

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Peter Čambal

**ANALÝZA POZŮSTATKŮ HISTORICKÝCH LÉČIV
OBSAHUJÍCÍCH TROPANOVÉ ALKALOIDY**

**Analysis of the Relicts of Historical Pharmaceuticals
Containing Tropane Alkaloids**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Praha 2019

Prohlášení

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

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

V Praze dne 20. března 2019.

Anotace

V práci byla modifikována metoda pro HPLC-MS stanovení tropanových alkaloidů atropinu a skopolaminu v historických pozůstatcích léčiv. Separace probíhala na koloně X-Bridge BEH C18 (150×3 mm, 2,5 μm) s použitím isokratické eluce binární mobilní fáze obsahující acetonitril a 2% vodný roztok mravenčí kyseliny s upraveným pH na hodnotu 2,2 o vzájemném poměru 78,5:12,5 (v/v) při průtoku 0,4 ml min⁻¹. V analyzovaných vzorcích historických pozůstatků léčiv starých více než 200 let byly prokázány atropin i skopolamin a zjištěno, že se ve vzorcích nachází řada dalších látek, u nichž byla provedena fragmentace na produktové ionty, ale které se dosud nepodařilo identifikovat. Hlavní tropanové alkaloidy, atropin i skopolamin, byly ve vzorcích kvantifikovány metodou přidavku standardu a bylo zjištěno, že jejich koncentrace odpovídají literárním údajům.

Klíčová slova: HPLC, degradace, tropanové alkaloidy, hmotnostní spektrometrie

Annotation

The method for HPLC-MS determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine in historical pharmaceuticals was modified. Separation was performed on the X-Bridge BEH C18 column (150 × 3 mm, 2.5 μm) using an isocratic elution with a binary mobile phase containing acetonitrile and a 2% aqueous solution of formic acid (with adjusted pH to 2.2) with a ratio of 78.5 : 12.5 (v/v) at a flow rate of 0.4 ml min⁻¹. Both atropine and scopolamine were detected, beside a wide range of other substances, in the analyzed samples of historical pharmaceuticals older than 200 years. The mass fragmentation spectra of all substances found was measured. Major tropane alkaloids, atropine and scopolamine, were quantified in the samples by the standard addition method and their concentrations were found to correspond to the literature data.

Key words: HPLC, degradation, tropane alkaloids, mass spectrometry

Poděkování

Tímto chci poděkovat doc. RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D. za odborné vedení bakalářského projektu, odborné konzultace a rady. Děkuji také RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D. za umožnění měření hmotnostních spekter a Mgr. Karlu Kudláčkovi za usměrňování a pomoc při měření.

Obsah

1	Cíl práce	6
2	Teoretická část	7
2.1	Stabilita léčiv a lékových forem	7
2.2	Alkaloidy	9
2.2.1	Tropanové alkaloidy	10
2.2.2	Atropin	11
2.2.3	Hyoscyamin	15
2.2.4	Skopolamin	16
3	Experimentální část	20
3.1	Analyzované vzorky	20
3.2	Použité chemikálie	21
3.3	Použité přístroje, postupy měření a metody zpracování dat	21
4	Výsledky a diskuse	24
4.1	Výběr, modifikace a optimalizace metody pro separaci atropinu a skopolaminu	24
4.2	Analýza historických vzorků	26
4.2.1	Hmotnostní spektrometrie	26
4.2.2	Kvantifikace atropinu a skopolaminu v analyzovaných vzorcích	29
5	Závěr	30
	Literatura	31

Seznam použitých zkratek a symbolů

A	plocha píku
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (angl. atmospheric pressure chemical ionization)
BDDE	borem dopovaná diamantová elektroda (angl. boron doped diamond electrode)
CE	kapilární elektroforéza (angl. capillary electrophoresis)
DAD	detektor s diodovým polem (angl. diode array detector)
EI	elektronová ionizace (angl. electron ionization)
ESI	ionizace elektrosprejem (angl. electrospray ionization)
k	kapacitní faktor
LOD	mez detekce (angl. limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (angl. limit of quantification)
MS/MS	tandemová hmotnostní detekce
PTFE	polytetrafluorethylen
t_r	retenční čas
t_M	mrtvý čas
w	hmotnostní zlomek
Φ	molární frakce

1 Cíl práce

Cílem předkládané bakalářské práce byla analýza pozůstatků historických léčiv obsahujících tropanové alkaloidy z blínu černého (*Hyoscyamus niger*). Pro tento účel bylo třeba vybrat a modifikovat vhodnou HPLC metodu pro separaci a kvantifikaci hlavních alkaloidů blínu, jimiž jsou atropin a skopolamin, a dále se pokusit za pomoci hmotnostní spektrometrie identifikovat jejich případné degradační produkty.

2 Teoretická část

Analýza historických léčivých přípravků je zajímavá a přínosná z mnoha důvodů. Tím nejpodstatnějším je zjištění informací o dlouhodobé stabilitě léčivých přípravků. Stabilita léčivých přípravků se běžně sleduje po relativně krátkou dobu, několik měsíců až let [1]. V poslední době také narůstá počet prací, které se zabývají změnami ve složení léčivých přípravků v řádu desítek let, což by mohlo přispět k možnému prodloužení expirační doby léčiv, která je nyní maximálně pět let [2, 3]. K dalším možným důvodům patří bezpečnost muzejních sbírek, pochopení dobové farmaceutické literatury a v neposlední řadě i snaha zjistit, zda a jaké mohly mít dané přípravky léčivé účinky [4].

2.1 Stabilita léčiv a lékových forem

Stabilita léčivé látky souvisí se schopností látky udržet si za určitých podmínek během doby uskladnění a používání stejné vlastnosti [5]. Obecně lze stabilitu podle typu rozdělit na chemickou, fyzikální, mikrobiologickou, toxikologickou a terapeutickou. Fyzikální i chemická stabilita jsou ovlivněny řadou shodných faktorů, mezi které patří struktura dané látky, pH prostředí, nebo přítomnost kyslíku, vlhkosti, světla [6]. Degradáčními reakcemi dochází ke snížení obsahu účinné látky a snížení účinku. Identifikací a kvantifikací degradačních produktů lze objasnit mechanismy degradačních reakcí, což je velmi důležité z následujících důvodů:

1. Degradáčním produktem může být toxická sloučenina. Ne ve všech případech je toxicita degradačního produktu známá.
2. Léčivá látka musí být stabilní i v prostředí gastrointestinálního traktu, pokud je navržena pro orální podání. Většina léčivých látek je dostatečně stabilní při neutrálním pH v tenkém střevě, ale mohou podléhat degradaci v kyselém prostředí žaludku. Mezi takové látky patří například některá antibiotika.

3. Degradací léčivé látky se přípravek stane esteticky neakceptovatelný. Pokud se v průběhu času objeví výrazné změny, například změna barvy nebo zápach, daný přípravek se považuje za znehodnocený.

Léčivé látky mají různou chemickou strukturu, a proto degradaci podléhají různými způsoby. Nejčastějšími reakcemi jsou hydrolyza, eliminace, dehydratace, isomerizace a racemizace, oxidace, fotodegradace a reakce s přítomnými pomocnými látkami nebo dalšími léčivými látkami.

Styk s vodou je pro léčiva častý, a proto je hydrolyza jedním z nejčastějších způsobů degradace. Příkladem může být vzdušná vlhkost. Hydrolyze nejčastěji podléhají látky, jejichž struktura obsahuje esterovou vazbu, například tropanové alkaloidy, acetylsalicylová kyselina, prokain nebo methyلفenidát. Mechanismus degradační reakce závisí vždy na struktuře daného esteru. Skupiny odčerpávající elektrony podporují hydrolyzu, naopak skupiny dodávající elektrony inhibují hydrolyzu. Mezi látky, které podléhají hydrolyze, dále patří amidy, barbituráty, hydantoiny, imidy a Schiffovy báze.

Jednou z dalších častých degradačních reakcí je oxidace. Kyslík se zúčastňuje většiny oxidačních reakcí a je přítomen při výrobě a dlouhodobém skladování léčivých přípravků. Mechanismus oxidační reakce závisí na struktuře dané látky, přítomnosti reaktivních forem kyslíku a jiných oxidantů. Například katecholamíny, jako adrenalin, podléhají oxidaci na chinony, kdežto oxidace fenothiazinů probíhá přes komplexnější mechanismy a vznikají různé produkty.

Bylo objeveno, že velké množství léčivých látek podléhá fotodegradaci. Jedná se obecně o velmi komplexní reakční mechanismy s více produkty. Často při fotodegradaci probíhá zároveň oxidace za přítomnosti kyslíku. Proto některé léčivé látky, například fenothiaziny degradují oxidací na jiné produkty v závislosti na přítomnosti nebo nepřítomnosti světla.

Eliminace je typická pro látky s funkční skupinou karboxylové kyseliny. U některých léčivých látek se jedná o dekarboxylaci, tedy uvolnění molekuly oxidu uhličitého. Typickým příkladem je 4-aminosalicylová kyselina. U různých dalších léčivých látek existují i jiné eliminační reakce, například trimelamol eliminuje hydroxymethylovou skupinu a vzniká formaldehyd.

Mnoho léčivých látek podléhá racemizaci nebo epimerizaci. Jde o reverzibilní přeměnu mezi dvěma optickými izomery. Například pilokarpin podléhá epimerizaci za bazické katalýzy, zatímco tetracykliny za kyselé katalýzy. Adrenalin po oxidaci podléhá

racemizaci v silně kyselém prostředí, naopak oxazepam podléhá racemizaci rychlou reakcí v neutrálním až zásaditém prostředí.

Lékové formy většinou neobsahují pouze danou účinnou látku, ale také pomocné látky, případně se jedná o směs účinných látek. Pomocné látky se podílejí na potřebných praktických vlastnostech lékové formy. Lékové formy podléhají jak chemické, tak fyzikální degradaci. Jednotlivé účinné látky spolu mohou reagovat různým způsobem.

Léčivé a pomocné látky existují v různých mikroskopických fyzikálních stavech s různou mírou uspořádanosti. Příkladem mohou být amorfni, krystalické, solvované a hydratované stavy. Časem mohou léčivé nebo pomocné látky přejít z jednoho stavu do termodynamicky stabilnějšího stavu.

V literatuře byly publikovány i údaje o stabilitě pozůstatků léčiv starých několik desítek až stovek let, přičemž v některých případech se ukázaly účinné látky jako velmi stabilní [4].

2.2 Alkaloidy

Alkaloidy jsou skupina sloučenin poměrně hojně se vyskytujících po celé Zemi [7]. Získat se dají z různých živých organismů. Alkaloidy se tradičně izolují z rostlin, ale nachází se i ve zvířatech, hmyzu, mořských bezobratlých a mikroorganismech. Řada alkaloidů se používá v medicíně již stovky let a některé z nich jsou dosud vynikajícími léky. V minulosti se také používaly k přípravě jedů na šípy, což pravděpodobně předcházelo využití v medicíně. Příkladem může být využití strofantinu při léčbě akutní srdeční nedostatečnosti.

Alkaloid je cyklická sloučenina obsahující dusík v negativním oxidačním stavu s omezenou distribucí v živých organismech [8]. Tato definice zahrnuje alkaloidy obsahující dusík vázaný v heterocyklickém systému i alkaloidy obsahující dusík, který není cyklicky vázaný. Chemie atomu dusíku umožňuje rozdělit alkaloidy do minimálně čtyř skupin dusíkatých sloučenin:

1. Sekundární a terciární aminy, které jsou více nebo méně protonované a tudíž hydrofilní při $\text{pH} < 7,0$ a nebo lipofilní (neprotonované) při $\text{pH} > 8,0$.
2. Kvarterní aminosloučeniny, které jsou velmi polární, nabitě v celé škále hodnot pH a musí se izolovat ve formě solí.
3. Neutrální aminosloučeniny, které zahrnují amidy, například kapsaicin.

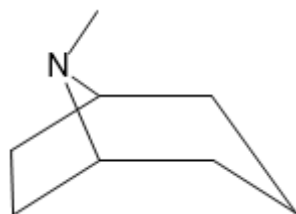
4. N-oxidy, které jsou obecně velmi dobře rozpustné ve vodě, například pyrrolizidinové alkaloidy.

Mnoho alkaloidů je odvozených od aminokyselin, ale ne všechny. Proto lze alkaloidy rozdělit podle jejich biogenetického původu na čtyři skupiny:

1. Alkaloidy odvozené z aminokyselin, například arginin, lysin, histidin, tyrosin, tryptofan, anthranilová kyselina nebo nikotinová kyselina.
2. Purinové alkaloidy, například xantin a kofein.
3. Aminované terpeny, například akonitin.
4. Polyketidové alkaloidy, kde je dusík zaveden do polyketidového skeletu, například koniin.

2.2.1 Tropanové alkaloidy

Tropanové alkaloidy patří k nejstarším rostlinným lékům na světě [7, 9]. Jsou odvozené od ornitinu a součástí jejich struktury je tropanový kruh. Struktura tropanového kruhu je znázorněna na obr. 2.1 (cit. [7]). Tropanový kruh vzniká kombinací pyrrolidinu s acetátovými jednotkami. Vzniklý produkt často nese kyslík na uhlíku C-3, který pak podléhá esterifikaci.



Obr. 2.1: Chemická struktura tropanového kruhu.

Tropanové alkaloidy jsou běžné složky rostlin čeledi lilkovité (*Solanaceae*) ale jsou hojně zastoupené i v rostlinách čeledi svlačcovité (*Convolvulaceae*) a rudodřevovité (*Erythroxylaceae*) a zřídka je lze nalézt v dalších rostlinách.

V tropanových alkaloidech obsažených v rostlinách různých čeledí je výrazná odlišnost ve struktuře. Může to být substituce a stereochemie substituentů na tropanovém kruhu a struktura esterifikující kyseliny na uhlíku C-3.

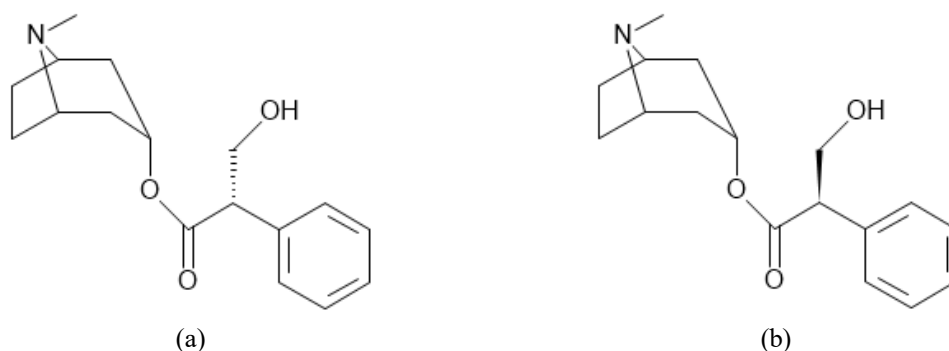
Tropanové alkaloidy se běžně používají jako spasmolytika [9]. Atropin se používá v očních kapkách pro rozšíření zorniček a zabránění akomodaci oka, což umožňuje oftalmologické vyšetření. Tropanové alkaloidy mají však různé vedlejší účinky

a způsobují kontraindikace. Je známo, že způsobují srdeční poruchy spojené hlavně s tepem, euforické stavy, dezorientaci, depresi a vysychání mukózních membrán. Neměly by se používat u pacientů se zeleným zákalem, hypertrofií prostaty, onemocněním močových cest a v průběhu těhotenství.

Kvůli jejich účinkům na centrální nervovou soustavu jsou tropanové alkaloidy často zneužívány. Ze všech nejvíce pravděpodobně kokain. Je to druhá nejoblíbenější psychotropní látka, dočasně ovlivňující mentální a fyzické funkce. Inhibuje zvyšování hladiny serotoninu, noradrenalinu a dopaminu. Vyšší dávky mohou vyvolat zablokování sodíkových kanálů, což vede k srdeční zástavě. Pravidelné užívání způsobuje depresi, pokusy o sebevraždu, nespavost a retardaci. Zřídka se kokain využívá v medicíně při nasálních a lakrimálních operacích.

2.2.2 Atropin

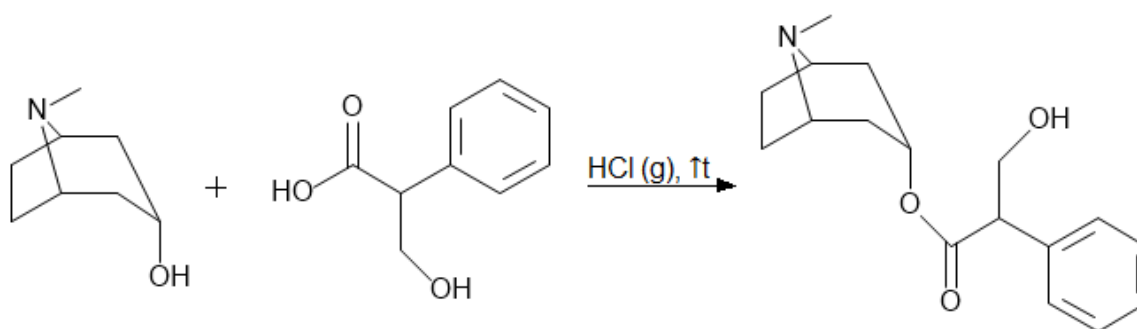
Charakteristika. Atropin je tropanový alkaloid. Je racemickou směsí enantiomerů hyoscyaminu [10, 11]. Za farmakologickou aktivitu je však zodpovědný pouze L-hyoscyamin. Vysoký obsah atropinu je v jedovatém rulíku zlomocném (*Atropa belladonna*) a v dalších jedovatých rostlinách čeledi lilkovité (*Solanaceae*) jako blín černý (*Hyoscyamus niger*), durman obecný (*Datura stramonium*) nebo mandragora lékařská (*Mandragora officinarum*). Lze ho připravit i synteticky. Systematický název atropinu je (3-endo)-8-methyl-8-azabicyklo[3.2.1]okt-3-yl ester α -(hydroxymethyl)benzenoctové kyseliny a má číslo CAS 51-55-8. Sumární vzorec atropinu je $C_{17}H_{23}NO_3$. Relativní molekulová hmotnost je 289,37. Struktury enantiomerů jsou zobrazeny na obr. 2.2.



Obr. 2.2: Chemická struktura (a) L-hyoscyaminu, (b) D-hyoscyaminu.

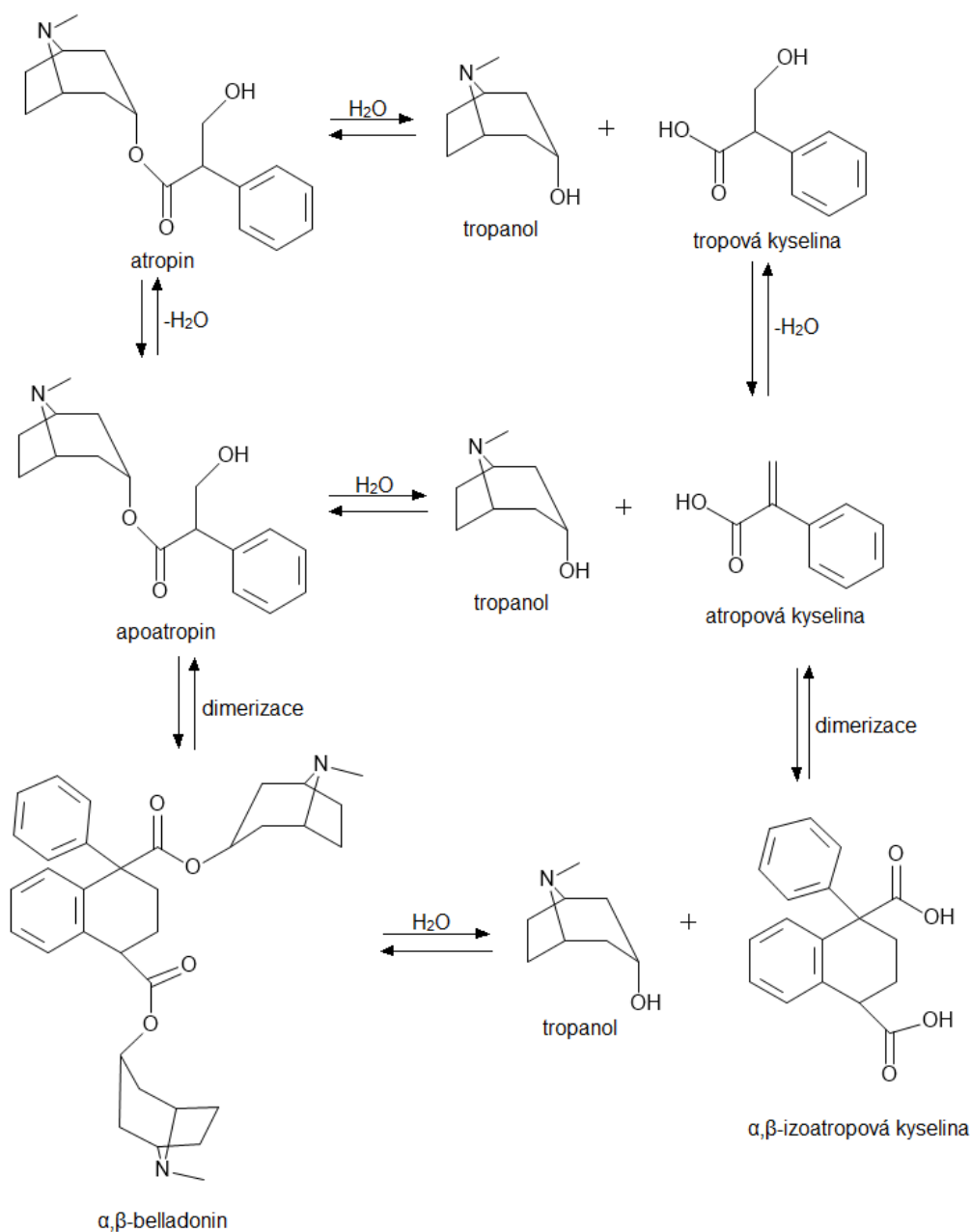
Základní chemické a fyzikální vlastnosti. Atropin může být ve formě bezbarvých krystalů nebo bílého prášku, s bodem tání v rozmezí 114 až 118 °C, bez zápachu. Je velmi dobře rozpustný v ethanolu, méně dobře v chloroformu a málo rozpustný v etheru, glycerolu a vroucí vodě.

Syntéza. Částečnou syntézu atropinu Fischerovou-Speierovou esterifikací z tropové kyseliny a tropanolu poprvé uskutečnil A. Ladenburg v roce 1879 (cit. [12]). Tropanol a tropová kyselina se zahřívají za přítomnosti chlorovodíku a vzniká atropin. Schéma reakce je znázorněno na obr. 2.3. Existují i postupy a schémata pro totální syntézu. Ta pozůstává z totální syntézy tropové kyseliny a totální syntézy tropanolu.



Obr. 2.3: Schéma syntézy atropinu esterifikací kyseliny tropové a tropanolem.

Degradace. Způsoby degradace atropinu a strukturu degradačních produktů opisuje schéma na obr. 2.4 (cit. [13]). Mezi degradační produkty patří tropanol, tropová kyselina, atropová kyselina a apoatropin. Apoatropin dimerizuje na α,β -belladonin a atropová kyselina na α,β -izoatropovou kyselinu. α,β -izoatropová kyselina reakcí se dvěma molekulami tropanolu dává α,β -belladonin.



Obr. 2.4: Schéma degradace a chemické struktury degradačních produktů atropinu (upraveno podle [13]).

Toxicita u člověka. Toxická dávka u člověka způsobuje ospalost, strnulost, nevolnost až zvracení, tachykardii až selhání krevního oběhu, křeče, paralýzu a postupný úpadek do kómatu [14]. Smrtelná dávka u dětí má široké rozmezí od 1,6 mg až do 100 mg. Dospělý člověk se dokázal zotavit po požití 1 g.

Mechanismus účinku. Atropin má anticholinergní účinek [15]. Kompetuje s acetylcholinem a dalšími muskarinními agonisty o vazebné místo na muskarinním receptoru. Dochází ke vzniku iontové vazby mezi asparagovou kyselinou přítomnou na

N-terminálním konci třetího transmembránového helixu a kvartérním dusíkem acetylcholinu nebo terciárním a kvarterním dusíkem antagonistů.

Extrakce. Pro extrakci atropinu z rostlinného materiálu pro jeho možnou kvantifikaci v takovém materiálu byla v literatuře navržena řada metod [16]. Djilani a Lesgeir [17] navrhli jednoduchý postup extrakce atropinu ze suchého rostlinného materiálu směsí rozpouštědel methanol:acetonitril v poměru 80:20 (v/v) s využitím ultrazvukové lázně.

Analýza. Atropin je možné analyzovat především separačními analytickými metodami [10, 18]. Nejvíce používanými metodami jsou kapalinová chromatografie a plynová chromatografie, méně používána je kapilární zónová elektroforéza [19]. V případě kapalinové chromatografie to bývá RP-HPLC se stacionární fází obsahující oktadecylové řetězce. Mobilní fáze obvykle obsahuje acetonitril a vodný pufr. Při použití UV detekce je třeba volit vlnovou délku okolo 200 nm, vzhledem k malým hodnotám molárních absorpčních koeficientů. Z tohoto důvodu se dává přednost hmotnostní detekci (tab. 2.1).

Tabulka 2.1

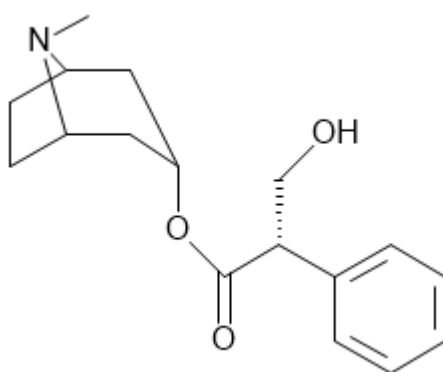
Příklady HPLC-MS metod pro kvantifikaci atropinu v krvi, plasmě a séru.

Vzorek	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	LOD [$\mu\text{g l}^{-1}$]	LOQ [$\mu\text{g l}^{-1}$]	Ref.
léčiva	C ₁₈	CH ₃ CN : 0,02 M dodecylsulfát sodný (pH= 3.5)	fluorescence po derivatizaci	10	– ^a	[20]
krv	C ₈	0,1 % HCOOH v H ₂ O : 0,1 % HCOOH v CH ₃ CN	APCI	0,6–0,7	0,9	[21]
plasma	C ₁₈	0,1 % HCOOH v H ₂ O : 0,1 % HCOOH v CH ₃ CN	ESI+	0,01	0,05	[22]
sérum	C ₁₈	CH ₃ COONH ₄ + CH ₃ COOH + anhydrid CF ₃ COOH : H ₂ O : CH ₃ CH	ESI+	– ^a	5	[23]

^a Údaj není k dispozici.

2.2.3 Hyoscyamin

Charakteristika. Hyoscyamin patří mezi tropanové alkaloidy a je L-izomerem obsaženým v atropinu, zodpovědným za farmakologickou aktivitu [10]. Velké množství hyoscyaminu obsahují rostliny z čeledi lilkovité (*Solanaceae*), hlavně blín černý (*Hyoscyamus niger*). Jeho systematický název je (α S)-(3-endo)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]okt-3-yl ester α -(hydroxymethyl)benzenoctové kyseliny a má číslo CAS 101-31-5. Sumární vzorec hyoscyaminu je $C_{17}H_{23}NO_3$. Relativní molekulová hmotnost je 289,37. Struktura L-hyoscyaminu zobrazena na obr. 2.5.



Obr. 2.5: Chemická struktura L-hyoscyaminu.

Základní chemické a fyzikální vlastnosti. Hyoscyamin vykazuje optickou aktivitu. Je jednoduše racemizovatelný. Za laboratorních podmínek bílý prášek s teplotou tání v rozmezí 106 až 109 °C. Je volně rozpustný v ethanolu a zředěných kyselinách, velmi dobře rozpustný v chloroformu, málo rozpustný v etheru a velmi málo rozpustný ve vodě.

Syntéza. Hyoscyamin lze připravit esterifikací L-tropové kyseliny tropanolem za přítomnosti plynného chlorovodíku při zvýšené teplotě [24]. Totální syntéza je založena na totální syntéze tropanolu a L-tropové kyseliny.

Toxicita u člověka. Smrtelná dávka při orálním podání je méně než 5 mg kg^{-1} [14]. Intoxikace orální cestou způsobuje, že člověk je nesoustředěný, zmatený, vzrušený a vykazuje slabost, svalovou inkoordinaci a má závratě [15]. Držení těla a řeč jsou zhoršené. Může docházet k nevolnosti a zvracení. Chování a duševní příznaky se podobají akutní psychóze. Funkce paměti je narušená a orientace je špatná. Zuřivost a blouznění nejsou neobvyklé. Příznaky trvají obvykle 48 hodin nebo i déle. Při těžkých

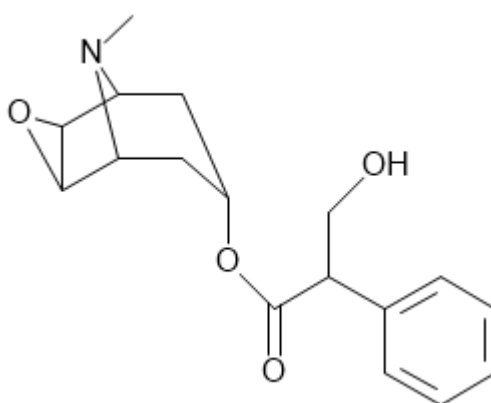
otravách se objevují deprese a selhání krevního oběhu, krevní tlak klesá a dýchání se stává nedostatečné. Po paralýze a úpadku do kómatu, nastává smrt v důsledku selhání dýchání.

Mechanismus účinku. Jde o kompetitivní antagonismus u procesů asociovaných s acetylcholinem a dalšími muskarinními agonisty. Ovlivněny jsou receptory periferních tkání, které jsou stimulovány nebo naopak inhibovány muskarinem, kam patří exokrinní žlázy, hladké svaly a srdeční sval.

Analýza. Hyoscyamin lze analyzovat různými technikami [24]. Protože L-hyoscyamin se nachází společně s D-hyoscyaminem v atropinu, lze oba enantiomery separovat a stanovit chirální kapilární elektroforézou s využitím sulfatovaných β -cyklodextrinů s UV detekcí při vlnové délce 214 nm (cit. [25]). Metoda je relativně přesná, relativní směrodatná odchylka nebyla vyšší než 1,9 %.

2.2.4 Skopolamin

Charakteristika. Patří, tak jako atropin a hyoscyamin, mezi tropanové alkaloidy [10, 26]. Je obsažen v rostlinách čeledi lilkovité (*Solanaceae*), nejvíce u rostlin rodu *Datura*, *Scopolia* a *Duboisia*. Systematický název skopolaminu je (αS)-(1 α ,2 β ,4 β ,5 α ,7 β)-9-methyl-3-oxa-9-azatricyclo[3.3.1.0^{2,4}]non-7-yl ester α -(hydroxymethyl)benzenoctové kyseliny a má číslo CAS 51-34-3. Sumární vzorec skopolaminu je C₁₇H₂₁NO₄. Jeho relativní molekulová hmotnost je 303,35. Struktura je zobrazena na obr. 2.6.

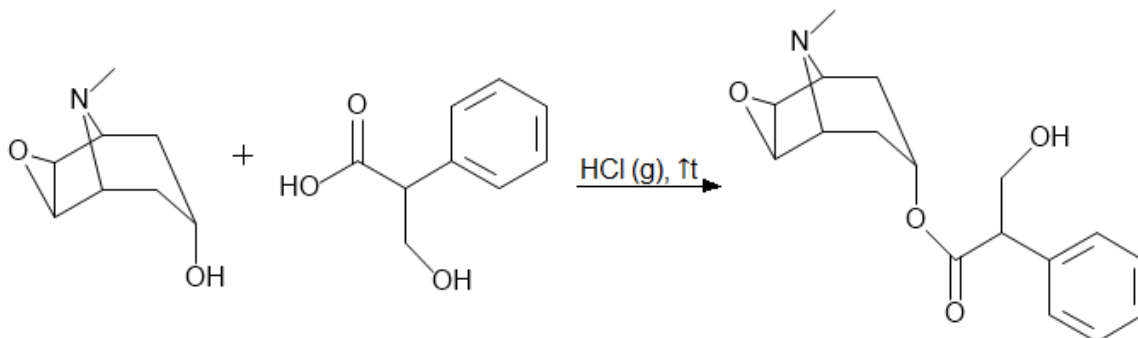


Obr. 2.6: Chemická struktura skopolaminu.

Základní chemické a fyzikální vlastnosti. Za laboratorních podmínek je skopolamin krystalická látka s teplotou tání 59 °C. Volně rozpustný v ethanolu, chloroformu, acetonu,

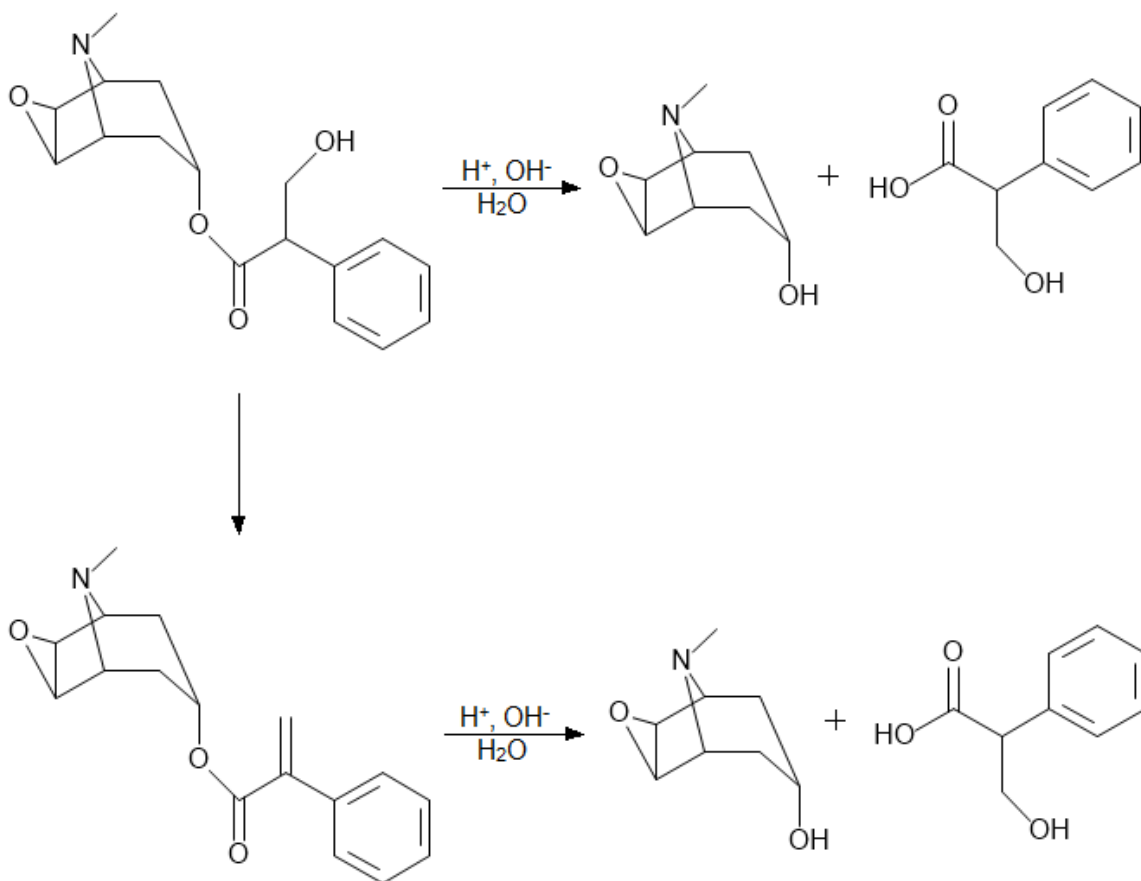
etheru a horké vodě. Ve vodě o teplotě 15 °C rozpustný v 9,5 dílech vody. V benzenu a petroletheru málo rozpustný.

Syntéza. Skopolamin je ester skopololu a tropové kyseliny [26]. Lze ho tedy získat esterifikací, zahřátím skopololu a tropové kyseliny za přítomnosti plynného chlorovodíku. Tuto reakci znázorňuje schéma na obr. 2.7. Dalším způsobem esterifikace je reakce hydrochloridu skopololu s acetyltropoylchloridem v nitrobenzenu. Popsán byl i postup totální syntézy.



Obr. 2.7: Schéma syntézy skopolaminu esterifikací tropové kyseliny a skopololem.

Degradace. Skopolamin obsahuje esterovou vazbu a podléhá hydrolýze na skopolol a tropovou kyselinu [27]. Eliminací vody může přecházet na aposkopolamin. Schéma degradace a chemické struktury degradačních produktů jsou znázorněny na obr. 2.8.



Obr. 2.8: Schéma degradace a chemické struktury degradačních produktů skopolaminu (upraveno podle [26]).

Toxicita u člověka. Vyšší dávky skopolaminu působí na centrální nervovou soustavu a efekt je podobný jako u toxických dávek jiných antimuskarinních látek, například roztržitost, podrážděnost, dezorientace, halucinace [14, 15].

Mechanismus účinku. Anticholinergní látka, která vystupuje jako kompetitivní inhibitor v oblastech postgaliárních muskarinních receptorů parasymptického nervového systému a působí i na hladké svaly, které reagují na acetylcholin, ale nemají dostatečnou cholinergní inervaci [14, 15].

Extrakce a izolace. Skopolamin se, společně s atropinem a hyoscyaminem, nachází v rostlinách čeledi lilkovité (*Solanaceae*) [26]. Obsah skopolaminu závisí na fázi životního cyklu rostliny. U rostlin druhu *Atropa* a *Scopolia* je hyoscyamin převažujícím alkaloidem po celou dobu života rostliny. U durmanu obecného (*Datura stramonium*) je hyoscyamin hlavním alkaloidem v době květu a po době květu, zatímco u mladých rostlin je to skopolamin. U mnoha jiných druhů rodu *Datura* (například *Datura ferox*, *Datura metel*, *Datura meteloides*) je skopolamin zásadním alkaloidem listů nezávisle na stáří rostliny, a proto se používají k izolaci skopolaminu. Pro extrakci skopolaminu

z rostlinného materiálu pro jeho možnou kvantifikaci byla v literatuře navržena řada metod, jejich přehled podává review [16].

Analýza. Popsaných bylo více analytických metod pro stanovení skopolaminu v léčivech, moči a plasmě [26]. Využívá se plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS), kapalinová chromatografie s elektrosprejovou ionizací a tandemovou hmotnostní detekcí (LC-ESI MS/MS), vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí a nepřímou konduktometrickou detekcí, kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS), kapilární zónová elektroforéza, spektrofotometrie a potenciometrie. Z novějších metod lze zmínit jednoduché stanovení skopolaminu hlavně pro kontrolu procesu výroby léčiv metodou square wave voltametrie s využitím borem dopované diamantové elektrody [28]. Metoda je založena na elektrochemické oxidaci skopolaminu v prostředí 0,5 M kyseliny sírové. Square wave voltametrie nabízí lepší citlivost, nízký nabíjecí proud a rychlejší zaznamenávání dat. Mez detekce metody je 0,84 $\mu\text{mol l}^{-1}$.

3 Experimentální část

3.1 Analyzované vzorky

Analyzované historické vzorky pochází z kapucínské barokní lékárny na Hradčanech, stáří vzorků je větší než 200 let [29].

Prvním vzorkem, dále označovaným jako Historický vzorek I, jsou zachovaná semena pravděpodobně blínu černého (*Hyoscyamus niger*). Byly odebrány z dochovaného obsahu dřevěné lékárenské nádoby, označené nápisem „SEM: HYOSC: C:“, uchované v Národním muzeu pod inv. č. H2-4781 (obr. 3.1a).

Druhým vzorkem, dále označovaným jako Historický vzorek II, byl pozůstatek léčivého přípravku, pravděpodobně extraktu z blínu černého. Vzorek byl odebrán z dochované skleněné lékárenské nádoby, označené zbytkem nápisu „[?] yosciam“, uchované v Národním muzeu pod inv. č. H2-9510 (obr. 3.1b).



Obr. 3.1: Barokní lékárenské nádoby z kapucínské lékárny na Hradčanech, které byly zdrojem (a) Historického vzorku I (Národní muzeum, inv. č. H2-4781), (b) Historického vzorku II (Národní muzeum, inv. č. H2-9510)

3.2 Použité chemikálie

K přípravě mobilní fáze byl používán acetonitril Chromasolv gradient grade for HPLC (Honeywell), koncentrovaná mravenčí kyselina, p.a. (Lach-ner, ČR) a koncentrovaná kyselina chlorovodíková, p.a. (Lach-ner, ČR).

K optimalizaci separace a kvantifikaci účinných látek v analyzovaných vzorcích byly použity standardy: atropin ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich) a skopolamin (scopolaminium bromatum, Zdravotnické zásobování, ČR).

K rozpouštění vzorků a extrakci byl používán methanol Chromasolv gradient grade for HPLC (Honeywell) a výše uvedený acetonitril.

3.3 Použité přístroje, postupy měření a metody zpracování dat

Při přípravě mobilní fáze byl používán pH-metr 3510 Jenway s kombinovanou pH elektrodou HC 103 (Theta 90, ČR). Ke kalibraci elektrody byla používána třibodová kalibrace se standardními pufrů pH = 4,00, 7,00 a 10,00. Při extrakci vzorků byla používána ultrazvuková lázeň Sonorex RK 100 (Bandelin Electronic, Německo). Roztoky byly po extrakci filtrovány pomocí stříkačkových filtrů o velikosti pórů 0,45 μm , resp. 0,20 μm (Whatman).

Separace analytů byla realizována na koloně X-Bridge BEH C18 (150 \times 3 mm, 2,5 μm ; Waters), která byla temperována na 30 °C. Byla použita binární izokratická eluce, složkou A mobilní fáze byl acetonitril, složkou B mobilní fáze pak 0,1% vodný roztok mravenčí kyseliny s pH upraveným přídavkem kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 2,2. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml min⁻¹. Nastříkovaný objem vzorku byl 5 μl .

Kapalinová chromatografie s UV detekcí byla prováděna na přístroji UHPLC Nexera XR (Shimadzu), vybaveným DAD. Jako detekční vlnová délka byla použita hodnota 204 nm.

Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí byla realizována na přístroji Agilent 1290 s hmotnostním spektrometrem Agilent 6460 (Agilent Technologies) s trojitým kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem a ESI ionizací v pozitivním módu.

Napětí na kapiláře bylo 135 V a kolizní energie 15 V. Měření probíhalo v rozsahu 100–700 m/z .

K extrakci analytů z historických vzorků byla použita metoda podle [17]. Do skleněné vialky o objemu 4 ml bylo odváženo asi 500 mg vzorku přesně, bylo přidáno 1,00 ml směsi methanol:acetonitril 80:20 (v/v) a uzavřená vialka byla při teplotě 25 °C umístěna do ultrazvukové lázně na 60 minut. Následně byl získaný roztok z vialky přefiltrován 0,45 μm stříkačkovým filtrem (Whatman) a dále analyzován pomocí kapalinové chromatografie.

Při kvantifikaci atropinu a skopolaminu v analyzovaných vzorcích byla použita metoda přidavku standardu tak, že do skleněné vialky o objemu 4 ml bylo odváženo asi 500 mg vzorku přesně, bylo přidáno 1,00 ml směsi methanol:acetonitril 80:20 (v/v), dále 100 μl standardního roztoku atropinu a 100 μl standardního roztoku skopolaminu (takže celkový objem roztoku ve vialce byl 1,200 ml). Uzavřená vialka byla při teplotě 25 °C umístěna do ultrazvukové lázně na 45 minut. Následně byl získaný roztok z vialky přefiltrován 0,45 μm stříkačkovým filtrem (Whatman) a dále analyzován pomocí kapalinové chromatografie. Jako odezva byla vybrána plocha peaku extrahovaného HPLC-MS chromatogramu pro příslušný iont m/z . Výpočet koncentrace analytu v extraktu byl proveden podle vzorce

$$c(\text{analyt}) = \frac{c(\text{standard}) \frac{V(\text{standard})}{V(\text{celkový})}}{\frac{A_2}{A_1} - \frac{V(\text{extrakt})}{V(\text{celkový})}} \quad (3.1)$$

kde $c(\text{analyt})$ je stanovovaná koncentrace analytu v extraktu [mg ml^{-1}], $c(\text{standard})$ je známá koncentrace analytu v extraktu [mg ml^{-1}], A_1 je plocha chromatografického peaku pro extrakt bez přidavku standardů, A_2 je plocha chromatografického peaku pro extrakt s přidavkem standardů, $V(\text{standard})$ je přidávaný objem standardu [0,100 ml], $V(\text{extrakt})$ je objem vzorku vzatý ke stanovení před přidavkem [1,00 ml], a $V(\text{celkový})$ je celkový objem vzorku po přidavku standardů [1,20 ml].

Výpočet procentuálního obsahu analytu ve vzorku byl proveden podle vzorce

$$w(\text{analyt}) = \frac{c(\text{analyt}) V(\text{standard})}{m(\text{vzorek})} 100 \quad (3.2)$$

kde $w(\text{analyt})$ je stanovovaná koncentrace analytu ve vzorku [%], $c(\text{analyt})$ je koncentrace analytu v extraktu [mg l^{-1}], $V(\text{extrakt})$ je objem extraktu a $m(\text{vzorek})$ je navážka vzorku k extrakci [mg].

Výpočet retenčního faktoru byl proveden podle literatury [30]. Grafy byly vytvořeny prostřednictvím programu OriginPro 6.0 (Microcal Software, USA). Výpočty byly prováděny v programu Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA).

4 Výsledky a diskuse

4.1 Výběr, modifikace a optimalizace metody pro separaci atropinu a skopolaminu

Pro separaci dvou hlavních očekávaných analytů, tedy atropinu a skopolaminu, byla vybrána RP-HPLC metoda podle Fliniauxe a kol. [31]. Protože je originální metoda založena na použití mobilní fáze, jejíž složkou je kyselina fosforečná, která je nežádoucí při použití hmotnostní detekce, bylo nutné metodu modifikovat. Kyselina fosforečná byla proto nahrazena mravenčí kyselinou.

Při optimalizaci metody byla použita kolona X-Bridge BEH C₁₈ (150×3 mm, 2,5 μm). Jako mobilní fáze byla použita binární isokratická eluce. Složkou A mobilní fáze byl acetonitril, složkou B mobilní fáze 2% vodný roztok mravenčí kyseliny, jehož pH bylo upraveno přidáním chlorovodíkové kyseliny na 2,2.

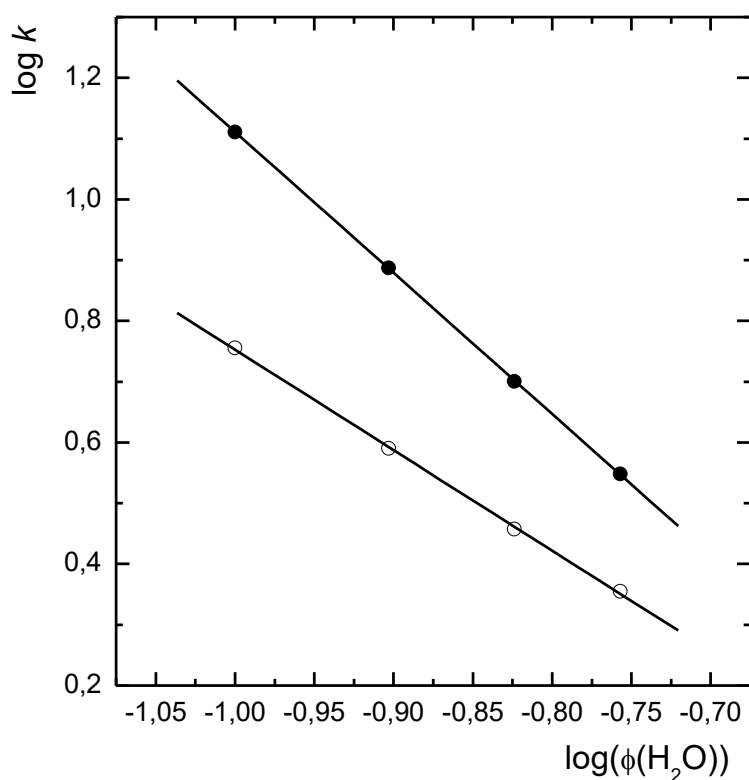
Pomocí roztoků standardů atropinu a skopolaminu byl studován vliv složení mobilní fáze na separaci peaků obou látek. Měření probíhala při obsahu acetonitrilu 10,0 %, 12,5 %, 15,0 % a 17,5 %. Získané retenční časy, resp. kapacitní poměry jsou uvedeny v tabulce 4.1. Je patrné, že píky standardů atropinu a skopolaminu byly separovány s poměrně velkým rozdílem retenčních časů a tedy i s dostatečným rozlišením. Na obr. 4.1 je uvedena závislost $\log k$ na logaritmu molární frakce vody v mobilní fázi, která je lineární pro obě studované látky a je tedy patrné, že je možné mobilní fázi snadno modifikovat pro příslušná měření s historickými vzorky.

Pro další měření byla vybrána mobilní fáze s obsahem 12,5 % složky B. Na obr. 4.2 je uveden HPLC-MS chromatogram směsi standardů atropinu a skopolaminu při separaci s tímto složením mobilní fáze.

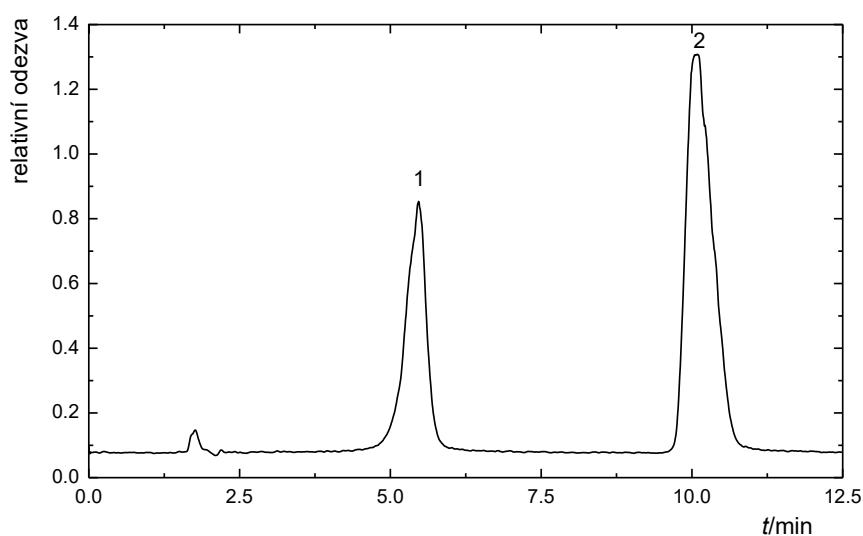
Tabulka 4.1

Vliv složení mobilní fáze (složka A: acetonitril, složka B: 2% vodný roztok mravenčí kyseliny s upraveným pH na hodnotu 2,2) při separaci atropinu a skopolaminu na koloně X-Bridge BEH C18 (150×3 mm, 2,5 μm) isokratickou elucí při průtoku 0,4 ml min⁻¹ na hodnoty retenčních časů a retenčních faktorů obou látek.

% (A)	t_M /min	skopolamin		atropin	
		t_r /min	k	t_r /min	k
10,0	1,49	8,48	5,69	19,23	12,91
12,5	1,49	5,80	3,89	11,49	7,71
15,0	1,49	4,27	2,87	7,47	5,01
17,5	1,48	3,35	2,26	5,23	3,53



Obr. 4.1: Závislost $\log k$ na logaritmu molární frakce vody pro atropin (●) a skopolamin (○) při jejich HPLC separaci na koloně X-Bridge BEH C18 (150×3 mm, 2,5 μm) isokratickou elucí při průtoku 0,4 ml min⁻¹, binární mobilní fáze, složka A: acetonitril, složka B: 2% vodný roztok mravenčí kyseliny s upraveným pH na hodnotu 2,2.

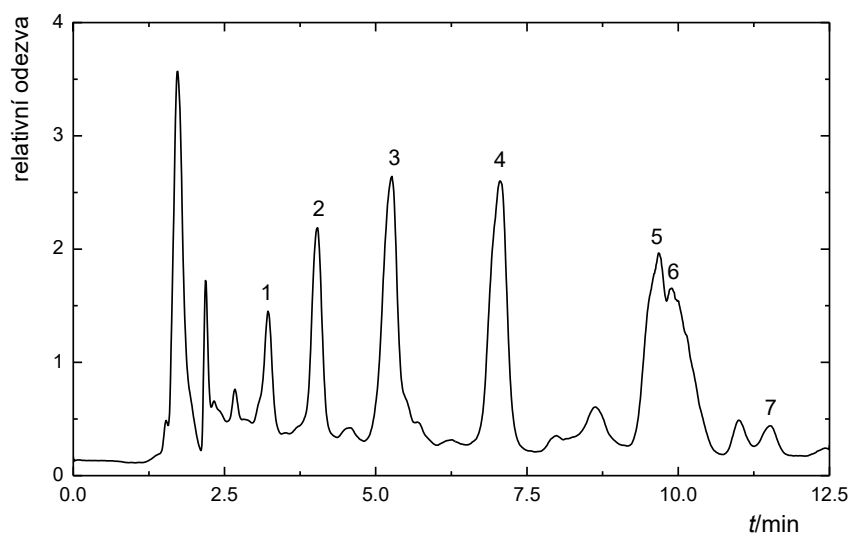


Obr. 4.2: HPLC-MS chromatogram směsi standardů (1) skopolaminu ($c = 88,6 \text{ mg l}^{-1}$) a (2) atropinu ($c = 91,3 \text{ mg l}^{-1}$) analyzované na koloně X-Bridge BEH C18 (150×3 mm, 2,5 μm) isokratickou elucí s binární mobilní fází obsahující acetonitril a 2% vodný roztok mravenčí kyseliny s upraveným pH na hodnotu 2,2 o vzájemném poměru 78,5:12,5 (v/v) při průtoku 0,4 ml min⁻¹.

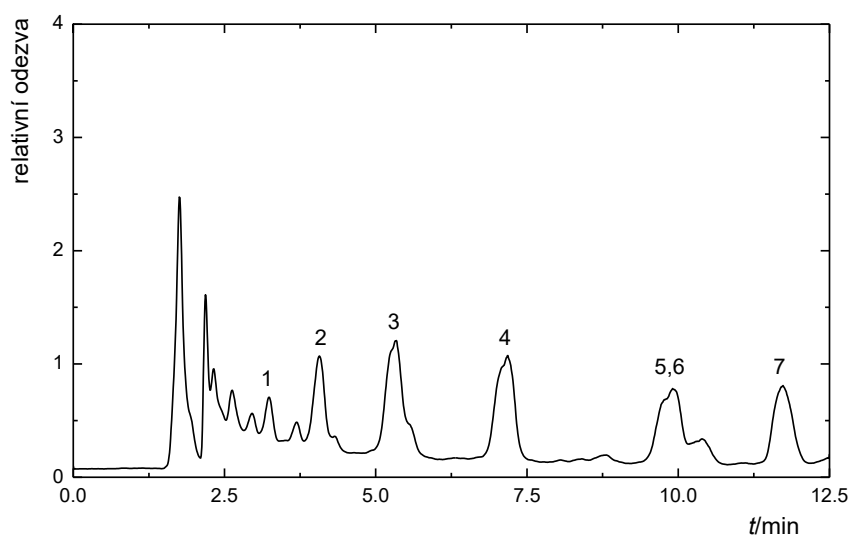
4.2 Analýza historických vzorků

4.2.1 Hmotnostní spektrometrie

S využitím modifikované metody pro HPLC separaci atropinu a skopolaminu byly změřeny HPLC-MS chromatogramy extraktů obou studovaných historických vzorků. Jak je patrné z obr. 4.2 a 4.3 v chromatogramech obou extraktů byla nalezena řada látek. Navíc byla pozorována koeluce obou sledovaných látek, skopolaminu i atropinu, s dalšími látkami; v případě skopolaminu ($t_r = 5,34 \text{ min}$) to byla neznámá látka s $m/z = 371$, v případě atropinu ($t_r = 10,42$) pak neznámá látka o $m/z = 459$. Pro identifikaci byla provedena fragmentace prekurzorových iontů jednotlivých látek, hodnoty m/z vzniklých produktových iontů jsou uvedeny v tabulce 4.2. Žádná z hodnot však neodpovídá m/z degradačních produktů účinných látek uvedených v literatuře. Pro atropin ($m/z = 290$) i skopolamin ($m/z = 304$) odpovídají hodnoty m/z produktových iontů hodnotám nalezeným v literatuře, která pro atropin udává $m/z = 123, 94$ a 91 (cit. [32]) a pro skopolamin hodnoty $m/z = 156, 138$ a 121 (cit. [33]).



Obr. 4.2: HPLC-MS chromatogram extraktu Historického vzorku I analyzovaného na koloně X-Bridge BEH C18 (150×3 mm, 2,5 μm) isokratickou elucí s binární mobilní fází obsahující acetonitril a 2% vodný roztok mravenčí kyseliny s upraveným pH na hodnotu 2,2 o vzájemném poměru 78,5:12,5 (v/v) při průtoku 0,4 ml min⁻¹. Identifikace označených peaků viz Tabulka 4.2.



Obr. 4.3: HPLC-MS chromatogram extraktu Historického vzorku II analyzovaného na koloně X-Bridge BEH C18 (150×3 mm, 2,5 μm) isokratickou elucí s binární mobilní fází obsahující acetonitril a 2% vodný roztok mravenčí kyseliny s upraveným pH na hodnotu 2,2 o vzájemném poměru 78,5:12,5 (v/v) při průtoku 0,4 ml min⁻¹. Identifikace označených peaků viz Tabulka 4.2.

Tabulka 4.2

Identifikace hlavních složek HPLC-MS chromatogramu analýzy historických vzorků: číslo peaku, retenční čas, m/z prekurzorových a produktových iontů, identifikace látky.

Číslo peaku	t_r / min	m/z		identifikace
		prekurzorový ion	produktové ionty	
1	3,26	283	89, 133	
2	4,07	327	89, 133, 177	
3	5,34	371	327, 283, 221, 177, 133, 131, 89, 87, 73	
		304	138, 121, 110, 98	skopolamin
4	7,19	415	133, 89, 177, 87, 131	
5	9,91	459	133, 89, 177, 87, 131	
6	10,42	290	124, 93, 77	atropin
7	11,74	210	182	

4.2.2 Kvantifikace atropinu a skopolaminu v analyzovaných vzorcích

Hlavní tropanové alkaloidy, atropin a skopolamin, byly v obou studovaných historických vzorcích kvantifikovány metodou přidavku standardu. Byly použity extrahované MS chromatogramy pro $m/z = 290$ v případě atropinu a $m/z = 304$ v případě skopolaminu.

Naměřené a vypočítané hodnoty uvádí tabulka 4.3. Ze zjištěných hodnot je patrné, že obsah alkaloidů v Historickém vzorku II, tedy extraktu z blínu, je ve stejném řádu jako v semenech. To by ukazovalo na to, že při přípravě tohoto extraktu byla použita pouze digesce vodou (jak udávají dobové prameny [34]). Obsah atropinu v Historickém vzorku I, tedy v zachovaných semenech blínu, je srovnatelný s údaji v literatuře, která udává obsah atropinu v rozmezí $5,0 \cdot 10^{-3}$ hm. % až $4,0 \cdot 10^{-2}$ hm. % (cit. [35, 36]). Pro obsah skopolaminu v semenech nebyly nalezeny relevantní literární údaje.

Tabulka 4.3

Kvantifikace atropinu a skopolaminu v analyzovaných historických vzorcích metodou přidavku standardu pomocí HPLC-MS (použité koncentrace standardů: $c(\text{atropin}) = 1,095 \text{ mg ml}^{-1}$, $c(\text{skopolamin}) = 1,063 \text{ mg ml}^{-1}$).

		Historický vzorek I.	Historický vzorek II.
$m(\text{vzorek}) / \text{g}$		0,50108	0,50084
atropin	$A_1 / \text{rel. odezva min}$	85292589	39724870
	$A_2 / \text{rel. odezva min}$	439115690	318953349
	$w / \%$	$4,20 \cdot 10^{-3}$	$2,50 \cdot 10^{-3}$
skopolamin	$A_1 / \text{rel. odezva min}$	33125095	22328876
	$A_2 / \text{rel. odezva min}$	278000981	109860820
	$w / \%$	$2,30 \cdot 10^{-3}$	$4,30 \cdot 10^{-3}$

5 Závěr

Byla modifikována a optimalizována HPLC-MS metoda pro analýzu vzorků historických léčiv obsahujících tropanové alkaloidy. Pomocí hmotnostní spektrometrie byly v obou studovaných vzorcích prokázány atropin i skopolamin a dále zjištěno, že se ve vzorcích nachází řada dalších látek, u nichž byla provedena fragmentace na produktové ionty, ale které se dosud nepodařilo identifikovat. Hlavní tropanové alkaloidy, atropin i skopolamin, byly ve vzorcích kvantifikovány metodou přidavku standardu a bylo zjištěno, že jejich koncentrace odpovídají literárním údajům. Podařilo se rovněž prokázat, že Historický vzorek II, byl nejspíše připraven digescí blínu pouze vodou (jak odpovídá dobové farmaceutické praxi), protože obsah alkaloidů v tomto extraktu je nízký, než kdyby při jeho přípravě byla použita extrakce ethanolem.

Literatura

- [1] Nesměrák K., Štícha M., Čvančarová M.: HPLC/MS analysis of historical pharmaceutical preparations of heroin and cocaine. *Analytical Letters* **43** (2010), 2572–2581.
- [2] Greene J.: Short expiration dates may exacerbate drug shortages. *Annals of Emergency Medicine* **71** (2018), A13–A15.
- [3] Zilker M., Sörgel F., Holzgrave U.: A systematic review of the stability of finished pharmaceutical products and drug beyond their labeled expiry dates. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **166** (2019), 222–235.
- [4] Nesměrák K., Kudláček K., Babica J.: Analytical chemistry studying historical pharmaceuticals and health care formulations. *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* **148** (2017), 1557–1568.
- [5] Wong A, Datla A.: Assay and stability testing. *Separation Science and Technology*, **6** (2005), 335–358.
- [6] Yoshioka S., Stella V.J.: *Stability of Drugs and Dosage Forms*. New York, Kluwer Academic Publishers 2002.
- [7] Wink M., Roberts M. F.: *Alkaloids Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications*. New York, Plenum Press 1998.
- [8] Pelletier S.W.: The nature and definition of an alkaloid. In: *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives. Volume I*. S.W. Pelletier (ed.). New York, Wiley 1983, p. 1–31.
- [9] Kukula-Koch W.A., Widelski J.: Alkaloids. In: *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies*. S.B. McCreath, R. (eds.). Amsterdam, Academic Press 2016, p. 163–198.
- [10] *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 4th Ed. A.C Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop (eds.). London, Pharmaceutical Press, 2011.
- [11] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00572> (navštíveno: 20. dubna 2019).
- [12] Al-Badr A.A., Muhtadi F.J.: Atropine. *Analytical Profiles of Drug Substances* **14** (1985), 325–389.
- [13] Kirchhoff C., Bitar Y., Ebel S., Holzgrave U.: Analysis of atropine, its degradation products and related substances of natural origin by means of reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1046** (2004), 115–120.
- [14] Ellenhorn M.J., Schonwald S., Ordog G., Wasserberger J.: *Ellenhorn's Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*. 2nd Ed. Baltimore, Williams and Wilkins 1997.
- [15] *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 13th Ed. L. Brunton, B. Knollmann, R. Hilal-Dandan (eds.). New York, McGraw-Hill 2007.
- [16] Šramská P., Maciejka A., Topolewska A., Stepnowski P., Haliński Ł.P.: Isolation of atropine and scopolamine from plant material using liquid-liquid extraction and EXTrelut® columns. *Journal of Chromatography B* **1043** (2017), 202–208.
- [17] Djilani A., Legseir B.: Extraction of atropine by ultrasounds in different solvent systems. *Fitoterapia* **76** (2005), 148-152.

- [18] Christen P., Bieri S., Veuthey JL: Analysis of tropane alkaloids in biological matrices. In: *Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology*. E. Fattorusso, O. Tagliatalata-Scafati (eds.). Weinheim, Wiley-VCH Verlag 2008, p. 341–367.
- [19] Dräger B.: Analysis of tropane and related alkaloids. *Journal of Chromatography A* **978** (2002), 1–35.
- [20] Takahashi M., Nagashima M., Shigeoka S., Nishijima M., Kamata K.: Determination of atropine in pharmaceutical preparations by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* **775** (1997), 137–141.
- [21] Skulska A., Kala M., Adamowicz P., Chudzikiewicz E., Lechowicz W.: Determination of fentanyl, atropine and scopolamine in biological material using LC-MS/APCI methods. *Przegląd lekarski* **64** (2007), 263–267 (PubMed ID:17724883).
- [22] John H., Binder T., Höchstetter H., Thiermann H.: LC-ESI MS/MS quantification of atropine and six other antimuscarinic tropane alkaloids in plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **396** (2010), 751–763.
- [23] Boermans P.A., Go H.S., Wessels A.M., Uges D.R.: Quantification by HPLC-MS/MS of atropine in human serum and clinical presentation of six mild-to-moderate intoxicated atropine-adulterated-cocaine users. *Therapeutic Drug Monitoring* **28** (2006), 295–298.
- [24] Muhtadi F.J.: Hyoscyamine. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients* **23** (1994), 153–228.
- [25] Heine S., Ebert K., Blaschke G.: Determination of L-hyoscyamine in atropine and D-hyoscyamine in L-hyoscyamine by chiral capillary electrophoresis as an alternative to polarimetry. *Electrophoresis* **24** (2003), 2687–2692.
- [26] Muhtadi F.J., Hassan M.M.A.: Analytical profile of scopolamine hydrobromide. *Analytical Profiles of Drug Substances* **19** (1990), 477–551.
- [27] Windheuser J.J., Sutter J. L., Sarrif A.: Analysis of scopolamine and its degradation products by GLC and liquid partition chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **61** (1972), 1311–1313.
- [28] Santos S.B., Camila Farinha Valezi C.F., Jessica Scremin J., Salamanca-Neto C.A.R., Dall'Antonia, L.H., Sartori E.R.: A simple square-wave voltammetric method for determination of scopolamine in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode. *Química Nova* **37** (2014), 1579–1583.
- [29] Nesměrác K., Kunešová J.: Farmaceutická historie kapucínského kláštera v Praze na Hradčanech. Část I. Klášterní lékárna. *Česká a Slovenská farmacie* **64**:3 (2015), 79–94.
- [30] Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W.: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3rd Ed. New York, Wiley 2010.
- [31] Fliniaux M.A., Manceau F., Jacquin-Dubreuil A.: Simultaneous analysis of L-hyoscyamine, L-scopolamine and DL-tropic acid in plant material by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **644** (1993), 193–197.

- [32] Liu Y., Uboh C.E., Soma L.R., Li X., Guan F., You Y., Chen J.W.: Efficient use of retention time for the analysis of 302 drugs in equine plasma by liquid chromatography–MS/MS with scheduled multiple reaction monitoring and instant library searching for doping control. *Analytical Chemistry* **83** (2011), 6834–6841.
- [33] Wang S., Fu P., Liu L., Wang L., Peng C., Zhang W., Liu R.: Rapid discovery and identification of multiple absorbed chemical constituents and metabolites in rat cerebrospinal fluid after oral administration of Jitai tablets by a LC-MS based metabolomics approach. *RSC Advances* **6** (2016), 32811–32822.
- [34] Drábek P.: Léčivé přípravky v Obnoveném pražském dispensatoriu z roku 1750. I. část – úvod a prvních devět tříd lékových forem. *Česká a Slovenská farmacie* **59** (2010), 227–233.
- [35] Hosseini N., Ebrahimi S.N., Salehi P., Asghari B., Ahmadi M.: Simultaneous determination of atropine and scopolamine in different parts of *Hyoscyamus arachnoideus* Pojark plants by high-performance liquid chromatography. *Journal of Medicinal Plants Research* **5** (2011), 3552–3557
- [36] Alaghemand A., Ghorbanpour M., Moghaddasia B.: Determination of atropine, hyoscine and rutin content of henbane seeds from different regions in Iran. *Advances in Environmental Biology* **7** (2013), 614–618.