

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

**Katedra analytické chemie**

# **Voltametrické stanovení arekolinu**

**Barbora Indruchová**

**Diplomová práce**

**2022**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Barbora Indruchová**  
Osobní číslo: **C20527**  
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**  
Téma práce: **Voltametrické stanovení arekolinu**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

1. Seznamte se s principy a variantami voltametrie a proveďte literární rešerši týkající se klasifikace alkaloidů, zejména pyridinových a piperidinových. Dále se zde věnujte výskytu a vlastnostem arekolinu včetně přehledu metod jeho stanovení.
2. V experimentální části proveďte optimalizaci stanovení arekolinu pomocí voltametrických technik na elektrodách uhlíkového typu.
3. Navrženou metodu otestujte na modelových a reálných vzorcích a zároveň nastiňte možnosti stanovení arekolinu na jiných typech pevných elektrod.
4. Dosažené výsledky diskutujte a na závěr kriticky zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené 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: **7. února 2022**  
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Ing. Karel Ventura, CSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 21. února 2022

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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 4. 5. 2022

Barbora Indruchová

## **Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Ing. Tomáši Mikyskovi Ph.D., za odborné rady a připomínky k práci, a především za projevenou ochotu a trpělivost.

Dále bych na tomto místě chtěla poděkovat všem učitelům a profesorům, kteří mě kdy učili za předané znalosti a vědomosti.

Velký dík patří také mé rodině za podporu projevenou nejen při psaní této práce, ale také za dobu celého studia.

Děkuji Bohu za svůj život a za tento svět.

## **Anotace:**

Teoretická část této práce je zaměřena na charakterizaci alkaloidů a možnosti jejich rozdělení do skupin. Největší pozornost je věnována arekolinu, hlavnímu alkaloidu palmy areky obecné. Jsou zde mimo jiné popsány jeho vlastnosti, účinky na lidský organismus, toxicita a možnosti praktického využití. Teoretická část se také zabývá možnostmi stanovení arekolinu a popisem elektrod na bázi uhlíku.

V experimentální části je pak popsána příprava roztoků, použité přístroje, metody, vybavení a elektrody, a také příprava uhlíkové pastové elektrody. V části Výsledky a diskuze je shrnuto vypracování nové voltametrické metody pro stanovení arekolinu pomocí uhlíkových elektrod metodou square-wave voltametrie. V této kapitole tedy nalezneme výběr základního elektrolytu, výběr vhodné elektrody, optimalizaci podmínek metody, kalibrační přímku, výpočet LOD a LOQ a možnost rušivých vlivů dalších látek. Spolehlivost metody je dále ověřena pomocí modelových a reálných vzorků.

## **Klíčová slova:**

Arekolin, Alkaloidy, Voltametrické stanovení, Uhlíková pastová elektroda

## **Annotation:**

The theoretical part of this work is focused on the characterization of alkaloids and the possibility of their classification. The most attention is paid to arecoline, the main alkaloid of the *Areca catechu* palm. Among other things, its properties, effects on the human body, toxicity and possibilities of practical use are described here. The theoretical part also deals with the possibilities of arecoline determination and the description of carbon-based electrodes.

The experimental part then describes the preparation of solutions, used instrument, methods equipment and electrodes, as well as the preparation of carbon paste electrode. The Results and Discussion section summarizes the development of a new voltammetric method for the determination of arecoline using carbon electrodes by the square wave voltammetry method. In this chapter we will find the selection of the basic electrolyte, the selection of a suitable electrode, the optimization of the method conditions, the calibration line, the calculation of LOD and LOQ and the possibility of interfering effects of other substances. The reliability of the method is further verified using model and real samples.

## **Key words:**

Arecoline, Alkaloids, Voltammetric determination, Carbon paste electrode

# Obsah

Úvod.....	11
1. Alkaloidy .....	12
1.1. Názvosloví alkaloidů.....	12
1.2. Historie.....	12
1.3. Dělení alkaloidů .....	13
Alkaloidy s pyrrolovým jádrem.....	14
Tropanové alkaloidy .....	14
Alkaloidy s chinolinovým jádrem.....	15
Alkaloidy s pyridinovým jádrem .....	15
Piperidinové alkaloidy .....	16
Alkaloidy s indolovým jádrem .....	16
Seroidní alkaloidy .....	16
Ostatní alkaloidy .....	17
1.4. Fyzikální a chemické vlastnosti alkaloidů .....	17
2. Arekolin .....	18
2.1. Areka obecná.....	19
Alkaloidy areky obecné .....	19
2.2. Žvýkání betelového sousta.....	20
2.3. Účinky arekolínu.....	20
Účinky na nervovou soustavu.....	21
Účinky na kardiovaskulární systém.....	21
Anti-parazitické účinky.....	22
Účinky na trávicí soustavu.....	22
Účinky na endokrinní soustavu.....	22
Ostatní účinky .....	22
2.4. Toxicita arekolínu .....	23



2.5.	Použití arekolinu .....	23
2.6.	Extrakce arekolinu z ořechů palmy arekové .....	24
3.	Elektrochemické stanovení arekolinu .....	26
4.	Další metody stanovení arekolinu.....	27
4.1.	Chromatografie .....	27
	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	27
	Plynová chromatografie .....	28
4.2.	Kapilární elektroforéza.....	28
4.3.	Ostatní metody .....	28
5.	Elektrody na bázi uhlíku .....	29
5.1.	Uhlíkové pastové elektrody.....	29
	Uhlíkový prášek.....	29
	Pojivo.....	29
5.2.	Elektrody ze skelného uhlíku .....	30
5.3.	Elektrody z borem dopovaného diamantu.....	30
6.	Experimentální část.....	31
6.1.	Chemikálie a laboratorní pomůcky .....	31
	Chemikálie .....	31
	Laboratorní pomůcky.....	31
6.2.	Příprava roztoků .....	32
	Roztok standardu .....	32
	Roztoky základních elektrolytů .....	32
	Modelové vzorky .....	33
	Reálný vzorek .....	34
6.3.	Použité elektrody.....	34
	Příprava uhlíkové pastové elektrody.....	34
6.4.	Přístroje a zařízení.....	35

6.5. Použité metody a postupy .....	35
Square-wave voltametrie (SWV), diferenčně pulzní voltametrie (DPV) a lineární voltametrie (LSV) .....	35
Cyklická voltametrie (CV).....	36
6.6. Výsledky a diskuze .....	37
Úvodní elektrochemické experimenty .....	37
Výběr základního elektrolytu.....	37
Výběr vhodné voltametrické metody.....	39
Optimální pH .....	41
Opakovatelnost měření .....	45
Cyklická voltametrie.....	48
Ověření opakovatelnosti na stejném a novém povrchu .....	49
Kondicionace elektrody .....	50
Volba parametrů SWV.....	53
Kalibrační křivka, mez detekce a mez stanovitelnosti.....	55
Interferenční studie .....	57
Modelové a reálné vzorky.....	59
7. Závěr .....	64
8. Seznam použité literatury .....	66

# Úvod

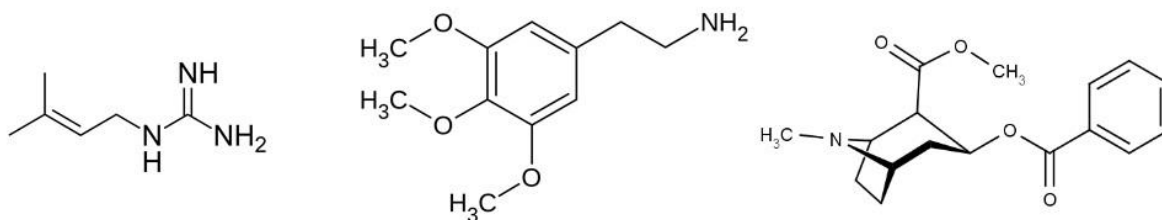
Výzkumy naznačují, že arekolin je účinnou látkou čtvrté nejrozšířenější drogy na světě, a i přes tuto skutečnost metod jeho stanovení není příliš mnoho. Jedinými rozšířenějšími metodami jeho stanovení jsou chromatografické techniky, kdy metoda HPLC pro jeho stanovení byla vyvinuta již před více než třiceti lety a v průběhu následujících let byla vylepšována. Avšak co se týče elektrochemických technik nebylo v dostupné literatuře nalezeno mnoho případů kdy by se touto problematikou již někdo zabýval. Proto bylo voltametrické stanovení arekolinu vybráno jako téma pro tuto diplomovou práci.

Na počátku si řekneme něco málo o alkaloidech, jejich vlastnostech a možnostech jejich dělení do různých kategorií. Následně se budeme věnovat arekolinu, a to především jeho výskytu, vlastnostem, účinkům na lidský organismus a použití. Nakonec také probereme možnosti jeho stanovení a v teoretické části bude také zmínka o elektrodách na bázi uhlíku.

Jak již bylo zmíněno experimentální část bude věnována vypracování vhodné metody pro voltametrické stanovení arekolinu, a to především na uhlíkové pastové elektrodě, ale budou odzkoušeny i další elektrody.

# 1. Alkaloidy

Jedná se o zásadité organické sloučeniny, které ve své struktuře mají alespoň jeden dusík. Většina alkaloidů obsahuje tento dusík v heterocyklu, některé z nich jsou však aromatické, výjimečně i alifatické, aminy (obrázek 1). Další podmínkou, aby látka mohla být nazývána alkaloidem je, že alespoň jeden z těchto dusíků musí být odvozen od aminokyseliny [1-3].



Obrázek 1: Typy alkaloidů: alifatický – Galegin (vlevo) [4]; aromatický – Meskalin (uprostřed) [5]; heterocyklický – Kokain (vpravo) [6]

Alkaloidy se vyskytují především v rostlinách, ale přibližně v posledních sto letech byly alkaloidy nalezeny i v některých živočiších, hmyzu, mikroorganizmech a houbách. Kvůli toxicitě většiny alkaloidů pak v organizmech plní především ochrannou funkci. U rostlin chrání např. před býložravci a hmyzem, u živočichů pak před predátory [1, 7].

## 1.1. Názvosloví alkaloidů

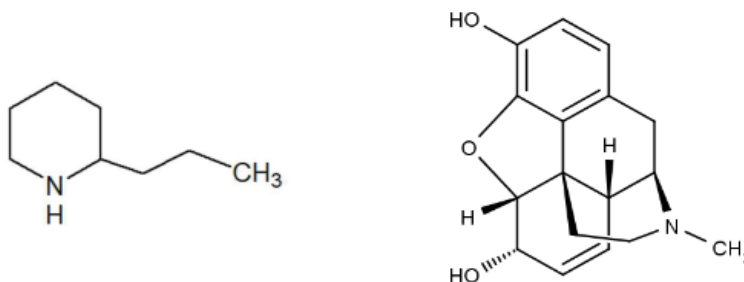
Co se týče pojmenování, pro velký počet alkaloidů, není jednoduché a sjednocující názvosloví možné. I pro některé větší skupiny příbuzných alkaloidů s různými strukturami by bylo komplikované nalézt jednotný princip pojmenování. Jedinou společnou charakteristikou názvů alkaloidů je tedy momentálně to, že končí koncovkou -in. Mimo to mají alkaloidy velmi často triviální názvy. Tyto názvy pak bývají odvozeny například ze jména rostliny, ve které byl alkaloid nalezen; podle některé vlastnosti daného alkaloidu; či po některém z chemiků, kteří se proslavili výzkumem na poli alkaloidů [7].

## 1.2. Historie

Protože jsou alkaloidy látky převážně rostlinného původu, interakce člověka s nimi probíhá už nejspíše od pravěku, kdy člověk zjistil, že když se necítí dobře a bude žvýkat nějakou rostlinu bude mu lépe, nebo že když sní jinou rostlinu tak zemře. A látky, kterým by za to vděčil mohly, ale také nemusely, být alkaloidy. Od toho se odvíjí využívání alkaloidů v průběhu historie, kdy

se využívaly a dodnes využívají v léčitelství a medicíně, ale také jako jedy. Dále se s alkaloidy můžeme setkat v čajích a kávě, anebo figurují jako účinné látky drog [7, 2].

První pokusy o izolaci alkaloidů z dříve používaných léčiv, však proběhly až v devatenáctém století. Roku 1805 byl izolován a popsán první alkaloid, kterým byl morfin (obrázek 2) získaný z opia. Dalším významným milníkem bylo v roce 1886 syntetizování koniinu (obrázek 2), jednoduchého, avšak toxického alkaloidu, originálně obsaženém v bolehlavu plamatém. [7]



Obrázek 2: Koniin (vlevo) [3], Morfin (vpravo) [9]

V dalších letech byly objevovány, izolovány a syntetizovány stále nové a nové alkaloidy. Nyní známe již přes 40000 alkaloidů ať již přírodního původu nebo syntetických [8].

### 1.3. Dělení alkaloidů

Alkaloidy můžeme dělit do skupin podle jejich nejrůznějších charakteristik anebo původu. Jednou z možností je dělení na základě působení na lidský organismus po jejich požití, popřípadě jiném kontaktu s těmito látkami. Působení alkaloidů na organismus velmi závisí na jejich struktuře. Většinou mají vliv na nervový systém, kdy urychlují, nebo naopak tlumí nervový přenos. Podle konkrétních účinků pak alkaloidy můžeme dělit do následujících skupin [10].

- Euforika – látky způsobující euforii a pocity blaženosti
- Analgetika – látky mající tišící účinky, tlumí bolest
- Anestetika – látky způsobující znecitlivění, tlumí bolest ale i další vjemy
- Hypnotika – látky mající uspávací účinky
- Antipyretika – látky snižující zvýšenou teplotu či horečku
- Analeptika – látky stimulující nervovou soustavu

Dále alkaloidy můžeme také dělit podle jejich původu, a to v jakých organismech se vyskytují. Takto získáváme skupiny jako např. alkaloidy rostlinného původu, alkaloidy zvířecího původu, alkaloidy vyskytující se v houbách nebo mikroorganismech [7].

Předchozí způsoby dělení jsou významné především z biologického nebo biochemického pohledu na věc a neřeknou nám mnoho o jejich struktuře nebo chemickém původu. Z chemického hlediska pro nás budou významnější následující možnosti dělení.

Jednou těchto možností je dělit alkaloidy podle toho od které aminokyseliny byly odvozeny, získáváme tak například tyto skupiny alkaloidů [7, 2]:

- odvozené od ornitinu
- odvozené od lysinu
- odvozené od kyseliny anthranilové
- odvozené od fenylalaninu
- odvozené od tyrosinu
- odvozené od tryptofanu
- odvozené od histidinu
- odvozené od kyseliny nikotinové
- odvozené od aspartátu

Další způsob dělení je podle toho, jaký heterocyklus obsahují ve své struktuře. Toto dělení můžeme samozřejmě použít pouze pro alkaloidy, které jsou heteroaromatické, těchto alkaloidů je ale naštěstí většina a ostatní řadíme do samostatné skupiny. Tímto dělením však získáváme mnoho skupin. Proto v následujících odstavcích budou zmíněny pouze některé tyto skupiny, a to pouze ve stručnosti s jedním nebo dvěma příklady jednodušších alkaloidů řadících se zde [1].

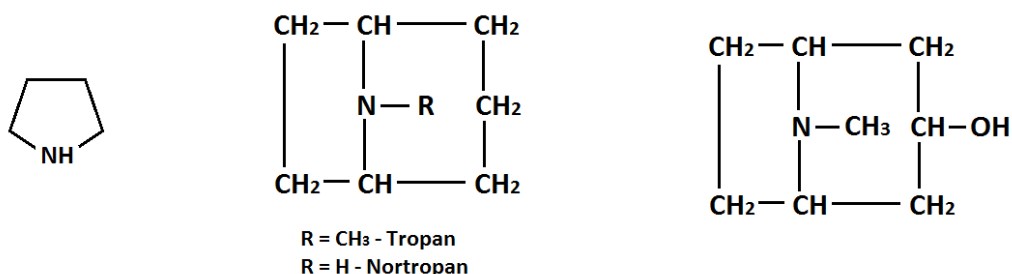
## **Alkaloidy s pyrrolovým jádrem**

Jednoduché pyrrolové deriváty se v rostlinách vyskytují jen méně často, a to i přes to, že pyrrolový systém je zcela běžný v komplikovanějších útvarech. Mezi jednoduché pyrrolové alkaloidy patří kupříkladu pyrrolidin (obrázek 3) nacházející se v mrkvi a také ve směsi s dalšími alkaloidy v tabáku. Dalším alkaloidem tohoto typu je N-methylpyrrolin, vedlejší alkaloid v tabáku a v rulíku [1].

## **Tropanové alkaloidy**

Jsou to estery organických kyselin s hydroxyderiváty tropanu, popřípadě nortropanu (obrázek 3). Tyto estery nazýváme hydraminy, přičemž jedním z nich je tropin (obrázek 3), nacházející

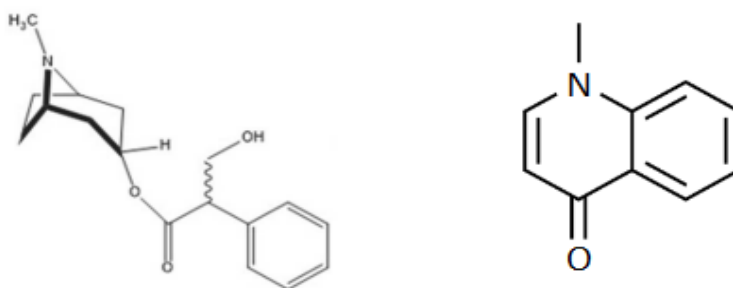
se v malých množstvích v rulíku a můžeme jej také získat hydrolyzou atropinu. Hydraminy mohou být dále esterifikovány organickými kyselinami za vzniku topeinů. Zde řadíme atropin (obrázek 4), alkaloid obsažený v rostlinách z čeledi lilkovitých, a to především v rulíku zlomocném, od jehož latinského názvu *Atropa belladonna* převzal i své jméno [1].



Obrázek 3: Pyrrolidin (vlevo), Tropan a Nortropan (uprostřed), Tropin (vpravo) [1]

## Alkaloidy s chinolinovým jádrem

Nejjednodušším chinolinovým alkaloidem je echinopsin (obrázek 4), který byl izolován ze semen rostlin rodu bělotrn. Z těchto semen ho můžeme extrahovat etanolem za přítomnosti kyseliny octové, kdy se následně po odpaření extraktu a alkalizaci vytřepe do chloroformu odkud se zahuštěním získá krystalický [1].



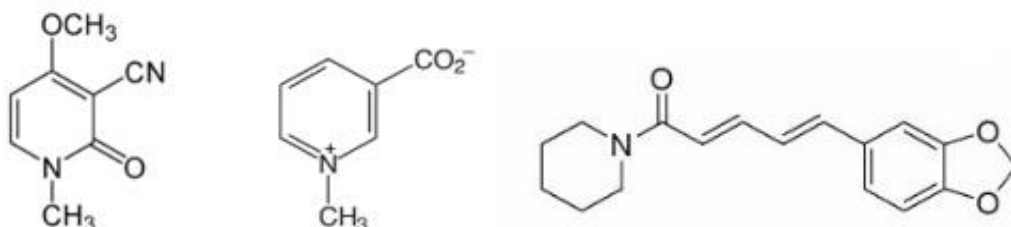
Obrázek 4: Atropin (vlevo) [3], Echinopsin (uprostřed) [11]

## Alkaloidy s pyridinovým jádrem

Do této skupiny se řadí nikotin (obrázek 7) a také některé další alkaloidy nacházející se společně s ním v tabáku. Dále sem pak patří alkaloidy odvozené od kyseliny nikotinové jako je například trigonellin (obrázek 5), který obsahují mnohé nám dobře známé rostliny, jako je kupříkladu hrách setý, kopřiva dvoudomá, chmel obecný či brambor a mnohé další. Do této skupiny se také řadí arekolin alkaloid palmy arekové (viz dále) nebo i ricinin (obrázek 5) obsažený spolu s lépe známějším bílkovinným toxinem ricinem v semenech skočce obecného [1].

## Piperidinové alkaloidy

Mezi jednoduché piperidinové alkaloidy patří především piperin (obrázek 5), který je obsažen v černém pepři neboli nedozrálých plodech pepřovníku černého. Obsah piperinu v pepři může činit i více než 10%. Do této kategorie řadíme také již dříve zmiňovaný koniin (obrázek 2) [7].



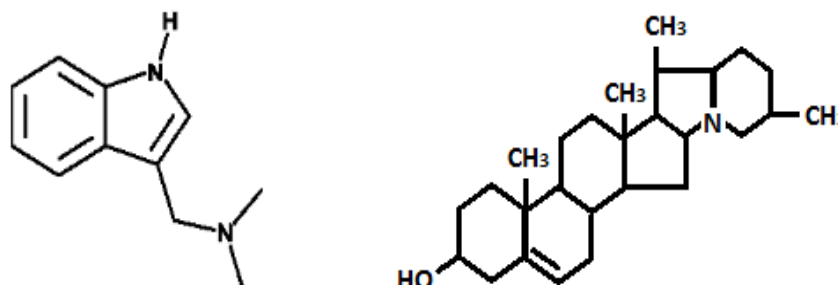
Obrázek 5: Ricinin (vlevo), Trigonellin (uprostřed), Piperin (vpravo) [7]

## Alkaloidy s indolovým jádrem

Indolové báze jsou v přírodě hojně rozšířeny, avšak často mají značně komplikovanou strukturu. Přesto i jednodušší indolové látky byly nalezeny v rostlinách, a to i třeba samotný indol v jasmínovém oleji, avšak indol sám o sobě není považován za alkaloid. Jedním z nejjednodušších indolových alkaloidů je tedy gramin (obrázek 6) získaný z ječmene [1].

## Steroidní alkaloidy

Oproti předcházejícím skupinám steroidní alkaloidy jsou již i ve svých nejjednodušších formách látky poměrně komplikované. Příkladem může být solanidin (obrázek 6), alkaloid nacházející se v klíčcích brambor, který ve své struktuře má již 27 uhlíků [1].



Obrázek 6: Gramin (vlevo) [12], Solanidin (vpravo) [1]

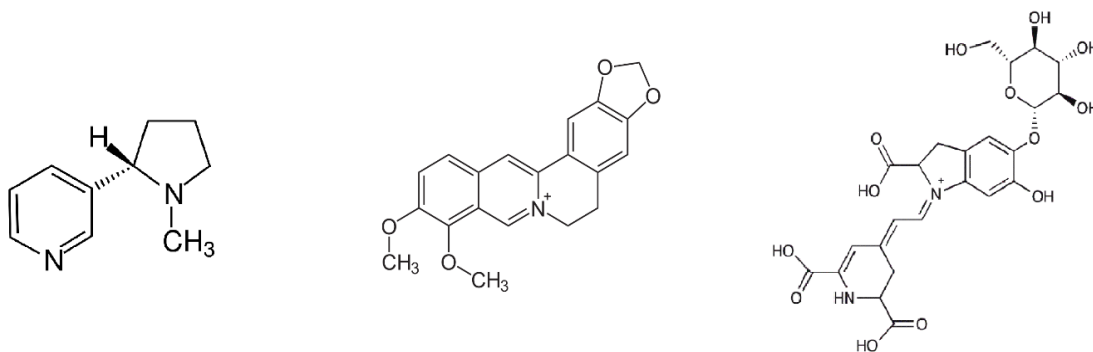


## Ostatní alkaloidy

Dalšími heterocykly, které ve své struktuře obsahují ostatní alkaloidy, jsou např. isochinolin, akridin, chinolizidin, imidazol a pyrrokolin. I když se nejedná o konečný výčet všech skupin, a to co zde bylo zmíněno je pouhé minimum, pro představu, jak dělení na základě heteroaromatického jádra obsaženého ve struktuře probíhá, tento krátký výčet stačí [1].

### 1.4. Fyzikální a chemické vlastnosti alkaloidů

Většina alkaloidů jsou pevné krystalické látky s definovatelnou teplotou tání nebo rozkladu. Některé mohou být ale i amorfními látkami a některé jako např. koniin (obrázek 2) a nikotin (obrázek 7) jsou kapalné [7].



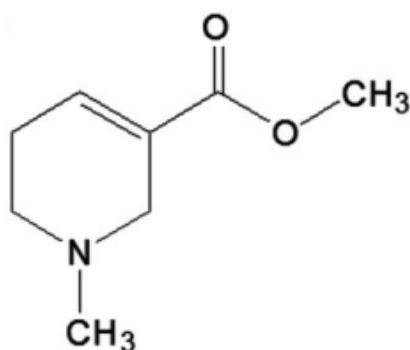
Obrázek 7: Nikotin (vlevo) [13], Berberin (uprostřed) [14], Betanin (vpravo) [15]

Jedná se především o bezbarvé látky, avšak složité alkaloidy s více aromatickými jádry mohou být výjimečně i barevné. Jako např. žlutý berberin, nebo červený betanin (obrázek 7). Alkaloidy jsou většinou rozpustné pouze v organických rozpouštědlech, avšak jejich soli jsou již vysoce rozpustné i ve vodě [7].

Chemické vlastnosti alkaloidů již zcela závisí na struktuře. Všeobecně můžeme říct pouze to, že se jedná o více či méně zásadité látky a jejich bazická povaha je činí velmi náchylnými k rozkladu. Ten může nastat působením tepla, anebo světla za přítomnosti kyslíku [7].

## 2. Arekolin

Arekolin  $C_8H_{13}O_2N$  (obrázek 8), plným systematickým názvem také metyl ester kyseliny 1-metyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-5-karboxylové. Je to alkaloid palmy arekové neboli areky obecné a nachází se především v jejich ořeších. Jedná se o alkaloid s pyridinovým jádrem, který je odvozen od kyseliny nikotinové [1, 16].



Obrázek 8: Arekolin [17]

Některé z jeho vlastností jsou shrnuty v následující tabulce (tabulka 1), stejně tak vlastnosti jeho hydrobromidu, jakožto jeho nejběžnější soli.

Tabulka 1: Vlastnosti arekolinu a jeho hydrobromidu [1, 16, 18, 19, 20, 21, 22]

Vlastnost	Arekolin	Hydrobromid
Skupenství	kapalné	pevné (krystalický)
Barva	bezbarvá	bílá až nažloutlá
Molekulová hmotnost	155,19	236,11
Bod varu	209 °C	-----
Bod tání	<25 °C	179 °C
Rozpustnost	rozpustný ve vodě a v organických rozpouštědlech	rozpustný ve vodě a v organických rozpouštědlech
pKa	7,64	8,23

## 2.1. Areka obecná

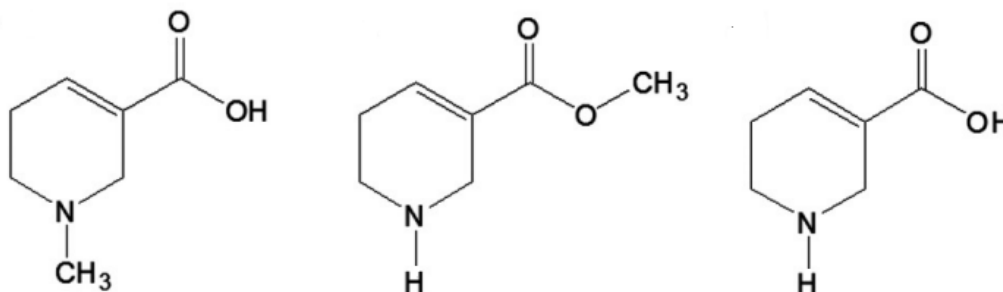
Areka obecná (obrázek 9), latinsky *Areca catechu*, je palma známá i pod názvy „Pisangová palma“ nebo také „Indická akácie“. Je to stálezelená palma, dorůstající se do výšky až 10-30 metrů, avšak může být také mnohem nižší. Roste v tropickém podnebí a je velmi citlivá na mraz. Přirozeně se vyskytuje především v jižní Asii, a to konkrétně v Indii a na Srí Lance a také v Malaisii [23].



Obrázek 9: Areka obecná: celá rostlina (vlevo) [23], rostlina s plody (uprostřed) [23], ořechy (vpravo) [24]

Palma má zelený až zelenobílý tenký kmen, který se po celé své délce nerozvětňuje. Na vrcholu kmene vyrůstají velké zpeřené tmavozelené listy, vytvářející chochol. Pod tímto chocholem se nacházejí smetanově bílé až nazelenalé květy příjemné vůně, rostoucí v rozvětvených květních palicích. Tyto květy dozrávají v oranžové až červené plody. Plodem této palmy je tedy arekový ořech, který však spíše nalezneme pod názvem betelový ořech [23].

### Alkaloidy areky obecné



Obrázek 10: Alkaloidy areky obecné [17] – Arekaidin (vlevo), Guvakolin (uprostřed), Guvacin (vpravo)

Do padesátých let minulého století bylo postupně zjištěno že areková palma obsahuje více než šest různých alkaloidů. Čtyřmi hlavními jsou arekolin, arekaidin, guvakolin a guvacin (obrázek 10). Přičemž arekaidin a guvacin vznikají hydrolýzou z arekolinu a guvakolinu. Zjistilo se, že

z těchto alkaloidů jsou v ořeších palmy nejvíce obsaženy arekolin a arekaidin, obsah těchto alkaloidů v čerstvých semenech (ořeších) je tedy následující [17]:

- Arekolin – 0,30-0,63%
- Arekaidin – 0,31-0,66%
- Guvakolin – 0,03-0,06%
- Guvacin – přes 0,19%

## 2.2. Žvýkání betelového sousta

V jižní Asii, Číně a v některých afrických zemích je zvykem užívání arekolinu ve formě žvýkání tzv. „Betelového sousta“ (obrázek 11). Jedná se o ještě zcela nedozrálé rozdrcené ořechy areky obecné zabalené v listech pepřovníku betelového potřeného vápnem. Někdy se mohou přidat listy tabáku, hřebíček nebo další aromatické koření. Betelové sousto tedy obsahuje všechny alkaloidy palmy arekové, ale hlavní aktivní složkou je zde především arekolin. Užívání betelu může mít několik pozitivních účinků na lidský organismus, avšak jedná se o návykovou látku. Pravidelné uživatele této drogy můžeme poznat podle zčernalých zubů a dásní [17, 25].



Obrázek 11: Betelové sousto [26, 27]

## 2.3. Účinky arekolinu

Výzkumy arekolinu ukázaly, že má mnohé pozitivní i negativní účinky na lidský organismus. To zahrnuje vliv na nervovou, kardiovaskulární, endokrinní a zažívací soustavu a také účinky na další tělesné pochody [17].

## **Účinky na nervovou soustavu**

Arekolin a ostatní alkaloidy areky obecně se váží na GABA receptory v mozku což přispívá k jejich psychoaktivním účinkům. GABA receptory mají podobnou strukturu jako receptory acetylcholinové. Jedná se o chloridové kanály nacházející se v mnoha tělesných tkáních. Arekolin však nepůsobí jako jednoduchý aktivační ligand GABA receptorů, ale naopak je jeho blokátorem, což znamená, že arekolin má opačný účinek látek, které zvyšují aktivitu GABA receptorů, jako je např. diazepam (valium). Kdy diazepam má tlumící účinky na centrální nervovou soustavu a arekolin naopak působí jako stimulant. Teoreticky bychom tohoto faktu mohli využít v případech předávkování valiem, kdy by arekolin mohl fungovat jako protilátka, avšak tato skutečnost nebyla zatím prokázána [28].

V lidovém léčitelství je žvýkání arekových ořechů užíváno i k posílení paměti. Navíc bylo klinicky prokázáno, že arekolin může zlepšovat kognitivní funkce a paměť u pacientů trpících Alzheimerovou chorobou [17].

Užívání arekolinu může také výrazně snížit závažnost symptomů schizofrenie, a tudíž by se mohl využívat při její léčbě, stejně tak má i pozitivní účinky při léčbě depresí [17, 28].

## **Účinky na kardiovaskulární systém**

Okamžité účinky žvýkání betelu (požití arekolinu a ostatních alkaloidů) zahrnují zvýšení tepové frekvence, nadměrné pocení, zčervenání obličeje a pocit tepla na kůži. Bylo prokázáno, že po požití arekových ořechů dochází ke zvýšení teploty kůže na tváři až o 2 °C. I přes zvýšení tepu dochází ke zvýšení krevního tlaku pouze v začátcích užívání arekolinu [28].

Další účinky na kardiovaskulární systém zahrnují stažení cév, což v přítomnosti zúžení cévy může zvýšit riziko akutní srdeční příhody. Zatím však nebylo zaznamenáno mnoho případu kdy by k něčemu takovému došlo [28].

Arekolin také vykazuje anti-aterogenní účinky, což znamená že působí proti ateroskleróze, chronickému onemocnění cévní stěny. Bylo také prokázáno že arekolin může potlačovat uvolňování prozánětlivých cytokinů [17].

## **Anti-parazitické účinky**

Arekolin je látka aktivně působící proti tasemnicím, mechanismus tohoto účinku souvisí s jeho paralytickým efektem. Také je in vitro vysoce účinný proti larvám některých druhů tasemnic. Výzkumy odhalily, že arekolin má také synergický účinek proti onkomelanii (malý tropický sladkovodní šnek) a to v kombinaci s pentachlorfenolem sodným a dalšími látkami. Je účinný také proti motolici jaterní [17].

## **Účinky na trávicí soustavu**

Uživatelé betelového sousta říkají, že má uklidňující účinky na zažívání. Avšak mezi lidmi, kteří takto užívají arekolin se zvyšuje pravděpodobnost vzniku peptických vředů. Arekolin také přispívá ke zvýšení sekrece slin, což zapříčiňuje jejich naředění, a tudíž snížení obsahu amylázy a  $K^+$  iontů. Pravidelná konzumace arekových ořechů vede k abnormální činnosti jater. Bylo zjištěno, že u hlodavců dochází ke zvýšení množství aminotransferáz, což naznačuje, že může vzniknout hepatocelulární poškození. Zatím však není dokázáno, jestli takovéto poškození přispívá ke vzniku cirhózy jater, avšak toto onemocnění je neobvykle běžným problémem u lidí užívajících arekolin [28].

## **Účinky na endokrinní soustavu**

Arekolin má také vliv na vznik hormonů. Bylo zjištěno, že tento alkaloid stimuluje aktivitu hypotalamu, hypofýzy a nadledvin. To je hlavně zapříčiněno vyloučením hormonu uvolňujícího kortikotropin a blokadí přítoku vápníku do buněk dřeně nadledvin. Je také možné, že arekolin podněcuje produkci testosteronu u mužů [17].

## **Ostatní účinky**

Arekolin také zhoršuje astma. Astmatictí pacienti hlásili přitížení příznaků astmatu po užití arekových ořechů a více než polovina těch, kteří skončili s užíváním betelu tak učinilo pro negativní efekt na jejich astma. Tato pozorování byla později dokázána i výzkumem, kdy se zjistilo, že arekolin způsobuje výrazné zúžení průdušek u astmatiků a v menší míře i u lidí kteří astmatem netrpí [28].

Konzumace arekolinu, ale také možná i listů pepřovníku betelového (oba v betelovém soustě), způsobuje krátkodobou hypoglykémii. Neobjevují se však žádné zprávy o klinických problémech vycházejících z tohoto efektu [28].

## **2.4. Toxicita arekolinu**

Arekolin je toxická látka, jejíž LD50 činí při orálním podání 2500 mg/kg u krys a 550 mg/kg u myši. Ukázalo se, že arekolin může působit hepatotoxicky a testikulárně toxicky. Avšak nedávné studie naznačují, že nejzávažnějšími problémy užívání arekolinu jsou mnohá onemocnění ústní dutiny [17, 16].

Co se týká karcinogenity arekolinu. Tak podle IARC (International Agency for Research on Cancer) se čistý arekolin řadí do skupiny 2B – potenciálně karcinogenní pro člověka (possibly carcinogenic to humans), a to hlavně pro nepřítomnost studií, které by se tímto problémem zabývaly. Ale betelové sousto a stejně tak i samotné ořechy areky obecné se již dle IARC řadí do skupiny 1 – karcinogenní pro člověka (carcinogenic to humans). Kdy existují jasné důkazy o tom, že zapříčiňuje rakovinu ústní dutiny, jícnu a hltanu, a také může podporovat vznik rakoviny jater [29-31].

Arekové ořechy mají i další škodlivé účinky na lidské zdraví, kupříkladu nebezpečí vzniku kardiovaskulárních onemocnění a cerebrovaskulární poruchy, a také zvýšenou pravděpodobnost vzniku cukrovky [31].

Bylo potvrzeno, že arekolin má genotoxický a cytotoxický efekt na mnohé buňky savců. Je také neurotoxický, a to kvůli vzniku oxidačního stresu vyvolaného zvýšeným generováním reaktivních forem kyslíku a snížením hladiny antioxidantů v těle [32].

## **2.5. Použití arekolinu**

Nejrozšířenějším použitím arekolinu je jeho konzumace při žvýkání betelového sousta. Jak již bylo řečeno, tato droga je hlavně užívána v Asii, ale postupně se rozšiřuje i do dalších zemí. Jedná se pravděpodobně o čtvrtou nejrozšířenější návykovou látku, kterou v užitém množství předčí jen tabák (nikotin), alkohol a kofein. Udává se, že celosvětově betelové sousto užívá až 600 milionů lidí. Efekt této drogy je popisován jako příjemný a obecně stimuluje, navozující pohodu, euforii a pocit tepla v celém těle. Také zvyšuje bdělost a schopnost pracovat [31, 32].

Arekolin se tedy hlavně využívá pro své psychoaktivní účinky, ale také velmi dobře působí proti parazitům, jako je například tasemnice. Betelové sousto je také známo pro svůj pozitivní efekt na zažívání. V malých množstvích by tedy arekolin mohl mít mnohé pozitivní účinky na lidský organismus, ale nesmíme zapomínat, že se jedná o toxickou látku, která způsobuje mnohá onemocnění [17].

Dle některých studií by arekolin díky svým cytotoxickým účinkům mohl působit proti některým typům rakoviny. Ukázalo se, že arekolin má potenciál sloužit jako doplněk k chemoterapeutickým činidlům užívaných k léčbě rakoviny děložního čípku [33].

## 2.6. Extrakce arekolinu z ořechů palmy arekové

Nejjednodušší metodou extrakce arekolinu je jeho vyextrahování do vody v ultrazvukové lázni (obrázek 12). Kdy se jemně nadrženy ořech smísí s malým množstvím deionizované vody ve známém poměru a nechá se na něj působit ultrazvuk po dobu deseti či více minut. Směs se dále vhodným způsobem přefiltruje a filtrát je připraven k použití [34].



Obrázek 12: Možnosti extrakce: ultrazvuková lázeň (vlevo) [35], Soxhletův extraktor (vpravo) [36]

Další metoda, při které se využívá ultrazvuk je již komplikovanější, avšak díky čistícím krokům oddělíme některé vedlejší látky, které by mohly narušovat stanovení. Nadrženy ořechy se navlhčí amoniakem a smísí s chloroformem, tato směs se nechá několik hodin v ultrazvukové lázni a poté se přefiltruje. K filtrátu se přidá kyselina sírová, do které se z chloroformu vytřepává arekolin. Kyselá vrstva se poté oddělí a pročistí se protřepáním s petroléterem. Ke kyselině s extrahovaným arekolinem se poté přidá několik kapek amoniaku a arekolin se



extrahuje do chloroformu. Chloroformový extrakt se zbaví zbytků vody, přefiltruje a nechá zcela vyschnout. Takto nám zůstane pouze čistý arekolin [37].

Mimo účinků ultrazvuku můžeme využít také Soxhletovu extrakci (obrázek 12), kdy se postupuje obdobně jako v předchozím odstavci, jen místo chloroformu používáme jeho příbuzný dichlormetan. Extrakce pak probíhá v Soxhletově extraktoru při teplotě pod 50°C po dobu až 6 hodin [38].

K získání arekolinu z arekových ořechů můžeme využít i extrakci superkritickou tekutinou, a to konkrétně nadkritickým oxidem uhličitým, kdy největší extrahované množství získáváme při teplotě 50°C a tlaku 10,3MPa [39].

### 3. Elektrochemické stanovení arekolinu

Jednou z elektrochemických metod pro stanovení arekolinu je potenciometrie. Membrána použité elektrody je pak vytvořena z PVC a komplexu iontových párů vzniklých smísením arekolinu a látky s vhodným proti iontem, kupříkladu tetraboritan sodný (NaTPB), kyselina fosfomolybdenová (PMA) nebo kyselina fosfowolframová (PTA). Vnitřní roztok elektrody pak tvoří roztoky arekolinu a KCl o stejné koncentraci. Tato metoda je poměrně robustní a přesná, ale měření by mělo probíhat při pH od 3 do 6, optimálně při hodnotě 5,4 dosažené použitím takzvaného Tris pufru (roztoku trisaminometanu). Kalibrační křivka pro použití takovéto metody při stanovení arekolinu je lineární v rozsahu koncentrací: pro elektrodu vytvořenou z NaTPB  $c = 10 - 0,04 \text{ mmol/l}$  a pro elektrody z PMA a PTA  $c = 10 - 0,005 \text{ mmol/l}$ . Arekolin byl touto metodou stanovován ve slinách uživatelů betelového sousta [40].

Arekolin je možné stanovit taktéž fotoelektrochemicky, za použití senzorů tvořených nanovrstvami grafitického nitridu uhlíku, které jsou aktivovány novým typem uhlíkového materiálu, v angličtině nazývaného carbon nanohorns, jedná se v podstatě o nanovrstvy grafitu svinuté do tvaru, který připomíná roh či osten. Toto měření pak probíhá v prostředí fosfátového pufru o pH 9. Můžeme stanovit arekolin vyextrahovaný z ořechu areky obecné [41].

Co se týče voltametrického stanovení arekolinu, v dostupné literatuře nebyl nalezen žádný důkaz toho, že by se touto problematikou již někdo v minulosti zabýval. Arekolin je však alkaloid strukturně velmi podobný nikotinu, jehož voltametrické stanovení je již rutinní záležitostí. Pro tuto podobnost bylo předpokládáno, že je možné i arekolin stanovit voltametricky, a také to, že jeho chování při stanovení by mohlo být podobné nikotinu. Nikotin je voltametricky stanovován mnoha technikami za použití nejrůznějších elektrod. Pro stanovení arekolinu pak byla v experimentální části této práce zkoumána možnost použití elektrod na bázi uhlíku, a to především uhlíkových pastových elektrod a elektrod ze skelného uhlíku.

## 4. Další metody stanovení arekolinu

V historii byly pro identifikaci arekolinu používané nejrůznější barevné reakce. Pro kvantifikaci pak například papírová chromatografie, titrační metody nebo i kolorimetrie. V dnešní době se pro stanovení arekolinu využívá především chromatografických metod [29].

### 4.1. Chromatografie

Arekolín se chromatograficky stanovuje především pomocí kapalinové chromatografie, avšak existují i metody stanovení plynovou chromatografií. Mimo to může být také použita metoda vysokotlaké papírové chromatografie [37].

#### Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC se pro stanovení arekolinu používá již více než třicet let, před deseti lety byla vyvinuta nová rychlá HPLC technika, která brala ohled na vývoj na poli chromatografie. Analytické podmínky pro stanovení arekolinu pomocí HPLC s obrácenými fázemi a UV detekcí jsou tedy následující [38]:

- Kolona – 250 x 4,6 mm (vnitřní průměr)
- Částice – 5 µm typu Inertsil ODS-3
- Mobilní fáze – směs acetonitrilu a fosfátového pufru (pH5,9) v poměru 88:12% (V/V)
- Teplota kolony – 25°C
- Tok mobilní fáze – 1ml/min
- Detekce – 254nm

Retenční čas arekolinu při těchto podmínkách byl 5 minut [38].

V průběhu let byly také vyvinuty další techniky HPLC pro stanovení arekolinu, kdy se především měnil způsob detekce. Bylo hlavně zkoumáno spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, a to především tandemovou hmotnostní spektrometrií. Byla vyvinuta robustní a přesná metoda LC-MS/MS [42].

## **Plynová chromatografie**

I přes to, že plynová chromatografie není při stanovení arekolinu tak rozšířená, jako chromatografie kapalinová, můžeme použít i tuto metodu stanovení. V minulosti byla využita ke stanovení arekolinu v krevní plazmě. Zde se využívá ve spojení GC/MS, a to konkrétně kapilární plynová chromatografie s programovanou teplotou ve spojení s amoniakální chemicky ionizační hmotnostní spektrometrií. Tato technika má dostatečnou citlivost, přesnost a selektivitu pro stanovení arekolinu v lidské krevní plazmě [43].

### **4.2. Kapilární elektroforéza**

Ke stanovení arekolinu může být také využita kapilární elektroforéza s elektrochemickou luminiscenční detekcí (CE-ECL) s přidavkem vhodné iontové kapaliny (IL). Kdy jako IL je použit BMIM-BF<sub>4</sub> a podmínky pro analýzu jsou: Separáční napětí 16kV; pH7,5; přidavky dalších látek a ECL detekce při 1,2V. Takováto analýza trvá přibližně 7-8 minut [44].

### **4.3. Ostatní metody**

Mezi další metody stanovení arekolinu patří také blízká infračervená spektroskopie (NIR) pro rychlou analýzu při kontrole procesu sušení arekových ořechů. Spolu s vývojem moderních technik, jako jsou například magnetická rezonance nebo zobrazovací hmotnostní spektrometrie (MSI), došlo také k výzkumu jejich uplatnění při stanovení arekolinu, kdy bylo zjištěno, že je lze v některých případech použít [29, 45].

## 5. Elektrody na bázi uhlíku

Elektrod vytvořených z uhlíkových materiálů je nepřehledné množství a neustále probíhají výzkumy zabývající se vývinem nových uhlíkatých materiálů pro přípravu těchto elektrod. Zde budou jen lehce probrány elektrody, které byly využity v experimentální části této práce.

### 5.1. Uhlíkové pastové elektrody

Uhlíkové pastové elektrody (CPE – Carbon paste electrodes) jsou elektrody které byly objeveny před více než šedesáti lety (obrázek 13). Oblíbenost těchto elektrod v následujících letech rostla, a to díky jejich využitelnosti při mnohých elektrochemických stanoveních, především pak ve voltametii. Uhlíková pastová elektroda vzniká smíšením uhlíkového prášku s vhodným pojivem [46, 47].

#### Uhlíkový prášek

Vhodným uhlíkatý materiál, který tvoří tento prášek by měl splňovat následující kritéria: velikost částic v řádech mikrometrů, jednotná distribuce částic, vysoká čistota a nízká schopnost adsorpce [47].

Nejčastěji využívaným uhlíkovým práškem při výrobě elektrod je spektroskopický grafit s částicemi o velikosti několika mikrometrů (typicky 5-20 $\mu$ m). Některé další materiály, se kterými se můžeme setkat při přípravě těchto elektrod jsou saze, dřevné uhlí, prášek ze skelného uhlíku, drcený diamant a další. Vyskytují se i elektrody vytvořené z nových uhlíkových materiálů, jako je fulleren C-60, uhlíková nanovlákna, nebo také uhlíkové nanotrubičky [47,48].

#### Pojivo

Hlavní funkcí pojiva, kterým bývá organická kapalná sloučenina, je, jak již naznačuje název, propojit jednotlivé částice uhlíkového prášku, avšak pojivo se také podílí na vlastnostech elektrod. Hlavními požadavky na pojivo tedy jsou, aby bylo: chemicky inertní a nebylo elektroaktivní, vysoce viskózní a netěkavé, minimálně rozpustné ve vodě a nemísitelné s organickými rozpouštědly [47].

Nejpoužívanějšími pojivy jsou minerální (parafinové) oleje. Dále se také používají silikonové oleje a také estery organofosfátů a nově i iontové kapaliny [47,48].



Obrázek 13: Materiály a vybavení potřebné k přípravě uhlíkových patových elektrod [49]

## 5.2. Elektrody ze skelného uhlíku

Skelný uhlík byl poprvé připraven před šedesáti lety a tato forma uhlíku vykazuje značně odlišné chování od ostatních forem. Při jeho výrobě lze vytvořit tělesa o různých tvarech a jeho výhodou je také to, že u skelného uhlíku dochází k pomalejší oxidaci při zvýšených teplotách než u dalších forem uhlíku. To znamená, že skelný uhlík má mnohem vyšší odolnost k chemickému napadení. Toto dělá ze skelného uhlíku vysoce žádoucí materiál pro přípravu chemicky odolných elektrod. Skelný uhlík se vyrábí řízeným zahříváním předmodelované polymerní pryskyřice v inertní atmosféře [50].

## 5.3. Elektrody z borem dopovaného diamantu

Čistý diamant má tak nízkou elektrickou vodivost, že je pro přípravu elektrod zcela nevhodným materiálem. Avšak zavedením nečistoty, jako je například bor či dusík, do jeho struktury můžeme zvýšit jeho vodivost natolik, abychom z něj mohli vyrobit elektrodu. Nejběžněji se tedy využívá mikrokrytalický diamant dopovaný borem. Jedna z výhod takovýchto elektrod je vysoká chemická stabilita a možnost měření v širokém elektrochemickém potenciálovém okně [51].

## **6. Experimentální část**

### **6.1. Chemikálie a laboratorní pomůcky**

#### **Chemikálie**

Veškeré použité chemikálie byly čistoty p.a. a k přípravě roztoků byla použita deionizovaná voda.

Hydroxid sodný – J. T. Baker

Kyselina sírová 95-97% – J. T. Baker

Kyselina chlorovodíková 35% – Lach-Ner

Chlorid draselný – Lachema-Chemapol

Kyselina boritá prášková – Lachema-Chemapol

Kyselina octová 99% – Lach-Ner

Kyselina fosforečná 85% – Penta

Arekolin hydrobromid – ChemCruz

#### **Laboratorní pomůcky**

Na následujícím seznamu je vypsáno základní laboratorní vybavení použité při tomto experimentu, použité přístroje a elektrody jsou popsány dále.

Odměrné baňky 100ml, 10ml, 25ml, 500ml

Měrná nádobka

Stojan s držákem pro měrnou nádobku a elektrody

Navážovací lodička

Kopist

Dělená pipeta 2ml

Automatické pipety – 1-10ml, 100-1000 $\mu$ l a 2-20 $\mu$ l

Zásobní lahve na roztoky

Kádinky různých objemů

## **6.2. Příprava roztoků**

### **Roztok standardu**

Nejprve byl připraven roztok standardu arekolinu hydrobromidu. Tento standardní roztok byl připraven o koncentraci 0,01mol/l a to odvážením 0,02361g arekolinu hydrobromidu do 10ml odměrné baňky. Baňka byla následně doplněna deionizovanou vodou a takto vzniklý roztok byl důkladně promíchán. Tento roztok byl nadále používán pro všechna měření.

### **Roztoky základních elektrolytů**

#### Roztoky HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a KCl

Byly také připraveny roztoky základních elektrolytu a to nejprve 0,1M roztoky HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a KCl. Bylo připraveno 100ml každého z těchto roztoků. Do tří 100ml odměrných baněk bylo tedy odměřeno příslušné množství chemikálií, a to pro roztok chloridu draselného 0,7456g čistého KCl, pro roztok kyseliny chlorovodíkové 0,88ml 35%ní HCl a pro roztok kyseliny sírové 0,54ml 96%ní H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Všechny odměrné baňky byly doplněny po rysku deionizovanou vodou a roztoky byly důkladně promíchány.

#### Roztoky Britton-Robinsonova pufru

Dále byly také připraveny roztoky Britton-Robinsonova (B-R) pufru o různých hodnotách pH. B-R pufr se skládá se dvou složek (složka A a složka B), které jsou nadále smíseny v daných poměrech pro vznik roztoku o požadovaném pH.

Složkou A je 0,2M roztok hydroxidu sodného, tento roztok byl připraven odvážením 4,0g NaOH do 500ml odměrné baňky, která byla následně doplněna deionizovanou vodou a promíchána.

Složka B je směs 0,04M kyselin, a to konkrétně H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COOH a H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. Tento roztok byl vytvořen tak, že příslušná množství těchto kyselin byla odměřena do jedné 500ml odměrné baňky, která byla následně doplněna deionizovanou vodou. Odměřená množství byla: pro



kyselinu fosforečnou 1,23ml 85%ní  $H_3PO_4$ , pro kyselinu octovou 1,27ml 99%ní  $CH_3COOH$  a pro kyselinu boritou 1,2368g práškové  $H_3BO_3$ .

Obě složky pak byly smíchány v určených poměrech tak aby daly roztok pufru o požadovaném pH. Bylo připraveno jedenáct roztoků o pH 2-12, a to tak aby se pH zvýšilo vždy přibližně o jednotku. Odměřená množství jednotlivých složek a následné pH roztoků jsou shrnuta v následující tabulce 2.

*Tabulka 2: Poměry složek Britton-Robinsonova pufru a výsledné pH roztoků*

pH	Složka A – V [ml]	Složka B – V [ml]
2,05	0,0	20,0
3,18	3,0	17,0
4,20	4,0	16,0
4,97	5,0	15,0
6,12	6,0	14,0
6,98	6,8	13,2
8,09	7,5	12,5
9,15	8,2	11,8
9,91	8,7	11,3
10,85	9,1	10,9
11,63	10,0	10,0

### **Modelové vzorky**

Byly připraveny dva modelové vzorky o koncentracích 0,1 a 1 mmol/l. Modelový vzorek č.1 (koncentrace 0,1mmol/l) byl připraven odměřením 0,25ml standardního roztoku arekolinu o koncentraci 0,01mol/l do 25ml odměrné baňky, baňka pak byla doplněna deionizovanou vodou a důkladně promíchána. Modelový vzorek č.2 (koncentrace 1mmol/l) byl připraven odměřením 1ml standardního roztoku arekolinu o koncentraci 0,01mol/l do 10ml odměrné baňky, která byla doplněna po rysku deionizovanou vodou.

## Reálný vzorek

Nakonec byl také připraven reálný vzorek, který byl získán extrakcí arekolinu z ořechu palmy arekové, zakoupeného od firmy Herbal-store s.r.o. Jablonec nad Nisou. Tento ořech byl tedy nastrouhán na jemném strouhátku a bylo odváženo 0,5238g této drti. Toto množství bylo následně smícháno v čisté kádince s 10ml deionizované vody a takto vzniklá směs byla dána do ultrazvukové lázně na 10 minut. Těchto 10 minut však bylo rozděleno do tří 3 – 4 minutových intervalů, a to proto aby se směs nepřehřívala. Směs se dále nechala chvíli odstát, aby se pevné částice usadily u dna a roztok byl přefiltrován přes filtr o velikosti pórů 1 $\mu$ m. Filtrát byl nadále používán bez dalších úprav pro měření.

### 6.3. Použité elektrody

Pro voltametrická měření provedená při tomto experimentu byly využity různé pracovní elektrody, které jsou vypsány níže, byl tedy použit tříelektrodivý systém (obrázek 14) sestávající se z těchto elektrod:

Referenční elektroda: Argento-chloridová elektroda Ag/AgCl 3MKCl

Pomocná elektroda: Pt-plíšek

Pracovní elektrody:

- Uhlíková pastová elektroda – CPE (Carbon paste electrode)
- Elektroda ze skelného uhlíku – GCE (Glassy carbon electrode)
- Elektroda z borem dopovaného diamantu – BDDE (Boron doped diamond electrode)
- Platinová elektroda – PtE

### Příprava uhlíkové pastové elektrody

Uhlíkovou pastovou elektrodu bylo nutné před samotným měřením nejdříve připravit, neboť příprava tohoto typu elektrod probíhá laboratorně. Pro přípravu elektrody byl použit uhlíkový prášek „CR 5“ o velikosti částic okolo 5  $\mu$ m a jako pojivo parafinový olej. Tyto dva komponenty byly smíseny v poměru 80:20%, a to tak, že bylo odváženo 0,4g uhlíkového prášku a 0,1g parafinového oleje. Toto bylo vloženo do třecí misky a směs byla pomocí tloučku a špachtle důkladně homogenizována. Vzniklá pasta byla poté natlačena do těla elektrody s průměrem pracovního povrchu 2,5mm.

## 6.4. Přístroje a zařízení

Na tomto místě jsou zařazeny přístroje použité v průběhu měření.

Elektrochemický analyzátor PGSTAT128N (Metrohm-Autolab, Nizozemí) (obrázek 14)

Magnetická míchačka s nastavitelnou rychlostí otáček IKA lab disc white (IKA Works GmbH & Co, Německo)

Přenosný pH metr Orion Star A221 (Thermo Fisher Scientific, USA) s pH měrnou elektrodou

Analytické váhy BP 211D (Sartorius AG, Německo)



Obrázek 14: - Elektrochemický analyzátor PGSTAT128N (vlevo), Měrná cela s tříelektrodovým zapojením, laboratorním stojanem a magnetickou míchačkou (vpravo) [49]

## 6.5. Použité metody a postupy

### **Square-wave voltametrie (SWV), diferenčně pulzní voltametrie (DPV) a lineární voltametrie (LSV)**

Pro většinu měření byla použita metoda square-wave voltametrie, toto měření pak zahrnovalo kondičionální krok za míchání a stabilního kondičionálního potenciálu, dobu klidu a následný sken v anodické oblasti. Pokud není uvedeno jinak experimenty probíhaly v prostředí základního elektrolytu, jehož složení je specifikováno dále. Optimální přístrojové podmínky byly následující:

- počáteční potenciál 0 V
- konečný potenciál 1,2 V
- potenciál kondicionace -0,2V vs. ref.Ag/AgCl
- doba kondicionace 10 s
- doba klidu 10 s
- potenciálový krok 10 mV
- amplituda pulzu 20 mV
- Frekvence 25 Hz

Pro srovnání citlivosti metody square wave voltametrie byly použity metody diferenčně pulzní voltametrie a lineární voltametrie.

### **Cyklická voltametrie (CV)**

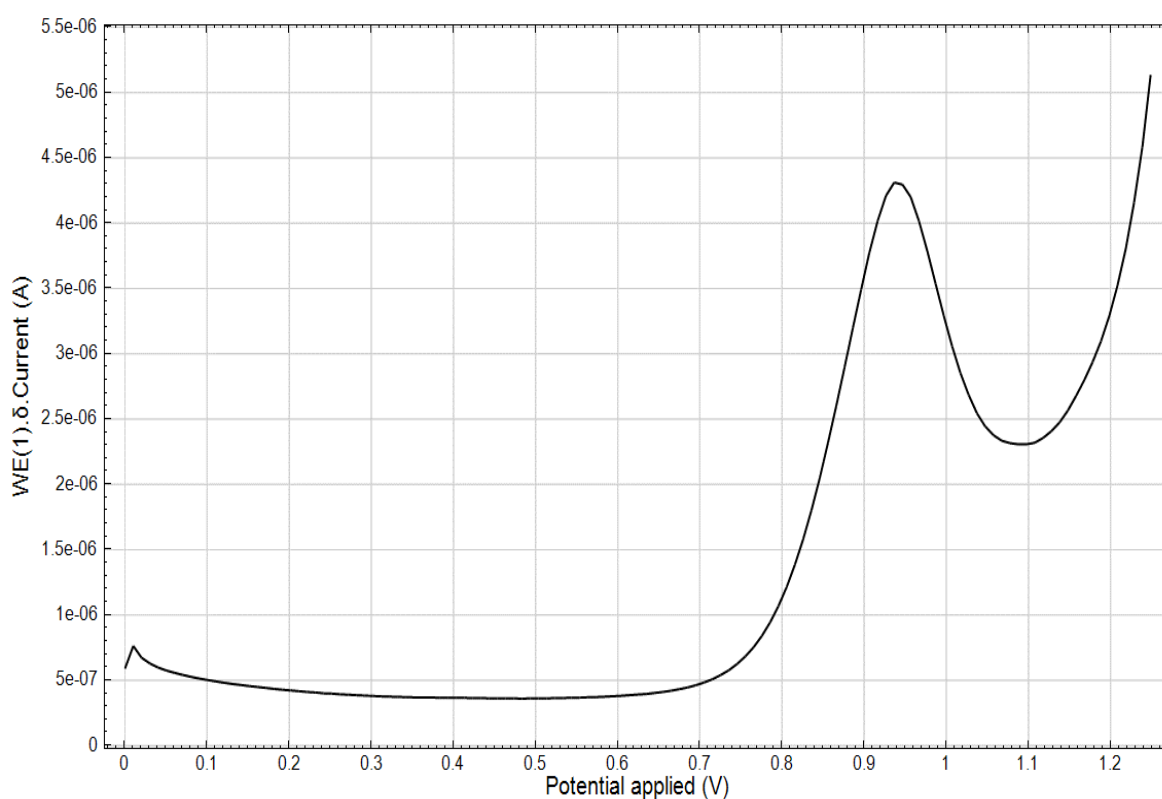
Metoda cyklické voltametrie byla použita pro charakterizaci arekolinu v roztoku. Parametry metody byly následující:

- počáteční potenciál 0 V
- nejvyšší potenciál 1,2 V
- doba klidu 5 s
- potenciálový krok 2,44 mV
- počet cyklů 10
- rychlost skenu 100 mV/s

## 6.6. Výsledky a diskuze

### Úvodní elektrochemické experimenty

Ze všeho nejdřív bylo nutné zjistit základní elektrochemické chování arekolinu. Bylo zjištěno, že při voltametrickém stanovení arekolinu dochází k jeho oxidaci při potenciálu 0,95V (obrázek 15). Tímto byla potvrzena domněnka vycházející z optimalizované metody pro stanovení nikotinu, který je strukturně podobný arekolinu.



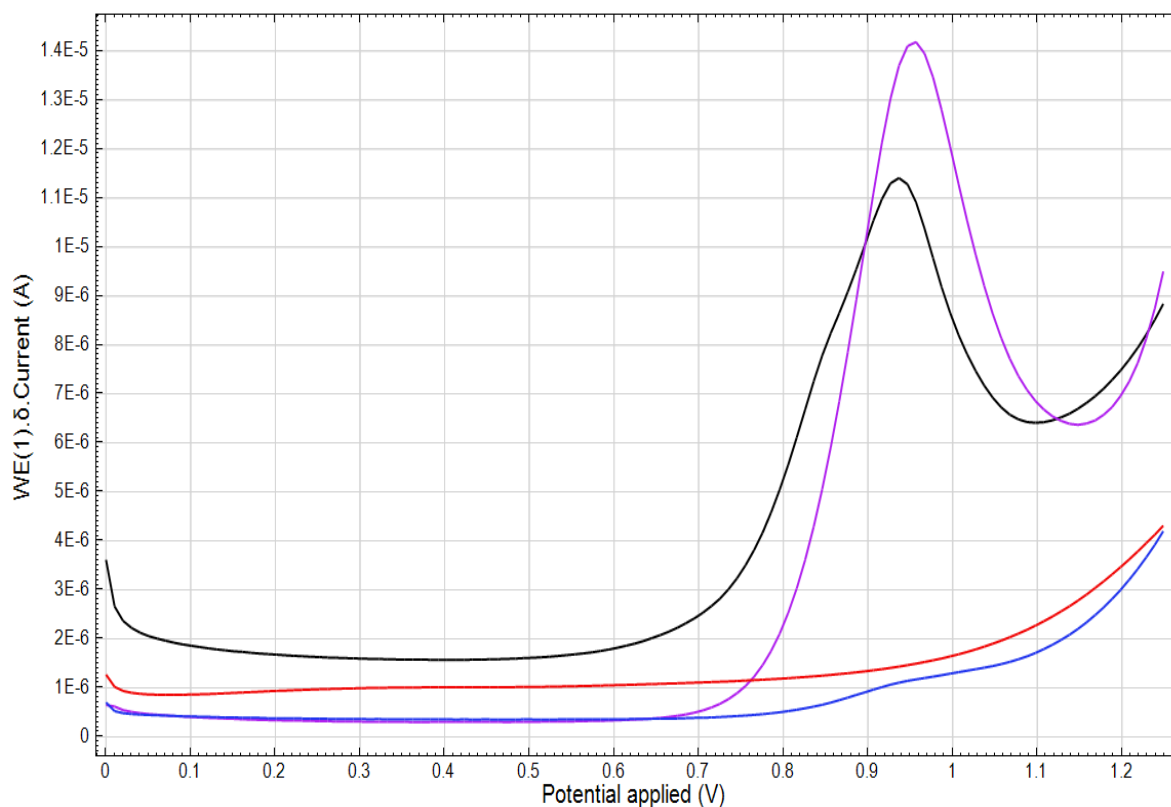
Obrázek 15: Záznam SWV pro standard arekolinu;  $c = 0,1 \text{ mmol/l}$ ; B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE

### Výběr základního elektrolytu

Dále bylo nutné vybrat základní elektrolyt. Arekolín byl proměřen v následujících roztocích 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1M HCl; 0,1M KCl a roztoky Britton-Robinsonova pufru o pH 4,2; 6,98 a 9,15.

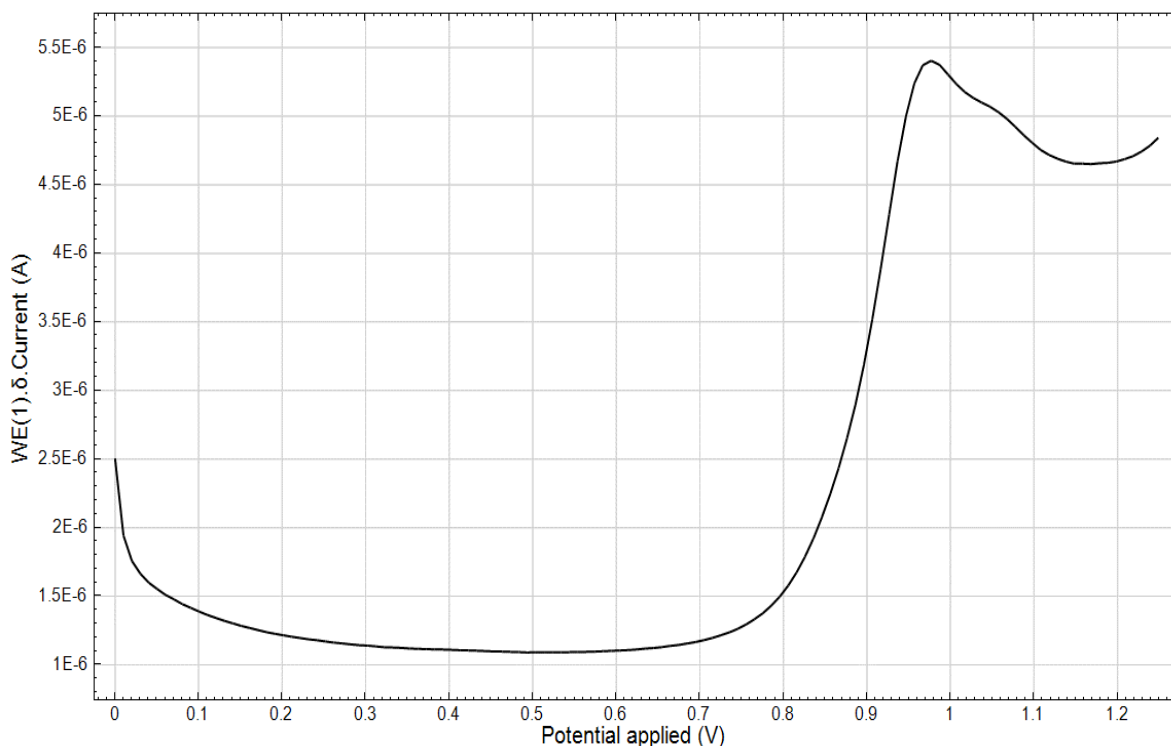
Tato měření byla provedena na následujících elektrodách: GCE, Pt a BDD. Z těchto elektrod byla jako nejvhodnější vybraná GCE, neboť ostatní neposkytovaly dostatečný signál.

Největší signál z těchto vybraných elektrolytů poskytoval B-R pufr o pH 9,15 (obrázek 16); avšak zde se jednalo jen o předběžná měření, proto optimální pH muselo být dále zjištěno. Avšak předtím, než se tak stalo, bylo měření arekolinu v B-R pufru o pH 9,15 provedeno i na CPE, kdy bylo zjištěno, že také poskytuje dostatečný signál, dokonce vyšší než GCE, proto byly následující měření provedeny jak na GCE, tak i na CPE.



Obrázek 16: Srovnání pracovních elektrod při pH 9,15;  $c = 0,5 \text{ mmol/l}$ ; Legenda: GCE – černá, Pt – červená, BDD – modrá, CPE – fialová

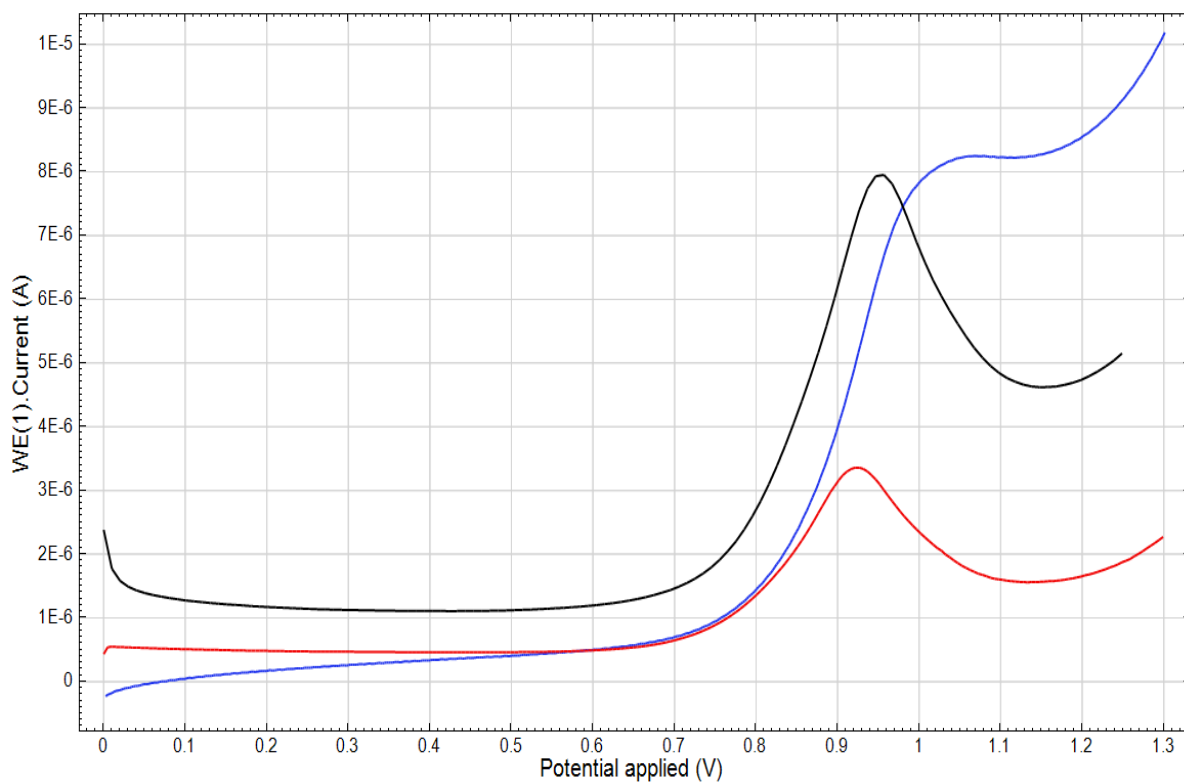
Na tomto místě je také vhodné poznamenat, že při pH 6,98 bylo při měření na GCE zaznamenáno dělení píku na dva, čehož si můžeme povšimnout na následujícím obrázku (obrázek 17). Při tomto pH byly tedy pozorovány dva oxidační procesy.



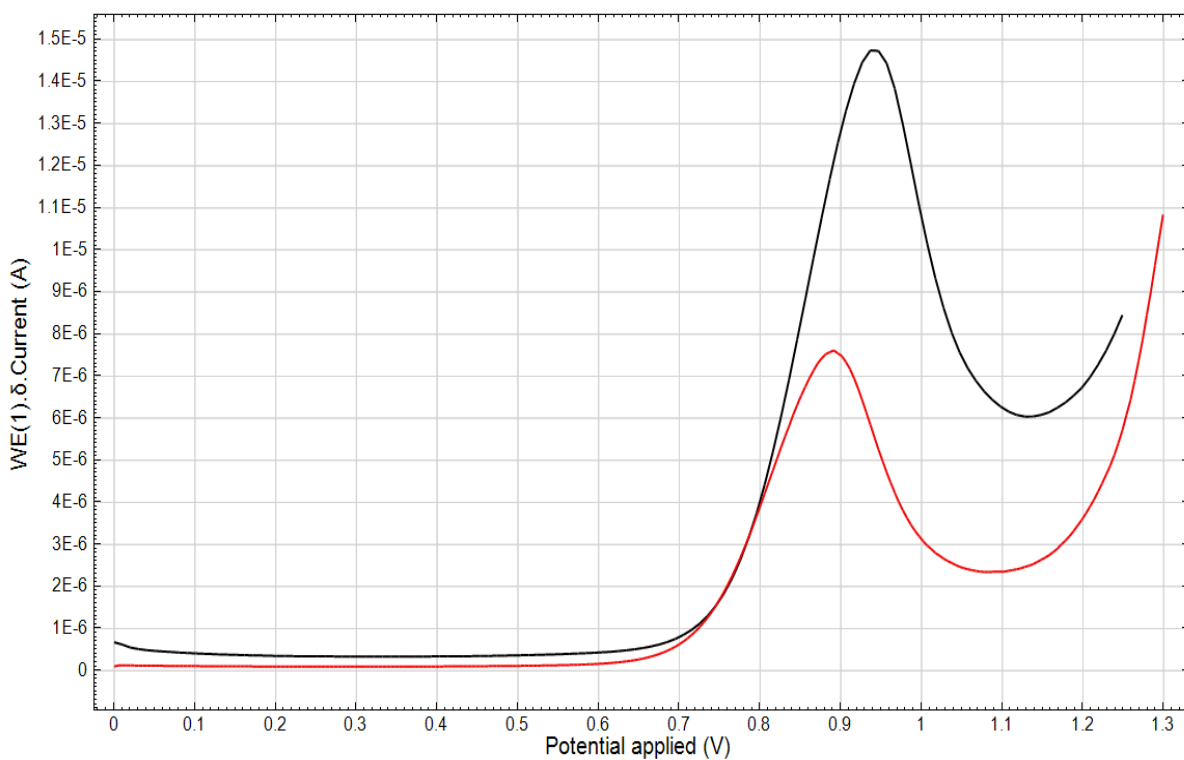
Obrázek 17: Záznam SWV pro standard arekolinu;  $c = 0,5 \text{ mmol/l}$ ; B-R pufr pH 6,98; elektroda GCE

## Výběr vhodné voltametrické metody

Na počátku bylo také důležité vybrat vhodnou voltametrickou metodu. Byly tedy porovnávány metody LSV, DPV a SWV, a to nejdříve na elektrodě GCE. Jak je patrné z následujícího obrázku (obrázek 18) nejvýraznější signál dává SWV, avšak při této metodě je největší pozadí, toto však může být vylepšeno vhodnou optimalizací metody. Přijatelný signál dostaneme i při měření DPV, ale signál je již oproti SWV výrazně nižší, výhodou této metody je nižší interference pozadí. Metoda LSV je již pro měření arekolinu nedostatečná. SWV a DPV byly proměřeny i na CPE (obrázek 19), kde vykazovaly stejný trend jak na GCE. Pro následující měření byla tedy vybrána metoda SWV pro její vyšší citlivost, avšak metoda DPV by mohla její vhodnou alternativou, v případech měření vyšších koncentrací arekolinu.



Obrázek 18: Srovnání SWV, DPV a LSV; koncentrace arekolinu  $c = 0,5 \text{ mmol/l}$ ; B-R pufr pH 9,15; elektroda GCE; Legenda: SWV – černá, DPV – červená, LSV – modrá



Obrázek 19: Srovnání SWV a DPV; koncentrace arekolinu  $c = 0,5 \text{ mmol/l}$ ; B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE; Legenda: SWV – černá, DPV – červená

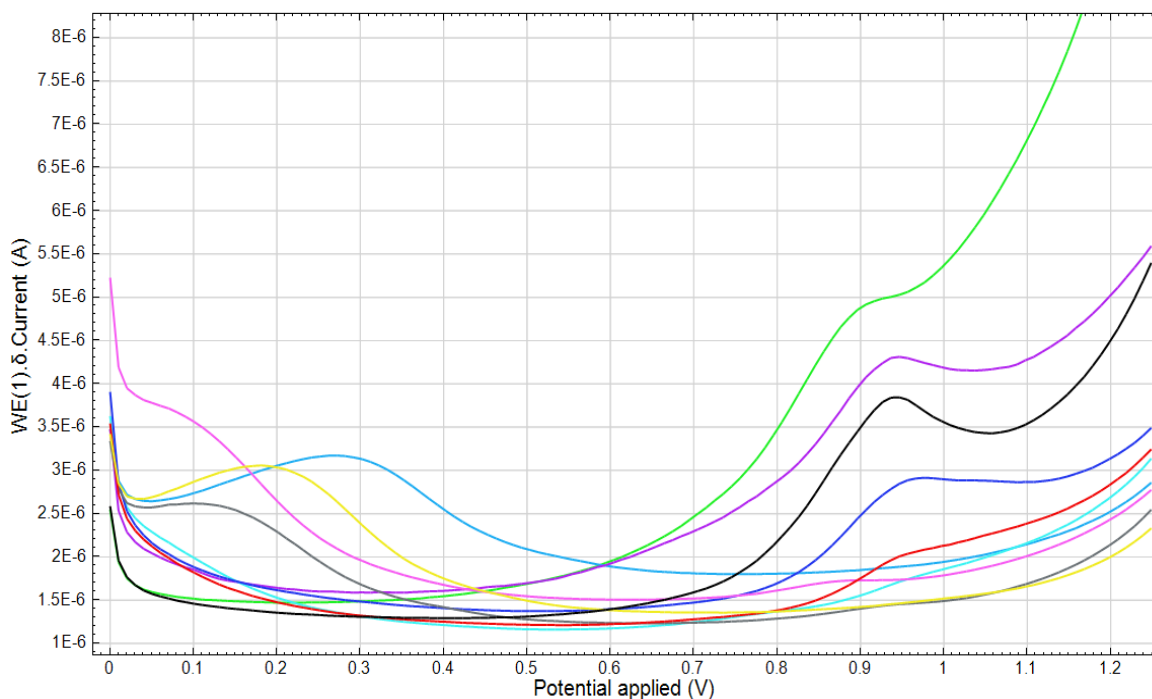


## Optimální pH

Dále bylo nutné zjistit optimální pH B-R pufru, který byl při předběžných měřeních vybrán ve své alkalické oblasti jako nejlepší elektrolyt. Byla proměřena řada jedenácti roztoků s postupně se zvyšujícím pH, tak aby se vždy zvýšilo přibližně o jednotku (konkrétní hodnoty pH v tabulce 2). Měření celé řady pH bylo provedeno na GCE i CPE, výsledky budou diskutovány samostatně.

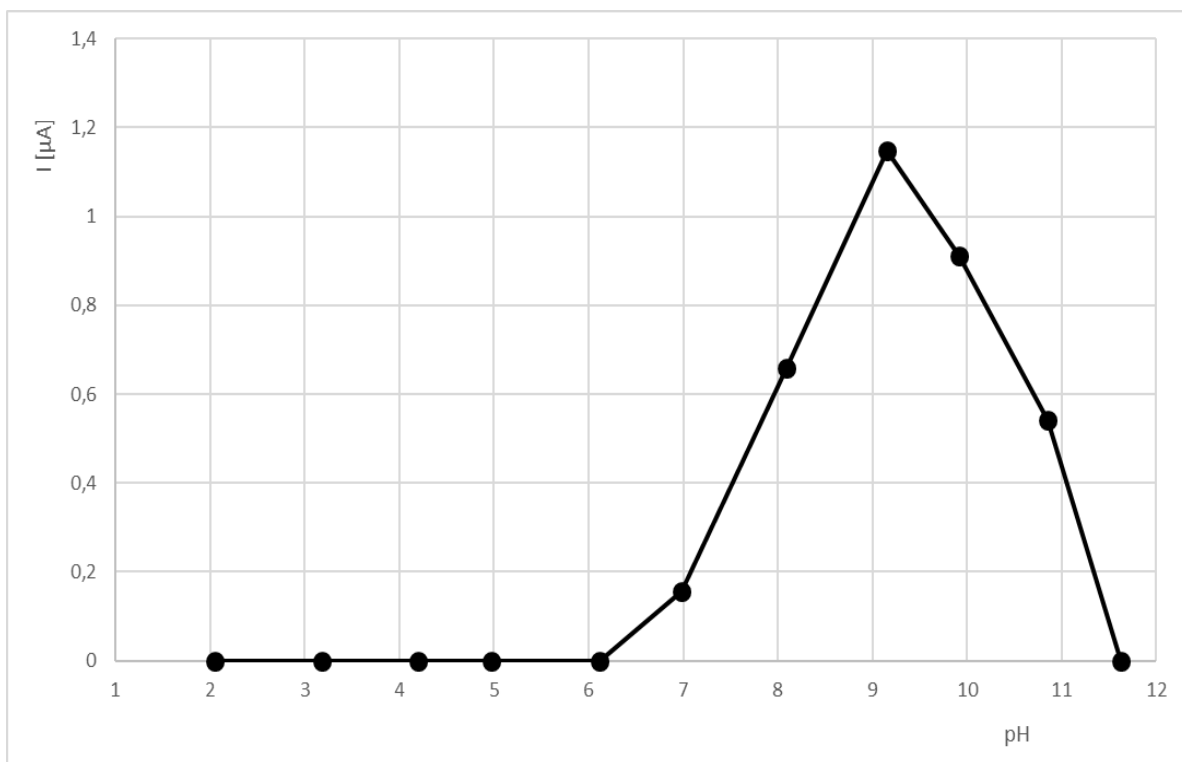
### Měření s elektrodou ze skelného uhlíku

Z následujícího obrázku (obrázek 20) jasně vyplývá, že arekolín je elektroaktivní pouze v zásaditém pH, kdy nejvyšší signál na GCE poskytuje při pH 9,15 (černý pík), čímž se potvrdila předběžná měření. Následující měření tedy budou prováděna při tomto pH B-R pufru. Z následujícího grafu bylo vyřazeno měření pro pH 11,63, neboť v daném potenciálovém okně nebyl zaznamenán příslušný pík

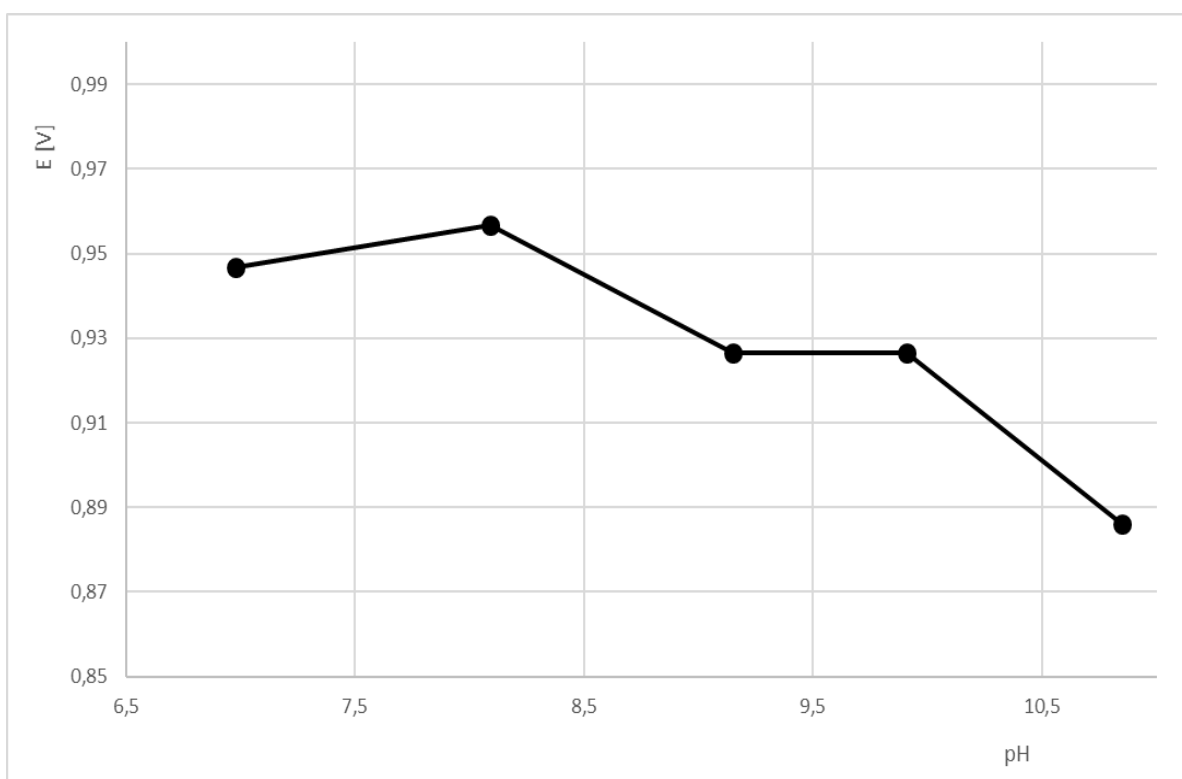


Obrázek 20: Výběr optimálního pH; arekolín  $c = 0,1 \text{ mmol/l}$ , elektroda GCE, Legenda: 2,05 – světle modrá, 3,18 – žlutá, 4,2 – šedá, 4,97 – růžová, 6,12 – blankytně modrá, 6,98 – červená, 8,09 – modrá, 9,15 – černá, 9,91 – fialová, 10,85 – zelená

Z vyhodnocených výšek a potenciálů píků byly sestrojeny grafy jejich závislostí na pH, které vidíme níže (obrázek 21 a obrázek 22). Můžeme si povšimnout, že jak již bylo řečeno arekolín v kyselé oblasti pH neposkytuje signál. Ten pak po pH 6,12 prudce stoupá a svého maxima dosahuje při pH 9,15 a následně opět prudce klesá a při pH 11,63 opět dosahuje nuly. Potenciál píku se při zvyšujícím se pH mírně snižuje.



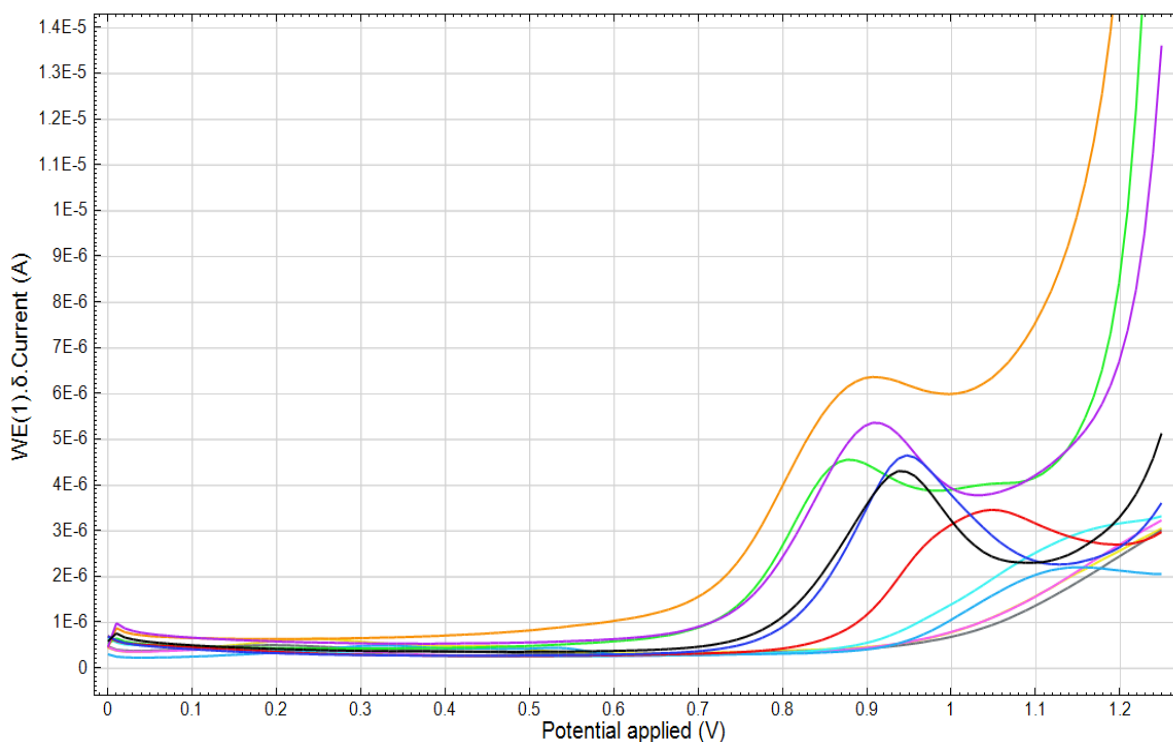
Obrázek 21: Závislost výšky piku (proudu) na pH; arekolin  $c = 0,1\text{mmol/l}$ , elektroda GCE



Obrázek 22: Závislost potenciálu piku na pH; arekolin  $c = 0,1\text{mmol/l}$ , elektroda GCE

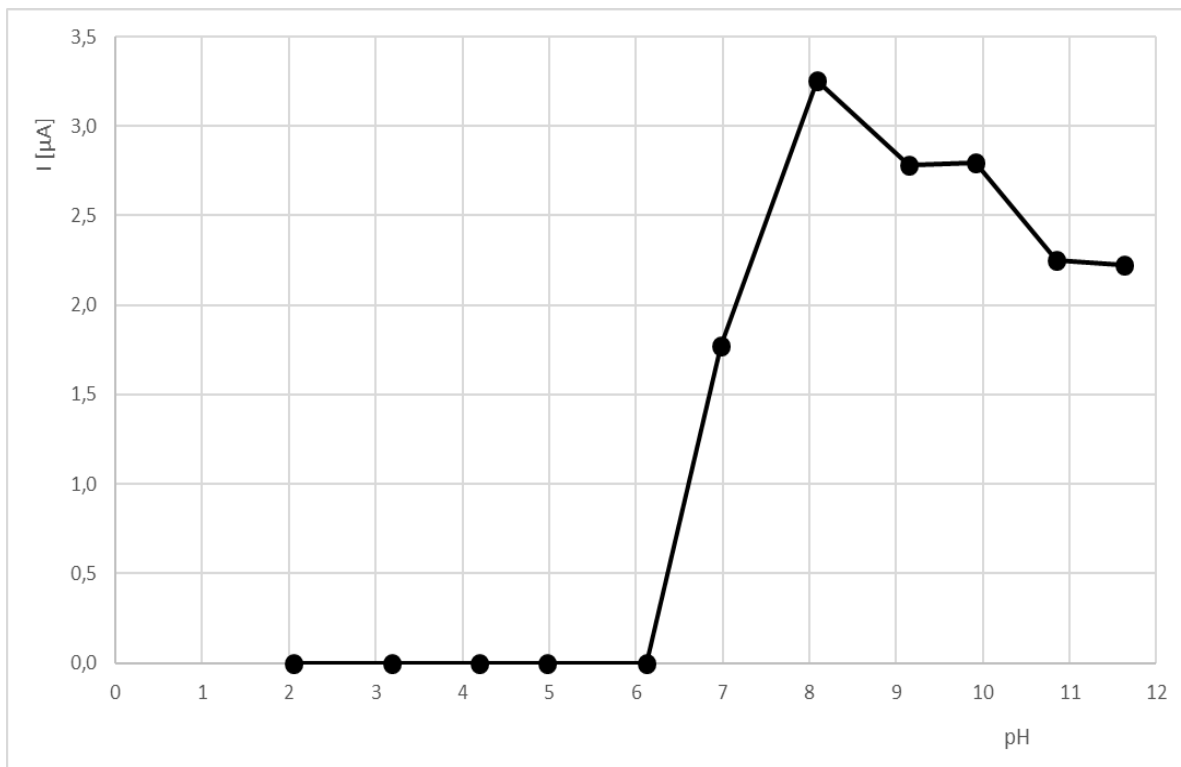
## Měření s uhlíkovou pastovou elektrodou

Výsledky měření na CPE (obrázek 23) jsou podobného charakteru jako při měření na GCE, avšak jak si můžeme povšimnout na následujícím obrázku optimální pH je již 8,09, avšak následující měření byly i pro CPE prováděny při pH 9,15, a to proto, aby bylo možné provádět měření na obou elektrodách za stejných podmínek.

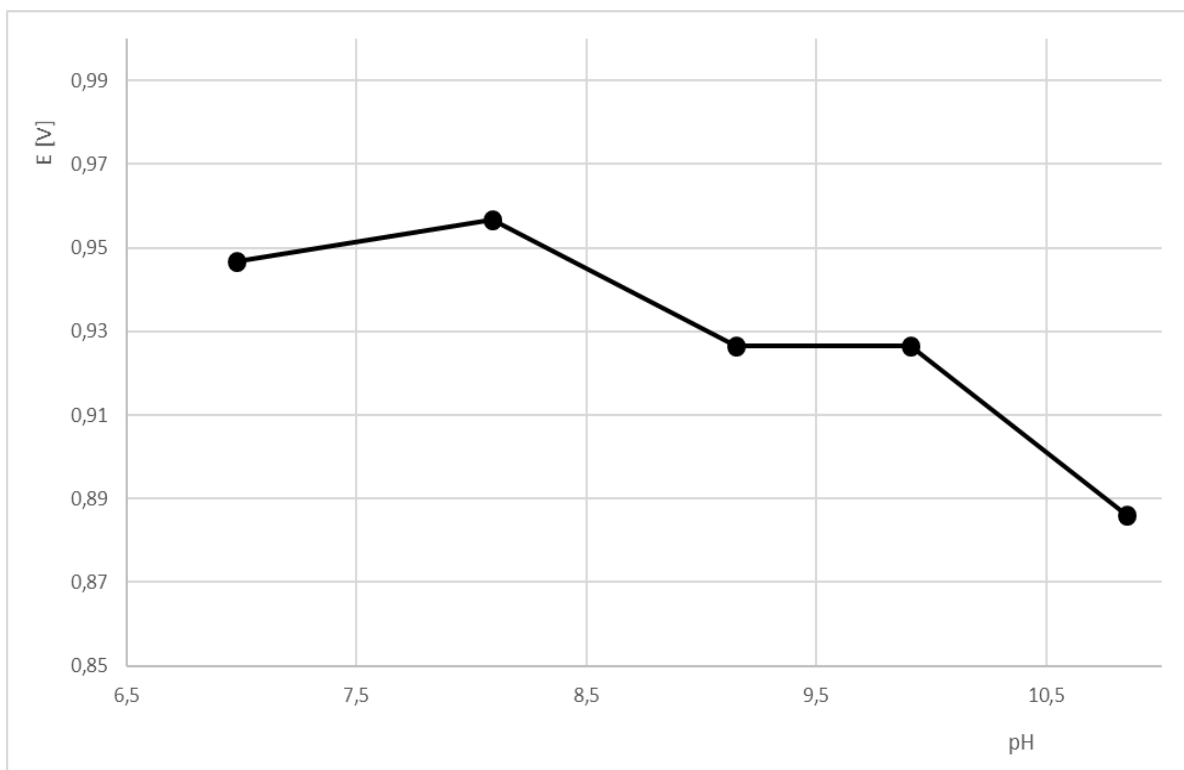


Obrázek 23: Výběr optimálního pH; arekolin  $c = 0,1 \text{ mmol/l}$ , elektroda GCE, Legenda: 2,05 – světle modrá, 3,18 – žlutá, 4,2 – šedá, 4,97 – růžová, 6,12 – blankytně modrá, 6,98 – červená, 8,09 – modrá, 9,15 – černá, 9,91 – fialová, 10,85 – zelená, 11,63 – oranžová

Z vyhodnocených výšek a potenciálů píků byly sestrojeny grafy jejich závislostí na pH, které vidíme níže (obrázek 24 a obrázek 25). Jak vidíme na grafu závislosti proudu na pH, výška píku prudce roste po pH 6,12, svého maxima pak dosahuje při pH 8,09 a pak pozvolna klesá, na rozdíl od měření na GCE, kdy tento pokles byl strmý. Právě pozvolného poklesu signálu s pH zde využíváme při použití vyššího než optimálního pH při dalších měřeních, jak již bylo vysvětleno výše. Potenciál píku se vzrůstajícím pH opět klesá.



Obrázek 24: Závislost výšky píku (proudu) na pH; arekolin  $c = 0,1\text{mmol/l}$ , elektroda CPE



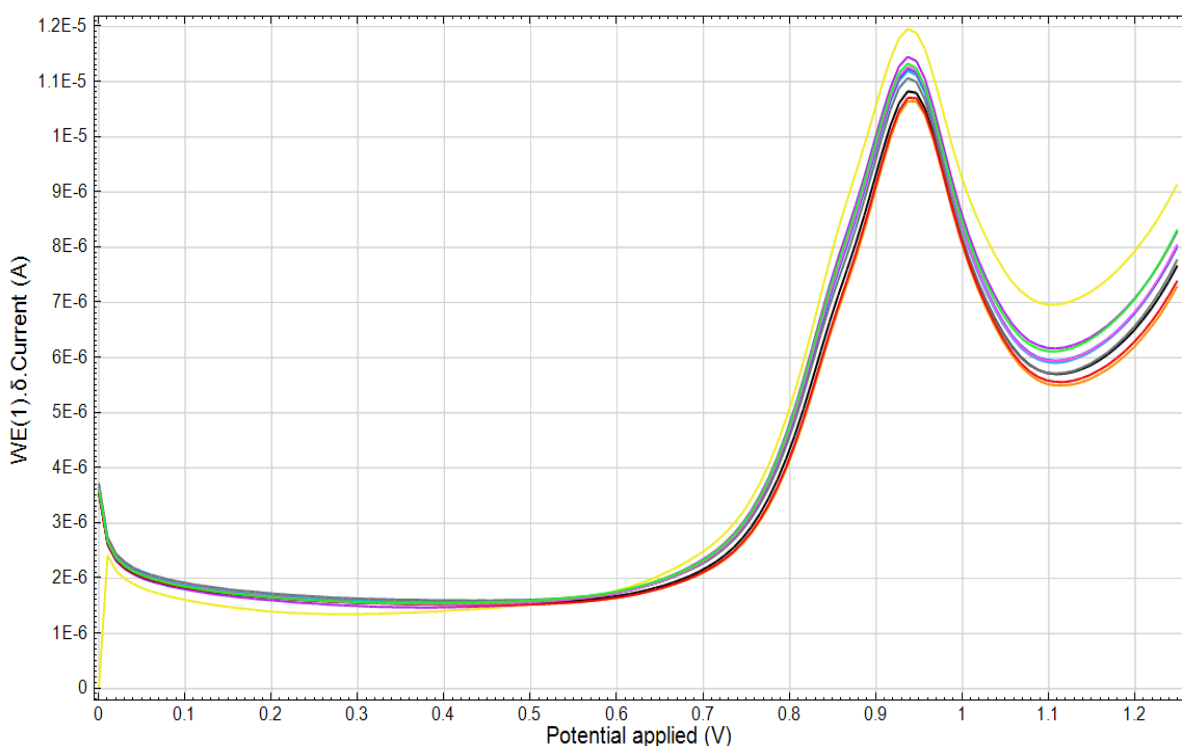
Obrázek 25: Závislost potenciálu píku na pH; arekolin  $c = 0,1\text{mmol/l}$ , elektroda CPE

## Opakovatelnost měření

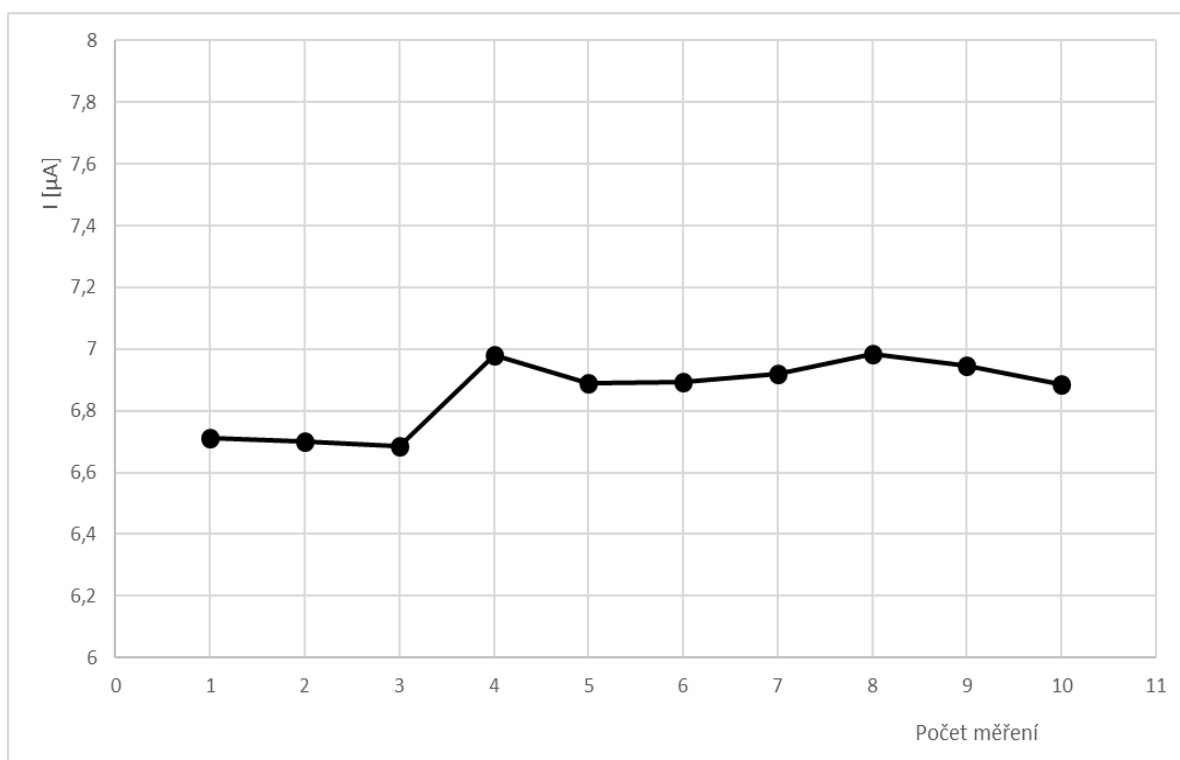
Také musela být ověřena možnost opakovatelnosti měření. Toto bylo zjištěno provedením sady deseti měření za sebou. Tato měření byla provedena při pH 9,15, a to jak na GCE, tak i CPE.

### Měření s elektrodou ze skelného uhlíku

Na následujících obrázcích (obrázek 26 a obrázek 27) si můžeme povšimnout toho, že se proud při opakování měření příliš neliší, avšak vyskytuje se zde jisté kolísání. Toho si všímáme především mezi měřeními číslo 3 a 4 kdy číslo od čísla 4 vykazují měření vyšší proud, mezi těmito měřeními totiž proběhla delší pauza. Podobný fakt byl pozorován i při předcházejících měřeních, kdy první měření ze sady vykazovalo větší nepřesnost. Proto by bylo dobré i přes dobrou opakovatelnost, která zde činí 1,6 % zařadit před měření krok kondicionace elektrody.



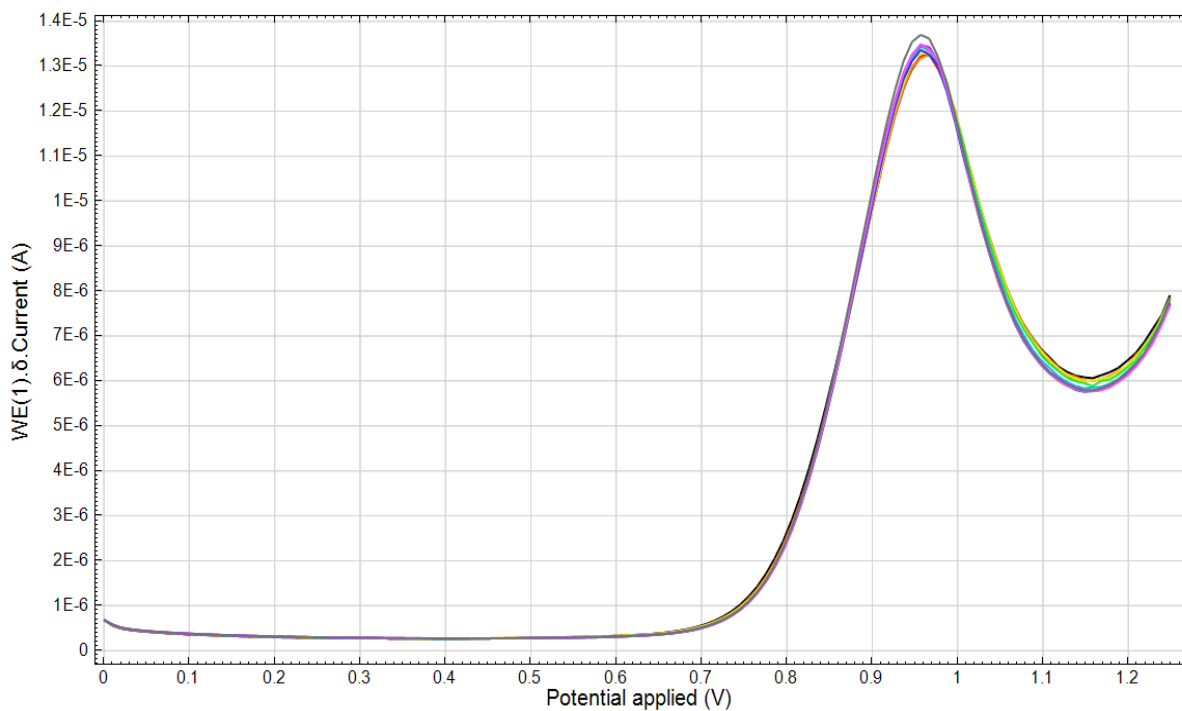
Obrázek 26: Opakovatelnost měření – deset po sobě následujících měření; koncentrace arekolinu  $c = 0,5 \text{ mmol/l}$ ; B-R pufr pH 9,15; elektroda GCE



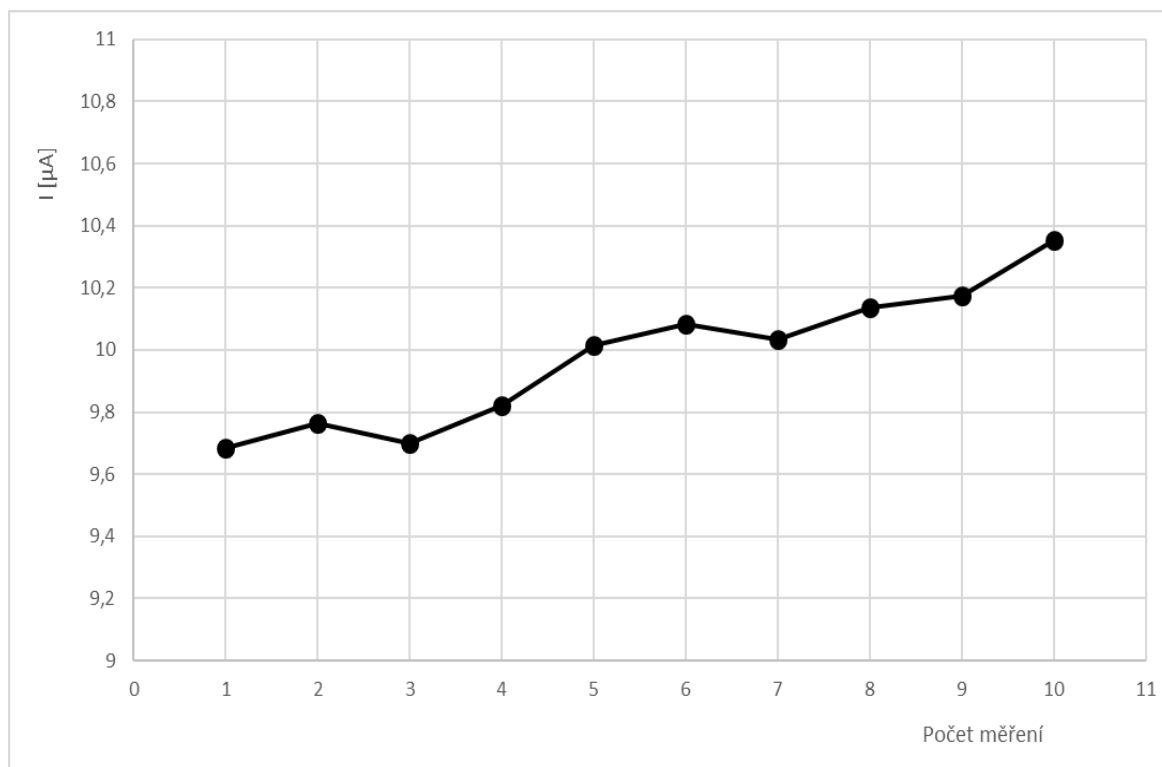
Obrázek 27: Opakované měření na jednom povrchu; koncentrace arekolinu  $c = 0,5 \text{ mmol/l}$ ; B-R pufr pH 9,15; elektroda GCE

### Měření s uhlíkovou pastovou elektrodou

Ze sady deseti měření vyplývá, že proud s rostoucím počtem měření stoupá, jak vidíme na obrázcích (obrázek 28 a obrázek 29). Tuto chybu bychom mohli zmírnit pravidelným obnovováním povrchu pasty, nebo před měření zařadit vhodný kondicioniční krok. Opakovatelnost je, ale i zde přijatelná a činí 2,14%. I přes to, že opakovatelnost pro CPE vycházela horší, než pro GCE, byla CPE vybrána pro další měření, neboť poskytovala vyšší signál a také samotný pík byl při měření pomocí CPE symetričtější.



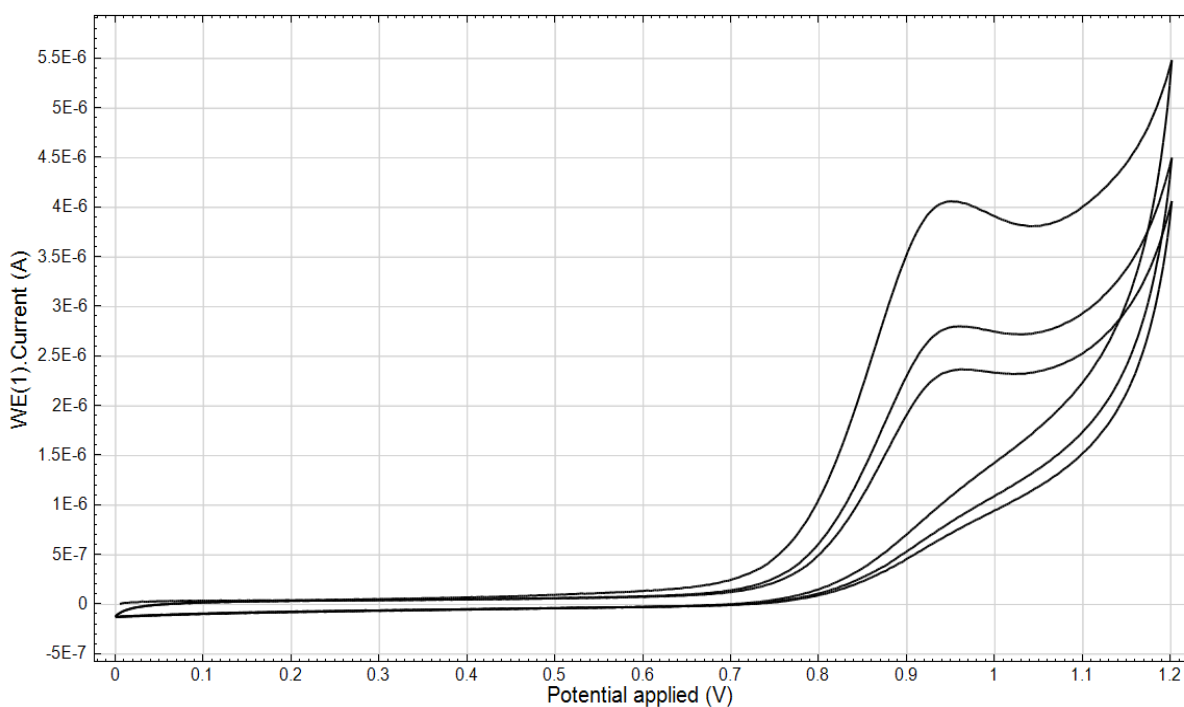
Obrázek 28: Opakovatelnost měření – deset po sobě následujících měření; koncentrace arekolinu  $c = 0,5 \text{ mmol/l}$ ; B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE



Obrázek 29: Opakované měření na jednom povrchu; koncentrace arekolinu  $c = 0,5 \text{ mmol/l}$ ; B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE

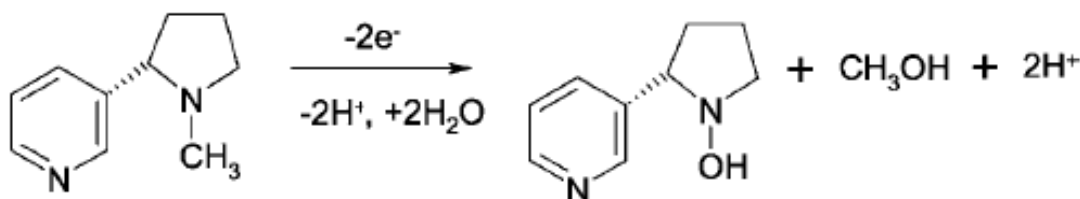
## Cyklická voltametrie

Metodou cyklické voltametrie bylo zjišťováno, zda elektrochemická oxidace arekolinu je děj reverzibilní či ireverzibilní. Měření probíhalo v roztoku arekolinu v prostředí B-R pufru při pH 9,15 a stejně jako všechna následující měření i toto bylo provedeno již jen na uhlíkové pastové elektrodě. Na následujícím záznamu CV (obrázek 30), na kterém jsou zobrazeny tři cykly, vidíme, že se jedná o děj ireverzibilní.



Obrázek 30: Cyklická voltametrie; rychlost skenu 100 mV/s; koncentrace arekolinu  $c = 0,1 \text{ mmol/l}$ ; B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE

Přesný průběh elektrochemické oxidace arekolinu není známý, proto na následujícím obrázku (obrázek 31) vidíme schéma elektrochemické oxidace nikotinu, který je strukturálně podobný arekolinu, a proto by jejich elektrochemické oxidace mohly probíhat podobně. Zkoumání elektrodového mechanismu pro arekolin by si vyžádalo další experimenty.

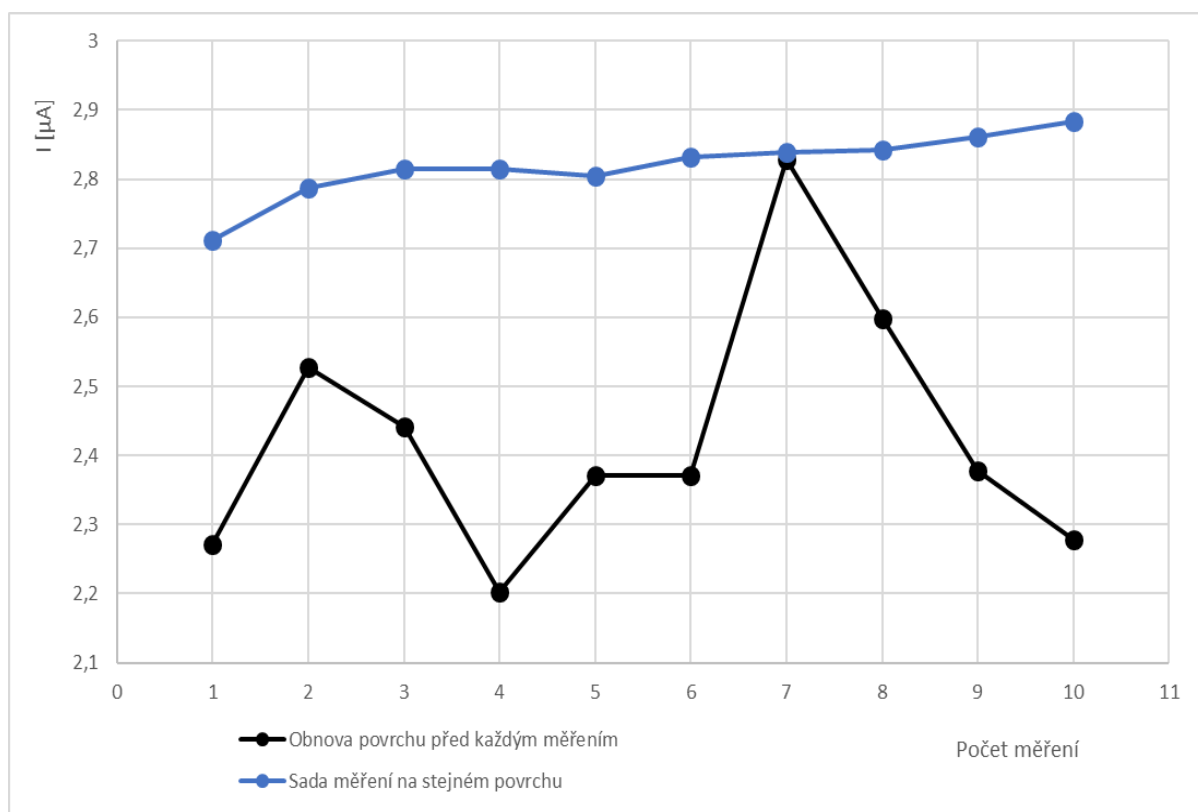


Obrázek 31: Schéma elektrochemické oxidace nikotinu [52]



## Ověření opakovatelnosti na stejném a novém povrchu

Jelikož pro další měření byla vybrána uhlíková pastová elektroda bylo taktéž nutno zjistit, zdali bude výhodnější měření provádět na stejném povrchu elektrody, nebo povrch před každým měřením obnovovat. Proto byla provedena sada deseti měření na stejném povrchu a následně sada dalších deseti, kdy byl povrch elektrody před každým měřením obnoven. V grafu (obrázek 32) vidíme porovnání obou těchto způsobů, kdy je jasně vidět, že obnova povrchu elektrody před každým měřením není vhodná a do měření vkládáme větší chybu, neboť nejsme schopni povrch obnovit otřením pokaždé stejně. Dále si můžeme povšimnout také toho, že závislost pro sadu měření na jednom povrchu nevykazuje stejný stoupající průběh, pozorovaný při dřívějších, výše uvedených, měřeních. Nová měření probíhala při nižší koncentraci, a tento fakt tedy může naznačovat, že kalibrační závislost nebude mít u vyšších koncentrací stejnou směrnici jako u nižších koncentrací.



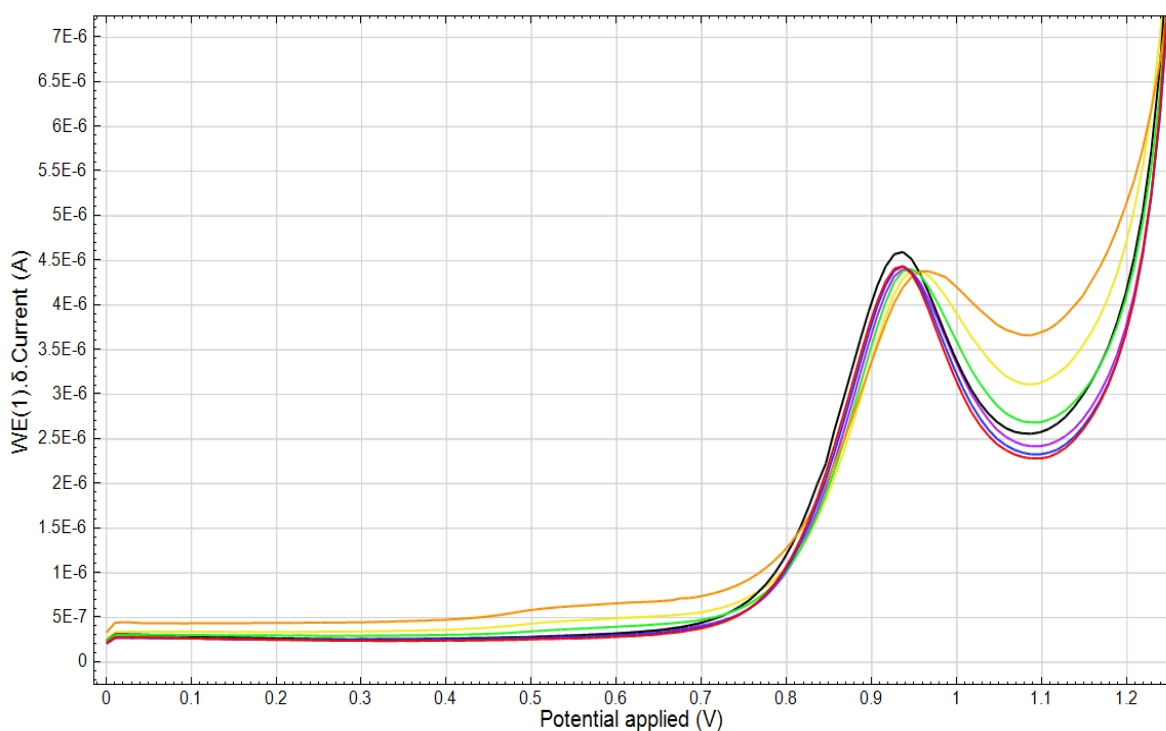
Obrázek 32: Opakovatelnost měření – obnova elektrody na začátku vs před každým měřením; koncentrace arekolinu  $c = 0,1$  mmol/l; B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE

## Kondicionace elektrody

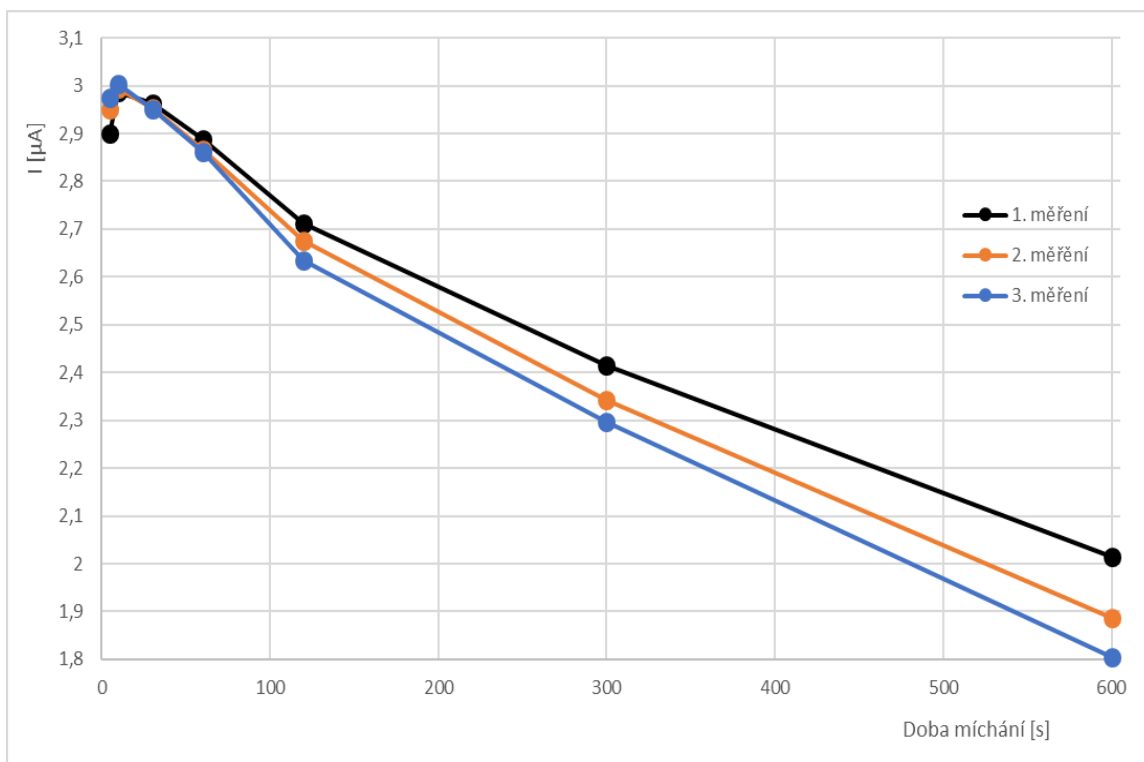
Byla také prozkoumána možnost zařazení kondicionačního kroku na začátku měření, kdy byl zjišťován vliv doby míchání a velikost kondicionačního potenciálu na velikost signálu a opakovatelnost měření.

### Doba míchání

Prvním krokem bylo zjistit vliv doby míchání před analýzou na průběh měření. Byla tedy provedena měření pro dobu míchání 5s, 10s, 30s, 60s, 120s, 300s a 600s. Kondicionační potenciál byl nastaven na 0V. Výsledky jsou shrnuty na následujících obrázcích (obrázek 33 a obrázek 34). Z tohoto měření vyplynulo že se zvyšující se dobou míchání odezva klesá a také se zhoršuje opakovatelnost měření, proto byl jako optimální doba míchání vybrán čas 10s.



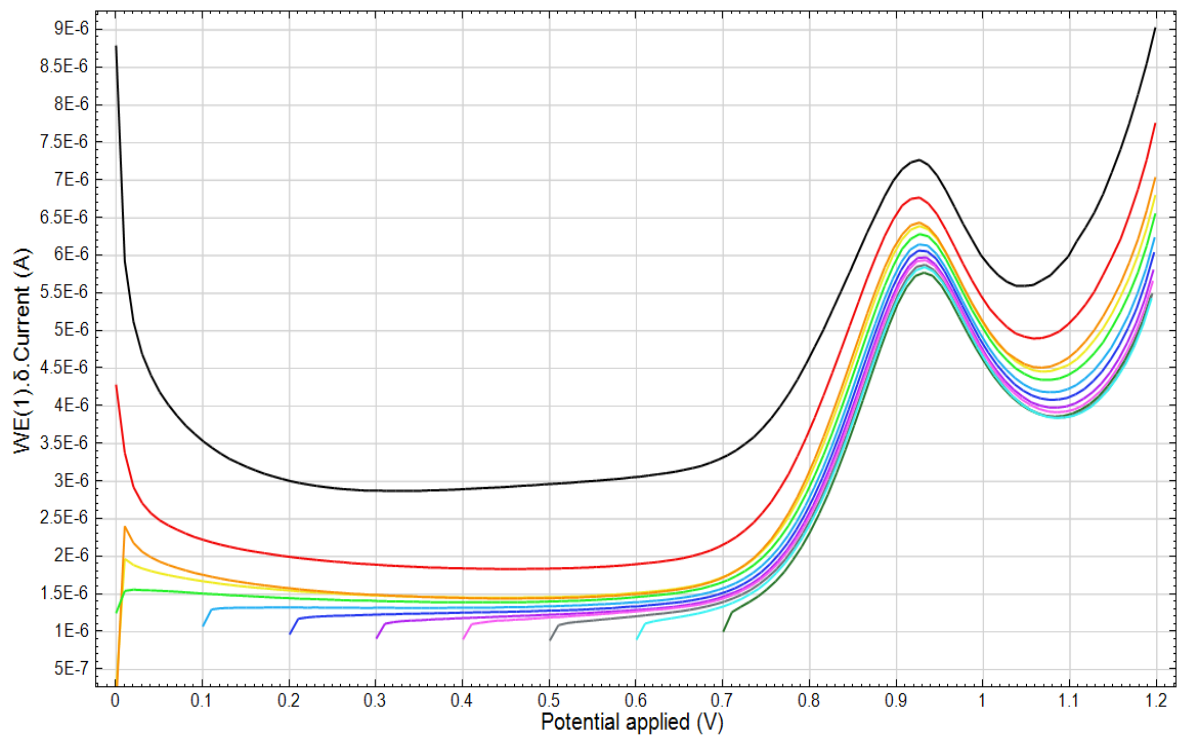
Obrázek 33: Optimální doba míchání; koncentrace arekolinu  $c = 0,1 \text{ mmol/l}$ ; B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE; Legenda: 5s – černá, 10s – červená, 30s – modrá, 60s – fialová, 120s – zelená, 300s – žlutá, 600s – oranžová



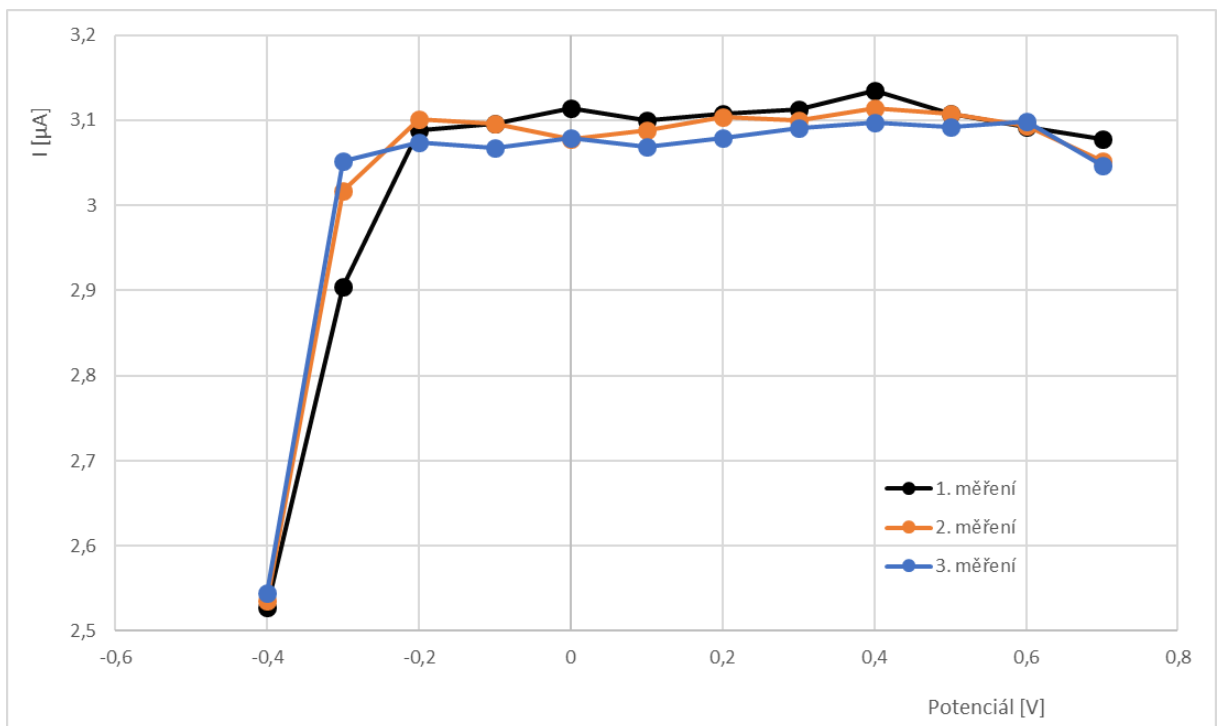
Obrázek 34: Závislost výšky píku na době míchání pro jednotlivá měření; koncentrace arekolinu  $c = 0,1 \text{ mmol/l}$ ; B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE

### Kondicionační potenciál

Dále byl také zjišťován vliv kondicionačního potenciálu vloženého na elektrody. Potenciál byl proměřován v rozmezí  $-0,4 - 0,7\text{V}$  zvyšující se vždy o  $0,1\text{V}$ . Bylo zjištěno, že více záporné potenciály pro měření nejsou vhodné, protože snižují velikost píku. Avšak změna kondicionačního potenciálu v rozmezí  $-0,2 - 0,7\text{V}$  již nemá na měření vliv, a to jak na výšku píku, tak i na opakovatelnost měření, viz obrázky 35 a 36. Dále bylo tedy pokračováno s hodnotou kondicionačního potenciálu  $-0,2\text{V}$ .



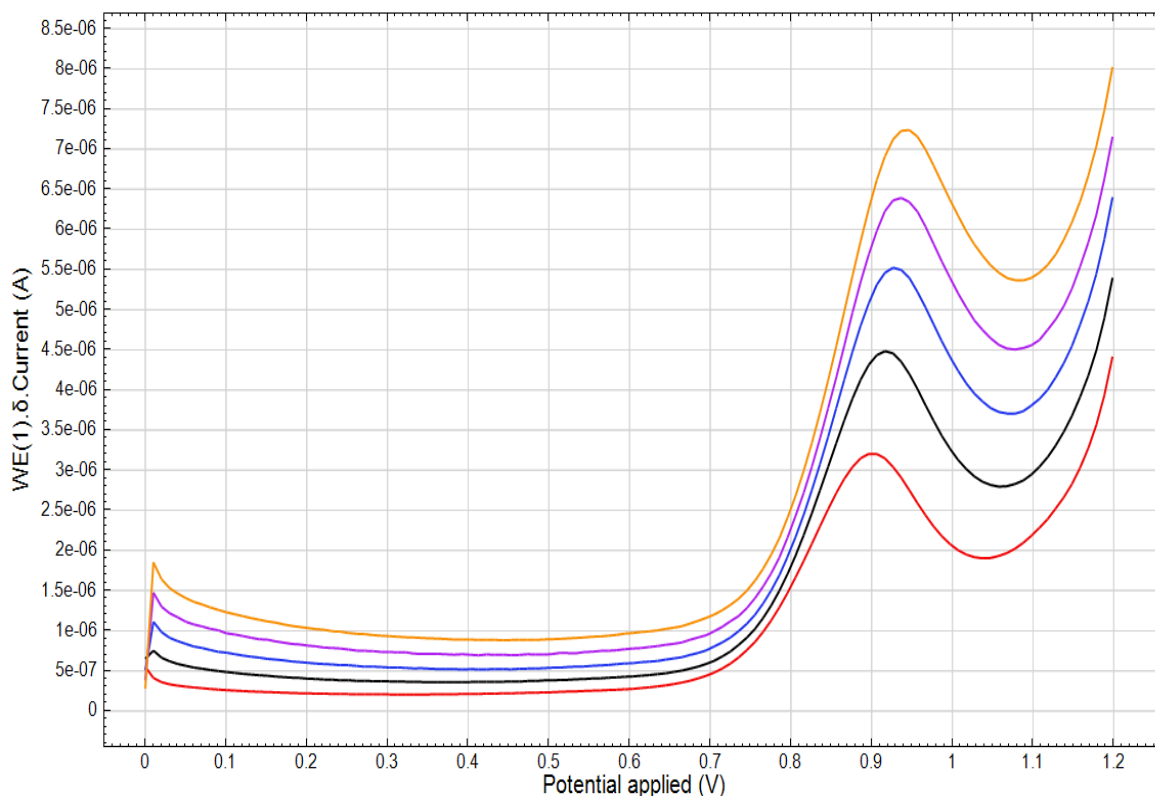
Obrázek 35: Optimální hodnota kondičionálního potenciálu; koncentrace arekolinu  $c = 0,1 \text{ mmol/l}$ ; B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE; Legenda: -0,4V – černá, -0,3V – červená, -0,2V – oranžová, -0,1V – žlutá, 0V – světle zelená, 0,1V – světle modrá, 0,2V – modrá, 0,3V – fialová, 0,4V – růžová, 0,5V – šedá, 0,6V – blankytně modrá, 0,7V – tmavě zelená



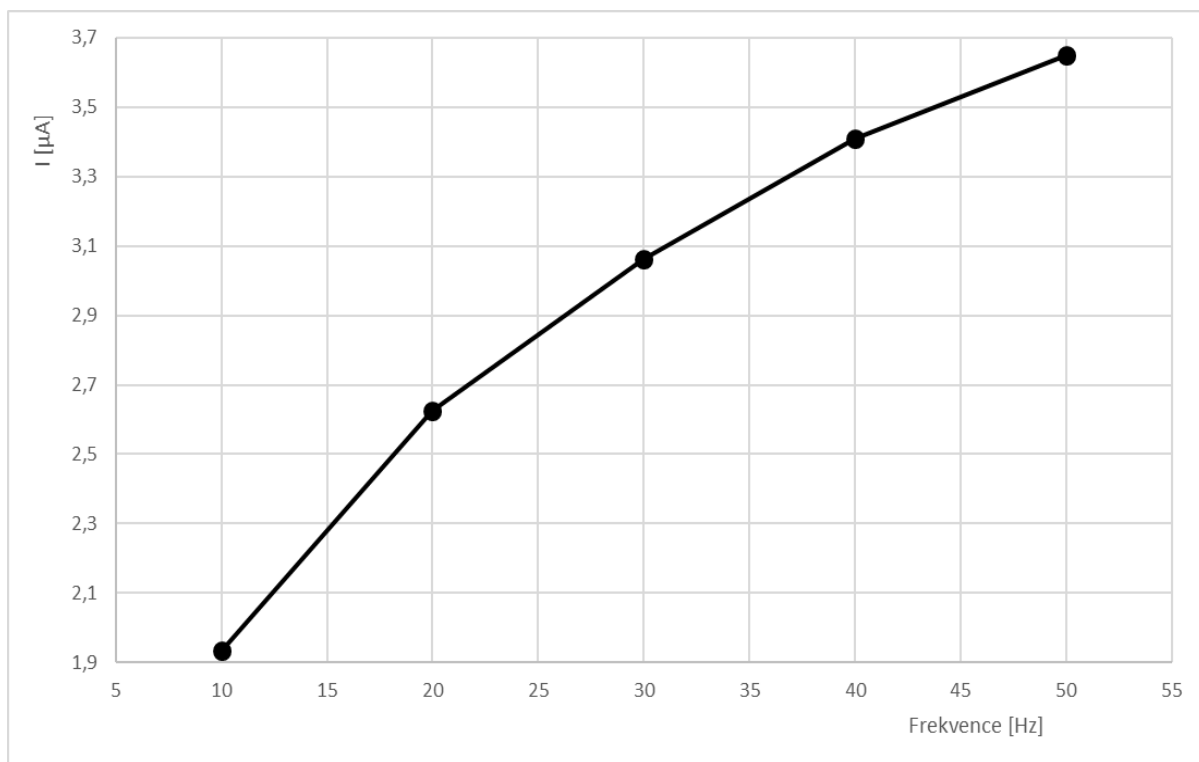
Obrázek 36: Závislost výšky píku na kondičionálním potenciálu pro jednotlivá měření; koncentrace arekolinu  $c = 0,1 \text{ mmol/l}$ ; B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE

## Volba parametrů SWV

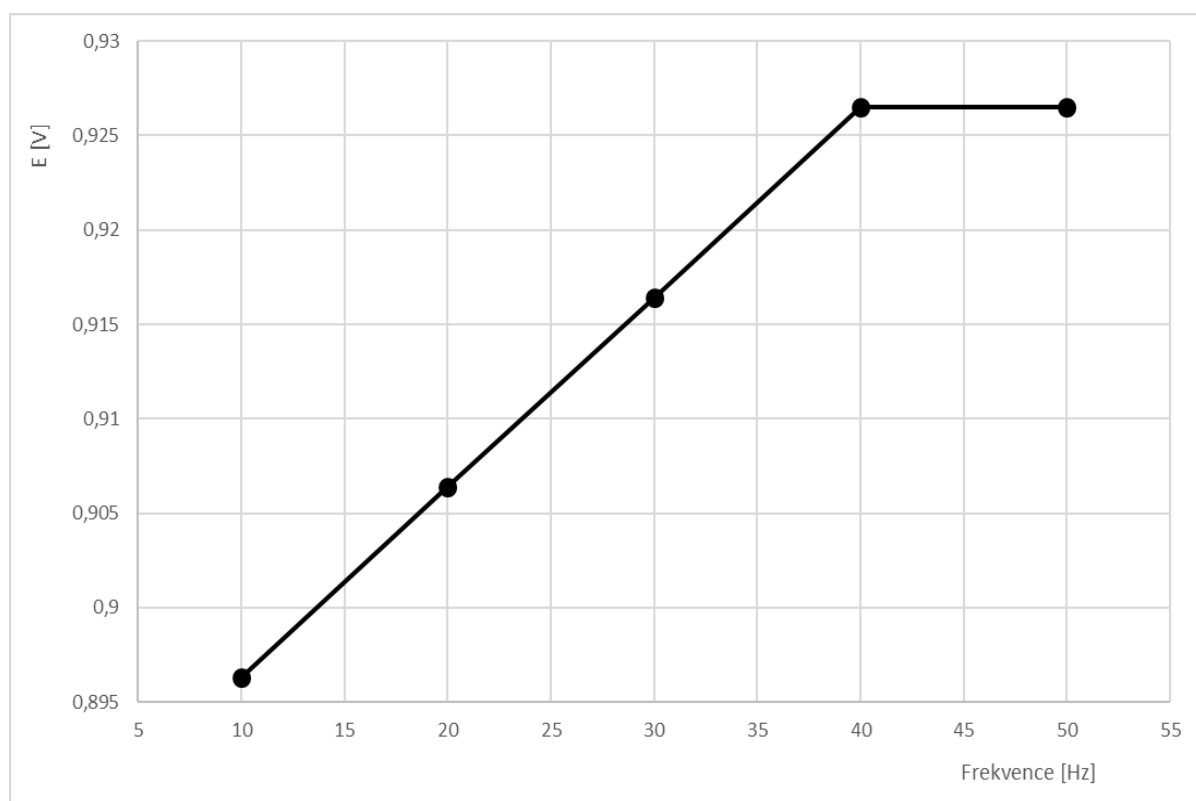
V rámci experimentu bylo také nutno optimalizovat parametry metody. Pro tuto optimalizaci byla měněna hodnota frekvence a to od 10 – 50Hz (po 10Hz). Bylo zjišťováno, jaký vliv má tato změna na měřený signál. Na grafu závislosti potenciálu (polohy píku) na frekvenci (obrázek 39) vidíme, že se zvyšující se frekvencí se arekolín vylučuje při vyšších potenciálech. Z grafu výšky píku (proudu) na frekvenci (obrázek 38) pak, že se píky s rostoucí frekvencí mírně zvyšují. Toto zvětšování však není natolik výrazné, aby vyvážilo negativní aspekt vyšších frekvencí, a to zvýšený signál pozadí, tuto skutečnost pozorujeme na následujících SWV záznamech (obrázek 37). Pro následující měření byla tedy vybrána frekvence 25Hz, a to z toho důvodu, že při této frekvenci byla provedena všechna předcházející měření.



Obrázek 37: Optimální frekvence; koncentrace arekolínu  $c = 0,1 \text{ mmol/l}$ ; B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE; Legenda: 10Hz – červená, 20Hz – černá, 30Hz – modrá, 40Hz – fialová, 50Hz - oranžová



Obrázek 38: Závislost proudu na frekvenci; koncentrace arekolinu  $c = 0,1 \text{ mmol/l}$ ; B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE

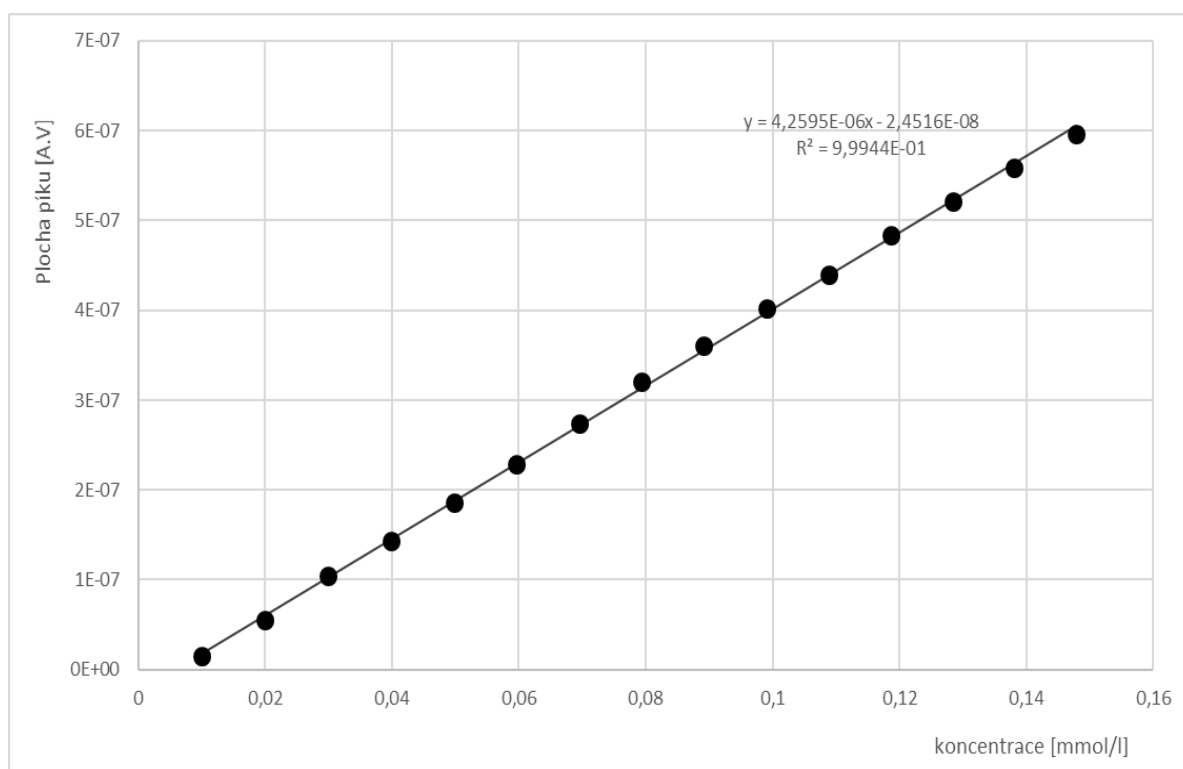


Obrázek 39: Závislost potenciálu na frekvenci; koncentrace arekolinu  $c = 0,1 \text{ mmol/l}$ ; B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE

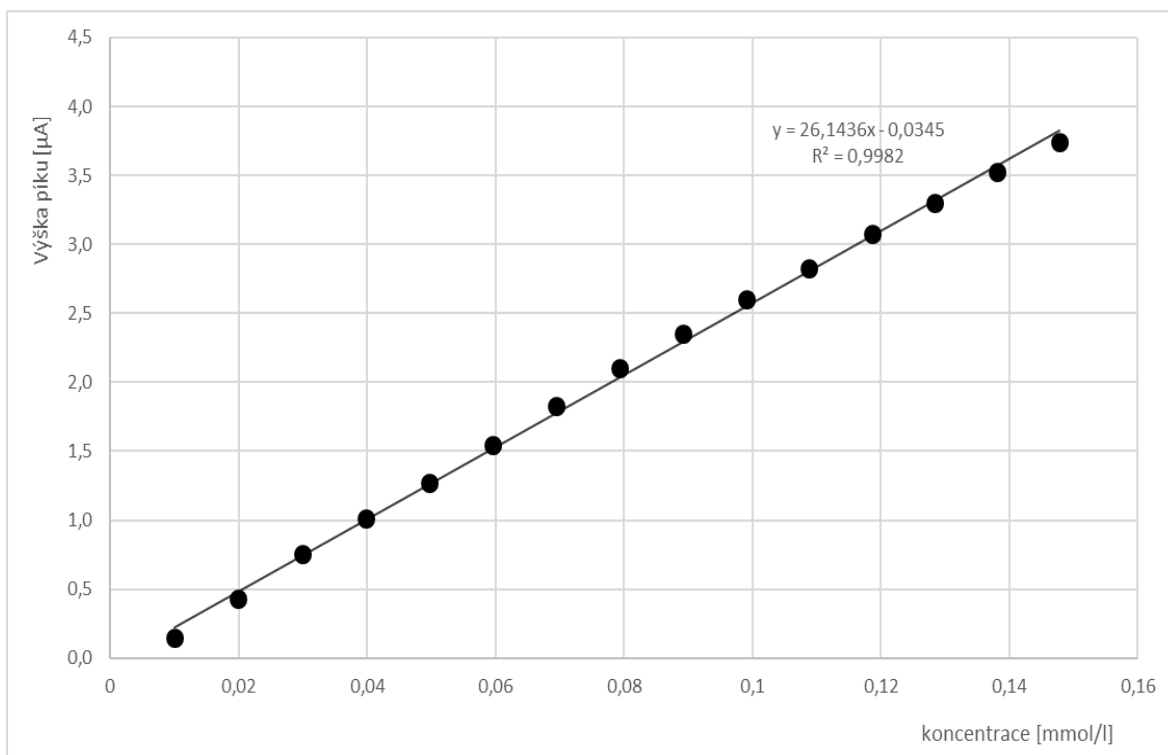
## Kalibrační křivka, mez detekce a mez stanovitelnosti

Taktéž byla sestavena kalibrační křivka, a to v rozmezí koncentrací, kde byla závislost signálu na koncentraci lineární. Kalibrační závislost byla sestavena jak pro výšku píku (obrázek 41), tak i pro plochu píku (obrázek 40), a protože výpočty z plochy píku vycházely vždy lépe, byly při všech následujících výpočtech využity hodnoty ploch píku, a ne jeho výšky.

Na následujících grafech vidíme srovnání kalibračních křivek sestavených z hodnot výšek píku a z ploch píku vždy v závislosti na koncentraci arekolinu. Můžeme si povšimnout toho, že ač obě tyto závislosti jsou lineární, hodnota spolehlivosti u závislosti plochy píku na koncentraci je vyšší než hodnota spolehlivosti pro závislost výšky píku na koncentraci.



Obrázek 40: Kalibrační křivka – závislost plochy píku na koncentraci arekolinu; B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE



Obrázek 41: Kalibrační křivka – závislost výšky píku na koncentraci arekolinu; B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE

### Mez detekce

$$LOD = \frac{3 \times SMODCH}{Směrnice} = \frac{(3 \times 0,020722 \times 10^{-7})}{4,2595^{-6}} = 0,001459 \text{ mmol/l}$$

$$LOD = 1,459 \text{ } \mu\text{mol/l}$$

Mez detekce je rovna koncentraci, při které je analytický signál statisticky odlišný od šumu. V tomto případě odpovídá koncentraci arekolinu 1,459  $\mu\text{mol/l}$ .

### Mez stanovitelnosti

$$LOQ = \frac{10 \times SMODCH}{Směrnice} = \frac{(10 \times 0,020722 \times 10^{-7})}{4,2595^{-6}} = 0,004864 \text{ mmol/l}$$

$$LOQ = 4,864 \text{ } \mu\text{mol/l}$$

Mez stanovitelnosti je rovna minimální koncentraci, při které je již možno provést kvantitativní vyhodnocení. V tomto případě odpovídá koncentraci arekolinu 4,864  $\mu\text{mol/l}$ .

Jedná se o teoretické výpočty, a proto skutečná koncentrace při které můžeme pík vyhodnotit může být vyšší. Prakticky byl pík spolehlivě vyhodnotitelný při koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ .

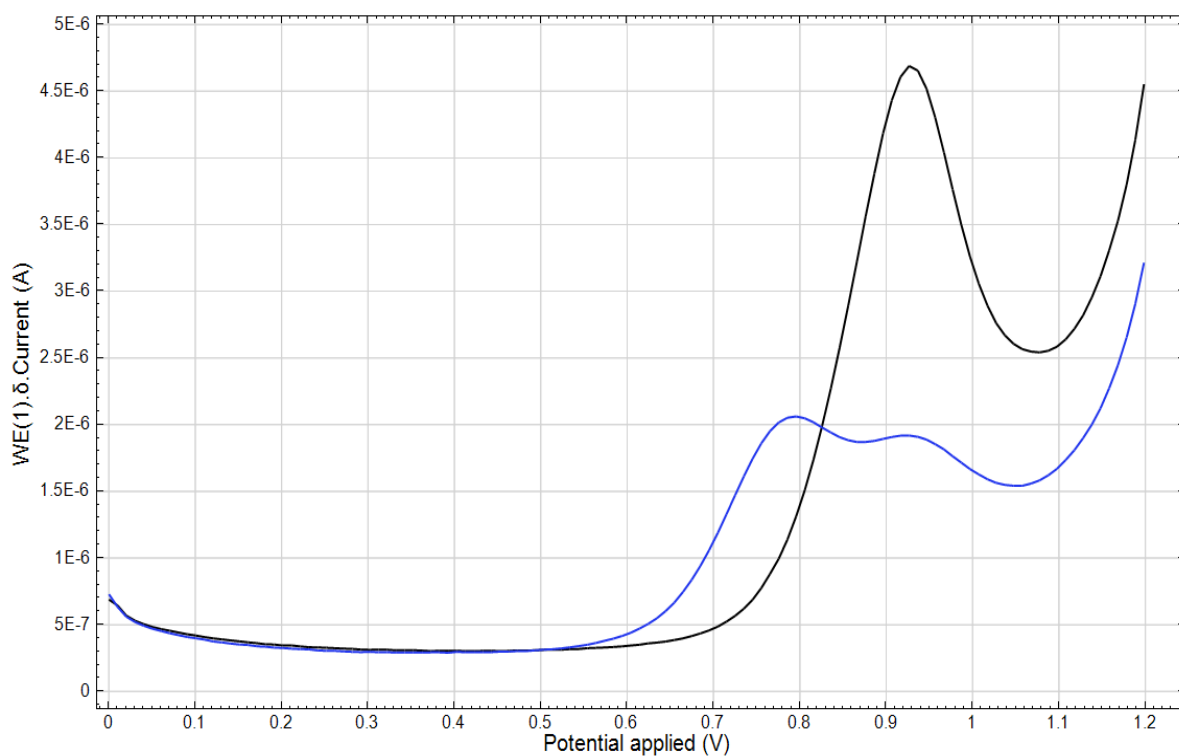


## **Interferenční studie**

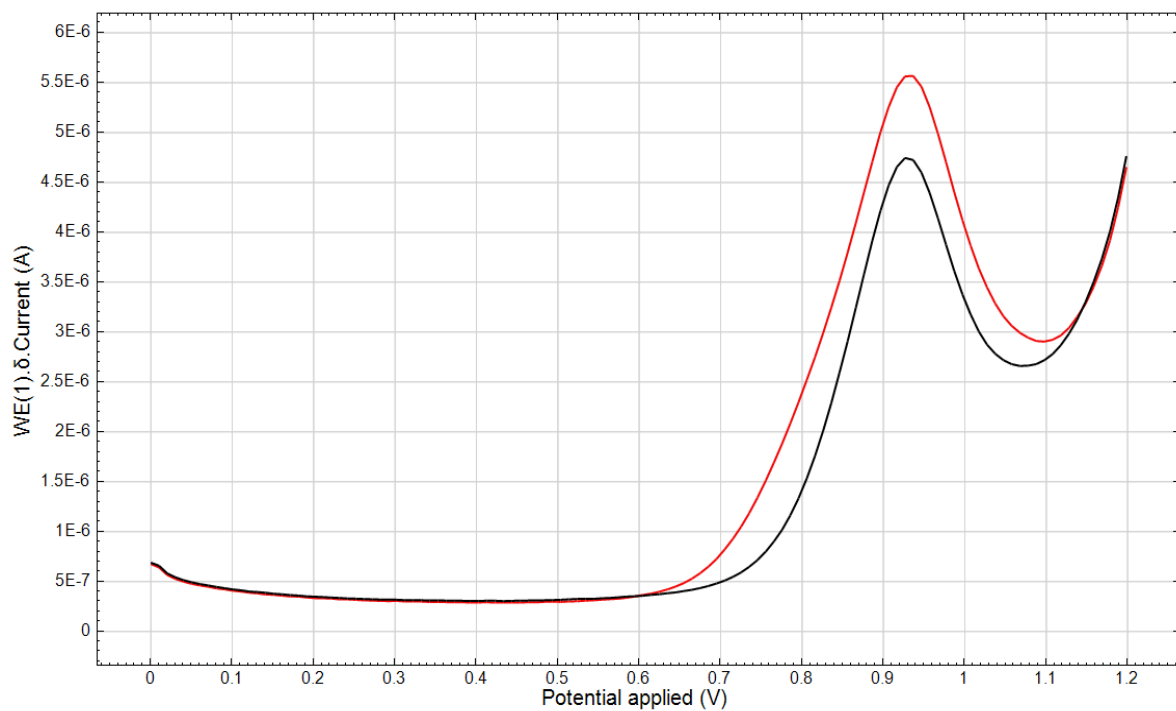
Bylo také nutné zjistit možnost interference některých látek při voltametrickém měření arekolinu. Arekové ořechy obsahují mnoho látek, které by se mohly chovat jako interferenty, avšak standardy těchto látek jsou těžko dostupné. Proto byl jako potenciální interferent zvolen nikotin, který se sice v ořeších palmy arekové nevyskytuje, avšak do betelového sousta (hlavní forma výskytu arekolinu) se velmi často přidává tabák, jehož účinnou složkou je právě nikotin. V takto získaných vzorcích, popřípadě ve vzorcích tělesných tekutin (sliny, krevní plazma...) získaných po žvýkání betelového sousta, se může společně s arekolinem vyskytnout tedy i nikotin.

### Nikotin jako interferent

Nejprve bylo nutné zjistit, jestli má nikotin rušivý vliv při stanovení arekolinu. Všechna měření byla prováděna metodou SWV na uhlíkové pastové elektrodě v prostředí Britton-Robinsonova pufru o pH 9,15. Nejprve byly tedy proměřeny standardy arekolinu a nikotinu samostatně. Roztoky byly připraveny tak aby jejich výsledná koncentrace v měrné nádobce byla stejná (0,1mmol/). Na obrázku (obrázek 42) vidíme záznam proudu při měnícím se potenciálu pro obě tato měření, je patrné, že nikotin se vylučuje ve stejné oblasti jako arekolin, a tudíž se chová jako interferent. Z tohoto obrázku je také patrné, že v tomto prostředí oxidace nikotinu poskytuje dva píky blízko u sebe. Na dalším obrázku (obrázek 43) je srovnání velikostí píku pro roztok čistého standardu arekolinu a píku pro směs arekolinu a nikotinu v molárním poměru 1:1. Je patrné, že pík se v důsledku přídavku nikotinu zvětšuje. V tabulce (tabulka 3) jsou pak shrnuta data pro změnu velikosti píku při různých poměrech koncentrací arekolinu a nikotinu.



Obrázek 42: Nikotin jako interferent – standardy nikotinu ( $c = 0,1\text{mmol/l}$ ) a arekolinu ( $c = 0,1\text{mmol/l}$ ); B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE; Legenda: Nikotin – modrá, Arekolin – černá



Obrázek 43: Nikotin jako interferent – směs nikotinu a arekolinu 1:1 ( $c = 0,1\text{mmol/l}$ ) a čistý arekolin ( $c = 0,1\text{mmol/l}$ ); B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE; Legenda: Nikotin a Arekolin – červená, Arekolin – černá

Tabulka 3: Změna plochy a výšky píku při přidavku nikotinu k arekolinu; koncentrace arekolinu vždy  $c = 0,1 \text{ mmol/l}$ ; B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE

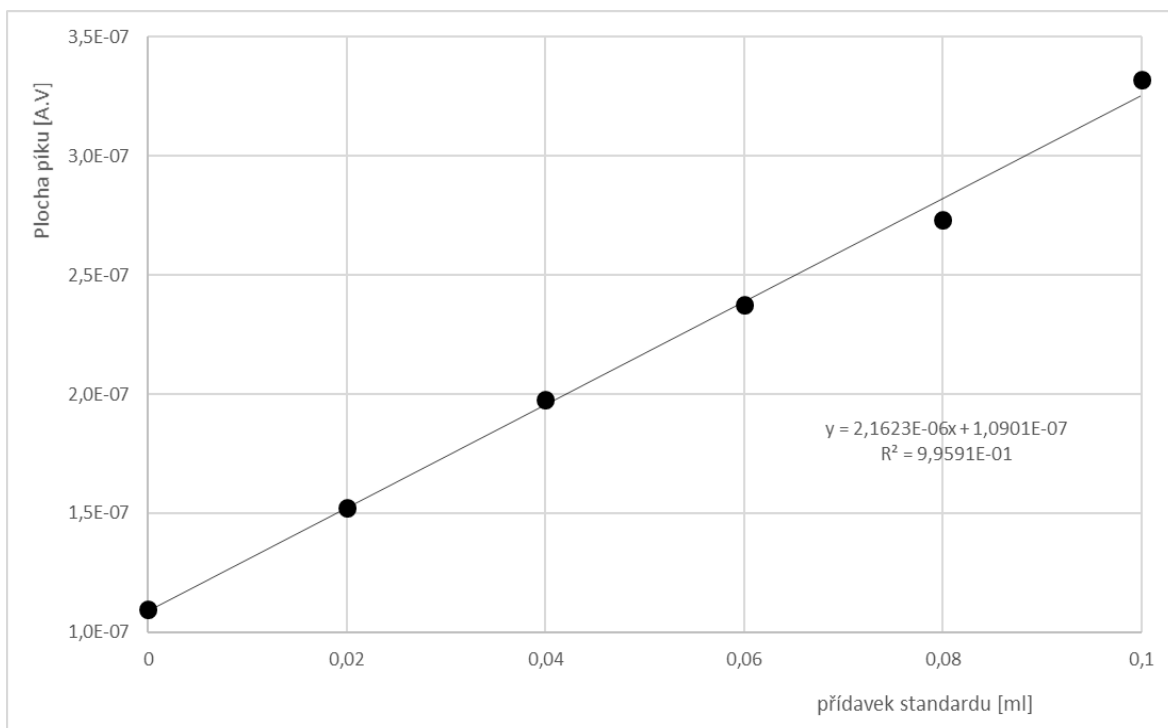
Molární poměr koncentrací arekolinu a nikotinu	Plocha píku [A.V]	Výška píku [ $\mu\text{A}$ ]
1:0	$4,3572 * 10^{-7}$	3,0207
1:1	$6,4873 * 10^{-7}$	3,6681
1:10	$34,1513 * 10^{-7}$	11,1227

## Modelové a reálné vzorky

Funkčnost metody byla také vyzkoušena na dvou modelových vzorcích a jednom reálném. Příprava těchto roztoků byla popsána v předcházejících kapitolách. Všechny tyto roztoky byly proměřeny metodou SWV na uhlíkové pastové elektrodě v prostředí Britton-Robinsonova pufru o pH 9,15. Vzorky byly vždy tímto pufrům naředěny tak aby jejich koncentrace spadala do kalibračního rozsahu a celkový objem měřeného roztoku byl 20ml. Koncentrace byla zjišťována metodou vícenásobného standardního přidavku, neboť tato metoda je nejpřesnější.

### Modelové vzorky

Byly připraveny dva modelové vzorky o koncentracích 0,1 a 1 mmol/l. Modelový vzorek č.1 (0,1mmol/l) byl dále upraven tak, že bylo odpipetováno 5ml tohoto roztoku a doplněno 15ml B-R pufru. Z modelového vzorku č.2 (1mmol/l) bylo pipetováno 1,5ml a doplněno 18,5ml B-R pufru. Oba tyto roztoky byl dále proměřeny, každý standardní přidavek činil 20 $\mu\text{l}$  0,01M roztoku standardu. Dále můžeme vidět jeden z naměřených grafů (obrázek 44), výsledky jsou pak shrnuty v tabulce 4 a jsou dále diskutovány.



Obrázek 44: Modelový vzorek č.1 – závislost plochy píku na přídavku standardu arekolinu; B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE

Tabulka 4: Výsledky pro modelové vzorky

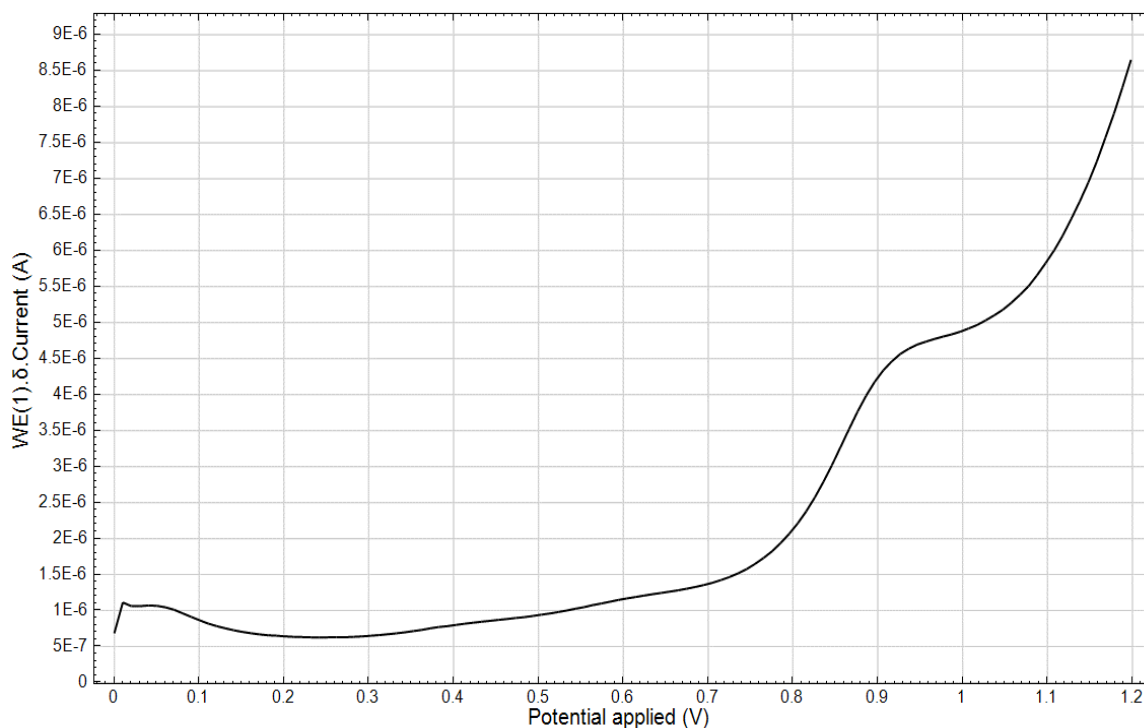
Název	Skutečná koncentrace [mmol/l]	Naměřená koncentrace [mmol/l]	Výtěžnost [%]
Modelový vzorek č.1	0,1	0,1017±0,000898	101,7
Modelový vzorek č.2	1	0,991±0,00932	99,1

Jak můžeme vidět na předcházející tabulce, oba výsledky, jak pro modelový vzorek o nižší koncentraci, tak i pro ten s vyšší vycházejí téměř přesně, naměřené hodnoty se od skutečných koncentrací neliší o více než 2%. Tato metoda je tedy vhodná pro stanovení arekolinu.

### Reálný vzorek s přídavkem modelového vzorku

Vzorek nebyl proměřován žádnou jinou spolehlivou metodou, kterou by bylo možné přesně stanovit obsah arekolinu ve vzorku, pro porovnání s obsahem naměřeným metodou SWV. Bylo nutné provést alespoň základní ověření, a to tak, že k 0,5ml vzorku bylo přidáno 5ml modelového vzorku č.1 a tato směs byla doplněna 14,5 ml B-R pufru o pH 9,15. V takto vzniklém roztoku se snížila koncentrace látek, které mohou narušovat měření, avšak díky přídavku modelového vzorku zůstává koncentrace arekolinu dostatečná pro stanovení. Takto

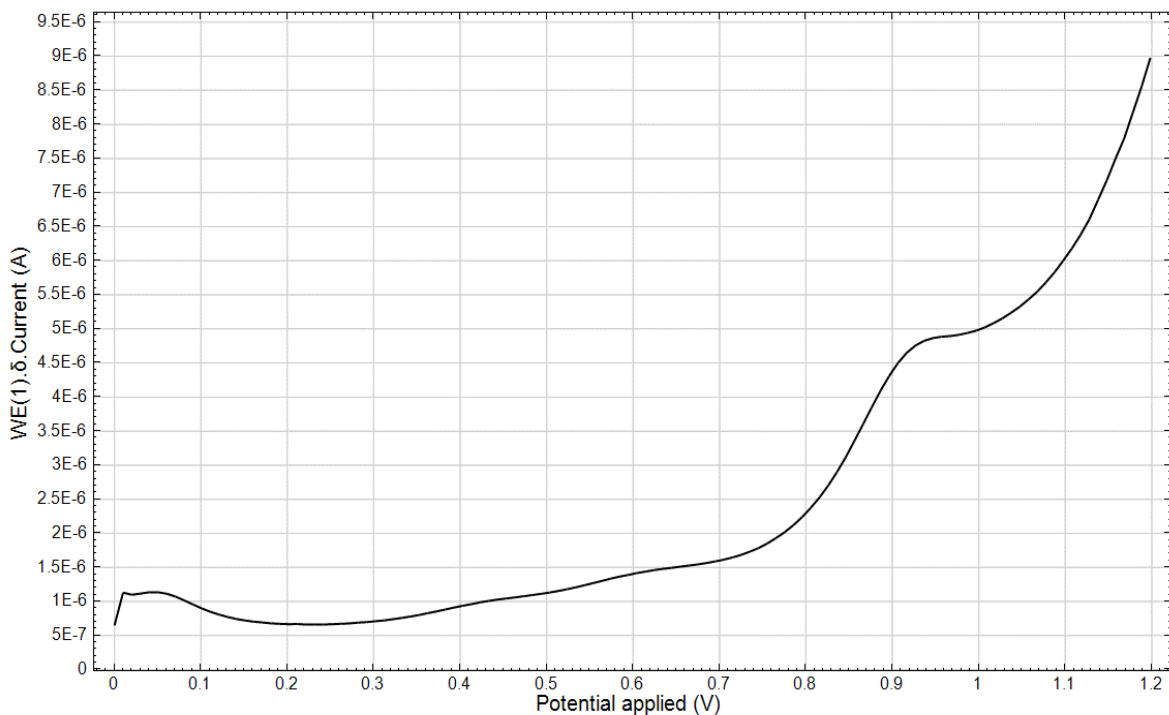
naměřená koncentrace vycházela 1,85mg na g ořechu neboli 0,185%. Tato hodnota vychází vyšší než následující (zjištěná při měření čistého vzorku), a to díky snížení rušivých vlivů matrice. Na následujícím obrázku (obrázek 45) si můžeme povšimnout toho, že náznaky píků, které jsou viditelné na následujícím záznamu jsou zde sotva znatelné.



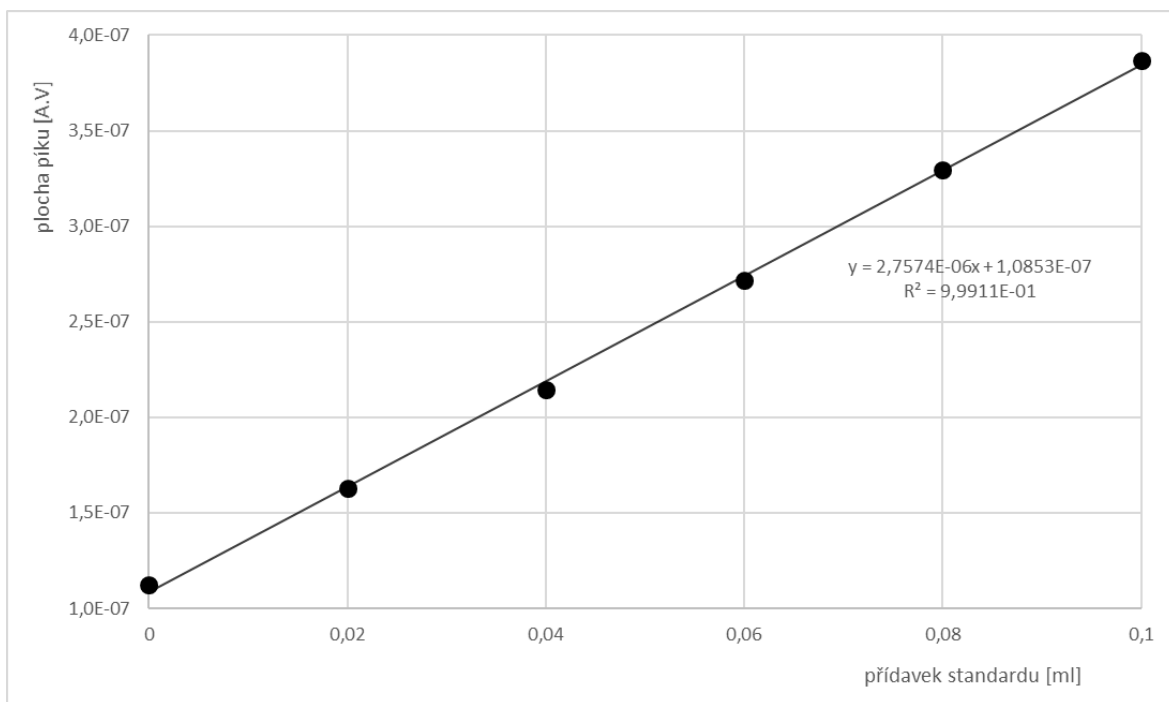
Obrázek 45: Reálný vzorek + Modelový vzorek; B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE

### Reálný vzorek

Přesná příprava reálného vzorku je popsána v experimentální části. Z tohoto vzorku byl dále pipetován 1ml a následně bylo přidáno 19ml B-R pufru. Tento roztok byl dále proměřen metodou standardního přidavku, kdy bylo přidáváno 20 $\mu$ l 0,01M roztoku standardu. Toto měření bylo provedeno vícekrát. Dále můžeme vidět jeden z naměřených záznamů závislosti proudu na vloženém potenciálu (obrázek 46), kde si můžeme povšimnout náznaků dalších píků, které jsou způsobeny ostatními látkami nacházejícími se ve vzorku. Na dalším grafu (obrázek 47) vidíme závislost velikosti plochy píku na přidavku standardu, výsledky jsou pak shrnuty v tabulce 5 a jsou dále diskutovány.



Obrázek 46: Reálný vzorek; B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE



Obrázek 47: Reálný vzorek – závislost plochy píku na přídavku standardu arekolinu; B-R pufr pH 9,15; elektroda CPE

Tabulka 5: Výsledky pro reálný vzorek

Měření	koncentrace [mg/g]	obsah [%]
1.	1,50	0,15
2.	1,31	0,13
3.	1,17	0,11
Průměr	1,32±0,1384	0,13±0,0138

Koncentrace arekolinu ve vzorku byla stanovena na 1,32 mg/g ořechu, zakoupeného od firmy Herbal-store s.r.o. Jablonec nad Nisou, což je 0,132 % (m/m). Tato hodnota se od teoretického obsahu 0,3 – 0,63%, který byl nalezen v literatuře, liší, avšak z dalších zdrojů bylo zjištěno, že obsah arekolinu v ořeších palmy arekové může velmi kolísat a v některých případech být jen minimální. Tato odchylka však mohla být způsobena také tím, že se jednalo o reálný vzorek, ve kterém se mimo arekolinu vyskytuje mnoho dalších látek, které mohou rušit měření. Chyba se také mohla vyskytnout díky nedostatečné extrakci arekolinu ze vzorku.

## 7. Závěr

Tato diplomová práce je zaměřena na voltametrické stanovení arekolinu pomocí elektrod na bázi uhlíku, a to především pomocí uhlíkové pastové elektrody. Pasta pro tuto elektrodu byla vytvořena z uhlíkového prášku CR-5 a parafinového oleje.

Na počátku bylo nutné provést záznam elektrochemického chování arekolinu v základním elektrolytu, kdy docházelo k jeho oxidaci. Pokud nebylo řečeno jinak pro měření byla vždy použita metoda Square-wave voltametrie. Podmínky pro úvodní měření byly vybrány na základě jeho podobnosti s nikotinem. Nejprve byl vybrán základní elektrolyt, ve kterém budou stanovení probíhat. Oxidace arekolinu byla tedy sledována v následujících roztocích 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1M HCl; 0,1M KCl a roztoky Britton-Robinsonova pufru o pH 4,2; 6,98 a 9,15. Nejstabilnější a největší odezvu přinášel roztok B-R pufru o pH 9,15. Tato měření byla provedena na čtyřech různých elektrodách, konkrétně na elektrodě ze skelného uhlíku, platinové elektrodě, elektrodě z borem dopovaného diamantu a uhlíkové pastové elektrodě. Dostatečný signál poskytovaly pouze uhlíková pastová elektroda a elektroda ze skelného uhlíku, následující měření byla tedy provedena na obou těchto elektrodách, a poté bylo rozhodnuto na které elektrodě bude pokračováno dále.

Protože jako nejvhodnější základní elektrolyt byl vybrán roztok Britton-Robinsonova pufru, bylo dále nutné zjistit optimální pH tohoto roztoku. Byla proměřována sada roztoků o pH od 2 do 12, kdy se pH v každém roztoku lišilo přibližně o jednotku, jako optimální pH byla vybrána hodnota 9,15. Dále byla zjišťována možnost opakovatelnosti měření, pro obě elektrody byla opakovatelnost přijatelná. Pro následující měření byla tedy vybrána uhlíková pastová elektroda, která poskytovala všeobecně vyšší a symetričtější pík. Opakovatelnost na uhlíkové pastové elektrodě tedy činila 2,14%. Protože povrch uhlíkové pastové elektrody je možné obnovit, byla také zvažována možnost obnovy povrchu před každým měřením, a proto byly provedeny další dvě sady měření, a to sada na stejném povrchu a sada pro obnovu povrchu před každým měřením. Bylo zjištěno, že není vhodné obnovovat povrch před každým měřením, neboť obnovou vnášíme do měření vyšší odchylku.

Byl také zjišťován přínos vložení kondičionálního kroku na začátek měření. Byla sledována změna velikosti a opakovatelnosti signálu při změně doby míchání před měřením a při změně velikosti kondičionálního potenciálu. Jako optimální byla vybrána rychlost míchání 10s a



potenciál kondicionace -0,2V vs. ref.Ag/AgCl. Dále byla zjišťována optimální frekvence při SWV měření. Jako nejlepší byla zvolena hodnota 25Hz.

Po optimalizaci všech podmínek měření byla měřena kalibrační závislost plochy píku na koncentraci. Kalibrační křivka byla lineární v rozmezí koncentrací 10 až 150  $\mu\text{mol/l}$ . A ze směrnice této závislosti a směrodatné odchylky pro první měření byla vypočítána hodnota meze stanovitelnosti a meze detekce. Teoretická mez detekce (LOD) tady činila 1,459  $\mu\text{mol/l}$  a mez stanovitelnosti (LOQ) 4,864  $\mu\text{mol/l}$ . Před ověřením spolehlivosti této metody modelovými vzorky bylo nutné zjistit možnost interference ostatních látek při měření arekolinu. Jako možný interferent byl vybrán nikotin, pro který bylo zjištěno, že vykazuje rušivý vliv, jeho přidavek do roztoku arekolinu zvětšoval výšku a plochu měřeného píku.

Spolehlivost této metody byla ověřena proměřením dvou modelových vzorků o různé koncentraci. Odchylka naměřené hodnoty od skutečné hodnoty činila pro modelový vzorek č.1 1,7% a pro modelový vzorek č.2 0,9%, což poukazuje na spolehlivost metody. Tato metoda byla tedy nakonec použita i pro měření reálného vzorku, ve kterém byla zjištěna koncentrace arekolinu 1,32 mg/g ořechu, což činí 0,132 % (m/m). Takto zjištěná hodnota byla nižší než průměrná koncentrace nalezená v literatuře, což mohlo být způsobeno nižší koncentrací arekolinu v tomto konkrétním ořechu, nedostatečnou extrakcí arekolinu z ořechu, nebo interferencí ostatních složek extrahovaných spolu s arekolinem. Bohužel však reálný vzorek arekolinu nebyl proměřován žádnou další spolehlivou metodou, kterou bychom mohli koncentraci arekolinu ověřit. Jediné, co bylo provedeno bylo proměření reálného vzorku v kombinaci s modelovým vzorkem, čímž se snížila koncentrace inerferentů aniž by byla snížena koncentrace arekolinu pod úroveň, na které by nebylo možno vyhodnotit pík, takto získaná koncentrace vycházela mírně vyšší 0,185%, což naznačuje přítomnost interferentů rušících měření.

## 8. Seznam použité literatury

- [1] J. STANĚK. *Alkaloidy*. 1. vydání. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1957.
- [2] M.F. ROBERTS, M. WINK (ed.). *Alkaloids – Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. 1. vydání. New York: Springer Science+Business Media, 1998. ISBN 978-1-4419-3263-1.
- [3] J. HAJŠLOVÁ a kolektiv. *Charakterizace alkaloidů a kanabinoidů v rostlinných produktech*. Studie: Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí, 2017.
- [4] Galegine. In: *en.wikipedia.org* [online]. 24. srpna 2021. [cit. 2022-03-15]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Galegine>
- [5] Meskalin. In: *wikiwand.com* [online]. [cit. 2022-03-15]. Dostupné z: <https://www.wikiwand.com/cs/Meskalin>
- [6] A. KOTYK. MikroRNA kontroluje příjem kokainu specifickou signalizací. In: *archiv.akademon.cz* [online]. 12. srpna 2010. [cit. 2022-03-15]. Dostupné z: <https://archiv.akademon.cz/Article/Detail?name=mikroRNA%20kontroluje%20prijem%20kokainu%20specifickou%20signalizaci&source=0810>
- [7] G.A. CORDEL. *Introduction to alkaloids*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1981. ISBN 0-471-03478-9.
- [8] J. BUCKINGHAM, K.H. BAGGALEY, A.D. ROBERTS, L.F. SZABÓ (ed.). *Dictionary of alkaloids*. 2. vydání. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2010. ISBN: 978-1-4200-7769-8.
- [9] A. KOTYK. Lidské buňky produkují morfin. In: *archiv.akademon.cz* [online]. 6. listopadu 2004 [cit. 2022-03-22]. Dostupné z: <https://archiv.akademon.cz/Article/Detail?name=Lidske%20bunky%20produkuji%20morfin&source=1104>
- [10] Biochemie:Alkaloidy. In: *mojechemie.cz* [online]. 3. listopadu 2011 [cit. 2022-04-01]. Dostupné z: <https://www.mojechemie.cz/Biochemie:Alkaloidy>
- [11] Echinopsine. In: *chemspider.com* [online]. [cit. 2022-04-10]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6491.html>
- [12] Gramine. In: *bertin-bioreagent.com* [online]. [cit. 2022-04-10]. Dostupné z: <https://www.bertin-bioreagent.com/pr99634/gramine>

- [13] Co je to nikotin a jak působí na naše tělo. In: *anamneza.cz* [online]. [cit. 2022-04-06]. Dostupné z: <https://www.anamneza.cz/Co-je-to-nikotin-a-jak-pusobi-na-nase-telo/clanek/87>
- [14] Berberin. In: *cs.wikipedia.org* [online]. 5. srpna 2021. [cit. 2022-03-26]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Berberin>
- [15] Betanin (red beet extract diluted with Dextrin). In: *chemimpex.com* [online]. [cit. 2022-03-26]. Dostupné z: <https://www.chemimpex.com/betanin-red-beet-extract-diluted-with-dextrin>
- [16] Compound summary Arecoline. In: *pubchem.ncbi.nlm.nih.gov* [online]. [cit. 2022-04-10]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Arecoline>
- [17] Y.-J. LIU, W. PENG, M.-B. HU, M. XU, Ch.-J. WU. The pharmacology, toxicology and potential applications of arecoline: a review. *Pharmaceutical Biology*, 2016, roč. 54, č. 11, str. 2753–2760.
- [18] Arecoline hydrobromide Chemical Properties. In: *activemotif.com* [online]. [cit. 2022-04-19]. Dostupné z: <https://www.activemotif.com/catalog/details/14132/arekoline-hydrobromide>
- [19] Arecoline hydrobromide Chemical Identifiers. In: *thermofisher.com* [online]. [cit. 2022-04-19]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/250130050>
- [20] Compound summary Arecoline hydrobromide. In: *pubchem.ncbi.nlm.nih.gov* [online]. [cit. 2022-04-19]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9301>
- [21] Arecoline hydrobromide Chemical Properties. In: *apexbt.com* [online]. [cit. 2022-04-19]. Dostupné z: <https://www.apexbt.com/arecoline-hydrobromide.html>
- [22] Arecoline hydrobromide. In: *go.drugbank.com* [online]. [cit. 2022-04-19]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/salts/DBSALT002647>
- [23] Areka obecná. In: *atlasrostlin.cz* [online]. [cit. 2022-04-20]. Dostupné z: <https://www.atlasrostlin.cz/exoticke-rostliny/areka-obecna>
- [24] Betelový ořech (areca catechu) – celé ořechy. In: *ladirna.cz* [online]. [cit. 2022-04-20]. Dostupné z: <https://ladirna.cz/eshop/betel-cely>
- [25] P. ŠINDELÁŘ. Etnografie Číny. 1. vydání. Brno: Nakladatelství Masarykovy univerzity, 2014. ISBN 978-80-210-7049-3.
- [26] TOPI PIGULA. Zbetelený v Barmě aneb čtvrtá nejužívanější droga světa na vlastní kůži. In: *zivotnacestach.cz* [online] 8. listopadu 2015. [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: <https://www.zivotnacestach.cz/zbeteleny-v-barme-aneb-ctvrta-nejuzivanejsi-droga-sveta-na-vlastni-kuzi/>

- [27] Žvýkání betelu zvyšuje riziko rakoviny dutiny ústní, varují lékaři. In: *tyden.cz* [online] 12. srpna 2015. [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: [https://www.tyden.cz/rubriky/zdravi/zvykani-betelu-zvysuje-riziko-rakoviny-dutiny-ustni-varuji-lekari\\_351681.html?showTab=diskutovane](https://www.tyden.cz/rubriky/zdravi/zvykani-betelu-zvysuje-riziko-rakoviny-dutiny-ustni-varuji-lekari_351681.html?showTab=diskutovane)
- [28] B.J. BOUCHER, N. MANNAN. Metabolic effects of the consumption of Areca catechu. *Addiction Biology*, 2002, roč. 7, str. 103-110.
- [29] F. BELAND a kolektiv. *Acrolein, Crotonaldehyde and Arecoline* [online]. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2021 [cit. 2022-04-27]. IARC Monographs Volume 128. ISBN: 978-92-832-0195-3. Dostupné z: <https://publications.iarc.fr/602>
- [30] R.A. BHISEY a kolektiv. *Betel-quid and Areca-nut Chewing and Some Areca-nut-derived Nitrosamines* [online]. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2004 [cit. 2022-04-27]. IARC Monographs Volume 85. ISBN: 978-92-832-1585-1. Dostupné z: <https://publications.iarc.fr/103>
- [31] N.G. OLIVEIRA, D.L. RAMOS, R.J. DINIS-OLIVEIRA. Genetic toxicology and toxicokinetics of arecoline and related areca nut compounds: an updated review. *Archives of Toxicology*, 2021, roč. 95, str. 375-393.
- [32] Y.-T. SHIN, P.S. CHEN, Ch.-H. WU, Y.-T. TSENG, Y.-Ch. WU, Y.-Ch. LO. Arecoline, a major alkaloid of the areca nut, causes neurotoxicity through enhancement of oxidative stress and suppression of the antioxidant protective systém. *Free Radical Biology & Medicine*, 2010, roč. 49, str. 1471-1479.
- [33] A.A. MARUTI, R. KHAMSITA, SUVEN, D. EDY MEIYANTO. Sinergisitas efek sitotoksik kombinasi arekolin dan doxorubicin pada sel kanker serviks HeLa. *Majalah Farmasi Indonesia*, 2011, roč. 22, č. 4, str. 265-272.
- [34] G.A. LORD, C.K. LIM, S. WARNAKULASURIYA, T.J. PETERS. Chemical and analytical aspects of areca nut. *Addiction Biology*, 2002, roč. 7, str. 99-102.
- [35] Ultrazvukové lázně. In: *labicom.cz* [online]. [cit. 2022-04-30]. Dostupné z: <https://www.labicom.cz/produkty/laboratorni-vybaveni/mechanicke-tepelne-operace/ultrazvukove-lazne>
- [36] V. KOTLAND. *Separace lipidů z buněčných tkání*, 2019. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie materiálů. Diplomová práce.
- [37] D. DUTTA, C. RAMANNA, V.V. KAMATH. Estimation of arecoline content of various forms of areca nut preparations by high-pressure thin-layer chromatography. *Journal of Advanced Clinical & Research Insights*, 2017, roč. 4, str. 31-37.

- [38] Ch. JANTARAT, P. SIRATHANARUN, W. SONGSERM, W. SRINORNATE, S. DAENGPROM. A Simple and Rapid HPLC Technique for Determination of Arecoline in Areca Nut (*Areca catechu* L.) Extract. *Walailak J Sci & Tech*, 2013, roč. 10, č. 1, str. 57-66.
- [39] N. N. N. A. RAHMAN, M.Z.I. SARKER, W. SETIANTO, F.M. OMAR, J.H. AKANDA, M.O.A. KADIR. Optimization of Arecoline Extraction from Areca Nut Using Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2010, roč.18, č. 1, str. 1-7.
- [40] A. ABOUNASSIF, B. M. AL-HADIYA, G. A. E. MOSTAFA. PVC matrix membrane sensors for potentiometric determination of arecoline. *Instrumentation Science and Technology*, 2010, roč. 38, str. 165-177.
- [41] H. DAI, S. ZHANG, G. XU, L. GONG, M. FU, X. LI, S. LU, Ch. ZENG, Y. JIANG, Y. LINAB, G. CHEN. A sensitive arecoline photoelectrochemical sensor based on graphitic carbon nitride nanosheets activated by carbon nanohorns. *RSC Advances*, 2014, roč. 4, str. 11099–11102.
- [42] V. JAIN, A. GARG, M. PARASCANDOLA, P. CHATUVEDI, S.S. KHARIWALA, I. STEPANOV. Analysis of Alkaloids in Areca Nut-Containing Products by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, roč. 65, str. 1977-1983.
- [43] M.J. HAYES, L. KHEMANI, M. BAX, D. ALKALAY. Quantitative Determination of Arecoline in Plasma by Gas Chromatography Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Biomedical and environmental mass spektrometry*, 1989, roč. 18, str. 1005-1009.
- [44] Q. XIANG, Y. GAO, B. HAN, J. LI, Y. XU, J. YIN. Determination of arecoline in areca nut based on field amplification in capillary electrophoresis coupled with electrochemiluminescence detection. *Luminescence*, 2013, roč. 28, str. 50-55.
- [45] A. SRIMANY, Ch. GEORGE, H.R. NAIK, D. G. PINTO, N. CHANDRAKUMAR, T. PRADEEP. Developmental patterning and segregation of alkaloids in areca nut (seed of *Areca catechu*) revealed by magnetic resonance and mass spectrometry imaging. *Phytochemistry*, 2016, roč. 125, str. 35-42.
- [46] T. MIKYSEK, M. STOČES, I. ŠVANCARA, K. VYTRÁS. Možnosti charakterizace uhlíkových pastových elektrod. *Chemické listy*, 2014, roč. 108, str. 513-518.
- [47] I. ŠVANCARA, K. VYTRÁS, K. KALCHER, A. WALCARIUS, J. WANG. Carbon Paste Electrodes in Facts, Numbers, and Notes: A Review on the Occasion of the 50-

Years Jubilee of Carbon Paste in Electrochemistry and Electroanalysis, *Electroanalysis*, 2009, roč. 21, č. 1, str. 7-28.

- [48] I. ŠVANCARA, A. WALCARIUS, K. KALCHER, K. VYTRÁS. Carbon paste electrodes in the new millennium. *Central European Journal of Chemistry*, 2009, roč. 7, č. 4, str. 598-656.
- [49] K. KOLESÍKOVÁ. *Voltametrické stanovení kapsaicinu pomocí uhlíkových pastových elektrod*, 2014. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra analytické chemie. Diplomová práce.
- [50] W.E. VAN DER LINDEN, J.W. DIEKER. Glassy carbon as electrode material in electroanalytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, 1980, roč. 119, str. 1-24.
- [51] R.L. McCREERY. Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry, *Chemical Reviews*, 2008, roč. 108, str. 2646-2687.
- [52] X. LI, H. ZHAO, L. SHI, X. ZHU, M. LAN, Q. ZHANG, Z.H. FAN. Electrochemical sensing of nicotine using screen-printed carbon electrodes modified with nitrogen-doped graphene sheets. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2017, č. 784, str. 77–84.