

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Peter Čambal

**ANALÝZA DEGRADAČNÍCH PRODUKTŮ ÚČINNÝCH  
LÁTEK V HISTORICKÝCH POZŮSTATCÍCH LÉČIVÝCH  
PŘÍPRAVKŮ Z 18. A 20. STOLETÍ**

**Analysis of the degradation products of the active  
substances in historical pharmaceutical relicts from the  
18th and 20th century**

Diplomová práce

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

Praha 2021

## **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 souhlasu této univerzity.

V Praze dne 20. června 2021.

## **Poděkování**

Děkuji především doc. RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D. za odborné vedení diplomového projektu, rady, konzultace a vstřícnost i za ztížených podmínek. Poděkování patří také RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D. a RNDr. Martinu Štíchovi, Ph.D. za umožnění měření hmotnostních spekter, RNDr. Václavu Červenému, Ph.D. a Bc. Richardu Landlovi za umožnění měření pomocí atomové absorpční spektrometrie, Mgr. Antonu Korbanovi za umožnění stanovení mentholu pomocí plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickým detektorem a RNDr. Karlu Kudláčkovi, Ph.D. za pomoc a rady při analýze extraktu ze senny.

## Abstrakt

Léčivé přípravky analyzované v této práci byly extrakt ze senny starý více než 200 let, mast „Naso-Merfen“ stará 75 let a mast „Sulfathiazol“ stará 42 let. Účinnými látkami v léčivých přípravcích byly sennosidy A a B (extrakt ze senny), efedrin a menthol (mast „Naso-Merfen“) a sulfathiazol (mast „Sulfathiazol“). Extrakt ze senny byl analyzován metodami RP-HPLC a HPLC-MS. Podmínky separace byly optimalizovány zejména pro separaci enantiomerů sennosidu A a sennosidu B. Účinné látky nebyly ve vzorku detegovány. Identifikován byl jejich degradační produkt a několik sloučenin typických pro sennu a byl porovnán jejich výskyt v historickém a novodobém vzorku. Navrženo bylo detailní schéma ESI<sup>-</sup>-MS<sup>n</sup> mechanismu fragmentace sennosidu A a B. Extrakt vzorku masti „Naso-Merfen“ byl analyzován metodami HILIC-UV, HPLC-MS, GC-MS a AAS. Podmínky separace byly optimalizovány. Účinné látky byly kvantifikovány. Nebyly identifikovány žádné degradační produkty účinných látek. Extrakt vzorku masti „Sulfathiazol“ byl analyzován metodami RP-HPLC a HPLC-MS. Podmínky separace byly optimalizovány. Účinná látka byla kvantifikována. Nebyly nalezené žádné degradační produkty účinné látky. Byla potvrzena autenticita všech analyzovaných vzorků.

**Klíčová slova:** AAS, dlouhodobá stabilita, degradace, GC-MS, HILIC-UV, historické léčivé přípravky, hmotnostní spektrometrie, HPLC-MS, HPLC-UV

## Abstract

Historical pharmaceutical preparations analyzed in this thesis were a senna extract more than 200 years old, an ointment „Naso-Merfen“ 75 years old, and an ointment „Sulfathiazol“ 42 years old. The active substances in the analyzed samples were sennosides A and B (senna extract), ephedrine and menthol (the ointment „Naso-Merfen“), and sulfathiazole (the ointment „Sulfathiazol“). The senna extract was analyzed by RP-HPLC and HPLC-MS. Separation conditions were optimized, especially for separation of the sennoside A and B enantiomers. The active substances were not detected in the sample. One degradation product and substances characteristic for senna were identified. Their presence in the historical and contemporary sample was compared. Detailed ESI<sup>-</sup>-MS<sup>n</sup> fragmentation mechanisms of sennoside A and B have been proposed. The sample of the ointment „Naso-Merfen“ was analyzed by HILIC-UV, HPLC-MS, GC-MS, and AAS. Separation conditions were optimized. The active substances were quantified. Degradation products of the active substances were not detected in the sample. The sample of the ointment „Sulfathiazol“ was analyzed by RP-HPLC and HPLC-MS. Separation conditions were optimized. The active substance was quantified. Degradation products of the active substance were not detected. The authenticity of all analyzed historical samples was confirmed.

**Key words:** AAS, degradation, long-term stability, GC-MS, HILIC-UV, historical pharmaceuticals, mass spectrometry, HPLC-MS, HPLC-UV

# Obsah

1	CÍL PRÁCE .....	8
2	TEORETICKÝ ÚVOD .....	9
2.1	Stabilita farmak, faktory, které ji ovlivňují a cesty degradace účinných látek .....	9
2.1.1	Stabilita farmak .....	9
2.1.2	Degradační cesty účinných látek léčivých přípravků .....	11
2.2	Anthrachinonové glykosidy, sennosid A, sennosid B .....	13
2.3	Alkaloidy .....	18
2.3.1	Efedrin .....	20
2.4	Terpeny .....	27
2.4.1	Menthol .....	28
2.5	Sulfonamidy a deriváty thiazolu .....	34
2.5.1	Sulfathiazol .....	37
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	42
3.1	Analyzované vzorky .....	42
3.1.1	Analyzovaný vzorek extraktu ze senny .....	42
3.1.2	Analyzovaný vzorek masti „Naso-Merfen“ .....	43
3.1.3	Analyzovaný vzorek masti „Sulfathiazol“ .....	44
3.2	Použité chemikálie .....	45
3.3	Použité přístroje .....	45
3.4	Postupy přípravy vzorků a podmínky měření .....	46
3.4.1	Analýza extraktu ze senny .....	46
3.4.2	Analýza vzorku masti „Naso-Merfen“ .....	47
3.4.3	Analýza vzorku masti „Sulfathiazol“ .....	48
3.5	Zpracování dat .....	49
4	VÝSLEDKY A DISKUSE .....	50
4.1	Analýza extraktu ze senny .....	50
4.1.1	Optimalizace chromatografických podmínek .....	50
4.1.2	Kalibrační závislosti .....	50
4.1.3	HPLC-MS analýza vzorku .....	51
4.1.4	Hmotnostní spektrometrie sennosidu A a B .....	54

4.2	Analýza masti „Naso-Merfen“ .....	56
4.2.1	Optimalizace separace efedrinu pomocí HILIC-UV .....	56
4.2.2	Optimalizace separace mentholu pomocí GC-MS .....	57
4.2.3	Optimalizace extrakce .....	58
4.2.4	Kalibrační závislosti .....	59
4.2.5	HILIC-UV analýza vzorku .....	60
4.2.6	HPLC-MS analýza vzorku .....	61
4.2.7	GC-MS analýza vzorku .....	64
4.2.8	UV-PCMVG-AAS analýza vzorku .....	65
4.2.9	Kvantifikace účinných látek .....	65
4.3	Analýza masti „Sulfathiazol“ .....	65
4.3.1	Optimalizace chromatografických podmínek .....	65
4.3.2	Optimalizace extrakce .....	67
4.3.3	Kalibrační závislosti .....	68
4.3.4	HPLC-UV analýza vzorku .....	68
4.3.5	HPLC-MS analýza vzorku .....	69
4.3.6	Kvantifikace sulfathiazolu v historickém vzorku .....	71
5	ZÁVĚR .....	72
	Literatura .....	73

## Seznam použitých zkratk a symbolů

AAS	atomová absorpční spektrometrie
DAD	detektor s diodovým polem (angl. diode array detector)
EI	ionizace nárazem elektronu (angl. electron impact ionization)
ESI	elektrosprejová ionizace (angl. electrospray ionization)
FID	plamenově ionizační detektor (angl. flame ionization detector)
FLD	fluorescenční detekce
GC	plynová chromatografie (angl. gas chromatography)
GC×GC	multidimenzionální plynová chromatografie
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (angl. hydrophilic interaction liquid chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (angl. high performance liquid chromatography)
<i>LOD</i>	mez detekce (angl. limit of detection)
<i>LOQ</i>	mez kvantifikace (angl. limit of quantification)
MS	hmotnostní spektrometrie (angl. mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní detekce
NPD	dusíko-fosforový detektor (angl. nitrogen phosphorus detector)
PPD	polarizovaný fotometrický detektor (angl. polarized photometric detector)
<i>R</i>	regresní koeficient
RID	detektor indexu lomu (angl. refractive index detector)
QQQ	trojitý kvadrupól
Q-TOF	trojitý kvadrupól ve spojení s analyzátozem doby letu (angl. tripple quadrupole and time of flight)
Q-Trap	trojitý kvadrupól ve spojení s iontovou pastí (angl. tripple quadrupole and ion trap)
PCMVG	fotchemická generace studené páry rtuti (angl. photochemical cold mercury vapor generation)
UV	ultrafialový

# 1 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce je analýza historických pozůstatků farmak, zejména studium jejich obsahu, kvantifikace obsahu účinných látek a prozkoumání dlouhodobé stability účinných látek. Pro splnění tohoto cíle byl nutný vývoj a optimalizace metod vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro separaci a stanovení účinných látek a případnou identifikaci degradačních produktů pomocí hmotnostní spektrometrie a jiných analytických technik. Jedním z cílů bylo také popsat fragmentační mechanismy hmotnostních spekter studovaných látek, pokud nejsou v literatuře dostatečně popsány.



## 2 TEORETICKÝ ÚVOD

V této práci byly analyzovány historické pozůstatky farmak, které pocházely ze sbírek Národního muzea, Českého farmaceutického muzea nebo Katedry analytické chemie PŘF UK. Stáří vzorků bylo více než 200 let (vzorek senny) a 75 nebo 42 let (vzorky mastí). Účinnými látkami byly anthrachinonové glykosidy, alkaloid, terpen a sulfonamid. Vzorky byly analyzovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s UV a hmotnostní detekcí, plynovou chromatografií s hmotnostně spektrometrickým detektorem a atomovou absorpční spektrometrií.

Tyto vzorky historických pozůstatků farmak poskytují unikátní možnost prozkoumání dlouhodobé stability účinných látek, která se normálně sleduje pouze v rozpětí několika málo měsíců až let. Na základě identifikace účinných látek a degradačních produktů lze také potvrdit autenticitu daného přípravku a následně, pokud je to možné, porovnat obsah látek v historickém pozůstatku s obsahem deklarovaným literaturou.

Účinné látky obsažené ve vzorcích historických pozůstatků farmak mohou během dlouhé doby skladování degradovat na jiné látky. Ve vzorku se mohou nacházet jak účinné látky, tak jejich degradační produkty. Toto závisí zejména na struktuře daných účinných látek. Pro hlubší pochopení procesů degradace a prozkoumání dlouhodobé stability účinných látek je v této kapitole probrána stabilita léčiv a degradační cesty účinných látek. Dále jsou probrány samotné účinné látky, jejich vlastnosti, stabilita a degradace.

### 2.1 Stabilita farmak, faktory, které ji ovlivňují a cesty degradace účinných látek

#### 2.1.1 Stabilita farmak

Farmaka obsahují léčivé látky s farmakologickou aktivitou [1]. Pro terapeutické použití jsou určeny léčivé přípravky v různých lékových formách, které obsahují tyto

účinné látky v kombinaci s dalšími, pomocnými látkami (excipienty). Stabilita léčivých přípravků po celou dobu jejich trvanlivosti je ve moderní farmacii velmi důležitou záležitostí [2]. Lze ji definovat jako schopnost výrobku zachovat si charakteristiky získané při výrobním procesu, v rámci specifických limitů po dobu skladování a používání. Je faktorem pro určení doby expirace léčivých přípravků, která typicky bývá v řádu jednotek let. K nestabilitě léčivého přípravku vede jakákoliv změna fyzikálních, chemických, mikrobiologických a terapeutických vlastností v kterékoliv jeho složce. Proto se v průběhu vývoje nového léčivého přípravku bere zvláštní ohled na to, aby účinné látky i excipienty zůstaly stabilní a zachovaly si své vlastnosti během celé doby trvanlivosti. Produkt následně musí:

- vykazovat minimálně 90 % původní terapeutické aktivity,
- mít obsah účinné látky minimálně 90 % deklarované koncentrace,
- obsahovat efektivní koncentraci přidaných konzervačních látek,
- být bez jakékoliv pozorovatelné změny (barva, vznik sraženiny, zápach),
- být netoxický a nezpůsobit žádné podráždění.

Stabilitu účinných látek ovlivňuje mnoho faktorů. Jsou jimi vlhkost, excipienty, teplota, pH, kyslík a světlo. Ve vodě rozpustná účinná látka se při kontaktu s vlhkostí rozpouští, což vede k fyzikálním a chemickým změnám a následně ke ztrátě charakteristických vlastností. Některé excipienty (například škrob) obsahují hodně vody a ovlivňují stabilitu zvýšením obsahu vody v léčivém přípravku. Někdy ke snížení stability dochází také v důsledku interakce účinné látky a excipientu. V některých případech mívá na stabilitu léčiva velký vliv teplota. Jejím zvýšením většinou dochází k urychlení hydrolyzy. Na stabilitu léčiv podléhajících hydrolyze v roztocích má velký vliv pH, proto se při výrobě přípravku používají pufrы (pH, při kterém je stabilita nejvyšší) pro minimalizaci tohoto vlivu. U některých léčiv přítomnost kyslíku podporuje oxidaci, proto se přípravky náchylné k oxidaci při vystavení kyslíku skladují například v atmosféře dusíku nebo oxidu uhličitého. Fotosenzitivní léčiva se rozkládají na světle. Takovéto látky by se měly uchovávat v hnědém skle a ve tmě.

### 2.1.2 Degradací cesty účinných látek léčivých přípravků

Nejvíce studovaný a nejvíce pochopený druh nestability je degradace léčiva chemickou reakcí, jehož důsledkem je pokles účinku léčivého přípravku [1]. Nejčastěji se sleduje pokles koncentrace účinných látek. Pokles účinku *per se* různými cestami je však pouze jedním z mnoha důvodů pro kvantifikaci a hlubší zkoumání tohoto poklesu. Identifikace a kvantifikace degradačních produktů umožňuje lepší pochopení mechanismu daných chemických reakcí. Studium stability účinných látek lze také různě optimalizovat výrobní proces. Dalšími důležitými důvody jsou zejména:

1. Degradací může vznikat produkt, který je toxický. Toxicita degradačních produktů může být, ale také nemusí být známá. Například pralidoxim se rozkládá dvěma cestami v závislosti na pH. V bazickém prostředí vzniká kyanidový aniont. Degradačním produktem tetracyklinu je epianhydrotetracyklin, který je spojován s Fanconiho syndromem.
2. Lék se po degradaci účinné látky stává esteticky nepříjemný. Pokud v průběhu času nastane významná změna barvy nebo zápachu, výrobek je považován za expirovaný. Například adrenalin podléhá oxidaci na adenochrom, červenou látku. Jakýkoliv lék s růžovým nádechem, obsahující adrenalin, je považován za expirovaný.
3. V případech, kdy je lék určený k orálnímu podání, musí být mimo samotného léčivého přípravku stabilní i v podmínkách gastrointestinálního traktu. Většina látek je dostatečně stabilní v prostředí tenkého střeva s neutrálním pH (bez ohledu na degradaci enzymy) ale může být nestabilní v podmínkách v žaludku. Látky náchylné na kyselé prostředí jsou například různé peniciliny a erythromycin a některé jeho analogy. Znalost stability účinné látky v pH 1 až 2 při teplotě 37 °C je důležitá při navrhování látek potenciálně labilních vůči kyselému prostředí a jejich lékových forem.

Účinné látky přítomné v léčivém přípravku (ale i další přítomné látky) mají různou chemickou strukturu a mohou degradovat různými cestami, jako jsou hydrolýza, dehydratace, isomerizace, racemizace, eliminace, oxidace, fotodegradace a interakce s excipienty a dalšími látkami. Typ chemické reakce závisí na struktuře a přítomnosti různých funkčních skupin.

Hydrolýza je jednou nejběžnějších degradačních reakcí u farmak. Dochází k ní při styku s vodou nebo vlhkostí ze vzduchu. Voda může být v malých množstvích přítomná

i v pevných lékových formách. Je charakteristická pro látky obsahující esterovou nebo amidovou funkční skupinu ve své struktuře. U esterů tvořených karbamovou, sulfonovou nebo amidosulfonovou kyselinou s alkoholy k hydrolyze dochází nukleofilní adicí hydroxidového aniontu. Rychlost degradace závisí na druhu substituentů, přičemž skupiny odebírající elektrony hydrolyzu urychlují a elektron-donorové skupiny hydrolyzu inhibují. Roli hrají také sterické faktory. Objemné substituenty rychlost hydrolyzy zmenšují. Například nahrazením isopropylové skupiny *n*-propylovou v karboxylové části molekuly klesne rychlost degradace hydrolyzou pětkrát. Příklady látek obsahujících esterovou funkční skupinu mohou být pilokarpin, dalvastatin a warfarin, u kterých dochází v důsledku hydrolyzy k otevření cyklu a vzniku příslušné karboxylové kyseliny. Amidová funkční skupina se také často vyskytuje ve strukturách léčivých látek, ale je méně náchylná k hydrolyze, protože karbonylový uhlík amidové vazby je méně elektrofilní. Odstupující aminová skupina se proto hůře eliminuje. Například paracetamol, chloramfenikol, linkomycin, indometacin a sulfacetamid hydrolyzují na amid a karboxylovou kyselinu.  $\beta$ -laktamová antibiotika jako peniciliny a cefalosporiny, které jsou cyklické amidy (laktamy), rychle podléhají hydrolyze a jejich cyklus se otevírá. Příkladem může být amoxicilin.

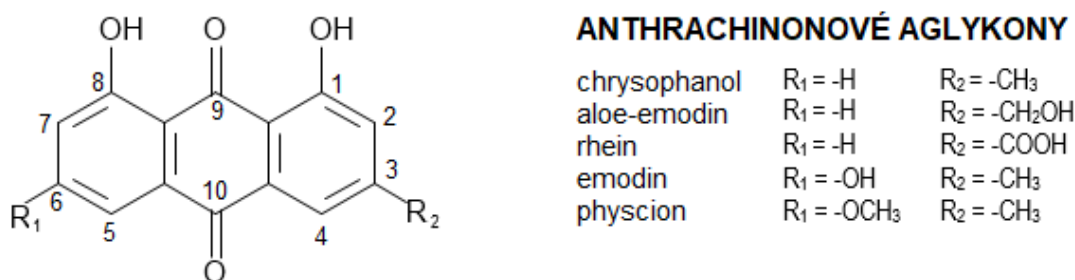
K dehydrataci dochází často u sacharidů jako glukóza nebo laktóza, které poskytují produkt 5-(hydroxymethyl)furfural. Erythromycin je podezřelý z kyselé katalyzované dehydratace, zatímco prostaglandiny  $E_1$  a  $E_2$  podléhají dehydrataci a následně i isomerizaci. Isomerizaci podléhá i například amfotericin B (*trans-cis* isomerizace), cyklosporin A (přesmyk *N, O*-acylu) nebo tirilazad (dienon-fenolový přesmyk). Racemizace a epimerizace je reverzibilní přeměna mezi optickými isomery. K racemizaci dochází u benzodiazepinů, penicilinů a cefalosporinů, například oxazepam podléhá racemizaci rychlou reakcí v neutrálním až zásaditém pH. Pilokarpin podléhá epimerizaci za bazické katalýzy, zatímco tetracykliny jako rolitetracyklin nebo ergotamin podléhají epimerizaci za kyselé katalýzy. U látek s obsahujících ve své struktuře karboxylovou funkční skupinu je možná dekarboxylační reakce, například u 4-aminosalicylové kyseliny. Existují i další eliminační reakce, například trimelamol eliminuje hydroxymethylové skupiny za vzniku formaldehydu, levotyroxin eliminuje jod.

Oxidace je již dlouho známá cesta chemické degradace. Kyslík účastnící se většiny oxidačních reakcí se vyskytuje v prostředí, kterému jsou léčiva vystaveny při výrobním procesu i skladování. V literatuře byla už v roce 1940 popsána oxidace askorbové kyseliny a faktory ovlivňující tuto reakci, jako například role iontů kovů.

Mechanismus oxidace závisí na struktuře reagujících látek a přítomnosti reaktivních forem kyslíku, případně dalších oxidantů. Katecholaminy jako adrenalin jsou oxidovány na chinony. Mechanismy fotodegradace bývají většinou velmi komplexní. Často je doprovázena oxidací za přítomnosti kyslíku. Některé látky poskytují rozdílné oxidační produkty v závislosti na přítomnosti světla, například fumagilin, fenothiaziny a cholekalciferol.

## 2.2 Anthrachinonové glykosidy, sennosid A, sennosid B

*Charakteristika.* Sennosidy patří mezi anthrachinonové glykosidy [5, 6]. Jsou to deriváty anthracenkarboxylových kyselin. Anthrachinony jsou sloučeniny, které zahrnují 1,4-diketocyklohex-2,5-dienovou strukturu připojenou k fenylovému kruhu z obou stran. Struktury anthrachinonové jednotky s příslušnými aglykony jsou uvedeny na obr. 2.1.



Obr. 2.1: Struktura anthrachinonové jednotky a příslušných aglykonů. Převzato a upraveno z [5].

U většiny anthrachinonů se hydroxylové skupiny nachází na uhlících C1 a C8. Pouze uhlíky C3 a C6 mohou být také substituovány: hydroxylovou, hydroxymethylovou nebo karboxylovou skupinou na uhlíku C3 a fenolovou nebo methylovou skupinou na uhlíku C6. Ne všechny anthrachinony jsou přímo chinony, například sennosidy jsou dianthrony pozůstávající ze dvou anthronových jednotek a každá nese pouze jednu karbonylovou skupinu [7, 8]. Dianthrony pozůstávající ze dvou stejných anthronových jednotek se řadí mezi homodianthrony. Patří sem sennidin A a B, sennosid A a B. V případě, že jsou anthronové jednotky odlišné, řadí se takovéto dianthrony mezi heterodianthrony (sennosid C a D).

Cukerné jednotky jsou u anthrachinonových glykosidů připojené hlavně na uhlík C8, C10 nebo hydroxylovou skupinu na uhlíku C6 (u kaskarosidů C8 a zároveň C10) cit. [7–9]. U sennosidů jsou cukerné jednotky připojené na hydroxylovou skupinu na

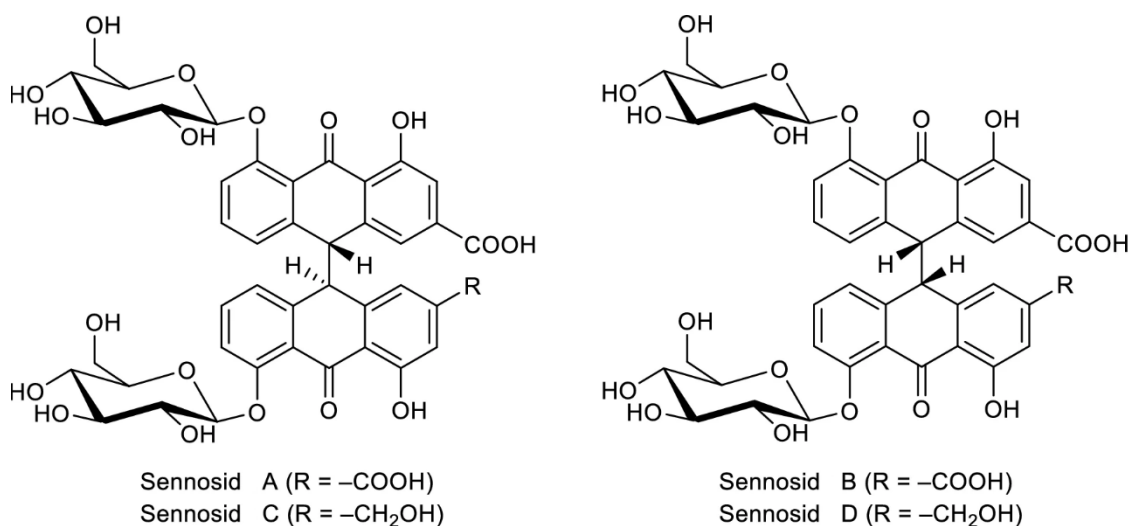
uhlíku C8. Oxidace při sušení vede ke vzniku anthrachiononů a dimerizaci na dianthronové glykosidy.

Anthrachinonové deriváty jsou obsaženy, v houbách (*Fungi*), lišejnících (*Lichen*) a semenných rostlinách (*Spermatophyta*). Obsaženy jsou také v rostlinách některých čeledí krytosemenných rostlin (*Angiospermae*), jako bobovité (*Fabaceae*), liliovité (*Liliaceae*), rdesnovité (*Polygonaceae*), řeselátkovité (*Rhamnaceae*), mořenovité (*Rubiaceae*) a krtičníkovité (*Scrophulariaceae*) [7]. Obsah derivátů anthracenu je odlišný v čerstvě odebraném vzorku rostliny a vysušeném rostlinném materiálu.

Senna je léčivá látka pozůstávající z vysušených listů (příležitostně z vysušených lusků) některých druhů rodu *Cassia* [10, 11]. Existují dva hlavní druhy, jeden původem ze severovýchodní Afriky, *Cassia senna* L. (synonymum *Senna alexandrina* P.Mill.), a *Cassia angustifolia* Vahl, původem z Indie, také známá jako senna indická [6, 11, 12].

V rostlinách rodu *Senna* se kromě sennosidů nachází i velké množství dalších anthrachinonových derivátů, konkrétně palmidin A, aloe-emodin dianthron diglykosid, aloe-emodin-8-glykosid, rhein-8-glykosid, rhein a emodin-8-soforosid [6, 12]. Přítomny jsou také glykosidy odvozené od naftalenu, a to hydroxymusizin glykosid a tinnevellin glykosid [10, 12, 13]. Dále senna obsahuje flavonoid kaempferol, jeho glykosid kaempferin, isorhamnetin, sterol a jeho glykosid, pryskyřici a šťavelan vápenatý [14]. V senně jsou obsaženy i těkavé sloučeniny (mono- a seskviterpeny, fenylypropanové sloučeniny, mastné kyseliny a jejich estery [15]).

Majoritní zastoupení ze sennosidů mají především sennosidy A a B. Obsah těchto látek ve vysušených listech senny se liší v rozpětí 1,5 až 3,0 %. Sennosid A a sennosid B jsou enantiomery, rozlišitelné konfigurací na uhlíku C10 a C10'. Sennosid A je pravotočivý a sennosid B je levotočivý isomer. Sumární vzorec sennosidů A i B je C<sub>42</sub>H<sub>38</sub>O<sub>20</sub>. Obě látky mají stejnou relativní molekulovou hmotnost, a to 862,7. Sennosid A má číslo CAS 81-27-6 a sennosid B CAS 127-57-4. Struktura sennosidů A, B, C a D je zobrazena na obr. 2.2.



Obr. 2.2: Struktura sennosidů A, B, C a D.

*Fyzikální a chemické vlastnosti.* Sennosidy A a B jsou za normálních podmínek krystalky žluté barvy, bez zápachu. Jsou dobře rozpustné v methanolu a vodných roztocích methanolu, méně rozpustné v acetonitrilu. Další fyzikální a chemické vlastnosti nejsou v literatuře dobře popsány.

*Izolace.* Sennosidy se získávají extrakcí a izolací z rostlinného materiálu, nesyntetizují se. Existuje více postupů, jak extrahovat a izolovat sennosidy i další glykosidy z rostlinného materiálu. Vhodný obecný postup podle literatury [16] je: Materiál obsahující glykosidy je zhomogenizován na prášek. Prášek se extrahuje během kontinuální perkolace v Soxhletově aparatuře za použití ethanolu jako rozpouštědla. Vlivem tepla jsou deaktivovány různé enzymy přítomné v částech rostlin. Glykosidy jsou termolabilní a extrakce by měla probíhat při teplotě pod 45 °C. K extraktu se přidává octan olovnatý kvůli vysrážení tríslovin a zbavení se nečistot. Přebytek octanu olovnatého se sráží na sulfid olovnatý probubláním sulfanem. Extrakt se přefiltruje a zakoncentruje pro získání surových glykosidů. Glykosidy v čisté formě se získají frakčním vytřepáváním, frakční krystalizací a preparativními technikami jako preparativní tenkovrstvá chromatografie a kolonová chromatografie.

*Farmakologie.* Senna se pravděpodobně používala na léčbu zácpy již od devátého nebo desátého století [9, 17]. V současnosti je běžné vypítí odvaru připraveného vyluhováním asi 3 g senny šálkem horké vody po dobu 15 až 20 min. Komerčně dostupné jsou také kapalné nebo vysušené extrakty, tablety, sirupy a další přípravky.

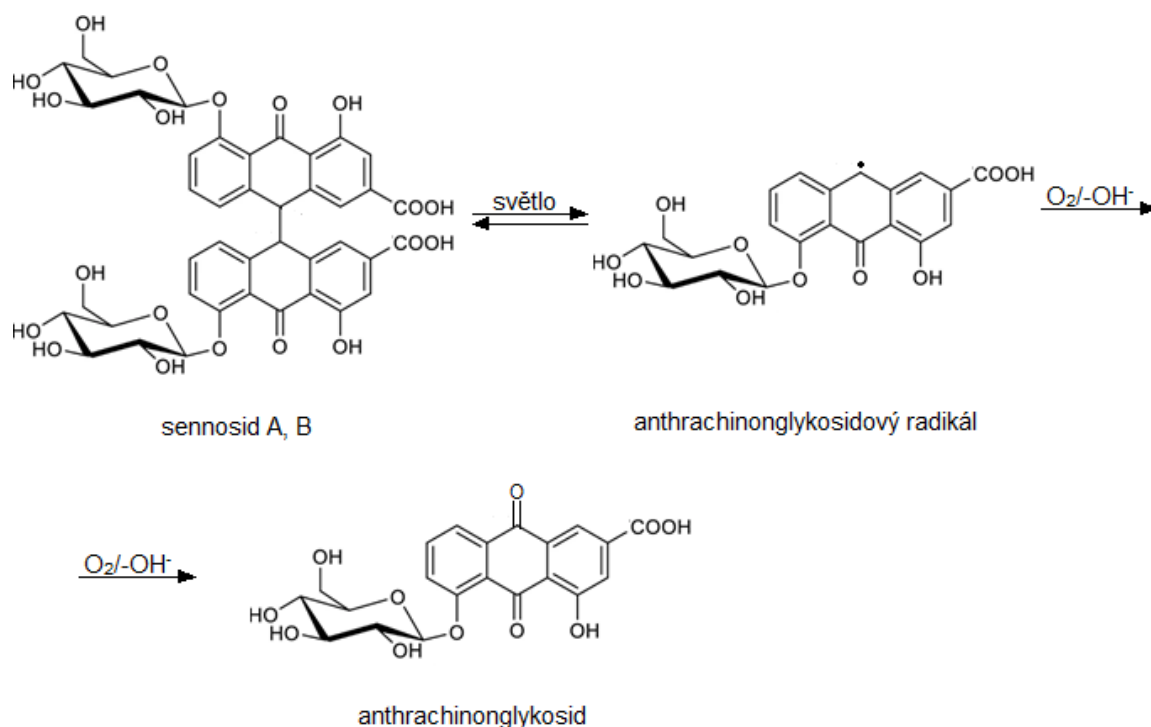
Za laxativní účinky jsou kromě sennosidů odpovědné i další anthrachinonové deriváty, přesněji jejich aglykony. Aby vykazovaly účinek, je nutná hydroxylace na

uhlících C1 a C8 [5]. Glykosilace je také důležitá, protože pomáhá dostat molekuly na místo účinku v tlustém střevě. Tam se glykosidy rozpadají na příslušné aglykony. Důležitý je také stupeň oxidace. Glykosidy anthranolu a anthronů mají silnější laxativní účinky než anthrachinonové glykosidy. Některé anthrachinonové aglykony, například rhein, alizarin a emodin vykazují také aktivitu proti lidskému cytomegaloviru [18]. Další využití je například pročištění vnitřností před kolonoskopickým vyšetřením [13].

*Stabilita a degradace.* Z několika studií vyplývá, že stabilita vodných roztoků sennosidu A i sennosidu B velmi závisí na podmínkách uchovávání těchto roztoků, jako je pH, čas a teplota [19, 20]. Bylo zjištěno, že vodné roztoky jsou nejstabilnější při pH = 6,5 ( $t_{90}$  = 8,4 měsíců) a nejméně stabilní při pH = 8,4 ( $t_{90}$  = 2,5 měsíců). Během uchovávání po dobu dvou let při pokojové teplotě však nedošlo k poklesu laxativního účinku u myši, nezávisle na pH. Pouze u alkalických roztoků došlo k vymizení laxativního účinku po době 4,25 let. S časem skladování se zvyšovala akutní toxicita roztoků sennosidů.

Bylo zjištěno, že sennosid A i B podléhají fotodegradaci [21]. Vystavení roztoků sennosidů dennímu světlu vedlo k 40 % úbytku sennosidů za jeden den a úplné degradaci po třiceti dnech. Sennosidy byly rozpuštěny v 50% (v/v) methanolu a uchovávány v různých podmínkách (vystavení světlu v inkubátoru po různě dlouhou dobu, střídání světla a tmy), čím bylo prokázáno, že za degradaci je zodpovědné světlo. Prvním krokem je pravděpodobně rozdělení molekuly na příslušné anthronglykosidové radikály. Tyto radikály buď zreagují za opětovného vzniku sennosidu, nebo vzniká příslušný anthrachinonglykosid. Předpokládalo se, že z anthrachinonglykosidu vznikne rhein (z původní molekuly sennosidů A a B), případně aloe-emodin (z původní molekuly sennosidů C, D). Toto však prokázáno nebylo. Schéma deagradčních reakcí a struktura reagujících molekul jsou znázorněny na obr. 2.3. Stabilitu bylo možné lépe zachovat rozpuštěním sennosidů pouze v 0,1% roztoku hydrogenuhličitanu sodného, bez přídavku methanolu. Při vystavení světlu dochází také ke zrychlení isomerizace sennosidu A na sennosid B [22].





Obr. 2.3: Fotodegradace sennosidu A a sennosidu B (převzato a upraveno podle [21]).

Anthrachinonové skupiny jsou velmi reaktivní při vystavení UV záření s vlnovou délkou 340 až 360 nm [23]. Touto aktivací přechází anthrachinonové molekuly na radikály. Výsledkem jsou vysoce reaktivní, excitované částice, které zahrnují i vytvoření tripletního stavu  $n-\pi^*$  (silný akceptor elektronů). Tuto reakci lze využít k navázání anthrachinonových derivátů k vhodnému substrátu.

Sennosid A i sennosid B podléhá hydrolyze na odpovídající aglykony sennidin A a sennidin B. Degradace obou látek, včetně hydrolyzy glykosidových jednotek připojených  $\beta$ -O vazbou nebo redukce dianthronové struktury rozštěpením vazby mezi uhlíky C10 a C10', může být způsobena řadou enzymů mikroorganismů [24]. Sennosidy jsou stabilnější vůči oxidaci kvůli C10-C10' vazbě. C-C glykosidy jsou obecně stabilnější vůči hydrolyze [5]. Bylo prokázáno, že sennosidy A a B nejsou stabilní ve vodných roztocích (stabilita silně záleží na podmínkách uchování, jak je uvedeno výše) a rhein-8-O-glykosid a rhein jsou hlavními degradačními produkty [20, 25]. Degradace sennosidů však nesnižuje laxativní účinky, které jsou způsobeny anthrachinonovými deriváty obecně.

*Analytické metody pro stanovení sennosidů.* Pro stanovení sloučenin obsažených v senně se používají různé analytické metody. Většina z nich je založena na HPLC s reverzní fází s mobilními fázemi, které obsahují methanol a vodu [26], methanol a pufr

[20, 27, 28], methanol a vodu s iontově párovými činidly [29], acetonitrilové pufr [25, 30, 31] a tetrahydrofuranový pufr [32]. Používá se spojení s detektorem diodového pole a hmotnostně spektrometrickým detektorem (trojitý kvadrupól, případně Q-TOF jako hmotnostní analyzátor) [33]. Při měření s hmotnostní detekcí se většinou používá ionizace ESI v negativním módu. Při tomto typu ionizace byly v literatuře [33] detegovány molekulární ionty s  $m/z = 861,2172$  (sennosid A) a  $861,2028$  (sennosid B). Uvedené metody kapalinové chromatografie jsou blíže specifikovány v tab. 2.1.

**Tabulka 2.1**

Bližší specifikace metod kapalinové chromatografie používaných pro stanovení sennosidů.

Stacionární fáze	Mobilní fáze	Eluce	Detekce	Ref.
C18	CH <sub>3</sub> OH / H <sub>2</sub> O	gradientová	DAD	[26]
C18	CH <sub>3</sub> OH / 0,1 % HCOOH v H <sub>2</sub> O	gradientová	DAD	[27]
C18	2 % dioxan / Britton-Robinsonův pufr	izokratická	UV	[28]
C18	CH <sub>3</sub> OH / (C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>4</sub> -N-OP-(OH) <sub>2</sub> O v H <sub>2</sub> O	izokratická	UV	[29]
C18	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> / (C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> ) <sub>4</sub> -N-Br v CH <sub>3</sub> CN	izokratická	DAD	[30]
C18	CH <sub>3</sub> CN / H <sub>2</sub> O / H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	izokratická	UV	[31]
-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	tetrahydrofuran / H <sub>2</sub> O / CH <sub>3</sub> COOH	izokratická	UV	[32]
C18	CH <sub>3</sub> CN / 0,1 % HCOOH v H <sub>2</sub> O	gradientová	MS	[33]

## 2.3 Alkaloidy

Během několika stovek milionů let evoluce si rostliny vytvořily širokou škálu sekundárních metabolitů jako prostředky pro obranu před býložravci, mikroorganismy, viry a jinými rostlinami [34]. Pravděpodobně se tak nejedná o čistou náhodu, že mnoho alkaloidů interaguje například s receptory neurotransmiterů. Lidstvo používá alkaloidy již tisíce let [6, 34]. První civilizace, které je používaly, byly pravděpodobně Sumerové a Egypťané. První důkazy o tom, že člověk používal rostliny obsahující alkaloidy, byly nalezeny na asyrských tabulkách napsaných klínovým písmem. Na těchto asi 4000 let starých tabulkách bylo zmíněno asi 250 rostlin, například mák setý (*Papaver somniferum*), rulík zlomocný (*Atropa belladonna*) a mandragora lékařská (*Mandragora officinarum*). Mimo Mezopotámii se znalosti o rostlinách obsahujících alkaloidy rozvíjely i v Číně, kde císař Šen-nung popsal 365 léků přibližně 3000 let p. Kr. Mezi další civilizace, které bylo rozšířené používání takových rostlin patří Indie nebo antické Řecko. Minimálně až do 19. století však alkaloidy nebyly reprodukovatelně izolovány ani

analyzovány. Až později, zejména v 20. století, s rozvojem analytických separačních technik, jako chromatografie a hmotnostní spektrometrie došlo k objasnění jejich struktury.

Alkaloid je organická sloučenina obsahující ve své struktuře dusík, která vykazuje farmakologickou aktivitu u lidí a živočichů [6]. První definici alkaloidů zavedl Meissner v roce 1818 a patřila všem organickým sloučeninám rostlinného původu s bazickým charakterem [35, 36]. Další studium odhalilo přítomnost atomu dusíku a heterocyklického systému ve struktuře alkaloidů. Pak byly alkaloidy klasifikovány jako primární, sekundární, terciární a kvartérní aminy. Zjistilo se, že alkaloidy se vyskytují kromě rostlin i u živočichů, člověka, mořských organismů, hub a mikroorganismů. Do skupiny alkaloidů byly postupně zařazovány další sloučeniny, například i neutrální metabolity s amidovými skupinami, sloučeniny s atomem dusíku přítomným v postranním řetězci, případně s nitro skupinou nebo dalšími jinými funkčními skupinami obsahujícími atom dusíku [37, 38]. Dnes lze alkaloidy klasifikovat také na základě metabolických drah aminokyselin, ze kterých jsou odvozeny, případně podle toho, jestli jejich základní uhlíkový skelet pochází z aminokyseliny nebo ne. Rostliny jsou stále hlavním zdrojem alkaloidů, kterých bylo zatím popsáno přibližně 27 000. Jsou rozšířené v rostlinných pletivech, mezi jiným, čeledi toješťovitě (*Apocynaceae*), hvězdnicovitě (*Astraceae*), dřívěškovitě (*Berberidaceae*), brutnákovitě (*Boraginaceae*), zimnostrázovitě (*Buxaceae*), merlíkovitě (*Chenopodiaceae*), pryšcovitě (*Euphorbiaceae*), makovitě (*Papaveraceae*), lilkovitě (*Solanaceae*) a mnohých dalších [39, 40].

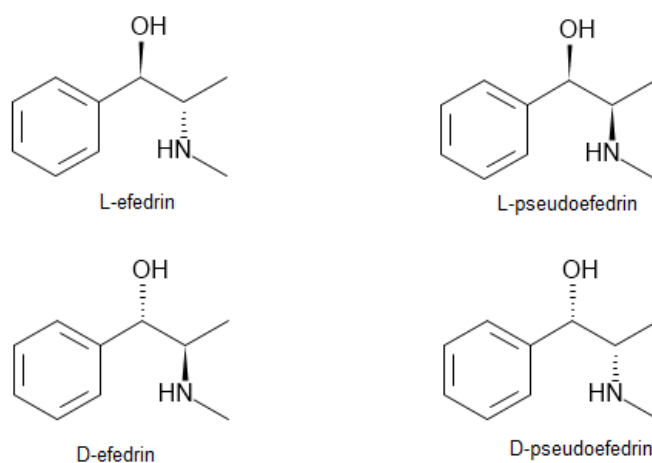
Alkaloidy se v rostlinách nachází spíše ve formě ve vodě rozpustných solí organických kyselin (například šťavelové, octové, citronové, vinné nebo mléčné), esterů nebo ve spojení s tříslovinami nebo sacharidy než jako volné báze [5]. Většinou se izolují z rostlinného materiálu ve formě krystalických, amorfních a netěkavých sloučenin bez zápachu. Alkaloidy s nízkou molekulovou hmotností (například pilokarpin), a alkaloidy neobsahující atom kyslíku ve své struktuře jsou obvykle za normálních podmínek kapalné. Většina alkaloidů je bezbarvých a má hořkou chuť. Mnohé alkaloidy jsou opticky aktivní, s L-isomery farmakologicky aktivnějšími než jejich racemické směsi, které jsou typické nižší, nebo odlišnou aktivitou (například enantiomery morfinu). Volné báze alkaloidů jsou rozpustné v nepolárních organických rozpouštědlech a jejich rozpustnost ve vodě je malá (výjimkami jsou kofein a efedrin). Soli alkaloidů jsou rozpustné ve vodě a zředěných kyselinách a nerozpustné, případně velmi omezeně rozpustné v organických rozpouštědlech. Tento rozdíl v rozpustnosti alkaloidů závislý na

jejich formě se využívá ve farmaceutickém průmyslu na jejich izolaci z komplexních rostlinných matic a výrobu farmaceuticky přijatelných výrobků.

Alkaloidy obecně vykazují farmakologickou aktivitu u savců [34]. Většina alkaloidů s biologickou aktivitou u člověka ovlivňuje nervový systém, konkrétně interakce neurotransmiterů, například acetylcholinu, adrenalinu, noradrenalinu,  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny, dopaminu a serotoninu. Alkaloidy jsou nositeli mnoha dalších druhů farmakologické aktivity, například antihypertenzivní (indolové alkaloidy), antiarytmické (chinidin, ajmalin, spartein), jsou to účinná antimalarika (chinin), působí proti rakovině (dimerní indoly, vinkristin, vinblastin).

### 2.3.1 Efedrin

*Charakteristika.* Efedrin patří mezi nejvýznamnější neheterocyklické alkaloidy [36]. Je to pseudoalkaloid [6], spojený s metabolickou drahou L-fenylalaninu. Je obsažen v rostlinách rodu chvojník (*Ephedra*) [6, 41, 42]. Systematický název efedrinu je 2-(methylamino)-1-fenyl-propan-1-ol a má číslo CAS 299-42-3. Sumární vzorec efedrinu je  $C_{10}H_{15}NO$  a relativní molekulová hmotnost 165,23. Získává se extrakcí z rostlinného materiálu nebo synteticky. Vyskytuje se ve formě čtyř diastereoisomerů. Nejvíce zastoupený v rostlinách a zodpovědný za farmakologickou aktivitu je především L-efedrin [42], následuje D-pseudoefedrin. Struktury L-efedrinu a isomerů jsou znázorněny na obr. 2.4.

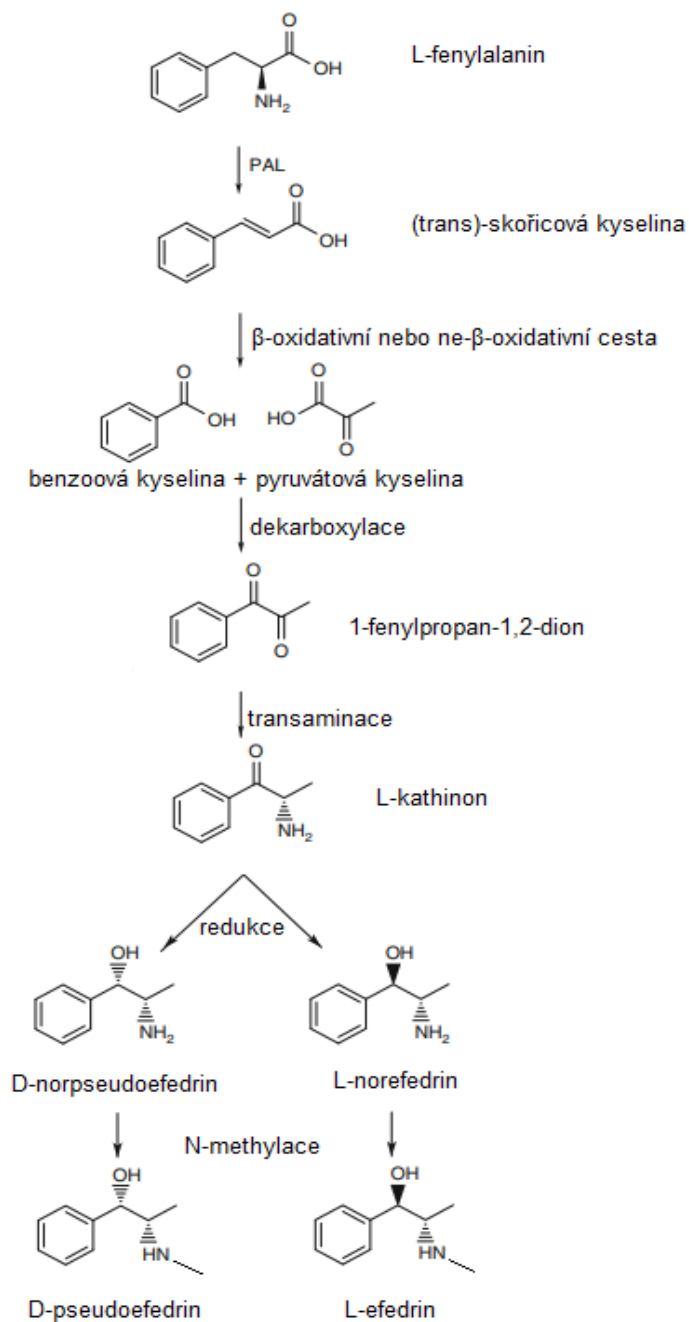


Obr. 2.4: Struktura L-efedrinu a dalších isomerů.

*Fyzikální a chemické vlastnosti.* Za normálních podmínek existuje čistý efedrin ve formě bezbarvých krystalů nebo bílého krystalického prášku [41]. Velmi rychle absorbuje oxid uhličitý a rozkládá se při vystavení světlu. Je rozpustný v chloroformu, velmi dobře rozpustný v ethanolu [41, 43, 44] a prakticky nerozpustný v etheru [45]. Rozpustný je i ve vodě a v tucích [46]. Bod tání a tuhnutí je 217 až 220 °C [44].

*Izolace.* Stonek rostliny obsahující efedrin je v čínské medicíně známý jako Ma Huang již 5000 let [42, 46-48]. Efedrin byl poprvé izolován z materiálu pocházejícího z Číny v roce 1885 japonským vědcem Yamanashim, ne však v čisté formě. Po jeho smrti pokračovali v jeho práci Nagai (izolace čisté formy [47]) a Hori, kteří sloučeninu pojmenovali efedrin a také rostlinu – chvojník obecný (*Ephedra vulgaris*). Ze stejného druhu byl efedrin izolován v roce 1888 německou společností Merck. V roce 1889 Ladenburg a Oelschägel publikovali své výsledky s bází pojmenovanou pseudoefedrin, připravenou společností Merck z rostliny rodu *Ephedra*. O tři roky později Miller izoloval pouze pseudoefedrin z druhu rostoucího v Evropě. Rostlina byla identifikována Arthurem Meyerem jako *Ephedra vulgaris*. Bylo zjištěno, že rostlina *Ephedra vulgaris* obsahuje efedrin, pokud roste v Číně a pseudoefedrin, pokud roste v Evropě.

*Biosyntéza.* Prekurzorem při biosyntéze efedrinu v rostlinách je L-fenylalanin [49]. Zjednodušené schéma biosyntézy je na obr. 2.5. Poskytuje fenylovou skupinu a první uhlík postranního řetězce efedrinu. Skořicová kyselina, benzoová kyselina a benzaldehyd jsou jednoduše včleněny do struktury efedrinu a zbývající dva uhlíky pochází z pyruvátu. Při biosyntéze dochází k degradaci postranního řetězce L-fenylalaninu za vzniku (*trans*)-skořicové kyseliny. Tuto reakci katalyzuje L-fenylalanin amoniumlyasa. Zkracování řetězce za vzniku benzoové kyseliny je realizováno  $\beta$ -oxidativní nebo ne- $\beta$ -oxidativní cestou. Benzoová kyselina může být esterifikována acetylkoenzymem A a následně acetylována pyruvátem a dekarboxylací vzniká diketon. Jeho transaminací vzniká kathinon. Z kathinonu vzniká redukcí karbonylového uhlíku norefedrin nebo norpseudoefedrin. Konečným produktem po *N*-methylaci je efedrin nebo pseudoefedrin.

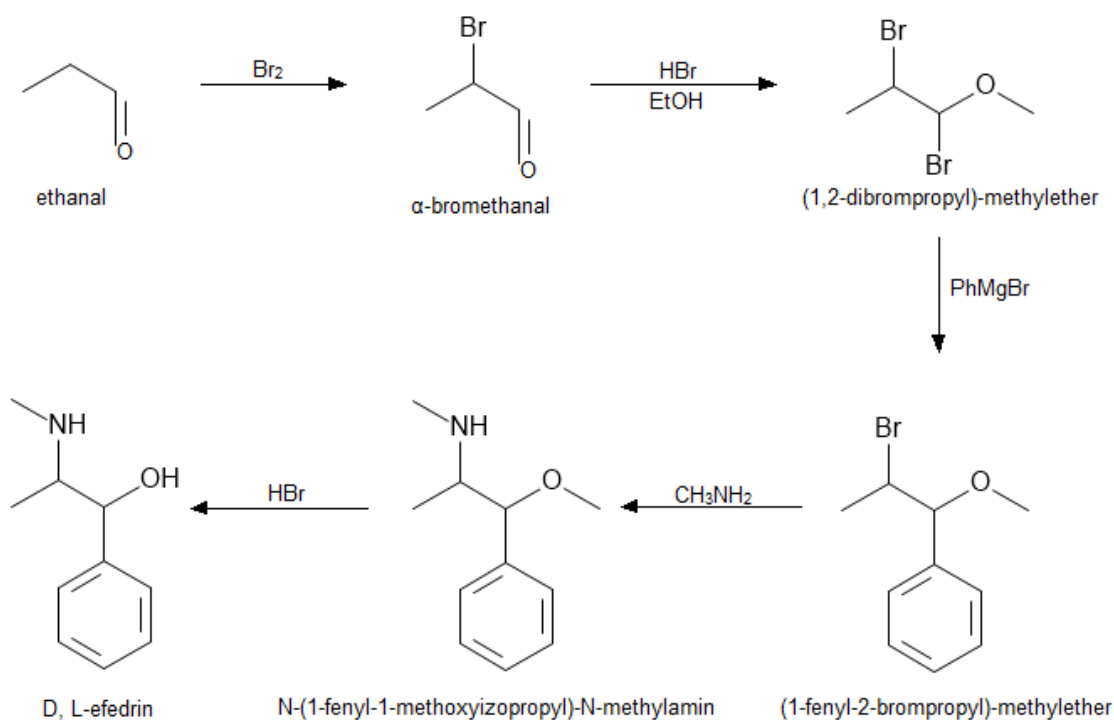


Obr. 2.5: Schéma biosyntézy efedrinu v rostlinách rodu *Ephedra*. Převzato a upraveno podle [42].

**Syntéza.** Efedrin lze získat extrakcí z rostlinného materiálu nebo synteticky [42]. V komerční produkci se využívají tři metody. První je extrakce z rostlinného materiálu, zejména z rostlin rodu *Ephedra*. Prvním krokem je většinou přidání báze k alkaloidům a následuje extrakce organickým rozpouštědlem [49]. Synteticky lze vyrábět racemické směsi efedrinu [50]. Poslední a nejvíce rozšířenou možností je semisyntetický proces výroby [49]. Je založený na kombinaci fermentace a chemické syntézy. Benzaldehyd je mikroorganismy biotransformován na L-fenylacetylkarbinol za katalýzy pyruvát

dekarboxylasou. Při fermentaci se většinou používají kvasinky *Saccharomyces*, případně i jiné druhy kvasinek. Tímto procesem lze s velmi vysokou enantioselektivitou získat čistý L-efedrin.

První totální syntéza efedrinu byla provedena Späthem v roce 1925 [51]. Východí látky byly ethanal, brom a fenylmagnesium bromid. Bromací ethanalu vznikl  $\alpha$ -brom-ethanal, který po reakci s bromovodíkem v prostředí ethanolu poskytl (1,2-dibrompropyl)methylether. Grignardovou reakcí s fenylmagnesium bromidem došlo k výměně bromu za fenylovou skupinu. Reakcí s methylaminem následně došlo k debromaci. Bromovodíkem byla odstraněna methoxy skupina a vznikl L, D-efedrin. Isomery byly odděleny pomocí vinné kyseliny. Celé schéma syntézy podle Spätheho je uvedeno na obr. 2.6.

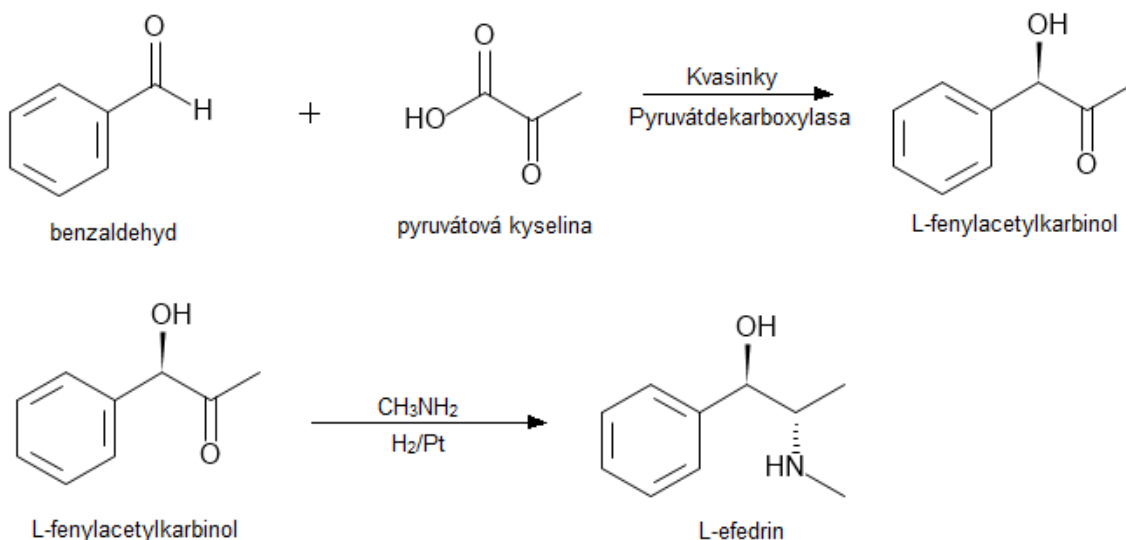


Obr. 2.6: Schéma první totální syntézy efedrinu.

Efedrin byl syntetizován například i Manskem katalytickou redukcí 1-fenylpropan-1,2-dionu v methanolovém roztoku methylaminu [50]. Isomery efedrinu byly odděleny mandlovou kyselinou. Existuje mnoho postupů syntéz racemické směsi efedrinu i pouze L-efedrinu.

Produkce L-efedrinu z benzaldehydu je založená na biosyntéze L-fenylacetylkarbinolu fermentací melasy a cukru kvasinkami za přítomnosti benzaldehydu [42, 52].

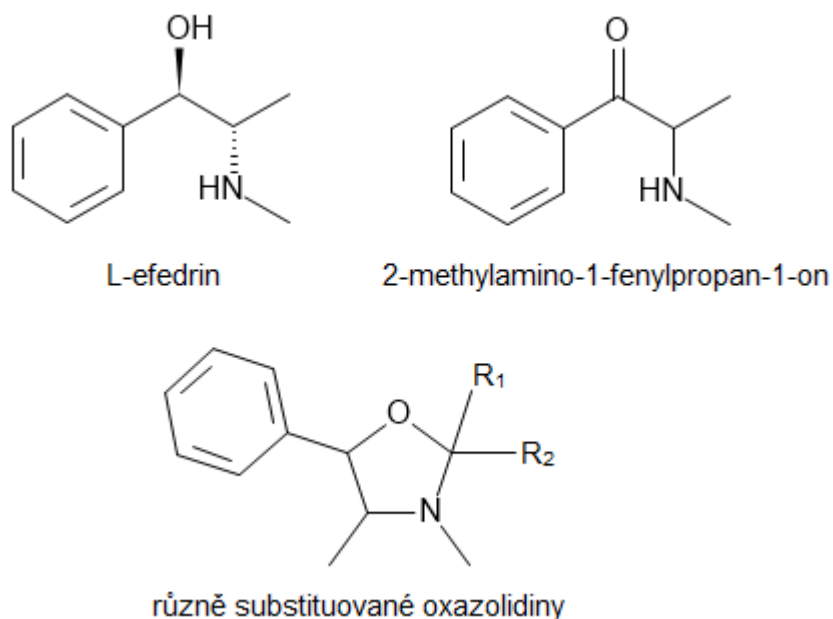
Po dokončení biosyntézy je 28–40 % L-fenylacetylkarbinolu izolováno a převedeno reaktivní methylaminací v prostředí dibutyletheru s platinou jako katalyzátorem na čistý L-efedrin. Takto získaný L-efedrin se převádí na formu hydrochloridu. Schéma reakce je znázorněno na obr. 2.7.



Obr. 2.7: Schéma výroby efedrinu semisyntetickým procesem. Převzato a upraveno z [42].

*Stabilita a degradace.* Bylo zjištěno, že při extrakci efedrinu z vodného roztoku do diethyletheru běžné i analytické čistoty dochází ke ztrátám [53]. Minimálně z části vznikly tyto ztráty reakcí efedrinu s nečistotami (aldehydy) v diethyletheru. Snížení ztrát efedrinu při extrakci bylo dosaženo promytím diethyletheru disiřičitanem sodným, ředěnou kyselinou chlorovodíkovou, roztokem hydroxidu sodného a přidáním *n*-butanolu do extraktu před odpařením. Efedrin (100 g dm<sup>-3</sup>) uchován v diethyletheru několik týdnů na světle při pokojové teplotě se rozpadl na různě substituované oxazolidiny. Na oxazolidiny se efedrin rozpadl v roztocích diethyletheru a benzenu i při degradaci UV zářením ( $\lambda = 254$  nm). Oxidace L-efedrinu peroxidem niklu, uhličitánem stříbrným a oxidem mangančitým poskytla benzaldehyd, směs oxazolidinů a 2-methylamino-1-fenylpropan-1-on. Struktury degradačních produktů jsou znázorněny na obr. 2.8.





Obr. 2.8: Struktura efedrinu a porovnání se strukturami degradačních produktů. R<sub>1</sub> a R<sub>2</sub> značí různé substituenty (–H, –CH<sub>3</sub>, –C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>).

Při vystavení teple se hydrochlorid efedrinu rozkládá na fenylethylketon a methylamin. Efedrin může být také enzymaticky degradován některými bakteriemi [54]. Pseudoefedrin dehydrogenasa byla schopná selektivní konverze (*S,S*)-D-pseudoefedrinu a (*S,R*)-D-efedrinu na (*S*)-methylkathinon a (*R*)-methylkathinon. Efedrin dehydrogenasa projevila selektivitu pro oxidaci (*R,S*)-L-efedrinu a (*R,R*)-L-pseudoefedrinu.

*Farmakologie.* Efedrin patří mezi nejstarší léčiva používané v čínské medicíně již více než 5000 let [42, 61–63]. V moderní medicíně se používá od roku 1923 po znovuobjevení efedrinu a prozkoumání jeho hodnotných vlastností. Efedrin je sympatomimetikum s podobnými účinky jako adrenalin. Proto se užívá jako dekonjestivum, při redukci hmotnosti a zvýšení energie jako doplněk stravy [42]. U lidí stimuluje termogenezi, lipolýzu. Díky těmto vlastnostem se efedrin rychle stal oblíbeným produktem na trhu s přípravky na redukci hmotnosti a zvýšení fyzického výkonu. Po objevení se nežádoucích účinků, případů předávkování a kontraindikací při kombinaci s jinými látkami byl však pro takovéto účely v roce 2004 zakázán americkou Food and Drug Administration. Dnes se v mnoha zemích prodává ilegálně, protože jeho používání je upraveno příslušnou legislativou.

Nejčistější forma efedrinu se pro jeho sympatomimetické účinky používá při bronchodilatační léčbě (pomáhá astmatickým pacientům uvolněním hladkých svalů

průdušek), jako dekonjestivum i jako vazokonstrikční látka. Vazokonstrikční účinek na mukózní membrány z efedrinu dělá výběrové dekonjestivum, co je i největším významem efedrinu v klinické praxi. Používají se i deriváty efedrinu, například pseudoefedrin při léčbě kašle a nachlazení.

Adrenergní účinky způsobené efedrinem se objevují hlavně v důsledku jeho schopnosti být sympatomimetickým agonistou  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergních receptorů. Obecně v důsledku takové stimulace dochází ke zvýšení tepu, periferní vazokonstrikci, bronchodilataci a stimulaci centrální nervové soustavy.

Pokud se efedrin používá pro terapeutické účely se sledováním dávkování, nemá žádnou potenciální toxicitu. Toxicita se může projevit při předávkování a vede k paranoidní psychóze, blouznění a halucinacím. Velké dávky efedrinu mohou způsobit hypertenzi, bolest hlavy, závratě, zvracení, nervozitu a nespavost. Efedrin má velký distribuční objem, není vázán na proteiny krevní plasmy a zůstává ve volné formě s velkou afinitou ke tkáním a kapacitou pro dosažení velkých koncentrací v centrální nervové soustavě. Většina efedrinu je po biotransformaci v játrech vyloučena močí v nezměněné formě.

*Analytické metody pro stanovení efedrinu.* V literatuře je popsáno mnoho analýz produktů obsahujících efedrin [55]. Obecně se používají separační metody. K extrakci efedrinu z léčivých přípravků a tělních tekutin byly používány metody extrakce kapalina-kapalina, extrakce na tuhé fázi, mikroextrakce na tuhé fázi a headspace [56]. Dnes se většinou používá extrakce na tuhé fázi, vzhledem k průtoku velkých objemů extrakční kolonou a prekoncentraci analytů. V rutinních laboratořích se pro normální i chirální analýzy používají metody plynové chromatografie (GC-NPD [57], GC-FID [58], GC×GC [59], GC-MS [60-62]), kapalinové chromatografie (LC-UV [63, 64], LC-MS/MS [63, 65-68]) i kapilární elektroforézy [69, 70]. Kapilární elektroforézou lze separovat isomery efedrinu a s ním spojených sloučenin. Výhoda metod GC-MS je nižší cena vybavení, často však zahrnují derivatizační krok pro zlepšení přesnosti a chromatografického profilu analýzy. Metody LC-MS/MS šetří čas, protože lze analyzovat nederivatizované sloučeniny a v některých případech i isomery jako norefedrin a norpseudoefedrin s délkou analýzy 8 min [66, 71]. Podrobnější popisy metod pro stanovení efedrinu poskytují tab. 2.2 a 2.3.

**Tabulka 2.2**

Bližší specifikace metod plynové chromatografie pro stanovení efedrinu.

stacionární fáze	detekce	Ref.
5 % difenyl- / 95 % dimethylpolysiloxan	NPD	[57]
5 % difenyl- / 95 % dimethylpolysiloxan	FID, MS	[58]
I. chirální ( $\beta$ -cyklodextrin), II. polyethylenglykol	FID	[59]
5 % difenyl- / 95 % dimethylpolysiloxan	MS	[60]
5 % difenyl- / 95 % dimethylpolysiloxan	MS	[61]
5 % difenyl- / 95 % dimethylpolysiloxan	MS	[62]

**Tabulka 2.3**

Bližší specifikace metod kapalinové chromatografie pro stanovení efedrinu.

stacionární fáze	mobilní fáze	eluce	detekce	Ref.
-C <sub>5</sub> H <sub>6</sub>	0,1 mol dm <sup>-3</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 3,5 % CH <sub>3</sub> OH v H <sub>2</sub> O	izokratická	UV	[63]
-O-C <sub>5</sub> H <sub>6</sub>	3 % CH <sub>3</sub> OH v 50 mmol dm <sup>-3</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	izokratická	UV	[64]
-C <sub>5</sub> H <sub>6</sub>	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> , CH <sub>3</sub> COOH, CH <sub>3</sub> CN v H <sub>2</sub> O	izokratická	MS/MS	[65]
-SO <sub>3</sub> H	5 mmol dm <sup>-3</sup> HCOONH <sub>4</sub> / CH <sub>3</sub> CN	gradientová	MS/MS	[66]
C18	HCOOH, CH <sub>3</sub> CN v H <sub>2</sub> O / HCOOH v H <sub>2</sub> O	izokratická	MS-Q-TOF	[67]
C8	H <sub>2</sub> O / 0,1 % HCOOH, CH <sub>3</sub> COOH v CH <sub>3</sub> CN	izokratická	MS/MS	[68]
C18	HCOONH <sub>4</sub> v H <sub>2</sub> O / CH <sub>3</sub> CN	gradientová	MS-QQQ	[71]

## 2.4 Terpeny

Terpeny, známé i jako terpenoidy nebo isoprenoidy, jsou nejpočetnější a strukturně nejdiverzifikovanější skupinou přírodních látek [72]. Běžně jsou obsaženy v rostlinách a produkovány ve tkáních, květech a příležitostně v kořenech. Jsou také největší skupinou sloučenin nalezenou v esenciálních olejích [73]. Pojmenování „terpen“ bylo původně používáno pro uhlovodíky nalezené v terpentýnu a přípona „en“ značí přítomnost dvojných vazeb [72].

Terpeny jsou klasifikovány na základě počtu a uspořádání atomů uhlíku ve struktuře tvořené lineárním uspořádáním isoprenových jednotek následovaném cyklizací a přeuspořádáním uhlíkové kostry podle empirického isoprenového pravidla [74]. Isopren, stavební jednotka terpenů, je 2-methylbuta-1,3-dien. Jediná isoprenová jednotka je tedy zástupcem základní třídy terpenů – hemiterpenoidů.

Obecně jsou terpeny rozpustné v tucích. Většina z nich jsou bezbarvé kapaliny lehčí než voda s bodem varu 150 až 180 °C. Jsou těkavé, mají vysoký index lomu

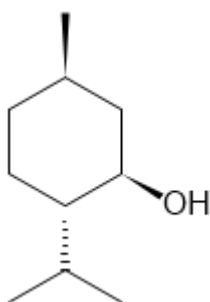
a opticky aktivní. Terpeny jsou nenasycené sloučeniny a obsahují jednu nebo více dvojných vazeb, což znamená, že mohou podstoupit adiční reakce s vodíkem, halogeny, halogenkyselinami a jinými molekulami. Některé tvoří hydráty. Vytváří také charakteristické produkty při adici  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NOCl}$  a  $\text{NOBr}$ .

Esenciální oleje obsahující terpeny mohou být z chemického hlediska rozděleny na monoterpenoidní a seskviterpenoidní na základě odlišné teploty varu (monoterpenoidní 140 až 180 °C, seskviterpenoidní >200 °C).

Biosyntéza terpenů probíhá v cytosolu přes mevalonát nebo v plastidu přes 2-C-methyl-D-erythriol-4-fosfát. Přes mevalonát jsou syntetizovány hlavně hemi-, mono-, di- a triterpeny ale existují i výjimky a vzájemná propojení mezi dvěma způsoby syntézy [75, 76].

#### 2.4.1 Menthol

*Charakteristika.* Menthol je přírodní monoterpenoidní alkohol získaný z různých druhů mátových olejů rostlin rodu *Mentha* (máta) [6, 41]. Je to opticky aktivní látka a má tři chirální centra. V přírodě se z osmi možných isomerů většinou vyskytuje levotočivý isomer, L-menthol, v konfiguraci (1*R*,2*S*,5*R*). Struktura L-mentholu je znázorněna na obr. 2.9. Systematický název je 5-methyl-2-izopropyl-cyklohexan-1-ol. Jeho relativní molekulová hmotnost je 156,26; sumární vzorec  $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}$  a číslo CAS 89-78-1.



Obr. 2.9: Struktura L-mentholu.

*Fyzikální a chemické vlastnosti.* Menthol za normálních podmínek existuje ve formě bílých krystalů nebo krystalického prášku [41]. Je málo rozpustný ve vodě, velmi dobře rozpustný v ethanolu, chloroformu a etheru, volně rozpustný v ledové octové kyselině, a minerálních olejích [41, 77]. Menthol má rozdělovací koeficient oktanol-voda roven  $\log P = 3,4$ .

*Izolace.* Menthol byl poprvé izolován roku 1771 holandským botanikem Gambiusem z mátového oleje [78]. Mezi zdroje mátového oleje patří černá máta peprná (*Mentha piperita* var. *vulgaris*), bílá máta peprná (*Mentha piperita* var. *officinalis*), máta rolní (*Mentha arvensis*), *Mentha canadensis* var. *piperascens* a další [6]. Máta obsahuje asi 1 až 3 % těkavého oleje. První dva uvedené druhy neobsahují méně než 45 % mentholu, přičemž další druhy obsahují 70 až 90 % mentholu. Společně s mentholem jsou v oleji obsaženy i další isomery a látky: D-neomenthol, D-isomenthol, menthon, menthofuran, menthylacetát a cineol. Menthol získaný z přírodních zdrojů je levotočivý (L-menthol) nebo směs enantiomerů (D, L-menthol).

Mentholový olej se získává hydrodestilací nebo parní destilací z čerstvých nadzemních částí rostlin sesbíraných před vykvetením. Pro izolaci L-mentholu z oleje máty peprné je olej podroben chlazení. Krystaly mentholu vykrystalizují z oleje a jsou odděleny centrifugací.

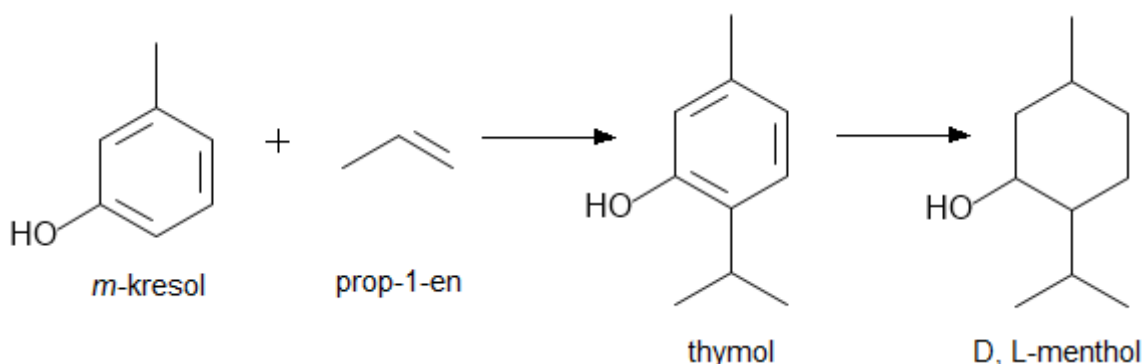
Olej získaný parní destilací rostliny *Mentha arvensis* v době květu obsahuje asi 70 až 80 % volného L-mentholu. Olej se zchladí a vypadnou krystaly mentholu. Odděleny jsou centrifugací. Protože krystalický produkt obsahuje stopy oleje, takto získaný menthol má jemně bylinný, mátový tón. Čistý L-menthol lze získat rekrystalizací rozpouštědly s nízkými body varu. Zbytek oleje, který pořád obsahuje 40 až 50 % volného L-mentholu může být znovu použitý k přípravě L-mentholu.

*Biosyntéza.* Monoterpeny máty jsou odvozené od plastidiálního 2-C-methyl-D-erythriol-4-fosfátu, který slouží jako zdroj univerzálních prekurzorů C<sub>5</sub> isoprenových jednotek isopentenyl difosfátu a dimethylallyl difosfátu [79]. Biosyntéza L-mentholu probíhá přes osm enzymových reakcí [80]. Zahrnuje vytvoření a následnou cyklizaci univerzálního prekurzoru monoterpenů, geranyl difosfátu, na L-(4S)-limonen jako první enzymovou reakci. Následuje hydroxylace na uhlíku C3 a série čtyř redoxních přeměn a isomerizací. Na substituovaném cyklohexanovém kruhu vznikají tři chirální centra a vzniká L-menthol.

*Syntéza.* L-menthol patří mezi nejdůležitější látky používané při výrobě parfémů a vytváření příchutí různých produktů [81]. Hojně se používá například v léčivech, kosmetice a zubních pastách. Z celkové světové výroby mentholu tvoří většinu přírodní menthol. Poptávka po syntetickém mentholu však stále roste. Příčinou je nevyzpytatelnost přírodního zdroje (*Mentha arvensis*), protože pěstování této rostliny ovlivňuje počasí, například monzuny. Existuje mnoho způsobů, jak syntetizovat L-menthol a liší se v celkovém výtěžku a také složitosti celého procesu. Výchozími

látkami pro syntézu L-mentholu mohou být například *m*-kresol, myrcen, D-limonen, D-pulegon, L-piperiton, L- $\beta$ -pinen a L- $\delta$ -3-karen.

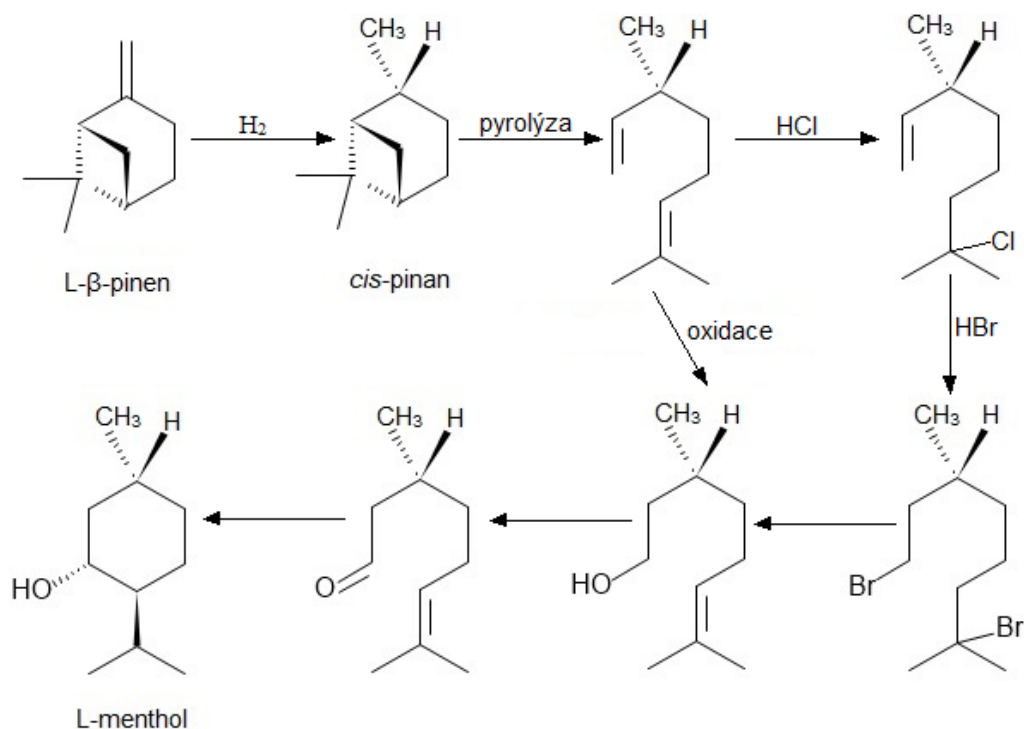
L-menthol lze syntetizovat postupem objeveným Fleischerem, Bauerem a Hoppem v roce 1976. Schéma části tohoto procesu je znázorněno na obr. 2.10. Výchozí látkou je *m*-kresol. Jeho alkylací vzniká thymol. Katalytickou hydrogenací thymolu vzniká směs isomerů mentholu. Frakční destilací této směsi se získává racemická směs enantiomerů D- a L-mentholu. L-menthol i D-menthol lze získat krystalizací očkováním. Do roztoku se přidávají krystaly příslušné enantiomerní formy jeho esteru, které ovlivňují selektivitu krystalizace v prospěch jednoho nebo druhého enantiomeru. Separací krystalů a jejich podrobením hydrolyze se získá L-menthol (případně D-menthol). Matečný louh, bohatý na D-menthol, se vrací do destilačního cyklu. Celkový výtěžek L-mentholu činí asi 90 %.



Obr. 2.10: Syntéza racemické směsi enantiomerů mentholu z *m*-kresolu. Převzato a upraveno z [81].

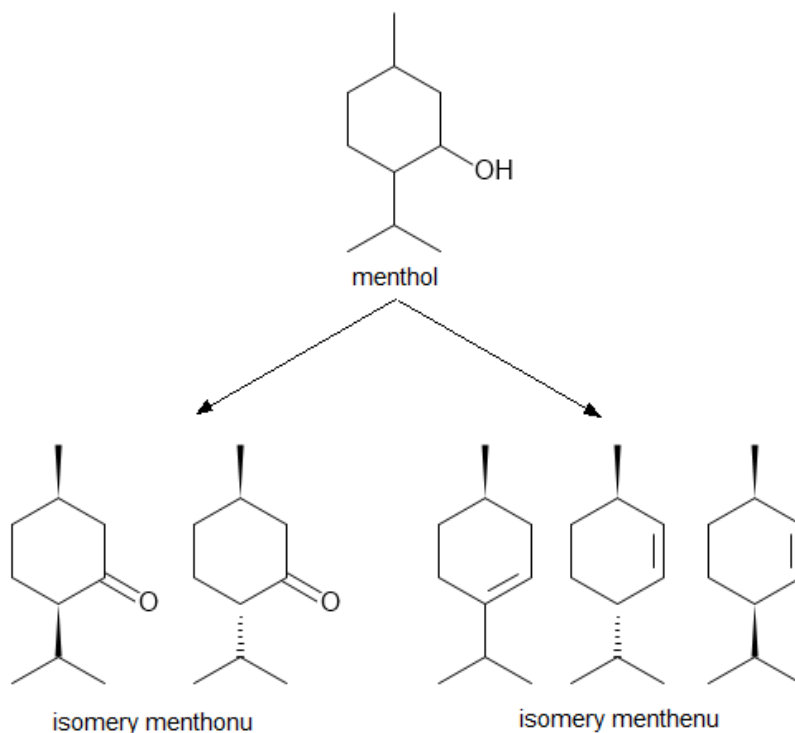
Syntéza L-mentholu z L- $\beta$ -pinenu je výhodná, protože požadované strukturní vlastnosti jsou již přítomné a je dostupný v dostatečné optické čistotě. Schéma je znázorněno na obr. 2.11. Hydrogenací L- $\beta$ -pinenu vzniká *cis*-pinan jako hlavní produkt reakce. Tento cyklický systém se pyrolýzou štěpí na opticky čistý 2,6-dimethylokta-2,7-dien. Přímou oxidací ho lze přeměnit na D-citronelol s dobrým výtěžkem reakce. Alternativou pro tento krok je podrobení 2,6-methylokta-2,7-dienu adici kyseliny chlorovodíkové (podle Markovnikova pravidla), následované adicí kyseliny bromovodíkové (proti Markovnikovu pravidlu) a solvolýzou produktu se získá směs citronelolů. Katalytickou oxidací D-citronelolu vzniká D-citronelal. L-menthol lze získat různými procedurami, například hydrogenací L-izopulegolu, který vzniká z D-citronelalu uzavřením cyklu (katalyzováno organokovovou sloučeninou hliníku). V produktu

se nachází i stopová množství D-mentholu kvůli vzniku *trans*-pinanu v prvním kroku syntézy.



Obr. 2.11: Syntéza L-mentholu z L-β-pinenu. Převzato a upraveno z [81].

*Stabilita a degradace.* V literatuře [82] byla studována stabilita mentholu v ethanolových roztocích (koncentrace mentholu 30 g dm<sup>-3</sup>) při vystavení vysokým teplotám (300 až 900 °C) v prostředí dusíku i v prostředí dusíku s kyslíkem o koncentraci 9 %. Mechanismus degradace však závisel na zvolených podmínkách. V prostředí s přítomností kyslíku vznikalo více oxidačních produktů. Menthon je produktem oxidace mentholu a lze ho získat ozonizací nebo další oxidací mentholu. Při vyšších teplotách vznikalo asi 1,4 % menthonu, při teplotě 300 °C asi 0,6 %. V prostředí s přítomností dusíku při teplotě 300 °C byla koncentrace menthonu pod mezí detekce, při vyšších teplotách byla asi 0,06 %. Potvrzen byl tak i vliv přítomnosti kyslíku pro tuto reakci. Při použití vyšších teplot vznikaly také isomery menthenu. Struktury těchto degradačních produktů jsou znázorněny na obr. 2.12.



Obr. 2.12: Degradační produkty pyrolýzy mentholu. Převzato a upraveno z [82].

Menthol za běžných skladovacích podmínek ( $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) po dobu až 18 měsíců nevykazoval žádnou významnou degradaci [83]. Testován byl krém s obsahem mentholu 1 % (v/v). Neobjevily se žádné degradační produkty při podrobení alkalickým, kyselým či oxidačním podmínkám. K degradaci (ze 70 %) na menthon docházelo až v extrémních podmínkách, a to po vystavení extrémně oxidačnímu prostředí horké kyseliny chromové. Za běžných skladovacích podmínek nebyl po době skladování menthon detegován.

*Farmakologie a toxikologie.* Menthol má obrovské využití v různých oblastech, od výrobků pro osobní péči a léků přes cukrovinky až po pesticidy a cigarety [84]. Je třetím nejdůležitějším ochucovadlem (po vanilce a citronu). Velký význam má jeho využití v oblasti medicíny a farmacie. Dostupný je často volně v různých lékových formách, případně i na předpis. Vykazuje různé druhy biologické aktivity, jako protizánětlivou, antibakteriální, antipruritickou, antifungální, analgetickou a působí i proti rakovině. Běžně se používá například při léčbě bolesti v krku a ve sprejích do nosu.

Dobře známý je pocitově chladivý účinek L-mentholu po rozžvýkání, vdechnutí, požití nebo aplikaci na kůži. Navzdory jeho rozsáhlému používání byl mechanismus účinku prozkoumán až nedávno. Příčinou tohoto účinku je aktivace „mentholového receptoru,“ iontového kanálu selektivního pro teplotu, napětí (potenciál) a menthol [85]. Aktivován může být teplotami menšími než  $26 \text{ }^\circ\text{C}$  a různými látkami (kromě mentholu



například icilinem). Jiné isomery mentholu nevyvolávají tento účinek a liší se zápachem a fyzikálně-chemickými vlastnostmi [84]. Experimenty bylo prokázáno také, že L-menthol je schopný selektivní aktivace  $\kappa$ -opioidního receptoru (je slabým agonistou) a důsledkem jsou analgetické vlastnosti [86].

Obecně platná domněnka, že menthol je bezpečná látka bez žádné podstatné toxicity, byla potvrzena několika málo studii. Žádná toxicita nebyla pozorována u potkanů při testování po dobu 28 dní s dávkami do  $800 \text{ mg kg}^{-1}$  denně [87]. Ani chronická expozice relativně velkým koncentracím mentholových par nevyvolala žádné toxické účinky [88]. Doporučená denní dávka mentholu pro člověka navržená WHO je 0 až  $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ .

*Analytické metody pro stanovení mentholu.* Stanovení mentholu běžně používanými metodami kapalinové chromatografie, například s UV/VIS nebo hmotnostní detekcí, může být problematické vzhledem k jeho nízké absorpci v UV a viditelné oblasti spektra elektromagnetického záření a zlé ionizovatelnosti ESI<sup>+</sup> i ESI<sup>-</sup> ionizací. Bylo vyvinuto mnoho metod pro stanovení mentholu, například metody RP-HPLC s derivatizačním krokem a fluorescenční detekcí [89], s detektorem indexu lomu [90] nebo s polarizovaným fotometrickým detektorem [91]. Použita byla i metoda NP-HPLC pro separaci isomerů mentholu využívající detektor indexu lomu [92]. Menthol lze stanovit také například pomocí nepřímé fotometrické detekce [93] nebo kolorimetricky [94, 95]. Všechny tyto metody mají více nevýhod, hlavně však relativně nízkou citlivost, až na HPLC s fluorescenční detekcí. Problém je i nedostatečná použitelnost pro reálné vzorky, jako jsou sirupy a tablety dlouhé a náročné přípravě vzorku. Plynová chromatografie je považována za citlivou metodu, vhodnou ke stanovení mentholu [96]. Používá se ve spojení s plamenově ionizačním detektorem [96-98] a hmotnostními spektrometry [99, 100]. Stacionární fáze bývá většinou nepolární a jako nosný plyn se používá helium. Metody kapalinové a plynové chromatografie pro stanovení mentholu jsou blíže specifikovány v tab. 2.4 a 2.5.

**Tabulka 2.4**

Bližší specifikace metod kapalinové chromatografie pro stanovení mentholu.

stacionární fáze	mobilní fáze	eluce	LOD	detekce	Ref.
C8	CH <sub>3</sub> OH / H <sub>2</sub> O / tetrahydrofuran 80/18/2	izokratická	1 μmol dm <sup>-3</sup>	FLD	[89]
C18	H <sub>2</sub> O / CH <sub>3</sub> OH	izokratická	0,76 μg cm <sup>-3</sup>	RID	[90]
C18	H <sub>2</sub> O / CH <sub>3</sub> CN	izokratická	– <sup>a</sup>	PPD	[91]
C18	H <sub>2</sub> O / CH <sub>3</sub> OH	izokratická	– <sup>a</sup>	nepřímá UV	[93]

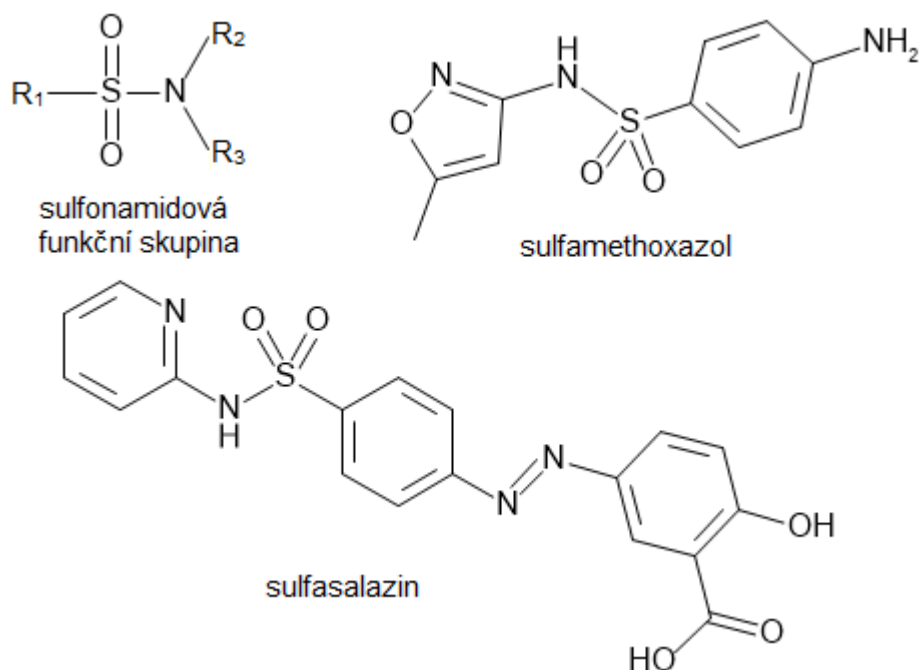
-<sup>a</sup> Údaj není k dispozici.**Tabulka 2.5**

Bližší specifikace metod plynové chromatografie pro stanovení mentholu.

stacionární fáze	detekce	Ref.
6 % kyanopropyl- / 94 % dimethylpolysiloxan	FID	[96]
5 % difenyl- / 95 % dimethylpolysiloxan	FID	[97]
5 % difenyl- / 95 % dimethylpolysiloxan	FID	[98]
100 % dimethylpolysiloxan	MS	[99]
polyethylenglykol	MS-QQQ	[100]

## 2.5 Sulfonamidy a deriváty thiazolu

Termín *sulfonamid* se vztahuje na deriváty *p*-aminobenzensulfonamidu (sulfanilamidu) [101]. Základem jeho struktury je aminobenzen a v *para* poloze má navázanou sulfonylovou skupinu s připojenou substituovanou aminoskupinou (S-N vazba). Tato sulfonamidová funkční skupina obecně není výrazně reaktivní. Vazbu mezi dusíkem a sírou v této funkční skupině by mělo být relativně obtížné štěpit. Obecná struktura sulfonamidové skupiny spolu s příklady některých různě substituovaných sulfonamidů je znázorněna na obr. 2.13.



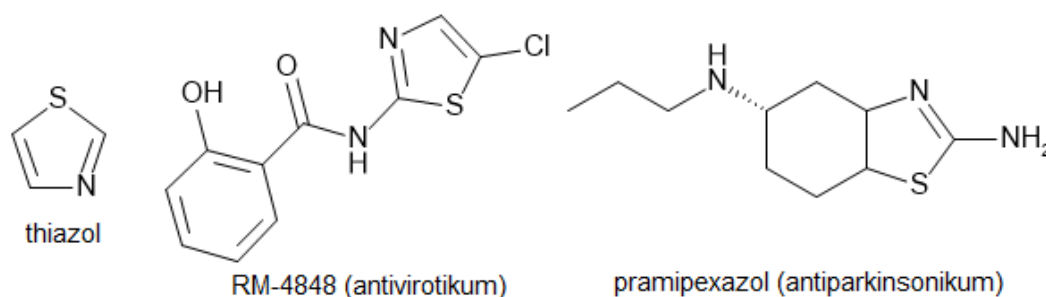
Obr. 2.13: Struktura sulfonamidové funkční skupiny, příklady různě substituovaných sulfonamidů.

Sulfonamidy představují poměrně velkou skupinu antibiotik s mnoha využitími v klinické praxi. Jsou to první účinné antibiotika zavedené v klinické medicíně a používají se již od 30. let 20. století [102]. Využívají se i ve veterinárním lékařství. Považují se za bakteriostatika a jejich účinek tkví v inhibici bakteriální biosyntézy tetrahydrolistové kyseliny [101, 102]. Sulfonamidy vykazují antimikrobiální aktivitu proti gram pozitivním i gram negativním mikroorganismům [102, 103].

V dnešní době se sulfonamidy používají omezeně, protože si některé bakterie postupně vybudovaly imunitu vůči těmto sloučeninám a také byly objeveny a zavedeny obecně účinnější třídy antibiotik [102]. Navzdory tomuto mají sulfonamidy široké použití i dnes, zejména při léčbě infekcí močových cest a léčbě a prevenci parazitických (zejména malariálních) infekcí, běžně v kombinaci s trimethoprimem nebo pyrimethaminem. Sulfabipyridin se nachází v chemické struktuře sulfasalazinu, který se často používá k léčbě zánětlivých onemocnění střev. Kombinace sulfadoxinu a pyrimethaminu se používá jako profylaxe proti malárii rezistentní vůči chlorochinu.

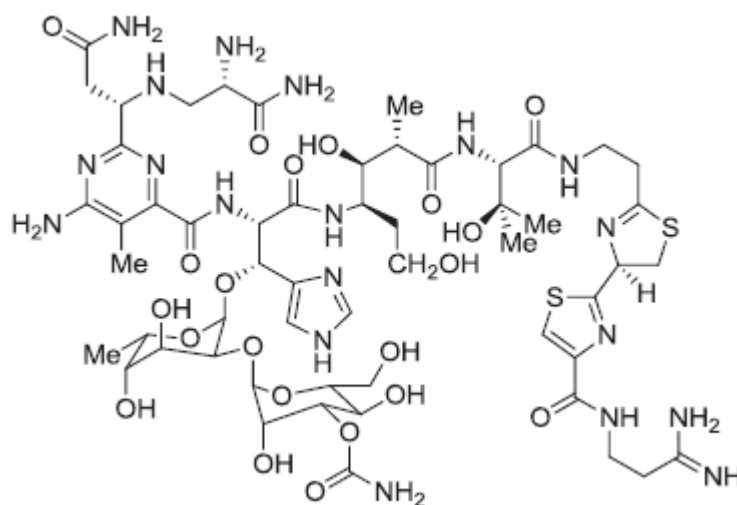
Sulfonamidy mohou být toxické a charakteristická pro celou tuto třídu sloučenin se zdá být hepatotoxicita spojená s řadou nežádoucích účinků. Za určitých podmínek mohou být také dermatotoxické (například v případě mastí) a výsledkem může být fototoxická nebo fotoalergická reakce [104].

Heterocykly jsou součástí mnoha přírodních i syntetických organických sloučenin spojených s nějakým druhem biologické aktivity [105]. Thiazol je heterocyklická sloučenina obsahující síru a dusík. Jeho struktura je znázorněna na obr. 2.14 spolu se dvěma příklady jeho derivátů. Thiazol je součástí struktury mnoha biologicky aktivních přírodních i syntetických látek a má důležité místo v medicíně. Suchozemské i mořské mikroorganismy jsou dobrým zdrojem thiazolu a benzothiazolu. Oba jsou sekundárními metabolity polyketidů.



Obr. 2.14: Struktura thiazolu a příklady jeho derivátů, léčivých látek.

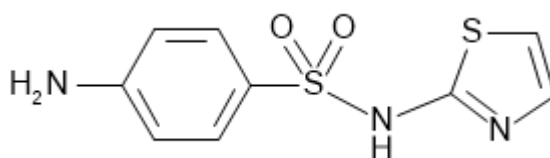
Thiazol a jeho deriváty jsou hojně využívány, protože vykazují téměř všechny druhy biologické a farmakologické aktivity jako jsou antibakteriální, antiprotozoální, antimalariální nebo protinádorová aktivita (bleomyciny a jejich analogy mají ve své struktuře zabudovaných i více molekul thiazolu, například zorbamycin, obr. 2.15), léčba alergií, genově modifikační aktivity. Používají se také jako antischizofrenika, antihypertenziva, a proti infekci HIV. Některé mají protizánětlivé účinky a existuje mnoho dalších aktivit spojených s deriváty thiazolu.



Obr. 2.15: Struktura zorbamycinu. Převzato a upraveno z [105].

## 2.5.1 Sulfathiazol

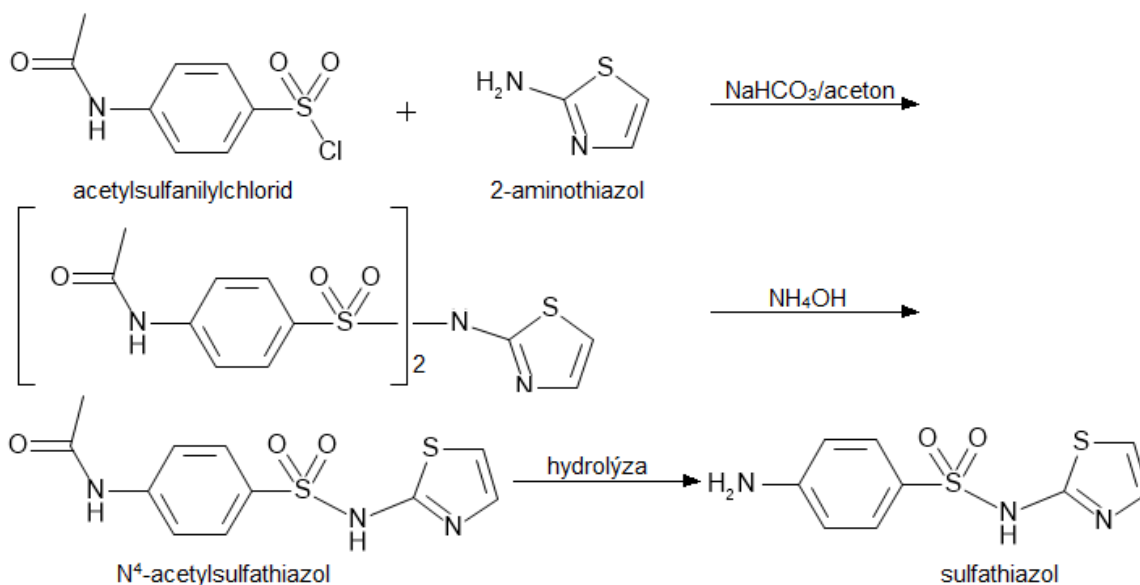
*Charakteristika.* Sulfathiazol je antibiotikum s krátkodobými účinky a patří mezi sulfonamidy a zároveň deriváty thiazolu [41, 106]. Používá se také ve formě sodné soli, která je obecně rozpustnější. Struktura sulfathiazolu je znázorněna na obr. 2.16. Jeho systematický název je 4-amino-*N*-(1,3-thiazol-2-yl)-benzensulfonamid, CASN 72-14-0 a 144-74-1 (sodná sůl). Sumární vzorec sulfathiazolu je  $C_9H_9N_3O_2S_2$  a relativní molekulová hmotnost 255,31.



Obr. 2.16: Struktura sulfathiazolu.

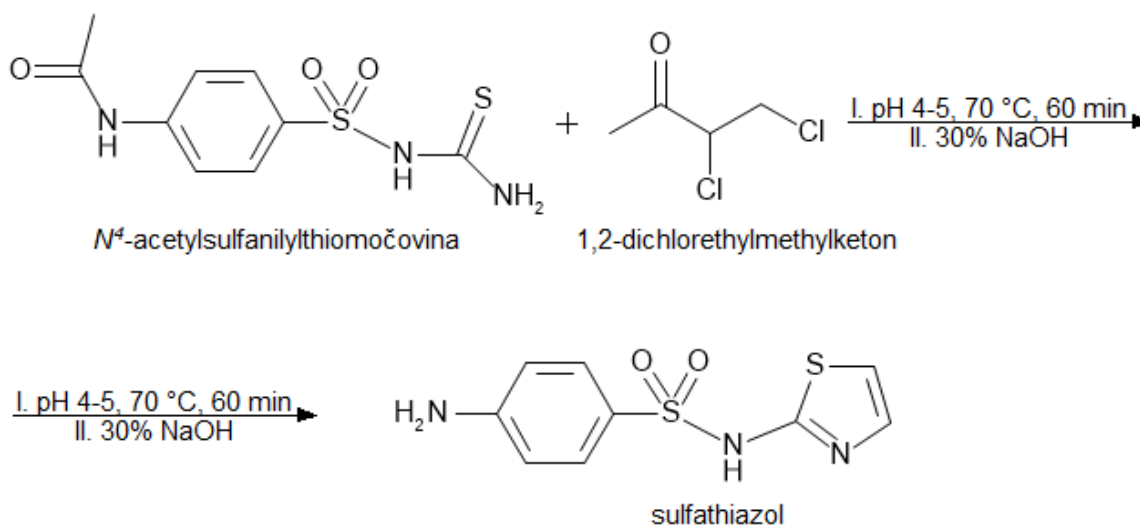
*Fyzikální a chemické vlastnosti.* Za normálních podmínek je sulfathiazol bílý krystalický prášek bez zápachu. Je velmi málo rozpustný ve vodě, málo rozpustný v ethanolu a dimethylsulfoxidu a prakticky nerozpustný v chloroformu a etheru. Rozpouští se v acetonu, minerálních kyselinách a vodných roztocích hydroxidů nebo uhličitánů. Nevykazuje optickou aktivitu, protože nemá žádné chirální centrum.

*Syntéza.* Sulfathiazol lze syntetizovat podle více postupů [106]. Prvním krokem při syntéze sulfathiazolu je reakce acetylsulfanilylchloridu s 2-aminothiazolem za vzniku *N*-acetylsulfathiazolu. Po deacetylaci hydrolyzou vzniká sulfathiazol. Schéma reakce je znázorněno na obr. 2.17.



Obr. 2.17: Syntéza sulfathiazolu z acetylsulfanilylchloridu a 2-aminothiazolu. Převzato a upraveno z [106].

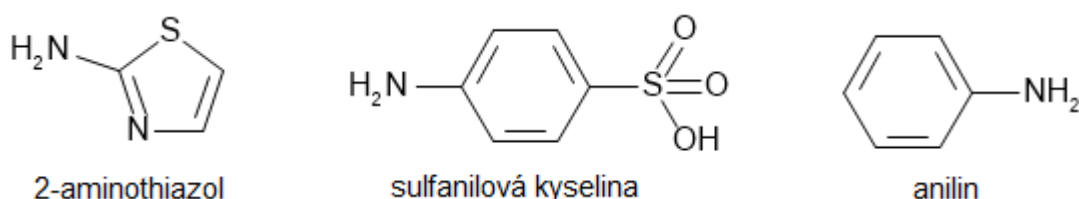
Alternativou může být syntéza kondenzací  $N^4$ -acetylsulfanilylthiomočoviny s 1,2-dichlorethylmethylketonem. Následnou hydrolyzou vzniká sulfathiazol. Schéma reakce je znázorněno na obr. 2.18. Sulfathiazol byl připraven také reakcí karbomethoxy-sulfanilylchloridu s kyanamidem vápenatým za vzniku methoxysulfanilylkyanamidu. Jeho reakcí s thiosíranem sodným vzniká karbomethoxysulfanilylthiomočovina. Ta kondenzuje s chloracetaldehydem a po reakci s hydroxidem sodným vzniká sulfathiazol.



Obr. 2.18: Syntéza sulfathiazolu z  $N^4$ -acetylsulfanilylthiomočoviny z 1,2-dichlorethylmethylketonu. Převzato a upraveno z [106].

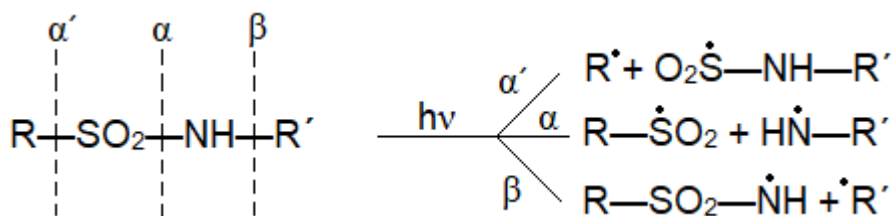
*Stabilita, degradace.* Sulfathiazol byl podroben několika degradačním studiím a byly nalezeny degradační produkty. Bylo zjištěno, že podléhá hydrolyze v kyselém

prostředí při zvýšené teplotě (testováno ve zředěné kyselině chlorovodíkové o různých koncentracích). Reakce se řídí kinetikou pseudoprvního řádu. Degradální produkty hydrolýzy byly pomocí chromatografických a spektrometrických technik identifikovány jako 2-aminothiazol a sulfanilová kyselina [107]. Jejich struktury jsou znázorněny na obr. 2.19.



Obr. 2.19: Struktury degradačních produktů kyselé hydrolýzy sulfathiazolu.

Sulfathiazol se používal spolu s dalšími sulfonamidy ve formě mastí. Ukázalo se, že sulfonamidy obecně i sulfathiazol mohou mít vedlejší účinky (reakce s kůží), spojené s fotodegradací těchto látek [104]. V literatuře byla prostudována stabilita sulfonamidů, včetně sulfathiazolu, při vystavení UV záření. Při interakci sulfonamidů s UV zářením vznikají radikály. Ke štěpení chemické vazby může dojít ve třech místech. Tato místa a vznikající příslušné radikály jsou znázorněny na obr. 2.20.



Obr. 2.20: Štěpení vazeb sulfonamidů příslušné radikály. Převzato a upraveno z [104].

Byly popsány i mechanismy vzniku některých degradačních produktů. Sulfathiazol v methanolovém roztoku byl podrobený degradaci zářením s vlnovou délkou 254 nm (32 hod) a 320 nm (172 hod). Identifikovány byly pouze dva degradační produkty, a to anilin a 2-aminothiazol (stopové množství). Identifikace těchto degradačních produktů naznačuje, že ke štěpení chemické vazby UV zářením dochází pravděpodobně v místech  $\alpha'$  a  $\alpha$  (obr. 2.20). Struktura 2-aminothiazolu a anilinu je znázorněna na obr. 2.19.

Sodná sůl sulfathiazolu postupně tmavne při vystavení dennímu světlu [106]. Při vystavení vlhkému vzduchu pohlcuje oxid uhličitý a stává se ve vodě neúplně

rozpustnou. Bylo zjištěno, že roztok močové kyseliny v glycerinu zvýšil fotostabilitu sodné soli sulfathiazolu v roztocích. Fotoprotektivní účinek roste s koncentrací močové kyseliny v roztoku. Močová kyselina vykazovala fotoprotektivní účinek i za přítomnosti siřičitanu sodného nebo EDTA.

Termální stabilita sulfonamidů obecně je podle literatury velmi dobrá [108]. Sulfathiazol byl spolu s dalšími sulfonamidy podroben degradaci při teplotách 60 až 100 °C po dobu 0 až 180 min. Významný vliv měla doba zahřívání roztoků.

*Farmakologie.* Sulfathiazol inhibuje syntézu tetrahydrolistové kyseliny [101]. Ta je prekurzorem při syntéze purinových bazí a thymidinu, složek DNA a RNA, nezbytných pro buněčný růst a rozmnožování. Sulfonamidy jsou účinné pouze proti mikroorganismům, které si syntetizují vlastní listovou kyselinu. V případě člověka a zvířat se listová kyselina získává ze stravy. Běžně se sulfathiazol používal ve formě mastí, například k léčbě hnisavých kožních infekcí vyvolaných pyogenními koky [109]. Příkladem může být léčba měkkého vředu [110]. Podávat ho lze i orálně. U senzitivních pacientů však může vyvolávat vedlejší účinky jak při aplikaci na kůži, tak při interní aplikaci [111]. Mezi toxické projevy patří dermatitida, nevolnost a zvracení, retence dusíkatých látek a oligurie, hematurie, horečka, pálení a svědění očí, a anémie. Z kůže může být částečně absorbován do krve. Sulfathiazol lze použít také k léčbě subakutní a chronické osteomyelitidy [112].

*Analytické metody pro stanovení sulfathiazolu.* Sulfonamidy jsou sloučeniny známé relativně dlouhou dobu, a proto existuje v literatuře více metod pro jejich stanovení v různých matricích, žádná však není univerzální [101]. Obecně patří sulfonamidy mezi polární a netěkavé látky, rozpustné v různých rozpouštědlech, proto lze k jejich separaci a stanovení použít kapalinovou chromatografii. Většinou se používají nepolární stacionární fáze. Mobilní fáze většinou obsahují acetonitril nebo methanol a vodu nebo pufr, případně roztok mravenčí kyseliny nebo některých jiných aditiv. Jako detektory se používají hlavně hmotnostní spektrometr, spektrometrické detektory (DAD, UV-VIS) a fluorescenční detektor.

Příkladem může být metoda [101] využívající stacionární fázi C18 a izokratickou eluci mobilní fáze složené z acetonitrilu a 0,2% mravenčí kyseliny v poměru 20/80 (v/v). Průtok mobilní fáze byl  $1,0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ . UV-detekce probíhala pomocí duálního spektrofotometrického detektoru při vlnových délkách 260 nm a 280 nm. Celková doba analýzy byla 4,5 min.



V literatuře jsou popsány i metody pro stanovení sulfathiazolu v matricích jako je med [113–115] nebo mléko [108, 116]. Například sulfathiazol, oxytetracyklin a tetracyklin se povedlo separovat a kvantifikovat ve vzorcích medu pomocí micelární RP-HPLC s fotometrickou detekcí [114]. Mez detekce pro sulfathiazol byla  $0,9 \mu\text{g g}^{-1}$ . V případě LC/MS-MS stanovení [115] byla mez detekce 0,5 až 10 ppb pro různá antibiotika (1 ppb pro sulfathiazol). Metoda zahrnovala i hydrolyzu, kvůli sulfonamidům vázaným na sacharidy. Na vzorcích mléka byla zkoumána i termální stabilita sulfonamidů obecně (efekt pasterizace), kde byla zjištěna dobrá teplotní stabilita sulfonamidů. Sulfonamidy i degradační produkty byly detegovány metodou LC-MS/MS. Metody kapalinové chromatografie jsou blíže specifikovány v tab. 2.6.

**Tabulka 2.6**

Bližší specifikace metod kapalinové chromatografie pro stanovení sulfathiazolu.

stacionární fáze	mobilní fáze	eluce	detekce	Ref.
C18	0,1 % HCOOH v H <sub>2</sub> O / CH <sub>3</sub> CN	gradientová	MS-QQQ	[108]
C18	2 % CH <sub>3</sub> COOH v H <sub>2</sub> O / CH <sub>3</sub> CN	izokratická	FLD	[113]
C18	H <sub>2</sub> O / (COOH) <sub>2</sub> , SDS v CH <sub>3</sub> CN	izokratická	DAD	[114]
C18	5% CH <sub>3</sub> CN, 3% HCOOH / 3 % HCOOH	izokratická	MS-QQQ	[115]
C18	H <sub>2</sub> O / CH <sub>3</sub> CN	izokratická	UV	[116]

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Analyzované vzorky

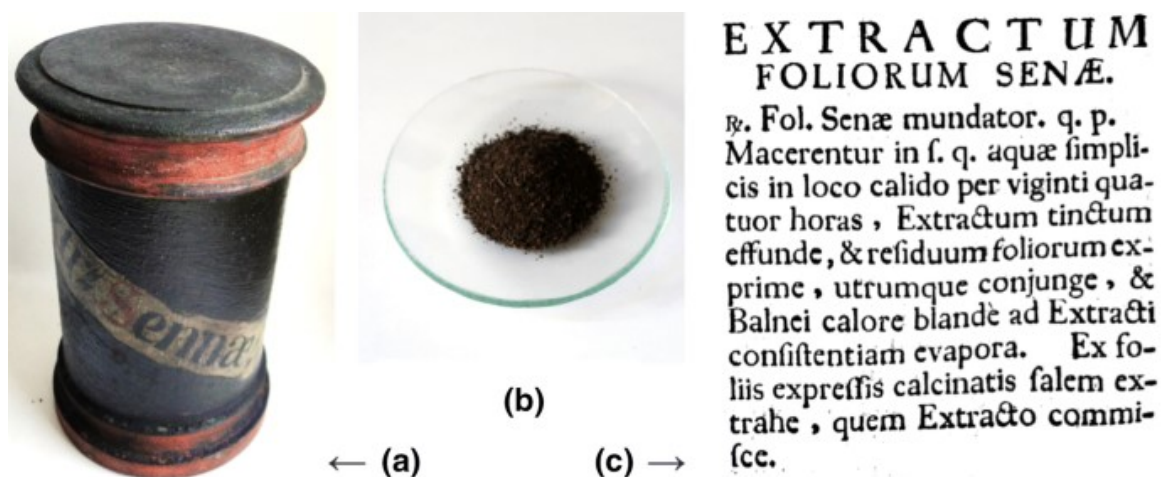
Vzorky historických léčivých přípravků, analyzovaných v této práci, pochází ze sbírky Národního muzea (vzorek extraktu ze senny), Katedry analytické chemie PřF UK (mast „Naso-Merfen“) nebo Českého farmaceutického muzea (mast „Sulfathiazol“).

#### 3.1.1 Analyzovaný vzorek extraktu ze senny

Extrakce je jednou z nejstarších metod přípravy léků [117]. Název pochází z latinského slova „extrahere“ (vytáhnout). Je založena na separaci farmakologicky aktivních sloučenin obsažených v rostlinných a živočišných tkáních od pevného materiálu, použitím selektivních rozpouštědel. Extrakce hrála také zásadní roli při izolaci a objevech různých farmakologicky aktivních sloučenin v 19. století, například morfinu z máku setého (*Papaver somniferum*), alkaloidu kolchicinu ze šafranu, nebo salicylové kyseliny z kůry bílé vrby. Přístup k čistým alkaloidům a glykosidům navíc znamenal, že dávkování farmakologických aktivních složek začalo být přesnější a bezpečnější. Do dneška extrakce zůstává důležitou metodou používanou k přípravě léčiv v průmyslu i v domácnosti (příprava odvarů z bylinek). Zatím byly v literatuře popsány pouze analýzy pozůstatků historických alkoholových extraktů.

Extrakt ze senny z kapucínské barokní lékárny v Hradčanech se zachoval z 18. století. Tato lékárna byla založena v roce 1680 a od konce 18. století zůstala v téměř neporušeném stavu i s uchovanými pozůstatky léčivých přípravků [118]. Na obr. 3.1 lze vidět barokní lékovku s extraktem, vzhled odebraného reprezentativního vzorku extraktu a také původní postup používán k extrakci listů senny. Podle lékopisů používaných dobovými lékárníky, konkrétně *Dispensatorium pharmaceuticum Austriaco-Viennense* (Vídeňský lékopis vydán v roce 1729, cit. [119]) a *Dispensatorium medico-pharmaceuticum Pragense* (Pražský lékopis vydán v roce 1739, cit. [120]), se extrakt ze

senny připravoval máčením vhodného množství čistých listů senny v čisté vodě po dobu 24 hodin a v chladu. Barevná tekutina byla dekantována, listy byly vymačkány, obě části extraktu byly spojeny a odpařeny při nízké teplotě. K odparku byl přidán i popel, který vznikl při spálení použitých listů.



Obr. 3.1: a) barokní lékovka, ve které je uchován extrakt ze senny (Národní muzeum, inventární číslo H2-4653), b) ukázka reprezentativního vzorku obsahu lékovky, c) původní postup přípravy *Extractum foliorum sennæ* (Extrakt z listů senny) z *Dispensatorium medico-pharmaceuticum Pragense* [120].

### 3.1.2 Analyzovaný vzorek masti „Naso-Merfen“

Mast „Naso-Merfen“ byla vyrobena firmou České chemické závody, Pardubice-Rybitví v roce 1946. Uchována byla v bílé plastové nádobce. Účinnými látkami byly efedrin a menthol. Mast má výrobcem deklarovaný obsah síranu efedrinu 0,1 gramu na 10 gramů výrobku (1 % hm.), co činí asi 0,386 % hm. čistého efedrinu. Deklarovaný obsah mentholu je 0,05 gramu na 10 gramů výrobku (0,5 % hm.). Mast obsahuje také fenylyhydrargyrium borát (dezinfekční účinky), 0,0025 gramu na 10 gramů výrobku (0,025 % hm.). Jako masťový základ byla použita bílá vazelína. Krabička, na které je deklarované složení masti je na obr. 3.2, spolu s plastovou nádobkou, ve které je mast uchována a skleněnou tyčinkou k aplikaci.



Obr. 3.2: Krabička, plastová nádobka s mastí „Naso-Merfen“ a skleněná tyčinka k aplikaci.

### 3.1.3 Analyzovaný vzorek masti „Sulfathiazol“.

Mast „Sulfathiazol“ byla vyrobena Spojenými farmaceutickými závody (SPOFA) v roce 1979. Deklarovaný obsah sulfathiazolu v masti je 5 % hm. Krabička a tuba, ve které je mast uchována je znázorněna na obr. 3.3.



Obr. 3.3: Krabička a tuba, ve které je uchována mast „Sulfathiazol“.

## 3.2 Použité chemikálie

Pro optimalizaci separace a kvantifikaci účinných látek v historických vzorcích byly použity standardy: efedrin hydrochlorid (sbírka Katedry analytické chemie, PŘF UK), fenylyhydrargyrium borát (Sigma-Aldrich), chlorid rtuťnatý (Sigma-Aldrich), L-menthol (> 99 %, Sigma-Aldrich), sennosid A a sennosid B (analytical standard, Sigma-Aldrich), sulfathiazol ( $\geq 98$  %, Sigma-Aldrich).

Jako referenční standard senny byl použit čaj „Sennae Folium“ v nálevových sáčcích firmy Megafyt Pgarma (ČR), zakoupený v lékárně.

Další používané chemikálie byly analytické čistoty: aceton (Lach-ner), acetonitril (HPLC Supra-Gradient, Biosolve), amoniak 28 % (Lach-ner), dichroman draselný (Lachema), ethanol 99 % (Merck), kyselina dusičná 65 % (Analytika), kyselina chlorovodíková 36 % (Centralchem), methanol (HPLC gradient grade, Supelco), 2-merkptoethanol 99 % (Sigma-Aldrich), mravenčan amonný (Lach-ner), mravenčí kyselina 98 % (Lach-ner), octan amonný (Lach-ner), octová kyselina 99 % (Lach-ner).

## 3.3 Použité přístroje

Při přípravě vodných složek mobilních fází byl používán pH-metr 3510 Jenway s kombinovanou elektrodou HC 103 (Theta 90, ČR). Ke kalibraci elektrody byla používána tříbodová kalibrace se standardními pufrů pH = 4,00, 7,00 a 10,00. Pro podpoření rozpouštění standardů a při extrakci účinných látek z historických vzorků byla používána ultrazvuková lázeň Sonorex RK 100 (Bandelin Electronic, Německo). K centrifugaci při extrakci byla používána centrifuga MiniSpin Plus (Eppendorf, Německo). Pro odpaření kapalně fáze byl používán koncentrátor DNA miVac (Genevac). K filtraci roztoků po extrakci byly používány stříkačkové filtry s velikostí pórů 0,45  $\mu\text{m}$  a 0,20  $\mu\text{m}$  (Whatman).

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí byla realizována na přístroji UHPLC Nexera XR (Shimadzu, Japonsko) s DAD. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí s vysokým rozlišením byla měřena na chromatografu Agilent 1200 HPLC System (Agilent, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Bruker Qq-TOF compact, řízeným softwarem Compass otofControl 4.0 (obojí Bruker Daltonics, Německo), s ESI ionizací. Vysokoúčinná kapalinová

chromatografie s hmotnostní detekcí s nízkým rozlišením byla měřena na přístroji Agilent 6460 (Agilent Technologies) s trojitým kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem a ESI ionizací. Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí byla realizována na přístroji GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu) s kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem a EI ionizací. Atomová absorpční spektrometrie byla realizována na přístroji ContrAA 700 (Analytik Jena, Německo).

## 3.4 Postupy přípravy vzorků a podmínky měření

### 3.4.1 Analýza extraktu ze senny

Do zkumavky bylo přesně naváženo asi 200 mg homogenizovaného vzorku. Následně bylo přidáno 5 cm<sup>3</sup> 70% methanolu a zkumavka byla umístěna do ultrazvukové lázně na 20 min. Po centrifugaci (10 min při 500 rpm) byla kapalná fáze odebrána a k pevné fázi bylo přidáno 2 cm<sup>3</sup> 70% methanolu. Zkumavka byla na 5 min umístěna do ultrazvukové lázně a po centrifugaci byla kapalná fáze znovu odebrána. Tento krok byl ještě jednou zopakován. Tři získané extrakty byly odebrány do odměrné baňky a doplněny 70% methanolem na objem 10 cm<sup>3</sup>. Výtěžnost extrakce, vyjádřena jako výtěžnost sennosidu A, byla 95,2±5,9 %.

Extrakt byl analyzován metodou RP-HPLC s UV detekcí při vlnové délce 254 nm, měřené pomocí DAD. Separace probíhala na koloně XBridge<sup>®</sup> BEH C18 (150×3 mm; 2,5 μm; Waters) při konstantní teplotě 40 °C. Analýza probíhala binární gradientovou elucí za použití methanolu (složka mobilní fáze A) a 0,2% octové kyseliny (složka mobilní fáze B). Použitý gradientový program je uveden v tab. 3.1. Průtok mobilní fáze byl 0,2 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> a celková doba analýzy byla 25 min. Nastříkovaný objem vzorku byl 3 mm<sup>3</sup>.

**Tabulka 3.1**

Gradientový program použitý při analýze extraktu ze senny.

<i>t</i> / min	0	17,5	18	20	20,5	25
% A	25	65	80	80	25	25

Při hmotnostní detekci s vysokým rozlišením byla použita ESI ionizace v negativním módu s napětím na kapiláře 2,7 kV. Jako zmlžovací plyn byl použit dusík

při tlaku 50 kPa. Dusík byl použit také jako sušící plyn při průtoku  $4,0 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$  a teplotě  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ . Rozsah skenu byl 50 až  $1000 \text{ m/z}$ . Pro kalibraci hmotnostního spektrometru byl jako standard použitý octan sodný. Pro kvantifikaci sennosidu A i B byly pomocí roztoků standardů změřeny kalibrační závislosti. Použita byla metoda kalibrační přímky. Sennosidy A a B nebyly však v historickém vzorku kvantifikovány, protože jejich koncentrace byla pod mezí detekce DAD i hmotnostního spektrometru.

### 3.4.2 Analýza vzorku masti „Naso-Merfen“

V masti „Naso-Merfen“ byl stanovován efedrin, menthol a fenylhydrargyrium borát. Vzorek masti byl proto analyzován několika různými metodami. Pro stanovení efedrinu a mentholu byly použity extrakty získané následujícím postupem: Bylo přesně naváženo asi 50 mg vzorku masti (vždy v triplikátech) do uzavíratelné průhledné plastové zkumavky o objemu  $1,5 \text{ cm}^3$ . K navážce masti bylo přidáno  $0,5 \text{ cm}^3$  acetonitrilu. Extrakce probíhala při konstantní teplotě  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 20 min (tříkrát protřepáno, vždy po době 5 min). Následně byl extrakt protřepán na minitřepače (5 min, 2000 rpm) a podroben centrifugaci (5 min, 10000 rpm). Kapalná fáze byla odebrána do uzavíratelné zkumavky o objemu  $1,5 \text{ cm}^3$ . K pevné fázi bylo opět přidáno  $0,5 \text{ cm}^3$  acetonitrilu a celý postup byl takto zopakován ještě dvakrát. Extrakty byly spojovány do jednoho a následně odpařeny do sucha v koncentrátoru DNA (80 min,  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ ). K pevné fázi bylo přidáno vždy  $1,50 \text{ cm}^3$  acetonitrilu. Rozpouštění bylo podpořeno ultrazvukovou lázní (30 min, při laboratorní teplotě). Takto připravený extrakt byl nastříkovan do HPLC systému.

Kvantifikace efedrinu probíhala metodou HILIC-UV, při vlnové délce 254 nm, měřené pomocí DAD. Separace probíhala na koloně XBridge<sup>®</sup> BEH Amide ( $150 \times 3 \text{ mm}$ ;  $2,5 \text{ } \mu\text{m}$ ; Waters) při konstantní teplotě  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , binární izokratickou elucí mobilní fáze pozůstávající z acetonitrilu (složka A) a  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$  mravenčanu amonného (složka B,  $\text{pH} = 3,00$  upraveno mravenčí kyselinou) v poměru 88/12 (v/v). Celkový průtok mobilní fáze byl  $0,4 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  a nastříkovaný objem vzorku činil  $1 \text{ mm}^3$ .

Při hmotnostní detekci byla použita ESI ionizace v pozitivním i negativním módu. Data byla měřena v rozsahu  $m/z = 50\text{--}1000$ . Teplota sušícího plynu  $200 \text{ }^\circ\text{C}$  při průtoku  $3,0 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ . Napětí na RSI kapiláře bylo 2,8 kV. K analýze získaných dat byl použit software Compass DataAnalysis 4.4 (Build 200.55.2969; Bruker Daltonics, Německo).

Kvantifikace mentholu byla realizována pomocí GC-MS. Separace probíhala na kapilární koloně Rxi-1301 Sil MS (délka 60 m;  $0,25 \text{ mm i.d.}$ ;  $0,25 \text{ } \mu\text{m}$  tloušťka filmu)

se silarylen-kyanidovou stacionární fází. Jako nosný plyn bylo použito helium (99,999 %). Objem nástřiku vzorků a standardů byl 0,5 mm<sup>3</sup> (split 1:20). Teplota injektoru byla 230 °C. Pro separaci byl použitý teplotní program: teplota byla zvýšena z počátečních 80 °C na 290 °C rychlostí 30 °C min<sup>-1</sup> a po dobu 5 min byla konstantní. Hmotnostní detekce s EI ionizací při energii 70 eV a teplotě iontového zdroje 200 °C probíhala v módu SIM, zaznamenávající charakteristické ionty mentholu s  $m/z = 71$ ; 81 a 95.

Pro stanovení fenyhydrargyrium borátu byl upraven postup extrakce rtuti podle literatury. Pro přípravu roztoků bylo do kádinek přesně váženo asi 150 mg vzorku masti. K navážce masti bylo přidáno 5 cm<sup>3</sup> směsi kyseliny chlorovodíkové, dusičné a vody v poměru 4/3/1 (v/v). Kádinky byly překryty hodinovým sklem a směs byla vařena 30 min na vodní lázni. Po ochlazení a filtraci byl přidán 2-merkapt ethanol tak, aby jeho výsledná koncentrace v baňce o objemu 25 cm<sup>3</sup> byla 0,1 % (v/v) a roztoky byly doplněny na objem 10 cm<sup>3</sup>. Roztoky byly dále ředěny odebráním 3,5 cm<sup>3</sup> do baňky o objemu 25 cm<sup>3</sup>. Dále byl přidán 1 cm<sup>3</sup> 5% roztoku dichromanu draselného a ledová octová kyselina tak, aby její výsledná koncentrace byla 0,02 mol dm<sup>-3</sup>. Hodnota pH roztoků byla upraveno na 4,00. Byl přidán ještě ethanol tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 40 % (v/v) a roztoky byly doplněny deionizovanou vodou do objemu 25 cm<sup>3</sup>.

Kvantifikace fenyhydrargyrium borátu byla realizována metodou UV-PCMVG-AAS. Jako fotochemický generátor byla použita UV-výbojka, okolo které byla ovinuta teflonová kapilára (1000×1 mm i.d., 2 mm o.d.) pro transport vzorku. Vzorek byl dávkován do proudu argonu pomocí šesticestného FIA ventilu a přiváděn do separátoru fází. Křemenná detekční cela s externím vyhříváním na 150 °C byla použita pro detekci rtuti při vlnové délce 253,6519 nm atomovým absorpčním spektrometrem. Pro měření kalibračních závislostí byl používán standard rtuťnatých iontů i fenyhydrargyrium borátu.

### **3.4.3 Analýza vzorku masti „Sulfathiazol“.**

Extrakce probíhala následujícím postupem: Přesně bylo naváženo asi 50 mg vzorku masti „Sulfathiazol“ do odměrné baňky o objemu 25 cm<sup>3</sup>. Následně bylo přidáno 15 cm<sup>3</sup> acetonu. Extrakce sulfathiazolu do acetonu byla podpořena ultrazvukovou lázní (30 min při laboratorní teplotě). Po extrakci v ultrazvukové lázni byl roztok doplněn acetonem na objem 25 cm<sup>3</sup>. Roztok byl promíchán a jeho část byla následně odebrána



a přefiltrována. Takto připravený extrakt byl nastříkovan do HPLC systému. Extrakce byla provedena vždy v triplikátech.

Extrakt byl podroben analýze metodou RP-HPLC s UV detekcí při vlnové délce 280 nm, měřenou pomocí DAD. Separace probíhala na koloně Kinetex 2,6  $\mu\text{m}$  Phenyl-Hexyl (100 $\times$ 3 mm) binární izokratickou elucí za použití methanolu (složka mobilní fáze A) a 0,01 mol dm<sup>-3</sup> octanu amonného o pH = 7,20 (složka B, pH upraveno vodným roztokem amoniaku) v poměru 20/80 (v/v). Během analýzy byla udržována konstantní teplota 30 °C. Průtok mobilní fáze byl nastavený na 0,5 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>. Nastříkovaný objem vzorku byl 1 mm<sup>3</sup>. Každý ze třech replikátů historického vzorku byl měřen třikrát. Pro kvantifikaci sulfathiazolu byla pomocí roztoků standardu v acetonu změřena kalibrační závislost. Použita byla metoda kalibrační přímky. Sulfathiazol vykazoval dostatečně velkou odezvu pro kvantifikaci metodou HPLC-UV.

Při hmotnostní detekci byla použita ESI ionizace v pozitivním i negativním módu. Data byla měřena v rozsahu  $m/z = 50\text{--}1000$ . Teplota sušícího plynu 200 °C při průtoku 3.0 dm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>. Napětí na RSI kapiláře bylo 2,8 kV. K analýze získaných dat byl použit software Compass DataAnalysis 4.4 (Build 200.55.2969; Bruker Daltonics, Německo).

### 3.5 Zpracování dat

Získaná data byla zpracována statistickými postupy korespondujícími s hladinou významnosti  $\alpha = 0,05$ . Pro nalezení případných odlehlých výsledků byl vždy prováděn Deanův-Dixonův test na odlehlost. Konečný výsledek byl vyjadřován jako medián, opatřený intervalem spolehlivosti. Grafy a rovnice kalibračních závislostí byly vytvořeny pomocí programu OriginPro 6.0 (Microcal Software, USA). Výpočty byly prováděny v programu Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, USA).

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Analýza extraktu ze senny

#### 4.1.1 Optimalizace chromatografických podmínek

Pro optimalizaci separace sennosidů A a B i dalších sloučenin obsažených v senně byla vybrána a optimalizována metoda podle literatury [27]. Pro separaci byla vybrána kolona XBridge® BEH C18 (150×3 mm; 2,5 μm; Waters). Kolona byla temperována na 40 °C. Mobilní fáze obsahovala methanol (složka A) a 0,2% octovou kyselinu (složka B). Nastříkovaný objem vzorku byl 3 mm<sup>3</sup>. Sloučeniny senny byly detegovány při vlnové délce 254 nm, měřené pomocí DAD.

Optimalizace separace byla prováděna na referenčním vzorku čaje z listů senny (Megafyt Pharma), následně na historickém vzorku. Optimalizován byl poměr jednotlivých složek v mobilní fázi i obsah octové kyseliny ve složce B. Bylo vyzkoušeno několik gradientových programů a jako nejvhodnější byl zvolen program uvedený v tab. 3.1. Obsah octové kyseliny ve složce mobilní fáze B byl optimalizován v rozmezí 0,0 až 0,5 % (v/v) a jako nejvhodnější byl zvolen 0,2 % (v/v). Sennosid A a B se povedlo separovat s dostatečným rozlišením.

#### 4.1.2 Kalibrační závislosti

Pro sennosid A i B byla změřena kalibrační závislost. Měření probíhalo na kapalinovém chromatografu s hmotnostní detekcí. K sestavení kalibračních závislostí byly použity plochy píků s  $m/z = 861,1925$  a použita byla metoda kalibrační přímky. Po vynesení plochy píků jednotlivých standardů do grafu v závislosti na koncentraci, byla použita metoda lineární regrese. Popis rovnice přímky proložené souborem bodů, mez detekce, mez kvantifikace pro analyty a lineární dynamický rozsah detektoru shrnuje tab. 4.1.

**Tabulka 4.1**

Popis rovnic kalibračních přímk pro sennosid A a B, meze detekce, kvantifikace a lineární dynamický rozsah detektoru.

	Sennosid A	Sennosid B
Lineární dynamický rozsah [mg dm <sup>-3</sup> ]	5–40	5–40
Citlivost [10 <sup>6</sup> plocha mg dm <sup>-3</sup> ]	1,61 ± 0,17	1,09 ± 0,019
Úsek [10 <sup>6</sup> plocha]	6,5 ± 4,2	0,8 ± 0,4
<i>R</i>	0,9881	0,9997
<i>LOD</i> [mg dm <sup>-3</sup> ]	0,70	0,07
<i>LOQ</i> [mg dm <sup>-3</sup> ]	2,31	0,23

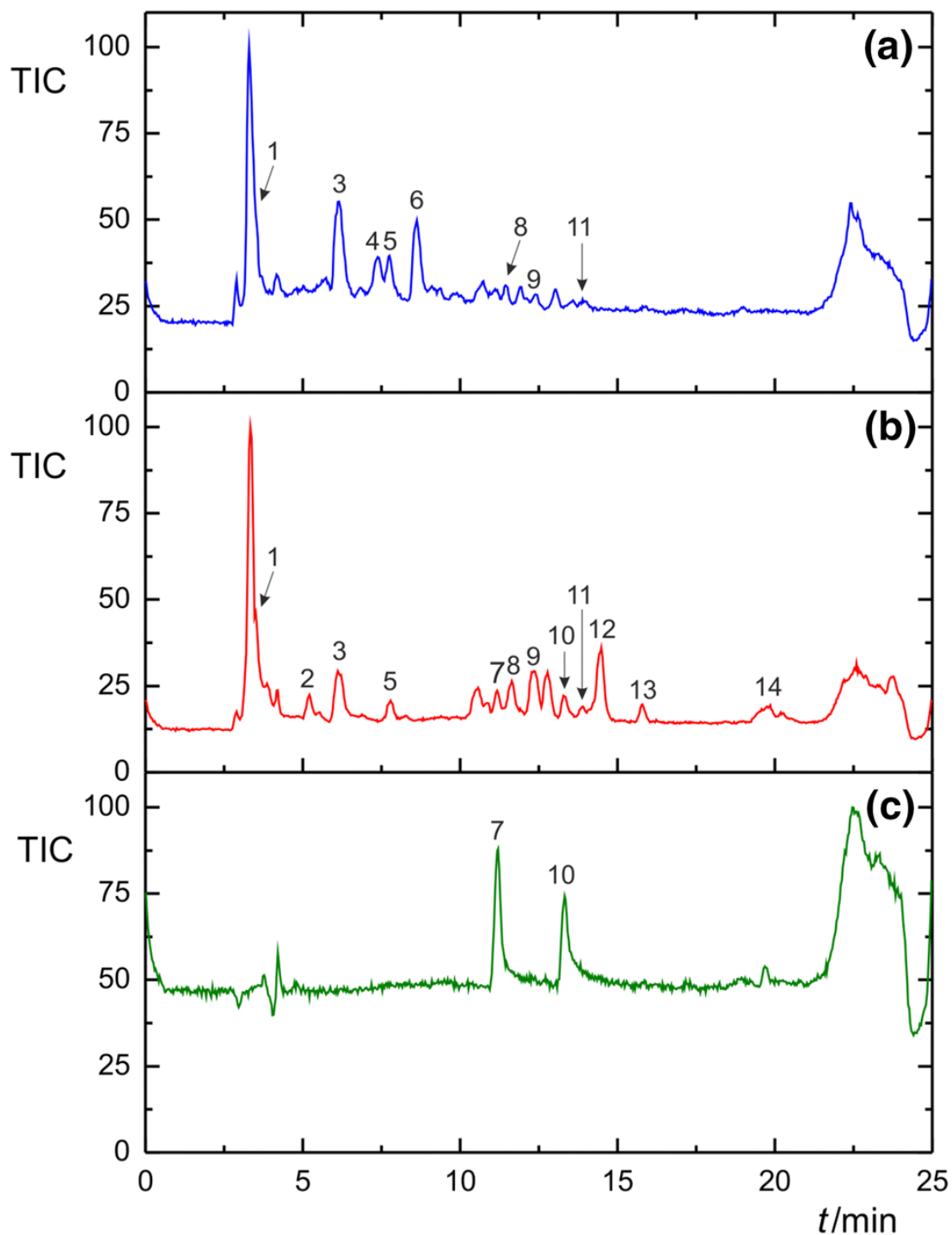
### 4.1.3 HPLC-MS analýza vzorku

Historický pozůstatek extraktu ze senny, referenční současný léčivý přípravek a směs analytických standardů sennosidu A a B byly analyzovány za použití optimalizovaného postupu extrakce a separace. Naměřené HPLC-MS chromatogramy jsou zobrazeny na obr. 4.1. Identifikace detegovaných sloučenin byla založena na porovnání dat získaných z tandemové hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením s daty uvedenými v literatuře. Získané výsledky poukazují na širokou škálu sloučenin přítomných ve vzorku historického pozůstatku extraktu ze senny. Ačkoli oba glykosidy s největším zastoupením v senně, sennosid A a sennosid B, nebyly ve vzorku detegovány, autenticita analyzovaného extraktu mohla být potvrzena na základě detekce jiných sloučenin typických pro sennu (tab. 4.2). Porovnáním chromatogramu analyzovaného historického vzorku a chromatogramu analyzovaného současného vzorku se povedlo objevit dva možné degradační produkty sennosidu A a B. Navzdory snaze se však nepovedlo zjistit jejich struktury. Jedná se o píky (4) a (6) na obr. 4.1, lze se pouze domnívat na základě literatury, že v případě píku (6) jde o epikatechin [121]. Dalším objeveným degradačním produktem obou sennosidů v historickém vzorku je rhein (pík (1), obr. 4.1), co je i v souladu s literaturou [20, 25]. Ačkoli se sennosid A i B v historickém vzorku rozpadly, je pozoruhodné, že některé glykosidy ve vzorku zůstaly stabilní více než 200 let po jeho přípravě.

**Tabulka 4.2**

Identifikované sloučeniny typické pro sennu, přítomnost v historickém a referenčním vzorku.

Pík	<i>m/z</i> [M-H] <sup>-</sup>	Identita	Přítomnost ve vzorku	
			historickém	referenčním
1	283,0252	rhein	Ano	Ano
2	285,0413	luteolin	Ne	Ano
3	479,0829	myricetin-3-O-glykosid	Ano	Ano
4	195,0873	neidentifikováno	Ano	Ne
5	593,1497	kaempferol-8-O-rhamnosid-O-hexosid	Ano	Ano
6	441,0837	neidentifikováno	Ano	Ne
7	861,1925	sennosid B	<LOD	Ano
8	463,0899	kvercetin-3-O-glykosid	Ano	Ano
9	609,1457	rutin	Ano	Ano
10	861,1925	sennosid A	<LOD	Ano
11	593,1497	kaempferol-3-O-rutinosid	Ano	Ano
12	447,0947	kvercetin-3-O-rhamnosid	Ne	Ano
12	393,1204	6-hydroxymusizin-glykosid	Ne	Ano
13	407,1357	tinnevellin-8-O-glykosid	Ne	Ano
14	285,0413	kaempferol	Ne	Ano



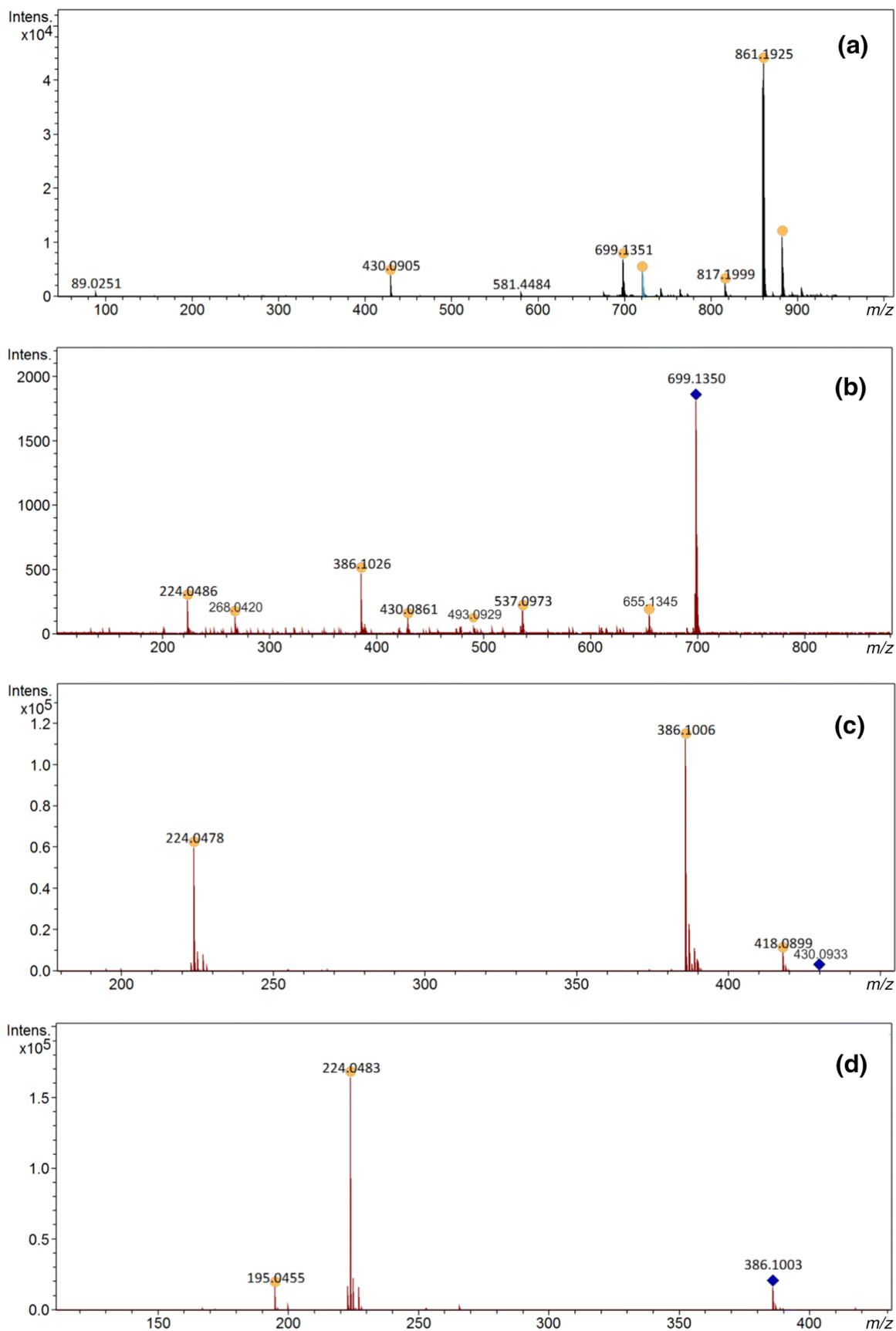
Obr. 4.1: HPLC-MS chromatogram a) historického vzorku extraktu ze senny, b) současného vzorku léčivého přípravku ze senny, c) směsi standardů sennosidu A a B. Separace proběhla na koloně XBridge® BEH C18 (150×3 mm; 2,5 μm; Waters) gradientovou elucí binární mobilní fáze (složka A mobilní fáze: methanol, složka B mobilní fáze: 0,2% octová kyselina) při průtoku mobilní fáze 0,2 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> a konstantní teplotě 40 °C.

#### 4.1.4 Hmotnostní spektrometrie sennosidu A a B

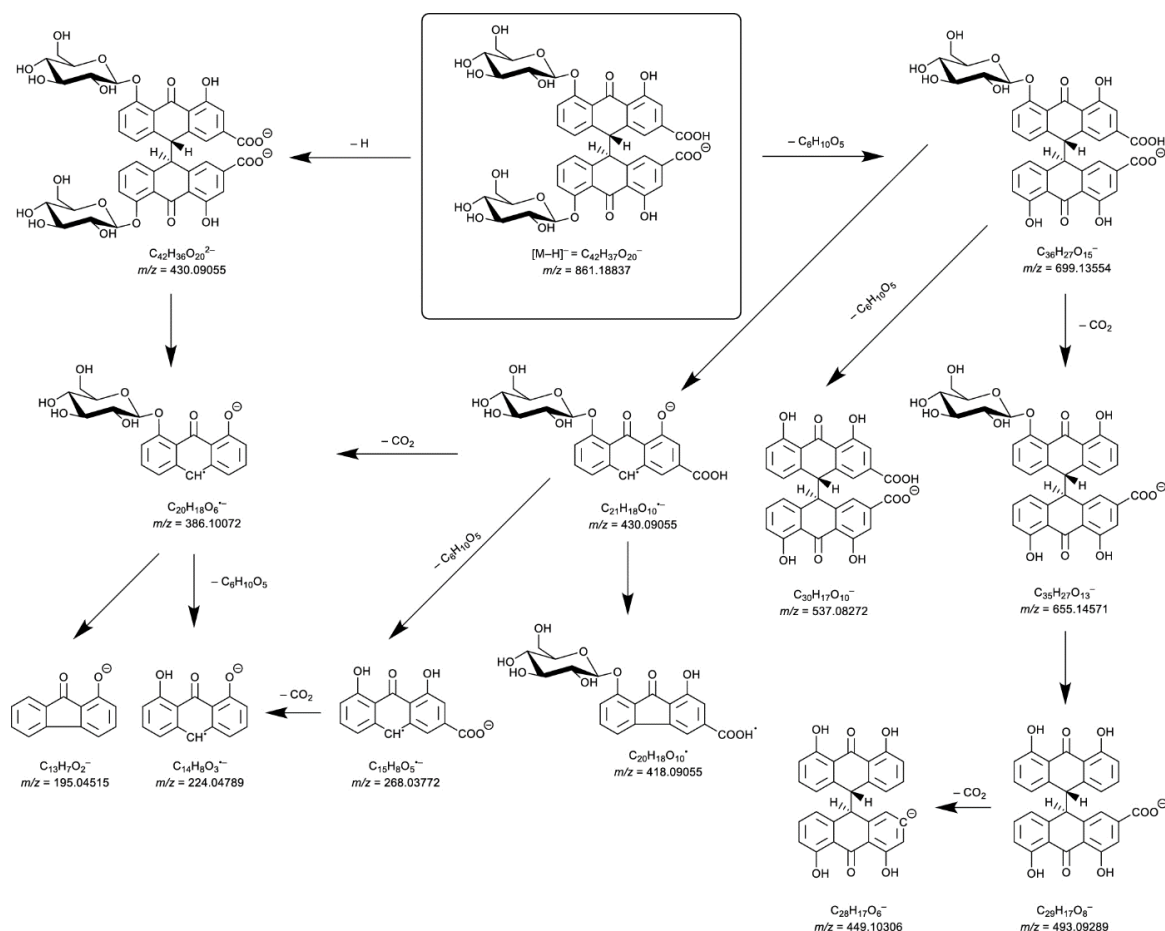
ESI<sup>-</sup>-MS<sup>n</sup> spektra sennosidu A a B byly detailně prostudovány s cílem obohatit již publikované informace v literatuře, protože fragmentace jejich hmotnostních spekter jsou v literatuře popsány málo a neúplně [122–124].

Výsledkem podobné struktury (isomerie) sennosidu A a B byly, podle očekávání, téměř totožné způsoby fragmentace v jejich hmotnostním spektru. Proto jsou na obr. 4.2 uvedena pouze ESI<sup>-</sup>-MS<sup>n</sup> spektra sennosidu A. Sennosid A i B poskytly charakteristický produktový iont s  $m/z = 699,1350$  (C<sub>36</sub>H<sub>27</sub>O<sub>15</sub>), který značí ztrátu glykosidové jednotky (165,023 Da). Podobně, fragment s  $m/z = 537,0973$  je aglykon sennosidů po ztrátě obou glykosidových jednotek [121].

Mechanismus ESI<sup>-</sup> fragmentace sennosidu A je popsán pomocí obr. 4.3. Protože ionty s  $m/z = 655,1345$ ; 493,0929; 418,0899 a 195,0455 nebyly v literatuře popsány, lze toto schéma považovat za detailnější rozšíření fragmentačního schémata.



Obr. 4.2: ESI<sup>-</sup> hmotnostní spektrum a) sennosidu A (mateřský iont  $[M-H]^-$  s  $m/z = 861,1925$ ; b) MS<sup>2</sup> spektrum iontu  $m/z = 699,1350$ ; c) MS<sup>2</sup> spektrum rodičovského iontu  $m/z = 430,0933$ ; d) MS<sup>3</sup> spektrum iontu  $m/z = 386,1003$ . Prekurzorový iont je označený modrým kosočtvercem.



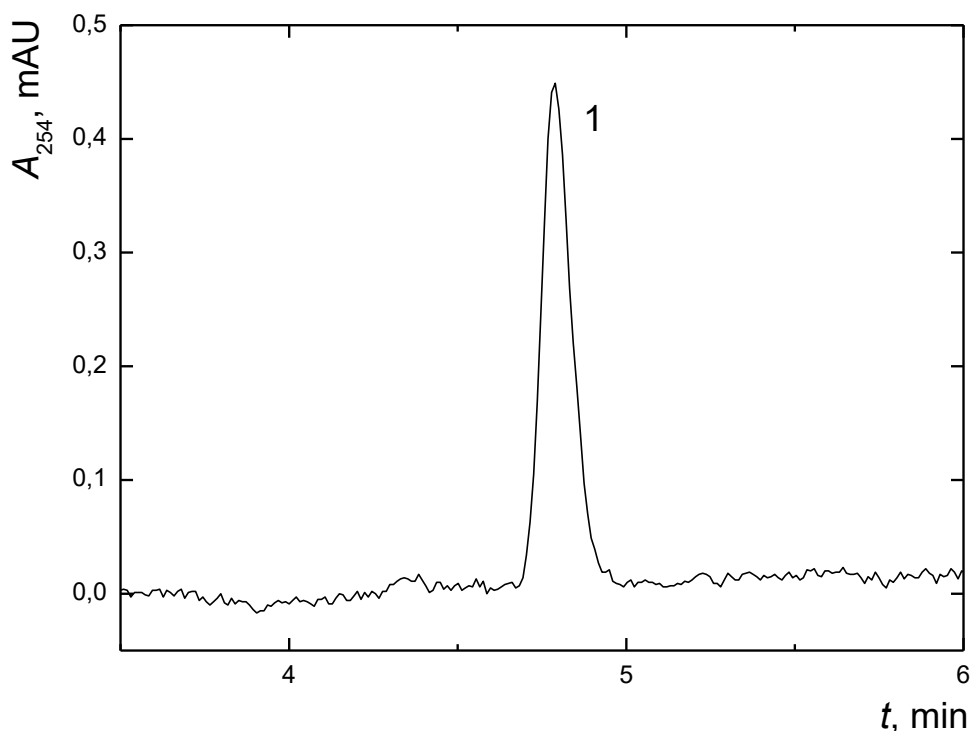
Obr. 4.3: Rozšířené schéma fragmentace sennosidu A.

## 4.2 Analýza masti „Naso-Merfen“

### 4.2.1 Optimalizace separace efedrinu pomocí HILIC-UV

Pro separaci efedrinu metodou HILIC-UV byla použita metoda podle literatury [125]. Pro separaci byla zvolena kolona XBridge® BEH Amide (150×3 mm; 2,5 μm; Waters) a izokratická eluce mobilní fáze obsahující acetonitril (složka A) a 5 mmol dm<sup>-3</sup> mravenčan amonný, pH = 3,00, (složka B) v poměru 88/12 (v/v). Separace probíhala při konstantní teplotě 30 °C a průtoku 0,4 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>. Nastříkaný objem vzorku byl 1 mm<sup>3</sup>. Vlnová délka detektoru byla nastavena na 254 nm. Celková délka jedné analýzy byla nastavena na 15 min. Ekvilibrace kolony před měřením byla vždy minimálně 20 min. Metoda nebyla dále optimalizována, protože efedrin eluoval v retenčním čase 4,85 min. Pozdější měření extraktu historického vzorku ukázaly, že efedrin se od ostatních látek povedlo separovat s dostatečným rozlišením. Na obr. 4.4 je zobrazen HILIC-UV chromatogram standardu efedrinu hydrochloridu o koncentraci 50 mg dm<sup>-3</sup>.

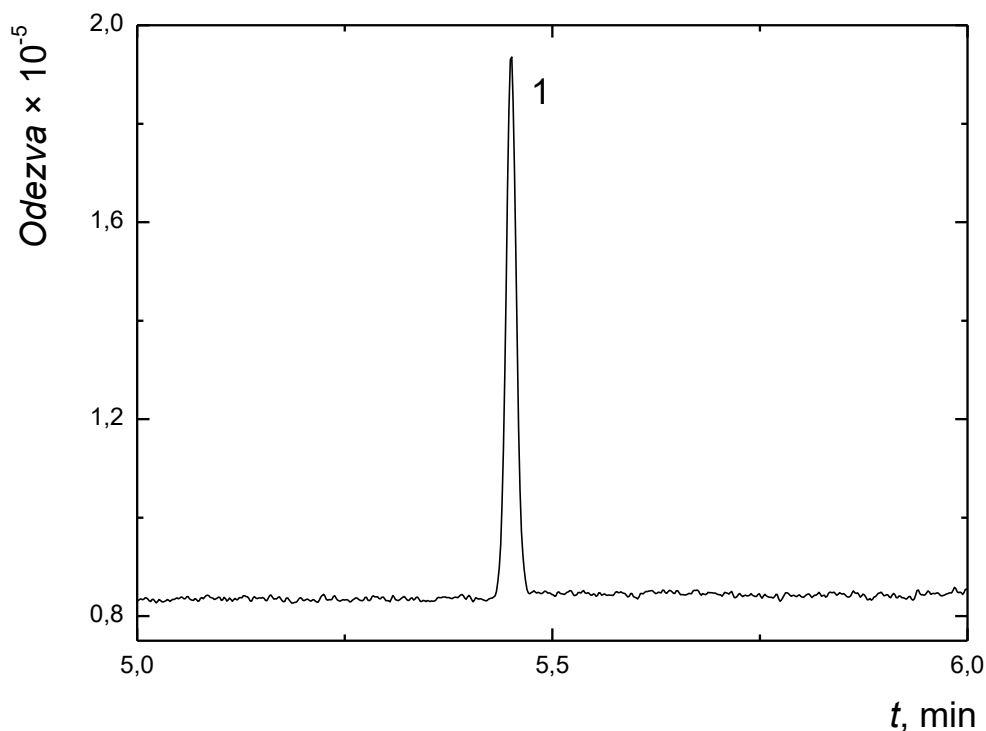




Obr. 4.4: HILIC-UV chromatogram standardu efedrinu hydrochloridu o koncentraci  $50 \text{ mg dm}^{-3}$ . Pík (1) efedrin. Separace proběhla na koloně XBridge® BEH Amide ( $150 \times 3 \text{ mm}$ ;  $2,5 \mu\text{m}$ ; Waters) izokratickou elucí binární mobilní fáze obsahující acetonitril (složka A) a  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$  mravenčan amonný,  $\text{pH} = 3,00$  (složka B), při vlnové délce detekce  $254 \text{ nm}$ , konstantní teplotě  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  a průtoku  $0,4 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ .

#### 4.2.2 Optimalizace separace mentholu pomocí GC-MS

Pro separaci a stanovení mentholu byla vyvinuta metoda plynové chromatografie. Počáteční měření probíhala metodou GC-FID, nebyla však dosažena dostatečná citlivost. Ukázalo se, že metoda GC-MS je dostatečně citlivá pro detekci a stanovení mentholu ve vzorku masti „Naso-Merfen.“ Optimalizován byl teplotní program a poměr splitu. Bylo změřeno hmotnostní spektrum mentholu. Citlivost detektoru byla zvýšena použitím módu SIM. Zaznamenávány byly charakteristické ionty mentholu s  $m/z = 71$ ;  $81$  a  $95$ . Zvolené nejvhodnější podmínky jsou uvedeny v kap. 3.4.2. GC-MS chromatogram standardu mentholu je zobrazen na obr. 4.5.



Obr. 4.5: GC-MS chromatogram standardu mentholu. Pík (1) menthol. Separace proběhla na koloně Rxi-1301 Sil MS (60 m × 0,25 mm i.d.; 0,25 μm tloušťka filmu) za použití helia jako nosného plynu. Teplota injektoru byla 230 °C. Hmotnostní detekce s EI ionizací byla měřena v módu SIM, při teplotě iontového zdroje 200 °C a energii 70 eV.

#### 4.2.3 Optimalizace extrakce

Konečný postup pro extrakci efedrinu ze vzorku masti, popsán v kapitole 3.4.2, byl optimalizován pouze změnou rozpouštědla pro rozpuštění pevné fáze po odpaření. Vyzkoušená rozpouštědla byla methanol, 5 mmol dm<sup>-3</sup> mravenčan amonný (pH = 3,00) a acetonitril. V prvních dvou případech mast i po centrifugaci tvořila pevnou vrstvu na povrchu a bez jejího narušení nebylo možné kapalnou fázi odebrat a docházelo by tak ke ztrátám při extrakci. Jako vhodné rozpouštědlo byl zvolený acetonitril, protože detektor při analýze extraktu metodou HILIC-UV vykazoval dostatečně velkou odezvu pro efedrin, a navíc bylo detegováno více látek než v případě extrakce do methanolu nebo mravenčanového pufru. Menthol byl extrahován spolu s efedrinem a v acetonitrilu je rozpustný velmi dobře. Účinnost extrakce efedrinu ze vzorku masti „Naso-Merfen“ byla

ověřena extrakcí efedrinu z referenční masti, vyrobené rozpuštěním standardu efedrinu hydrochloridu v bílé vazelině zahříváné na vodní lázni.

#### 4.2.4 Kalibrační závislosti

##### 4.2.4.1 Kalibrační závislost pro stanovení efedrinu

Metodou HILIC-UV byla pro stanovení efedrinu ve vzorku masti „Naso-Merfen“ změřena kalibrační závislost. Použita byla metoda kalibrační přímky (čtyřbodová kalibrace). Koncentrace efedrinu v použitých roztocích standardu efedrinu hydrochloridu se pohybovala v rozmezí 16,4 až 82,1 mg dm<sup>-3</sup>. Plochy píků standardů byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci. Získané body byly proloženy regresní přímkou, jejíž rovnice je

$$\begin{aligned} A &= 65 c - 200 \\ r &= 0,9994 \end{aligned} \tag{4.1}$$

kde  $A$  je plocha píku [ $\mu$ AU min] a  $c$  je koncentrace efedrinu [mg dm<sup>-3</sup>].

##### 4.2.4.2 Kalibrační závislost pro stanovení mentholu

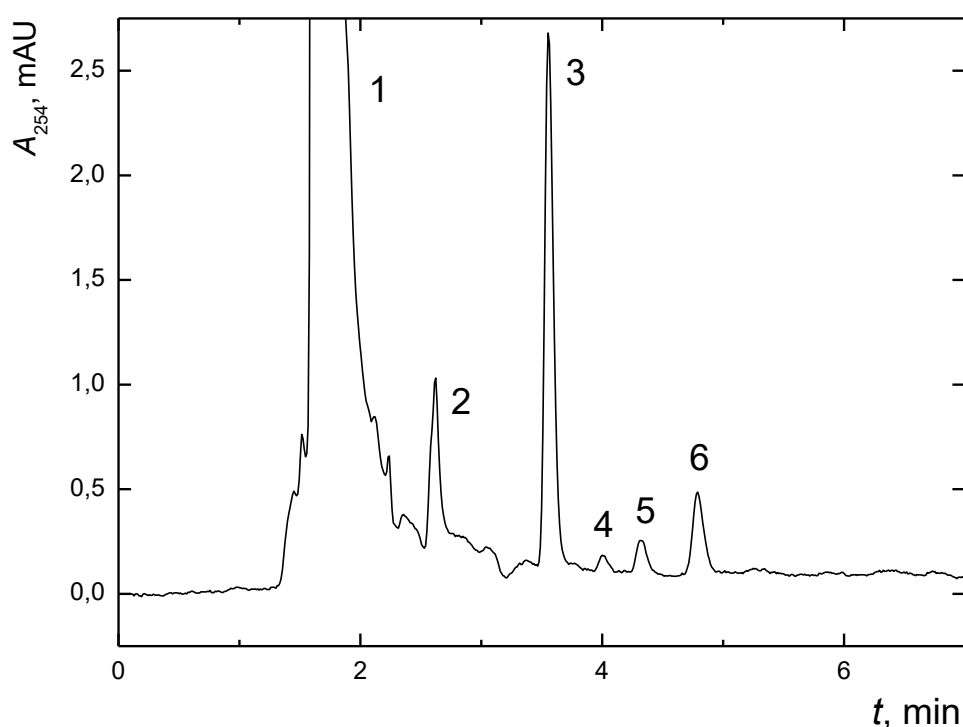
Kalibrační závislost pro stanovení mentholu ve vzorku masti „Naso-Merfen“ byla změřena pomocí metody GC-MS. Použita byla metoda kalibrační přímky (pětibodová kalibrace). Koncentrace mentholu v použitých roztocích standardu se pohybovala v rozmezí 1 až 10 mg dm<sup>-3</sup>. Plochy píků standardů byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci. Získané body byly proloženy regresní přímkou, jejíž rovnice je

$$\begin{aligned} A &= 7200 c - 800 \\ r &= 0,9999 \end{aligned} \tag{4.2}$$

kde  $A$  je plocha píku [min] a  $c$  je koncentrace mentholu [mg dm<sup>-3</sup>].

#### 4.2.5 HILIC-UV analýza vzorku

Na obr. 4.6 je zobrazen HILIC-UV chromatogram vzorku extraktu z masti „Naso-Merfen.“ Látky, kterým v chromatogramu odpovídají píky (1) až (5), nebyly touto metodou identifikovány. Pík (6) s retenčním časem 4,79 min lze přiřadit efedrinu na základě shody s retenčním časem standardu i absorpcí v UV oblasti. Pro potvrzení struktury efedrinu a pokus o identifikaci ostatních detegovaných látek byla použita hmotnostní detekce s vysokým rozlišením.



Obr. 4.6: HILIC-UV chromatogram vzorku extraktu z masti „Naso-Merfen.“ Píky (1) až (5) neznámé látky, (6) efedrin. Separace proběhla na koloně XBridge® BEH Amide (150×3 mm; 2,5 μm; Waters) izokratickou elucí binární mobilní fáze obsahující acetonitril (složka A) a 5 mmol dm<sup>-3</sup> mravenčan amonný, pH = 3,00 (složka B) při vlnové délce detekce 254 nm, konstantní teplotě 30 °C a průtoku 0,4 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>.

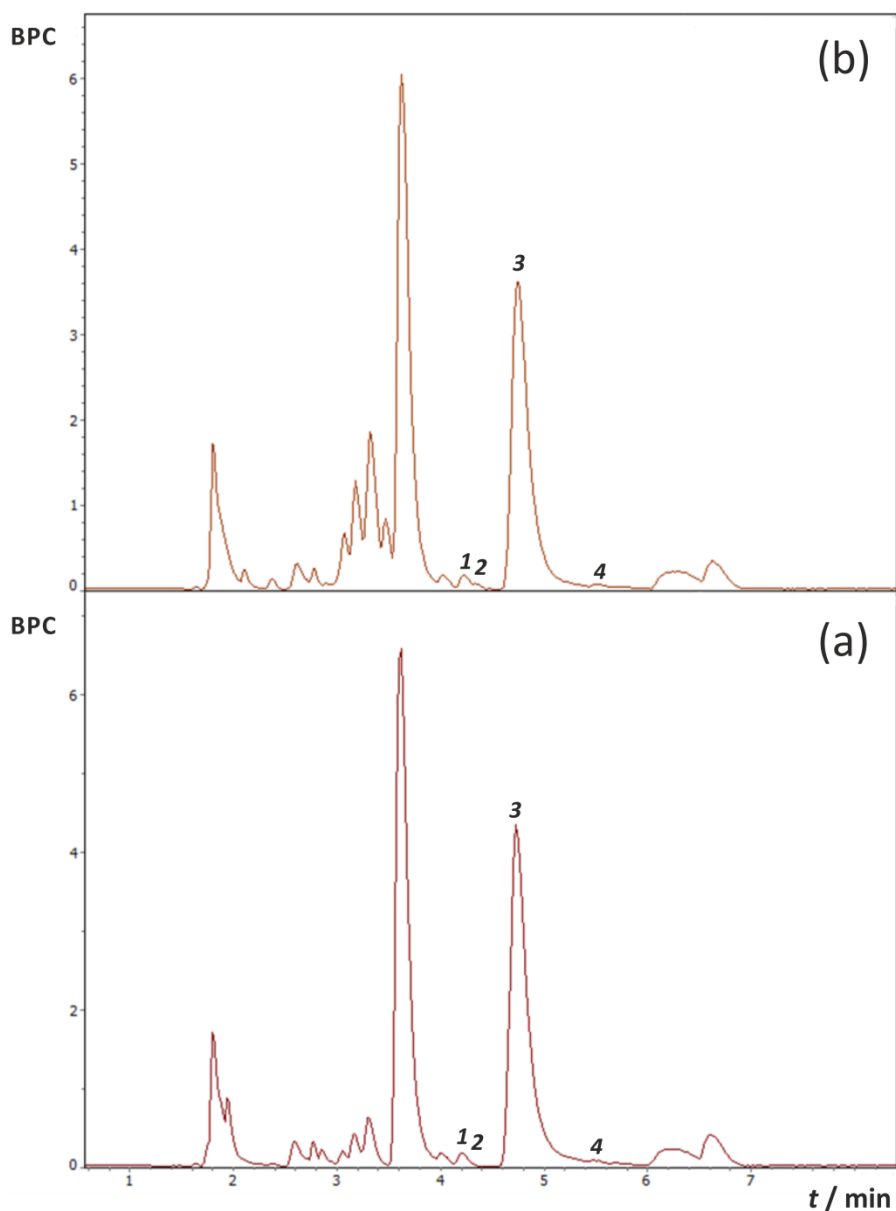
#### 4.2.6 HPLC-MS analýza vzorku

Extrakt z masti „Naso-Merfen“ a extrakt z referenční masti byly analyzovány metodou HPLC-MS. Mezi HPLC-MS chromatogramem extraktu historického vzorku masti „Naso-Merfen“ a extraktu novodobého replikátu nebyl nalezen podstatný rozdíl (obr. 4.7). Z toho plyne, že nebyly identifikovány žádné degradační produkty, které by se musely na záznamu projevit. Celkem bylo nalezeno 24 látek, ze kterých se podařilo pomocí knihovny spekter identifikovat jen několik látek. Jejich přehled je uveden v tab. 4.3. Látky lze rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří efedrin a jeho příbuzné látky vyskytující se v přírodním materiálu. Mezi těmito látkami byl identifikován i 2-methylamino-1-fenylpropan-1-on, který je sice degradačním produktem efedrinu, nicméně jeho množství v historickém vzorku masti nebylo oproti novodobému replikátu zvýšené a tato látka se běžně vyskytuje v malém množství v efedrinu izolovaném z přírodního materiálu. Druhou skupinu látek tvoří sloučeniny typické pro vazelínu, použitou jako masťový základ studovaného historického vzorku.

**Tabulka 4.3**

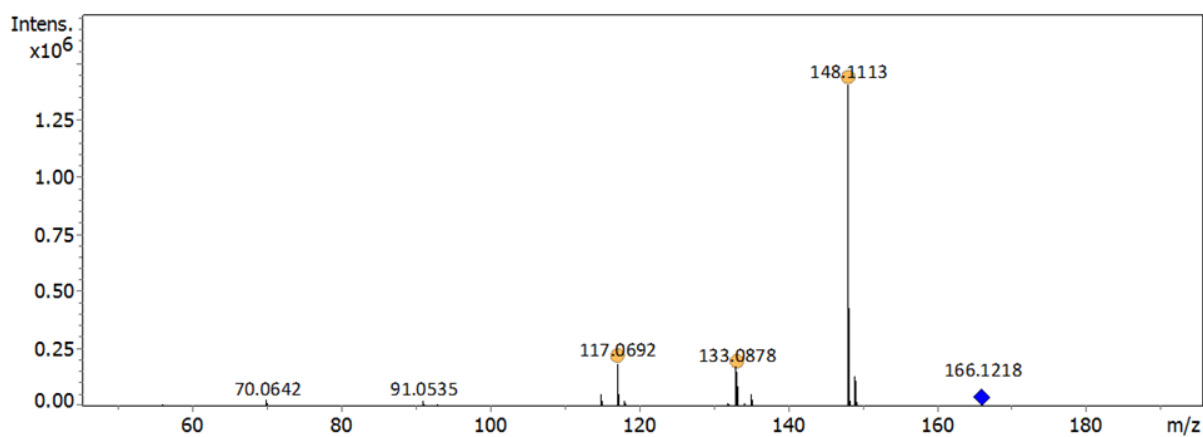
Identifikované látky v chromatogramech extraktu z historického vzorku masti Naso-Merfen.

ESI mód	$t_r$ /min	$m/z$			Název látky, CASRN
		experimentální	teoretický	$\Delta$ /ppm	
pozitivní	4,2	180,1379	180,13830	2,2	methylefedrin, 42151-56-4
	4,4	164,1064	164,10700	3,3	2-methylamino-1-fenyl-propan-1-on, 160977-88-8
	4,7	166,1220	166,12260	3,6	efedrin, 299-42-3
	5,5	182,1170	182,11760	3,2	etilefrin, 709-55-7
negativní	1,7	349,2419	349,2418	-0,4	oktadecyl sulfát, 143-03-3
	1,7	321,2107	321,2105	-0,6	cetyl sulfát, 143-02-2
	1,7	265,1481	265,1479	-0,8	dodecyl sulfát, 151-41-7
	1,8	255,2332	255,2330	-0,9	palmitová kyselina, 57-10-3
	1,8	283,2648	283,2643	-1,8	stearová kyselina, 57-11-4
	2,0	271,2281	271,2279	-0,9	10-hydroxypalmitová kyselina, 506-13-8

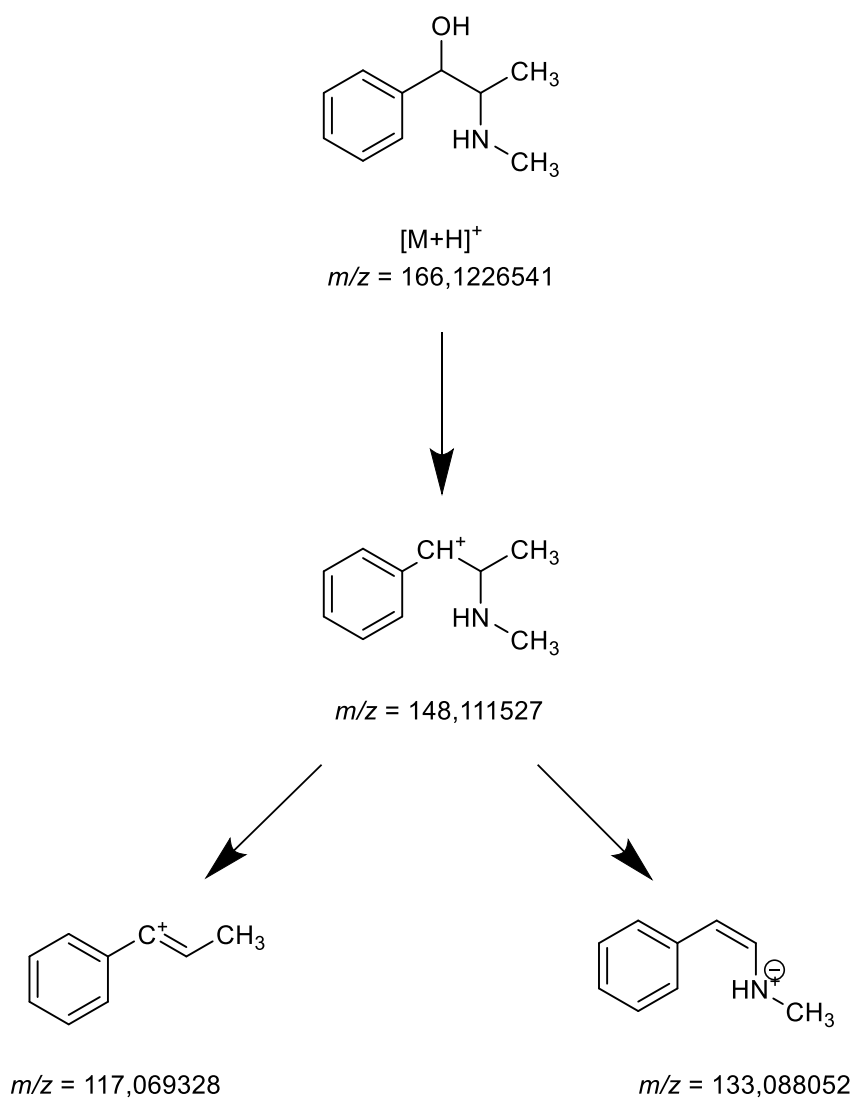


Obr. 4.7: ESI<sup>+</sup>-HPLC-MS chromatogram základního píku spektra (a) extraktu z historického vzorku masti „Naso-Merfen,“ (b) extraktu z novodobého replikátu masti. Identifikované píky: (1) methylefedrin, (2) 2-methylamino-1-fenyl-propan-1-on, (3) efedrin, a (4) etilefrin. Podmínky měření: separace na koloně XBridge<sup>®</sup> BEH Amide (150×3 mm; 2,5 μm; Waters) při konstantní teplotě 30 °C, binární izokratická eluce mobilní fází 88 % acetonitrilu a 12 % 5 mmol dm<sup>-3</sup> mravenčanu amonného (pH = 3,00) při průtoku 0,4 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>, nastříkovaný objem vzorku 1 mm<sup>3</sup>, MS kalibrace na octan sodný.

Dále bylo naměřeno fragmentační MS<sup>2</sup> spektrum efedrinu (obr. 4.8), přičemž spektrum efedrinu z extraktu z historického vzorku masti „Naso-Merfen“ bylo identické se spektrem naměřeným pro standard efedrinu. Naměřené spektrum bylo částečně interpretováno (obr. 4.9), nalezené fragmenty jsou v plné shodě s literaturou [126]. Tím byla potvrzena identita efedrinu v analyzovaném vzorku.



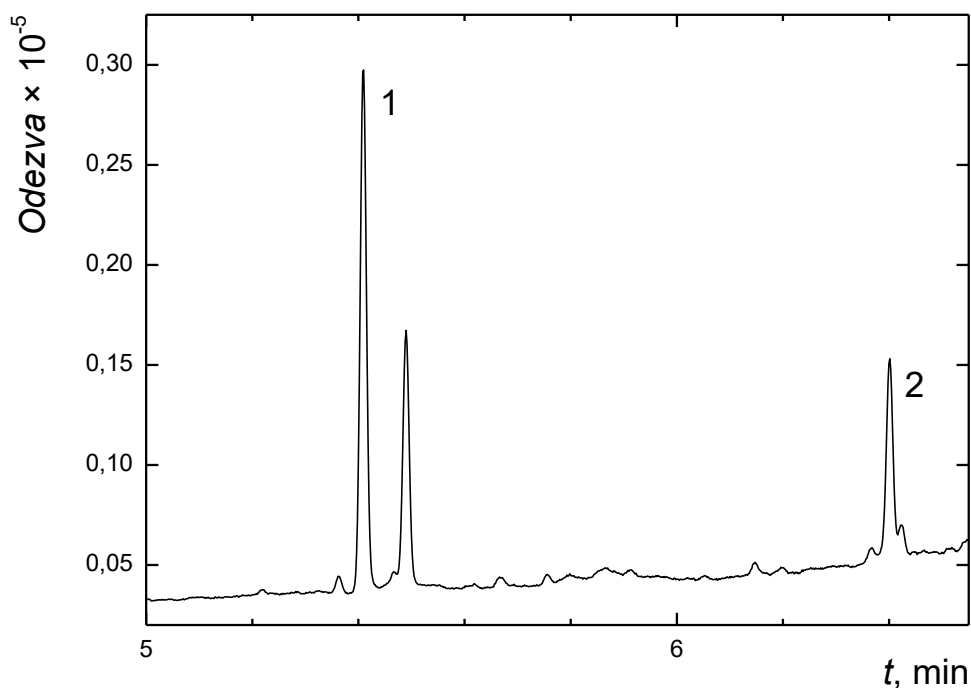
Obr. 4.8: ESI<sup>+</sup>-MS<sup>2</sup> hmotnostní spektrum prekurzorového iontu efedrinu (označen modrým kosočtvercem).



Obr. 4.9: Návrh ESI+MS<sup>2</sup> fragmentace efedrinu (hodnoty *m/z* vypočítané).

#### 4.2.7 GC-MS analýza vzorku

Menthol nebyl detegován pomocí metody HPLC-UV ani při použití standardů o vyšších koncentracích. Při HPLC-MS se jeho ionizace metodou ESI v negativním i pozitivním módu se ukázala jako nedostatečná. Pomocí metody GC-MS byl změřen chromatogram extraktu z masti „Naso-Merfen“ (obr. 4.10). Pík (1) s retenčním časem 5,41 min lze přiřadit mentholu na základě shody s retenčním časem standardu i porovnáním s knihovou EI spekter. Pík (2) lze přiřadit efedrinu na základě shody s knihovou EI spekter (shoda 94 %). Dále bylo s nedostatečným rozlišením detegováno mnoho látek uhlovodíkové povahy (uhlovodíky, estery mastných kyselin a mastné kyseliny), pravděpodobně pocházejících z vazelíny, která byla při výrobě masti použita jako masťový základ. Nebyly však detegovány žádné degradační produkty mentholu.



Obr. 4.10: GC-MS chromatogram vzorku extraktu z masti „Naso-Merfen.“ Píky (1) menthol, (2) efedrin. Separace proběhla na koloně Rxi-1301 Sil MS (60 m × 0,25 mm i.d.; 0,25 μm tloušťka filmu) za použití helia jako nosného plynu. Teplota injektoru byla 230 °C. Hmotnostní detekce s EI ionizací byla měřena v módu SIM, při teplotě iontového zdroje 200 °C a energii 70 eV.



#### **4.2.8 UV-PCMVG-AAS analýza vzorku**

Ke stanovení fenyhydrargyrium borátu ve vzorku masti „Naso-Merfen“ byla použita metoda UV-PCMVG-AAS. Postup extrakce rtuti ze vzorku masti i postup přípravy kalibračních roztoků byl založený na literatuře [127, 128]. Vzorek poskytl měřitelný signál pro rtuť. Koncentrace rtuti ve vzorku však byla pod mezí kvantifikace metody, proto stanovena nebyla.

#### **4.2.9 Kvantifikace účinných látek**

##### **4.2.9.1 Kvantifikace efedrinu**

Kvantifikací efedrinu metodou kalibrační přímky (měřeno na HILIC-UV) bylo zjištěno, že jeho obsah ve vzorku masti „Naso-Merfen“  $0,12 \pm 0,003$  % hm., což je méně, než bylo deklarováno výrobcem (0,386 % hm.). Toto značí použití menšího množství síranu efedrinu při výrobním procesu, než bylo třeba k dosažení deklarovaného obsahu efedrinu v masti, protože degradační produkty efedrinu nebyly detegovány.

##### **4.2.9.2 Kvantifikace mentholu**

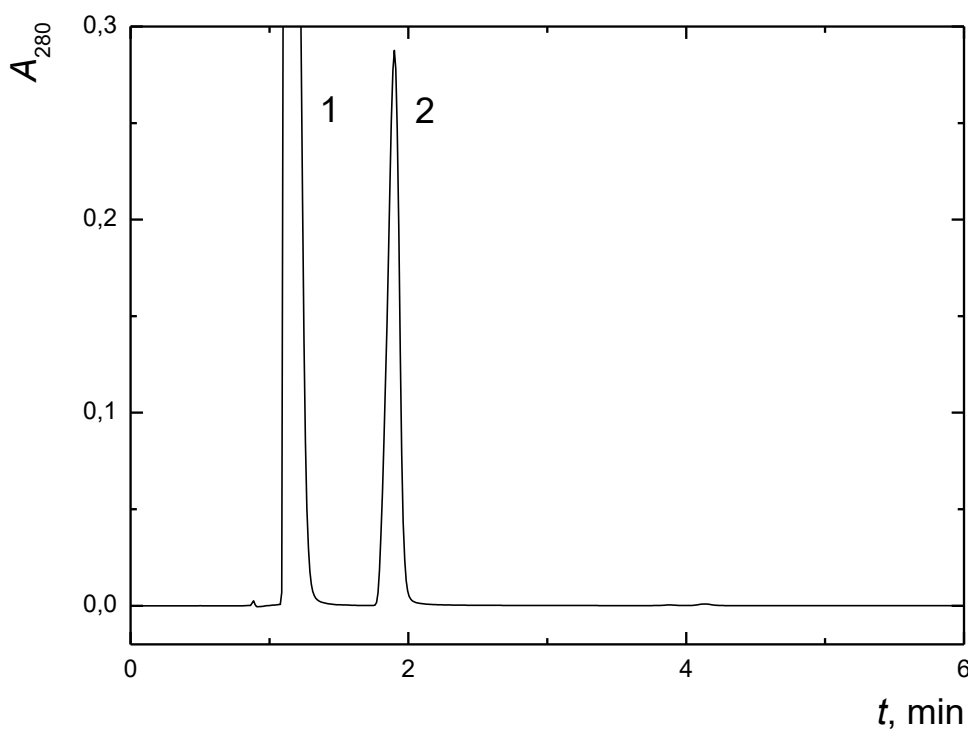
Menthol byl ve vzorku masti „Naso-Merfen“ kvantifikován pomocí metody GC-MS. Zjištěný obsah mentholu ve vzorku masti byl  $0,01 \pm 0,005$  % hm., což je méně, než bylo deklarováno výrobcem (0,5 % hm.). Příčinou může být použití menšího množství mentholu při výrobním procesu, než bylo potřebné pro dosažení obsahu deklarovaného výrobcem. Další možností, že menthol mohl také vytékat při výrobě masti, nebo při jejím skladování, protože nebyly detegovány žádné degradační produkty.

### **4.3 Analýza masti „Sulfathiazol“**

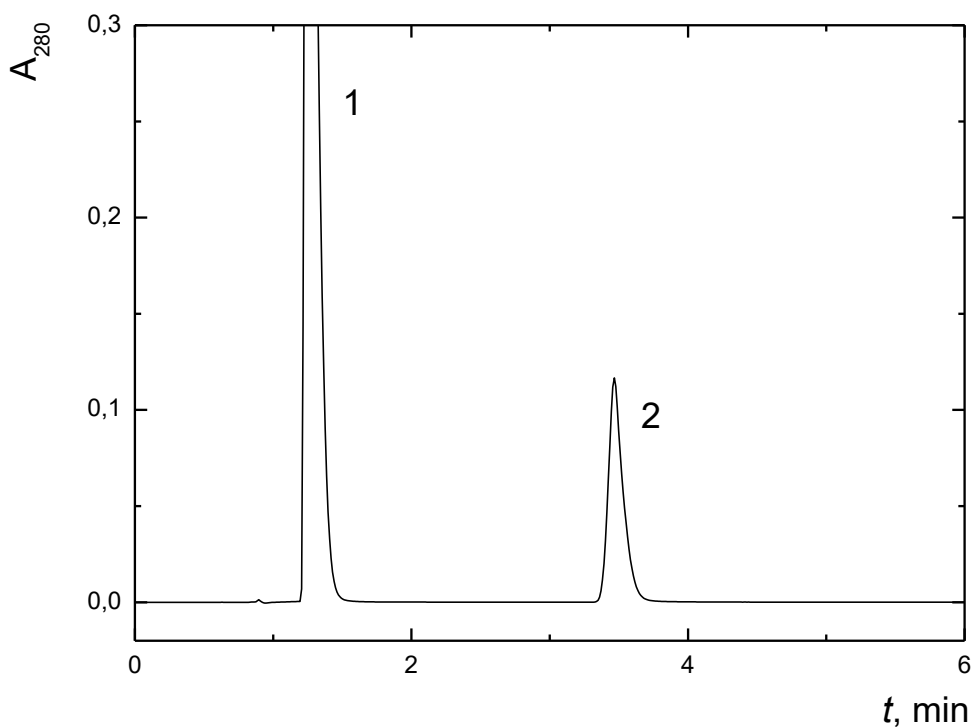
#### **4.3.1 Optimalizace chromatografických podmínek**

Pro separaci sulfathiazolu byla vybrána a dále optimalizována metoda podle literatury [129]. Separace probíhala na koloně Kinetex 2,6  $\mu\text{m}$  Phenyl-Hexyl (100 $\times$ 3 mm)

izokratickou elucí binární mobilní fáze složené z methanolu (složka A) a octanového pufru (složka B,  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  octan amonný,  $\text{pH} = 7,20$ ) v poměru 30/70 (v/v) při vlnové délce 280 nm, konstantní teplotě  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  a průtoku mobilní fáze  $0,5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ . Nastříkovaný objem vzorku byl  $2 \text{ mm}^3$ . Pro zvýšení retence sulfathiazolu, nutné zejména v případě objevení se degradačních produktů, byl obsah methanolu v mobilní fázi snížen ze 30 % (v/v) na 20 %. Nastříkovaný objem vzorku byl snížen na  $1 \text{ mm}^3$ , s cílem snížit odezvu detektoru pro aceton a zároveň zachovat dostatečně velkou odezvu sulfathiazolu. Celkový čas jedné analýzy byl prodloužen z původně zvolených 15 min na 20 min, protože nebylo známo, jestli budou po sulfathiazolu eluovat i další látky. HPLC-UV chromatogram standardu sulfathiazolu o koncentraci  $200 \text{ mg dm}^{-3}$  za použití původní převzaté metody je zobrazen na obr. 4.11. HPLC-UV chromatogram toho samého standardu při změněných podmínkách je zobrazen na obr. 4.12. Povedlo se zvýšit retenci sulfathiazolu a zachovat dostatečně velkou odezvu.



Obr. 4.11: HPLC-UV chromatogram standardu sulfathiazolu o koncentraci  $200 \text{ mg dm}^{-3}$ . Píky (1) aceton, (2) sulfathiazol. Separace proběhla na koloně Kinetex  $2,6 \text{ } \mu\text{m}$  Phenyl-Hexyl ( $100 \times 3 \text{ mm}$ ) izokratickou elucí binární mobilní fáze složené z methanolu (složka A) a octanového pufru (složka B,  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  octan amonný,  $\text{pH} = 7,20$ ) v poměru 30/70 (v/v) při vlnové délce 280 nm, konstantní teplotě  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  a průtoku mobilní fáze  $0,5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ . Nastříkovaný objem vzorku byl  $2 \text{ mm}^3$ .



Obr. 4.12: HPLC-UV chromatogram standardu sulfathiazolu o koncentraci  $200 \text{ mg dm}^{-3}$ . Píky (1) aceton, (2) sulfathiazol. Separace proběhla na koloně Kinetex  $2,6 \mu\text{m}$  Phenyl-Hexyl ( $100 \times 3 \text{ mm}$ ) izokratickou elucí binární mobilní fáze složené z methanolu (složka A) a octanového pufru (složka B,  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  octan amonný,  $\text{pH} = 7,20$ ) v poměru 20/80 (v/v) při vlnové délce 280 nm, konstantní teplotě  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  a průtoku mobilní fáze  $0,5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ . Nastříkovaný objem vzorku byl  $1 \text{ mm}^3$ .

#### 4.3.2 Optimalizace extrakce

Pro extrakci sulfathiazolu ze vzorku masti byl použit aceton, protože v ostatních běžně používaných rozpouštědlech nemá látka velkou rozpustnost [56]. V úvahu byla vzata také hydrolýza v případě použití roztoků kyselin. Byly vyzkoušeny tři postupy extrakce sulfathiazolu ze vzorku masti. Postup nejprve odpovídal postupu pro extrakci efedrinu, popsanému v kapitole 3.4.2, změněno bylo pouze používané rozpouštědlo (acetonitril na mobilní fázi a aceton) a extrakt nebyl zahříván. Po odpaření kapalná fáze byla pevná fáze rozpouštěna v  $1,00 \text{ cm}^3$  acetonu, resp. v  $1,00 \text{ cm}^3$  mobilní fáze (methanol a  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  octan amonný,  $\text{pH} = 7,20$ ). Při použití acetonu došlo k rozpuštění pevné fáze po použití ultrazvukové lázně (30 min při laboratorní teplotě). Přefiltrované extrakty byly nastříkovány do HPLC systému. Při použití mobilní fáze se nepovedlo pevnou fázi

úplně rozpustit a tomu následně odpovídaly i nižší odezvy detektoru než v případě rozpouštění v acetonu. Proto byl jako nejvhodnější rozpouštědlo vybrán aceton. Výtěžek extrakce vztažený k deklarovanému obsahu sulfathiazolu (za předpokladu, že sulfathiazol ve vzorku masti byl stabilní) v masti byl však menší než 10 %. Toto bylo způsobeno použitím příliš malého množství acetonu. Postup byl tedy upraven podle kap. 3.4.3. a výtěžek extrakce činil více než 100 %, což už v této fázi značilo, že obsah sulfathiazolu ve vzorku masti je vyšší, než bylo deklarováno výrobcem.

### 4.3.3 Kalibrační závislosti

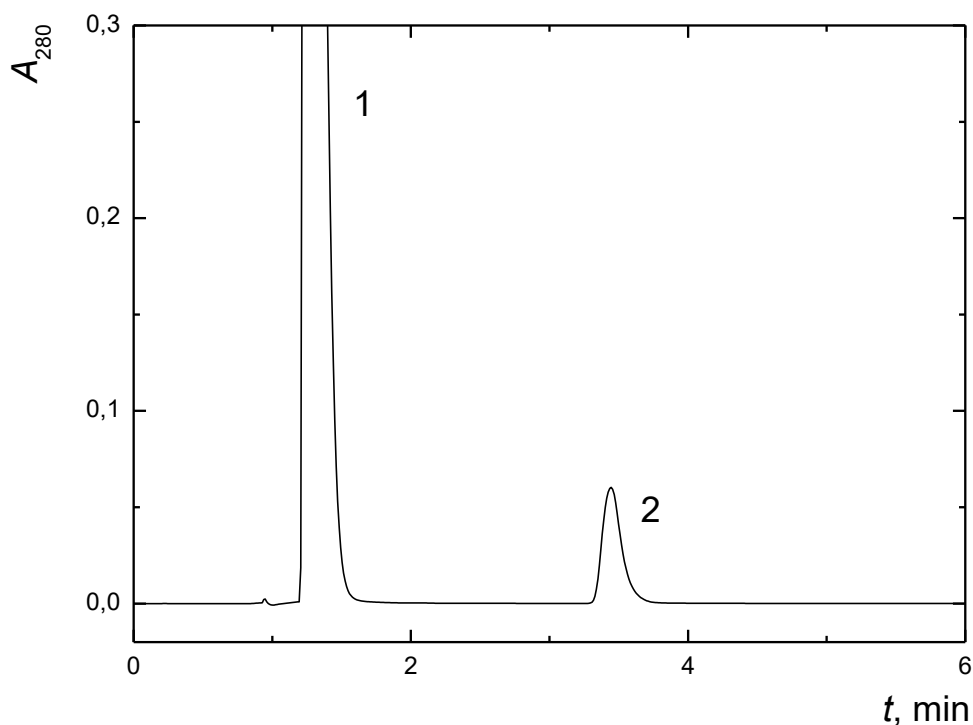
Pro kvantifikaci sulfathiazolu ve vzorku masti byla změřena kalibrační závislost metodou RP-HPLC s UV detekcí při vlnové délce 280 nm. Byla použita metoda kalibrační přímky (pětibodová kalibrace). Plochy píků jednotlivých standardů o koncentracích 100 až 300 mg dm<sup>-3</sup> byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci. Získané body byly proloženy regresní přímkou s rovnicí

$$A = 4200 c - 32000 \quad (4.3)$$
$$r = 0,9998$$

kde  $A$  je plocha píku [ $\mu$ AU min] a  $c$  koncentrace sulfathiazolu [mg dm<sup>-3</sup>].

### 4.3.4 HPLC-UV analýza vzorku

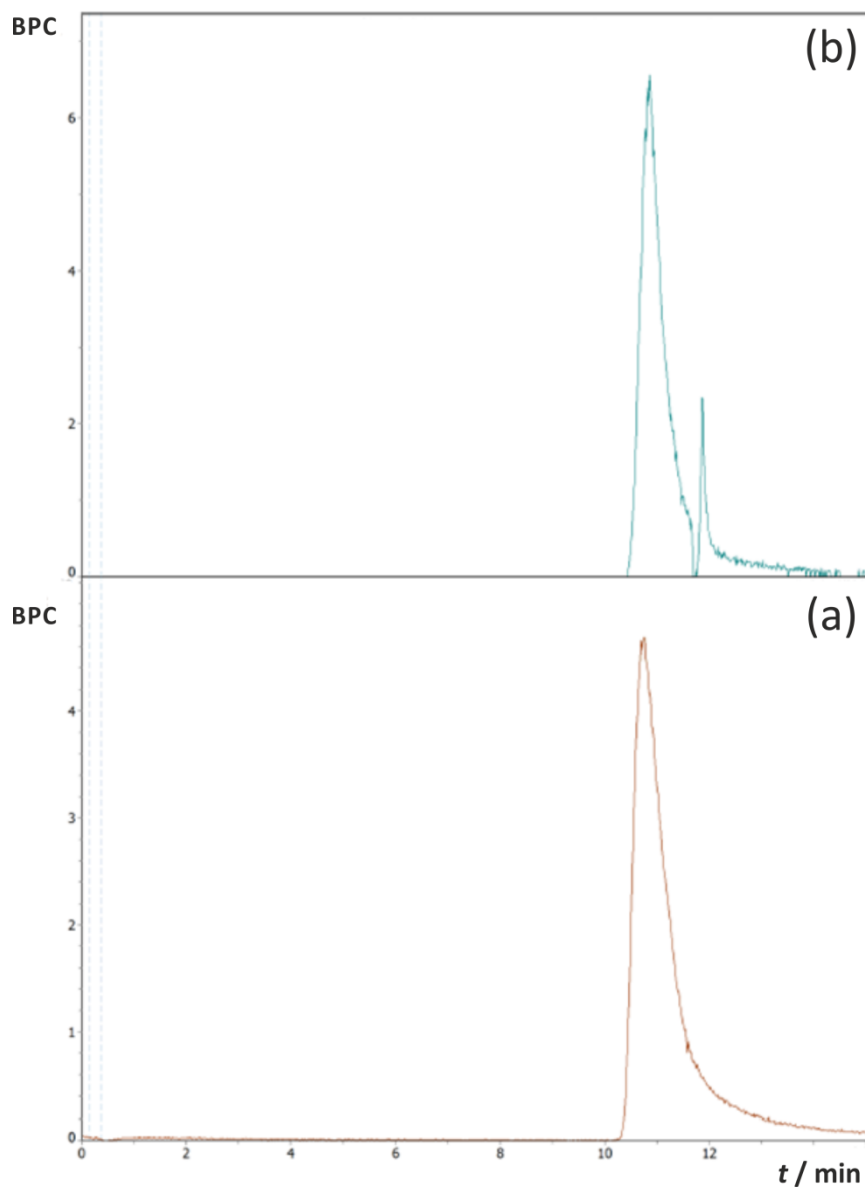
HPLC-UV chromatogram vzorku extraktu z masti „Sulfathiazol“ je zobrazen na obr. 4.13. Pík (1) s retenčním časem 1,25 min lze přiřadit acetonu na základě shody retenčních časů při měření čistého rozpouštědla a absorpcí v UV oblasti. Pík (2) s retenčním časem 3,44 min lze přiřadit sulfathiazolu na základě shody s retenčním časem měřeného standardu (obr. 4.12). Metodou HPLC-UV nebyly ve vzorku detegovány žádné degradační produkty sulfathiazolu ani jiné látky (kromě acetonu, do kterého byl sulfathiazol extrahován).



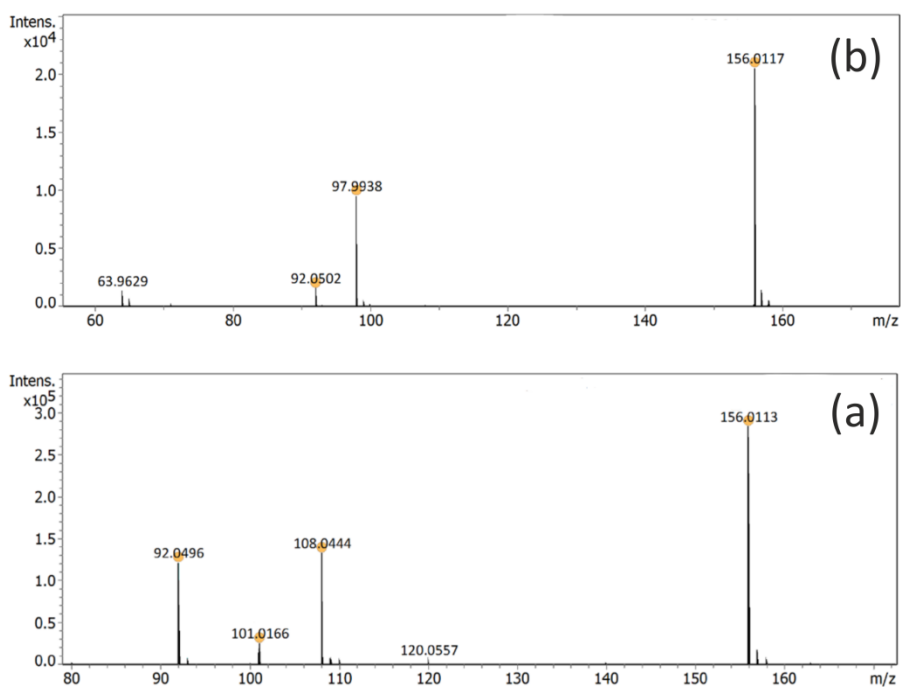
Obr. 4.13: HPLC-UV chromatogram vzorku extraktu masti „Sulfathiazol“. Píky (1) aceton, (2) sulfathiazol. Separace proběhla na koloně Kinetex 2,6  $\mu\text{m}$  Phenyl-Hexyl (100 $\times$ 3 mm) izokratickou elucí binární mobilní fáze složené z methanolu (složka A) a octanového pufru (složka B, 0,01 mol dm<sup>-3</sup> octan amonný, pH = 7,20) v poměru 20/80 (v/v) při vlnové délce 280 nm, konstantní teplotě 30 °C a průtoku mobilní fáze 0,5 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>.

#### 4.3.5 HPLC-MS analýza vzorku

V HPLC-MS chromatogramu extraktu historického vzorku masti „Sulfathiazol“ byla – vedle acetonu, použitého jako rozpouštědlo – nalezena jediná látka (obr. 4.14). Porovnáním se standardem sulfathiazolu a následným proměřením ESI-MS<sup>2</sup> spekter (obr. 4.15) byla potvrzena identita této látky jako sulfathiazolu. Nebyly tedy identifikovány žádné degradační produkty. Naměřená MS<sup>2</sup> spektra jsou v plné shodě s literaturou [130].



Obr. 4.14: ESI-HPLC-MS chromatogram základního píku spektra extraktu z historického vzorku masti „Sulfathiazol“ (a) v pozitivním módu a (b) v negativním módu. Separace proběhla na koloně Kinetex 2,6  $\mu\text{m}$  Phenyl-Hexyl (100 $\times$ 3 mm) při konstantní teplotě 30  $^{\circ}\text{C}$ , binární izokratická eluce mobilní fází 20 % methanolu a 80 % 0,01 mol  $\text{dm}^{-3}$  octanu amonného (pH = 7,20) při průtoku 0,2  $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ , nastříkovaný objem vzorku 1  $\text{mm}^3$ , MS kalibrace na octan sodný.



Obr. 4.15: ESI-MS<sup>2</sup> hmotnostní spektrum prekurzorového iontu sulfathiazolu (a) v pozitivním módu a (b) v negativním módu.

#### 4.3.6 Kvantifikace sulfathiazolu v historickém vzorku

Kvantifikací sulfathiazolu metodou kalibrační přímky (měřeno na HPLC-UV) bylo zjištěno, že jeho obsah v historickém vzorku masti je  $7,02 \pm 0,05$  % hm., což přesahuje výrobcem deklarovaný obsah. Toto je pravděpodobně způsobeno použitím většího množství sulfathiazolu při výrobním procesu, než bylo třeba pro dosažení obsahu 5 % hm., protože ani pomocí HPLC-MS nebyly detegovány žádné degradační produkty. Zjištěný obsah sulfathiazolu v historickém vzorku masti značí mimořádnou dlouhodobou stabilitu této účinné látky (po dobu 42 let) v masti. Potvrzením struktury sulfathiazolu byla potvrzena také autenticita pozůstatku historického léčivého přípravku.

## 5 ZÁVĚR

Cílem předkládané diplomové práce byla analýza pozůstatků historických léčivých přípravků. Účinnými látkami byly anthrachinonové glykosidy senny, alkaloid, terpen a sulfonamid ve formě extraktu a mastí. Vzorky byly analyzovány metodami RP-HPLC (extrakt ze senny, mast „Sulfathiazol“) a HILIC (mast „Naso-Merfen“) s UV a hmotnostní detekcí a GC-MS (mast „Naso-Merfen“). Vzorek masti „Naso-Merfen“ byl dále analyzován i metodou atomové absorpční spektrometrie.

Na základě získaných výsledků byla potvrzena autenticita všech analyzovaných vzorků.

Při analýze extraktu senny nebyly účinné látky detegovány a nebyla proto provedena kvantifikaci jejich obsahu. Pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením byly identifikovány degradační produkty sennosidů a další látky typické pro sennu. Zároveň byl prostudován mechanismus MS/MS fragmentace účinných látek a rozšířeny poznatky z literatury. Výsledky dosažené při analýze extraktu ze senny byly publikovány v literatuře [117].

Při analýze masti „Naso-Merfen“ byl kvantifikován obsah všech účinných látek ve vzorku. Struktury účinných látek byly potvrzeny pomocí hmotnostní spektrometrie. Byly detegovány i látky pocházející z vazelíny, použité jako masťový základ. Obsah efedrinu ve vzorku masti „Naso-Merfen“ byl  $0,12 \pm 0,003$  % hm., obsah mentholu  $0,01 \pm 0,005$  % hm. Přítomnost fenylyhydrargyrium borátu byla dokázána pomocí atomové absorpční spektrometrie. Nižší obsah účinných látek byl pravděpodobně způsoben již při výrobě, protože nebyly detegovány žádné degradační produkty.

Při analýze masti „Sulfathiazol“ byl kvantifikován obsah účinné látky ve vzorku. Nebyly detegovány žádné degradační produkty sulfathiazolu. Obsah sulfathiazolu ve vzorku masti „Sulfathiazol“ byl  $7,02 \pm 0,05$  % hm. Vyšší obsah účinné látky byl pravděpodobně způsoben již při výrobě.



# Literatura

- [1] Yoshioka S., Stella V. J.: *Stability of Drugs and Dosage Forms*. Kluwer Academic Publishers, New York, 2002.
- [2] Naveed S., Basheer S., Qamar F.: Stability of a dosage form and force degradation studies. *Journal of Bioequivalence and Bioavailability* **8** (2016), 191–193.
- [3] Dekker A. O., Dickinson R. G.: Oxidation of ascorbic acid by oxygen with cupric ion as catalyst. *Journal of the American Chemical Society* **62** (1940), 2165–2171.
- [4] Weissberger A., LuValle J. E., Thomas D. S.: Oxidation processes. XVI. The autoxidation of ascorbic acid. *Journal of the American Chemical Society* **65** (1943), 1934–1939
- [5] Bartnik M., Facey P.C.: Glycosides. In: *Farmacognosy: Fundamentals, applications and strategies*. Academic Press, 2017.
- [6] Seth A., Shah B.: *Textbook of Pharmacognosy and Phytochemistry*. Elsevier, 2009.
- [7] Bruneton J.: *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants* (2nd Edition). Lavoisier Publishing, Paris, 1999.
- [8] Bone K., Mills S.: *Principles and Practice of Phytotherapy* (2nd Edition). Elsevier, 2013.
- [9] Evans W.C.: *Trease and Evans' Pharmacognosy* (16th Edition). Elsevier, London, 2009.
- [10] Franz G.: The senna drug and its chemistry. *Pharmacology* **47** (1993), 2–6.
- [11] Stoll A., Becker B.: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Volume 7*. Springer, Vienna, 1950.
- [12] Murti P., Seshadri T. R.: Chemical composition of Indian senna leaves. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences – Section A* **10** (1939).
- [13] Balasankar D., Vanilarasu K., Selva Preetha P., Umadevi S.R.M., Bhowmik D.: Senna – A Medical Miracle Plant. *Journal of Medicine Plants Studies* **1** (2013), 41–47.
- [14] Lemli J., Toppet S., Cuveele J., Janssen G.: Naphtalene glycosides in *Cassia senna* and *Cassia angustifolia*. *Planta Medica* **43** (1981), 11–17.
- [15] Alsiede M. M. S. A., Abddrahman M. A., Saeed A. E. M.: Nutritional composition and fatty acids analysis of Senna Singueana leaves and seeds. *American Journal of Science and Technology* **2** (2015), 270–273.
- [16] Issekutz B.: *Die Geschichte der Arzneimittelforschung*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1971.
- [17] Lemli J.: Senna – an old drug in modern research. *Pharmacology* **36** (1988), 3–6.
- [18] Barnard D.L., Huffman J. H., Morris J. L., Wood S. G., Hughes B. G., Sidwell R.W.: Evaluation of the antiviral activity of anthraquinones, anthrones and anthraquinone derivatives against human cytomegalovirus. *Antiviral Research* **17** (1992), 63–77.
- [19] Takahashi M., Sakurai K., Saito K.: Stability study of sennoside standard solution and structure analysis of degradation product. *Bunseki Kagaku* **61** (2012), 341–346. *CA* **157**:615963.
- [20] Lainonen H., Marvola M., Hietala P., Parviainen T.: The effect of different storage conditions on the chemical stability, laxative effect and acute toxicity of sennoside solutions. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **63** (1988), 37–41.

- [21] Meier N., Meier B., Peter S., Josic G., Wolfram E.: Photostability of sennosides in solution and their degradation products. *Planta Medica International Open*, **4** (2017) (S 01): S1–S202
- [22] Merle J., Barthes D., Besson J.: High-performance liquid chromatographic study on sennoside A and B changes in solution. *Pharmaco, Edizione Practica* **39** (1984), 233–242.
- [23] Hermanson G.T.: *Bioconjugate Techniques* (3rd Edition). Academic Press, 2013.
- [24] de Witte P.: Metabolism and pharmacokinetics of anthranoids. *Pharmacology* **47** (1993), 86–97.
- [25] Goppel M., Franz G.: Stability control of senna leaves and senna extracts. *Planta Medica* **70** (2004), 432–436.
- [26] Demirezer L.Ö., Karahan N., Ucakturk E., Kuruuzum A., Guvenalp Z., Kazaz C.: HPLC fingerprinting of sennosies in laxative drugs with isolation of standard substances from some senna leaves. *Records of Natural Products* **5** (2011), 261–270.
- [27] Bala S., Uniyal G. C., Dubey T., Singh S. P.: An improved method for the analysis of sennosides in *Cassia angustifolia* by high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis* **12** (2001), 277–280.
- [28] Hayashi S., Yoshida A., Tanaka H., Mitani Y., Yoshizawa K.: Analytical studies of the active constituents IV. Determination of sennosides in senna and formulations by high-performance liquid chromatography. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **28** (1980), 406–412.
- [29] Komolafe O. O.: Ion-pair partition chromatography analysis of anthraquinone glycosides of senna and pharmaceutical preparations of senna. *Journal of Chromatographic Science* **16** (1978), 496–499.
- [30] Sun S. W., Su H. T.: Validated HPLC method for determination of sennoside A and B in senna tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **29** (2002), 881–894.
- [31] Rosenthal I., Wolfram E., Meier B.: An HPLC method to determine sennoside A and sennoside B in *Sennae fructus* and *Sennae folium*. *Pharmeuropa Bio & Scientific Notes* (2014), 92–102.
- [32] Ohshima Y., Takahashi K.: Separation method for sennosides. *Journal of Chromatography A* **258** (1983), 292–296.
- [33] Huang Z., Xu Y., Wang Q., Gao X.: Metabolism and mutual biotransformations of anthraquinones and anthrones in rhubarb by human intestinal flora using UPLC–Q–TOF/MS. *Journal of Chromatography B* **1104** (2019), 59–66.
- [34] Wink M., Roberts M. F.: *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. Plenum Press, New York, 1998.
- [35] Preininger V.: The pharmacology and toxicology of the Papaveraceae alkaloids. In: *The Alkaloids: Chemistry Physiology. Volume 15*. New York, Plenum Press, 1975, p, 207–261.
- [36] Kukula-Koch W. A., Widelski J.: Alkaloids. In: *Pharmacognosy. Fundamentals, Applications and Strategies*. Academic Press, 2017.
- [37] Aniszewski T.: *Alkaloids – Secrets of Life*. Elsevier, 2007.
- [38] Funayama S., Cordell G. A.: *Alkaloids: A Treasury of Poisons and Medicines*. Academic Press, 2015.
- [39] Grycova L., Dostal J., Marek R.: Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry* **68** (2007), 150–175.

- [40] Thornber C. W.: Alkaloids of the menispermaceae. *Phytochemistry* **9** (1970), 157–187.
- [41] Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B.: *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons* (4th Edition). Pharmaceutical Press, London, 2011.
- [42] Limberger R. P., Jacques A. L. B., Schmitt G. C., Arbo M. D. Pharmacological effects of ephedrine. In: *Natural Products*. Springer, Berlin, 2013, p. 1217–1237.
- [43] Haynes W.M.: *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (94th Edition). CRC Press, 2013.
- [44] Ali S. L.: Ephedrine. In: *Analytical Profiles of Drug Substances. Volume 15*. Florey K. (ed). Academic Press, Orlando, 1986, p. 233–281.
- [45] Lewis R. J.: *Hawley's Condensed Chemical Dictionary* (15th Edition). Wiley, New York, 2007.
- [46] Chen K. K., Schmidt C. F.: *Ephedrine and related substances*. London, Bailliere, Tindall and Cox, 1930.
- [47] Morton J. F.: *Major Medicinal Plants: Botany, Culture, and Uses*. Thomas, Springfield, 1977.
- [48] Lee M. R.: The history of rphedra (ma-huang). *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh* **41** (2011), 78–84.
- [49] Hagel J. M., Krizevski R., Marsolais F., Lewinsohn E., Facchini P. J.: Biosynthesis of amphetamine analogs in plants. *Trends in Plant Science* **17** (2012), 404–412.
- [50] Manske R. H. F., Johnson T. B.: Synthesis of ephedrine and structurally similar compounds. I. A new synthesis of ephedrine. *Journal of the American Chemical Society* **51** (1929), 580–582.
- [51] Späth E., Gobring R.: Die Synthesen des Ephedrins, des Pseudoephedrins, ihren optischen Antipoden und Razemkörper. *Monatshefte für Chemie* **41** (1920), 319–338.
- [52] Gazaliev A. N., Zhurinov M. Z., Fazylov S. D., Balitskii S. N.: Isolation, analysis and synthesis of ephedrine and its derivatives. *Chemistry of Natural Compounds* **25** (1989), 261–271.
- [53] Beckett A. H., Jones G. R., Hollingsbee A.: Degradation of (–)-ephedrine in solution and during extraction with diethyl ether. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **30** (1978), 15–19.
- [54] Shanati T., Ansorge–Schumacher M. B.: Biodegradation of ephedrine isomers by *Anthrobacter* sp. strain TS–15: discovery of novel ephedrine and pseudoephedrine dehydrogenases. *Applied and Environmental Microbiology* **86** (2020).
- [55] Kraemer T., Maurer H. H.: Determination of amphetamine, methamphetamine and amphetamine–derived designer drugs or medicaments in blood and urine. *Journal of Chromatography B* **713** (1998), 163–187.
- [56] Jimenez C., de la Torre R., Ventura M., Segura J., Ventura R.: Stability studies of amphetamine and ephedrine derivatives in urine. *Journal of Chromatography B* **843** (2006), 84–93.
- [57] Van Eenoo P., Delbeke F.T., Roels K., De Backer P.: Simultaneous quantitation of ephedrines in urine by gas chromatography–nitrogen–phosphorus detection for doping control purposes. *Journal of Chromatography B* **760** (2001), 255–261.
- [58] LeBelle M. J., Savard C., Dawson B. A., Black D. B., Katyal L. K., Zrcek F., By A. W.: Chiral identification and determination of ephedrine, pseudoephedrine, methamphetamine and metecathinone by gas chromatography and nuclear magnetic resonance. *Forensic Science International* **71** (1995), 215–223.

- [59] Wang M., Marriott P. J., Chan W. H., Lee A. W. M., Huie C. W.: Enantiomeric separation and quantification of ephedrine-type alkaloids in herbal materials by comprehensive twodimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1112** (2006), 361–368.
- [60] Uekusa K., Ono T., Hayashida M., Nihira M., Ohno Y.: GC/MS analysis of an herbal dietary supplement containing ephedrine. *Legal Medicine* **11** (2009), 573–575.
- [61] Kankaanpää A., Gunnar T., Ariniemi K., Lillsunde P., Mykkänen S., Seppälä T.: Singlestep procedure for gas chromatography–mass spectrometry screening and quantitative determination of amphetamine-type stimulants and related drugs in blood, serum, oral fluid and urine samples. *Journal of Chromatography B* **810** (2004), 57–68.
- [62] Spyridaki M. H., Tsitsimpikou C. J., Siskos P. A., Georgakopoulos C. G.: Determination of ephedrine in urine by gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **758** (2001), 311–314.
- [63] Sander L. C., Sharpless K. E., Satterfield M. B., Ihara T., Phinney K. W., Yen J. H., Wise S. A., M. L., Lam J. W., McCooeye M., Gardner G., Fraser C., Sturgeon R., Roman M.: Determination of ephedrine alkaloids in dietary supplement standard reference materials. *Analytical Chemistry* **77** (2005), 3101–3112.
- [64] Roman M. C.: Determination of ephedrine alkaloids in botanicals and dietary supplements by HPLC–UV: collaborative study. *Journal of AOAC International* **87** (2004), 1–14.
- [65] Trujillo W. A., Sorenson W. R.: Determination of ephedrine alkaloids in dietary supplements and botanicals by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: collaborative study. *Journal of AOAC International* **86** (2003), 657–668.
- [66] Beyer J., Peters F. T., Kraemer T., Maurer H. H.: Detection and validated quantification of nine herbal phenalkylamines and methcathinone in human blood plasma by LC–MS/MS with electrospray ionization. *Journal of Mass Spectrometry* **42** (2006), 150–160.
- [67] Badoud F., Grata E., Perrenoud L., Saugy M., Rudaz S., Veuthey J. L.: Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. II. Confirmatory analysis. *Journal of Chromatography A* **1217** (2010), 4109–4119.
- [68] Deventer K., Pozo O. J., Eeno P., Delbeke F. T.: Development and validation of an LC–MS/MS method for the quantification of ephedrine in urine. *Journal of Chromatography B* **877** (2009), 369–374.
- [69] Li G., Zhang Z., Chen X., Hu, Z., Zhao Z., Hooper M.: Analysis of ephedrine in ephedra callus by acetonitrile modified capillary zone electrophoresis. *Talanta* **48** (1999), 1023–1029.
- [70] Mateus–Avois L., Mangin P., Saugy M.: Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of ephedrine and related compounds in urine without extraction. *Journal of Chromatography B* **791** (2003), 203–216.
- [71] Concheiro M., dos Santos Sadler Simões S. M., Quintela O., de Castro A., Rodrigues Dias M. J., Cruz A., López-Rivadulla M.: Fast LC–MS/MS method for the determination of amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB and PMA in urine. *Forensic Science International* **171** (2007), 44–51.

- [72] Ludwiczuk A., Skalicka-Wozniak K., Georgiev M. I.: Terpenoids. In: *Pharmacognosy. Fundamentals, Applications and Strategies*. Academic Press, 2017, p. 233–266 .
- [73] Buckle J.: *Clinical Aromatherapy: Essential Oils in Healthcare* (3rd Edition). Churchill, Elsevier, 2014.
- [74] Zwenger S., Basu C.: Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Review* **3** (2008), 1–7.
- [75] Cheng A. X., Lou Y. G., Mao Y. B., Lu S., Wang L. J., Chen X. Y.: Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology* **49** (2007), 179–186.
- [76] Maffei M. E., Gertsch J., Appendino G.: Plant volatiles: production, function and pharmacology. *Natural Products Reports* **28** (2011), 1359–1380.
- [77] *The Merck Index – An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. O'Neil, M. J. (ed.) Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2013.
- [78] Patel T., Ishiui Y., Yosipovitch G.: Menthol: A refreshing look at this ancient compound. *Journal of the American Academy of Dermatology* **57** (2007), 873–878.
- [79] Eisenreich W., Sagner S., Zenk M. H., Bacher A.: Monoterpene essential oils are not of mevalonoid origin. *Tetrahedron Letters* **38** (1997), 3889–3892.
- [80] Croteau R. B., Davis E. M., Ringer K. L., Wildung M. R.: (–)-Menthol biosynthesis and molecular genetics. *Naturwissenschaften* **92** (2005), 562–577.
- [81] [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Book%3A\\_Logic\\_of\\_Organic\\_Synthesis\\_\(Rao\)/01%3A\\_Synthesis\\_of\\_Organic\\_Molecules](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3A_Logic_of_Organic_Synthesis_(Rao)/01%3A_Synthesis_of_Organic_Molecules) (navštíveno 15. června 2021).
- [82] Czégény Z., Bozi J., Sebestyén Z., Blazsó M., Jakab E., Barta-Rajnai E., Forster M., Nicol J., McAdam K. G., Liu C.: Thermal behaviour of selected flavour ingredients and additives under simulated cigarette combustion and tobacco heating conditions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **121** (2016), 190–204.
- [83] Gallagher P., Jones S.: A stability and validation study of 1 % (v/v) menthol in aqueous cream. *International Journal of Pharmacy Practice* **5** (1997), 101–104.
- [84] Limpanuparb T., Lorpaiboon W., Chinsukserm K.: An *in silico* investigation of menthol metabolism. *PLOS One* **14** (2019), e0216577.
- [85] Brauchi S., Orio P., Latorre R.: Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101** (2004), 15494–15499.
- [86] Galeotti N., Di Cesare Mannelli L., Mazzanti G., Bartolini A., Ghelardini C.: Menthol: A natural analgesic compound. *Neuroscience Letters* **322** (2002), 145–148.
- [87] Thorup I., Würtzen G., Carstensen J., Olsen P.: Short term toxicity study in rats dosed with pulegone and menthol *Toxicology letters*. **19** (1983), 207–210.
- [88] Rakieten N., Rakieten M. L., Boykin M.: Effects of menthol vapor on the intact animal with special reference to the upper respiratory tract. *Journal of the American Pharmaceutical Association* **43** (1954), 390–392.

- [89] Lin Y. T., Wu H. L., Kou H. S., Wu S. M., Chen S. H.: Enantiomeric analysis of (+)-menthol and (-)-menthol by fluorogenic derivatization and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1087** (2005), 223–228.
- [90] Shaikh K. A., Patil S. D.: Sensitive and selective method for the analysis of menthol from pharmaceutical products by RP-HPLC with refractive index detector. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* **2** (2010), 360–364.
- [91] Hamasaki K., Kato K., Watanabe T., Yoshimura Y., Nakazawa H., Yamamoto A., Matsunaga A.: Determination of *l*-menthol in pharmaceutical products by high performance liquid chromatography with polarized photometric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **16** (1998), 1275–1280.
- [92] Barron D., Pabst A.: Recent advances in high-performance liquid chromatography of volatile natural products. In: *Modern Phytochemical Methods*. Springer, Boston, 1991.
- [93] Parkin J. E.: High-performance liquid chromatographic assay of menthol using indirect photometric detection. *Journal of Chromatography A* **303** (1984), 436–439.
- [94] Yurova N. G., Popov D. M., Denisova T. A.: Photometric determination of menthol. *Farmatsiya (Moscow)* **30** (1981), 65. *CA* **94**:145418.
- [95] Safronova T. O., Popov D. M., Shevchenko T. G.: Photocolorimetric determination of menthol in oil and tincture of peppermint. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **16** (1982), 68–70.
- [96] Abualhasan M. N., Zaid A. N., Jaradat N., Mousa A.: GC method validation for the analysis of menthol in suppository pharmaceutical dosage form. *International Journal of Analytical Chemistry* **2017** (2017), 1728414.
- [97] Savchenko L. P., Ivanauskas L., Uminska K. A., Barsteigiene Z., Georgiyants V. A.: Development and validation of a gas chromatographic method for the menthol assay in compounding ointment. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **10** (2018), 450–453.
- [98] Gonzáles-Penas E., López-Alvarez M., Martínez de Narvajas F., Ursúa A.: Simultaneous GC determination of turpentine, camphor, menthol and methyl salicylate in a topical analgesic formulation (Dologex®). *Chromatographia* **52** (2000), 245–248.
- [99] Peat J., Frazee C., Kearns G., Garg U.: Determination of menthol in plasma and urine by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). In: *Clinical Applications of Mass Spectrometry in Drug Analysis. Methods in Molecular Biology, volume 1383*. Garg U. (eds) Humana Press, New York, 2016, p. 205–211.
- [100] Wang T. M., Ding L. Q., Jia Y. Q., Jin H. J., Shi R., Li Z., Ma Y. M., Simultaneous determination of six volatile components in Longhu Randan pills using gas chromatography coupled with tripple quadrupole mass spectrometry. *Analytical Methods* **6** (2014), 3713–3717.
- [101] Kořínková P.: *Metody stanovení sulfonamidů ve vodách. Bakalářská práce*. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha, 2008.
- [102] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548382/> (navštíveno 15. června 2021).
- [103] Greenwood D.: Sulfonamides. In: *Antibiotic and Chemotherapy* (9th Edition). Elsevier, 2010.
- [104] Golpashin F., Weiß B., Dürr H.: Photochemische Modell-Studien an lichtdermatoseninduzierenden Pharmaka: Sulfonamide und Sulfonylhansstoffe. *Archiv der Pharmazie* **317** (1984), 906–913.

- [105] Rouf A., Tanyeli C.: Bioactive thiazole and benzothiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* **97** (2015), 911–927.
- [106] Kapoor V. K.: Sulfathiazole. In: *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients. Volume 22*. H. G. Brittain (ed.). Academic Press, New York, 1993, p. 389–430.
- [107] Pawelczyk E., Zajac M.: Specific acid hydrolysis of sulfathiazole. *Acta Poloniae Pharmaceutica* **33** (1976), 479–484.
- [108] Roca M., Althaus R. L., Molina M. P.: Thermodynamic analysis of the thermal stability of sulfonamides in milk using liquid chromatography tandem mass spectrometry detection. *Food Chemistry* **136** (2013), 376–383.
- [109] Keeney E. L.: Sulfathiazole ointment in treatment of cutaneous infections. *The Journal of the American Medical Society* **117** (1941), 1415–1417.
- [110] Glicklich E. A., Sherman D. S.: Toxic effects of sulfathiazole used in treatment of chancroidal infection. *Archives of Dermatology and Syphilology* **43** (1941), 992–996.
- [111] Burgess J. F.: The danger of sulfathiazole ointments. *Canadian Medical Association Journal* **50** (1944), 60–61.
- [112] Dickson F. D., Diveley R. L., Kiene R.: The use of sulfathiazole in the treatment of subacute and chronic osteomyelitis. *The Journal of Bone & Joint Surgery* **23** (1941), 516–520.
- [113] Martel A. C., Zeggane S.: HPLC determination of sulfathiazole in French honeys. *Journal of Liquid Chromatography and Related Sciences*. **26** (2003), 953–961.
- [114] Diaz T. G., Cabanillas A. G., Salinas F.: Rapid determination of sulfathiazole, oxytetracycline and tetracycline in honey by high-performance liquid chromatography. *Analytical Letters* **23** (1990), 607–616.
- [115] Kaufmann A., Roth S., Ryser B., Widmer M., Guggisberg D.: Quantitative LC/MS–MS determination of sulfonamides and some other antibiotics in honey. *Journal of AOAC International* **85** (2002), 853–860.
- [116] Karami-Osboo R., Miri R., Javidnia K., Shojaee M. H., Kobarfard F.: Extraction and determination of sulfadiazine and sulfathiazole in milk magnetic solid phase extraction HPLC–UV. *Analytical Methods* **7** (2015), 1586–1589.
- [117] Nesměrák K., Kudláček K., Čambal P., Štícha M., Kozlík P., Červený V.: Authentication of senna extract from the eighteenth century and study of its composition by HPLC–MS. *Monatshefte für Chemie* **151** (2020), 1241–1248.
- [118] Nesměrák K., Kunešová J.: Farmaceutická historie kapucínského kláštera v Praze na Hradčanech. Část I. Klášterní lékárna. *Česká a Slovenská farmacie* **64** (2015), 79–94.
- [119] Collegium Pharmaceuticum: *Dispensatorium pharmaceuticum Austriaco-Viennense*. Kürner, Vienna, 1729.
- [120] Facultas Medica: *Dispensatorium medico-pharmaceuticum Pragense*. Vetero-Pragae, 1739.
- [121] Tan J., Zheng M., Duan S., Zeng Y., Zhang Z., Cui Q., Zhang J., Hong T., Bai J., Du S.: Chemical profiling and screening of the marker components in the fruit of *Cassia fistula* by HPLC and UHPLC/LTQ–Orbitrap MS<sup>n</sup> with chemometrics. *Molecules* **23** (2018), 1501.

- [122] Liao W., Chiu K., Mabuni C., Soliman M.: Analysis of sennosides A and B from dieter's tea by HPLC–diode array spectrophotometry and negative ion electrospray mass spectrometry. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **61** (1998), 317–324.
- [123] Gao L. L., Guo T., Xu X. D., Yang J.S.: Rapid identification and simultaneous analysis of multiple constituents from *Rheum tanguticum* Maxim. Ex Balf. by UPLC–Q–TOF–MS. *Natural Product Research* **31** (2017), 1529–1535.
- [124] Wu H., Feng F., Jiang X., Hu B., Qiu J., Wang C. H., Xiang Z.: Pharmacokinetic and metabolic profiling studies of sennoside B by UPLC–MS/MS and UPLC–Q–TOF–MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **179** (2020), 112938.
- [125] Tircova B., Kozlk P.: HILIC–MS/MS method for analysis of ephedrine in internet–available drugs. *Chromatographia* **80** (2017), 523–528.
- [126] Karaminkov R., Chervenkov S., Härter P., Neusser H. J.: Resonance-enhanced two-photon ionization mass spectroscopy of ephedrine: Indication for a state–selective fragmentation in a flexible molecule. *Chemical Physical Letters* **442** (2007), 238–244.
- [127] Holak W.: Atomic absorption spectrophotometric determination of mercury in mercury–containing drugs: Collaborative study. *Journal – Association of Official Analytical Chemists* **66** (1953), 1203–1206.
- [128] Linhart O.: *Speciační analýza arsenu a rtuti pomocí postkolonového generování těkavých sloučenin pro potřeby atomových spektrometrických metod. Disertační práce.* Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha, 2018.
- [129] Fatmi A. A., Taylor D., Masih S. Z.: Determination of sulfonamides in triplesulfa cream by HPLC method. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **10** (1984), 31–43.
- [130] Kristiansen G. K., Brock R., Bojesen G.: Comparison of flow injection/thermospray MS/MS and LC/thermospray MS/MS methods for determination of sulfonamides in meat and blood. *Analytical Chemistry* **66** (1994), 3253–3258