

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Studium rostlinných alkaloidů  
hunnemaninu, papaverinu a chininu  
prostřednictvím moderních  
analytických metod

Petr Geršl

Jihomoravský kraj

Brno 2024

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Studium rostlinných alkaloidů  
hunnemaninu, papaverinu a chininu  
prostřednictvím moderních  
analytických metod

A Study of Plant Alkaloids  
Hunnemanine, Papaverine  
and Quinine Through Modern  
Methods of Analysis

**Autor:** Petr Geršl

**Škola:** Cyrilometodějské gymnázium a střední odborná škola pedagogická Brno, Lerchova 63, 602 00 Brno

**Kraj:** Jihomoravský kraj

**Vedoucí práce:** doc. Mgr. Petr Táborský, Ph.D.

**Konzultant:** Mgr. Pavel Hannig

Brno 2024

# Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne

---

Petr Geršl

## Poděkování

Rád bych poděkoval mému konzultantovi, panu Mgr. Pavlu Hannigovi, doktorandovi oboru chemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně, který se mnou celou práci naplánoval, naučil mě pracovat s přístroji pro moderní chemickou analýzu a vysvětlil mi klíčové koncepty pro pochopení problematiky této práce.

Velké poděkování patří také řediteli Ústavu chemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity, panu doc. Mgr. Petru Tábořskému, Ph.D., který mi umožnil provádět experimentální část mé práce v Laboratoři luminiscenčních metod.

Tato práce byla vypracována za finanční podpory JMK a JCMM.



**jihomoravský kraj**

## Anotace

Tato práce se zabývá studiem vybraných alkaloidů a prací s nimi pomocí moderních analytických metod. U chininu a papaverinu jsou zkoumány jejich koncentrace v populárních tonikových nápojích a starších tabletách. U hunnemaninu je zkoumána hodnota pKr a jeho schopnost vazby na G-kvadruplexové struktury DNA.

V teoretické části jsou popsány alkaloidy jako skupina biochemických látek obecně, dále pak struktury DNA a analytické metody, které byly při výzkumu použity. V experimentální části jsou prezentovány výsledky jednotlivých měření a jejich interpretace.

## Klíčová slova

Alkaloid, hunnemanin, chinin, papaverin, UV-Vis spektroskopie, fluorescenční spektroskopie, G-kvadruplex

## Annotation

This paper concerns itself with the study of a number of chosen alkaloids and the modern analytical methods used to examine them. The concentrations of quinine and papaverine are determined in popular tonic drinks and older drug tablets respectively. The pKr value and the ability to bond with G-quadruplex DNA structures of hunnemanine is also examined.

In the theoretical part, alkaloids as a group of biochemical compounds are described, so are the different structures of DNA and the analytical methods that were used for this research. In the experimental part, the results of individual measurements are presented along with their interpretation.

## Key words

Alkaloid, hunnemanine, quinine, papaverine, UV-Vis spectroscopy, fluorescence spectroscopy, G-quadruplex

## Seznam tabulek

1	Hodnoty pK <sub>r</sub> hunnemaninu a standardní odchylka . . . . .	16
2	Vyhodnocení metody nejmenších čtverců . . . . .	19
3	Koncentrace chininu v populárních tonikových nápojích . . . . .	23
4	Obsah papaverinu v tabletě . . . . .	25

## Seznam obrázků

1	Struktury vybraných aminokyselin . . . . .	3
2	Struktury vybraných protoalkaloidů . . . . .	3
3	Struktury vybraných pseudoalkaloidů . . . . .	4
4	Struktura hunnemaninu . . . . .	6
5	Struktura papaverinu . . . . .	6
6	Struktura chininu . . . . .	7
7	Struktury dusíkatých bází a cukerné složky DNA . . . . .	8
8	Schematické struktury G-kvadruplexu . . . . .	9
9	Schéma instrumentace UV-Vis spektroskopu . . . . .	10
10	Excitační a emisní spektrum . . . . .	11
11	Schéma instrumentace fluorimetru . . . . .	11
12	Deprotonovaná a protonovaná forma hunnemaninu . . . . .	14
13	Změřené excitační a emisní spektrum hunnemaninu . . . . .	14
14	Emisní spektra hunnemaninu v různých prostředích . . . . .	15
15	Závislost intenzity emisního maxima hunnemaninu na prostředí . . . . .	16
16	Emisní spektra hunnemaninu při titraci oligonukleotidu . . . . .	18
17	Závislost intenzity emisního maxima roztoku na koncentraci oligonukleotidu . . . . .	18
18	Změřené excitační a emisní spektrum chininu . . . . .	19
19	Emisní spektra kalibračních roztoků chininu a roztoků toniků . . . . .	21
20	Emisní kalibrační křivka s koncentracemi chininu ve vzrocích toniku . . . . .	21
21	Absorpční spektra kalibračních roztoků chininu a roztoků toniků . . . . .	22
22	Absorpční kalibrační křivka s koncentracemi chininu ve vzrocích toniku . . . . .	22
23	Absorpční spektra kalibračních vzorků papaverinu a roztoku tablety . . . . .	24
24	Kalibrační křivka s koncentrací papaverinu v tabletě . . . . .	25



# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod a cíle práce</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část</b>	<b>3</b>
2.1	Klasifikace alkaloidů . . . . .	3
2.1.1	Pravé alkaloidy . . . . .	3
2.1.2	Protoalkaloidy . . . . .	3
2.1.3	Pseudoalkaloidy . . . . .	4
2.2	Nomenklatura alkaloidů . . . . .	4
2.3	Výskyt alkaloidů v přírodě . . . . .	5
2.4	Použité alkaloidy . . . . .	5
2.4.1	Hunnemanin . . . . .	5
2.4.2	Papaverin . . . . .	6
2.4.3	Chinin . . . . .	7
2.5	Struktura DNA . . . . .	7
2.5.1	Primární struktura DNA . . . . .	7
2.5.2	Sekundární struktura DNA . . . . .	8
2.5.3	Guaninový kvadruplex . . . . .	9
	Struktura G-kvadruplexu . . . . .	9
	Stabilita G-kvadruplexu . . . . .	9
2.6	Použité analytické metody . . . . .	10
2.6.1	Ultrafialovo-viditelná spektroskopie . . . . .	10
	Princip metody . . . . .	10
	Instrumentace . . . . .	10
2.6.2	Fluorescenční spektroskopie . . . . .	11
	Princip metody . . . . .	11
	Instrumentace . . . . .	11
<b>3</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>12</b>
3.1	Použité přístroje . . . . .	12
3.2	Použité chemikálie . . . . .	12
3.3	Příprava roztoků . . . . .	13
	Brittonův-Robinsonův pufr . . . . .	13
	Draselný pufr . . . . .	13
	Fosfátový pufr . . . . .	13
	Standardní roztok chininu . . . . .	13
	Standardní roztok papaverinu . . . . .	13
3.4	Určování pK <sub>r</sub> hunnemaninu . . . . .	14
3.4.1	Popis experimentu . . . . .	14
3.4.2	Výsledky . . . . .	15
3.4.3	Diskuse . . . . .	16

3.5	Titrace G-kvadruplexu hunnemaninem . . . . .	17
3.5.1	Popis experimentu . . . . .	17
3.5.2	Výsledky . . . . .	18
3.5.3	Diskuse . . . . .	19
3.6	Stanovení chininu v toniku . . . . .	19
3.6.1	Popis experimentu . . . . .	19
	Fluorimetrická kalibrační křivka . . . . .	20
	Absorpční kalibrační křivka . . . . .	20
	Analýza toniků . . . . .	20
3.6.2	Výsledky . . . . .	21
3.6.3	Diskuse . . . . .	23
3.7	Stanovení papaverinu v tabletě . . . . .	24
3.7.1	Popis experimentu . . . . .	24
3.7.2	Výsledky . . . . .	24
3.7.3	Diskuse . . . . .	26
<b>4</b>	<b>Závěr</b>	<b>27</b>
	<b>Bibliografie</b>	<b>28</b>

# 1 Úvod a cíle práce

Alkaloidy jsou vysoce diverzní skupinou biochemických látek, které jsou charakteristické přítomností heterocyklu, jehož heteroatomem je dusík [1]. Zpravidla jsou také značně bioaktivní a u živočichů působí v tělech různě. Některé z nich jsou proslulé jako psychotropní látky (morfin, kokain), jiné se zase používají jako léčiva (berberin, sanguinarin) [2]. Dobře fungují jako psychotropní látky, protože se často strukturně podobají některým neurotransmiterům, nejčastěji serotoninu nebo dopaminu. Neuroreceptory mohou aktivovat i inhibovat. Vliv ale mohou mít také na DNA. Některé z nich stabilizují anomálie v sekundární struktuře (klastry nukleotidů), což může zamezit replikaci nebo opravám DNA (*vide infra*). Mezi ně patří třeba výše zmíněný berberin a sanguinarin [3], ale také hunnemanin.

Tato práce se blíže zabývá třemi konkrétními alkaloidy, hunnemaninem, papaverinem a chininem. U každého z nich je zkoumána jiná věc tak, aby bylo možné na výzkumu ukázat využití moderních metod chemické analýzy založených primárně na optických vlastnostech těchto sloučenin.

U papaverinu a chininu byly zkoumány jejich koncentrace v produktech, které je obsahují.

Chinin je běžně obsažen v toniku a dodává mu tak jeho charakteristickou hořkou příchutí. Jeho konzumace ale není vhodná v těhotenství kvůli možným vedlejším účinkům na plod. Obecně vyšší míra konzumace tonikové vody nebo jiných produktů obsahujících chinin může vést k nepříjemnostem, obvykle nevolnosti. Koncentrace ve třech vybraných tonikových nápojích byla zjištěna metodou absorpční a fluorescenční spektroskopie (*vide infra*).

Papaverinové tablety jsou dnes dostupné pouze v některých státech a jako léčivo už v Česku běžně dostupné nejsou. Papaverin se používal primárně na léčbu některých poruch trávicího traktu, migrén, ve formě injekcí také pro potíže s erekcí. Koncentrace papaverinu ve starším balení tablet byla zjištěna metodou absorpční spektroskopie.

U hunnemaninu byly zkoumány celkem dvě jeho vlastnosti. Nejprve byla zjištěna hodnota pH, při níž je v rovnováze protonovaná a deprotonovaná forma alkaloidu. Tato hodnota bývá obecně označována jako pK<sub>r</sub>. Dalé bylo provedeno studium vazby hunnemaninu na G-kvadruplexové struktury DNA. Výsledkem byl počet molekul, které se na tyto struktury navázaly (*vide infra*). Výzkum hunnemaninu byl prováděn metodou absorpční a fluorescenční spektroskopie (*vide infra*).

Teoretická část se zabývá bližší klasifikací alkaloidů a jejich výskytem v přírodě. Zkoumané alkaloidy jsou přiblíženy z obecného hlediska, případně také jejich užití. Navíc jsou také teoreticky popsány výše zmíněné analytické metody.

V experimentální části jsou prezentovány výsledky výzkumu spolu s diskusí a jinými závěry z nich vyplývajícími.

Primárním cílem této práce je zahájení výzkumu málo známého alkaloidu hunnemaninu a jeho možného využití v léčbě rakoviny v prvotních stádiích a to zjištěním, zda se alkaloid váže na guaninový kvadruplex, nekanonickou strukturu DNA. Tato jeho vlastnost může být dále zkoumána a blíže určeny efekty vazby hunnemaninu na guaninový kvadruplex.

Sekundárním cílem této práce může být zvýšení zájmu o méně známé látky, jakou je třeba hunnemanin. Zrovna alkaloidy jsou velmi diverzní skupinou a o spoustě z nich toho mnohé nevíme. Věřím ale, že jsou to právě alkaloidy, které nám mohou v budoucnosti pomoci nejen při léčbě rakoviny.

Mým osobním cílem je vyzkoušet si moderní metody chemické analýzy založené primárně na optických vlastnostech zkoumaných látek. To je také ostatně důvodem, proč není v této práci zkoumán pouze hunnemanin.

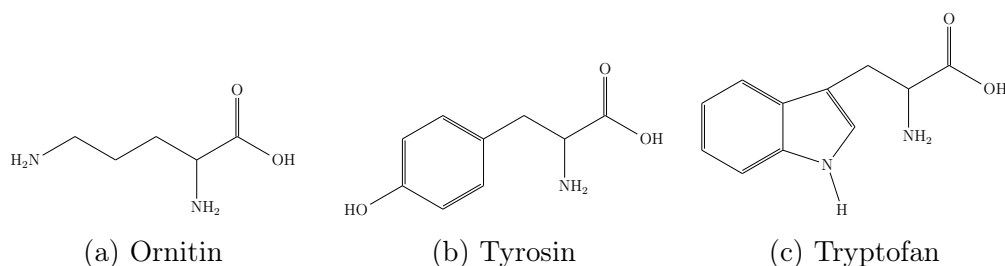
## 2 Teoretická část

### 2.1 Klasifikace alkaloidů

Alkaloidy jsou zpravidla děleny do tří skupin podle biosyntetického původu. Největší skupinou jsou právě alkaloidy, dále pak protoalkaloidy a pseudoalkaloidy.

#### 2.1.1 Právě alkaloidy

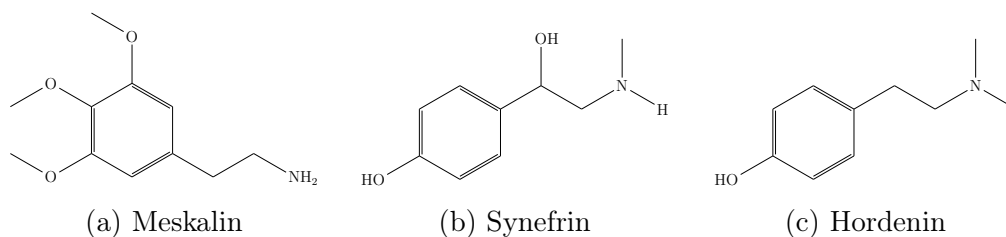
Právě alkaloidy jsou odvozeny od aminokyselin, obvykle vznikají kondenzací dekarboxylované aminokyseliny s vhodným uhlovodíkovým zbytkem, který neobsahuje dusík. Dusík aminokyseliny se tak stane součástí heterocyklické části alkaloidu. Mezi aminokyseliny, ze kterých se právě alkaloidy syntetizují, patří ornitin, tyrosin nebo tryptofan [4]. Konkrétní příklady alkaloidů jsou uvedeny níže.



Obrázek 1: Struktury vybraných aminokyselin

#### 2.1.2 Protoalkaloidy

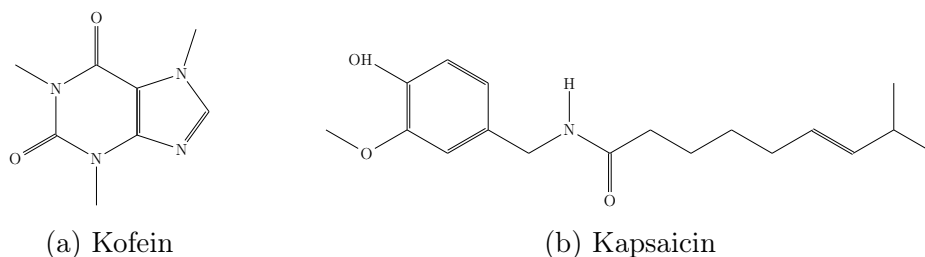
Protoalkaloidy jsou podobně jako právě alkaloidy odvozeny od aminokyselin, ale dusík aminokyseliny v nich není součástí heterocyklu [4]. Jejich struktury jsou v porovnání s pravými alkaloidy o něco jednodušší. Mezi protoalkaloidy patří například meskalin nebo synefrin a hordenin.



Obrázek 2: Struktury vybraných protoalkaloidů

### 2.1.3 Pseudoalkaloidy

Pseudoalkaloidy jsou často heterocyklické sloučeniny, které ale nejsou strukturně ani biosynteticky odvozeny od aminokyselin, nýbrž od jejich pre- nebo postkurzorů. Mohou také vznikat v procesech, které nejsou s aminokyselinami nijak spojeny, například při různých transaminačních procesech. Patří mezi ně známé látky jako kapsaicin nebo kofein.



Obrázek 3: Struktury vybraných pseudoalkaloidů

Alkaloidy<sup>1</sup> lze jinak dělit také podle biologického původu, totiž z jakých druhů či čeledí rostlin pocházejí. Dále je lze klasifikovat na základě strukturních podobností. Mnohé alkaloidy se mohou navzájem docela podobat a jejich struktury lze jeden od druhého navzájem odvozovat. Mluvíme potom například o *protopinových alkaloidech*, protože jsou strukturně odvozené od alkaloidu *protopinu*.

## 2.2 Nomenklatura alkaloidů

Neexistuje jednotný systematický model na pojmenování jednotlivých alkaloidů. Tradičně jsou alkaloidy pojmenovávány pomocí taxonomického názvu rostliny, z níž byly extrahovány, přidáním koncovky *-in* (v angl. *-ine*). Jestliže z jedné rostliny je extrahováno hned několik alkaloidů, potom je třeba koncovku upravit, obvykle na *-idin*, *-anin*, *-alin*, *-inin* nebo jiné<sup>2</sup>. Pokud ani to nestačí, přidávají se ke jménu různé předpony, třeba *iso-*, nebo čísla. U alkaloidů jiného původu se názvy tvoří obdobně, stejně tak u alkaloidů strukturně podobných [6].

<sup>1</sup>Slovem *alkaloidy* budou dále v této práci označovány pravé, proto- i pseudoalkaloidy dohromady.

<sup>2</sup>Příkladem mohou být alkaloidy extrahované ze stromu *Cinchona officinalis* - *kinchonin*[4, 5] a *kinchonidin*[4].

## 2.3 Výskyt alkaloidů v přírodě

Velká část alkaloidů má původ v rostlinách, jsou to často konečné produkty jejich metabolismu. Stále se ale objevují nové alkaloidy s rozdílným původem. Mnoho se jich objevuje u zvířat, hmyzu, mořských rostlin, ale také u mikroorganismů. V každém z organismů, ve kterém se nacházejí, mají svou roli. V rostlinách často fungují jako lákadla pro zajištění opylování, zároveň ale mohou fungovat jako ochrana rostliny před predátory, ať už je to jejich hořkou chutí nebo toxicitou. Totéž platí o některých mikroorganismech [2]. Pro účely této práce jsou zajímavé primárně dva zdroje alkaloidů a to rostlinné čeledi *Apocynaceae* a *Papaveraceae*.

Rostliny z čeledi **Makovité** (*Papaveraceae*) obsahují alkaloidy odvozené od tyrosinu. Čeleď je relativně velká a vyskytuje se zejména, ale ne výhradně, v subtropických oblastech severní polokoule. Alkaloidy pocházející z rostlin této čeledi mají silné biologické vlastnosti a jsou často silnými narkotiky. Mezi ně patří například známý morfin, kodein, narkotin nebo papaverin (*vide infra*), ale také protopin, allokryptopin a hunnemanin (*vide infra*) [4, 7].

Rostliny z čeledi **Toješkovité** (*Apocynaceae*) obsahují celou řadu alkaloidů. Nejvýznamnější jsou ty odvozené od tryptofanu [4], ale čeleď obsahuje také některé steroidové alkaloidy (holonamin, konimin) s různou biologickou aktivitou [8] a alkaloidy odvozené od indolu (iboganinové alkaloidy) [9, 10]. Od tryptofanu jsou odvozeny například alkaloidy chinin (*vide infra*), reserpin, rescinnamin nebo také výše zmíněný iboganin [4].

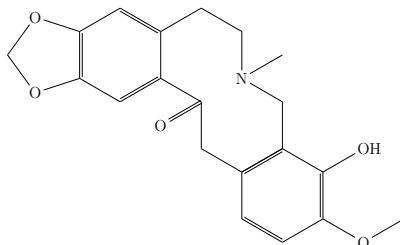
## 2.4 Použité alkaloidy

### 2.4.1 Hunnemanin

Hunnemanin je pravý alkaloid patřící mezi alkaloidy strukturně odvozené od protopinu - *protopinové alkaloidy*. Protopin se ukázal jako relativně efektivní léčivo proti rakovině prostaty. Zamezuje mitóze rakovinných buněk a podporuje jejich apoptickou smrt [11]. Podobně funguje také protopinový alkaloid berberin [12]. Protirakovinné účinky má relativně velké množství alkaloidů, mezi další patří například sanguinarin nebo chelerythrin. Jako léčivo se dnes používá třeba vinblastin [13].

Hunnemanin byl poprvé izolován v roce 1942 z rostliny *Hunnemannia fumariifolia* spolu s protopinem a allokryptopinem. Tehdy byla také zjištěna jeho struktura [14].

Hunnemanin byl dále extrahován z rostliny *Eschscholtzia californica* a zkoumán jako možný fungicid s výbornými výsledky [15]. Spolu se směsí dalších alkaloidů byl izolován také z rostliny *Dactylicapnos torulosa* [16] a jako majoritní složka byl identifikován v rostlině *Argemone fruticosa* [17].



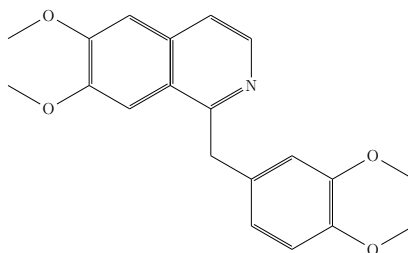
Obrázek 4: Struktura hunnemaninu

### 2.4.2 Papaverin

Papaverin je pravý benzyloisochinolinový alkaloid. Poprvé byl izolován v roce 1848 z latexu rostliny *Papaver somniferum* [18]. Jeho výskyt v něm je ale minoritní, a proto se musí syntetizovat.

Papaverin je biologicky aktivní látkou a jeho efekty na lidský organismus se velmi různí. Má pozitivní účinky při léčbě infekčních onemocnění, například sepse, ale i jiných [19]. Dále byl studován jeho vliv na rakovinné buňky prostaty s pozitivním efektem na vyvolání jejich apoptózy s nízkou toxicitou pro okolí [20], zlatitopapaverinový komplex má antirakovinné účinky na některé rakovinné buňky prsu a prostaty s nízkou toxicitou okolí [21]. Zkoumán byl také vliv papaverinu na viry chřipky [22] a COVIDu-19 [23, 24].

Papaverin se používá také jako relativně běžné léčivo. Používá se jako antispasmodikum, dále jako vazodilatátor, je podáván pacientům s poruchami cév, zejména v mozku nebo v končetinách. Na léčbu impotence se podává injekcí přímo do postižené oblasti, obecně dokáže uvolňovat hladké svalstvo [2]. V současnosti ovšem není v České republice registrovaný žádný lék obsahující papaverin (dle SÚKL).

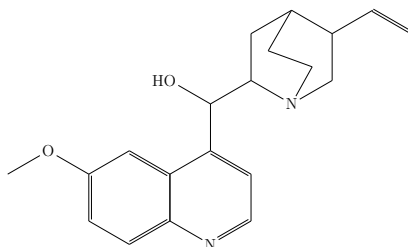


Obrázek 5: Struktura papaverinu



### 2.4.3 Chinin

Chinin je pravý alkaloid vyskytující se ve stromech z rodu *Cinchona*. Poprvé byl izolován v roce 1820 Pelletierem a Caventouem [25]. Jeho struktura je ale značně komplexní a proto byla totální syntéza sestavena až v roce 1944 [26, 27].



Obrázek 6: Struktura chininu

Chinin a chininové alkaloidy tvoří podstatnou část alkaloidů extrahovaných ze stromů rodu *Cinchona*. Používá se primárně jako léčivo proti malárii a některým onemocněním souvisejícím s křečemi nebo svaly, které po kontrakci nejsou schopné relaxovat. Tradičně se používá také jako dochucovadlo tonikové vody (toniků) a způsobuje její charakteristickou hořkou příchuť [2].

## 2.5 Struktura DNA

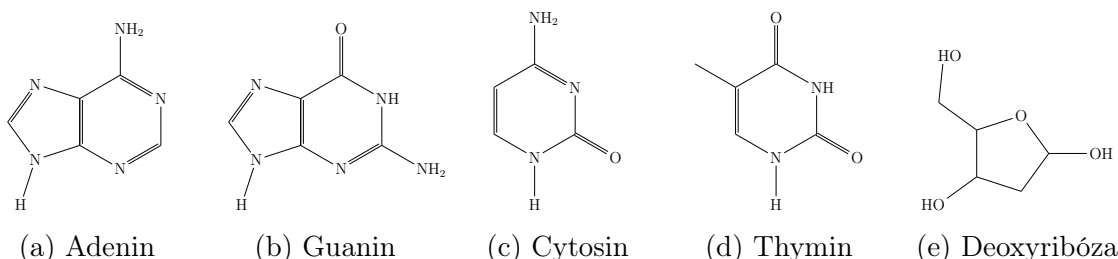
Struktura DNA bývá obvykle popisována na třech úrovních:

1. pořadí dusíkatých bází (primární struktura)
2. prostorové uspořádání řetězců těchto bází (sekundární struktura)
3. uspořádání celé molekuly DNA (terciární struktura)

### 2.5.1 Primární struktura DNA

DNA se skládá ze čtyř dusíkatých bází - purinové báze, adenin a guanin, spolu s pyrimidinovými bázemi, cytosinem a thyminem, cukerné složky (v případě DNA je to deoxyribóza) a fosfátu. Molekuly deoxyribózy jsou spojeny diesterovými fosfátovými můstky a tím tvoří kostru celé molekuly DNA. Na cukerných molekulách jsou zároveň navázány dusíkaté báze.

Dusíkatá báze, cukerná složka a fosfát dohromady tvoří útvar *nukleotid*<sup>3,4</sup>. Řetězce nukleotidů (resp. pořadí dusíkatých bází v řetězci) definují primární strukturu DNA [28].



Obrázek 7: Struktury dusíkatých bází a cukerné složky DNA

### 2.5.2 Sekundární struktura DNA

Molekula DNA je složena ze dvou řetězců dusíkatých bází, které jsou spojeny v dvojšroubovici prostřednictvím vodíkových můstků mezi komplementárními bázemi na obou řetězcích<sup>5</sup>. Vzniklá struktura připomíná dvoušroubovici, která se stáčí kolem společné osy [28].

Sekundární struktura má tři typy – *A*-DNA, *B*-DNA a *Z*-DNA. Nejběžnější je *B*-DNA. Taková dvoušroubovice je pravotočivá a antiparalelní. Na jeden závit připadá řetězec deseti bází a roviny párů bází jsou na osu šroubovice kolmé [28]. *A* forma obsahuje namísto deseti na závit celkem jedenáct bází a jejich páry nejsou na osu šroubovice kolmé. *Z* forma je levotočivá a na jeden závit připadá dvanáct bází. Vyskytuje se obvykle v delších řetězcích střídajících se purinových a pyrimidinových bází [29].

Sekundární struktura DNA je značně závislá na struktuře primární. Ta může zapříčinit vznik mnoha strukturních anomálií. Kostra DNA (tj. cukerný řetězec spojený fosfátovými můstky) je do značné míry flexibilní a umožňuje tak relativně snadný vznik těchto anomálií. Nejběžnější anomálií je deformace osy šroubovice. V prostředí s nižším pH bývají stabilní H-triplexy. Vznikají mezimolekulárními interakcemi tří bází a zapříčiňují komplexnější změny ve struktuře DNA. Pro svůj vznik potřebují delší sekvence stejných pyrimidinových bází na jednom z vláken a delší sekvence purinových bází na druhém z vláken [30].

<sup>3</sup>Hovoříme-li pouze o dusíkaté bázi a cukerné složce dohromady, mluvíme o *nukleosidu*.

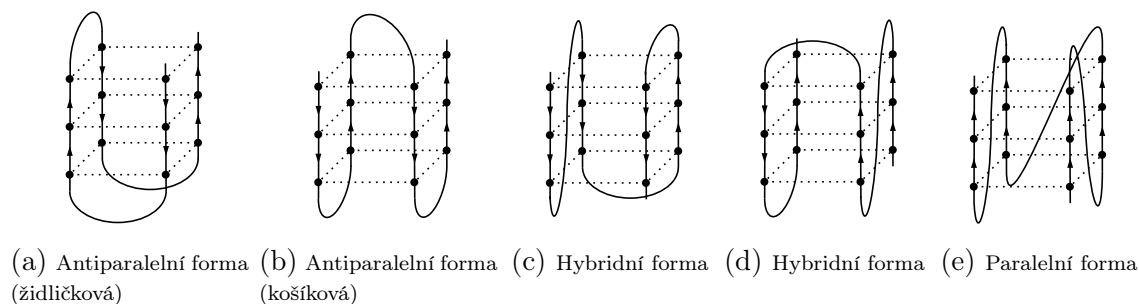
<sup>4</sup>Nukleotidy se ovšem nenachází pouze v DNA a běžně se vyskytují volně v těle. Příklad je třeba *adenosintrifosfát* (příp. *adenosindifosfát*, *adenosinmonofosfát*), který je v buněčných procesech zdrojem (resp. zásobárnou) energie.

<sup>5</sup>Dusíkaté báze jsou v závislosti na své struktuře mezi sebou komplementární. Komplementární páry jsou adenin-thymin, guanin-cytosin.

### 2.5.3 Guaninový kvadruplex

*Guaninový kvartet* (příp. tetráda) je deformací sekundární struktury DNA. Vzniká mezimolekulárním spojením čtyř molekul guaninu do planárního čtvercového uspořádání. *Guaninový kvadruplex* (někdy též tetraplex) je spojení několika kvartetů nad sebou. Stabilní G-kvadruplexové struktury se obvykle nacházejí na telomerech chromosomů, kde DNA obsahuje sekvence bohaté na guanin [30, 31].

**Struktura G-kvadruplexu** G-kvadruplexy vznikají intermolekulárně nebo intramolekulárně. V závislosti na směru vláken (resp. částí vláken), lze rozdělit kvadruplexy na paralelní (všechna vlákna míří stejným směrem), antiparalelní (dvě vlákna míří jedním směrem a dvě vlákna opačným směrem) a hybridní (tři vlákna míří jedním směrem a jedno vlákno opačným směrem) [30, 31]. Několik příkladů těchto struktur je zakresleno v obrázku níže.



Obrázek 8: Schematické struktury G-kvadruplexu

**Stabilita G-kvadruplexu** Ačkoliv G-kvadruplex se vytváří samovolně, k jeho stabilizaci jsou potřeba monovalentní kovové ionty. Největší efekt má draselný kation  $K^+$ , dále pak rubidný, cesný, sodný nebo lithný kation [31].

Vliv na stabilitu G-kvadruplexu mají také alkaloidy [32, 33, 34, 35, 36, 37]. Jejich vliv a mechanismus stabilizace je aktuálně předmětem výzkumu, mj. také v Česku. Změna stability G-kvadruplexu je často určena teplotou, při níž se struktura rozpadá.

Stabilita G-kvadruplexu je klíčová pro výzkum možných léků a léčebných metod různých typů rakoviny. Stabilní G-kvadruplex totiž může zamezit replikaci DNA rakovinné buňky a tím zastavit růst nádoru nebo zamezit metastázi.

## 2.6 Použité analytické metody

V experimentální části této práce byly použity dvě analytické metody – ultrafialovo-viditelná spektroskopie (UV-Vis spektroskopie, často také absorpční spektroskopie) a fluorescenční spektroskopie.

### 2.6.1 Ultrafialovo-viditelná spektroskopie

**Princip metody** UV-Vis spektroskopie spočívá v excitaci valenčních elektronů zkoumané látky (nuklidu nebo molekuly) při absorpci energie světla o dané vlnové délce. Dochází tedy ke změně zářivého toku. Poměr původního zářivého toku a zářivého toku prošlého skrze vzorek vyjadřuje veličina *transmittance*. *Absorbance* je definována jako záporný dekadický logaritmus transmittance. Absorbance má specifickou hodnotu pro každou vlnovou délku. Dohromady hodnota absorbance v závislosti na vlnové délce tvoří *absorpční spektrum*. Absorpční spektrum lze interpretovat kvalitativně, jelikož jednotlivé charakteristické skupiny látek mají různé absorpční vlastnosti. Kvantitativně lze absorpční spektrum využít při zjišťování koncentrace známé látky pomocí Beerova-Lambertova zákona<sup>6</sup> [38, 39].

**Instrumentace** Zdrojem viditelného světla bývají obvykle halogenové lampy. Zdrojem ultrafialového záření je deuteriová lampa [38, 40].

Záření zdroje je směsí mnoha vlnových délek a pro analýzu je třeba izolovat jednotlivé vlnové délky. Na to se využívá monochromátor, nejčastěji Czerného-Turnerova konstrukce. Záření z monochromátoru poté putuje na vzorek. Vzorek je umístěn v kyvetě, která je nejčastěji vyrobena z křemenného skla<sup>7</sup>. Před vložením do spektrometru musí být kyveta důkladně očištěna a je třeba dbát na dotyky prstů v oblasti, kudy prochází záření spektrometru [38, 39].

Prošlé záření dopadá na detektor, který převádí energii záření na elektrický signál. Hodnota je zaznamenána a vyhodnocena počítačovým rozhraním [38, 39].

Zdroj záření → Monochromátor → Vzorek → Detektor

Obrázek 9: Schéma instrumentace UV-Vis spektroskopu

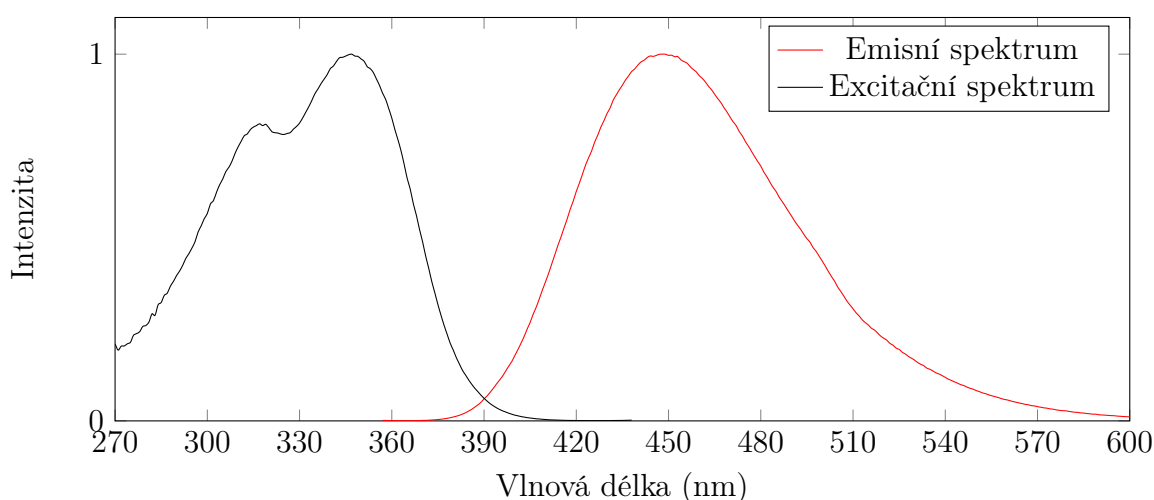
<sup>6</sup>Dle Beerova-Lambertova zákona je absorbance ( $A$ ) přímo úměrná koncentraci absorbující látky ( $c$ ) a tloušťce absorbující vrstvy ( $l$ ). Každá látka má svůj molární absorpční koeficient, který je charakteristický pro každou látku za daných podmínek při dané vlnové délce ( $\epsilon$ ).  $A = cl\epsilon$

<sup>7</sup>Běžné jsou také plastové a skleněné kyvety, ale ty nejsou vhodné pro výzkum v UV oblasti spektra.

## 2.6.2 Fluorescenční spektroskopie

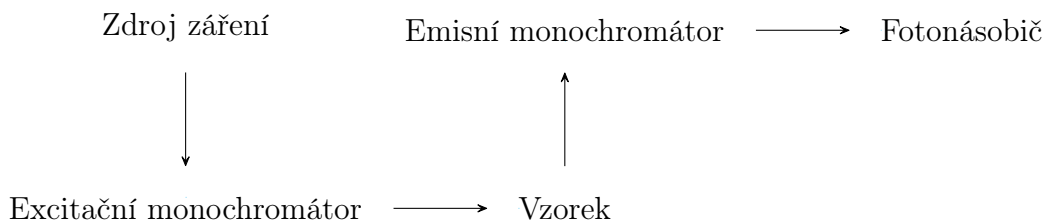
**Princip metody** Fluorescenční spektroskopie spočívá v excitaci valenčních elektronů molekuly, které při deexcitaci uvolní nabytou energii emisí fotonu. Při ozáření vzorku různými vlnovými délkami záření dochází ke změně intenzity fluorescence a získává se *excitační spektrum*. Při konstantní excitační vlnové délce lze poté měřit intenzitu emise v jednotlivých vlnových délkách a vzniká *emisní spektrum* [38, 39].

Platí, že maxima intenzit excitačního a emisního spektra jsou zhruba stejná a spektra jsou navzájem často zrcadlovými obrazy<sup>8</sup>. Rozdíl ve vlnových délkách maximalních intenzit obou spekter se nazývá *Stokesův posun* [38, 39].



Obrázek 10: Excitační a emisní spektrum

**Instrumentace** Instrumentace fluorimetrů je podobná absorpčním spektrometrům. Zdrojem záření je často xenonová oblouková lampa, někdy také lasery. Monochromátory jsou analogické těm z absorpčních spektrometrů, jsou ale v tomto případě dva. Jeden z nich pro záření ze zdroje, druhý pro záření ze vzorku. Záření dopadá na fotonásobiče [38, 39].



Obrázek 11: Schéma instrumentace fluorimetru

<sup>8</sup>Emisní a excitační spektra dohromady tvoří *excitačně-emisní matice*, které jsou pro mnohé organické látky charakteristické a proto jsou vhodné pro kvalitativní analýzu.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Použité přístroje

- fluorimetr (Aminco Bowman Series 2, Thermo Spectronic, USA)
- absorpční spektrometr (UV-1601, Shimadzu, Japonsko)
- pH metr (ORION 2-star, Thermo Scientific, USA)

### 3.2 Použité chemikálie

- kyselina trihydrogenboritá ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ , čistá, 99,50%)
- kyselina trihydrogenfosforečná ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , konc., 85,00%)
- kyselina octová ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ , čistá, 99,80%)
- kyselina sírová ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 96,00%)
- kyselina chlorovodíková (HCl, 35%)
- hydroxid sodný (NaOH, čistý)
- chlorid draselný (KCl, čistý)
- hydrogenfosforečnan draselný ( $\text{K}_2\text{HP}_4$ , čistý)
- dihydrogenfosforečnan draselný ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , čistý)
- hunnemanin ( $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{N}$ , roztok)
- chinin ( $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{N}_2$ , čistý)
- papaverin ( $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{N}$ , čistý)
- oligonukleotid GG1 (5'-GGGCGGGCGCGAGGGAGGGT-3', roztok)

### 3.3 Příprava roztoků

**Brittonův-Robinsonův pufr** Brittonův-Robinsonův pufr byl připraven rozpuštěním 2,4856 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 4,6118 g  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 2,92 ml  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$  v malém množství deionizované vody a doplněn do odměrné baňky na 1l. Menší objemy tohoto roztoku byly titrovány 0,2M roztokem NaOH na hodnoty pH postupně 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 7,50; 7,75; 8,00; 8,25; 8,50; 8,75; 9,00; 9,25; 9,50; 10,00; 11,00 a 12,00. Připravené pufrы o různých hodnotách pH byly mezi experimenty uskladněny v plastových nádobách v lednici.

**Draselný pufr** Draselný pufr byl připraven rozpuštěním 0,7496 g KCl v malém množství deionizované vody a doplněn do odměrné baňky na 50 ml (konc. 0,201M).

**Fosfátový pufr** Fosfátový pufr byl připraven rozpuštěním 1,5233 g KCl, 2,3206 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  a 1,3062 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  v malém množství deionizované vody. Roztok byl doplněn do odměrné baňky na 100 ml o celkové koncentraci draselných kationtů 0,5667M.

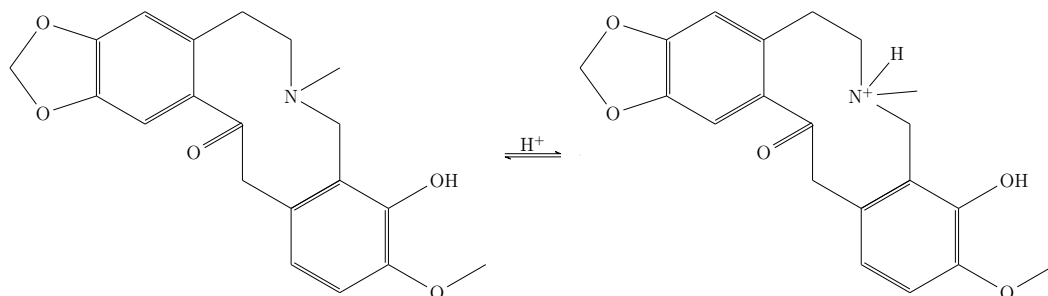
**Standardní roztok chininu** Standardní roztok chininu o koncentraci  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  byl připraven rozpuštěním 10 mg chininu v malém množství zředěné kyseliny sírové a doplněn do odměrné baňky na 100 ml.

**Standardní roztok papaverinu** Standardní roztok papaverinu o koncentraci  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  byl připraven rozpuštěním 2,5 mg papaverinu v malém množství zředěné kyseliny chlorovodíkové ( $\text{pH} \approx 2,6$ ) a doplněn do odměrné baňky na 25 ml.

### 3.4 Určování pK<sub>r</sub> hunnemaninu

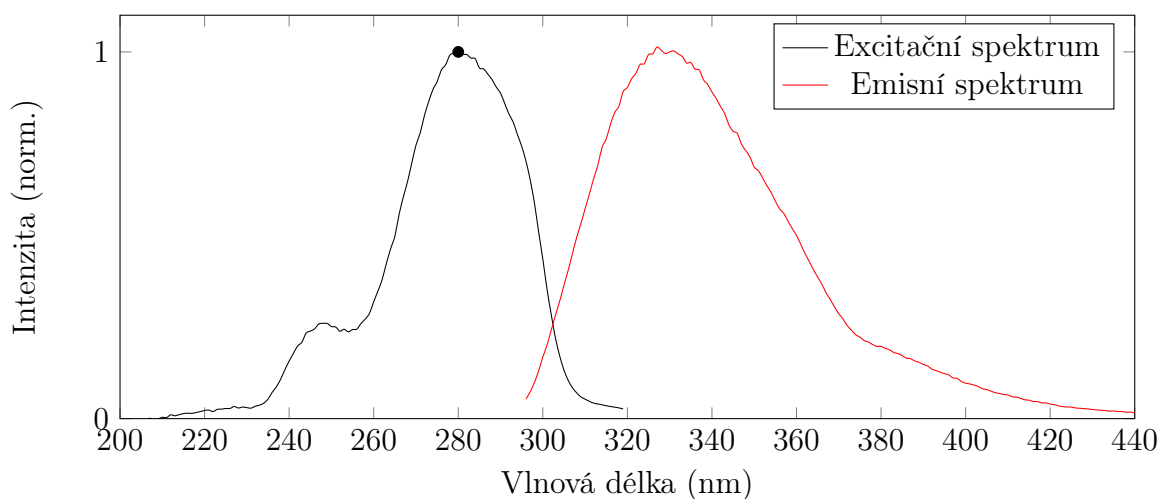
#### 3.4.1 Popis experimentu

Hodnota pK<sub>r</sub> hunnemaninu je taková hodnota pH, při níž je protonovaná forma hunnemaninu v rovnováze s deprotonovanou formou.



Obrázek 12: Deprotonovaná a protonovaná forma hunnemaninu

Nejprve byl v kyvetě vodou zředěn původní roztok hunnemaninu na koncentraci  $10^{-5}$ M. Kyveta byla očištěna technickým lihem a vložena do fluorimetru a bylo stanoveno excitační spektrum hunnemaninu. Excitační maximum bylo určeno na vlnové délce 280 nm. Bylo změřeno také emisní spektrum tohoto vzorku, emisní maximum bylo určeno na vlnové délce 330 nm.



Obrázek 13: Změřené excitační a emisní spektrum hunnemaninu

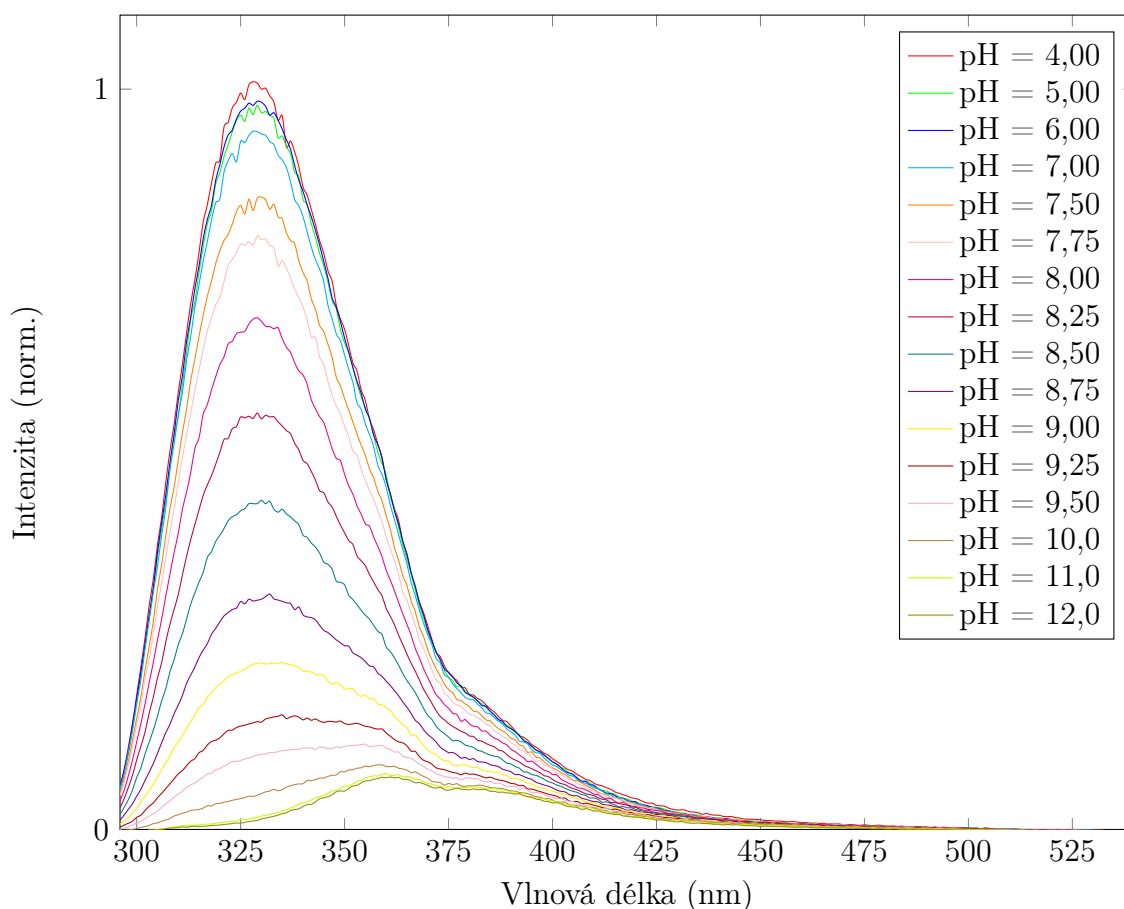
Pro každý připravený Brittonův-Robinsonův pufr byla v kyvetě připravena směs roztoku hunnemaninu a pufru o dané hodnotě pH o koncentraci hunnemaninu  $10^{-5}$ M a změřeno jeho emisní spektrum. Excitační monochromátor byl při tom nastaven na 280 nm a měření provedeno třikrát za sebou. Toto měření bylo provedeno celkem třikrát.



Z naměřených dat byla vytvořena závislost intenzity emisního maxima hunnemaninu v jednotlivých prostředích na pH. Tato závislost byla proložena logistickou křivkou a v jejím inflexním bodě stanovena hodnota pKr hunnemaninu.

### 3.4.2 Výsledky

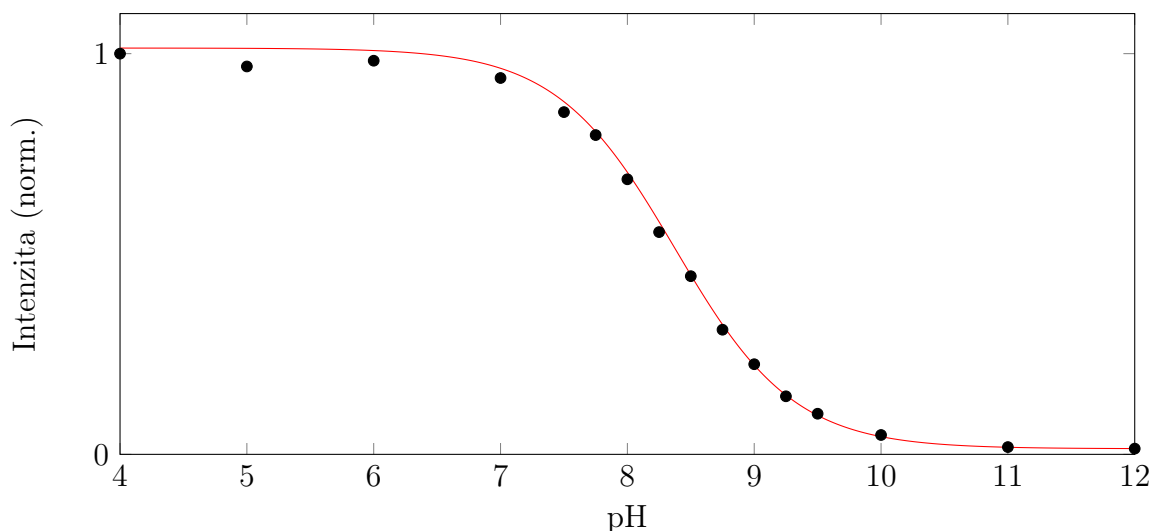
Měřením emisních spekter hunnemaninu v různých prostředích vznikl tento soubor spekter:



Obrázek 14: Emisní spektra hunnemaninu v různých prostředích

Z dat z těchto emisních spekter byla sestavena závislost intenzity emisního maxima (330 nm) na prostředí. Tato závislost byla proložena logistickou křivkou dle předpisu, kde  $a$  je minimální hodnota intenzity,  $b$  je maximální hodnota intenzity (resp. hodnota intenzity při nejnižším pH),  $c$  je hodnota inflexního bodu křivky (pKr) a  $d$  je šířka esovité části křivky:

$$y = a + \frac{b}{1 + e^{-4(\frac{x-c}{d})}} \quad (1)$$



Obrázek 15: Závislost intenzity emisního maxima hunnemaninu na prostředí

Měření	1.	2.	3.	Průměr	Odchylka
pKr	8,15	8,37	8,28	8,27	0,09

Tabulka 1: Hodnoty pKr hunnemaninu a standardní odchylka

Měření bylo provedeno celkem třikrát. Standardní odchylka byla vypočítána ze vztahu, kde  $n$  je počet konkrétních naměřených hodnot,  $x_i$  je konkrétní naměřená hodnota a  $\mu$  je aritmetický průměr:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2} \quad (2)$$

### 3.4.3 Diskuse

Zjištěná hodnota pKr hunnemaninu se v jednotlivých měřeních značně lišila, a proto by bylo třeba pro její zpřesnění provést ještě několik dalších měření. Hodnotu pKr lze také stanovit metodou absorpční spektroskopie, což ostatně bylo také provedeno. Dostupným absorpčním spektroskopem ale bohužel nebylo možné dojít k důvěryhodným výsledkům.

## 3.5 Titrace G-kvadruplexu hunnemaninem

### 3.5.1 Popis experimentu

Zhruba týden před samotným měřením byl připraven základní roztok oligonukleotidu, aby se formovaly kvadruplexové struktury (stabilizované přítomností draselných kationtů). Roztok byl připraven směsí fosfátového pufru (finální konc.  $K^+$  0,01M), draselného pufru (finální konc. KCl 0,005M) a roztoku oligonukleotidu (finální konc.  $7,14 \cdot 10^{-5}M$ ). Připravený roztok byl skladován v lednici.

Těsně před měřením byl připraven titrační roztok oligonukleotidu směsí dříve připraveného základního roztoku oligonukleotidu a roztoku hunnemaninu (finální konc.  $2 \cdot 10^{-5}M$ ).

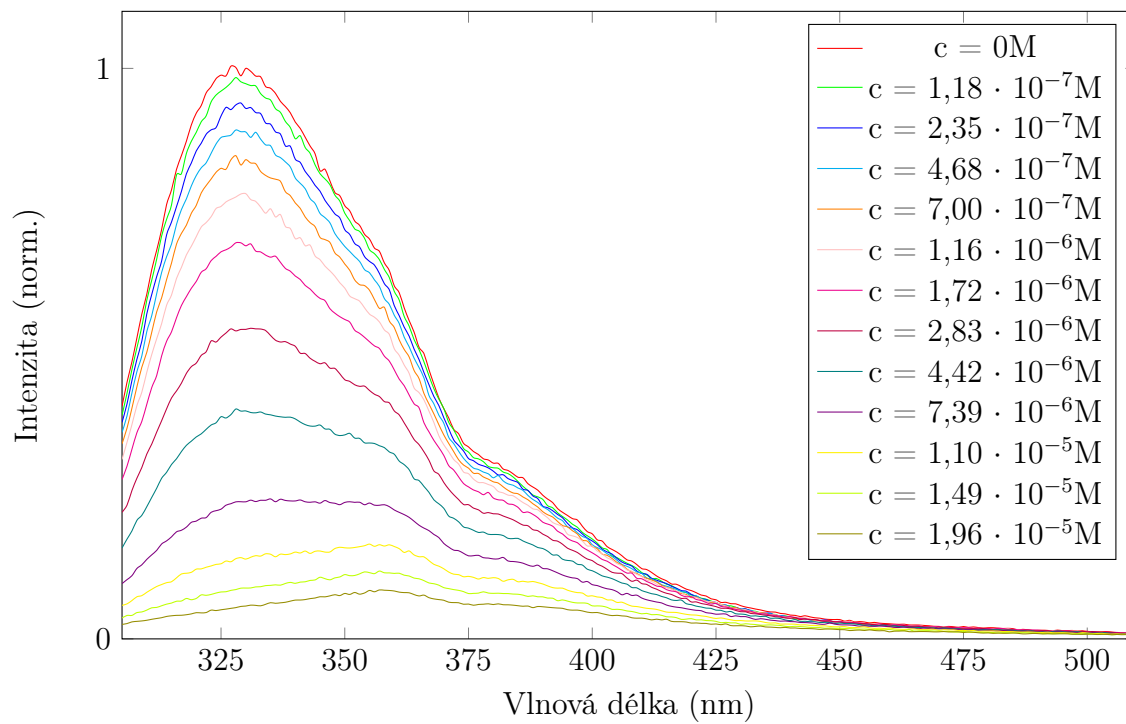
Nejprve byl v kyvetě připraven základní roztok alkaloidu směsí fosfátového pufru (finální konc.  $K^+$  0,01M), draselného pufru (finální konc. KCl 0,005M), roztoku hunnemaninu (finální konc.  $2 \cdot 10^{-5}M$ ) a změřeno emisní spektrum hunnemaninu v tomto roztoku.

Potom byl do té stejné kyvety přidáván titrační roztok oligonukleotidu (konc. oligonukleotidu  $7,07 \cdot 10^{-5}M$ ). Mezi každým přidavkem titračního roztoku bylo změřeno emisní spektrum hunnemaninu. Dávka titračního roztoku se také postupně v průběhu zvyšovala. Přidavků bylo celkem 11. Titrační roztok byl připraven tak, že se koncentrace žádné jiné složky kromě oligonukleotidu v kyvetě nemění.

Z naměřených dat byla sestavena závislost koncentrace oligonukleotidu na intenzitě emisního maxima. Tato závislost byla proložena několika křivkami, které predikují změnu emisního maxima při navázání daného počtu molekul alkaloidu na G-kvadruplex a metodou nejmenších čtverců byla vybrána ta nejbližší naměřeným hodnotám.

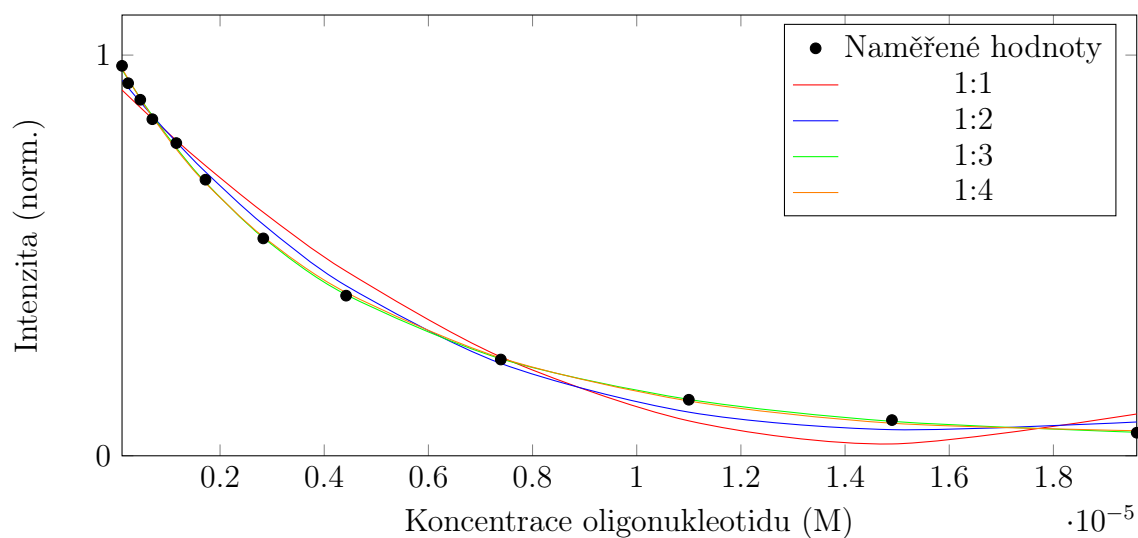
### 3.5.2 Výsledky

Měřením emisních spekter roztoku s konstantní koncentrací hunnemaninu a zvyšující se koncentrací oligonukleotidu vznikl tento soubor spekter:



Obrázek 16: Emisní spektra hunnemaninu při titraci oligonukleotidu

Z dat z těchto emisních spekter byla sestavena závislost intenzity emisního maxima (330 nm) hunnemaninu na koncentraci oligonukleotidu:



Obrázek 17: Závislost intenzity emisního maxima roztoku na koncentraci oligonukleotidu

Poměr (oligonukleotid:alkaloid)	Součet obsahů čtverců
1:1	$2,28 \cdot 10^{-2}$
1:2	$6,09 \cdot 10^{-3}$
1:3	$4,83 \cdot 10^{-4}$
1:4	$6,91 \cdot 10^{-4}$

Tabulka 2: Vyhodnocení metody nejmenších čtverců

Metodou nejmenších čtverců bylo vyhodnoceno, že nejlépe naměřené hodnoty propisuje křivka pro poměr 1:3 oligonukleotidu ku hunnemaninu.

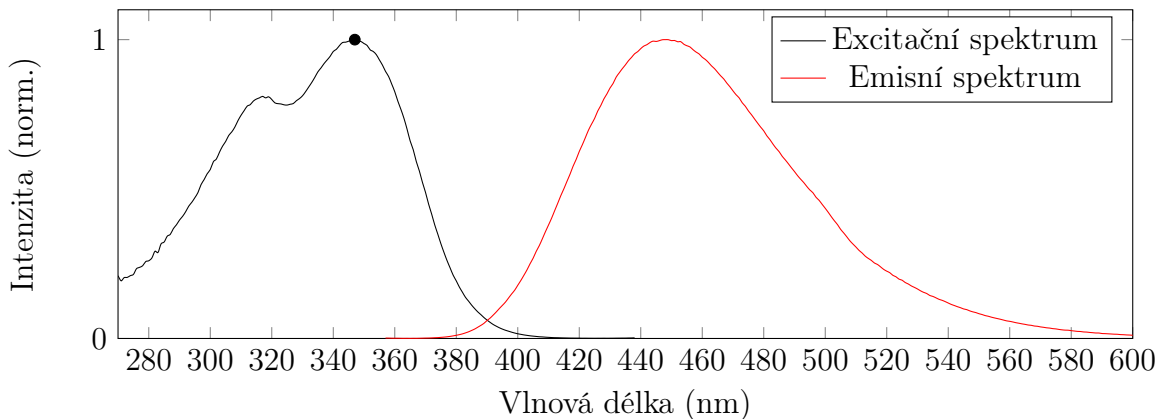
### 3.5.3 Diskuse

Pro zpřesnění výsledků tohoto experimentu by bylo zapotřebí jej provést ještě několikrát. Zajímavé by také mohlo být blíže zkoumat mechanismus vazby hunnemaninu na G-kvadruplex, dále přesná struktura vzniklého G-kvadruplexu. Zároveň by bylo možné dále zkoumat, jak se změní teplota rozkladu G-kvadruplexu při navázání alkaloidu nebo jestli je vaznost hunnemaninu závislá na pH.

## 3.6 Stanovení chininu v toniku

### 3.6.1 Popis experimentu

Nejprve byl pomocí standardního roztoku chininu do kyvety připraven nový roztok o koncentraci  $1,50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Změřeno bylo excitační spektrum chininu. Excitační maximum bylo určeno na vlnové délce 347 nm. Následně bylo změřeno emisní spektrum chininu. Emisní maximum bylo určeno na vlnové délce 448 nm.



Obrázek 18: Změřené excitační a emisní spektrum chininu

**Fluorimetrická kalibrační křivka** Pomocí standardního roztoku byly do kyvety postupně připraveny kalibrační vzorky chininu o koncentracích 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25 a 1,50  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . U kalibračních vzorků bylo zjištěno jejich emisní spektrum. Excitační monochromátor byl při tom nastaven na 347 nm a měření provedeno třikrát za sebou.

Z naměřených dat byla vytvořena závislost intenzity emisního maxima chininu (448 nm) kalibračních vzorků na koncentraci chininu. Tato závislost byla proložena lineární křivkou (kalibrační křivka).

**Absorpční kalibrační křivka** Pomocí standardního roztoku byly do kyvety postupně připraveny kalibrační roztoky chininu o koncentracích 10, 20, 30, 40 a 50  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . U kalibračních roztoků bylo zjištěno jejich absorpční spektrum a každé měření bylo provedeno třikrát za sebou.

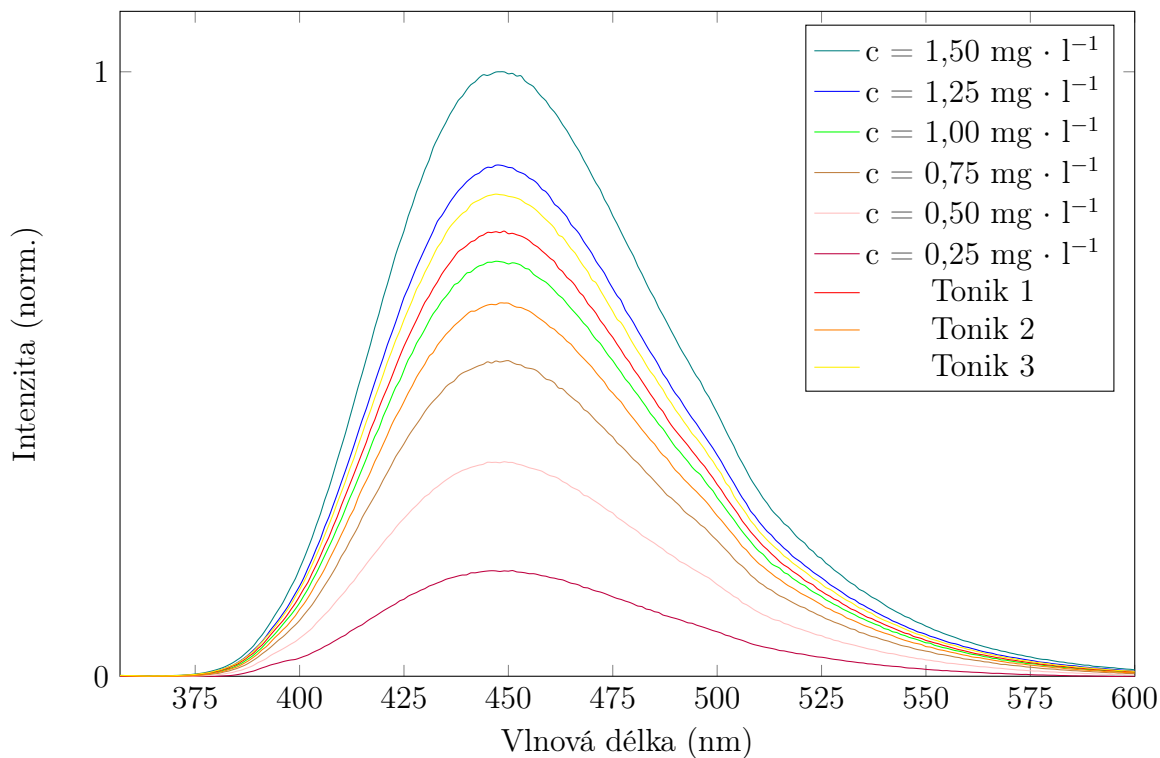
Z naměřených dat byla vytvořena závislost intenzity absorpčního maxima chininu (347 nm) v kalibračních vzorcích na koncentraci chininu. Tato závislost byla proložena lineární křivkou (kalibrační křivka).

**Analýza toniků** Pro analýzu byly použity tři běžně dostupné sycené tonikové nápoje. Před analýzou byly zbaveny přebytečného oxidu uhličitého štěrcáním s lahví a přelitím do kádinek. V kádinkách byly několik minut odstátý.

Postupně byly do kyvet připraveny jejich směsi se zředěnou kyselinou sírovou pro absorpční spektrometr (dvakrát zředěny) a pro fluorimetr (padesátkrát zředěny). U všech bylo zjištěno jejich emisní a absorpční spektrum a určena intenzita fluorescence (resp. absorbance) při 448 nm (resp. 347 nm). Tato hodnota byla následně dosazena do předpisu kalibračních křivek a určena koncentrace chininu v toniku.

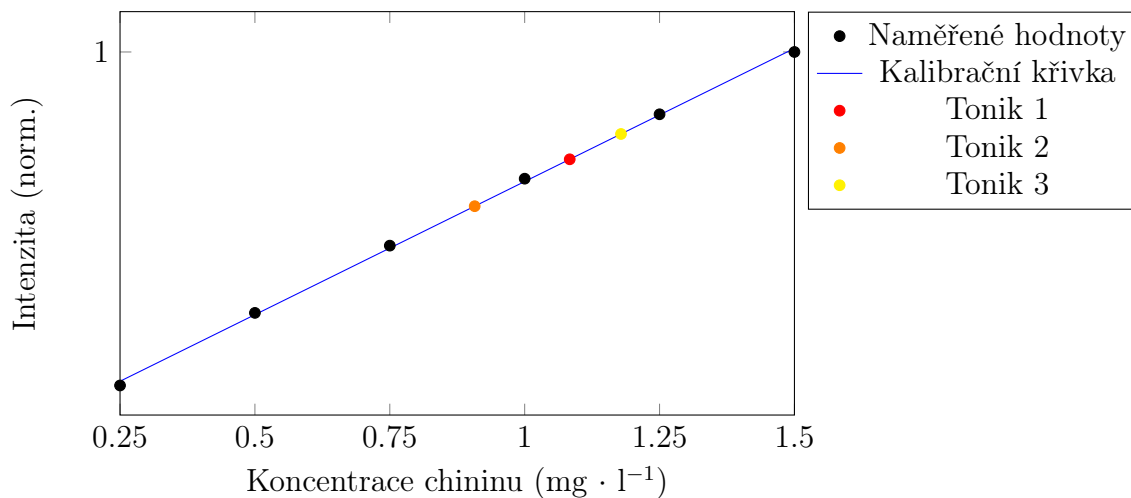
### 3.6.2 Výsledky

Měřením emisních spekter chininu v různých koncentracích a vzorcích toniků vznikl tento soubor spekter:



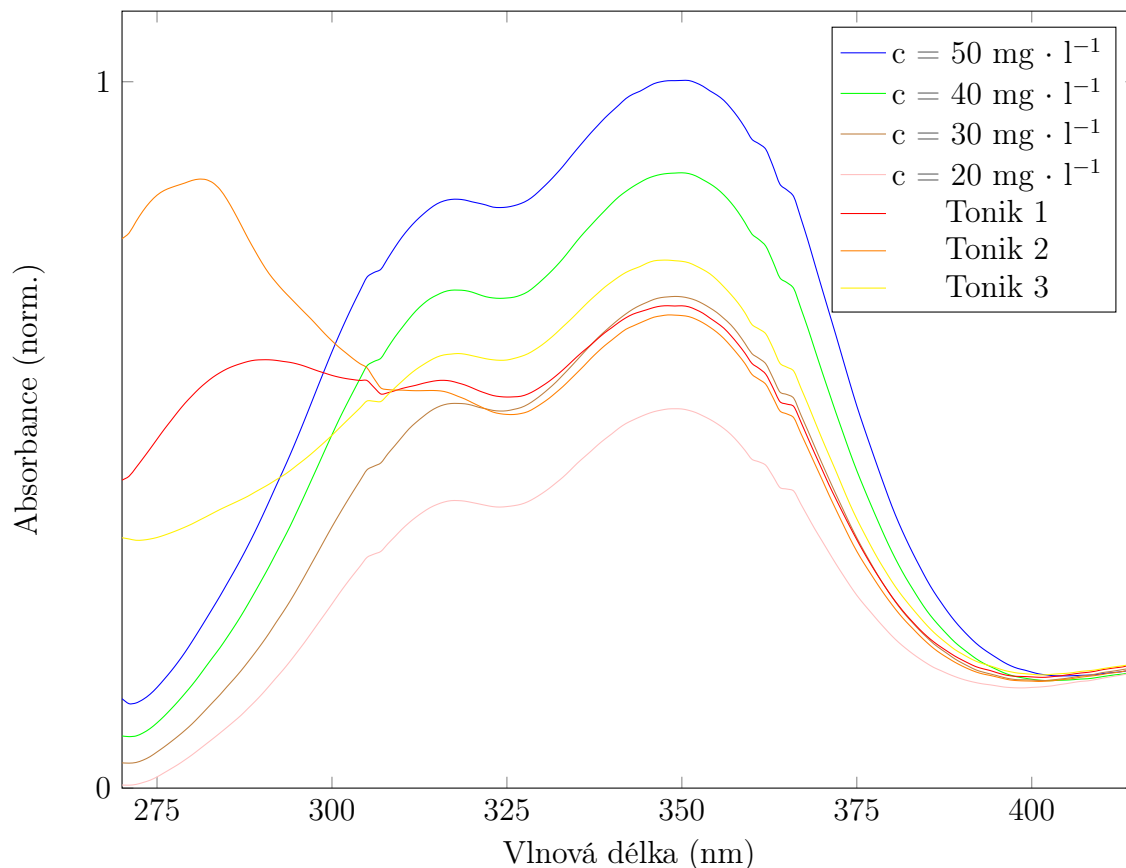
Obrázek 19: Emisní spektra kalibračních roztoků chininu a roztoků toniků

Z dat z emisních spekter byla sestavena závislost intenzity na koncentraci chininu v kalibračních vzorcích. Závislost byla proložena lineární křivkou a z jejího předpisu ( $y = 0.660171x + 0.018663$ ) dopočítána koncentrace chininu v toniku.



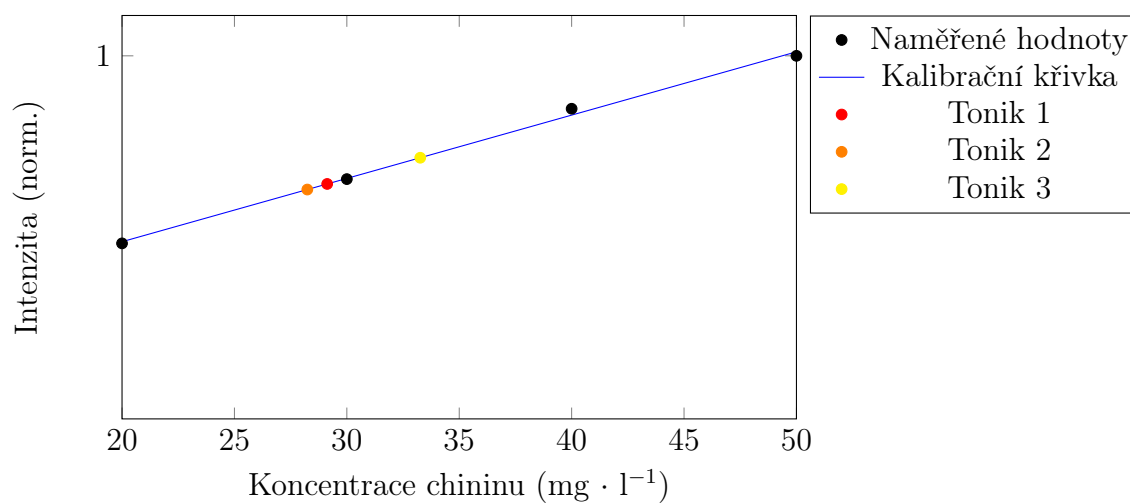
Obrázek 20: Emisní kalibrační křivka s koncentracemi chininu ve vzorcích toniku

Měřením absorpčních spekter chininu v různých koncentracích a vzorcích toniků vznikl tento soubor spekter:



Obrázek 21: Absorpční spektra kalibračních roztoků chininu a roztoků toniků

Z dat z absorpčních spekter byla sestavena závislost absorpce na koncentraci chininu v kalibračních vzorcích. Závislost byla proložena lineární křivkou a z jejího předpisu ( $y = 0.015692x + 0.225369$ ) dopočítána koncentrace chininu v toniku.



Obrázek 22: Absorpční kalibrační křivka s koncentracemi chininu ve vzorcích toniků



	Fluorescence <sup>i</sup>			Absorbance <sup>i</sup>		
	$Em_{max}$ <sup>ii</sup>	$c_i$ <sup>iii</sup>	$c$ <sup>iv</sup>	$A_{max}$ <sup>v</sup>	$c_i$	$c$
<b>Tonik 1</b>	0,73	1,08	54,17	0,68	29,13	58,25
<b>Tonik 2</b>	0,61	0,91	45,37	0,66	28,24	56,48
<b>Tonik 3</b>	0,80	1,18	58,93	0,75	33,27	66,53

<sup>i</sup> norm.

<sup>ii</sup> emisní maximum (norm.)

<sup>iii</sup> vypočtená koncentrace chininu ve vzorku toniku (v  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ )

<sup>iv</sup> koncentrace chininu v toniku (v  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ )

<sup>v</sup> absorpční maximum (norm.)

Tabulka 3: Koncentrace chininu v populárních tonikových nápojích

Z naměřených dat plyne, že v populárních tonikových nápojích se koncentrace chininu pohybuje v rozmezí od 45 do 67  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , což je pod maximální hranicí stanovenou americkým Ústavem pro kontrolu potravin a léčiv ( $83 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ )<sup>9</sup>. Koncentrace chininu v zakoupených značkách toniků se nepodařilo dohledat. Obecně se udává, že komerční tonikové nápoje obsahují chinin v koncentraci zhruba od 25 do 60  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$  [41].

### 3.6.3 Diskuse

Pro zpřesnění měření by bylo třeba měření provést ještě několikrát. Zároveň je problematická neshodná ověřitelnost nalezených hodnot, protože výrobci koncentrace chininu ve svých nápojích nesdílí. V tomto případě bylo stanovení provedeno metodou fluorescenční spektroskopie i absorpční spektroskopie, ale za relevantnější je třeba považovat výsledky fluorescenční spektroskopie, jelikož tato metoda je mnohem citlivější a je hlavně selektivní. Protože neznáme přesné složení vybraných tonikových nápojů, nemůžeme si být jisti, že ve vzorku absorbuje pouze chinin. Ostantě je zřejmé, že tomu tak není vzhledem k rozdílnosti spekter jednotlivých toniků od kalibračních vzorků. Je tedy možné, že v tonicích absorbuje ještě jiná složka, a tudíž z měření plyne obecně vyšší koncentrace chininu v nápojích než ta, která byla změřena fluorimetricky.

<sup>9</sup>dle 21 CFR 172.575

## 3.7 Stanovení papaverinu v tabletě

### 3.7.1 Popis experimentu

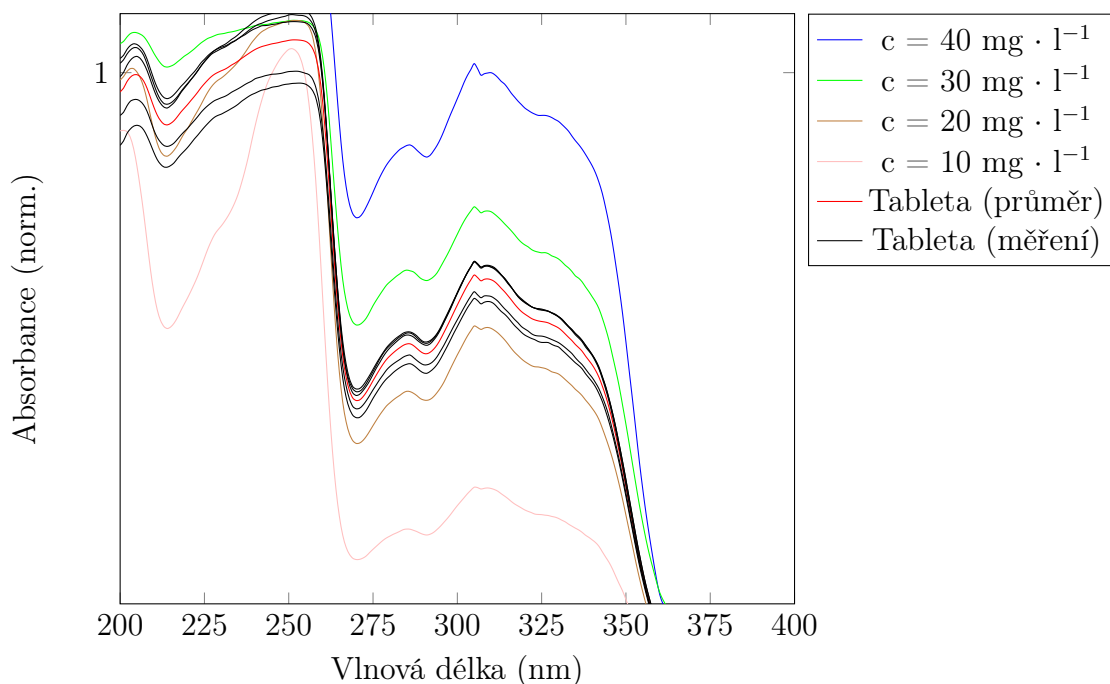
Pomocí standardního roztoku byly do kyvety postupně připraveny kalibrační vzorky papaverinu o koncentracích 10, 20, 30 a 40  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . U kalibračních vzorků bylo zjištěno jejich absorpční spektrum.

Z naměřených dat byla vytvořena závislost absorbance při 310 nm na koncentraci papaverinu. Tato závislost byla proložena lineární křivkou (kalibrační křivka).

Pro analýzu byla použita starší tableta papaverinu, dříve běžně dostupná jako léčebný přípravek. Tableta byla rozpuštěna v menším množství zředěné kyseliny chlorovodíkové ( $\text{pH} \approx 2,6$ ) a poté doplněna v odměrné baňce na 100 ml. Na obalu tablety byla zjištěna hmotnost papaverinu v tabletě na 40 mg. Připravený roztok tak měl mít koncentraci 400  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Do kyvety byl tento roztok proto šestnáctkrát zředěn (tj. konc. 25  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ).

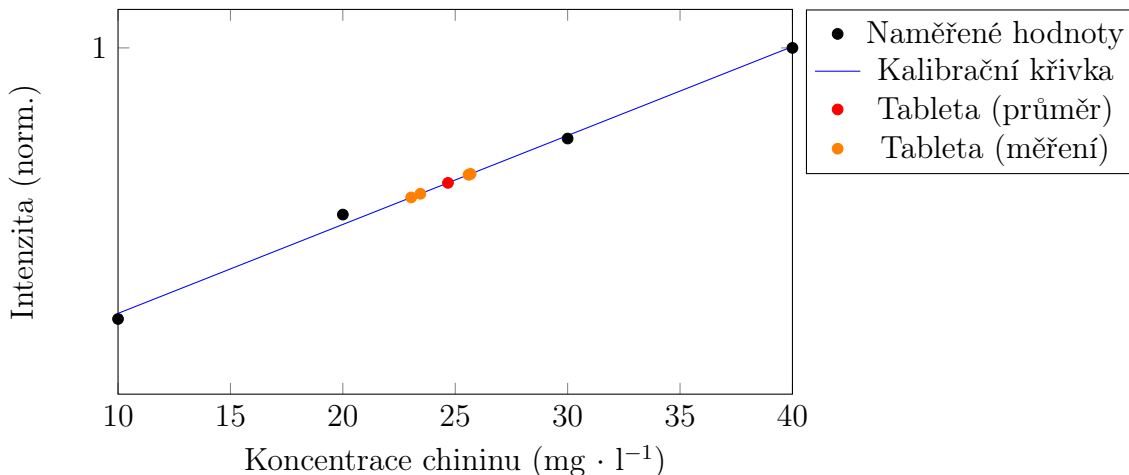
### 3.7.2 Výsledky

Měřením absorpčních spekter kalibračních vzorků papaverinu v různých koncentracích a roztoku papaverinové tablety vznikl tento soubor spekter:



Obrázek 23: Absorpční spektra kalibračních vzorků papaverinu a roztoku tablety

Z dat z absorpčních spekter byla sestavena závislost absorpčního maxima na koncentraci papaverinu v kalibračních vzorcích. Závislost byla proložena lineární křivkou a z jejího předpisu ( $y = 0.023113x + 0.078827$ ) dopočítána koncentrace papaverinu v tabletě.



Obrázek 24: Kalibrační křivka s koncentrací papaverinu v tabletě

Měření	1.	2.	3.	4.	5.
Obsah (v mg)	40,99	36,87	37,52	40,95	41,06
Reálná hodnota	40,00				
Průměr	39,48				
Rozptyl	4,19				
Odchylka	1,86				
Lordův test ( $u_0$ )	0,12				

Tabulka 4: Obsah papaverinu v tabletě

V roztoku tablety byla koncentrace papaverinu stanovena na  $24,68 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , koncentrace v původním roztoku tablety tedy  $394,83 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , z původní tablety tedy papaverin tvořil  $39,48 \text{ mg}$ . Měření bylo provedeno celkem pětikrát.

Správnost výsledku byla overěna Lordovým testem. Hodnota Lordova testu pro toto měření  $u_0$  s přesností nad 95% je nižší než kritická hodnota testu  $u_5 (=0,306)$ . Hodnota  $u_0$  se počítá ze vztahu, kde  $x$  je reálná hodnota (tj. hmotnost papaverinu uvedená na balení tablet),  $\mu$  je průměr naměřených hodnot a  $R$  je rozptyl naměřených hodnot:

$$u_0 = \frac{|x - \mu|}{R} \quad (3)$$

### 3.7.3 Diskuse

Pro větší přesnost by se měření mohlo provést ještě několikrát. Podivná jsou opět změřená absorpční spektra papaverinu. Absorpční maximum papaverinu je v nižších vlnových délkách, ale to se nepodařilo na spektrech přesně ukázat. Proto na vytvoření kalibrační křivky nakonec nebyla použita absorbance u maxima, ale u vyšší vlnové délky, kde jsou změny v absorbanci lépe pozorovatelné. Tyto nesrovnalosti mohou být způsobeny výskytem jiných absorbujících složek tablety, jejichž výskyt může také souviset se stářím tablety.

## 4 Závěr

V práci se podařilo prokázat navázání hunnemaninu na guaninový kvadruplex, což otevírá dveře pro další výzkum této interakce. Na tuto práci lze navázat přesným výzkumem stability guaninového kvadruplexu po navázání hunnemaninu, například pozorováním změny teploty tání této struktury před a po navázání alkaloidu. To může dále vést přímo k výzkumu alkaloidu při interakci s nádorovými buňkami.

Věřím, že tato práce může být impulsem k výzkumu nejen hunnemaninu, ale také jiných méně známých látek, o kterých toho i přes čas, kdy víme o jejich existenci, mnohé nevíme. Spoustu z nich ani nezkoumáme. Příkladem je právě hunnemanin. Poslední významnější článek, který byl o hunnemaninu vydán, je více než patnáct let starý. Jenže látek, jako je hunnemanin, je celá spousta. Bez toho, aniž bychom je ale zkoumali, nemůžeme vědět, jestli nám mohou být takové látky k užitku.

Chemie alkaloidů a výzkum neznámých a neprobádaných látek jsou pro mě neuvěřitelně zajímavé a staly se pro mě ještě zajímavějšími v průběhu tvorby této práce. Rád bych se v tomto oboru angažoval dál a pomáhal prozkoumávat ty oblasti chemie, které nemusí teď na první pohled působit příliš zajímavě, ale v budoucnosti mohou pomoci s urychlením výzkumu nebo s věcmi, které si v současnosti neumíme ani představit.

## Bibliografie

1. BEGLEY, Tadhg P. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. Wiley, 2009. ISBN 978-0-471-75477-0.
2. FUNAYAMA, Shinji; CORDELL, Geoffrey A. *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. Plenum Press, 1998. ISBN 978-0-306-45465-3.
3. FATTORUSO, Ernesto; TAGLIALATELA-SCAFATI, Orazio (ed.). *Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology*. Wiley-VCH, 2008. ISBN 978-3-527-31521-5.
4. ANISZEWSKI, Tadeusz. *Alkaloids - Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*. Elsevier, 2007. ISBN 978-0-444-52736-3.
5. XUE, Huan et al. Cinchonine, a Potential Oral Small-Molecule Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonist, Lowers Blood Glucose and Ameliorates Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Drug Design, Development and Therapy*. 2023, č. 17, s. 1417–1432. Dostupné z DOI: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S404055>.
6. HESSE, Manfred. *Alkaloids: Natures's Curse or Blessing*. Wiley-VCH, 2002. ISBN 978-3-906390-24-6.
7. LISTOS, Joanna et al. The Mechanisms Involved in Morphine Addiction: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, roč. 20, č. 17, s. 4302–. Dostupné z DOI: [10.3390/IJMS20174302](https://doi.org/10.3390/IJMS20174302).
8. KARIM, Hidayatul Atiqah Abd; ISMAIL, Nor Hadiani; OSMAN, Che Puteh. Steroidal Alkaloids From the Apocynaceae Family: Their Isolation and Biological Activity. *Natural Product Communications*. 2022, roč. 17. Dostupné z DOI: [10.1177/1934578X221141265](https://doi.org/10.1177/1934578X221141265).
9. NAMA, Alexis Bienvenue et al. Iboga-type alkaloids from the leaves of *Tabernaemontana penduliflora* (Apocynaceae). *Phytochemistry Letters*. 2023, roč. 54, s. 63–69. Dostupné z DOI: [10.1016/j.phyto1.2023.01.018](https://doi.org/10.1016/j.phyto1.2023.01.018).
10. PEREIRA, Paulo et al. Chemical constituents from *Tabernaemontana catharinensis* root bark: A brief NMR review of indole alkaloids and in vitro cytotoxicity. *Quim. Nova*. 2008, roč. 31, s. 20–24. Dostupné z DOI: [10.1590/S0100-40422008000100004](https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000100004).
11. CHEN, Chun-Han et al. Protopine, a novel microtubule-stabilizing agent, causes mitotic arrest and apoptotic cell death in human hormone-refractory prostate cancer cell lines. *Cancer Letters*. 2012, roč. 315, č. 1, s. 1–11. Dostupné z DOI: [10.1016/J.CANLET.2011.09.042](https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2011.09.042).

12. MANTENA, Sudheer K.; SHARMA, Som D.; KATIYAR, Santosh K. Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006, roč. 5, č. 2, s. 296–308. Dostupné z DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0448.
13. MONDAL, Arijit et al. Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. *European Journal of Pharmacology*. 2019, roč. 858, s. 172472–172472. Dostupné z DOI: 10.1016/J.EJPHAR.2019.172472.
14. MANSKE, Richard HF; MARION, Léo; LEDINGHAM, Archie E. The alkaloids of papaveraceous plants. XXXIV. *Hunnemannia fumariaefolia* Sweet and the constitution of a new alkaloid, hunnemanine. *Journal of the American Chemical Society*. 1942, roč. 64, č. 7, s. 1659–1661.
15. SINGH, Sarita et al. Antifungal activity of alkaloids from *Eschscholtzia californica*. *Folia microbiologica*. 2009, roč. 54, s. 204–6. Dostupné z DOI: 10.1007/s12223-009-0032-7.
16. RÜCKER, Gerhard et al. Alkaloids from *Dactylicapnos torulosa*. *Phytochemistry*. 1994, roč. 36, s. 519–523. Dostupné z DOI: 10.1016/S0031-9422(00)97106-1.
17. STERMITZ, F.R. et al. Alkaloids of *Argemone fruticosa* and *A. echinata*. *Phytochemistry*. 1973, roč. 12, s. 381–382. Dostupné z DOI: 10.1016/0031-9422(73)80022-6.
18. MERCK, Georg. Vorläufige Notiz über eine neue organische Base im Opium. *Annalen der Chemie und Pharmacie*. 1848, roč. 66, s. 125–128. Dostupné z DOI: 10.1002/jlac.18480660121.
19. TAMADA, Kenya et al. Papaverine identified as an inhibitor of high mobility group box 1/receptor for advanced glycation end-products interaction suppresses high mobility group box 1-mediated inflammatory responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019, roč. 511, č. 3, s. 665–670. Dostupné z DOI: 10.1016/J.BBRC.2019.01.136.
20. HUANG, Hang et al. Papaverine selectively inhibits human prostate cancer cell (PC-3) growth by inducing mitochondrial mediated apoptosis, cell cycle arrest and downregulation of NF- $\kappa$ B/PI3K/Akt signalling pathway. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology*. 2017, roč. 22, č. 1, s. 112–118.
21. GABER, Ahmed et al. Novel Papaverine Metal Complexes with Potential Anticancer Activities. *Molecules*. 2020, roč. 25, č. 22, s. 5447–. Dostupné z DOI: 10.3390/MOLECULES25225447.

22. AGGARWAL, Megha et al. Repurposing Papaverine as an Antiviral Agent against Influenza Viruses and Paramyxoviruses. *Journal of Virology*. 2020, roč. 94, č. 6. Dostupné z DOI: 10.1128/JVI.01888-19.
23. VALIPOUR, Mehdi; IRANNEJAD, Hamid; EMAMI, Saeed. Papaverine, a promising therapeutic agent for the treatment of COVID-19 patients with underlying cardiovascular diseases (CVDs). *Drug Development Research*. 2022, roč. 83, č. 6, s. 1246–1250. Dostupné z DOI: 10.1002/ddr.21961.
24. MOSTAFA, Ehab M. et al. Repurposing of FDA approved alkaloids as COVID 19 inhibitors;in silico studies. *Pharmacognosy Journal*. 2021, roč. 13, č. 1, s. 110–123. Dostupné z DOI: 10.5530/PJ.2021.13.16.
25. PELLETIER, Pierre Joseph; CAVENTOU, Joseph-Bienaimé. *Recherches chimiques sur les quinquinas*. Crochard, 1820.
26. TURNER, RICHARD B.; WOODWARD, R. B. The Chemistry of the Cinchona Alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*. 1953, roč. 3, s. 1–63.
27. WOODWARD, R. B.; DORRING, W. E. The Total Synthesis of Quinine. *Journal of the American Chemical Society*. 1944, roč. 66, č. 5, s. 849. Dostupné z DOI: <https://doi.org/10.1021/ja01233a516>.
28. KLOUDA, Pavel. *Základy biochemie*. Pavko, 2013.
29. FERRIER, Denise R. *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistr*. Lippincott Williams & Wilkins, 2014.
30. HECHT, Sidney M. (ed.). *Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids*. Oxford University Press, 1996. ISBN 978-0-19-508467-5.
31. BAUMANN, Peter (ed.). *G-Quadruplex DNA: Methods and Protocols*. Humana Press, 2010. ISBN 978-1-58829-950-5.
32. JAROŠOVÁ, Petra et al. Naturally occurring quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids selectively stabilize G-quadruplexes. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2018, roč. 20, č. 33, s. 21772–21782. Dostupné z DOI: 10.1039/C8CP02681E.
33. JAROŠOVÁ, Petra et al. Quaternary protoberberine alkaloids and their interactions with DNA. *Chemical Papers*. 2019, roč. 73, č. 12, s. 2965–2973. Dostupné z DOI: 10.1007/S11696-019-00857-Z.
34. CUI, Xiaojie; LIN, Sen; YUAN, Gu. Spectroscopic probing of recognition of the G-quadruplex in c-kit promoter by small-molecule natural products. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2012, roč. 50, č. 4, s. 996–1001. ISSN 0141-8130. Dostupné z DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.02.029>.



35. JAROŠOVÁ, Petra et al. Alkaloid Escholidine and Its Interaction with DNA Structures. *Biology*. 2021, roč. 10, č. 12. ISSN 2079-7737. Dostupné z DOI: 10.3390/biology10121225.
36. RUIZ, Noelia et al. Study of the interaction of the palmatine alkaloid with hybrid G-quadruplex/duplex and i-motif/duplex DNA structures. *Biophysical Chemistry*. 2022, roč. 281, s. 106715–. Dostupné z DOI: 10.1016/J.BPC.2021.106715.
37. MANDAL, Paulami et al. Sensing of Different Human Telomeric G-Quadruplex DNA Topologies by Natural Alkaloid Allocryptopine Using Spectroscopic Techniques. *Journal of Physical Chemistry B*. 2018, roč. 122, č. 45, s. 10279–10290. Dostupné z DOI: 10.1021/ACS.JPCB.8B07856.
38. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Pavko, 2016.
39. KAMIL ZÁRUBA, a kolektiv. *Analytická chemie, 2. díl*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2021.
40. CHRISTIAN, Gary D.; DASGUPTA, Purnendu K.; SCHUG, Kevin A. *Analytical Chemistry*. Wiley & Sons, 2013. ISBN 978-0-470-88757-8.
41. O'REILLY, James E. Fluorescence experiments with quinine. *Journal of Chemical Education*. 1975, roč. 52, č. 9, s. 610–612.