

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Pavla Vašíčková

ANALÝZA DEGRADACE ÚČINNÝCH LÁTEK  
HISTORICKÝCH LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ

Analysis of Degradation of Substances of Historical  
Pharmaceutical Preparations

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Martin Štícha

Praha 2014

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 29. srpna 2014.

## **Abstrakt**

Cílem diplomové práce bylo analyzovat změny ve složení historických léčivých přípravků z let 1930–1997. Účinné látky těchto přípravků zahrnovaly opiáty a alkaloidy, léčiva byla ve formě tablet a injekčních roztoků. Byla studována přítomnost účinných látek a jejich degradačních produktů. Téměř u všech účinných látek byl stanoven jejich obsah. Měření bylo prováděno pomocí RP-HPLC s hmotnostní detekcí. Pomocí MS/MS byly navrženy fragmentace jednotlivých složek. Některé účinné látky prokázaly i po letech vysokou stabilitu (kodein, ethylmorfin, theobromin), zatímco jiné se zcela rozložily (acetyldemethyldihydrothebain).

Klíčová slova: opiáty, alkaloidy, dlouhodobá stabilita, RP-HPLC, MS/MS

## **Abstract**

The aim of this thesis is the analysis of transformations of the composition of pharmaceutical preparations from the years 1930–1997. The alkaloids and opium alkaloids are active substances of these pharmaceutical preparations. Pharmaceutical preparations were in form of tablet and injection solution. The presence of active compounds and their degradation products were detected using RP-HPLC with spectrometric detection. The MS/MS fragmentation pathways of compounds found were proposed. The high stability of some active substances was proved (codeine, ethylmorphine and theobromine) while some other compounds were completely decomposed.

Key words: opiates, alkaloids, long-term stability, RP-HPLC, MS/MS

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala Českému farmaceutickému muzeu v Kuksu za poskytnuté vzorky historických lékových forem pro mou práci a také Mgr. Janu Babicovi za určení datace těchto vzorků. Dále bych ráda poděkovala Ústavu soudního lékařství a toxikologie 1LF, především Doc. Ing. Marii Balíkové, CSc., za pomoc při analýze injekčního roztoku Morphin-Atropin. Také bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Karlu Nesměrákovi za jeho ochotu, trpělivost a cenné rady. Děkuji také svému konzultantovi RNDr. Martinu Štíchovi za odbornou pomoc a předané zkušenosti při měření experimentální části této práce. Nakonec děkuji své rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

# Obsah

<b>1</b>	<b>CÍL PRÁCE .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÝ ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>STABILITA LÉČIVÝCH LÁTEK A LÉKOVÝCH FOREM .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2</b>	<b>OPIÁTY .....</b>	<b>10</b>
<b>2.3</b>	<b>KODEIN .....</b>	<b>12</b>
<b>2.4</b>	<b>ETHYLMORFIN .....</b>	<b>14</b>
<b>2.5</b>	<b>PAPAVERIN .....</b>	<b>15</b>
<b>2.6</b>	<b>THEOBROMIN .....</b>	<b>17</b>
<b>2.7</b>	<b>HYDROMORFON .....</b>	<b>19</b>
<b>2.8</b>	<b>MORFIN .....</b>	<b>20</b>
<b>2.9</b>	<b>ATROPIN .....</b>	<b>22</b>
<b>2.10</b>	<b>THEBAIN .....</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>ANALYZOVANÉ VZORKY HISTORICKÝCH LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.1</b>	<b>ANALYZOVANÉ VZORKY TABLET .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.2</b>	<b>ANALYZOVANÉ VZORKY INJEKČNÍCH ROZTOKŮ .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3</b>	<b>POSTUPY MĚŘENÍ A VYHODNOCOVÁNÍ VÝSLEDKŮ .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.1</b>	<b>POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.2</b>	<b>ANALÝZA VZORKU KODEINU .....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.3</b>	<b>ANALÝZA VZORKU ETHYLMORFINU .....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.4</b>	<b>ANALÝZA VZORKU PAPAVERINU A THEOBROMINU .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.5</b>	<b>ANALÝZA VZORKU DILAUDID CHLORIDU .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.6</b>	<b>ANALÝZA VZORKU MORFINU A ATROPINU .....</b>	<b>33</b>
<b>3.3.7</b>	<b>ANALÝZA VZORKU PAPAVERINU A ATROPINU .....</b>	<b>33</b>
<b>3.3.8</b>	<b>ANALÝZA VZORKU ACETYLDEMETHYLDIHYDROTHEBAINU .....</b>	<b>34</b>

<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>ANALÝZA TABLET „CODEINPHOSPHORIC. DR. HEISLER 0,05 G“ .....</b>	<b>35</b>
4.1.1	OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK .....	35
4.1.2	IDENTIFIKACE LÁTEK VE VZORKU A INTERPRETACE HMOTNOSTNÍCH SPEKTER .....	36
4.1.3	STANOVENÍ OBSAHU KODEINU VE VZORKU .....	41
<b>4.2</b>	<b>ANALÝZA TABLET „DIOLAN“ .....</b>	<b>42</b>
4.2.1	OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK .....	42
4.2.2	IDENTIFIKACE LÁTEK VE VZORKU A INTERPRETACE HMOTNOSTNÍCH SPEKTER .....	42
4.2.3	STANOVENÍ OBSAHU ETHYLMORFINU VE VZORCÍCH .....	46
<b>4.3</b>	<b>ANALÝZA TABLET „PAPAVÉRIN-THEŠAL“ .....</b>	<b>47</b>
4.3.1	OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK .....	47
4.3.2	IDENTIFIKACE LÁTEK VE VZORKU A INTERPRETACE HMOTNOSTNÍCH SPEKTER .....	48
4.3.3	STANOVENÍ OBSAHU PAPAVERINU A THEOBROMINU VE VZORKU .....	55
<b>4.4</b>	<b>ANALÝZA TABLET „DILAUDID HYDR.“ .....</b>	<b>56</b>
4.4.1	OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK .....	56
4.4.2	IDENTIFIKACE LÁTEK VE VZORKU A INTERPRETACE HMOTNOSTNÍCH SPEKTER .....	57
4.4.3	STANOVENÍ OBSAHU HYDROMORFONU VE VZORKU .....	61
<b>4.5</b>	<b>ANALÝZA INJEKČNÍHO ROZTOKU „MORPHIN-ATROPIN PRO INJECTIONE DR. HEISLER“ .....</b>	<b>61</b>
4.5.1	OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK .....	61
4.5.2	IDENTIFIKACE LÁTEK VE VZORKU A INTERPRETACE HMOTNOSTNÍCH SPEKTER .....	62
4.5.3	STANOVENÍ OBSAHU MORFINU A ATROPINU VE VZORKU .....	69
<b>4.6</b>	<b>ANALÝZA INJEKČNÍHO ROZTOKU „PAPAVÉRIN-ATROPIN“ .....</b>	<b>70</b>
4.6.1	OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK .....	70
4.6.2	IDENTIFIKACE LÁTEK VE VZORKU A INTERPRETACE HMOTNOSTNÍCH SPEKTER .....	70
4.6.3	STANOVENÍ OBSAHU PAPAVERINU A ATROPINU VE VZORKU .....	76
<b>4.7</b>	<b>ANALÝZA INJEKČNÍHO ROZTOKU „ACEDICON“ .....</b>	<b>77</b>
4.7.1	OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK .....	77
4.7.2	IDENTIFIKACE LÁTEK VE VZORKU A INTERPRETACE HMOTNOSTNÍCH SPEKTER .....	77
4.7.3	STANOVENÍ OBSAHU ACETYLDEMETHYLDIHYDROTĚBAINU VE VZORKU .....	85
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>88</b>

## Seznam použitých zkratk a symbolů

A	plocha píku
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
<i>c</i>	hmotnostní koncentrace [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]
CNS	centrální nervová soustava
DAD	detektor s diodovým polem
EI	elektronová ionizace
ESI	elektrosprejová ionizace
MP	mravenčanový pufr
MS/MS	vícetupňová hmotnostní spektrometrie
<i>m/z</i>	efektivní hmotnost iontu
SChHV	Spolek pro chemickou a hutní výrobu
TIC	totální iontový chromatogram
<i>t<sub>R</sub></i>	retenční čas

# 1 CÍL PRÁCE

Cílem mojí diplomové práce byla analýza účinných látek a produktů jejich degradace v historických léčivých přípravcích. Obvykle se u léčiv požaduje stabilita v rozsahu zhruba pěti let, po tuto dobu se nesmí výrazně změnit obsah a složení léčiva. Analýza historických léčivých přípravků nabízí příležitost zhodnotit stabilitu a případný rozklad účinných látek v mnohem delších časových úsecích.

Vzorky historických léčivých přípravků (injekční roztoky a tablety) byly získány ze sbírek Českého farmaceutického muzea v Kuksu. Účinnými látkami byly opiáty a alkaloidy, stáří vzorků bylo v rozmezí dvacet až osmdesát let. Vzorky byly analyzovány kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí, při čemž bylo nutné modifikovat a optimalizovat pracovní postupy převzaté z literatury. Byly rovněž navrženy fragmentační mechanismy získaných hmotnostních spekter. Výsledky měření byly uvedeny do kritického kontextu s literárními údaji.

## 2 TEORETICKÝ ÚVOD

### 2.1 Stabilita léčivých látek a lékových forem

Následkem chemické degradace léčivé látky (nebo fyzikální degradace lékové formy) může být změna terapeutické účinnosti léčivé látky, v extrémním případě i projevení toxických účinků [1, 2]. Proto je nezbytné, aby léčivé látky, resp. jejich lékové formy, byly dostatečně stabilní a zachovaly si odpovídající kvalitu až do doby použití (nebo do stanovaného data jejich spotřeby). Kvalita musí být zachována za poměrně různých podmínek, kterým jsou léčivé látky a lékové formy vystaveny během výroby, skladování a dopravy.

Z hlediska stability léčivé (hlavně účinné) látky je významná její chemická stabilita. Nejvíce studovanou formou stability lékových forem je proto stanovení možného úbytku léčivé látky vlivem chemických reakcí. Neméně důležitá je i identifikace vzniklých degradačních produktů z důvodu lepšího pochopení příslušného degradačního mechanismu [3]. Znalost těchto mechanismů je důležitá z několika důvodů:

1. Léčivá látka se může rozkládat na toxickou látku. Je důležité nejen určit jak rychlost tohoto rozpadu, tak i jaké jsou degradační produkty a jaká je jejich toxicita. Toxické mohou být i reakční meziprodukty.
2. Léčivá látka by měla být stabilní nejen v příslušné lékové formě, ale také za podmínek, které budou následovat po požití. Například účinná látka lékové formy pro orální podání musí být stabilní i za takových pH, která jsou shodná s pH gastrointestinálního traktu.

Léčivé látky mají rozdílnou molekulární strukturu a jsou tedy přístupné mnoha různým degradačním cestám. Nejčastějšími z nich jsou hydrolýza, dehydratace, oxidace, izomerizace a racemizace, eliminace, fotodegradace, interakce s pomocnými látkami a v organismu interakce ostatními léčivy. Tyto chemické reakce a degradační mechanismy léčiv ovlivňuje řada faktorů: teplota, světlo, vlhkost, vzduch respektive kyslík, pH, iontová síla, přídavné a pomocné látky obsažené v léčivech.

Hydrolýza je jednou z nejběžnějších reakcí. Pro většinu parentálních léčivých přípravků je běžné, že přijdou do kontaktu s vodou. I když se jedná o tuhou lékovou formu, kontaktu s vlhkostí se prakticky nelze vyhnout. Hydrolýza je hlavní degradační cestou pro léčivé látky obsahující v molekule estery nebo amidy.

Oxidace je také častá chemická degradační cesta pro léčivé látky. Kyslík, který se na většině oxidací podílí, je bohatě zastoupený v prostředí, kterému jsou vystaveny, ať už během zpracování nebo dlouhodobého skladování. Oxidační mechanismy pro léčivou látku závisí na její chemické struktuře a na přítomnosti reaktivního kyslíku nebo ostatních oxidantů.

V lékové formě je jen zřídka obsažena jen účinná léčivá látka, často jsou přidávány další chemické látky dotvářející lékovou formu. Proto se mohou vyskytnout reakce mezi léčivou látkou a jednou nebo více z přísad. Podobně tak dvě léčivé látky v jedné lékové formě mohou vzájemně reagovat. Na stabilitu léčivé látky tak bude mít vliv i její léková forma. Například větší stabilita se dá předpokládat u injekčních roztoků zatavených ve skleněných ampulkách, které jsou tak izolovány od okolního prostředí.

Faktory ovlivňující chemickou stabilitu léčivých látek a lékových forem se rozdělují na faktory vnitřní a faktory vnějšího prostředí. Mezi vnitřní faktory patří molekulární struktura léčiva. Mezi vnější faktory se řadí teplota, vzduch (respektive kyslík), světlo, vlhkost, pH, iontová síla a pomocné látky obsažené v lékových formách.

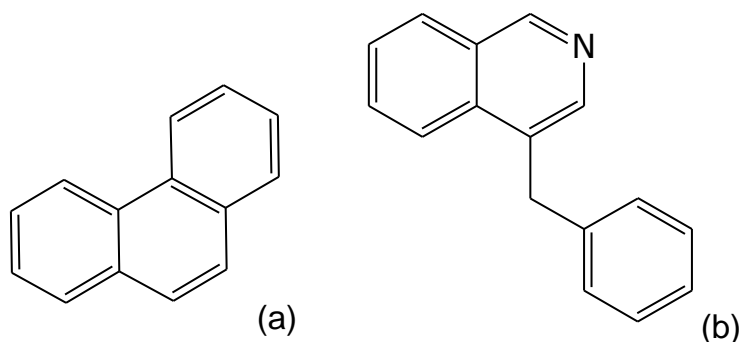
Neméně důležitá je i fyzikální stabilita, protože léčivé i pomocné látky existují v různých mikroskopických fyzikálních stavech s různým stupněm uspořádání. Příkladem jsou amorfní a různé krystalické, hydratované a solvatované stavy. V průběhu času může léčivá nebo pomocná látka přecházet z jednoho stavu (obvykle nestabilního nebo metastabilního) do stavu jiného, termodynamicky stabilního. Fyzikální stabilita je ovlivněna mnoha stejnými proměnnými, které ovlivňují chemickou stabilitu, například přítomností vody.

Většina studií zabývajících se stabilitou lékových forem se zaměřuje na časové období několika měsíců či jednotek let [4, 5]. Byly však provedeny i analýzy historických lékových forem, starých přes sedmdesát let, obsahující mimo jiné závěry týkající se stability [6–8].

## **2.2 Opiáty**

Jako opiáty (nebo opioidy) jsou označovány látky, jejichž účinek je srovnatelný s účinkem hlavního alkaloidu opia, morfinu. Mohou být přírodního původu, polosyntetické nebo syntetické. Alkaloidy opia, které po farmakologické stránce nemají účinky příbuzné účinkům morfinu, jako např. papaverin, pod pojem opiáty nespádají.

Na základě struktury můžeme alkaloidy opia dělit do dvou skupin: fenanthrenové a benzylochinolinové, jejichž struktura je znázorněna na obr. 2.1. Mezi zástupce první skupiny řadíme morfin, kodein a thebain. Charakteristické pro ně je, že působí na centrální nervovou soustavu. Alkaloidy skupiny benzylochinolinové (papaverin, narkotin a narcein) účinkují na hladké svalstvo [9, 10].



Obr. 2.1 Chemická struktura (a) fenanthrenu a (b) benzylochinolinu.

Z farmakologického hlediska řadíme opiáty především mezi analgetika neboli látky tlumící bolest [9, 11]. Analgetika potlačují vnímání bolesti tím, že tlumí příslušné okruhy centrální nervové soustavy, především v mozkové kůře. Při celkovém podání jsou schopny snížit vnímání bolesti s dostatečnou selektivitou. Liší se tak od inhalačních narkotik, která odstraňují bolest vyvoláním centrálního útlu, i od místních anestetik, která blokují bolest pouze periferně. Jejich podání má spolehlivý účinek, ale bohužel i značné riziko. Opiáty působí i jako narkotika, což znamená, že způsobují útlum dýchacího centra. Při předávkování proto hrozí obrna dýchání. Mezi další nežádoucí účinky při jejich užití patří zamlžení vědomí, změny nálady (stavy úzkosti nebo naopak euforie), zvracení, zácpa, únik moči a jiné nežádoucí vegetativní účinky. Největším rizikem u opiátů je silná nebezpečná závislost, kterou při opakovaném užívání způsobují [9–11].

Opiáty se získávají ze zaslé šťávy makovic máku setého (*Papaver somniferum*). Obsah nejdůležitějších alkaloidů se pohybuje kolem těchto hodnot: morfin 10 %, narkotin 6 %, papaverin 0,8 %, kodein 0,5 %, narcein 0,3 %, thebain 0,2 % [9]. Účinky zaslé makové šťávy (opia) jsou známy přibližně od starověku, řadu století se opium používalo k odstraňování silných bolestí [11]. Morfin byl poprvé izolován z opia roku 1806 německým lékárníkem Sertürnerem (ačkoliv dva roky předtím Charles Derosne

provedl separaci směsi morfinu a narkotinu). V roce 1925 byla objasněna struktura morfinu, jeho totální syntéza byla vypracována v roce 1952. Kodein byl poprvé izolován v roce 1833 [10].

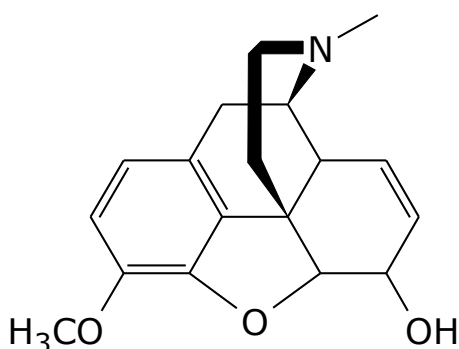
Jak již bylo zmíněno, morfin způsobuje útlum dýchacího centra a silnou návykovost, proto bylo intenzivně hledáno nové analgetikum bez těchto nežádoucích vlastností. Některé deriváty morfinu měly ještě vyšší analgetický účinek než samotný morfin, zároveň s ním však bohužel vzrostla i euforická aktivita a návykovost (heroin). U jiných derivátů byla naopak návykovost silně potlačena, zároveň se však ukázaly jako velmi málo analgeticky účinné (kodein). U zjednodušených analogů morfinu (morfinanů a benzomorfanů) bylo dosaženo lepších výsledků, nebyly však klinicky potvrzeny. Složitější deriváty morfinu vykazovaly silnou analgetickou aktivitu, bohužel také vysokou návykovost [9, 10].

Všechna silně účinná analgetika mají společné strukturální prvky: obsahují aromatické jádro vázané na uhlík (nebo nebazický dusík), na němž není poután žádný vodík. Aromatické jádro je dále spojeno prostřednictvím dvouuhlíkatého (výjimečně tříuhlíkatého) článku s terciárním (příp. sekundárním) bazickým dusíkem. Převážná většina účinných syntetických analgetik je strukturálně příbuzná (-)-morfinu, (+)-isomery jsou neúčinné nebo jen velmi málo účinné [10].

### 2.3 Kodein

Kodein má systematický název (5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ )-7,8-didehydro-4,5-epoxy-3-methoxy-17-methylmorfinan-6-ol, jeho sumární vzorec je C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>, CASN 76-57-3, jeho struktura je uvedena na obr. 2.2. Relativní molekulová hmotnost kodeinu je 299,4. Tento alkaloid se získává buď izolací z opia nebo methylací morfinu. Je to bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky s teplotou tání 154–156 °C, který pomalu zvětrává na suchém vzduchu a je ovlivněn světlem, proto by měl být uchováván v tmavých a dobře uzavřených nádobách. Je dobře rozpustný v chloroformu, etanolu a vařící vodě, volně rozpustný v metanolu a zředěných kyselinách, téměř nerozpustný v roztocích alkalických hydroxidů. Ve formě soli se nejčastěji vyskytuje jako fosforečnan kodeinu, kodein hydrochlorid nebo kodein sulfát. Tyto soli jsou bílé krystalické prášky nebo bezbarvé až bílé krystalky, které se rozkládají při teplotě

235 °C resp. 280 °C. Jsou dobře rozpustné ve vodě, těžko v ethanolu a prakticky nerozpustné v chloroformu a etheru [10, 13].



Obr. 2.2 Chemická struktura kodeinu.

Kodein je řazen mezi antitusika – látky ovlivňující centrum pro kašel, které tlumí kašlací reflex. Oproti morfinu je kodein až desetkrát méně analgeticky účinný, také mnohem méně návykový. Zesiluje účinky hypnotik (léčiva tlumící CNS). Používá se při dráždivém kašli, při léčbě průjmu a jako analgetikum při léčbě mírných bolestí, často v kombinaci s paracetamolem nebo kyselinou acetylsalicylovou [9–11].

Kodein je po orálním podání dobře absorbován, maximální hladina kodeinu v krvi se objevuje zhruba po jedné hodině po požití. Je metabolizován v játrech, O-demethylací (zahrnující P450 isozym CYP2D6) vzniká metabolit morfin, N-demethylací vzniká norkodein. Následnou konjugací vznikají glukuronidy a sulfáty jak morfinu a norkodeinu, tak jejich metabolitů. Po orálním podání je 86 % absorbované dávky vyloučeno močí během 24 hodin, z toho 40–70 % připadá na volný nebo konjugovaný kodein, 5–15 % na volný nebo konjugovaný morfin, 10–20 % na volný nebo konjugovaný norkodein, stopové množství může připadat na volný nebo konjugovaný normorfin. Malé množství absorbované dávky může být vyloučeno žlučí a stolicí. Po nitrosvalovém podání je 15–20 % dávky vyloučeno močí během 24 hodin jako nezměněný kodein. V moči může být zaznamenáno také malé množství hydrokodonu, norhydrokodonu, 6 $\alpha$ -hydrokodolu a 6 $\beta$ -hydrokodolu [13, 14].

Přestože kodein nemá typické účinky opiátů vedoucí k závislosti, jeho přídavek do analgetických směsí nebezpečí závislosti zvyšuje. Metabolická přeměna kodeinu na morfin, tedy metabolické zvýšení toxicity původní látky, může vést až k toxikomanii u pacientů, kteří mají „rychlý“ CYP2D6 (četnost 1–3 %). U závislých osob je proto

kodein oblíbenou náhradní látkou, kterou je ovšem třeba podávat ve vysokých dávkách (tzv. sirupy proti kašli „po lahvích“) [9].

Přehled stanovení kodeinu v jednotlivých matricích chromatografickými metodami je uveden v tabulce 2.1.

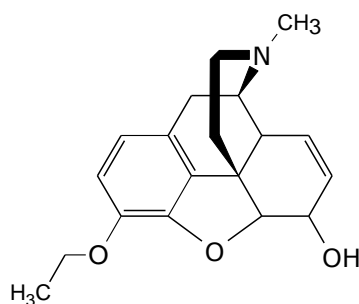
Tabulka. 2.1

Vybraná stanovení kodeinu v různých matricích chromatografickými metodami

matrice	metoda	limit kvantifikace [ng ml <sup>-1</sup> ]	citace
komerční vzorek	TLC-MS/MS	-	[15]
komerční vzorek	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	-	[16]
plasma a moč	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	3,1	[17]
sérum	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	6,4	[18]
moč	UPLC-MS/MS( ESI <sup>+</sup> )	7,0	[19]
sliny	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	1,5	[20]

## 2.4 Ethylmorfin

Ethylmorfin (obr. 2.3), systematicky 7,8-didehydro-4,5-epoxy-3-ethoxy-17-methylmorfinan-6-ol, CASN 76-58-4, sumární vzorec C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>. Je to krystalický prášek s teplotou tání 199–201 °C a relativní molekulovou hmotností 313,4. Ve formě soli se nejčastěji vyskytuje jako ethylmorfin hydrochlorid. Ethylmorfin hydrochlorid je bílý mikrokrytalický prášek o bodu tání 123°C. Je rozpustný ve vodě a v ethanolu, špatně rozpustný v chloroformu a v etheru [13].



Obr. 2.3 Chemická struktura ethylmorfinu.

Ethylmorfin je syntetický derivát morfinu, který se vyrábí alkyací morfinu. Při přípravě různých polosyntetických derivátů morfinu bylo cílem najít analgetikum účinné jako morfin, ovšem bez návykovosti a nežádoucích vedlejších účinků. V případě

ethylmorfinu bylo dosaženo snížení toxicity, ale také analgetického účinku, naopak byl zvýšen účinek antitusický (tlumící kašel).

Ethylmorfin se používá jako lék proti kašli a jako složka analgetických směsí. Ve formě 1–10% roztoku se také využívá v očním lékařství. Tablety Diolan, v nichž je účinnou látkou právě ethylmorfin, mají v dnešní době podobné využití jako např. methadon, slouží jako náhražka tvrdých drog (především heroinu) v tzv. substitučním programu [10–13].

Ethylmorfin je metabolizován v játrech, kde se rozpadá na morfin a normorfin, ze kterých dále vznikají hlavní metabolické produkty morfin-3-glukuronid a normorfin-3-glukuronid [24].

Přehled stanovení ethylmorfinu v jednotlivých matricích je uveden v tabulce 2.2.

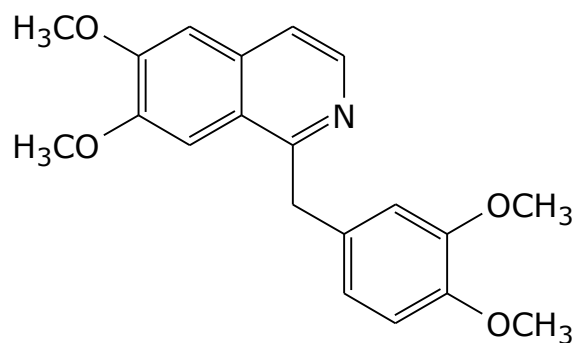
Tabulka 2.2

Vybraná stanovení ethylmorfinu v různých matricích chromatografickými metodami

matrice	metoda	limit kvantifikace [ng ml <sup>-1</sup> ]	citace
moč	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	3	[21]
moč	UPLC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	6	[19]
moč	UHPLC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	3	[22]
krev	UPLC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	1,8	[23]

## 2.5 Papaverin

Papaverin je alkaloid získávaný z opia, dá se připravit i synteticky. Systematický název papaverinu je 1-[(3,4-dimethoxyfenyl)methyl]-6,7-dimethoxyisochinolin, CASN 58-74-2, struktura je uvedena na obr. 2.4. Jeho sumární vzorec je C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub> a relativní molekulová hmotnost 339,4. Je to bílý krystalický prášek s teplotou tání 147 °C. Je téměř nerozpustný ve vodě, lehce rozpustný v chloroformu a etheru, dobře rozpustný v horkém benzenu, bezvodé kyselině octové a acetonu. Pomocí kyseliny se převádí na formu soli, buď na papaverin hydrochlorid nebo papaverin sulfát.



Obr. 2.4 Chemická struktura papaverinu.

Papaverin hydrochlorid je bílý krystalický prášek s teplotou tání 220–225 °C. Je rozpustný v chloroformu, špatně rozpustný ve vodě a v ethanolu, prakticky nerozpustný v etheru.

Papaverin sulfát je bílý krystalický prášek. Je rozpustný ve vodě a v ethanolu, špatně rozpustný v etheru a v chloroformu.

Papaverin byl izolován Merckem již roku 1848 z matečných louhů po oddělení morfinu a kodeinu z opia. První syntézu papaverinu vypracovali Pictet a Gams již roku 1909, přesto se až do druhé světové války připravoval převážně izolací z opia. Jeho konstituce byla objasněna v osmdesátých letech [10, 13].

Papaverin se řadí mezi spasmolytika neboli látky uvolňující křeče převážně hladkého svalstva dutých orgánů. Působí také jako vazodilátor – způsobuje rozšíření cév a tím snižuje krevní tlak. Patří mezi isochinolinové deriváty alkaloidů opia. Na rozdíl od fenantrenových opiových alkaloidů nepůsobí na CNS a nemá analgetický, euforický, antitusický (= kašel tlumící) ani spasmogenní (= křeče vyvolávající) účinek. Pro tyto vlastnosti byl dříve farmaceuticky používán, sám nebo v kombinaci s dalšími látkami, nejčastěji analgetiky nebo atropinem. Používal se jako spasmolytikum trávicího ústrojí, močových cest a také jako spasmolytikum cévní. Papaverin se dobře resorbuje po perorálním podání, časté bylo také jeho použití pro intravenózní podání. Mezi nežádoucí účinky papaverinu se řadí arytmie, pokles krevního tlaku, snížení periferního prokrvení. Dnes se papaverin již nepoužívá pro jeho nedostatečnou specifitu účinku a omezenou terapeutickou šíří [9, 11, 25].

Po orálním podání je papaverin snadno a úplně absorbován, ale podléhá značnému „first-pass“ metabolismu, což znamená, že značná část léčiva je metabolizována v játrech během procesu vstřebávání. V organismu je metabolizován demethylací,

následuje glukuronová a sulfátová konjugace výsledné fenolové skupiny. Okolo 50-80 % dávky je vyloučeno močí během 48 hodin jako konjugované fenolové metabolity, především 6-hydroxypapaverin (37% dávky) a 4'-hydroxypapaverin (okolo 8,5% dávky). Méně než 1 % je vyloučeno močí jako nezměněný papaverin [13].

Přehled analytických technik pro stanovení papaverinu v různých matricích podává tabulka 2.3.

Tabulka 2.3

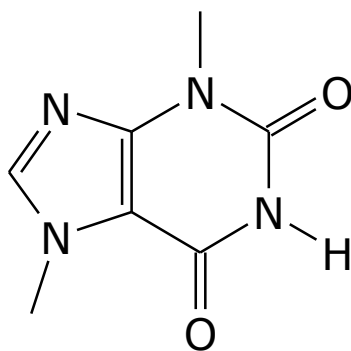
Vybraná stanovení papaverinu v různých matricích chromatografickými metodami

matrice	metoda	limit kvantifikace [ng ml <sup>-1</sup> ]	citace
komerční vzorek	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	-	[16]
moč	UHPLC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	3	[22]
moč	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	-	[26]
plazma, krev, posmrtná krev	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	10	[27]
sliny	LC-MS/MS (APCI <sup>+</sup> )	10	[28]

## 2.6 Theobromin

Theobromin je derivát xantinu a alkaloid obsažený v semenech kakaovníku pravého (*Theobroma cacao*). Poprvé byl z kakaových bobů izolován roku 1883. Dá se vyrobit i synteticky. V přírodě se obyčejně vyskytuje společně s kofeinem, jehož je metabolitem.

Systematický název theobrominu je 3,7-dimethylpurin-2,6-dion, CASN 83-67-0, struktura je uvedena na obr. 2.5. Jeho sumární vzorec je C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> a relativní molekulová hmotnost 180,2. Je to bílý krystalický prášek hořké chuti s bodem tání 350 °C, při pomalém zahřívání sublimuje při teplotě 290–295 °C. Je špatně rozpustný ve vodě, v etanolu a v chloroformu, téměř nerozpustný v benzenu a etheru. Dobře se rozpouští ve zředěných minerálních kyselinách a ve vodných roztocích alkalických hydroxidů.



Obr. 2.5 Chemická struktura theobrominu.

Theobromin patří do skupiny centrálních analeptik neboli centrálních stimulantů. Tyto látky stimulují životně důležitá centra v prodloužené míše nebo v mozkové kůře, odkud se jejich působením v menší nebo větší míře šíří do ostatních oblastí CNS. Theobromin se do této skupiny řadí především díky své strukturální podobnosti s kofeinem. Jeho účinky jsou ale ve srovnání s kofeinem odlišné, má především účinky vasodilatační a diuretické, analeptické účinky vykazuje velmi nízké. Kromě rozšíření cév způsobuje theobromin zesílení a zrychlení srdeční činnosti a mírný pokles krevního tlaku. Také působí jako svalový relaxant hladkého svalstva. Theobromin se používá jako hypotensivum, někdy v kombinaci s trolnitrátem (tablety Nitrothesal), dále je obsažen v léčivech proti astmatu (např. Propyre T) a diuretikách (Urodonal). Běžná dávka se pohybuje mezi 300 a 600 mg [10–13].

Theobromin je při orálním podání velmi dobře absorbován. V organismu je metabolizován demethylací, zejména na 7-methylxanthin, který je dále oxidován na 7-methylmočovou kyselinu. V menší míře vzniká i 3-methylxanthin. Okolo 90 % absorbované dávky je vyloučeno do moči s poločasem asi 8 hodin, z toho 40 % připadá na 7-methylxanthin, 20 % na 3-methylxanthin, 11 % na 7-methylmočovou kyselinu, 15 % je nezměněný theobromin a zbývajících 16 % připadá na další metabolit 6-amino-5-(*N*-methylformylamino)-1-methyluracil [13].

Přehled analytických technik pro stanovení theobrominu v různých matricích podává tabulka 2.4.

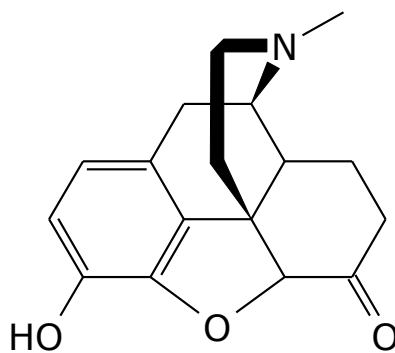
Tabulka 2.4

Vybraná stanovení theobrominu v různých matricích chromatografickými metodami

matrice	metoda	limit kvantifikace [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]	citace
moč	LC/MS a LC/MS ( $\text{ESI}^+$ )	0,75	[29]
plazma	LC-MS ( $\text{ESI}^+$ )	0,002	[30]
sliny, moč, plazma	UPLC-MS/MS ( $\text{ESI}^+$ )	0,02	[31]
kakao	UPLC-MS/MS a HPLC-MS/MS ( $\text{ESI}^+$ )	0,09	[32]

## 2.7 Hydromorfon

Systematický název hydromorfonu je 4,5- $\alpha$ -epoxy-3-hydroxy-17-methyl-morfinan-6-on, CASN 466-99-9, struktura je uvedena na obr. 2.6. Jeho sumární vzorec je  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_3$  a relativní molekulová hmotnost 285,3. Je to jemný bílý krystalický prášek s bodem tání 266 °C. Je mírně rozpustný ve vodě, lépe rozpustný v ethanolu a úplně rozpustný v chloroformu. Ve formě soli se nejčastěji vyskytuje jako hydromorfon hydrochlorid, který je znám pod farmakologickým názvem Dilaudid. Dilaudid je bílý krystalický prášek, který je citlivý na světlo. Taje v rozmezí teplot 305 a 315 °C, při nichž dochází k úplnému rozkladu. Je rozpustný ve vodě, špatně rozpustný v ethanolu a prakticky nerozpustný v chloroformu.



Obr. 2.6 Chemická struktura hydromorfonu.

Hydromorfon je polosyntetický derivát morfinu (hydrogenovaný keton). Poprvé byl syntetizován v roce 1921, od roku 1926 je terapeuticky používán. Řadí se mezi opioidní analgetika, používá se při léčbě chronických bolestí. Při perorálním užití má zhruba pětkrát vyšší analgetický účinek než morfin aplikovaný touto cestou, bohužel však také vyvolává euforii a závislost. U závislých osob plně nahradí morfin. U některých jedinců jsou nežádoucí účinky nižší než u morfinu, je však možný i opak. Kromě perorálního

podání hydromorfonu se využívá lékových forem pro parenterální, rektální a spinální aplikaci [9–13].

Hydromorfon se dobře vstřebává z gastrointestinálního traktu. Je metabolizován v játrech glukuronidací za vzniku hydromorfon-3-glukuronidu nebo redukcí ketoskupiny a následnou konjugací. Vylučuje se močí, přibližně 6 % dávky je močí vyloučeno během 24 hodin jako nezměněný hydromorfon, přibližně 30 % jako konjugovaný hydromorfon a pouze stopové množství jako 6 $\alpha$  a 6 $\beta$ -hydroxy metabolity. Hydromorfon je metabolit hydrokodonu [13].

Přehled analytických technik pro stanovení hydromorfonu v různých matricích podává tabulka. 2.5.

Tabulka 2.5.

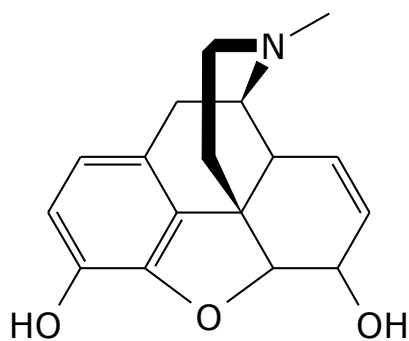
Vybraná stanovení hydromorfonu v různých matricích chromatografickými metodami

matrice	metoda	limit kvantifikace [ng ml <sup>-1</sup> ]	citace
plazma	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	1,0	[33]
plazma	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	0,01	[34]
moč	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	3,0	[21]
moč	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	1,5	[35]
moč, sérum, plazma, krev, mekonium	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	2,0	[36]

## 2.8 Morfin

Morfin je hlavním alkaloidem obsaženým v opiu, dá se vyrobit i synteticky. Systematický název morfinu je (5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ )-7,8-didehydro-4,5-epoxy-17-methylmorfinan-3,6-diol, CASN 57-27-2, struktura je uvedena na obrázku 2.7. Sumární vzorec morfinu je C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub> a relativní molekulová hmotnost 285,3. Je to bílý krystalický prášek nebo bílé případně bezbarvé jehlicovité krystalky. Teplota tání se pohybuje v rozmezí 254-256 °C, při níž dochází k úplnému rozkladu. Analgeticky účinný je (-)-morfin, (+)-isomery jsou neúčinné. Měl by být uchováván v dobře uzavřených nádobách, chráněn před světlem. Je dobře rozpustný v glycerolu a ethanolu, hůře rozpustný ve vodě a v chloroformu, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpustnost se může měnit podle způsobu přípravy a krystalického stavu. Ve formě soli se vyskytuje morfin hydrochlorid, morfin sulfát a morfin acetát. Soli jsou bílé případně bezbarvé krystalické prášky, krystalky nebo bílé objemové hmoty. Jsou dobře rozpustné ve vodě a

v ethanolu, prakticky nerozpustné v chloroformu (kromě morfinu acetátu) a v etheru. Jejich roztoky vzniklé rozpuštěním příslušné soli ve vodě jsou levotočivé [10, 13].



Obr. 2.7 Chemická struktura morfinu.

Morfin se rychle absorbuje po podkožní, nitrožilní i nitrosvalové aplikaci. Absorpce při orálním podání je proměnlivá, funguje zde značný „first-pass“ metabolismus a biodostupnost je v tomto případě 20–30 %. Může se vyskytnout enterohepatická cirkulace. Nejvyšší koncentrace se dostanou do ledvin, jater, plic a do sleziny, v nižších koncentracích je obsažen ve svalech a v mozku, v tkáních se neakumuluje. Morfin prochází přes hematoencefalickou bariéru a přes placentu, byl nalezen v mateřském mléku a potu. Metabolizováno je přibližně 90 % aplikované dávky morfinu [13, 14].

Mezi jeho hlavní metabolity patří morfin-6-glukuronid a morfin-3-glukuronid. Morfin-6-glukuronid vykazuje podobnou afinitu k opioidním receptorům jako samotný morfin a je více analgeticky účinný, zatímco morfin-3-glukuronid působí jako antagonist. Další metabolické reakce zahrnují N-demethylaci, O-methylaci a N-oxid formaci, vzniká normorfin, kodein a morfin éterický sulfát.

Morfin je vylučován močí, asi 10 % z celkového množství je vylučováno žlučí do stolice. Po parenterálním podání je více než 90 % aplikované dávky vyloučeno močí během 24 hodin. Z toho 10 % připadá na nezměněný morfin, 65–70 % na konjugovaný morfin, až 10 % je morfin-3-éterický sulfát, 1 % je normorfin a 3 % je normorfin glukuronid. Po orální aplikaci je zhruba 60 % aplikované dávky vyloučeno močí během 24 hodin a přibližně 3 % jako nezměněný morfin během 48 hodin. Vylučování močí morfinu je ovlivněno pH moči. Pokud je moč více kyselá, je vyloučeno více nezměněného morfinu a naopak při více zásadité moči stoupá obsah konjugovaných

glukuronidů. V mrtvém těle je morfin pomalu přeměňován na pseudomorfin, který může být nalezen při exhumaci. Morfin je hlavní metabolit heroínu a kodeinu [13, 37].

Ve vodných roztocích je morfin oxidován na pseudomorfin a morfin N-oxid. Oxidace morfinu v pevné fázi nejspíš probíhá podle jiného mechanismu, protože v krystalickém morfinu sulfátu byl objeven 10-*S*-hydroxymorfin a v bázi morfinu stopové množství 10-oxomorfinu [38].

Nejčastěji je dávkován ve formě injekčního roztoku hydrochloridu. Používá se při krutých bolestech např. u zhoubných nádorových onemocnění, po těžkých úrazech, po operacích apod. Jeho tlumivé účinky na dechové centrum se dají využít při prudce probíhajícím plicním edému. Vzhledem k jeho návykovosti je třeba uvážit jeho použití. Při krátkodobém užívání, přiměřeném dávkování a vhodném způsobu aplikace je při krutých bolestech téměř vyloučen vznik závislosti [9, 14].

Přehled analytických technik pro stanovení morfinu v různých matricích podává tabulka 2.6.

Tabulka 2.6.

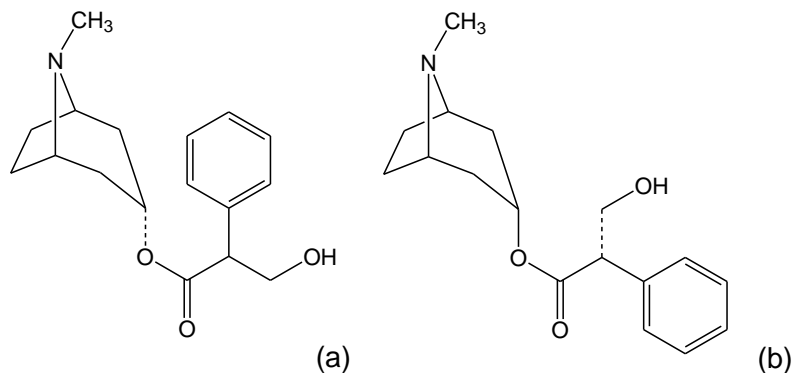
Vybraná stanovení morfinu v různých matricích chromatografickými metodami

matrice	metoda	limit kvantifikace [ng ml <sup>-1</sup> ]	citace
historické lékové formy	LC-MS/MS (APPI <sup>+</sup> )		[8]
komerční vzorek	TLC-MS/MS	-	[15]
komerční vzorek	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	-	[16]
moč	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	1,2	[39]
moč	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	3,0	[35]
sérum	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	9,1	[40]
plazma	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	4,7	[41]
sliny	UHPLC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	1,92	[42]
sliny	UHPLC-MS/MS (APCI <sup>+</sup> )	0,69	[42]
sliny	UHPLC-MS/MS (APPI <sup>+</sup> )	2,08	[42]

## 2.9 Atropin

Atropin (obr. 2.8), systematicky [(1*R*,5*S*)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]oktan-3-yl]-3-hydroxy-2-fenyl-propanoát, je esterem tropinu a kyseliny tropové. Je to bezbarvý až bílý krystalický prášek nahořklé chuti. Sumární vzorec atropinu je C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>, relativní molekulová hmotnost 289,4, teplota tání 114–118 °C. Atropin je dobře rozpustný v ethanolu a chloroformu, téměř nerozpustný ve vodě. Ve formě soli je využíván síran

atropinu, který se velmi snadno rozpouští ve vodě, v ethanolu a glycerinu. V etheru a chloroformu je prakticky nerozpustný. V přítomnosti vlhkosti se zčásti hydrolyzuje [10, 13].



Obr. 2.8 Chemická struktura (a) atropinu a (b) hyoscyaminu.

Atropin je hlavním účinným alkaloidem lilkovitých rostlin, zejména rulíku (*Atropa belladonna*), blínu (*Hyoscyamus niger*) a durmanu (*Datura stramonium*), ale lze jej připravit i synteticky [9, 10]. V rostlinách se nativně vyskytuje alkaloid (–)-hyoscyamin, který se v roztoku spontánně mění na racemický (±)-hyoscyamin, tedy na atropin. V uvedených rostlinách se v rozdílných množstvích vyskytuje i skopolamin (hyoscin), který je chemicky a v řadě hledisek i účinkem blízký atropinu.

Z farmakologického hlediska se atropin řadí mezi parasympatolika, tedy léky tlumící činnost parasympatického systému [10, 11]. Má anticholinergní vlastnosti, což znamená, že blokuje účinek neurotransmiteru acetylcholinu. Jeho účinek je odstupňován následovně: žlázy > oko, srdce > hladké svalstvo > CNS. Jako první projev účinku atropinu nastává většinou útlum sekrece slinných a potních žláz, což způsobuje sucho v ústech a ztížené polykání. Poté následuje snížení sekrece žláz dýchacích cest (chrápot) i sekrece slz. K blokádě sekrece žaludečních žláz je nutná vysoká dávka atropinu. U očí atropin způsobuje dlouhodobou mydriázu (rozšíření oční zornice), akomodaci a zvýšení nitroočního tlaku. U srdce působí příznivě při poruchách rytmu. U hladkého svalstva uvolňuje křeče (spasmolytikum). Na centrální nervovou soustavu působí až v relativně vysokých dávkách. Způsobuje neklid, podráždění, halucinace, záškuby až křeče. Vysoké dávky atropinu také vyvolávají hypertermii, především blokádou pocení. Můžeme jej zařadit i mezi antiparkinsonika, výrazně zlepšuje svalovou ztuhlost [9–11].

Při perorálním podání se atropin dobře absorbuje a dobře proniká biologickými membránami [13]. Přibližně 80–90% původní dávky je vyloučeno močí během 24 hodin, z toho připadá polovina na metabolity a polovina na nemetabolisovaný atropin. Stopová množství atropinu se vylučují i stolicí. Mezi nalezené metabolity atropinu patří tropin, kyselina tropová, noratropin, *N*-demethyltropin, *N*-demethylatropin, *p*-hydroxyatropin, *p*-hydroxyatropin *N*-oxid, glukuronidové konjugáty a sulfátové konjugáty atropinu, *N*-demethyltropin a *p*-hydroxyatropin [43, 44].

Přehled stanovení atropinu v jednotlivých matricích je uveden v tabulce 2.7.

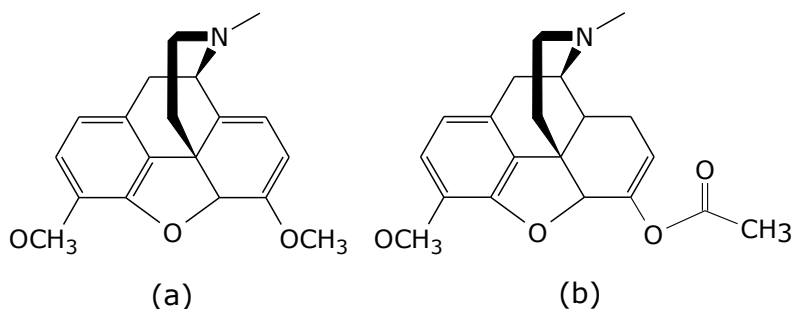
Tabulka 2.7

Vybraná stanovení atropinu v různých matricích chromatografickými metodami

vzorek	metoda	limit detekce [ng ml <sup>-1</sup> ]	citace
tablety	RPHPLC-UV	–	[45]
moč	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	5	[43]
moč	LC-UV, MS, NMR	–	[44]
moč	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	–	[46]
plazma	LC-MS (APCI <sup>+</sup> )	1	[47]
plazma	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	1	[47]

## 2.10 Thebain

Thebain (obr. 2.9) je opioidní alkaloid, dá se vyrobit i synteticky. Systematický název thebainu je (5 $\alpha$ )-6,7,8,14-tetrahydro-4,5-epoxy-3,6-dimethoxy-17-methylmorfinan, CASN 115-37-7. Sumární vzorec thebainu je C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub> a relativní molekulová hmotnost 311,4. Je to bílý prášek s teplotou tání 193 °C. Je rozpustný v horkém ethanolu, chloroformu a benzenu, hůře rozpustný v etheru a velmi špatně se rozpouští ve vodě.



Obr. 2.9 Chemická struktura (a) thebainu a (b) thebakonu.

Mezi deriváty thebainu patří acetyldemethylhydrothebain neboli thebakon. Systematický název thebakonu je (5 $\alpha$ )-6,7didehydro-4,5-epoxy-3-methoxy-17-methylmorfinan-6-ol acetát, CASN 466-90-0. Sumární vzorec je C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub> a relativní molekulová hmotnost 341,4. Je to bílý prášek s teplotou tání 154 °C. Je rozpustný v ethanolu, chloroformu a etheru, prakticky nerozpustný ve vodě. Mezi jeho soli patří thebakon hydrochlorid, který je znám pod farmaceutickým názvem Acedicon. Jeho bílé krystalky jsou rozpustné ve vodě a tají v rozmezí teplot 132–135 °C, při nichž dochází k úplnému rozkladu [13].

Thebain je jedním z vedlejších alkaloidů vyskytujících se v opiu, izoluje se jako odpadní produkt při extrakci morfinu z opia. Jeho obsah v máku setém (*Papaver somniferum*) je přibližně 0,2%. Vedle máku setého známe i mák listenatý neboli thebainový (*Papaver bracteatum*), jehož hlavním alkaloidem je právě thebain. Tento mák má semena bílá a jeho využití není tak široké jako u máku setého.

Thebain je užíván jako složka analgetik, především těch nenávykových. Acedicon je poměrně málo užívaným analgetikem. Má asi poloviční analgetickou účinnost než morfin, ve srovnání s kodeinem je čtyřikrát účinnější. Kromě tlášení bolesti tlumí také kašel. Denní dávka je obvykle 10–30 mg.

V játrech je thebakon metabolizován na thebain. Hlavním metabolitem thebainu je oripavin (3-O-demethylthebain), který se následnou O-demethylací rozpadá postupně na kodein a dále na morfin. Mezi další metabolity thebainu patří nororipavin (3-O,N-di-demethylthebain) a northebain. Volný thebain a jeho metabolity se vylučují močí během 96 hodin, stopové množství je vyloučeno stolicí [14, 48, 49].

Přehled analytických technik pro stanovení thebainu v různých maticích podává tabulka 2.8.

Tabulka 2.8

Vybraná stanovení thebainu v různých maticích chromatografickými metodami

matrice	metoda	limit kvantifikace [ng ml <sup>-1</sup> ]	citace
komerční vzorek	TLC-MS/MS	-	[15]
komerční vzorek	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	-	[16]
komerční vzorek	LC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> )	-	[53]
moč	LC-MS (APCI <sup>+</sup> )	0,3	[54]

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Analyzované vzorky historických léčivých přípravků

Studované vzorky historických léčivých přípravků byly získány z Českého farmaceutického muzea v Kuksu, část vzorků pocházela ze sbírek Katedry analytické chemie PřF UK. Podmínky skladování vzorků nebyly přesně známy, předpokládá se jejich uložení v temnu při laboratorní teplotě. Datace vzorků byla provedena buď na základě vytištěné šarže, nebo v některých případech jen přibližně podle informací na obalu (podle názvu firmy a udané ceny). Vzorky lze rozdělit do dvou skupin podle druhu lékové formy (tablety a injekční roztoky) a dále podle účinné látky.

#### 3.1.1 Analyzované vzorky tablet

Perorální tablety „Codein phosphoric. Dr. Heisler 0,05 g“ (obr. 3.1) byly vyrobeny v rozmezí let 1944–1945. Analyzované tablety byly lehce nažloutlé barvy, deklarovaný obsah fosforečnanu kodeinu byl 0,05 g v jedné tabletě.



Obr. 3.1 Obal analyzovaného historického léčivého přípravku kodeinu „Codein phosphoric. Dr. Heisler 0,05 g“ z let 1944–1945.

Tablety s hydrochloridem ethylmorfinu, jako účinnou látkou, byly k dispozici v několika druzích (obr. 3.2). První druh představovaly perorální tablety „Diolan“ vyrobené firmou Spolek pro chemickou a hutní výrobu (SChHV) v rozmezí let 1944–1945. Analyzované tablety byly nažloutlé barvy, deklarovaný obsah byl 0,01 g,

0,015 g nebo 0,03 g hydrochloridu ethylmorfinu v jedné tabletě. Druhým druhem byly perorální tablety „Diolan“ vyrobené firmou Slovakofarma Hlohovec v roce 1952. Analyzovaná tableta byla bílé barvy, deklarovaný obsah hydrochloridu ethylmorfinu byl 0,03 g v jedné tabletě. Třetím druhem byly perorální tablety „Diolan“ vyrobené firmou Spofa v roce 1991. Analyzovaná tableta byla bílé barvy, deklarovaný obsah hydrochloridu ethylmorfinu byl 0,03 g v jedné tabletě.



Obr. 3.2 Obaly analyzovaných historických léčivých přípravků hydrochloridu ethylmorfinu: (a) „Diolan“ 0,01 g z let 1944–1945, (b) „Diolan“ 0,015 g z let 1944–1945, (c) „Diolan“ 0,03 g z let 1944–1945, (d) „Diolan“ 0,03 g z roku 1952, (e) „Diolan“ 0,03 g z roku 1991.

Perorální tablety „Papaverin-Thesal“ (obr. 3.3) byly vyrobeny firmou Spofa v roce 1954. Analyzovaná tableta byla lehce šedého zbarvení, deklarovaný obsah účinných látek byl 0,3 g theobrominu a 0,025 g hydrochloridu papaverinu v jedné tabletě.



Obr. 3.3 Obal analyzovaného historického léčivého přípravku papaverinu a theobrominu „Papaverin-Thesal“ z roku 1954.

Perorální tablety „Dilaudid hydr.“ (obr. 3.4) byly vyrobeny jako klinický vzorek firmou Sanomedica (Praha) v roce 1941. Analyzovaná tableta byla bílé barvy, deklarovaný obsah hydrochloridu hydromorfonu byl 0,0025 g v jedné tabletě.



Obr. 3.4 Obal analyzovaného historického léčivého přípravku hydrochloridu hydromorfonu „Dilaudid hydr.“ z roku 1941.

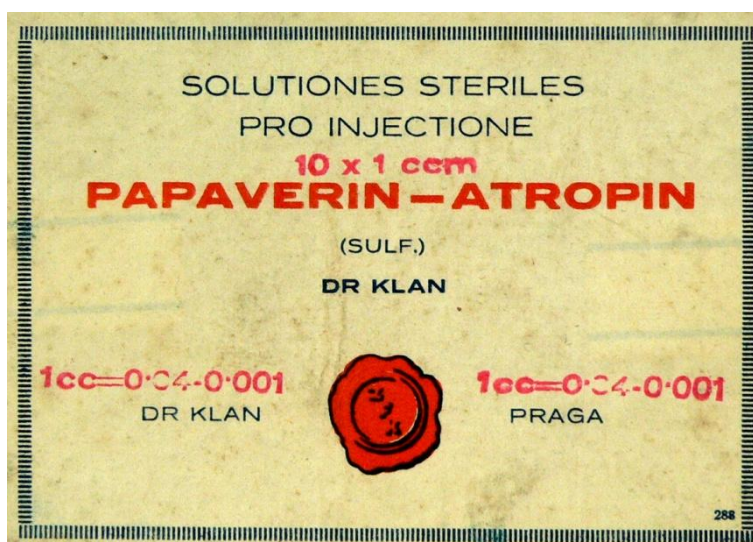
### 3.1.2 Analyzované vzorky injekčních roztoků

Injekční roztok „Morphin-Atropin pro injectione Dr. Heisler“ (obr. 3.5) byl vyrobený firmou Spojené farmaceutické závody (Chrast u Chrudimi) v rozmezí let 1946–1948. Analyzovaným vzorkem byl čirý roztok o objemu 1 ml uchovávaný v zatavené skleněné ampulce, deklarovaná koncentrace byla 0,02 g ml<sup>-1</sup> hydrochloridu morfinu a 0,0002 g ml<sup>-1</sup> síranu atropinu.



Obr. 3.5 Obal analyzovaného historického léčivého přípravku „Morphin-Atropin pro injectione Dr. Heisler“ z let 1946–1948.

Injekční roztok „Papaverin-Atropin“ (obr. 3.6) byl vyroben firmou Dr. Klan (Praha) v rozmezí let 1937–1945. Analyzovaným vzorkem byl nažloutlý roztok o objemu 1 ml uchovávaný v zatavené skleněné ampulce, deklarovaná koncentrace byla  $0,04 \text{ g ml}^{-1}$  síranu papaverinu a  $0,001 \text{ g ml}^{-1}$  síranu atropinu.



Obr. 3.6 Obal analyzovaného historického léčivého přípravku „Papaverin-Atropin“ z let 1937–1945.

Injekční roztok „Acedicon“ (obr. 3.7) byl vyroben firmou C. H. Boehringer Sohn, Hamburk, v rozmezí let 1930–1939. Analyzovaným vzorkem byl čirý roztok o objemu 1 ml uchovávaný v zatavené skleněné ampulce, deklarovaná koncentrace byla  $0,01 \text{ g ml}^{-1}$  acetyldemethyldihydrothebainu hydrochloridu.



Obr. 3.7 Obal analyzovaného historického léčivého přípravku „Acedicon“ z let 1930–1939.

### 3.2 Použité chemikálie

Ke kvantifikaci účinných látek analyzovaných historických lékových forem byly použity následující standardy: hemihydrát fosforečnanu kodeinu Ph. Eur. 2012 97% (Zentiva), papaverin hydrochlorid  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich), monohydrát síranu atropinu  $\geq 97\%$  (Sigma-Aldrich), theobromin  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich).

Ostatní použité chemikálie byly (pokud není udáno jinak) analytické čistoty: acetonitril pro HPLC (Lach-Ner), amoniak 25% vodný roztok (Lach-Ner), diethylether (Merck), hydroxid sodný (Lachema), chlorid sodný (Lachema), methanol pro HPLC (Lach-Ner), chloroform pro HPLC (Lach-Ner), mravenčí kyselina 86% (Lachema), pyridin (Sigma-Aldrich), síran hořečnatý bezv. (Lachema), směs *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu a trimethylchlorosilanu 99:1 (Supelco).

### 3.3 Postupy měření a vyhodnocování výsledků

#### 3.3.1 Použité přístroje

K vážení byly použity analytické váhy Kern ALJ 220-4 (Německo). Při rozpouštění byla požívána ultrazvuková lázeň Sonorex Bandelin (Německo). Roztoky byly pipetovány pomocí automatických pipet Biohit Proline (Finsko). K měření pH byl

použit pH metr IQ 125 (Scientific Instruments, USA). Roztoky byly filtrovány pomocí filtrů Iso-Disc Filters N-13-2, Nylon 13 mm × 0,2 μm (Supelco, USA).

Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí byla měřena na chromatografu HP 1100 (Hewlett-Packard) s vnitřním diode-array detektorem, spojeným s hmotnostním spektrometrem Bruker Esquire 3000 s iontovou pastí a ESI inoizací.

Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí byla měřena na plynovém chromatografu QP 2010 spojeném s jednoduchým kvadrupólem s elektronovou ionizací (Shimadzu). Byla použita kolona DB5 o délce 25 m, vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 μm a nosným plynem bylo He 5.1.

### 3.3.2 Analýza vzorku kodeinu

Analyzovaná tableta byla zhomogenizována v třecí misce, bylo odváženo asi 100 mg přesně a rozpuštěno v 50,00 ml acetonitrilu v odměrné baňce. Rozpuštěný vzorek byl přefiltrován.

Naředěný vzorek byl analyzován metodou HPLC-MS na koloně Prontosil C<sub>18</sub> o délce 200 mm, průměru 2 mm a velikosti zrn 3 μm. Teplota kolony byla nastavena na 25 °C. Byla použita izokratická eluce s mobilní fází acetonitril a 10 mM mravenčanový pufr o pH = 3,00 (50:50, v/v). Průtok mobilní fáze byl 0,200 ml min<sup>-1</sup>. Bylo dávkováno 10 μl vzorku a celková doba analýzy byla 6 min. Detekce probíhala při vlnové délce 285 nm. Za DAD detektor byl sériově připojen hmotnostní spektrometr s ESI ionizací v pozitivním módu. Jako zmlžovací plyn byl použit dusík (40 psi). Jako sušící plyn byl použit dusík s průtokem 7,5l min<sup>-1</sup> o teplotě 315 °C a napětí na kapiláře 4kV. Rozsah měření byl 50–600 *m/z*.

### 3.3.3 Analýza vzorku ethylmorfinu

Analyzovaná tableta byla zhomogenizována v třecí misce, bylo odváženo asi 10 mg přesně a rozpuštěno v 5,00 ml acetonitrilu v odměrné baňce. Rozpuštěný vzorek byl přefiltrován.

Naředěný vzorek byl analyzován metodou HPLC-MS na koloně Watrex RP C<sub>18</sub> o délce 250 mm, průměru 4 mm a velikosti zrn 5 μm. Teplota kolony byla nastavena na 25 °C. Byla použita izokratická eluce s mobilní fází acetonitril a 10 mM mravenčanový pufr o pH = 3,00 (40:60, v/v). Průtok mobilní fáze byl 0,650 ml min<sup>-1</sup>. Bylo dávkováno

10  $\mu\text{l}$  vzorku a celková doba analýzy byla 15 min. Detekce probíhala při vlnové délce 284 nm. Za DAD detektor byl sériově připojen hmotnostní spektrometr s ESI ionizací v pozitivním módu. Jako zmlžovací plyn byl použit dusík (45 psi). Jako sušící plyn byl použit dusík s průtokem  $8,5 \text{ l min}^{-1}$  o teplotě  $325 \text{ }^\circ\text{C}$  a napětí na kapiláře 4kV. Rozsah měření byl 50–700  $m/z$ .

#### 3.3.4 Analýza vzorku papaverinu a theobrominu

Analyzovaná tableta byla zhomogenizována v třecí misce. Pro stanovení papaverinu bylo odváženo asi 25 mg přesně a rozpuštěno v 5,00 ml směsi acetonitril–voda (1:1, v/v) v odměrné baňce. Rozpuštěný vzorek byl přefiltrován. Pro stanovení theobrominu bylo odváženo asi 10 mg přesně a rozpuštěno v 50 ml směsi acetonitril–voda (1:1, v/v) v odměrné baňce. Rozpuštěný vzorek byl přefiltrován a 0,50 ml filtrátu bylo zředěno acetonitrem v odměrné baňce na celkový objem 10,00 ml.

Naředěný vzorek byl analyzován metodou HPLC-MS na koloně Watrex RP  $\text{C}_{18}$  o délce 250 mm, průměru 4 mm a velikosti zrn  $5 \mu\text{m}$ . Teplota kolony byla nastavena na  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Byla použita izokratická eluce s mobilní fází acetonitril a 10 mM mravenčanový pufr o  $\text{pH} = 3,00$  (50:50, v/v). Průtok mobilní fáze byl  $0,650 \text{ ml min}^{-1}$ . Bylo dávkováno 10  $\mu\text{l}$  vzorku a celková doba analýzy byla v případě papaverinu 10 min v případě theobrominu 15 min. Detekce papaverinu probíhala při vlnové délce 240 nm, v případě analýzy theobrominu byla použita vlnová délka 272 nm. Za DAD detektor byl sériově připojen hmotnostní spektrometr s ESI ionizací v pozitivním módu. Jako zamlžovací plyn byl použit dusík (45 psi). Jako sušící plyn byl použit dusík s průtokem  $8,5 \text{ l min}^{-1}$  o teplotě v případě papaverinu  $325 \text{ }^\circ\text{C}$  v případě theobrominu  $315 \text{ }^\circ\text{C}$  a napětí na kapiláře 4kV. Rozsah měření byl 50–600  $m/z$ .

#### 3.3.5 Analýza vzorku dilaudid chloridu

Analyzovaná tableta byla zhomogenizována v třecí misce, bylo odváženo asi 10 mg přesně a rozpuštěno v 10,00 ml směsi acetonitril–voda (1:1, v/v) v odměrné baňce. Rozpuštěný vzorek byl přefiltrován a 1,00 ml filtrátu bylo zředěno acetonitrem v odměrné baňce na celkový objem 10,00 ml.

Naředěný vzorek byl analyzován metodou HPLC-MS na koloně Watrex RP  $\text{C}_{18}$  o délce 250 mm, průměru 4 mm a velikosti zrn  $5 \mu\text{m}$ . Teplota kolony byla nastavena na

25 °C. Byla použita izokratická eluce s mobilní fází acetonitril a 10 mM mravenčanový pufr o pH = 3,00 (40:60, v/v). Průtok mobilní fáze byl 0,650 ml min<sup>-1</sup>. Bylo dávkováno 20 µl vzorku a celková doba analýzy byla 15 min. Detekce probíhala při vlnové délce 280 nm. Za DAD detektor byl sériově připojen hmotnostní spektrometr s ESI ionizací v pozitivním módu. Jako zmlžovací plyn byl použit dusík (45 psi). Jako sušící plyn byl použit dusík s průtokem 8,5 l min<sup>-1</sup> o teplotě 325 °C a napětí na kapiláře 4kV. Rozsah měření byl 50–700 *m/z*.

### 3.3.6 Analýza vzorku morfinu a atropinu

Z analyzovaného roztoku bylo odpipetováno 10 µl a bylo zředěno acetonitrem v odměrné baňce na celkový objem 10,00 ml.

Naředěný vzorek byl analyzován metodou HPLC-MS na koloně Supelcosil RP C<sub>18</sub> o délce 150 mm, průměru 4,6 mm a velikosti zrn 5 µm. Teplota kolony byla nastavena na 25 °C. Byla použita gradientová eluce s mobilní fází acetonitril a 10 mM mravenčanový pufr o pH = 3,00. Bylo dávkováno 5 µl vzorku a celková doba analýzy byla 25 min. Detekce probíhala při vlnové délce 252 a 269 nm. Za DAD detektor byl sériově připojen hmotnostní spektrometr s ESI ionizací v pozitivním módu. Jako zmlžovací plyn byl použit dusík (45 psi). Jako sušící plyn byl použit dusík s průtokem 8,5 l min<sup>-1</sup> o teplotě 325 °C a napětí na kapiláře 4kV. Rozsah měření byl 50–600 *m/z*.

### 3.3.7 Analýza vzorku papaverinu a atropinu

Z analyzovaného roztoku bylo odpipetováno 5 µl a zředěno 10,00 ml acetonitrem v odměrné baňce. Dále bylo 0,10 ml takto připraveného roztoku zředěno acetonitrem v odměrné baňce na celkový objem 10,00 ml.

Naředěný vzorek byl analyzován metodou HPLC-MS na koloně Watrex C<sub>18</sub> o délce 250 mm, průměru 4 mm a velikosti zrn 5 µm. Teplota kolony byla nastavena na 25 °C. Byla použita gradientová eluce s mobilní fází acetonitril a 10 mM mravenčanový pufr o pH = 3,00. Bylo dávkováno 10 µl vzorku a celková doba analýzy byla 25 min. Detekce probíhala při vlnové délce 252 nm. Za DAD detektor byl sériově připojen hmotnostní spektrometr s ESI ionizací v pozitivním módu. Jako zmlžovací plyn byl použit dusík (45 psi). Jako sušící plyn byl použit dusík s průtokem 8,5 l min<sup>-1</sup> o teplotě 325 °C a napětí na kapiláře 4kV. Rozsah měření byl 50–600 *m/z*.

### 3.3.8 Analýza vzorku acetyldemethyldihydrothebainu

Z analyzovaného roztoku bylo odpipetováno 10  $\mu\text{l}$  a bylo zředěno vodou v odměrné baňce na celkový objem 10,00 ml.

Naředěný vzorek byl analyzován metodou HPLC-MS na koloně Watrex RP C<sub>18</sub> o délce 250 mm, průměru 4 mm a velikosti zrn 5  $\mu\text{m}$ . Teplota kolony byla nastavena na 25 °C. Byla použita izokratická eluce s mobilní fází acetonitril a 10 mM mravenčanový pufr o pH = 3,00 (40:60, v/v). Průtok mobilní fáze byl 0,650 ml min<sup>-1</sup>. Bylo dávkováno 10  $\mu\text{l}$  vzorku a celková doba analýzy byla 25 min. Detekce probíhala při vlnové délce 281 nm. Za DAD detektor byl sériově připojen hmotnostní spektrometr s ESI ionizací v pozitivním módu. Jako zmlžovací plyn byl použit dusík (45 psi). Jako sušící plyn byl použit dusík s průtokem 8,5 l min<sup>-1</sup> o teplotě 325 °C a napětí na kapiláře 4kV. Rozsah měření byl 50–600 *m/z*.

Z analyzovaného roztoku bylo odebráno 0,50 ml a přidáno 50  $\mu\text{l}$  vodného roztoku amoniaku o koncentraci 25 %. Tím došlo k převedení analyzovaného roztoku na bázi. K této směsi bylo přidáno 0,50 ml destilované vody, 1,00 ml diethyletheru a 0,5 mg chloridu sodného. Po protřepání a oddělení fází byla odebrána vrchní organická část. Po přidávku 0,5 mg síranu hořečnatého byl roztok odpařen do sucha proudem argonu. Následně byl vzorek derivatizací upraven pro GC-MS analýzu. K odparku bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  pyridinu a 50  $\mu\text{l}$  směsi *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu a trimethylchlorosilanu. Roztok byl zahřát na 80 °C a sonifikován po dobu 30 minut. Poté byl vzorek odpařen do sucha v proudu argonu a následně rozpuštěn ve 100  $\mu\text{l}$  chloroformu.

Nasilylovaný vzorek byl analyzován metodou GC-MS na koloně DB5 o délce 25 m, vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25  $\mu\text{m}$ . Teplota kolony byla nastavena na 100 °C. Teplota injektoru byla 250 °C. Průtok mobilní fáze (Helium) v koloně byl 0,53 ml min<sup>-1</sup>. Hodnota tlaku byla nastavena na 100 kPa. Bylo dávkováno 6  $\mu\text{l}$  vzorku a celková doba analýzy byla 11 min. K analýze eluovaných látek byl použit hmotnostní spektrometr s elektronovou ionizací. Teplota iontového zdroje byla 200 °C a teplota interface byla 280 °C. Rozsah měření byl 35–400 *m/z*.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Analýza tablet „Codeinphosphoric. Dr. Heisler 0,05 g“

#### 4.1.1 Optimalizace chromatografických podmínek

Analýza vzorku perorálních tablet kodeinu byla prováděna metodou HPLC/MS. Při optimalizaci metody jsem vycházela z dříve publikovaných prací, jejichž přehled je podán výše v kap. 2.3. Nejprve jsem se zaměřila na výběr nejvhodnější stacionární fáze s ohledem na její celkovou selektivitu. Vzhledem k charakteru analytu a s využitím informací z literatury jsem se rozhodla pro RP-HPLC chromatografii.

Jako první jsem testovala kolonu Supelco RP C<sub>18</sub> o délce 150 mm, vnitřním průměru 4,6 mm a velikostí zrn 5 μm. Mobilní fází byla směs methanol–voda testovaná v různých poměrech MeOH:H<sub>2</sub>O (90:10, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 50:50, 25:75). Získané chromatogramy vykazovaly symetrický a úzký pík kodeinu, ale analyzovaná látka měla relativně krátký retenční čas ležící v blízkosti píku odpovídajícímu mrtvému času.

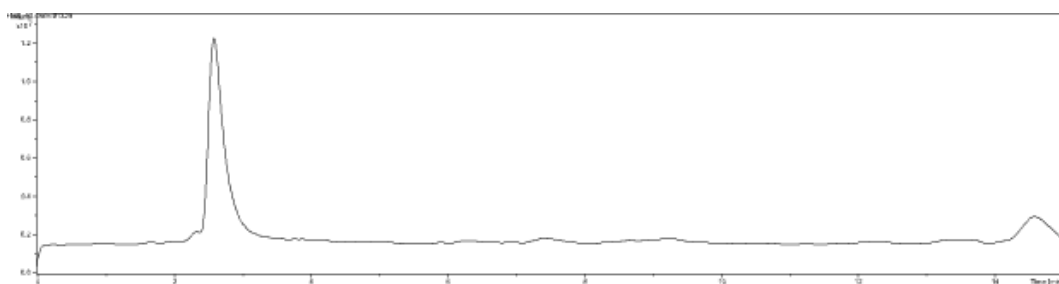
Z tohoto důvodu jsem přešla k testování kolony Watrex RP C<sub>18</sub> o délce 250 mm, vnitřním průměru 4 mm a velikosti zrn 5 μm. Nejprve jsem použila izokratickou eluci s mobilní fází ve složení methanol–voda v různých poměrech MeOH:H<sub>2</sub>O (90:10, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90). Bylo zjištěno, že separační proces probíhá mnohem lépe v mírně kyselém prostředí a proto jsem přešla k mobilní fázi tvořené acetonitrilem a mravenčanem amonným (10mM) okyseleným na pH = 3,00 mravenčí kyselinou. Byly testovány následující poměry organické a vodné fáze 20:80, 30:70, 35:65, 40:60 a 50:50, jako optimální poměr byl stanoven 50% organické fáze a 50% vodné fáze. Dále byl testován vliv průtokové rychlosti mobilní fáze na separační účinnost kolony. Rychlost průtoku byla variována v intervalu 0,3–0,7 ml min<sup>-1</sup> a bylo sledováno retenční chování analytu. Bohužel se ukázalo, že průtoková rychlost, která by byla optimální z hlediska chromatografie je příliš vysoká s ohledem na použitou hmotnostní detekci s ESI ionizací.

Proto byla k separaci použita kolona s menším vnitřním průměrem a jemnější zrnitostí, konkrétně kolona Prontosil C<sub>18</sub> o délce 200 mm, vnitřním průměru 2 mm a

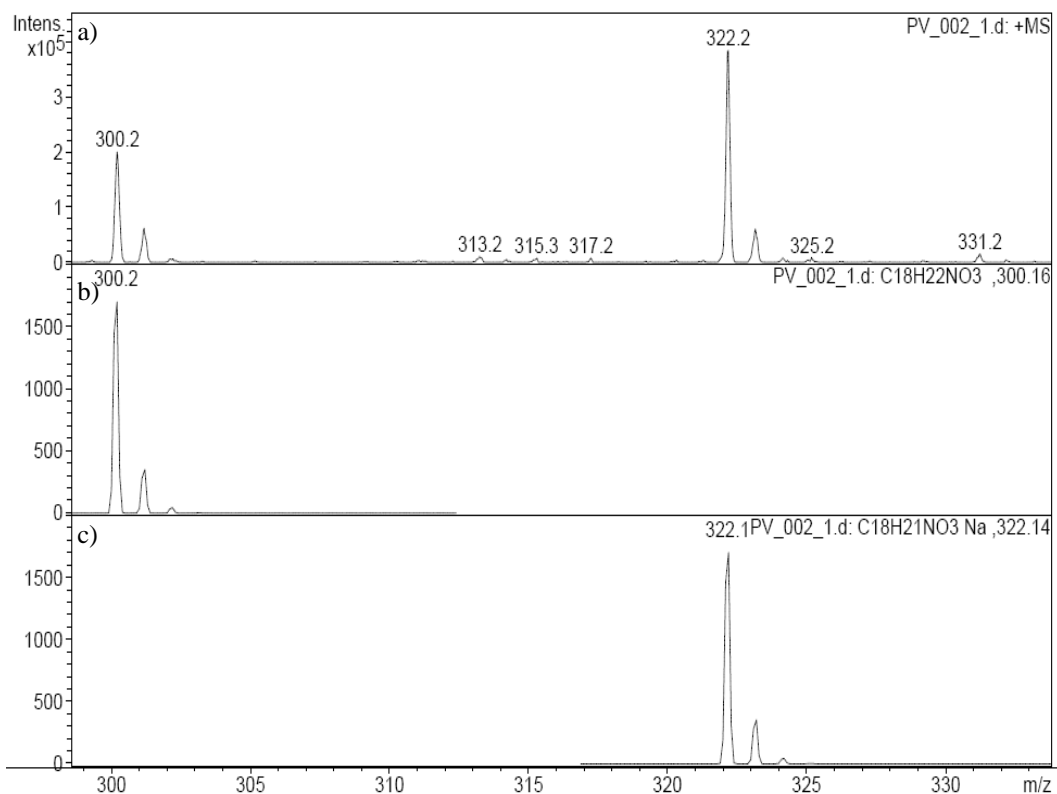
velikosti zrn  $3\mu\text{m}$ . Byla použita izokratická eluce s mobilní fází acetonitril a 10mM mravenčanový pufr o  $\text{pH} = 3,00$  (50:50, v/v). Průtok mobilní fáze byl 0,2 ml/min.

#### 4.1.2 Identifikace látek ve vzorku a interpretace hmotnostních spekter

HPLC/MS chromatogram analyzovaného vzorku tablety kodeinu je zobrazen na obr. 4.1, kodeinu náleží pík s retenčním časem 2,6 min. Rozmytý pík s retenčním časem 14,5 min byl identifikován jako nečistota z methanolu ( $m/z = 365$ ), s analyzovaným vzorkem kodeinu tedy nesouvisí. Odpovídající hmotnostní spektrum píku kodeinu s hlavními ionty  $[\text{M}+\text{H}^+]$  je zobrazeno na obr. 4.2.

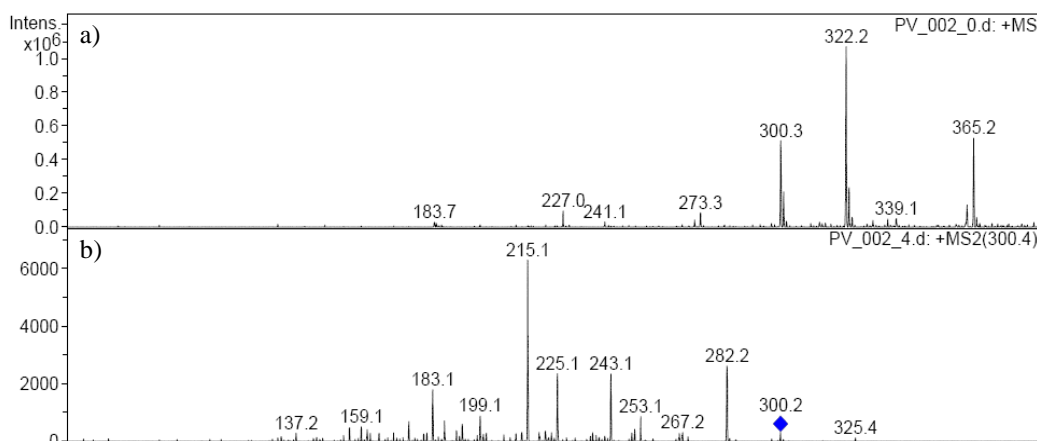


Obr. 4.1: HPLC/MS chromatogram analyzovaného vzorku tablety kodeinu na koloně Prontosil  $\text{C}_{18}$   $200 \times 2 \text{ mm} \times 3\mu\text{m}$  izokratickou elucí s mobilní fází acetonitril a 10mM mravenčanový pufr o  $\text{pH} = 3,00$  (50:50, v/v) s průtokem 0,200 ml/min,  $t_R$  kodeinu je 2,6 min.



Obr. 4.2: Hmotnostní spektra: a) naměřené spektrum eluovaného kodeinu z analyzovaného vzorku, b) vypočítané izotopické zastoupení iontu  $C_{18}H_{22}NO_3$ , c) nasimulované izotopické zastoupení pro iont  $C_{18}H_{21}NO_3Na$ .

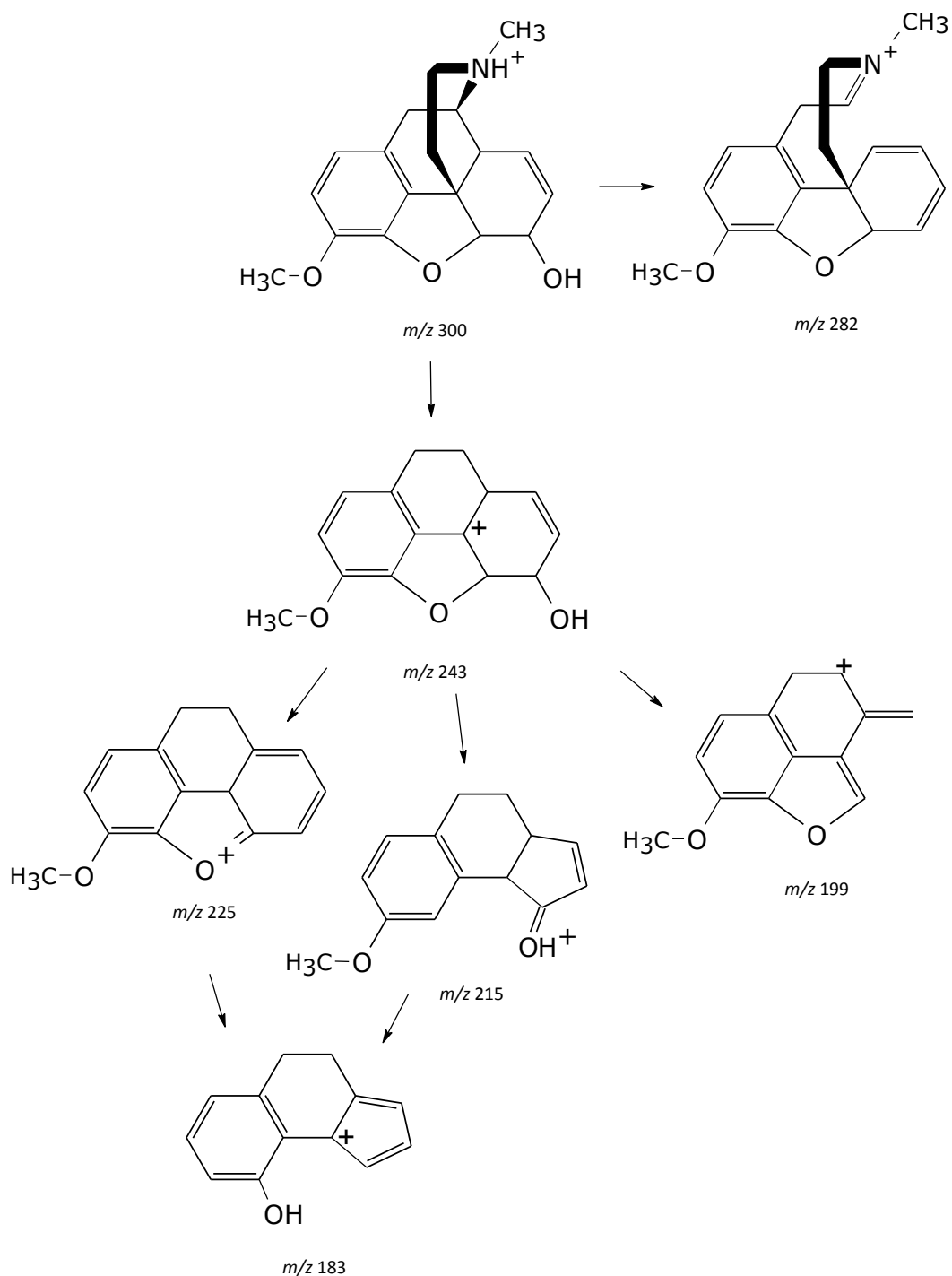
Z obrázku 4.2 je patrna dobrá shoda protonizovaného iontu kodeinu s teoretickým izotopovým zastoupením u iontu  $m/z = 300$  a iontu  $m/z = 322$ , který je aduktem se sodíkem. Dále bylo změřeno hmotnostní spektrum kodeinu, které je zobrazeno na obr. 4.3 a). Molekulární iont s hodnotou  $m/z$  300 náleží protonizovanému kodeinu ( $C_{18}H_{22}NO_3$ ), hodnota  $m/z$  322 odpovídá kodeinu se sodíkem ( $C_{18}H_{21}NO_3Na$ ), hodnota  $m/z$  621 odpovídá dimeru kodeinu se sodíkem ( $C_{36}H_{42}N_2O_6Na$ ). Molekulární iont s hodnotou  $m/z$  365 nenáleží ke kodeinu, tento iont byl identifikován jako nečistota z rozpouštědla.



Obr. 4.3: Hmotnostní spektrum analyzovaného vzorku tablety kodeinu ESI ionizací v pozitivním módu: a) HPLC/MS/MS spektrum kodeinu, b) dceřiné spektrum vznikající z iontu  $m/z = 300$ .

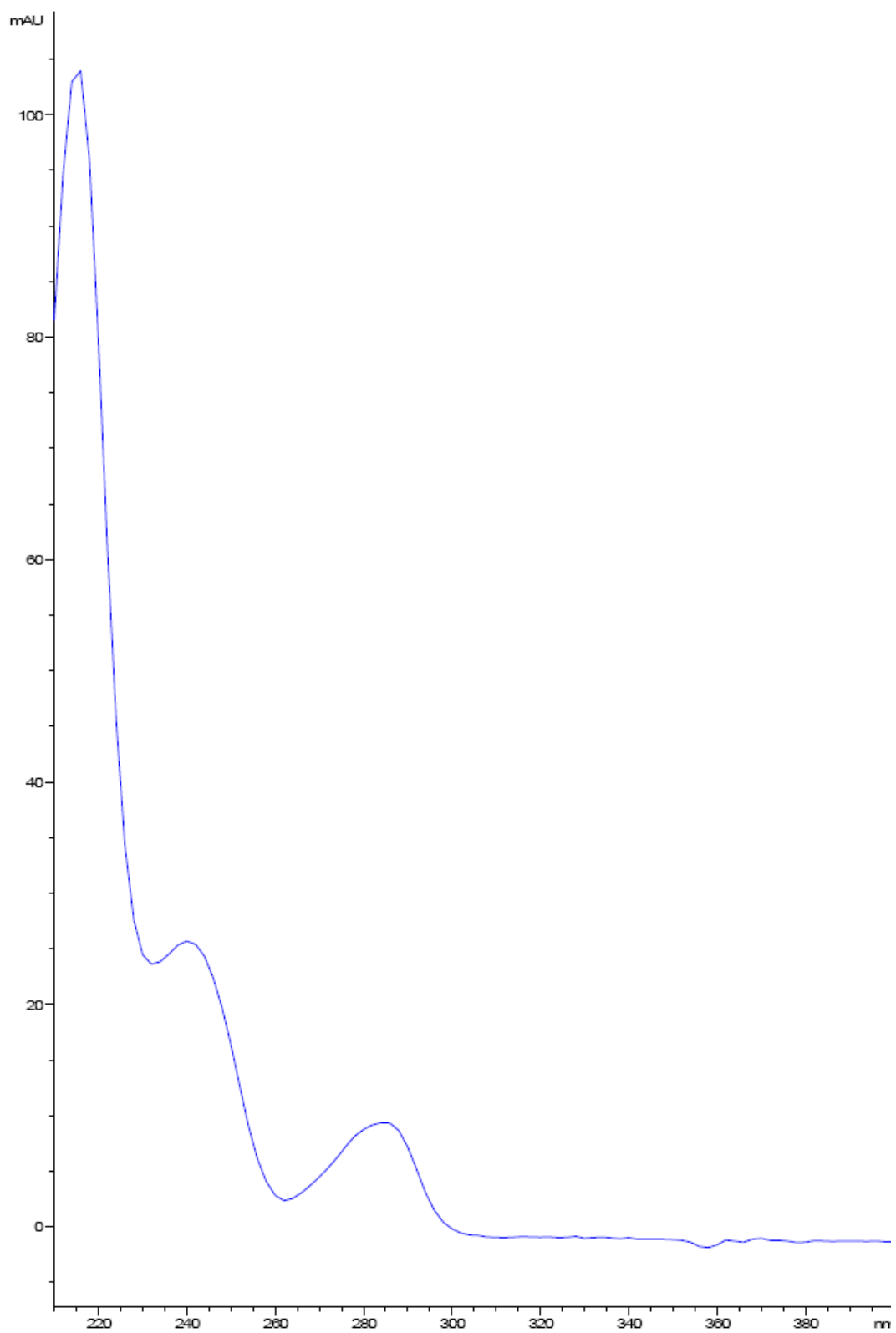
Pro potvrzení identity píku  $m/z = 300$  byla provedena MS/MS analýza. Jako prekurzor byl vybrán iont protonované molekuly kodeinu s hodnotou  $m/z = 300$ . Jeho fragmentací v iontové pasti vznikly produkty rozpadu, které jsou zaznamenány jako spektrum dceřiných iontů (obr. 4.3 b)). Hlavními rozpadovými produkty jsou ionty s hodnotami  $m/z$  282, 243, 225, 215, 199 a 183. Mechanismus fragmentace je uveden na obr. 4.4. Z prekurzorového iontu  $m/z = 300$  vzniká iont 243 odštěpením skupiny  $-\text{CH}_2\text{CHNHCH}_3$ , následujícím odštěpením molekuly vody vzniká iont 225. Z tohoto iontu odštěpením skupiny  $-\text{HCOCH}$  vzniká iont 183. Z iontu 243 vzniká iont 199 (odštěpením skupiny  $-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ ) a také 215 (odštěpením skupiny  $-\text{CO}$ ). Z iontu 215 vzniká iont 183 odštěpením skupiny  $-\text{CH}_3\text{OH}$ . Iont 282 vzniká odštěpením molekuly vody z prekurzorového iontu  $m/z = 300$ .

V porovnání s předchozí prací [8] byla namísto ionizace za atmosférického tlaku použita ionizace elektrosprejem. V tomto případě dochází k účinnější fragmentaci molekulárního iontu za vzniku vyššího počtu dceřiných iontů a tím se zvyšuje citlivost stanovení.



Obr. 4.4: Základní fragmentace protonizované molekuly kodeinu.

Identita kodeinu byla dále potvrzena porovnání UV spektra píku na chromatogramu (obr. 4.5), které se shodovalo se spektrem publikovaným v literatuře [13], zejména shodou absorpčních maxim (kodein ve slabě kyselém prostředí vykazuje tři absorpční maxima při vlnových délkách 215 nm, 240 nm a 285 nm).

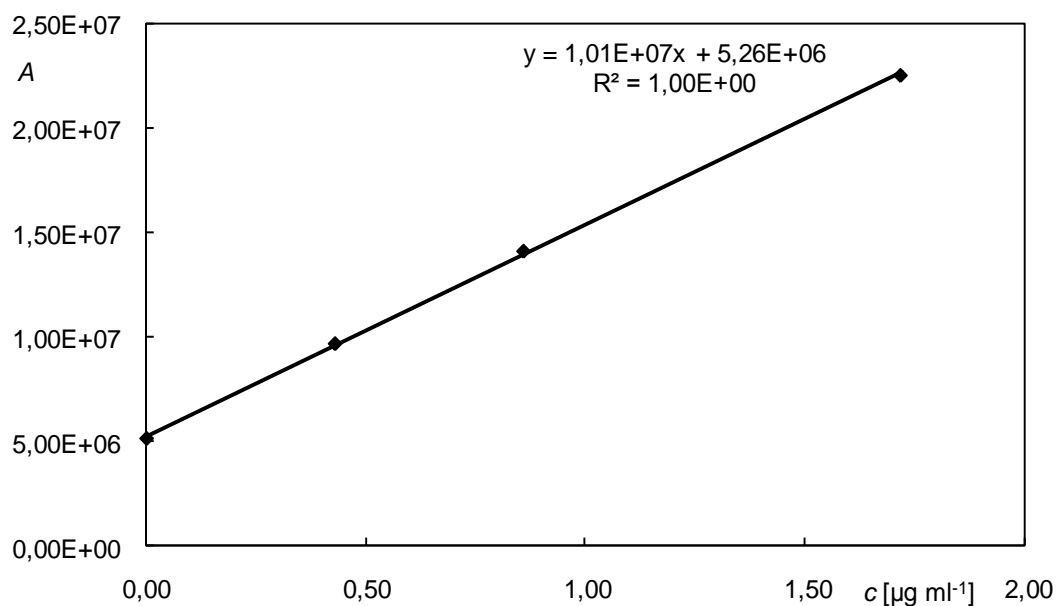


Obr. 4.5: UV spektrum kodeinu změřeno na DAD detektoru.

#### 4.1.3 Stanovení obsahu kodeinu ve vzorku

Stanovení obsahu kodeinu ve vzorku bylo provedeno metodou standardního přídatku na základě ploch chromatografických píků. Kalibrační přímka tohoto stanovení je zobrazena na obr. 4.6. Analyzovaná tableta kodeinu obsahovala  $49,0 \pm 0,4$  mg kodeinu, což odpovídá  $98,0 \pm 0,7$  % deklarované hodnoty (variační koeficient nepřesáhl 5%).

Hodnota nalezeného obsahu byla tedy shodná s deklarovanou hodnotou a to i po sedmdesáti letech skladování. Kodein v tabletě zůstal i po tolika letech stále stabilní, chromatografie neprokázala přítomnost žádných produktů degradace léčiva.



Obr. 4.6: Stanovení obsahu kodeinu v analyzovaném vzorku tablety metodou standardního přídatku - graf kalibrační závislosti plochy píků A na koncentraci analyzované látky  $c$  [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ].

## 4.2 Analýza tablet „Diolan“

### 4.2.1 Optimalizace chromatografických podmínek

Analýza vzorku perorálních tablet Diolanu s ethylmorfinem jako účinnou látkou byla prováděna metodou HPLC/MS. Při optimalizaci metody jsem vycházela z dříve publikovaných prací, jejichž přehled je podán výše v kap. 2.4. Nejprve jsem se zaměřila na výběr nejvhodnější stacionární fáze. Vzhledem k charakteru analytu a s využitím informací z literatury jsem se rozhodla pro RP-HPLC chromatografii. Proces optimalizace byl prováděn se vzorky připravenými z tablety Diolan 0,03g SChHV, protože u této tablety byl deklarován nejvyšší obsah účinné látky.

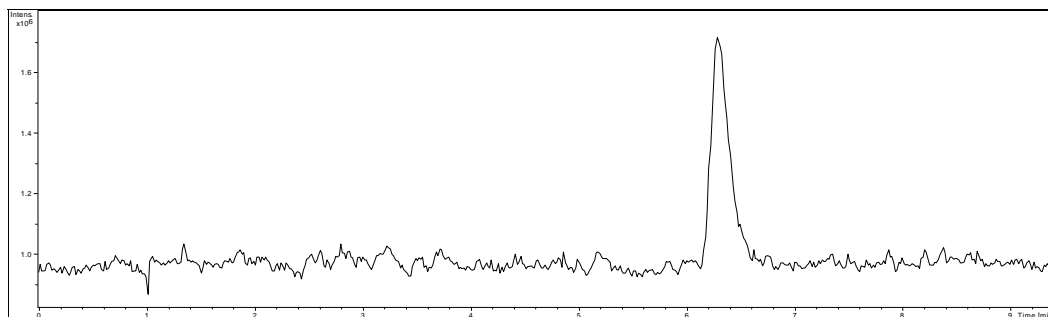
Na základě zkušeností z měření kodeinu jsem jako první testovala kolonu Prontosil C<sub>18</sub> o délce 200 mm, vnitřním průměru 2 mm a velikostí zrn 3 μm. Mobilní fází byla směs acetonitril–mravenčanový pufr (10mM, pH = 3,00) testovaná v poměru 50:50 a 60:40. Do všech měřených vzorků s ethylmorfinem byl přidáván kodein, jako vnitřní standard. Získané chromatogramy vykazovaly nesymetrický a „hrbolatý“ pík ethylmorfinu, který měl podobný eluční čas jako použitý vnitřní standard. Při pokusu o separování těchto dvou píků byla testována i gradientová eluce, kdy byl s časem měněn poměr organické a vodné fáze z původních 35% až do 65% organické fáze během 10 minut. Ani tato metoda však nepřispěla k lepšímu rozlišení.

Dále byla testována kolona Watrex C<sub>18</sub> o délce 250 mm, vnitřním průměru 4 mm a velikostí zrn 5 μm. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a mravenčanového pufru (10mM, pH = 3,00). Byly testovány následující poměry organické a vodné fáze: 20:80, 30:70, 35:65, 40:60 a 50:50, jako optimální poměr byl stanoven 40% organické fáze a 60% vodné fáze. Dále byl testován vliv průtokové rychlosti mobilní fáze na separační účinnost kolony. Rychlost průtoku byla variována v intervalu 0,30–0,70 ml min<sup>-1</sup> a bylo sledováno retenční chování analytu. Optimální průtoková rychlost byla určena na základě tlakových možností kolony a s ohledem na použitou hmotnostní detekci s ESI ionizací na 0,65 ml min<sup>-1</sup>.

### 4.2.2 Identifikace látek ve vzorku a interpretace hmotnostních spekter

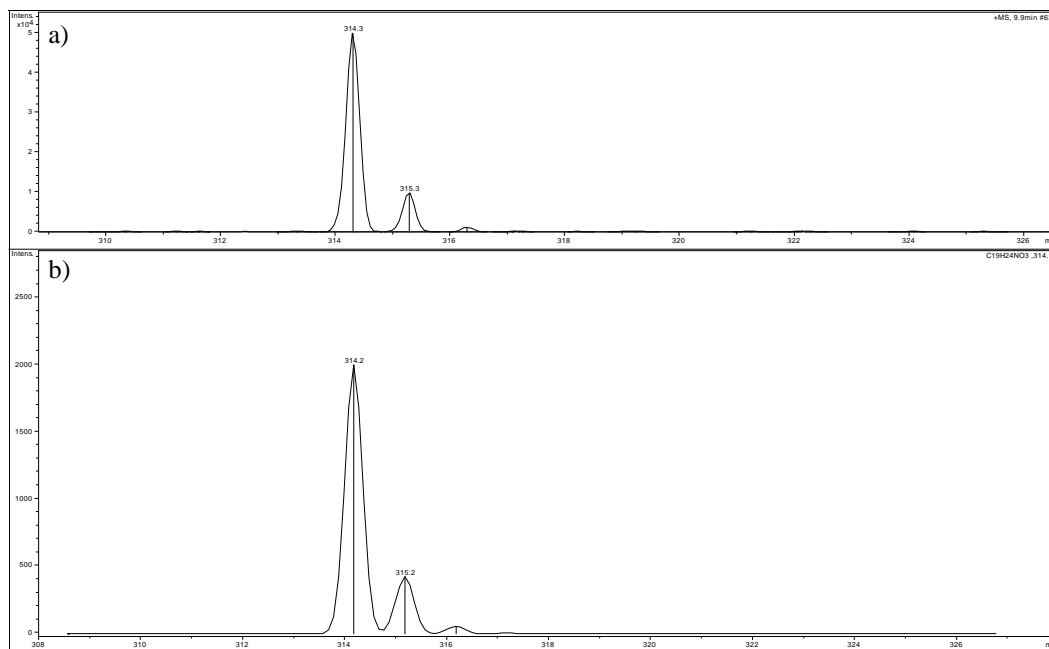
HPLC/MS chromatogram analyzovaného vzorku tablety diolanu je zobrazen na obr. 4.7, byl nalezen pouze jeden pík s retenčním časem 6,3 min. Ostatní malé píky

srovnatelné s velikostí šumu přísluší tetrabutylamoniu, nečistotě obožené v mravenčanovém pufru.



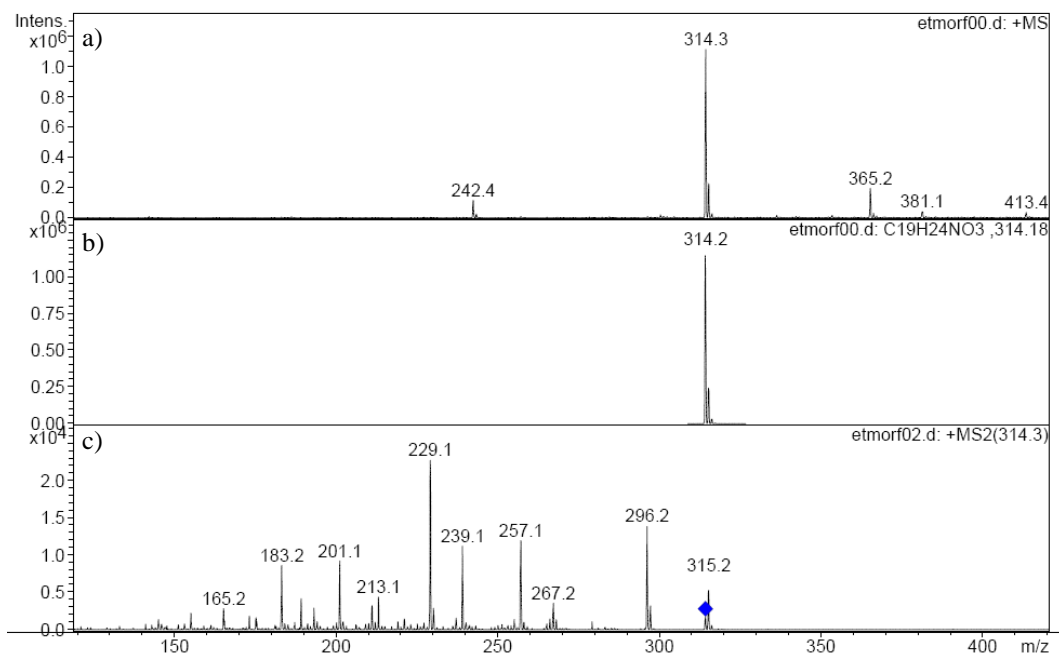
Obr. 4.7: HPLC/MS chromatogram analyzovaného vzorku tablety Diolanu 0,03 g (Spolek pro chemickou a hutní výrobu) na koloně Watrex RP C<sub>18</sub> 250 × 4 mm × 5 μm izokratickou elucí s mobilní fází acetonitril a 10 mM mravenčanový pufr o pH = 3,00 (40:60, v/v) s průtokem 0,650 ml min<sup>-1</sup>.

Odpovídající hmotnostní spektrum píku ethylmorfinu a jeho vypočítané izotopické zastoupení je zobrazeno na obr. 4.8, ze kterého je patrná dobrá shoda protonizovaného iontu ethylmorfinu (obr. 4.8 a)) s teoretickým izotopovým zastoupením u iontu  $m/z = 314$  (obr. 4.8 b)).



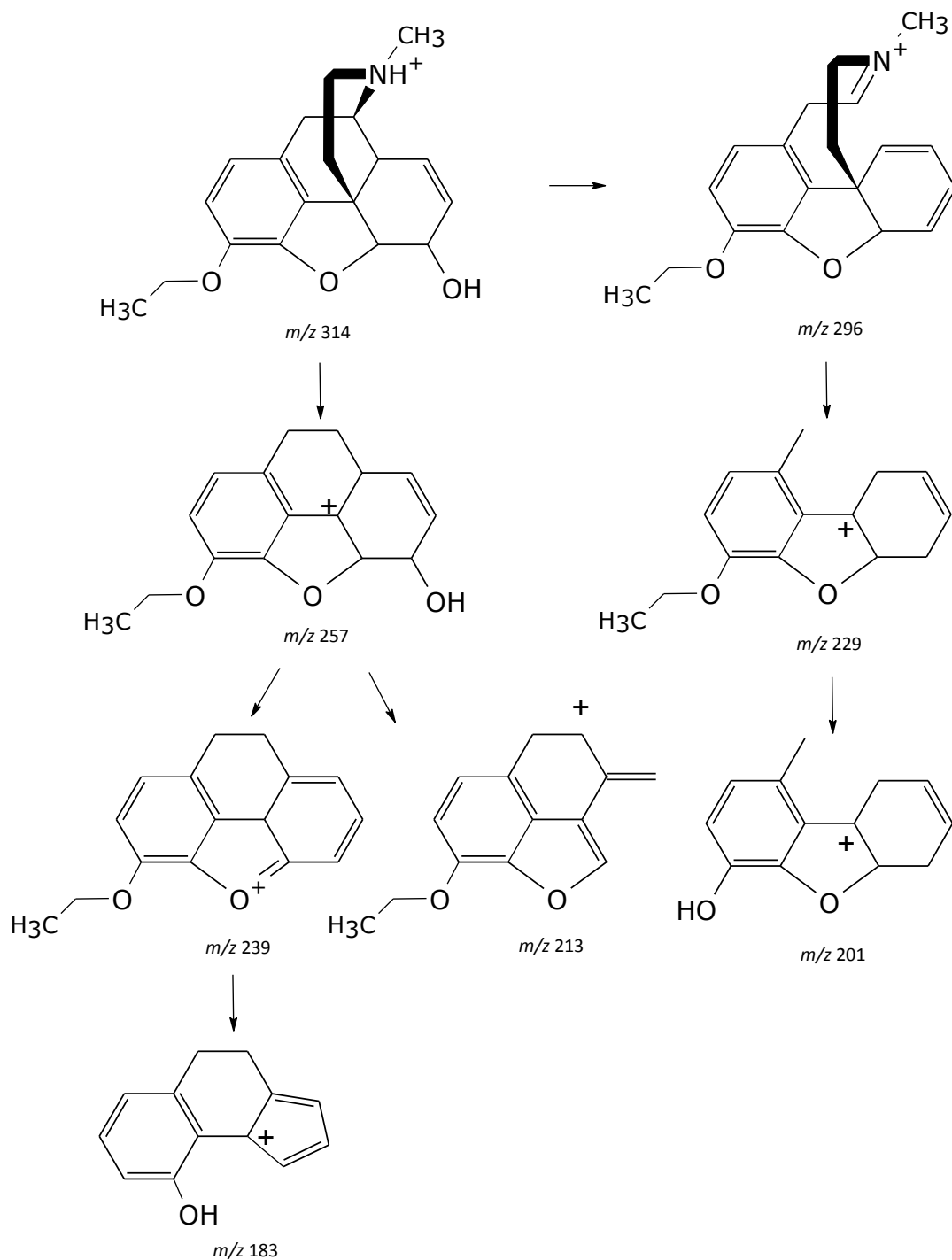
Obr. 4.8: Hmotnostní spektra: a) naměřené spektrum eluovaného ethylmorfinu z analyzovaného vzorku, b) vypočítané izotopické zastoupení iontu C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>3</sub>.

Dále bylo změřeno hmotnostní spektrum analyzovaného vzorku Diolanu, které je zobrazeno na obr. 4.9 a). Molekulární iont s hodnotou  $m/z$  314 náleží protonizovanému ethylmorfinu ( $C_{19}H_{24}NO_3$ ), hodnota  $m/z$  242 tetrabutylamoniu – nečistotě obsažené v mravenčanovém pufru. Molekulární ionty s hodnotou  $m/z$  365, 381 a 413 nenáleží k ethylmorfinu, tyto ionty byly identifikovány jako nečistoty z rozpouštědla.



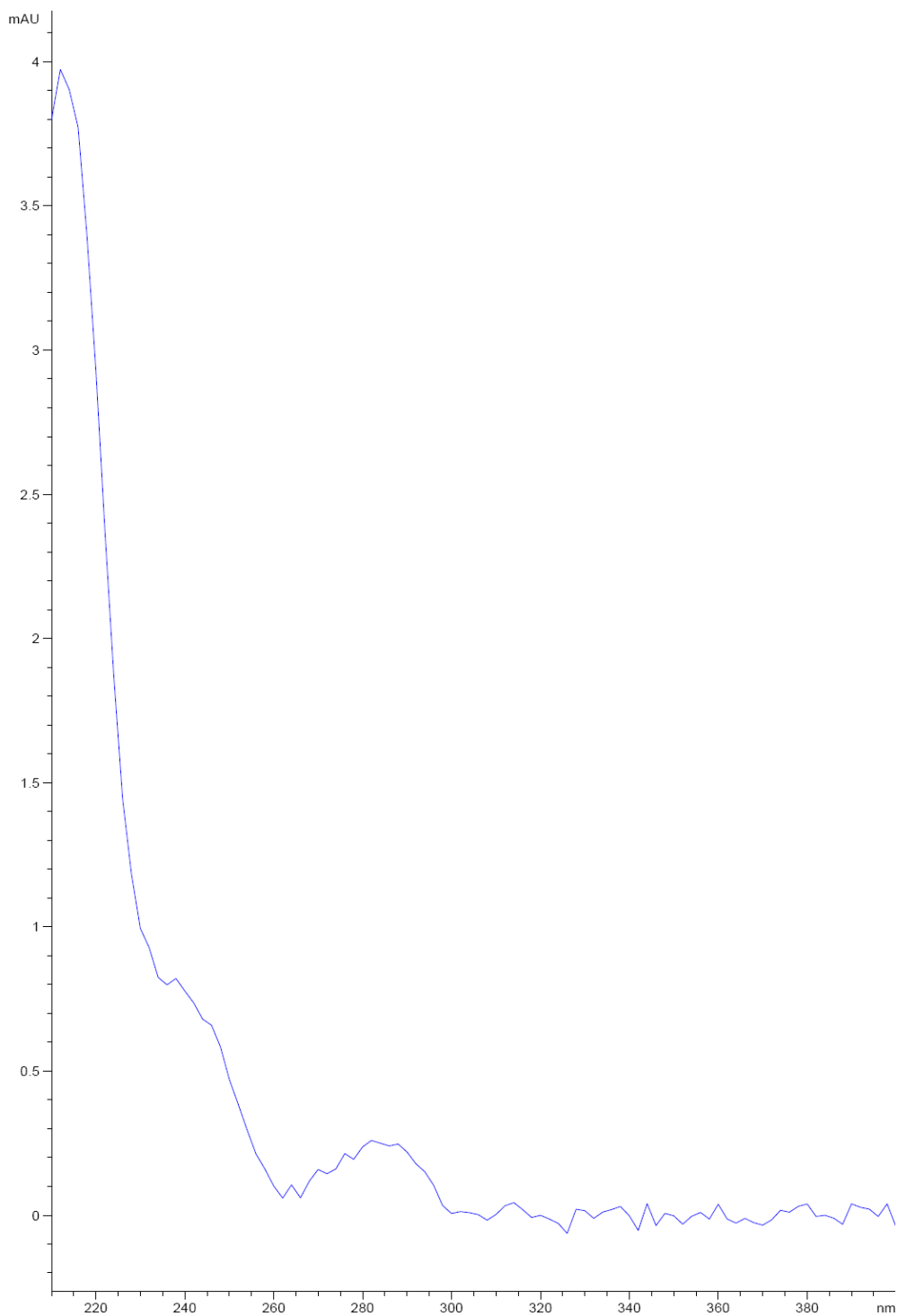
Obr. 4.9: Hmotnostní spektrum analyzovaného vzorku tablety Diolanu ESI ionizací v pozitivním módu: a) HPLC/MS/MS spektrum ethylmorfinu, b) nasimulované izotopické zastoupení pro iont  $C_{19}H_{24}NO_3$ , c) dceřiné spektrum vznikající z iontu  $m/z = 314$ .

Pro potvrzení identity píku  $m/z = 314$  byla provedena MS/MS analýza. Jako prekurzor byl vybrán iont protonované molekuly ethylmorfinu s hodnotou  $m/z = 314$ . Jeho fragmentací v iontové pasti vznikly produkty rozpadu, které jsou zaznamenány jako spektrum dceřiných iontů (obr. 4.9 c)). Hlavními rozpadovými produkty jsou ionty s hodnotami  $m/z$  296, 257, 239, 229, 213, 201 a 183. Mechanismus fragmentace je uveden na obr. 4.10. Z prekurzorového iontu  $m/z = 314$  vzniká iont 296 odštěpením molekuly vody, z něhož následným odštěpením  $-C_4H_5N$  vzniká iont 229. Z tohoto iontu odštěpením skupiny  $-C_2H_4$  vzniká iont 201. Z prekurzorového iontu  $m/z = 314$  vzniká iont 257 odštěpením skupiny  $-C_3H_7N$ , z něhož vznikají další dva ionty: odštěpením molekuly vody vzniká iont 239 a odštěpením skupiny  $-C_2H_4O$  vzniká iont 213. Z iontu 239 vzniká iont 183 odštěpením skupiny  $-C_3H_4O$ .



Obr. 4.10: Základní fragmentace protonizované molekuly ethylmorfinu.

Identita ethylmorfinu byla dále potvrzena porovnáním UV spektra píku na chromatogramu (obr. 4.11), které se shodovalo se spektrem publikovaným v literatuře [13], zejména shodou absorpčních maxim (ethylmorfin ve slabě kyselém prostředí vykazuje tři absorpční maxima při vlnových délkách 215 nm, 240 nm a 284 nm).



Obr. 4.11: UV spektrum ethylmorfinu změřeno na DAD detektoru.

#### 4.2.3 Stanovení obsahu ethylmorfinu ve vzorcích

Toto stanovení proběhlo pouze orientačně, protože jsem během měření neměla k dispozici standard ethylmorfinu. Díky přidanému vnitřnímu standardu kodeinu bylo možné provést poměrové porovnání obsahu ethylmorfinu v jednotlivých tabletách.

Metoda HPLC/MS neprokázala v tabletách Diolanu přítomnost žádných degradačních produktů ethylmorfinu a lze tedy předpokládat, že obsah účinné látky se po letech výrazně nezměnil. U tablety Diolan 0,03g SChHV byl obsah účinné látky určen jako 100% a obsah ethylmorfinu v ostatních tabletách byl stanoven vůči ní. Přehled procentuálního zastoupení ethylmorfinu v jednotlivých tabletách Diolanu je znázorněn v tabulce 4.1.

Tabulka 4.1  
Stanovení obsahu ethylmorfinu v jednotlivých tabletách

tableta	%
Diolan 0.01 g SChHV	98,4
Diolan 0.015 g SChHV	114,6
Diolan 0.03 g SChHV	100,0
Diolan 0.03 g Slovakofarma	117,9
Diloan 0.03 g Spofa 1991	109,3

### 4.3 Analýza tablet „Papaverin-Thesal“

#### 4.3.1 Optimalizace chromatografických podmínek

Analýza vzorku perorálních tablet Papaverin-Thesal byla prováděna metodou HPLC/MS. Při optimalizaci metody jsem vycházela z dříve publikovaných prací, jejichž přehled je podán výše v kap. 2.5. Nejprve jsem se zaměřila na výběr nejvhodnější stacionární fáze s ohledem na její celkovou selektivitu. Vzhledem k charakteru analytu a s využitím informací z literatury jsem se rozhodla pro RP-HPLC chromatografii.

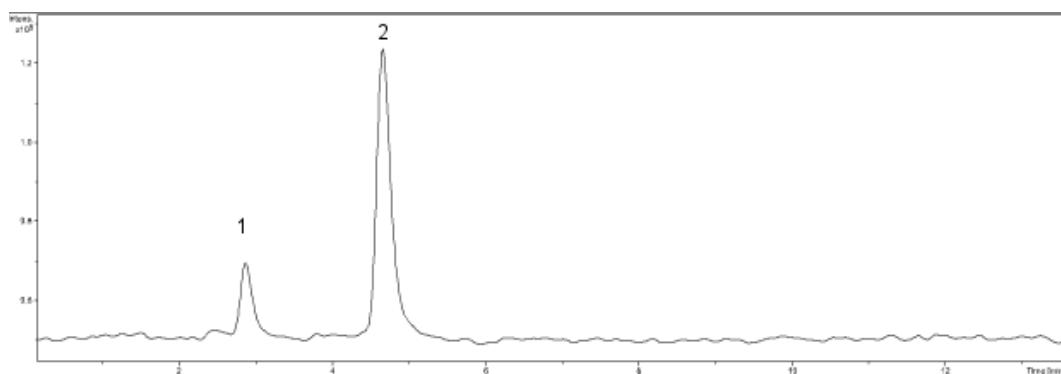
Byla použita kolona Phenomenex Synergi RP o délce 250 mm, vnitřním průměru 2 mm a velikosti zrn 4 $\mu$ m. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a mravenčanového pufru (10mM, pH = 3,00) s izokratickou elucí, testovaná v různých poměrech ACN:MP (50:50, 60:40). S použitím tohoto složení mobilní fáze nebyl detekován pík theobrominu a pík papaverinu byl příliš rozmytý. Byla použita mobilní fáze ACN:H<sub>2</sub>O v různých poměrech (90:10, 70:30, 60:40, 55:45, 50:50). V tomto případě došlo ke zvýšení symetrie píku papaverinu, ale pík theobrominu stále nebyl detegován.

Dále byla použita kolona Watrex RP C<sub>18</sub> o délce 250 mm, vnitřním průměru 4 mm a velikosti zrn 5 $\mu$ m. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a mravenčanového pufru s izokratickou elucí, tato směs byla testována v různých poměrech (90:10, 70:30,

60:40, 50:50, 40:60). Přičemž jako optimální poměr, při kterém došlo k nejlepšímu rozlišení obou píků, byl určen poměr 50:50.

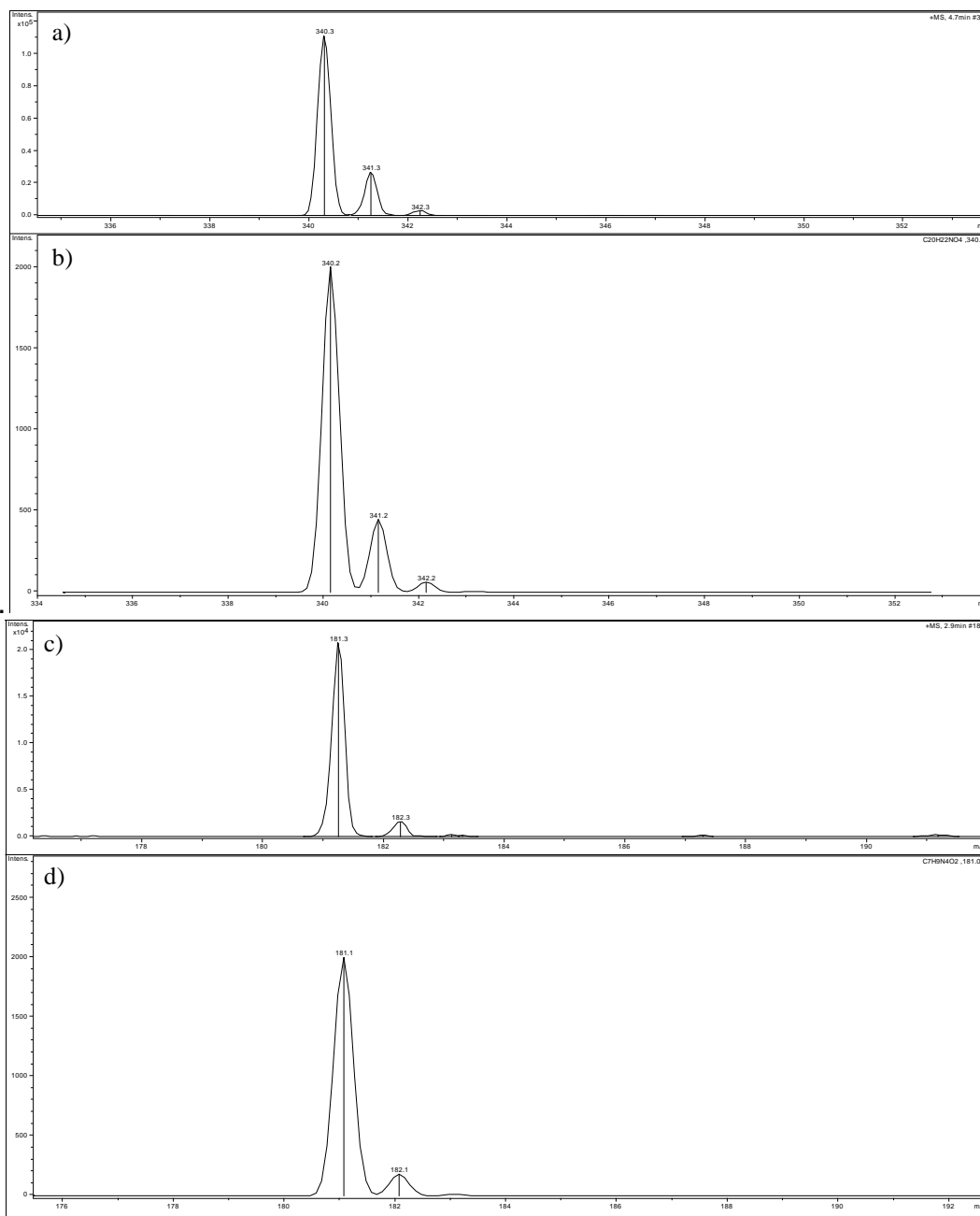
#### 4.3.2 Identifikace látek ve vzorku a interpretace hmotnostních spekter

HPLC/MS chromatogram analyzovaného vzorku tablety Papaverin-Thesal je zobrazen na obr. 4.12. Pík s retenčním časem 2,9 minut přísluší theobrominu, pík s retenčním časem 4,7 minut přísluší papaverinu. Ostatní malé píky přísluší tetrabutylamoniu, nečistotě oboženě v mravenčanovém pufru.



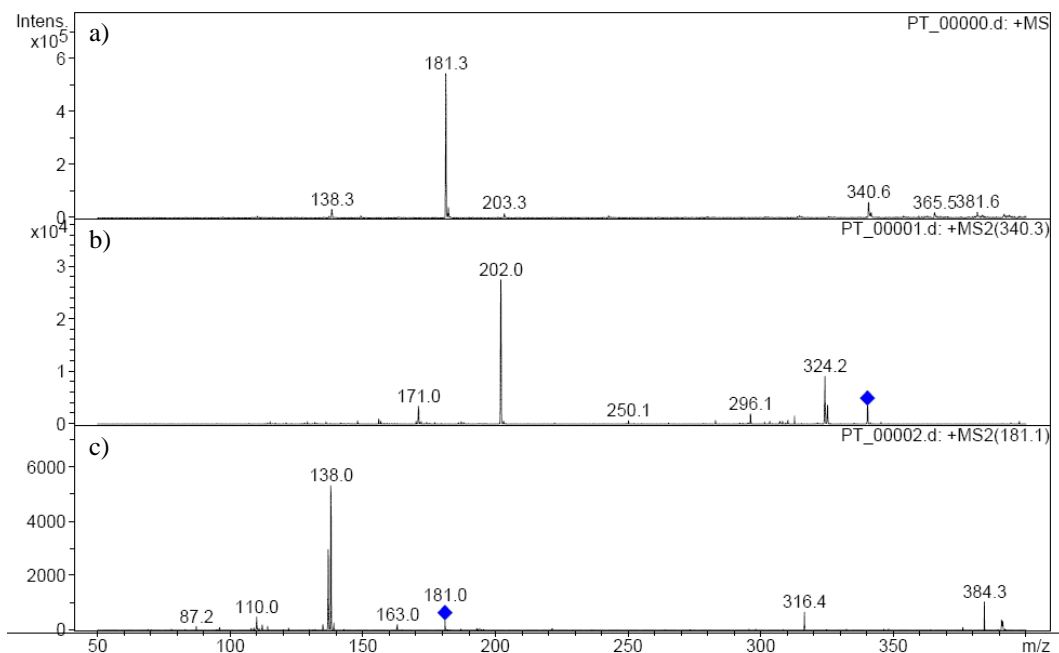
Obr. 4.12: HPLC/MS chromatogram analyzovaného vzorku tablety Papaverin-Thesal na koloně Watrex RP C<sub>18</sub> 250 × 4 mm × 5 μm izokratickou elucí s mobilní fází acetonitril a 10 mMmravenčanový pufr o pH = 3,00 (50:50, v/v) s průtokem 0,650 ml min<sup>-1</sup>. Píky (1) theobromin, (2) papaverin.

Odpovídající hmotnostní spektrum píku papaverinu a theobrominu s jejich vypočítaným izotopickým zastoupením je zobrazeno na obr. 4.13. Je zde patrná dobrá shoda protonizovaného iontu papaverinu (4.13 a)) s teoretickým izotopovým zastoupením u iontu  $m/z = 340$  (4.13 b)) a shoda protonizovaného iontu theobrominu (4.13 c)) s teoretickým izotopovým zastoupením u iontu  $m/z = 181$  (4.13 d)).



Obr. 4.13: Hmotnostní spektra: a) naměřené spektrum eluovaného papaverinu z analyzovaného vzorku, b) vypočítané izotopické zastoupení iontu C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>, c) naměřené spektrum eluovaného theobrominu z analyzovaného vzorku, d) vypočítané izotopické zastoupení iontu C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>.

Dále bylo změřeno hmotnostní spektrum analyzovaného vzorku Papaverin-Thesal, které je zobrazeno na obr. 4.14 a). Molekulární iont s hodnotou  $m/z$  340 náleží protonizovanému papaverinu (C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>), molekulární iont s hodnotou  $m/z$  181 náleží protonizovanému theobrominu (C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>).



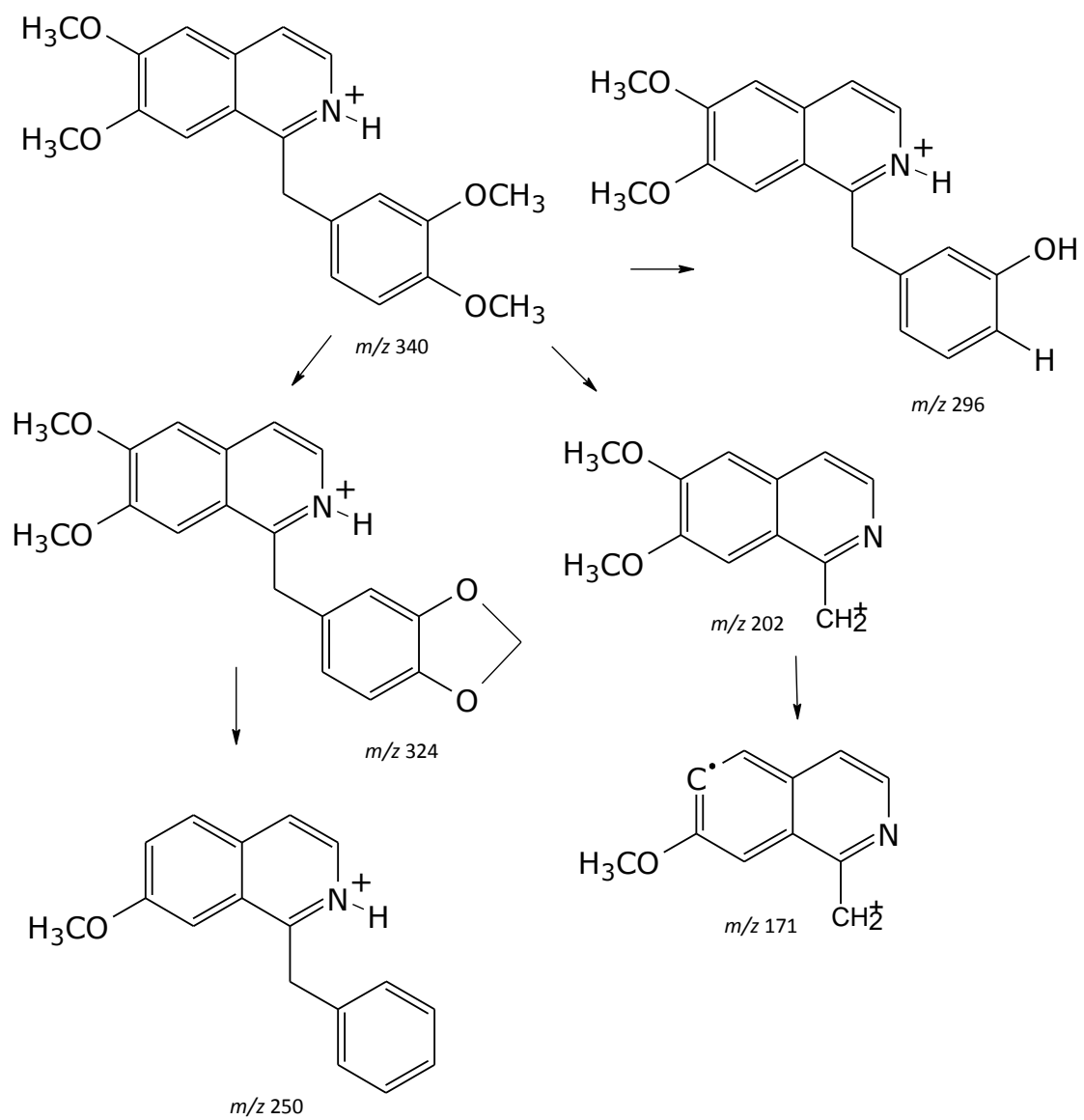
Obr. 4.14: Hmotnostní spektrum analyzovaného vzorku tablety Papaverin-Thesal ESI ionizací v pozitivním módu: a) HPLC/MS/MS spektrum Papaverin-Thesal, b) dceřině spektrum vznikající z iontu  $m/z = 340$  (papaverin) c) dceřině spektrum vznikající z iontu  $m/z = 181$  (theobromin).

Pro potvrzení identity píku  $m/z = 340$  a  $m/z = 181$  byla provedena MS/MS analýza. Jako prekurzor byl vybrán iont protonované molekuly papaverinu s hodnotou  $m/z = 340$  a iont protonované molekuly theobrominu s hodnotou  $m/z = 181$ . Jejich fragmentací v iontové pasti vznikly produkty rozpadu, které jsou zaznamenány jako spektrum dceřiných iontů papaverinu (obr. 4.14 b)) a theobrominu (obr. 4.14 c)).

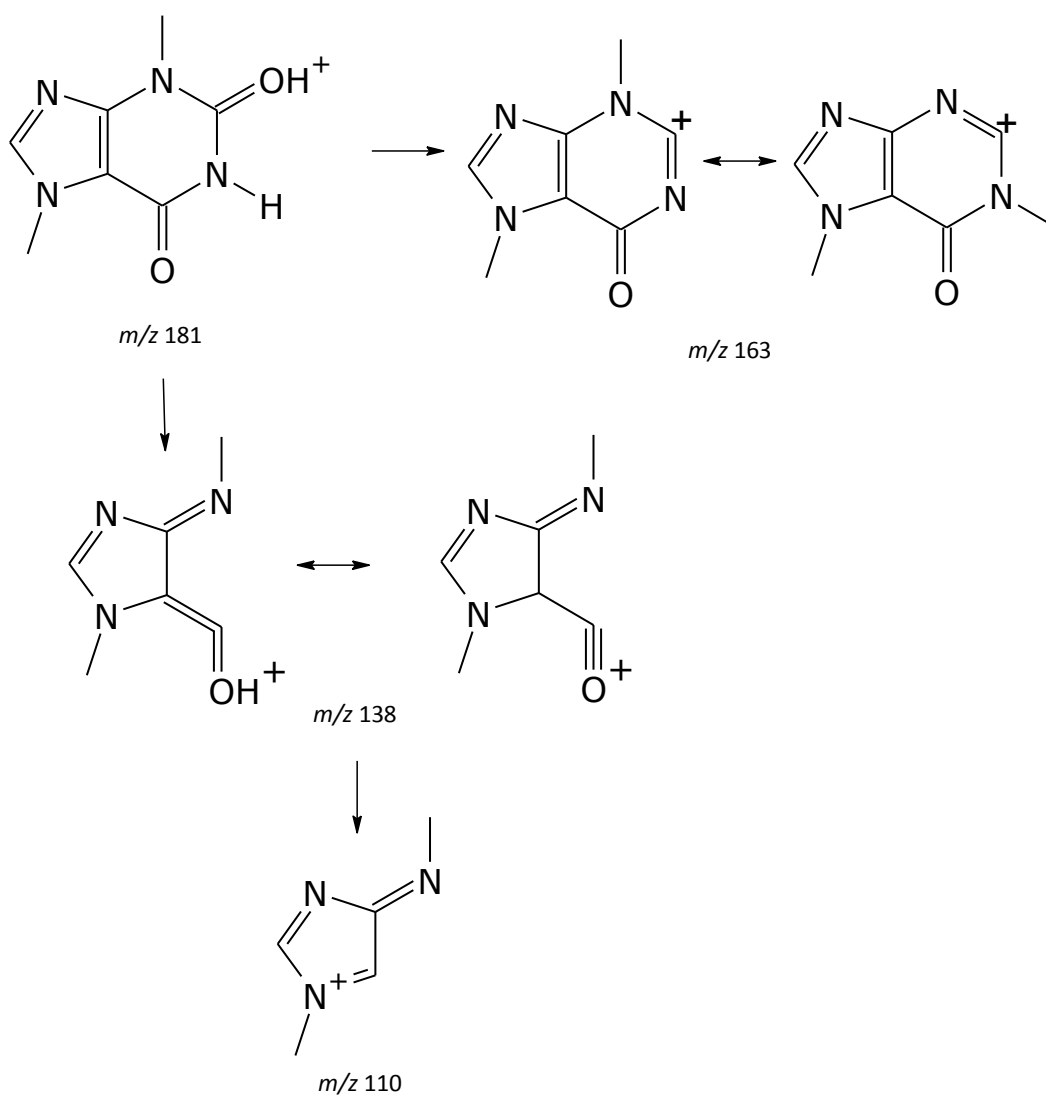
Hlavními rozpadovými produkty papaverinu jsou ionty s hodnotami  $m/z$  324, 296, 250, 202 a 171. Mechanismus fragmentace je uveden na obr. 4.15. Z prekurzorového iontu  $m/z = 340$  vzniká odštěpením skupiny  $-\text{CH}_4$  iont 324, z něhož následným odštěpením skupin  $-\text{CH}_2\text{O}$  z isochinolinového kruhu a  $-\text{COO}$  z benzylového kruhu vzniká iont 250. Z prekurzorového iontu  $m/z = 340$  dále vzniká odštěpením  $-\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2$  iont 202, z něhož následným odštěpením skupiny  $-\text{CH}_3\text{O}$  vzniká iont 171. Iont 296 vzniká odštěpením  $-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$  z prekurzorového iontu  $m/z = 340$ .

Hlavními rozpadovými produkty theobrominu jsou ionty s hodnotami  $m/z$  181, 163, 138 a 110. Mechanismus fragmentace je uveden na obr. 4.16. Z prekurzorového iontu  $m/z = 181$  vzniká odštěpením  $-\text{CHNO}$  iont 138, z něhož následným odštěpením  $-\text{CO}$  vzniká iont 110.

Iont 163 vzniká odštěpením vody z prekurzorového iontu  $m/z = 181$ .

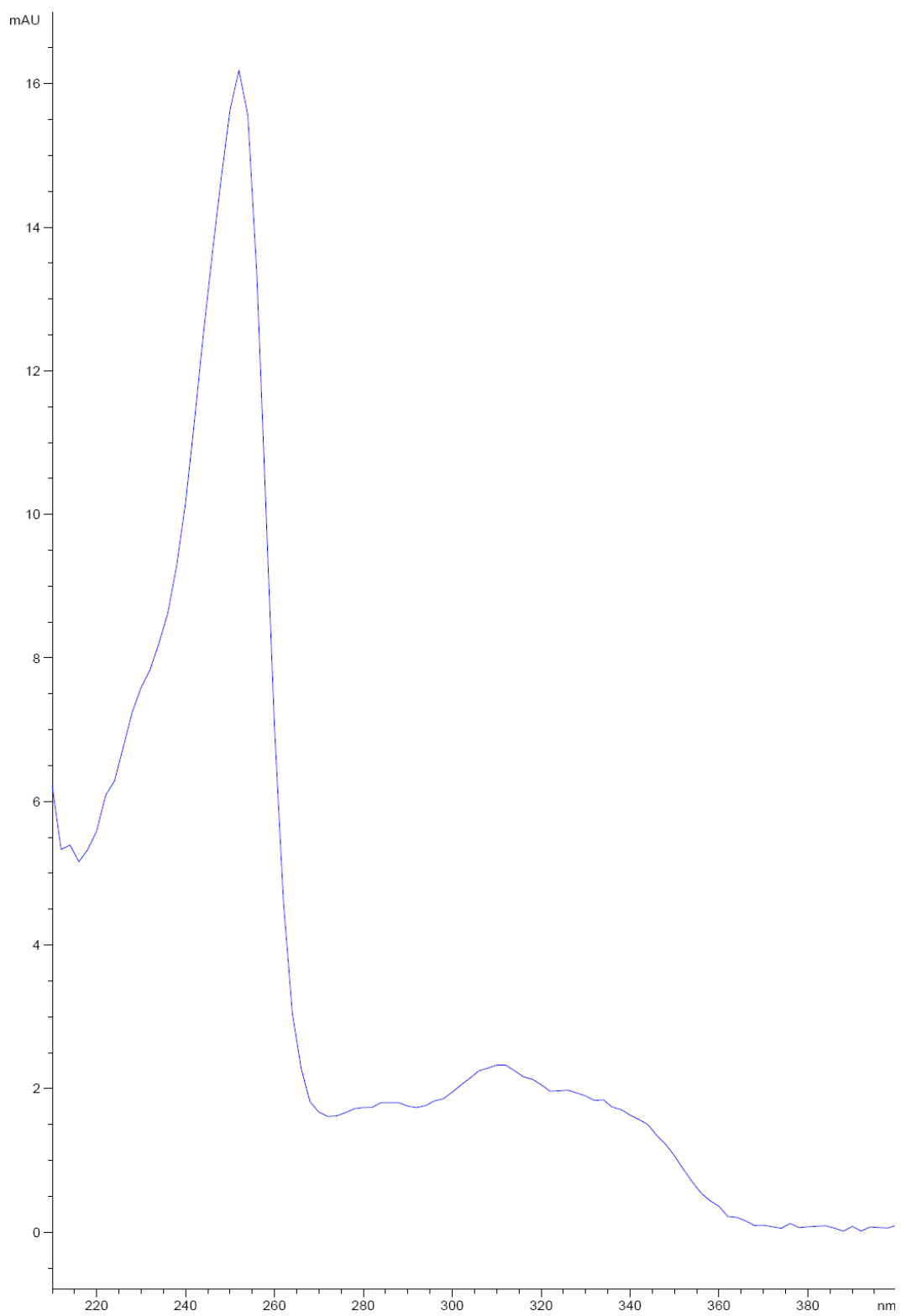


Obr. 4.15: Základní fragmentace protonizované molekuly papaverinu.

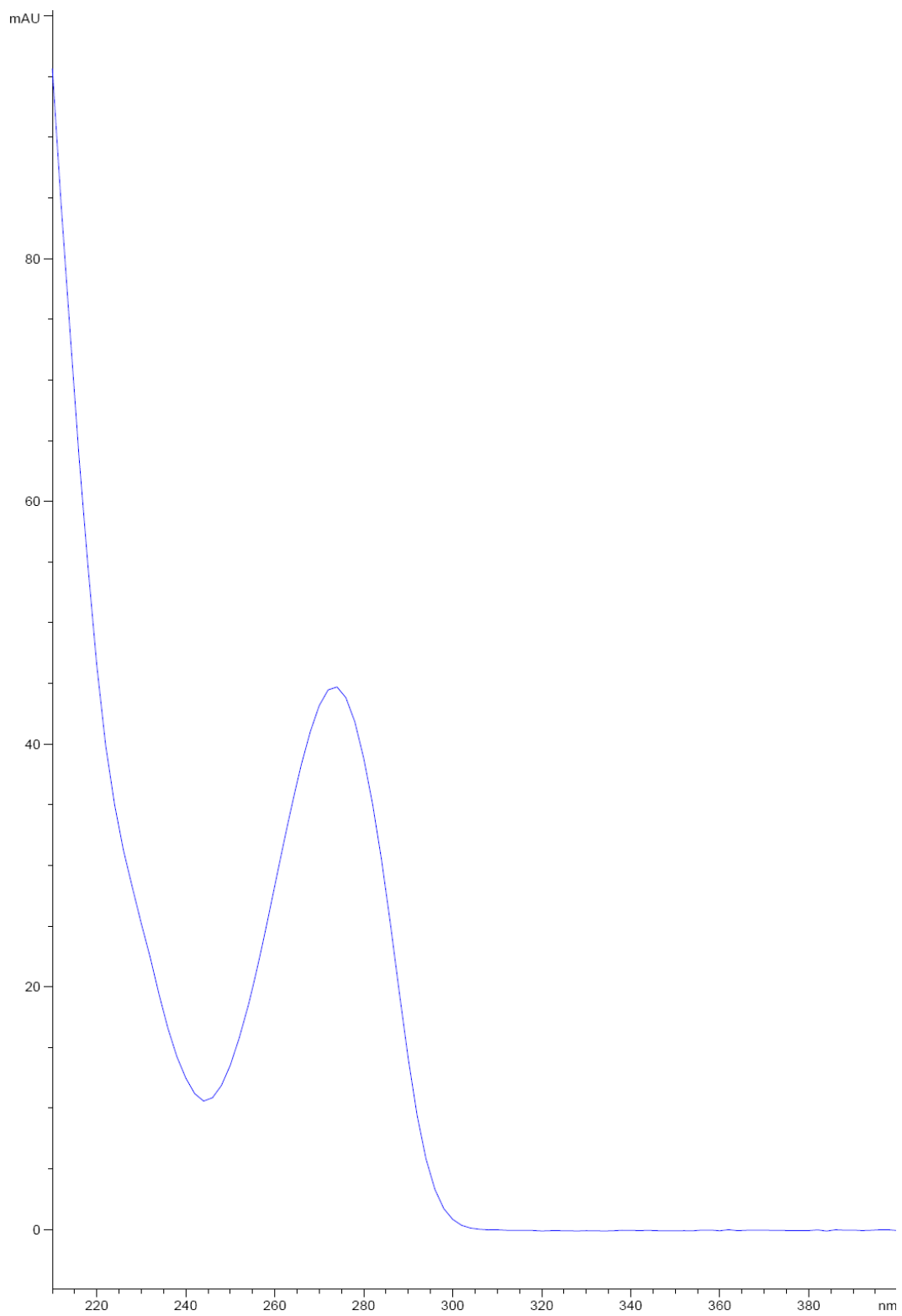


Obr. 4.16: Základní fragmentace protonizované molekuly theobrominu.

Identita papaverinu a theobrominu byla dále potvrzena porovnáním UV spektra píku papaverinu na chromatogramu (obr. 4.17) a UV spektra píku theobrominu na chromatogramu (obr. 4.18). Spektra se shodovala se spektry publikovanými v literatuře [13], zejména shodou absorpčních maxim. Papaverin ve slabě kyselém prostředí vykazuje absorpční maxima při vlnových délkách 250 nm a 310 nm. Theobromin ve slabě kyselém prostředí vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 272 nm.



Obr. 4.17: UV spektrum papaverinu změřeno na DAD detektoru.

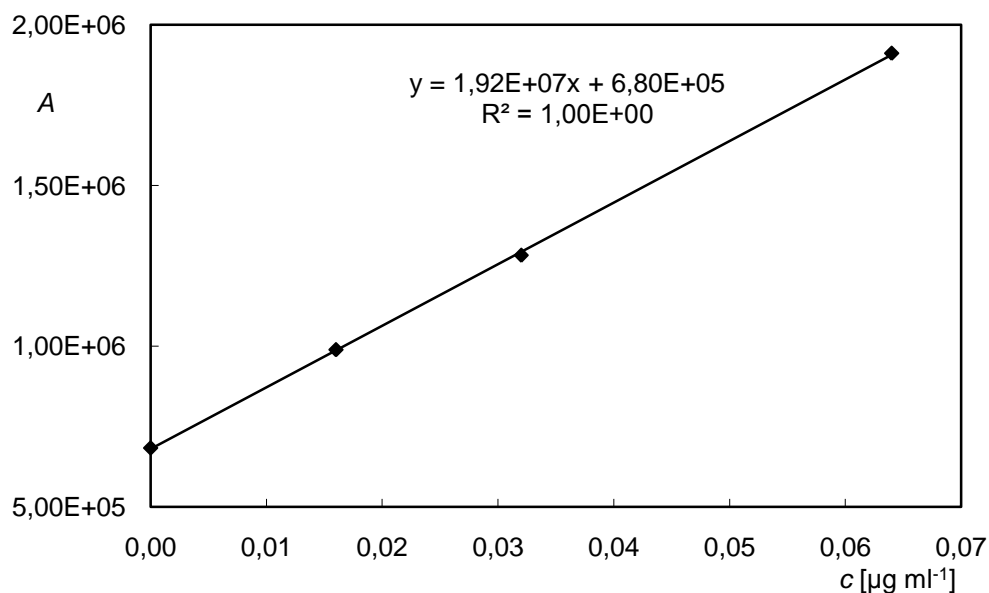


Obr. 4.18: UV spektrum theobrominu změřeno na DAD detektoru.

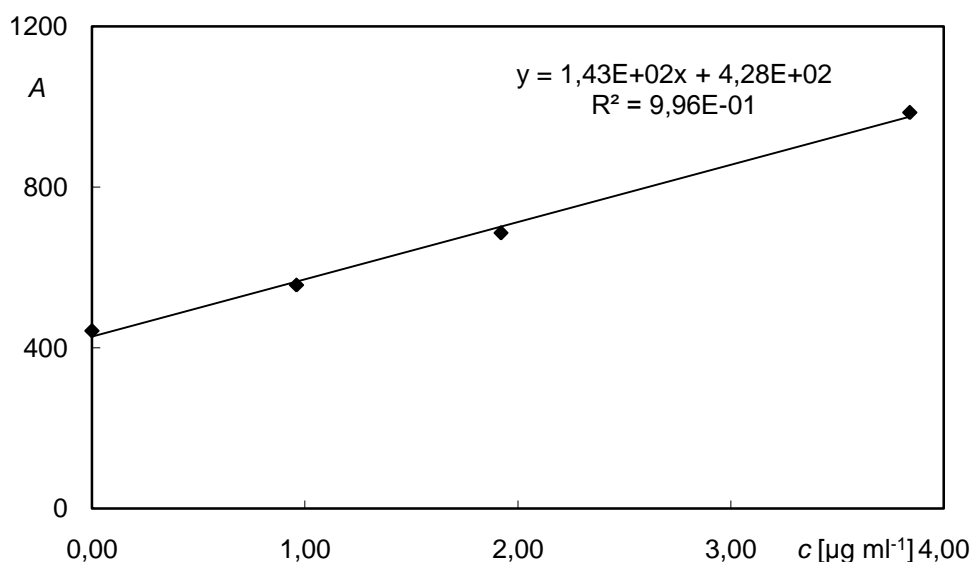
#### 4.3.3 Stanovení obsahu papaverinu a theobrominu ve vzorku

Stanovení obsahu papaverinu a theobrominu v tabletě Papaverin-Thesal bylo provedeno metodou standardního přídatku na základě ploch chromatografických píků. Kalibrační závislosti těchto stanovení jsou zobrazeny na obr. 4.19 a 4.20. Analyzovaná tableta obsahovala  $13,4 \pm 0,2$  mg papaverinu, což odpovídá  $53,7 \pm 0,8$  % deklarované hodnoty. Dále tableta obsahovala  $279,2 \pm 1,1$  mg theobrominu, což odpovídá  $93,1 \pm 0,4$  %. (variační koeficient obou stanovení nepřesáhl 5%).

Degradační produkty v tomto vzorku nebyly detegovány. Vzhledem k tomu, že ke stanovení papaverinu byl použit certifikovaný kalibrační standard, je jediným pravděpodobným vysvětlením jeho nízkého obsahu (nalezena polovina deklarovaného množství) chyba při výrobě tohoto léčivého přípravku.



Obr. 4.19: Stanovení obsahu papaverinu v analyzovaném vzorku injekčního roztoku metodou standardního přídatku - graf kalibrační závislosti plochy píků A na koncentraci analyzované látky  $c$  [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ].



Obr. 4.20: Stanovení obsahu theobrominu v analyzovaném vzorku injekčního roztoku metodou standardního přídatku - graf kalibrační závislosti plochy píků A na koncentraci analyzované látky c [µg ml<sup>-1</sup>].

#### 4.4 Analýza tablet „Dilaudid hydr.“

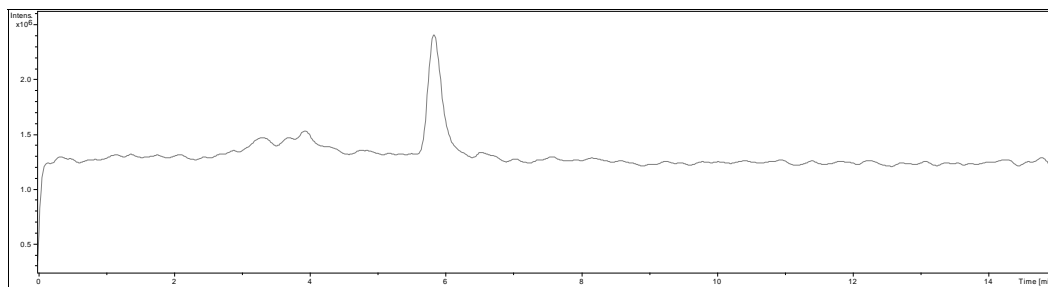
##### 4.4.1 Optimalizace chromatografických podmínek

Analýza vzorku perorálních tablet Dilaudid hydrochlorid s obsahem účinné látky hydromorfonu byla prováděna metodou HPLC/MS. Při optimalizaci metody jsem vycházela z dříve publikovaných prací, jejichž přehled je podán výše v kap. 2.6. Nejprve jsem se zaměřila na výběr nejvhodnější stacionární fáze s ohledem na její celkovou selektivitu. Vzhledem k charakteru analytu a s využitím informací z literatury jsem se rozhodla pro RP-HPLC chromatografii.

Byla použita kolona Watrex RP C<sub>18</sub> o délce 250 mm, vnitřním průměru 4 mm a velikosti zrn 5µm. Byla použita izokratická eluce s mobilní fází ve složení acetonitril-mravenčanový pufr (10mM, pH = 3,00), a byla testována v několika poměrech ACN:MP (60:40, 50:50, 40:60), přičemž jako optimální byl určen poměr 40:60. Rychlost průtoku mobilní fáze byla variována v intervalu 0,3–0,7 ml min<sup>-1</sup> a jako optimální byla určena rychlost průtoku 0,650 ml min<sup>-1</sup>. Pík hydromorfonu byl souměrný a v dostatečné intenzitě pro identifikaci a stanovení.

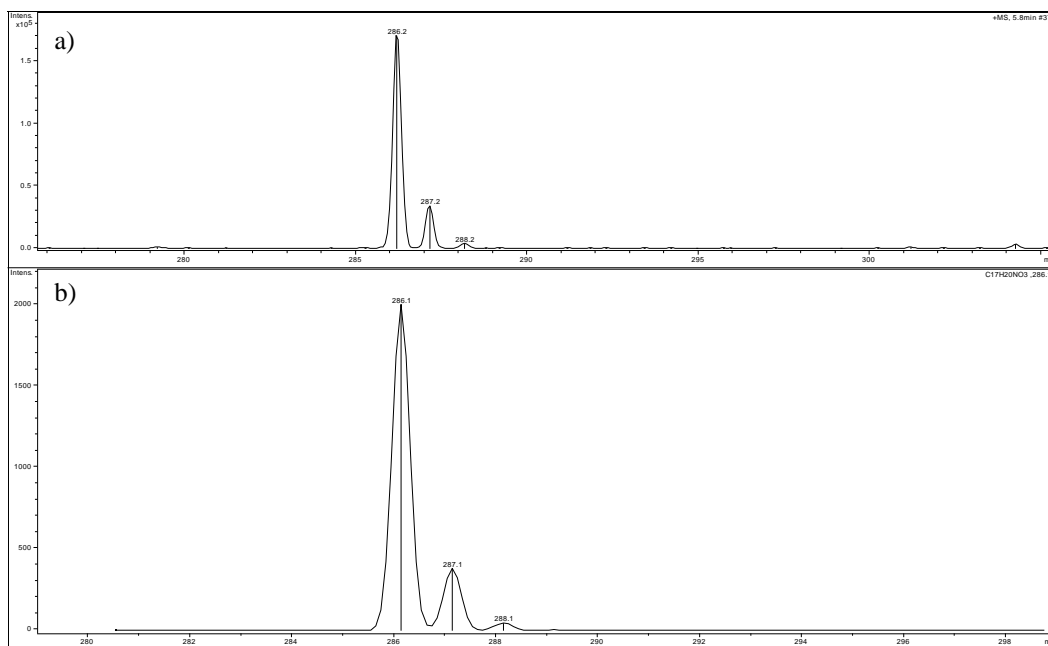
#### 4.4.2 Identifikace látek ve vzorku a interpretace hmotnostních spekter

HPLC/MS chromatogram analyzovaného vzorku tablety Dilaudid hydrochloridu je zobrazen na obr. 4.21, byl nalezen pouze jeden pík s retenčním časem 5,8 min. Ostatní malé píky srovnatelné s velikostí šumu přísluší tetrabutylamoniu, nečistotě obožené v mravenčanovém pufru.



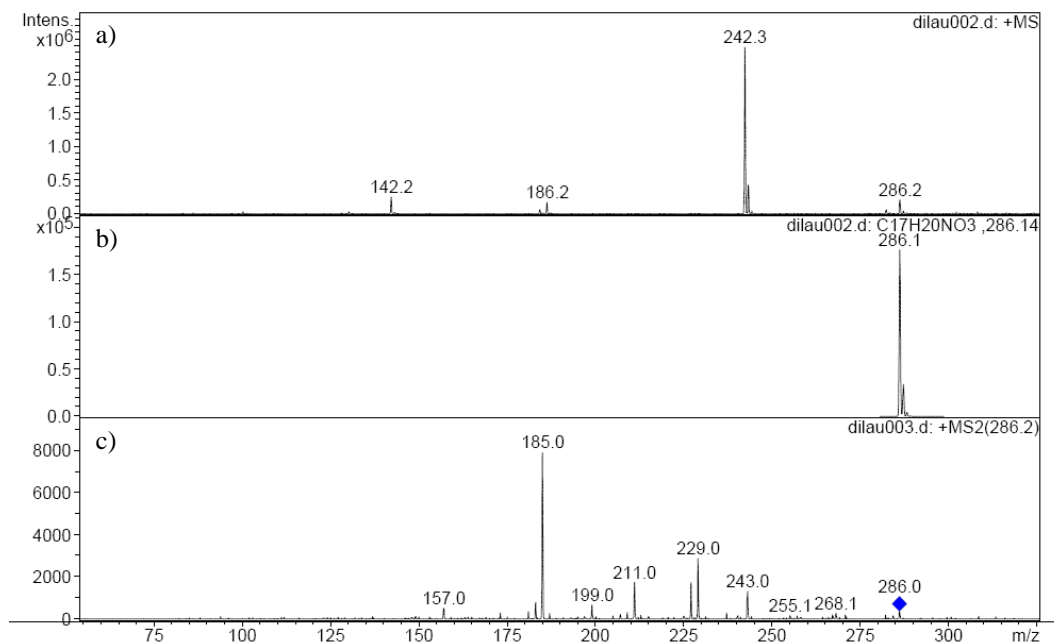
Obr. 4.21: HPLC/MS chromatogram analyzovaného vzorku tablety dilaudid chloridu na koloně Watrex RP C<sub>18</sub> 250 × 4 mm × 5 μm izokratickou elucí s mobilní fází acetonitril a 10mM mravenčanový pufr o pH = 3,00 (40:60, v/v) s průtokem 0,650 ml min<sup>-1</sup>.

Odpovídající hmotnostní spektrum píku hydromorfonu a jeho vypočítané izotopické zastoupení je zobrazeno na obr. 4.22, ze kterého je patrná dobrá shoda protonizovaného iontu hydromorfonu (obr. 4.22 a)) s teoretickým izotopovým zastoupením u iontu  $m/z = 286$  (obr. 4.22 b)).



Obr. 4.22: Hmotnostní spektra: a) naměřené spektrum eluovaného hydromorfonu z analyzovaného vzorku, b) vypočítané izotopické zastoupení iontu C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub>.

Dále bylo změřeno hmotnostní spektrum analyzovaného vzorku dilaudid hydrochloridu, které je zobrazeno na obr. 4.23 a). Molekulární iont s hodnotou  $m/z$  286 náleží protonizovanému hydromorfonu ( $C_{17}H_{20}NO_3$ ), hodnota  $m/z$  242 tetrabutylamoniu – nečistotě obsažené v mravenčanovém pufru. Molekulární ionty s hodnotou  $m/z$  142 a 186 nenáleží k hydromorfonu, tyto ionty byly identifikovány jako nečistoty z rozpouštědla.

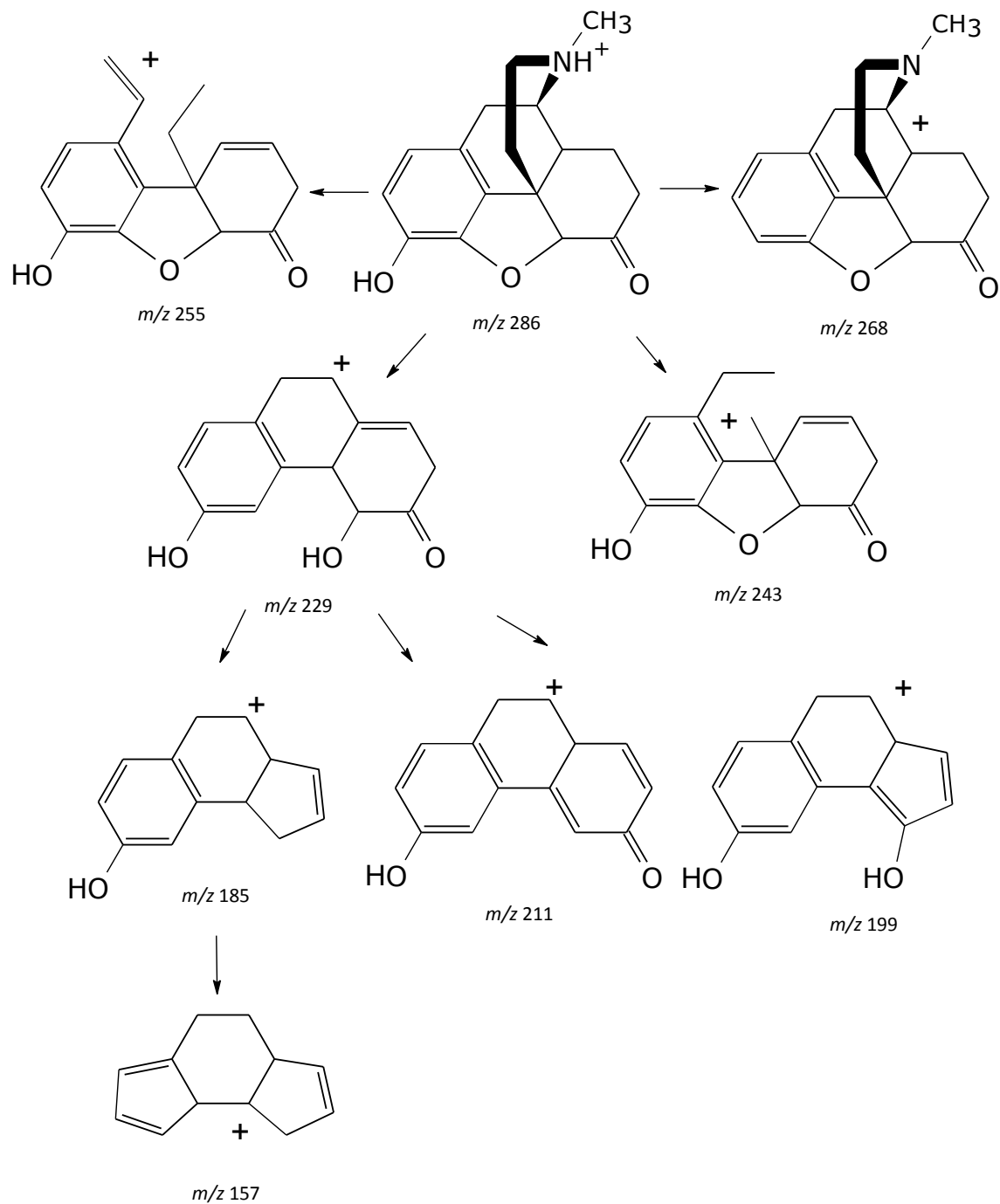


Obr. 4.23: Hmotnostní spektrum analyzovaného vzorku tablety Dilaudid hydrochloridu ESI ionizací v pozitivním módu: a) HPLC/MS/MS spektrum hydromorfonu, b) nasimulované izotopické zastoupení pro iont  $C_{17}H_{20}NO_3$ , c) dceřiné spektrum vznikající z iontu  $m/z = 286$ .

Pro potvrzení identity píku  $m/z = 286$  byla provedena MS/MS analýza. Jako prekurzor byl vybrán iont protonované molekuly hydromorfonu s hodnotou  $m/z = 286$ . Jeho fragmentací v iontové pasti vznikly produkty rozpadu, které jsou zaznamenány jako spektrum dceřiných iontů (obr. 4.23 c)). Hlavními rozpadovými produkty jsou ionty s hodnotami  $m/z$  268, 255, 243, 229, 211, 199, 185 a 157. Mechanismus fragmentace je uveden na obr. 4.24.

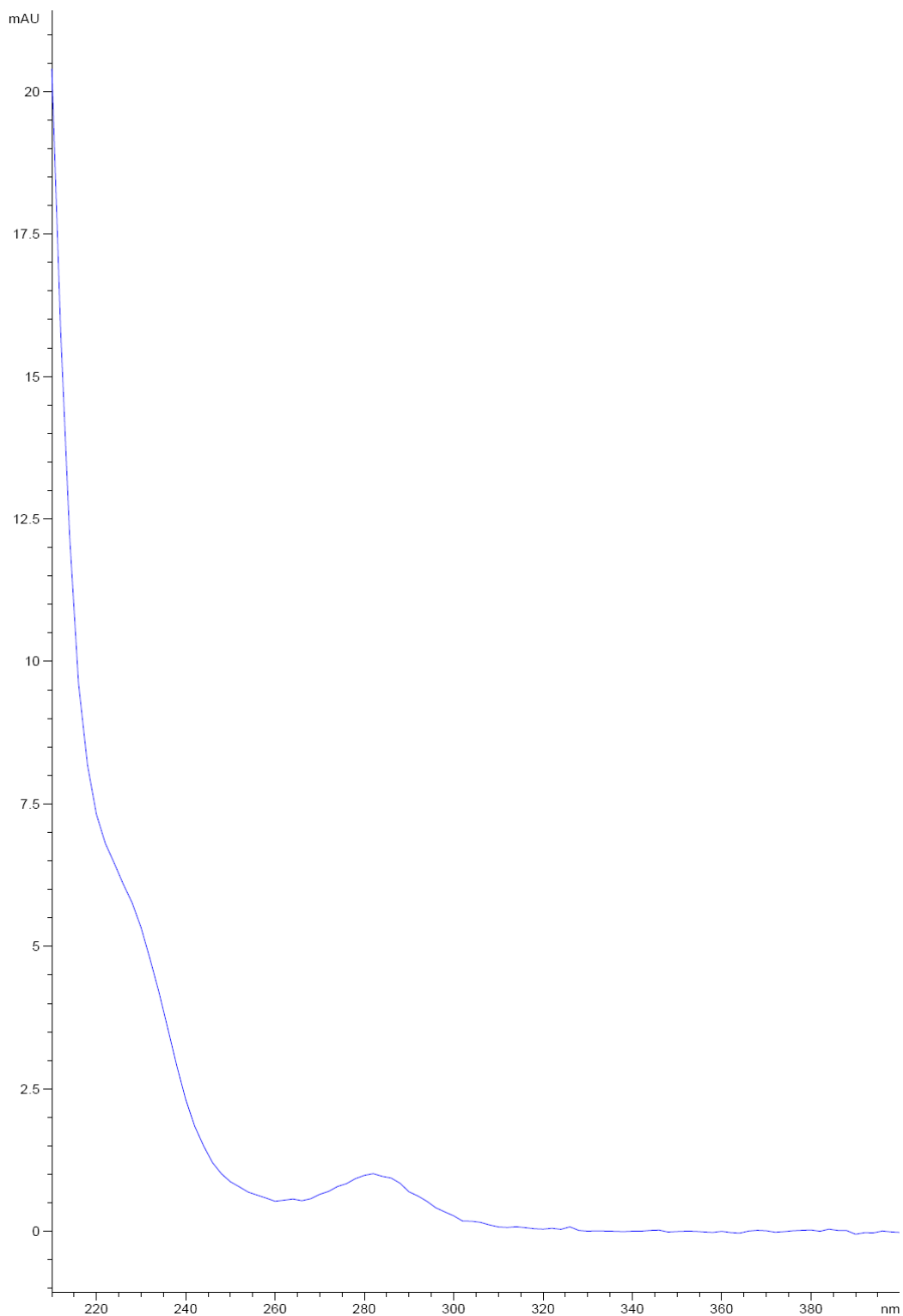
Z prekurzorového iontu  $m/z = 286$  vzniká iont 229 odštěpením  $-C_3H_7N$ , z něhož vznikají další tři ionty: odštěpením  $-COO$  vzniká iont 185, odštěpením molekuly vody vzniká iont 211 a odštěpením  $-CH_2O$  vzniká iont 199. Z iontu 185 vzniká odštěpením  $-CO$  iont 157. Z prekurzorového iontu  $m/z = 286$  vzniká iont 268 odštěpením molekuly

vody. Dále z prekurzorového iontu  $m/z = 286$  vzniká iont 255 odštěpením skupiny  $-\text{CH}_5\text{N}$ . Iont 243 vzniká z prekurzorového iontu  $m/z = 286$  odštěpením skupiny  $-\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$ .



Obr. 4.24: Základní fragmentace protonizované molekuly hydromorfonu.

Identita hydromorfonu byla dále potvrzena porovnání UV spektra píku na chromatogramu (obr. 4.25), které se shodovalo se spektrem publikovaným v literatuře [13], zejména shodou absorpčních maxim (hydromorfon ve slabě kyselém prostředí vykazuje tři absorpční maxima při vlnových délkách 205 nm, 230 nm a 280 nm).



Obr. 4.25: UV spektrum hydromorfonu změřeno na DAD detektoru.

#### 4.4.3 Stanovení obsahu hydromorfonu ve vzorku

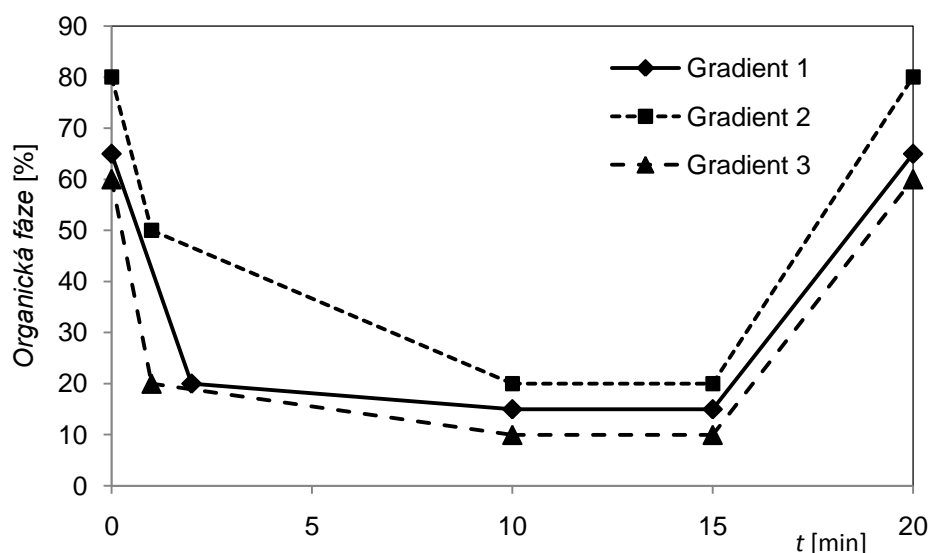
Přesné ani semikvantitativní stanovení nebylo u tohoto vzorku možné, protože standard hydromorfonu není dostupný. Ve vzorku nebyly detekovány žádné degradační produkty hydromorfonu a lze tedy usuzovat na jeho dlouhodobou stabilitu v tomto léčivém přípravku.

#### 4.5 Analýza injekčního roztoku „Morphin-Atropin pro injectione Dr. Heisler“

##### 4.5.1 Optimalizace chromatografických podmínek

Analýza vzorku injekčního roztoku Morphin-Atropin byla prováděna metodou HPLC/MS. Při optimalizaci metody jsem vycházela z dříve publikovaných prací, jejichž přehled je podán výše v kap. 2.7. Nejprve jsem se zaměřila na výběr nejvhodnější stacionární fáze s ohledem na její celkovou selektivitu. Vzhledem k charakteru analytu a s využitím informací z literatury jsem se rozhodla pro RP-HPLC chromatografii.

Byla použita kolona Supelcosil RP C<sub>18</sub> o délce 150 mm, vnitřním průměru 4,6mm a velikostí zrn 5 μm. Při izokratické eluci byla mobilní fází směs methanol–mravenčanový pufr (10mM, pH = 3,00) testovaná v různých poměrech MeOH:MP (80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60). Za těchto podmínek nebyl atropin v chromatogramu identifikován a tak byla organická složka mobilní fáze změněna z methanolu na acetonitril a s ním byla použita gradientová eluce. Byly testovány tři různé gradientové eluce, jejichž podmínky jsou znázorněny v grafu na obrázku 4.26. Podmínky gradientu s označením „Gradient 1“ poskytovaly nejlepší možnost identifikace píku atropinu, jenž jsou detailně uvedeny v tabulce 4.2.



Obrázek 4.26: Časový průběh různých gradientů optimalizovaných pro HPLC stanovení injekčního roztoku Morphin-Atropin.

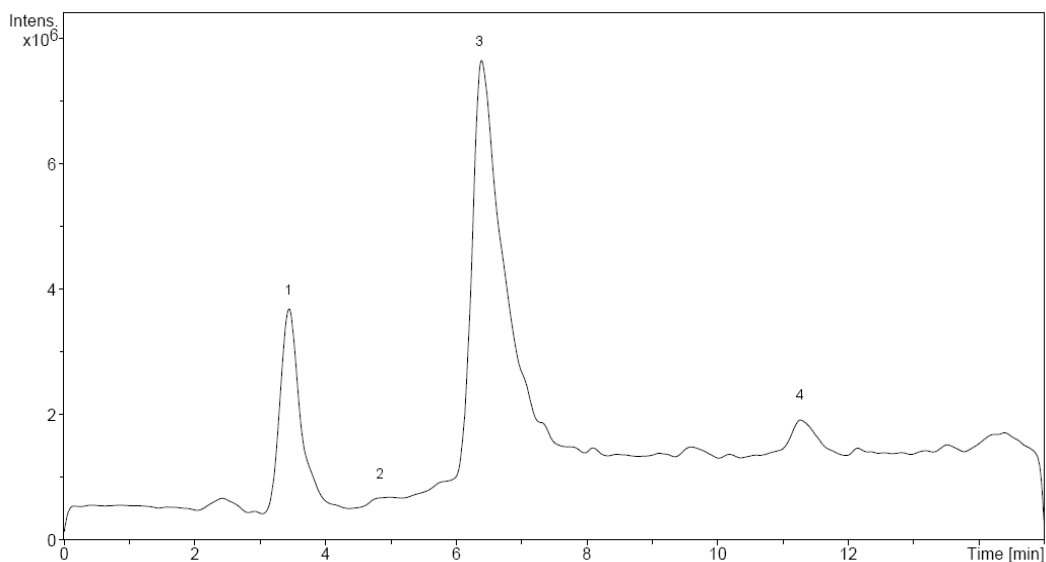
Tabulka 4.2

HPLC gradient používaný pro analýzu injekčního roztoku Morphin-Atropin. Roztok A představuje acetonitril a roztok B 10mM mravenčanový pufr o pH = 3,00

t min	složení gradientu		průtoková rychlost ml min <sup>-1</sup>
	roztok A, %	roztok B, %	
0,00	35	65	0,800
2,00	80	20	0,600
10,00	85	15	0,600
15,00	35	65	0,600
20,00	35	65	0,800

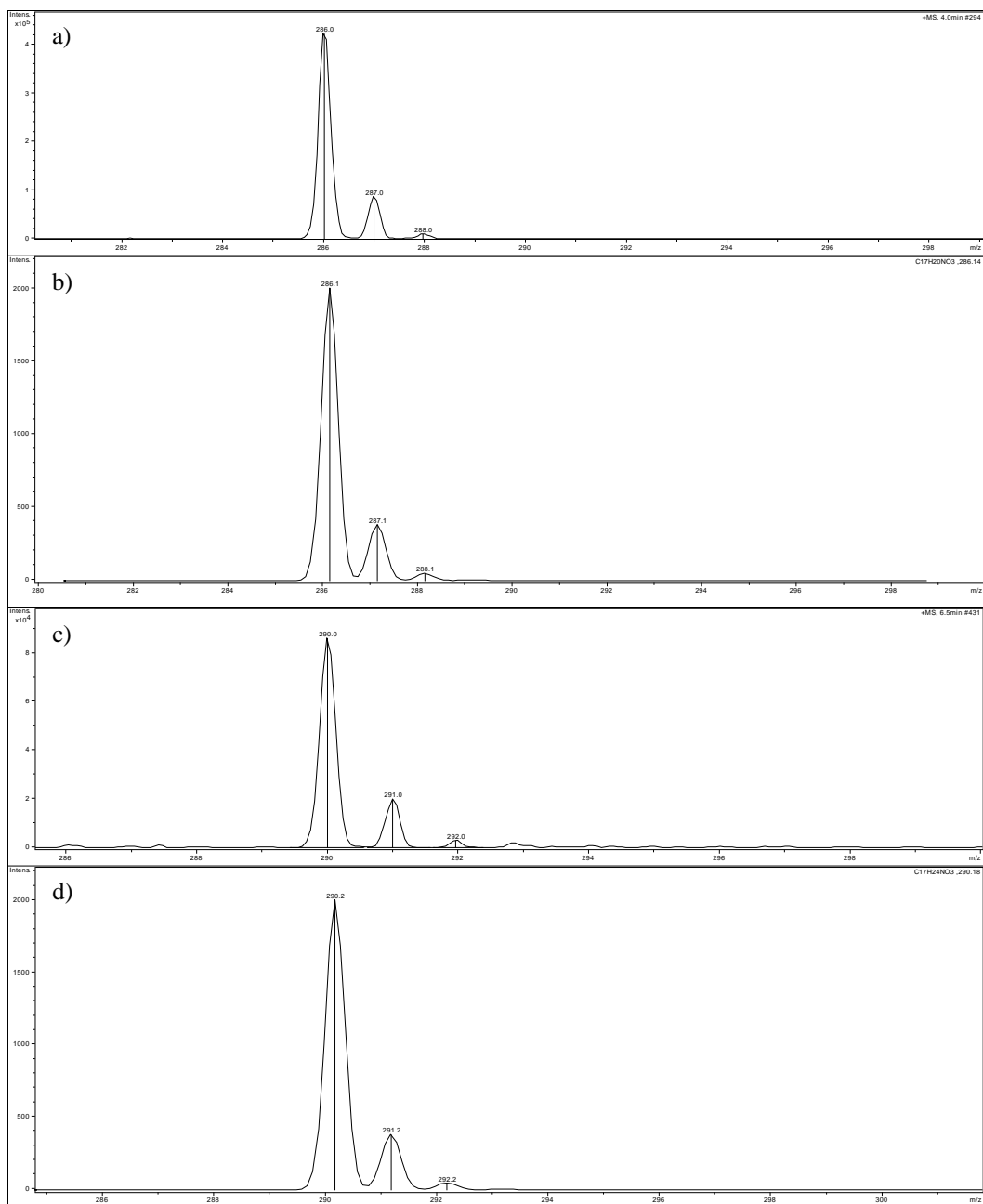
#### 4.5.2 Identifikace látek ve vzorku a interpretace hmotnostních spekter

HPLC/MS chromatogram analyzovaného vzorku injekčního roztoku Morphin-Atropin je zobrazen na obr. 4.27. Pík s retenčním časem 3,4 minut přísluší morfinu, pík s retenčním časem 6,4 minut přísluší atropinu, pík s retenčním časem 4,7 minut byl identifikován jako kodein. Pík s retenčním časem 11,3 minut náleží degradačnímu produktu morfinu s  $m/z = 201$ . Ostatní malé píky přísluší tetrabutylamoniu, nečistotě oboženě v mravenčanovém pufru a dalším nečistotám, které se nepodařilo identifikovat a které byly obsaženy i ve slepém vzorku, tudíž nemají s injekčním roztokem vzorku Morphin-Atropin nic společného.



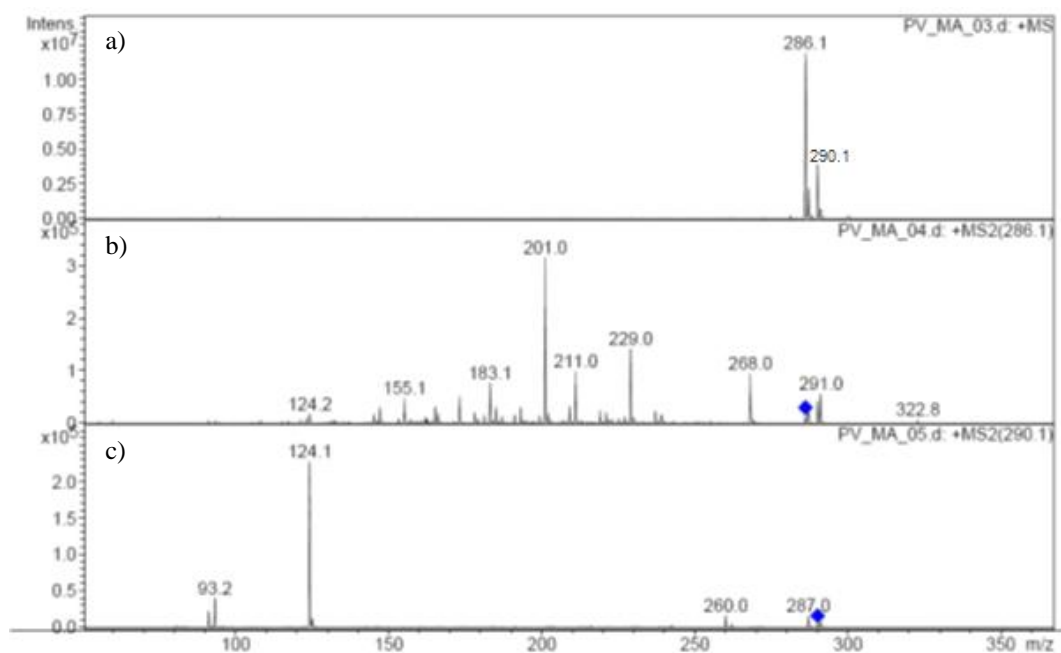
Obr. 4.27: HPLC/MS chromatogram analyzovaného vzorku injekčního roztoku Morphin-Atropin na koloně Supelcosil RP C<sub>18</sub> o délce 150 × 4,6 mm × 5 μm gradientovou elucí s mobilní fází acetonitril a 10mM mravenčanový pufr o pH = 3,00. Pík: 1) morfin, 2) kodein, 3) atropin a 4) degradační produkt morfinu  $m/z = 201$ .

Odpovídající hmotnostní spektrum píku morfinu a atropinu s jejich vypočítaným izotopickým zastoupením je zobrazeno na obr. 4.27. Je zde patrná dobrá shoda protonizovaného iontu morfinu (4.28 a)) s teoretickým izotopovým zastoupením u iontu  $m/z = 286$  (4.28 b)) a shoda protonizovaného iontu atropinu (4.28 c)) s teoretickým izotopovým zastoupením u iontu  $m/z = 290$  (4.29 d)).



Obr. 4.28: Hmotnostní spektra: a) naměřené spektrum eluovaného morfinu z analyzovaného vzorku, b) vypočítané izotopické zastoupení iontu C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup>, c) naměřené spektrum eluovaného atropinu z analyzovaného vzorku, d) vypočítané izotopické zastoupení iontu C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup>.

Dále bylo změřeno hmotnostní spektrum analyzovaného vzorku Morphin-Atropin, které je zobrazeno na obr. 4.29 a). Molekulární iont s hodnotou  $m/z$  286 náleží protonizovanému morfinu (C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup>), molekulární iont s hodnotou  $m/z$  290 náleží protonizovanému atropinu (C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup>).

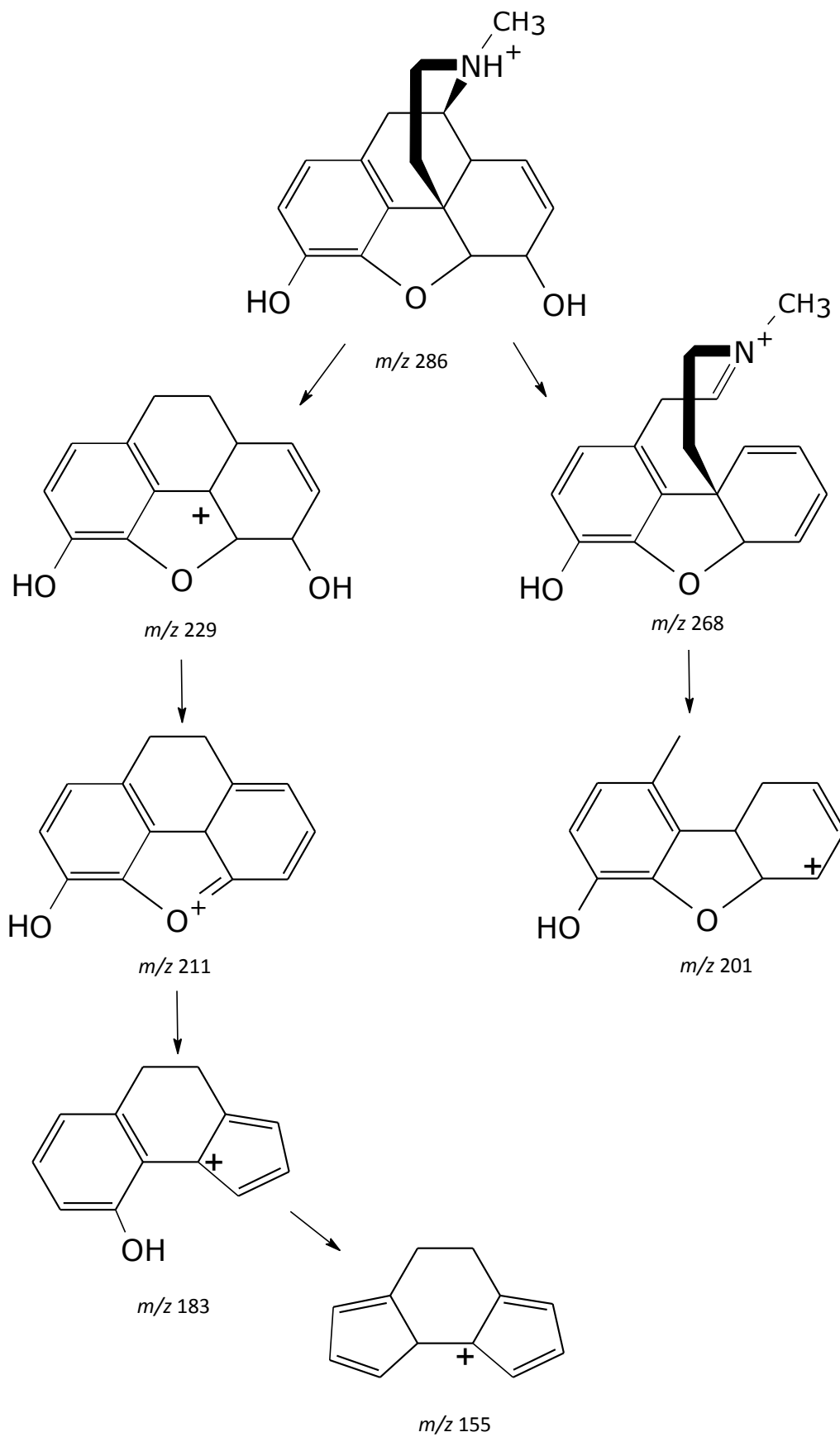


Obr. 4.29: Hmotnostní spektrum analyzovaného vzorku injekčního roztoku Morphín-Atropín ESI ionizací v pozitivním módu: a) HPLC/MS/MS spektrum vzorku injekčního roztoku Morphín-Atropín b) dceřiné spektrum vznikající z iontu  $m/z = 286$  (morfin) c) dceřiné spektrum vznikající z iontu  $m/z = 290$  (atropin).

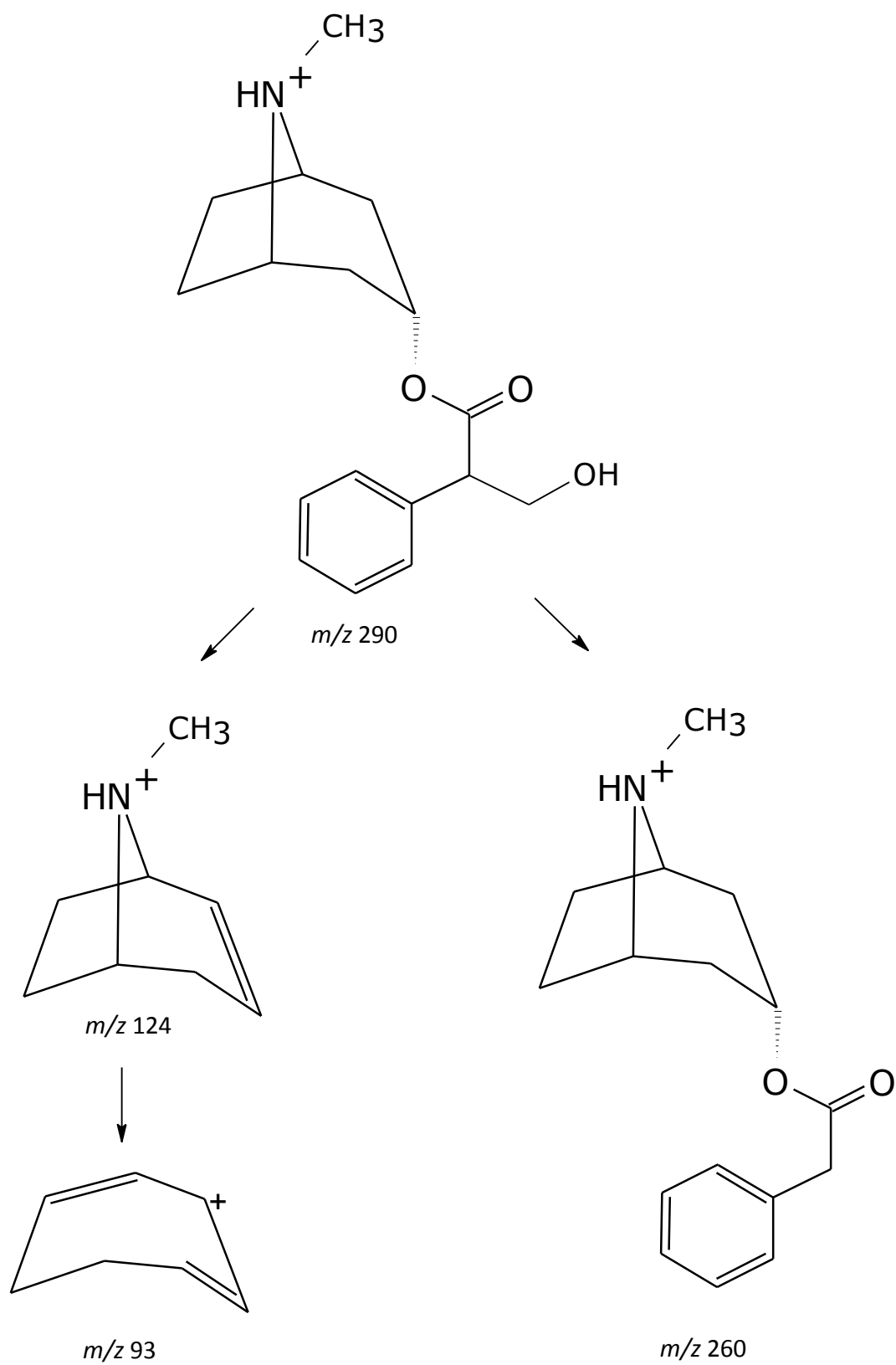
Pro potvrzení identity píku  $m/z = 286$  a  $m/z = 290$  byla provedena MS/MS analýza. Jako prekurzor byl vybrán iont protonované molekuly morfinu s hodnotou  $m/z = 286$  a iont protonované molekuly atropinu s hodnotou  $m/z = 290$ . Jejich fragmentací v iontové pasti vznikly produkty rozpadu, které jsou zaznamenány jako spektrum dceřiných iontů morfinu (obr. 4.29 b)) a atropinu (obr. 4.29 c)).

Hlavními rozpadovými produkty morfinu jsou ionty s hodnotami  $m/z$  268, 229, 211, 201, 183 a 155. Mechanismus fragmentace je uveden na obr. 4.30. Z prekurzorového iontu  $m/z = 286$  vzniká odštěpením molekuly vody iont 268, z něhož následným odštěpením  $-C_4H_5N$  vzniká iont 201. Z prekurzorového iontu  $m/z = 286$  dále vzniká odštěpením  $-C_3H_7N$  iont 229, z něhož následným odštěpením molekuly vody vzniká iont 211. Z iontu 211 vzniká odštěpením  $-CO$  iont 183, z něhož následným odštěpením  $-CO$  vzniká iont 155.

Hlavními rozpadovými produkty atropinu jsou ionty s hodnotami  $m/z$  260, 124 a 93. Mechanismus fragmentace je uveden na obr. 4.31. Z prekurzorového iontu  $m/z = 290$  vzniká odštěpením skupiny  $-C_9H_{10}O_3$  iont 124, z něhož následným odštěpením  $-CH_3N$  vzniká iont 93. Z prekurzorového iontu  $m/z = 290$  dále vzniká odštěpením  $-CH_2O$  iont 260.

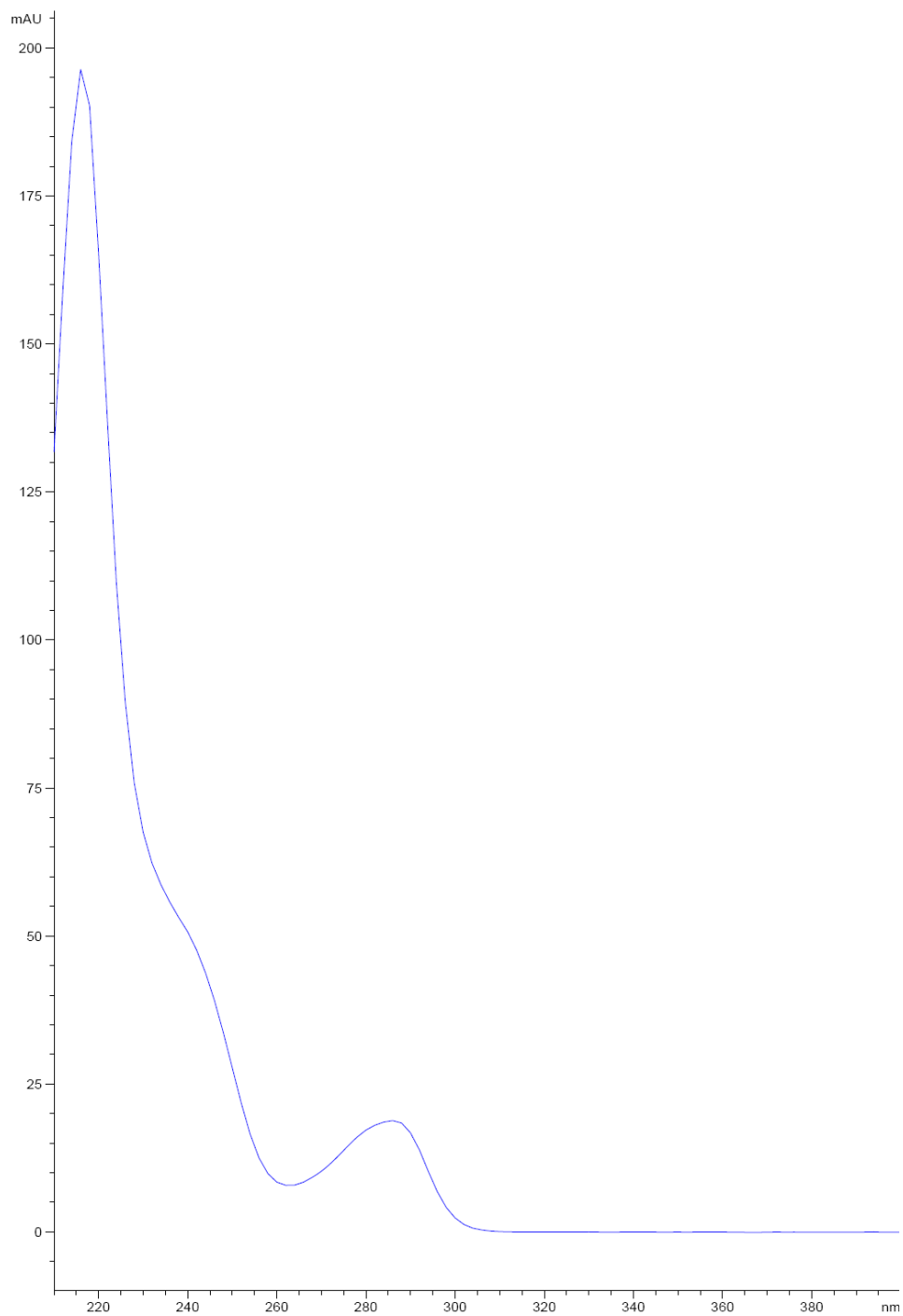


Obr. 4.30: Základní fragmentace protonizované molekuly morfinu.



Obr. 4.31: Základní fragmentace protonizované molekuly atropinu.

Identita morfinu byla dále potvrzena porovnáním UV spektra píku morfinu na chromatogramu (obr. 4.32). Spektrum se shodovalo se spektrem publikovaným v literatuře [13], zejména shodou absorpčních maxim. Morfin ve slabě kyselém prostředí vykazuje tři absorpční maxima při vlnových délkách 220, 240 a 285 nm. Atropin nevykazuje v celém rozsahu UV-VIS spektra pozorovatelné absorpční maximum.



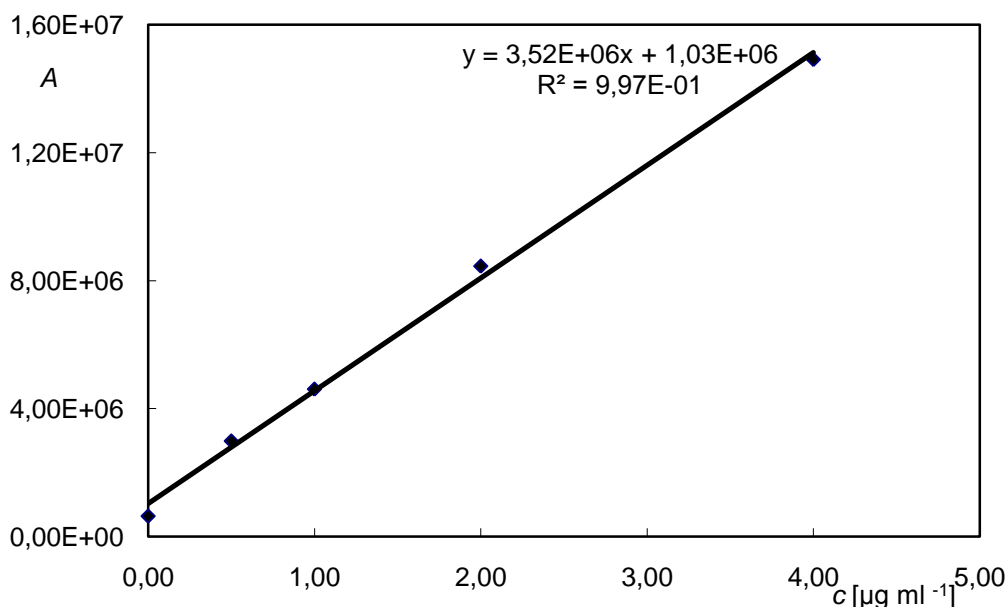
Obr. 4.32: UV spektrum morfinu změřeno na DAD detektoru.

#### 4.5.3 Stanovení obsahu morfinu a atropinu ve vzorku

Stanovení morfinu nemohlo být provedeno z důvodu nedostupnosti standardu. Jeho obsah byl stanoven na Ústavu soudního lékařství a toxikologie 1LF metodou vnitřního standardu pomocí GC-MS, kdy jako vnitřní standard byl použit morfin-d3. Tímto způsobem byl stanovený obsah na  $15 \text{ mg ml}^{-1}$  morfinu, což odpovídá 75 % deklarované koncentrace.

Obsah atropinu byl stanoven metodou standardního přídavku na základě ploch chromatografických píků. Kalibrační závislost tohoto stanovení je zobrazena na obr. 4.33. Analyzovaný injekční roztok Morphín-Atropin obsahoval  $0,59 \pm 0,02 \text{ mg}$  atropinu, což odpovídá  $58,2 \pm 2,0 \%$  deklarované koncentrace (variační koeficient nepřesáhl 5%).

Hodnoty obsahu účinných látek se po letech snížily oproti deklarovaným hodnotám, degradační produkty morfinu (kodein a  $m/z = 201$ ) byly v injekčním roztoku nalezeny, přičemž jejich koncentrace stanovována nebyla. Degradační produkt  $m/z = 201$  nebyl blíže identifikován. Jako degradační produkt morfinu byl určen podle fragmentace této účinné látky. Degradační produkty atropinu v roztoku nebyly detegovány. Vzhledem k tomu, že ke stanovení atropinu byl použit certifikovaný kalibrační standard, je jediným pravděpodobným vysvětlením nalezeného polovičního obsahu chyba při výrobě tohoto léčivého přípravku.



Obr. 4.33: Stanovení obsahu atropinu v analyzovaném vzorku injekčního roztoku metodou standardního přídavku - graf kalibrační závislosti koncentrace analyzované látky  $c$  [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ] na ploše píků  $A$ .

## 4.6 Analýza injekčního roztoku „Papaverin-Atropin“

### 4.6.1 Optimalizace chromatografických podmínek

Analýza vzorku injekčního roztoku Papaverin-Atropin byla prováděna metodou HPLC/MS. Při optimalizaci metody jsem vycházela z dříve publikovaných prací, jejichž přehled je podán výše v kap. 2.8. Nejprve jsem se zaměřila na výběr nejvhodnější stacionární fáze s ohledem na její celkovou selektivitu. Vzhledem k charakteru analytu a s využitím informací z literatury jsem se rozhodla pro RP-HPLC chromatografii.

Jako první jsem testovala kolonu Supelco RP C<sub>18</sub> o délce 150 mm, vnitřním průměru 4,6 mm a velikostí zrn 5 µm. Mobilní fází byla směs acetonitril–mravenčanový pufr (10mM, pH = 3,00) v uspořádání s gradientovou elucí, která byla použita s ohledem na nízkou koncentraci atropinu a se zkušenostmi se vzorkem Morphin-Atropin. Ani za těchto podmínek nebyla separace látek dostatečně účinná a proto byla změněna kolona.

Byla použita kolona Watrex RP C<sub>18</sub> o délce 250 mm, vnitřním průměru 4 mm a velikosti zrn 5µm. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril–mravenčanový pufr (10mM, pH = 3,00) s gradientovou elucí, jejíž parametry jsou uvedeny v tabulce 4.3. Oproti předchozímu gradientu byla snížena průtoková rychlost s ohledem na délku kolony a tlak v koloně.

Tabulka 4.3

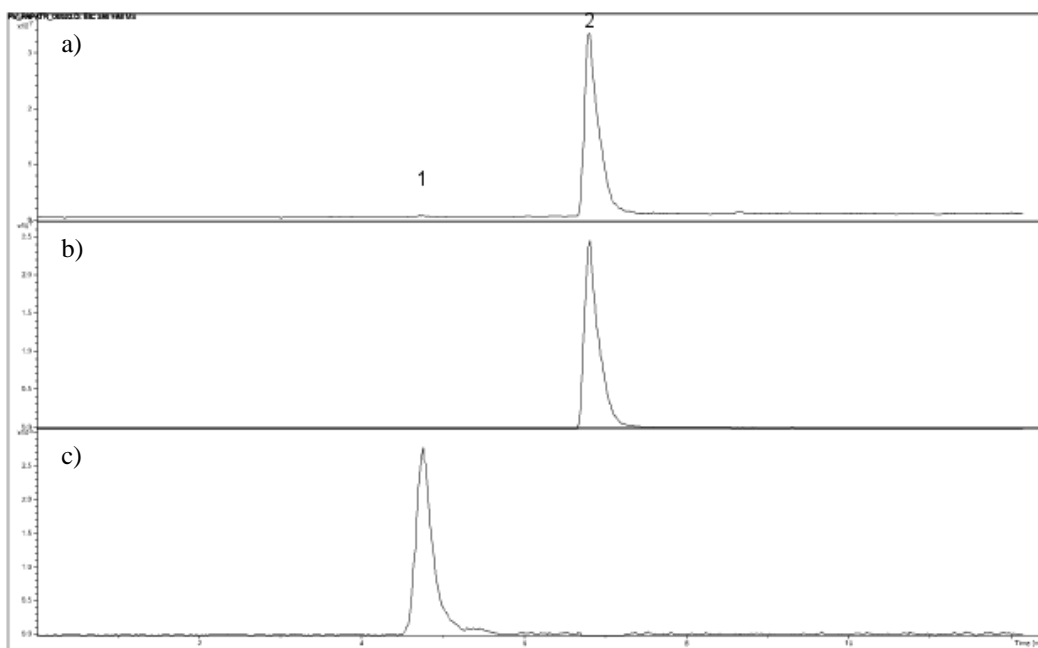
HPLC gradient používaný pro analýzu vzorku Papaverin-Atropin. Roztok A představuje acetonitril a roztok B 10mM mravenčanový pufr o pH = 3,00

t min	složení gradientu		průtoková rychlost ml min <sup>-1</sup>
	roztok A, %	roztok B, %	
0,00	35	65	0,750
2,00	80	20	0,600
10,00	85	15	0,600
15,00	35	65	0,600
20,00	35	65	0,800

### 4.6.2 Identifikace látek ve vzorku a interpretace hmotnostních spekter

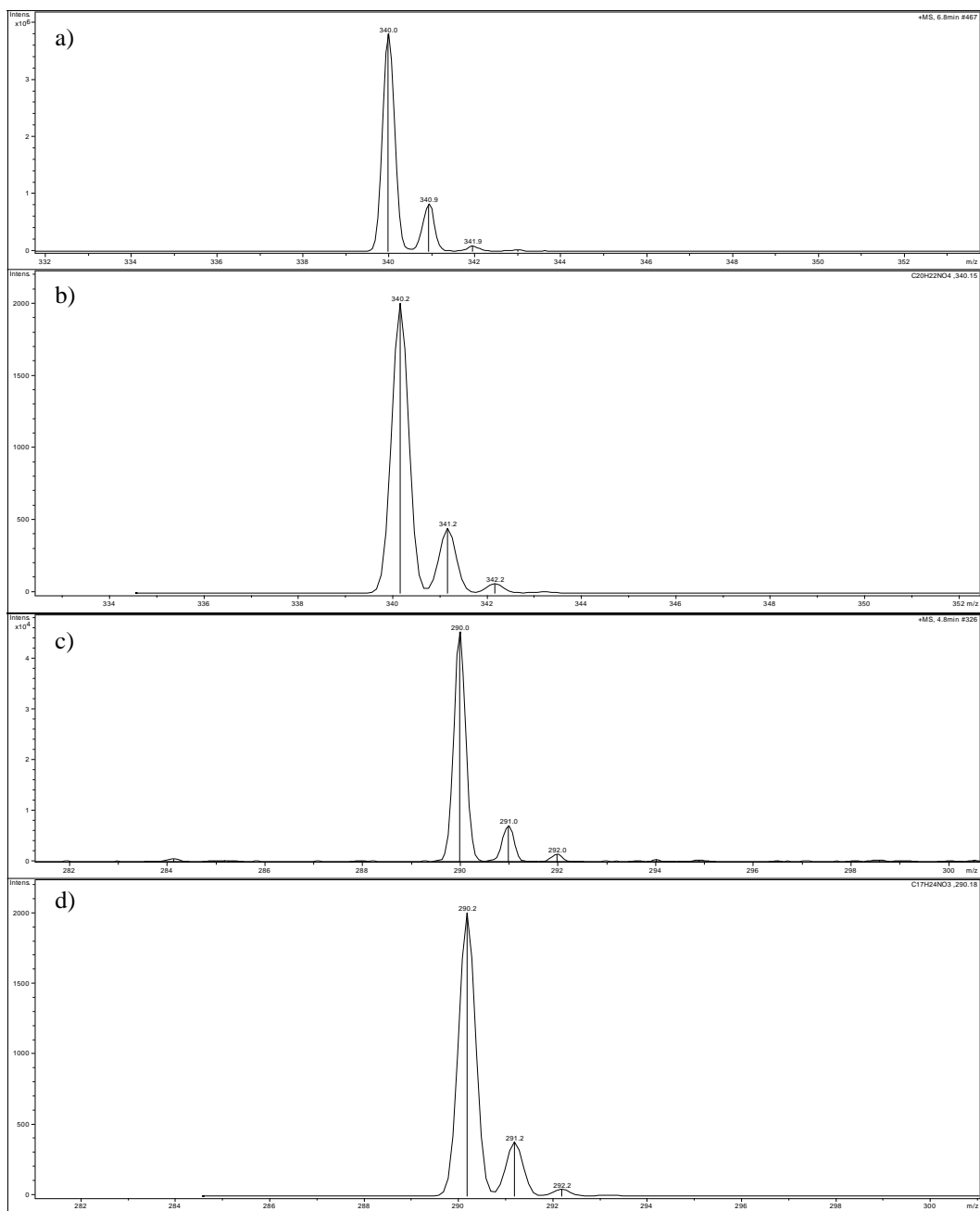
HPLC/MS chromatogram analyzovaného vzorku injekčního roztoku Papaverin-Atropin je zobrazen na obr. 4.34 a). Pík s retenčním časem 4,8 minut přísluší atropinu, pík s retenčním časem 6,8 minut přísluší papaverinu. Na obrázku 4.34 b) je zobrazen

izolovaný pík papaverinu při  $m/z = 340$  a na obrázku 4.34 c) je zobrazen izolovaný pík atropinu při  $m/z = 290$ .



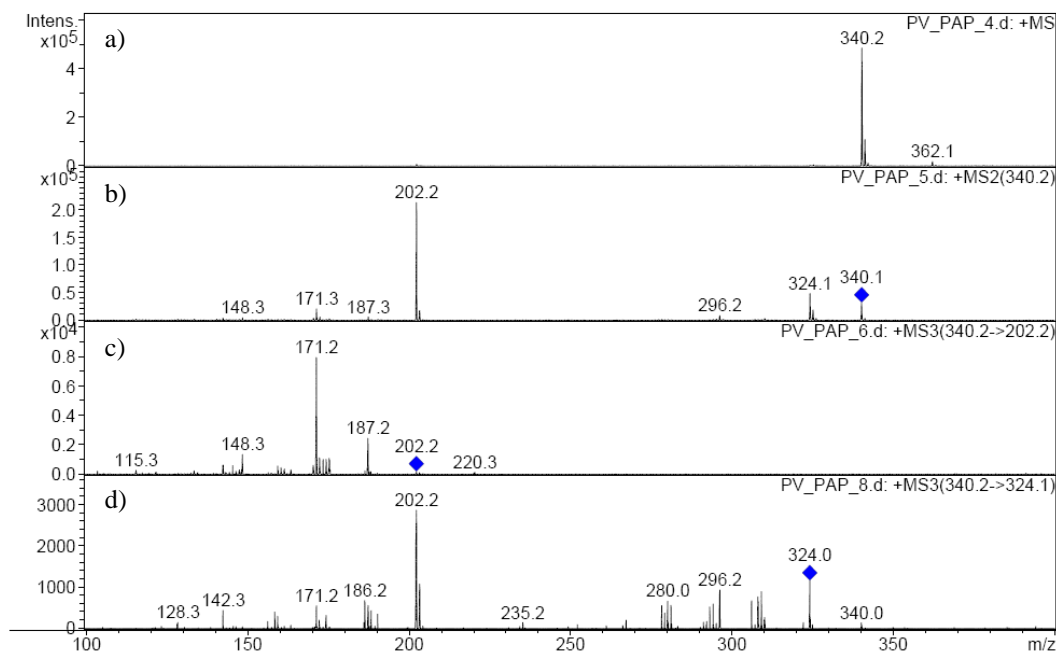
Obr. 4.34: HPLC/MS chromatogram analyzovaného vzorku injekčního roztoku Papaverin-Atropin na koloně Supelco RP C<sub>18</sub>150 × 4,6 mm × 5 μm gradientovou elucí s mobilní fází acetonitril a 10mM mravenčanový pufr o pH = 3,00: a) naměřený TIC chromatogram eluovaného vzorku, píky (1) atropin, (2) papaverin, b) izolovaný pík papaverinu při  $m/z = 340$ , c) izolovaný pík atropinu při  $m/z = 290$ .

Odpovídající hmotnostní spektrum píku papaverinu a atropinu s jejich vypočítaným izotopickým zastoupením je zobrazeno na obr. 4.35. Je zde patrná dobrá shoda protonizovaného iontu papaverinu (4.35 a)) s teoretickým izotopovým zastoupením u iontu  $m/z = 340$  (4.35 b)) a shoda protonizovaného iontu atropinu (4.35 c)) s teoretickým izotopovým zastoupením u iontu  $m/z = 290$  (4.35 d)).



Obr. 4.35: Hmotnostní spektra: a) naměřené spektrum eluovaného papaverinu z analyzovaného vzorku, b) vypočítané izotopické zastoupení iontu  $C_{20}H_{22}NO_4$ , c) naměřené spektrum eluovaného atropinu z analyzovaného vzorku, d) vypočítané izotopické zastoupení iontu  $C_{17}H_{24}NO_3$ .

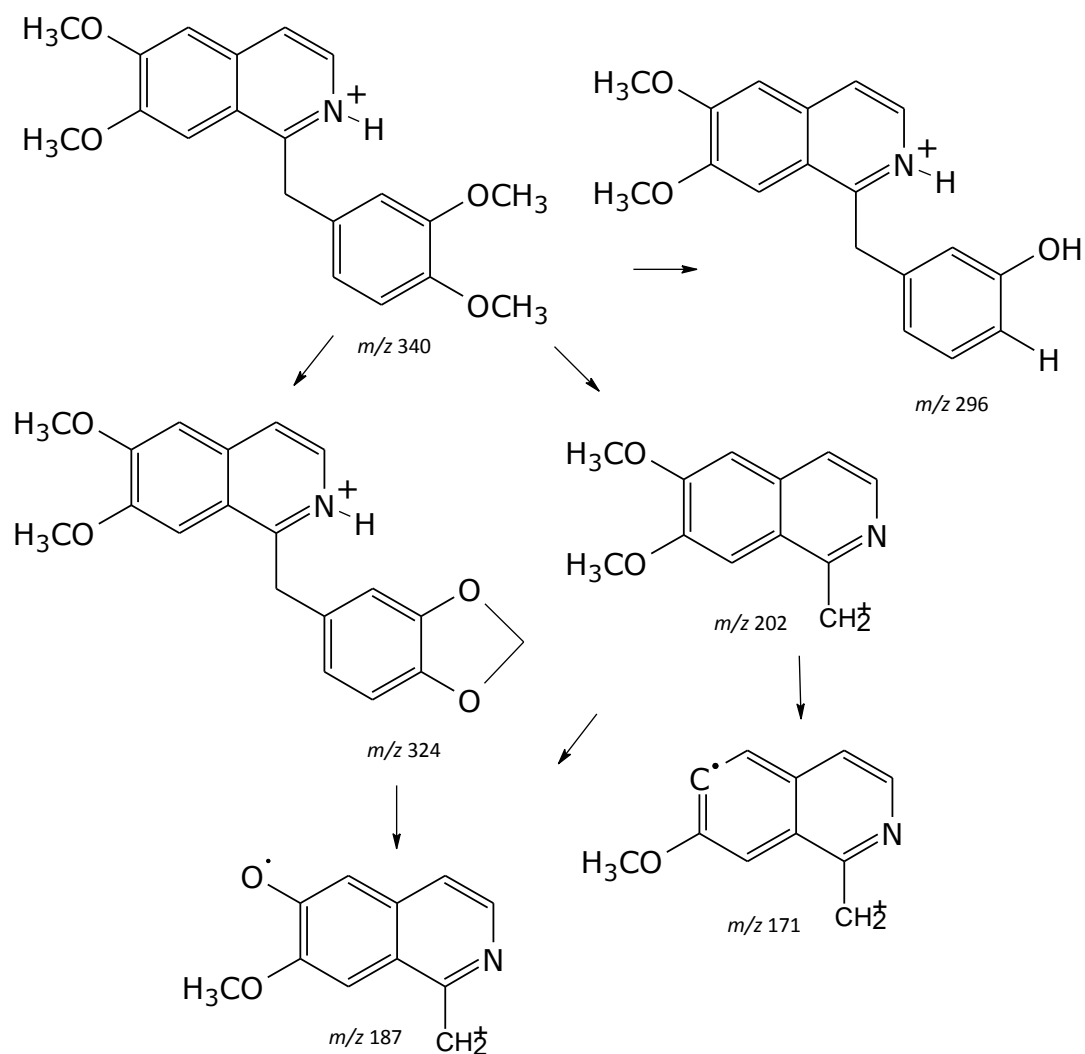
Dále bylo změřeno hmotnostní spektrum analyzovaného vzorku Papaverin-Atropin, které je zobrazeno na obr. 4.36 a). Molekulární iont s hodnotou  $m/z$  340 náleží protonizovanému papaverinu ( $C_{20}H_{22}NO_4$ ).



Obr. 4.36: Hmotnostní spektrum analyzovaného vzorku injekčního roztoku Papaverin-Atropin ESI ionizací v pozitivním módu: a) HPLC/MS/MS spektrum vzorku injekčního roztoku Papaverin-Atropin b) dceřiné spektrum vznikající z iontu  $m/z=340$  (papaverin) c) dceřiné spektrum vznikající z iontu  $m/z=202$ , d) dceřiné spektrum vznikající z iontu  $m/z=324$ .

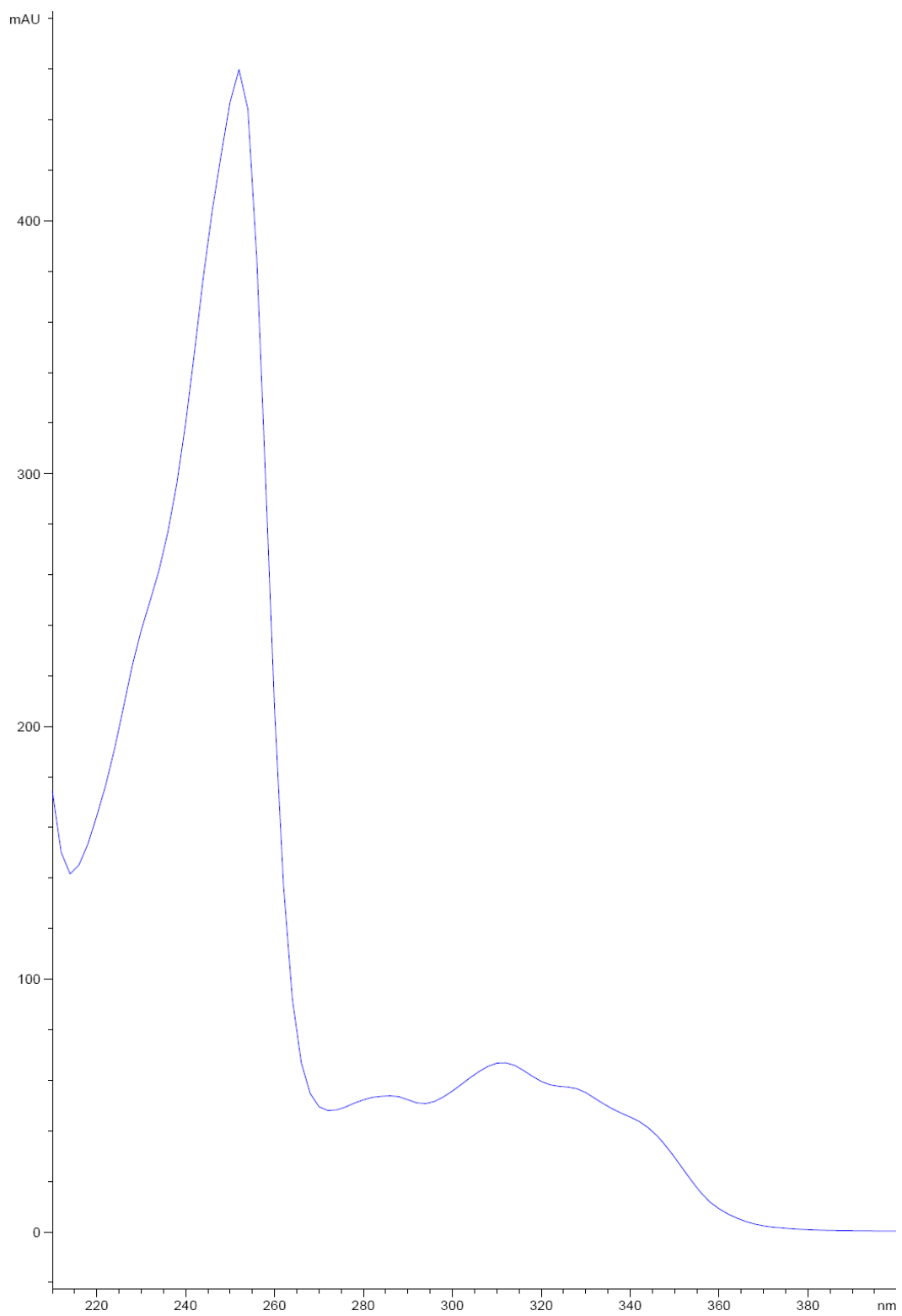
Pro potvrzení identity píku  $m/z = 340$  byla provedena MS/MS analýza. Jako prekurzor byl vybrán iont protonované molekuly papaverinu s hodnotou  $m/z = 340$ . Jejich fragmentací v iontové pasti vznikly produkty rozpadu, které jsou zaznamenány jako spektrum dceřiných iontů papaverinu (obr. 4.36 b)).

Hlavními rozpadovými produkty papaverinu jsou ionty s hodnotami  $m/z$  324, 296, 202, 187 a 171. Mechanismus fragmentace je uveden na obr. 4.37. Z prekurzorového iontu  $m/z = 340$  vzniká odštěpením skupiny  $-CH_4$  iont 324, z něhož následným odštěpením skupin  $-CH_3$  a  $-C_7H_6O_2$  vzniká iont 187. Z prekurzorového iontu  $m/z = 340$  dále vzniká odštěpením  $-C_8H_{10}O_2$  iont 202, z něhož následným odštěpením skupiny  $-CH_3O$  vzniká iont 171. Iont 296 vzniká odštěpením  $-C_2H_4O$  z prekurzorového iontu  $m/z = 340$ .



Obr. 4.37: Základní fragmentace protonizované molekuly papaverinu.

Identita papaverinu byla dále potvrzena porovnáním UV spektra píku papaverinu na chromatogramu (obr. 4.38). Spektrum se shodovalo se spektrem publikovaným v literatuře [13], zejména shodou absorpčních maxim. Papaverin ve slabě kyselém prostředí vykazuje dvě absorpční maxima při vlnových délkách 250 nm a 310 nm.

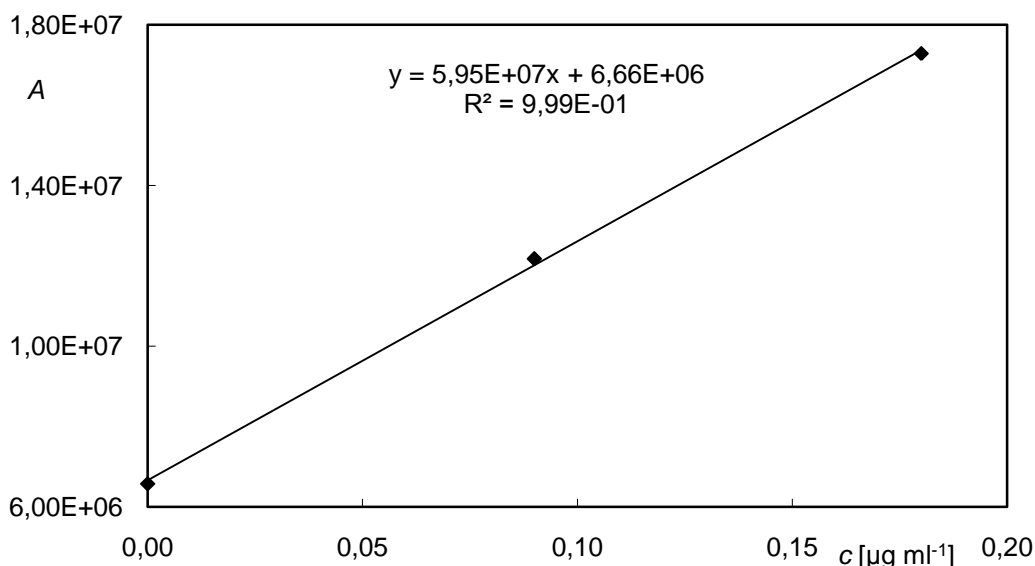


Obr. 4.38: UV spektrum papaverinu změřeno na DAD detektoru.

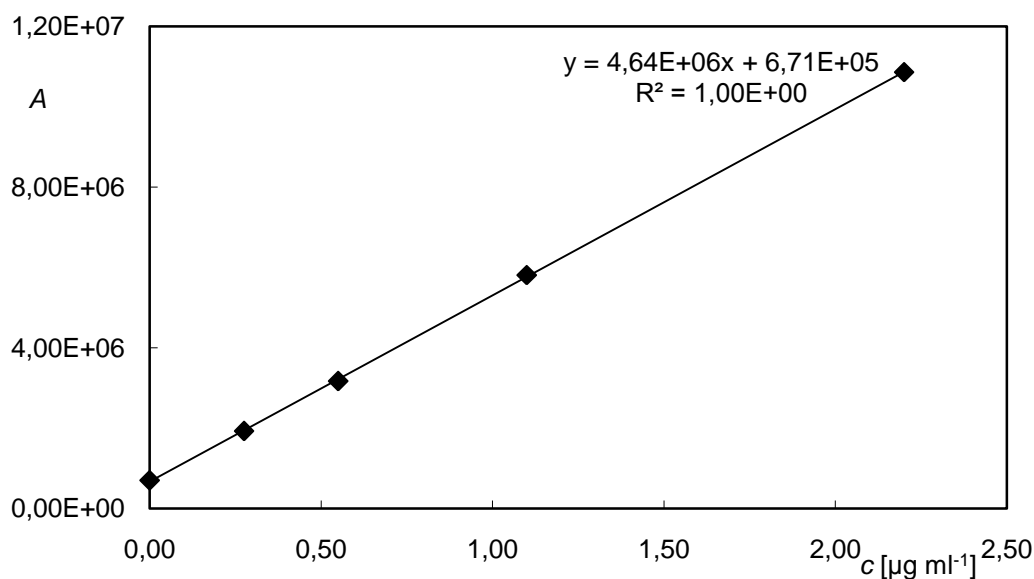
#### 4.6.3 Stanovení obsahu papaverinu a atropinu ve vzorku

Stanovení obsahu papaverinu a atropinu v injekčním roztoku bylo provedeno metodou standardního přídatku na základě ploch chromatografických píků. Kalibrační závislosti těchto stanovení jsou zobrazeny na obr. 4.39 a 4.40. Analyzovaný injekční roztok obsahoval  $44,8 \pm 0,3$  mg papaverinu, což odpovídá  $111,9 \pm 0,7$  % deklarované hodnoty. Injekční roztok obsahoval  $0,58 \pm 0,02$  mg atropinu, což odpovídá  $57,8 \pm 2,0$  % (variační koeficient obou stanovení nepřesáhl 5%).

Chromatografické stanovení neprokázalo žádné degradační produkty. Obsah papaverinu lze považovat i po letech za stabilní. U vzorku atropinu byl k jeho stanovení použit certifikovaný kalibrační standard, tudíž jediným pravděpodobným vysvětlením jeho nízkého obsahu (nalezena polovina deklarovaného množství) je chyba při výrobě tohoto léčivého přípravku.



Obr. 4.39: Stanovení obsahu papaverinu v analyzovaném vzorku injekčního roztoku metodou standardního přídatku - graf kalibrační závislosti plochy píků A na koncentraci analyzované látky c [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ].



Obr. 4.40: Stanovení obsahu atropinu v analyzovaném vzorku injekčního roztoku metodou standardního přídávku - graf kalibrační závislosti plochy píků  $A$  na koncentraci analyzované látky  $c$  [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ].

## 4.7 Analýza injekčního roztoku „Acedicon“

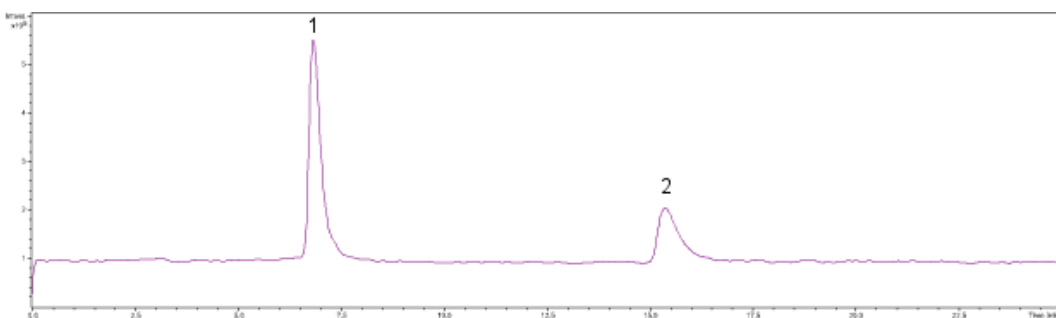
### 4.7.1 Optimalizace chromatografických podmínek

Analýza vzorku injekčního roztoku Acedicon s obsahem účinné látky acetyldemethyldihydrothebainu byla prováděna metodou HPLC/MS. Vzhledem k předcházejícím měřením byla použita kolona Watrex RP  $C_{18}$  o délce 250 mm, vnitřním průměru 4 mm a velikosti zrn  $5\mu\text{m}$ . Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a mravenčanového pufru (10mM, pH=3,00) v poměru 40:60. Touto metodou byly detekovány píky s  $m/z = 300$  a  $m/z = 215$ , které nepřísluší stanovované účinné látce. Následnou MS/MS fragmentací bylo zjištěno, že pík s  $m/z = 300$  přísluší dvěma látkám. Tyto dvě látky byly separovány metodou GC/MS s pomocí silylační modifikace.

### 4.7.2 Identifikace látek ve vzorku a interpretace hmotnostních spekter

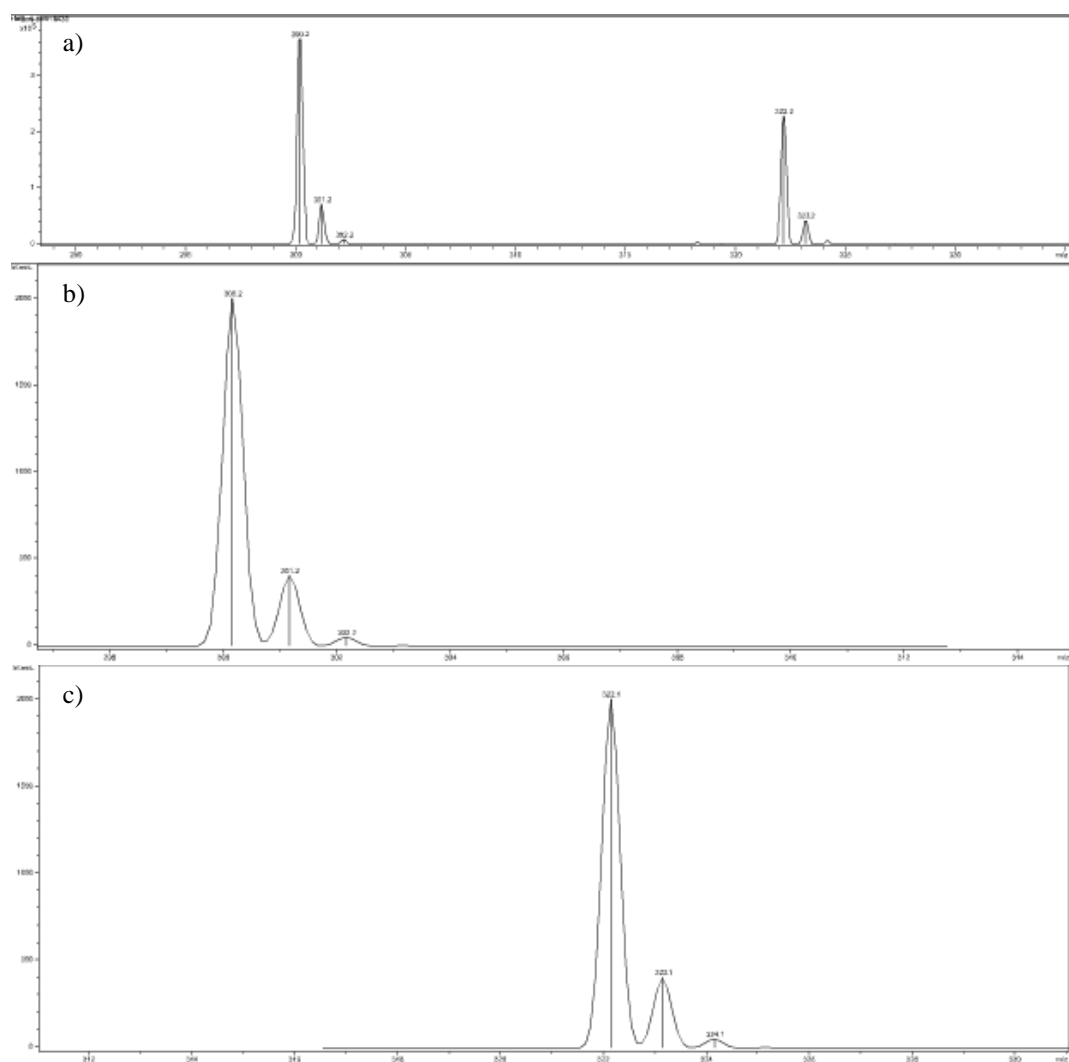
HPLC/MS chromatogram analyzovaného vzorku injekčního roztoku Acedicon je zobrazen na obr. 4.41. Byly nalezeny dva píky, ovšem ani jeden z nich nepřísluší acetyldemethyldihydrothebainu. Píky s retenčním časem 6,9 min byl identifikován jako

degradační produkt s  $m/z = 300$ , pík s retenčním časem 15,4 min byl identifikován jako degradační produkt s  $m/z = 215$ .



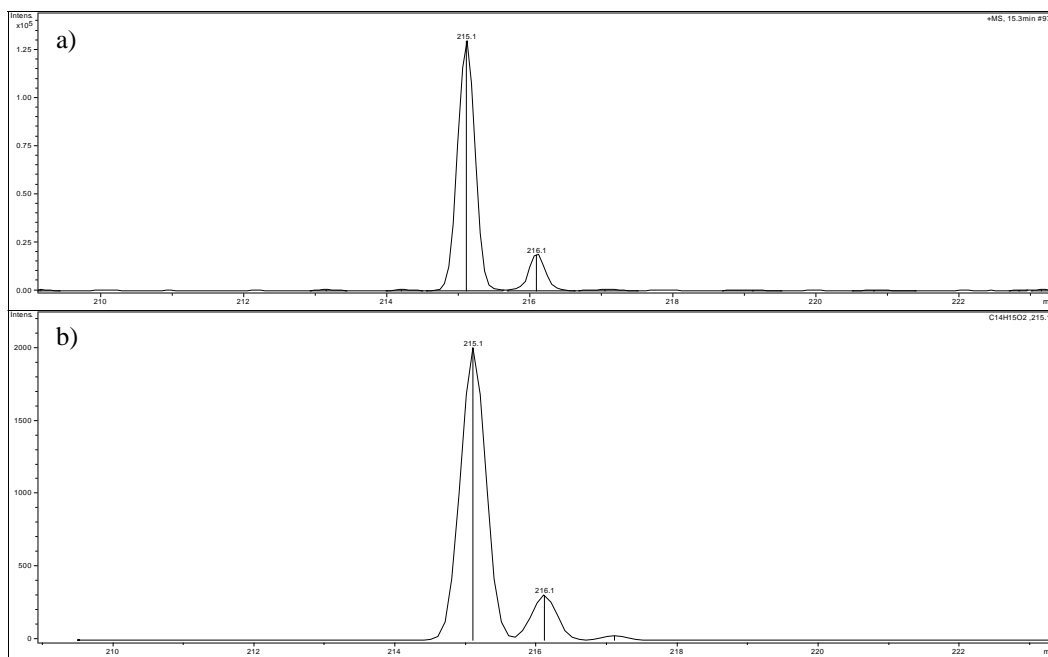
Obr. 4.41: HPLC/MS chromatogram analyzovaného vzorku injekčního roztoku Acedicon na koloně Watrex RP C<sub>18</sub> 250 × 4 mm × 5 μm izokratickou elucí s mobilní fází acetonitril a 10mM mravenčanový pufr o pH = 3,00 (40:60, v/v) s průtokem 0,650 ml min<sup>-1</sup>. Píky: (1) degradační produkt  $m/z = 300$ , (2) degradační produkt  $m/z = 215$ .

Pík s  $m/z = 300$  byl předběžně identifikován jako kodein (C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>3</sub>), který vznikl deacetylací z acetyldemethylhydrothebainu. Na základě fragmentace vzorku kodeinu, která je popsána v kapitole 4.1.2 byl pík s  $m/z = 215$  předběžně identifikován jako degradační produkt kodeinu (C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>). Odpovídající hmotnostní spektrum píku kodeinu a jeho vypočítané izotopické zastoupení je zobrazeno na obr. 4.42, ze kterého je patrná dobrá shoda protonizovaného iontu kodeinu (obr. 4.42 a)) s teoretickým izotopovým zastoupením u iontu  $m/z = 300$  (obr. 4.42 b)). Pík 322 náleží kodeinu s aduktem sodíku. Teoretické izotopové zastoupení iontu  $m/z = 322$  je zobrazeno na obr. 4.42 c).



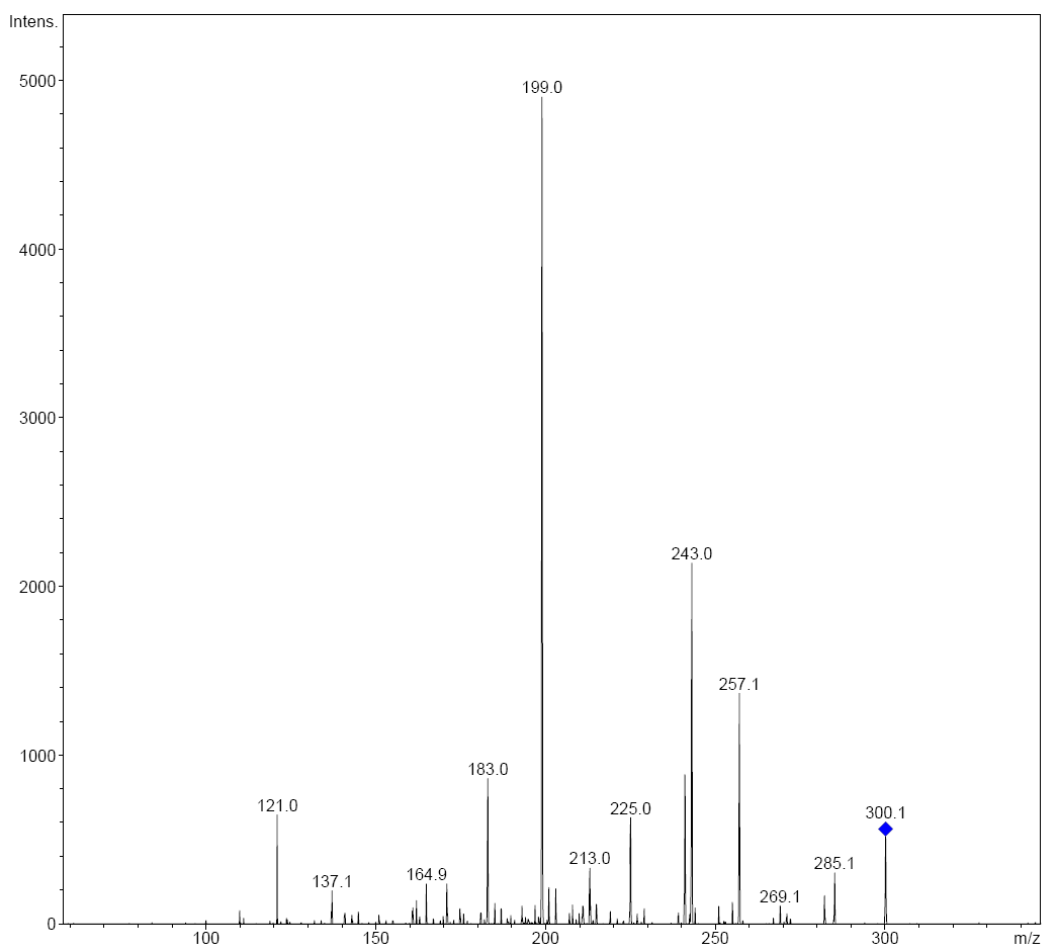
Obr. 4.42: Hmotnostní spektra: a) naměřené spektrum eluovaného kodeinu z analyzovaného vzorku, b) vypočítané izotopické zastoupení iontu  $C_{18}H_{22}NO_3^+$ , c) nasimulované izotopické zastoupení pro iont  $C_{18}H_{21}NO_3Na$ .

Odpovídající hmotnostní spektrum píku degradačního produktu s  $m/z = 215$  a jeho vypočítané izotopické zastoupení je zobrazeno na obr. 4.43, ze kterého je patrná dobrá shoda protonizovaného iontu degradačního produktu (obr. 4.43 a)) s teoretickým izotopovým zastoupením u iontu  $m/z = 215$  (obr. 4.43 b)).

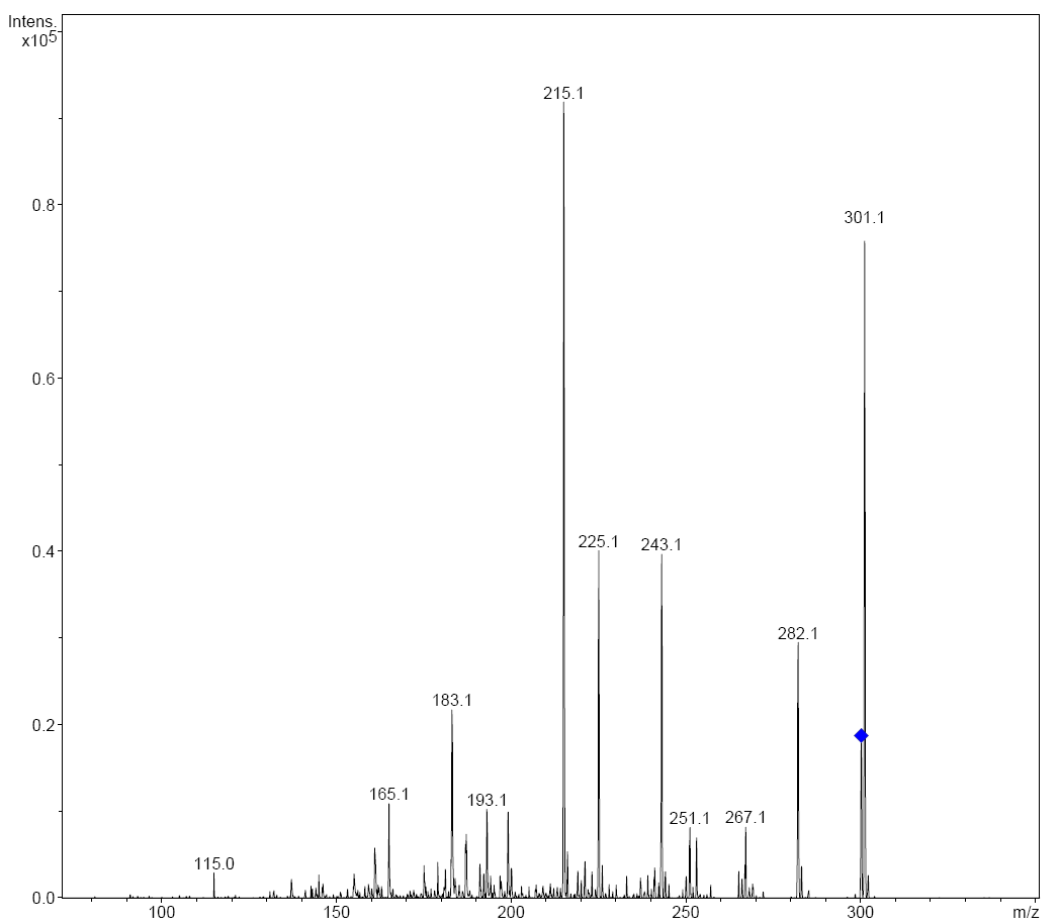


Obr. 4.43: Hmotnostní spektra: a) naměřené spektrum eluovaného degradačního produktu  $m/z = 215$  z analyzovaného vzorku, b) vypočítané izotopické zastoupení iontu  $C_{14}H_{15}NO_2$ .

Pro potvrzení identity píku  $m/z = 300$  byla provedena MS/MS analýza. Jako prekurzor byl vybrán iont protonované molekuly předběžně určeného kodeinu s hodnotou  $m/z = 300$ . Jeho fragmentací v iontové pasti vznikly produkty rozpadu, které jsou zaznamenány jako spektrum dceřiných iontů (obr. 4.44). Pro srovnání byla provedena MS/MS analýza standardu kodeinu, jehož spektrum dceřiných iontů je zobrazeno na obr. 4.45. Při srovnání těchto dvou spekter bylo zjištěno, že dceřiné ionty našeho vzorku a standardu kodeinu úplně nesouhlasí. Hlavními rozpadovými produkty kodeinu (standardu) jsou ionty s hodnotami  $m/z$  282, 243, 225, 215, 193, 183 a 165. Při fragmentaci píku  $m/z = 300$  eluovaného ze vzorku Acedicon byly hlavními rozpadovými produkty ionty s hodnotami  $m/z$  285, 269, 257, 243, 225, 199, 183 a 165. Fragmenty, které zde byly navíc, musely pocházet z látky, která má stejnou molekulární hmotnost a stejný sumární vzorec jako kodein. Tato látka byla předběžně identifikována jako hydrokodon. Mechanismus fragmentace hydrokodonu je uveden na obr. 4.46. Mechanismus fragmentace kodeinu je uveden na obr. 4.4 v kapitole 4.1.

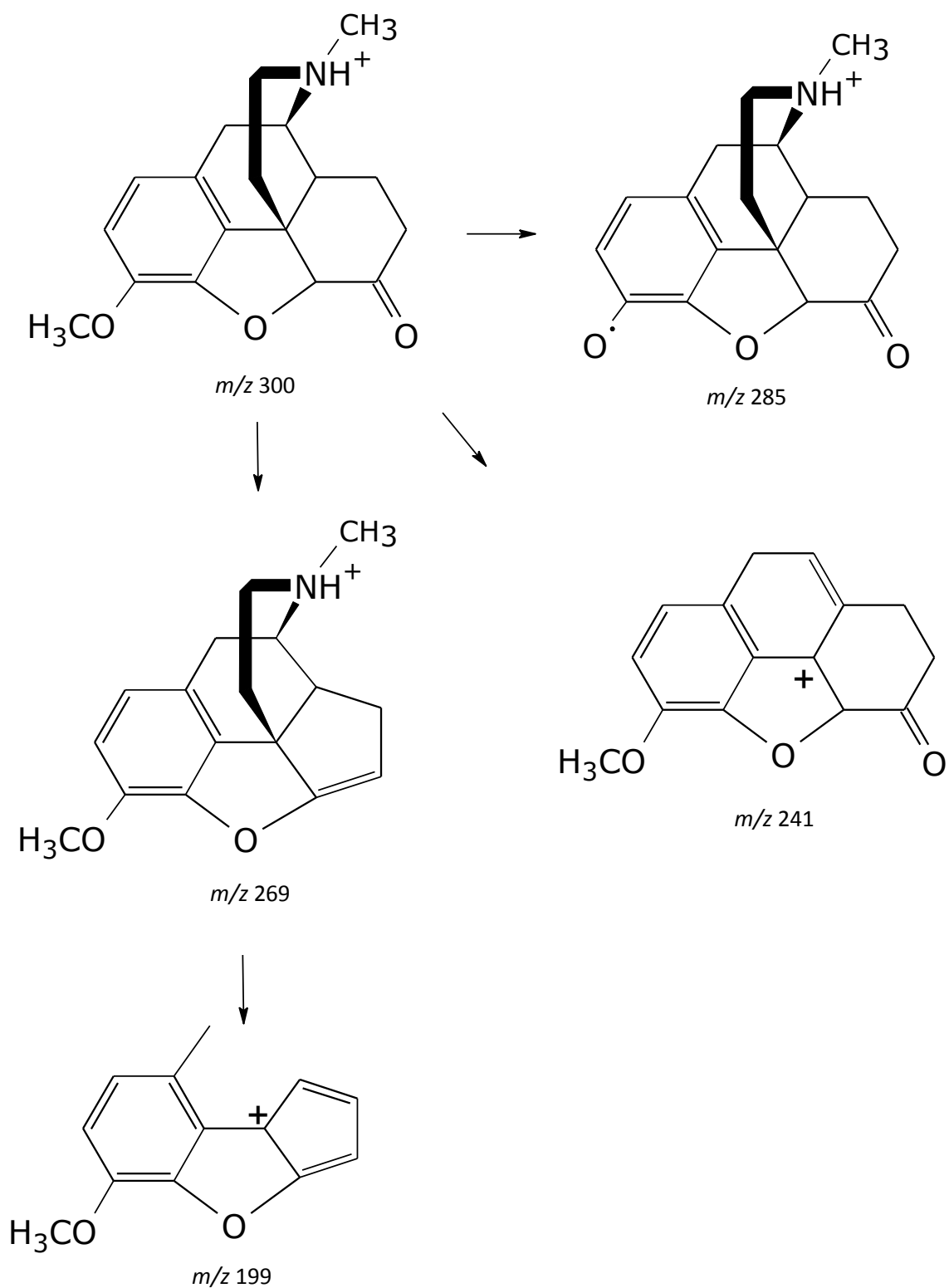


Obr. 4.44: MS/MS spektrum analyzovaného vzorku injekčního roztoku Acediconu v pozitivním módu ESI ionizací: dceřiné spektrum vznikající z iontu  $m/z = 300$ .



Obr. 4.45: MS/MS spektrum standardu kodeinu v pozitivním módu ESI ionizací: dceřiné spektrum vznikající z iontu  $m/z = 300$ .

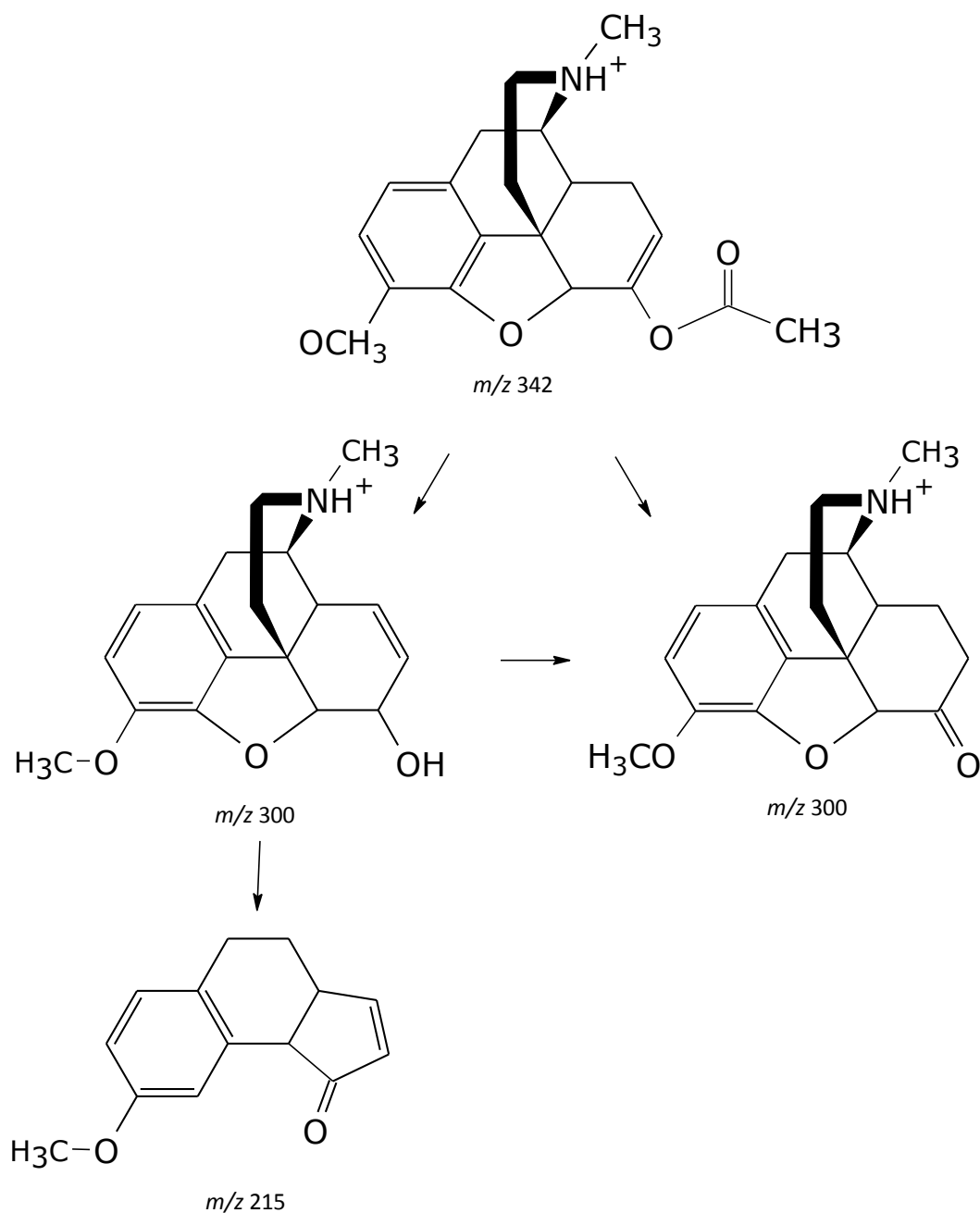
Z prekurzorového iontu  $m/z = 300$  vzniká iont 285 odštěpením  $-\text{CH}_3$ . Z prekurzorového iontu  $m/z = 300$  vzniká odštěpením  $-\text{CH}_3\text{O}$  iont 269, z něhož následným odštěpením  $-\text{C}_4\text{H}_8\text{N}$  vzniká iont 199. Z prekurzorového iontu  $m/z = 300$  vzniká odštěpením  $-\text{C}_3\text{H}_9\text{N}$  iont 241.



Obr. 4.46: Mechanismus fragmentace hydrokodonu.

Ve vzorku injekčního roztoku Acedicon došlo k deacetylaci účinné látky acetyldemethyldihydrothebainu na kodein, který byl následně oxidován na hydrokodon.

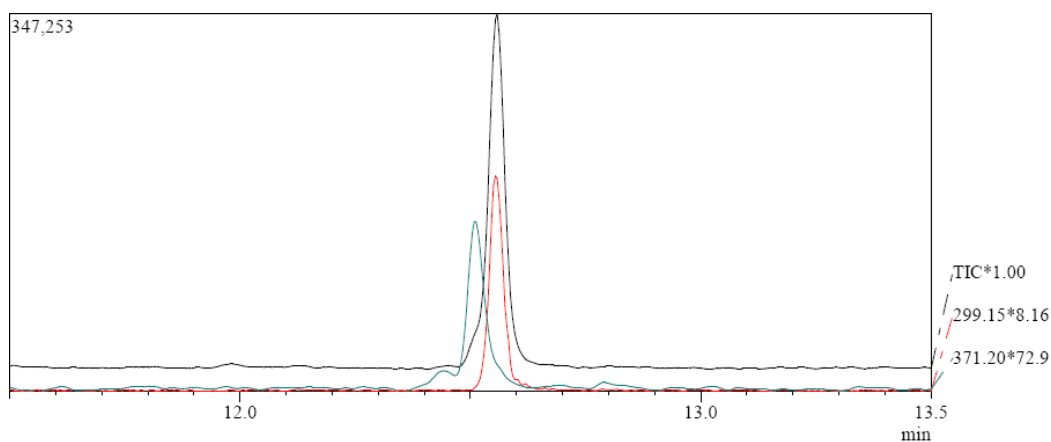
Z kodeinu vznikl také degradační produkt  $m/z = 215$ , který byl identifikován při HPLC/MS analýze.



Obr. 4.47: Mechanismus vzniku degradačních produktů acetyldemethylhydrothebainu.

Separace kodeinu a hydrokonu byla provedena pomocí GC/MS s pomocí silylační modifikace. Příslušný chromatogram je zobrazen na obr. 4.48. Píky se rozdělily, pík s  $m/z = 371$  přísluší nasilylovanému kodeinu. Druhý pík s  $m/z = 299$  přísluší

hydrokodonu, který na rozdíl od kodeinu nemá volnou hydroxylovou skupinu, tudíž nemohl být nasilylován, čímž se potvrdila jeho identita.



Obr. 4.48: GC/MS chromatogram nasilylovaného vzorku Acedicon s použitím kolony DB5 25 m × 0,25 mm × 0,25 μm s průtokem mobilní fáze (Helium) 0,53 ml min<sup>-1</sup> a s EI ionizací.

#### 4.7.3 Stanovení obsahu acetyldemethyldihydrothebainu ve vzorku

Ve vzorku nebyl detekován žádný acetyldemethyldihydrothebain, ale pouze jeho degradační produkty, kterými jsou hydrokodon, kodein a degradační produkt kodeinu s  $m/z = 215$ . Kodein a hydrokodon, jejichž  $m/z = 300$  pro obě látky, nebylo možné pomocí metody HPLC/MS separovat a tudíž ani stanovit jejich koncentraci. Je však zřejmé, že acetyldemethyldihydrothebain je v čase nestabilní a samovolně se rozkládá.

## 5 ZÁVĚR

Cílem mé diplomové práce bylo analyzovat historické léčivé přípravky opiátů a alkaloidů, které byly ve formě tablet nebo injekčních roztoků. K analýze byla použita metoda HPLC/MS a GC/MS. Pro každý analyzovaný léčivý přípravek byly optimalizovány podmínky stanovení. Byla studována přítomnost účinných látek a jejich degradačních produktů. Na základě interpretace MS/MS spekter byly identifikovány hlavní fragmentační produkty účinných látek. Téměř u všech lékových forem byl metodou standardního přídatku na základě ploch chromatografických píků stanoven obsah účinné látky. Přehled analyzovaných vzorků a stanovených obsahů účinných látek podává tab. 5.1.

Tabulka. 5.1

Přehled analyzovaných vzorků historických léčivých přípravků a stanovených obsahů účinných látek

název přípravku	účinná látka	nalezený obsah (%)
Codein phosphoric.	kodein	98,0
Diolan 0,01 g SChHV	ethylmorfin	98,4
Diolan 0,015 g SChHV	ethylmorfin	114,6
Diolan 0,03 g SChHV	ethylmorfin	100,0
Diolan 0,03 g Slovakofarma	ethylmorfin	117,9
Diolan 0,03 g Spofa	ethylmorfin	109,3
Papaverin-Thesal	papaverin	53,7
	theobromin	93,1
Dilaudid hydr.	hydromorfon	— <sup>a</sup>
Morphin-Atropin	morfin	75,0
	atropin	58,2
Papaverin-Atropin	papaverin	111,9
	atropin	57,8
Acedicon	acetyldemethyldihydrothebain	— <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Nebylo možné stanovit vzhledem k nedostatku standardu.

<sup>b</sup> Účinná látka se zcela rozložila.

Jak je z tabulky patrné, obsah některých účinných látek v léčivých přípravcích zůstal téměř nezměněn. Především kodein, ethylmorfin a theobromin zůstal i po letech stále stabilní. Všechny tyto tři látky pocházely z léčivých přípravků ve formě tablet. Naopak acetyldemethyldihydrothebain byl v injekčním roztoku Acedicon zcela rozložen. U atropinu, který byl analyzován vždy ve formě injekčního roztoku, ať už ve směsi

s morfinem nebo papaverinem, nebyly detegovány žádné degradační produkty a přesto byl jeho obsah stanoven jako polovina původního deklarovaného obsahu. Jelikož byl k jeho stanovení použit certifikovaný kalibrační standard, je jediným pravděpodobným vysvětlením nalezeného nízkého obsahu chyba při výrobě těchto dvou léčivých přípravků. Analogicky je tomu stejně u vzorku tablety Papaverin-Thesal, kde bylo stanoveno zhruba poloviční množství papaverinu.

## 6 LITERATURA

- [1] Yoshioka, S.; Stella, V.J.: *Stability of Drugs and Dosage Forms*. New York, Kluwer 2002.
- [2] Tønnesen, H. H.: *Photostability of Drugs and Drug Formulations*. 2nd ed. Boca Raton, CRC Press 2004.
- [3] Smith, R. J.; Webb, M. L.: *Analysis of Drug Impurities*. Blackwell 2007.
- [4] Stark, G.; Fawcett, J. P.; Tucker, I. G.; Weatherall, I. L.: Instrumental evaluation of color of solid dosage forms during stability testing. *International Journal of Pharmaceutics* 143 (1996), 93–100.
- [5] Petereit, H.-U.; Weisbrod, W.: Formulation and process considerations affecting the stability of solid dosage forms formulated with methacrylate copolymers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 47 (1999), 15–25.
- [6] Roksvaag, P. O.; Fredrikson, J. B.; Waaler T.: High-performance liquid chromatographic assay of morphine and the main degradation product pseudo-morphine. A study of pH, discoloration and degradation in 1 to 43 years old morphine injections. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 55 (1980), 198–202.
- [7] Gonzalez, J.R.: Study of antique medicines. *Farmacia Clinica* 6 (1989), 451–2, 454, 457–8. CA 113:218335.
- [8] Nesměrák, K.; Štícha, M.; Čvančarová, M.: HPLC/MS analysis of historical pharmaceutical preparations of heroin and cocaine. *Analytical Letters* 43 (2010), 2572–2581.
- [9] Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M.: *Farmakologie a toxikologie*. Praha, Grada 2004.
- [10] Melichar, B. a kol.: *Chemická léčiva*. Praha, Avicenum 1972.
- [11] Wenke, M.; Hynie, S.; Mráz, M.: *Farmakologie*. Praha, Avicenum 1977.
- [12] Meyers, R. A.: *Encyklopedia of Analytical Chemistry. Applications, Theory and Instrumentation*. 2001
- [13] Moffat, A. C.; Osselton, M. D.; Widdop, B (Eds.): *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 4th Edition. London, Pharmaceutical Press 2011.
- [14] Patrick, G. L.: *An Introduction to Medicinal Chemistry*. New York, Oxford University Press 1995.
- [15] Wheeler D. M. S., Kinstle T. H., Rinehart Jr. K. L.: Mass spectral studies of alkaloids related to morphine. *Journal of the American Chemical Society* 89 (1967), 4494–4501.
- [16] Zhang Z., Yan K., 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 Communications in Mass Spectrometry* 22 (2008), 2851–2862.
- [17] Maralikova B., Weinmann W.: Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification. *Journal of Chromatography B* 811 (2004), 21–30.
- [18] Bassan D. M., Erdmann F., Krüll R.: Quantitative determination of 43 common drugs and drugs of abuse in human serum by HPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400 (2011), 43–50.
- [19] Berg T., Lundanes E., Christophersen A. S., Strand D. H.: Determination of opiates and cocaine in urine by high pH mobile phase reversed phase UPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B* 877 (2009), 421–432.
- [20] Concheiro M., de Castro A., Quintela O., Cruz A., López-Rivadulla M.: Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (2008), 2329–2338.
- [21] Deventer K., Pozo O. J., Eenoo P. V., Delbeke F. T.: Development of quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the detection of narcotics in

- urine relevant to doping analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21 (2007), 3015–3023.
- [22] Maquille A., Guillarme D., Rudaz S., Veuthey J. L.: High-throughput screening of drugs of abuse in urine by supported liquid-liquid extraction and UHPLC coupled to tandem MS. *Chromatographia* 70 (2009), 1373–1380
- [23] Øiestad E. L., Johansen U., Øiestad A. M. L., Christophersen A. S.: Drug screening of whole blood by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* 35 (2011), 280–293.
- [24] Xu B. Q., Bjørneboe A., Ripel A., Aasmundstad T. A., Christophersen A. S., Mørland J.: Ethylmorphine metabolism in isolated rat hepatocytes. *Pharmacology & Toxicology* 73 (1993), 35–40.
- [25] Válka I., Walterová D., Šimánek V.: Determination of papaverine by capillary isotachopheresis. *Journal of Chromatography* 350 (1985), 336–338.
- [26] Peng Z., Song W., Han F., Chen H., Zhu M., Chen Y.: Chromatographic tandem mass spectrometric detection of papaverine and its major metabolites in rat urine. *International Journal of Mass Spectrometry* 266 (2007), 114–121.
- [27] Taylor K., Elliott S.: A validated hybrid quadrupole linear ion-trap LC-MS method for the analysis of morphine and morphine glucuronides applied to opiate deaths. *Forensic Science International* 187 (2009), 34–41.
- [28] Dams R., Murphy C. M., Choo R. E., Willy E. L., De Leenheer A. P., Huestis M. A.: LC-atmospheric pressure chemical ionization-MS/MS analysis of multiple illicit drugs, methadone, and their metabolites in oral fluid following protein precipitation. *Analytical Chemistry* 75 (2003), 798–804.
- [29] Vonaparti A., Lyris E., Panderi I., Koupparis M., Georgakopoulos C.: Direct injection liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric horse urine analysis for the quantification and confirmation of threshold substances for doping control. II. Determination of theobromine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23 (2009), 1020–1028.
- [30] Song M., Wang T., Li Q., Zhao L., Fang H., Li D., Bi K.: Identification and dynamic analysis of the purine alkaloids in rat plasma after oral administration of green tea by liquid chromatography hybrid ion trap time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 903 (2012), 23–29.
- [31] Ptolemy A. S., Tzioumis E., Thomke A., Rifai S., Kellogg M.: Quantification of theobromine and caffeine in saliva, plasma and urine via liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A single analytical protocol applicable to cocoa intervention studies. *Journal of Chromatography B* 878 (2010), 409–416.
- [32] Ortega N., Romero M. P., Maciá A., Reguant J., Anglès N., Morelló J. R., Motilva M. J.: Comparative study of UPLC-MS/MS and HPLC-MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples. *Journal of Food Composition and Analysis* 23 (2010), 298–305.
- [33] Valtier S., Mueck R. L., Bebartha V. S.: Quantitative method for analysis of hydrocodone, hydromorphone and norhydrocodone in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 925 (2013), 40–45.
- [34] Hao G. T., Chen Y., Dong R. H., Qu H. Y., Liang Y. G., Li Y. Y., Zheng Z. J., Gao H. Z., Liu Z. Y.: Simultaneous determination of hydrocodone, and its two metabolites in human plasma by HPLC-MS-MS. *Chromatographia* 74 (2011), 567–574.
- [35] Li X., Shen B., Jiang Z., Huang Y., Zhuo X.: Rapid screening of drugs of abuse in human urine by high-performance liquid chromatography coupled with high resolution and high mass accuracy hybrid linear ion trap-orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1302 (2013), 95–104.
- [36] Coles R., Kushnir M. M., Nelson G. J., McMillin G. A., Urry F. M.: Simultaneous determination of codeine, morphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone, and 6-

- acetylmorphine in urine, serum, plasma, whole blood, and meconium by LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology* 31(2007), 1–14.
- [37] Zheng M., McErlane K. M., Ong M. C.: High-performance liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry analysis of morphine and morphine metabolites and its application to a pharmacokinetic study in male Sprague-Dawley rats. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 16 (1998), 971-980.
- [38] Proksa B.: Separation of morphine and its oxidation products by capillary zone electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 20 (1999), 179-183.
- [39] Lin H.-R., Choi K.-I., Lin T.-C., Hu A.: Simultaneous quantification of amphetamine, opiates, ketamine and relative metabolites in urine for confirmatory analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 929 (2013), 133-141.
- [40] Bassan D. M., Erdmann F., Krüll R.: Quantitative determination of 43 common drugs and drugs of abuse in human serum by HPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400 (2011), 43-50.
- [41] Mousshoff F., Trafkowski J., Kuepper U., Madea B.: An automated and fully validated LC-MS/MS procedure for the simultaneous determination of 11 opioids used in palliative care, with 5 of their metabolites. *Journal of Mass Spectrometry* 41 (2006), 633-640.
- [42] Determination of 17 illicit drugs in oral fluid using isotope dilution ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with three atmospheric pressure ionizations. *Journal of Chromatography B* 878 (2010), 3095-3105.
- [43] Chen H., Chen Y., Du P., Han F.: Sensitive and specific liquid chromatographic–tandem mass spectrometric assay for atropine and its eleven metabolites in rat urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40 (2006), 142–150.
- [44] Van der Meer M. J., Hundt H. K. L., Müller F. O.: The metabolism of atropine in man. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 38 (1986), 781–784.
- [45] Sa'sa' S. I., Abusaleh A. H., Khalil H. S.: Determination of diphenoxylate hydrochloride and atropine sulphate in tablet formulations by reversed – phase HPLC. *Analytical Letters* 18 (1985), 2551–2568.
- [46] Sauvage F. L., Gaulier J. M., Lachâtre G., Marquet P: Pitfalls and prevention strategies for liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the selected reaction – monitoring mode for drug analysis. *Clinical Chemistry* 54 (2008), 1519–1527.
- [47] Beyer J., Peters F. T., Kraemer T., Maurer H. H.: Detection and validated quantification of toxic alkaloids in human blood plasma – comparison of LC-APCI-MS with LC-ESI-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry* 42 (2007), 621–633.
- [48] Buděšínský, Z.; Protiva, M.; Němeček, O.: *Synthetická léčiva*. Praha, ČSAV 1954.
- [49] Casy, A. F.; Parfitt, R. T.: *Opioid Analgesics. Chemistry and Receptors*. New York, Plenum Press 1986.
- [50] Mikus G., Somogyi A. A., Bochner F.: Thebaine O-demethylation to oripavine: Genetic differences between two rat strains. *Xenobiotica* 21 (1991), 1501–1509.
- [51] Mistra A. L., Pontani R. B., Mulé S. J.: Pharmacokinetics and Metabolism of [3H] Thebaine. *Xenobiotica* 4 (1974), 17–32.
- [52] Yamazoe Y., Numata H., Yanagita T.: Thebaine metabolites in the urine of Rhesus monkeys. *Japan Journal of Pharmacology* 31 (1981), 443–442.
- [53] Raith K., Neubert R., Poeknapo C., Boettcher C., Zenk M. H., Schmidt J.: Electrospray tandem mass spectrometric investigations of morphinans. *American Society for Mass Spectrometry* 14 (2003), 1262–1269.
- [54] Kikura-Hanajiri R., Kaniwa N., Ishibashi M., Makino Y., Kojima S.: Liquid chromatographic–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric analysis of opiates and metabolites in rat urine after inhalation of opium. *Journal of Chromatography B* 789 (2003), 139–150.