznamy uvedeny v příloze.

Přístrojové podmínky:

Počáteční potenciál: 0 V

Nejnižší potenciál: 1,4 V nebo -1,4 V

Počet cyklů: 3

Rychlost skenu: 0,05 V/s

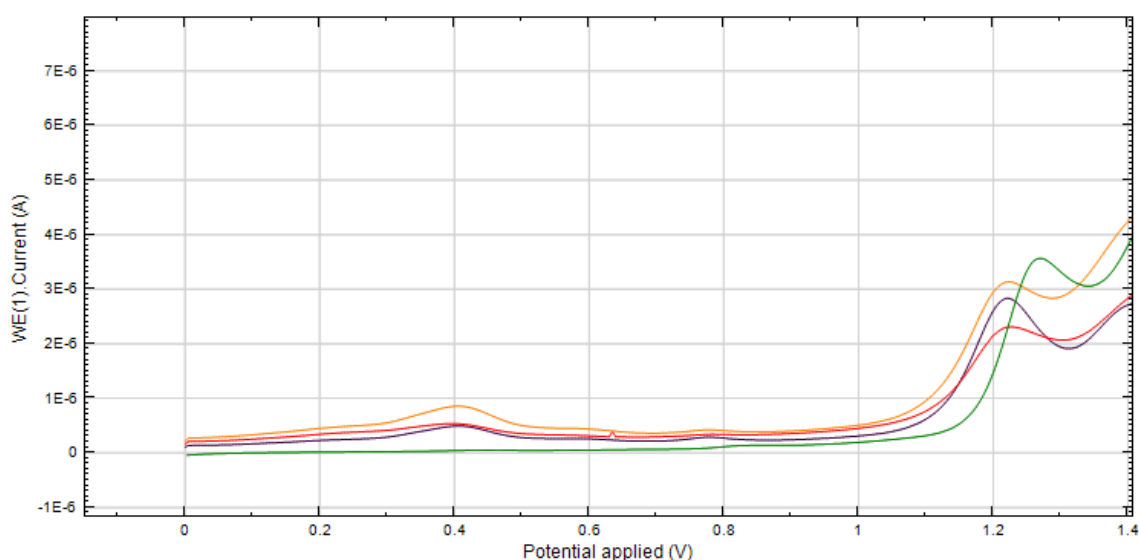
Přírůstek potenciálu: 0,00244 V

## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1. Úvodní elektrochemické experimenty

Z odborných článků uvedených v kapitole 3.6.1. bylo zjištěno, že elektrochemické stanovení berberinu již bylo provedeno a jako elektrody byly využity rtuťová elektroda, bórem dopovaná diamantová elektroda a elektroda ze skelného uhlíku, proto bylo zřejmé, že k oxidaci berberinu bude ochotně docházet v anodické oblasti.

Nicméně z počátku bylo důležité zjistit základní elektrochemické chování berberinu na elektrodách: GCPE/PO, GCPE/SO, GC a BDDE. Tyto elektrody byly použity za účelem, zjištění chování berberinu na jednotlivých površích, obrázek 16. K počátečnímu měření byla využita lineární voltametrie s podmínkami, které byly automaticky nastaveny programem NOVA 1.11. Z přiloženého obrázku 16. je zřejmé, že k oxidaci berberinu dochází ochotně při potenciálu okolo 1,2 V.



Obrázek 16: Voltamogram k porovnání elektrochemického chování berberinu, na elektrodách – zelená (GCPE/SO), oranžová (GCPE/PO), modrá (GC), zelená (BDDE), koncentrace berberinu  $c = 3,6 \cdot 10^{-5}$  mol/l, LSV, B-R pufr pH 1,98.

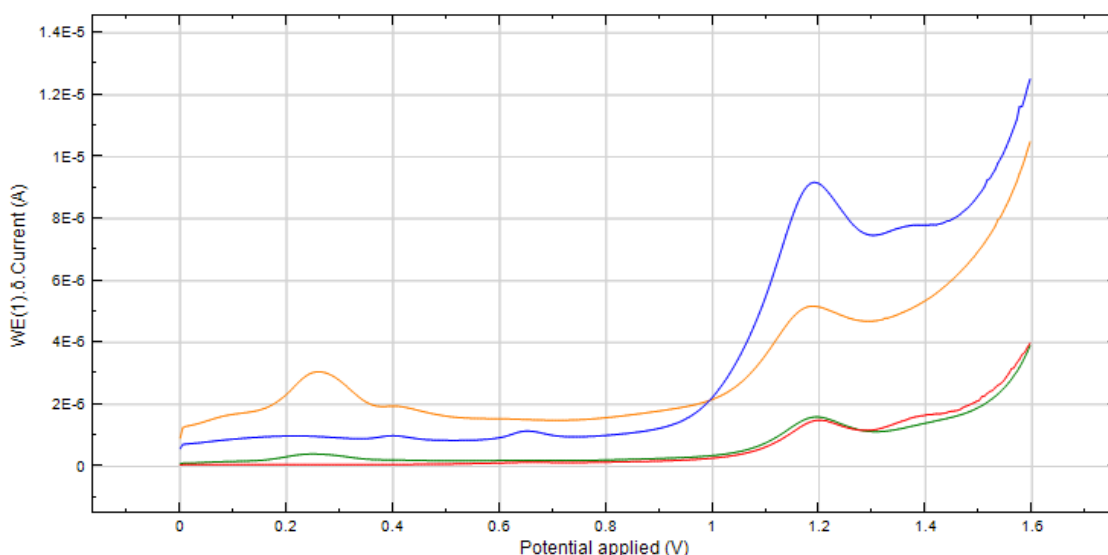
## Výběr základního elektrolytu a vhodné elektrody

V tomto kroku byla zjišťována vhodná hodnota pH k dosažení optimálních a zároveň reprodukovatelných výsledků. Ale také bylo důležité, aby v daném prostředí nedocházelo k oxidaci produktů na povrchu elektrody.

K měření byly použity předem připravené roztoky pufrů a kyselin: Britton - Robinsonův pufr (pH 1,81 - 11,98), acetátový pufr (pH 4,21), fosfátový (pH 7,02) a borátový pufr (pH 9,89), z kyselin to byly  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH 0,61),  $\text{HClO}_4$  (pH 0,71) a  $\text{HCl}$  (pH 0,58).

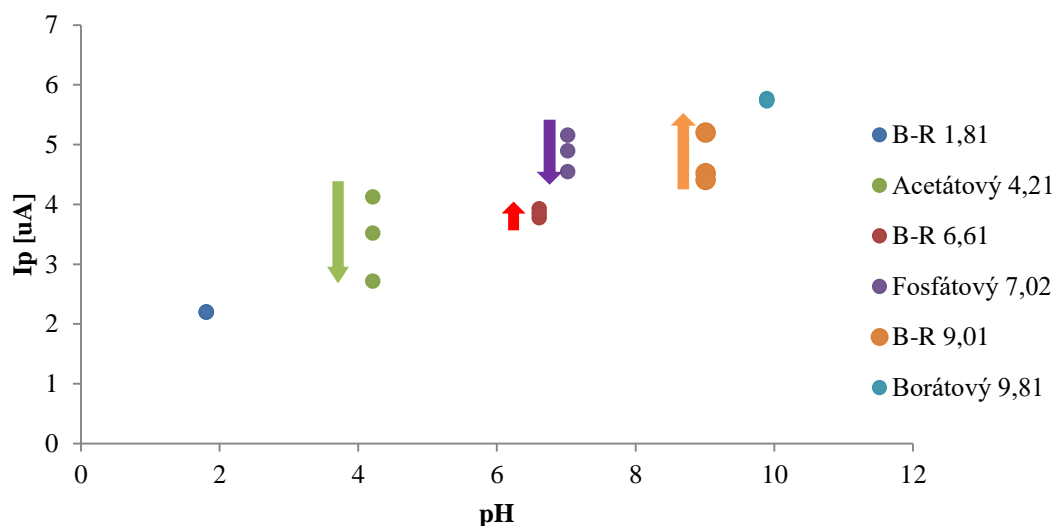
Základní elektrochemie berberinu byla proměřena v těchto elektrolytech a to tak, že 15 ml zvoleného elektrolytu bylo odpipetováno do voltametrické nádoby, k němu byl postupně přidán zásobní roztok berberinu, jehož výsledná koncentrace byla  $5,34 \cdot 10^{-4}$  mol/l.

Avšak před výběrem vhodného elektrolytu bylo důležité zvolit elektrodu, která by vykazovala reprodukovatelné výsledky. K prvotním měřením byla využita pastová elektroda ze skelného uhlíku a parafínového oleje, která se ukázala jako hůře reprodukovatelná s nižšími proudy, proto byla nahrazena elektrodou GCPE/SO, která byla využita k měření, obrázek 17.



Obrázek 17: Srovnání GCPE/PO a GCPE/SO v BR a acetátovém pufru o stejném pH 4,21, zelená = GCPE/PO acetátový pufr, červená = GCPE/PO BR pufr, oranžová = GCPE/SO acetátový pufr, modrá = GCPE/SO BR pufr, koncentrace berberinu  $c = 1,076 \cdot 10^{-4}$  mol/l, LSV.

Ze všech proměřených elektrolytů poskytoval nejlépe reprodukovatelné výsledky Britton-Robinsonův pufr o pH 1,81 a borátový pufr o pH 9,89 (obrázek 18). Šipky vyznačené na obrázku 18. naznačují trend v měření. Nicméně z toho důvodu, že dřívější experimenty byly prováděny z větší části v Britton-Robinsonově pufru, byl k dalšímu měření zvolen naopak pufr borátový (tabulka 4) Roztoky velmi silných kyselin nebyly použity z důvodu, že nevykazovaly žádný oxidovatelný signál.



Obrázek 18: Závislost proudu píku na pH pro elektrolyty o daném pH 1,81; 4,21; 6,61; 7,02; 9,89; koncentrace berberinu  $c = 1,076 \cdot 10^{-4}$  mol/l, LSV, GCPE/SO.

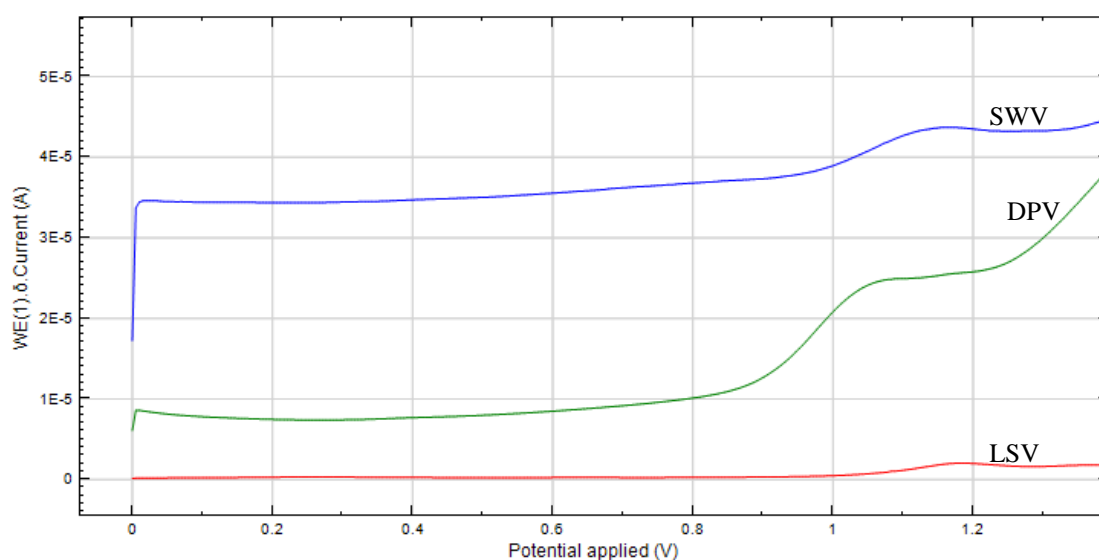
Tabulka 4: Hodnoty stanovení berberinu pomocí GCPE/SO, koncentrace berberinu  $c = 1,076 \cdot 10^{-4}$  mol/l.

Berberin			
elektrolyt	pH	Ep [V]	Ip [ $\mu$ A]
Britton-Robinsonův	1,81	1,19	2,19
Acetátový	4,21	1,18	3,42
Britton-Robinsonův	6,61	1,13	3,85
Fosfátový	7,02	1,11	4,85
Britton-Robinsonův	9,01	1,10	4,46
Borátový	9,89	1,04	5,74

## 5.2. Výběr měřicí techniky

Po optimalizaci vhodného prostředí, tzn. borátového pufru o pH 9,89 a výběru elektrody GCPE/SO přišlo na řadu srovnání citlivosti metody lineární voltametrie, diferenčně pulzní voltametrie a voltametrie čtvercových vln. Měření probíhalo za podmínek, které byly automaticky nastaveny programem NOVA 1.11. pro každou metodu, viz 4.4.

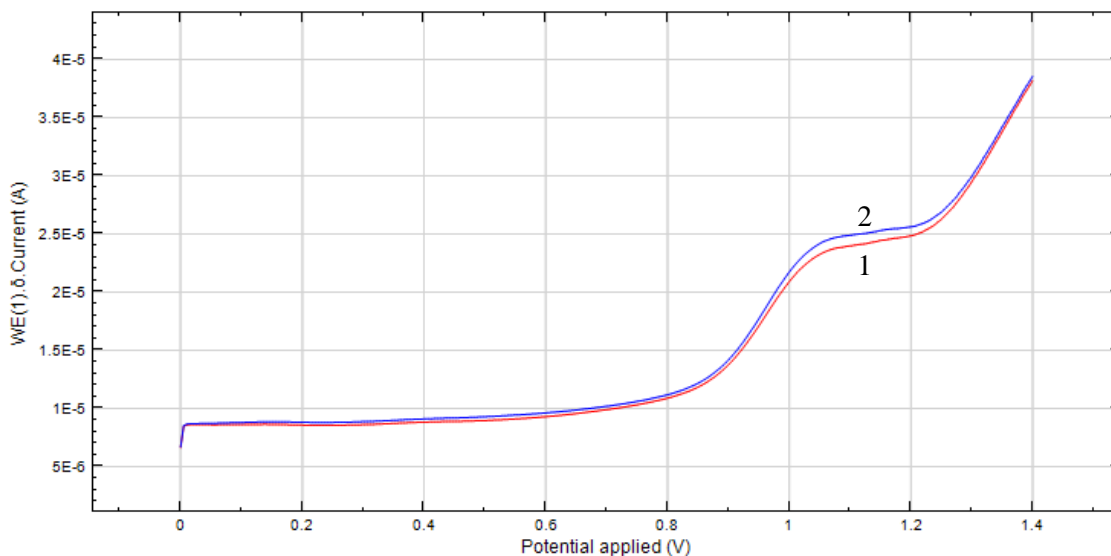
Do měřicí nádoby bylo nadávkováno 15 ml borátového pufru, k němuž bylo přidáno 100  $\mu$ l zásobního roztoku berberinu o výsledné koncentraci  $5,38 \cdot 10^{-3}$  mol/l. Z naměřených voltamogramů na obrázek 19 je patrné, že z těchto tří metod měření se jeví diferenčně pulzní voltametrie jako nejcitlivější metoda a byla tak vybrána k dalšímu měření.



Obrázek 19: Srovnání citlivosti metody LSV (červeně), DPV (zeleně) a SWV (modře), standardní podmínky programu NOVA 1.11., borátový pufr pH 9,89, koncentrace berberinu  $c = 3,6 \cdot 10^{-5}$  mol/l, GCPE/SO.

### 5.3. Průvodní experimenty v borátovém pufru

Z důvodu zjištění stálosti berberinu, bylo provedeno měření v čerstvě připraveném a odstátém roztoku, umístěného v lednici, o koncentraci  $5,34 \cdot 10^{-3}$  mol/l. Z přiloženého obrázku 20, lze pozorovat nepatrný nárůst proudu v odstátém roztoku berberinu. K měření byl proto použit zásobní roztok berberinu uchovávaný v lednici.

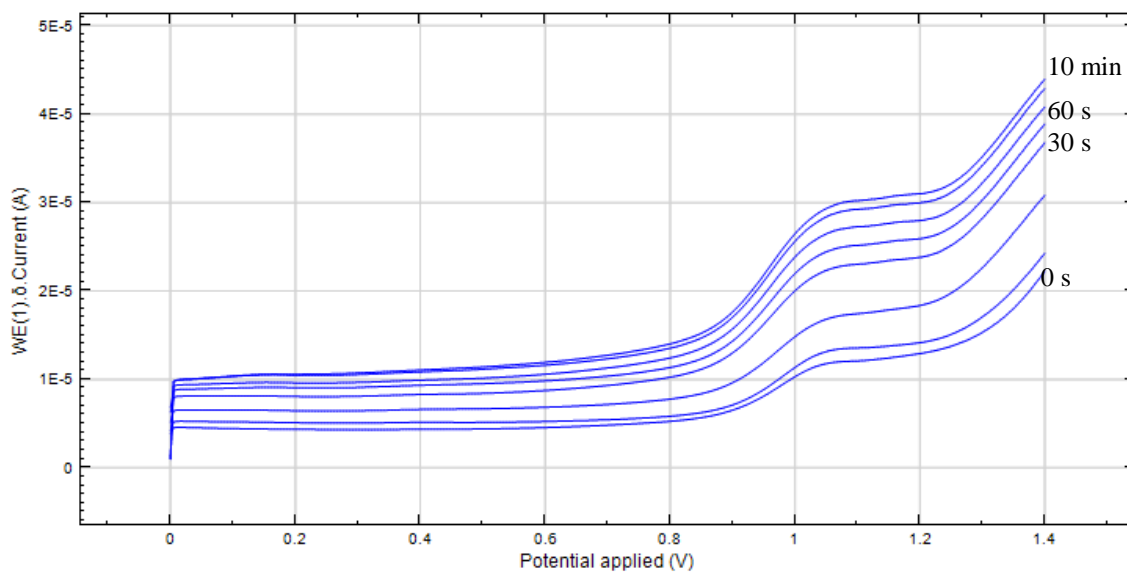


Obrázek 20: Srovnání signálu zásobního roztoku berberinu – 13.2.2018 (1), 26.2.2018 (2), koncentrace berberinu  $c = 1,076 \cdot 10^{-4}$  mol/l, DPV, GCPE/SO, automaticky nastavené podmínky programu NOVA 1.11.

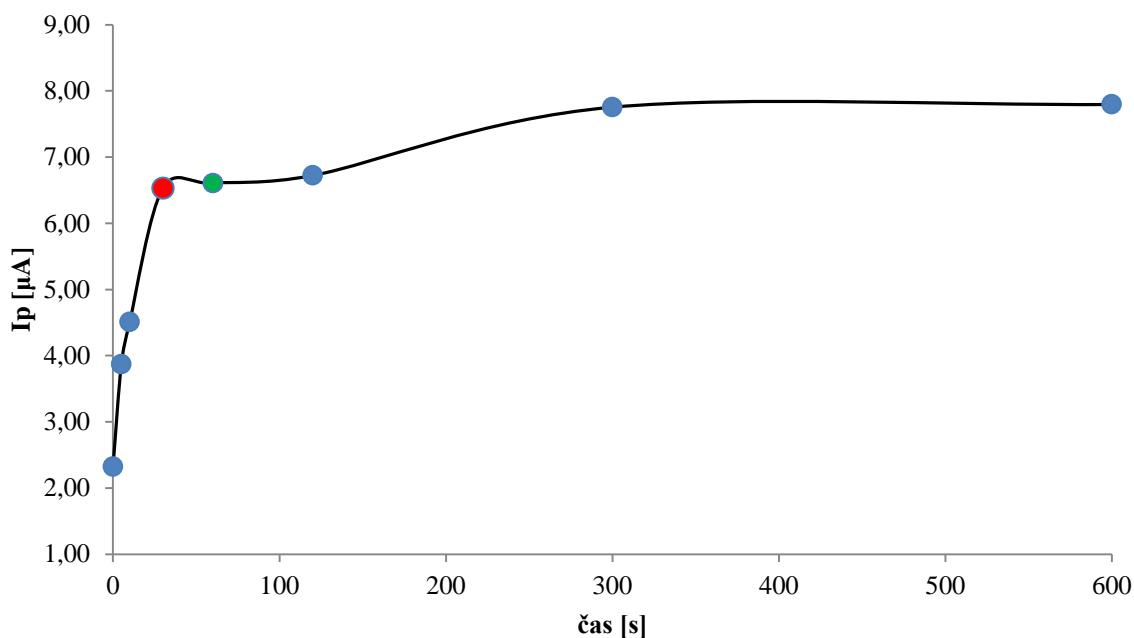
- **Výběr optimální doby míchání**

V tomto kroku bylo zjišťováno, zdali míchání ovlivňuje stabilitu signálu GCPE/SO elektrody. Výběr optimální doby míchání je také významný k tomu, že vede k odstranění produktů oxidace od elektrody. K experimentu byl zvolen čas 0 s, 5 s, 10 s, 30 s, 1 min, 2 min, 5 min a 10 min. Z grafu na obrázku 21 je patrné, že s rostoucí dobou míchání dochází také k nárůstu hodnoty píku a pozadí. Nejvhodnější doba míchání před samotným měřením je 30 s a 60 s, nicméně aby nedocházelo ke zbytečnému prodlužování doby analýzy, byla vybrána jako postačující doba míchání 30 s, obrázky 22 a 23.

Z obrázku 23 je patrné, že v nemíchaném roztoku, získané proudy nevykazovaly žádný trend, zatímco v míchaném roztoku došlo k zisku ustálených hodnot proudů.

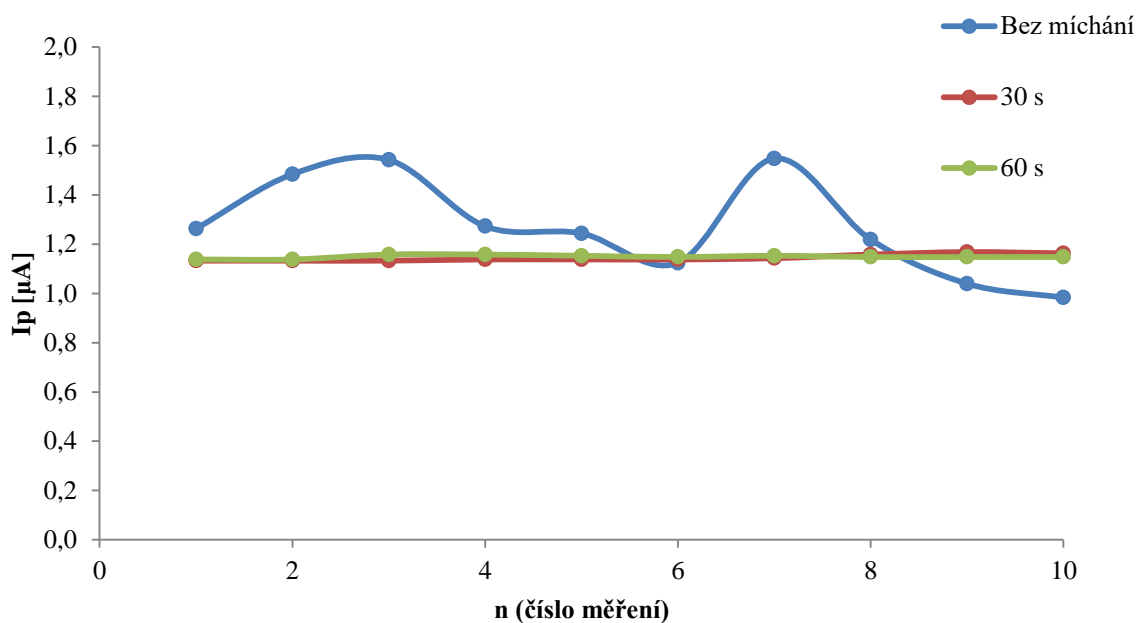


Obrázek 21: Výběr optimální doby míchání, borátový pufr (pH 9,89), koncentrace berberinu  $c = 1,076 \cdot 10^{-4}$  mol/l, DPV, GCPE/SO, automaticky nastavené podmínky programu NOVA 1.11.



Obrázek 22: Závislost proudu na době míchání, 30 s červeně, 60 s zeleně, koncentrace berberinu  $c = 1,076 \cdot 10^{-4}$  mol/l, borátový pufr (pH 9,89), DPV, GCPE/SO, automaticky nastavené podmínky programu NOVA 1.11.

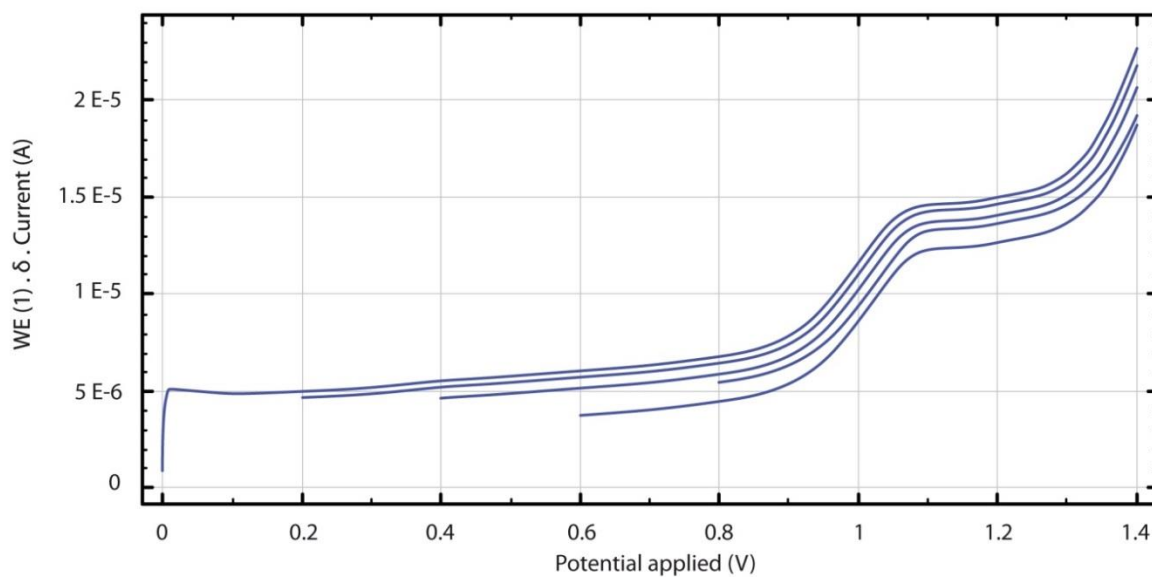




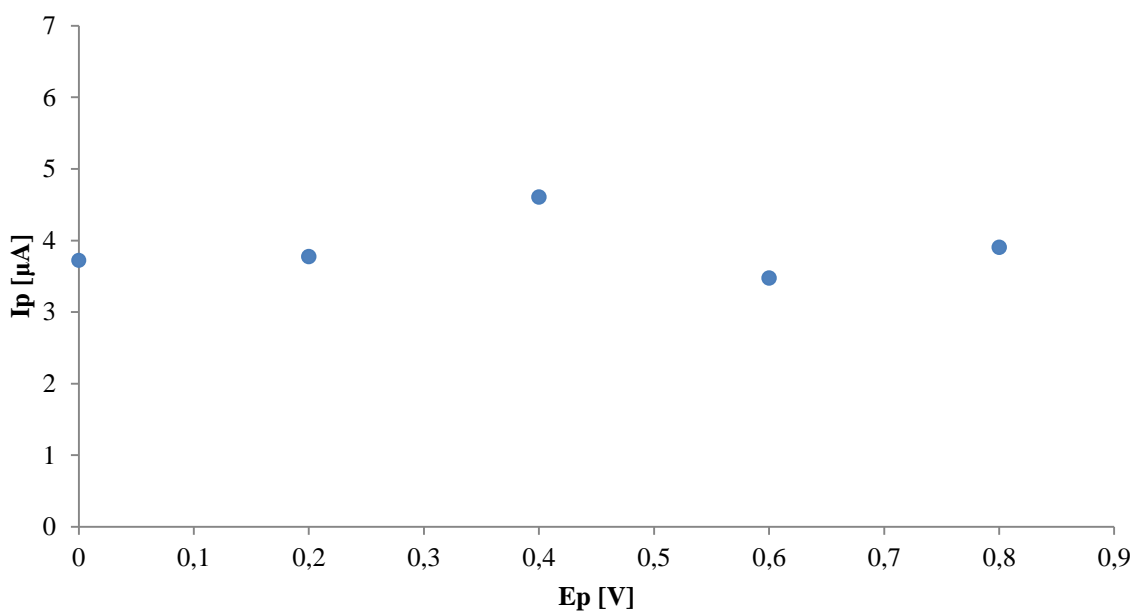
Obrázek 23: Závislost proudu na době míchání, koncentrace berberinu  $c = 1,076 \cdot 10^{-4}$  mol/l, borátový pufr (pH 9,89), DPV, GCPE/SO, automaticky nastavené podmínky programu NOVA 1.11.

- **Potenciál akumulace**

Další částí experimentu, bylo zjišťování, zdali potenciál akumulace má výrazný vliv na odezvu. Měření bylo provedeno v borátovém pufru (pH 9,89) na elektrodě GCPE/SO, přičemž byla měněna hodnota napětí od 0 V až do 0,8 V po hodnotě 0,2 V, obrázek 24. Z přiloženého grafu na obrázku 25 je patrné, že se zvyšujícím se napětím nedochází k lineárnímu nárůstu proudu. A z toho důvodu byl potenciál akumulace nastaven na hodnotu 0 V.



Obrázek 24: Vliv potenciálu akumulace 0 - 0,8 V, borátový pufr (pH 9,89), koncentrace berberinu  $c = 1,076 \cdot 10^{-4}$  mol/l, DPV, GCPE/SO, automaticky nastavené podmínky programu NOVA 1.11.



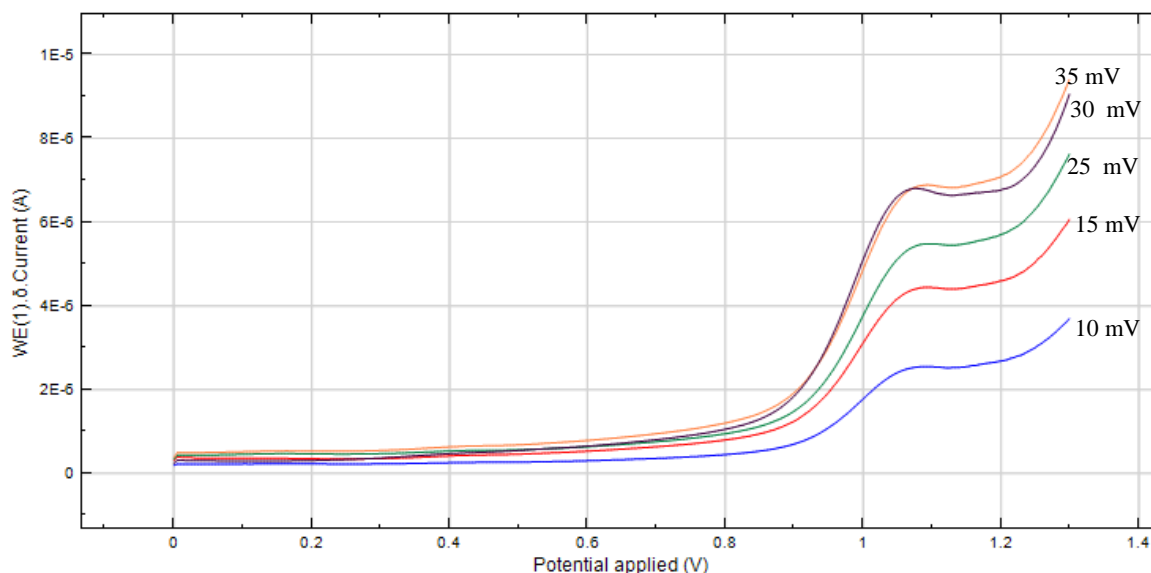
Obrázek 25: Závislost proudu na napětí pro 0 - 1 V, borátový pufr (pH 9,89), koncentrace berberinu  $c = 1,076 \cdot 10^{-4}$  mol/l, DPV, GCPE/SO, automaticky nastavené podmínky programu NOVA 1.11.

## 5.4. Optimalizace podmínek DPV techniky

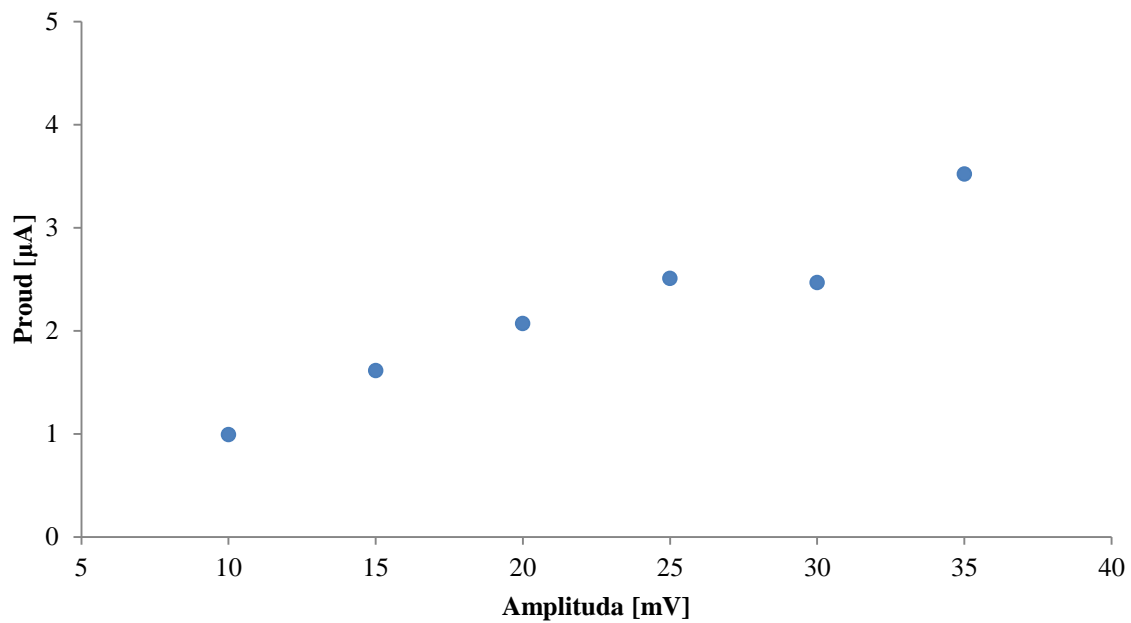
Pro správné vyhodnocení reálného a modelového vzorku bylo nutné optimalizovat všechny parametry metody diferenčně pulzní voltametrie. Z dosavadních experimentů byla vyhodnocena jako nejvhodnější elektroda poskytující reprodukovatelné výsledky, GCPE s použitým silikonovým olejem. Dále byl získán vhodný elektrolyt, ve kterém ochotně docházelo k oxidaci berberinu při potenciálu 1,2 V. Tímto elektrolytem byl borátový pufr o pH 9,89. Optimální doba míchání před samotným měřením byla zvolena doba 30 s.

### Amplituda pulzu

Výběr nejvhodnější hodnoty amplitudy pulzu probíhal na základě proměření hodnot 10-30 mV na GCPE/SO elektrodě. Z obrázku 26 a 27 vyplývá, že nejvhodnější odezvu proudu vykazuje hodnota 25 mV a tudíž, byla použita pro další analýzy. Původní hodnota amplitudy byla 50 mV, došlo tedy ke snížení amplitudy pulzu o polovinu. Každá hodnota změněného parametru amplitudy pulzu byla proměřena třikrát, tak stejně i u délky pulzu a vzdálenosti mezi pulzy.



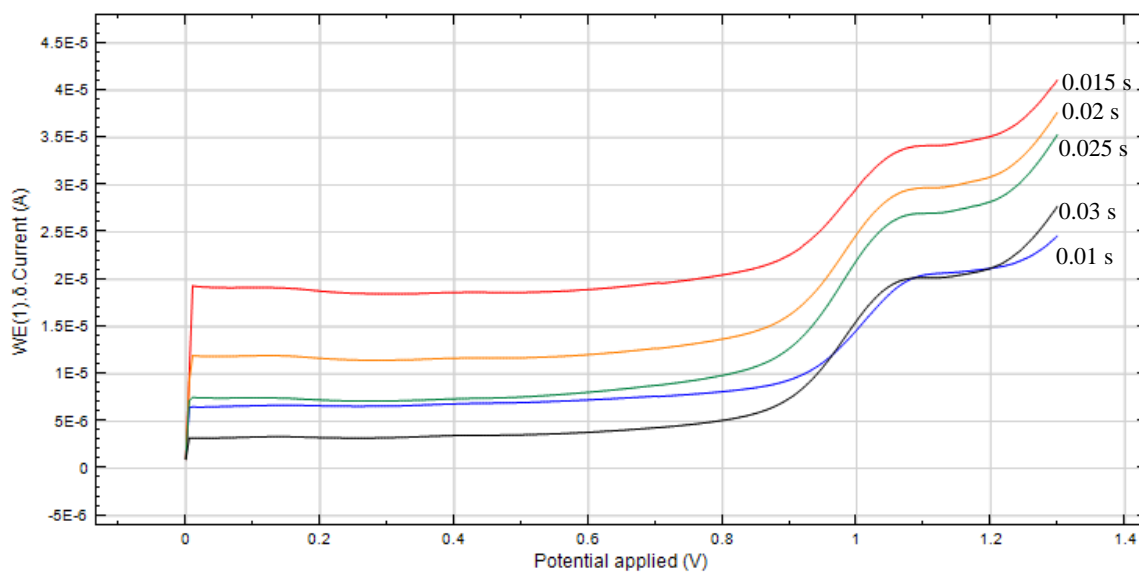
Obrázek 26: Voltamogram závislosti berberinu na hodnotě amplitudy pulzu, koncentrace berberinu  $c = 1,076 \cdot 10^{-4}$  mol/l, borátový pufr (pH 9,89), DPV, GCPE/SO, přírůstek potenciálu 0,005 V, délka pulzu 0,05 s, rychlost skenu 0,05 V/s, míchání 30 s.



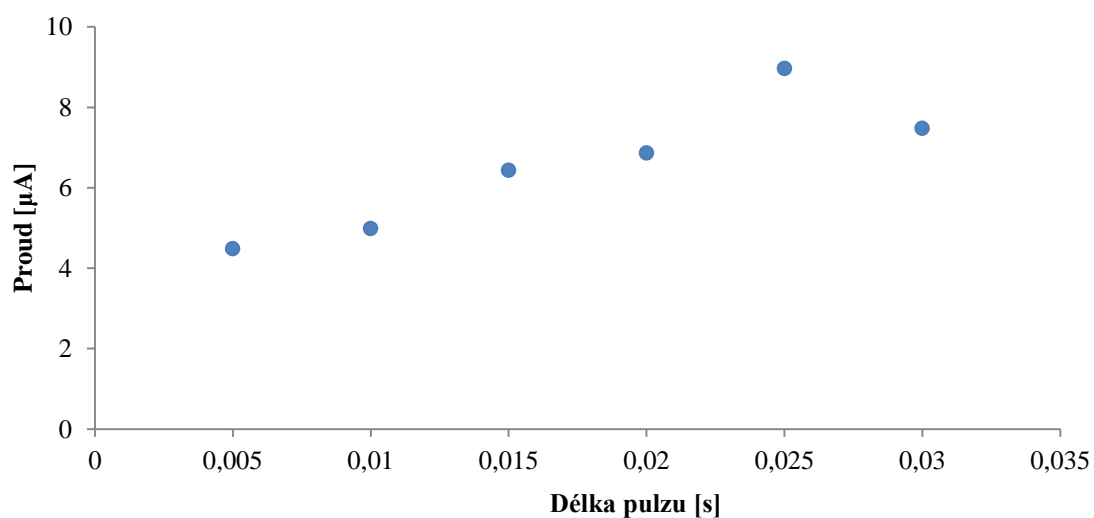
Obrázek 27: Závislost velikosti proudu na hodnotě amplitudy, koncentrace berberinu  $c = 1,076 \cdot 10^{-4}$  mol/l, borátový pufr (pH 9,89), DPV, GCPE/SO, přírůstek potenciálu 0,005 V, délka pulzu 0,05 s, rychlost skenu 0,05 V/s, míchání 30 s.

## Délka pulzu

Dalším proměřovaným parametrem byla délka pulzu pro hodnoty 0,01 – 0,03 s. Na základě výsledků z obrázků 28 a 29 se jeví jako nejvhodnější hodnota délky pulzu 0,025 s. Původní měření probíhalo při hodnotě 0,05 s. Měření taktéž probíhalo při zoptimalizované hodnotě amplitudy, čili při 25 mV.



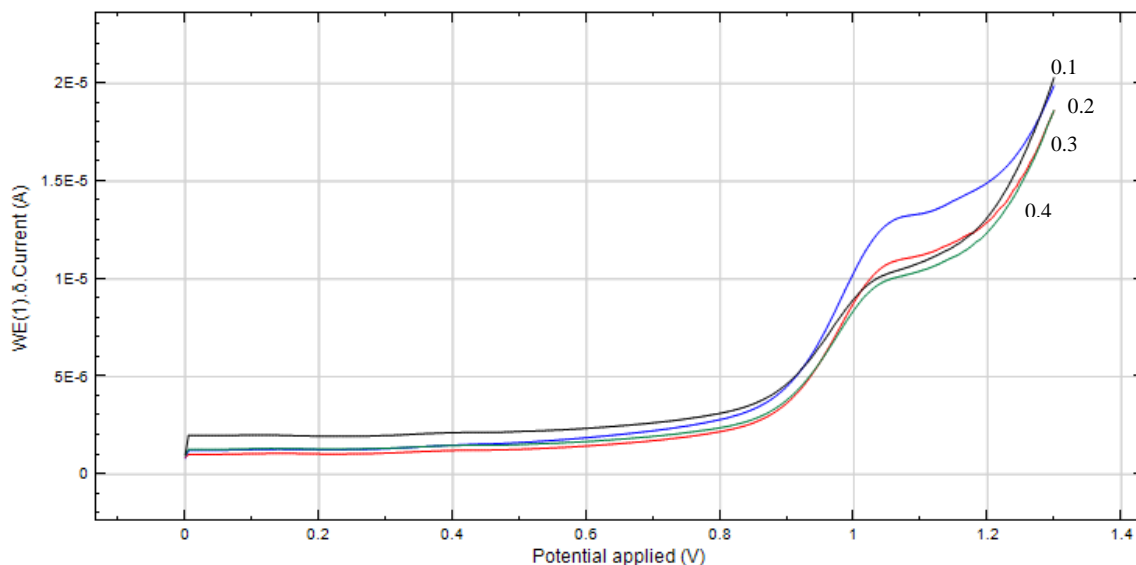
Obrázek 28: Voltamogram závislosti berberinu na hodnotě délky pulzu, koncentrace berberinu  $c = 1,076 \cdot 10^{-4}$  mol/l, borátový pufr (pH 9,89), DPV, GCPE/SO, amplituda 25 mV, míchání 30 s.



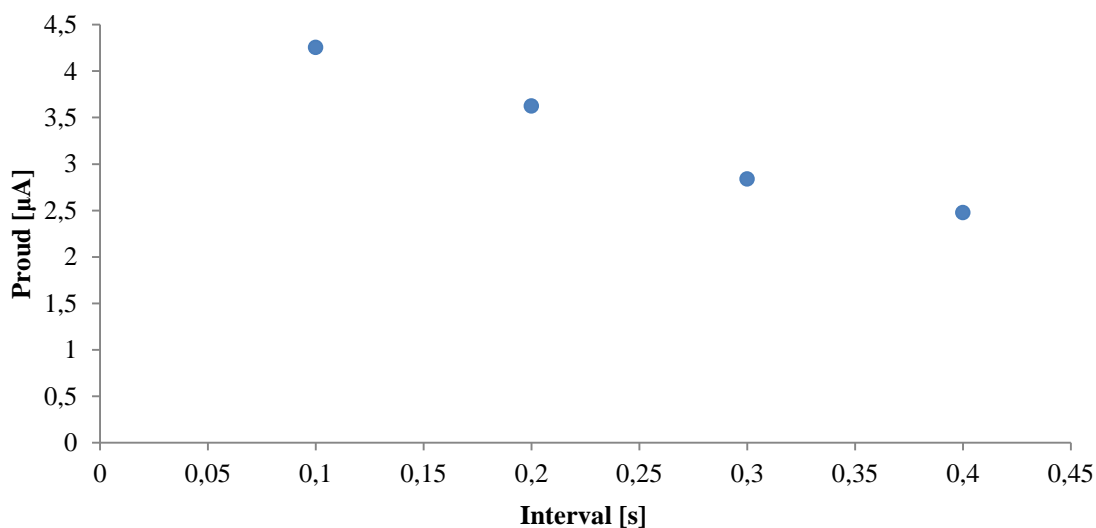
Obrázek 29: Závislost proudu na délce pulzu, podmínky jako obrázek 26.

## Vzdálenost mezi pulzy

Posledním analyzovaným parametrem byla vzdálenost mezi pulzy. Se změnou tohoto parametru dochází zároveň ke změně rychlosti skenu. Ke zjištění optimálního času bylo měření provedeno pro hodnoty 0,1-0,4 s. Z přiložených obrázků 30 a 31 plyne, že nejvhodnější dobou je 0,1 s.



Obrázek 30: Voltamogram závislosti berberinu na vzdálenosti mezi pulzy, koncentrace berberinu  $c = 1,076 \cdot 10^{-4}$  mol/l, borátový pufr (pH 9,89), DPV, GCPE/SO, amplituda 25 mV, délka pulzu 0,025 s, míchání 30 s.



Obrázek 31: Závislost proudu na vzdálenosti mezi pulzy, podmínky jako obrázek 28.

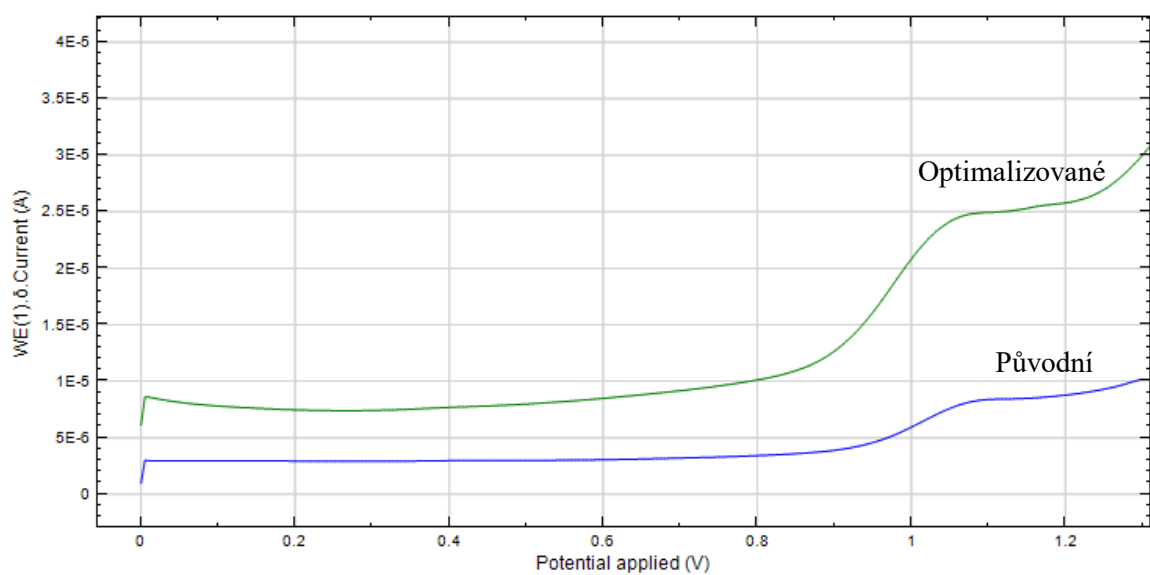
## 5.5. Optimální podmínky

Z dosavadních měření byly vybrány vhodné podmínky pro měření diferenčně pulzní voltametrií, viz optimalizované přístrojové podmínky níže. Dále byla zvolena GCPE/SO elektroda jako elektroda pracovní a jako vhodné prostředí borátový pufr o pH 9,89. Pro tyto podmínky byl proměřen zásobní roztok berberinu o koncentraci  $c = 5,34 \cdot 10^{-3}$  mol/l. Srovnáním voltamogramu za původních podmínek nastavených programem NOVA1.11 a optimalizovaných podmínek, obrázek 32, bylo potvrzeno, že nově nastavené podmínky vykazují vyšší citlivost, než podmínky dosavadní.

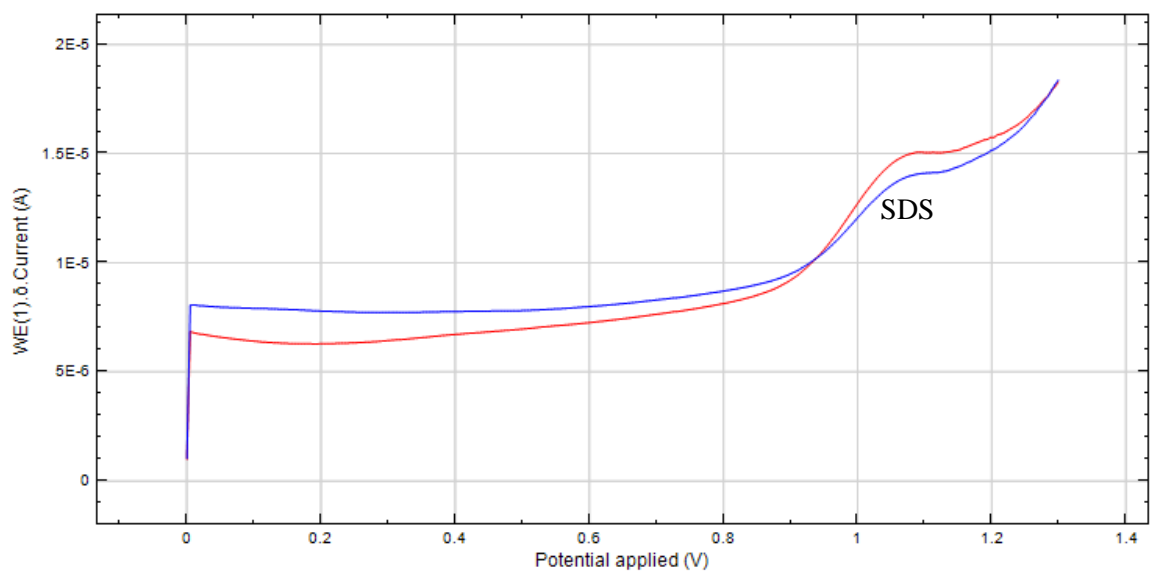
Dále byla ověřena možnost zvýšení akumulace berberinu, který nese kladný náboj, pomocí tenzidu, konkrétně dodecylsíranu sodného. Po vyhodnocení signálů bylo zjištěno, že nedošlo k výraznému nárůstu tohoto signálu (obrázek 33), tudíž můžeme tvrdit, že přídavek tenzidu nehraje významnou roli při zvýšení citlivosti signálu berberinu.

Optimalizované přístrojové podmínky DPV :

Počáteční potenciál: 0 V  
Koncový potenciál: 1,3 V  
Potenciálový krok: 0,005 V  
Amplituda pulzu: 0,025 V  
Délka pulzu: 0,025 s  
Rychlost skenu: 0,05 V/s  
Vzdálenost mezi pulzy: 0,1 s



Obrázek 32: Srovnání voltamogramů při použití původních a nových podmínek DPV, modře = původní podmínky, zeleně = optimalizované podmínky, koncentrace berberinu  $c = 1,076 \cdot 10^{-4}$  mol/l, borátový pufr (pH 9,89), DPV, GCPE/SO.



Obrázek 33: Srovnání voltamogramů při použití SDS, červeně = bez SDS, modře = s SDS, optimalizované podmínky, koncentrace berberinu  $c = 1,076 \cdot 10^{-4}$  mol/l, borátový pufr (pH 9,89), DPV, GCPE/SO.

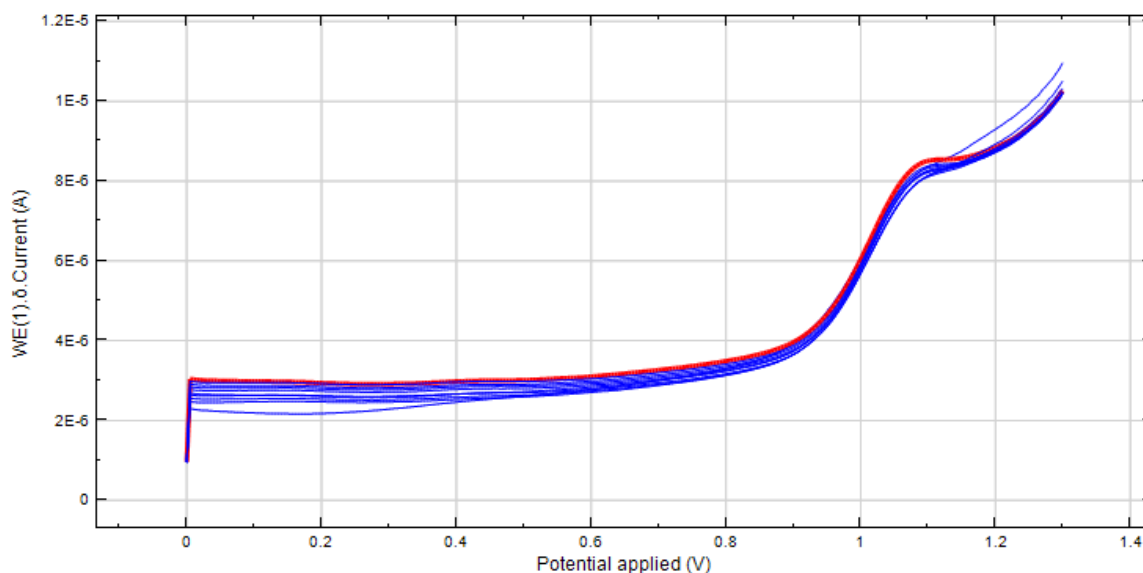


## Reprodukovatelnost signálu

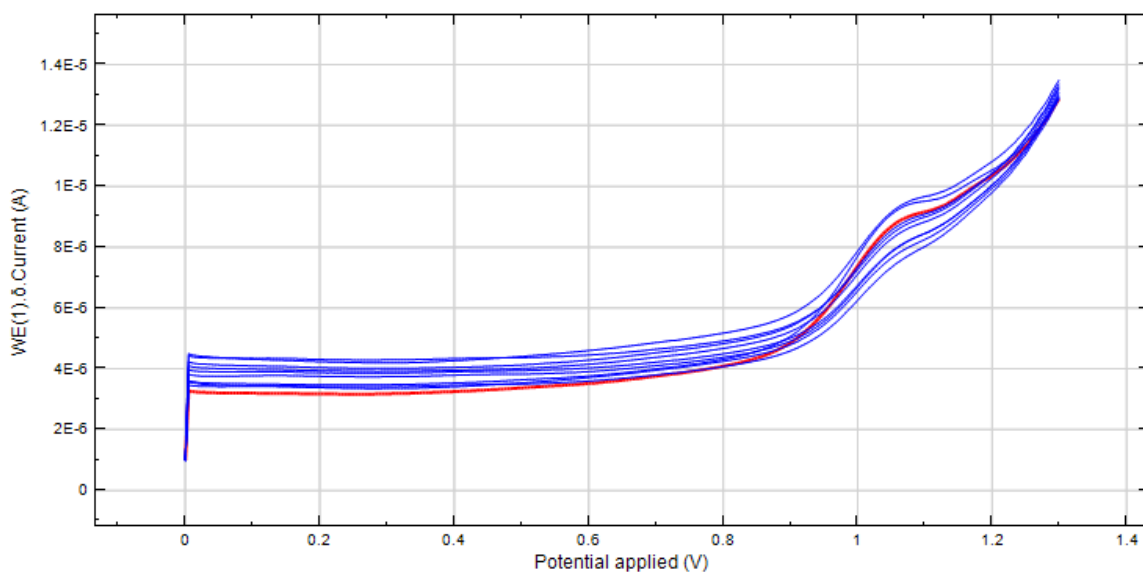
K ověření reprodukovatelnosti po optimalizaci všech parametrů, viz kapitola 5.5. optimální podmínky, bylo potřeba provést sérii měření jak pro elektrodu s konstantním povrchem, tak i pro elektrodu, jejíž povrch byl před každým měřením obnoven. Každé měření bylo provedeno desetkrát a doba míchání před měřením byla nastavena na 30 s. Z přiloženého obrázku 34 vyplývá, že s každým následujícím skenem na jednom povrchu, dochází k mírnému snižování intenzity signálu, které je pravděpodobně zapříčiněno usazováním produktů oxidace na povrchu elektrody. Zakreslená červená linie odpovídá signálu pro první měření. Dále byly vypočteny odchylky pro tato měření. Odchylka pro konstantní povrch elektrody 12%, pro obnovovaný 24%.

Naopak u elektrody s obnovou povrchu před každým měřením, signál nevykazoval žádný trend a získané linie jsou náhodné, jak můžeme vidět na obrázku 35. Opět zde červená linie charakterizuje první měření.

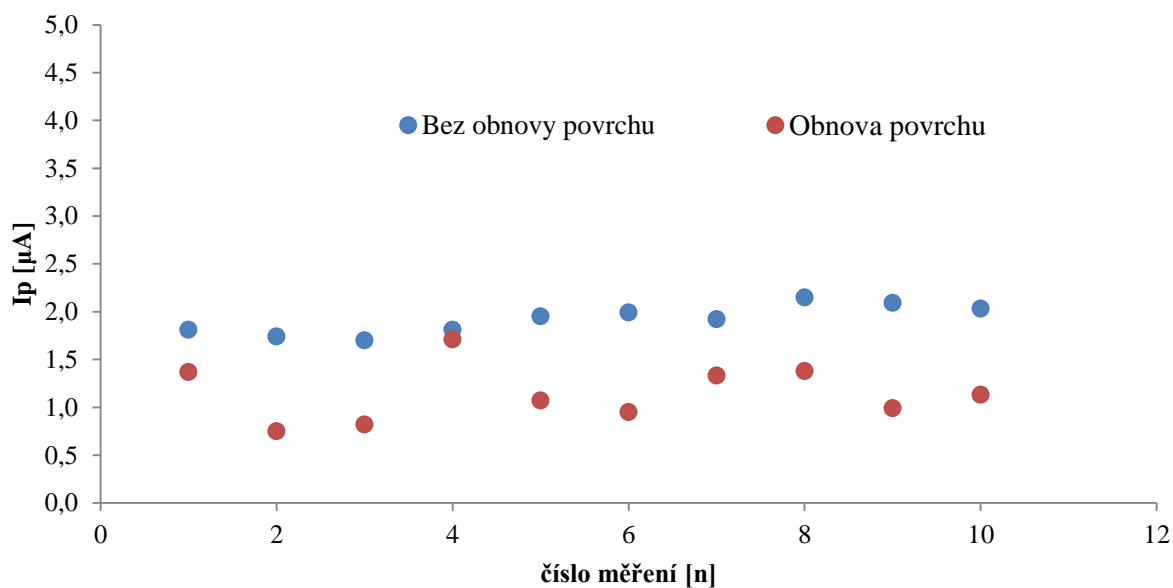
Z obrázku 36 můžeme pozorovat, že nejstabilnější odezva byla získána pro měření na elektrodě bez obnovy povrchu, tudíž byla použita pro měření kalibrační křivky, modelového a reálného vzorku.



Obrázek 34: Záznam deseti měření na jednom povrchu GCPE/SO elektrody, optimalizované podmínky, koncentrace berberinu  $c = 1,076 \cdot 10^{-4}$  mol/l, borátový pufr (pH 9,89), DPV.



Obrázek 35: Záznam deseti měření na obnovovaném povrchu GCPE/SO elektrody, optimalizované podmínky, koncentrace berberinu  $c = 1,076 \cdot 10^{-4}$  mol/l, borátový pufr (pH 9,89), DPV.

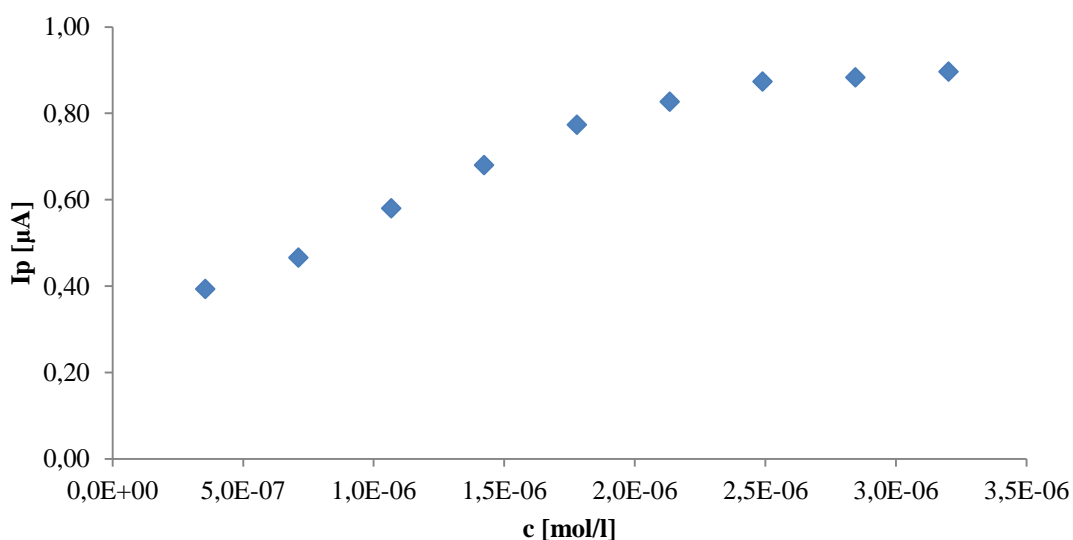


Obrázek 36: Graf deseti měření na jednom a obnovovaném povrchu GCPE/SO elektrody, optimalizované podmínky, koncentrace berberinu  $c = 1,076 \cdot 10^{-4}$  mol/l, borátový pufr (pH 9,89), DPV.

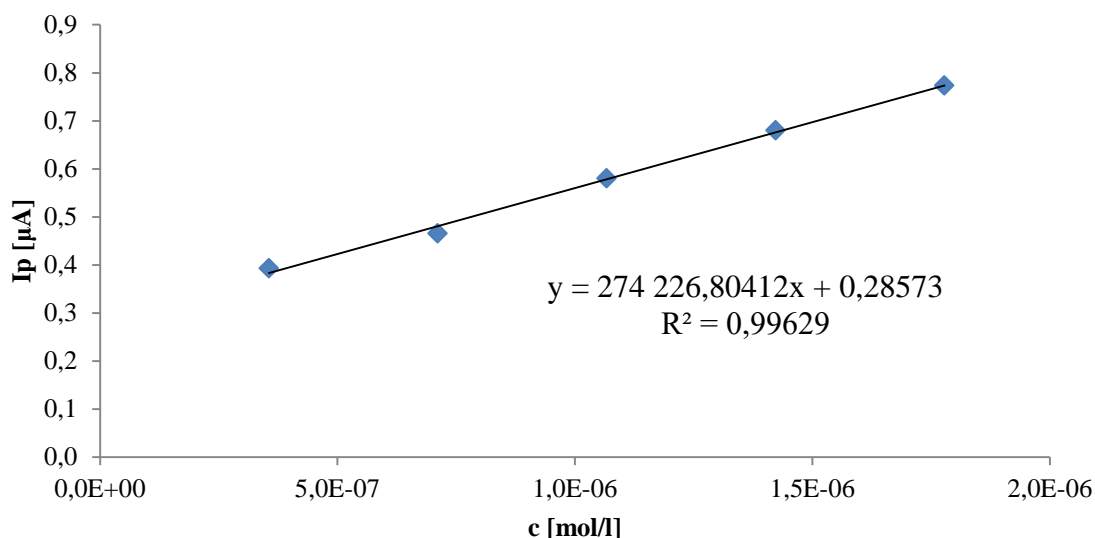
## 5.6. Kalibrační závislost

Před samotným stanovením berberinu v modelovém a reálných vzorcích bylo potřeba proměřit kalibrační řadu roztoků k získání kalibrační křivky. Pro zjištění lineární závislosti byla kalibrační křivka nejprve proměřena v širším rozmezí koncentrací. Z obrázku 37 lze vidět, že lineární oblast se vyskytuje v rozmezí koncentrací  $3,55 \cdot 10^{-7}$  až  $1,78 \cdot 10^{-6}$  mol/l, při vyšších koncentracích docházelo k nepravidelnému vychylování signálu. Z toho důvodu byla rovnice regrese použita pro vymezenou lineární oblast, obrázek 38.

Modelový vzorek spolu s reálnými vzorky byl ředěn tak, aby jejich koncentrace byla v rozmezí kalibračních hodnot. Dále byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti, k výpočtu posloužila koncentrace  $3,55 \cdot 10^{-7}$  mol/l. Pro tuto koncentraci byly proměřeny tři signály, z nich byla stanovena směrodatná, dále LOD a LOQ.



Obrázek 37: Graf závislosti proudu na koncentraci, kalibrační křivka v rozsahu koncentrací  $c = 3,56 \cdot 10^{-7}$  až  $c = 3,2 \cdot 10^{-4}$  mol/l, borátový pufr (pH 9,89), DPV, GCPE/SO.



Obrázek 38: Lineární oblast kalibrační křivky berberinu, GCPE/SO elektroda, optimalizované podmínky, borátovýpufr (pH 9,89), koncentrace berberinu  $c = 3,55 \cdot 10^{-7}$  až  $1,78 \cdot 10^{-6}$  mol/l, DPV.

### Mez detekce

$$LOD = \frac{3 \cdot S_{MODCH}}{\text{směrnice}}$$

$$LOD = \frac{3 \cdot 8,89 \cdot 10^{-7}}{274226,80412}$$

$$LOD = 9,72 \cdot 10^{-12} \text{ mol/l}$$

Mez detekce,  $LOD = 9,72 \cdot 10^{-12}$  mol/l odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky význačně odlišný od šumu.

### Mez stanovitelnosti

$$LOQ = \frac{10 \cdot S_{MODCH}}{\text{směrnice}}$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot 8,89 \cdot 10^{-7}}{274226,80412}$$

$$LOQ = 3,24 \cdot 10^{-11} \text{ mol/l}$$

Mez stanovitelnosti,  $LOQ = 3,24 \cdot 10^{-11}$  mol/l odpovídá koncentraci, při které přesnost měření dovoluje vyhodnocení z hlediska kvantity.

## 5.7. Modelový vzorek a reálné vzorky

Po optimalizaci všech parametrů diferenčně pulzní voltametrie bylo možné přejít k otestování spolehlivosti metody, které probíhalo na modelovém a dále pak na reálných vzorcích. Analýza probíhala na pastové elektrodě ze skelného uhlíku se silikonovým olejem v prostředí borátového pufru o pH 9,89. Míchání, které mělo pozitivní vliv na stabilitu signálu 30 s. Stanovení probíhalo jak metodou kalibrační křivky, tak i metodou standardního přídatku.

Přístrojové podmínky:

Počáteční potenciál: 0 V

Konečný potenciál: 1,3 V

Přírůstek potenciálu: 0,005 V

Amplituda pulzu: 0,025 V

Délka pulzu: 0,025 s

Rychlost skenu: 0,05 V/s

### Modelový vzorek

Příprava modelového vzorku probíhala následovně. Zásobní roztok berberinu o koncentraci  $5,379 \cdot 10^{-3}$  mol/l byl naředěn ethanolem tak, aby se jeho výsledná koncentrace pohybovala v rozmezí kalibrační křivky. Ke zjištění hledané, ale zároveň nám známe koncentrace berberinu, posloužila k vyhodnocení jak metoda kalibrační křivky, tak i metoda standardního přídatku. Získané výsledky jsou předloženy v tabulce číslo 5.

Tabulka 5: Přehled získaných hodnot pro modelový vzorek.

	Naměřená koncentrace [ $\mu\text{g}/100\text{ml}$ ]	Skutečná koncentrace [ $\mu\text{g}/100\text{ml}$ ]	Výtěžnost [ % ]
Kalibrační křivka	$11,291 \pm 0,152$ pro N = 3	11,543	97
Standardní přídavek	$8,658 \pm 0,1,85$ pro N = 3	11,543	75

## Reálné vzorky

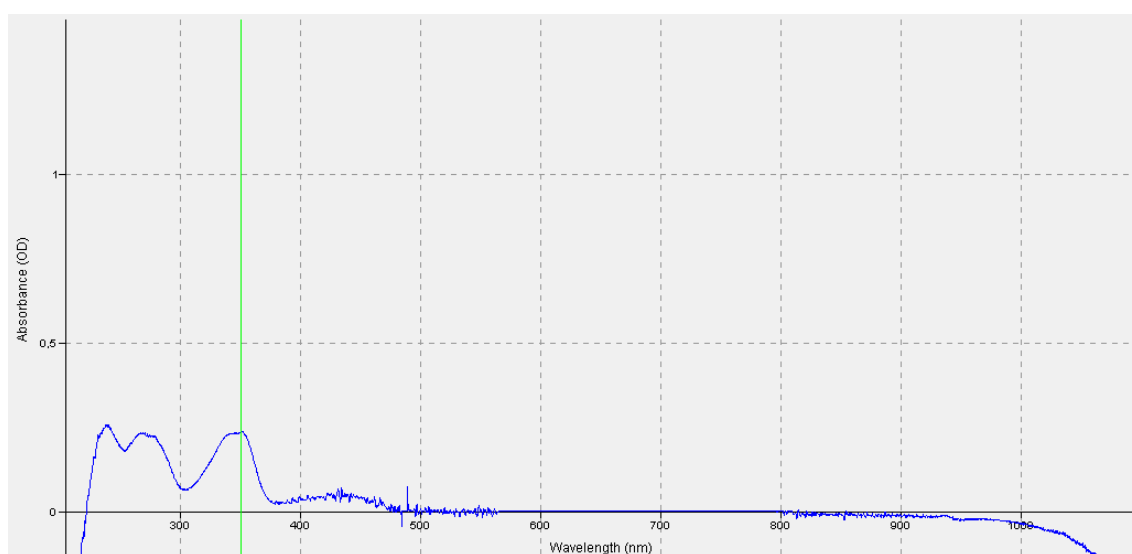
Aby byla potvrzena funkčnost metody, provedlo se měření pomocí diferenčně pulzní voltametrie i pro reálné vzorky, za identických podmínek jako u modelového vzorku. Rozpouštění zakoupených vzorků probíhalo v ethanolu a k efektivnějšímu rozpouštění byl použit ultrazvuk.

Výsledky diferenčně pulzní voltametrie byly srovnány s hodnotami, které byly získány z UV-VIS spektrofotometrie a posloužily pouze pro srovnání. Metoda nebyla žádným způsobem optimalizována a měření probíhalo při vlnové délce 350 nm. Jako blank posloužil čistý ethanol, ve kterém je berberin rozpustný. Dále byly zvolené takové koncentrace, aby byly v rozsahu kalibrační přímky. Hodnoty absorbancí jsou uvedeny v tabulce 6 a vybrané záznamy reálných vzorku v obrázek 39 a 40.

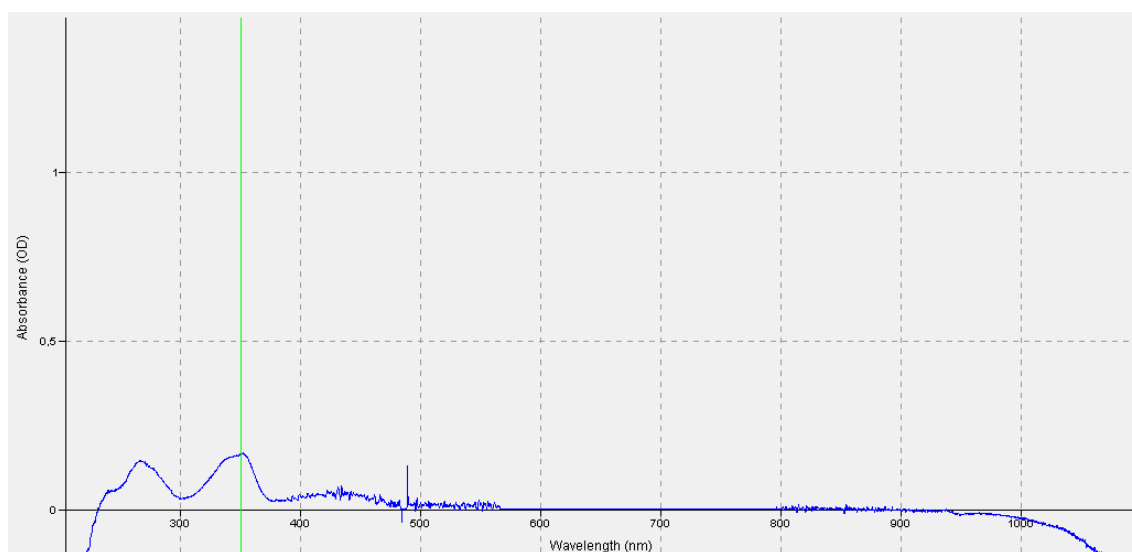
Stejně jako u modelového vzorku, tak i zde probíhalo vyhodnocení koncentrace pomocí kalibrační křivky a metody standardního přídavku jak pro DPV, tak pro UV-VIS spektrofotometrii. Výsledky shrnuty v tabulce 7. V zakoupeném vzorku regeneračního oleje společnosti YBE nebyla prokázána přítomnost berberinu metodou DPV ani UV-VIS. Důvodem může být nízká citlivost metod. V reálných vzorcích Mahónie cesminolisté byla přítomnost berberinu v největší koncentraci prokázána v kořeni, v menším množství v listech.

Tabulka 6: Hodnoty absorbance při vlnové délce 350nm pro reálné vzorky.

Vzorek	$A^{350}$
Výtažek z kořene	0,174
Olej	-
Kořen Mahónie cesminolisté	0,80
Bobule Mahónie cesminolisté	-
Listy Mahónie cesminolisté	0,538
Vlaštovičník větší	0,113



Obrázek 39: UV-VIS spektrum berberinu v zakoupeném extraktu kořene.



Obrázek 40: UV-VIS spektrum berberinu v kořeni Mahónie cesminolisté.

Tabulka 7: Přehled vzorků a jejich koncentrací získaných měření (N = 3).

	DPV		UV-VIS	Deklarované množství
	Kalibrační křivka	Standardní přídavek		
Vzorek	Koncentrace [mg/g]	Koncentrace [mg/g]	Koncentrace [mg/g]	Koncentrace [mg/g]
Výtažek z kořene	650 ± 25	526 ± 15	707 ± 81	850
Olej	-	-	-	
Kořen Mahónie cesminolisté	0,146 ± 0,015	0,78 ± 0,10	0,250 ± 0,94	
Bobule Mahónie cesminolisté	-	-	-	
Listy Mahónie cesminolisté	0,122 ± 0,078	0,181 ± 0,077	0,091 ± 0,005	
Vlaštovičník větší	-	-	-	



## 6. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla charakterizace alkaloidu berberinu a jeho elektrochemická studie na uhlíkových pastových elektrodách. Tyto pastové elektrody byly připraveny z uhlíkových prášků nesoucí označení CR-5 a Sigradur G, jako pojivo posloužil parafínový a silikonový olej.

Na začátku bylo nezbytné ověřit elektrochemické chování berberinu, konkrétně jeho oxidaci v základním elektrolytu. Podmínky pro toto měření byly automaticky nastaveny programem NOVA 1.11. a měření probíhalo v režimu lineární voltametrie v Britton-Robinsonově pufru o pH 1,81 s použitím GCPE/PO. Výsledkem byl rostoucí oxidační pík při potenciálu 1,2 V.

Dalším krokem byl výběr vhodné pracovní elektrody, který probíhal testováním GCPE/PO, GCPE/SO, GC a BDDE elektrody. Pro úvodní experimenty posloužila k měření GCPE s parafínovým olejem, která se později ukázala jako nevhodná, z toho důvodu, že neposkytovala reprodukovatelné výsledky. V důsledku toho byla nahrazena elektrodou GCPE se silikonovým olejem. Další důležitou součástí bylo nezbytné vybrat vhodný elektrolyt, který by poskytoval nejstabilnější a zároveň největší odezvu. Proto byla sledována oxidace berberinu v 0,1 mol/l  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{HCl}$  a Britton-Robinsonově, acetátovém, fosfátovém a borátovém pufru. Z provedených experimentů vykazoval nejlepší odezvu borátový pufr o pH 9,89. Po vybrání GCPE/SO elektrody jako elektrody pracovní a borátového pufru jako základního elektrolytu bylo nutné ještě ověřit citlivost metod. Jak už bylo zmíněno výše, úvodní experimenty probíhaly v režimu lineární voltametrie, avšak při srovnání s diferenčně pulzní voltametrií a cyklickou voltametrií bylo zjištěno, že nejvhodnější metodou k dalšímu měření bude DPV z důvodu zisku nejcitlivějších voltamogramů.

Po výběru elektrody GCPE/SO, borátového pufru jako elektrolytu a vhodné měřicí techniky DPV se pokračovalo prováděním experimentů k optimalizaci zvolené metody. Optimalizace zahrnovala úpravu přístrojových podmínek jakožto úpravu amplitudy na hodnotu 25 mV, délky pulzu na 0,025 s a vzdálenost mezi pulzy na 0,1 s. Za těchto podmínek vykazovalo měření ještě citlivějších výsledků. Nezbytnou součástí optimalizace byl také výběr vhodného potenciálu akumulace, při kterém docházelo ke

změně potenciálu. Nicméně bylo zjištěno, že nejstabilnější signál byl získán při akumulačním potenciálu 0 V. Jako nejvhodnější doba míchání před samotnou analýzou, která má pozitivní vliv na stabilitu signálu byla stanovena na 30 s. Také bylo nutné ověření reprodukovatelnosti signálu pro oxidaci berberinu. K tomuto ověření byla provedena série měření na jednom povrchu elektrody a na povrchu elektrody, který byl před každou analýzou obnoven. Tento nový povrch poskytoval pro každé měření hůře reprodukovatelné výsledky, proto bylo měření prováděno na jednom povrchu elektrody.

Dále byla proměřena a sestavena kalibrační křivka pro široké rozmezí koncentrací  $3,55 \cdot 10^{-7}$  mol/l až  $3,2 \cdot 10^{-6}$  mol/l, avšak tato křivka byla lineární pouze v oblasti  $3,56 \cdot 10^{-7}$  až  $1,78 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Z těchto koncentrací, které tvořily lineární část křivky byla vypočtena mez detekce  $LOD = 9,72 \cdot 10^{-12}$  mol/l a mez stanovitelnosti  $LOQ = 3,24 \cdot 10^{-11}$  mol/l.

Navržená metoda byla ověřena pomocí modelových a reálných vzorků a získané výsledky byly srovnány s výsledky UV-VIS spektrofotometrie. Z proměřených vzorků byl stanoven největší obsah berberinu v zakoupeném extraktu kořene, kde nalezené množství bylo 650 mg/g metodou kalibrační křivky a 526 mg/g metodou standardního přídatku. Deklarované množství prodejcem bylo 850 mg/g. V zakoupeném vzorku regeneračního oleje YBE nebyl zjištěn žádný podíl toho alkaloidu, důvodem může být nízká citlivost použitých metod. Ve vzorku Mahónie cesminolisté pocházející z vlastní zahrady, byl největší podíl berberinu nalezen ve vzorku kořene a to 0,146 mg/g.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. FERENČÍK, M.; et al. *Biochémiá*; Slovak Academic Press: Bratislava, 2000.
2. PÍŠOVÁ, K. *Rostliné alkaloidy v historii lidstva*. Pedagogická fakulta Univerzity Karlovy v Praze: Praha, 2011, Bakalářská práce.
3. ANISZEWSKI, T. *Alkaloids - Secrets of Life.*, 1st ed.; Elsevier: Boston, 2007.
4. CORDELL, G. A. *Introduction to alkaloids a biogenetic approach*, 1st ed.; John Wiley & Sons Inc: New York, 1981.
5. MUSILOVÁ, L.; et al. Úloha sekundárních metabolitů u rostlin v bakteriální degradaci organických xenobiotik. *Chemické listy* 2012, (11), 1029–1033.
6. VELÍŠEK, J.; et al. *Chemie potravin I.*; Osis: Praha, 2009.
7. MINAŘÍK, J.; et al. *Farmakognosie: učební text pro střední zdravotnické školy*, 1st ed.; AVICENUM: Praha, 1979.
8. MANSKE, R. H. F.; et al. *The Alkaloids*, 1st ed.; Academic Press, 1949.
9. EVANS, E. Ch. *Trease and Evans Pharmacognosy*, 16th ed.; Elsevier: New York, 2006.
10. LINHART, I. *Toxikologie - Interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*, 2nd ed.; VŠCHT: Praha, 2014.
11. OPLETAL, L.; SKŘIVANOVÁ, V. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*, 2nd ed.; Karolinum: Praha, 2010.
12. BALOUN, J.; et al. *Rostliny způsobující otravy a alergie*, 1st ed.; Avicenum: Praha, 1989.
13. VELÍŠEK, J.; HAJŠLOVÁ, J.; et al. *Chemie potravin III.*, 2nd ed.; Osis: Praha, 2009.
14. ANISZEWSKI, T.; et al. *Alkaloids*, 2nd ed.; Elsevier Science: Boston, 2015.

15. LEDVINA, M.; STOKLASOVÁ, A.; CERMAN, J. *Biochemie pro studující medicíny I.díl*; Karolinum: Praha, 2009.
16. SLAVÍK, J.; SLAVÍKOVÁ, L. Minor alkaloids from *Chelidonium majus* L. *Chem. Commun.* 1977, 42 (7), 2686–2693.
17. GUINAUDEAU, H.; SHAMMA, M. The Protopine Alkaloids. *J. Nat. Prod.* 1982, 45 (3), 237–246.
18. SUCHÝ, V. *Farmakognosie: Část všeobecná*; Univerzita Komenského: Bratislava, 1994.
19. SALAŠ, J.; HARTMANN, M. *Farmaceutická chemia*; Osveta: Bratislava, 1975.
20. SIGMA ALDRICH, dostupné z [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com). [Online].
21. HAIXUE, K. *Recent Advances in Theories and Practice of Chinese Medicine*; InTech, 2012.
22. SPILKOVÁ, K.; et al. *Farmakognozie*; Karolinum: Praha, 2016.
23. PHILLIPSON, J. D.; ROBERTS, M. F.; ZENK, M. H. *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Berlin, 1985.
24. GU, Y.; QIAN, D.; DUAN, J. A.; et al. Simultaneous determination of seven main alkaloids of *Chelidonium majus* L. by ultra-performance LC with photodiode-array detection.. *Journal of separation science* 2010, 33 (8), 1004–1009.
25. TEPLÍKOVÁ, J., *Berberis vulgaris* [cit.8.2..2018]. Dostupné z: [www.ireceptar.cz](http://www.ireceptar.cz) [online].
26. Zahradacentrum [online]. Opuncie [cit. 8.2.2018], dostupné z: [www.zahradacentrum.cz](http://www.zahradacentrum.cz). [Online] 15. 12 2017.
27. Rehabilitace.Info[online]. Mahonie cesminolistá, Vlaštovičník větší [cit. 8.2.2018]. Dostupné z: [www.rehabilitaceinfo.cz](http://www.rehabilitaceinfo.cz).

28. VUDDANDA, P. R.; CHAKRABORTY, S.; SINGH, S. Berberine: a potential phytochemical with multispectrum therapeutic activities. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2010, 19 (10), 1297–1307.
29. NECHEPURENKO, I. V.; SALAKHUTDINOV, N. F.; TOLSTIKOV, A. A. Berberine: Chemistry and Biological Activity. *Chemistry for Sustainable Development* 2010, 18, 1–23.
30. KAKALI, B.; MAITI, M.; KUMAR, G. S. Interaction of Isoquinoline Alkaloid Palmatine with Deoxyribonucleic Acids: Binding Heterogeneity, and Conformational and Thermodynamic Aspects. *Chemistry & Biodiversity* 2008, 5 (4), 575–590
31. GAŠPAREC, Z.; ŠEBOJKA, K. L.; LOVRIĆ, M. The ultraviolet and visible absorption spectra of berberrubine.. *Can. J. Chem.* 1982, 60, 970–975.
32. GLASBY, J. *Encyclopedia of the Alkaloids*; Springer US: New York, 1977.
33. DAI, X.; SONG, H.; LIU, W.; et al. On-line UV-NIR spectroscopy as a process analytical technology (PAT) tool for on-line and real-time monitoring of the extraction process of Coptis Rhizome. *RSC Advance* 2016, 12 (6), 10078–10085.
34. GOSHMAN, L. M. Clinical toxicology of commercial products. *J. Pharm. Sci.* 1985, 74 (10), 1139.
35. SIMON, M.; KERRY, B. *The Essential Guide to Herbal Safety*; Churchill Livingstone, 2005.
36. XIE, J.; XU, Y.; HUANG, X.; CHEN, Y.; et al. Berberine-induced apoptosis in human breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species generation and mitochondrial-related apoptotic pathway. *Tumour Biol.* 2015, 36 (2), 1279–1288.
37. JAHNKE, G. D.; PRICE, C. J.; MARR, M. C.; MYERS, C. B.; et al. Berberine-induced apoptosis in human breast cancer cells is Developmental toxicity evaluation of berberine in rats and mice. *Birth Defects Res. B Dec. Reprod. Toxicol* 2006, 77 (3), 195–206.

38. SAMANANI, N.; FACCHINI, P. J.; et al. Purification and characterization of norcoclaurine synthase. The first committed enzyme in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* 2002, 277 (37), 33878–33883.
39. SVOBODA, J. *Organická Syntéza I.*, 1st ed.; VŠCHT: Praha, 2000.
40. PAUL, M. D. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3rd Edition*, 3rd ed.; John Wiley and Sons: United States, 2009.
41. SAMANANI, N.; FACCHINI, P. J. Purification and characterization of norcoclaurine synthase. The first committed enzyme in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* 2002, 277 (37), 33878–33883.
42. STANĚK, K. *Alkaloidy*, 1st ed.; Nakladatelství Československé akademie věd: Praha, 1957.
43. MORAVCOVÁ, J. *Biologicky aktivní přírodní látky*, 1st ed.; VŠCHT: Praha, 2006.
44. MIŠTOVÁ, T. Alkaloidy obsažené v rostlinách čeledi Papaveraceae Juss. Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009.
45. BREMNER, J. B.; KELSO, M. J. Synthesis of Berberine-Efflux Pump Inhibitor Hybrid Antibacterials. *Synth. Commun.* 2010, 40 (23), 3561–3568.
46. CORDELL, G. A. *Introduction to alkaloids a biogenetic approach*, 1st ed.; John Wiley & Sons Inc: New York, 1981.
47. MÓRICZ, Á. M.; FORNAL, E.; et al. Effect-Directed Isolation and Identification of Antibacterial Chelidonium majus L. Alkaloids. *Chromatographia* 2015, 78 (9-10), 707–716.
48. LEE, J.; CHO, J. G.; et al. Isolation of isoquinoline alkaloids from the tuber of *Corydalis turtschaninovii* and their inhibition activity on low density lipoprotein oxidation. *J. Korean Chem. Soc.* 2009, 52 (6), 646–654.
49. ES, O.; et al. Isolation of isoquinoline Determination of berberine and strychnine in medicinal plants and herbal preparations by pressurized liquid extraction with capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 2001, 22 (13), 2723–2729.

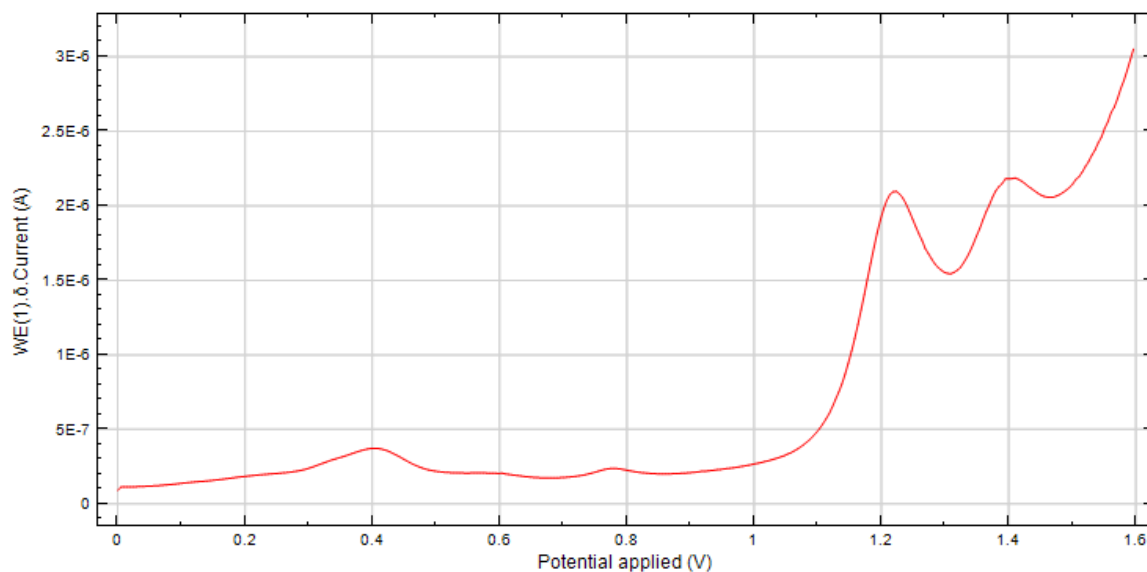
50. GAO, P.; CHEN, X.; et al. New oil-in-salt liquid-phase microextraction on permutite for the extraction and concentration of alkaloids in *Coptis chinensis*. *Sep. Sci.* 2017, 40 (6), 1334–1342.
51. SUAUA, R.; RICO, R.; et al. Isoquinoline alkaloids from *Berberis Vulgaris* subsp. *Australis*. *Phytochemistry* 1998, 49 (8), 2545–2549.
52. AZIMI, G.; HAKAKIAN, A.; et al. Bioassay-directed isolation of quaternary benzyloisoquinolines from *Berberis integerrima* with bactericidal activity against *Brucella abortus*. *Pharm. Res.* 2017, 13 (2), 149–158.
53. LIU, S.; CHEN, Y.; et al. Effects of ultrahigh pressure extraction conditions on yields of berberine and palmatine from cortex *Phellodendri amurensis*. *Anal. methods* 2013, 5 (17), 4506–4512.
54. WANG, Y.; ZHANG, Y.; XIAO, J.; et al. Simultaneous determination of baicalin, baicalein, wogonoside, wogonin, scutellarin, berberine, coptisine, ginsenoside Rb1 and ginsenoside Re of *Banxia xiexin* decoction in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* 2017, 32 (2), 4083.
55. SKOPALOVÁ, J.; VACEK, J.; PAPOUŠKOVÁ, B.; et al. Electrochemical oxidation of berberine and mass spectrometric identification of its oxidation products. *Bioelectrochemistry* 2012, 87, 15–20.
56. GETO, A.; PITA, M.; TESSEMA, M.; et al. Electrochemical determination of berberine at a multi-walled carbon nanotubes-modified glassy carbon electrode. *Sens. Actuators, B* 2013, 183, 96–101.
57. DICULESCU, V. C.; ENACHE, T. A.; et al. Electrochemical Oxidation of Berberine and of Its Oxidation Products at a Glassy Carbon Electrode. *Electroanalysis* 2009, 21 (9), 1027–1034.
58. ŠEBOJKA, K. L. Adsorption and Reduction of Berberine at a Mercury Electrode. *Electroanalysis* 2000, 12 (8), 599–604.

59. STANKOVIĆ, D. M.; SAMPHAO, A.; KALCHER, K. Anti-cancer Herbal Drug Berberine – Sensitive Determination Using Boron-doped Diamond Electrode. *Electroanalysis* 2015, 27 (12), 2753–2759.
60. SONG, J. F.; HE, Y. Y.; GUO, W. Polarographic determination of berberine in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in medicinal plants.. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 28 (2), 355–363.
61. LOCHMANN, H.; BAZZANELLA, A.; KROPSCH, S. Determination of tobacco alkaloids in single plant cells by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr., A* 2001, 917 (1-2), 311–317.
62. MANIA, M.; DICULESCU, V. C. Guaicolinic spices curcumin and capsaicin electrochemical oxidation behaviour at a glassy carbon electrode. *J. Electroanal. Chem.* 2012, 682, 83–89.
63. MERSAL, G. Electrochemical applications and computational studies on ephedrine drug. *J. of Solid State Electrochemistry* 2011, 16 (6), 2031–2039.

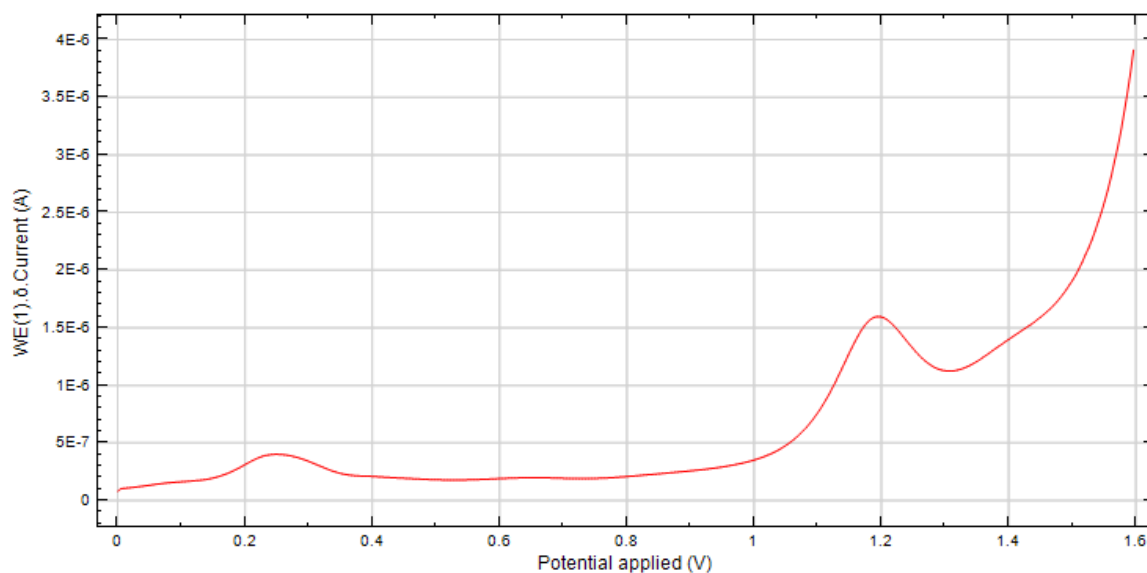


## 8. PŘÍLOHY

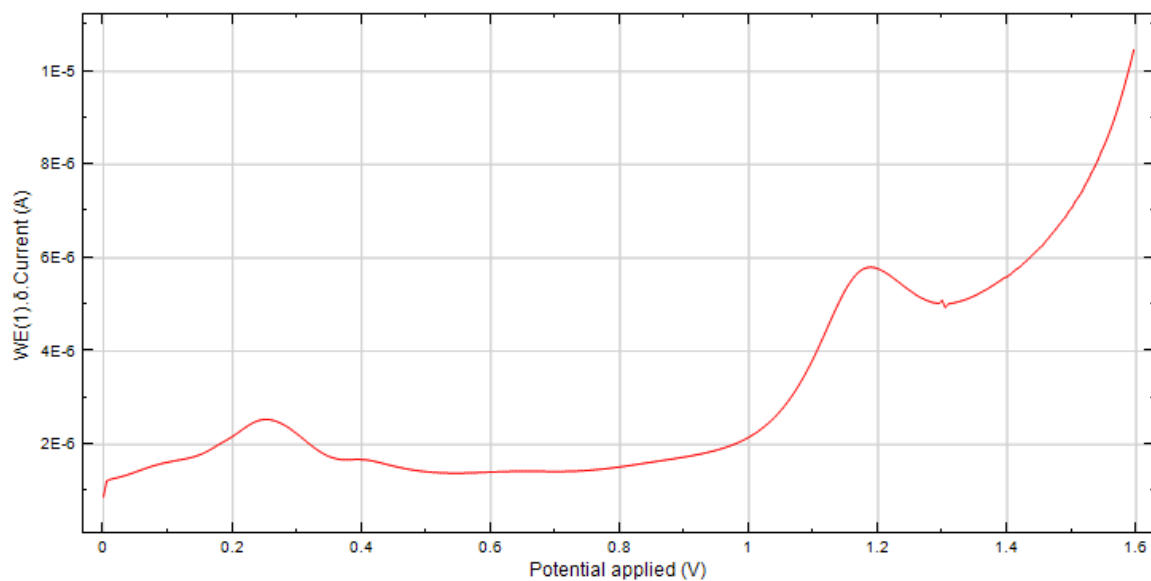
V příloze jsou předloženy vybrané voltamogramy, které byly získány proměřením GCPE/SO a GCPE/PO elektrody v různých elektrolytech a při různých metodách voltametrického měření.



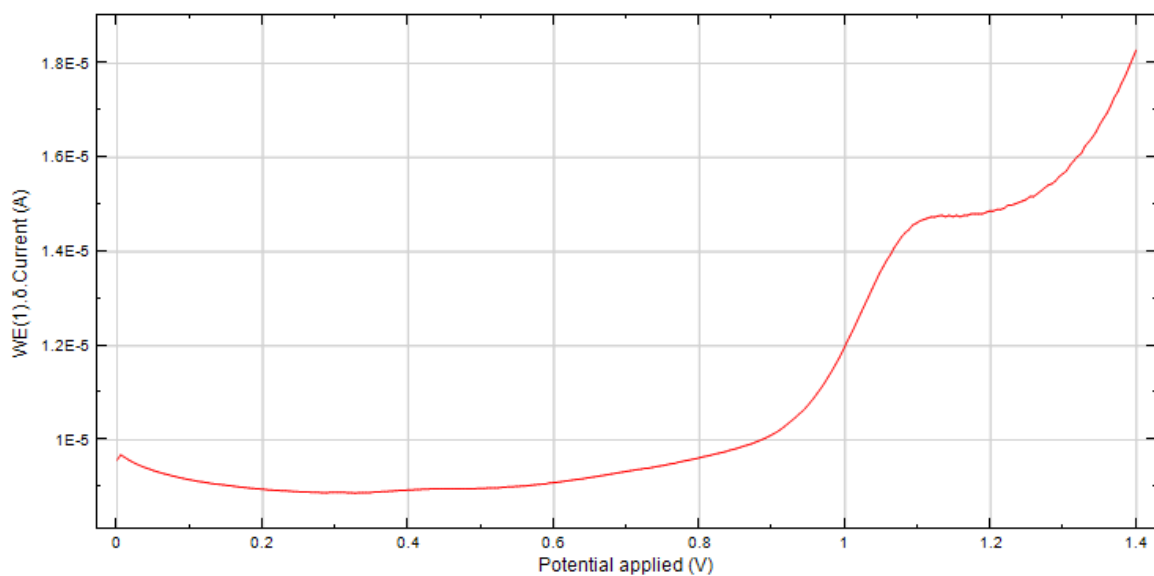
Ukázkový voltamogram berberinu v roztoku Britton-Robinsonova pufru, pH 2,6,  $c = 3,55 \cdot 10^{-7}$  mol/l, GCPE/PO, DPV, míchání 30 s.



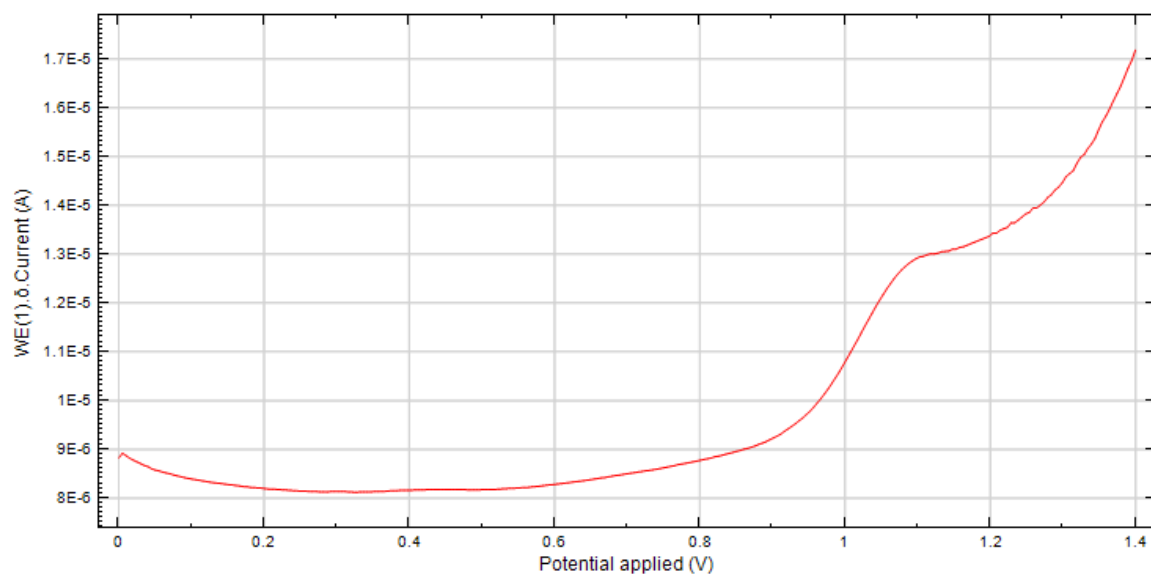
Ukázkový voltamogram berberinu v roztoku acetátového pufru, pH 4,21,  $c = 3,55 \cdot 10^{-7}$  mol/l, GCPE/PO, DPV, míchání 30 s.



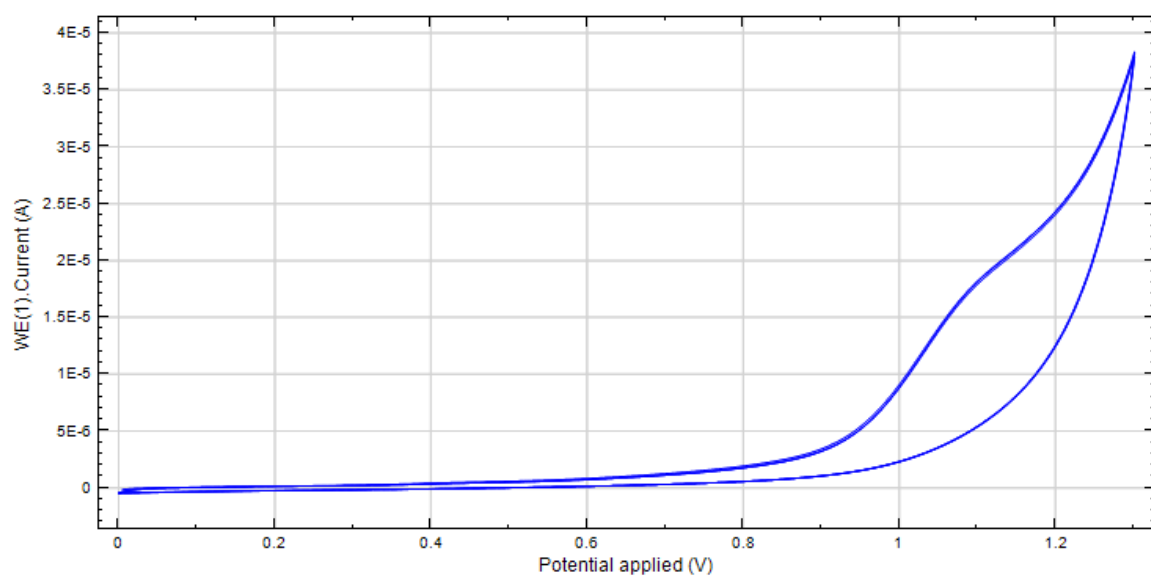
Ukázkový voltamogram berberinu v roztoku acetátového pufru, pH 4,21,  $c = 3,55 \cdot 10^{-7}$  mol/l, GCPE/SO, DPV, míchání 30 s.



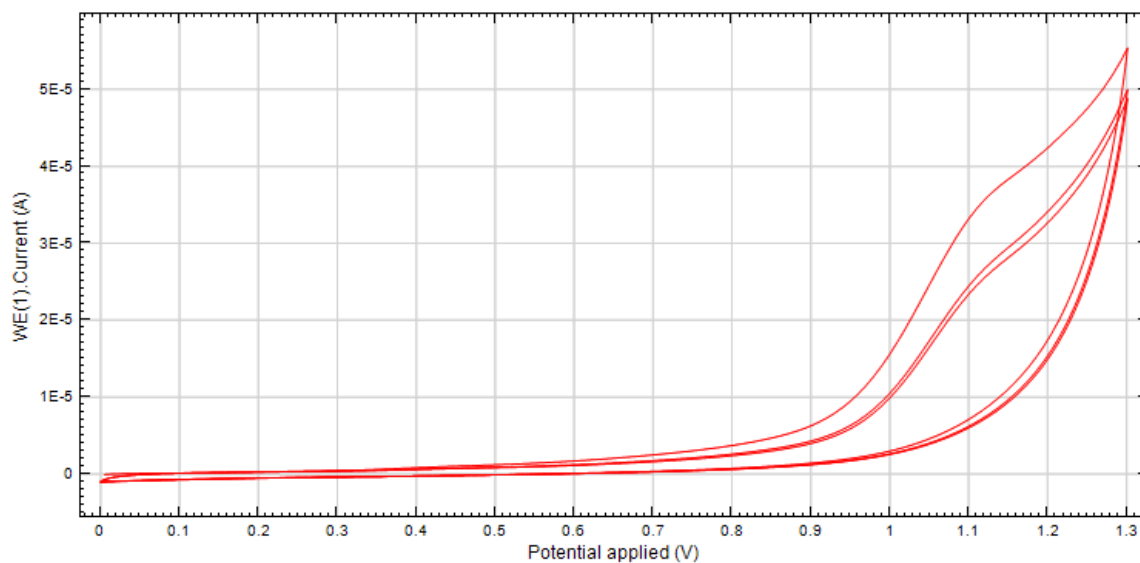
Ukázkový voltamogram berberinu ve vzorku výtažku z kořene, borátový pufr, pH 9,89,  $c = 1,18 \cdot 10^{-6}$  mol/l, GCPE/SO, DPV, míchání 30 s.



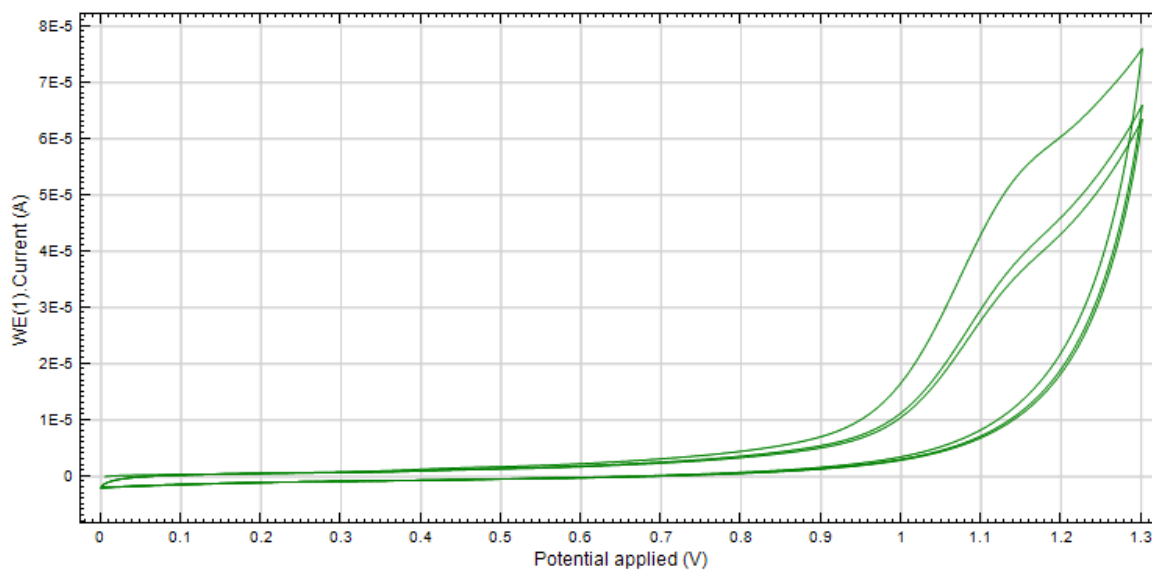
Ukázkový voltamogra berberinu ve vzorku kořene Mahónie cesminolisté, borátový pufr, pH 9,89,  $c = 1,01 \cdot 10^{-7}$  mol/l, GCPE/SO, DPV, míchání 30 s.



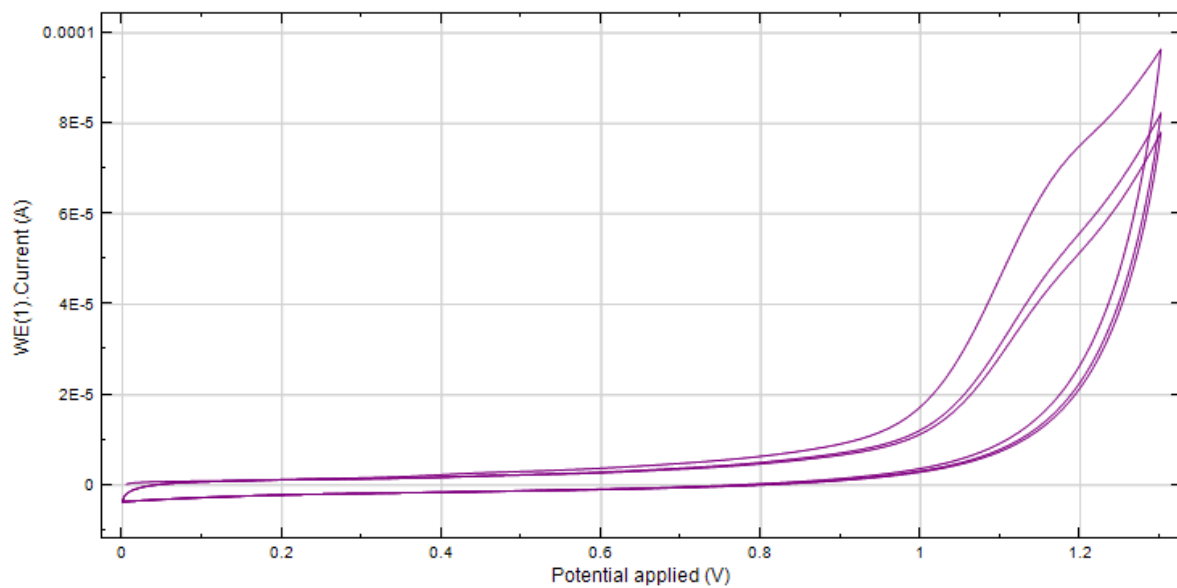
Ukázkový voltamogram berberinu v roztoku borátového pufru, pH 9,89,  $c = 3,55 \cdot 10^{-7}$ , mol/l, GCPE/SO, CV, rychlost skenu 20 mV/s, míchání 30 s.



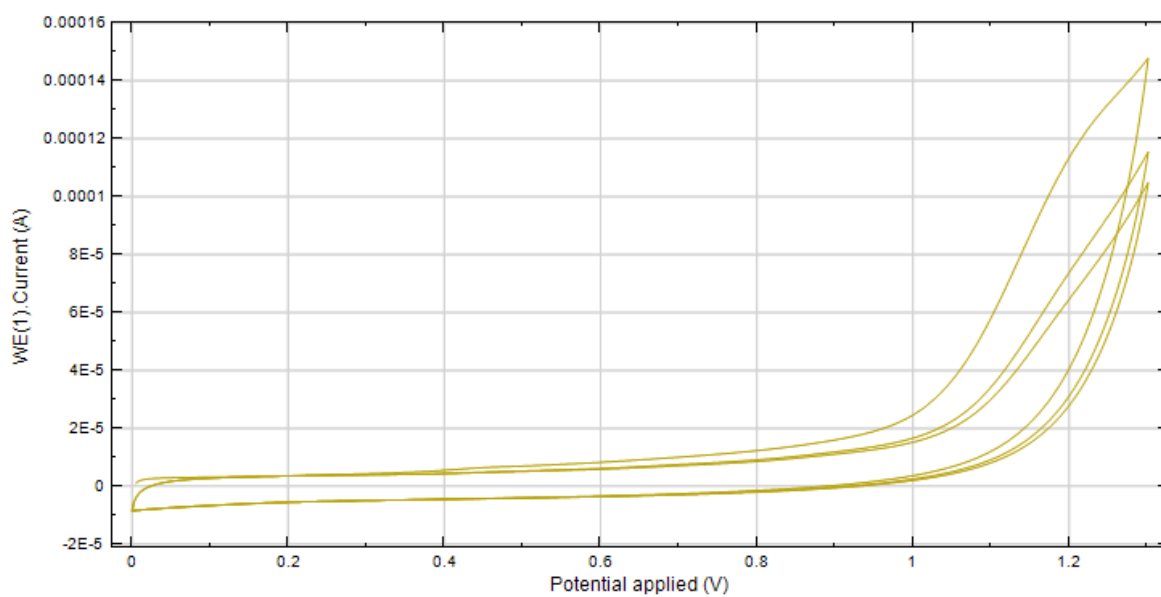
Ukázkový voltamogram berberinu v roztoku borátového pufru, pH 9,89,  $c = 3,55 \cdot 10^{-7}$  mol/l, GCPE/SO, CV, rychlost skenu 50 mV/s, míchání 30 s.



Ukázkový voltamogram berberinu v roztoku borátového pufru, pH 9,89,  $c = 3,55 \cdot 10^{-7}$ , mol/l, GCPE/SO, CV, rychlost skenu 100 mV/s, míchání 30 s.



Ukázkový voltamogram berberinu v roztoku borátového pufru, pH 9,89,  $c = 3,55 \cdot 10^{-7}$  mol/l, GCPE/SO, CV, rychlost skenu 200 mV/s, míchání 30s.



Ukázkový voltamogram berberinu v roztoku borátového pufru, pH 9,89,  $c = 3,55 \cdot 10^{-7}$  mol/l, GCPE/SO, CV, rychlost skenu 500 mV/s, míchání 30 s.