

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Karel Kudláček

**ANALÝZA HISTORICKÝCH LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ  
S OBSAHEM ALKALOIDŮ, SULFANILAMIDU, DERIVÁTŮ  
BARBITUROVÉ KYSELINY A DERIVÁTU PYRAZOLU**

**Analysis of Historical Pharmaceutical Preparations  
Containing Alkaloids, Sulfanilamide, Derivatives  
of Barbituric Acid, and Derivative of Pyrazolone**

Diplomová práce

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

Praha 2016

## **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 v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 14. května 2016

## **Poděkování**

Poděkování patří především RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D., za odborné vedení diplomového projektu a cenné rady. Děkuji také RNDr. Václavu Červenému, Ph.D. za odborné konzultace při analýze atomovou absorpční spektrometrií a RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D. za umožnění měření hmotnostních spekter. Za poskytnutí studovaných vzorků děkuji PharmDr. Janu Babicovi, Ph.D. z Českého farmaceutického muzea v Kuksu.

## Abstrakt

Léčivé přípravky obsahující chinin (injekční roztoky), sulfanilamid, aminofenazon, barbital (tablety), kofein, fenobarbital (dražé) a theofylin (čípek) staré sedmdesát let byly analyzovány pomocí RP-HPLC. Kvantifikace probíhala metodou HPLC-UV a UV-spektrofotometrií. Degradální produkty byly detegovány metodami HPLC-UV, a HPLC-MS. Separační podmínky byly optimalizovány. Chininové vzorky obsahují 92 %, resp. 87 % deklarovaného obsahu chininu. Chinotoxin byl identifikován jako rozpadový produkt chininu. Koncentrace theofylinu a kofeinu v příslušných formách zůstala po letech nezměněna. Nižší množství účinné látky (pokles o 8–22 %) bylo nalezeno v přípravcích obsahující sulfanilamid, barbital, fenobarbital a aminofenazon. Degradální produkty nebyly u těchto léčiv nalezeny.

**Klíčová slova:** degradace, dlouhodobá stabilita, léčiva, RP-HPLC, spektrometrie

## Abstract

Pharmaceutical preparations of quinine (injection solutions), sulfanilamide, aminophenazone, barbital (tablets), caffeine, phenobarbital (dragee), and theophylline (suppositories) about seventy years old were analyzed using RP-HPLC. Samples were quantified by HPLC-UV and UV-spectrophotometry. Products of degradation were identified using HPLC-UV and HPLC-MS. Conditions of separation were optimized. The samples of quinine injection solutions consist of 92% or 87% of declared quinine content. Quinotoxine has been identified as the product of quinine degradation. The quantification of theophylline in suppositories and caffeine in dragee did not show any degradation after more than 67 years from their manufacturing. Decrease of potent amount (decrease about 8–22 %) were found in drugs containing sulfanilamide, barbital, phenobarbital and aminophenazone. Products of degradation of these pharmaceuticals were not found.

**Key words:** degradation, long-term stability, pharmaceuticals, RP-HPLC, spectrometry

## Obsah

1	CÍL PRÁCE.....	8
2	TEORETICKÝ ÚVOD.....	9
2.1	Stabilita léčivých látek a lékových forem.....	9
2.2	Chinin.....	11
2.3	Sulfanilamid.....	15
2.4	Aminofenazon.....	17
2.5	Barbital.....	20
2.6	Fenobarbital.....	22
2.7	Kofein.....	25
2.8	Theofylin.....	28
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	31
3.1	Analyzované vzorky.....	31
3.1.1	Analyzované vzorky injekčních roztoků.....	31
3.1.2	Analyzované vzorky tablet.....	33
3.1.3	Analyzované vzorky dražé.....	34
3.1.4	Analyzované vzorky čípků.....	35
3.2	Použité chemikálie.....	35
3.3	Postupy měření a vyhodnocení výsledků.....	36
3.3.1	Použité přístroje.....	36
3.3.2	Analýza vzorku „Chinin-calcium“.....	36
3.3.3	Analýza vzorku „Cardiazol-chinin“.....	37
3.3.4	Analýza vzorku „Proseptol“.....	38
3.3.5	Analýza vzorku „Veraethyl“.....	39
3.3.6	Analýza vzorku „Guaral“.....	40
3.3.7	Analýza vzorku „Syntophyllin“.....	41
3.4	Statistické zpracování dat.....	42
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	43
4.1	Analýza injekčního roztoku „Chinin-calcium“.....	43
4.1.1	Optimalizace chromatografických podmínek.....	43
4.1.2	Kalibrační závislosti.....	44
4.1.3	HPLC analýza vzorku.....	45
4.1.4	Stanovení obsahu chininu ve vzorku „Chinin-calcium“.....	50
4.1.5	Stanovení obsahu glukonanu vápenatého ve vzorku „Chinin-calcium“.....	50
4.2	Analýza injekčního roztoku „Cardiazol-chinin“.....	51
4.2.1	HPLC analýza vzorku.....	51

---

4.2.2	Stanovení obsahu chininu ve vzorku „Cardiazol-chinin“ .....	54
4.3	Analýza tablety „Proseptol“ .....	55
4.3.1	Optimalizace chromatografických podmínek .....	55
4.3.2	Kalibrační závislosti .....	58
4.3.3	HPLC analýza vzorku .....	58
4.3.4	Stanovení obsahu sulfanilamidu ve vzorku „Proseptol“ .....	60
4.4	Analýza tablety „Veraethyl“ .....	60
4.4.1	Optimalizace chromatografických podmínek .....	60
4.4.2	Kalibrační závislosti .....	63
4.4.3	HPLC analýza vzorku .....	64
4.4.4	Stanovení obsahu aminofenazonu ve vzorku „Veraethyl“ .....	67
4.4.5	Stanovení obsahu barbitalu ve vzorku „Veraethyl“ .....	67
4.5	Analýza dražé „Guaral“ .....	68
4.5.1	Optimalizace chromatografických podmínek .....	68
4.5.2	Kalibrační závislosti .....	72
4.5.3	HPLC analýza vzorku .....	73
4.5.4	Stanovení obsahu kofeinu ve vzorku „Guaral“ .....	76
4.5.5	Stanovení obsahu fenobarbitalu ve vzorku „Guaral“ .....	76
4.6	Analýza čípku „Syntophyllin“ .....	77
4.6.1	Optimalizace chromatografických podmínek .....	77
4.6.2	Kalibrační závislosti .....	79
4.6.3	HPLC analýza vzorku .....	79
4.6.4	Stanovení obsahu theofylinu ve vzorku „Syntophyllin“ .....	81
5	ZÁVĚR .....	82
	LITERATURA .....	84

## Seznam použitých zkratk a symbolů

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (angl. atmospheric pressure chemical ionization)
$A_s$	faktor asymetrie píku
DAD	detektor s diodovým polem (angl. diode array detector)
ESI	ionizace elektrosprejem (angl. electrospray ionization)
FLD	fluorescenční detekce
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (angl. high-performance liquid chromatography)
MS	hmotnostní spektrometrie (angl. mass spectrometry)
$n$	počet měření <i>nebo</i> počet teoretických pater
Q-TOF	trojitý kvadrupól ve spojení s analyzátozem „doby letu“ (angl. triple quadrupole and time of flight)
QTrap	trojitý kvadrupól ve spojení s iontovou pastí (angl. triple quadrupole and ion trap)
$R_{1,2}$	rozlišení píku
TISP	turboionspray ionizace
TOF	doba letu (angl. time of flight)
$t_r$	retenční čas (min)
UV	ultrafialový
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky píku (min)
$\lambda_{em}$	emisní vlnová délka
$\lambda_{ex}$	excitační vlnová délka

## **1 CÍL PRÁCE**

Cílem předkládané diplomové práce je analýza historických léčivých přípravků, stanovení obsahu účinné látky a identifikace případných degradačních produktů. Stabilita léčiv se obvykle sleduje po dobu maximálně pěti let. V tomto časovém úseku by měla být zachována jakost léčiva, které je skladováno za optimálních specifikovaných podmínek. Analýzou historických léčivých přípravků je možné posoudit stabilitu účinných látek a identifikovat případné degradační produkty v léčivu v delším časovém horizontu. Právě znalostí kvality a kvantity účinné látky lze posuzovat, zda došlo ke změně terapeutické účinnosti léčivého přípravku.



## 2 TEORETICKÝ ÚVOD

Analytická chemie hraje významnou roli při studiu složení materiálů používaných nebo vyráběných v minulosti. Výsledky takových analýz poskytují obraz o technologii, sociálních zvycích a jiná zajímavá zjištění v kontextu analyzovaného objektu, zároveň mohou být důležité pro případné restaurátorské a konzervátorské účely. Jednou ze zajímavých oblastí aplikace analytické chemie na historické objekty je studium složení historických vzorků léčivých přípravků, ať již za účelem jejich identifikace (v případě, že není známo, o jaké léčivo se jedná), objasnění neznámé či nejasné receptury, získání informací o kvalitě použitých surovin či stanovení degradačních produktů stárnutí léčivých látek. Příkladem může být analýza léčivého přípravku z cínové pyxidy nalezené ve starověkém lodním vraku v zálivu Baratti, datované do let 140–130 př. Kr. Podle identifikovaných komponent (hydrozincit, smithonit, hematit, škrob, zvířecí a rostlinný tuk a smůla z borovice) se jednalo pravděpodobně o oftalmologický preparát [1]. Jinými příklady jsou analýza mastí ze 16. století [2] nebo pryskyřic a balzámů z 18. století [3].

Analyzovanými vzorky v této práci byly historické léčivé přípravky (injekční roztoky, tablety, dražé a čípek) získané ze sbírek Českého farmaceutického muzea v Kuksu. Účinnými látkami léčiv byly alkaloidy, sulfonamidy, deriváty barbiturové kyseliny a pyrazolu, stáří v rozmezí sedmdesáti a osmdesáti let. Vzorky byly analyzovány separačními metodami HPLC s fluorescenčním a UV detektorem a HPLC-MS, a dále spektrometrickými metodami. Postupy převzaté z literatury byly optimalizovány. Účinné látky byly kvantifikovány a případné degradační produkty byly identifikovány.

### 2.1 Stabilita léčivých látek a lékových forem

Léčivá látka může podléhat různým chemickým reakcím, jejichž následkem dochází k úbytku léčivé látky a k tvorbě produktu, který může být toxický [4]. Z toho důvodu je

důležité, aby kvalita léčivé látky, nebo přesněji jejího léčivého přípravku zůstala zachována až do data expirace. Terapeutická účinnost souvisí s množstvím léčivé látky, proto se nejčastěji sleduje její úbytek ve zvoleném časovém úseku [4, 5]. Léčivá látka může podléhat různým degradačním reakcím, jejichž produkty mohou být toxické. Identifikací těchto produktů lze objasnit degradační mechanismus účinné látky, jehož znalost je důležitá z několika důvodů:

1. Degradační reakcí vzniká toxický produkt. Příkladem je málo toxický pralidoxim, který v bazickém prostředí podléhá rozpadové reakci za tvorby toxického kyanidu [4, 6].
2. Léčivá látka by měla být stabilní nejen ve své lékové formě, ale také po její aplikaci. Mnoho léčivých látek může být stabilní při neutrálním pH, které je shodné s prostředím tenkého střeva, ale mohou podléhat rozpadu při nízkých hodnotách pH žaludečních šťáv [4].

Léčivé látky mohou na základě své chemické struktury podléhat nejrůznějším degradačním reakcím. Nejčastěji se jedná o hydrolýzu, dehydrataci, izomerizaci a racemizaci, eliminaci, oxidaci, nebo o komplexní interakci s pomocnými, nebo jinými účinnými látkami. Tyto reakce mohou být ovlivněny řadou faktorů, jako je světlo, teplota, vlhkost, přístup vzduchu (vzdušná oxidace), pH, nebo kontaminace mikroorganismy.

Hydrolýza je jednou z nejčastějších degradačních reakcí. Pro mnoho léčivých přípravků je běžné, že se dostanou do kontaktu s vodou. Léčivé přípravky v pevné formě často přicházejí do kontaktu se vzdušnou vlhkostí [4]. K hydrolýze dochází nejčastěji u léčivých látek obsahující esterovou funkční skupinu, jako jsou tropanové alkaloidy, kokain a některá lokální anestetika (prokain, tetrakain). Hydrolýze také podléhají léčivé látky obsahující amidovou funkční skupinu. Jedná se například o alkaloid ergometrin, nebo barbituráty [5].

Další častou degradační reakcí je oxidace. Léčivé přípravky jsou vystaveny vzdušnému kyslíku během procesu přípravy, nebo během dlouhodobého skladování. Oxidační mechanismus léčivé látky souvisí s její strukturou a s přítomností reaktivního kyslíku nebo jiných oxidantů.

Eliminaci nejčastěji podléhají karboxylové kyseliny, které mohou odštěpit molekulu oxidu uhličitého. Příkladem může být dekarboxylace 4-aminosalicylové kyseliny [4].

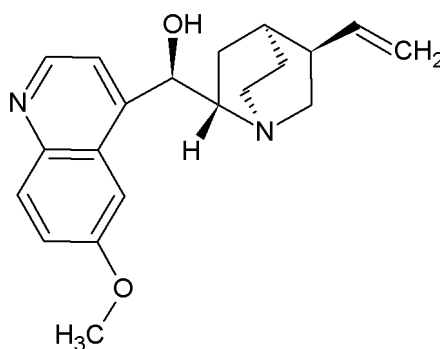
Lékové formy málokdy obsahují samotnou účinnou látku. Často bývají přítomny podpůrné látky, které mohou s léčivou látkou reagovat, stejně tak mohou být v lékové formě přítomny dvě i více léčivých látek, které mezi sebou reagují.

Vnitřní faktory, jako je struktura léčivé látky, nebo faktory vnějšího prostředí jako je pH, iontová síla, vlhkost, světlo, kyslík či přísady a pomocné látky mají vliv na degradační reakce. Stabilita pevných látek pak záleží také na bodu tání, krystalizaci a hygroskopicitě. Na stabilitu léčivého přípravku bude mít vliv i jeho forma. Injekční roztoky, které jsou zataveny ve skleněných ampulích, budou pravděpodobně stabilnější delší dobu, protože jsou lépe izolovány od okolního prostředí. Pro skladování léčivých přípravků je obecně vhodnější zamezit vyšším teplotám, přístupu vzduchu a světla.

Léčivé i pomocné látky existují v mikroskopických fyzikálních stavech s různou mírou uspořádání. Příkladem mohou být amorfni, krystalické, hydratační a solvatační stavy. Léčivé i pomocné látky mohou tak s časem přecházet z nestabilních či metastabilních stavů do termodynamicky stabilních stavů. Fyzikální stabilita je ovlivněna mnoha faktory shodnými s faktory, které mají vliv na chemickou stabilitu [4].

## 2.2 Chinin

*Charakteristika.* Chinin je alkaloid s chinolinovým kruhem. Jde o dvojsytnou bázi, která s kyselinami vytváří soli chininu. Lze jej připravit synteticky, nebo získat z kůry chinovníku červeného (*Cinchona succirubra*) a chinovníku lékařského (*Cinchona officinalis*). Jeho systematický název je (*R*)-(6-methoxychinolin-4-yl)((*2S,4S,8R*)-8-vinyl-1-azabicyclo[2,2,2]oktan-2-yl)methanol, CASN 130-95-0, struktura je uvedena na obr. 2.1. Sumární vzorec chininu je  $C_{20}H_{24}N_2O_2$  a relativní molekulová hmotnost je 324,42 (cit. [6, 7]).

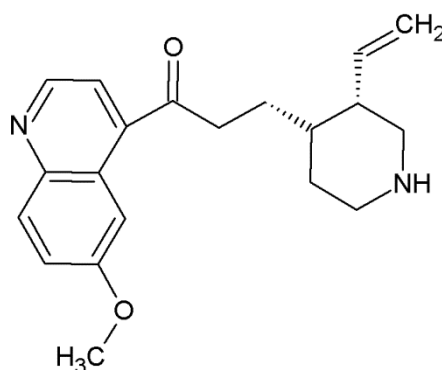


Obr. 2.1: Strukturální vzorec chininu.

*Fyzikální a chemické vlastnosti.* Je to bílý mikrokrytalický prášek s teplotou tání  $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bez zápachu, velmi hořké chuti. Je dobře rozpustný ve vodě, v etheru a alkoholu [6, 7].

*Izolace.* Roku 1820 byl chinin izolován z kůry chinovníku francouzskými chemiky Pierre-Joseph Pelletierem a Joseph-Bienaimem Caventou. Tato metoda je dosud jedinou ekonomicky výhodnou metodou získávání chininu. Prášková kůra chinovníku je smíchána s oxidem vápenatým, vodou a s roztokem hydroxidu sodného a ponechána 24 hodin. Směs je pak extrahována benzenem pod zpětným chladičem. Benzenový extrakt je za horka filtrován do dělicí nálevky obsahující kyselinu sírovou za účelem vytvoření hydrogensíranu chininu. Oddělená směs kyseliny a hydrogensíranu chininu je pak zahřívána a neutralizována uhličitánem sodným (hydrogensíran je převeden na síran). Pročištění směsi se provádí, po okyselení pár kapkami kyseliny sírové, přidáním aktivního uhlí, zahříváním a následným filtrováním. Chinin sulfát se po vychladnutí filtrátu oddělí od roztoku filtrací. Pro přípravu čistého chininu se chinin sulfát rozpouští ve vroucí vodě spolu s uhličitánem sodným a následně se nechává krystalizovat [7].

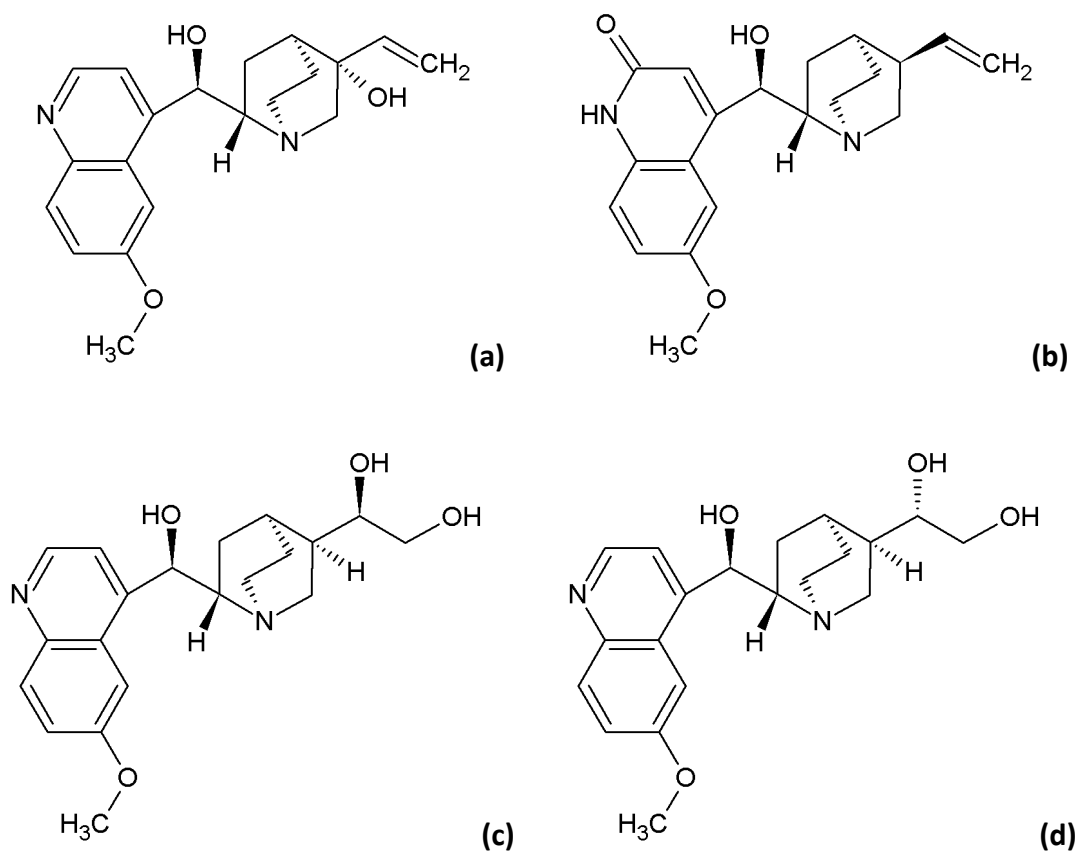
*Syntéza.* V polovině 19. století se August Wilhelm von Hofman zabýval syntézou chininu z uhelného dehtu. Předpokládal reakci dvou ekvivalentů naftylaminu se dvěma molekulami vody. Roku 1854 byl Adolfem Streckerem upřesněn sumární vzorec chininu a o dva roky později se William Henry Perkin pokusil syntetizovat chinin za pomoci *N*-allyl-*o*-toluidin a kyslíku se současným odštěpením molekuly vody, což ale mělo za následek tvorbu barviva mauveinu. V té době Louis Pasteur provedl degradaci chininu kyselinou sírovou na chinotoxin (obr. 2.2), který byl roku 1918 použit Paulem Rabem jako výchozí látka pro zpětnou syntézu chininu, respektive jeho stereoizomerů. Koncem 2. světové války (1944) byla navržena Robertem B. Woodwardem syntéza chinotoxinu. Vladimír Prelog demonstroval degradaci chinotoxinu na homomerochinin, který je snáze syntetizovatelný a následně představil i zpětnou rekonstrukci chinotoxinu [8, 9]. Milan Uskoković v roce 1970 představil syntézu chininu se stereochemickou kontrolou na většině chirálních center, na kterou později navázal Gilbert Stork [8].



Obr. 2.2: Strukturální vzorec chinotoxinu.

---

*Farmakologie.* Chinin působí jako protoplazmatický jed, inhibuje řadu enzymů a má dlouhotrvající lokální anestetický účinek. Roztoky chininu a jeho solí mají silně hořkou chuť [6, 9]. Používá se v medicíně jako antipyretikum a antimalarikum. Při rychlém intravenózním podání dochází k těžké hypotenzi, arytmií a akutnímu oběhovému selhání. Doporučená dávka chininu pro dospělého je 600 mg infuzí, pomalu podávané. Pro intravenózní podání je vhodné chinin rozpustit ve fyziologickém roztoku s 5% obsahem dextrosy. Při léčbě malárie je obvyklá orálně podávaná dávka v podobě kapslí chininu nebo jeho solí o obsahu 325 mg čtyřikrát denně po dobu jednoho týdnu. Letální dávka chininu orálně pro dospělého jedince je přibližně 8 g. Podle literatury [11, 12] je chinin jak v pevné formě (v tabletě), tak i v roztoku (jako jeho dihydrochloridová sůl pro intravenózní podání) v čase stabilní a nedochází k jeho degradaci. Při zahřívání na teplotu převyšující 100 °C v přítomnosti kyseliny, např. acetylsalicylové, dochází k oxidaci hydroxylové skupiny a k rozrušení chinuklidinového kruhu za vzniku toxičtějšího chinotoxinu, který je bez antipyretického účinku. Antimalarický účinek je slabší než u chininu [12]. K exkreci metabolitů chininu dochází především močí [6], podle literatury [13, 14] se vylučuje v největším zastoupení jako 3-hydroxychinin, jehož struktura je spolu s dalšími metabolity uveden na obr. 2.3.

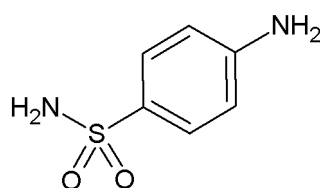


Obr. 2.3: Metabolity chininu: (a) (3*S*)-hydroxychinin, (b) 2'-chininon, (c) (10*R*)-10,11-dihydroxydihydrochinin, (d) (10*S*)-10,11-dihydroxydihydrochinin.

*Analýza.* Chinin lze analyzovat pomocí separačních metod. Vedle plynové chromatografie [7] se chinin stanovuje kapalinovou chromatografií [6, 7]. V literatuře je popsáno stanovení reversní kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí v léčivech a biologických tekutinách s kvantifikačním limitem  $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$  [15] a ve standardu chininu [16]. Pro stanovení chininu v léčivech byla popsána kvantifikace kapalinovou chromatografií s UV detekcí [17]. Kapalinová chromatografie ve spojení s Q-TOF jako hmotnostním detektorem byla popsána pro analýzu standardu chininu s elektrosprejovou ionizací [14]. Byla popsána [18] analýza standardu chininu za použití trojitého kvadrupólu jako hmotnostního analyzátoru s elektrosprejovou ionizací v pozitivním módu. Kvantifikační limit této metody je  $10 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$ . V literatuře [19] je popsána analýza chininu metodou hmotnostní spektrometrie s elektronovou a elektrosprejovou ionizací. Ke stanovení chininu lze také použít UV-spektrofotometrii a spektrofluorimetrii [6, 7].

## 2.3 Sulfanilamid

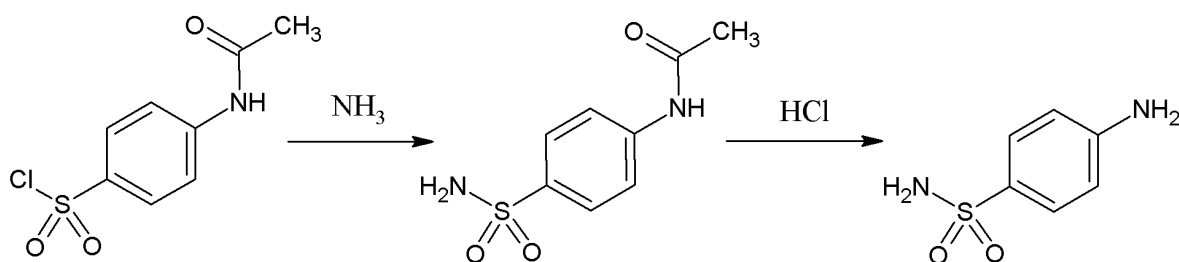
*Charakteristika.* Sulfanilamid se řadí mezi sulfonamidy, které jsou deriváty sulfonových kyselin. Připravují se syntézou substituentů na amidovou ( $-\text{SO}_2-\text{NH}-\text{R}$ ) nebo aminovou ( $-\text{NH}_2$ ) skupinu sulfanilamidového jádra. Vyskytuje se samotný a často i ve formě sodných solí [6, 20]. Systematický název je 4-aminobenzensulfonamid, CASN 63-74-1. Struktura je uvedena na obr. 2.4. Sumární vzorec sulfanilamidu je  $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$  a relativní molekulová hmotnost je 172,20 (cit. [6]).



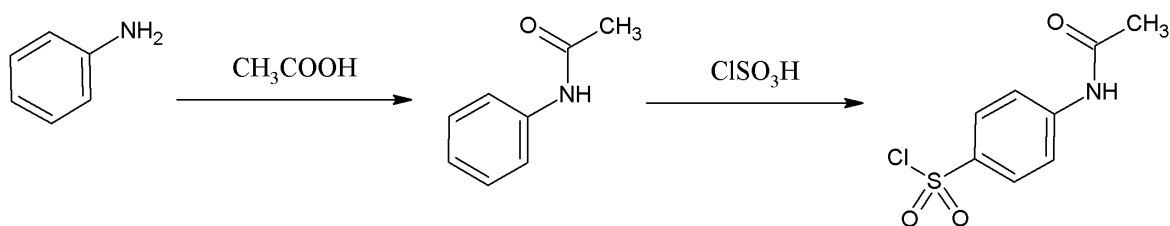
Obr. 2.4: Strukturní vzorec sulfanilamidu.

*Fyzikální a chemické vlastnosti.* Jde o bílý krystalický prášek, který se při zahřívání barví fialovo-modře za vzniku anilinu a amoniaku. Taje při  $165\text{ }^\circ\text{C}$ . Je rozpustný ve vodě, ethanolu a acetonu. V chloroformu a etheru je prakticky nerozpustný. Dobře se rozpouští v roztocích alkalických hydroxidů a kyselině chlorovodíkové [6].

*Syntéza.* Sulfanilamid objevil Paul Gelmo začátkem 20. století [21, 22], který látku syntetizoval ze 4-(acetylamo)-benzensulfonyl chloridu. V roce 1932 bylo patentováno azobarvivo prontosil, u kterého Domagk, Mietzsch a Klarer [23] objevili *in vivo* antibakteriální účinky. Prontosil se při aplikaci metabolizuje na sulfanilamid [24]. Syntéza podle Gelma [22] je uvedena na obr. 2.5. Podle literatury [25] je možné výchozí produkt syntézy podle Gelma připravit z anilinu (obr. 2.6).

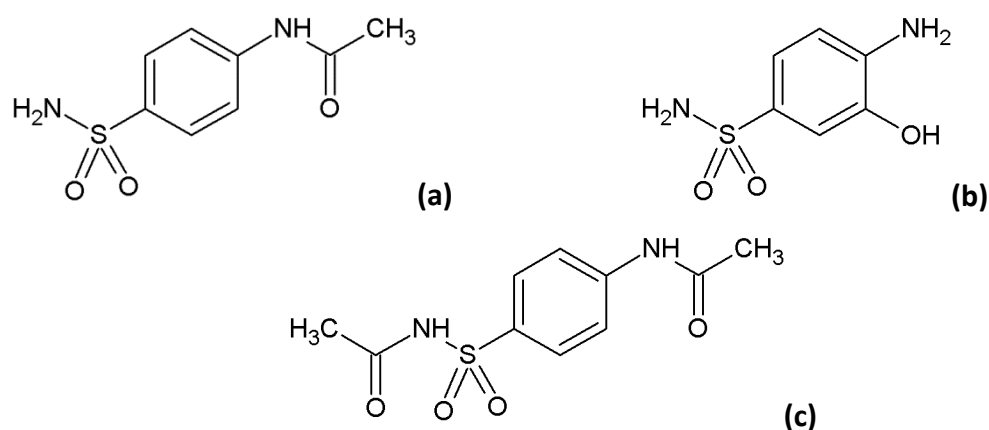


Obr. 2.5: Syntéza sulfanilamidu podle Gelma.



Obr. 2.6: Syntéza 4-(acetylamino)-benzensulfonyl chloridu z anilinu.

*Farmakologie.* Sulfanilamid působí jako antibiotikum na bakterie, které syntetizují listovou kyselinu. Inhibuje gram pozitivní i negativní bakterie, zejména pak na *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *klebsiella*, *nocardia*, *salmonella*, *shigella* a enterobakterie. Bakterie rodu *rickettsia* sulfanilamid naopak stimuluje k růstu. Listovou kyselinu tyto bakterie syntetizují pomocí dihydropteroát synthasy (EC 2.5.1.15), kterou sulfanilamid kompetitivně inhibuje, protože je strukturně blízký substrátu enzymu (*p*-aminobenzoové kyselině). Živočišné buňky jsou proti sulfanilamidu rezistentní, protože nesyntetizují listovou kyselinu. Sulfanilamid se podává orálně, absorbuje se pak v žaludku, méně v tenkém střevu. Terapeutická koncentrace v krvi se pohybuje v rozmezí 40–100 mg dm<sup>-3</sup>. Část absorbované látky se v játrech acetyluje a glukuronizuje. Sulfanilamid se včetně inaktivních metabolitů vylučuje močí [20], jejich struktury jsou uvedeny na obr. 2.7. Hlavním metabolitem sulfanilamidu je 4-acetylaminobenzensulfonamid, dalšími metabolity pak jsou 2-aminofenol-5-sulfonamid a *N*-(4-acetamidobenzensulfonyl)-acetamid [26, 27].



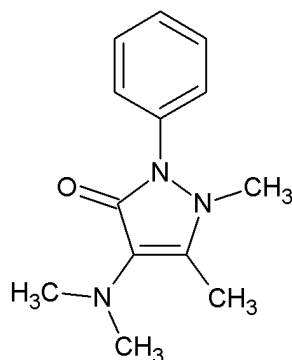
Obr. 2.7: Metabolity sulfanilamidu: (a) 4-acetylaminoacetamidobenzensulfonamid, (b) 2-aminofenol-5-sulfonamid a (c) *N*-(4-acetylaminoacetamidobenzensulfonyl)acetamid.



*Analýza.* Sulfanilamid se analyzuje pomocí plynové i kapalinové chromatografie [6]. V literatuře je popsána analýza metodou reversní kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (QTrap analyzátor) s elektrosprejovou ionizací v matrici veterinárních léčiv (limit kvantifikace  $2,9 \text{ ng g}^{-1}$ ) [28]. Reversní kapalinová chromatografie s UV detekcí byla popsána pro stanovení standardu sulfanilamidu s kvantifikačním limitem  $0,25 \text{ mg dm}^{-3}$  [29]. Sulfanilamid v léčivu lze stanovit také metodou UV-spektrofotometrie [30].

## 2.4 Aminofenazon

*Charakteristika.* Aminofenazon, nebo také aminopyrin, je pyrazolonovým derivátem. Aminofenazon lze připravit z fenazonu, který vzniká syntézou fenylylhydrazinu a ethylacetoacetátu [31, 32]. Vyskytuje se ve formě solí, například jako sůl salicylové a askorbové kyseliny. [6, 24]. Systematický název je 4-dimethylamino-1,5-dimethyl-2-phenyl-4-pyrazolin-3-on, CASN 58-15-1. Struktura je uvedena na obr. 2.8. Sumární vzorec aminofenazonu je  $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$  a relativní molekulová hmotnost je 231,29 (cit. [6]).

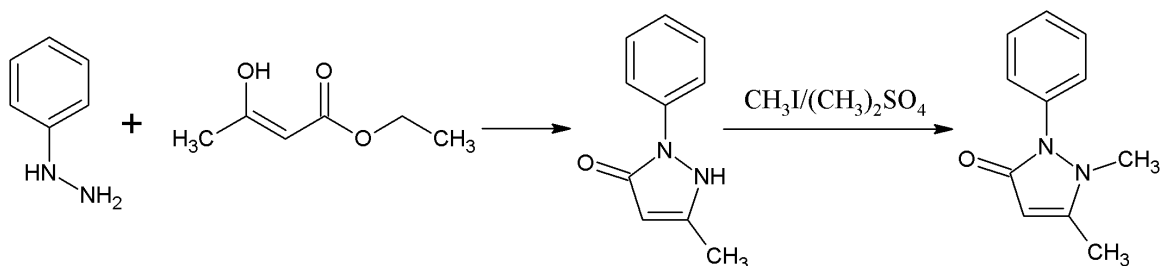


Obr. 2.8: Strukturní vzorec aminofenazonu.

*Fyzikální a chemické vlastnosti.* Tvoří malé bezbarvé krystaly, krystalický prášek má bílou barvu. Teplota tání se pohybuje v rozmezí  $107\text{--}109 \text{ }^\circ\text{C}$ . Je dobře rozpustný v chloroformu a ethanolu. Rozpouští se také ve vodě, benzenu a v etheru [6].

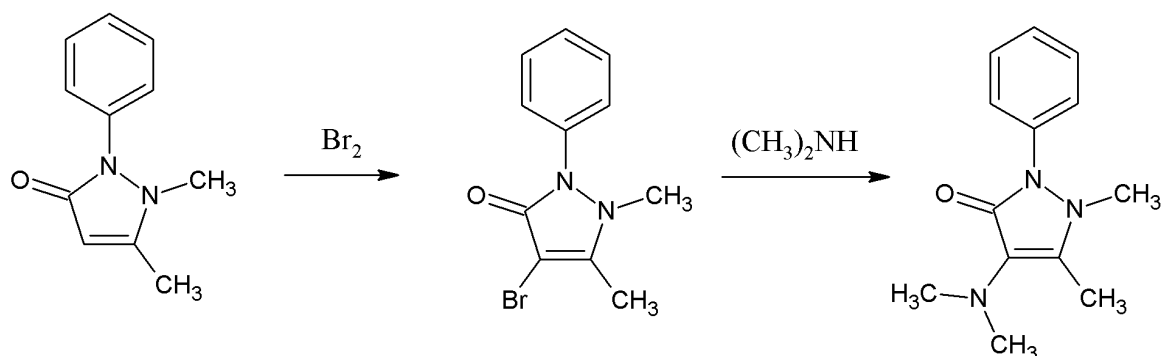
*Syntéza.* V osmdesátých letech 19. století byl Ludwigem Knorrem patentován lék Antipyryn s fenazonem, jako účinnou látkou. V roce 1896 byl uveden lék Pyramidon s účinnou látkou aminofenazonem, který má třikrát silnější antipyretický účinek než fenazon [32]. Aminofenazon lze připravit z fenazonu, který byl Knorrem syntetizován z fenylylhydrazinu a ethylacetoacetátu [31]. Kondenzací reaktantů vzniká meziprodukt

1-fenyl-3-methylpyrozolon, jehož methylací vzniká fenazon. Schéma syntézy je zobrazeno na obr. 2.9.



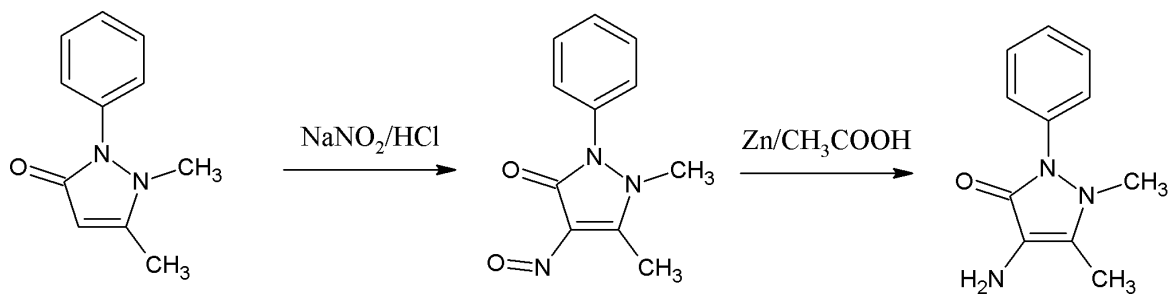
Obr. 2.9: Syntéza fenazonu z fenyldiazinu a ethylacetoacetátu.

Aminofenazon pak lze připravit bromací fenazonu a následnou reakcí s dimethylaminem (obr. 2.10) (cit. [32]).

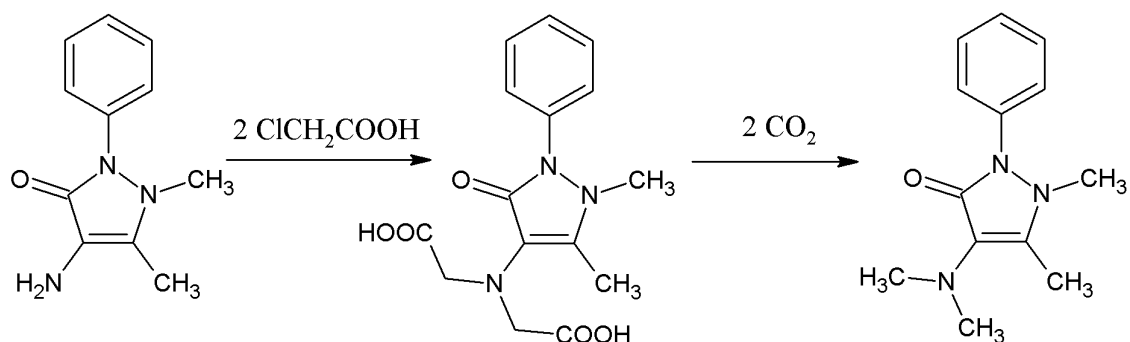


Obr. 2.10: Bromace fenazonu a reakce s dimethylaminem za vzniku aminofenazonu.

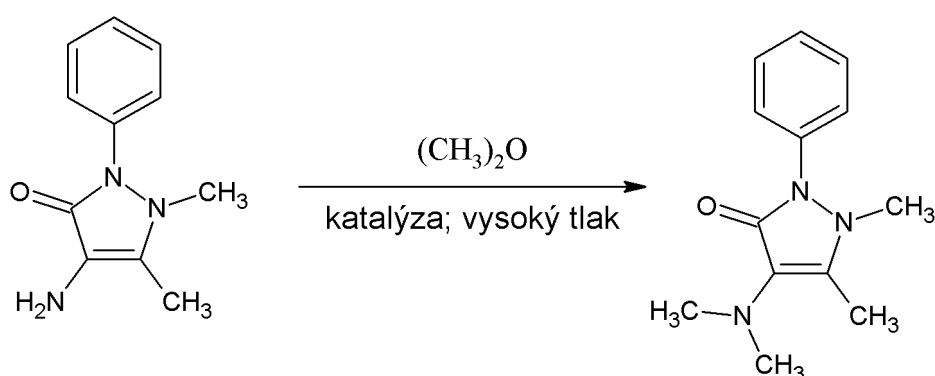
Dalším způsobem přípravy je diazotace fenazonu a následná redukce za vzniku 1-fenyl-2,3-dimethyl-4-amino-5-pyrazolonu (obr. 2.11) a jeho reakcí s dvěma ekvivalenty chloroctové kyseliny (obr. 2.12), nebo katalyticky za vysokého tlaku reakcí 1-fenyl-2,3-dimethyl-4-amino-5-pyrazolonu s dimethyletherem (obr. 2.13) (cit. [32]).



Obr. 2.11: Syntéza meziprojektu 1-fenyl-2,3-dimethyl-4-amino-5-pyrazolonu.

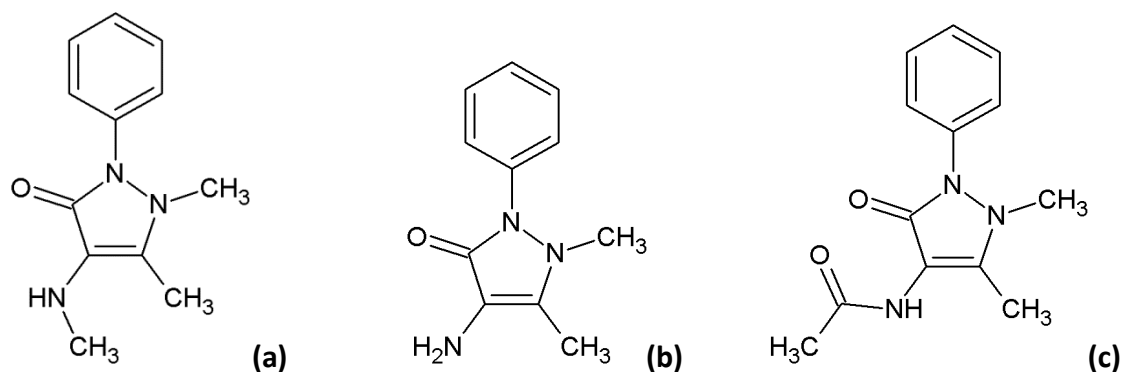


Obr. 2.12: Reakce 1-fenyl-2,3-dimethyl-4-amino-5-pyrazolonu s dvěma ekvivalenty chloroctové kyseliny za vzniku aminofenazonu.



Obr. 2.13: Katalytická reakce 1-fenyl-2,3-dimethyl-4-amino-5-pyrazolonu s dimethyletherem při vysokém tlaku za vzniku aminofenazonu.

*Farmakologie.* Aminofenazon má podobně jako fenazon antipyretické účinky a řadí se mezi nesteroidní protizánětlivá léčiva. Pro svoje nežádoucí účinky se v dnešní době příliš nepoužívá, protože léčivé přípravky obsahující aminofenazon způsobují agranulocytózu [24]. Za působení dusitanu sodného v kyselém prostředí vzniká dimethylnitrosamin, který je potenciálním karcinogenem [24, 33]. Aminofenazon se podává orálně [6]. Terapeutická dávka se pohybuje mezi 300–500 mg [32], dávka 5 g je letální [6]. Vylučuje se především močí. Metabolizuje se největší měrou na 1-fenyl-2,3-dimethyl-4-(methylamino)-5-pyrazolon, 1-fenyl-2,3-dimethyl-4-amino-5-pyrazolon a 1-fenyl-2,3-dimethyl-4-(acetamido)-5-pyrazolon (obr. 2.14) (cit. [6, 34, 35]).

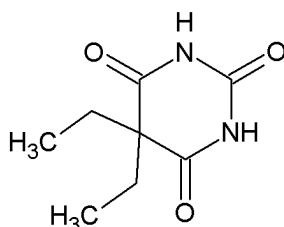


Obr. 2.14: Metabolity aminofenazonu: (a) 1-fenyl-2,3-dimethyl-4-(methylamino)-5-pyrazolon, (b) 1-fenyl-2,3-dimethyl-4-amino-5-pyrazolon, (c) 1-fenyl-2,3-dimethyl-4-(acetamido)-5-pyrazolon.

*Analýza.* Aminofenazon se kvantifikuje pomocí reversní kapalinové chromatografie s UV detekcí. Byl stanoven v krysí moči při 251 nm [35], v čípku při 253 nm [36] a v lidské moči při 254 nm [37]. Analyzuje se také reversní kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí v léčivu elektrosprejovou ionizací (limit kvantifikace je  $0,3 \text{ ng g}^{-1}$ ) [38] a v biologické matrici elektrosprejovou ionizací (limit kvantifikace je  $5,0 \text{ ng g}^{-1}$ ) [39].

## 2.5 Barbital

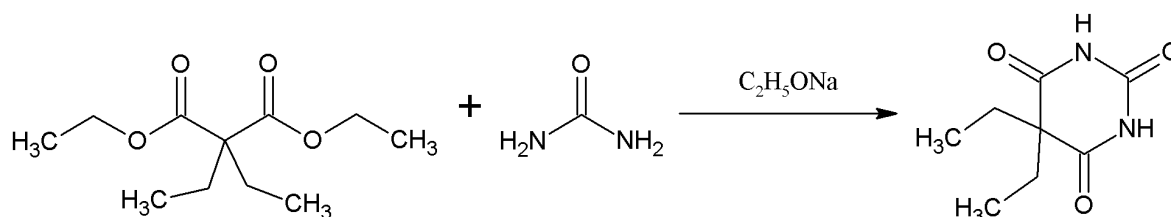
*Charakteristika.* Barbital, jinak nazývaný diethylbarbiturová kyselina, je derivátem barbiturové kyseliny. Existuje samotný a často také ve formě sodné soli, která je ve vodě lépe rozpustná [6, 24]. Systematický název je 5,5-diethyl-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-pyrimidinetrion, CASN 57-44-3. Struktura je uvedena na obr. 2.15. Sumární vzorec barbitalu je  $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$  a molekulová hmotnost je 184,192 (cit. [6]).



Obr. 2.15: Strukturní vzorec barbitalu.

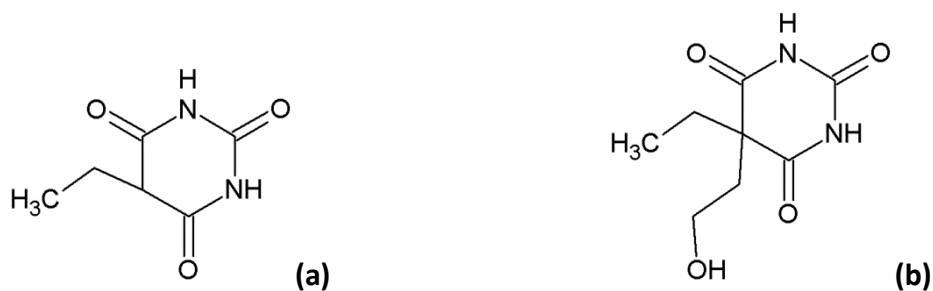
*Fyzikální a chemické vlastnosti.* Tvoří bezbarvé krystaly, nebo bílý krystalický prášek. Teplota tání se pohybuje v rozmezí 188–192 °C. Je rozpustný v ethanolu a etheru méně pak v chloroformu a vodě. Rozpouští se také v acetonu a v zásaditých roztocích [6].

*Syntéza.* Barbital byl objeven v roce 1884 Josephem von Meringem, tedy dvacet let po objevení barbiturové kyseliny Adolfem von Baeyerem. Barbital byl patentován von Meringem a Emilem Fischerem roku 1903 pod názvem Veronal [31]. Barbital lze připravit kondenzací močoviny a diethyl-2,2-diethylmalonátu [32]. Kondenzací reaktantů za přítomnosti ethoxidu sodného vzniká, za současné eliminace dvou ekvivalentů ethanolu, diethylbarbiturová kyselina. Schéma syntézy je zobrazeno na obr. 2.16.



Obr. 2.16: Syntéza barbitalu z močoviny a diethyl-2,2-diethylmalonátu.

*Farmakologie.* Barbital patří mezi hypnotika, používá se taky pro léčbu epileptických záchvatů [32]. V závislosti na dávce dochází úměrně k útlumu centrální nervové soustavy. Nízké dávky vedou k sedaci. Při překročení hypnotické dávky může dojít k celkové anestezii a konečně pak k utlumení respiračních a vasomotorických center v prodloužené míše, což má za následek kóma a případně smrt. Barbital se, podobně jako jiné barbituráty s výjimkou fenobarbitalu, biotransformuje v játrech oxidázami na alkoholy, kyseliny a ketony, které se pak močí vylučují ve formě glukuronidových konjugátů [20]. Velká část absorbované dávky se ale vylučuje v nezměněné formě, menší podíl barbitalu se metabolizuje na 5-ethylbarbiturovou kyselinu a 5-ethyl-5(2-hydroxyethyl)barbiturovou kyselinu (obr. 2.17) [40]. Většina barbiturátů se metabolizuje pomalu, barbital a fenobarbital patří do skupiny hypnotik s dlouhým biologickým poločasem [6, 20, 40]. Barbital se podává orálně [6, 32]. Dávka podávaná orálně se pohybuje mezi 300–600 mg (terapeutická koncentrace v plazmě je 5–30 mg dm<sup>-3</sup>) [6, 32], dávka 2 g je letální. Vylučuje se především močí [6].

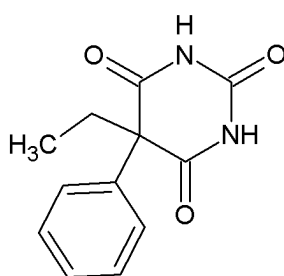


Obr. 2.17: Metabolity barbitalu: (a) 5-ethylbarbiturová kyselina, (b) 5-ethyl-5(2-hydroxyethyl)barbiturová kyselina

*Analýza.* Barbital se kvantifikuje pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí [6] a pomocí reversní kapalinové chromatografie s UV detekcí při 254 nm [6, 41] a ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí (trojitý kvadrupólový analyzátor, TISP, ESI a APCI ionizace), limit kvantifikace je  $0,5 \text{ ng g}^{-1}$  [42].

## 2.6 Fenobarbital

*Charakteristika.* Fenobarbital, je derivátem barbiturové kyseliny. Vyskytuje se volný, ale i ve formě solí, například sodné, která je lépe rozpustná ve vodě [6, 43]. Systematický název je 5-ethyl-5-fenyl-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-pyrimidintrion, CASN 50-06-6. Struktura je uvedena na obr. 2.18. Sumární vzorec fenobarbitalu je  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$  a relativní molekulová hmotnost je 232,24 (cit. [6]).

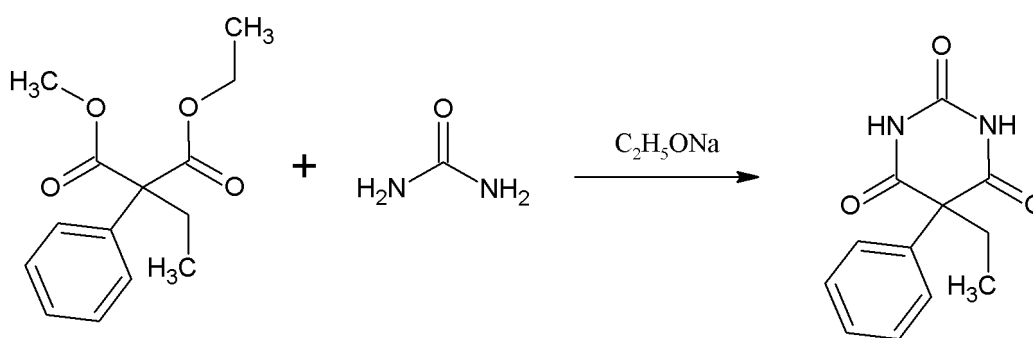


Obr. 2.18: Strukturní vzorec fenobarbitalu.

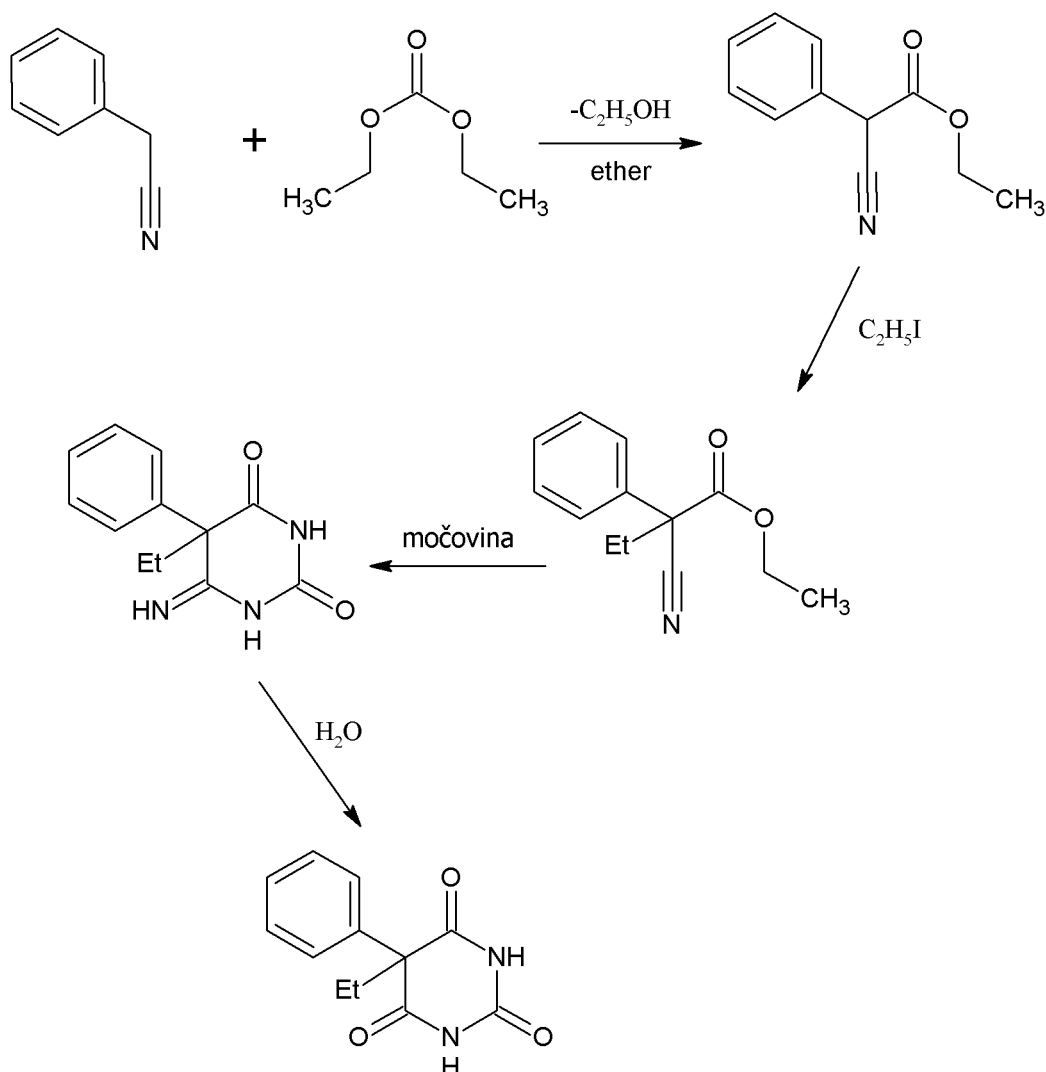
*Fyzikální a chemické vlastnosti.* Fenobarbital tvoří bezbarvé krystaly, nachází se také jako bílý krystalický prášek [6]. Taje v rozmezí teplot  $174\text{--}178 \text{ }^\circ\text{C}$ . Volný se dobře rozpouští v ethanolu, etheru a chloroformu, špatně se rozpouští ve vodě a benzenu. Jako sodná sůl se velmi dobře rozpouští ve vodě a ethanolu, ve chloroformu a etheru je pak prakticky nerozpustný [6, 43]. Je stabilní v kyselém prostředí, v roztocích s vysokým pH

podléhá hydrolýze, dochází k rozrušení vazby 1-6 v barbitalovém kruhu mezi karbonylovým atomem uhlíku a sousedním dusíkem a následné dekarboxylaci. Při zahřívání se pak látka rozpadá na  $\alpha$ -ethylbenzenoctovou kyselinu a močovinu [43].

*Syntéza.* Poprvé byl syntetizován Heinrichem Hörleinem v roce 1911 a von Baeyerem prodáván o rok později pod názvem Luminal [44]. Fenobarbital lze podle literatury [43] připravit kondenzací 1,2-diethyl-2-fenyl-3-methylesteru propandiové kyseliny a močoviny (obr. 2.19) nebo kondenzací fenylacetonitrilu a diethylkarbonátu za vzniku esteru, jehož ethylací, následnou kondenzací s močovinou a hydrolýzou vzniká fenobarbital (obr. 2.20) (cit. [43]).



Obr. 2.19: Kondenzace 1,2-diethyl-2-fenyl-3-methylesteru propandiové kyseliny a močoviny za vzniku fenobarbitalu.

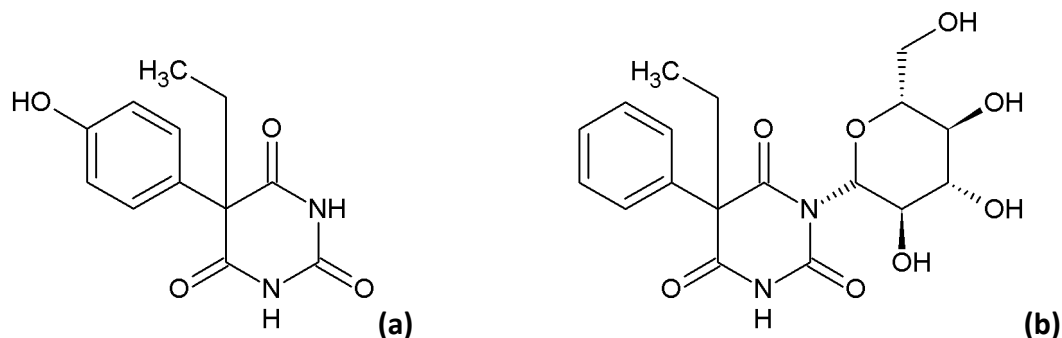


Obr. 2.20: Syntéza fenobarbitalu kondenzací výchozích látek fenylacetonitrilu a diethylkarbonátu.

*Farmakologie.* Fenobarbital byl nejprve podáván jako hypnotikum, antikonvulzivní účinky byly objeveny později Alfredem Hauptmannem. Používá se dodnes při léčbě generalizovaných tonicko-klonických záchvatů [20]. Mezi nežádoucí účinky patří sedace, zhoršení kognitivních a paměťových funkcí, může mít i depresivní účinky [24]. V závislosti na dávce dochází, podobně jako u barbitalu, uměrně k útlumu centrální nervové soustavy [20]. Dávka podávaná orálně se snadno absorbuje [6]. Fenobarbital se z části vylučuje močí v nezměněné podobě (20–30 %). Eliminaci lze urychlit zvýšením pH moči [6, 20]. Hlavním metabolitem je *p*-hydroxyfenobarbital (obr. 2.21a) (cit. [6, 20, 40, 43]) a *N*-glukopyranosylfenobarbital (obr. 2.21b) (cit. [6]).



Terapeutická koncentrace v plasmě se pohybuje mezi 2–30 mg dm<sup>-3</sup>, denní dávka podávaná orálně je v rozmezí 60–180 mg [6], jiný zdroj uvádí 30–120 mg [32]. Dávka 1,5 g orálně může být letální [6].

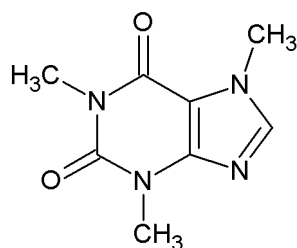


Obr. 2.21: Metabolity fenobarbitalu: (a) *p*-hydroxyfenobarbital, (b) *N*-glukopyranosylfenobarbital.

*Analýza.* Fenobarbital lze analyzovat reversní kapalinovou chromatografií s UV detekcí při 254 nm [45], při 220 nm v moči a plasmě (limit detekce 0,1 µg dm<sup>-3</sup>) [46], při 241 nm v séru (limit kvantifikace 0,37 mg dm<sup>-3</sup>) a při 215 nm v léčivech (limit kvantifikace 0,11 mg dm<sup>-3</sup>) [47]. Analýza fenobarbitalu metodou reversní kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí byla popsána v literatuře [48] v moči za použití trojitého kvadrupólu jako hmotnostního analyzátoru a elektrosprejové ionizace, limit detekce metody byl 10 µg dm<sup>-3</sup>. Fenobarbital byl podle jiného zdroje [49] analyzován v plasmě kvadrupólem s iontovou pastí jako tandemovým hmotnostním analyzátozem s elektrosprejovou ionizací. Reversní kapalinovou chromatografií ve spojení s trojitým kvadrupólem a ESI ionizací byl analyzován fenobarbital v masných výrobcích. Limit kvantifikace metody byl 0,50 ng g<sup>-1</sup> (cit. [42]).

## 2.7 Kofein

*Charakteristika.* Kofein je podobně jako theofylin xanthinový alkaloid [9]. Jde o látku rostlinného původu. Vyskytuje se například v čajovníku čínském (*Camellia sinensis*), v kávovníku arabském (*Coffea arabica*), v kakaovníku pravém (*Theobroma cacao*), nebo v paulinii nápojné (*Paullinia cupana*). Lze jej izolovat z rostlinných materiálů, nebo připravit synteticky [8, 32]. Vyskytuje se volný i vázaný ve formě solí [6]. Systematický název je 1,3,7-trimethyl-2,6-dioxopurin, CASN 58-08-2. Struktura je uvedena na obr. 2.22. Sumární vzorec kofeinu je C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> a relativní molekulová hmotnost je 194,191 (cit. [6]).

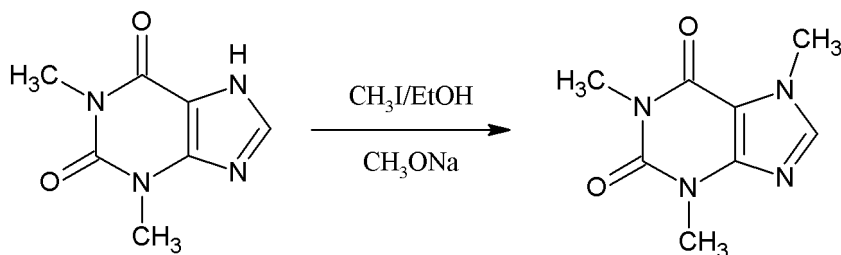


Obr. 2.22: Strukturní vzorec kofeinu.

*Fyzikální a chemické vlastnosti.* Kofein tvoří hedvábně bílé krystaly, obvykle slepené dohromady. Nachází se také jako bílý krystalický prášek. Taje při 238 °C, ale sublimuje již při 178 °C. Pokud kofein krystalizuje z vodného roztoku, vzniká monohydrát. Při krystalizaci z ethanolu, chloroformu nebo etheru vzniká bezvodý. Dobře se rozpouští v pyrrolu, ethylacetátu, chloroformu a tetrahydrofuranu. Je rozpustný ve vodě, alkoholu a acetonu. Méně se pak rozpouští v etheru [6].

*Izolace.* Kofein byl poprvé izolován v roce 1821 Ferdinandem Friedliebem Rungem z kávových zrn. Chemická struktura byla objasněna Emilem Fischerem v roce 1882. O tři roky později Fischer kofein syntetizoval [31]. Kofein lze extrahovat z listů čajovníku. Ze sušených rozetřených listů se kofein extrahuje Soxhletovým extraktorem do ethanolu, ze kterého se adsorbuje na oxid hořečnatý. Ředěnou kyselinou sírovou se pak desorbuje a extrahuje chloroformem. Nakonec se ponechá krystalizovat. Kofein se také získává ze zelených kávových zrn vařením v páře a následnou extrakcí chloroformem [50].

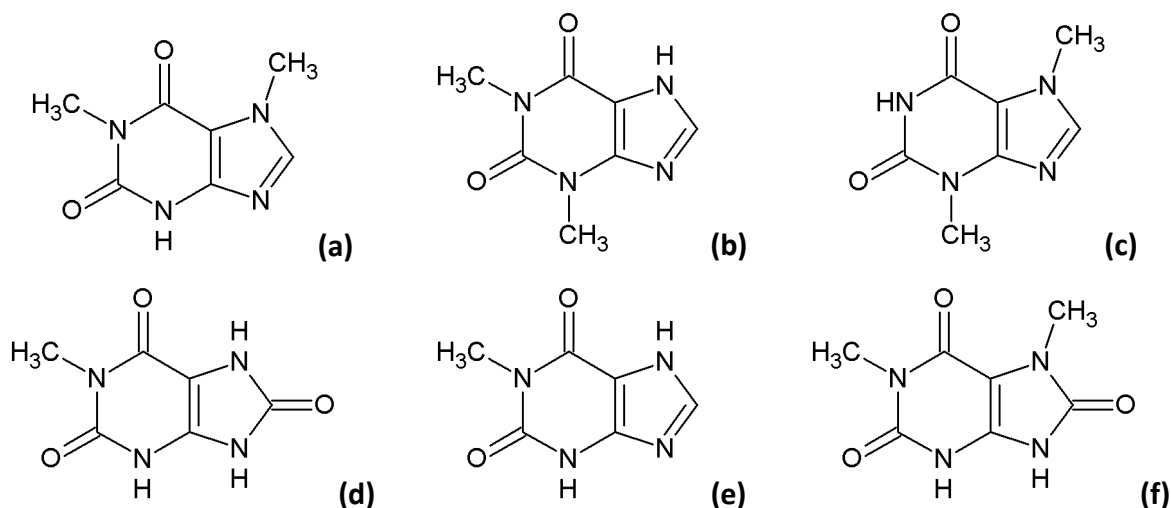
*Syntéza.* Kofein lze syntetizovat z močoviny podle Traubeho. Meziproduktem syntézy kofeinu je theofylin, ze kterého methylací vzniká kofein. Schéma syntézy theofylinu je uvedeno v kapitole 2.8. Methylace theofylinu za vzniku kofeinu je uvedena na obr 2.23 (cit. [32, 50]).



Obr. 2. 23: Syntéza kofeinu methylací theofylinu.

*Farmakologie.* Kofein stimuluje centrální nervovou soustavu. Působí také na srdeční sval a ledviny [8, 32]. Má ve srovnání s theofylinem slabší bronchodilatační účinky [24].

Působí skrze několik metabolických cest: antagonismus adenosinových receptorů, inhibice fosfodiesterasy, uvolňování intracelulárního vápníku a antagonismus benzodiazepinových receptorů [20, 24, 51]. Pro stimulaci centrální nervové soustavy se užívá orálně dávka v rozmezí 50–200 mg každé 3 hodiny, maximálně 1 g denně [6, 24]. Letální dávka se pohybuje mezi 5–50 g orálně, ale bylo popsáno zotavení po dávce 30 g. Toxický účinek nastává při koncentraci 15 mg dm<sup>-3</sup> kofeinu v krvi, letální koncentrace je pak 80 mg dm<sup>-3</sup> [6]. Kofein se v lidském těle metabolizuje ze 70–80 % na paraxanthin, dále pak na theofylin a theobromin, které se metabolizují na 1-methylmočovou kyselinu, 1-methylxanthin a 1,7-dimethylmočovou kyselinu [52, 53]. Struktura primárních i sekundárních metabolitů je uvedena na obr 2.24.

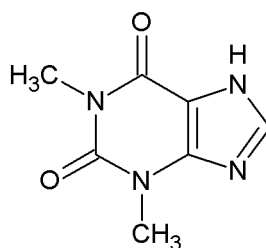


Obr. 2.24: Metabolity kofeinu: (a) paraxanthin, (b) theofylin, (c) theobromin, (d) 1-methylmočová kyselina, (e) 1-methylxanthin, (f) 1,7-dimethylmočová kyselina.

*Analýza.* Existuje mnoho chromatografických metod pro analýzu kofeinu, jejich výčet je uveden v citaci [54]. Kofein lze například kvantifikovat pomocí kapalinové chromatografie s UV detekcí při 265 nm v zeleném čaji [55], nebo ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí (QTrap analyzátor, ESI ionizace) v moči s limitem kvantifikace 10 µg dm<sup>-3</sup> [56].

## 2.8 Theofylin

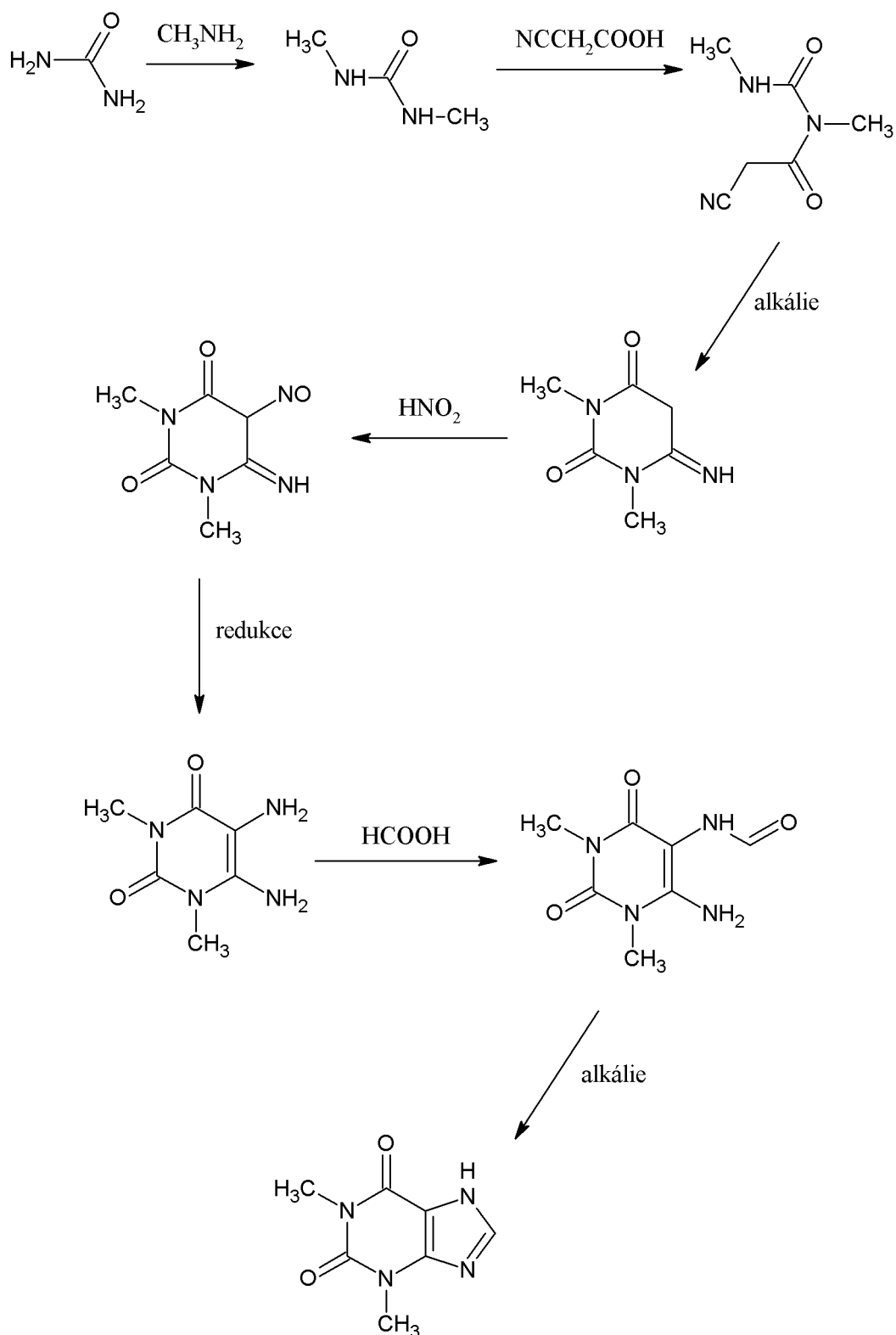
*Charakteristika.* Theofylin je xanthinový alkaloid, který je obsažen v listech čajovníku, v kávovníku a v kakaovníku. Lze jej připravit také synteticky. Jeho systematický název je 1,3-dimethyl-7*H*-purin-2,6-dion, CASN 58-55-9, jeho struktura je uvedena na obr. 2.25. Sumární vzorec theofylinu je  $C_7H_8N_4O_2$  a relativní molekulová hmotnost je 180,17 (cit. [6, 57]).



Obr. 2.25: Strukturální vzorec theofylinu.

*Fyzikální a chemické vlastnosti.* Bezvodý theofylin tvoří bílé krystalky bez zápachu s teplotou tání mezi 270 a 274 °C. Vyskytuje se ve formě jak bezvodé a monohydratované, tak ve formě zásaditých solí. Ve sloučenině, která je tvořena dvěma ekvivalenty theofylinu a jedním ekvivalentem ethylendiaminu (pak se jedná o aminofylin) tvoří ve vodě lépe rozpustnou sůl, což je výhodné při perorálním podání [57]. Theofylin je rozpustný ve vodě, chloroformu i ethanolu, méně pak v etheru. Rozpouští se také v ředěných kyselinách, v roztocích alkalických hydroxidů a v amoniaku [6, 57].

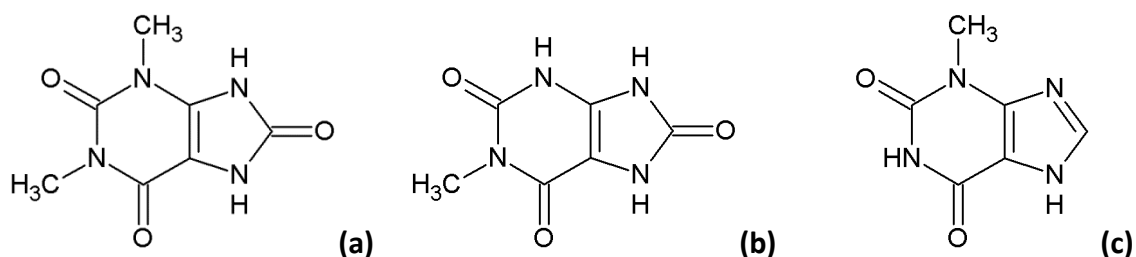
*Izolace a syntéza.* Theofylin byl poprvé izolován Albrechtem Kosselem roku 1888 [58]. Ačkoliv jej lze získat z kávovníku, čajovníku nebo kakaovníku, vyrábí se nejčastěji synteticky z močoviny podle Traubeho, který theofylin jako první syntetizoval coby meziprodukt syntézy kofeinu [57]. Schéma syntézy je uvedeno na obr. 2.26.



Obr. 2.26: Schéma syntézy theofylinu z močoviny podle Traubeho [57]

*Farmakologie.* Theofylin má bronchodilatační účinky, proto se používá při respiračních onemocněních jako je chronická obstrukční plicní nemoc nebo astma [6, 59]. Terapeutický rozsah dávky theofylinu v plasmě je velmi úzký (8–20 mg dm<sup>-3</sup>), pokud dojde k jeho

překročení, může dojít u pacienta k nevolnosti, zvracení či bolestem hlavy, také ale může dojít k život ohrožujícím stavům, jako je srdeční arytmie, nebo epileptický záchvat [57, 60]. Theofylin se běžně podává ve formě tablet orálně, ale také v podobě čípků, zejména u dětí trpících astmatem [57]. Při identifikaci metabolitů theofylinu v moči byla podle literatury [57, 60] zastoupena 1,3-dimethylmočová kyselina, v menším množství pak také 1-methylmočová kyselina a 3-methylxanthin (obr. 2.27). Podle literatury [59] dochází k úbytku theofylinu ve formě tablety v závislosti na pH prostředí. Při zahřívání na 80 °C po dobu 24 hodin v 0,1M kyselině chlorovodíkové dochází k největšímu úbytku theofylinu (až z 60 %), naopak v bazickém prostředí 0,1M hydroxidu sodného při 24 hodinovém zahřívání na 80 °C se původní koncentrace theofylinu snižuje o 10–12 %. Bezvodý theofylin je při vysokých teplotách (80 °C po dobu 48 hodin) poměrně stabilní. Při vystavení theofylinu oxidačnímu vlivu 3% peroxidu vodíku po dobu 48 hodin při laboratorní teplotě dochází k 25% úbytku původního množství. Theofylin vázaný v podobě ethylendiaminové soli (jako aminofylin) je podle Browera a kol. [61] v čípku po zahřívání na 40 °C po dobu 3 měsíců stabilní.



Obr. 2.27: Metabolity theofylinu: (a) 1,3-dimethylmočová kyselina, (b) 1-methylmočová kyselina, (c) 3-methylxanthin.

*Analýza.* Theofylin absorbuje záření v ultrafialovém spektru, je možné ho stanovit UV-spektrofotometrií. Ve formě ethylendiaminové soli se theofylin extrahuje 0,1M hydroxidem sodným [57, 62], v alkalickém prostředí má pak absorpční maximum při 275 nm [6]. Kvantifikace theofylinu metodou reverzní kapalinové chromatografie s UV detekcí byla popsána v léčivech při 275 nm [63] a při 235 nm s kvantifikačním limitem 0,8 mg dm<sup>-3</sup> [59], v plasmě krysy při 280 nm [60] a člověka při 272 nm s limitem kvantifikace 0,1 µg dm<sup>-3</sup> [64]. Reverzní kapalinová chromatografie ve spojení s TOF hmotnostním analyzátozem a elektrosprejovou ionizací byla použita pro analýzu theofylinu v krvi a plicní tkáni [65]. K analýze lze také použít plynovou absorpční chromatografii [61], nebo plynovou chromatografii s hmotnostní detekcí [6].

---

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Analyzované vzorky

Vzorky historických léčivých přípravků byly získány z Českého farmaceutického muzea v Kuksu. Datace vzorků byla provedena na základě vytištěné šarže (1937–1948). Podmínky skladování vzorků nebyly přesně známy, lze ale předpokládat, že byly uloženy v temnu za laboratorní teploty.

#### 3.1.1 *Analyzované vzorky injekčních roztoků*

Injekční roztok „Chinin-calcium“ byl vyroben firmou Pragochemia v roce 1948 (obr. 3.1). Analyzovaný roztok byl uchováván v ampuli vyrobené z hnědého skla o objemu 5 ml. Roztok žluté barvy měl deklarovaný obsah chininu (jako báze) 3 %, jako pomocná látka byl v roztoku přítomný glukonát vápenatý [CASN 299-28-5] v podílu 10 %. Po otevření ampule došlo během 24 hodin při laboratorní teplotě i v chladu k tvorbě bílé sraženiny. Při skladování v teplotách pod bodem mrazu k tvorbě sraženiny nedocházelo. Podle literatury by se mohlo jednat o fosforečnan vápenatý, vznikající pravděpodobně mikrobiálním rozkladem glukonátu vápenatého [66].



Obr. 3.1 Obal analyzovaného injekčního roztoku „Chinin-calcium“ firmy Pragochemia, vyroben v roce 1948.

Injekční roztok „Cardiazol-chinin“ byl vyroben firmou Sanomedia s. r. o. (Praha) v roce 1937 (obr. 3.2). Roztok nahnědlé barvy o objemu 1 ml byl uchováván v čiré skleněné ampuli. Výrobce deklarovaný obsah laktátu chininu [CASN 749-49-5] byl 0,25 g v 1 ml. Roztok dále obsahoval 0,1 g pentamethylentetrazolu [CASN 54-95-5] v 1 ml.





Obr. 3.2 Obal analyzovaného vzorku „Cardiazol-chinin“ vyrobeného firmou Sanomedia v roce 1937.

### 3.1.2 Analyzované vzorky tablet

Léčivý přípravek ve formě tablet „Proseptol“ byl vyroben firmou Dr. Klan Praha v roce 1945 (obr. 3.3). Kulaté bílé tabletky s dělicí rýhou o hmotnosti přibližně 0,5 g obsahují dle výrobce 0,5 g účinné látky sulfanilamidu [CASN 63-74-1].



Obr. 3.3: Obal analyzovaného vzorku „Proseptol“ výrobce Dr Klan Praha z roku 1945.

Léčivý přípravek ve formě tablet „Veraethyl“ byl vyroben firmou Pragochemia kolem roku 1945. Obal přípravku je zobrazen na obr. 3.4. Jde o bílé kulaté tablety s dělicí rýhou uprostřed o hmotnosti přibližně 0,4 g. Tableta obsahuje podle výrobce 0,254 g aminofenazonu [CASN 58-15-1] a 0,102 g barbitalu [CASN 57-44-3].



Obr. 3.4: Obal analyzovaného vzorku „Veraethyl“, který byl vyroben firmou Pragochemia kolem roku 1945.

### 3.1.3 Analyzované vzorky dražé

Léčivý přípravek „Guaral“ jako dražé byl vyroben firmou Pragochemia před rokem 1945. Obal přípravku je zobrazen na obr. 3.5. Hmotnost kulovitých šedých dražé se pohybovala okolo 1 g. Vzorek obsahuje podle výrobce 0,1 g fenobarbitalu [CASN 50-06-6] a 0,013 g kofeinu [CASN 58-08-2]. Dalšími látkami obsaženými v přípravku podle výrobce byly: fosfolaktát vápenatý (0,05 g), vaječný lecithin (0,005 g), *Extractum strychni siccum* (0,002 g), *Extractum valerianae* (0,09 g) a *Extractum guaranae siccum* (0,025 g).



Obr. 3.5: Obal analyzovaného vzorku „Guaral“, který byl vyroben firmou Pragochemia před rokem 1945.

### 3.1.4 Analyzované vzorky čípků

Léčivý přípravek „Syntophyllin“ Spolku pro chemickou a hutní výrobu (národní podnik, farmaceutické oddělení, Praha 11), byl vyrobený roku 1948 (obr. 3.6). Čípek byl žlutohnědé barvy, zabalený po jednotlivých kusech v alobalu. Deklarovaný obsah účinné látky aminofylinu dihydrátu [CASN 317-34-0] v jednom čípku byl 0,35 g.



Obr. 3.6 Obal analyzovaného vzorku „Syntophyllin“ Spolku pro chemickou a hutní výrobu, vyrobený roku 1948.

## 3.2 Použité chemikálie

Ke kvantifikaci účinných látek v analyzovaných vzorcích byly použity standardy: chinin hydrochlorid dihydrát (analytický standard, Sigma-Adrich), theofylin (> 99 %, Sigma-Aldrich), sulfanilamid (analytický standard, Sigma-Adrich), aminofenazon (Sigma-Aldrich), barbital (Lachema), kofein (Zentiva) a fenobarbital (Sigma-Aldrich). Pro stanovení vápníku byl použit certifikovaný referenční materiál (Analytika) s obsahem  $1000 \text{ mg dm}^{-3}$  uhličitanu vápenatého v matrici 2% kyseliny dusičné. Chinotoxin byl připraven v laboratoři metodou dle Biddleho [67].

Ostatní použité chemikálie byly analytické čistoty: acetonitril pro HPLC (Sigma-Aldrich), octan amonný (Lach-ner), octová kyselina 99 % (Lach-ner), hydroxid sodný (Penta).

### 3.3 Postupy měření a vyhodnocení výsledků

#### 3.3.1 Použité přístroje

Pro navažování pevných vzorků a standardů byly použity analytické váhy Sartorius R 200 D. Rozpouštění bylo podpořeno ultrazvukovou lázní Sonorex RK 100 (Bandelin Electronic). Při přípravě pufrů byl použit pH-metr 3510 značky Jenway, kalibrovaný na standardní pufrы. Roztoky byly filtrovány pomocí stříkačkových filtrů FP 30/0,45CA (Whatman) o velikosti póru 0,45  $\mu\text{m}$ .

Kapalinová chromatografie s fluorescenční a UV detekcí byla realizována na přístroji UHPLC Nexera XR (Shimadzu).

Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí probíhala na přístroji Agilent Serie 1290 (Agilent Technologies) s trojitým kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem Agilent 6460 (Agilent Technologies) a ESI ionizací.

Atomová absorpční spektrometrie byla realizována přístrojem ContraAA 700 firmy Analytikjena.

Pro UV-spektrofotometrii byl použit přístroj HP 8453 (Hewlet Packard), měření probíhalo v křemenných kyvetách s optickou drahou 1 cm.

#### 3.3.2 Analýza vzorku „Chinin-calcium“

Analyzovaný injekční roztok, který obsahoval účinnou látku v deklarované koncentraci 30  $\text{g dm}^{-3}$ , byl ředěn mobilní fází na předpokládanou koncentraci chininu 60  $\text{mg dm}^{-3}$ .

Naředěný vzorek byl analyzován metodou RP-HPLC za detekce DAD při vlnové délce 254 nm a za fluorescenční detekce s excitační vlnovou délkou 325 nm a emisní vlnovou délkou 375 nm. Separace byla uskutečněna na koloně Zorbax Eclipse C18 (150 mm $\times$ 4,6, 3,5  $\mu\text{m}$ ; Agilent), která byla temperována na 30 °C. Kvantifikace chininu probíhala metodou kalibrační přímky izokratickou elucí za použití směsi acetonitrilu a 0,02M acetátového pufru ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) o pH = 4,00 (20:80, v/v). Průtok

mobilitní fáze byl nastaven na  $1,00 \text{ ml min}^{-1}$ . Pro sestavení kalibrační přímky bylo použito pět předem připravených standardních roztoků chininu hydrochloridu v koncentračním rozsahu  $20\text{--}100 \text{ mg dm}^{-3}$ . Pro statistické vyhodnocení byl vzorek měřen třikrát. Objem nástřiku vzorku činil  $5 \text{ }\mu\text{l}$  a celková doba analýzy trvala 20 minut. Hmotnostní detekce byla uskutečněna za použití ESI ionizace v pozitivním a negativním módu. Pro zmlžení byl použit dusík (55 psi). Jako sušící plyn byl použit dusík o průtoku  $11 \text{ dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ , teplotě  $350 \text{ }^\circ\text{C}$  a napětí na kapiláře 4 kV. Měření probíhalo v rozsahu  $100\text{--}700 \text{ m/z}$ .

Pro ověření kvantifikace chininu byla použita metoda UV-spektrofotometrie. Analyzovaný injekční roztok byl ředěn mobilní fází v odměrné baňce z původní koncentrace  $30 \text{ g dm}^{-3}$  na předpokládanou koncentraci chininu  $1,20 \text{ mg dm}^{-3}$ , což odpovídá  $3,70 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ . Analýza probíhala při vlnové délce 254 nm metodou pětibodové kalibrační přímky v koncentračním rozsahu  $1\text{--}5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ . Pro statistické vyhodnocení byl vzorek měřen třikrát.

Stanovení glukonanu vápenatého bylo uskutečněno atomovou absorpční spektrometrií metodou kalibrační přímky. Byl stanoven celkový obsah vápníku, který v molekule glukonanu vápenatého váže dvě molekuly glukonanu. Podle obsahu vápníku byla zpětně vypočítána koncentrace glukonanu vápenatého. Absorbance byla měřena na spektrální čáře vápníku o vlnové délce  $422,6728 \text{ nm}$ . Poměr acetyleny (palivo) a oxidu dusného (oxidant) byl 0,572. Obsah ampule byl kvantitativně převeden, včetně bílé sraženiny, do 100 ml kyseliny dusičné zředěné v poměru 1:99. Roztok byl dále ředěn v destilované vodě (s přídatkem 1 ml koncentrované kyseliny dusičné a 10 ml roztoku chloridu draselného o koncentraci  $10 \text{ g dm}^{-3}$ ). Předpokládaná koncentrace vápenatých kationtů ředěného vzorku byla  $0,375 \text{ mg dm}^{-3}$ . Pro metodu kalibrační přímky bylo připraveno pět standardních roztoků v koncentračním rozsahu  $0,10\text{--}2,00 \text{ mg dm}^{-3}$  ředěním certifikovaného referenčního materiálu vápníku od Analytika, který obsahoval  $1 \text{ g dm}^{-3}$  uhličitanu vápenatého v matrici 2% kyseliny dusičné. Každý roztok byl okyselen 0,5 ml kyseliny dusičné a bylo přidáno 5 ml chloridu draselného o koncentraci  $10 \text{ g dm}^{-3}$ , následně byl roztok doplněn destilovanou vodou na objem 50 ml. Statistické vyhodnocení bylo provedeno z triplicitního stanovení vzorku.

### 3.3.3 Analýza vzorku „Cardiazol-chinin“

Vzorek obsahující laktát chininu jako účinnou látku o deklarované koncentraci  $250 \text{ g dm}^{-3}$  (obsah samotného chininu tedy byl  $196 \text{ g dm}^{-3}$ ) byl ředěn mobilní fází na předpokládanou

koncentraci laktátu chininu  $77,40 \text{ mg dm}^{-3}$  (odpovídající koncentrace chininu je  $60,65 \text{ mg dm}^{-3}$ ). Pro analýzu metodou UV-spektrofotometrie byl vzorek ředěn mobilní fází na koncentraci  $2,51 \text{ mg dm}^{-3}$  laktátu chininu, což odpovídá  $6,06 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ , resp.  $1,97 \text{ mg dm}^{-3}$  chininu odpovídající  $6,06 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ .

Naředěný vzorek byl analyzován kapalinovou chromatografií a UV spektrofotometrií metodikou popsanou v kap. 3.3.2.

### 3.3.4 Analýza vzorku „Proseptol“

Analyzovaná tableta o deklarovaném obsahu účinné látky 0,5 g sulfanilamidu byla zvážena ( $m = 478,2 \text{ mg}$ ) a rozpuštěna ve 100 ml mobilní fáze. Rozpuštění bylo podpořeno ultrazvukem. Vznikl tak roztok o teoretické koncentraci  $4782 \text{ mg dm}^{-3}$ , který byl filtrován a ředěn mobilní fází na předpokládanou koncentraci  $47,82 \text{ mg dm}^{-3}$ .

Naředěný vzorek byl analyzován metodou RP-HPLC za detekce DAD při vlnové délce 262 nm. Analyt byl separován na koloně Zorbax Eclipse C18 ( $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $3,5 \text{ }\mu\text{m}$ ; Agilent), která byla temperována na  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Kvantifikace probíhala metodou kalibrační přímky izokratickou elucí za použití směsi acetonitrilu a 0,1% octové kyseliny (10:90, v/v). Průtok mobilní fáze byl nastaven na  $0,75 \text{ ml min}^{-1}$ . Objem nástřiku vzorku byl  $5 \text{ }\mu\text{l}$  a celková doba analýzy trvala 5 minut. Kalibrační přímka byla strojena z pěti předem připravených standardních roztoků sulfanilamidu v koncentračním rozsahu  $20\text{--}100 \text{ mg dm}^{-3}$ . Pro statistické vyhodnocení bylo stanovení vzorku provedeno třikrát.

Hmotnostní detekce byla uskutečněna za použití ESI ionizace v pozitivním a negativním módu. Pro zmlžení byl použit dusík (55 psi). Jako sušící plyn byl použit dusík o průtoku  $11 \text{ dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ , teplotě  $350 \text{ }^\circ\text{C}$  a napětí na kapiláře 4 kV. Měření probíhalo v rozsahu  $100\text{--}400 \text{ m/z}$ .

Kvantifikace sulfanilamidu byla ověřena metodou UV-spektrofotometrie. Roztok rozpuštěné tablety o předpokládané koncentraci sulfanilamidu  $4782 \text{ mg dm}^{-3}$  byl filtrován a ředěn mobilní fází na koncentraci  $0,96 \text{ mg dm}^{-3}$ , což odpovídá  $5,55 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ . Analýza probíhala při vlnové délce 259 nm metodou pětibodové kalibrační přímky v koncentračním rozsahu  $2\text{--}10 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ . Statistické vyhodnocení bylo provedeno z triplicitního stanovení vzorku.

### 3.3.5 Analýza vzorku „Veraethyl“

Analyzovaná tableta „Veraethyl“ o deklarovaném obsahu 0,254 g aminofenazonu a 0,102 g barbitalu byla zvážena ( $m = 396,6$  mg) a rozpuštěna za pomoci ultrazvukové lázně ve 100 ml směsi acetonitrilu a 0,02M acetátového pufru ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) o  $\text{pH} = 3,40$  v poměru 15:85 (v/v). Výsledný roztok o předpokládané koncentraci aminofenazonu  $2540 \text{ mg dm}^{-3}$  a barbitalu  $1020 \text{ mg dm}^{-3}$  byl filtrován a dále ředěn. Byly připraveny dva ředěné vzorky. Pro analýzu aminofenazonu byl připraven vzorek o předpokládané koncentraci aminofenazonu  $50,8 \text{ mg dm}^{-3}$ . Pro analýzu barbitalu byl připraven vzorek o předpokládané koncentraci  $204,0 \text{ mg dm}^{-3}$ .

Naředěný vzorek byl analyzován metodou RP-HPLC za detekce DAD. Aminofenazon byl stanoven při vlnové délce 260 nm, barbital pak při 223 nm. Analyty byly separovány na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ; Agilent), která byla temperována na 30 °C. Kvantifikace probíhala metodou kalibrační přímky izokratickou elucí za použití směsi acetonitrilu a 0,02M acetátového pufru ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) o  $\text{pH} = 3,40$  v poměru 30:70 (v/v). Průtok mobilní fáze byl nastaven na  $1,00 \text{ ml min}^{-1}$ . Objem nástřiku vzorku byl 5  $\mu\text{l}$  a celková doba analýzy trvala 4 minuty. Kalibrační přímka pro stanovení aminofenazonu byla strojena z pěti předem připravených standardních roztoků v koncentračním rozsahu 20–100  $\text{mg dm}^{-3}$ . Kalibrační přímka pro stanovení barbitalu byla sestrojena z pěti předem připravených standardních roztoků v koncentračním rozsahu 80–400  $\text{mg dm}^{-3}$ . Statistické vyhodnocení bylo provedeno z triplicitních stanovení obou vzorků.

Hmotnostní detekce byla uskutečněna za použití ESI ionizace v pozitivním a negativním módu. Pro zmlžení byl použit dusík (55 psi). Jako sušící plyn byl použit dusík o průtoku  $11 \text{ dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ , teplotě 350 °C a napětí na kapiláře 4 kV. Měření probíhalo v rozsahu 100–700  $m/z$ .

Kvantifikace aminofenazonu byla ověřena metodou UV-spektrofotometrie. Roztok rozpuštěné tablety o předpokládané koncentraci aminofenazonu  $2540 \text{ mg dm}^{-3}$  byl filtrován a ředěn vodou na koncentraci  $5,1 \text{ mg dm}^{-3}$ , což odpovídá  $2,20 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . Analýza probíhala při vlnové délce 268 nm metodou standardního přídatku. Do křemenné kyvety obsahující 2,00 ml naředěného vzorku byly pipetovány přídatky o objemu 100  $\mu\text{l}$  ( $n = 6$ ) o koncentraci  $92,5 \text{ mg dm}^{-3}$ , což odpovídá molární koncentraci  $4,00 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ . Při výpočtech byla provedena korekce objemu.



### 3.3.6 Analýza vzorku „Guaral“

Analyzovaný vzorek dražé „Guaral“ o deklarovaném obsahu 0,013 g kofeinu a 0,01 g fenobarbitalu byl zvážěn ( $m = 1,008$  g) a rozpuštěn ve 100 ml mobilní fáze, která sestávala z acetonitrilu a 0,02M acetátového pufru ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) o  $\text{pH} = 4,00$  v poměru 30:70 (v/v). Rozpuštění bylo podpořeno ultrazvukem a roztok byl pak přefiltrován. Pro stanovení kofeinu byl filtrát ředěn mobilní fází obsahující acetonitril a 0,02M acetátový pufr ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) o  $\text{pH} = 4,00$  v poměru 15:85 (v/v). Předpokládaná koncentrace kofeinu v ředěném vzorku byla  $65 \text{ mg dm}^{-3}$ . Pro stanovení fenobarbitalu byl filtrát ředěn mobilní fází obsahující acetonitril a 0,02M acetátový pufr ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) o  $\text{pH} = 4,00$  v poměru 30:70 (v/v). Předpokládaná koncentrace fenobarbitalu v ředěném vzorku byla  $15 \text{ mg dm}^{-3}$ .

Naředěné vzorky byly analyzovány metodou RP-HPLC za detekce DAD. Kofein byl stanoven při vlnové délce 272 nm, fenobarbital pak při 209 nm. Analyty byly separovány na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ; Agilent), která byla temperována na 30 °C. Kvantifikace probíhala metodou kalibrační přímky v případě kofeinu gradientovou elucí (viz kap. 4.5.3), fenobarbital byl stanoven izokraticky za použití směsi acetonitril a 0,02M acetátový pufr ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) o  $\text{pH} = 4,00$  v poměru 30:70 (v/v). Průtok mobilní fáze byl nastaven na  $1,00 \text{ ml min}^{-1}$ . Objem nástříku vzorku byl 5  $\mu\text{l}$ . Celková doba analýzy kofeinu trvala 13 minut, fenobarbitalu pak 6 minut. Kalibrační přímka pro stanovení kofeinu byla strojena z pěti předem připravených standardních roztoků v koncentračním rozsahu 20–100  $\text{mg dm}^{-3}$ . Kalibrační přímka pro stanovení fenobarbitalu byla sestrojena z pěti předem připravených standardních roztoků v koncentračním rozsahu 5–25  $\text{mg dm}^{-3}$ . Statistické vyhodnocení bylo provedeno z triplicitních stanovení vzorků.

Hmotnostní detekce byla uskutečněna za použití ESI ionizace v pozitivním a negativním módu. Pro zmlžení byl použit dusík (55 psi). Jako sušící plyn byl použit dusík o průtoku  $11 \text{ dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ , teplotě 350 °C a napětí na kapiláře 4 kV. Měření probíhalo v rozsahu 100–500  $m/z$ .

Kvantifikace kofeinu byla ověřena metodou UV-spektrofotometrie. Roztok rozpuštěné dražé o předpokládané koncentraci kofeinu  $130 \text{ mg dm}^{-3}$  byl filtrován a ředěn mobilní fází na koncentraci  $1,3 \text{ mg dm}^{-3}$ , což odpovídá  $6,69 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ . Analýza probíhala při vlnové délce 272 nm metodou standardního přídávku. Do křemenné kyvety obsahující 2,00 ml naředěného vzorku byly pipetovány přídávky o objemu 15  $\mu\text{l}$  ( $n = 6$ ) o koncentraci



100 mg dm<sup>-3</sup>, což odpovídá molární koncentraci  $5,15 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>. Při výpočtech byla provedena korekce objemu.

### 3.3.7 Analýza vzorku „Syntophyllin“

Analyzovaný čípek ( $m = 1,9253$  g) byl rozpuštěn v 250 ml mobilní fáze v odměrné baňce v ultrazvukové lázni a přefiltrován. Připravený filtrát obsahující teoreticky 1104 mg dm<sup>-3</sup> theofylinu (což odpovídá deklarované koncentraci aminofylinu 1400 mg dm<sup>-3</sup>) byl ředěn mobilní fází, aby vznikl roztok o předpokládané koncentraci theofylinu 44,16 mg dm<sup>-3</sup>.

Výsledný roztok byl použit pro analýzu metodou RP-HPLC s detekcí DAD při vlnové délce 270 nm. Separace byla uskutečněna na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5 μm; Agilent) temperované na 30 °C. Theofylin byl kvantifikován metodou kalibrační přímky izokratickou elucí za použití směsi acetonitrilu a 0,02M acetátového pufru (CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>) o pH = 4,00 (20:80, v/v). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,50 ml min<sup>-1</sup>. Objem nástřiku vzorku byl 5 μl a celková doba analýzy byla 6 minut. Pro sestavení kalibrační přímky bylo použito pět předem připravených standardních roztoků theofylinu v koncentračním rozsahu 20–100 mg dm<sup>-3</sup>. Statistické vyhodnocení bylo provedeno z triplicitního stanovení vzorku.

Hmotnostní detekce probíhala za použití ESI ionizace v pozitivním a negativním módu. Pro zmlžení byl použit dusík (55 psi). Jako sušící plyn byl použit dusík o průtoku 11 dm<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup>, teplotě 350 °C a napětí na kapiláře 4 kV. Analýza probíhala v rozsahu 100–700 *m/z*.

Množství theofylinu ve vzorku bylo ověřeno podle literatury [62] metodou UV-spektrofotometrie. Vzorek čípku rozpuštěného v 250 ml mobilní fáze byl ředěn roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 0,1 mol dm<sup>-3</sup>. Předpokládaná koncentrace ředěného vzorku theofylinu byla 1,10 mg dm<sup>-3</sup>, tedy  $6,13 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>. Kvantifikace probíhala při vlnové délce 276 nm metodou standardního přídatku. Do křemenné kyvety obsahující 2,00 ml připraveného vzorku byly pipetovány přídatky o objemu 25 μl ( $n = 6$ ) o koncentraci 100 mg dm<sup>-3</sup>, což odpovídá molární koncentraci  $5,55 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>.

### 3.4 Statistické zpracování dat

Výpočty retenčních faktorů vycházejí z literatury [68]. Faktor asymetrie ( $A_s$ ) byl vypočítán podle vzorce

$$A_s = \frac{A}{B} \quad (3.1)$$

kde  $A$  je rozdíl retenčního času píku a retenčního času v 10% výšce na vzestupné části píku,  $B$  je rozdíl retenčního času v 10% výšce na sestupné části píku a retenčního času píku.

Počet teoretických pater ( $n$ ) byl vypočítán podle vzorce

$$n = 5,545 \left( \frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (3.2)$$

kde  $t_r$  je retenční čas (min) a  $w_{1/2}$  je šířka píku (min) v polovině výšky píku.

Rozlišení píků ( $R_{1,2}$ ) bylo charakterizováno výpočtem podle vzorce

$$R_{1,2} = \frac{2(t_{r,2} - t_{r,1})}{w_1 + w_2} \quad (3.3)$$

kde  $t_{r,1}$  a  $t_{r,2}$  jsou retenční časy separovaných analytů (min) a  $w_1$  a  $w_2$  (min) pak šířky píků těchto analytů při základně.

Naměřená data byla zpracována běžnými statistickými postupy na hladině významnosti 0,95 (cit. [69]). U dat získaných při jednotlivých stanovení byl proveden Deanův-Dixonův test na odlehlost. Výsledek byl pak vyjádřen jako medián s intervalem spolehlivosti.

Grafy a kalibrační rovnice byly vytvořeny prostřednictvím programu OriginPro 8.0 (Microcal Software, USA). Výpočty byly prováděny v programu Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA).

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

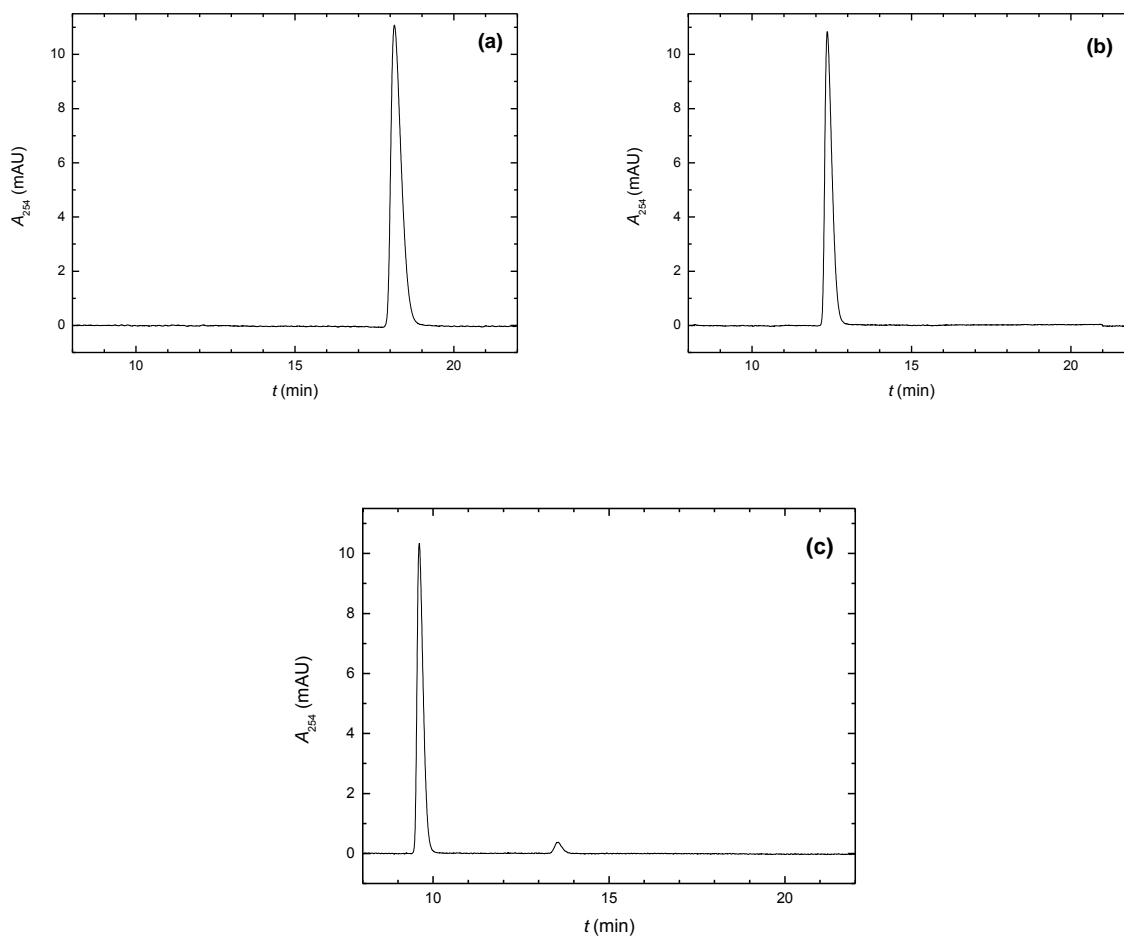
### 4.1 Analýza injekčního roztoku „Chinin-calcium“

#### 4.1.1 Optimalizace chromatografických podmínek

Vzorek injekčního roztoku „Chinin-calcium“ byl analyzován metodou RP-HPLC s UV a fluorescenčním detektorem. Podmínky separace chininu vycházely z literatury [15, 18]. Použití mobilní fáze obsahující 0,02M acetátový pufr ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) o  $\text{pH} = 4,00$  a acetonitril (80:20 v/v) poskytlo úzký symetrický pík chininu ( $A_s = 2,10$ ), proto nebylo složení mobilní fáze dále optimalizováno. Za účelem zkrácení doby analýzy byl optimalizován průtok mobilní fáze v rozmezí  $0,5\text{--}1,0 \text{ ml min}^{-1}$ . Jako optimální se ukázala průtoková rychlost  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ , při které pík chininu eluoval s retenčním časem 9,6 min. Vliv průtoku mobilní fáze na separaci chininu je zobrazen v tab. 4.1, chromatogramy jsou zobrazeny na obr. 4.1.

Tab. 4.1: Vliv průtoku mobilní fáze tvořící acetátový pufr (0,02M,  $\text{pH} = 4,00$ ) a acetonitril (80:20 v/v) na separaci chininu ( $t_r$  retenční čas analytu,  $A_s$  faktor asymetrie píku,  $n$  počet teoretických pater).

průtok ( $\text{ml min}^{-1}$ )	$t_r$ (min)	$A_s$	$n$
0,50	18,1	2,41	14063
0,75	12,4	2,30	13554
1,00	9,6	2,10	13233



Obr. 4.1: Vliv průtoku mobilní fáze na HPLC separaci standardu chininu analyzovaného na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ; Agilent) izokratickou elucí s mobilní fází obsahující acetátový pufr (0,02M, pH = 4,00) a acetonitril. Průtoku mobilní fáze (a) 0,50 ml min<sup>-1</sup>, (b) 0,75 ml min<sup>-1</sup>, (c) 1,00 ml min<sup>-1</sup>. Analyty detegovány UV detektorem při 254 nm.

#### 4.1.2 Kalibrační závislosti

Studovaný vzorek injekčního roztoku byl kvantifikován metodou kalibrační přímky (pětibodová kalibrace) na kapalinovém chromatografu s UV detektorem. Plochy píků jednotlivých standardů byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci. Soubor bodů byl poté proložen přímkou metodou lineární regrese, jejíž rovnice je

$$A = 2090 c \quad (4.1)$$

$$r = 0,9999$$

kde  $A$  je plocha píku ( $\mu\text{AU min}$ ) a  $c$  je koncentrace ( $\text{mg dm}^{-3}$ ).

Pro ověření kvantifikace kapalinovou chromatografií byl vzorek analyzován UV-spektrofotometrií metodou pětibodové kalibrační přímky. Závislost absorbance jednotlivých standardů na jejich koncentraci byla vynesena do grafu. Soubor bodů byl pak proložen přímkou metodou lineární regrese, jejíž rovnice je

$$A_{254} = 27000 c \quad (4.2)$$
$$r = 0,9993$$

kde  $A$  je absorbance (AU) při vlnové délce 254 nm a  $c$  je koncentrace ( $\text{mol dm}^{-3}$ ).

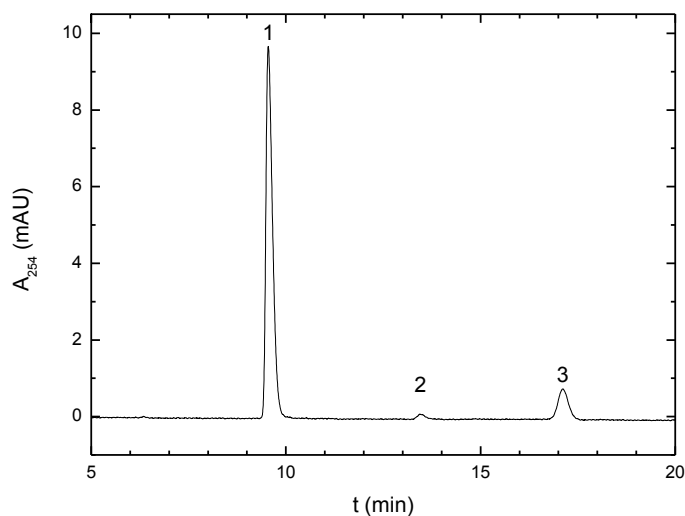
Kvantifikace glukonanu vápenatého probíhala metodou kalibrační přímky atomovou absorpční spektrometrií. Absorbance jednotlivých kalibračních standardů byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci. Soubor bodů byl poté proložen přímkou metodou lineární regrese, jejíž rovnice je

$$A_{422} = 0,30 c - 0,08 \quad (4.3)$$
$$r = 0,9999$$

kde  $A$  je absorbance (AU) při vlnové délce 422,6728 nm a  $c$  je koncentrace ( $\text{mg dm}^{-3}$ ).

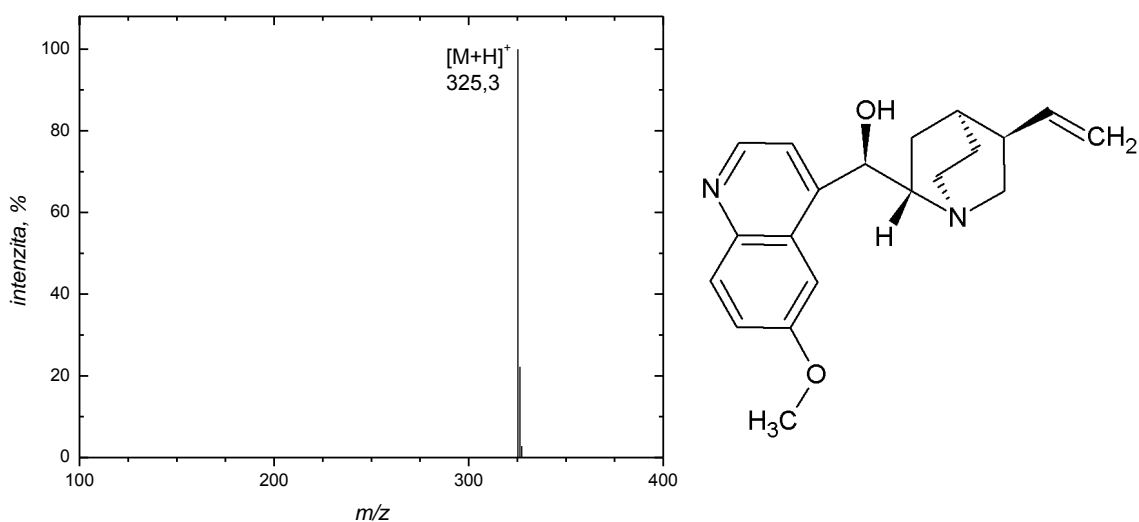
#### 4.1.3 HPLC analýza vzorku

HPLC-UV chromatogram studovaného vzorku „Chinin-calcium“ je zobrazen na obr. 4.2. Pík s retenčním časem 9,6 min příslušející chininu byl identifikován na základě standardu chininu, méně znatelný pík s retenčním časem 13,5 min byl přítomný také ve standardu. Podle literatury [70, 71] by se mohlo jednat o dihydrochinin [CASN 522-66-7]. Pík s retenčním časem 17,1 min by na základě literatury [10, 11, 12] mohl být degradačním produktem chininu, chinotoxinem.

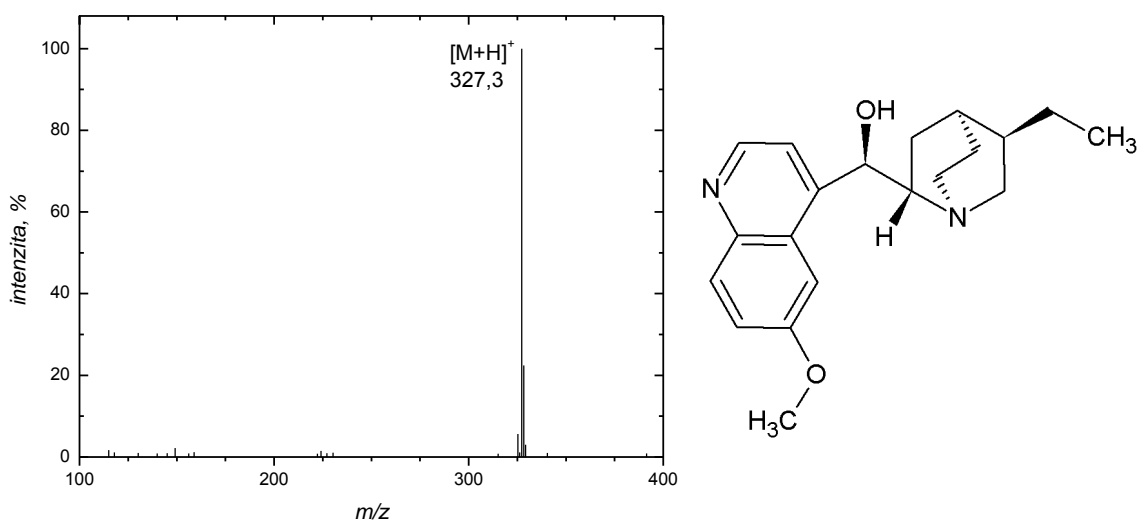


Obr. 4.2: HPLC-UV chromatogram vzorku injekčního roztoku „Chinin-calcium“ analyzovaného na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5 μm; Agilent) izokratickou elucí s mobilní fází obsahující acetátový pufr (0,02M, pH = 4,00) a acetonitril (80:20 v/v) při vlnové délce 254 nm. Píky (1) chinin, (2) dihydrochinin, (3) chinotoxin.

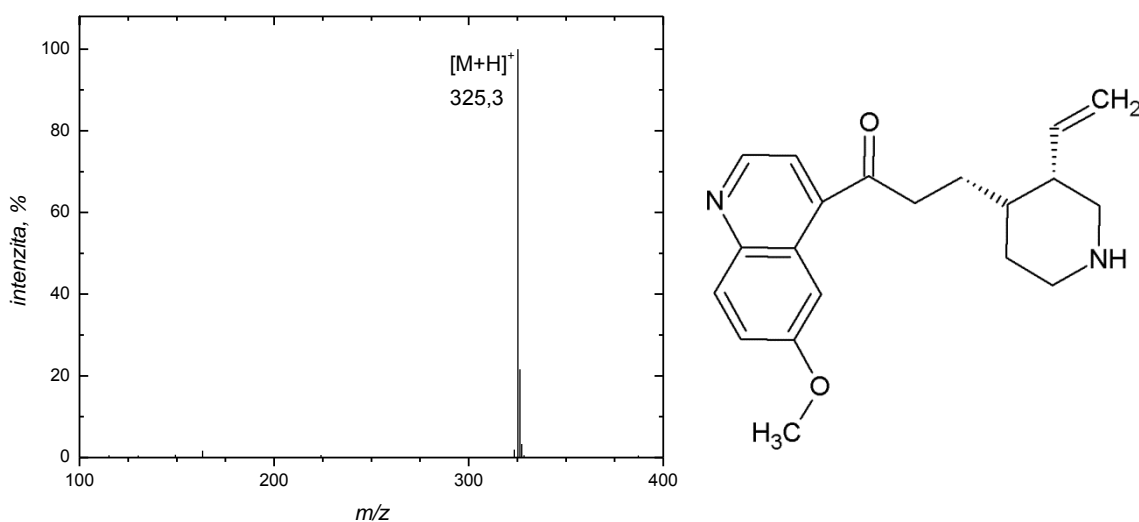
Identifikace píků byla ověřena pomocí hmotnostních spekter injekčního roztoku „Chinin-calcium“. Podle spektra prvního píku (obr. 4.3) lze usuzovat, že  $m/z = 325,3$  patří protonované molekule chininu [14]. Spektrum druhého píku (obr. 4.4) obsahuje vedle iontu  $m/z = 327,3$  s vysokou intenzitou mnoho dalších iontů v rozsahu  $m/z = 115-326$ . Iont s  $m/z = 327,3$  by mohl být na základě literatury [70, 71] identifikován jako dihydrochinin, jehož relativní molekulová hmotnost je 326,43. Dihydrochinin fluoreskuje, podobně jako chinin, při emisní vlnové délce 375 nm [16], což je patrné z chromatogramu na obr. 4.6. Třetí pík (obr. 4.5) má nejintenzivnější iont s  $m/z = 325,3$ . Je tedy pravděpodobné, že se jedná o látku identifikovanou jako chinotoxin, který má relativní molekulovou hmotnost stejnou jako chinin ( $M_r = 324,42$ ).



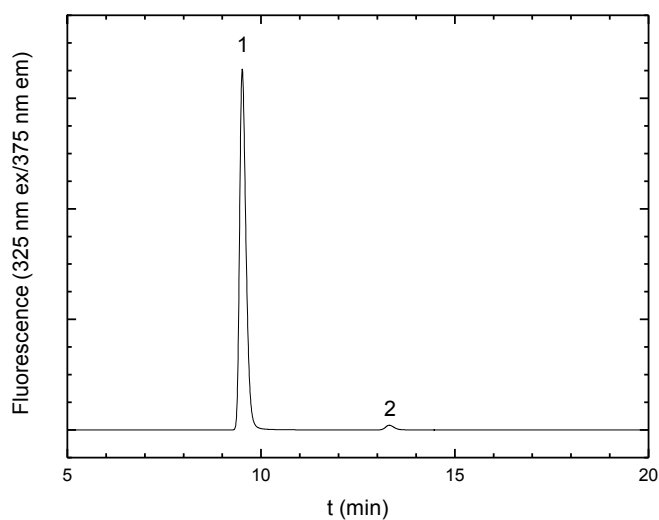
Obr. 4.3: Hmotnostní spektrum ESI v pozitivním módu píku (1) s retenčním časem 9,6 min z HPLC analýzy injekčního vzorku „Chinin-calcium“ a odpovídající vzorec identifikovaného analytu: chinin.



Obr. 4.4: Hmotnostní spektrum ESI v pozitivním módu píku (2) s retenčním časem 13,5 min z HPLC analýzy injekčního vzorku „Chinin-calcium“ a odpovídající vzorec identifikovaného analytu: dihydrochinin.



Obr. 4.5: Hmotnostní spektrum ESI v pozitivním módu píku (3) s retenčním časem 17,1 min z HPLC analýzy injekčního vzorku „Chinin-calcium“ a odpovídající vzorec identifikovaného analytu: chinotoxin.

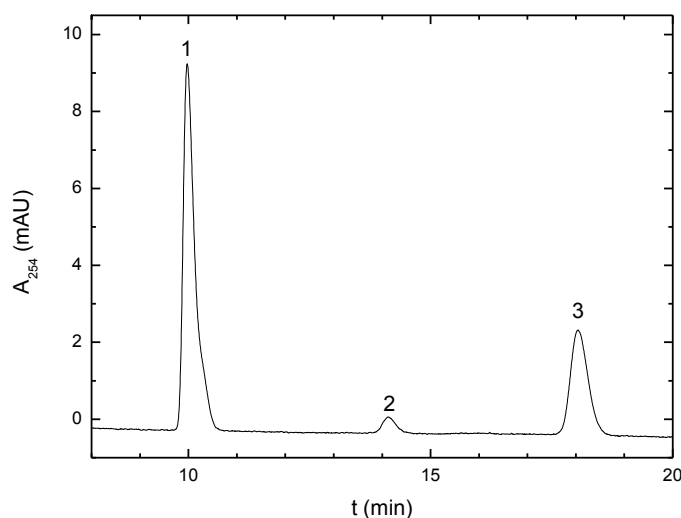


Obr. 4.6: HPLC-FLD chromatogram vzorku injekčního roztoku „Chinin-calcium“ analyzovaného na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5 μm; Agilent) izokratickou elucí s mobilní fází obsahující acetátový pufr (0,02M, pH = 4,00) a acetonitril (80:20 v/v) s fluorescenční detekcí ( $\lambda_{em} = 325$  nm,  $\lambda_{ex} = 375$  nm). Píky (1) chinin, (2) dihydrochinin.

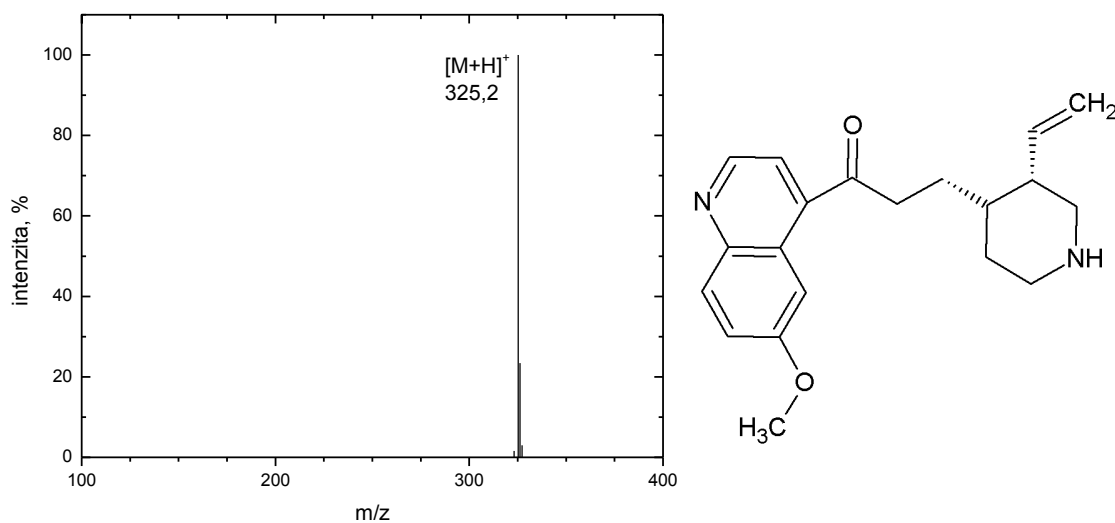
Za účelem potvrzení hypotézy o chinotoxinu byl ze standardu chininu připraven chinotoxin na základě literatury [67]. Do varné baňky bylo naváženo 0,5 g chininu, který byl rozpuštěn ve 100 ml octové kyseliny ředěné vodou v poměru 1:13 destilovanou vodou.



Směs byla zahřívána po dobu 4,5 hodiny pod zpětným chladičem. Výsledný roztok žlutého zbarvení byl pak analyzován HPLC za stejných podmínek jako vzorek injekčního roztoku „Chinin-calcium“. Na chromatogramu (obr. 4.7) je zřejmý pík (3) připraveného chinotoxinu, což bylo potvrzeno kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí (obr. 4.8). Při HPLC s fluorescenčním detektorem byly v připraveném roztoku chinotoxinu detegovatelné pouze píky (1) a (2) viditelné při excitační vlnové délce 325 nm. Podle literatury [72] je fluorescence chinotoxinu posunuta k vyšším vlnovým délkám, proto jej není možné při zmíněné vlnové délce detegovat, což vysvětluje jeho „nepřítomnost“ v HPLC-FLD analýze vzorku injekčního roztoku „Chinin-calcium“ (obr. 4.6).



Obr. 4.7: HPLC-UV chromatogram připraveného chinotoxinu analyzovaného na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5  $\mu$ m; Agilent) izokratickou elucí s mobilní fází obsahující acetátový pufr (0,02M, pH = 4,00) a acetonitril (80:20 v/v). UV detekce při vlnové délce 254 nm. Píky (1) chinin, (2) dihydrochinin, (3) chinotoxin.



Obr. 4.8: Hmotnostní spektrum ESI v pozitivním módu píku (3) s retenčním časem 17,1 min z HPLC analýzy chinotoxinu připraveného ze standardu chininu a strukturní vzorec chinotoxinu.

#### 4.1.4 Stanovení obsahu chininu ve vzorku „Chinin-calcium“

Kvantifikaci chininu metodou kalibrační přímky pomocí HPLC-UV bylo zjištěno, že vzorek ředěného injekčního roztoku obsahuje  $55,2 \pm 0,6 \text{ mg dm}^{-3}$ , což odpovídá  $92,0 \pm 1,8 \%$  deklarovaného množství účinné látky (variační koeficient nepřesáhl 5 %).

Pro ověření kvantifikace byl ředěný vzorek injekčního roztoku analyzován pomocí UV-spektrofotometrie metodou kalibrační přímky. Bylo zjištěno, že studovaný vzorek obsahuje  $(3,41 \pm 0,08) \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (odpovídá  $1,11 \pm 0,03 \text{ mg dm}^{-3}$ ), tedy  $92,3 \pm 2,2 \%$  deklarovaného obsahu chininu (variační koeficient nepřesahuje 5 %).

#### 4.1.5 Stanovení obsahu glukonanu vápenatého ve vzorku „Chinin-calcium“

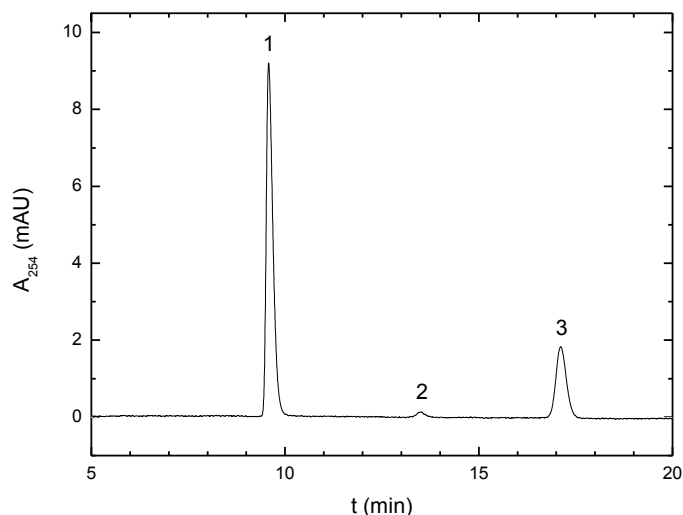
Glukonan vápenatý, resp. vápník, byl kvantifikován metodou kalibrační přímky atomovou absorpční spektrometrií, kterou byl stanoven obsah vápníku v ředěném vzorku a koncentrace glukonanu byla zpětně vypočtena. Ředěný vzorek obsahuje  $0,363 \pm 0,038 \text{ mg dm}^{-3}$ , což odpovídá  $96,8 \pm 0,1 \%$  deklarovaného obsahu glukonanu vápenatého.

## 4.2 Analýza injekčního roztoku „Cardiazol-chinin“

Vzorek injekčního roztoku „Cardiazol-chinin“ byl analyzován metodou RP-HPLC s UV a fluorescenčním detektorem. Podmínky separace chininu jsou shodné jako při analýze vzorku injekčního roztoku „Chinin-calcium“ (viz kap. 4.1.1). Kalibrační závislosti jsou uvedeny v kapitole 4.1.2.

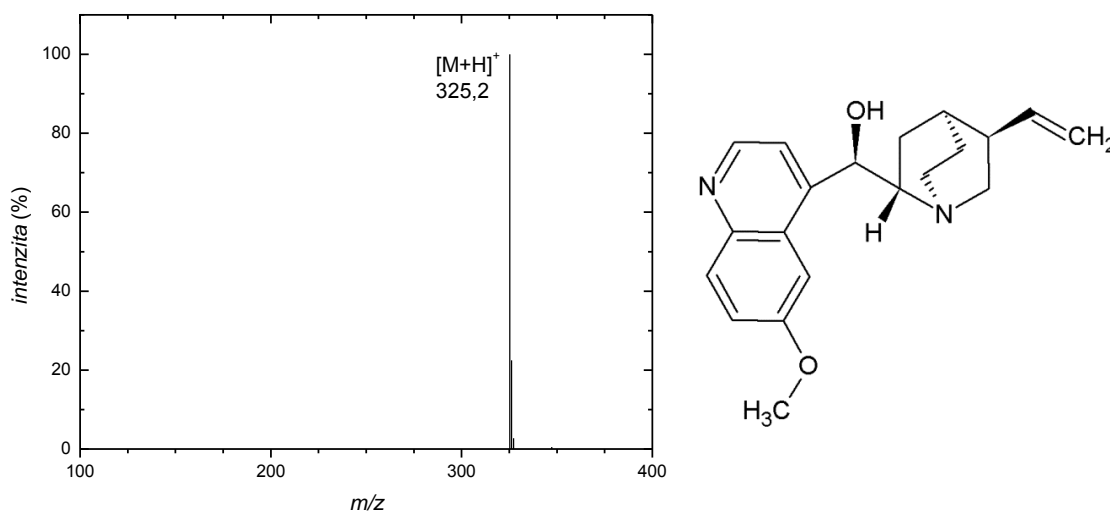
### 4.2.1 HPLC analýza vzorku

HPLC-UV chromatogram studovaného vzorku „Cardiazol-chinin“ je zobrazen na obr. 4.9. Pík s retenčním časem 9,6 min příslušející chininu byl identifikován na základě standardu chininu, méně znatelný pík s retenčním časem 13,5 min byl přítomný také ve standardu. Jak bylo uvedeno v kapitole 4.1.3, mohlo by se jednat podle literatury [70, 71] o dihydrochinin. Pík s retenčním časem 17,1 min by na základě literatury [10, 11, 12] mohl být degradačním produktem chininu, chinotoxinem.

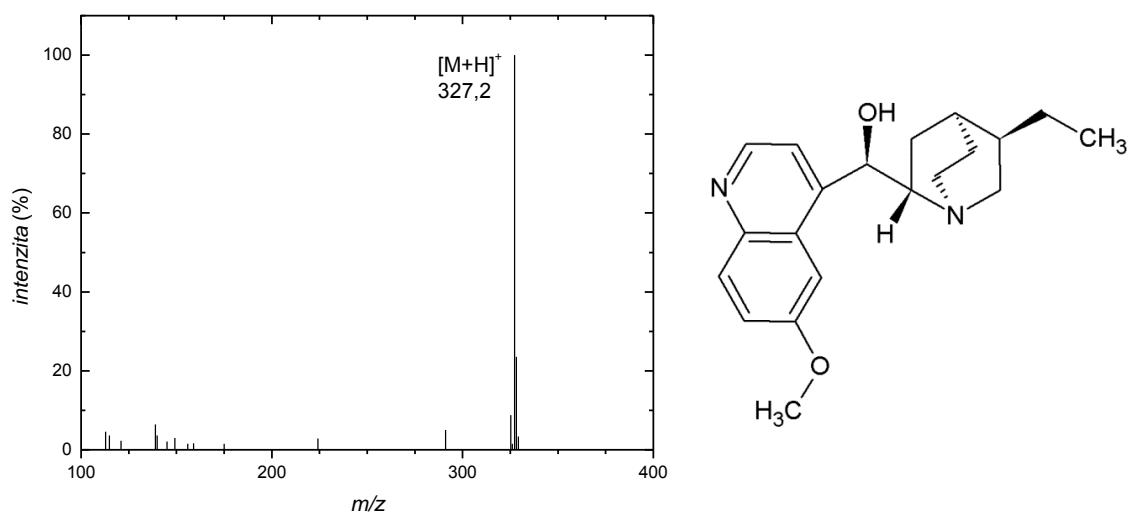


Obr. 4.9: HPLC-UV chromatogram vzorku injekčního roztoku „Cardiazol-chinin“ analyzovaného na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5 μm; Agilent) izokratickou elucí s mobilní fází obsahující acetátový pufr (0,02M, pH = 4,00) a acetonitril (80:20 v/v). UV detekce probíhala při vlnové délce 254 nm. Píky (1) chinin, (2) dihydrochinin, (3) chinotoxin.

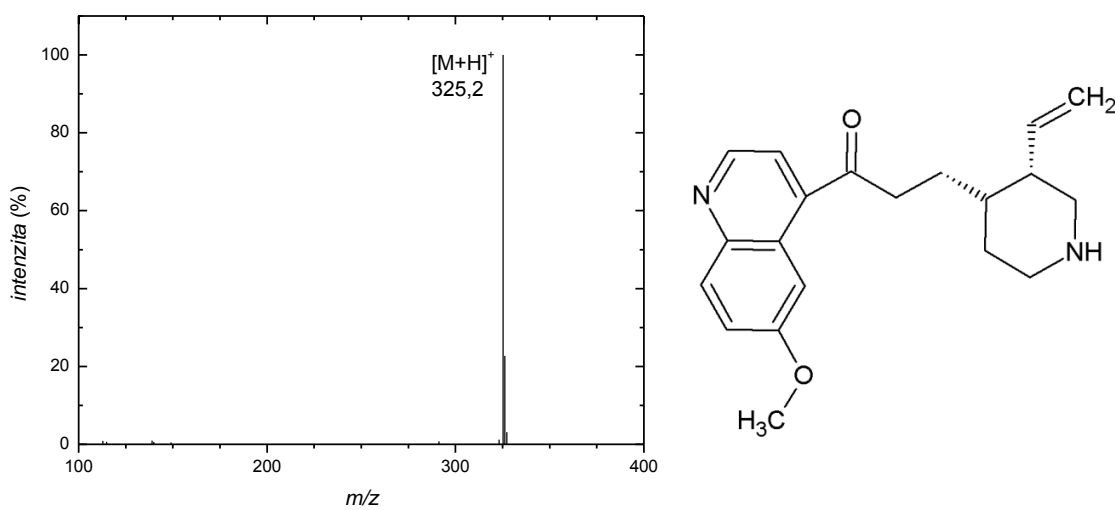
Identifikace separovaných analytů byla ověřena pomocí hmotnostních spekter injekčního roztoku „Cardiazol-chinin“. Podle spektra prvního píku (obr. 4.10) je pravděpodobné, že  $m/z = 325,2$  patří protonované molekule chininu. Spektrum druhého píku (obr. 4.11) obsahuje vedle iontu  $m/z = 327,2$  s vysokou intenzitou mnoho dalších iontů v rozsahu  $m/z$  110–326. Ion s  $m/z = 327,3$  by mohl být na základě literatury [70, 71] identifikován jako dihydrochinin ( $M_r = 326,43$ ), jak bylo uvedeno v kapitole 4.1.3. Dihydrochinin fluoreskuje, podobně jako chinin, při emitační vlnové délce 375 nm [16], což je patrné z chromatogramu na obr. 4.13. Třetí pík (obr. 4. 12) má nejintenzivnější iont s  $m/z = 325,3$ . Lze tedy opět předpokládat, že se jedná o látku identifikovanou jako chinotoxin, který má relativní molekulovou hmotnost stejnou jako chinin ( $M_r = 324,42$ ).



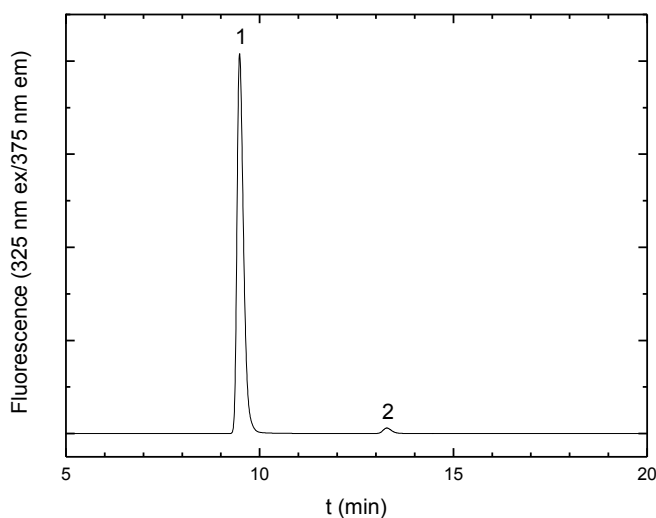
Obr. 4.10: Hmotnostní spektrum ESI v pozitivním módu píku (1) s retenčním časem 9,6 min z HPLC analýzy injekčního vzorku „Cardiazol-chinin“ a odpovídající vzorec identifikovaného analytu: chinin.



Obr. 4.11: Hmotnostní spektrum ESI v pozitivním módu píku (2) s retenčním časem 13,5 min z HPLC analýzy injekčního vzorku „Cardiazol-chinin“ a odpovídající vzorec identifikovaného analytu: dihydrochinin.



Obr. 4.12: Hmotnostní spektrum ESI v pozitivním módu píku (3) s retenčním časem 17,1 min z HPLC analýzy injekčního vzorku „Cardiazol-chinin“ a odpovídající vzorec identifikovaného analytu: chinotoxin.



Obr. 4.13: HPLC-FLD chromatogram vzorku injekčního roztoku „Cardiazol-chinin“ analyzovaného na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5 μm; Agilent) izokratickou elucí s mobilní fází obsahující acetátový pufr (0,02M, pH = 4,00) a acetonitril (80:20 v/v) s fluorescenční detekcí ( $\lambda_{em} = 325$  nm,  $\lambda_{ex} = 375$  nm). Píky (1) chinin, (2) dihydrochinin.

Ověření hypotézy o chinotoxinu jako degradačním profuktu chininu bylo diskutováno výše v kap. 4.1.3. I v případě HPLC-FLD analýzy injekčního roztoku „Cardiazol-chinin“ (obr. 4.13) nebyl pík chinotoxinu viditelný, protože jeho exitační vlnová délka je posunuta k vyšším vlnovým délkám [72].

Metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí byl v pozitivním módu ionizace detegován ještě iont s  $m/z = 139,1$ . Pravděpodobně se jedná o protonovaný pentamethylentetrazol [CASN 54-95-5], jehož molekulová hmotnost je 138,170. Analyt nebyl při analýze HPLC-UV ve zvoleném rozsahu vlnových délek detegován. Z důvodu absence standardu nebyla látka kvantifikována.

#### 4.2.2 Stanovení obsahu chininu ve vzorku „Cardiazol-chinin“

Stanovením obsahu chininu metodou kalibrační přímky pomocí HPLC-UV bylo zjištěno, že vzorek ředěného injekčního roztoku obsahuje  $52,3 \pm 0,2$  mg  $\text{dm}^{-3}$ , což odpovídá  $87,2 \pm 0,5$  % deklarovaného množství účinné látky (variační koeficient nepřesáhl 5 %).

Pro ověření kvantifikace byl ředěný vzorek injekčního roztoku analyzován pomocí UV-spektrofotometrie metodou kalibrační přímky. Bylo zjištěno, že studovaný vzorek

obsahuje  $5,71 \pm 0,10 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> (odpovídá  $1,85 \pm 0,03$  mg dm<sup>-3</sup>), tedy  $94,1 \pm 1,7$  % deklarovaného obsahu chininu (variační koeficient nepřesahuje 5 %).

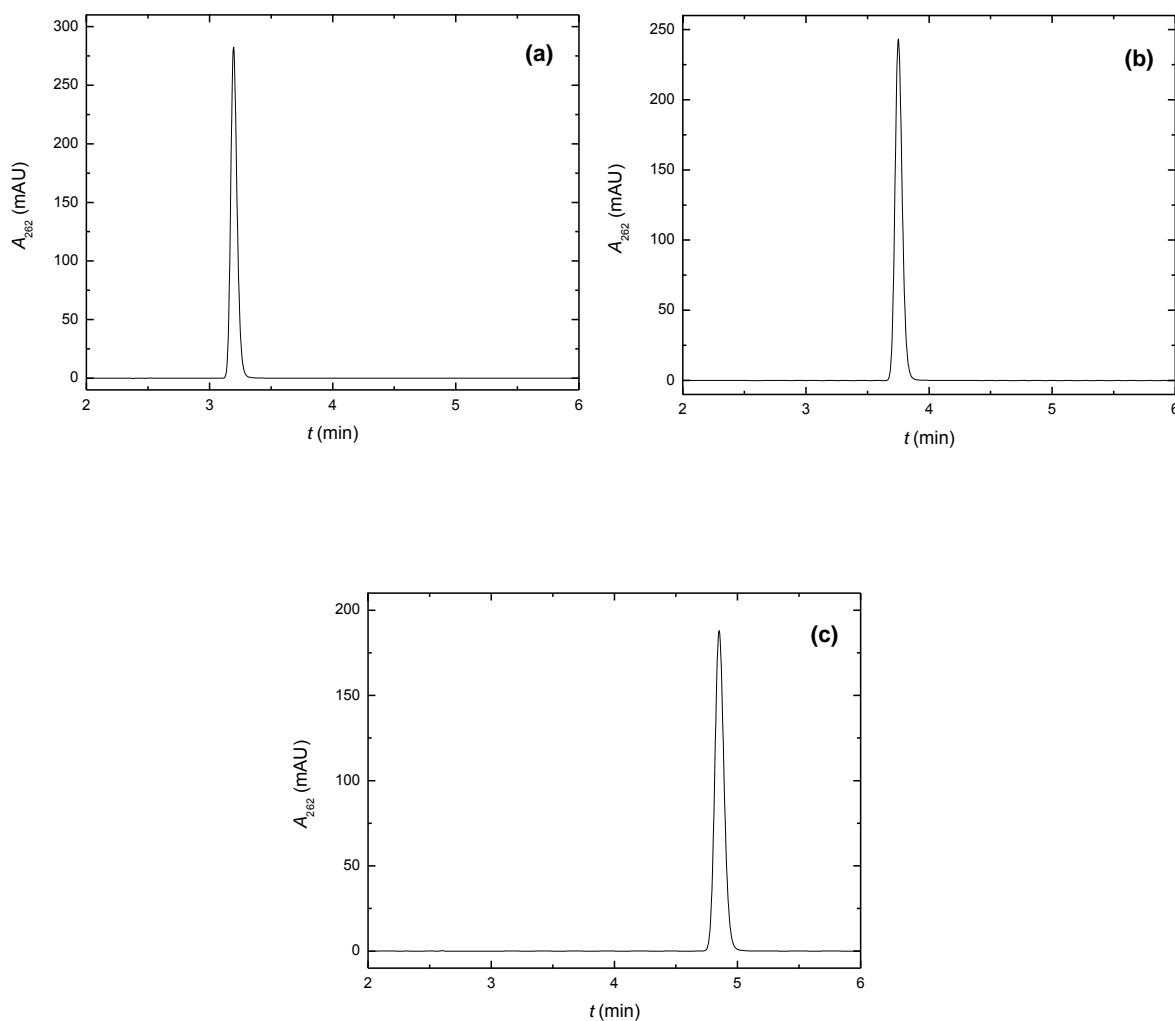
### 4.3 Analýza tablety „Proseptol“

#### 4.3.1 Optimalizace chromatografických podmínek

Vzorek tablety „Proseptol“ byl analyzován pomocí kapalinové chromatografie s UV detekcí. Podmínky separace vycházely z literatury [29]. Byl optimalizován poměr acetonitrilu a 0,1% octové v rozmezí podílu acetonitrilu 5–15 % (v/v) při průtokové rychlosti 0,75 ml min<sup>-1</sup>. Vliv složení mobilní fáze na separaci sulfanilamidu je uveden v tab. 4.2. Jako optimální byla zvolena mobilní fáze obsahující acetonitril a octovou kyselinu v poměru 10:90 (v/v), odpovídající chromatogram je zobrazen na obr. 4.14 b.

Tab. 4.2: Vliv složení mobilní fáze (acetonitril a 0,1% octová kyselina) na separaci sulfanilamidu při průtoku 0,75 ml min<sup>-1</sup> mobilní fáze ( $t_r$  retenční čas analytu,  $A_s$  faktor asymetrie píku,  $n$  počet teoretických pater).

podíl (%)	$t_r$ (min)	$A_s$	$n$
5	4,9	1,17	19414
10	3,8	1,20	19667
15	3,2	1,30	18724



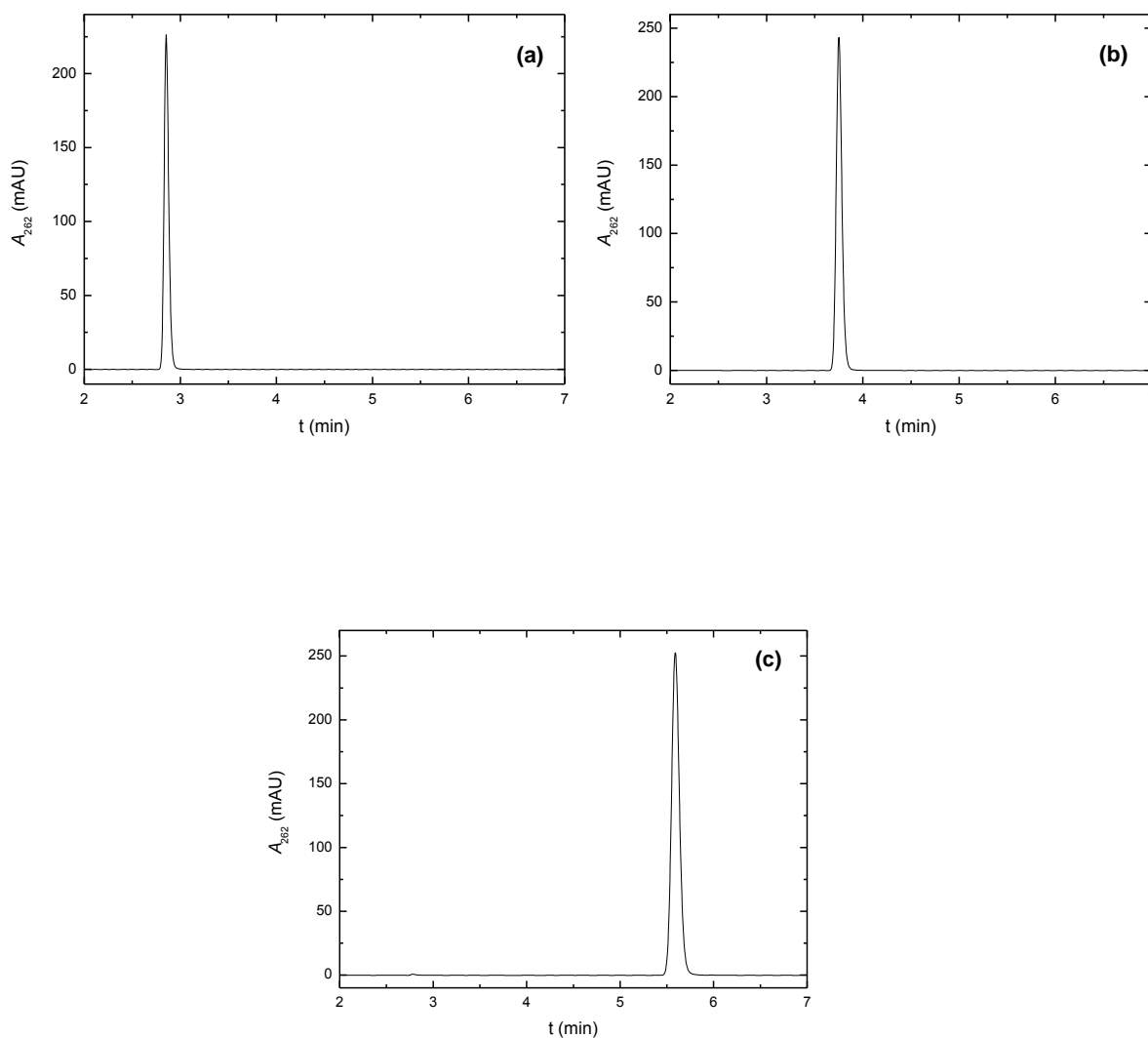
Obr. 4.14: Vliv podílu (v/v) acetonitrilu a 0,1% octové kyseliny na HPLC-UV separaci standardu sulfanilamidu analyzovaného na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5  $\mu$ m; Agilent) izokratickou elucí při průtokové rychlosti 0,75 ml min<sup>-1</sup> a detekci při vlnové délce 262 nm s průtokem. Podíl směsi acetonitril–0,1% octová kyselina (a) 15:85 (b) 10:90, (c) 5:95.

Dále byla optimalizována průtoková rychlost mobilní fáze v rozmezí od 0,50 do 1,00 ml min<sup>-1</sup> za použití mobilní fáze sestávající se z acetonitrilu a 0,1% octové kyseliny (10:90 v/v). Vliv průtoku mobilní fáze na separaci je znázorněn na obr. 4.15. Z tab. 4.3 je zřejmé, že průtok 0,75 ml min<sup>-1</sup> poskytuje symetrický pík sulfanilamidu a zároveň rychlou analýzu při současném zachování účinnosti separace.



Tab. 4.3: Vliv průtoku mobilní fáze (acetonitril–0,1% octová kyselina, 10:90 v/v) na separaci sulfanilamidu ( $t_r$  retenční čas analytu,  $A_s$  faktor asymetrie píku,  $n$  počet teoretických pater).

průtok (ml min <sup>-1</sup> )	$t_r$ (min)	$A_s$	$n$
0,50	5,6	1,21	20471
0,75	3,8	1,20	19667
1,00	2,9	1,36	16680



Obr 4.15: Vliv rychlosti průtoku mobilní fáze na HPLC-UV separaci standardu sulfanilamidu analyzovaného na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5  $\mu$ m; Agilent) izokratickou elucí s mobilní fází obsahující acetonitril a 0,1% octovou kyselinu (10:90 v/v) při vlnové délce 262 nm. Průtoková rychlost mobilní fáze: (a) 1,00 ml min<sup>-1</sup>, (b) 0,75 ml min<sup>-1</sup>, (c) 0,50 ml min<sup>-1</sup>.

#### 4.3.2 Kalibrační závislosti

Studovaný vzorek tablety byl kvantifikován metodou kalibrační přímky (pětibodová kalibrace) na kapalinovém chromatografu s UV detektorem. Plochy píků jednotlivých standardů byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci. Soubor bodů byl poté proložen přímkou metodou lineární regrese. Její rovnice je

$$A = 16700 c \quad (4.4)$$
$$r = 0,9999$$

kde  $A$  je plocha píku ( $\mu\text{AU min}$ ) a  $c$  je koncentrace ( $\text{mg dm}^{-3}$ ).

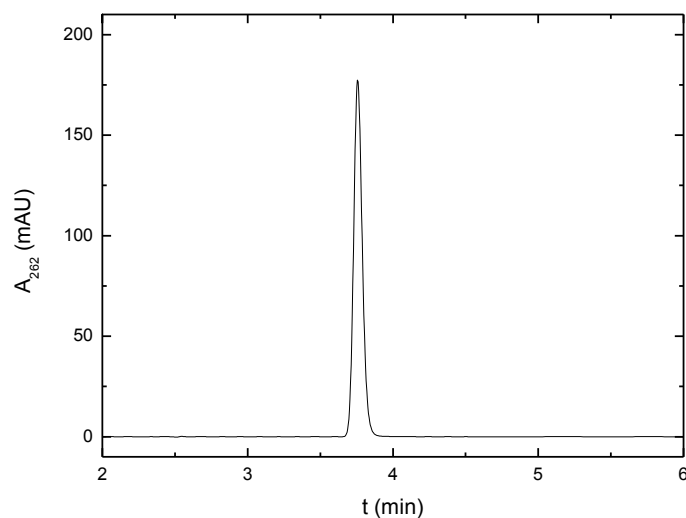
Pro ověření kvantifikace byla provedena analýza UV-spektrofotometrií metodou pětibodové kalibrační přímky. Závislost absorbance jednotlivých standardů na jejich koncentraci byla vynesena do grafu. Soubor bodů byl pak proložen přímkou metodou lineární regrese, jejíž rovnice je

$$A_{276} = 15800 c - 0,005 \quad (4.5)$$
$$r = 0,9998$$

kde  $A$  je absorbance (AU) při vlnové délce 276 nm a  $c$  je koncentrace ( $\text{mol dm}^{-3}$ ).

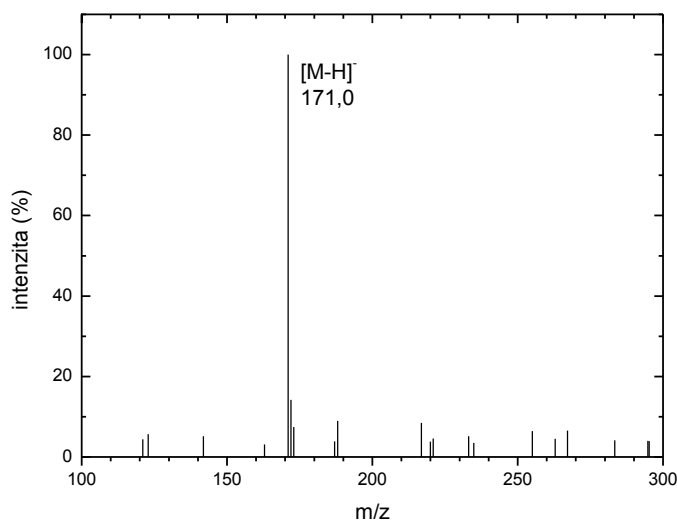
#### 4.3.3 HPLC analýza vzorku

HPLC-UV chromatogram studovaného vzorku tablety je zobrazen na obr. 4.16. Pík s retenčním časem 3,8 min byl identifikován na základě standardu jako sulfanilamid.



Obr. 4.16: HPLC-UV chromatogram vzorku tablety „Proseptol“ analyzovaného na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ; Agilent) izokratickou elucí s mobilní fází obsahující acetonitril a 0,1% octovou kyselinu (10:90 v/v) při vlnové délce 262 nm a průtoku mobilní fáze 0,75 ml min<sup>-1</sup>.

Identifikace píku byla potvrzena hmotnostní detekcí (obr. 4.17). Ion s největší intenzitou  $m/z = 171,0$  patří pravděpodobně deprotonované molekule sulfanilamidu.



Obr. 4.17: Hmotnostní spektrum ESI v negativním módu píku s retenčním časem 3,8 min z HPLC analýzy injekčního vzorku „Proseptol“ a odpovídající vzorec identifikovaného analytu: sulfanilamid.

#### 4.3.4 Stanovení obsahu sulfanilamidu ve vzorku „Proseptol“

Sulfanilamid byl ve studovaném vzorku tablety kvantifikován metodou kalibrační přímky pomocí HPLC-UV. Bylo zjištěno, že ředěný roztok tablety obsahuje  $43,8 \pm 0,2 \text{ mg dm}^{-3}$ , což odpovídá  $91,7 \pm 0,4 \%$  deklarovaného množství účinné látky (variační koeficient nepřesáhl 5 %, při výpočtu byla zohledněna nižší hmotnost tablety).

Pro ověření kvantifikace byl ředěný vzorek injekčního roztoku analyzován pomocí UV-spektrofotometrie metodou kalibrační přímky. Bylo zjištěno, že studovaný vzorek obsahuje  $5,09 \pm 0,10 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (odpovídá  $0,88 \pm 0,02 \text{ mg dm}^{-3}$ ), tedy  $91,6 \pm 1,7 \%$  deklarovaného obsahu chininu (variační koeficient nepřesahuje 5 %, při výpočtu byla zohledněna nižší hmotnost tablety).

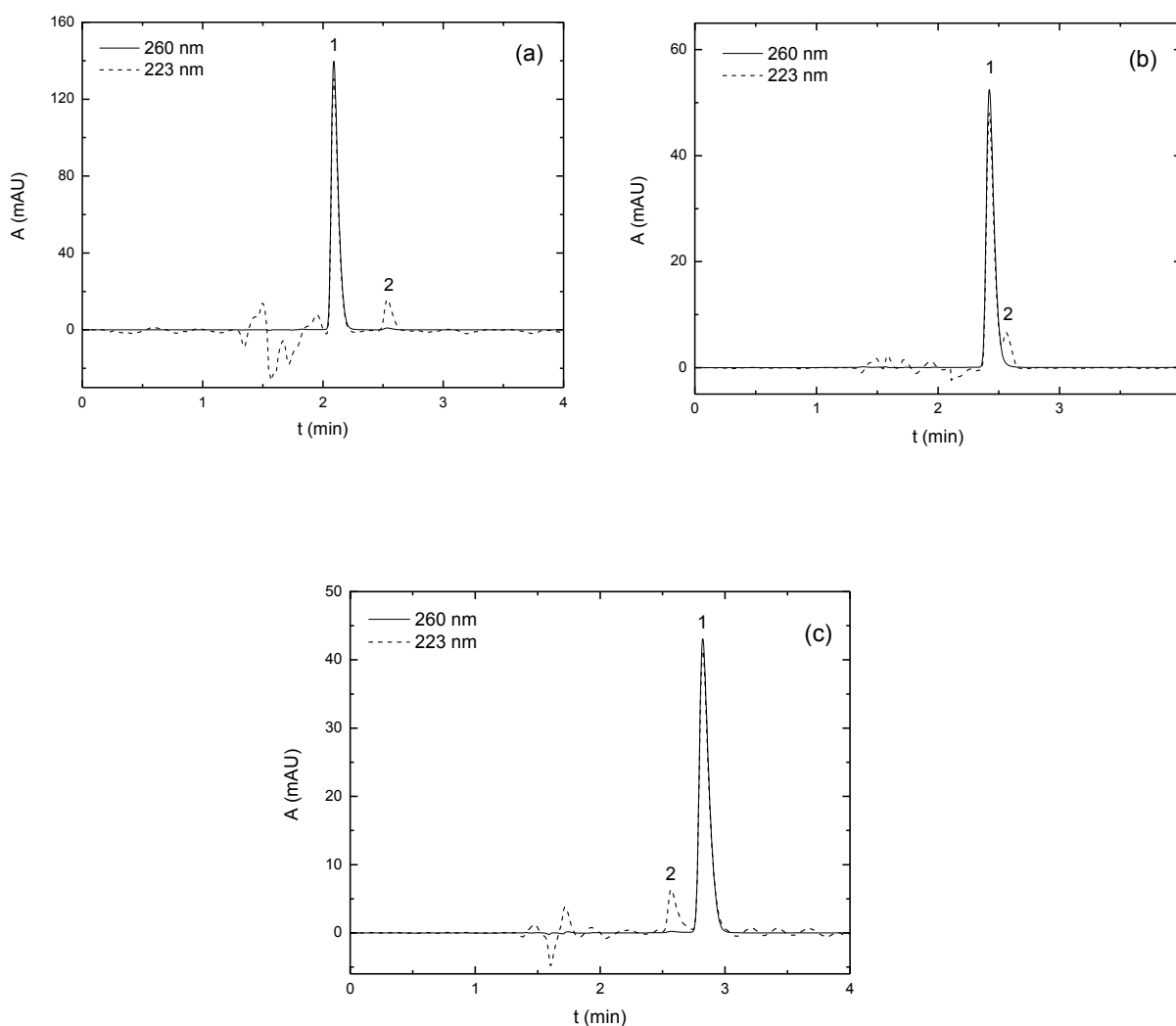
### 4.4 Analýza tablety „Veraethyl“

#### 4.4.1 Optimalizace chromatografických podmínek

Vzorek tablety „Veraethyl“ byl analyzován pomocí kapalinové chromatografie s UV detekcí. Aminofenazon byl analyzován při vlnové délce 260 nm, barbital pak při 223 nm. Podmínky separace vycházely z literatury [35, 39, 73]. Bylo optimalizováno pH 0,02M acetátového pufru ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) v rozsahu 3,40–4,00. Poměr acetonitrilu a acetátového pufru byl nastaven na 30:70 (v/v), průtok byl nastaven na  $1,00 \text{ ml min}^{-1}$ . Při pH 3,70 došlo k překryvu píku aminofenazonu a barbitalu, nebylo proto možné určit faktor asymetrie píku barbitalu a počet teoretických pater. Jak je patrné z chromatogramů (obr. 4.18), změna pH téměř nemá na retenční čas barbitalu vliv, dochází ale ke změnám retenčního času píku aminofenazonu. Při pH 3,40 bylo dosaženo nejvyšší symetrie obou píků. Oba píky jsou při uvedeném pH nejlépe rozlišeny ( $R_{1,2} = 2,19$ ), viz tab. 4.4.

Tab. 4.4: Vliv pH acetátového pufru na separaci aminofenazonu a barbitalu při průtoku mobilní fáze 1,00 ml min<sup>-1</sup> ( $t_r$ , retenční čas analytu,  $A_s$  faktor asymetrie píku,  $n$  počet teoretických pater,  $R_{1,2}$  rozlišení píků). Mobilní fáze sestává z acetonitrilu a 0,02M acetátového pufru (30:70 v/v).

pH	$R_{1,2}$	$t_r$ (min)		$A_s$		$n$	
		aminofenazon	barbital	aminofenazon	barbital	aminofenazon	barbital
3,40	2,19	2,1	2,5	1,90	1,93	6515	7272
3,70	0,84	2,4	2,6	2,09	–	6622	–
4,00	1,19	2,8	2,6	2,24	3,33	6558	5442



Obr. 4.18: Vliv pH acetátového pufru na HPLC-UV separaci směsi standardů (1) aminofenazonu a (2) barbitalu na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5 μm; Agilent) izokratickou elucí s mobilní fází obsahující acetonitril a 0,02 M acetátový pufr (CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>) v poměru 30:70 (v/v), průtok 1,00 ml min<sup>-1</sup>. Hodnota pH pufru: (a) pH = 3,40, (b) pH = 3,70, (c) pH = 4,00.

Dále byl optimalizován podíl acetonitrilu v mobilní fázi v rozsahu 20–30% při pH 0,02M acetátového pufru rovno 3,40 a průtoku 1,00 ml min<sup>-1</sup>. Jako optimální byl vybrán vzhledem k účinnosti separace barbitalu (viz tab. 4.5) podíl 30% acetonitrilu.

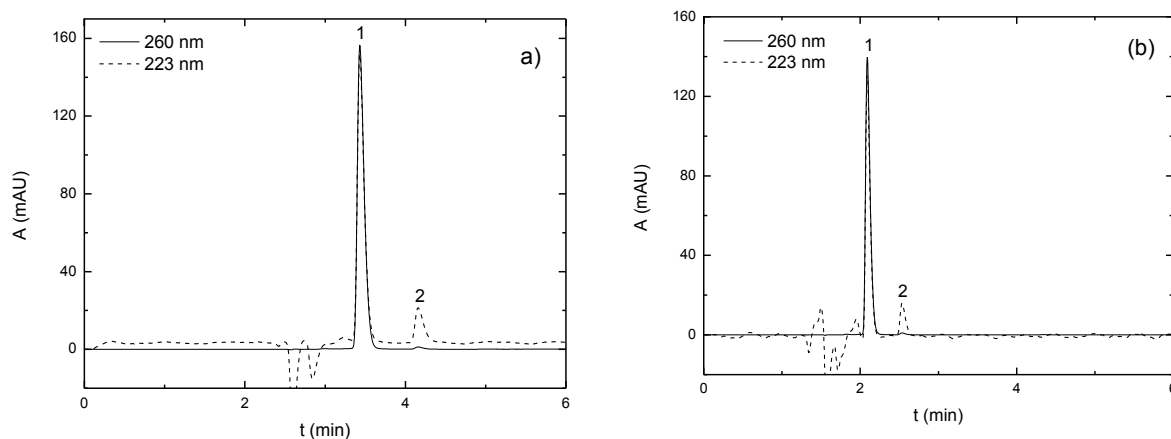
Tab. 4.5: Vliv podílu acetonitrilu v mobilní fázi (acetonitril a 0,02M acetátový pufr, pH = 3,40) na separaci aminofenazonu a barbitalu při průtoku mobilní fáze 1,00 ml min<sup>-1</sup> ( $t_r$  retenční čas analytu,  $A_s$  faktor asymetrie píku,  $n$  počet teoretických pater,  $R_{1,2}$  rozlišení píků).

podíl (%)	$R_{1,2}$	$t_r$ (min)		$A_s$		$n$	
		aminofenazon	barbital	aminofenazon	barbital	aminofenazon	barbital
20	4,30	2,8	3,9	2,02	2,26	6461	3072
30	2,19	2,1	2,5	1,90	1,93	6515	7272

Nakonec byl optimalizován průtok mobilní fáze v rozsahu 0,60–1,00 ml min<sup>-1</sup>. Poměr acetonitrilu a 0,02M acetátového pufru (pH = 3,40) byl nastaven na 30:70 (v/v). Vliv průtoku mobilní fáze na separaci analytů je uveden v tab. 4.6. Průtok 1,00 ml min<sup>-1</sup> poskytuje rychlou analýzu, jak je vidět na obr. 4.19, s dostatečným rozlišením píků. Píky jsou zároveň nejméně rozmyté.

Tab. 4.6: Vliv průtoku mobilní fáze (acetonitril a 0,02M acetátový pufr, pH = 3,40, 30:70 v/v) na separaci aminofenazonu a barbitalu ( $t_r$  retenční čas analytu,  $A_s$  faktor asymetrie píku,  $n$  počet teoretických pater,  $R_{1,2}$  rozlišení píků).

průtok (ml min <sup>-1</sup> )	$R_{1,2}$	$t_r$ (min)		$A_s$		$n$	
		aminofenazon	barbital	aminofenazon	barbital	aminofenazon	barbital
0,60	2,58	3,4	4,2	2,03	2,13	7716	7380
0,80	2,09	2,6	3,1	1,98	2,03	6824	7768
1,00	2,19	2,1	2,5	1,90	1,93	6515	7272



Obr. 4.19: Vliv rychlosti pŕtoku mobilnĕ fĕze na separaci smĕsi standardŭ (1) aminofenazonu a (2) barbitalu na kolonĕ Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5  $\mu$ m; Agilent) izokratickou elucĕ s mobilnĕ fĕzĕ obsahujĕcĕ acetonitril a 0,02 M acetĕtovĕ pufr (CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>) pH = 3,40 v pomĕru 30:70 (v/v). Rychlost pŕtoku mobilnĕ fĕze: (a) 0,60 ml min<sup>-1</sup>, (b) 1,00 ml min<sup>-1</sup>.

#### 4.4.2 Kalibraĕnĕ zĕvislosti

*Aminofenazon.* Obsah analytu ve studovanĕm vzorku tablety byl stanoven metodou kalibraĕnĕ pŕĕmky (pĕtibodovĕ kalibrace) na kapalinovĕm chromatografu s UV detektorem pŕi vlnovĕ dĕlce 260 nm. Plochy pĕkŭ jednotlivĕch standardŭ byly vyneseny do grafu v zĕvislosti na koncentraci. Soubor bodŭ byl potĕ proložen pŕĕmkou metodou lineĕrnĕ regrese. Jeĕj rovnice je

$$A = 5800 c \quad (4.6)$$

$$r = 0,9999$$

kde  $A$  je plocha pĕku ( $\mu$ AU min) a  $c$  je koncentrace ( $\text{mg dm}^{-3}$ ).

Ovĕření kvantifikace bylo realizovĕno UV-spektrofotometriĕ metodou standardnĕho pŕĕdavku ( $n = 6$ ). Zĕvislost absorbance jednotlivĕch standardŭ na jejich koncentraci byla vynesena do grafu. Soubor bodŭ byl pak proložen pŕĕmkou metodou lineĕrnĕ regrese, jeĕjĕ rovnice je

$$A = 7900 + 0,19c \quad (4.7)$$

$$r = 0,9999$$

kde  $A$  je absorbance (AU) při vlnové délce 276 nm a  $c$  je koncentrace ( $\text{mol dm}^{-3}$ ).

*Barbital*. Obsah analytu ve studovaném vzorku tablety byl stanoven metodou kalibrační přímky (pětibodová kalibrace) na kapalinovém chromatografu s UV detektorem při vlnové délce 223 nm. Plochy píků jednotlivých standardů byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci. Soubor bodů byl poté proložen přímkou metodou lineární regrese. Její rovnice je

$$A = 680 c + 13000 \quad (4.8)$$

$$r = 0,9996$$

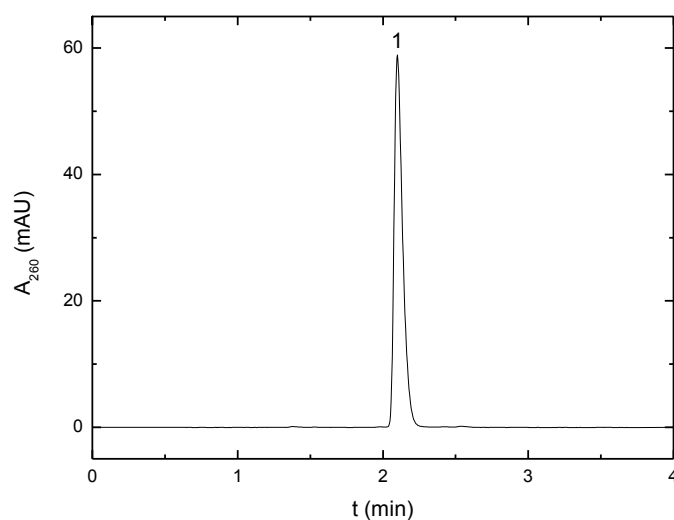
kde  $A$  je plocha píku ( $\mu\text{AU min}$ ) a  $c$  je koncentrace ( $\text{mg dm}^{-3}$ ).

Vzhledem k nízké hodnotě absorpčního maxima a malé hodnotě molárního absorpčního koeficientu nebylo provedeno ověření kvantifikace barbitalu pomocí UV-spektrofotometrie.

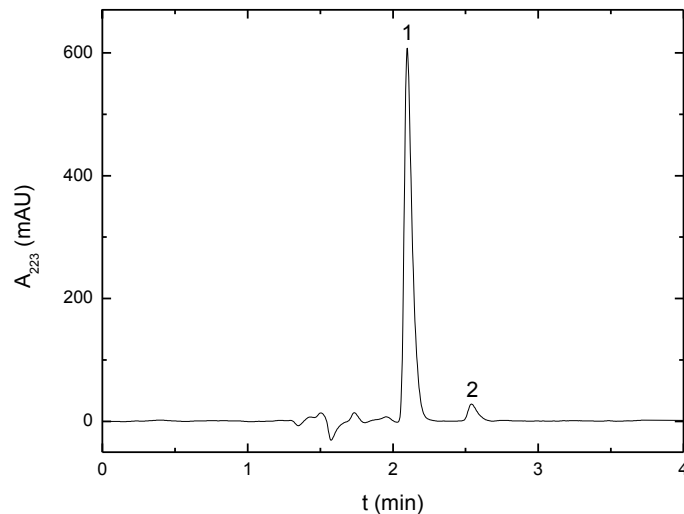
#### 4.4.3 HPLC analýza vzorku

HPLC-UV chromatogram roztoku tablety „Veraethyl“ analyzované při 260 nm je zobrazen na obr. 4.20. Pík (1) s retenčním časem 2,1 min byl identifikován na základě standardu jako aminofenazon. HPLC-UV chromatogram tablety analyzované při 223 nm je zobrazen na obr. 4.21. Pík (2) s retenčním časem 2,5 min byl identifikován na základě standardu jako barbital.



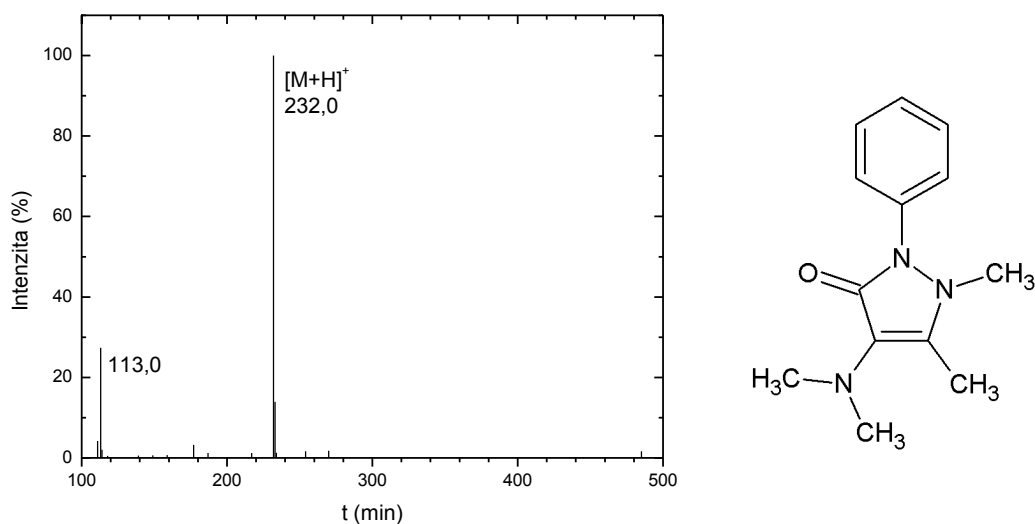


Obr. 4.20: HPLC-UV chromatogram vzorku tablety „Veraethyl“ analyzovaného na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5 μm; Agilent) při vlnové délce 260 nm izokratickou elucí s mobilní fází obsahující acetonitril a acetátový pufr (0,02M, pH = 3,40) v poměru 30:70 (v/v) při průtoku 1,00 ml min<sup>-1</sup>. Pík aminofenazonu s retenčním časem 2,1 min.

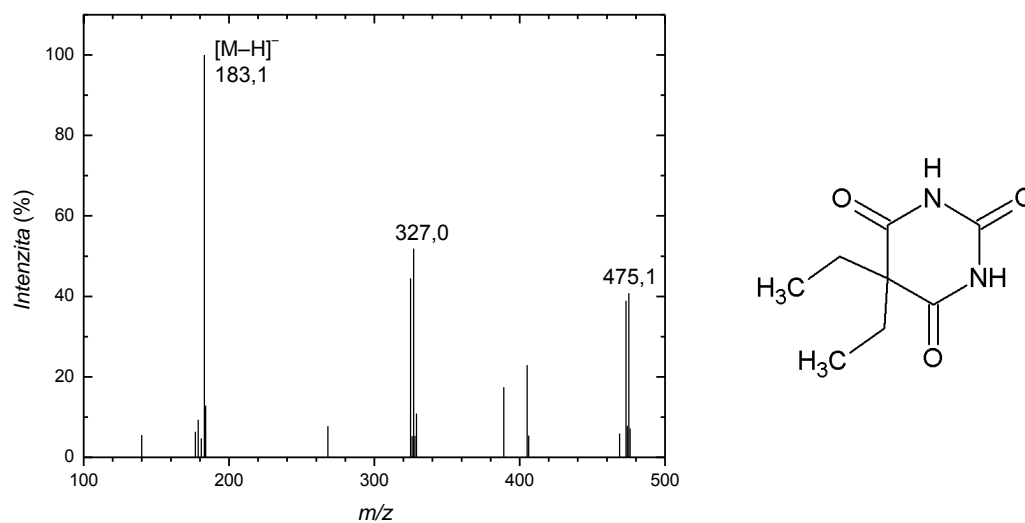


Obr. 4.21: HPLC-UV chromatogram vzorku tablety „Veraethyl“ analyzovaného na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5 μm; Agilent) při vlnové délce 223 nm izokratickou elucí s mobilní fází obsahující acetonitril a acetátový pufr (0,02M, pH = 3,40) v poměru 30:70 (v/v) při průtoku 1,00 ml min<sup>-1</sup>. Pík (1) aminofenazonu s retenčním časem 2,1 min, pík (2) barbitalu s retenčním časem 2,5 min.

Identifikace aminofenazonu byla potvrzena kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Hmotnostní spektrum píku (1) analyzovaného vzorku (obr. 4.22) obsahuje dva hlavní ionty s velkou intenzitou ( $m/z = 232,0$  a  $m/z = 113,0$ ). Hmotnostní spektrum aminofenazonu podle literatury [39] tvoří kromě iontu protonizované molekuly aminofenazonu ( $m/z = 232,0$ ) také rozpadový iont s  $m/z = 113,0$ . Analyt lze tedy identifikovat jako aminofenazon. Hmotnostní spektrum píku (2) analyzovaného vzorku (obr. 4.23) obsahuje iont s největší intenzitou  $m/z = 183,1$ . Podle literatury [52] se pravděpodobně jedná o deprotonovanou molekulu barbitalu. Ve spektru se také vyskytují intenzivní ionty s  $m/z = 327,0$  a  $m/z = 475,1$ . Tyto ionty nebyly dále identifikovány, pravděpodobně se jedná o adukty [74].



Obr. 4.22: Hmotnostní spektrum ESI v pozitivním módu píku (1) s retenčním časem 2,1 min z HPLC analýzy injekčního vzorku „Veraethyl“ a odpovídající vzorec identifikovaného analytu: aminofenazon.



Obr. 4.23: Hmotnostní spektrum ESI v negativním módu píku (2) s retenčním časem 2,5 min z HPLC analýzy injekčního vzorku „Veraethyl“ a odpovídající vzorec identifikovaného analytu: barbitál.

#### 4.4.4 Stanovení obsahu aminofenazonu ve vzorku „Veraethyl“

Kvantifikaci aminofenazonu metodou kalibrační přímky pomocí HPLC s DAD bylo zjištěno, že ředěný vzorek obsahuje  $42,1 \pm 0,2 \text{ mg dm}^{-3}$ , což odpovídá  $82,0 \pm 0,4 \%$  deklarovaného množství účinné látky (variační koeficient nepřesáhl 5 %).

Pro ověření kvantifikace byl ředěný vzorek analyzován UV-spektrofotometrií metodou standardního přidavku ( $n = 6$ ). Bylo zjištěno, že studovaný vzorek obsahuje  $2,3 \pm 0,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  (odpovídá  $5,3 \pm 0,0 \text{ mg dm}^{-3}$ ), tedy  $105,0 \pm 0,0 \%$  deklarovaného obsahu aminofenazonu (variační koeficient nepřesahuje 5 %). Spektrofotometrickou analýzou byl stanoven obsah aminofenazonu o více než 20 % než metodou kapalinové chromatografie. Důvodem rozdílnosti výsledků může být interference analytu způsobující vyšší naměřenou absorbanci. Analýzou pomocí kapalinové chromatografie byly analyty separovány a pravděpodobně tím bylo zamezeno interferenci analytu. Z toho důvodu lze považovat výsledek stanovení kapalinovou chromatografií za správný.

#### 4.4.5 Stanovení obsahu barbitalu ve vzorku „Veraethyl“

Barbital byl ve studovaném vzorku tablety kvantifikován metodou kalibrační přímky pomocí HPLC s UV detekcí. Bylo zjištěno, že ředěný roztok tablety obsahuje

169,2±8,1 mg dm<sup>-3</sup>, což odpovídá 82,9±4,0 % deklarovaného množství účinné látky (variační koeficient nepřesáhl 5 %).

Spektrofotometrické ověření kvantifikace nebylo z důvodu nízkého molárního absorpčního koeficientu barbitalu provedeno.

## 4.5 Analýza dražé „Guaral“

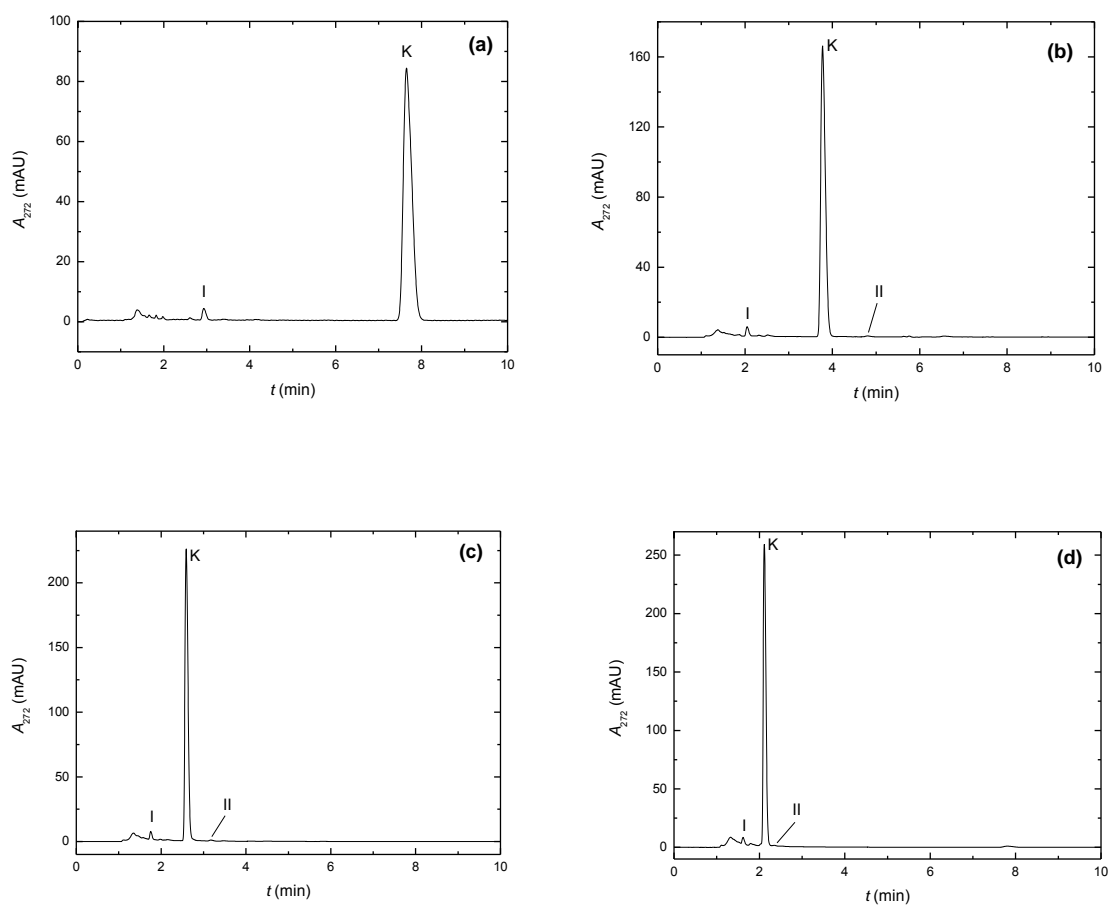
### 4.5.1 Optimalizace chromatografických podmínek

Vzorek dražé „Guaral“ byl analyzován pomocí kapalinové chromatografie s UV detekcí. Kofein byl analyzován při vlnové délce 272 nm, fenobarbital pak při 209 nm. Optimalizace chromatografických podmínek byla vzhledem ke složité matici prováděna přímo s roztokem analyzovaného dražé „Guaral“.

*Kofein.* Podmínky separace vycházely z literatury [54, 56]. Byl optimalizován podíl acetonitrilu v mobilní fázi v rozsahu 10–25 % v mobilní fázi obsahující acetonitril a 0,02M acetátový pufr (CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>), pH = 4,00. Optimalizace probíhala při průtoku mobilní fáze 1,00 ml min<sup>-1</sup>. Chromatogramy při zvolených separačních podmínkách jsou uvedeny na obr. 4.24. Retenční charakteristiky jsou uvedeny v tab. 4.7. Jako optimální byl zvolen podíl 15% acetonitrilu, který poskytoval dostatečně rozlišený pík kofeinu a zároveň krátkou dobu analýzy.

Tab. 4.7: Vliv podílu acetonitrilu v mobilní fázi (acetonitril a 0,02M acetátový pufr, pH = 4,00) na separaci kofeinu při průtokové rychlosti 1,00 ml min<sup>-1</sup> ( $t_r$  retenční čas analytu,  $A_s$  faktor asymetrie píku,  $n$  počet teoretických pater,  $R_{1,2}$  rozlišení píku kofeinu a sousedních neidentifikovaných píků I a II, viz obr. 4.24).

podíl (%)	$t_r$ (min)	$A_s$	$n$	$R_{\text{kofein, I}}$	$R_{\text{kofein, II}}$
10	7,6	1,77	6701	10,12	–
15	3,8	1,65	5876	3,67	2,95
20	2,6	1,57	5969	1,16	1,75
25	2,1	1,63	4925	1,18	0,97

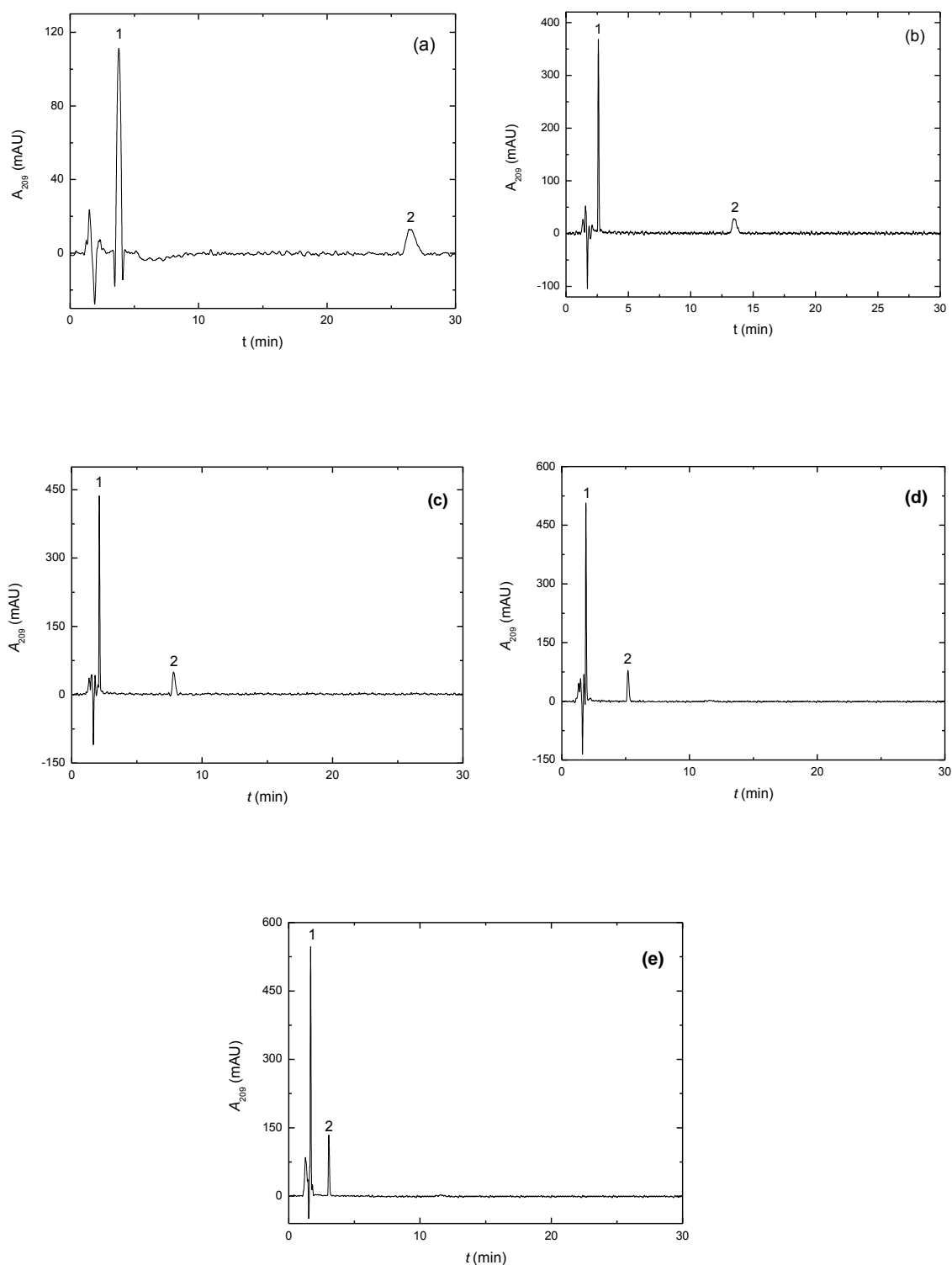


Obr. 4.24: Vliv podílu acetonitrilu v mobilní fázi na separaci kofeinu při HPLC-UV chromatografii vzorku dražé „Guaral“ na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5  $\mu$ m; Agilent) izokratickou elucí s mobilní fází obsahující acetonitril a 0,02M acetátový pufr ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ), pH = 4,00. Podíl acetonitrilu: (a) 10 %, (b) 15 %, (c) 20 %, (d) 30 %. Píky: K – kofein, I a II – neidentifikované nečistoty.

*Fenobarbital*. Podmínky separace vycházely z literatury [45, 47, 75]. Byl optimalizován podíl acetonitrilu v mobilní fázi v rozsahu 15–40 %. Optimalizace probíhala při průtoku mobilní fáze  $1,00 \text{ ml min}^{-1}$ . Chromatogramy při zvolených separačních podmínkách jsou zobrazeny na obr. 4.25. Podíl 30 % acetonitrilu se ukázal jako optimální, jak je patrné z tab. 4.8.

Tab. 4.8: Vliv podílu acetonitrilu v mobilní fázi (acetonitril a 0,02M acetátový pufr, pH = 4,00) na separaci fenobarbitalu při průtoku  $1,00 \text{ ml min}^{-1}$  ( $t_r$  retenční čas fenobarbitalu,  $A_s$  faktor asymetrie píku,  $n$  počet teoretických pater,  $R_{1,2}$  rozlišení píku fenobarbitalu a kofeinu).

podíl (%)	$t_r$ (min)	$A_s$	$n$	$R_{1,2}$
15	26,4	1,91	5505	19,35
20	13,7	2,11	5486	21,01
25	7,8	1,68	5495	14,41
30	5,2	1,58	6602	11,99
40	3,0	1,77	5475	6,07



Obr. 4.25: Vliv podílu acetonitrilu v mobilní fázi na separaci fenobarbitalu při HPLC-UV chromatografii vzorku dražé „Guaral“ na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5  $\mu$ m; Agilent) izokratickou elucí s mobilní fází obsahující acetonitril a 0,02M acetátový pufr ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ), pH = 4,00. Podíl acetonitrilu: (a) 15 %, (b) 20 %, (c) 25 %, (d) 30 % a (e) 40 %. Píky: 1 – kofein, 2 – fenobarbital.

Na základě optimalizace separačních podmínek byl sestaven gradientový program pro stanovení kofeinu, jehož průběh je zobrazen na obr 4.26.

#### 4.5.2 Kalibrační závislosti

*Kofein.* Obsah analytu ve studovaném vzorku dražé byl stanoven metodou kalibrační přímky (pětibodová kalibrace) na kapalinovém chromatografu s UV detektorem při vlnové délce 272 nm. Plochy píků jednotlivých standardů byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci. Soubor bodů byl poté proložen přímkou metodou lineární regrese. Její rovnice je

$$A = 7100 c \quad (4.9)$$

$$r = 0,9998$$

kde  $A$  je plocha píku ( $\mu\text{AU min}$ ) a  $c$  je koncentrace ( $\text{mg dm}^{-3}$ ).

Ověření kvantifikace bylo realizováno UV-spektrofotometrií metodou standardního přídatku ( $n = 6$ ). Závislost absorbance jednotlivých standardů na jejich koncentraci byla vynesena do grafu. Soubor bodů byl pak proložen přímkou metodou lineární regrese, jejíž rovnice je

$$A = 9200 c + 0,084 \quad (4.10)$$

$$r = 0,9999$$

kde  $A$  je absorbance (AU) při vlnové délce 272 nm a  $c$  je koncentrace ( $\text{mol dm}^{-3}$ ).

*Barbital.* Studovaný vzorek dražé byl kvantifikován metodou kalibrační přímky (pětibodová kalibrace) kapalinovým chromatografem s UV detektorem při vlnové délce 209 nm. Plochy píků jednotlivých standardů byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci. Soubor bodů byl poté proložen přímkou metodou lineární regrese. Její rovnice je

$$A = 11000 c \quad (4.11)$$

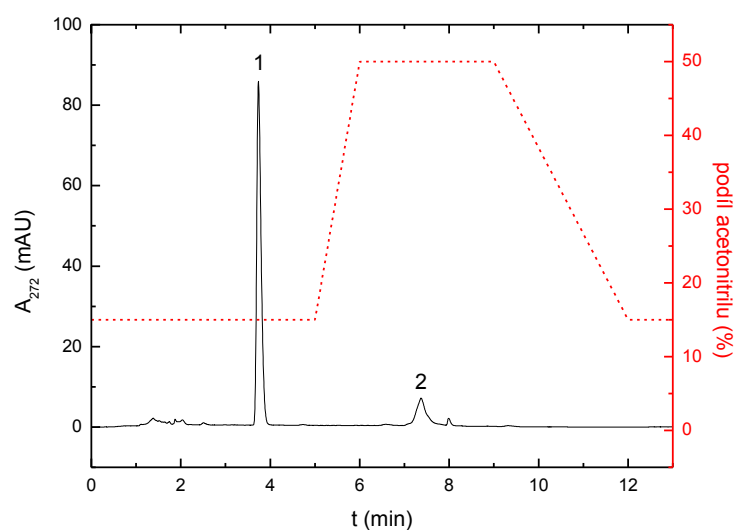
$$r = 0,9978$$

kde  $A$  je plocha píku ( $\mu\text{AU min}$ ) a  $c$  je koncentrace ( $\text{mg dm}^{-3}$ ).

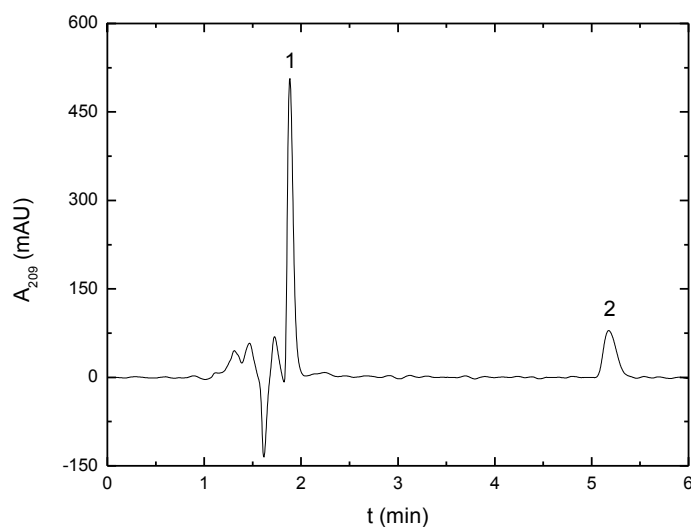


#### 4.5.3 HPLC analýza vzorku

HPLC-UV chromatogram dražé analyzované gradientovou elucí při 272 nm je zobrazen na obr. 4.26. Pík (1) s retenčním časem 3,8 min byl identifikován podle standardu jako kofein. Pík (2) s retenčním časem 7,4 min byl identifikován na základě standardu jako fenobarbital. HPLC-UV chromatogram studovaného vzorku izokratickou elucí při 209 nm je zobrazen na obr. 4.27.

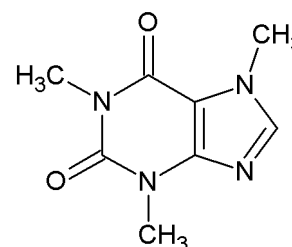
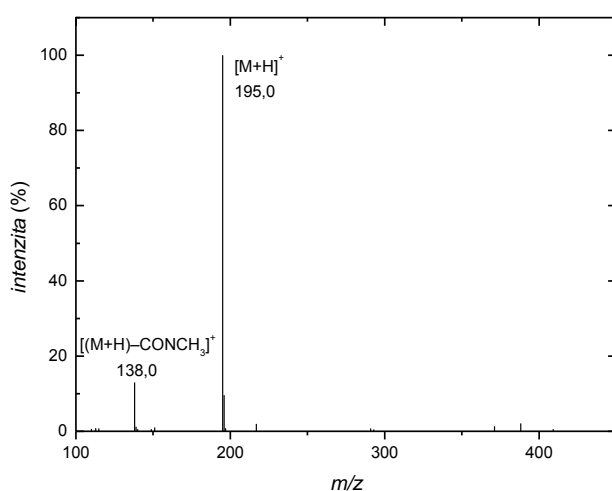


Obr. 4.26: HPLC-UV chromatogram vzorku dražé „Guaral“ analyzovaného na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5 μm; Agilent) detegovaný při vlnové délce 272 nm gradientovou elucí s mobilní fází obsahující acetonitril a acetátový pufr (0,02M, pH = 4,00) při průtoku 1,00 ml min<sup>-1</sup>. Gradientový program změny podílu acetonitrilu v mobilní fázi je zobrazen červenou křivkou. Pík kofeinu (1) eluje s retenčním časem 3,8 min, pík fenobarbitalu (2) eluje s retenčním časem 7,4 min.



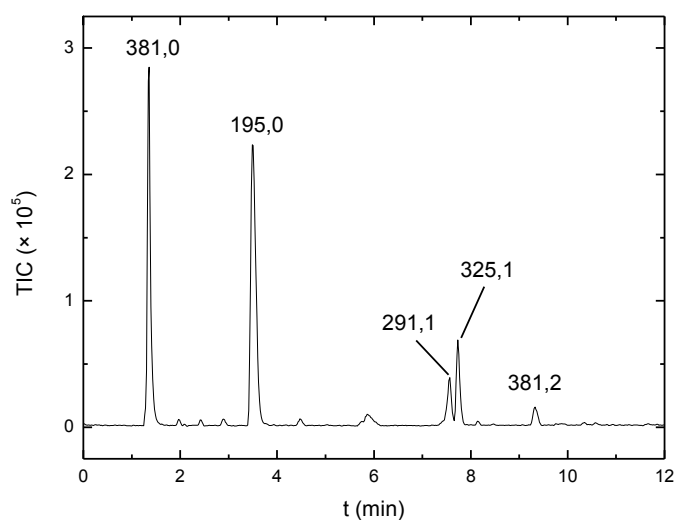
Obr. 4.27: HPLC-UV chromatogram vzorku dražé „Guaral“ analyzovaného na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5 μm; Agilent) detegovaný při vlnové délce 209 nm izokratickou elucí s mobilní fází obsahující acetonitril a acetátový pufr (0,02M, pH = 4,00) v poměru 30:70 (v/v) při průtoku 1,00 ml min<sup>-1</sup>. Pík (1) kofeinu eluuje s retenčním časem 1,8 min, pík (2) fenobarbitalu eluuje s retenčním časem 5,2 min.

Identifikace kofeinu byla potvrzena kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Hmotnostní spektrum píku kofeinu (1) analyzovaného vzorku (obr. 4.28) obsahuje dva hlavní ionty s velkou intenzitou ( $m/z = 195,0$  a  $m/z = 138,0$ ). Hmotnostní spektrum kofeinu podle literatury [56, 76] obsahuje kromě iontu protonizované molekuly kofeinu ( $m/z = 195,0$ ) také rozpadový iont s  $m/z = 138,0$ .



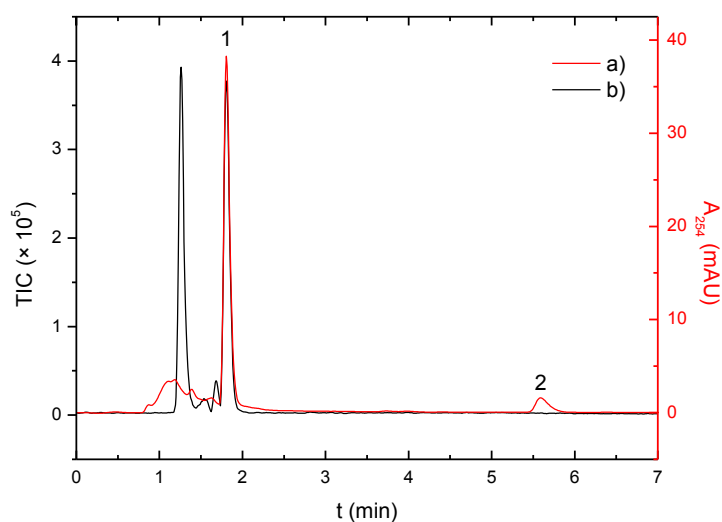
Obr. 4.28: Hmotnostní spektrum ESI v pozitivním módu píku (1) s retenčním časem 3,8 min z HPLC analýzy injekčního vzorku „Guaral“ a odpovídající vzorec identifikovaného analytu: kofein.

Chromatogram získaný pomocí HPLC-MS gradientovou elucí zobrazuje kromě píku kofeinu ( $m/z = 195,0$ ), také další separované látky, jejichž hmoty jsou uvedeny na obr. 4.29. Pravděpodobně se jedná o látky mající původ v přísadách (rostlinné extrakty, vaječný lecithin), které jsou součástí studovaného vzorku dražé „Guara!“.



Obr. 4.29: HPLC-MS chromatogram vzorku dražé „Guara!“ analyzovaného na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ; Agilent) gradientovou elucí s mobilní fází obsahující acetonitril a acetátový pufr (0,02M, pH = 4,00) při průtoku 1,00  $\text{ml min}^{-1}$ . Pík s  $m/z = 195,0$  přísluší kofeinu.

Identifikaci fenobarbitalu se nepodařilo pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí ověřit. Z HPLC-UV chromatogramu je patrné, že pík fenobarbitalu je viditelný při UV detekci, ale při zvolených parametrech se v HPLC-MS pravděpodobně neionizuje (obr. 4.30).



Obr. 4.30: Překryv HPLC-MS (černá křivka) a HPLC-UV (červená křivka) chromatogramů vzorku dražé „Guaral“ analyzovaného na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ; Agilent) izokratickou elucí s mobilní fází obsahující acetonitril a acetátový pufr (0,02M, pH = 4,00) v poměru 30:70 (v/v) při průtoku 1,00 ml  $\text{min}^{-1}$ . Píky: (1) kofein, (2) fenobarbital.

#### 4.5.4 Stanovení obsahu kofeinu ve vzorku „Guaral“

Kvantifikaci kofeinu metodou kalibrační přímky pomocí HPLC s DAD bylo zjištěno, že ředěný vzorek obsahuje  $81,1 \pm 0,3 \text{ mg dm}^{-3}$ , což odpovídá  $124,7 \pm 0,5 \%$  deklarovaného množství účinné látky (variační koeficient nepřesáhl 5 %).

Pro ověření kvantifikace byl ředěný vzorek analyzován UV-spektrofotometrií metodou standardního přidavku ( $n = 6$ ). Bylo zjištěno, že studovaný vzorek obsahuje  $(9,1 \pm 0,1) \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (odpovídá  $1,8 \pm 0,02 \text{ mg dm}^{-3}$ ), tedy  $136,2 \pm 1,5 \%$  deklarovaného obsahu kofeinu (variační koeficient nepřesahuje 5 %). Vyšší podíl kofeinu ve vzorku byl tedy pravděpodobně způsoben již při výrobě léčivého přípravku.

#### 4.5.5 Stanovení obsahu fenobarbitalu ve vzorku „Guaral“

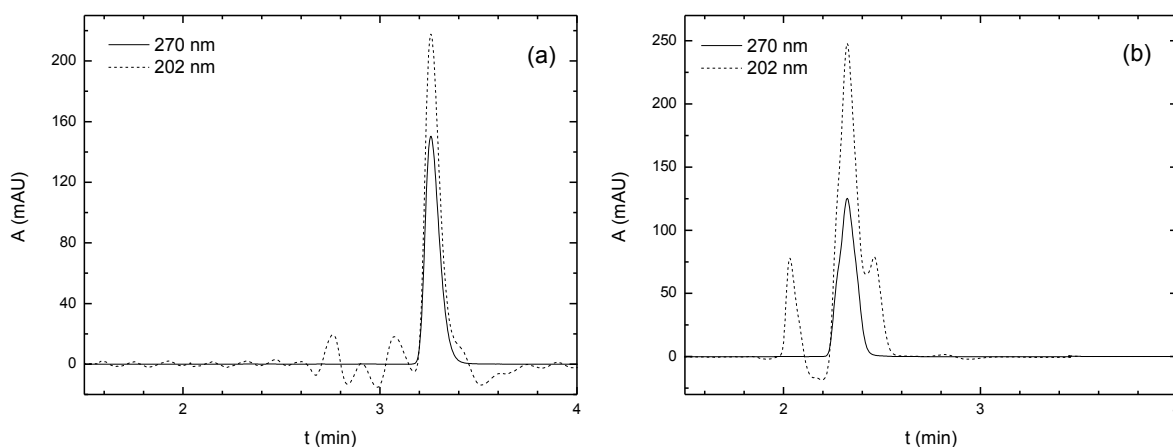
Fenobarbital byl ve studovaném dražé tablety kvantifikován metodou kalibrační přímky pomocí HPLC s DAD. Bylo zjištěno, že ředěný roztok tablety obsahuje  $11,8 \pm 0,2 \text{ mg dm}^{-3}$ , což odpovídá  $78,4 \pm 1,3 \%$  deklarovaného množství účinné látky (variační koeficient nepřesáhl 5 %).

Spektrofotometrické ověření kvantifikace nebylo z důvodu nízkého molárního absorpčního koeficientu fenobarbitalu provedeno.

## 4.6 Analýza čípku „Syntophyllin“

### 4.6.1 *Optimalizace chromatografických podmínek*

Vzorek čípku „Syntophyllin“ byl analyzován pomocí kapalinové chromatografie s UV detekcí. Podmínky separace vycházely z literatury [6, 59, 63]. Byl optimalizován poměr acetonitrilu a 0,02M acetátového pufru ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) o  $\text{pH} = 4,00$  v rozmezí podílů acetonitrilu 10–60 % (v/v) při průtokové rychlosti  $0,60 \text{ ml min}^{-1}$ . Se zvyšujícím se podílem acetonitrilu docházelo k poklesu plochy píku theofylinu za současného rozštěpení píku. S klesajícím podílem pufru pravděpodobně dochází ke zvyšování  $\text{pH}$  mobilní fáze a tím pádem i k ionizaci analytu ( $\text{p}K_a = 8,6$  [57]). Na obr. 4.31a je patrný jediný pík theofylinu zaznamenaný při vlnové délce 270 nm a 202 nm při použití acetonitrilu a acetátového pufru v podílu 20:80 (v/v) jako mobilní fáze. Na obr. 4.31b je při použití acetonitrilu a acetátového pufru v podílu 60:40 (v/v) znatelné rozštěpení píku theofylinu při vlnové délce 202 nm. Vliv složení mobilní fáze na separaci theofylinu je uveden v tabulce 4.9. Jako optimální byla zvolena mobilní fáze obsahující acetonitril a acetátový pufr v poměru 20:80 (v/v), jejíž použití poskytuje symetrický pík ( $A_s = 1,67$ ) a krátkou dobu analýzy se současným zachováním účinnosti separace.



Obr. 4.31: Vliv složení mobilní fáze na separaci vzorku čípku „Syntophyllin“ analyzovaného na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ; Agilent) izokratickou elucí při průtoku  $0,60 \text{ ml min}^{-1}$  s mobilní fází obsahující acetonitril a acetátový pufr (0,02M, pH = 4,00) v poměru: (a) 20:80 (v/v), (b) 60:40 (v/v).

Tab. 4.9: Vliv složení mobilní fáze (acetonitril a 0,02M acetátový pufr, pH = 4,00) na separaci theofylinu ( $t_r$  retenční čas analytu,  $A_s$  faktor asymetrie píku,  $n$  počet teoretických pater,  $A$  plocha píku při 270 nm). Průtok  $0,60 \text{ ml min}^{-1}$ .

podíl (%)	$t_r$ (min)	$A_s$	$n$	$A$ (mAU min)
10	6,7	1,55	8716	792
20	3,3	1,67	8982	787
30	2,7	1,65	7019	785
40	2,5	1,76	6963	784
50	2,4	1,15	3372	783
60	2,3	1,07	2769	778

Byl optimalizován průtok mobilní fáze, která sestávala z acetonitrilu a 0,02M acetátového pufru ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) o pH = 4,00 v poměru 20:80 (v/v), v rozmezí  $0,50\text{--}0,70 \text{ ml min}^{-1}$ . Podle tabulky 4.10 je zřejmé, že nejkratší doby analýzy lze dosáhnout za současného zachování účinnosti separace při průtoku  $0,50 \text{ ml min}^{-1}$ .

Tab. 4.10: Vliv průtoku mobilní fáze (acetonitril a 0,02M acetátový pufr, pH = 4,00, 20:80 v/v) na separaci theofylinu ( $t_r$  retenční čas analytu,  $A_s$  faktor asymetrie píku,  $n$  počet teoretických pater).

průtok (ml min <sup>-1</sup> )	$t_r$ (min)	$A_s$	$n$
0,50	3,9	1,67	10200
0,60	3,3	1,67	8982
0,70	2,8	1,96	8434

#### 4.6.2 Kalibrační závislosti

Analyzovaný vzorek čípku byl kvantifikován metodou kalibrační přímky (pětibodová kalibrace) na kapalinovém chromatografu s UV detektorem. Plochy píků jednotlivých standardů byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci. Soubor bodů byl poté proložen přímkou metodou lineární regrese, jejíž rovnice je

$$A = 9100 c \quad (4.12)$$

$$r = 0,9998$$

kde  $A$  je plocha píku ( $\mu\text{AU min}$ ) a  $c$  je koncentrace ( $\text{mg dm}^{-3}$ ).

Pro ověření kvantifikace kapalinovou chromatografií byl vzorek analyzován UV-spektrofotometrií metodou standardního přidavku ( $n = 6$ ). Závislost absorbance jednotlivých standardů na jejich koncentraci byla vynesena do grafu. Soubor bodů byl pak proložen přímkou metodou lineární regrese, jejíž rovnice je

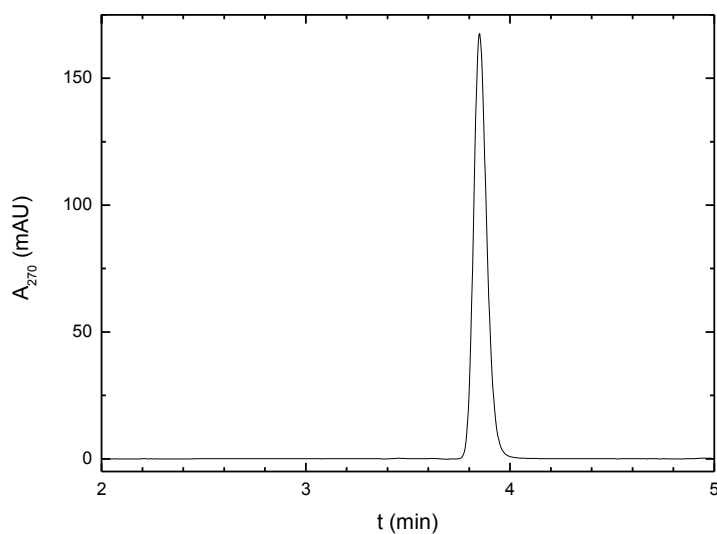
$$A_{276} = 11700 + 0,079 c \quad (4.13)$$

$$r = 0,9998$$

kde  $A$  je absorbance (AU) při vlnové délce 276 nm a  $c$  je koncentrace ( $\text{mol dm}^{-3}$ ).

#### 4.6.3 HPLC analýza vzorku

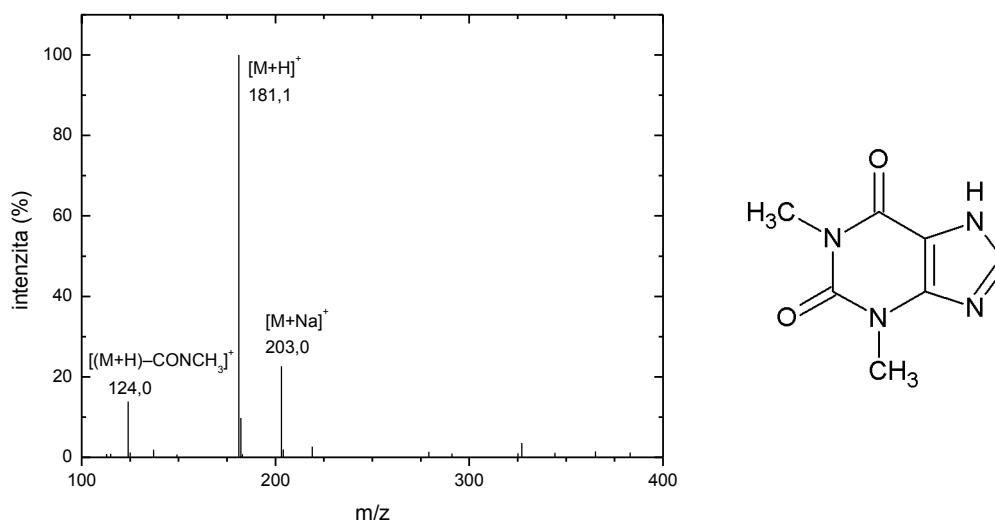
HPLC chromatogram theofylinu je zobrazen na obr. 4.32. Pík s retenčním časem 3,8 min byl identifikován pomocí standardu jako theofylin.



Obr. 4.32: HPLC-UV chromatogram vzorku čípku „Syntophyllin“ analyzovaného na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5 μm; Agilent) izokratickou elucí s mobilní fází obsahující acetátový pufr (0,02M, pH = 4,00) a acetonitril (80:20 v/v). UV detekce při vlnové délce 270 nm. Pík theofylinu s retenčním časem 3,8 min.

Identifikace analytu byla potvrzena kapalinovou chromatografií s hmotnostním detektorem. Spektrum (obr. 4.33) obsahuje iont s nejvyšší intenzitou o  $m/z = 181,1$ . Jedná se pravděpodobně o protonovanou molekulu theofylinu, jehož relativní molekulová hmotnost je 180,1. Ve spektru jsou znatelné ionty s  $m/z = 124,0$  a  $m/z = 203,0$ , které byly identifikovány na základě literatury [76].





Obr. 4.33: Hmotnostní spektrum ESI v pozitivním módu píku s retenčním časem 3,8 min z HPLC analýzy injekčního vzorku „Syntophyllin“ a odpovídající vzorec identifikovaného analytu: theofylin.

#### 4.6.4 Stanovení obsahu theofylinu ve vzorku „Syntophyllin“

Kvantifikaci theofylinu metodou kalibrační přímky pomocí HPLC-UV detekcí bylo zjištěno, že vzorek ředěného roztoku čípku obsahuje  $46,3 \pm 0,1 \text{ mg dm}^{-3}$ , což odpovídá  $104,9 \pm 0,3 \%$  deklarovaného množství účinné látky (variační koeficient nepřesáhl 5 %).

Pro ověření kvantifikace byl ředěný vzorek analyzován pomocí UV-spektrofotometrií metodou standardního přídávku ( $n = 6$ ). Bylo zjištěno, že studovaný vzorek obsahuje  $6,69 \pm 0,22 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (odpovídá  $1,21 \pm 0,04 \text{ mg dm}^{-3}$ ), tedy  $109,2 \pm 3,6 \%$  deklarovaného obsahu theofylinu (variační koeficient nepřesahuje 5 %).

## 5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byla analýza historických léčivých přípravků obsahující alkaloidy, sulfanilamid, deriváty barbiturové kyseliny a pyrazolu jako účinné látky ve formě injekčních roztoků, čípku, tablet a dražé. Vzorky byly analyzovány metodami RP-HPLC s UV a fluorescenčním detektorem a RP-HPLC s hmotnostní detekcí, jejichž podmínky separace byly optimalizovány. Vzorky byly dále analyzovány metodou UV-spektrofotometrie a metodou atomové absorpční spektrometrie. U všech léčivých přípravků byla stanovena koncentrace účinné látky léčivého přípravku z plochy chromatografických píků, u většiny byla kvantifikace potvrzena UV-spektrofotometrií měřením absorbance. Reversní kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí byly identifikovány účinné látky a případné další přítomné látky. Přehled stanovených obsahů analytů metodou HPLC a UV-spektrofotometrie je uveden tab. 5.1.

Tab. 5.1: Přehled analyzovaných léčivých přípravků a stanovený obsah účinných látek metodami reverzní kapalinové chromatografie s UV detekcí (HPLC-UV) a UV-spektrofotometrií (UV-spf).

název analyzovaného přípravku	účinná látka	stanovený obsah (%)	
		HPLC-UV	UV-spf
Chinin-calcium	chinin	92,0±1,8	92,3±2,2
Cardiazol-chinin	chinin	87,2±0,5	94,1±1,7
Proseptol	sulfanilamid	91,7±0,4	91,6±1,7
Veraethyl	aminofenazon	82,0±0,4	105,0±0,0
	barbital	82,9±4,0	– <sup>a</sup>
Guaral	kofein	124,7±0,5	136,2±1,5
	fenobarbital	78,4±1,3	– <sup>a</sup>
Syntophyllin	theofylin	104,9±0,3	109,2±3,6

<sup>a</sup> stanovení neprovedeno z důvodu nízkého molárního absorpčního koeficientu

Jak je z tabulky 5.1 zřejmé, množství účinné látky některých léčivých přípravků zůstalo po mnoha letech nezměněno. Především účinné látky theofylin vzorku čípku „Syntophyllin“ a kofein ve vzorku dražé „Guaral“ zůstaly pravděpodobně v nezměněném množství. Vyšší obsah účinné látky byl patrně způsoben již při výrobě. Ve zbývajících

případech došlo k poklesu účinné látky v rozmezí 8–22 %. Degradční produkt, který byl nalezen v injekčních roztocích chininových přípravků, byl identifikován jako chinotoxin. V přípravcích „Proseptol“ a „Veraethyl“ ve formě tablet, kde byl nalezen snížený obsah účinných látek, nebyly detegovány při zvolených separačních podmínkách žádné degradační produkty. Nižší obsah účinných látek proto může být vysvětlen jako chyba při výrobě. Degradční produkt fenobarbitalu v přípravku „Guaral“ nebyl pravděpodobně nalezen z důvodu komplikované matrice vzorku.

Výsledky dosažené v této diplomové práci byly částečně prezentovány na 19. ročníku soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie „O cenu Karla Štulíka“ ve dnech 3. a 4. února 2016 na Přírodovědecké fakultě UJEP v Ústí nad Labem, a přijaty k publikaci v Czech Chemical Society Symposium Series (příloha).

## Literatura

- [1] Giachi G., Pallecchi P., Romualdi A., Ribechini E., Lucejko J.J., Colombini M.P., Lippi M.M.: Ingredients of a 2,000-y-old medicine revealed by chemical, mineralogical, and botanical investigations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110** (2013) 1193–1196.
- [2] Baeten J., Romanus K., Degryse P., De Clercq W., Poelman H., Verbeke K., Luypaerts A., Walton M., Jacobs P., De Vos D., Waelkens M.: Application of a multi-analytical toolset to a 16th century ointment: Identification as lead plaster mixed with beeswax. *Microchemical Journal* **95** (2010) 227–234.
- [3] Steigenberger G., Herm Ch.: Natural resins and balsams from an eighteenth-century pharmaceutical collection analysed by gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **401** (2011) 1771–1784.
- [4] Yoshioka S., Stella V. J.: *Stability of Drugs and Dosage Forms*. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000.
- [5] Schou S. A., Mørch J.: Stability of pharmaceutical preparations. *Archiv for Pharmaci og Chemi* **66** (1959) 231–255, 287–331, 371–387, 423–475 a 503–524.
- [6] *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 4th Edition. Moffat, A. C.; Osselton, M. D.; Widdop, B (Eds.). London, Pharmaceutical Press 2011.
- [7] Muhtadi F. J., Loutfy M. A., Hassan M. A.: Quinine hydrochloride. In: *Analytical Profiles of Drug Substances. Vol. 12*. Florey K. (ed.). New York, Academic Press 1983, p. 547–621.
- [8] Nicolaou K. C., Montagnon T.: *Molecules that Changed the World*. Weinheim, Wiley-VCH 2008.
- [9] Talapatra S. K., Talapatra B.: *Chemistry of Plant Natural Products: Stereochemistry, Conformation, Synthesis, Biology, and Medicine*. Springer 2015.
- [10] Lerkiatbundit S.: Stability of quinine dihydroquinine in commonly used intravenous solutions. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* **18** (1993) 343–345.
- [11] Ebel F., Mastilovič O.: Stabilities of two tablet preparations containing acetylsalicylic acid and quinine, assessed by accelerated ageing. *Acta Pharmaceutica Jugoslavica* **24** (1974) 29–36.
- [12] Parrá V., Radějová E., Mohelská, O.: Príspevok k možnosti rozlíšenia chinínu od jeho degradačného produktu chinotoxínu. *Československá farmacie* **18** (1969) 309–313.
- [13] Mirghani R. A., Yasar Ü., Zheng T., Cook J. M., Gustafsson L. L., Tybring G., Ericsson Ö.: Enzyme kinetics for the formation of 3-hydroxyquinine and three new metabolites of quinine in vitro; 3-hydroxylation by CYP3A4 is indeed the major metabolic pathway. *Drug Metabolism and Disposition* **30** (2002) 1368–1371.

- 
- [14] Marcisisin S. R., Jin X., Bettger T., McCulley N., Sousa J.C., Shanks G.D., Tekwani B.L., Sahu R., Reichard G.A., Sciotti R.J., Melendez V., Pybus B.S.: CYP450 phenotyping and metabolite identification of quinine by accurate mass UPLC-MS analysis: a possible metabolic link to blackwater fever. *Malaria Journal* **12** (2013) 214.
- [15] Samanidou V. F., Evaggelopoulou E. N., Papadoyannis I. N.: Simultaneous determination of quinine and chloroquine anti-malarial agents in pharmaceuticals and biological fluids by HPLC and fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **38** (2005) 21–28.
- [16] Gatti R., Gioia M. G., Cavrini V.: Determination of cinchona alkaloids and vitamin B<sub>6</sub> by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* **512** (2004) 85–91.
- [17] Johnston M. A., Smith W. J., Kennedy J. M., Lea A. R., Hailey D. M.: Reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of cinchona alkaloids in pharmaceuticals. *Journal of Chromatography* **189** (1980) 241–247.
- [18] Brum L. jr., Uchoa T., Guterres S. S., Costa T. D.: Development and validation of LC-MS/MS method for the simultaneous determination of quinine and doxycycline in pharmaceutical formulations. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **32** (2009) 2699–2711.
- [19] Bartók T., Szöllösi G., Felföldi K., Bartók M.: New results on the mass spectra of cinchona alkaloids. *Journal of Mass Spectrometry* **35** (2000) 711–717.
- [20] Katzung B. G., Masters S. B., Trevor A. J.: *Basic and Clinical Pharmacology*. 11th Edition. New York: McGraw-Hill Medical, 2009.
- [21] Kaempffert W.: News of Dr. Paul Gelmo, discoverer of sulfanilamide. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* **5** (1950) 213–214.
- [22] Gelmo P.: Über Sulfamide der p-Amidobenzolsulfonsäure. *Journal für praktische Chemie* **77** (1908) 369–382 (*Chem. Abstr.* **2**:11546).
- [23] [anonym]: G. Domagk. *British Medical Journal* **1**:5391 (1964) 1189.
- [24] *Martindale The Complete Drug Reference. 36th Edition*. Sweetman S.C. (ed.). London, Pharmaceutical Press 2009.
- [25] Baine O.: The preparation of sulfanilamide. *Journal of Chemical Education* **16** (1939) 278.
- [26] Arita T., Hori R., Takada M., Akuzu S., Misawa A.: Transformation and excretion of drugs in biological systems. VII. Effect of biotransformation on renal excretion of sulfonamides. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **20** (1972) 570–580.
- [27] Fries W., Manfred K., Werner L.: Additional route in the metabolism of sulfanilamide. *Xenobiotica* **1** (1971) 241–255.
- [28] Schneider M. J., Lehotay S. J., Lightfield A. R.: Validation of a streamlined multiclass multiresidue method for determination of veterinary drug residues in bovine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **407** (2015) 4423–4435.

- 
- [29] Mahmoud W. M. M., Khaleel D. H., Hadad G. M., Abdel-Salam R. A., Haiß A., Kümmerer K.: Simultaneous determination of 11 sulfonamides by HPLC–UV and application for fast screening of their aerobic elimination and biodegradation in a simple test. *CLEAN – Soil, Air, Water* **41** (2013) 907–916.
- [30] Ni Y., Qi Z., Kokot S.: Simultaneous ultraviolet–spectrophotometric determination of sulfonamides by multivariate calibration approaches. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **82** (2006) 241–247.
- [31] Sneade W.: *Drug Discovery: A History*. Wiley 2005.
- [32] Kar A.: *Medicinal Chemistry*. 3rd Edition. New Delhi, New Age International 2005.
- [33] Lijinsky W., Greenblatt M.: Carcinogen dimethylnitrosamine produced in vivo from nitrite and aminopyrine. *Nature* **236** (1972) 177–178.
- [34] Kotzumi T., Ueda M., Takada S.: Urine data analysis for pharmacokinetics of aminopyrine and its metabolites in man. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **22** (1974) 894–906.
- [35] Tanaka T., Kaneo Y., Goromaru T., Iguchi S.: Further metabolism of 4-acetylaminoantipyrine, the major metabolite of aminopyrine, in rats. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **35** (1987) 3519–3522.
- [36] Kalmár É., Kormányos B., Szakonyi G., Dombi G.: Validated HPLC determination of 4-dimethylaminoantipyrine in different suppository bases. *Indian Research Journal of Pharmacy and Science* **76** (2014) 31–37.
- [37] Agúndez J. A. G., Martínez C., Martín R., Benítez J.: Determination of aminopyrine, dipyrone and its metabolites in urine by high-performance liquid chromatography. *Therapeutic Drug Monitoring* **16** (1994) 316–322.
- [38] Kim H. J., Lee H. J., Park H. J., Kim J., Kim S. C., Kim W. S.: Determination of non-opioid analgetics in adulterated food and dietary supplements by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants A* **31** (2014) 973–978.
- [39] Park J.A., Zhang D., Kim S.K., Cho S.H., Cho S.M., Yi H., Shim J.H., Kim J.S., Abd El-Aty A.M., Shin H.C.: Simultaneous determination of aminopyrine and antipyrine in porcine muscle, milk, and eggs using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* **38** (2015) 4048–4054.
- [40] Briggs M., Briggs M.: *The Chemistry and Metabolism of Drugs and Toxins: An Introduction to Xenobiochemistry*. London: Heinemann Medical, 1974.
- [41] Shabir G. A., Bradshaw T. K., Arain S. A., Shar G. Q.: A new validated method for the simultaneous determination of a series of eight barbiturates by RP-HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **33** (2010) 61–71.
- [42] Wang M., Guo B., Huang Z., Duan J., Chen Z., Chen B., Yao S.: Improved compatibility of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry for tracing occurrence of barbital homologous residues in animal tissues. *Journal of Chromatography A* **1217** (2010) 2821–2831.
- [43] Marcus K. C., Fusari A., Fusari S.: Phenobarbital. In: *Analytical Profile of Drug Substances. Volume 7*. Florey K. (ed.) New York, Academic Press 1979, p. 359–399.
- [44] Yasiry Z., Shorvon S. D.: How phenobarbital revolutionized epilepsy therapy: the story of phenobarbital therapy in epilepsy in the last 100 years. *Epilepsia* **53** (2012) 5326–5339

- 
- [45] Henderson J. W. Jr., Woodward C., Majors R. E.: *High Throughput HPLC Analysis of Barbiturates*. Application Note. Agilent Technologies, 2006. (dostupné na: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-5092EN.pdf>)
- [46] Asadi M., Dadfarnia S., Shabani A., Abbasi B.: Simultaneous extraction and quantification of lamotrigine, phenobarbital, and phenytoin in human plasma and urine samples using solidified floating organic drop microextraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science* **38** (2015) 2510–2516.
- [47] Abdel Salam R. A., Hadad G. M., Abdel Hameed E. A.: Simultaneous determination of two multicomponent mixtures containing phenobarbitone and ephedrine hydrochloride using HPLC and chemometric assisted spectrophotometric methods. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **36** (2013) 384–405.
- [48] Liang C., Ye H., Wang R., Ni C., Rao Y., Zhang Y.: Identification and quantification of 34 drugs and toxic compounds in blood, urine, and gastric content using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* **38** (2015) 1680–1690.
- [49] Yin L., Wang T., Shi M., Zhang Y., Zhao X., Yang Y., Gu J.: Simultaneous determination of ten antiepileptic drugs in human plasma by liquid chromatography and tandem mass spectrometry with positive/negative ion-switching electrospray ionization and its application in therapeutic drug monitoring. *Journal of Separation Science* **39** (2016) 964–972.
- [50] Zubair M. U., Hassan M. A., Al-Meshal I. A.: Caffeine. In: *Analytical Profile of Drug Substances. Volume 15*. Florey K. (ed.) New York, Academic Press 1986, p. 71–153.
- [51] Institute of Medicine. *Caffeine for the Sustainment of Mental Task Performance: Formulations for Military Operations*. Washington, D.C.: National Academy Press, 2001.
- [52] Sørensen L.K.: Determination of acidic and neutral therapeutic drugs in human blood by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Forensic Science International* **206** (2011) 119–126.
- [53] Huq F.: Molecular modelling analysis of the metabolism of caffeine. *Asian Journal of Biochemistry* **1** (2006) 276–286.
- [54] Sultan M.: Simultaneous HPLC determination and validation of amphetamine, methamphetamine, caffeine, paracetamol and theophylline in illicit seized tablets. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **6** (2014) 294–298.
- [55] Erickson J.: Determination of the concentration of caffeine, theobromine, and gallic acid in commercial tea samples. *Concordia College Journal of Analytical Chemistry* **2** (2011), 31–35.
- [56] Tuomi T., Johnsson T., Reijula K.: Analysis of nicotine, 3-hydroxycotinine, cotinine, and caffeine in urine of passive smokers by hplc-tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry* **45** (1999) 2164–2172.
- [57] Cohen J. L.: Theophylline. In: *Analytical Profile of Drug Substances. Volume 4*. Florey K. (ed.) New York, Academic Press 1986, p. 466–493.
- [58] Kossel A.: Über eine neue Base aus dem Pflanzenreich. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **21** (1888) 2164–2167

- 
- [59] Maithani M., Singh R.: development and validation of a stability-indicating hplc method for the simultaneous determination of salbutamol sulphate and theophylline in pharmaceutical dosage forms. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques* **2** (2011) 1–5.
- [60] Park E., Ko G., Kim J., Sohn D. H.: Biotransformation of theophylline in cirrhotic rats induced by biliary obstruction. *Archives of Pharmacal Research* **22** (1999) 60–67.
- [61] Brower J. F., Juenge E. C., Page D. P., Dow M. L. Decomposition of aminophylline in suppository formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **69** (1980) 942–945.
- [62] *British Pharmacopoeia 2009*. London, British Pharmacopoeia Commission 2009.
- [63] Santos C. A., Mazzola P. G., Polacwicz B., Knirsch M. C., Cholewa O., Penna T. C. V.: Stability of furosemide and aminophylline in parental solutions. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **47** (2011) 89–96.
- [64] Nirogi R. V. S., Kandikere V. N., Shukla M., Mudigonda K., Ajjala D. R.: A simple and rapid HPLC/UV method for the simultaneous quantification of theophylline and etofylline in human plasma. *Journal of Chromatography B* **848** (2007) 271–176.
- [65] Pawlik E., Mahler H., Hartung B., Plässer G., Daldrup T.: Drug-related death. Adulterants from cocaine preparations in ling tissue and blood. *Forensic Science International* **249** (2015) 294–303.
- [66] West K. R., Sansom L. N., Cosh D. G., Thomas M. P.: Some aspects of the stability of parenteral nutrition solutions. *Pharmaceutica Acta Helveticae* **51** (1976) 19–22.
- [67] Biddle H.C.: Rearrangement of cinchonine and quinine into their poisonous isomers, cinchotoxine and quinotoxine. *Journal of the American Chemical Society* **34** (1912) 500–515.
- [68] Snyder L. R., Kirkland J. J., Dolan J. W.: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3rd Edition. Wiley 2010.
- [69] Miller J.N., Miller J.C.: *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 5th Editio. Harlow, Pearson Education 2005.
- [70] Crouthamel G. W., Kowarski B., Narang P. K.: Specific serum quinidine assay by high-performance liquid chromatography. *Clinical Chemistry* **23** (1977) 2030–2033.
- [71] Kolawole J. A., Mustapha A.: Improved RP-HPLC determination of quinine in plasma and whole blood stored on filter paper. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* **21** (2000) 345–352.
- [72] Heidt L. J., Forbes G. S.: The absorption and fluorescence spectra of the acid sulfates of quinine and ten of its derivatives in water and aqueous sulfuric acid solution. *Journal of the American Chemical Society* **55** (1933) 2701–2709.
- [73] Yang X., Zhang Y.: Determination of compound aminopyrine, antipyrine, barbitone injection by HPLC. *Anhui Yiyao* **13** (2009) 271–273 (*Chem. Abstr.* **155**:135993).
- [74] Asano T., Suzuki J., Hashimoto K., Fujino T.: Laser desorption ionization mass spectrometry of bioactive substances by using 2,4,6-trihydroxyacetophenone on cation-substituted zeolite. *Analytical Sciences* **29** (2013) 1035–1039.
- [76] Iftikhar I., Toth A. B.: Solution or gas phase? Oxidation and radical formation in electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). *Electroanalysis* **27** (2015) 2872–2881.



- [75] Vosough M., Ghafghazi S., Sabetkasei M.: Chemometrics enhanced HPLC–DAD performance for rapid quantification of carbamazepine and phenobarbital in human serum samples. *Talanta* **119** (2014) 17–23.

## ANALÝZA HISTORICKÝCH LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ CHININU A THEOFYLINU

KAREL KUDLÁČEK<sup>a</sup>, KAREL NESMĚRÁK<sup>a</sup>  
a JAN BABICA<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2,  
<sup>b</sup> České farmaceutické muzeum, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Kuks 81, 544 43 Kuks  
k.kudlacek@seznam.cz

Klíčová slova: chinin, theofylin, dlouhodobá stabilita, degradace, RP-HPLC

## Úvod

Analytická chemie hraje významnou roli při studiu složení materiálů používaných nebo vyráběných v minulosti. Výsledky takových analýz poskytují obraz o technologii, sociálních zvycích a jiná zajímavá zjištění v kontextu analyzovaného objektu, zároveň mohou být důležité pro případně restaurátorské a konzervátorské účely.

Jednou ze zajímavých oblastí aplikace analytické chemie na historické objekty je studium složení historických vzorků léčivých přípravků, ať již za účelem jejich identifikace (v případě, že není známo, o jaké léčivo se jedná), objasnění neznámé či nejasné receptury, získání informací o kvalitě použitých surovin či stanovení degradačních produktů stárnutí léčivých látek. Příkladem může být analýza léčivého přípravku z cínové pyxidy nalezené ve starověkém loďním vraku v zálivu Baratti, datované do let 140–130 př. Kr. Podle identifikovaných komponent (hydrozincit, smithonit, hematit, škrob, zvířecí a rostlinný tuk a směla z borovice) se jednalo pravděpodobně o oftalmologický preparát<sup>1</sup>. Jinými příklady jsou analýza mastí ze 16. století<sup>2</sup> nebo pryskyřic a balzámů z 18. století<sup>3</sup>. V naší laboratoři jsme metodou HPLC-MS analyzovali degradační produkty heroinu a kokainu v hromadě vyráběných léčivých přípravcích ze 30. let 20. století<sup>4</sup>.

V této práci jsme pomocí HPLC s UV a fluorescenčním detektorem analyzovali změny složení dvou injekčních přípravků s chininem jako účinnou látkou a čípků s theofylinem jako účinnou látkou. Zaměřili jsme se na kvantifikaci účinné látky a nalezení jejich případných degradačních produktů.

Chinin [CAS 130-95-0] je alkaloid vyskytující se v kůře chinovníku<sup>5</sup>. Má především antipyretické, antimalarické, analgetické a protizánětlivé vlastnosti. Theofylin [CAS 58-55-9] je derivát xanthinu, přirozeně se vyskytující v kakaovníku. Uplatňuje se jako bronchodilatační látka v terapii zánětů dýchacích cest.

## Experimentální část

Analýzované vzorky historických léčivých přípravků pocházely ze sbírek Českého farmaceutického muzea. Podmínky uskladnění vzorků nejsou přesně známy, předpokládá se uložení v temnu při teplotě místnosti.

Injekční roztok „Chinin-calcium“ (obr. 1a) byl vyroben okolo roku 1948 firmou Pragochemia. Nažloutlý injekční roztok byl uchováván v zatavených ampulkách z hnědého skla, Deklarovaný obsah chininu (jako báze) byl 3 %, dále byl v roztoku deklarován 10% obsah glukonanu vápenatého [CAS 299-28-5].

Injekční roztok „Cardiazol-Chinin“ (obr. 1b) byl vyroben v roce 1944 firmou Sanomedia. Nahnědlý injekční roztok byl uchováván v zatavených ampulkách z čirého skla. V roztoku bylo deklarováno 0,25 g/ml laktátu chininu [CAS 749-49-5] a 0,1 g/ml pentamethylentetrazolu [CAS 54-95-5].

Čípky „Syntophyllin“ (obr. 1c) byly vyrobeny v roce 1948 firmou Spolek pro chemickou a hutní výrobu. Čípek žluté barvy byl zabalen do staniolové fólie. Deklarovaný obsah theofylin.EDTA [CAS 317-34-0] byl 0,35 g v jednom čípku.

Ke kvantifikaci účinných látek v analyzovaných vzorcích byly použity standardy: chinin hydrochlorid dihydrát (analytický standard, Sigma-Aldrich) a theofylin (> 99 %, Sigma-Aldrich). Ostatní použité chemikálie byly analytické čistoty: acetonitril pro HPLC (Sigma-Aldrich), octan amonný (Lach-ner), octová kyselina 99 % (Lach-ner). Chinotoxin [CAS 84-55-9] byl připraven v laboratoři metodou dle Biddleho<sup>6</sup>.

Chromatografická měření byla realizována na přístroji UHPLC Nexera XR (Shimadzu) s DAD a fluorescenčním detektorem. Jako kolona byla použita Zorbax Eclipse C18 (4,6×150 mm, 3,5 μm; Agilent).

Kvantifikace glukonanu vápenatého byla provedena pomocí atomové absorpční spektrometrie přístrojem ContraAA 700 (Analytik Jena). Absorbance byla měřena na spektrální čáře vápníku o vlnové délce 422,6728 nm, poměr acetyleny (palivo) a oxidu dusného (oxidant) byl 0,572. Jako standard vápníku byl použit CRM uhlíčitán vápenatý 99,995 % v matrici 2% kyseliny dusičné (Analytika).

## Výsledky a diskuse

Podmínky separace vzorků obsahujících chinin vycházely z dříve publikovaných prací<sup>7,8</sup>, na jejichž základě byla po optimalizaci použita mobilní fáze obsahující 20 % acetonitrilu a 80 % acetátového pufru (0,02 mol dm<sup>-3</sup>, pH 4,00). Průtoková rychlost mobilní fáze byla 1,00 ml min<sup>-1</sup>. Vzorek injekčního roztoku „Chinin-calcium“ byl zředěn mo-



a



b

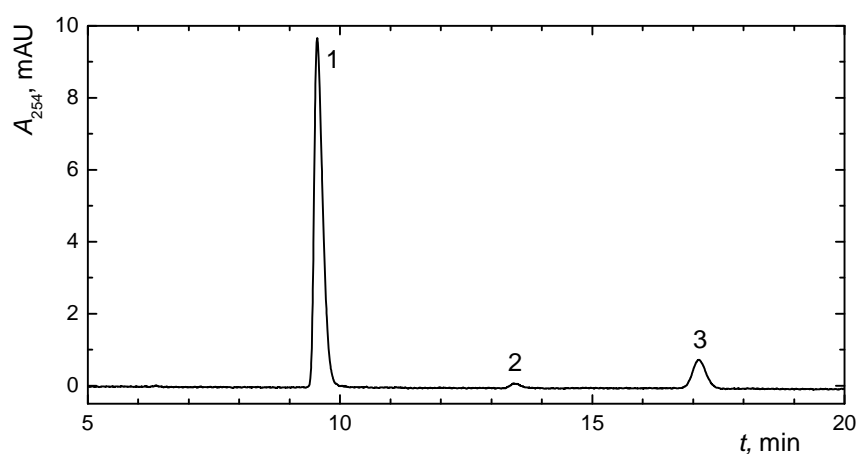


c

Obr. 1. Obaly analyzovaných vzorků historických léčivých přípravků (a) „Chinin-calcium“, (b) „Cardiazol-Chinin“, (c) „Syntophyllin“

bilní fází v poměru 1:499, vzorek injekčního roztoku „Cardiazol-Chinin“ byl zředěn mobilní fází v poměru 1:4999. Obsah účinné látky byl stanovován metodou kalibrační přímky. V přípravku „Chinin-calcium“ bylo stanoveno  $92,0 \pm 1,8$  % deklarovaného obsahu chininu, obsah glukonanu vápenatého byl kvantifikován měřením obsahu vápníku metodou AAS a následným přepočtem jako

$97,6 \pm 0,1$  % deklarovaného obsahu. V přípravku „Cardiazol-Chinin“ bylo stanoveno  $87,2 \pm 0,5$  % deklarovaného obsahu laktátu chininu. U obou přípravků byl nalezen jeden degradační produkt se stejným retenčním časem (obr. 2). Na základě literárních údajů<sup>9,10</sup> byl tento produkt identifikován jako chinotoxin, což bylo následně potvrzeno měřením s v laboratoři syntetizovaným chinotoxinem.



Obr. 2. HPLC-UV chromatogram vzorku historického léčivého přípravku „Chinin-calcium“. Identifikace peaků: (1) chinin, (2) neidentifikovaná nečistota, (3) chinotoxin. Stacionární fáze: Zorbax Eclipse C18 (4,6×150 mm, 3,5 μm). Mobilní fáze: 20 % acetonitril, 80 % acetátový pufr (0,02 mol dm<sup>-3</sup>, pH 4,00)

Podmínky separace vzorku obsahujícího theofylin vycházely z literatury<sup>11</sup>, po jejich optimalizaci byla k měření použita mobilní fáze obsahující 20 % acetonitrilu a 80 % acetátového pufru (0,02 mol dm<sup>-3</sup>, pH = 4,00) o průtokové rychlosti 0,50 ml min<sup>-1</sup>. Vzorek čípku byl rozpuštěn v mobilní fázi a po filtraci ředěn v poměru 1:21. Kvantifikace obsahu theofylinu byla provedena metodou kalibrační přímky. V analyzovaném vzorku bylo stanoveno 104,9±0,3 % deklarovaného množství theofylinu.

## Závěr

Byly navrženy a optimalizovány strategie a metody pro stanovení účinných látek ve třech historických léčivých přípravcích. U přípravků s obsahem chininu bylo zjištěno, že došlo ke snížení obsahu účinné látky o zhruba 10 % za vzniku chinotoxinu jako degradačního produktu. Přípravek s theofylinem jako účinnou látkou zůstal i po 67 letech, které od jeho výroby uplynuly, nezměněn.

## LITERATURA

1. Giachi G., Pallecchi P., Romualdi A., Ribechini E., Lucejko J.J., Colombini M.P., Lippi M.M.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 110, 1193 (2013).
2. Baeten J., Romanus K., Degryse P., De Clercq W., Poelman H., Verbeke K., Luybaerts A., Walton M., Jacobs P., De Vos D., Waelkens M.: *Microchem. J.* 95, 227 (2010).
3. Steigenberger G., Herm Ch.: *Anal. Bioanal. Chem.* 401, 1771 (2011).
4. Nesměrák K., Štícha M., Čvančarová M.: *Anal. Lett.* 43, 2572 (2010).
5. Katzung B.G., Masters S.B., Trevor A.J.: *Basic & Clinical Pharmacology*. 11. vyd. McGraw-Hill, New York 2009.
6. Biddle H.C.: *J. Am. Chem. Soc.* 34, 500 (1912).
7. Samanidou V.F., Evaggelopoulou E.N., Papadoyannis I.N.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38, 21 (2005).
8. Mirghani R.A., Ericsson O., Gustafsson L.L.: *J. Chromatogr. B* 708, 209 (1998).
9. Parrák V, Radějová E, Mohelská O.: *Čs. Farm.* 18, 309 (1969).
10. Talapatra S.K., Talapatra B.: *Chemistry of Plant Natural Products. Stereochemistry, Conformation, Synthesis, Biology, and Medicine*. Springer 2015.
11. Moffat A.C., Osselton D., Widdop B: *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 4. vyd. Pharmaceutical Press 2011.

**K. Kudláček<sup>a</sup>, K. Nesměrák<sup>a</sup>, and J. Babica<sup>b</sup>**  
<sup>a</sup>Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague; <sup>b</sup>Czech Pharmaceutical Museum, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague, Kuks): **Analysis of Historical Pharmaceutical Preparations of Quinine and Theophylline**

Pharmaceutical preparations of quinine (injection solutions) and theophylline (suppositories) about seventy years old were analyzed using RP-HPLC. The composition of mobile phase was optimized. The samples of quinine injection solutions consist of 92% or 87% of declared quinine content. Quinotoxine has been identified as the product of quinine degradation. The quantification of theophylline in suppositories did not show any degradation after more than 67 years from their manufacturing.

Key words: quinine, theophylline, long-term stability, degradation, RP-HPLC