

Študijný program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Michal Belianský

**Analýza fenobarbitalu v historických pozostatkoch farmaceutík
v rôznych liekových formách**

**Analysis of phenobarbital in historical residues of pharmaceuticals
in various dosage forms**

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: doc. RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Praha 2022

Prehlásenie

Prehlasujem, že som túto záverečnú prácu spracoval samostatne a že som uviedol všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

Som si vedomý toho, že prípadné využitie výsledkov získaných v tejto práci mimo Univerzitu Karlovu je možné iba po písomnom súhlase tejto univerzity.

V Prahe dňa 11. mája 2022

Bc. Michal Belianský

Abstrakt: V práci boli analyzované štyri vzorky historických pozostatkov farmaceutík staré až 50 rokov. Všetky analyzované vzorky obsahovali fenobarbital, avšak v rôznych liekových formách. Liekové formy vybraných historických farmaceutík boli tablety, dražé, čapíky a roztok. Pre analýzu bola použitá metóda HPLC s UV alebo hmotnostnou detekciou. Separácia analytov prípravkov prebiehala na kolóne Supelcosil™ LC-18 za použitia binárnej gradientovej elúcie. V troch zo štyroch analyzovaných historických vzorkách nebol identifikovaný žiadny degradačný produkt, pričom boli identifikované iné látky, ktoré neboli deklarované v liekopisoch. V najstaršej analyzovanej vzorke, roztoku, boli identifikované dva degradačné produkty fenobarbitalu: feneturid a 3-aminopentánová kyselina. Koncentrácia fenobarbitalu v tomto prípravku poklesla o 12,5% oproti pôvodnému deklarovanému obsahu. V neposlednej rade boli vybrané analyty historických pozostatkov farmaceutík kvantifikované a porovnané s deklarovaným obsahom.

Kľúčové slová: degradácia, HPLC, hmotnostná spektrometria, fenobarbital

Abstract: The work analysed four historical pharmaceutical residue samples up to 60 years old. All of the samples analysed contained phenobarbital, but in different dosage forms. The dosage forms of the selected historical pharmaceuticals were tablets, dragees, suppositories, and solution. The HPLC method with UV or mass detection was used for the analysis. Separation of the analytes took place in the Supelcosil™ LC-18 column using binary gradient elution. No degradation product was identified in three of the four historical designs analysed, while other substances not declared in the pharmacopoeias were identified. Two phenobarbital degradation products, feneturide and 3-aminopentanoic acid, were identified in the oldest sample, solution. The concentration of phenobarbital in this preparation decreased by 12.5% compared to the original content declared. Finally, analytes of historical pharmaceutical remains have been selected, quantified, and compared with the declared content.

Key words: degradation, HPLC, mass spectrometry, phenobarbital

Pod'akovanie

Chcem poďakovať doc. RNDr. Karlovi Nesměrákovi, Ph.D. za vedenie diplomovej práce, odborné konzultácie a všetky rady. Takisto by som chcel poďakovať RNDr. Martinovi Štíchovi, Ph.D. za zmeranie hmotnostných spektier a pomoc s ich interpretáciou.

Obsah

1	Cieľ práce.....	8
2	Teoretická časť.....	9
2.1	Analýza historických pozostatkov farmaceutík	9
2.2	Analyzované vzorky a ich kontext	10
2.3	Fenobarbital.....	13
2.3.1	Podávanie a mechanizmus účinku.....	14
2.3.2	Nepriaznivé účinky	14
2.3.3	Chemické vlastnosti fenobarbitalu	15
2.3.4	História	15
2.3.5	Stanovenie fenobarbitalu.....	16
2.3.6	Degradácia fenobarbitalu	17
2.4	Ostatné analyzované látky.....	19
3	Experimentálna časť	22
3.1	Analyzované vzorky.....	22
3.2	Použité chemikálie	25
3.3	Prístroje a experimentálne podmienky	25
3.3.1	Analýza Phenaemalu, Sedobelinu a Spasmoveralginu	26
3.3.2	Analýza Sklerophyllinu.....	27
3.4	Metódy spracovania dát	29
4	Výsledky a diskusia.....	30
4.1	Analýza tabliet Phenaemal	30
4.1.1	Separácia analytov.....	30
4.1.2	Hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením	31
4.1.3	Kvantifikácia vybraných analytov.....	32
4.2	Analýza dražé Sedobelin.....	33
4.2.1	Separácia analytov.....	33
4.2.2	Kvantifikácia vybraných analytov.....	35
4.3	Analýza čapíkov Spasmoveralgin	36
4.3.1	Separácia analytov.....	36
4.3.2	Hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením	39
4.3.3	Kvantifikácia vybraných analytov.....	40

4.4	Analýza roztoku Sklerophyllin.....	41
4.4.1	Separácia analytov.....	41
4.4.2	Hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením	44
4.4.3	Kvantifikácia vybraných analytov.....	45
5	Záver.....	48
	Literatúra	49

Zoznam použitých skratiek a symbolov

<i>b</i>	úsek lineárnej regrese
CV	cyklická voltametria (angl. cyclic voltammetry)
DAD	detektor s diódovým polom (angl. diode array detector)
EIC	chromatogram extrahovaného iónu (angl. extracted ion chromatogram)
ESI	elektro sprejová ionizácia (angl. electrospray ionization)
GABA	kyselina γ -aminomaslová (angl. γ -aminobutyric acid)
GC	plynová chromatografia (angl. gas chromatography)
HPLC	vysokoučinná kvapalinová chromatografia (angl. high performance liquid chromatography)
HR-MS	hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením (angl. high resolution mass spectrometry)
$L_{1,2}$	limit spoľahlivosti (angl. confidence interval)
LOD	limit detekcie (angl. limit of detection)
LOQ	limit kvantifikácie (angl. limit of quantification)
M_r	relatívna molekulová hmotnosť
MS/MS	tandemová hmotnostná spektrometria (angl. tandem mass spectrometry)
m/z	pomer hmotnosti k náboju (angl. mass-to-charge ratio)
QqTOF	kvadrupol čas letu (angl. quadrupole-time-of-flight)
R^2	koeficient determinácie
RP	reverzná fáza (angl. reverse phase)
$s_{y/x}$	smerodajná odchýlka lineárnej regresie
t_r	retenčný čas (min)

1 Ciel' práce

Z chemického i z historického hľadiska môže analýza historických pozostatkov farmaceutík priniesť zaujímavé informácie. Cieľom predloženej diplomovej práce bolo štúdium stability fenobarbitalu v závislosti na liekovej forme. K dispozícii boli: tablety, dražé, čapíky a roztok. Jednotlivé analyzované prípravky sa líšili zložením, od prípravku s jednou účinnou látkou až po prípravky s viacerými zložkami. Pre dosiahnutie tohto cieľu bolo potrebné vybrať a modifikovať vhodnú HPLC metódu pre separáciu a následnú kvantifikáciu hlavných analytov. Pri analýze roztoku bolo nutné použiť vhodnú CZE metódu pre stanovenie anorganických iónov. Taktiež bolo potrebné pokúsiť sa za pomoci hmotnostnej spektrometrie identifikovať prípadne degradačné produkty a neznáme analyty.

2 Teoretická časť

2.1 Analýza historických pozostatkov farmaceutík

Chemici sa stali partnermi archeológov práve vďaka chemickej analýze hmotných nálezov, ktoré boli získané z archeologických nálezísk [1]. Archeológia sa zaoberá štúdiom ľudskej minulosti a rovnako tak aj pri analýze historických pozostatkov farmaceutík sa dozvedáme veľa nových informácií o minulosti ľudstva. Ako príklad môžeme uviesť to, aké látky sa používali na výrobu liekov, aký bol spôsob ich prípravy a k čomu boli tieto farmaceutika presne používané. Tieto analýzy sú prevádzané už viac ako 200 rokov za použitia mnohých chemických metód [2], pričom farmaceutická chémia dostala veľký stimul, ktorý sa datuje od roku 1600 do roku 1670, kedy sa stala plne úradne uznávanou [3]. V súčasnosti nás predovšetkým zaujíma to, či je aktívna látka vo farmaceutiku bez zmeny alebo naopak, degraduje. Pri dôkladnejšej analýze za použitia viacerých chemických metód dokážeme zistiť zastúpenie pôvodnej látky, čiže látky, ktorá sa zachovala, a takisto aj látky zdegradovanej. Zaujíma nás spôsob ich použitia vo farmaceutickej oblasti v minulosti. Často je žiadúce zrekonštruovať a zopakovať postupy prípravy farmaceutík, práve kvôli lepšiemu pochopeniu trendov z minulosti. Môžeme porovnať ich zloženie s literatúrou (liekopisom) a zistiť aké množstvo látky bolo zachované v pôvodnej podobe a aké množstvo bolo zdegradované. Podľa tejto informácie dokážeme ďalej predpokladať za aký čas sa zdegraduje daná aktívna látka vo farmaceutiku. Popríklad sa môžeme pokúsiť navrhnúť vhodný použiteľný marker na určenie veku analyzovaného farmaceutika. Nesměrák a kol. [4, 5] vo svojej publikácii o degradácii ópiových alkaloidov vo farmaceutických pozostatkoch z 18. storočia navrhli vhodný marker na určenie veku pomocou pomeru koncentrácie noskapinu a jeho priameho dezintegračného produktu kotarninu. V jednej zo svojich publikácií ďalej Nesměrák a kol. [6] spomínajú unikátnosť každej analýzy, keďže o týchto historických farmaceutikách máme len obmedzené množstvo informácií. Farmaceutika majú rozdielny dátum prípravy a vždy sa snažíme o kompletnú kvantifikáciu všetkých látok vo vzorkách, no vo väčšine prípadov je nutné vo väčšine prípadov brať do úvahy aj prekážky, a to hlavne vo forme nejasej historickej literatúry farmaceutík [7]. Zilker a kol. [8] v jednej zo svojich publikácií preberajú analýzy 49

testovaných farmaceutických prípravkov starých 20 až 30 rokov z kolekcie starých farmaceutík z Inštitútu pre farmáciu vo Würzburgu (Nemecko). Farmaceutické prípravky, ktoré boli použité v tejto štúdiu boli bežne používanými prípravkami zo skupín: β -blokátory, β -sympatomimetika, anticholinérgika, antipsychotiká, antihistaminiká, antiinfektiva, nesteroidové protizápalové prípravky a jeden antiarytmický prípravok. Výsledok štúdie poukazoval na 44 z 49 testovaných prípravkov, ktorých látky stále zodpovedali špecifikáciám súčasných liekopisov. Ostatné prípravky obsahovali malé množstvo degradačných produktov alebo nečistoty, ktoré nespĺňali akceptačné kritéria. Vo výsledku bola preukázaná prekvapivo veľká chemická stabilita pre prípravky staré viac ako dve dekády. Vo svojej ďalšej publikácii Zilker a kol. [9] uvádzajú analýzy farmaceutických prípravkov starších viac ako 80 rokov a diskutuje o skutočnej dobe použiteľnosti vzhľadom na príslušnú liekovú formu a liekovú triedu. Zdá sa, že pre veľkú časť liekov by bolo rozumné predĺžiť dátum spotreby na viac ako päť rokov.

2.2 Analyzované vzorky a ich kontext

V tejto diplomovej práci boli analyzované štyri vzorky historických liečivých prípravkov s fenobarbitalom ako hlavnou liečivou látkou.

Prvým analyzovaným prípravkom boli tablety Phenaemal[®], vyrobené firmou Destin Arzneimittel (Nemecko) v roku 2017 (číslo šarže 12003446). V dobe analýzy uplynulo od výroby prípravku 5 rokov. Prípravok je určený k liečbe rôznych foriem epilepsie a pre zmierňovanie stavu psychomotorického nepokoja.

Druhým analyzovaným prípravkom boli dražé Sedobelin, vyrobené firmou Spofa (Československo) v roku 1978 (číslo šarže 5010378). V dobe analýzy uplynulo od výroby prípravku 43 rokov. Prípravok bol určený k liečbe spastických stavov, hlavne astmy a cholestázy. Do používania bol prípravok zavedený v roku 1942 firmou Eko (Praha), ktorú následne prevzal národný podnik Spofa (obr. 2.1). V súčasnosti nie je prípravok vyrábaný.

POTENCOVANÉ SPASMOLYTICUM
SE SEDATIVNÍM ÚČINEM
OCHRANNÉ SLOVNÍ ZNÁMKY

SEDOBELIN

*Parasympatikolytické alkaloidy ruliku ve spojení s tetrametoxyl-
benzyl- isochinolinum hydrochlor. a barbiturátem, doplňované
sedativními složkami — Menthanolum isovalerianicum a Extr
Crataegi.*

INDIKACE:
Asthma bronchiale, cholelithiasis,
vegetativní neurosy, spastické stavy.

BALENÍ:
Rourka s obsahem 20 dražé.

•EKO•
chemicko-farm. továrna, P R A H A .

Obr. 2.1 Reklama na přípravek Sedobelin z roku 1942 (prevzaté z [10]).

Třetím analyzovaným přípravkem boli čapíky Spasmoveralgin, vyrobené firmou Spofa (Československo) v roku 1985 (číslo šarže 3380985). V době analýzy uplynulo od výroby přípravku 36 rokov. Přípravok bol určený k liečbe spastických stavov a bolesti. Do používania bol prípravok zavedený v roku 1949 firmou Spofa (obr. 2.2). V súčasnosti prípravok už nie je vyrábaný.

Bolestivé spasmy tiší

SPASMOVERALGIN

suppositoria

Spolehlivé spasmooanalgeticum
ve formě čípků

1 scat. à 6 suppos.



SPOLEK PRO CHEMICKOU A HUTNÍ VÝROBU,
národní podnik, farmaceutické oddělení,
PRAHA II, Štěpánská 30

42

Obr. 2.2 Reklama na přípravek Spasmoveralgin z roku 1942 (prevzaté z [11]).

Štvrtým analyzovaným prípravkom bol roztok Sklerophyllin, vyrobený firmou Galena (Československo) v 60. rokoch 20. storočia. V dobe analýzy uplynulo od výroby prípravku okolo 50 rokov. Prípravok bol určený k liečbe artériosklerózy, vysokého tlaku a ku zmierňovaniu príznakov starnutia. Do používania bol prípravok zavedený v roku 1938 firmou Interpharma (Praha), ktorou následne prevzal národný podnik Spofa (obr. 2.3). Výroba prípravku bola zastavená v roku 1964 [12].

2.3.1 Podávanie a mechanizmus účinku

Do organizmu vstupuje fenobarbital intravenózne, intramuskulárne alebo orálne. Injekčná forma sa používa najčastejšie na liečbu *status epilepticus*¹ [20]. Príležitostne sa používa aj na liečbu nespavosti a úzkosti, no pri liečení nespavosti môže vzniknúť závislosť na fenobarbitale [21]. Je užitočný pri benzodiazepínovej a alkoholovej abstinencnej liečbe pre svoje protizáchvatové vlastnosti a sedatívny účinok [21]. Fenobarbital ako látka s dlhodobým účinkom nie je preferovanou možnosťou v chirurgickej praxi: na tento účel sa používajú krátkodobo pôsobiace barbituráty [22]. Nástup účinku je medzi 15 až 30 minútami a dĺžka účinku dosahuje až 48 hodín [23].

Fenobarbital a iné barbituráty prejavujú svoj antiepileptický účinok predovšetkým uľahčením inhibície sprostredkovanej kyselinou γ -aminomaslovou (GABA) prostredníctvom alosterickej interakcie s neurónovými postsynaptickými receptormi GABA_A [24, 25]. Zvyšuje aktiváciu GABA_A receptorov, a to predĺžením priemerného trvania otvoreného kanála bez ovplyvnenia otvorenej frekvencie alebo vodivosti [26]. Výsledné zvýšenie toku chloridov hyperpolarizuje membránu postsynaptickej neurónovej bunky, čím bráni prenosu epileptickej aktivity [27]. Barbituráty tiež aktivujú receptor GABA_A priamo, v neprítomnosti GABA, čo je účinok, ktorý môže byť základom ich sedatívnych vlastností [28].

2.3.2 Nepriaznivé účinky

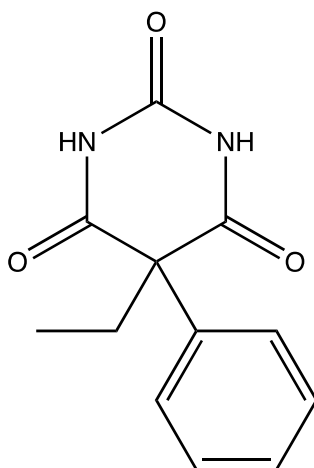
Medzi bežné nežiaduce účinky patrí: nekoordinovanosť, porucha rovnováhy a ospalosť. Tieto nepriaznivé účinky vo väčšej miere ovplyvňujú geriatrických pacientov [21, 29] a preto sú pri týchto pacientoch preferované iné antiepileptiká [29]. Menej časté komplikácie spojené s užívaním fenobarbitalu sú nízky krvný tlak, znížená možnosť dýchať alebo upadnutie do kómy [15].

Pri dlhodobom užívaní sú zaznamenané nepriaznivé účinky ako podráždenosť, strata chuti, bolesť kĺbov alebo svalov, depresia a zriedkavo aj poškodenie pečene [15]. Pri náhlom vysadení lieku môžu pacienti pociťovať abstinencné príznaky, preto je potrebné postupne znižovať dávky fenobarbitalu [21].

¹ *Status epilepticus* je jeden záchvat trvajúci viac ako 5 minút alebo dva a viac záchvatov v priebehu 5 minút bez toho, aby sa medzi záchvatmi vrátil človek do pôvodného stavu [86].

2.3.3 Chemické vlastnosti fenobarbitalu

Štruktúra fenobarbitalu je uvedená na obr. 2.4. Sumárny vzorec fenobarbitalu je $C_{12}H_{12}N_2O_3$, jeho systematický názov je 5-ethyl-5-fenyl-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-pyrimidinetrión, s číslom CAS 50-06-6. Relatívna molekulová hmotnosť je 232,23. Je to biela prášková látka.



Obr. 2.4 Štruktúra molekuly fenobarbitalu

2.3.4 História

Zmienka o prvom medicínálnom použití barbiturátu sa datuje do roku 1903, keď Emil Fischer a Joseph von Mering objavili, že barbital (taktiež známy aj ako kyselina diethylbarbiturová) je veľmi účinný pri navodzovaní spánku u psov. Po tomto objave firma Bayer začala predávať liek obchodným názvom Veronal, ktorý stal rýchlo používaným liekom na začiatku 20. storočia.

Fenobarbital bol prvýkrát syntetizovaný v roku 1911 Heinrichom Hörlienom a predávaný spoločnosťou Bayer pod obchodným názvom Luminal v roku 1912 pre svoje hypnotické účinky. Barbituráty zaznamenali veľký úspech [30]. Do roku 1960 bolo syntetizovaných viac ako 2500 barbiturátových derivátov, z ktorých 50 sa používalo v klinickej praxi [31] ako hypnotiká, anxiolytiká, antiepileptiká, anestetiká a sedatíva. Fenobarbital s dlhším farmaceutickým účinkom (v porovnaní s jeho predchodcom) sa tak stal kráľom barbiturátov ako v nemocniciach, tak aj v ambulantnej starostlivosti [32]. Tomuto lieku sa taktiež podarilo uspieť i v ďalšej významnej terapeutickej aplikácii pri liečbe epilepsie. Veronal a Luminal boli akceptovaní ako prví dvaja zástupcovia zo série barbiturátov v medzinárodných

liekopisoch – napríklad liekopis Spojených štátov v roku 1926 a britský liekopis v roku 1914 a 1932 [33]. Neskôr boli oba lieky zaradené aj do *Pharmacopoeia Internationalis*².

U fenobarbitalu sa potvrdili okrem výborných hypnotických účinkov aj antikonvulzívne vlastnosti. Objavenie týchto vlastností uskutočnil Alfred Hauptmann v roku 1912. Alfred Hauptmann bol rezidentný psychiater vo Freiburgu (Nemecko), pričom mal na starosti pacientov s epilepsiou. Zistil, že z dôvodu častých záchvatov pacientov dochádza k narušeniu spánkového rytmu, a tak sa rozhodol pacientom podávať nové hypnotiká, ktoré sa na trhu objavili (medzi nimi bol aj fenobarbital). Prekvapivo zistil, že výskyt záchvatov u hospitalizovaných pacientov výrazne klesol, aj napriek tomu, že im boli podávané len nízke dávky fenobarbitalu, a to nielen počas noci ale aj počas dňa [34]. Hauptmann týmto jeho vlastným experimentom pomohol pacientom, u ktorých sa nielen znížil počet záchvatov, ale aj ich intenzita. To umožnilo mnohým pacientom opustiť ústavy a užívať si normálny život.

Práve týmto spôsobom boli objavené antikonvulzívne vlastnosti barbiturátov, pričom fenobarbital bol prvým skutočne účinným liekom na liečbu epilepsie [33].

Zatiaľ čo Hauptmann dospel k veľkému objavu použitia fenobarbitalu, tak jeho celosvetové použitie ani zďaleka nebolo na nemeckej úrovni. Hlavným faktorom bol malý význam časopisu, v ktorom Hauptmann publikoval, keďže išlo o nemecký časopis *Münchener Medizinische Wochenschrift*. Druhým faktorom bolo vypuknutie prvej svetovej vojny. Vo Veľkej Británii bol komerčne dostupný až v roku 1923 (Winthrop Chemical Company), pričom o jeho účinkoch informoval Charles Brooks [33]. Začiatkom roku 1930 používanie fenobarbitalu definitívne nahradilo používanie bromidov pri liečbe epileptických záchvatov, aj napriek prvým správam o farmakologickej tolerancii a riziku záchvatov, pri príliš rýchlom vysadení fenobarbitalu. V súčasnosti je stále najviac predpisovaným antiepileptikom na svete [35].

2.3.5 Stanovenie fenobarbitalu

Najčastejšie je fenobarbital stanovovaný vo farmaceutikách, v moči alebo v krvi. Je najlepšie stanoviteľný pomocou UV detekcie, keďže absorbuje UV žiarenie pri vlnovej dĺžke 250 nm. Stanovenie fenobarbitalu je najčastejšie prevedené pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej

² Medzinárodný liekopis je liekopis vydaný svetovou zdravotníckou organizáciou (WHO) ako odporúčanie s cieľom poskytnúť medzinárodné špecifikácie kvality farmaceutických látok a liekových foriem spolu s podpornými všeobecnými metódami na globálne použitie [87].

chromatografie [36], poprípade HPLC s hmotnostnou detekciou [37], cyklická voltametria [38]. Taktiež je možné použiť plynovú chromatografiu s hmotnostnou detekciou [39]. Parametre vybraných analytických stanovení uvádza tabuľka 2.1.

Tabuľka 2.1

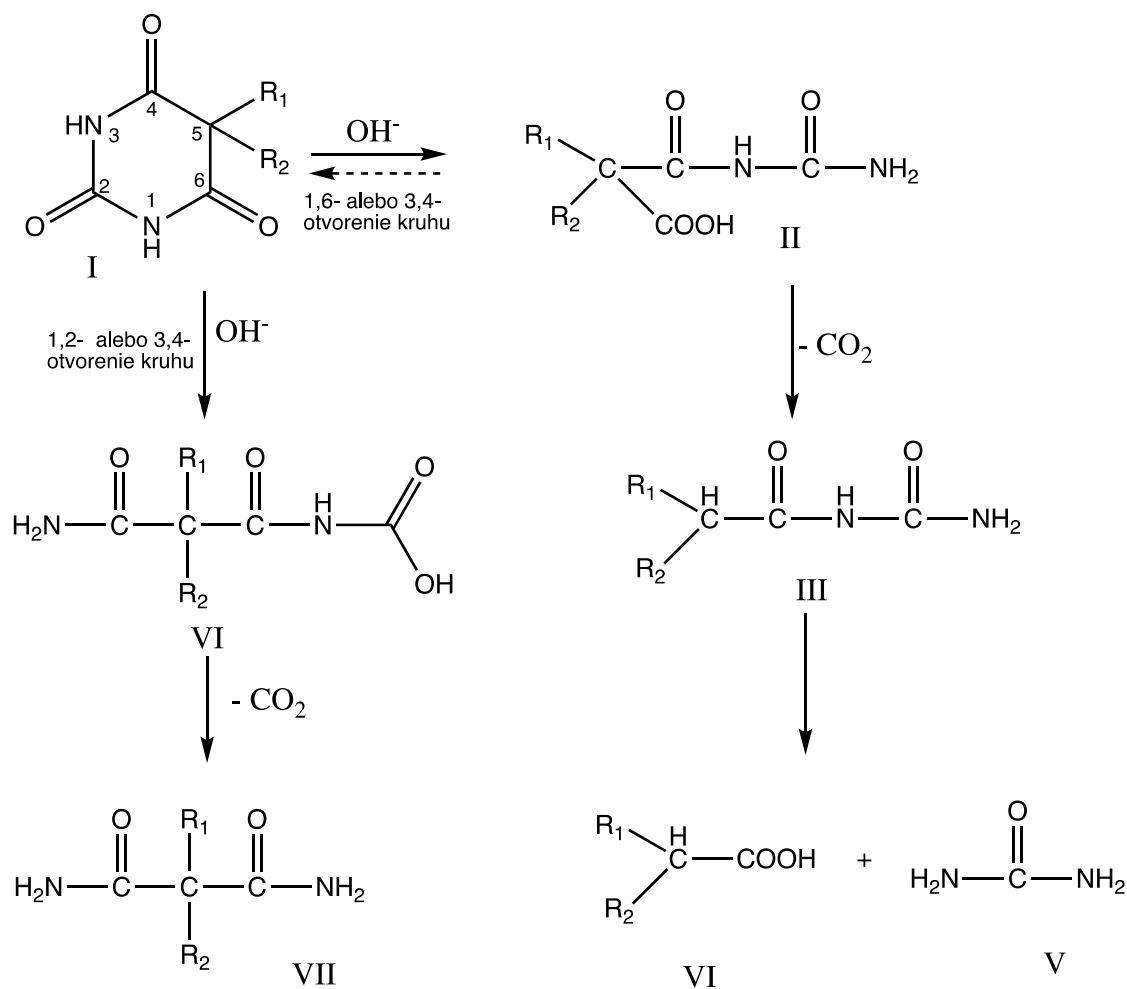
Parametre vybraných analytických stanovení fenobarbitalu

metóda	<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>	vzorka	referencia
HPLC	1,0 μM	– ^a	moč	[36]
HPLC-MS/MS	44,55 ng ml^{-1}	80,80 ng ml^{-1}	moč	[37]
CV	0,1 μM	– ^a	moč	[38]
GC-MS	0,1 ng mg^{-1}	0,25 ng mg^{-1}	vlasý	[39]

^a Hodnota nie je uvedená.

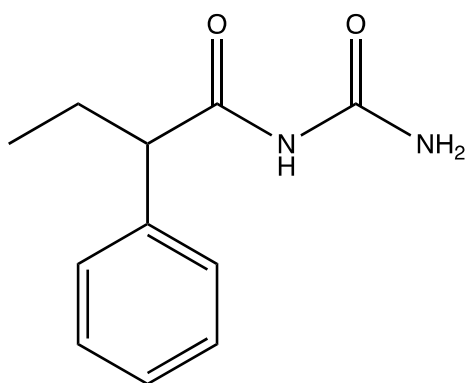
2.3.6 Degradácia fenobarbitalu

Mnoho štúdií sa zaoberalo degradáciou fenobarbitalu, keďže sa používa už viac ako 100 rokov. Vo svojej publikácii Garrett a kol. [40] popísali mechanizmus degradácie derivátov kyseliny barbiturovej (obr. 2.5). Ako prvý z degradačných produktov sa uvádza kyselina malonurová (II), pri ktorom sa dokazuje reverzibilný systém medzi barbiturátmi a derivátmi kyseliny malonurovej s otvoreným kruhom. Produkt hydrolyzy kyseliny malonurovej môže degradovať na derivát acetylmočoviny (III) a cyklizuje za vzniku barbiturátu. Hydrolyza barbiturátov prebieha dvomi cestami. Neionizovaná forma barbiturátu hydrolyzuje otvorením kruhu v polohe 1,2- alebo v ekvivalentnej polohe 2,3- čím sa získava malonamid (VII). Ionizovaná forma hydrolyzuje cez otvorenie v polohe 1,6- alebo 3,4- za vzniku substituovaného derivátu acetylmočoviny (III), z ktorej sú finálne produkty močovina (V) a derivát karboxylovej kyseliny (VI).



Obr. 2.5 Schéma pre degradáciu derivátov kyseliny barbiturovej (fenobarbital: $\text{R}_1 = \text{ethyl}$, $\text{R}_2 = \text{fenyl}$) (upravené z [40]).

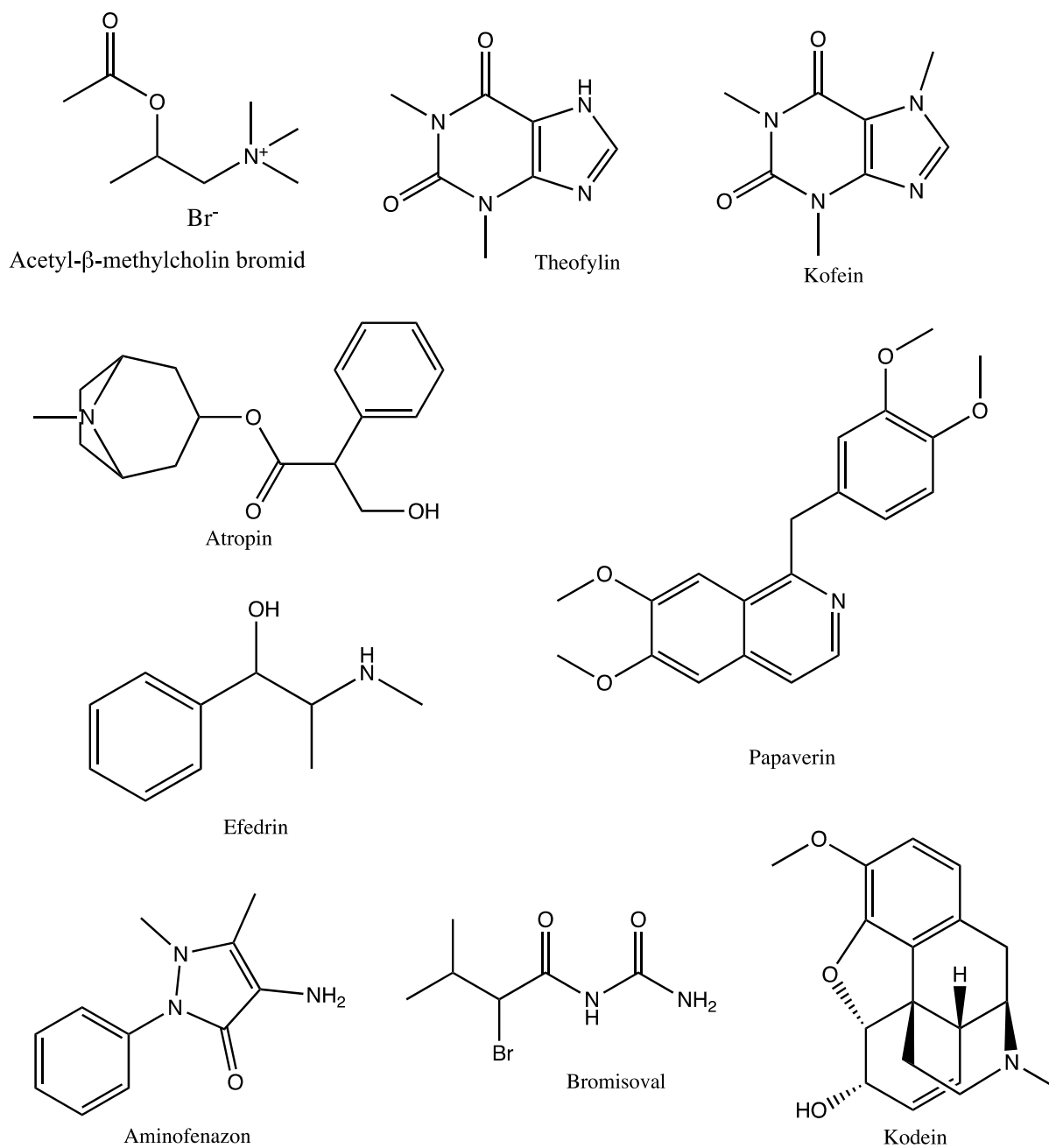
Hlavným degradačným produktom fenobarbitalu je feneturid. Jeho štruktúra je uvedená na obr. 2.6. Sumárny vzorec feneturidu je $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$, s číslom CAS 90-49-3, jeho systematický názov je *N*-(aminokarbonyl)- α -ethylbenzenacetamid, relatívna molekulová hmotnosť je 206,24.



Obr. 2.6 Štruktúra molekuly feneturidu

2.4 Ostatné analyzované látky

Chemické štruktúry ostatných analyzovaných látok v tejto diplomovej práci sú uvedené na obr. 2.7 a v tabuľke 2.2 sú uvedené ich sumárne vzorce, systematické názvy, čísla CAS a relatívne molekulové hmotnosti.



Obr. 2.7 Chemické štruktúry látok preberaných v tejto diplomovej práci

Tabuľka 2.2

Ostatné analyzované látky v tejto diplomovej práci a ich vlastnosti

Analyzovaná látka	Sumárny vzorec	Systematický názov	Číslo CAS	M_r
acetyl- β -methylcholin bromid	$C_8H_{18}BrNO_2$	2-acetoxy-N,N,N-trimethylpropan-1-aminium bromid	333-31-3	240,14
theofylin	$C_7H_8N_4O_2$	1-3-dimethylxantin	58-55-9	180,16
atropín	$C_{17}H_{23}NO_3$	(3-endo)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl-3-hydroxy-2-fenylpropanoat	51-55-8	289,40
papaverin	$C_{20}H_{21}NO_4$	1-(3,4-dimetoxybenzyl)-6,7,-dimetoxyisochinolin	58-74-2	339,40
bromisovalaminofenazon	$C_6H_{11}BrN_2O_2$	2-bromo-N-karbamoyl-3-methylbutanamid	496-67-3	223,07
aminofenazon	$C_{13}H_{17}N_3O$	4-dimethylaminoantipyrin	58-15-1	231,29
kofeín	$C_8H_{10}N_4O_2$	1,3,7-trimethylxantin	58-08-2	194,19
kodeín	$C_{18}H_{21}NO_3$	7,8-didehydro-4,5-epoxy-3-methoxy-17-methylmorfinan-6-ol	76-57-3	299,40
efedrin	$C_9H_{13}NO_3$	4-(1-hydroxy-2-(methylamino)ethyl)-1,2-benzenediol	51-43-4	183,20

Acetyl- β -methylcholin bromid je parasymptomimetický bromchokonstrikčný liek používaný v klinickej diagnostike [41]. Má úlohu muskarínového agonistu. Je indikovaný u dospelých a pediatrických pacientov vo veku 5 rokov a viac bez klinicky zjavnej astmy na diagnostiku bronchiálnej hyperaktivity dýchacích ciest prostredníctvom metacholínového testu [42].

Theofylin zostáva celosvetovo jedným z najčastejšie predpisovaných liekov na liečbu astmy a chronickej obštrukčnej choroby pľúc, predovšetkým kvôli jeho nízkej cene a širokej dostupnosti [43]. Theofylin je silný methylxantín, štrukturálne podobný kofeínu a používa sa od 30. rokov minulého storočia [44]. Methylxantíny sú široko distribuované v rastlinnom svete v rastlinách, ako napríklad *Thea sinensis* (čajovník čínsky), *Coffea arabica* (kávovník arabský) a *Theobroma cacao* (kakaovník pravý) [44].

Atropin je prirodzene sa vyskytujúci alkaloid extrahovaný z rastliny *Atropa belladonna* (ľuľkovec zlomocný). Je to neselektívny inhibítor muskarínových receptorov [45]. Má rozsiahle centrálna a periférna účinky, pričom je veľmi dôležitou látkou v očnej medicíne [46]. Hlavnými účinkami sú zmeny srdcovej frekvencie, zníženie bronchiálnej, potnej, slinnej, nazálnej a žalúdočnej sekrécie [46].

Papaverin, alkaloid izolovaný z maku siateho, je nešpecifický inhibítor PDE, ktorý bráni degradácii cAMP a cGMP. Tieto cyklické nukleotidy akumulujú v bunkách hladkého svalstva, čím sa čoraz viac podporuje relaxácia tkaniva [47]. Je účinný pri akútnej renálnej kolike a je dobrou alternatívou steroidných protizápalových liekov [48]. Takisto sa používa pri liečbe erektilnej dysfunkcie [49].

Bromisoval je sedatívum/hypnotikum podávané perorálne ako racemická zmes a často sa používa pri predávkovaní v prípadoch samovrážd [50].

Aminofenazon je pyrazolonový derivát a v minulosti bol používaný ako antipyretikum, analgetikum a proti zápalom [51]. Dychový test s aminofenazonom značeným ^{13}C sa používa ako neinvazívne meranie metabolickej aktivity cytochrómu P-450 v testoch funkcie pečene [52].

Kofeín je stimulant centrálného nervového systému zo skupiny methylxantínov [53]. Nachádza sa v mnohých potravinách a nápojoch, ktoré denne konzumujú ľudia po celom svete, najmä v káve a čaji. Znižuje celkový čas spánku a obmedzuje latenciu nástupu spánku, najpravdepodobnejšie blokáciou účinku adenozinu na podporu spánku [54]. Kofeín v liekoch najčastejšie pôsobí ako posilňovač účinkov ostatných látok [55].

Kodeín je prirodzene vyskytujúci sa ópiový alkaloid s nízkou účinnosťou. Na lekárske použitie sa zvyčajne pripravuje metyláciou morfinu, čím sa získa biely kryštalický prášok, bez zápachu, horkej chuti a ovplyvnenia svetlom [56]. Je bežnou zložkou mnohých liečivých prípravkov, avšak nie je účinný pri silnej bolesti, a preto je jeho použitie obmedzené na miernu až strednú úľavu od bolesti a na kašeľ [56].

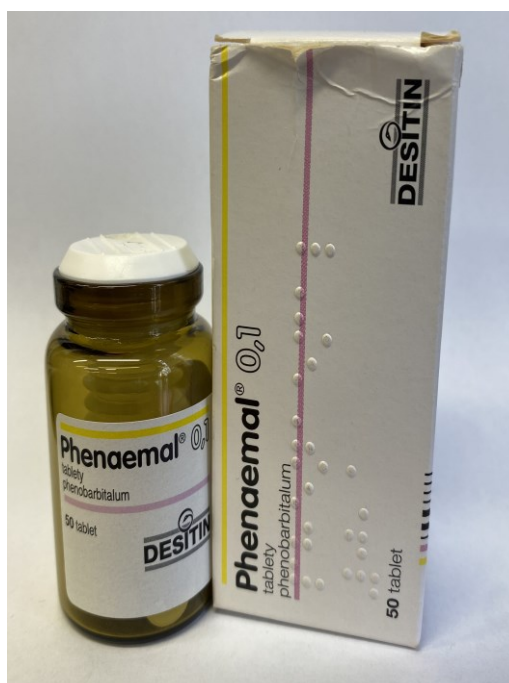
Efedrin zvyšuje arteriálny krvný tlak a má pozitívny inotropický efekt [57]. Je to syntetický nekatecholamínový agonista na α , β_1 a β_2 receptoroch s priamym aj nepriamym pôsobením [58]. Metabolizuje sa v pečeni oxidačnou deamináciou, demetyláciou a konjugáciou, pričom metabolity efedrinu zahŕňajú nerepinefrin, kyselinu benzoovú a kyselinu hippurovú [59].

3 Experimentálna časť

3.1 Analyzované vzorky

Analyzované vzorky pochádzali zo zbierky Katedry analytickej chémie, Prírodovedeckej fakulty, Univerzity Karlovej. Skladovacie podmienky týchto vzoriek nie sú známe, ale predpokladá sa, že boli uložené v tme pri izbovej teplote.

V tablekách Phenaemal[®] od spoločnosti Destin, číslo šarže 12003446 bolo podľa výrobcu deklarovaných 100 mg fenobarbitalu. Pomocnými látkami boli mikrokryštalická celulóza, želatína, monohydrát laktózy, kukuričný škrob, stearová kyselina a koloidný bezvodný oxid kremičitý. Celé balenie obsahovalo 50 tabliet. Pre analýzu boli použité 3 tablety, ktoré boli vždy analyzované zvlášť, kvôli štatistickému vyhodnoteniu výsledkov. Tablety boli odobrané z liekovej nádoby uvedenej na obr. 3.1.



Obr. 3.1 Balenie analyzovaného prípravku Phenaemal[®]

V druhom stanovovanom prípravku – dražé Sedobelin od spoločnosti Spofa, číslo šarže 5010378 – bol podľa výrobcu deklarovaný obsah jedného dražé: 50 mg fenobarbital, 20 mg papaverin chlorid, 0,25 mg radobelin (zmes rulíkových alkaloidov, hlavne atropín) a 100 mg *extractum crataegi* (extrakt z listu hlohu, ktorého hlavnými zložkami sú prokyanidin a hyperosid). Dražé bolo odobrané z liekovej nádoby na obr. 3.2.



Obr. 3.2 Balenie analyzovaného prípravku Sedobelin

Tretím stanovovaným prípravkom boli čapíky Spasmoveralgin od spoločnosti Spofa, číslo šarže 3380985, v ktorom bol podľa výrobcu deklarovaný obsah jedného čapíku: 300 mg bromisoval, 200 mg aminofenazon, 50 mg kofeín, 25 mg fenobarbital, 25 mg papaverin hydrochlorid, 15 mg kodeín dihydrofosfát, 5 mg efedrín hydrochlorid a 0,5 mg atropín methylbromid. Čapík bol odobratý z liekového obalu uvedeného na obr. 3.3.



Obr. 3.3 Balenie analyzovaného prípravku Spasmoveralgin

Posledný analyzovaný prípravok bol roztok Sklerophyllin od spoločnosti Galena, v ktorom bol podľa výrobcu deklarovaný nasledujúci obsah, v 200 ml roztoku: 300 mg acetyl- β -methylcholin bromid, 400 mg theofylin, 200 mg fenobarbital a 200 mg jodid sodný. Prípravok ďalej obsahuje farbivo na báze chlorofylu, v literatúre označené ako chlorophyllinpurin, o koncentrácii 1 mg ml^{-1} [60]. Vzorka roztoku bola odobraná z liekovej fľašky uvedenej na obr. 3.4.



Obr. 3.4 Balenie analyzovaného prípravku Sklerophyllin

3.2 Použité chemikálie

Nasledujúce látky boli použité ako štandardy účinných látok v prípravkoch alebo ako pomocné látky v nich: *O*-acetyl- β -methylcholin bromid (≥ 98 %, Merck), aminofenazon (Merck), atropín (≥ 99 %, Merck), kofeín (p.a., Sigma-Aldrich), kodeín (Zentiva, ČR), efedrín (p.a., Lachema, ČR), ethylparaben (ReagentPlus, Merck), chlorid horečnatý (p.a., Lach-Ner, ČR), papaverin hydrochlorid (p.a., zbierka Katedry analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Karlova), fenobarbital (p.a., Lach-Ner, ČR), bromid draselný (p.a., Lach-Ner, ČR), jodid draselný (p.a., Lach-Ner, ČR), chinová kyselina (98%, Merck), chlorid sodný (p.a., Lach-Ner, ČR), sacharóza (p.a., Lach-Ner, ČR), theofylin (≥ 99 %, Merck).

Účinne látky v stanovovaných farmaceutikách boli vždy extrahované v methanole (pre HPLC, Lach-Ner, ČR).

Pri príprave mobilnej fázy pre analýzu prípravkov Phenaemal, Sedobelin, a Spasmoveralgin bol ako mobilná fáza A použitý acetonitril (pre HPLC, Lach-Ner, ČR). Ako mobilná fáza B bol použitý octanový tlmivý roztok ktorý pozostával z octanu amónneho (p.a., Lach-Ner, ČR) a kyseliny octovej 99 % (p.a., Lach-Ner, ČR).

Pri prípravku Sklerophyllin bol ako prvá mobilná fáza použitý methanol. Na prípravu B mobilnej fázy bol použitý octanový tlmivý roztok, ktorý rovnako ako v predchádzajúcom prípade pozostával z octanu amónneho a kyseliny octovej.

Pre analýzu aminofenazonu vo vzorke prípravku Spasmoveralgin bol ako činidlo použitý 10 % vodný roztok kyseliny fosfomolybdenovej ($\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$) (ACS reagent, Merck) a ethanol 96 % (Lach-Ner, ČR). Pre analýzu iónov vo vzorke prípravku Sklerophyllin bola použitá kyselina mravčia 98 % (p.a., Lach-Ner, ČR), imidazol (ACS Reagent, Merck), 18-crown-6 éter (99 %, Merck), hydroxid sodný (p.a., Lachema, ČR) a deionizovaná voda pripravená na Mili-Q zariadení (Millipore, USA), so špecifickou vodivosťou $< 0.05 \mu\text{S cm}^{-1}$.

3.3 Prístroje a experimentálne podmienky

Na prípravu mobilnej fázy bol použitý pH meter 3510 (Jenway, Veľká Británia) so sklenenou elektródou HC 103 (Theta 90, Česká republika). Elektróda bola pred meraním kalibrovaná trojbodovou kalibráciou štandardnými tlmiacimi roztokmi pH= 4,00, 7,00, 10,00. Pri extrakcii vzoriek bol použitý ultrazvukový kúpeľ Sonorex RK 100 (Bandelin Elektronik, Nemecko).

Vzorky Sedobelínu a Spasmoveralginu boli po extrakcii filtrované pomocou striekačkových filtrov pri veľkosti pórov 0,20 μm (Whatman).

Pre separáciu všetkých farmaceutík bola použitá kolóna SupelcosilTM LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm ; Supelco).

Pre analýzu pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie bol použitý chromatograf s UV detekciou UHPLC Nexera XR (Shimadzu, Japonsko), vybavený DAD.

Pre analýzu pomocou kvapalinovej chromatografie s hmotnostným spektrometrom bol použitý model s dvojitou pumpou Agilent 1200 HPLC (Agilent, USA). ESI-MS detekcia bola uskutočnená na prístroji Bruker QqTOF so softvérom Compass otof Control 4.0 (Bruker Daltonics, Nemecko). Na spracovanie údajov bol použitý softvér Compass DataAnalysis 4.4 (Build 200.55.2969, Bruker Daltonics, Nemecko).

Pre analýzu pomocou spektrofotometra bol použitý spektrofotometer vybavený jednolúčovým diódovým poľom, spektrofotometer HP-8453 (Agilent, USA) v kremennej kvete optickej dĺžky 1 cm.

Pre analýzu pomocou kapilárnej elektroforézy bola použitá kapilárna elektroforéza Agilent 7100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Nemecko) vybavená diódovým poľom a bezkontaktným detektorom vodivosti.

3.3.1 Analýza Phenaemalu, Sedobelínu a Spasmoveralginu

Vzorka Phenaemalu bola pripravená rozpustením jednej tablety Phenaemalu pomocou ultrazvuku do 100 ml odmernej banky. Odmerná banka bola doliata po rysku metanolom.

Vzorka Sedobelínu bola pripravená rozpustením jedného dražé pomocou ultrazvuku do 50 ml odmernej banky. Odmerná banka bola doliata po temperácii po rysku metanolom.

Vzorka Spasmoveralginu bola pripravená rozpustením jedného čapíku pomocou ultrazvuku do 100 ml odmernej banky. Odmerná banka bola doliata po rysku metanolom.

Obsah odmernej banky obsahujúcej Sedobelin a Spasmoveralgin bol prefiltrovaný pomocou striekačkového filtru do vialky.

Použitá metóda pre separáciu analytov uvedených vzoriek bola prebratá z publikácie [61] a upravená. Kolóna bola temperovaná na 30 °C pri separácii. Za použitia gradientovej elúcie bol acetonitril použitý ako A mobilná fáza a zložkou B mobilnej fázy bol vodný roztok 0,020 M octanu amónneho s pH upraveným pomocou kyseliny octovej na 3,5. Prietok mobilnej fázy bol 1,0 ml min⁻¹. Nastrekovaný objem vzorky bol 3 μl . Konkrétny popis gradientovej elúcie pre separáciu analytov Sklerophyllinu sa nachádza v tab. 3.1.

Tabuľka 3.1

Gradientový program pre separáciu analytov pomocou HPLC-UV/MS na kolóne Supelcosil™ LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm; Supelco). Mobilne fázy: (A) acetonitril, (B) 0,020 M octan amónny (pH = 3,5, upravené kyselinou octovou)

čas / min	0,00	7,50	16,00	25,00	28,00	30,00
B mobilná fáza / %	70	70	55	10	10	70

Metóda bola použitá aj pre kvapalinovú chromatografiu s hmotnostnou spektrometriou. ESI-MS dáta boli zaznamenané v pozitívnom iónovom móde v rozsahu snímania od m/z 50 až m/z 1000. Teplota sušiacieho plynu bola nastavená na 220 °C pri prietoku 3,0 dm³ min⁻¹. Napätie na kapiláre bolo 2800 V.

Pri analýze aminofenazonu vo vzorke Spasmoveralginu bolo postupované podľa publikácie [62] Do 5 ml odmernej banky bolo odpipetované 25 μl z pripravenej vzorky Spasmoveralginu. Následne bolo pridaných 0,500 ml roztoku činidla a ponechané na trepačke po dobu 10 minút. Banka bola doplnená po rýsku ethanolom a ponechaná stáť 30 minút. Absorbancia bola zmeraná pri vlnovej dĺžke 630 nm (proti slepému pokusu) v kremennej kvete s hrúbkov absorpčnej vrstvy 1 cm.

3.3.2 Analýza Sklerophyllinu

Vzorka bola pripravená odobraním 1 ml prípravku Sklerophyllin do 5 ml odmernej banky a doliata po rýsku methanolom. Následne bola vzorka analyzovaná pomocou kvapalinovej chromatografie.

Použitá metóda pre separáciu analytov prípravku Sklerophyllin bola prebratá z publikácie [63] a upravená. Kolóna bola temperovaná na 30 °C pri separácii analytov prípravku Sklerophyllin. Za použitia gradientovej elúcie bol methanol použitý ako A mobilná fáza a zložkou B mobilnej fázy bol vodný roztok 0,010 M octanu amónneho s pH upraveným pomocou kyseliny octovej na 2,5. Prietok mobilnej fázy bol 1,0 ml min⁻¹. Nastrekovovaný objem vzorky bol 1 μl. Konkrétny popis gradientovej elúcie pre separáciu analytov Sklerophyllinu sa nachádza v tab. 3.2.

Tabuľka 3.2

Gradientový program pre separáciu analytov pomocou HPLC-UV/MS na kolóne Supelcosil™ LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm; Supelco). Mobilné fázy: (A) methanol, (B) 0,010 M octan amónny (pH = 2,5, upravené kyselinou octovou).

čas / min	0,00	8,00	16,00	17,00	18,00
B mobilná fáza / %	90	75	35	35	75

Táto metóda bola použitá aj pre kvapalinovú chromatografiu s hmotnostnou detekciou. ESI-MS dáta boli zaznamenané v pozitívnom iónovom móde v rozsahu snímania od m/z 50 až m/z 1000. Teplota sušiacého plynu bola nastavená na 220 °C pri prietoku 3,0 dm³ min⁻¹. Napätie na kapiláre bolo 2800 V.

Pri analýze analytov prípravku Sklerophyllin bola použitá aj kapilárna zónová chromatografia pre stanovenie jodidov, bromidov, sodných a horečnatých iónov vo vzorke. Stanovenie bromidov a jodidov sa uskutočnilo v 375 μm odtavenej kremičitej kapiláre, v celkovej dĺžke 110,0 cm, efektívnej dĺžke 95,0 cm a vnútorným priemerom 20 μm. Pred prvým použitím sa kapilára preplachovala 10 minút 1 M NaOH a 10 minút vodou. Medzi jednotlivými cyklami bola kapilára preplachovaná 3 minúty základným elektrolytom pozostávajúcim z 1 M kyseliny mravčej. Vzorka sa zavádzala tlakom 5 kPa počas 10 s. Počas separácie bolo napätie nastavené na -25 kV (prúd bol 4 μA) a tlak aplikovaný na výstupnú vialku bol 45 mbar. Použila sa bezkontaktná detekcia vodivosti. Teplota bola udržiavaná na 25 °C.

Stanovenie katiónov horčíka a sodíka sa uskutočnilo v 375 μm odtavenej kremičitej kapiláre, v celkovej dĺžke 80,0 cm, efektívnej dĺžke 71,5 cm a vnútorným priemerom 50 μm. Pred prvým použitím sa kapilára preplachovala 10 minút 1 M NaOH a 10 minút vodou. Medzi jednotlivými cyklami bola kapilára preplachovaná 3 minúty základným elektrolytom pozostávajúcim z 10 mM imidazolu pH upravené na 4,5 pomocou kyseliny octovej s prídavkom 4 mM 18-crown-6-éteru. Vzorka sa zavádzala tlakom 5 kPa počas 10 s. Počas separácie bolo napätie nastavené na 30 kV (prúd bol 6 μA). Použila sa UV detekcia pri vlnovej dĺžke 200 nm. Teplota bola udržiavaná na 25 °C.

3.4 Metódy spracovania dát

Pre kvantifikáciu fenobarbitalu a ostatných analyzovaných látok bola použitá metóda kalibračnej závislosti, skonštruovaná z plôch pík, pri ktorej bola zostrojená vždy minimálne päťbodová kalibračná priamka. Každý bod predstavoval vyššiu koncentráciu než bod predchádzajúci. Kalibračné závislosti boli pre každý analyt zostrojené jednotlivo. Pomocou lineárnej závislosti a plochy pík bola vypočítaná koncentrácia pre každú analyzovanú látku. Limit detekcie (*LOD*) a limit kvantifikácie (*LOQ*) boli vypočítane z parametrov kalibračnej závislosti charakterizovanej lineárnou funkciou $y = ax + b$. K výpočtu bola použitá smerodajná odchýlka regresie $s_{y/x}$ a hodnota b úseku lineárnej regrese

$$LOD = \frac{3 s_{x/y}}{b} \quad (3.1)$$

$$LOQ = 3,3 LOD \quad (3.2)$$

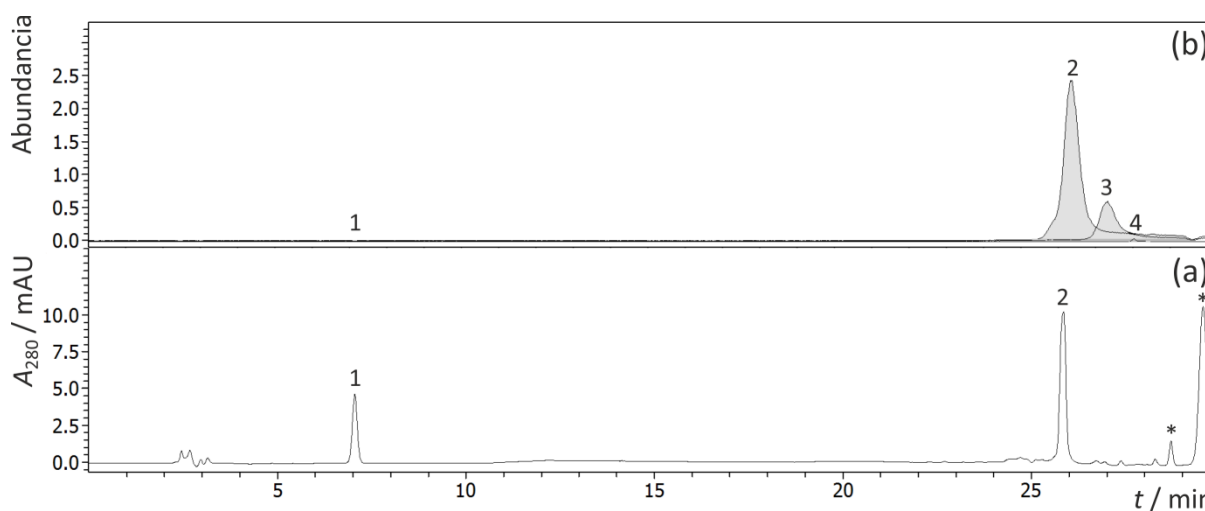
Grafy boli vytvorené pomocou programu OriginPro 9.0 (Microcal Software, USA). Výpočty boli vytvorené v programe Microsoft Excel 2020 (Microsoft Corporation, USA). Výsledky pri analýze HPLC-MS boli vyhodnotené pomocou softvéru Compass CompoundCrawler 3.0 (Bruker Daltonics, Nemecko).

4 Výsledky a diskusia

4.1 Analýza tablet Phenaemal

4.1.1 Separácia analytov

Pre separáciu analytov prípravku Phenaemal bola zvolená metóda podľa literatúry [61], ktorá bola následne optimalizovaná tak, aby bola kompatibilná pre RP-HPLC-UV a RP-HPLC-MS². Zmerané chromatogramy sú uvedené na obr. 4.1. Identifikácia analytov bola založená na analýze pomocou HR-MS² a porovnaním výsledných spektier so spektrami štandardov (pre väčšinu analytov dostupné) a zároveň s dátami v literatúre. Identifikované látky s príslušnými informáciami sú uvedené v tab. 4.1.



Obr. 4.1 Chromatogram vzorky Phenaemal (a) s UV detekciou pri vlnovej dĺžke 280 nm, (b) s hmotnostnou detekciou s ESI v negatívnom móde. Analyzované na kolóne SupelcosilTM LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm ; Supelco) gradientovou elúciou s mobilnou fázou obsahujúcou (A) acetonitril a (B) 0,02 M vodný roztok octanu amónneho s upraveným pH na hodnotu 3,5 pomocou kyseliny octovej (tab. 3.1) pri prietoku 1 ml min⁻¹. Identifikácia látok: (1) fenobarbital, (2) palmitová kyselina, (3) stearová kyselina, (4) α -linolenová kyselina. Píky označené (*) zodpovedajú nečistotám a pomocným látkam z tablety.

Tabuľka 4.1

Identifikované analyty z chromatogramu analýzy vzorky prípravku Phenaemal pomocou RP-HPLC-HRMS². Uvedené informácie sú: retenčný čas v HPLC, typ a m/z molekulového iónu, identifikácia látky a jej CASRN, referencia použitá ku konfirmácii identifikovanej látky. Podmienky analýzy uvedené pri obr. 4.1.

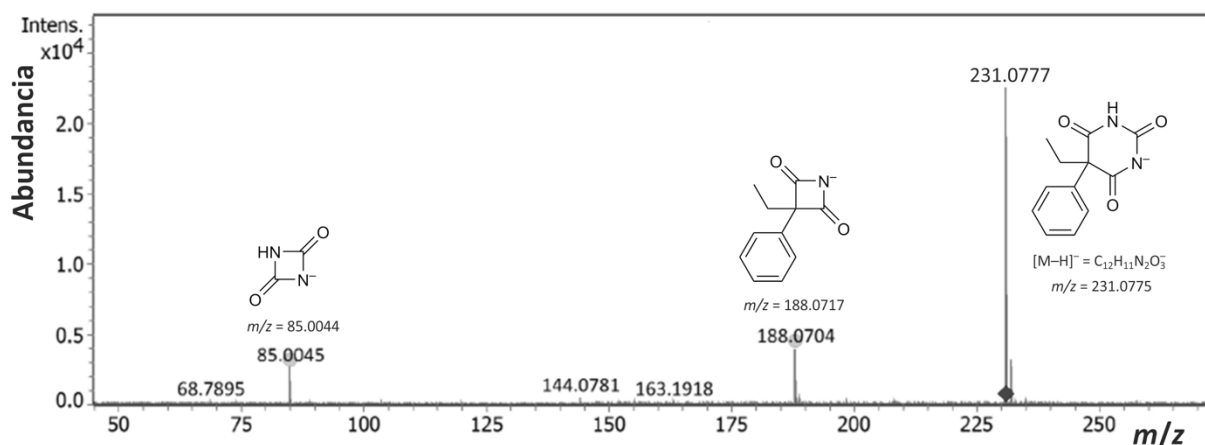
Číslo píku	t_r /min	Molekulový ión		Diagnostické ióny m/z	Identifikovaná látka, CASRN	Potvrdené podľa	
		typ	m/z			štandard	lit.
1	7,10	[M-H] ⁻	231,0780	188,0704, 163,1918, 144,0781, 85,0045, 68,7895	fenobarbital, 50-06-6	áno	[64]
2	24,60	[M-H] ⁻	255,2355	237,2227, 183,1386	kyselina palmitová, 57-10-3	nie	[65]
3	27,30	[M-H] ⁻	283,2664	265,2534	kyselina stearová, 57-11-4	nie	[66]
4	28,00	[M-H] ⁻	277,2160	259,2270	α -linolenová kyselina, 463-40-1	nie	[67]

Pomocou UV detekcie bolo možné identifikovať pík fenobarbitalu vo vzorke na základe porovnania retenčných časov píku ($t_r = 7,10$ min) s píkom štandardu fenobarbitalu. Následne bol fenobarbital identifikovaný aj pomocou RP-HPLC-MS².

Ostatné píky, ktorých retenčný čas bol 24 minút a viac boli identifikované až pomocou hmotnostnej detekcie na základe ich HR-MS² spektier. Takto boli identifikované látky: kyselina palmitová ($t_r = 24,60$ min), kyselina stearová ($t_r = 27,30$ min) a α -linolenová kyselina ($t_r = 28,00$ min). Tieto látky sa používajú ako pomocné a poťahové látky pri výrobe tabliet. Vzorka obsahovala takisto neurčené látky, ktoré neboli detailne identifikované, keďže ide o pomocné látky v tabletách alebo možné nečistoty vo vzorke. Takisto látky vykazovali väčšie m/z ako fenobarbital, tým pádom sa nemohlo jednať o žiadny z jeho degradačných produktov.

4.1.2 Hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením

Pre všetky prítomné nájdené látky boli zmerané tandemové hmotnostné spektra s vysokým rozlíšením pre identifikáciu látok. Zmerané HR-MS² spektrum fenobarbitalu (obr. 4.2) bolo porovnané so spektrom štandardu a aj s literatúrou [64]. Na obr. 4.2 sú uvedené návrhy štruktúr produktových iónov.



Obr. 4.2 ESI-MS² spektrum produktových iónov fenobarbitálu (prekurzorový ión je označený diamantom).

4.1.3 Kvantifikácia vybraných analytov

Fenobarbital bol kvantifikovaný za použitia metódy kalibračnej závislosti štandardov. Kalibrácia bola sedembodová, pričom každý bod zodpovedal inej koncentrácii (rastúci charakter), vzhľadom na lineárny dynamický rozsah. Kalibračná závislosť vychádzala z plochy pík. V tab. 4.2 sú údaje o kalibračnej závislosti pre fenobarbital, ktorého kalibrácia bola založená na veľkosti pík zmeraných na RP-HPLC-UV. Fenobarbital bol kvantifikovaný v troch tabletách prípravku, vždy každá zvlášť. Stanovený obsah fenobarbitálu v tabletách prípravku bol $112,88 \pm 2,80$ mg [1,13%; 3] v tablete. Tablety prípravku obsahovali o 12,88% viac fenobarbitálu ako bolo deklarované.

Tabuľka 4.2

Parametre kalibračných závislosti vybraných analytov v prípravku Phenaemal na základe plochy pík pomocou HPLC-UV.

Zlúčenina	fenobarbital
vlnová dĺžka detekcie / nm	250
lineárny dynamický rozsah/ mg dm ⁻³	100–2000
smernice / mAU min mg ⁻¹ dm ³	312±10
úsek/ mAU min	– ^a
R ²	0,9995
limit kvantifikácie/ mg dm ⁻³	199
limit detekcie/ mg dm ⁻³	60

^a Nemá štatistický význam, je nulový

4.2 Analýza dražé Sedobelin

4.2.1 Separácia analytov

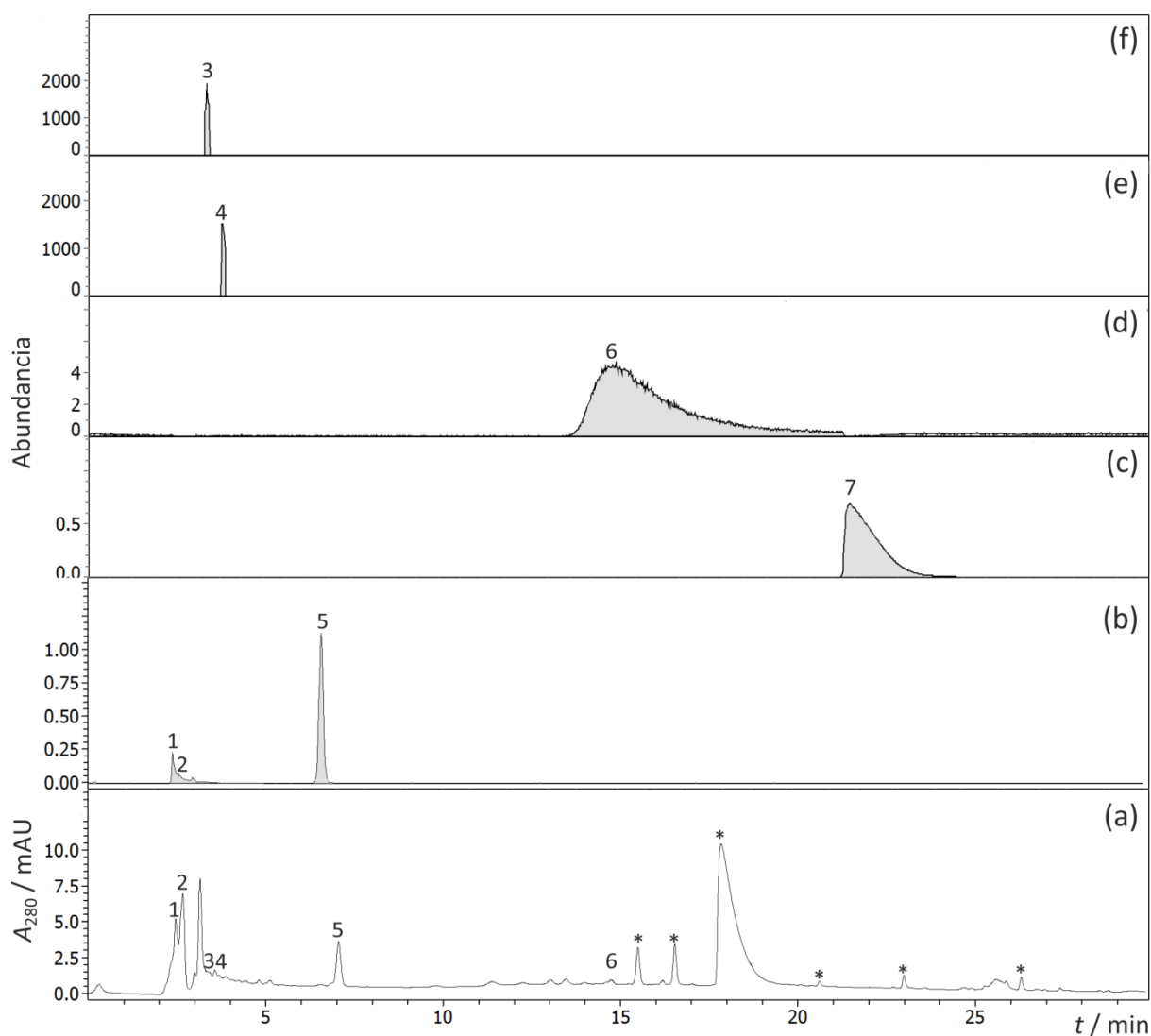
Vzorka prípravku Sedobelin bola analyzovaná pomocou RP-HPLC-UV a následne RP-HPLC-MS² metódou uvedenou v odd. 4.1.1. Chromatogramy z týchto analýz sú uvedené na obr. 4.3 (na nasledujúcej strane). Identifikácia analytov bola založená na analýze pomocou HRMS² a porovnaním výsledných spektier so spektrami štandardov (pre väčšinu analytov dostupné) a zároveň s dátami v literatúre. Identifikované látky spolu s príslušnými informáciami sú uvedené v tab. 4.3.

Tabuľka 4.3

Identifikované analyty z chromatogramu analýzy vzorky prípravku Sedobelin pomocou RP-HPLC-HRMS². Uvedené informácie sú: retenčný čas v HPLC, typ a m/z molekulového iónu, identifikácia látky a jej CASRN, referencia použitá ku konfirmácii identifikovanej látky. Podmienky analýzy uvedené pri obr. 4.3.

Číslo píku	t_r /min	Molekulový ión		Diagnostické ióny m/z	Identifikovaná látka, CASRN	Potvrdené podľa	
		typ	m/z			štandard	lit.
1	2,40	[M-H] ⁻	191,0565	171,0280, 127,0423, 109,0303, 93,0348, 85,0297	chinová kyselina, 77-95-2	áno	[69]
2	2,50	[M-H] ⁻	341,1093	149,0459, 113,0247, 89,0248, 59,0151	sacharóza, 57-50-1	áno	[70]
3	3,20	[M+Na] ⁺	617,1281	– ^a	prokyanidin, 20347-71-1	nie	[71]
4	3,60	[M+Na] ⁺	487,0822	– ^a	hyperosid, 482-36- 0	nie	[72]
5	6,70	[M-H] ⁻	231,0780		fenobarbital, 50- 06-6	áno	[64]
6	11,80	[M+H] ⁺	290,1729	260,1619, 142,1225, 124,1122, 93,0702	atropín, 51-55-8	áno	[73]
7	17,80	[M+H] ⁺	340,1527	340,1542, 324,1228, 296,1275, 202,8653, 171,0681, 123,0443	papaverin, 58-74-2	áno	[4]

^a Kvôli nízkej koncentrácii analytov vo vzorke nebolo možné získať MS²



Obr. 4.3 Chromatogram vzorky Sedobeli (a) s UV detekciou pri vlnovej dĺžke 280 nm, (b) s hmotnostnou detekciou s ESI v negatívnom móde (zobrazenie EIC), (c) s hmotnostnou detekciou s ESI v pozitívnom móde, zobrazenie pri $m/z = 340,1527$, (d) s hmotnostnou detekciou s ESI v pozitívnom móde, zobrazenie pri $m/z = 290,1729$, (e) s hmotnostnou detekciou s ESI v pozitívnom móde, zobrazenie pri $m/z = 487,0822$, (f) s hmotnostnou detekciou s ESI v pozitívnom móde, zobrazenie pri $m/z = 617,1281$. Analyzované na kolóne Supelcosil™ LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm; Supelco) gradientovou elúciou s mobilnou fázou obsahujúcou (A) acetonitril a (B) 0,02 M vodný roztok octanu amónneho s upraveným pH na hodnotu 3,5 pomocou kyseliny octovej (tab. 3.1) pri prietoku 1 ml min⁻¹. Identifikácia látok: (1) chinová kyselina, (2) sacharóza, (3) prokyanidin, (4) hyperosid, (5) fenobarbital, (6) atropín, (7) papaverin. Píky označené (*) zodpovedajú nečistotám a pomocným látkam z dražé.

Vo vzorke prípravku Sedobelin bol pomocou UV detekcie identifikovaný pík fenobarbitalu ($t_r = 6,70$ min) podľa porovnania retenčných časov so štandardom fenobarbitalu. Pomocou RP-HPLC-MS² sa následnou analýzou podarilo znovu dokázať toto tvrdenie.

Po analýze pomocou hmotnostnej detekcie v negatívnom a pozitívnom móde boli identifikované látky na základe ich spektier: chinová kyselina ($t_r = 2,40$ min), sacharóza ($t_r = 2,50$ min), prokyanidin ($t_r = 3,20$ min), hyperosid ($t_r = 3,60$ min), atropín ($t_r = 11,80$ min) a papaverin ($t_r = 17,80$ min). V tomto prípade takisto ako aj pri predchádzajúcom prípravku neboli nájdené žiadne degradačné produkty fenobarbitalu, avšak podarilo sa identifikovať ostatné deklarované látky. Prokyanidin a hyperosid sú látky nachádzajúce sa v listoch hlohu spolu s chinovou kyselinou, ako je uvedené aj v publikácii [68]. Sacharóza sa bežne používa práve pri výrobe dražé. Vzorok obsahovala takisto neurčené látky, ktoré neboli detailne identifikované, keďže ide o pomocné látky v dražé. Tieto látky mali väčšie m/z ako fenobarbital, teda nemohlo ísť o žiadny z jeho degradačných produktov.

4.2.2 Kvantifikácia vybraných analytov

Vybrané analyty, fenobarbital a papaverin boli kvantifikované použitím metódy kalibračnej závislosti štandardov. Kalibrácia bola najmenej päťbodová, pričom každý bod zodpovedal inej koncentrácii (rastúci charakter), vzhľadom na lineárny dynamický rozsah. V tab. 4.4 sú údaje o kalibračnej závislosti pre fenobarbital a papaverin, ktorých kalibrácia bola založená na veľkosti píkov zmeraných pomocou HPLC-UV. Výsledky kvantifikácie pre fenobarbital a papaverin sú uvedené v tab. 4.5.

Tabuľka 4.4

Parametre kalibračných závislostí vybraných analytov v prípravku Sedobelin na základe plochy píkov pomocou HPLC-UV.

Zlúčenina	fenobarbital	papaverin
vlnová dĺžka detekcie / nm	250	250
lineárny dynamický rozsah/ mg dm ⁻³	100–2000	100–1000
smernice / mAU min mg ⁻¹ dm ³	313±10,2	13000±1500
úsek/ mAU min	– ^a	– ^a
R^2	0,9995	0,9984
limit kvantifikácie/ mg dm ⁻³	199	280
limit detekcie/ mg dm ⁻³	60	85

^a Nemá štatistický význam, je nulový

Tabuľka 4.5

Výsledky kvantifikácie vybraných analytov prípravku Sedobelin pomocou HPLC-UV.

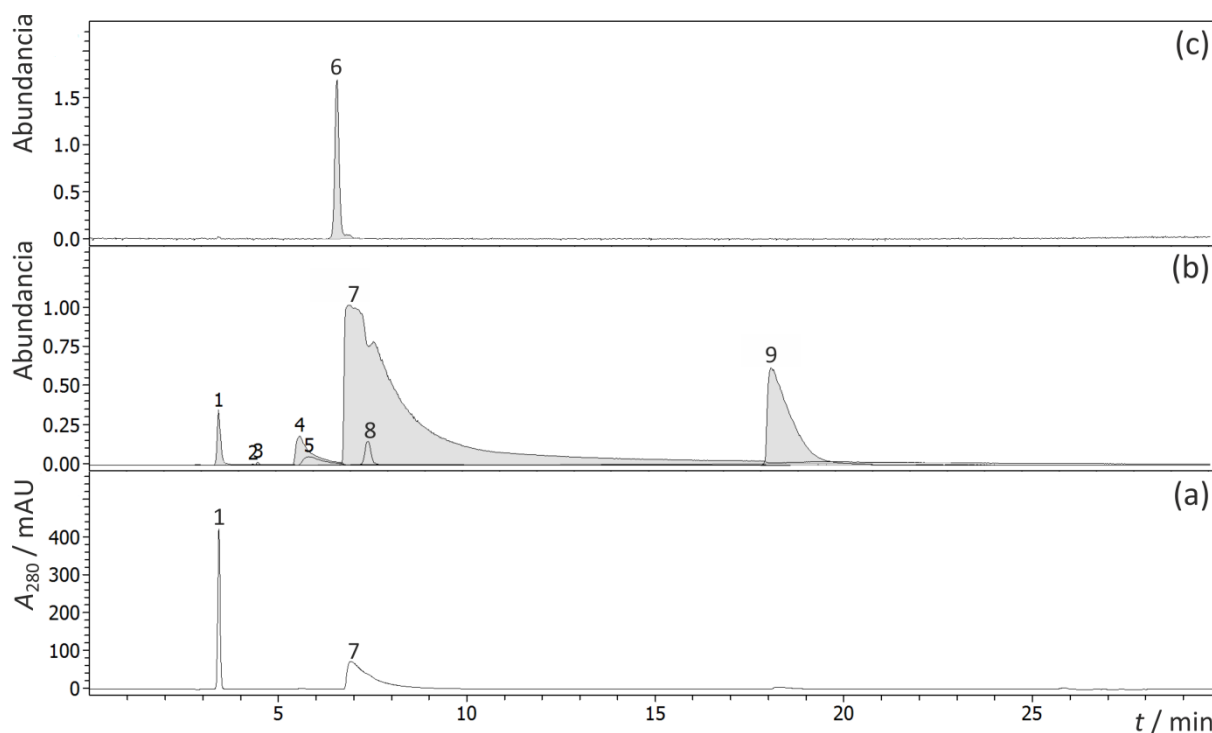
Zlúčenina	fenobarbital	papaverin
Deklarovaný obsah v 1 dražé / mg	50,0	20,0
Kvantifikovaný obsah v dražé / mg	73,9	18,7
Kvantifikovaný obsah v dražé vzhľadom k deklarovanej / %	147,9	93,3

Analyzované dražé prípravku Sedobelin obsahovalo o 47,78% viac fenobarbitalu ako bolo deklarované. Možným vysvetlením by mohla byť chyba pri výrobe prípravku, keďže papaverinu je len o 6,75% menej ako bolo deklarované výrobcom. V tomto prípade je fenobarbitálu nielen viac skoro o polovicu, ale aj po 43 rokoch od vyrobenia nezdegradoval.

4.3 Analýza čapíkov Spasmoveralgin

4.3.1 Separácia analytov

Vzorka prípravku Spasmoveralgin bola analyzovaná pomocou RP-HPLC-UV a následne RP-HPLC-MS² metódou uvedenou v odd. 4.1.1. Chromatogramy z týchto analýz sú uvedené na obr. 4.4. Identifikácia analytov bola založená na analýze pomocou HRMS² a porovnaním výsledných spektier so spektrami štandardov (pre väčšinu analytov dostupné) a zároveň s dátami v literatúre. V tab. 4.6 sú uvedené identifikované látky s príslušnými informáciami.



Obr. 4.4 Chromatogram vzorky Spasmoveralgin (a) s UV detekciou pri vlnovej dĺžke 280 nm, (b) s hmotnostnou detekciou s ESI v pozitívnom móde, (c) s hmotnostnou detekciou s ESI v negatívnom móde (zobrazenie EIC). Analyzované na kolóne Supelcosil™ LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm ; Supelco) gradientovou elúciou s mobilnou fázou obsahujúcou (A) acetonitril a (B) 0,02 M vodný roztok octanu amónneho s upraveným pH na hodnotu 3,5 pomocou kyseliny octovej (tab. 3.1) pri prietoku 1 ml min^{-1} . Identifikácia látok: (1) kofeín, (2) 3,4-methylendioxyamfetamin, (3) amid adipovej kyseliny, (4) kodeín, (5) efedrín, (6) fenobarbital, (7) aminofenazon, (8) bromisoval, (9) papaverin.

Tabuľka 4.6

Identifikované analyty z chromatogramu analýzy vzorky prípravku Spasmoveralgin pomocou RP-HPLC-HRMS². Uvedené informácie sú: retenčný čas v HPLC, typ a *m/z* molekulového iónu, identifikácia látky a jej CASRN, referencia použitá ku konfirmácii identifikovanej látky. Podmienky analýzy uvedené pri obr. 4.4.

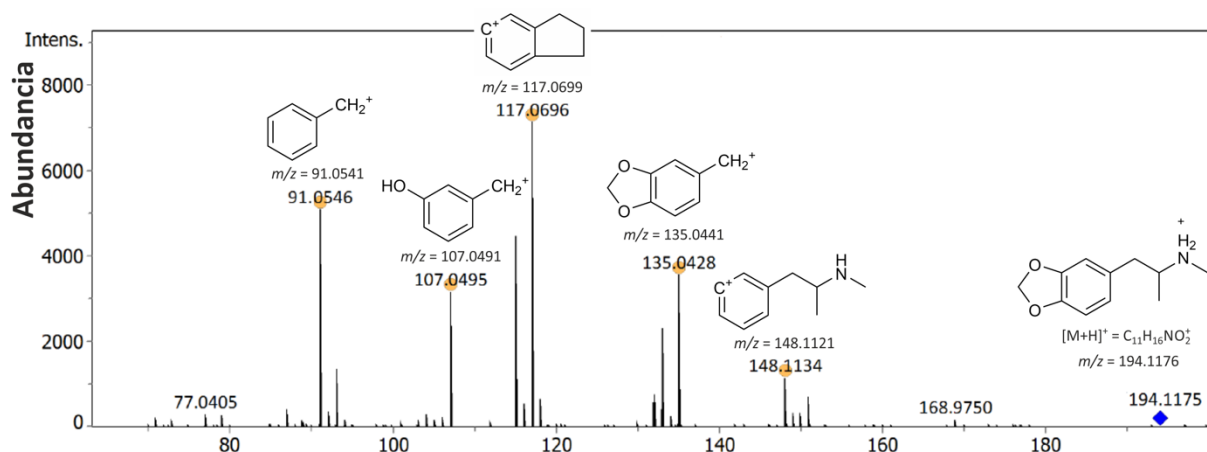
Číslo píku	<i>t_r</i> /min	Molekulový ión		Diagnostické ióny <i>m/z</i>	Identifikovaná látka, CASRN	Potvrdené podľa	
		typ	<i>m/z</i>			štandard	lit.
1	3,50	[M+H] ⁺	195,0879	138,0660, 123,0426, 110,0713, 83,0605, 69,0447	kofeín, 58-08-2	áno	[75]
2	4,40	[M+H] ⁺	194,1180	148,1134, 135,0428, 117,0696, 107,0495, 91,0546	3,4- methylenedioxyamfetamin, 42542-10-9	áno	[76]
3	4,50	[M+H] ⁺	145,0973	102,0917, 85,0650, 61,0397, 57,0698	amid adipovej kyseliny	nie	[77]
4	5,70	[M+H] ⁺	300,1601	282,1490, 267,1242, 251,1078, 243,1017, 225,0910, 215,10654, 199,0753, 183,0801	kodeín, 628-94-4	nie	[78]
5	5,90	[M+H] ⁺	166,1228	148,1117, 133,0881, 115,0542, 104,0621, 91,0544, 79,0544	efedrín, 51-43-4	áno	[79]
6	6,70	[M-H] ⁻	231,07774	188,0704, 163,1918, 144,0781, 85,0045, 68,7895	fenobarbital, 50-06-6	áno	[64]
7	7,00	[M+H] ⁺	232,1456	216,1132, 159,0914, 123,0554, 111,0918, 97,0761, 70,0652	aminofenazon, 628-94-4	áno	[80]
8	7,50	[M+H] ⁺	223,0000	180,0016, 134,9080, 119,9442, 106,9491, 101,0835, 86,0602, 69,0335	bromisoval, 496-67-3	nie	[81]
9	18,30	[M+H] ⁺	340,1531	324,1218, 310,0777, 296,1273, 202,0850, 171,0672, 123,0442, 87,0435	papaverin, 58-74-2	áno	[4]

Vo vzorke prípravku Spasmoveralgin sa nepodarilo identifikovať pík fenobarbitalu pri analýze pomocou UV detekcie. Prípravok obsahoval látky, ktorých väčšina mala podobný retenčný čas, ako je vidieť aj na obr. 4.4. Keďže výrobcom boli uvedené ďalšie látky, štandardy týchto látok boli analyzované rovnakou metódou ako vzorka. Následne boli chromatogramy štandardov a vzorky porovnané. Podľa rovnakých retenčných časov bol identifikovaný prvý pík ako kofeín ($t_r = 3,50$ min). Kofeín bol overený aj pomocou hmotnostnej detekcie.

Ostatné látky boli identifikované na základe ich spektier, ktoré boli obsiahnuté pomocou hmotnostnej detekcie v negatívnom a pozitívnom móde. Identifikované látky boli: 3,4-methylendioxyamfetamin ($t_r = 4,40$ min), amid adipovej kyseliny ($t_r = 4,50$ min), kodeín ($t_r = 5,70$ min), efedrín ($t_r = 5,90$ min), fenobarbital ($t_r = 6,70$ min), aminofenazon ($t_r = 7,00$ min), bromisoval ($t_r = 7,50$ min) a papaverin ($t_r = 18,30$ min). V tomto prípade sa podarilo identifikovať všetky nájdené látky. Deklarovaný atropín nebol nájdený v prípravku. Ani jeden pík nezodpovedal degradačnému produktu fenobarbitalu. 3,4-Methylendioxyamfetamin spolu s amidom adipovej kyseliny sú látky, ktoré neboli deklarované výrobcom. Nalez 3,4-methylendioxyamfetaminu, takisto známeho ako extáza, by mohol byť vysvetlený ako degradačný produkt efedrínu, podľa publikácie [74]. Amid adipovej kyseliny predstavuje pomocnú látku pri výrobe čapíkov. Ostatné identifikované látky zodpovedali látkam deklaroványm výrobcom.

4.3.2 Hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením

Potvrdenie prítomnosti 3,4-methylendioxyamfetaminu bolo hlavne podľa porovnania spektra s literatúrou [76], ale aj podľa overenia so štandardom. Priložené HR-MS² spektrum 3,4-methylen-dioxyamfetaminu je na obr. 4.5. Na obrázku sú uvedené návrhy sturktúr produktových iónov, ktoré takisto súhlasia s literatúrou.



Obř. 4.5 ESI⁺-MS² spektrum produktovŕch iŕonov 3,4-methylenedioxyamfetaminu (prekurzorovŕ iŕon je označenŕ diamantom).

4.3.3 Kvantifikácia vybranŕch analytov

Vybranŕe analyty pre pripravok Spasmoveralgin boli kvantifikované pouŕitŕm metŕody kalibračnej závislosti ŕtandardov. Kalibrácia bola najmenej pŕtŕbodovŕ, pričoŕm kaŕdŕy bod zodpovedal inej koncentrácii (rastŕci charakter), vzhľadom na lineárny dynamickŕy rozsah. V tab. 4.7 sŕ ũdaje o kalibračnej závislosti, ktorŕho kalibrácia bola zaloŕenŕ na veľkosti pŕkov zmeranŕch na HPLC-UV. Kvantifikácia pre aminofenazon nebola možnŕa pomocou HPLC (kvŕli rozliatemu pŕku), preto bola zvolenŕa spektrofotometrickŕa metŕoda zaloŕenŕa na reakcii s fosfomolybdenovou kyselinou. Vŕsledky kvantifikácie sŕ uvedenŕe v tab. 4.8.

Tabuľka 4.7

Parametre kalibračnŕch závislostŕi pre fenobarbital, papaverin a kofeŕn v pripravku Spasmoveralgin na zŕklade plochy pŕkov pomocou HPLC-UV. A aminofenazonu pomocou spektrofotometrickej metŕody.

Zlŕučenina	fenobarbital	papaverin	kofeŕn	aminofenazon
vlnovŕ dŕlŕka detekcie / nm	250	250	280	630
lineárny dynamickŕy rozsah/ mg dm ⁻³	100–2000	100–1000	100–1000	10–100
smernice / mAU min mg ⁻¹ dm ³	313±10	13000±1500	3500±270	(4,5±0,17)×10 ⁻³
ŕsek/ mAU min	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a
R ²	0,9995	0,9984	0,9979	0,9931
limit kvantifikácie/ mg dm ⁻³	199	280	195	97
limit detekcie/ mg dm ⁻³	60	85	59	29

^a Nemŕ ŕtatistickŕvŕznam, je nulovŕ

Tabuľka 4.8

Výsledky kvantifikácie vybraných analytov prípravku Spasmoveralgin pomocou HPLC-UV a spektrometru pri aminofenazone.

Zlúčenina	fenobarbital	papaverin	kofeín	aminofenazon
Deklarovaný obsah v 1 čapíku / mg	25,0	25,0	50,0	200,0
Kvantifikovaný obsah v čapíku / mg	13,5	32,4	48,4	114,4
Kvantifikovaný obsah v čapíku vzhľadom k deklarovaneému / %	54,0	129,7	96,9	57,2

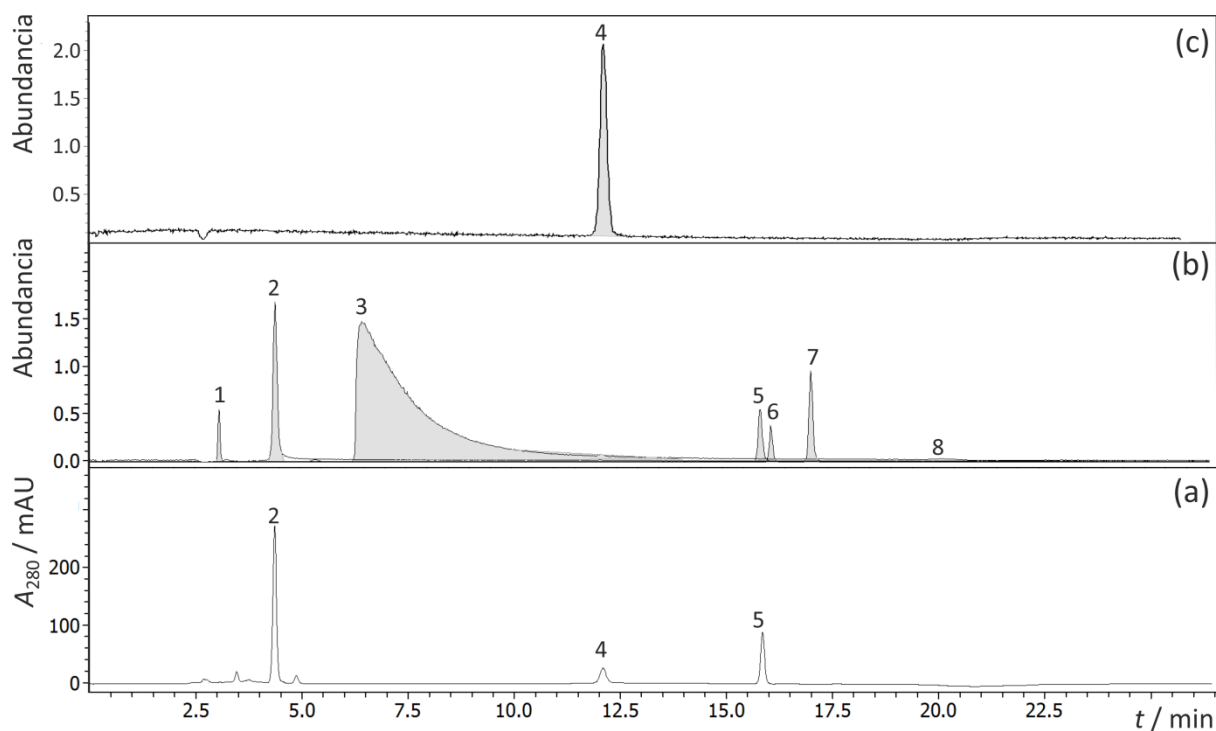
Analyzovaný čapík prípravku Spasmoveralgin obsahoval o 46,00% fenobarbitalu menej ako bolo deklarované. Keďže v prípravku neboli nájdené žiadne degradačné produkty fenobarbitalu mohlo sa jednať o chybu pri výrobe. Vysvetlením takisto môže byť použitá lieková forma, keďže pri výrobe čapíkov často dochádza k nehomogenite obsahu účinnej látky v jednotlivých kusoch liekovej formy.

Takisto prípravok obsahoval o 3,13% kofeínu a 42,80% aminofenazonu menej ako bolo deklarované. Zároveň obsahoval o 29,72% papaverinu viac ako bolo deklarované.

4.4 Analýza roztoku Sklerophyllin

4.4.1 Separácia analytov

Pre separáciu analytov prípravku Sklerophyllin bola zvolená metóda podľa literatúry [63], ktorá bola následne optimalizovaná tak, aby bola kompatibilná pre RP-HPLC-UV a RP-HPLC-MS². Získané chromatogramy z týchto analýz sú uvedené na obr. 4.6. Identifikácia analytov bola založená na analýze pomocou HRMS² a porovnaním výsledných spektier so spektrami štandardov (pre väčšinu analytov dostupné) a zároveň s dátami v literatúre. V tab. 4.9 sú uvedené príslušné informácie o identifikácii látok.



Obr. 4.6 Chromatogram vzorky Sklerophyllin (a) s UV detekciou pri vlnovej dĺžke 280 nm, (b) s hmotnostnou detekciou s ESI v pozitívnom móde, (c) s hmotnostnou detekciou s ESI v negatívnom móde. Analyzované na kolóne Supelcosil™ LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm ; Supelco) gradientovou elúciou s mobilnou fázou obsahujúcou (A) metanol a (B) 0,010 M vodný roztok octanu amónneho s upraveným pH na hodnotu 2,5 pomocou kyseliny octovej (tab. 3.2) pri prietoku 1 ml min^{-1} . Identifikácia látok: (1) 3-aminopentánová kyselina, (2) theofylin, (3) acetyl- β -methylcholin, (4) fenobarbital, (5) ethylparaben, (6) farbivo, (7) feneturid, (8) *O*-acetyl- β -methylcholin.

Tabuľka 4.9

Identifikované analyty z chromatogramu analýzy vzorky prípravku Sklerophyllin pomocou RP-HPLC-HRMS². Uvedené informácie sú: retenčný čas v HPLC, typ a m/z molekulového iónu, identifikácia látky a jej CASRN, referencia použitá ku konfirmácii identifikovanej látky. Podmienky analýzy uvedené pri obr. 4.6.

Číslo píku	t_r /min	Molekulový ión		Diagnostické ióny m/z	Identifikovaná látka, CASRN	Potvrdené podľa	
		typ	m/z			štandard	lit.
1	3,10	[M+H] ⁺	118,0860	70,0649, 58,0650	3-aminopentánová kyselina 18664-78-3	nie	n/a
2	4,40	[M-H] ⁻	185,0636	179,0567, 164,0340, 135,0070, 122,0359, 107,0125, 94,0414, 79,0177, 65,9993	theofylin, 58-55-9	áno	[83]
3	6,50	[M+H] ⁺	118,1213	62,0806, 59,0486	β -methylcholin, 7562-87-0	nie	[84]
4	12,20	[M-H] ⁻	231,07774	188,0704, 163,1918, 144,0781, 85,0045, 68,7895	fenobarbital, 50-06-6	áno	[64]
5	15,90	[M+H] ⁺	167,0737	139,0418, 121,0337, 105,0467, 95,0510, 77,0400, 65,0398	ethylparaben, 120-47-8	áno	[85]
6	16,20	[M+H] ⁺	547,1791	396,0577, 299,0739, 164,1077, 87,0442	farbivo, n/a	n/a	n/a
7	17,10	[M+H] ⁺	207,1168	119,0878, 91,0561, 61,0406	feneturid, 90-49-3	nie	n/a
8	20,00	[M+H] ⁺	160,1333	101,604, 85,0886	O-acetyl- β -methylcholin bromid, [333-31-3]	áno	[84]

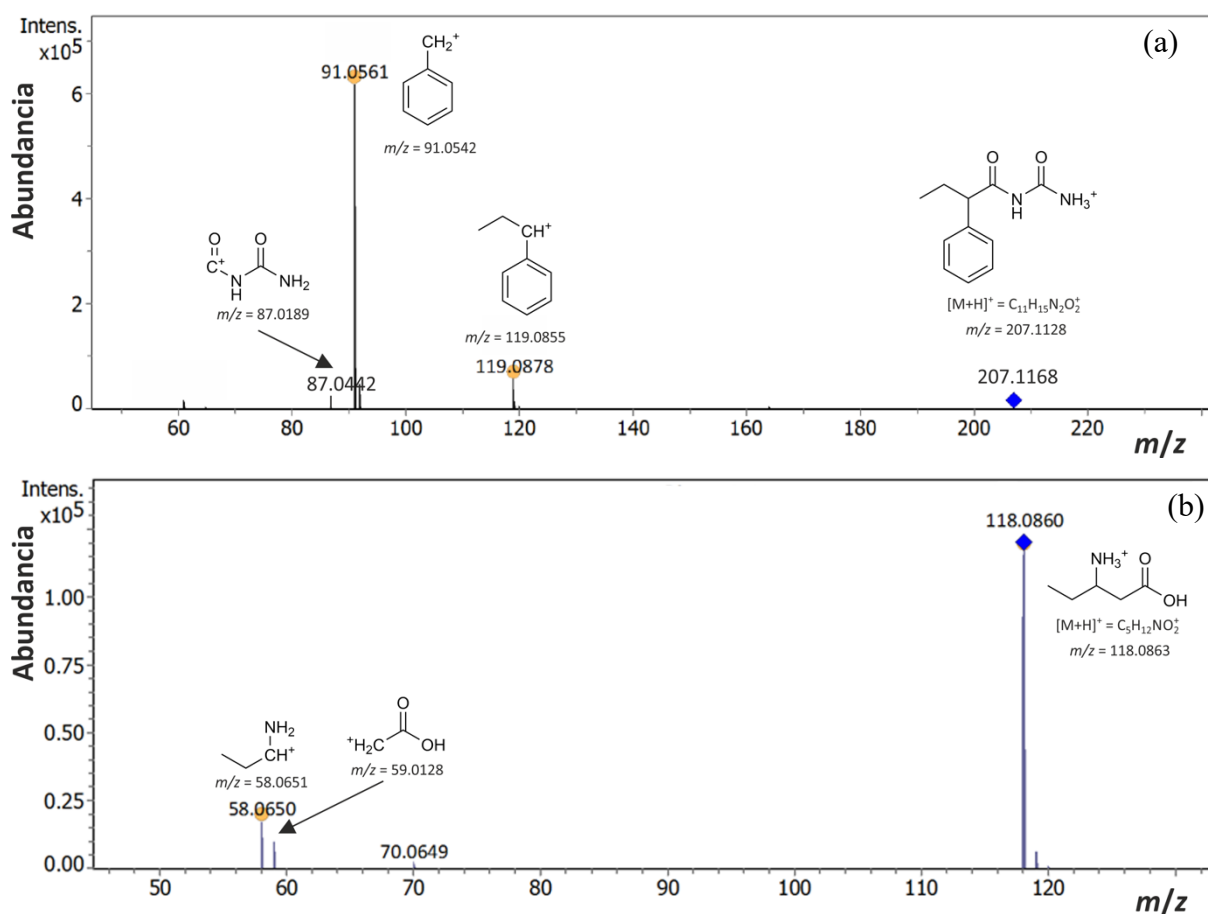
Najskôr bola vzorka prípravku Sklerophyllin analyzovaná pomocou UV detekcie. Chromatogram vzorky bol porovnaný s chromatogramom štandardov. Štandardy boli zvolené podľa deklarovaných látok výrobcom. Po následnom porovnaní bol identifikovaný pík 2 ako theofylin ($t_r = 4,40$ min) a pík 4 ako fenobarbital ($t_r = 12,20$ min). Následnou analýzou pomocou hmotnostnej detekcie bola overená presnosť tejto identifikácie.

Pomocou hmotnostnej detekcie v pozitívnom a negatívnom móde boli identifikované aj ostatné látky nachádzajúce sa vo vzorke, na základe ich spektier: 3-aminopentánová kyselina ($t_r = 3,10$ min), β -methylcholin ($t_r = 6,50$ min), ethylparaben ($t_r = 15,90$ min), farbivo ($t_r = 16,20$ min), feneturid ($t_r = 17,10$ min), O-acetyl- β -methylcholin bromid ($t_r = 20,00$ min). Všetky z

nájdeneých látok boli identifikované. Bol identifikovaný degradačný produkt fenobarbitalu – feneturid a pravdepodobný degradačný produkt 3-aminopentánová kyselina. V odstavci 2.3.6, alebo v publikácii [40] je feneturid potvrdený ako jeden z hlavných degradačných produktov fenobarbitalu. Degradačným produktom zodpovedá aj kvantifikovaný obsah fenobarbitalu, ktorý bol o 12,59% menší ako pri deklarovanom obsahu. K degradácii mohlo takisto dôjsť v dôsledku slabo kyslého prostredia prípravku. Nameraná hodnota pH bola 5,34. Zelené farbivo, ktoré bolo definované výrobcom ako „chlorophyllinpurin“, nebolo bližšie identifikované. Pravdepodobne však ide o jeden z mnohých derivátov chlorofylu: o chlorofylin (CASRN [19660-77-6]), jeho komplex s horečnatými kationmi – chlorofylin A (CASRN [15611-43-5]), alebo o jeho degradačný produkt – feoforbide a5 (CASRN [15664-29-6]). Podľa publikácie Kepharta [82] viacero derivátov chlorofylu môže vzniknúť z rastlinného materiálu pri príprave farbív na báze chlorofylu. Ethylparaben sa používa podľa liekopisov ako konzervačná látka vo farmaceutickej výrobe. β -methylcholin môže byť pravdepodobne vysvetlený ako nečistota z produkcie O-acetyl- β -methylcholin bromidu.

4.4.2 Hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením

HR-MS² spektrum feneturidu nebolo možné potvrdiť ani podľa štandardu a ani podľa literatúry, preto je na obr. 4.7a uvedené namerané spektrum, ktoré uvedené návrhy štruktúr produktových iónov. Situácia bola rovnaká aj pri druhom pravdepodobnom degradačnom produkte fenobarbitalu – 3-aminopentanovej kyseline, obr. 4.7b.



Obr. 4.7 HR-MS² spektra degradačných produktov fenobarbitalu (prekurzorový ión je označený diamantom): (a) ESI⁺-MS² spektrum produktových iónov feneturidu, (b) ESI⁺-MS² spektrum produktových iónov 3-aminopentanovej kyseliny.

4.4.3 Kvantifikácia vybraných analytov

Vybrané analyty pre prípravok Sklerophyllin boli kvantifikované použitím metódy kalibračnej závislosti štandardov. Kalibrácia bola najmenej päťbodová, pričom každý bod zodpovedal inej koncentrácii (rastúci charakter), vzhľadom na lineárny dynamický rozsah. V tab. 4.10 sú údaje o kalibračnej závislosti pre fenobarbital, ethylparaben a theofylin, ktorých kalibrácia bola založená na veľkosti píkov zmeraných pomocou HPLC-UV. Výsledky kvantifikácie pomocou RP-HPLC-UV sú uvedené v tab. 4.11. Kvantifikácia nájdených iónov prebiehala na kapilárnej zónovej elektroforéze. Výsledky kvantifikácie pomocou CZE sú uvedené v tab. 4.12

Tabuľka 4.10

Parametre kalibračných závislostí vybraných analytov v prípravku Sklerophyllin na základe plochy píkovej pomocou HPLC-UV.

Zlúčenina	fenobarbital	ethylparaben	theofylin
vlnová dĺžka detekcie / nm	250	280	280
lineárny dynamický rozsah/ mg dm ⁻³	300–2000	25–1000	100–2000
smernice / mAU min mg ⁻¹ dm ³	110±19	3190±87	670±25
úsek/ mAU min	– ^a	– ^a	– ^a
R ²	0,9958	0,9997	0,9991
limit kvantifikácie/ mg dm ⁻³	795	87	226
limit detekcie/ mg dm ⁻³	241	27	69

^a Nemá štatistický význam, je nulový

Tabuľka 4.11

Výsledky kvantifikácie vybraných analytov prípravku Spasmoveralgin pomocou HPLC-UV.

Zlúčenina	fenobarbital	theofylin	ethylparaben
Deklarovaný obsah v 200 ml roztoku / mg	200	400	– ^a
Kvantifikovaný obsah v 200 ml roztoku / mg	174,8	434,6	68,34
Kvantifikovaný obsah v 200 ml roztoku vzhľadom k deklarovaneému / %	87,41	108,4	–

^a Nie je výrobcom definovaný.

Tabuľka 4.12

Výsledky kvantifikácie vybraných analytov prípravku prípravku Sklerophyllin pomocou CZE.

Ión	Br ⁻	I ⁻	Mg ²⁺	Na ⁺
Deklarovaný obsah v 200 ml roztoku / mg	50	200	– ^a	– ^a
Kvantifikovaný obsah v 200 ml roztoku / mg	57,9	180,2	2,72	252,4
Kvantifikovaný obsah 200 ml roztoku vzhľadom k deklarovaneému / %	115,8	90,1	–	–

^a Nie je výrobcom definovaný.

Analyzovaný roztok prípravku Sklerophyllin obsahoval o 12,59% fenobarbitalu menej. Za tento fakt môžu zodpovedať nájdené degradačné produkty: feneturid a 3-aminopentanová kyselina. Obsah theofylínu bol o 8,66% väčší ako bolo deklarované. Ethylparaben bol kvantifikovaný a obsah bol určený na 68,34 mg v 200 ml roztoku. Ethylparaben sa vo farmáciách používa ako konzervačná látka. Obvykle sa podľa liekopisov parabeny dávajú v koncentrácii 1,0–1,5 g do litru roztoku. V tomto prípade obsah ethylparabenu nebol deklarován.

Deklarovaný obsah acetyl-β-metylcholin bromidu bol 300 mg v 200 ml roztoku, čo zodpovedá 100 mg v 200 ml roztoku samostatných aniónov bromidu. Kvantifikovaný obsah

aniónov bromidu teda zodpovedal 15,60% viac, než bolo deklarované. Zdrojom stanovených horečnatých katiónov môže byť práve zelené farbivo použité pri výrobe prípravku (viac rozoberané v odst. 4.4.1). Kvantifikované prítomné sodné ióny pochádzajú hlavne z deklarovaneho jodidu sodného, ale takisto môžu pochádzať z pomocných látok použitých v prípravku, ktoré neboli uvedené výrobcom. Z toho dôvodu boli pre porovnanie deklarovaneho a kvantifikovaného obsahu jodidu sodného použité anióny jodidu. Analyzovaného jodidu sodného bolo o 9,90% menej ako bolo deklarovaneho.

5 Záver

Boli analyzované štyri historické pozostatky liečiv s obsahom fenobarbitalu. Upravené a zoptimalizované metódy boli kompatibilné ako pre HPLC-UV takisto aj pre HPLC-MS. Pre prípravky Phenaemal, Sedobelin a Spasmoveralgin bola použitá rovnaká metóda. V týchto prípravkoch neboli nájdené žiadne degradačné produkty fenobarbitalu. Druhá použitá metóda bola použitá pre analýzu prípravku Sklerophyllin. Po analýze tejto vzorky pomocou HPLC-MS boli identifikované dva degradačné produkty fenobarbitalu: feneturid a 3-amino-pentánová kyselina. Vo všetkých analyzovaných prípravkoch boli nájdené a identifikované deklarované látky. Takisto boli identifikované aj ostatné nájdené látky.

Vybrané látky z prípravkov boli následne kvantifikované pomocou HPLC-UV. Sklerophyllin, v ktorom boli identifikované dva degradačné produkty fenobarbitalu bol po kvantifikácii určený jeho obsah o 12,5 % nižší, oproti tomu ako bol deklarovaný. V prípravku Spasmoveralgin na stanovenie aminofenazonu bola použitá spektrometrická metóda a v prípravku Sklerophyllin bola na stanovenie deklarovaného jodidu sodného a ostatných iónov použitá metóda CZE.

V Sklerophylline ako v jedinom prípravku boli identifikované degradačné produkty fenobarbitalu. Išlo o najstarší z analyzovaných prípravkov. Jeho liekovou formou bol roztok. Fenobarbital je stabilný po mnohé dekády v tuhých liekových formách, pričom v kvapalných je degradovaný.

Literatúra

- [1] Lambert J. B.: Archaeological Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **35** (2002), 583–584.
- [2] Braun K. L.: Integrating archaeology and interdisciplinary collaborations with museums into the chemistry curriculum. In: *Contextualizing Chemistry in Art and Archaeology: Inspiration for Instructors*. K. L. Braun, K. J. Labby (eds.). American Chemical Society, Washington 2021, p. 381–401.
- [3] Hickel E.: The laboratory as an adjunct to historical research. *Pharm. Hist.* **10** (1968), 105–108.
- [4] Nesměrák K., Kudláček K., Štícha M., Kozlík P., Červený V., Kunešová J.: Degradation of the opium alkaloids in pharmaceutical relics from the eighteenth century. *Monatsh. Chem.* **150** (2019), 1593–1602.
- [5] Nesměrák K., Štícha M., Belianský M., Červený V., Kozlík P., Kudláček K., Kunešová J.: *Laudanum opiatum caesareum*: authentication of the composition of a historical pharmaceutical preparation from the eighteenth century using a multianalytical approach. *Monats. Chem.* **152** (2021), 1089–1096.
- [6] Nesměrák K., Kudláček K., Babica J.: Analytical chemistry studying historical pharmaceuticals and health care formulations. *Monatsh. Chem.* **148** (2017), 1557–1568.
- [7] Fors H., Principe L. M., Sibum H. O.: From the library to the laboratory and back again: Experiment as a tool for historians of science. *Ambix* **63** (2016), 85–97.
- [8] Zilker M., Sörgel F., Holzgrabe U.: A long-time stability study of 50 drug substances representing common drug classes of pharmaceutical use. *Drug Test. Anal.* **11** (2019), 1065–1075.
- [9] Zilker M., Sörgel F., Holzgrabe U.: A systematic review of the stability of finished pharmaceutical products and drug substances beyond their labeled expiry dates. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **166** (2019), 222–235.
- [10] Reklamní příloha. *Čas. lék. čes* **81**:12 (1942), V.
- [11] Reklamní příloha. *Čas. lék. čes.* **87** (1949), 1110.
- [12] Pospíšil J.: Vyřazené přípravky. *Zdravotnické noviny* **13**:37 (1964), 5.

-
- [13] Reklamní příloha. *Čas. lék. čes.* **81**:13 (1942), IV.
- [14] Lewis C. B., Adams N.: Phenobarbital. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532277/>
- [15] Suddock J. T., Cain M. D.: Barbiturate Toxicity. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499875/>
- [16] Kwan P., Brodie J.: Phenobarbital for the treatment of tpilepsy in the 21st century: A critical review. *Epilepsia* **45** (2004), 1141–1149.
- [17] World Health Organization: *Initiative of Support to People with Epilepsy*. Dostupné z: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/61822>
- [18] Savica R., Beghi E., Mazzaglia G., Innocenti F., Brignoli O., Cricelli C., Caputi A. P., Musolino R., Spina E., Trifiro G.: Prescribing patterns of antiepileptic drugs in Italy: a nationwide population-based study in the years 2000-2005. *Eur. J. Neurol.* **14** (2007), 1317–1321.
- [19] Nicholas J. M., Ridsdale L., Richardson M. P., Ashworth M., Gulliford M.C.: Trends in antiepileptic drug utilisation in UK primary care 1993–2008: Cohort study using the General Practice Research Database. *Seizure* **21** (2012), 466–470.
- [20] Falco-Walter J. J., Bleck T., Brophy G. M., Vespa P. M.: Clinical medicine treatment of established status epilepticus. *J. Clinic. Med.* **5** (2016) 49.
- [22] Dumps C., Halbeck E., Bolkenius D.: Medikamente zur intravenösen Narkoseinduktion: Barbiturate. *Der Anaesthetist* **67** (2018), 535–552.
- [23] *Rosen's Emergency Medicine: Concepts and Clinical Practice. 7th Ed.* J.A.Marx (ed.). Mosby, Philadelphia 2010
- [24] Macdonald R. L., Rogers C.J., Twyman R. E.: Barbiturate regulation of kinetic properties of the GABAA receptor channel of mouse spinal neurones in culture. *J. Physiol.* **417** (1989), 483–500.
- [25] Rogawski M. A., Porter R. J.: Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. *Pharmacol. Rev.* **42** (1990), 223–286.
- [26] Macdonald R. L., Rogers C.J., Twyman R. E.: Differential regulation of gamma-aminobutyric acid receptor channels by diazepam and phenobarbital. *Ann. Neurol.* **25** (1989), 213–220.
- [28] Rho J. M., Donevan S. D., Rogawski M. A.: Direct activation of GABAA receptors by barbiturates in cultured rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* **497** (1996), 509–522.

- [29] Anderson G. D., Hakimian S.: Pharmacokinetic factors to consider in the selection of antiseizure drugs for older patients with epilepsy. *Drugs Aging* **35** (2018), 687–698.
- [30] Yasiry Z., Shorvon S. D.: How phenobarbital revolutionized epilepsy therapy: The story of phenobarbital therapy in epilepsy in the last 100 years. *Epilepsia* **53** (2012), 26–39.
- [31] Lennox W. G.: *Epilepsy and Related Disorders*. Brown, Boston 1960.
- [32] Shorter E.: *A History of Psychiatry: From the Era of the Asylum to the Age of Prozac*. Wiley 1997.
- [33] López-Munoz F., Ucha-Udabe R., Alamo C.: The history of barbiturates a century after their clinical introduction. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **1** (2005), 329–343.
- [34] Hauptmann A.: Luminal bei Epilepsie. *Münch. Med. Wochenschr.* **59** (1912), 1907.
- [35] Shorvon S.: *Handbook of Epilepsy Treatment*. Oxford: Blackwell Science 2000.
- [36] Paibir S. G., W. H.: High-performance liquid chromatographic analysis of phenobarbital and phenobarbital metabolites in human urine. *J. Chromatogr. B* **691** (1997), 111–117.
- [37] Anilanmert B., Çavus F., Narin I., Cengiz S., Sertler Ş., Özdemir A. A., Acikkol M.: Simultaneous analysis method for GHB, ketamine, norketamine, phenobarbital, thiopental, zolpidem, zopiclone and phenytoin in urine, using C18 poroshell column. *J. Chromatogr. B* **1022** (2016), 230–241.
- [38] Raoof J. B., Baghayeri M., Ojani R.: A high sensitive voltammetric sensor for qualitative and quantitative determination of phenobarbital as an antiepileptic drug in presence of acetaminophen. *Colloids Surfaces B* **95** (2012), 121–128.
- [39] Roveri F. L., Paranhos B. A. P. B., Yonamine. M.: Determination of phenobarbital in hair matrix by liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Forens. Sci. Int.* **265** (2016), 75–80.
- [40] Garrett E. R., Bojarski J. T., Yakatan G. J.: Kinetics of hydrolysis of barbituric acid derivatives. *J. Pharm. Sci.* **60** (1971), 1145–1154
- [41] <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:6804>
- [42] Birnbaum I S., Barreiro T. J.: Methacholine challenge testing: Identifying its diagnostic role, testing, coding, and reimbursement. *Chest.* **131** (2007), 1932–1935.
- [43] Barnes P. J.: Theophylline. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **15** (2013), 901–906.
- [44] Bucklin M. H., Groth C. M.: Theophylline. In: *Encyclopedia of Toxicology*. 3rd Ed. P. Wexler (ed.). Academic Press 2014, p. 530–532.
- [45] Lemaire-Hurtel A.S., Alvarez J. C.: Drugs involved in drug-facilitated crime: Pharmacological aspects. In: *Toxicological Aspects of Drug-Facilitated Crimes*. P. Knitz (ed.). Academic Press 2014, p. 47–91.

-
- [46] Hillier K.: Atropine. In: *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier 2009.
- [47] Partin A. W.: Evaluation and management of erectile dysfunction . In: *Campbell-Walsh-Wein Urology*. 12th Ed. A. W. Partin (ed.). Elsevier 2021, p. 1513–1538.
- [48] *Meyler's Side Effects of Drugs*. 16th Ed. J. K. Aronson (ed.). Elsevier 2016, p. 147–150.
- [49] Aronson J.K.: The international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions. In: *Meyler's Side Effects of Drugs*. 16th Ed. J. K. Aronson (ed.). Elsevier 2016, p. 2678.
- [50] Wallworth D. M., Lee J. T.: Chiral Bioanalysis. In: *Handbook of Analytical Separations. Volume 4*. I. D. Wilson (ed.). Elsevier 2003, p. 129–184.
- [51] Schulick R.D.: Assessment of liver function in the surgical patient. In: *Surgery of the Liver, Biliary Tract and Pancreas*. Saunders 2007, p. 30–36.
- [52] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aminopyrine>
- [53] Nehlig A., Daval J. D., Debry G.: Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res. Rev.* **17** (1992), 139–170.
- [54] Evatt D. P., Griffiths R. R.: Caffeine. In: *Encyclopedia of Human Nutrition*. Elsevier 2012, p. 221–227.
- [55] Watson J.: Caffeine. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press 2003, p. 745–750.
- [56] Bowery N. G.: Codeine. In: *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier 2009.
- [57] Stein E. J., Glick D. B.: Autonomic nervous system. In: *Basics of Anesthesia. 7th ed.* Elsevier 2017, p. 70–82.
- [58] Zimmerman J., Lee J. P., Cahalan M.: Vasopressors and inotropes. In: *Pharmacology and Physiology for Anesthesia: Foundations and Clinical Application*. 2nd Ed. Elsevier 2019, p. 520–534.
- [59] Spiller H.A.: Speed. In: *Encyclopedia of Toxicology*. 3rd Ed. P. Wexler (ed.). Academic Press 2014, p. 69–71.
- [60] *Nachtrag 1 zur 7. Auflage von Gehes Codex*. Schwarzec, Dresden 1938.
- [61] El-Gindy A.: HPLC and chemometric assisted spectrophotometric methods for simultaneous determination of diprophylline, phenobarbitone and papaverine hydrochloride. *Farmaco* **60** (2005), 745–753.
- [62] Ghimicescu C., Stan M., V. Dorneanu.: Colorimetric determination of aminophenazone in different pharmaceutical forms (Rumanian). *Farmacia* **23** (1975), 147–151.

- [63] Franeta J. T., Agraba D., Eric S., Pavkov S., Aleksic M., Vladimirov S.: HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. *Farmaco* **57** (2002), 709–713.
- [64] Spell J. Ch., Srinivasan K., Stewart J. T., Bartlett M. G.: Supercritical fluid extraction and negative ion electrospray liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of phenobarbital, butalbital, pentobarbital and thiopental in human serum. *Rapid Com. Mass Spectrom.* **12** (1998), 890–894.
- [65] Wang C., Zhang N., Wang Z., Qi Z., Zheng B., Li P., Liu J.: Rapid characterization of chemical constituents of *Platycodon grandiflorum* and its adulterant *Adenophora stricta* by UPLC-QTOF-MS/MS. *J. Mass Spectrom.* **52** (2017), 643–656.
- [66] Simirgiotis M. J., Benites J., Areche C., Sepu B.: Antioxidant capacities and analysis of phenolic compounds in three endemic nolana species by HPLC-PDA-ESI-MS. *Molecules* **20** (2015) 11490–11507.
- [67] Tao Y., Jiang Y., Li W., Cai B.: Rapid magnetic solid-phase extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography and quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for analysis of thrombin binders from a crude extract and injection of *Erigeron breviscapus*. *RSC Advances* **6** (2016), 34782–34790.
- [68] Kuczkowiak U., Petereit F., Nahrstedt A.: Hydroxycinnamic acid derivatives obtained from a commercial crataegus extract and from authentic *Crataegus* spp. *Scient. Pharm.* **82** (2014), 835–846.
- [69] Domínguez-Rodríguez G., Marina M. L., Plaza M.: In vitro assessment of the bioavailability of bioactive non-extractable polyphenols obtained by pressurized liquid extraction combined with enzymatic-assisted extraction from sweet cherry (*Prunus avium* L.) pomace. *Food Chem.* **385** (2022), 132688.
- [70] Taylor V. F, March R. E., Longerich H. P., Stadey Ch. J.: A mass spectrometric study of glucose, sucrose, and fructose using an inductively coupled plasma and electrospray ionization. *Int. J. Mass Spectrom.* **243** (2005), 71–84.
- [71] Gu L., Kelm M. A., Hammerstone J. F., Zhang Z., Beecher G., Holden J., Haytowitz D., Prior R.L.: Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. *J. Mass Spectrom.* **38** (2003), 1272–1280.
- [72] Su J., Fu P., Shen Y., Zhang Ch., Liang M., Liu R., Li H., Zhang W.: Simultaneous analysis of flavonoids from *Hypericum japonicum* Thunb.ex Murray (*Hypericaceae*) by HPLC-DAD–ESI/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46** (2008), 342–348.

- [73] John H., Binder T., Höchstetter H., Thiermann H.: LC-ESI MS/MS quantification of atropine and six other antimuscarinic tropane alkaloids in plasma. *Anal. Bioanal. Chem.* **396** (2010), 751–763.
- [74] Stojanovska N., Fu S., Tahtouh M., Kelly T., Beavis A., Kirkbride K. P.: A review of impurity profiling and synthetic route of manufacture of methylamphetamine, 3,4-methylenedioxymethylamphetamine, amphetamine, dimethylamphetamine and p-methoxyamphetamine. *Forensic Sci. Int.* **224** (2013), 8–26.
- [75] Bogusz M. J., Hassan H., Al-Enazi E., Ibrahim Z., Al-Tufail M.: Application of LC-ESI-MS-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41** (2006), 554–564.
- [76] Pihlainen K., Aalberg L., Tepponen M., Clark C. R., Kostianen R.: The identification of 3,4-MDMA from its mass equivalent isomers and isobaric substances using fast LC-ESI-MS-MS. *J. Chromatogr. Sci.* **43** (2005), 92–97.
- [77] Dembitsky V. M., Shkrob I., Rozentsvet O. A.: Fatty acid amides from freshwater green alga *Rhizoclonium hieroglyphicum*. *Phytochemistry* **54** (2000), 965–967.
- [78] Zhang Z., Yan B., Liu K., Bo T., Liao Y., Liu H.: Fragmentation pathways of heroin-related alkaloids revealed by ion trap and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22** (2008), 2851–2862.
- [79] Jeong E. S., Kim S., Cha E., Lee K. M., Kim H. J., Lee S., Kwon O., Lee J.: Simultaneous analysis of 210 prohibited substances in human urine by ultrafast liquid chromatography/tandem mass spectrometry in doping control. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **29** (2015), 367–384.
- [80] Marciniak B.: Photochemical decomposition of phenazone derivatives. Part 7: Mechanism of decomposition in aqueous solutions. *Pharmazie* **40** (1985), 110–112.
- [81] Kokatsu J., Yomoda R., Suwa T.: Selected ion monitoring for the determination of bromovalerylurea in human plasma. *Chem. Pharm. Bull.* **40** (1992), 1517–1519.
- [82] Kephart J. C.: Chlorophyll derivatives—Their chemistry, commercial preparation and uses. *Econom. Botany* **9** (1955), 3–38.
- [83] Guo Ch., Gong L., Wang W., Leng J., Zhou L., Xing S., Zhao Y., Xian R., Zhang X., Shi F.: Rapid screening and identification of targeted or non-targeted antitussive adulterants in herbal medicines by Q-Orbitrap HRMS and screening database. *Int. J. Mass Spectrom.* **447** (2020), 116250.
- [84] Shi X., Yang Y., Ren H., Sun S., Mu L. T., Chen X., Wang Y., Zhang Y., Wang L.H., Sun Ch.: Identification of multiple components in deep eutectic solvent extract of

- Acanthopanax senticosus* root by ultra-high-performance liquid chromatography with quadrupole orbitrap mass spectrometry. *Phytochem. Lett.* **35** (2020), 175–185.
- [85] Han Ch., Xia B., Chen X., Shen J., Miao Q., Shen Y.: Determination of four paraben-type preservatives and three benzophenone-type ultraviolet light filters in seafoods by LC-QqLIT-MS/MS. *Food Chem.* **194** (2016), 1199–1207.
- [86] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430686/>
- [87] *WHO Expert Committee On Specifications For Pharmaceutical Preparations. 23th Report.* WHO, Geneva 2019