

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie



Diplomová práce

Vývoj HPLC metody pro analýzu potravních doplňků na bázi extraktu berberinu

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Jan Zíka

Rád bych poděkoval vedoucímu mé práce prof. RNDr. Daliboru Šatínskému, Ph.D. za odborné vedení, konzultace a cenné rady, čímž významnou měrou přispěl k dokončení této práce. Dále bych touto cestou chtěl poděkovat své rodině za nenahraditelnou podporu v průběhu celého studia.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Jan Zíka

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Jan Zíka

Vedoucí práce: prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj HPLC metody pro analýzu potravních doplňků na bázi extraktu berberinu

V této práci byla vyvinuta a validována HPLC metoda stanovení berberinu a jeho příbuzných isochinolinových alkaloidů aromolinu, berbaminu, magnoflorinu, tetrahydropalmatinu, jatrorrhizinu, palmatinu, tetrahydroberberinu a oxyberberinu. Metoda byla následně aplikována na stanovení příslušných analytů v potravních doplňcích Allnature Berberin 98% extrakt, Ostrovit Berberin, Swanson Berberin a GreenFood Berberine.

K chromatografické analýze byla použita kolona Ascentis® Express AQ-C18 (150 x 4,6 mm, velikost částic 2,7 μm) za použití mobilní fáze acetonitril/0,085% vodný roztok kyseliny fosforečné. Rychlost průtoku mobilní fáze činila 1 ml/min s nástřikovým objemem vzorku 5 μl a teplotou v kolonovém prostoru o hodnotě 30 °C. Režim analýzy byl gradientový a detekce probíhala DAD detektorem při vlnových délkách 225 a 345 nm.

Klíčová slova: HPLC, berberin, aromolin, magnoflorin, berbamin, palmatin, tetrahydropalmatin, jatrorrhizin, tetrahydroberberin, oxyberberin, potravní doplněk

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Jan Zíka

Supervisor: prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Title of the diploma thesis: Development of HPLC method for analysis of food supplements based on berberine extract

In this diploma thesis, an HPLC method for the determination of berberine and its related isoquinoline alkaloids aromoline, berbamine, magnoflorine, tetrahydropalmatine, jatrorrhizine, palmatine, tetrahydroberberine and oxyberberine was developed and validated. The method was subsequently applied to the determination of the relevant analytes in the food supplements Allnature Berberin 98% extract, Ostrovit Berberin, Swanson Berberin and GreenFood Berberine.

An Ascentis® Express AQ-C18 (150 x 4.6 mm, particle size 2.7 µm) analytical column was used for chromatography analysis, using an acetonitrile/0.085% aqueous solution of phosphoric acid mobile phase. The flow rate of mobile phase was 1 ml/min with a sample injection volume of 5 µl and a column temperature of 30 °C. The gradient elution was used for analysis and detection was performed with a DAD detector at wavelengths of 225 and 345 nm.

Key words: HPLC, berberine, aromoline, magnoflorine, berbamine, palmatine, tetrahydropalmatine, jatrorrhizine, tetrahydroberberine, oxyberberine, food supplement

Obsah

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Seznam použitých zkratek | 9 |
| 2 | Úvod | 10 |
| 3 | Cíl a popis zadání práce | 11 |
| 4 | Teoretická část | 12 |
| 4.1 | Isochinolinové alkaloidy | 12 |
| 4.1.1 | Berberin | 12 |
| 4.1.2 | Jatrorrhizin | 14 |
| 4.1.3 | Palmatin | 14 |
| 4.2 | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC | 15 |
| 4.3 | Chromatografické kolony | 17 |
| 4.3.1 | Kolona Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 4,6 mm, 2,7 µm, Supelco Analytical | 17 |
| 4.4 | Možnosti stanovení berberinu a příbuzných alkaloidů | 19 |
| 5 | Experimentální část | 22 |
| 5.1 | Použité přístroje a pomůcky | 22 |
| 5.2 | Použité standardy a chemikálie | 23 |
| 5.3 | Použité vzorky | 24 |
| 5.4 | Příprava vzorků | 24 |
| 5.4.1 | Berberin 98% extrakt 500 mg Allnature | 24 |
| 5.4.2 | Ostrovit Berberin 90 tablet | 25 |
| 5.4.3 | Swanson Berberin 60 kapslí | 25 |
| 5.4.4 | GreenFood Berberine 60 kapslí | 25 |
| 5.5 | Příprava roztoků | 26 |
| 5.5.1 | Příprava mobilní fáze | 26 |
| 5.5.2 | Příprava zásobních roztoků standardů | 26 |
| 5.5.3 | Příprava pracovních roztoků standardů | 26 |
| 5.5.4 | Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu | 26 |
| 5.5 | Parametry měření | 27 |
| 5.6 | Parametry hodnocení metody | 28 |
| 6 | Výsledky a diskuze | 29 |
| 6.1 | Optimalizace metody | 29 |
| 6.1.1 | Volba průběhu gradientu | 29 |
| 6.1.2 | Volba vlnové délky | 30 |
| 6.1.2.1 | Absorpční spektrum aromolin | 31 |
| 6.1.2.2 | Absorpční spektrum magnoflorin | 32 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 6.1.2.3 | Absorpční spektrum berbamin | 32 |
| 6.1.2.4 | Absorpční spektrum tetrahydropalmin | 33 |
| 6.1.2.5 | Absorpční spektrum jatrorrhizin | 33 |
| 6.1.2.6 | Absorpční spektrum tetrahydroberberin | 34 |
| 6.1.2.8 | Absorpční spektrum berberin | 35 |
| 6.1.2.9 | Absorpční spektrum oxyberberin | 35 |
| 6.1.2.10 | Absorpční spektrum ethylparaben | 36 |
| 6.1.3 | Volba vnitřního standardu | 36 |
| 6.1.4 | Volba chromatografické kolony a mobilní fáze | 37 |
| 6.1.4.1 | Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm, methanol/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce | 37 |
| 6.1.4.2 | Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce | 38 |
| 6.1.4.3 | YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 5 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce | 38 |
| 6.1.4.4 | YMC Carotenoid 150 x 4,6 mm, 5 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce | 39 |
| 6.1.4.5 | YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 3 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce | 39 |
| 6.1.4.6 | YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm, 3 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce | 40 |
| 6.1.4.7 | Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 4,6 mm, 2,7 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce | 40 |
| 6.1.4.8 | Kinetex® 2,6 µm XB-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce | 41 |
| 6.1.4.9 | Luna® Omega 5 µm Polar C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 5 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce | 41 |
| 6.1.4.10 | Kinetex® 2,6 µm EVO-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce | 42 |
| 6.1.5 | Optimální nastavení pro HPLC analýzu | 44 |
| 6.2 | Validace vyvinuté metody | 45 |
| 6.2.1 | Test způsobilosti chromatografického systému | 45 |
| 6.2.2 | Linearita | 45 |
| 6.2.2.1 | Kalibrační závislost aromolin | 46 |
| 6.2.2.2 | Kalibrační závislost magnoflorin | 47 |
| 6.2.2.3 | Kalibrační závislost berbamin | 48 |
| 6.2.2.4 | Kalibrační závislost THP | 49 |
| 6.2.2.5 | Kalibrační závislost jatrorrhizin | 50 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 6.2.2.7 | Kalibrační závislost palmatin..... | 51 |
| 6.2.2.8 | Kalibrační závislost berberin | 52 |
| 6.2.2.9 | Kalibrační závislost THB..... | 53 |
| 6.2.2.10 | Kalibrační závislost oxyberberin..... | 54 |
| 6.2.3 | Opakovatelnost | 55 |
| 6.2.4 | Přesnost | 57 |
| 6.2.5 | Správnost | 57 |
| 6.2.6 | Limit detekce a kvantifikace | 58 |
| 6.3 | Stanovení obsahu účinných látek v potravních doplňcích..... | 59 |
| 6.3.1 | Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Allnature Berberin 98% extrakt | 60 |
| 6.3.2 | Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Ostrovit Berberin | 60 |
| 6.3.3 | Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Swanson Berberin..... | 61 |
| 7 | Závěr | 63 |
| 8 | Seznam použité literatury | 65 |
| 9 | Seznam tabulek | 69 |
| 10 | Seznam obrázků..... | 70 |

1 Seznam použitých zkratek

| | |
|-------|--|
| As | - asymetrie chromatografických píků |
| ACN | - acetonitril |
| DAD | - diode array detector |
| EP | - ethylparaben |
| GC | - plynová chromatografie |
| HPLC | - vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| MeOH | - methanol |
| M_w | - molekulová hmotnost |
| n_p | - kapacita separace |
| PTFE | - polytetrafluoroethylen |
| R_s | - rozlišení chromatografických píků |
| t_r | - retenční čas |
| RSD | - relativní směrodatná odchylka |
| SD | - směrodatná odchylka |
| SPP | - povrchově porézní částice |
| THB | - tetrahydroberberin |
| THP | - tetrahydropalmitin |
| TLC | - tenkovrstvá chromatografie |
| w_h | - šířka píku v polovině jeho výšky |

2 Úvod

Berberin je zástupcem isochinolinových alkaloidů z protoberberinové podskupiny s tisíciletou historií užívání již od dob počátků čínské a ajurvédské medicíny. Spolu s dalšími isochinolinovými alkaloidy je součástí rostlinného extraktu, anebo je průmyslově vyráběn chemickou syntézou.

Berberin vykazuje protizánětlivé, antioxidační, neuroprotektivní, nefroprotektivní a hepatoprotektivní vlastnosti. Dnes ho najdeme jako součást potravních doplňků, které deklarují jeho příznivé účinky na kardiovaskulární systém a příznivý vliv na funkci jater.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je jedna z nejpoužívanějších analytických technik, která se využívá při analýze léčiv a potravních doplňků. Je nejrozšířenější a nejvýhodnější metodou, jež je schopná přítomné analyty identifikovat a stanovit jejich obsah v příslušném vzorku.

V této práci byla vyvinuta metoda pro stanovení nejen protoberberinového alkaloidu berberinu, ale i jeho příbuzných isochinolinových alkaloidů aromolinu, magnoflorinu, berbaminu, jatrorrhizinu, tetrahydropalmatinu, palmatinu, tetrahydroberberinu a oxyberberinu. Metoda byla použita na stanovení berberinu a příbuzných látek v doplňcích stravy deklarujících jeho obsah, a to jmenovitě v přípravcích Allnature Berberin 98% extrakt, Ostrovit Berberin, Swanson Berberin a GreenFood Berberine. Výsledky těchto měření se nachází v experimentální části práce spolu s optimalizací a validací metody.

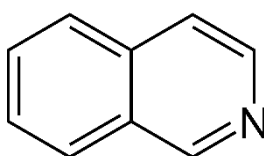
3 Cíl a popis zadání práce

Cílem diplomové práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat HPLC metodu pro analýzu potravních doplňků na bázi extraktu berberinu. Berberin je alkaloid z protoberberinové skupiny isochinolinových alkaloidů. Do isochinolinových alkaloidů se mimo jiné řadí také alkaloidy aromolin, magnoflorin, berbamin, tetrahydropalmatin, jatrorrhizin, palmatin, tetrahydroberberin a oxyberberin, pro jejichž identifikaci a kvantifikaci byla metoda rovněž vyvinuta. Následně bylo cílem aplikovat vyvinutou separační metodu na analýzu vybraných potravních doplňků s deklarovaným obsahem berberinu dostupných jak v kamenných lékárnách v České republice, tak v internetových obchodech a zjistit, v jaké koncentraci je berberin obsažen, a zda se v nich nevyskytují i jiné další alkaloidy než deklarovaný berberin.

4 Teoretická část

4.1 Isochinolinové alkaloidy

Isochinolinové alkaloidy jsou jedny z nejpočetnějších látek sekundárního metabolismu rostlin. Prekurzorem pro syntézu isochinolinových alkaloidů je aminokyselina tyrosin, resp. fenylalanin [1]. Lze je dělit do mnoha podskupin, v nichž je isochinolinová struktura základním stavebním kamenem [2]. Mezi podskupiny patří mimo jiné např. typ benzyloisochinolinový, bisbenzyloisochinolinový, aporfinový, morfinanový, protoberberinový či emetinový [1,3]. Do protoberberinového typu kromě berberinu patří také palmatin a jatrorrhizin [1]. Do typu aporfinového řadíme mimo jiné magnoflorin, do bisbenzyloisochinolinového pak mimo jiné berbamin a aromolin [4,5,6]. Oxyberberin a tetrahydroberberin jsou metabolity berberinu, tetrahydropalmatin je pak metabolit palmatinu.



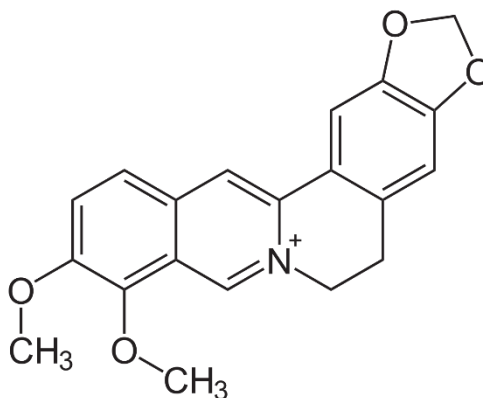
Obrázek 1: Základní struktura isochinolinových alkaloidů [7]

4.1.1 Berberin

Sumární vzorec: $C_{20}H_{18}NO_4^+$

Registrační číslo CAS: 633-65-8

M_w : 336,4 g/mol [8]



Obrázek 2: Molekulový vzorec berberinu [9]

Berberin je isochinolinový alkaloid proberberinového typu. Byl popsán v roce 1826, avšak má 3000 let dlouhou historii užívání jako součást čínské a ajurvédské medicíny [10, 11]. Objevuje se jako aktivní složka hlavně v kořenové kůře rostlin, kde je zpravidla nejvíce zastoupený. Dále se pak nachází v kůře nadzemních orgánů, kde je však již jeho koncentrace nižší. V listech a plodech alkaloid zpravidla nenajdeme, nebo je jeho přítomnost zanedbatelná [24]. Berberin je zastoupen v mnoha léčivých rostlinách, jako příklady můžeme uvést *Berberis vulgaris* – dřišťál obecný, *Berberis aristata* – dřišťál osinatý, *Berberis aquifolium* – mahónie cesmínolistá, *Hydrastis canadensis* – vodilka kanadská či *Coptis chinensis* – koptis čínský. Tento alkaloid je však v dnešní době také průmyslově vyráběn, a to chemickou syntézou. Vzhledově je berberin žlutým práškem bez zápachu. Je špatně rozpustný až nerozpustný ve vodě a dobře rozpustný v methanolu. Proto se při jeho extrakci používá hlavně methanol [10].

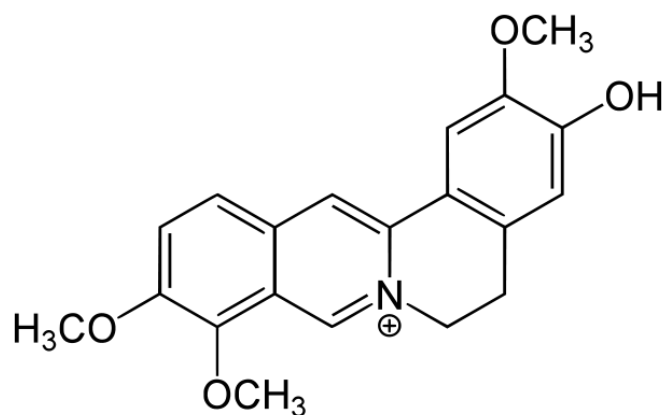
Jak již bylo zmíněno, berberin má bohatou historii užívání již od dob vzniku čínské a ajurvédské medicíny [10]. Nyní najdeme berberin na pultech lékáren jako součást některých rostlinných přípravků z řad potravních doplňků, které deklarují účinnost na kardiovaskulární systém, ovlivnění hladiny cholesterolu v krvi či podporu funkce jater [12]. Co se týče farmakokinetiky berberinu, začneme-li u absorbce, zjistíme, že to je jedna z jeho hlavních nevýhod. Jelikož se špatně rozpouští ve vodě, je jeho perorální dostupnost nízká. Jeho distribuce probíhá hlavně do tkání, v krvi se vyskytuje méně než 1 % absorbovaného berberinu. Nejvíce se berberin dostává do jater, ledvin, svalů, mozku, srdce a slinivky břišní. Metabolismus berberinu probíhá v játrech. Většina berberinu a jeho metabolitů se pak vylučuje z těla močí. V preklinických studiích berberin prokázal svůj antimikrobní, antioxidační, protizánětlivý, neuroprotektivní, nefroprotektivní a hepatoprotektivní efekt. Podle několika klinických studií má berberin potenciální biologickou aktivitu hned na několik onemocnění. Mezi hlavní patří metabolický syndrom, kde se prokázal antihyperlipidemický efekt a vliv na insulinovou rezistenci, dále hypoglykemický a hypolipidemický efekt v terapii diabetes mellitus, vliv na srdeční arytmií, terapie průjmu a doplňková terapie při onkologických onemocněních [10].

4.1.2 Jatrorrhizin

Sumární vzorec: $C_{20}H_{20}NO_4^+$

Registrační číslo CAS: 3621-38-3

M_w : 338,4 g/mol [13]



Obrázek 3: Molekulový vzorec jatrorrhizinu [14]

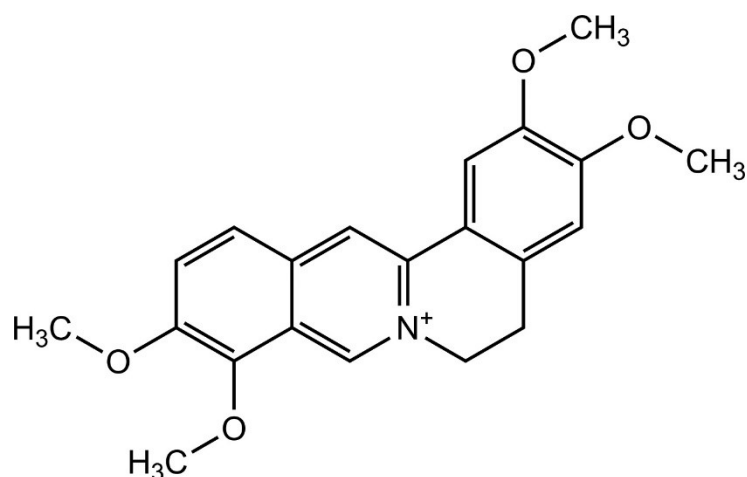
Jatrorrhizin je alkaloid protoberberinového typu nacházející se například v čeledi Annonaceae nebo právě v dřívěšálu obecném (*Berberis vulgaris*) společně s berberinem, palmatinem a jinými alkaloidy [15,3]. Užívá se jako jedna z účinných látek v přípravcích tradiční čínské medicíny [16]. Studie na potkanech prokázali aktivitu jatrorrhizinu na adrenergní systém, a to blokací α_1 a α_2 receptorů s následným antihypertenzním účinkem. Dále se při studiích ukázalo, že má inhibiční efekt na MAO-A a MAO-B receptory. In vitro studie na králičích trombocytech prokázaly i jeho antiagregační schopnosti [15].

4.1.3 Palmatin

Sumární vzorec: $C_{21}H_{22}NO_4^+$

Registrační číslo CAS: 3486-67-7

M_w : 352,4 g/mol [17]



Obrázek 4: Molekulový vzorec palmatinu [18]

Palmatin je alkaloid protoberberinového typu, stejně jako výše zmíněný jatrorrhizin s berberinem. Nachází se v přípravcích čínské medicíny, a to jako sekundární metabolit rostlin, jako je například dřevitál obecný (*Berberis vulgaris*) či chebule srdčitá (*Tinospora cordifolia*) [19,3]. V nedávné době proběhlo několik studií, které zkoumaly farmakologické vlastnosti tohoto alkaloidu. Prokázal se jeho neuroprotektivní efekt a s tím i potenciál využití palmatinu jako léčiva na neurodegenerativní onemocnění, jako je Alzheimerova choroba. Palmatin dále vykazuje hypolipidemický, protizánětlivý, antibakteriální a cytostatický efekt. Velká část studií ale také poukazuje na jeho nežádoucí účinky, zejména vliv na enzymatický metabolismus a významná DNA toxicita [19].

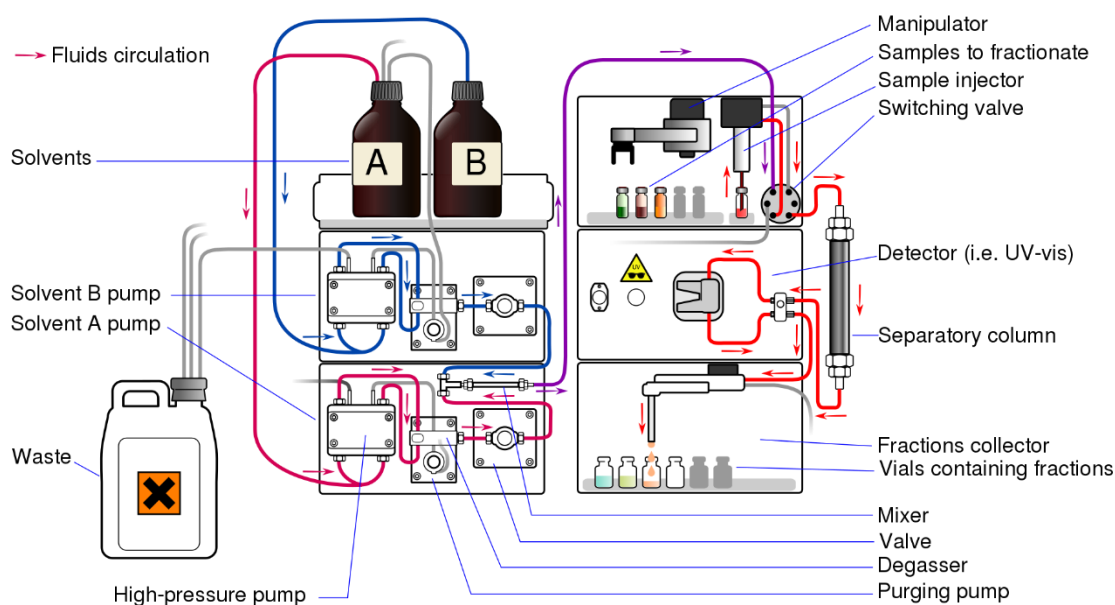
4.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie – HPLC

Vysokoučinná kapalinová chromatografie – High Performance Liquid Chromatography (HPLC) je v dnešní době jednou z nejprogressivnějších analytických technik. Je to velmi dobře zavedená metoda, která je při správném používání robustní, s velkou životností vlastního systému i jednotlivých komponent [20]. Jedná se o separační metodu umožňující analýzu směsí s možností kvalitativního a také kvantitativního hodnocení separovaných složek směsi. Své uplatnění nachází ve všech oblastech analýzy léčiv [21].

Chromatografické metody využívají dělení analyzovaných látek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna fáze je stacionární – nepohyblivá, a druhá je mobilní – pohyblivá. Podle

charakteru mobilní fáze můžeme chromatografické metody rozčlenit na plynovou chromatografii (GC), kde se jako mobilní fáze využívá inertní plyn, a kapalinovou, kde je mobilní fází kapalina. Kapalinová chromatografie může být uspořádána jak v kolonovém uspořádání, kam patří HPLC a UHPLC, tak v uspořádání plošném, kam spadá tenkovrstvá chromatografie (TLC). V průběhu chromatografického procesu dochází k postupnému, mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů a distribuci dělených látek mezi stacionární a mobilní fází [21]. Aby docházelo k distribuci látek směsi, musí existovat fázové rozhraní mezi mobilní a stacionární fází [22]. Dochází k vzájemným interakcím, které jsou základním předpokladem pro úspěšnou separaci. K separaci dochází na základě afinity dělených látek k jednotlivým fázím. Mezi hlavní přednosti HPLC patří rychlost a celková citlivost analýzy, která je však daná typem použitého detektoru, spotřeba minimálního množství vzorku a automatizace procesu analýzy [21].

Vývoj a optimalizace metody je volba takových chromatografických podmínek, aby látky ve směsi byly dokonale separovány a přesně detekovány za co nejkratší čas. Při vývoji a optimalizaci jsou obvykle realizovány následující kroky: analýza fyzikálně-chemických vlastností analytu, určení cíle metody, výběr detekce analytů, volba separačního módu, volba stacionární a mobilní fáze, předběžné experimenty s využitím standardních látek, volba metody či případné extrakce pro přípravu a úpravu vzorků, optimalizace a v neposlední řadě validace metody [20].



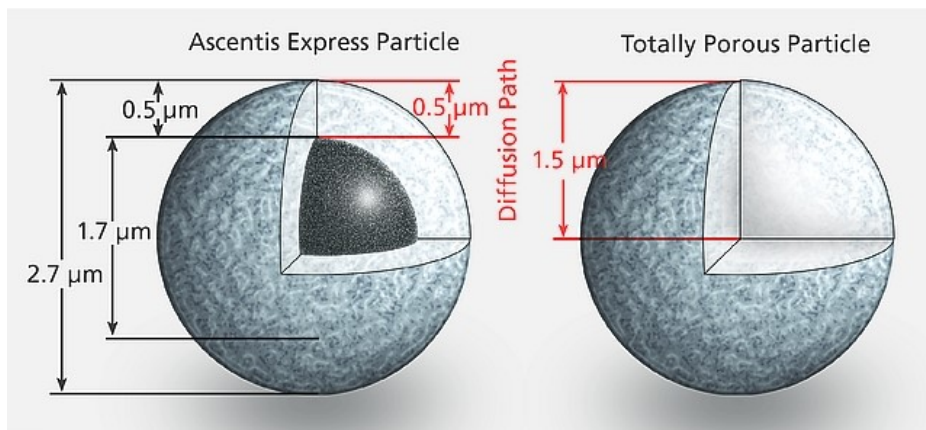
Obrázek 5: Obecné schéma kapalinového chromatografu [23]

4.3 Chromatografické kolony

Chromatografické kolony jsou ocelové či plastové v případě monolitických kolon, dříve také skleněné, trubice o různé délce a průměru. Kolony pro HPLC analýzu dosahují délky od 5 do 30 cm a šířky 2,1 – 4,6 mm. Nejčastěji používané délky jsou však od 5 do 15 cm. V současné době dochází ke zmenšování délek a průměrů kolon, což umožňuje snížit spotřebu vzorku nutného k analýze a zároveň i mobilní fáze. Zmenšením průměru kolon dochází ke snížení difuze během separace, což zvyšuje odezvu ostře fokusované zóny analytu na detektoru. Separační účinnost samotné kolony závisí na několika faktorech, jako je již zmiňovaná délka a šířka kolony, použitá stacionární fáze, vnitřní úprava a zejména velikost částic sorbentu [25]. Náplň kolony musí nutně být homogenní a rovnoměrná [26]. V tomto směru mohou být zajímavé monolitické kolony, které jsou tvořeny jedním kusem vysoce čištěného polymerního silikagelu. V závislosti na chemických vlastnostech studované látky, tedy hlavně na jejich polaritě, můžeme vybírat ze stacionárních fází klasických, reverzních či chirálních. V dnešní době je většina chromatografických kolon dostupných na trhu silikagelové povahy, objevují se však i alternativy na bázi zirkonových, titaniových a jiných polymerů [25,27].

4.3.1 Kolona Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 4,6 mm, 2,7 µm, Supelco Analytical

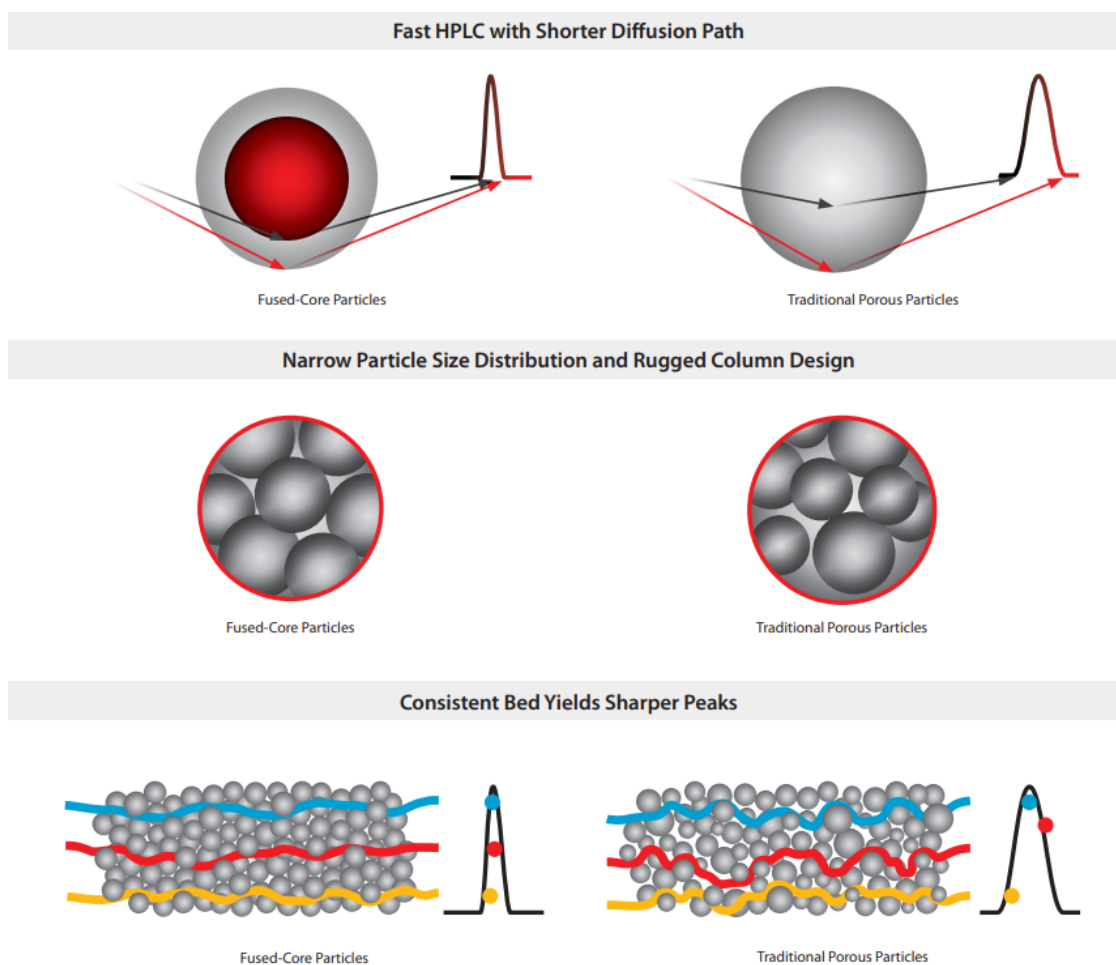
Tato kolona pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii je vyráběna za pomoci technologie Fused-Core® [28]. Ta umožňuje speciální design částic nacházejících se v kolonovém prostoru. Technologie byla poprvé představena v roce 2006 společností Advanced Materials Technology, Inc. a přinesla velkou změnu do světa vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Změna spočívá v rozdílném přístupu při přípravě částic, který by byl nejvíce patrný při provedení pomyslného příčného řezu částic. Klasické částice by na takovémto řezu byly jednodité z jednoho druhu materiálu, a to nejčastěji z porézního silikagelu. Částice s využitím Fused-Core® technologie (také nazývané jako core-shell, resp. porous-shell, obecně známé pod pojmem povrchově porézní částice - SPP) mají v centru pevné jádro a na jeho povrchu tenký porézní plášť [29,30].



Obrázek 6: Srovnání povrchově porézní částice a celkově porézní částice [31]

Hlavní výhodou této úpravy je velmi vysoká účinnost kolon pracujících při nízkých zpětných tlacích. Vysoká účinnost separace je dosažena zejména díky nižšímu rozmytí zóny separovaného analytu, jehož dráha neprochází skrze celou částici, ale obtéká rigidní jádro tak, jak je znázorněno na obrázku níže. Mezi příčiny zachování nízkých zpětných tlaků patří velmi nízké odchylky velikostí mezi jednotlivými částicemi a s tím spojená jejich vyšší hustota v kolonovém prostoru. V neposlední řadě tato kolona skýtá i spotřebitelskou výhodu, a to takovou, že není nutné modernizovat laboratorní přístrojové vybavení o chromatografické přístroje s vyšším provozním tlakem. Tento typ kolon má díky Fused-Core® technologii stejnou účinnost i při větších průměrech částic jako kolony s klasickou technologií s menším průměrem klasických částic [29].

Konkrétně pro tuto kolonu použitou při vývoji metody to znamená, že se s částicemi o velikosti 2,7 µm pracuje se stejnou účinností jako u kolony s celkově porézními částicemi o velikosti 2 µm při zachovaném pracovním kolonovém tlaku. AQ-C18 modifikace je úprava kolony, kde je inkorporováno malé množství polárního silanu, který koloně dodává odolnost proti vysychání. To dovoluje využití mobilních fází s velmi vysokým zastoupením (až 100%) vodné fáze [32].



Obrázek 7: Praktický vliv technologie SPP na průběh separace v porovnání s celkově porézními částicemi [33]

4.4 Možnosti stanovení berberinu a příbuzných alkaloidů

V následující tabulce se nachází výčet vybraných prací, ve kterých jsou uvedeny podmínky separace berberinu a příbuzných sloučenin. Většinou se jedná o chromatografické stanovení přímo z rostlinných drog nebo jejich extraktů za použití DAD detektoru, případně MS detektoru.

Tabulka 1: Přehled vybraných stanovení berberinu a příslušných alkaloidů

| Vzorek | Stanovované látky | Mobilní fáze | Detekce | Chromatografické kolony | Zdroj |
|---|--|---|-----------|---|-------|
| „YIQING“ kapsle, směs drog | berberin, aloemodin, rhein, emodin, chrysophanol, baicalin, baicalein, wogonin | KH_2PO_4 , 0,02% H_3PO_4 ve vodě + methanol | DAD | Lichrospher C_{18} (250 × 4,6 mm, 5 μm) | [34] |
| Potkaní plasma po podání tradiční Jinqi Jiangtang (JJT) tablety | neochlorogenová kys., chlorogenová kys., kryptochlorogenová kys. ferulová kys., berberin, epiberberin, koptisin, magnoflorin, berberubin, palmatin, jatrorrhizin | 0,1% HCOOH vodný roztok + ACN | ESI-MS/MS | Agilent Eclipse plus C_{18} (100 × 4,6 mm, 1,8 μm) | [16] |
| Wen-Qing-Yin tradiční čínská medicína složená ze 6 drog | berberin, bajkalin, ferulová kys., geniposid, hydroxymethoxyfurfural, paeoniflorin | 0,1% HCOOH vodný roztok + ACN | DAD | Cosmosil 5C18-AR-II (150 × 4,6 mm, 5 μm , Nacalai USA, Inc., Kyoto, Japan) | [35] |
| Sušená bylina Berberis aristata, její extrakt a ajurvédská léčivá forma | berberin | KH_2PO_4 vodný roztok (pH 2,5) + ACN | DAD | Zorbax ODS II (250 × 4,6 mm, 5 μm) | [36] |

| | | | | | |
|--|---|--|-----|--|------|
| Sušený stonek Tinospora cordifolia a Tinospora sinensis | berberin | Voda + ACN | DAD | Phenomenex Luna C-18 (250 × 4,6 mm, 5 μm) | [37] |
| Rostlinný materiál, sušené drogy | sanguinarin, berberin, protopin, chelidonin | CH ₃ COONH ₄ , octová kys. vodný roztok (pH 3,0) + ACN | DAD | BEH C18 (100 × 2,1 mm, 1,7 μm) | [38] |
| Tinktura Jiejia | katechin, baicalin, berberin | 0,3% H ₃ PO ₄ vodný roztok + ACN | DAD | Kromasil C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm) | [39] |
| Hydrastis canadensis – sušená droga, extrakt a potravní doplněk | hydrastin, berberin | NH ₄ HCO ₂ / HCOOH vodný roztok + ACN | UV | Zorbax Eclipse XDB-C18, (150 × 4,6 mm, 3,5 μm) | [40] |
| Tinktura | berberin | 0,1% CF ₃ COOH vodná váže + ACN | UV | Kromosil (250 × 4,6 mm, 5 μm) | [41] |
| Kapsle s obsahem berberinu a trimethoprimu | berberin, trimethoprim | KH ₂ PO ₄ /H ₃ PO ₄ vodný roztok (pH 3) + ACN | DAD | Agilent TC-C18, (250 × 4,6 mm, 5 μm) | [42] |

5 Experimentální část

5.1 Použité přístroje a pomůcky

Tabulka 2: Přehled použitých přístrojů a pomůcek

| | |
|---------------------------------|--|
| Chromatografická sestava | Shimadzu LC-10 |
| Pumpy | LC-10 AD VP |
| Degasser | FCV-10 AL VP |
| Autosampler | SIL-HTA |
| Termostat kolony | CTO-10 AC VP |
| Detektor | DAD detektor SPD-M10A VP |
| Vyhodnocovací software | LC LabSolution |
| Kolony | 1. Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm Supelco Analytical |
| | 2. YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 5 µm YMC CO., LTD. |
| | 3. YMC Carotenoid 150 x 4,6 mm, 5 µm YMC CO., LTD. |
| | 4. YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 3 µm YMC CO., LTD. |
| | 5. YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm, 3 µm YMC CO., LTD. |
| | 6. Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 4,6 mm, 2,7 µm Supelco Analytical |

| | |
|---------------------------|---|
| | 7. Kinetex® 2,6 µm XB-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm Phenomenex® |
| | 8. Luna® Omega 5 µm Polar C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 5 µm Phenomenex® |
| | 9. Kinetex® 2,6 µm EVO-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm Phenomenex® |
| Analytické váhy | Sartorius Secura 225D-1CEU |
| Ultrazvuková lázeň | Bandelin Sonorex RK100 |
| pH metr | pH metr SCHOTT |
| Pipety | Brand |
| Ostatní pomůcky | - PTFE filtry o velikosti pórů 0,22 µm - Jednorázové injekční stříkačky 3ml Omnifix®, Braun - Laboratorní sklo a pomůcky |

5.2 Použité standardy a chemikálie

Standardy:

- Berberin 91% (HWI Group)
- Palmatin 97% (Sigma Aldrich)
- Magnoflorin ≥ 98% (Sigma Aldrich)
- Jatrorrhizin ≥ 98% (ChemFaces)
- Tetrahydroberberin ≥ 98% (ChemFaces)
- Tetrahydropalmatin ≥ 90% (zapůjčeno z Katedry farmaceutické botaniky)
- Aromolin ≥ 90% (zapůjčeno z Katedry farmaceutické botaniky)
- Berbamin ≥ 90% (zapůjčeno z Katedry farmaceutické botaniky)
- Oxyberberin ≥ 90% (zapůjčeno z Katedry farmaceutické botaniky)
- Ethyl-4-hydroxybenzoát 99% (Sigma Aldrich)

Chemikálie:

- Acetonitril Gradient grade $\geq 99,9\%$ (Fischer Scientific)
- Methanol Gradient grade 100% (VWR Chemicals)
- Kyselina o-fosforečná 85% (Penta)
- Ultračistá voda (čištěná systémem Milli-Q)

5.3 Použité vzorky

Tabulka 3: Přehled zkoumaných přípravků

| Název přípravku | Výrobce | Deklarovaný obsah |
|--|-----------|--|
| Berberin 98% extrakt 500 mg 60 kapslí | Allnature | 500 mg berberinu v 1 kapsli |
| Ostrovit Berberin 90 tablet | Ostrovit | 500 mg extraktu (10 mg berberinu) v 1 tabletě |
| Swanson Berberin 60 kapslí | Swanson | 400 mg berberinu v 1 kapsli |
| GreenFood Berberine 60 kapslí | GreenFood | 250 mg berberinu v 1 kapsli |

5.4 Příprava vzorků

5.4.1 Berberin 98% extrakt 500 mg Allnature

Z homogenní směsi vzorku z pěti kapslí přípravku bylo naváženo 40 mg vzorku do každé ze 3 extrakčních zkumavek. Ke vzorku bylo přidáno 10 ml MeOH s vnitřním standardem. Následovalo 15 minut extrakce v ultrazvukové lázni. Vyextrahovaný vzorek byl poté pomocí injekčních stříkaček přefiltrován přes PTFE filtry o velikosti pórů 0,22 μm do skleněných vialek. Finální koncentrace IS ve vzorku byla 50 $\mu\text{g/ml}$.

5.4.2 Ostrovit Berberin 90 tablet

Tablety tohoto přípravku byly nejprve rozdrceny a zhomogenizovány pomocí laboratorní třecí misky. Z takto rozdrcených pěti tablet bylo odebráno 40 mg vzorku do každé ze 3 extrakčních zkumavek. Ke vzorku bylo přidáno 10 ml MeOH s vnitřním standardem. Následovalo 15 minut extrakce v ultrazvukové lázni. Vyextrahovaný vzorek byl poté pomocí injekčních stříkaček přefiltrován přes PTFE filtry o velikosti pórů 0,22 µm do skleněných vialek. Finální koncentrace IS ve vzorku byla 50 µg/ml.

5.4.3 Swanson Berberin 60 kapslí

Z homogenní směsi vzorku z pěti kapslí přípravku bylo naváženo 40 mg vzorku do každé ze 3 extrakčních zkumavek. Ke vzorku bylo přidáno 10 ml MeOH s vnitřním standardem. Následovalo 15 minut extrakce v ultrazvukové lázni. Vyextrahovaný vzorek byl poté pomocí injekčních stříkaček přefiltrován přes PTFE filtry o velikosti pórů 0,22 µm do skleněných vialek. Finální koncentrace IS ve vzorku byla 50 µg/ml.

5.4.4 GreenFood Berberine 60 kapslí

Z homogenní směsi vzorku z pěti kapslí přípravku bylo naváženo 40 mg vzorku do každé ze 3 extrakčních zkumavek. Ke vzorku bylo přidáno 10 ml MeOH s vnitřním standardem. Následovalo 15 minut extrakce v ultrazvukové lázni. Vyextrahovaný vzorek byl poté pomocí injekčních stříkaček přefiltrován přes PTFE filtry o velikosti pórů 0,22 µm do skleněných vialek. Finální koncentrace IS ve vzorku byla 50 µg/ml.

5.5 Příprava roztoků

5.5.1 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a okyselené vodné fáze. Acetonitril byl čerpán přímo ze zásobní lahve od výrobce. Při přípravě okyselené vodné fáze bylo do nádoby na mobilní fázi naplněno 900 ml ultračisté vody a přidáno 0,9 ml 85% kyseliny o-fosforečné. Vznikla 0,085% H_3PO_4 kyselá vodná fáze o pH cca 2,0.

5.5.2 Příprava zásobních roztoků standardů

Byly připraveny zásobní roztoky standardů (aromolin, magnoflorin, berbamin, THP, jatrorrhizin, THB, palmatin, berberin, oxyberberin) o koncentraci 1000 $\mu\text{g/ml}$. Do vialek bylo naváženo 0,50 mg standardu a toto množství bylo následně rozpuštěno v 0,5 ml methanolu. Zásobní roztoky standardů byly uchovávány po celou dobu experimentu při teplotě 4 °C.

5.5.3 Příprava pracovních roztoků standardů

Ze zásobních roztoků standardů byly připraveny pracovní roztoky standardů a koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$. Ze zásobních roztoků bylo do vialky napipetováno 25 μl standardu a doplněno 475 μl methanolu.

5.5.4 Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu

Byl připraven zásobní roztok vnitřního standardu ethylparabenu (EP) o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$. Do odměrné baňky bylo naváženo 10 mg EP a doplněno methanolem po rysku na 200 ml.

5.5 Parametry měření

Analýza byla provedena na HPLC sestavě Shimadzu LC-10, která se skládala z pump, degasseru, autosampleru, temperované chromatografické kolony a DAD detektoru. Výsledky byly vyhodnocovány pomocí chromatografického softwaru LC LabSolution, pomocí něž se chromatograf i ovládal. Jako vhodná mobilní fáze byla zvolena směs acetonitril/0,085% vodný roztok kyseliny fosforečné o celkovém pH 2,0. K systému byla nadále připojena nádoba s roztokem na oplach nástřikové jehly, která byla složena z ultračisté vody a acetonitrilu v poměru 1:1. Průtok mobilní fáze byl zvolen na 1 ml/min a režim analýzy byl gradientový. Podoba finálního gradientu se nachází v tabulce č. 3. Objem nástřiku vzorku na kolonu činil 5 μ l. Jako nejvhodnější stacionární fáze byla použita chromatografická kolona Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 (150 x 4,6 mm) o velikosti částic 2,7 μ m. Kolona byla po celou dobu měření temperována na 30 °C, což byla teplota, při níž separace na koloně probíhala nejlépe. Berberin a ostatní sledované isochinolinové alkaloidy byly detekovány při vlnových délkách 225 nm a 345 nm. Dvě vlnové délky byly zvoleny kvůli rozlišným maximům absorpance u jednotlivých látek.

Tabulka 4: Podoba a průběh použitého gradientu

| Finální gradient | |
|-----------------------------|-------------------------------|
| Časový průběh analýzy (min) | Zastoupení organické fáze (%) |
| 0.00 – 7.00 | 5-55 |
| 7.00 – 9.00 | 55-95 |
| 9.00 – 9.20 | 95-5 |
| 9.20 – 11.20 | 5-5 |

5.6 Parametry hodnocení metody

Mezi parametry hodnocení metody patřila linearita, opakovatelnost, přesnost, správnost, limit detekce a kvantifikace a poté samotná aplikace metody na měření vzorků. Byl také proveden test vhodnosti chromatografického systému. Validační parametry byly vybrány pomocí vhodných zdrojů [20].

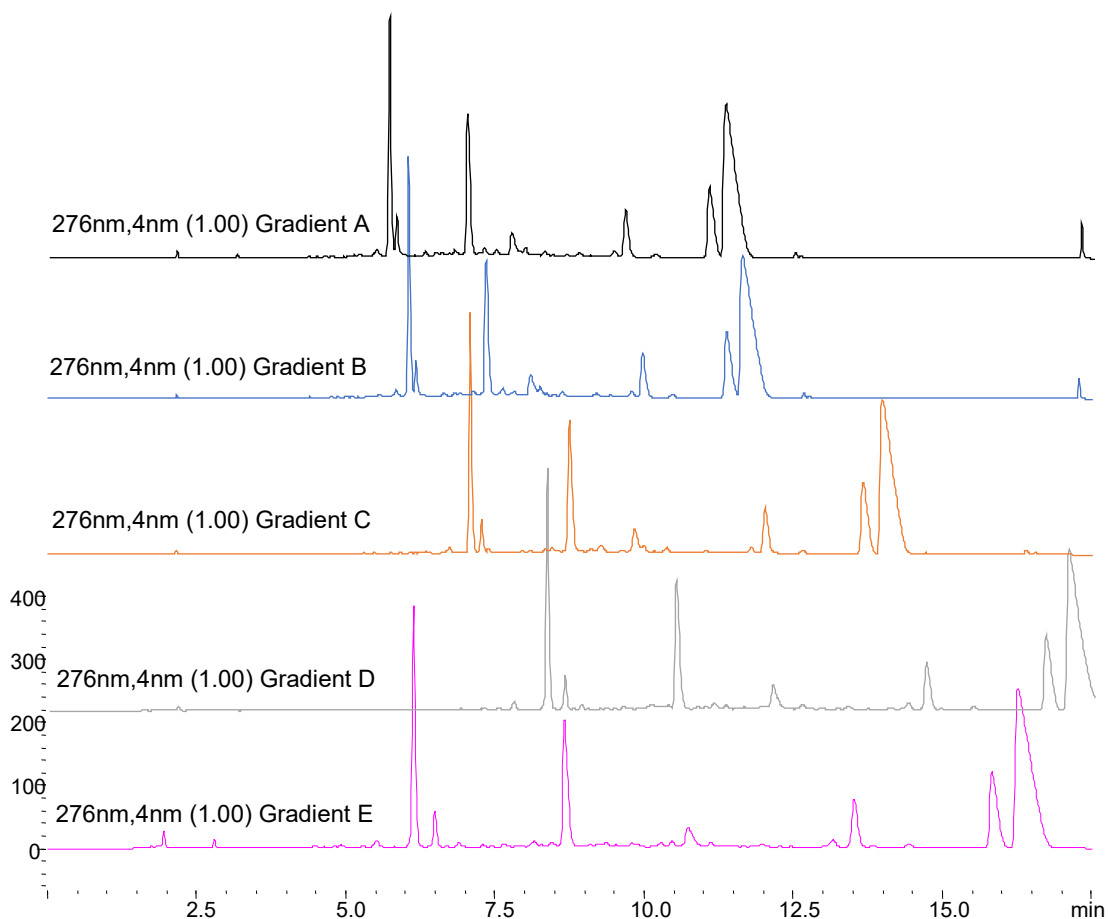
6 Výsledky a diskuze

6.1 Optimalizace metody

Cílem optimalizace metody bylo najít vhodné podmínky pro dostatečnou separaci jednotlivých isochinolinových alkaloidů tak, aby měly na výsledném chromatogramu dostatečné rozlišení, symetrii i šířku píků. Nejprve bylo nutné vhodně zvolit složení mobilní fáze a techniku chromatografie ve vztahu k mobilní fázi, a to jestli bude analýza prováděna v režimu analýzy isokratické nebo gradientové. Gradientová eluce poté byla sama o sobě také optimalizována, jak je dále uvedeno v bodě 6.1.1. Nadále musela být vhodně zvolena stacionární fáze, a to výběrem vhodné chromatografické kolony (6.1.4). Kolona byla po celou dobu analýzy temperována na vhodně zvolenou teplotu, která však musela být také optimalizována. Optimalizace teploty v kolonovém prostoru byla provedena na třech teplotních hladinách, a to při 30, 40 a 50 °C. Jako nejvhodnější se prokázala teplota 30 °C, kde byla patrná dokonalá separace přítomných analytů. Při vyšších teplotách nebylo dosaženo dostatečného rozlišení píků. Pro samotné analyty byla zvolena optimální vlnová délka pro detekci v závislosti na absorpčním maximu (6.1.2). V neposlední řadě byla stanovena i rychlost průtoku mobilní fáze a objem nástřiku vzorku na kolonu.

6.1.1 Volba průběhu gradientu

Na počátku optimalizace průběhu gradientu bylo zvoleno 5 rozdílných gradientů. Doba analýzy u všech gradientů byla nastavena na 17,5 minuty. Jednalo se o gradient A, se zastoupením organické fáze 5 % na počátku a 100 % na konci analýzy, gradient B, se zastoupením organické fáze 2 % na počátku a 100 % na konci analýzy, gradient C se zastoupením organické fáze 2 % na počátku a 70 % na konci analýzy, gradient D se zastoupením organické fáze 2 % na počátku a 50 % na konci analýzy a gradient E se zastoupením organické fáze 10 % na počátku a 50 % na konci analýzy. Jako nejvhodnější gradient byl vybrán gradient A, který byl dále optimalizován do konečné podoby, která já patrna v tabulce 4. Průběh gradientu byl testován se vzorkem Allnature Berberin 98% extrakt, pořadí eluentů je tedy od nejmenšího t_r magnoflorin, berbamin, jatrorrhizin, palmatin a berberin.



Obrázek 8: Volba vhodného průběhu gradientu

6.1.2 Volba vlnové délky

Pro detekci isochinolinových alkaloidů byly jako nejvhodnější zvoleny 2 vlnové délky, a to 225 nm a 345 nm. Tyto vlnové délky byly zjištěny za využití DAD detektoru, který snímá při všech nastavených vlnových délkách spektra najednou v průběhu celé analýzy. Aromolin vykazoval absorpční maximum při vlnových délkách 204 a 283 nm. (obr. č. 9) Magnoflorin vykazoval absorpční maximum při vlnových délkách 221, 268 a 301 nm. (obr.č. 10)

Berbamin vykazoval absorpční maximum při vlnových délkách 205 a 280 nm. (obr.č. 11)

Tetrahydropalmatin vykazoval absorpční maximum při vlnových délkách 204, 229 a 281 nm (obr.č. 12)

Jatrorrhizin vykazoval absorpční maximum při vlnových délkách 225, 265 a 345 nm. (obr.č. 13)

Tetrahydroberberin vykazoval absorpční maximum při vlnových délkách 203 a 285 nm. (obr.č. 14)

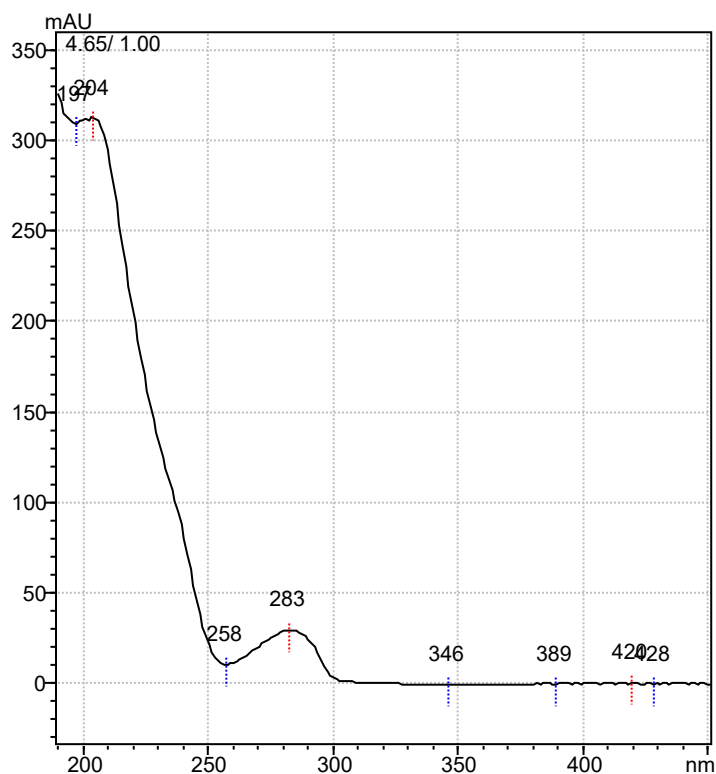
Palmatin vykazoval absorpční maximum při vlnových délkách 226, 265 a 346 nm. (obr.č. 15)

Berberin vykazoval absorpční maximum při vlnových délkách 228, 264, 347 nm. (obr.č. 16)

Oxyberberin vykazoval absorpční maximum při vlnových délkách 224 a 342 nm. (obr.č. 17)

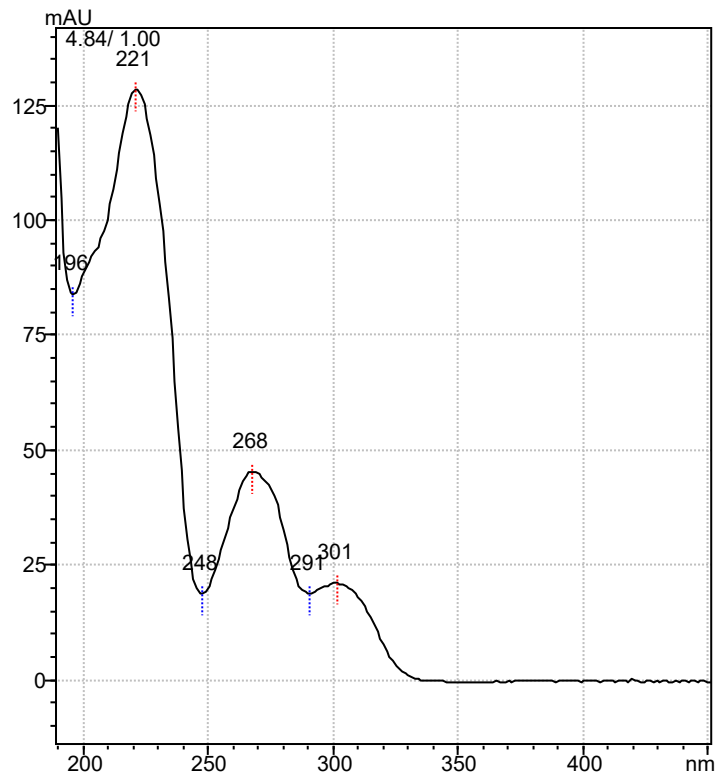
Z absorpčních maxim byly stanovené již uvedené optimální vlnové délky, a to 225 nm pro aromolin, magnoflorin, berbamin, tetrahydropalmatin a tetrahydroberberin, a 345 nm pro jatrorrhizin, palmatin, berberin, oxyberberin. Z absorpčního spektra vnitřního standardu ethylparabenu (obr. č. 18) je patrné, že pro něj byla zvolena optimální vlnová délka 225 nm.

6.1.2.1 Absorpční spektrum aromolin



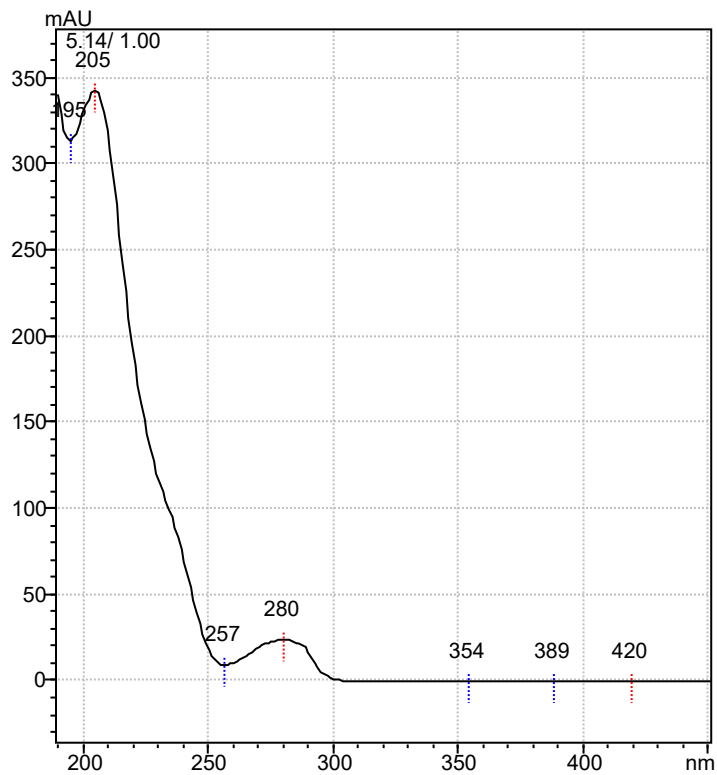
Obrázek 9: Absorpční spektrum standardu aromolinu

6.1.2.2 Absorpční spektrum magnoflorin



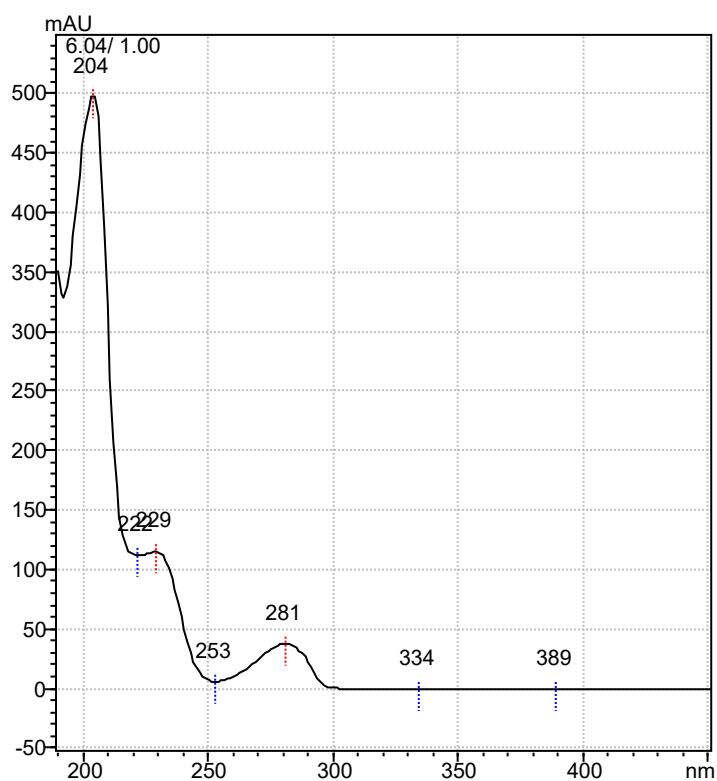
Obrázek 10: Absorpční spektrum standardu magnoflorinu

6.1.2.3 Absorpční spektrum berbaminu



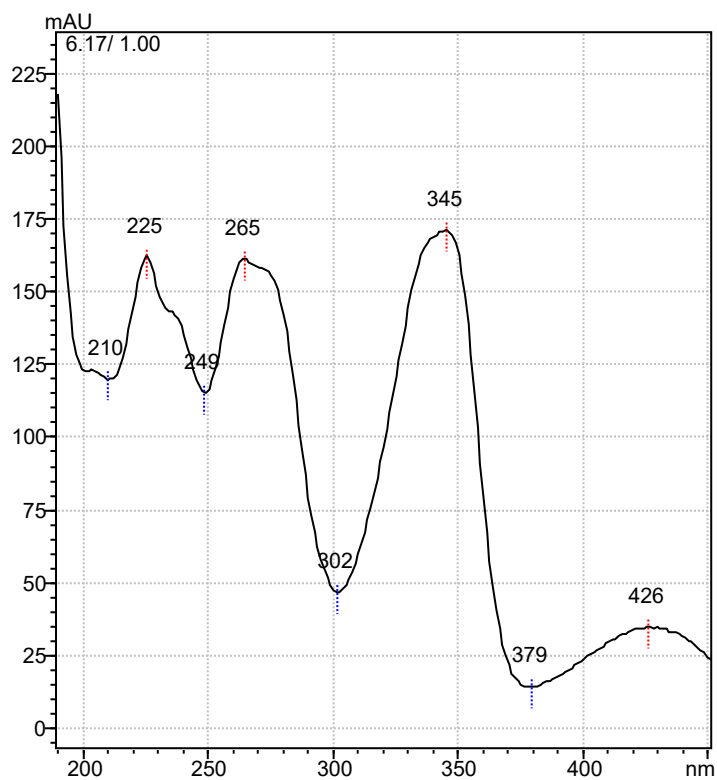
Obrázek 11: Absorpční spektrum standardu berbaminu

6.1.2.4 Absorpční spektrum tetrahydropalmatin



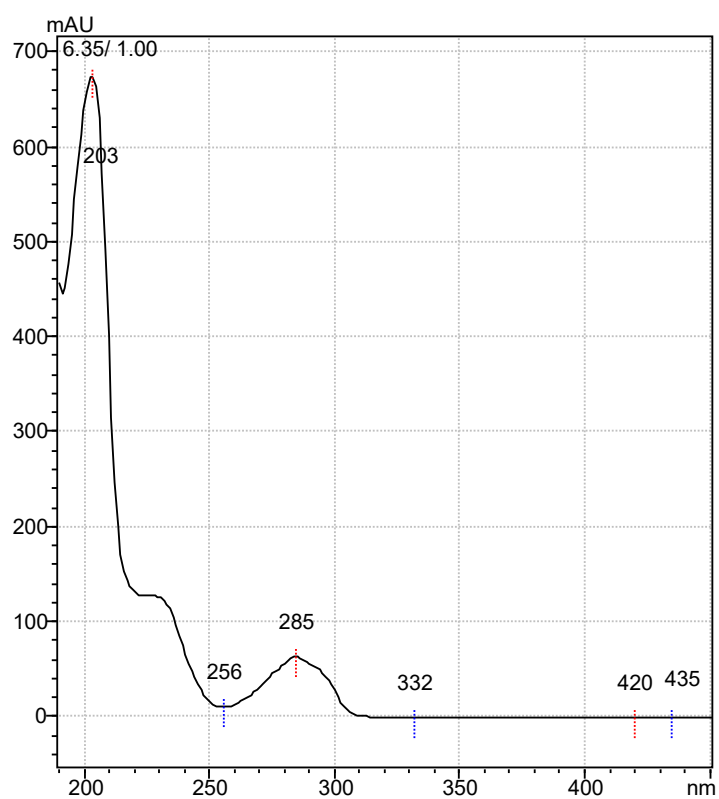
Obrázek 12: Absorpční spektrum standardu tetrahydropalmatinu

6.1.2.5 Absorpční spektrum jatrorrhizin



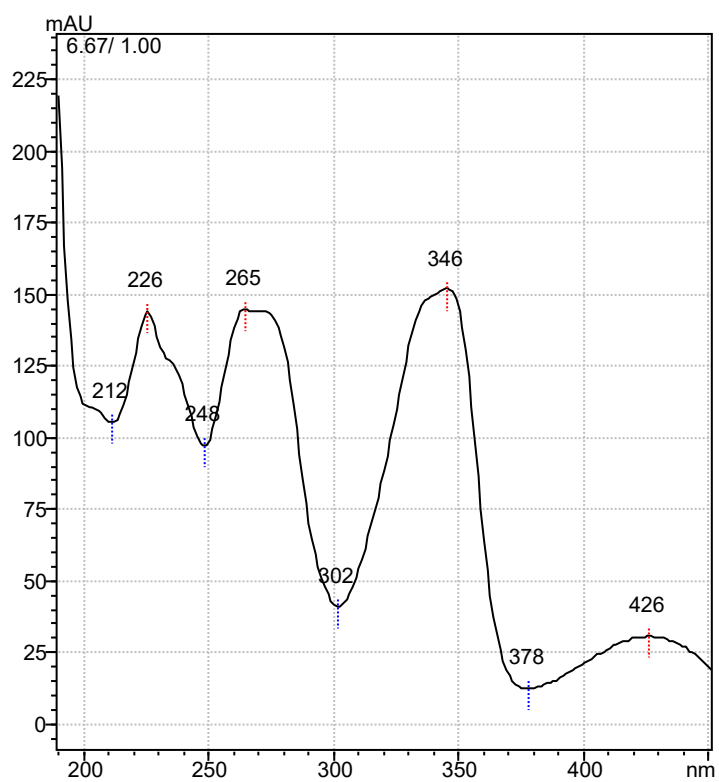
Obrázek 13: Absorpční spektrum standardu jatrorrhizinu

6.1.2.6 Absorpční spektrum tetrahydroberberin



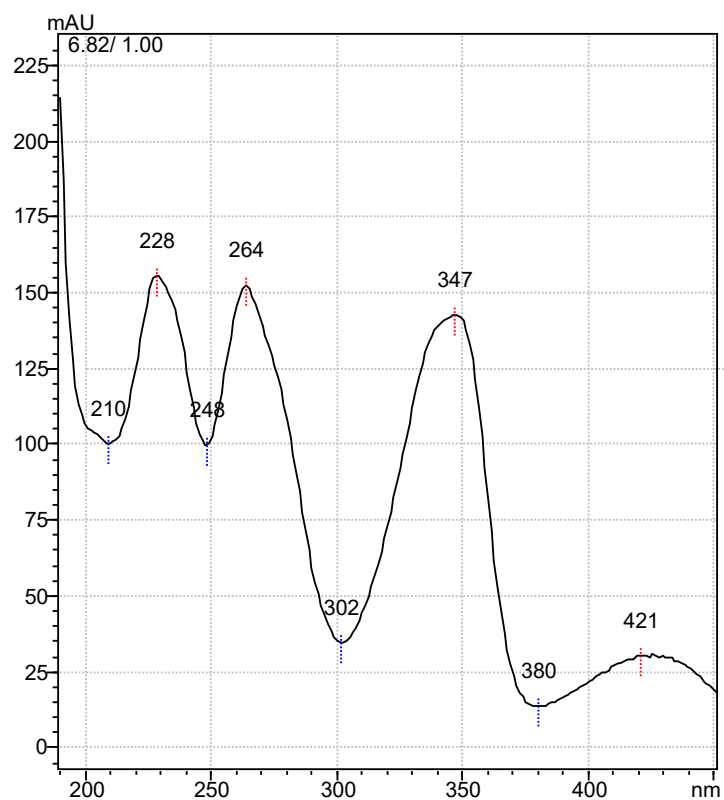
Obrázek 14: Absorpční spektrum standardu tetrahydroberberinu

6.1.2.7 Absorpční spektrum palmatin



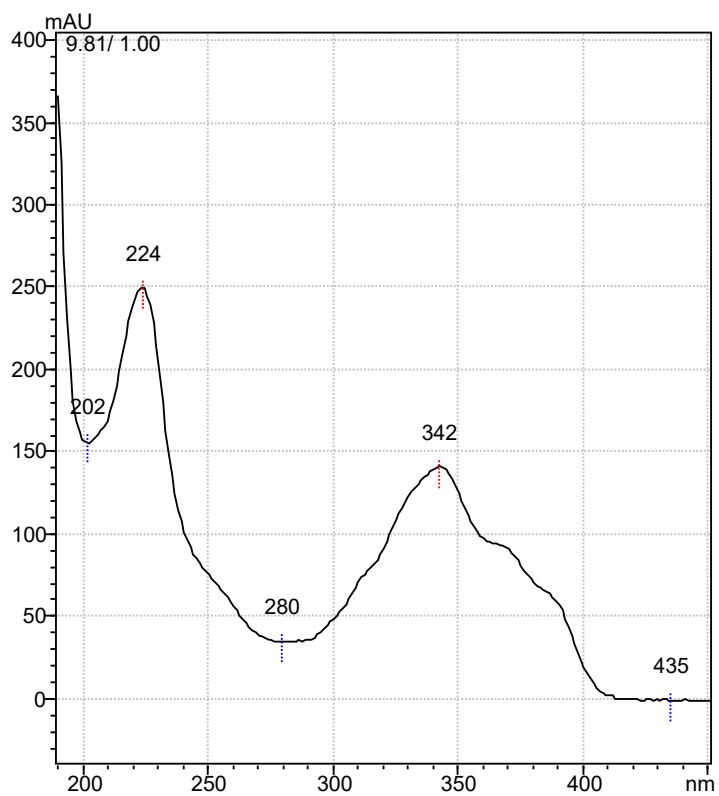
Obrázek 15: Absorpční spektrum standardu palmatinu

6.1.2.8 Absorpční spektrum berberin



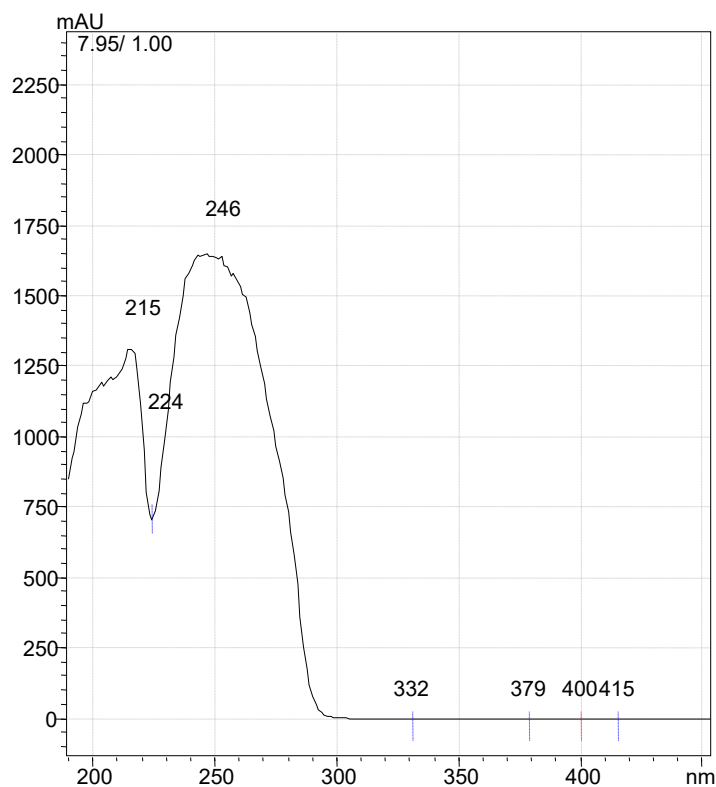
Obrázek 16: Absorpční spektrum standardu berberinu

6.1.2.9 Absorpční spektrum oxyberberin



Obrázek 17: Absorpční spektrum standardu oxyberberinu

6.1.2.10 Absorpční spektrum ethylparaben



Obrázek 18: Absorpční spektrum standardu ethylparabenu

6.1.3 Volba vnitřního standardu

Vhodný vnitřní standard byl vybírán z následujících sedmi látek:

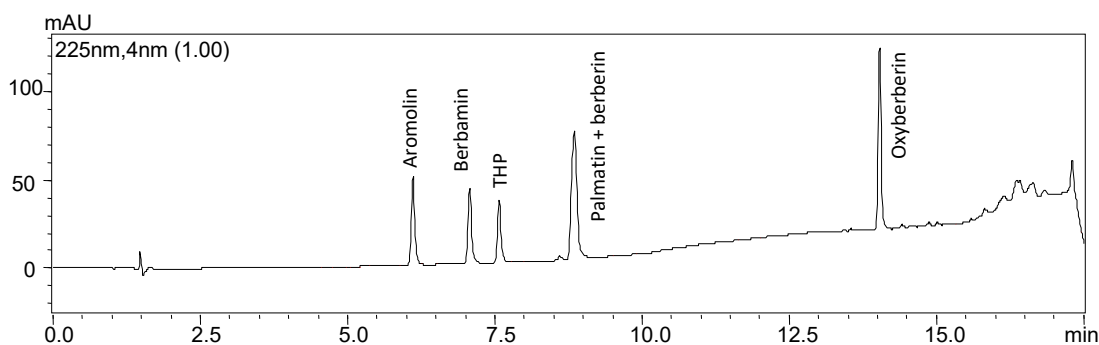
- Methylparaben ($t_r = 6,95$ min)
- Ethylparaben ($t_r = 7,94$ min)
- Propylparaben ($t_r = >7,94$ min, nevyhovující)
- Butylparaben ($t_r = >7,94$ min, nevyhovující)
- Estradiol ($t_r = 9,32$ min)
- Diklofenak ($t_r = 10,08$ min)
- Ibuprofen ($t_r = 10,11$ min)

Jako nejvhodnější vnitřní standard byl vybrán ethylparaben. Ten se eluoval ve vhodný retenční čas, v blízkosti stanovovaných látek a s žádnou z nich neinterferoval.

6.1.4 Volba chromatografické kolony a mobilní fáze

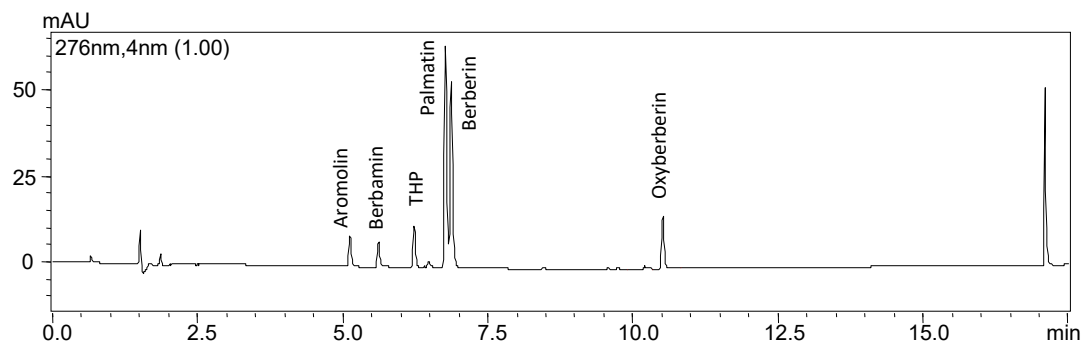
V rámci optimalizace metody bylo testováno celkem 9 chromatografických kolon. Jejich seznam je uvedený v tabulce č. 2. Volbu nejvhodnější chromatografické kolony ovlivňovala účinnost separace jednotlivých stanovovaných látek, symetrie jejich píků a i celková rychlost separace. Na následujících obrázcích budou demonstrovány chromatogramy jednotlivých testovaných kolon. V počátcích volby chromatografické kolony bylo měřeno pouze se 6 standardy, a to s aromolinem, berbaminem, THP, palmatinem, berberinem a oxyberberinem. Zbylé tři se přidaly v pozdější fázi měření, magnoflorin, THB ještě v průběhu volby chromatografické kolony a jatrorrhizin až poté z důvodů zpožděného dodání firmou ChemFaces. Ten tedy není na následujících chromatogramech patrný.

6.1.4.1 Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 μm, methanol/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)– gradientová eluce



Obrázek 19: Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 μm, methanol/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)– gradientová eluce

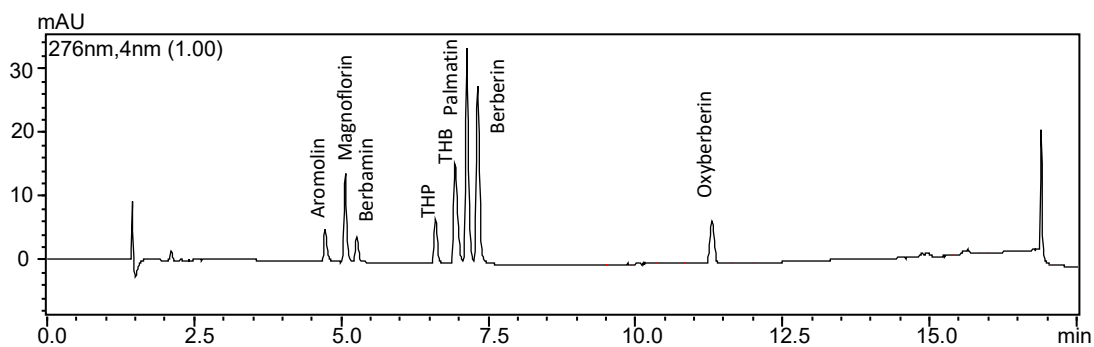
6.1.4.2 Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce



Obrázek 20: Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce

Při porovnání prvních dvou chromatogramů (obr. 19-20, oba za použití stejné chromatografické kolony), z nichž první prezentuje výsledky při použití methanolu jako součásti mobilní fáze a druhý při použití acetonitrilu, byl jako vhodnější složka mobilní fáze zvolen acetonitril. V jeho přítomnosti byla celková doba separace kratší a byla patrná částečná separace dvou standardů, a to palmatinu a berberinu.

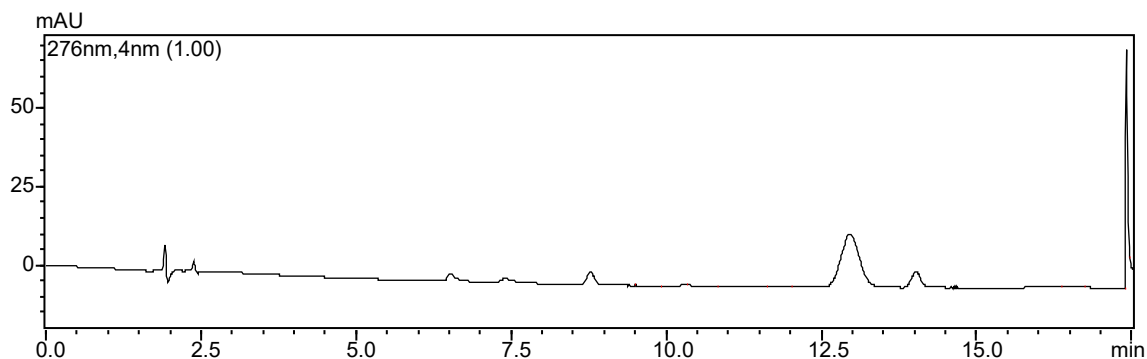
6.1.4.3 YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 5 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce



Obrázek 21: YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 5 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce

Účinnost této kolony byla jedna z těch, jež byla pro separaci analytů dostatečná.

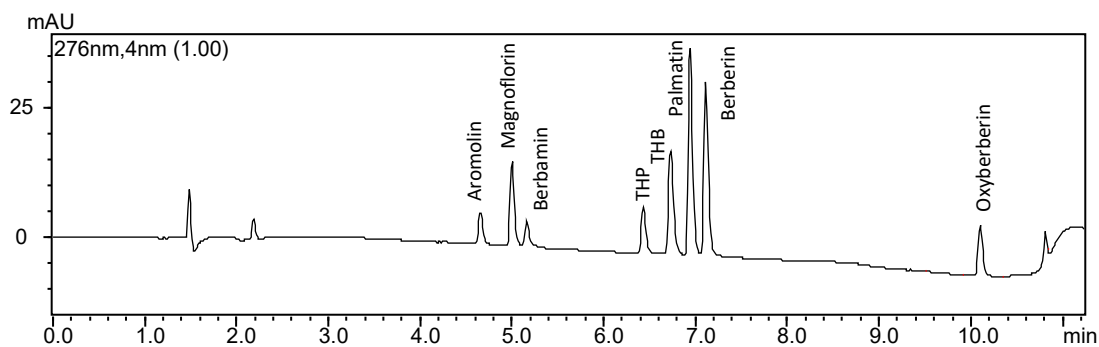
6.1.4.4 YMC Carotenoid 150 x 4,6 mm, 5 μ m, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce



Obrázek 22: YMC Carotenoid 150 x 4,6 mm, 5 μ m, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce

Z chromatogramu je patrné, že tato kolona nedokázala účinně odseparovat žádné z přítomných analytů. Tato kolona se tedy jevila nevhodná také z hlediska šířky separovaných píků.

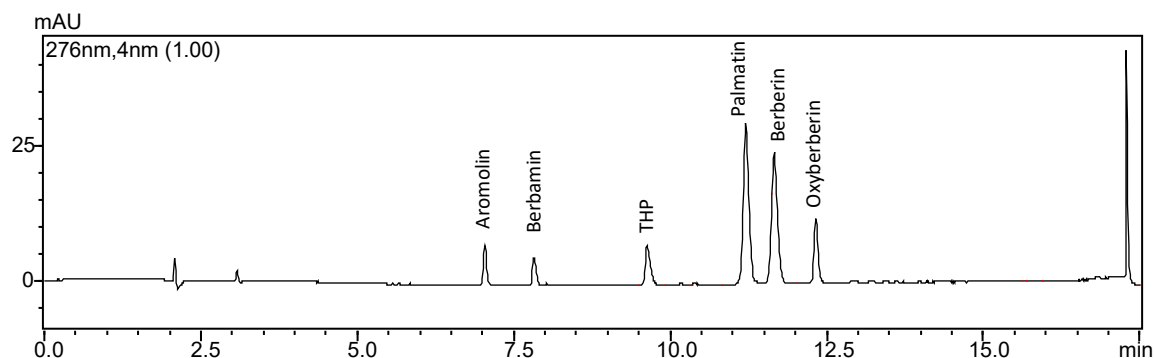
6.1.4.5 YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4.6 mm, 3 μ m, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce



Obrázek 23: YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4.6 mm, 3 μ m, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce

Účinnost této kolony byla jedna z těch, jež byla pro separaci analytů dostatečná.

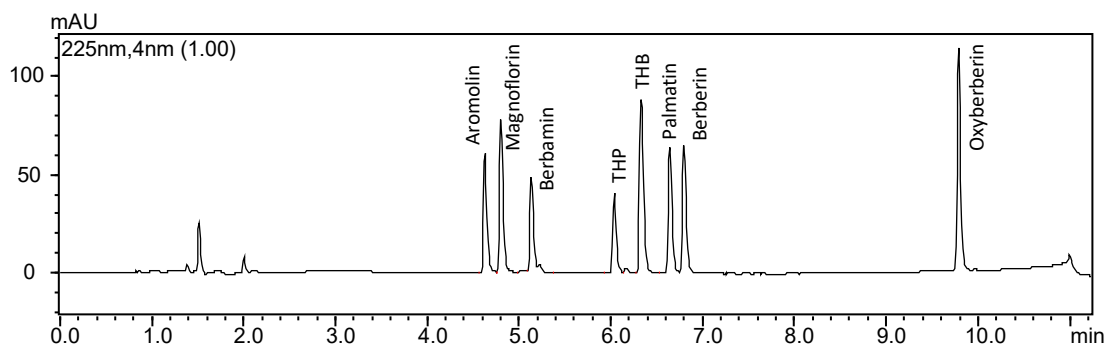
6.1.4.6 YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm, 3 μm , acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce



Obrázek 24: YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm, 3 μm , acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce

Tato kolona sice splnila dostatečnou účinnost pro separaci stanovovaných analytů, ale celkový čas separace byl v porovnání s ostatními kolonami zbytečně dlouhý .

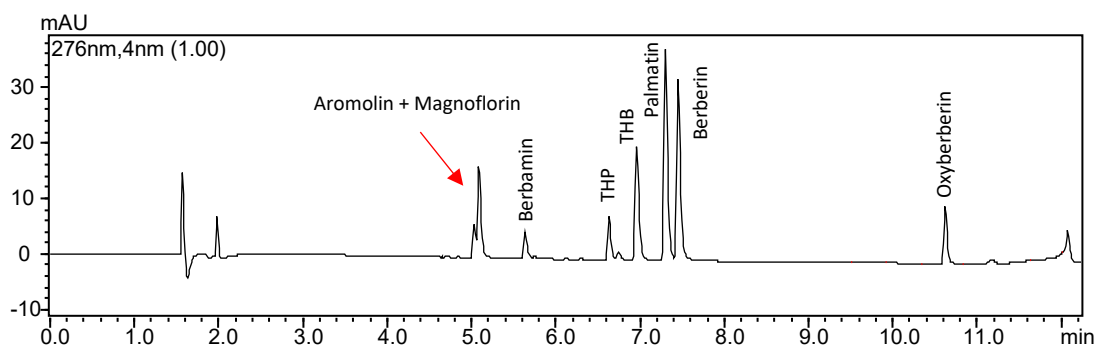
6.1.4.7 Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 4,6 mm, 2,7 μm , acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce



Obrázek 25: Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 4,6 mm, 2,7 μm , acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce

Účinnost této kolony byla jedna z těch, jež byla pro separaci analytů dostatečná. Tato kolona byla také zvolena jako optimální, s níž se pokračovalo v dalších krocích vývoje metody.

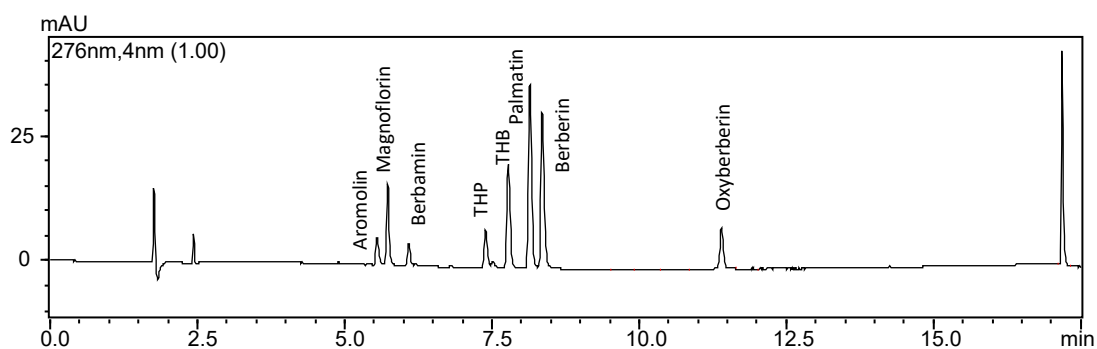
6.1.4.8 Kinetex® 2,6 µm XB-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce



Obrázek 26: Kinetex® 2,6 µm XB-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce

Při použití této kolony nebyly dostatečně separovány analyty aromolin a magnoflorin, které se při ostatních měřeních dostatečně účinnými kolonami eluovaly jako první. Z tohoto důvodu nebyla tato kolona uznána jako vyhovující.

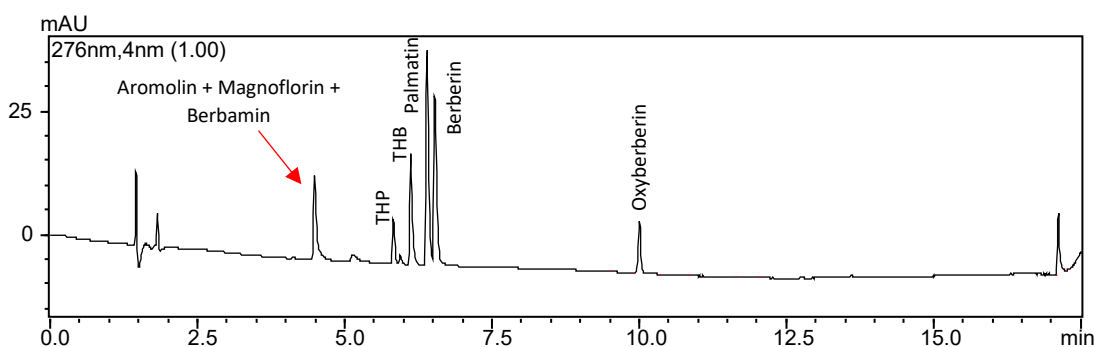
6.1.4.9 Luna® Omega 5 µm Polar C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 5 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce



Obrázek 27: Luna® Omega 5 µm Polar C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 5 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce

Účinnost této kolony byla jedna z těch, jež byla pro separaci analytů dostatečná.

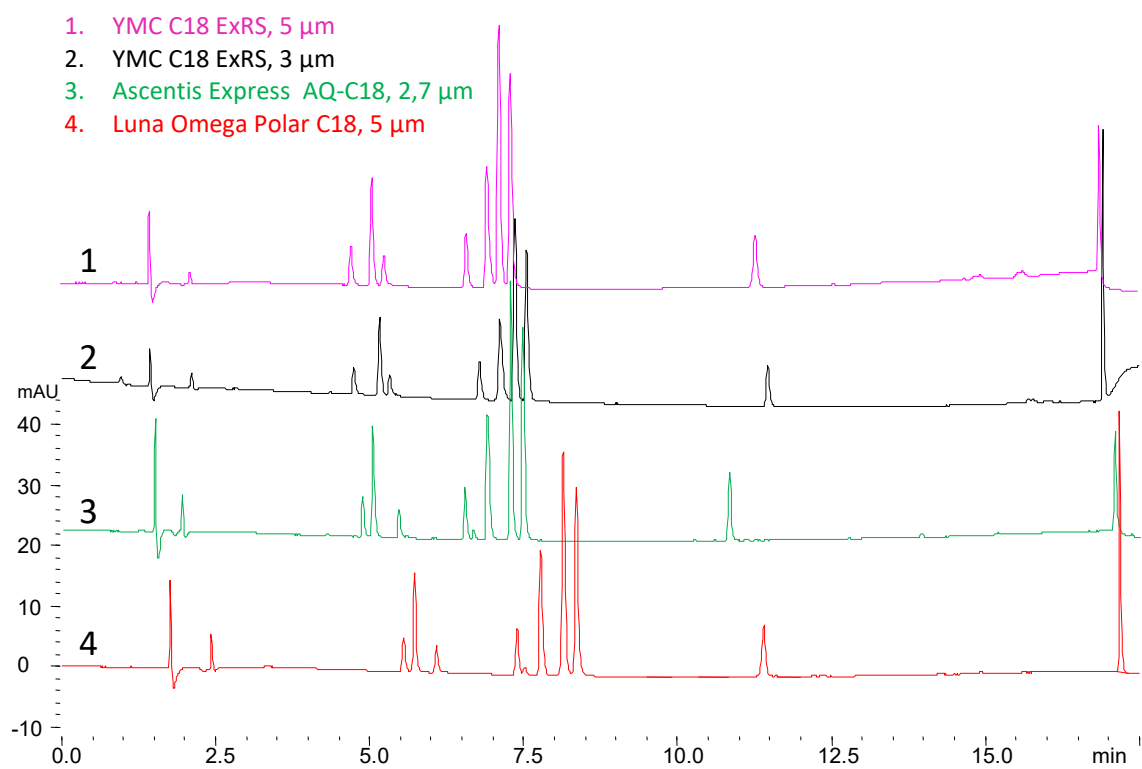
6.1.4.10 Kinetex® 2,6 µm EVO-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce



Obrázek 28: Kinetex® 2,6 µm EVO-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce

Při použití této kolony nebyly dostatečně separovány analyty, které se při ostatních měřeních dostatečně účinnými kolonami eluovaly jako první, a to konkrétně aromolin, magnoflorin a berbamin. Podobně, jak tomu bylo u kolony Kinetex® 2,6 µm XB-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm. Z toho samého důvodu nebyla tato kolona uznána jako vyhovující.

Na závěr této kapitoly je na obrázku č. 29 prezentováno grafické porovnání 4 chromatogramů 4 nejúčinnějších kolon, které byly v rámci optimalizace metody testovány. Jedná se o kolony YMC-Triart C18 ExR, 150 x 4,6 mm, 5 µm, YMC CO., LTD.; YMC-Triart C18 ExR, 150 x 4,6 mm, 3 µm, YMC CO., LTD.; Ascentis® Express 90 Å AQ-C18, 150 x 4,6 mm, 2,7 µm, Supelco Analytical a Luna® Omega 5 µm Polar C18 100 Å, 150 x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex®. Tyto čtyři kolony prokázaly dostatečnou účinnost separace pro využití v dalších krocích vývoje metody. Pro vlastní validaci byla vybrána kolona Ascentis® Express 90 Å AQ-C18, 150 x 4,6 mm, 2,7 µm, Supelco Analytical.



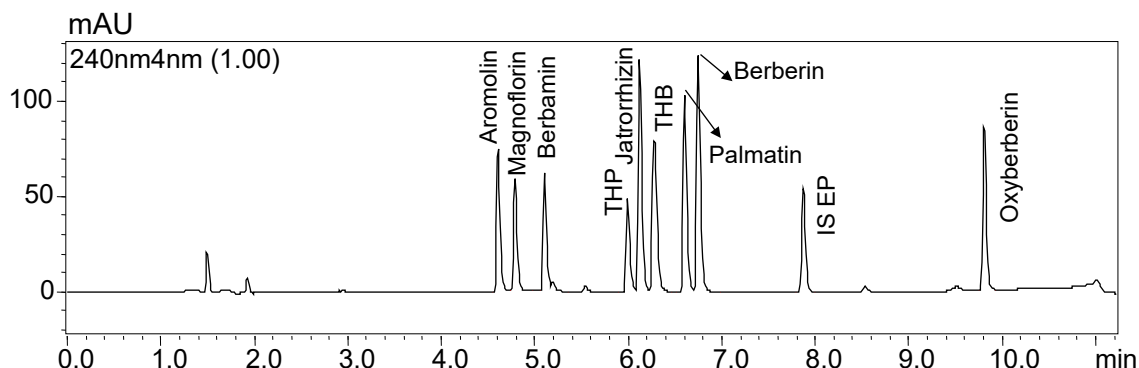
Obrázek 29: Chromatogramy porovnávající 4 nejúčinnější kolony

6.1.5 Optimální nastavení pro HPLC analýzu

V následující tabulce jsou shrnuty optimální podmínky zvolené pro analýzu doplněné o chromatogram demonstrující finální nastavení přístroje a optimální podmínky analýzy separace aromolinu, magnoflorinu, berbaminu, THP, jatrorrhizinu, THB, palmatinu, berberinu a oxyberberinu, včetně vnitřního standardu EP. Za těchto podmínek byla metoda dále validována. Chromatogram byl změřen při jiné vlnové délce, než je optimální pro stanovované analyty (240 nm). Je zde zvolen z důvodu jinak neproveditelného měření testu způsobilosti systému a pro demonstraci analytů na jednom jediném chromatogramu.

Tabulka 5: Optimální nastavení pro HPLC analýzu

| | |
|-----------------------------------|--|
| Stacionární fáze | Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 4,6 mm, 2,7 µm, Supelco Analytical |
| Mobilní fáze | acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0) |
| Objem nástřiku | 5 µl |
| Rychlost průtoku | 1 ml/min |
| Teplota v kolonovém prostoru | 30 °C |
| Tlak na koloně na počátku analýzy | 19 MPa |
| Detekce | 225 a 345 nm |
| Režim analýzy | gradientový |



Obrázek 30: Chromatogram znázorňující separaci všech standardů za optimálních separačních podmínek

6.2 Validace vyvinuté metody

6.2.1 Test způsobilosti chromatografického systému

V testu způsobilosti byly hodnoceny parametry retenčního času, píkove kapacity pro gradientovou eluci, symetrie píků a jejich rozlišení. Test způsobilosti byl měřen ze 3 analýz. Požadavky na jednotlivé parametry, $A_s < 2,0$ a $R_s > 1,5$, byly ve všech případech splněny.

Tabulka 6: Test způsobilosti chromatografického systému

| Analyzované standardy | t_r [min] | Opak. t_r RSD [%] | w_h [min] | n_p | A_s | Opak. A_s RSD [%] | R_s |
|-----------------------|-------------|---------------------|-------------|-------|-------|---------------------|-------|
| Aromolin | 4,60 | 0,07 | 0,040 | 69,75 | 1,86 | 1,95 | -- |
| Magnoflorin | 4,78 | 0,07 | 0,039 | 71,51 | 1,75 | 0,84 | 2,31 |
| Berbamin | 5,10 | 0,04 | 0,040 | 69,75 | 1,91 | 1,51 | 3,94 |
| THP | 5,99 | 0,07 | 0,044 | 63,50 | 1,81 | 2,18 | 8,71 |
| Jatrorrhizin | 6,12 | 0,06 | 0,042 | 66,48 | 1,72 | 0,82 | 1,50 |
| THB | 6,27 | 0,07 | 0,053 | 52,89 | 1,78 | 1,65 | 1,59 |
| Palmatin | 6,60 | 0,07 | 0,044 | 63,50 | 1,75 | 2,97 | 3,37 |
| Berberin | 6,74 | 0,08 | 0,047 | 59,51 | 1,74 | 2,01 | 1,55 |
| IS Ethylparaben | 7,87 | 0,08 | 0,043 | 64,95 | 1,45 | 1,98 | 12,58 |
| Oxyberberin | 9,80 | 0,05 | 0,039 | 71,51 | 1,54 | 2,45 | 23,46 |

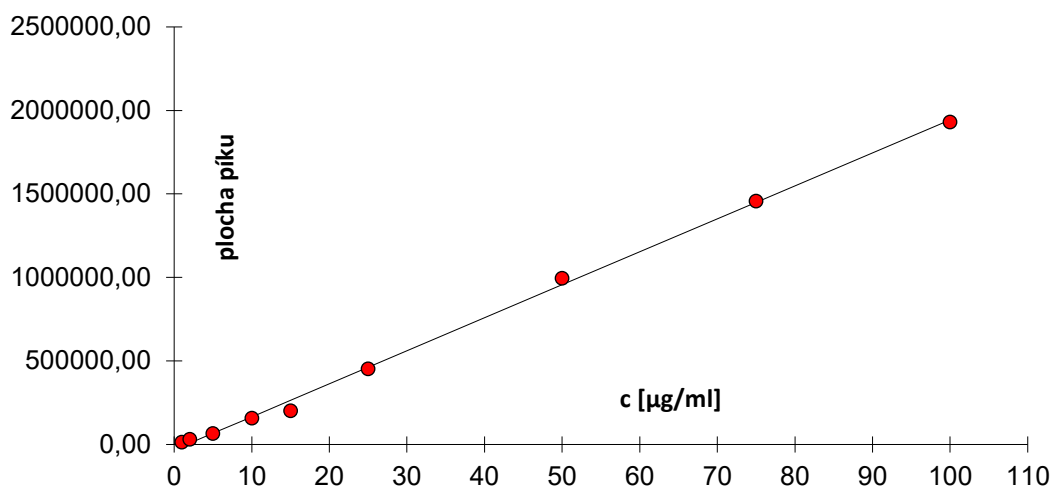
Chromatogram za optimálních separačních podmínek se nachází na obrázku č. 29.

6.2.2 Linearita

Ke stanovení linearity bylo použito 9 kalibračních hladin v koncentračním rozmezí od 1 $\mu\text{g/ml}$ do 100 $\mu\text{g/ml}$. Na každé koncentrační hladině směsi standardů byly provedeny 3 nástřiky, z jejichž hodnoty se pak určila průměrná hodnota plochy píku. Na vyhodnocení závislosti průměrných ploch jednotlivých koncentrací byla využita metoda lineární regrese.

6.2.2.1 Kalibrační závislost aromolin

Aromolin byl měřen v následujících koncentracích: 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2 µg/ml a 1 µg/ml.



Obrázek 31: Kalibrační závislost pro aromolin

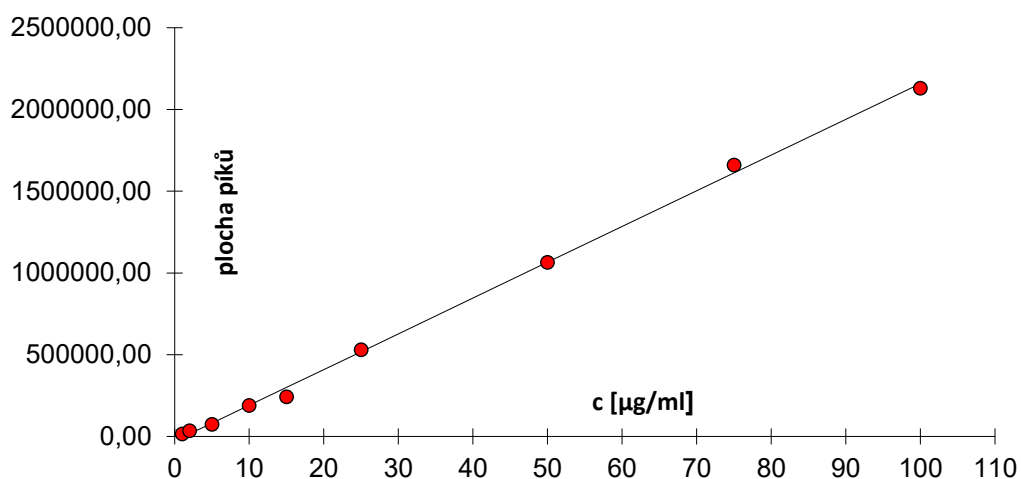
Tabulka 7: Parametry lineární regrese pro aromolin

| Statistické parametry pro regresi : $y = k \cdot x + q$ | | | |
|---|-----|-----------|-------------|
| Počet bodů | n = | 9 | Odhad chyby |
| Směrnice | k = | 19752,87 | ± 312,5473 |
| Abs. člen | q = | -31932,49 | ± 14400,18 |
| Korelační koef. | r = | 0,999125 | |
| Reziduální odch. | s = | 31575,35 | |

Korelační koeficient nabył hodnoty 0,9991.

6.2.2.2 Kalibrační závislost magnoflorin

Magnoflorin byl měřen v následujících koncentracích: 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2 µg/ml a 1 µg/ml.



Obrázek 32: Kalibrační závislost pro magnoflorin

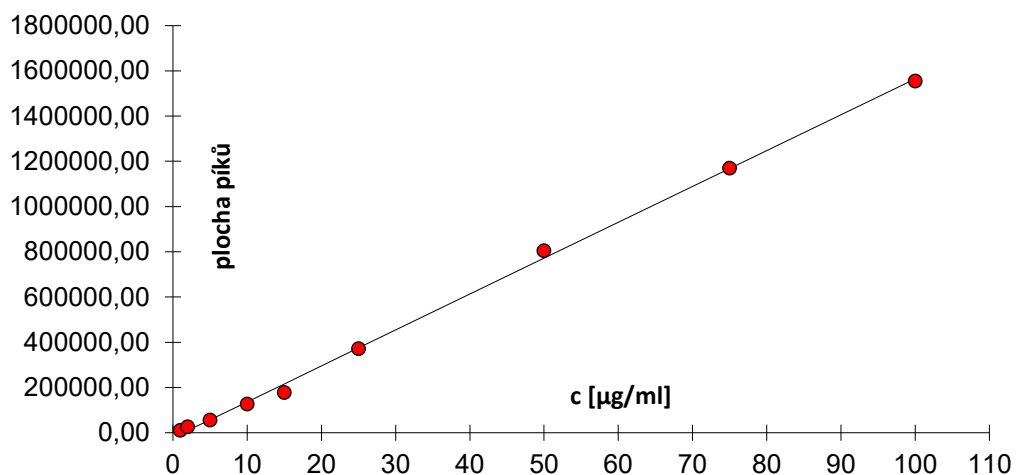
Tabulka 8: Parametry lineární regrese pro magnoflorin

| Statistické parametry pro regresi : $y = k \cdot x + q$ | | | | |
|---|-----|-----------|-------------|----------|
| Počet bodů | n = | 9 | Odhad chyby | |
| Směrnice | k = | 21863,09 | ± | 323,2773 |
| Abs. člen | q = | -28174,08 | ± | 14894,55 |
| Korelační koef. | r = | 0,999236 | | |
| Reziduální odch. | s = | 32659,37 | | |

Korelační koeficient nabył hodnoty 0,9992.

6.2.2.3 Kalibrační závislost berbamin

Berbamin byl měřen v následujících koncentracích: 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2 µg/ml a 1 µg/ml.



Obrázek 33: Kalibrační závislost pro berbamin

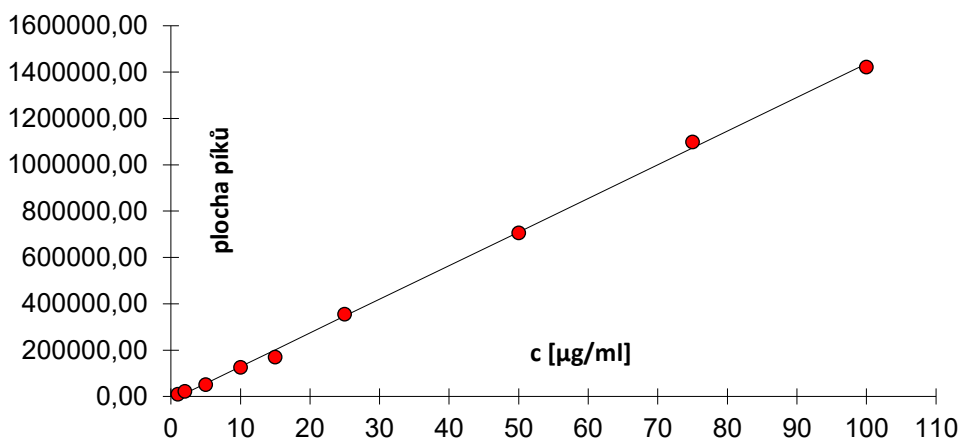
Tabulka 9: Parametry lineární regrese pro berbamin

| Statistické parametry pro regresi : $y = k \cdot x + q$ | | | |
|---|-----|-----------|-------------|
| Počet bodů | n = | 9 | Odhad chyby |
| Směrnice | k = | 15860,79 | ± 216,2985 |
| Abs. člen | q = | -21762,73 | ± 9965,654 |
| Korelační koef. | r = | 0,99935 | |
| Reziduální odch. | s = | 21851,74 | |

Korelační koeficient nabył hodnoty 0,9994.

6.2.2.4 Kalibrační závislost THP

THP byl měřen v následujících koncentracích: 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2 µg/ml a 1 µg/ml.



Obrázek 34: Kalibrační závislost pro THP

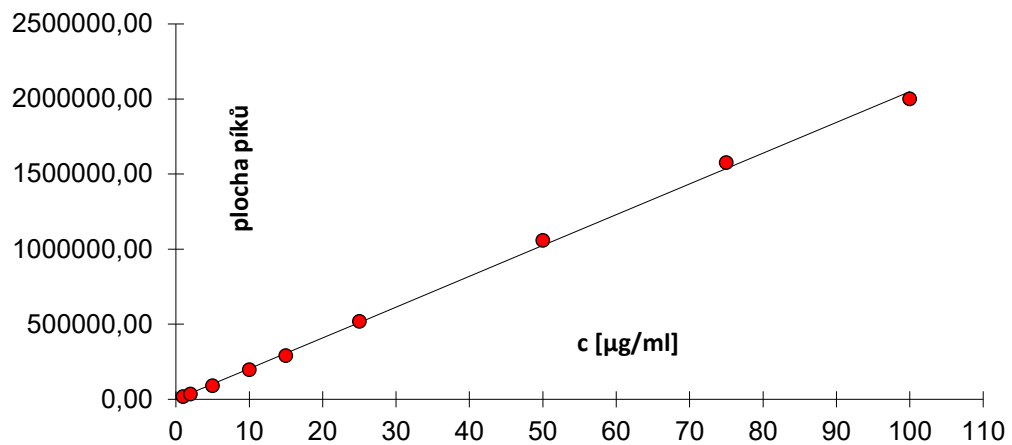
Tabulka 10: Parametry lineární regrese pro THP

| Statistické parametry pro regresi : $y = k \cdot x + q$ | | | | |
|---|-----|-----------|-------------|----------|
| Počet bodů | n = | 9 | Odhad chyby | |
| Směrnice | k = | 14527,62 | ± | 176,3012 |
| Abs. člen | q = | -16565,88 | ± | 8122,831 |
| Korelační koef. | r = | 0,999485 | | |
| Reziduální odch. | s = | 17810,97 | | |

Korelační koeficient nabyl hodnoty 0,9995.

6.2.2.5 Kalibrační závislost jatrorrhizin

Jatrorrhizin byl měřen v následujících koncentracích: 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2 µg/ml a 1 µg/ml.



Obrázek 35: Kalibrační závislost pro jatrorrhizin

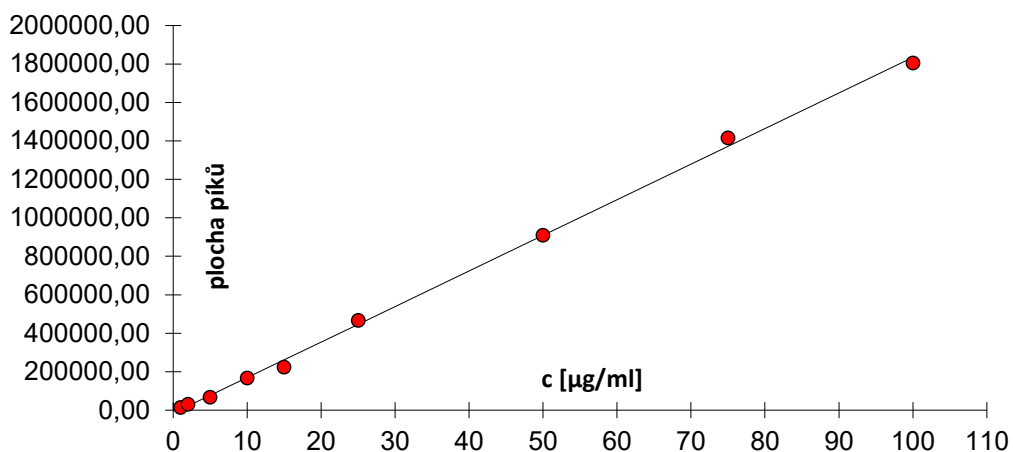
Tabulka 11: Parametry lineární regrese pro jatrorrhizin

| Statistické parametry pro regresi : $y = k \cdot x + q$ | | | | |
|---|-----|----------|-------------|----------|
| Počet bodů | n = | 9 | Odhad chyby | |
| Směrnice | k = | 20493,08 | ± | 278,4644 |
| Abs. člen | q = | -251,971 | ± | 12829,86 |
| Korelační koef. | r = | 0,999354 | | |
| Reziduální odch. | s = | 28132,1 | | |

Korelační koeficient nabył hodnoty 0,9994.

6.2.2.7 Kalibrační závislost palmatin

Palmatin byl měřen v následujících koncentracích: 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2 µg/ml a 1 µg/ml.



Obrázek 36: Kalibrační závislost pro palmatin

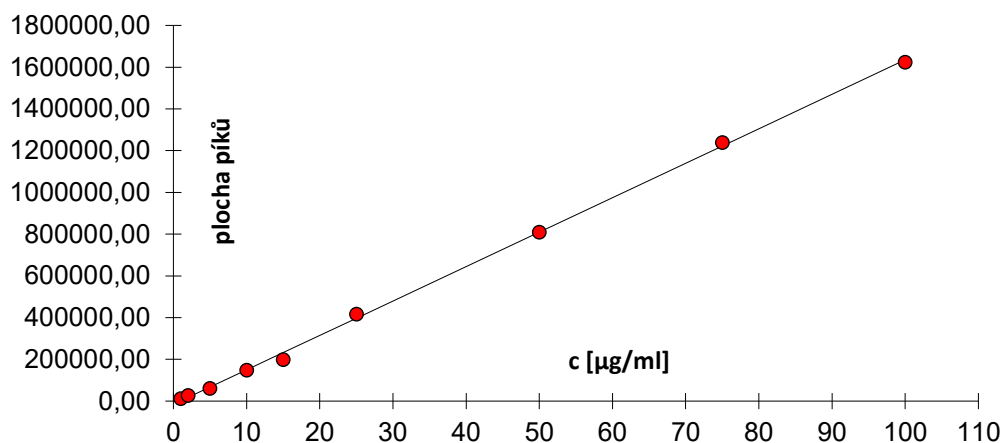
Tabulka 12: Parametry lineární regrese pro palmatin

| Statistické parametry pro regresi : $y = k \cdot x + q$ | | | | |
|---|-----|-----------|-------------|----------|
| Počet bodů | n = | 9 | Odhad chyby | |
| Směrnice | k = | 18501,16 | ± | 262,4337 |
| Abs. člen | q = | -15666,63 | ± | 12091,27 |
| Korelační koef. | r = | 0,999297 | | |
| Reziduální odch. | s = | 26512,58 | | |

Korelační koeficient nabył hodnoty 0,9993.

6.2.2.8 Kalibrační závislost berberin

Berberin byl měřen v následujících koncentracích: 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2 µg/ml a 1 µg/ml.



Obrázek 37: Kalibrační závislost pro berberin

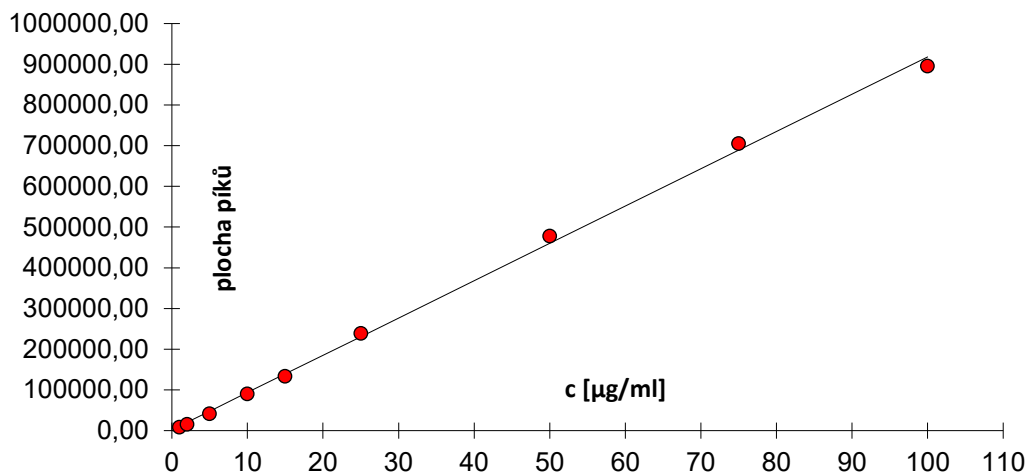
Tabulka 13: Parametry lineární regrese pro berberin

| Statistické parametry pro regresi : $y = k \cdot x + q$ | | | |
|---|-----|-----------|-------------|
| Počet bodů | n = | 9 | Odhad chyby |
| Směrnice | k = | 16502,26 | ± 172,0551 |
| Abs. člen | q = | -14914,91 | ± 7927,201 |
| Korelační koef. | r = | 0,99962 | |
| Reziduální odch. | s = | 17382,02 | |

Korelační koeficient nabył hodnoty 0,9996.

6.2.2.9 Kalibrační závislost THB

THB byl měřen v následujících koncentracích: 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2 µg/ml a 1 µg/ml.



Obrázek 38: Kalibrační závislost pro THB

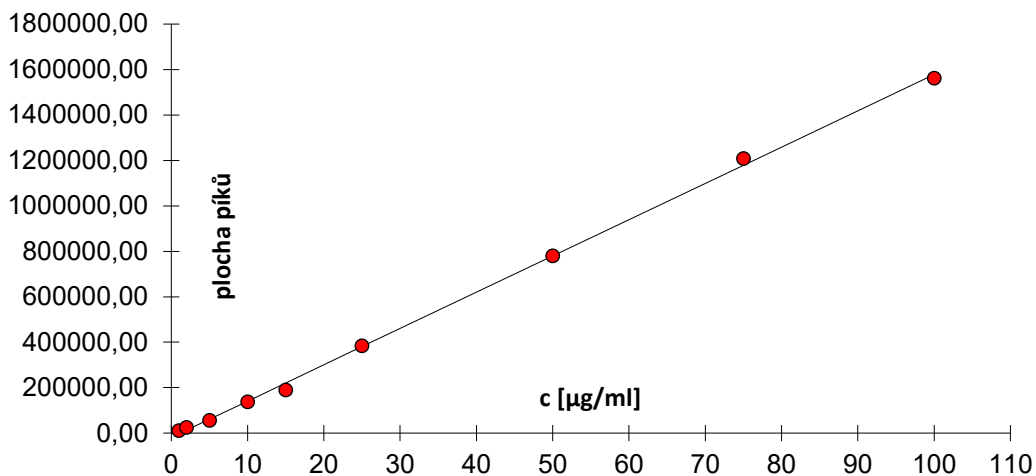
Tabulka 14: Parametry lineární regrese pro THB

| Statistické parametry pro regresi : $y = k \cdot x + q$ | | | |
|---|-----|----------|-------------|
| Počet bodů | n = | 9 | Odhad chyby |
| Směrnice | k = | 9161,076 | ± 132,4896 |
| Abs. člen | q = | 1949,005 | ± 6104,275 |
| Korelační koef. | r = | 0,999269 | |
| Reziduální odch. | s = | 13384,87 | |

Korelační koeficient nabył hodnoty 0,9993.

6.2.2.10 Kalibrační závislost oxyberberin

Oxyberberin byl měřen v následujících koncentracích: 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2 µg/ml a 1 µg/ml.



Obrázek 39: Kalibrační závislost pro oxyberberin

Tabulka 15: Parametry lineární regrese pro oxyberberin

| Statistické parametry pro regresi : $y = k \cdot x + q$ | | | | |
|---|-----|-----------|-------------|----------|
| Počet bodů | n = | 9 | Odhad chyby | |
| Směrnice | k = | 15971,3 | ± | 187,0105 |
| Abs. člen | q = | -19032,84 | ± | 8616,249 |
| Korelační koef. | r = | 0,99952 | | |
| Reziduální odch. | s = | 18892,89 | | |

Korelační koeficient nabył hodnoty 0,9995.

6.2.3 Opakovatelnost

Pro stanovení opakovatelnosti byly použity roztoky standardů aromolinu, magnoflorinu, berbaminu, tetrahydropalmatinu, palmatinu, berberinu, oxyberberinu, jatrorrhizinu a tetrahydroberberinu na koncentračních hladinách 1 µg/ml, 2 µg/ml a 25 µg/ml. Pro každý standard a koncentrační hladinu bylo uskutečněno 6 nástřiků, z nichž se poté stanovil průměr, SD a RSD.

Tabulka 16: Opakovatelnost analýzy roztoku standardů na koncentrační hladině 1 µg/ml

| c (1µg/ml) | Průměr | SD | RSD [%] |
|--------------|--------|-----|---------|
| Aromolin | 12814 | 173 | 1,35 |
| Magnoflorin | 14695 | 231 | 1,57 |
| Berbamin | 11202 | 202 | 1,81 |
| THP | 11122 | 166 | 1,49 |
| Palmatin | 14780 | 216 | 1,46 |
| Berberin | 13919 | 481 | 3,45 |
| Oxyberberin | 12158 | 190 | 1,56 |
| Jatrorrhizin | 19621 | 203 | 1,04 |
| THB | 8913 | 65 | 0,73 |

RSD se pohybovala v rozmezí 0,73 až 3,45 %, z čehož nejvyšší relativní směrodatnou odchylku měl berberin.

Tabulka 17: Opakovatelnost analýzy roztoku standardů na koncentrační hladině 2 µg/ml

| c (2 µg/ml) | Průměr | SD | RSD [%] |
|--------------|--------|-----|---------|
| Aromolin | 31084 | 380 | 1,22 |
| Magnoflorin | 35927 | 229 | 0,64 |
| Berbamin | 25897 | 550 | 2,12 |
| THP | 25179 | 108 | 0,43 |
| Palmatin | 32840 | 123 | 0,38 |
| Berberin | 29515 | 71 | 0,24 |
| Oxyberberin | 27254 | 95 | 0,35 |
| Jatrorrhizin | 36360 | 137 | 0,38 |
| THB | 16411 | 72 | 0,44 |

RSD se na koncentrační hladině 2 µg/ml pohybovala v rozmezí 0,24 až 2,12 %, z čehož nejvyšší relativní směrodatnou odchylku měl berbamin.

Tabulka 18: Opakovatelnost analýzy roztoku standardů na koncentrační hladině 25 µg/ml

| c (25 µg/ml) | Průměr | SD | RSD [%] |
|--------------|--------|-------|---------|
| Aromolin | 475894 | 6429 | 1,35 |
| Magnoflorin | 564614 | 10649 | 1,89 |
| Berbamin | 394416 | 10384 | 2,63 |
| THP | 379902 | 7802 | 2,05 |
| Palmatin | 497561 | 10602 | 2,13 |
| Berberin | 445347 | 9451 | 2,12 |
| Oxyberberin | 409865 | 8244 | 2,01 |
| Jatrorrhizin | 543494 | 4822 | 0,89 |
| THB | 245871 | 2499 | 1,02 |

RSD se na koncentrační hladině 25 µg/ml pohybovala v rozmezí 0,89 až 2,63 %, z čehož nejvyšší relativní směrodatnou odchylku měl berbamin.

6.2.4 Přesnost

Přesnost byla měřena za použití přípravku Berberin 98% extrakt od společnosti Allnature. Bylo připraveno a analyzováno 7 pracovních roztoků. Ty byly připraveny extrakcí 10 mg přípravku do rozpouštědla, kterým byl methanol. Pro každý pracovní roztok byla provedena 3 měření a z těchto 3 měření byla stanovena průměrná plocha píků.

Tabulka 19: Přesnost - Allnature Berberin 98% extrakt

| Přesnost | Magnoflorin | Berbamin | Jatrorrhizin | Palmatin | Berberin |
|----------------|-------------|----------|--------------|----------|----------|
| Plochy píků | 415382 | 164562 | 63024 | 135963 | 611709 |
| | 405754 | 154610 | 62882 | 135881 | 607019 |
| | 415284 | 162851 | 64088 | 138020 | 625589 |
| | 402829 | 163642 | 63196 | 138073 | 623155 |
| | 423009 | 173915 | 67408 | 145730 | 657295 |
| | 381211 | 159128 | 61731 | 134474 | 603265 |
| | 414592 | 173506 | 65300 | 144612 | 640674 |
| Průměr | 408294 | 164602 | 63947 | 138965 | 624101 |
| SD | 13694 | 7069 | 1884 | 4435 | 19404 |
| RSD (%) | 3,35 | 4,29 | 2,95 | 3,19 | 3,11 |

Relativní směrodatná odchylka byla <5 %.

6.2.5 Správnost

Pro určení správnosti metody byly analyzovány vzorky z přípravku Berberin 98% extrakt od společnosti Allnature metodou standardního přidavku. Bylo připraveno 8 pracovních roztoků a jedna směs standardů. Do 2 pracovních roztoků bylo přidáno extrakční činidlo methanol, do zbylých šesti poté methanol s přidavkem každého ze sledovaných standardů, což byly berberin a palmatin. Další alkaloidy nebyly z hlediska výtěžnosti testovány z důvodů nedostatečného množství standardů. Každý z pracovních roztoků byl 3 krát změřen a výsledné plochy píků byly následně zprůměrovány. Z výsledných hodnot pak byla vypočítána hodnota výtěžnosti, a to rozdílem a poměrem ploch pracovních roztoků s přidavkem standardů a bez něj, s plochou samotných měřených standardů v jejich připravené směsi.

Tabulka 20: Správnost - Allnature Berberin 98% extrakt

| Správnost | Palmatin | Berberin |
|---------------|----------|----------|
| Výtěžnost [%] | 93,35 | 108,36 |
| | 102,97 | 98,74 |
| | 102,67 | 102,47 |
| | 101,85 | 104,53 |
| | 104,48 | 106,03 |
| | 103,57 | 104,47 |
| Průměr [%] | 101,48 | 104,10 |
| SD | 3,73 | 2,99 |
| RSD [%] | 3,67 | 2,87 |

Výtěžnost dosahovala průměrných hodnot v rozmezí 95 – 105 %. Relativní směrodatná odchylka byla pod 5 %.

6.2.6 Limit detekce a kvantifikace

Limit detekce byl stanoven změřením zředěných pracovních roztoků poslední koncentrační hladiny měřené při stanovování linearitu, tj. 1 µg/ml. Tyto koncentrační hladiny byly 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,125 µg/ml a 0,0625 µg/ml. Jako limit detekce byla stanovena koncentrační hladina 0,0625 µg/ml.

Limit kvantifikace byl u jednotlivých standardů určen porovnáním jejich odezvy na koncentrační hladině s 10 násobkem šumu linie detektoru, jež byl 0,05 mAU. Výsledky jsou prezentovány v následující tabulce č. 22.

Tabulka 21: Limit detekce a kvantifikace

| | Šum linie [mAU] | Odezva [mAU] | Limit kvantifikace [μg/ml] |
|---------------------|-----------------|--------------|----------------------------|
| Aromolin | 0,05 | 0,475 | 0,250 |
| Magnoflorin | 0,05 | 0,675 | 0,125 |
| Berbamin | 0,05 | 0,475 | 0,250 |
| THP | 0,05 | 0,325 | 0,250 |
| Jatrorrhizin | 0,05 | 0,590 | 0,125 |
| THB | 0,05 | 0,250 | 0,250 |
| Palmatin | 0,05 | 0,560 | 0,125 |
| Berberin | 0,05 | 0,580 | 0,125 |
| Oxyberberin | 0,05 | 0,450 | 0,250 |

6.3 Stanovení obsahu účinných látek v potravních doplňcích

Vyvinutá metoda byla využita ke stanovení účinných látek v potravních doplňcích. Jednalo se o 4 potravní doplňky, konkrétně o Allnature Berberin 98% extrakt, Ostrovit Berberin, Swanson Berberin a GreenFood Berberine. Při analýze jednotlivých potravních doplňků byla zkoumána přítomnost berberinu a případně (v potravním doplňku nežádoucích) ostatních isochinolinových alkaloidů, pro které byla metoda vyvinuta. Poté byl porovnán deklarovaný obsah berberinu se skutečně přítomným na základě informací nalezených na obalu jednotlivých potravních doplňků. Následující přehledová tabulka (č. 23) demonstruje zastoupení zjištěných isochinolinových alkaloidů v analyzovaných přípravcích. Z tabulky č. 23 je patrné, že přípravek Allnature Berberin 98% extrakt obsahoval největší spektrum alkaloidů.

Tabulka 22: Přehled zastoupení jednotlivých analytů v analyzovaných přípravcích

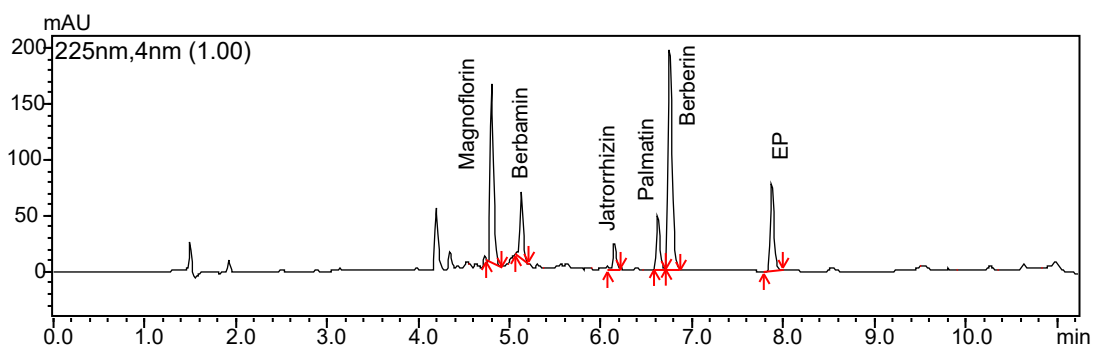
| | Magnoflorin | Berbamin | Jatrorrhizin | Palmatin | Berberin |
|--|-------------|----------|--------------|----------|----------|
| Allnature Berberin 98 % extrakt | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Ostrovit Berberin | × | × | ✓ | × | ✓ |
| Swanson Berberin | × | × | ✓ | × | ✓ |
| GreenFood Berberine | × | × | ✓ | × | ✓ |

6.3.1 Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Allnature Berberin 98% extrakt

V tomto přípravku byl deklarován obsah berberin extraktu 500 mg v jedné kapsli. Příprava vzorků je popsána v kapitole 5.4.1. Takto vyextrahované 3 vzorky byly každý dvakrát změřeny a výsledné plochy poté zprůměrovány a přepočítány na 100 mg vzorku a na celou hmotnost kapsle. Průměrná hmotnost jedné kapsle byla 413,14 mg.

Tabulka 23: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Allnature Berberin 98% extrakt

| Vzorek Allnature | Deklarovaný obsah [mg/cps] | Zjištěný obsah [mg] | Zjištěný obsah [%] |
|------------------|----------------------------|---------------------|--------------------|
| Magnoflorin | / | 2,01 | / |
| Berbamin | / | 1,09 | / |
| Jatrorrhizin | / | 0,32 | / |
| Palmatin | / | 0,77 | / |
| Berberin | / | 3,24 | / |



Obrázek 40: Chromatogram - Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Allnature Berberin 98% extrakt

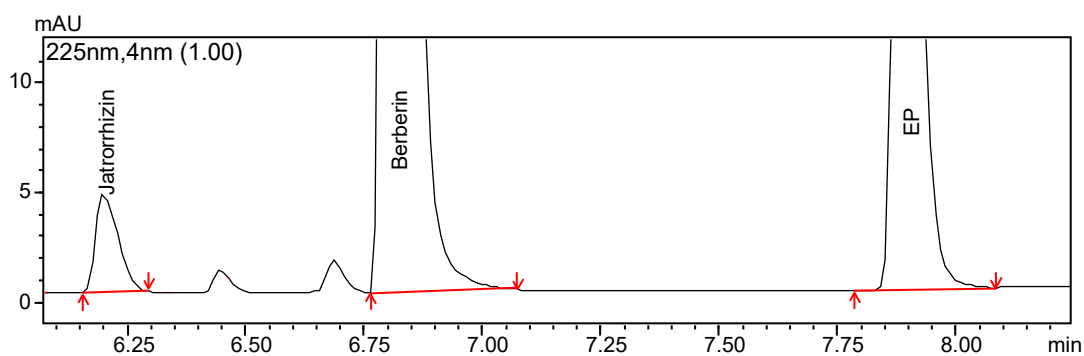
6.3.2 Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Ostrovit Berberin

V tomto přípravku byl deklarován obsah berberin extraktu 500 mg v jedné tabletě, z toho čistého berberinu pak 10 mg. Příprava vzorků je popsána v kapitole 5.4.2. Takto vyextrahované 3 vzorky byly každý dvakrát změřeny a výsledné plochy poté

zprůměrovány a přepočítány na 100 mg vzorku a na celou hmotnost tablety. Průměrná hmotnost jedné tablety byla 1186,91 mg.

Tabulka 24: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Ostrovit Berberin

| Vzorek Ostrovit | Deklarovaný obsah [mg/tbl] | Zjištěný obsah [mg] | Zjištěný obsah [%] |
|---------------------|----------------------------|---------------------|--------------------|
| Berberin | 10 | 9,08 | 90,8 |
| Jatrorrhizin | / | 0,24 | / |



Obrázek 41: Chromatogram - Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Ostrovit Berberin

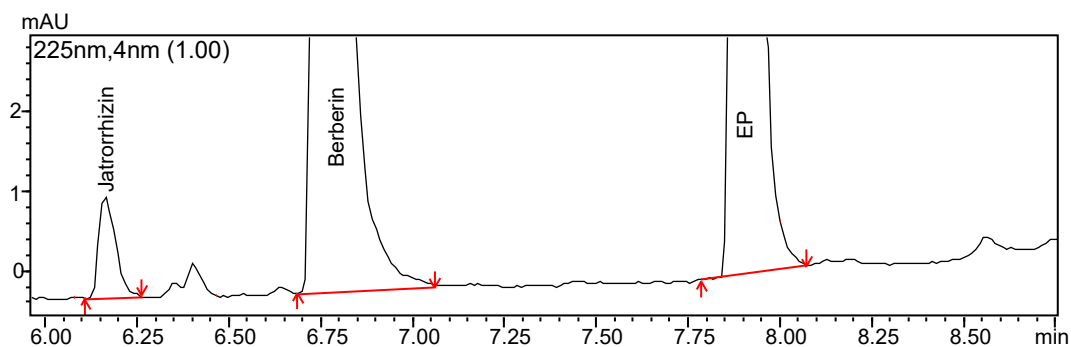
6.3.3 Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Swanson Berberin

V tomto přípravku byl deklarován obsah berberinu 400 mg v jedné kapsli. Příprava vzorků je popsána v kapitole 5.4.3. Takto vyextrahované 3 vzorky byly každý dvakrát změřeny a výsledné plochy poté zprůměrovány a přepočítány na 100 mg vzorku a na celou hmotnost kapsle. Průměrná hmotnost jedné kapsle byla 610,48 mg.

Tabulka 25: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Swanson Berberin

| Vzorek Swanson | Deklarovaný obsah [mg/cps] | Zjištěný obsah [mg] | Zjištěný obsah [%] |
|---------------------|----------------------------|---------------------|--------------------|
| Berberin | 400 | 446,16 | 111,54 |
| Jatrorrhizin | / | 3,43 | / |

6.3.4 Stanovení obsahu účinných látek v přípravku GreenFood Berberine

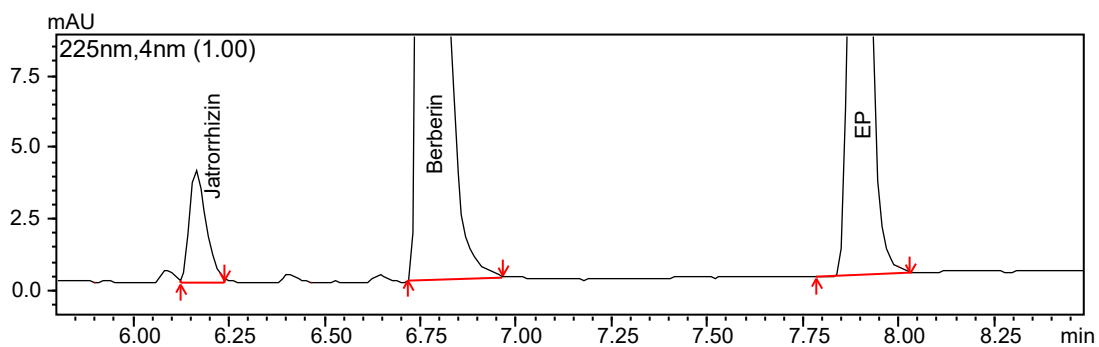


Obrázek 42: Chromatogram - Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Swanson Berberin

V tomto přípravku byl deklarován obsah berberinu 500 mg v jedné dávce, což odpovídalo dvěma 250 mg kapslím. Příprava vzorků je popsána v kapitole 5.4.4. Takto vyextrahované 3 vzorky byly každý dvakrát změřeny a výsledné plochy poté zprůměrovány a přepočítány na 100 mg vzorku a na celou hmotnost kapsle. Průměrná hmotnost jedné kapsle byla 454,92 mg.

Tabulka 26: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku GreenFood Berberine

| Vzorek GreenFood | Deklarovaný obsah [mg/cps] | Zjištěný obsah [mg] | Zjištěný obsah [%] |
|------------------|----------------------------|---------------------|--------------------|
| Berberin | 250 | 179,31 | 71,72 |
| Jatrorrhizin | / | 5,59 | / |



Obrázek 43: Chromatogram - Stanovení obsahu účinných látek v přípravku GreenFood Berberine

7 Závěr

Vyvinutá a validovaná HPLC metoda byla využita k identifikaci a kvantifikaci obsahových látek v potravních doplňcích, které deklarovaly různý obsah berberinu. Metoda kromě berberinu byla také schopna detekovat a kvantifikovat isochinolinové alkaloidy aromolin, berbamin, magnoflorin, tetrahydropalmatin, jatrorrhizin, tetrahydroberberin, palmatin a oxyberberin.

Touto metodou byly analyzovány celkem 4 potravní doplňky, a to jmenovitě Allnature Berberin 98% extrakt, Ostrovit Berberin, Swanson Berberin a GreenFood Berberine. Finální optimální podmínky pro analýzu byly stanoveny následovně. Byla využita chromatografická kolona Ascentis® Express 90 Å AQ-C18, 150 x 4,6 mm, 2,7 µm jako stacionární fáze. Optimální mobilní fází pro tuto metodu byl acetonitril/voda okyselená kyselinou fosforečnou na pH 2,0. Objem nástřiku na kolonu činil 5 µl, rychlost průtoku 1 ml/min a teplota v kolonovém prostoru byla 30 °C. Tlak na počátku separace činil 19 MPa. Pro detekci analytů byly vybrány dvě vlnové délky podle absorpčních maxim jednotlivých analytů, a to 225 nm pro aromolin, magnoflorin, berbamin, THP, THB a 345 nm pro jatrorrhizin, palmatin, berberin a oxyberberin. Režim analýzy byl stanoven na gradientový. Ethylparaben, jako původně zvolený vhodný vnitřní standard, nebyl při finálních výpočtech stanovení obsahu účinných látek využit. Při měření validačního parametru správnosti vykazovaly výsledky výpočtů s vnitřním standardem horší výtěžnost, než bez jeho použití. Vzhledem k tomu, že ve validaci metody vycházel parametr opakovatelnosti, nebyla tedy při finálních výpočtech použita metoda vnitřního standardu, nýbrž metoda standardu vnějšího. Při analýze potravních doplňků byla u každého z nich zjištěna přítomnost i jiného alkaloidu navíc, kromě již deklarovaného berberinu, a ani u jednoho z potravních doplňků nebyl deklarovaný obsah berberinu přesně dodržen. Z povahy potravních doplňků však nemusí být tento deklarovaný obsah garantován.

V přípravku Allnature Berberin 98% extrakt byly kromě berberinu v minoritním množství také přítomny alkaloidy magnoflorin, berbamin, jatrorrhizin a palmatin. Přítomnost berberinu není na obale potravního doplňku uvedeno, jedná se o extrakt. Uvedená deklarovaná hmotnost 500 mg udává tedy jen množství extraktu, neříká nic o

obsaženém berberinu. Nelze tedy stanovit procentuální zastoupení skutečně přítomného berberinu vůči deklarovanému množství. Ze všech stanovovaných přípravků byl však obsah berberinu u tohoto konkrétního potravního doplňku ze všech nejmenší.

V přípravku Ostrovit Berberin byly přítomny alkaloidy jatrorrhizin a berberin. Přítomnost berberinu vůči deklarovanému množství na obalu potravního doplňku byla 90,8 %. Skutečný obsah berberinu se tedy nejvíce ze všech sledovaných blížil hodnotě obsahu deklarovaného.

V přípravku Swanson Berberin byly přítomny alkaloidy jatrorrhizin a berberin. Přítomnost berberinu vůči deklarovanému množství na obalu potravního doplňku byla 111,54 %. Skutečný obsah berberinu u tohoto přípravku dokonce překonal obsah deklarovaný, a to o 11,54 %.

V přípravku GreenFood Berberine byly přítomny alkaloidy jatrorrhizin a berberin. Přítomnost berberinu vůči deklarovanému množství na obalu potravního doplňku byla 71,72 %.

8 Seznam použité literatury

- [1] Grycová L., Kvartérní protoberberinové alkaloidy, Rigorózní práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, *dostupné z: <https://is.muni.cz/th/dfbxo/>*, Brno, 2006 [cit. 27.3.2021].
- [2] Kuchař M., Farmaceutický encyklopedický slovník, Praha, 2014, s. 36 ISBN 978-80-7080-876-4.
- [3] Spilková J., Farmakognozie, Praha, 2016, s. 204, 212 ISBN 978-80-246-3264-3.
- [4] Singh A., Bajpai V., Kumar S., Arya K.R., Sharma K.R., Kumar B., Quantitative determination of isoquinoline alkaloids and chlorogenic acid in Berberis species using ultra high performance liquid chromatography with hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spektrometry, *Journal of Separation Science*, 2015, s. 2007-2191.
- [5] Jia X.-J., Li X., Wang F., Liu H.-Q., Zhang D.-J., Berbamine Exerts Anti-Inflammatory Effects via Inhibition of NF- κ B and MAPK Signaling Pathways, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017, s. 2307-2318.
- [6] Sugimoto Y., Sugimura Y., Yamada Y., Biosynthesis of bisbenzylisoquinoline alkaloids in cultured roots of *Stephania cepharantha*, *FEBS Letters*, 1990, s. 82-86.
- [7] <https://de.wikipedia.org/wiki/Isochinolin> [citováno 24.3.2021].
- [8] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Berberine> [citováno 24.3.2021].
- [9] <https://cs.wikipedia.org/wiki/Berberin> [citováno 24.3.2021].
- [10] Kumar A. E., Chopra K., Mukherjee M., Pottabathini R., Dhull D.K., Current knowledge and pharmacological profile of berberine: An update, *European Journal of Pharmacology*, 2015, s. 288-297.
- [11] Jahodář L., Léčivé rostliny v současné medicíně: (co Mattioli ještě nevěděl), Praha, 2010, s. 41 ISBN 978-80-87109-22-9.
- [12] <https://www.allnature.cz/allnature-berberin-extrakt-98-500-mg-60-cps-p1177308/> [citováno 24.3.2021].
- [13] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Jatrorrhizine> [citováno 3.5.2021].

- [14]<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b1/Jatrorrhizine.svg>
[citováno 3.5.2021].
- [15] Pérez E. G., Cassels B. K., Cordell G. A., *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Chapter 3 - Alkaloids from the Genus *Duguetia*, *Academic Press*, 2010, s. 83-156 ISBN 9780123813350.
- [16] Chang Y.-X., Ge A.-H., Yu X.-A., Jiao X.-C., Li J., He J., Tian J., Liu W., Azietaku J. T., Zhang B.-L., Gao X.-M., Simultaneous determination of four phenolic acids and seven alkaloids in rat plasma after oral administration of traditional Chinese medicinal preparation Jinqi Jiangtang Tablet by LC-ESI-MS/MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, s. 1-10.
- [17] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Palmatine> [citováno 3.5.2021].
- [18]https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0300908419301105-gr1_lrg.jpg
[citováno 3.5.2021].
- [19] Long J., Song J., Zhong L., Liao Y., Liu L., Li X., Palmatine: A review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics, *Biochimie*, 2019, s. 176-184.
- [20] Nováková L., Douša M., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*, Praha, 2013, s. 11, 32 ISBN 978-80-260-4244-0.
- [21] Klimeš J., *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami 2. vydání*, Hradec Králové, 2015, s. 29-40 ISBN 978-80-260-8175-3.
- [22] Základní charakteristiky chromatografického procesu, <http://www.hplc.cz> [citováno 25. 3. 2021].
- [23]https://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC#/media/Soubor:Preparative_HPLC.svg
[citováno 25. 3. 2021].
- [24] Singh A., Bajpai V., Kumar S., Kumar B., Srivastava M., Arya K.R., Sharma K.R., Distribution and Discrimination Study of Bioactive Compounds from *Berberis* species using HPLC-ESI-QTOF-MS/MS with Principle Component Analysis, *Natural Product Communications*, 2016, s. 1807-1812.

- [25] Dohnal J., Brusová H., Moderní přístupy k farmaceutické analýze, Praha, 2010, s. 73-75 ISBN 978-80-7305-085-6.
- [26] Karlíček R., Analytická chemie pro farmaceuty, Praha, 2013, s. 277 ISBN 978-80-246-2202-6.
- [27] Churáček J., Jandera P., Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie, Praha, 1985. s. 66-70.
- [28] https://www.analytix-shop.com/media/Hersteller/Kataloge/supelco-gb/Supelco_HPLC_Catalogue.pdf [citováno 21.4.2021].
- [29] Kirkland J. J., Schuster S. A., Johnson W. L., Boyes B. E., Fused-core particle technology in high-performance liquid chromatography: An overview, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2013 , s. 303–312.
- [30] Hayes R., Ahmed A., Edge T., Zhang H., Core–shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 2014, s. 36-52.
- [31] <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=17841440> [citováno 21.4.2021].
- [32] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/577331u?lang=en®ion=CZ> [citováno 21.4.2021].
- [33] http://galachem.ru/upload/pdf/Supelco_Columns.pdf [citováno 21.4.2021].
- [34] Qu H., Ma Y., Yu K., Cheng Y., Simultaneous determination of eight active components in Chinese medicine ‘YIQING’ capsule using high-performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, s. 66-72.
- [35] Yeh C.-C., Huang S.-S., Liu P.-Y., Wang B.-C., Tsai C.-F., Wang D.-Y., Cheng H.-F., Simultaneous quantification of six indicator compounds in Wen-Qing-Yin by high-performance liquid chromatography-diode array detection, *Journal of Food and Drug Analysis*, 2019, s. 749-757.

- [36] Pasrija A., Singh R., Katiyar C. K., Validated HPLC-UV method for the determination of berberine in raw herb Daruharidra (*Berberis aristata* DC), its extract, and in commercially marketed Ayurvedic dosage forms, *International Journal of Ayurveda Research*, 2010, s. 243-246.
- [37] Srinivasan G. V., Unnikrishnan K. P., Rema Shree A. B., Balachandran I., HPLC Estimation of berberine in *Tinospora cordifolia* and *Tinospora sinensis*, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, s. 96-99.
- [38] Och A., Szewczyk K., Pecio Ł., Stochmal A., Załuski D., Bogucka-Kocka A., UPLC-MS/MS Profile of Alkaloids with Cytotoxic Properties of Selected Medicinal Plants of the Berberidaceae and Papaveraceae Families, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, s. 7.
- [39] Kun L., Fei W., Yun-Peng D., Xiao-Qiu P., Yun-Juan E., Huo-Li Z., Simultaneous determination of contents of three active components in Jiejia tincture by HPLC method, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 2013, s. 370-374.
- [40] Brown P. N., Roman M. C., Determination of hydrastine and berberine in goldenseal raw materials, extracts, and dietary supplements by high-performance liquid chromatography with UV: collaborative study, *Journal of AOAC International*, 2008, s. 694-701.
- [41] Lakshmi Mrs. G., Sakinala P., RP-HPLC method development and validation for estimation of berberine in bulk and pharmaceutical dosage forms, *International Journal of Research and Analytical Reviews*, 2019, s. 357-368.
- [42] Wang J.-C., Zhang Q., Cai D.-F., Stability-Indicating Validated HPLC Method for Analysis of Berberine Hydrochloride and Trimethoprim in Pharmaceutical Dosage Form, *Journal of Chemistry*, 2012, s. 9.

9 Seznam tabulek

| | |
|--|----|
| Tabulka 1: Přehled vybraných stanovení berberinu a příslušných alkaloidů..... | 20 |
| Tabulka 2: Přehled použitých přístrojů a pomůcek | 22 |
| Tabulka 3: Přehled zkoumaných přípravků..... | 24 |
| Tabulka 4: Podoba a průběh použitého gradientu | 27 |
| Tabulka 5: Optimální nastavení pro HPLC analýzu..... | 44 |
| Tabulka 6: Test způsobilosti chromatografického systému | 45 |
| Tabulka 7: Parametry lineární regrese pro aromolin..... | 46 |
| Tabulka 8: Parametry lineární regrese pro magnoflorin..... | 47 |
| Tabulka 9: Parametry lineární regrese pro berbamin..... | 48 |
| Tabulka 10: Parametry lineární regrese pro THP | 49 |
| Tabulka 11: Parametry lineární regrese pro jatrorrhizin | 50 |
| Tabulka 12: Parametry lineární regrese pro palmatin | 51 |
| Tabulka 13: Parametry lineární regrese pro berberin..... | 52 |
| Tabulka 14: Parametry lineární regrese pro THB..... | 53 |
| Tabulka 15: Parametry lineární regrese pro oxyberberin | 54 |
| Tabulka 16: Opakovatelnost analýzy roztoku standardů na koncentrační hladině 1 µg/ml | 55 |
| Tabulka 17: Opakovatelnost analýzy roztoku standardů na koncentrační hladině 2 µg/ml | 56 |
| Tabulka 18: Opakovatelnost analýzy roztoku standardů na koncentrační hladině 25 µg/ml | 56 |
| Tabulka 20: Přesnost - Allnature Berberin 98% extrakt..... | 57 |
| Tabulka 21: Správnost - Allnature Berberin 98% extrakt..... | 58 |
| Tabulka 22: Limit detekce a kvantifikace | 59 |
| Tabulka 23: Přehled zastoupení jednotlivých analytů v analyzovaných přípravcích | 59 |
| Tabulka 24: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Allnature Berberin 98% extrakt | 60 |
| Tabulka 25: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Ostrovit Berberin | 61 |
| Tabulka 26: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Swanson Berberin..... | 61 |
| Tabulka 27: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku GreenFood Berberine | 62 |

10 Seznam obrázků

| | |
|---|----|
| Obrázek 1: Základní struktura isochinolinových alkaloidů [7] | 12 |
| Obrázek 2: Molekulový vzorec berberinu [9]..... | 12 |
| Obrázek 3: Molekulový vzorec jatrorrhizinu [14] | 14 |
| Obrázek 4: Molekulový vzorec palmatinu [18] | 15 |
| Obrázek 5: Obecné schéma kapalinového chromatografu [23] | 16 |
| Obrázek 6: Srovnání povrchově porézní částice a celkově porézní částice [31]..... | 18 |
| Obrázek 7: Praktický vliv technologie SPP na průběh separace v porovnání s celkově porézními částicemi [33] | 19 |
| Obrázek 8: Volba vhodného průběhu gradientu | 30 |
| Obrázek 9: Absorpční spektrum standardu aromolinu..... | 31 |
| Obrázek 10: Absorpční spektrum standardu magnoflorinu..... | 32 |
| Obrázek 11: Absorpční spektrum standardu berbaminu | 32 |
| Obrázek 12: Absorpční spektrum standardu tetrahydropalmatinu | 33 |
| Obrázek 13: Absorpční spektrum standardu jatrorrhizinu | 33 |
| Obrázek 14: Absorpční spektrum standardu tetrahydroberberinu | 34 |
| Obrázek 15: Absorpční spektrum standardu palmatinu | 34 |
| Obrázek 16: Absorpční spektrum standardu berberinu | 35 |
| Obrázek 17: Absorpční spektrum standardu oxyberberinu..... | 35 |
| Obrázek 18: Absorpční spektrum standardu ethylparabenu..... | 36 |
| Obrázek 19: Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm, methanol/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce | 37 |
| Obrázek 20: Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce | 38 |
| Obrázek 21: YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 5 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce | 38 |
| Obrázek 22: YMC Carotenoid 150 x 4,6 mm, 5 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce | 39 |
| Obrázek 23: YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 3 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce | 39 |
| Obrázek 24: YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm, 3 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce | 40 |
| Obrázek 25: Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 4,6 mm, 2,7 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce | 40 |
| Obrázek 26: Kinetex® 2,6 µm XB-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce | 41 |
| Obrázek 27: Luna® Omega 5 µm Polar C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 5 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce | 41 |
| Obrázek 28: Kinetex® 2,6 µm EVO-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, acetonitril/voda + kyselina fosforečná (pH-2,0)- gradientová eluce | 42 |
| Obrázek 29: Chromatogramy porovnávající 4 nejúčinnější kolony | 43 |
| Obrázek 30: Chromatogram znázorňující separaci všech standardů za optimálních separačních podmínek | 44 |
| Obrázek 31: Kalibrační závislost pro aromolin..... | 46 |
| Obrázek 32: Kalibrační závislost pro magnoflorin..... | 47 |
| Obrázek 33: Kalibrační závislost pro berbamin..... | 48 |
| Obrázek 34: Kalibrační závislost pro THP | 49 |

| | |
|---|----|
| Obrázek 35: Kalibrační závislost pro jatrorrhizin | 50 |
| Obrázek 36: Kalibrační závislost pro palmatin | 51 |
| Obrázek 37: Kalibrační závislost pro berberin | 52 |
| Obrázek 38: Kalibrační závislost pro THB | 53 |
| Obrázek 39: Kalibrační závislost pro oxyberberin | 54 |
| Obrázek 40: Chromatogram - Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Allnature Berberin 98% extrakt | 60 |
| Obrázek 41: Chromatogram - Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Ostrovit Berberin | 61 |
| Obrázek 42: Chromatogram - Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Swanson Berberin | 62 |
| Obrázek 43: Chromatogram - Stanovení obsahu účinných látek v přípravku GreenFood Berberine..... | 62 |