

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Lucie Nováková

ANALÝZA HISTORICKÝCH LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ NALOXONU, ADRENALINU A EFEDRINU

Analysis of historical pharmaceutical preparations of
naloxone, adrenaline and ephedrine

Diplomová práce

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

Konzultanti: RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.

RNDr. Martin Štícha

Praha 2015

Prohlášení

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

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

V Praze dne 6. května 2015

Abstrakt a klíčová slova

Abstrakt:

Cílem diplomové práce byla analýza historických léčivých přípravků, zahrnující stanovení obsahu léčivé látky a identifikaci jejích případných degradačních produktů. Historický léčivý přípravek naloxonu byl analyzován hmotnostní spektrometrií. Historické léčivé přípravky adrenalinu a efedrinu byly analyzovány pomocí UHPLC-MS a kvantifikovány metodou kalibrační přímky. V historické injekční formě naloxonu, „NARCAN“, datované kolem roku 1980, nebyly pozorovány žádné degradační produkty a naměřené hmotnostní i UV spektrum odpovídalo spektrům pro naloxon. Analyzovaný vzorek naloxonu byl stabilní i po 35 letech skladování. V analyzované historické injekční formě adrenalinu, „Adrenalin Hydrochlor., Dr. Heisler“ (datované mezi léty 1917 a 1938) bylo stanoveno $5,26 \pm 0,11$ % deklarovaného množství adrenalinu. V naměřných spektrech byly patrné degradační produkty, které však zatím nebyly v literatuře popsány a jejich identifikace byla nad rámec této práce. Analyzovaný vzorek adrenalinu byl v průběhu cca devadesáti let téměř kompletně degradován. Stabilitní test prováděný se čtyřmi roztoky standardu adrenalinu prokázal vliv kyslíku, světla, teploty i času na degradaci adrenalinu. V historické injekční formě efedrinu, „Ephedrin“ (datovaném mezi léty 1945 a 1948), bylo stanoveno $107,58 \pm 0,39$ % deklarovaného množství efedrinu a v naměřných spektrech nebyly patrné žádné degradační produkty. Analyzovaný vzorek efedrinu byl stabilní i po téměř sedmdesáti letech skladování.

Klíčová slova:

hmotnostní spektrometrie, UHPLC-MS, historické léčivé přípravky, naloxon, adrenalin, efedrin

Abstract:

The aim of the thesis was to analyze the historical pharmaceutical preparations, including the determination of the active substance and identify their possible degradation products. A historical pharmaceutical preparation of naloxone was analyzed by mass spectrometry. Historical pharmaceutical preparations of adrenaline and ephedrine were analyzed by UHPLC-MS and were quantified using a calibration curve. In the historical injection solution of naloxone, "NARCAN", dated around 1980, there were no significant degradation products and the measured mass and UV spectrum was consistent with the spectrum of naloxone. The analyzed sample of naloxone was stable even after 35 years of storage. In the analyzed historical injection solution of adrenaline, „Adrenalin Hydrochlor., Dr. Heisler“ (dated between 1917 and 1938) was determined 5.26 ± 0.11 % of the declared amount of adrenaline. In the measured spectra were noticeable degradation products, which have not been described in the literature yet and their identification was beyond the scope of this paper. The analyzed sample of adrenaline was almost completely degraded during about ninety years. The stability test carried out with four standard solutions of adrenaline proved influence of oxygen, light, temperature and time on the degradation of adrenaline. In the historic injectable form of ephedrine, „Ephedrin“ (dated between 1945 and 1948) was determined 107.58 ± 0.39 % of the declared amount of ephedrine and in the measured spectra were no apparent degradation products. The analyzed sample of ephedrine was stable for nearly seventy years of storage.

Key words:

mass spectrometry, UHPLC-MS, historical pharmaceutical preparations, naloxone, adrenaline, ephedrine

Poděkování

Ráda bych velice poděkovala svému vedoucímu diplomové práce, RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D., za skvělé vedení, pomoc při získávání informací a podkladů pro sepsování mé diplomové práce, stejně jako za pomoc při plánování experimentů. Dále mu děkuji za vstřícnost, velikou podporu, ochotu, cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnoval. Také bych chtěla poděkovat RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D. za pomoc, ochotu a rady při měření, za trpělivost, vstřícnost, konzultace a za pomoc při interpretaci výsledků. Děkuji také RNDr. Martinu Štíchovi za pomoc a rady při měření a interpretaci výsledků.

Za poskytnutí historických lékových forem adrenalinu a efedrinu děkuji Mgr. Janu Babicovi, Ph.D. z Českého farmaceutického muzea v Kuksu.

Obsah

1 Úvod	8
2 Teoretická část	9
2.1 Stabilita léčiv a léčivých přípravků	9
2.2 Naloxon	12
2.2.1 Struktura a vlastnosti.....	12
2.2.2 Výroba.....	12
2.2.3 Farmakologie naloxonu	13
2.2.4 Distribuce v organismu a metabolismus	14
2.2.5 Analytická stanovení.....	14
2.3 Adrenalin	16
2.3.1 Struktura a vlastnosti.....	16
2.3.2 Výroba.....	16
2.3.3 Farmakologie adrenalinu.....	18
2.3.4 Distribuce v organismu a metabolismus	22
2.3.5 Analytická stanovení.....	23
2.4 Efedrin	26
2.4.1 Struktura a vlastnosti.....	26
2.4.2 Výroba.....	26
2.4.3 Farmakologie efedrinu	27
2.4.4 Distribuce v organismu a metabolismus	28
2.4.5 Analytická stanovení.....	29
2.5 Princip separace na kolonách HILIC	32
3 Experimentální část	36
3.1 Analyzované vzorky a standardy.....	36
3.2 Použité chemikálie.....	38
3.3 Postupy měření a vyhodnocování výsledků	38
3.3.1 Hmotnostní spektrometrie (HPLC-MS).....	38
3.3.2 UHPLC-MS	39
3.3.3 Spektrofotometrické sledování rozpadu adrenalinu	40
4 Výsledky a diskuse	41
4.1 Analýza historického vzorku naloxon hydrochloridu metodou MS, HPLC/MS ..	41
4.1.1 Hmotnostní spektra	41
4.1.2 HPLC-MS	45

4.2 Analýza historického vzorku adrenalinu	46
4.2.1 UHPLC-MS analýza	46
4.2.2 Kvantifikace adrenalinu ve vzorku	50
4.2.3 Spektrofotometrické sledování rozpadu adrenalinu (stabilitní test)	51
4.3 Analýza historického vzorku efedrinu.....	54
4.3.1 UHPLC-MS analýza	54
4.3.2 Kvantifikace efedrinu ve vzorku.....	57
5 Závěr	59
Literatura.....	60

1 ÚVOD

Léčiva jsou v dnešním světě velmi důležitou a nedílnou součástí každodenního života. Svědčí o tom například fakt, že se ročně vyrábí stále více léčiv, vyvíjejí se nové druhy léčiv a celkově roste spotřeba léků. Podle Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR se například v roce 2011 zvedla celková tržba za léčiva a zdravotnické prostředky o 1,5 % oproti roku 2010 a v roce 2012 se tržba oproti roku 2011 zvedla o dalších 4,6 %.

Léčivo, stejně jako každá chemická látka, však může časem podléhat chemickým a fyzikálním změnám nejrůznějšího druhu. Výrobci léčiv garantují neměnnou kvalitu výrobku pouze po dobu použitelnosti přípravku. Po tuto dobu se provádějí stabilitní studie a je jich známo velké množství, avšak stabilitní studie pro dlouhé doby skladování nejsou příliš běžné, ačkoli jich už celá řada existuje. Proto bylo zajímavé sledovat stabilitu léčivých přípravků analýzou jejich historických lékových forem.

Cílem této diplomové práce bylo provést analýzu historických léčivých přípravků naloxonu, adrenalinu a efedrinu různými analytickými metodami. Úkolem bylo zjistit přítomnost či naopak nepřítomnost původní léčivé látky, případných degradačních produktů, kvantifikovat nalezené látky, popřípadě provést doplňující zkoušky.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Stabilita léčiv a léčivých přípravků

Stabilita léčiv popřípadě léčivých přípravků je definována jako vlastnost zachovat si po určitou dobu a za stanovených podmínek uchování určené jakostní znaky ve stanovených mezích [1]. Stabilita farmaceutického produktu může být také definována jako schopnost určitého přípravku zůstat ve specifickém obalu v odpovídajících fyzikálních, chemických, mikrobiologických, toxikologických, ochranných a informačních parametrech [2]. Stabilita se testuje stabilitními studii, což je soubor testů, které mají dokumentovat změny v kvalitě testovaného produktu působením vnějších vlivů a jejich úkolem je stanovit vhodný obalový materiál přípravku, podmínky skladování a uchování a dobu použitelnosti přípravku [1]. Stabilitní studie se provádí z různých důvodů, například při zavedení nového léčiva do výroby, změně technologie výroby či kvůli pravidelnému sledování stability. To je důležité pro zajištění kvalitního, účinného a hlavně bezpečného přípravku po celou dobu použitelnosti léčiva. Kvalita by měla být zachována za podmínek, se kterými se léčivo (resp. léková forma) setkává při výrobě, dopravě, skladování ve skladech, nemocnicích a lékárnách, stejně jako v domácnostech [3].

Důsledky případné nestability léčivého přípravku mohou být různé, například snížení koncentrace účinné látky, změna biologické dostupnosti, vznik rozkladných produktů, ztráta mikrobiologické nezávadnosti či změna vzhledu lékové formy [1]. Fyzikální a chemická degradace léčivých látek mohou mít za následek až toxické účinky [3].

Faktory určující chemickou stabilitu léčivých látek zahrnují vnitřní faktory, jako je například molekulární struktura samotné látky, která určuje cestu degradace, a faktory prostředí, mezi které patří například pH, iontová síla, tlumivé roztoky, přítomnost kyslíku, vlhkosti, světla, pomocných látek a aditiv a teplota, která je jedním z primárních faktorů ovlivňující stabilitu léčiv [3].

Fyzikální stabilita je také velmi důležitá a je ovlivněna mnoha stejnými faktory, které ovlivňují stabilitu chemickou, jako například přítomnost vody či vlhkosti. Léčivé i pomocné látky existují v různých mikroskopických stavech, které se od sebe liší různým stupněm uspořádání, například látky amorfni a různé krystalické, hydratované a solvované stavy látky. Časem může léčivá látka (nebo i látka pomocná) přecházet z jednoho stavu, obvykle metastabilního nebo nestabilního, do stavu jiného, termodynamicky stabilního.

Nejvíce prostudovaná forma nestability lékových forem je kvantitativní ztráta účinné látky, která může vést ke snížení účinnosti léku, navíc mohou degradační léčivé látky vznikat až toxické produkty [3]. Z tohoto důvodu je při stabilitních studiích důležité zjistit nejen to, kolik látky se časem ztratilo, ale také jaké vznikly degradační produkty. Degradací léčiva může vzniknout také produkt esteticky nepříjemný, který se od původního nezměněného léčiva odlišuje například barvou či zápachem. A i přesto, že je léčivo stabilizováno v zamýšlené léčivé formě, musí být zajištěna také stabilita při podmínkách pH gastrointestinálního traktu, v případě, že je léková forma určena k perorálnímu podání. Většina léčivých látek je poměrně stabilních při neutrálním pH, které je v tenkém střevě, ale mohou být nestabilní při pH žaludeční šťávy.

Léčivé látky mají různé molekulární struktury a jsou tedy náchylné k nejrůznějším cestám rozkladu [3]. Mezi možné degradační cesty patří například hydrolyza či dehydratace, izomerace a racemizace, fotodegradace, oxidace a komplexní interakce s pomocnou látkou nebo s jinými léčivými přípravky. Látky obsahující ve své struktuře skupinu karboxylové kyseliny mohou být někdy také náchylné k dekarboxylaci.

Pravděpodobně nejčastějším degradačním mechanismem léčivých látek je proces zprostředkovaný kapalinou, tedy hydrolyza [4]. Většina léčivých látek, a to i těch, které nejsou zvláště náchylné k hydrolyze, se totiž stává méně stabilními při zvýšené úrovni okolní vlhkosti [3]. Většina parenterálních léčivých přípravků, a to i pevné lékové formy, přichází do styku s vodou. Hydrolyza je často hlavní degradační cestou u sloučenin, které obsahují ve své molekule esterovou nebo amidovou skupinu.

Oxidace je další velmi častou cestou degradace. Je obecně definována jako ztráta elektronů v systému, ale u organických sloučenin se jedná spíše o zvýšení počtu atomů kyslíku nebo snížení počtu atomů vodíku v molekule [4]. Oxidace může být katalyzována kyslíkem, těžkými kovy nebo světlem. Kyslík, jakožto katalyzátor působící většinu oxidačních reakcí, je bohatě zastoupen v prostředí, kterému jsou léčiva vystavena v průběhu zpracování nebo při dlouhodobém skladování [3]. Mechanismus oxidace je závislý na chemické struktuře léčivé látky a na přítomnosti reaktivních forem kyslíku či jiných oxidantů.

Fotodegradace je ve farmacii méně významná, nicméně počet fotochemicky nestabilních léčivých látek poslední dobou stoupá [5]. Fotodegradací může léčivá látka ztratit svou účinnost, může však také způsobit světlem vyvolané nežádoucí účinky po podání pacientovi po interakci s endogenními látkami. Fotochemická degradace je zahájena tím, že látka absorbuje energii. Mnoho fotochemických reakcí je složitých a může zahrnovat řadu konkurenčních reakčních cest, ve kterých kyslík může hrát

významnou roli. Fotodegradace je tedy často doprovázená oxidací za přítomnosti kyslíku [3].

Lékové formy jsou jen zřídka kdy formulovány jen jako léčivé látky samy o sobě [3]. Často jsou v přípravku přítomny aditiva nebo pomocné látky. Mezi léčivem a jednou či více přidanými látkami může proběhnout chemická reakce, stejně jako mezi více léčivými látkami obsaženými v jednom přípravku. Pomocné látky mohou ovlivňovat stabilitu léčiva různými způsoby či mechanismy. Mohou například změnit pH léčivé látky, barevné pomocné látky mohou zvyšovat oxidaci a fotodegradaci léčiva tím, že produkují singletový kyslík, který se účastní řetězové reakce. Dalším příkladem jsou kovové ionty jako pomocné látky nebo jako nečistoty a ty často katalyzují degradaci léčivé látky oxidací či fotodegradací.

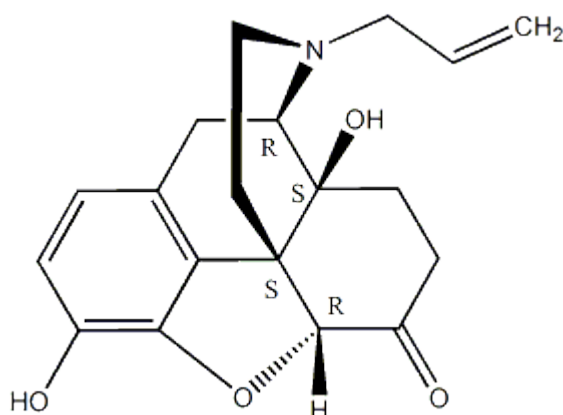
Zvýšit stabilitu lze například uchováváním injekčních roztoků v zatavené ampulce s inertní atmosférou, uchovávat lékové formy v tmavém prostředí, v chladu nebo i povrchovou úpravou lékové formy. Takovou úpravou může být například potahování tablet či granulí. Na povrch tablet (či granulí) je sprejováním nanesen tenký film, obvykle 10–100 μm silný [6].

Při stabilitních studiích léčivých přípravků se využívají organoleptické hodnocení, chemické, fyzikální, biologické a mikrobiologické zkoušky [1]. K organoleptickému hodnocení patří sledování vzhledu, barvy, chuti, zápachu a u roztoků i sledování čirosti. Toto hodnocení se provádí například porovnáváním se standardy a je důležité zejména u perorálních roztoků. Testování na fotostabilitu by mělo ukázat, že vystavení látky světlu nezpůsobí nepřijatelné změny v jejích vlastnostech. Mezi biologické a mikrobiologické zkoušky patří především zkouška mikrobiologické nezávadnosti, zkouška nepřítomnosti pyrogenů, zkouška na bakteriální endotoxiny či zkouška sterility. Mikrobiální kontaminace může pocházet již z výroby, nebo vzniká porušením integrity obalu během skladování či distribuce a následným průnikem mikroorganismů do přípravku.

Převážná většina studií zabývajících se stabilitou léčiv a lékových forem se zaměřuje na časové období několika málo měsíců či let [7–10]. V poslední době se však provádí stále více studií zabývajících se stabilitou dlouhodobou, například analýzou historických lékových forem starých přes sedmdesát let [11–13]. Byly prováděny dokonce i studie vzorků ze 16. století [14], například analýza mastí, či i 4000 let starých egyptských barviv z make-upů [15]. Dalším příkladem studie historických farmaceutických vzorků je analýza přírodních pryskyřic a balzámů z 18. století [16].

2.2 Naloxon

2.2.1 Struktura a vlastnosti



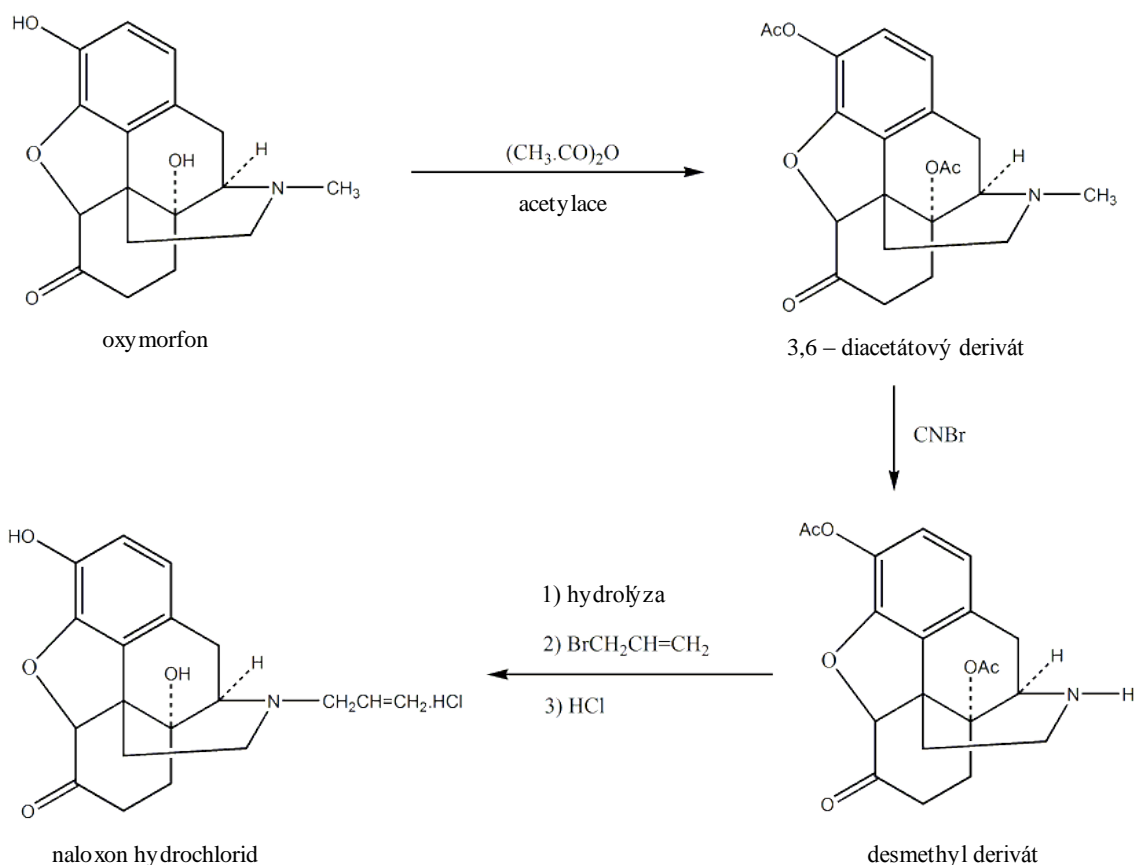
Obr. 2.1: Chemická struktura naloxonu.

Naloxon hydrochlorid, chemicky (5 α)-4,5-epoxy-3,14-dihydroxy-17-(2-propenyl)morphinan-6-on hydrochlorid (1:1) (CASN: [357-08-4]) je antagonist opioidů. Jeho sumární vzorec je $C_{19}H_{21}NO_4 \cdot HCl$ a relativní molekulová hmotnost je 363,84 [17]. Je to bílý prášek s teplotou tání 200–205 °C. Je rozpustný ve vodě, slabě rozpustný v ethanolu a prakticky nerozpustný v chloroformu a etheru. Naloxon (CASN: [465-65-5]), jehož pK_a je 7,9, je naopak v chloroformu rozpustný. Jeho chemická struktura je znázorněna na obr. 2.1, sumární vzorec je $C_{19}H_{21}NO_4$ a relativní molekulová hmotnost naloxonu je 327,37. Naloxon tvoří krystaly, jejichž teplota tání je 177–180 °C.

2.2.2 Výroba

Výchozí sloučeninou pro přípravu naloxon hydrochloridu může být oxymorfon, jehož acetylací vznikne 3,6-diacetátový derivát, který reakcí s bromkyanem poskytne desmethyl derivát (obr. 2.2) [18]. Desmethyl derivát se nejprve hydrolyzuje, následně se alkyluje s allyl bromidem a nakonec se nechá zreagovat s kyselinou chlorovodíkovou, čím vznikne finální produkt naloxon hydrochlorid.

Další možností je syntéza naloxonu malými změnami ve struktuře morfinu [19]. Úpravou substituentu na piperidinovém dusíku z methylové skupiny na delší postranní řetězec se lék změní z agonisty na antagonistu.



Obr. 2.2: Výroba naloxon hydrochloridu z oxymorfonu [18].

2.2.3 Farmakologie naloxonu

Naloxon je specifický opioidní antagonist na μ -receptorech [20] (μ -receptory jsou receptory v neuronech spřažené s G-proteinem, jejichž aktivací dochází k tlšení bolesti, tzv. antinociceptivnímu účinku [21]), který působí kompetitivně a je obecně používán k léčbě předávkování opioidy a k odvrácení nežádoucích účinků terapeutických dávek opioidů [22]. Pro tento účel je vhodný, jelikož nezvyšuje riziko útlumu dýchání [18]. Je také používán pro diagnostiku fyzické závislosti na opiátech a jako léčebný prostředek při léčbě patologických uživatelů opiátů [22]. Naloxon je schválen také pro použití u novorozenců pro odvrácení útlumu dýchání vyvolanému užíváním opiátů matkou [19]. Kromě toho se naloxon používá ke zlepšení krevního oběhu u pacientů v šoku. Další experimentální a méně dokumentované použití naloxonu zahrnuje odvrácení kómatu při předávkování alkoholem, potlačení chuti k jídlu a zmírnění demence ze schizofrenie. V extrémně malých dávkách se podává spolu s morfinem, aby se předešlo vzniku závislosti [23]. U zdravých jedinců nevykazuje žádné farmakologické účinky [24] a jeho nežádoucí účinky jsou minimální [19].

Naloxon se nejčastěji používá jako naloxon hydrochlorid [22]. Je podáván parenterálně vzhledem k vysokému first-pass efektu při podání orálně, obvykle intravenózně kvůli rychlému nástupu účinku. Podává se jednorázově v množství 0,4–2 mg, v případě potřeby se podání opakuje [17].

Food and Drug Administration schválila tablety pro léčbu závislosti na opiátech obsahující fixní dávku buprenorfin hydrochloridu a naloxon hydrochloridu v poměru 4:1 [25]. Jsou dostupné ve dvou koncentracích, 2 mg/0,5 mg obsahující 2,16 mg buprenorfin hydrochloridu (ekvivalentní ke 2 mg buprenorfinové báze) a 0,61 mg naloxon hydrochloridu (ekvivalentní k 0,5 mg naloxonové báze) a 8 mg/2 mg obsahující 8,64 mg buprenorfin hydrochloridu (ekvivalentní k 8 mg buprenorfinové báze) a 2,44 mg naloxon hydrochloridu (ekvivalentní ke 2 mg naloxonové báze).

2.2.4 Distribuce v organismu a metabolismus

Naloxon je po perorálním podání rychle absorbován, ale podléhá rozsáhlému first-pass metabolismu [17]. Je rychle, ale neúplně vylučován močí, hlavně jako konjugované metabolity. Do šesti hodin se vyloučí 30 % a do 72 hodin 60 % z podané dávky. Metabolity, které byly identifikovány, jsou naloxon-3-glukuronid a *N*-desalkyl a 6-hydroxy deriváty, spolu s jejich glukuronidovými konjugáty. U lidí a králíků je naloxon metabolizován také na příslušný dihydromorfin [26]. Po požití vysoké orální dávky naloxonu je *N*-deallylací metabolizován na nornaloxon. Biologický poločas se u dospělého jedince pohybuje v rozmezí 30 až 81 minut, zatímco u novorozenců je biologický poločas v rozmezí 30 až 186 minut [18].

2.2.5 Analytická stanovení

Byla popsána široká škála analytických metod pro detekci a kvantifikaci naloxonu a jeho metabolitů v biologických tekutinách, která zahrnuje například HPLC metody spojené s elektrochemickou, spektrofotometrickou nebo DAD-fluorescenční detekcí [22]. Pro lékové formy jako jsou tablety nebo injekční roztok se využívá metoda HPLC.

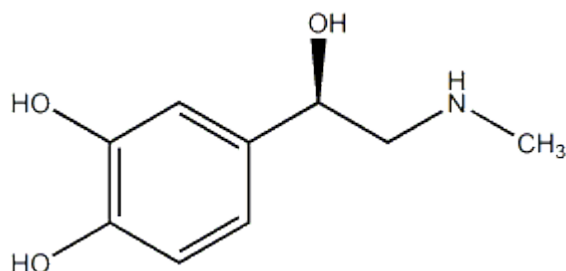
V tabulce 2.1 jsou uvedeny vybrané příklady stanovení naloxon hydrochloridu, eventuelně naloxonu, v různých maticích.

Tab. 2.1: HPLC stanovení naloxonu, resp. naloxon hydrochloridu na koloně C18.

typ vzorku	podmínky měření, detekce	LOD	LOQ	lineární rozmezí	reference
mikročástice pro léčbu drogové závislosti	izokratická eluce methanol-oktanosulfát sodný (pH=4,0) (45:55, v/v), detekce deuteriovou lampou	–	1,907 $\mu\text{g ml}^{-1}$	6–30 $\mu\text{g ml}^{-1}$	[22]
tableta s buprenorfin hydrochloridem	izokratická eluce acetonitril-10mM fosfátový pufr (pH=6,0) (83:17, v/v), UV detekce (210 nm)	0,01 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0,1–100 $\mu\text{g ml}^{-1}$	[25]
lidská plazma	izokratická eluce methanol-0,1% octová kyselina (15:85, v/v), elektrosprejová ionizace, trojitý kvadrupólový analyzátor, MS	33 pg ml^{-1}	1 ng ml^{-1}	1–100 ng ml^{-1}	[27]
	izokratická eluce 0,1M fosfátový pufr-methanol (84:16, v/v), elektrochemická detekce	1,0 ng ml^{-1}	–	2,5–160 ng ml^{-1}	[28]
	izokratická eluce acetonitril-2mM mravenčan amonný (82:18, v/v), elektrosprejová ionizace, trojitý kvadrupólový analyzátor, MS-MS	–	25 pg ml^{-1}	0,025–20 ng ml^{-1}	[29]
léčivé přípravky	izokratická eluce acetonitril-0,01M fosfátový pufr (70:30, v/v), UV detekce (254 nm)	–	–	10–50 $\mu\text{g ml}^{-1}$	[30]
myší plazma	gradientová eluce 0,1% mravenčí kyselina-0,1% mravenčí kyselina v acetonitrilu, elektrosprejová ionizace, trojitý kvadrupólový analyzátor, MS-MS	–	–	0,2–100 ng ml^{-1}	[31]

2.3 Adrenalin

2.3.1 Struktura a vlastnosti



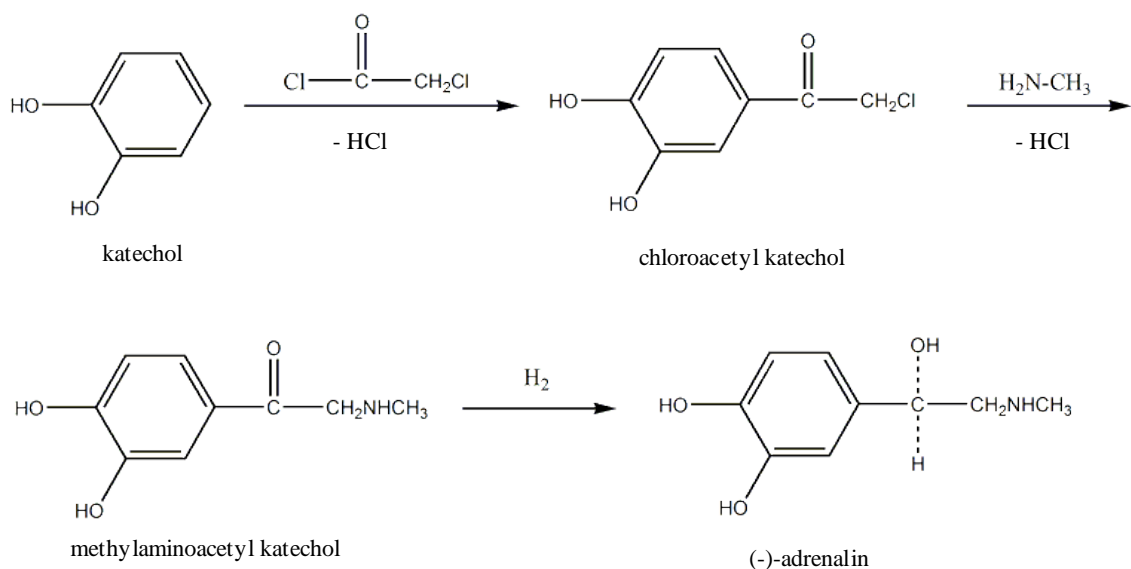
Obr. 2.3: Chemická struktura adrenalinu.

Adrenalin, chemicky 4-[(1*R*)-1-hydroxy-2-(methylamino)ethyl]benzen-1,2-diol (CASN: [51-43-4]), také známý jako epinefrin [17], je jeden z přirozeně se vyskytujících katecholaminů [32]. Jeho sumární vzorec je $C_9H_{13}NO_3$, relativní molekulární hmotnost je 183,20 [17] a jeho struktura je znázorněna na obr. 2.3. Je to bílý nebo krémový krystalický prášek nebo granule s teplotou tání 212 °C, při které se rozkládá. Na světle a vzduchu jeho barva tmavne, je nestabilní v neutrálních nebo alkalických roztocích. V ethanolu, chloroformu, etheru a petroletheru je adrenalin prakticky nerozpustný, mírně rozpustný je ve vodě a dobře rozpustný je v roztocích minerálních kyselin a kyseliny borité a v roztocích hydroxidu sodného nebo draselného. Při 20 °C je jeho $pK_{a,1} = 8,7$, $pK_{a,2} = 10,2$ a $pK_{a,3} = 12,0$.

2.3.2 Výroba

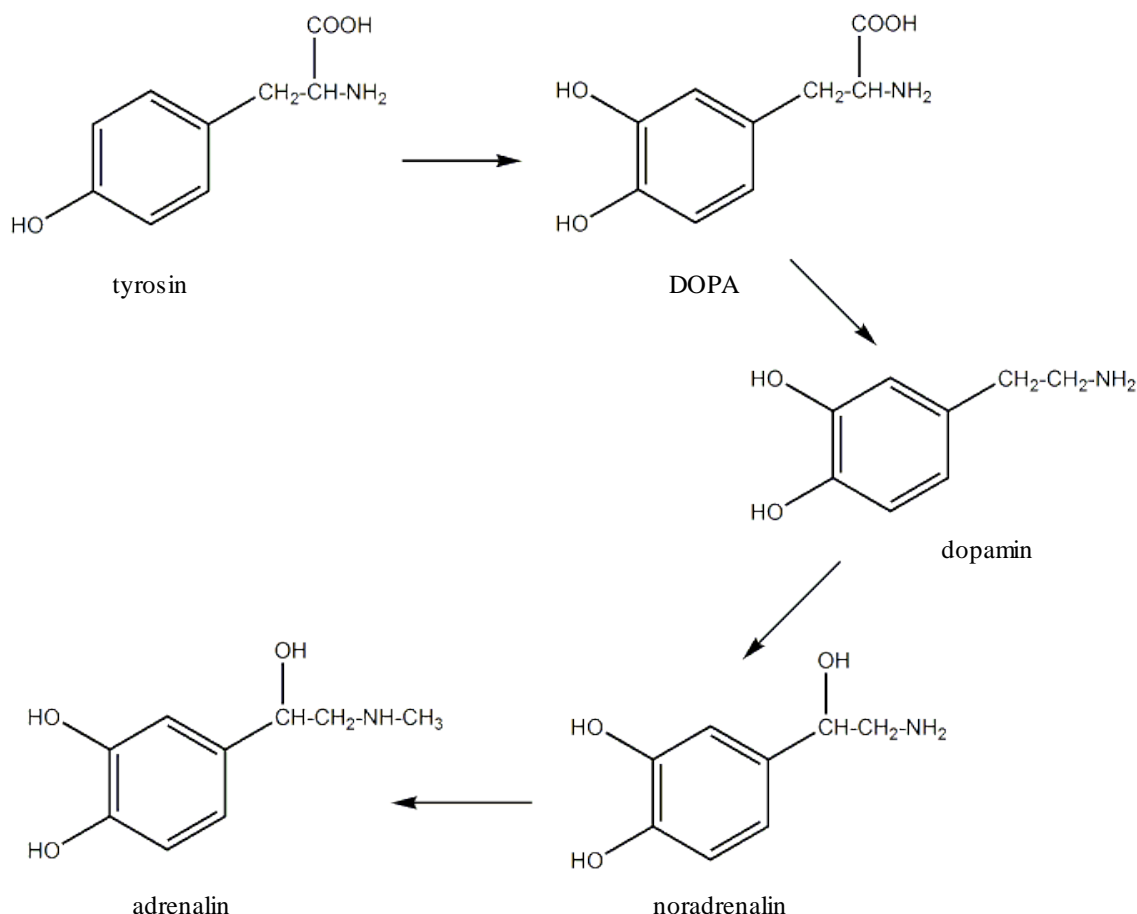
Adrenalin je přirozeně se vyskytující endogenní katecholaminový hormon, který sekretuje dřeň nadledvin společně se sympatickými nervovými zakončeními [32]. Jako první ho z nadledvin nezávisle na sobě izolovali na konci 19. století Abel a Fuerth [18].

Adrenalin je možné syntetizovat několika způsoby, velmi častá je syntéza z katecholu (obr. 2.4), kdy se katechol nechá zreagovat s monoacetylchloridem, čímž za odštěpení molekuly chlorovodíku vznikne chloroacetylkatechol [18]. Chloroacetylkatechol se následně nechá zreagovat s methylaminem, odštěpí se další molekula chlorovodíku a vznikne methylaminoacetylkatechol, jehož redukcí už získáme racemický adrenalin.



Obr. 2.4: Chemická syntéza adrenalinu z katecholu [18].

V lidském těle je adrenalin tvořen následujícím sledem reakcí: tyrosin → → 3,4-dihydroxyfenylalanin (DOPA) → dopamin → noradrenalin (norepinefrin) → → adrenalin (epinefrin) [33] (obr. 2.5). Jednotlivé kroky jsou katalyzovány enzymy tyrosin hydrolasou, 3,4-DOPA dekarboxylasou, dopamin- β -hydroxylasou a fenylethanolamin-*N*-methyltransferasou.



Obr. 2.5: Biosyntéza adrenalinu v lidském těle [33].

2.3.3 Farmakologie adrenalinu

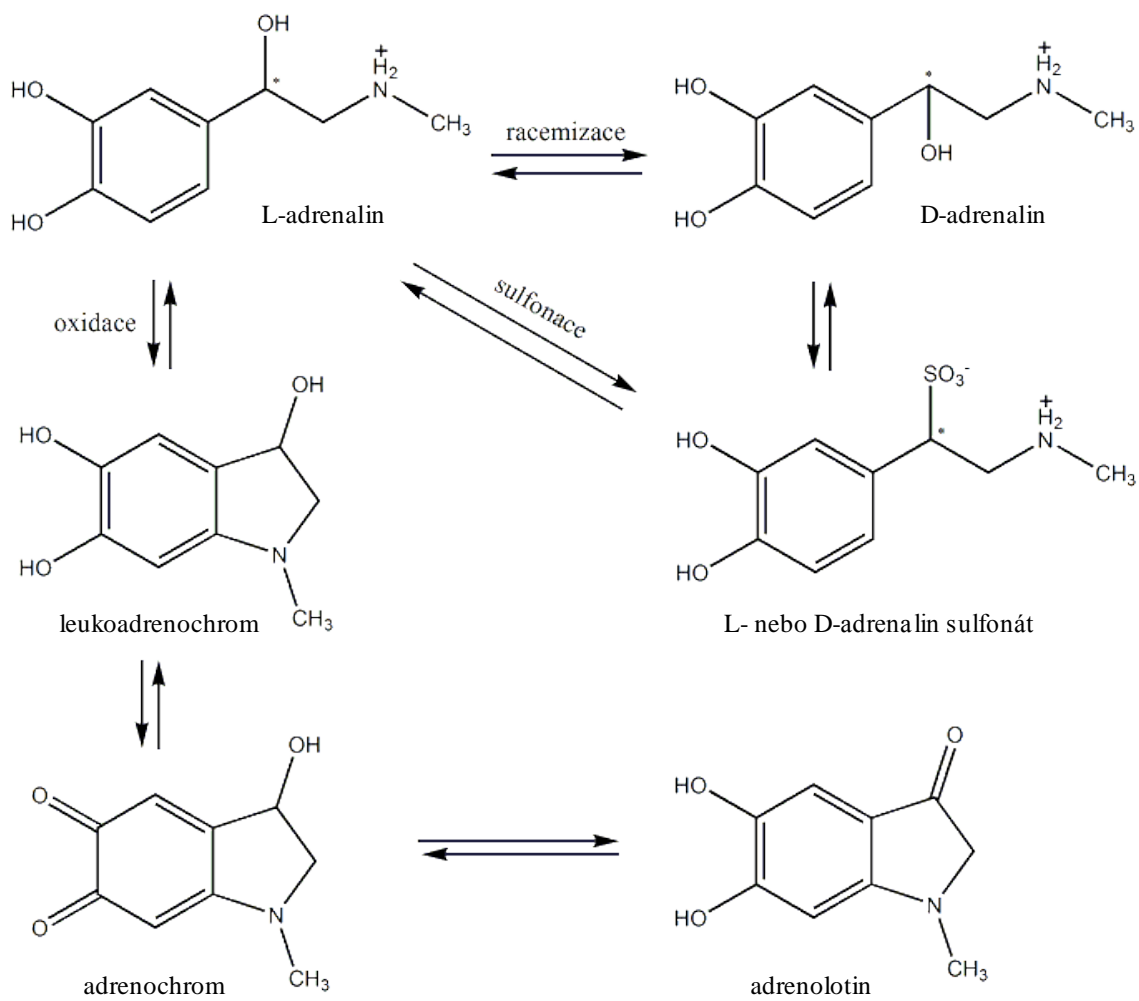
Adrenalin, stejně jako například dopamin nebo noradrenalin, patří do skupiny katecholaminů a je také jedním z důležitých neurotransmiterů v nervovém systému savců a biologických tělních tekutinách [34]. Působí neselektivně [35], má stejně vysokou afinitu ke všem adrenergním α - i β -receptorům [36]. Používá se jako vazokonstrikční přísada k lokálním anestetikům (drží anestetikum v místě působení, na axonu senzitivního nervu, tím dochází k prodloužení účinku anestetika [36]), antialergikum (adrenalin podaný intravenózně je nejdůležitějším léčivem při anafylaktickém šoku [36]), kardiostimulans (adrenalin působí na β -adrenoreceptory v srdci, čímž dojde ke zvýšení rychlosti a síly kontrakce srdce [19]) a výjimečně jako bronchodilatans (a to především u nočního astmatu jako látka s prodlouženými účinky) [35]. Je kontraindikován například u vysokého krevního tlaku, aterosklerózy, arytmií či hyperthyreózy.

Mnoho jevů souvisí s koncentrací adrenalinu v krvi, stejně jako v moči [37]. Normální množství adrenalinu v séru zdravého člověka se pohybuje na úrovni nmol l^{-1} . Změny v koncentraci adrenalinu mohou souviset se stresem či srdečními problémy [32].

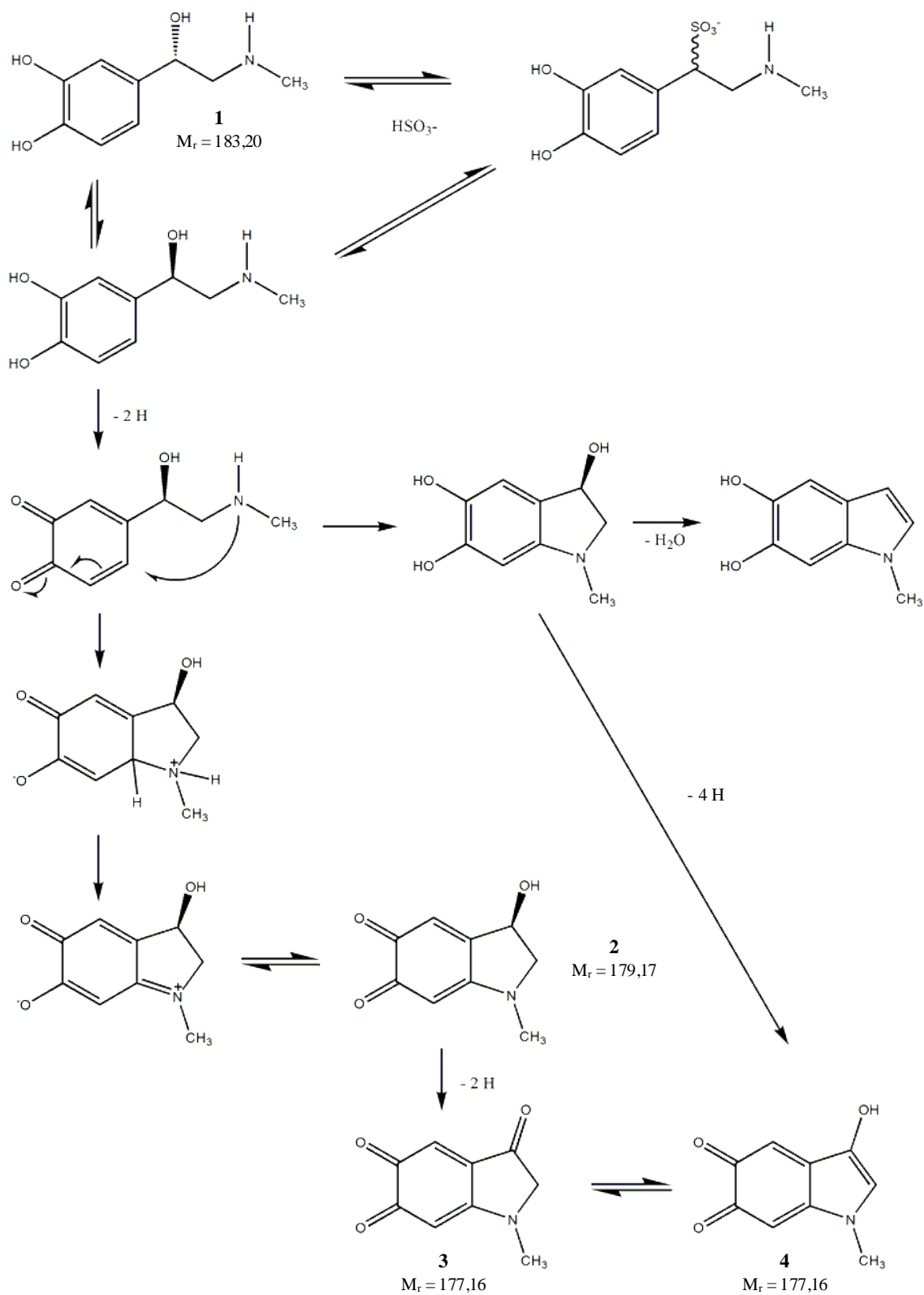
Abnormálně vysoká koncentrace v moči nebo plasmě může indikovat i tumor produkující katecholaminy, jako je feocytochrom, paragangliom či neuroblastom [38].

Hydrogenvinany nebo hydrochloridy adrenalinu jsou široce využívány ve formě injekčních roztoků [39]. Kvůli jeho běžnému užívání na pohotovostech a jednotkách intenzivní péče je typickou lékovou formou právě injekční sterilní roztok ve skleněných ampulkách na jedno použití. United States Pharmacopoeia definuje injekční roztok adrenalinu jako sterilní vodný roztok L-adrenalinu s vhodným pufrům (ve formě vinanové nebo hydrochloridové soli) [40]. L-forma adrenalinu je několikanásobně účinnější než jeho optický izomer, avšak může být inaktivován racemizací, oxidací, nebo reakcí s pomocnými látkami přítomnými v roztoku (obr. 2.6). Běžná koncentrace v komerčních produktech je 1–2 % pro dospělé, zatímco roztok pro děti obsahuje 0,5 nebo 0,15 % léčivé látky [39]. Mimo intravenózního způsobu podání existuje i podání subkutánní či inhalační, přičemž při inhalaci dochází k absorpci účinné látky rychleji než při podání subkutánním, avšak je nutné podání léčiva opakovat, jelikož dochází k rychlejšímu poklesu arteriální koncentrace adrenalinu v těle (v porovnání s podáním subkutánním) [41]. Orální podání je neúčinné, protože adrenalin, stejně jako ostatní katecholaminy, je inaktivován enzymy ve střevech [24].

Vzhledem k výrazné nestabilitě adrenalinu byla již provedena řada stabilitních studií [39, 42, 43]. Obecně k nestabilitě roztoků adrenalinu přispívají různé parametry, jako jsou teplota, vystavení světlu, pH roztoku, přítomnost aditivních látek, koncentrace farmaceuticky účinné látky či přítomnost kyslíku [39]. Ukázalo se, že na stabilitu má vliv i čas [42]. Při pokojové teplotě některé studie ukázaly pokles koncentrace adrenalinu 8 % po měsíci skladování, úbytek 7 % a 3,5 % po skladování 6 měsíců [43]. Při skladování 56 dní při teplotě 35 °C bez vystavení světla bylo při dalším experimentu degradováno skoro 40 % z původního množství adrenalinu. Vliv pH na stabilitu adrenalinu je značný a pro zvýšení stability injekčních roztoků se doporučuje tyto roztoky pufovat, nebo upravit pH do kyselé oblasti. Adrenalin dosahuje optimální stability při pH 3–4. Veliký podíl na degradaci adrenalinu má světlo, hlavně UV složka světla, proto se doporučuje skladovat roztoky adrenalinu v tmavých polypropylenových nádobách. Byly prostudovány také degradační cesty adrenalinu a jeho derivátů (obr. 2.7) [39].



Obr. 2.6: Degradační reakce L-adrenalinu v injekčních roztocích [40].

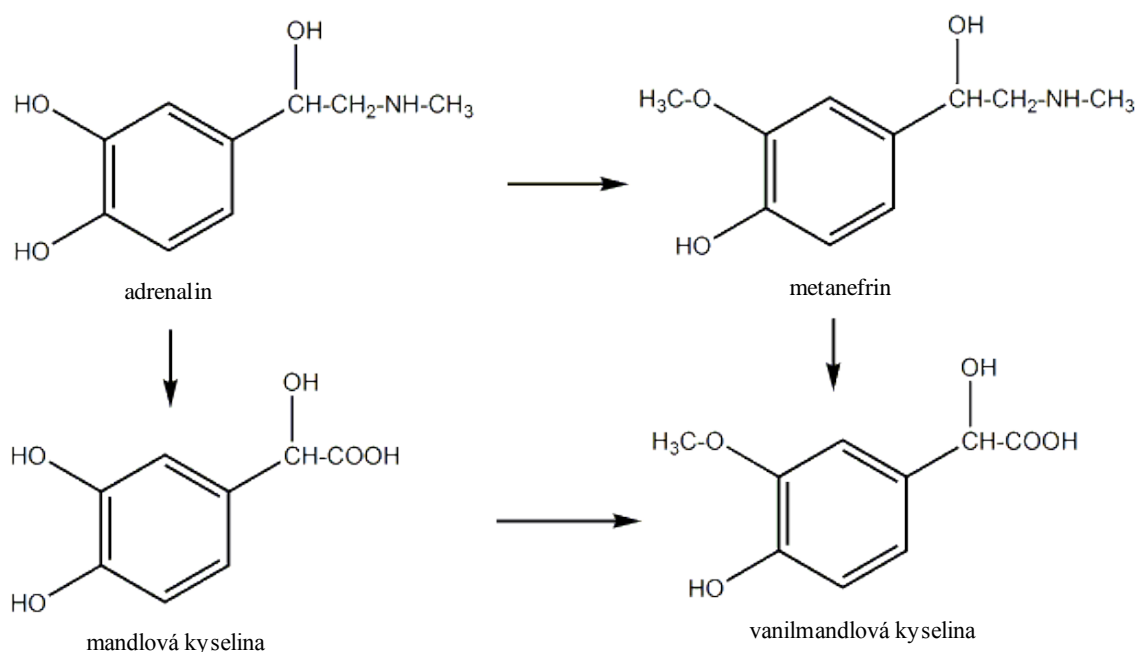


Obr. 2.7: Degradální cesty adrenalinu a jeho derivátů [39].

Běžné dávkování při subkutánním podání je 0,2 až 0,5 mg adrenalinu v 0,1% roztoku, intramuskulárně 1 až 3 mg adrenalinu v 0,2% olejové suspenzi, podle potřeby je možné opakovat [18]. Jelikož má adrenalin bioaktivní vlastnosti, mohou se při vyšších dávkách vyskytnout nežádoucí účinky zahrnující bolesti hlavy, nevolnost, u citlivějších jedinců dokonce i anafylaktický šok [44]. Může se však dostavit i úzkost, strach, napětí, třes, arytmie, či dokonce pulmonární edém, nebo krvácení do mozku jako výsledek výrazného zvýšení krevního tlaku [24]. Minimální subkutánní smrtelná dávka je zhruba 4 mg, avšak při okamžité podpůrné léčbě může dojít k zotavení i po předávkování 16 mg adrenalinu subkutánně nebo 30 mg intravenózně [17].

2.3.4 Distribuce v organismu a metabolismus

Adrenalin je po perorálním podání rychle degradován v trávicím traktu, po subkutánním podání se účinky adrenalinu dostaví do 5 minut a objevují se pomaleji než po intramuskulární injekci [17]. Rychle působí na srdce, slezinu, některé žlázy s vnitřní sekrecí a adrenergní nervy. V mozkomíšním moku jsou detekovatelné pouze metabolity adrenalinu. Hlavní metabolické cesty jsou oxidační deaminace a *O*-methylace následované redukcí nebo konjugací buď s glukuronovou kyselinou nebo se sulfátem. Přibližně 70–95 % z intravenózní dávky se vylučuje močí. Asi 80 % takto vyloučeného materiálu jsou *O*-methyl metabolity, 2 % jsou metabolity katecholu a pouze 1 % se vylučuje jako nezměněná látka. Hlavním metabolitem v moči je 4-hydroxy-3-methoxymandlová kyselina, další metabolity zahrnují 4-hydroxy-3-methoxyfenyloctovou kyselinu (homovanilová kyselina), konjugovaný metanefrin a 4-hydroxy-3-methoxyfenylglykol, spolu s menším množstvím 3,4-dihydroxy-mandlové kyseliny ve volné nebo konjugované formě a *N*-methyladrenalin. Spolu s homovanilovou kyselinou je dalším významným metabolitem v moči vanilmandlová kyselina [33] (obr. 2.8).



Obr. 2.8: Některé metabolity adrenalinu [33].

2.3.5 Analytická stanovení

Pro stanovení adrenalinu a dalších katecholaminů v nejrůznějších biologických materiálech a léčivých přípravcích je využíváno mnoho analytických metod, zahrnující především HPLC s elektrochemickou detekcí nebo hmotnostní spektrometrii, průtokovou injekční analýzu, kapilární elektroforézu, chemiluminiscenci, spektrofotometrii či fluorescenční detekci [32]. Jakožto elektroaktivní molekula může být adrenalin stanoven pomocí elektrochemických metod, například pomocí modifikovaných elektrod [37] jako je elektrochemicky aktivovaná uhlíková elektroda ze skelného uhlíku, mikroelektroda z uhlíkového vlákna nebo elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná polymerním filmem.

Další běžnou analytickou metodou pro stanovení adrenalinu je mimo klasické HPLC i metoda UHPLC. Kolony s reverzní fází na bázi silikagelu naráží na problém chvostování píků, které však lze eliminovat použitím kolony se stacionární fází s navázanými amidovými skupinami [45].

Příklady vybraných stanovení adrenalinu v různých matricích jsou uvedeny v tabulce 2.2.

Tab. 2.2: Analytická stanovení adrenalinu.

typ vzorku	metoda, podmínky měření	LOD	LOQ	lineární rozmezí	reference
standard adrenalinu	HPLC-MS, kolona Gemini C18, izokratická eluce octová kyselina–50mM octan amonný (pH=3,1) (1:99 v/v), pozitivní full scan MS mód	0,03 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0,07 $\mu\text{g ml}^{-1}$	–	[46]
kultury hovězích chromafinních buněk	HPLC-MS, kolona Zorbax XDB-C8, gradientová eluce 3 g Γ^{-1} methanol–octová kyselina (pH=2,8), APCI MS, pozitivní mód	1,9 ng ml^{-1}	2,1 ng ml^{-1}	–	[47]
lidská plazma	LC/MS, kolona ODS, gradientová eluce voda s 1 % mravenčí kyselinou–methanol s 1 % mravenčí kyselinou, elektrosprejová ionizace, průletový analyzátor, pozitivní mód	1,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$	–	–	[33]
	kinetická fluorimetrická metoda	0,003 $\mu\text{g ml}^{-1}$	–	–	[32]
lidská moč	kapilární elektroforéza, vlnová délka detektoru 220 nm, křemenná kapilára, hydrodynamické dávkování vzorku	5,0 nmol Γ^{-1}	10 nmol Γ^{-1}	–	[48]
	HPLC-MS/MS, kolona Acclaim Mixed Mode WCX, gradientová eluce 0,1% octová kyselina ve směsi methanol/voda (20/80, v/v)-2,0% octová kyselina ve směsi methanol/voda (20/80, v/v), APCI MS, Q-Trap, pozitivní MRM mód	3,2 $\mu\text{g } \Gamma^{-1}$	10,7 $\mu\text{g } \Gamma^{-1}$	10,7–1000 $\mu\text{g } \Gamma^{-1}$	[49]
	LC-MS/MS, kolona Allure Basix, izokratická eluce tetrahydrofuran–6,5mM vodný roztok mravenčí kyseliny (3:2, v/v), API tandemová MS, ionizace turbosprejem, pozitivní MRM mód	–	2,5 $\mu\text{g } \Gamma^{-1}$	0–10000 $\mu\text{g } \Gamma^{-1}$	[38]
mozková tkáň	RP-HPLC s elektrochemickou detekcí, kolona microbore ALF-125, izokratická eluce sodná sůl octan-1-sulfonové kyseliny (různé koncentrace)-fosforečnan-citronový pufr (různá pH)-methanol (různé koncentrace)	0,29 pg ml^{-1}	0,95 pg ml^{-1}	–	[50]

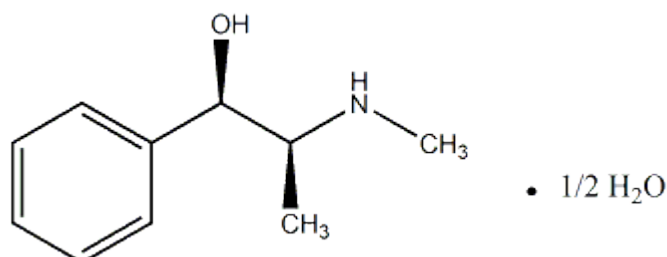
Tab. 2.2 pokračuje na další straně

Pokračování tab. 2.2 z předchozí strany

typ vzorku	metoda, podmínky měření	LOD	LOQ	lineární rozmezí	reference
injekce L-adrenalinu	HPLC-MS-MS, kolona Luna Phenyl- -Hexyl, izokratická eluce octanový pufr (pH=7,0)-acetonitril-mravenčí kyselina (89,03:10:0,07, v/v), elektrosprejová ionizace, pozitivní mód	–	–	–	[40]
	chirální HPLC, kolona Shodex ODS, izokratická eluce 0,2M chlorid draselný-0,2M chlorid draselný s 0,4% (v/v) octovou kyselinou- -acetonitril (96:1:3, v/v)	–	–	9,1–109,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$	[40]
thymopoly- -peptidová injekce	UPLC-MS, kolona ACQUITY UPLC BEH Shield RP18, gradientová eluce 0,1% mravenčí kyselina v acetonitrilu (50%)-0,1% mravenčí kyselina v acetonitrilu (100%), elektrosprejová ionizace, trojitý kvadrupólový analyzátor, pozitivní MRM mód	8,00 $\mu\text{g l}^{-1}$	12,00 $\mu\text{g l}^{-1}$	12,0–975,0 $\mu\text{g l}^{-1}$	[44]

2.4 Efedrin

2.4.1 Struktura a vlastnosti



Obr. 2.9: Chemická struktura hemihydrátu efedrinu.

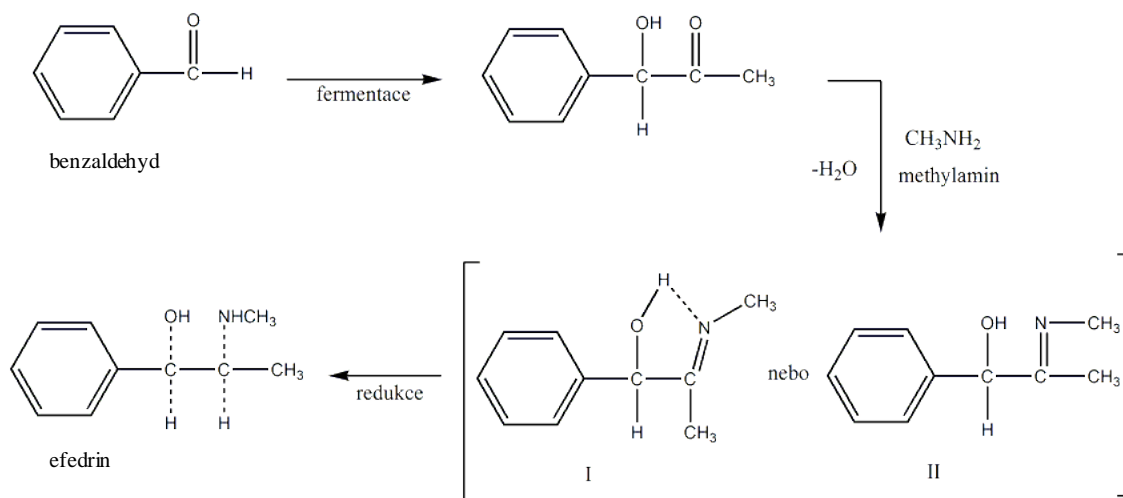
Efedrin hemihydrát, chemicky (1*R*,2*S*)-2-(methylamino)-1-fenylpropan-1-ol hydrát (2:1) (CASN: [50906-05-3]) [17], je alkaloid nalézající se v různých rostlinách rodu *Ephedra* (chvojník) a patří také do skupiny amfetaminů [51]. Sumární vzorec hemihydrátu efedrinu je $C_{10}H_{15}NO \cdot 1/2H_2O$, relativní molekulová hmotnost je 174,24 a jeho struktura je znázorněna na obr. 2.9 [17]. Jsou to bezbarvé krystaly nebo bílý krystalický prášek či granule, které se na světle rozkládají a jehož teplota tání je 40 °C. Je rozpustný ve vodě (1:20), ethanolu (cca 1:1), etheru (neomezeně) a v chloroformu za tvorby zákalu z důvodu oddělení vody. Bezvodý efedrin (CASN: [299-42-3]), jehož $pK_a = 9,2$ [52], sumární vzorec je $C_{10}H_{15}NO$ a relativní molekulová hmotnost je 165,23 [17], se může vyskytovat také ve své diastereoisomerické formě jako tzv. pseudoefedrin (CASN: [90-82-4]) [18]. Efedrin má vodíkové atomy lokalizované na stejnou stranu, zatímco dva vodíkové ionty pseudoefedrinu jsou na opačné straně roviny kruhu.

2.4.2 Výroba

Efedrin je alkaloid přirozeně se vyskytující v mnoho rostlinách rodu *Ephedra*, například v chvojníku čínském (*Ephedra sinica*, Stapf.) [53], nebo se vyrábí synteticky [18]. Jako první izoloval efedrin z této rostliny v roce 1887 Nagai navlhčením usušené rostliny buď vodným roztokem uhličitanu sodného, nebo vápennou vodou a následně extrakcí ethanollem nebo benzenem.

Pro komerční výrobu efedrinu je nejvíce používaná syntetická metoda, podle Neuberga (obr. 2.10). První krok výroby je fermentace benzaldehydu, který je výchozí látkou pro syntézu, buď pomocí melasy, nebo směsi glukózy a kvasinek. Touto reakcí vznikne příslušný keto alkohol, který po reakci s methylaminem dává za odštěpení vody

vzniknout meziprojektu, který lze znázornit buď jako sloučeninu I nebo II (obr. 2.10). Následnou redukcí vznikne konečný produkt, efedrin.



Obr. 2.10: Chemická syntéza efedrinu z benzaldehydu [18].

2.4.3 Farmakologie efedrinu

Efedrin je sympatomimetický rostlinný amin, který snadno prochází hematoencefalickou bariérou [35]. Je znám především pro své psychostimulační účinky. Pro CNS má potenciální stimulační účinky (u narkolepsie se používá jako centrální stimulans [35]) a pro periferní nervový systém má také sympatomimetický efekt [53]. Ovlivňuje α - i β -receptory, jelikož má kombinované přímé i nepřímé účinky [35]. Efedrin je využíván pro dýchací potíže (dnes již vzácně [35]), jako antitusikum, antipyretikum a proti zánětům [54]. Dalším prokázaným účinkem je úbytek váhy, proto se efedrin přidává do léků na redukci váhy [55]. Efedrin, stejně jako další sympatomimetika s nepřímými účinky, se přidává do léků používaných při inkompetentních uzávěrech močové trubice, při urgentní inkontinenci moči a po prostatektomii [35]. Pro své periferní účinky se efedrin, podobně jako například pseudoefedrin či norefedrin, přidává do léků proti nachlazení [53]. Pro své stimulační účinky je efedrin na listině World Anti-Doping Agency jako sloučenina, která má specifickou prahovou hodnotu pro dopingovou kontrolu [56], zakázaná je tato sloučenina od International Olympic Committee [53].

V těle se efedrin přirozeně nevyskytuje, jeho přítomnost pochází z podání efedrinu, buď v lékové formě, nebo z požití výživových doplňků obsahujících rostlinný materiál nebo extrakt z rostlin rodu *Ephedra* [57]. Terapeutická koncentrace v krvi je udávána v rozmezí 0,02–2 mg Γ^1 . World Anti-Doping Agency udává pro terapeutické užívání efedrinu hranici 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ v moči [51]. V lékových formách se objevuje jako

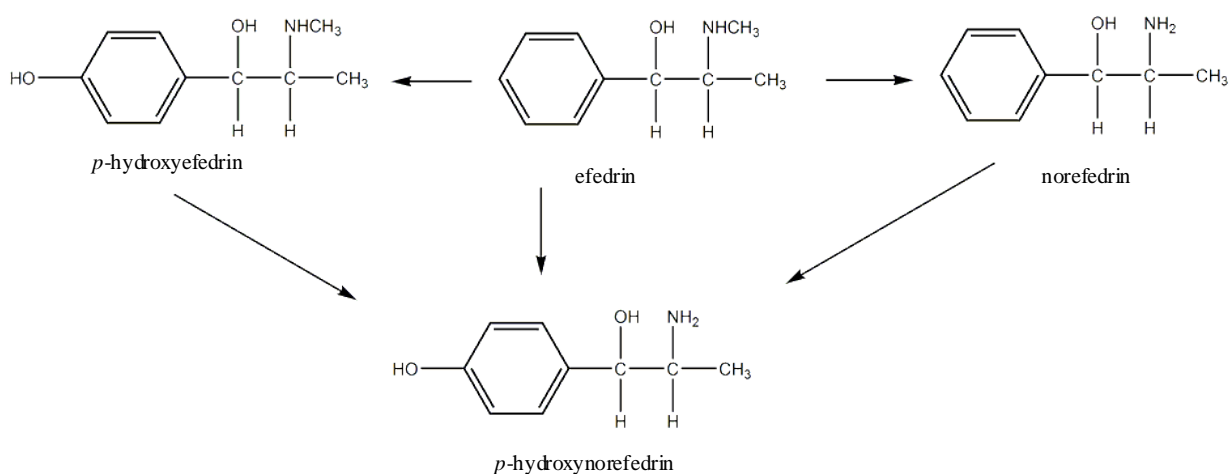
hemihydrát, anhydrát nebo hydrochlorid či síran [17]. Orálně se denně může podávat 90–180 mg v oddělených dávkách, v nosních kapkách v koncentraci 0,5–1 %.

Užití efedrinu se také pojí s nežádoucími účinky, které mohou variovat od mírné hypertenze a bušení srdce až k mozkové mrtvici, či dokonce smrti [54]. Mimo bušení srdce, které může přejít až k infarktu [51], jsou ve srovnání s kontrolní skupinou pozorovány také psychické symptomy, autonomní symptomy, či symptomy týkající se horního gastrointestinálního traktu [55]. Minimální letální dávka u dětí do dvou let věku se odhaduje na 200 mg a pro dospělé 2 g, nicméně úmrtí jsou vzácná [17]. Bez vyvolání vážných toxických účinků byly podávány jednotlivé dávky až 400 mg.

2.4.4 Distribuce v organismu a metabolismus

Efedrin je po perorální nebo perkutánní aplikaci snadno absorbován [17]. Je metabolizován *N*-demethylací na norefedrin (fenylpropanolamin) a oxidační deaminací následovanou konjugací. Hromadí se v játrech, plicích, ledvinách, slezině a mozku. Přibližně 90 % dávky se vylučuje močí do 24 hodin, z toho přibližně 55–75 % dávky je vyloučeno v nezměněné formě, 8–20 % jako norefedrin a 4–13 % jako deaminované metabolity, například benzoová kyselina, hippurová kyselina a 1-fenylpropan-1,2-diol. Při kyselém pH moči se mírně zvyšuje vylučování nezměněné látky, zatímco při alkalickém pH moči se v nezměněné podobě vyloučí asi 20–35 % dávky a zvyšuje se podíl norefedrinu. Metabolická dráha efedrinu je znázorněna na obr. 2.11 [58].

Při studiu možných degradačních produktů biotransformace byly při kultivaci efedrinu s bakterií *Arthrobacter globiformis* izolovány degradační produkty, které zahrnovaly methylamin, 1-hydroxy-2-oxo-1-fenylpropan, 2-hydroxy-1-oxo-1-fenylpropan, acetaldehyd, benzoovou kyselinu, či pyrokatechol [59].



Obr. 2.11: Metabolická dráha efedrinu [58].

2.4.5 Analytická stanovení

Pro analýzu efedrinu, popř. pseudoefedrinu, v biologických materiálech, léčivých nebo rostlinných přípravcích byla popsána celá řada analytických metod [51]. Nejširší uplatnění mají chromatografické metody, například plynová chromatografie či kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní detekcí, popř. s tandemovou hmotnostní detekcí [53, 57, 60]. Dále jsou popsány metody kapilární chromatografie [54], kapilární elektroforéza s UV detekcí či zónová kapilární chromatografie s amperometrickou detekcí [51]. Z dalších metod byla popsána například stanovení spektrofotometrická [61].

V tabulce 2.3 je uvedeno několik příkladů analytických metod pro analýzu efedrinu, popř. pseudoefedrinu, v různých matricích.

Tab. 2.3: Vybraná analytická stanovení efedrinu, popř. pseudoefedrinu.

typ vzorku	metoda, podmínky měření	LOD	LOQ	lineární rozmezí	reference
potravinové doplňky na hubnutí	HPLC-ESI-MS/MS, kolona Hypersil Gold, gradientová eluce methanol-0,02% mravenčí kyselina s mravenčanem amonným (pufr o pH=3,50), ESI-MS/MS, trojitý kvadrupólový analyzátor, pozitivní i negativní SRM mód	0,030 mg kg ⁻¹	0,10 mg kg ⁻¹	1–100 µg l ⁻¹	[51]
farmaceutické přípravky	HPLC-MS, kolona Zorbax SB-C18, gradientová eluce 30mM hydrogenufosforečnan draselný ve vodě-octová kyselina-triethylamin (400:0,25:0,1, v/v/v, pH=4,0)-methanol, ESI-MS, kvadrupólový analyzátor	–	–	–	[52]
	HPTLC, hliníková deska 60 F-254 pokrytá silikagelem, rozpouštědlo octan ethylnatý-methanol-20% amoniak (7:1,5:1, v/v/v), vyvíjení 30 minut	2 µg	6 µg	10–26 µg	[61]
čínský léčivý přípravek Ge-Gen Decoction	HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS, kolona Angela TM Venusil MP-C18, gradientová eluce 0,1% mravenčí kyselina-acetonitril, elektrospojová ionizace	1,06 µg ml ⁻¹	3,12 µg ml ⁻¹	6,21–62,10 µg ml ⁻¹	[62]

Tab. 2.3 pokračuje na další straně

Pokračování tab. 2.3 z předchozí strany

typ vzorku	metoda, podmínky měření	LOD	LOQ	lineární rozmezí	reference
tělní tekutiny	HPLC-MS, kolona XBridge™ Shield RP18, gradientová eluce acetonitril-10mM hydrogenuhličitan amonný (pH=10,5), elektrosprejová ionizace, MRM mód	–	0,20 ng ml ⁻¹	0,1–50,0 ng ml ⁻¹	[54]
lidská moč	LC/MS/MS, kolona ACE C18, gradientová eluce 0,1% mravenčí kyselina ve vodě-0,1% mravenčí kyselina v acetonitrilu, elektrosprej. ionizace, trojitý kvadрупólový analyzátor, pozitivní SRM mód	0,94 µg ml ⁻¹	2,86 µg ml ⁻¹	5–25 µg ml ⁻¹	[56]
	HPLC/ESI/MS, kolona Intersil ODS-80A, izokratická eluce methanol/voda (80/20, v/v) s 0,001% (v/v) octovou kyselinou, elektrosprejová ionizace, kvadрупólový analyzátor, Scan mód	17 ng ml ⁻¹	–	–	[63]
	UPLC-MS/MS, kolona Acquity UPLC HSS C18, gradientová eluce 5mM mravenčanový pufr s 0,05% mravenčí kyselinou-methanol, elektrosprejová ionizace, pozitivní MRM mód	2,5 ng ml ⁻¹	25 ng ml ⁻¹	25–500 ng ml ⁻¹	[64]
lidská krev (plasma)	HPLC-MS/MS, kolona Agilent Zorbax SCX, gradientová eluce 5mM mravenčanový pufr (pH = 3)-acetonitril, ESI-MS	–	10 ng ml ⁻¹	–	[53]
	LC-MS/MS, kolona Prodigy Phenyl-3, gradientová eluce 0,1% mravenčí kyselina ve vodě-0,1% mravenčí kyselina v methanolu, elektrosprejová ionizace, pozitivní SRM mód	2,7 µg l ⁻¹	–	–	[57]

Tab. 2.3 pokračuje na další straně

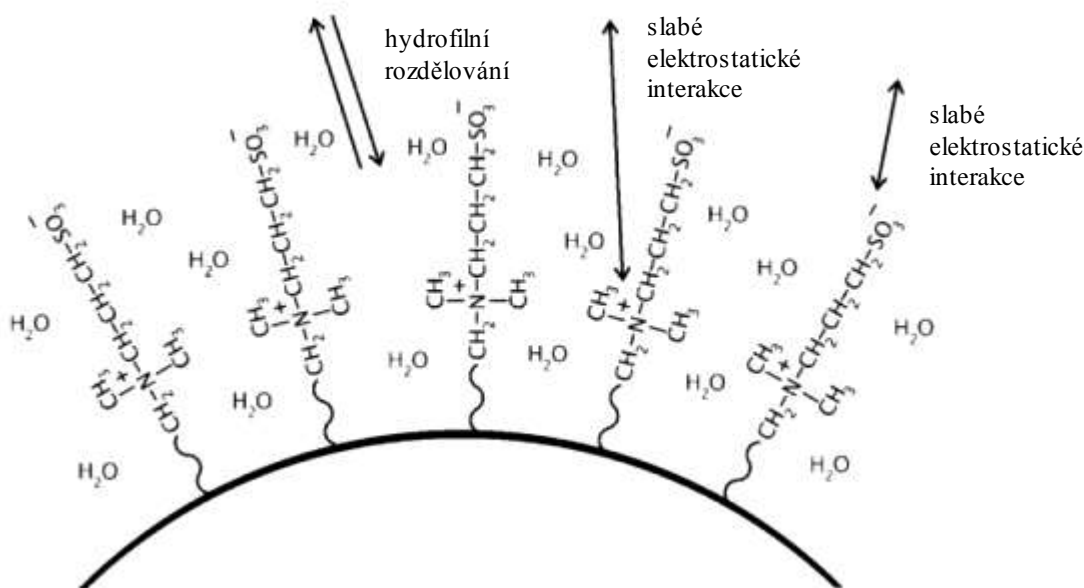
Pokračování tab. 2.3 z předchozí strany

typ vzorku	metoda, podmínky měření	LOD	LOQ	lineární rozmezí	reference
lidská krev (plasma)	HPLC-MS/MS, kolona Acclaim 120 C18, gradientová eluce acetonitril-10mM octanový pufr (pH=3,5), elektrosprejová ionizace, trojitý kvadrupólový analyzátor, pozitivní MRM mód	–	10,0 ng ml ⁻¹	10,0–1000,0 ng ml ⁻¹	[65]
vlasy	HPLC-APCI-MS, kolona LiChroCART Purospher 60 RP-18e, gradientová eluce 0,1% mravenčí kyselina ve vodě-0,1% mravenčí kyselina v acetonitrilu, chemická ionizace za atmosférického tlaku, SIM mód	0,10 ng mg ⁻¹	0,15 ng mg ⁻¹	0–20 ng mg ⁻¹	[66]
	LC-TOFMS, kolona XDB-C18, gradientová eluce 0,1% mravenčí kyselina-acetonitril, elektrosprejová ionizace, průletový analyzátor	50 pg mg ⁻¹	150 pg mg ⁻¹	–	[67]
odpadní voda	LC-MS/MS, kolona Kinetex PFP, gradientová eluce 0,05% mravenčí kyselina ve vodě-0,05% mravenčí kyselina v methanolu, elektrosprejová ionizace, SRM mód	63 ng l ⁻¹	189 ng l ⁻¹	–	[68]

2.5 Princip separace na kolonách HILIC

Princip HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography – hydrofilní interakční kapalinová chromatografie) byl poprvé popsán Samuelsonem a Sjöströmem v roce 1952 pro separaci monosacharidů použitím Amberlite IRA-4001 anexové stacionární fáze, ale termín HILIC jako takový byl poprvé použit Alpertem až v roce 1990 [69]. Alpert navrhl tento „smíšený mód“ pro řešení separace hydrofilních sloučenin za podmínek vhodných pro spojení s ESI a odráží současnou přítomnost různých interakcí, v nichž převažují hydrofilní interakce doprovázené dalšími interakcemi, jako jsou hydrofobní nebo elektrostatické interakce [70]. Nový termín, HILIC, byl navržen, aby popsal kombinaci polární stacionární fáze s mobilní fází složenou z vody a polárního organického rozpouštědla, ve které je voda silnějším elučním činidlem. Tato separační technika byla však v HPLC běžně používána již od roku 1975 pro analýzu cukru a polysacharidů, avšak analýza musela být prováděna pouze za izokratických podmínek kvůli refraktometrické detekci [71].

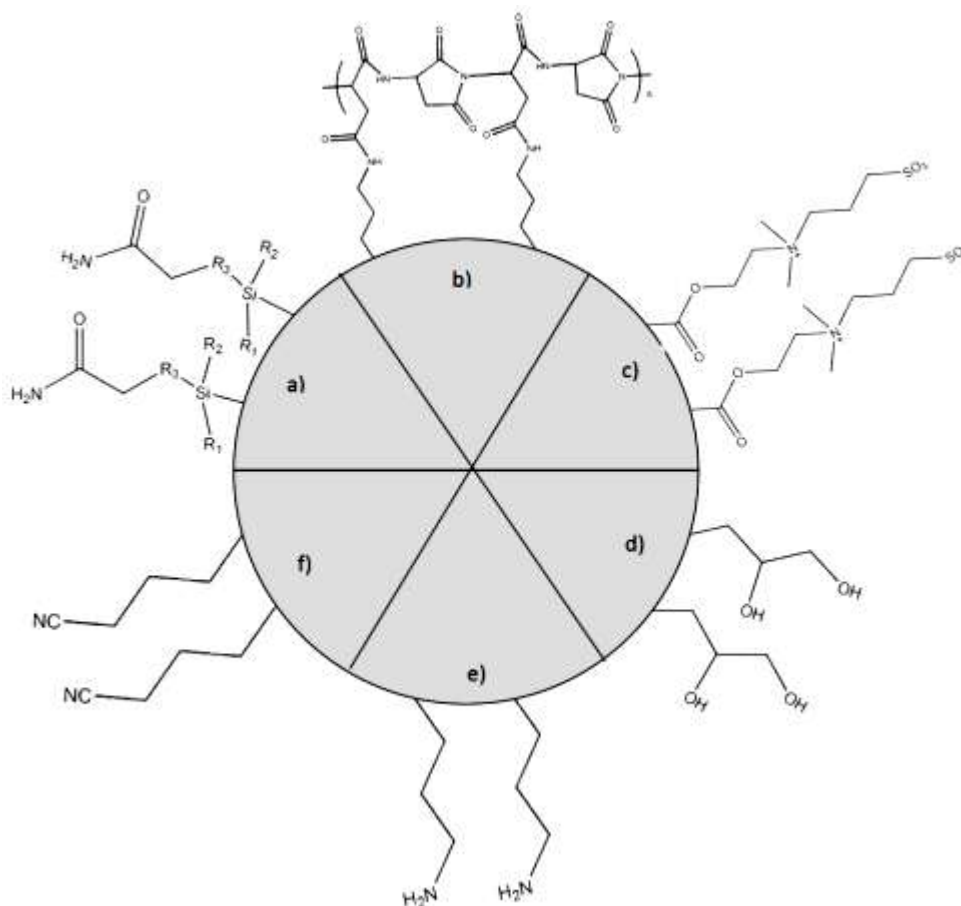
HILIC může být charakterizován jako chromatografická metoda používající stacionární fáze jako chromatografie s normálními fázemi v kombinaci s mobilními fázemi používanými v chromatografii s reverzními fázemi, které obsahují více než 50 % organického rozpouštědla ve vodě [72]. Mechanismus separace na HILIC kolonách však není stále plně objasněn [73]. Mezi jeden z hlavních separačních principů bývá řazen mechanismus rozdělování mezi hydrofobní částí mobilní fáze a silně hydrofilní vrstvou vody, která je imobilizována na povrchu polární stacionární fáze. Tím na polárních centrech stacionární fáze dochází k adsorpci vody a vznikne difuzní vrstva s gradientem koncentrace vody směrem do mobilní fáze. Dále popisované mechanismy zahrnují také důležitý vliv vodíkových vazeb, či vliv iontových interakcí a příspěvek hydrofobních interakcí v závislosti na použitých chromatografických podmínkách. Mechanismus separace je tedy považován za komplexní a jeho schéma je znázorněno na obr. 2.12.



Obr. 2.12: Schéma mechanismu HILIC separace [69].

Při podmínkách HILIC je stacionární fáze polární [73] a je jich mnoho druhů v závislosti na specifickém použití [70]. Primárně jsou rozdělovány do dvou skupin, na silikagelové kolony a kolony na bázi polymerů. Silikagelové kolony bez jakýchkoli navázaných skupin mají několik nevýhod, například irreverzibilní adsorpci polárních analytů na povrch kolony, proto se na silikagelový základ často navazují polárně vázané skupiny, z nichž některé jsou uvedené na obr. 2.13. Nesilikagelové stacionární fáze jsou běžně vyráběné z organických polymerů.

Další možné dělení je do tří skupin, na neutrální stacionární fáze, na kterých se neuplatňují elektrostatické interakce (např. diolové, amidové či cyklodextrinové), na nabitě stacionární fáze, na kterých hrají při retenci roli silné elektrostatické interakce (např. silikagel nebo aminopropyl silikagel) a na zwitterionty, na kterých se při retenci uplatňují slabé elektrostatické interakce (např. sulfobetain) [73]. Nejčastěji používanými stacionárními fázemi jsou silikagelové fáze a také silikagel modifikovaný aminopropylovou funkční skupinou. Pro bazické analyty jsou vhodné stacionární fáze modifikované amidovou skupinou nebo zwitteriontovou sulfobetainovou skupinou. Pro kyselé analyty jsou vhodnější stacionární fáze modifikované propylaminoskupinou díky iontovým interakcím aminoskupin s negativně nabitou skupinou kyselých analytů.



Obr. 2.13: Běžně používané HILIC silikagelové stacionární fáze: a) amidové, b) poly(sukcinimidové), c) sulfoalkylbetainové, d) diolové, e) aminopropylové a f) kyanopropylové kolony [70].

V HILIC je kritickým bodem správný výběr mobilní fáze, je to dokonce důležitější než u chromatografií s reverzními fázemi, u kterých je pro mobilní fázi vhodných hned několik rozpouštědel [74]. HILIC je v podstatě omezen jen na acetonitril jako organickou složku mobilní fáze [74], ostatní rozpouštědla jsou spíše používána ke změně selektivity systému [73]. Alkoholy, zejména methanol, dosahují zřídka dostatečné retence s výjimkou zwitteriontových stacionárních fází, které udrží analyty silnými elektrostatickými interakcemi a přispívají tak k retenci spíše než rozdělávání [74]. V některých případech jsou použitelné také tetrahydrofuran či dioxan, ale v ostatních případech jsou nepoužitelné. Nejvhodnějším a univerzálním tedy zůstává acetonitril. Mobilní fáze v HILIC obsahuje vysoké procento organické složky (více než 50 %), vodnou složku tvoří malé procento vody nebo pufru, ale aby byly zachovány podmínky pro HILIC, musí být její obsah nejméně 2,5 % [73].

Ovlivňování retence u HILIC je podobné jako na normálních fázích [73]. Více se zadržují polárnější látky a naopak se retence snižuje se zvýšením polaritý mobilní fáze (klesá tedy s rostoucím podílem vody nebo pufru). K ovlivnění retence se také používá

přídavek pufrů do mobilní fáze, přičemž retence obvykle klesá se zvyšující se koncentrací solí. Koncentrace solí se nejčastěji pohybuje v rozmezí 5–50 mmol Γ^{-1} . V HILIC se často používají chloristany nebo fosforečnany triethylaminu a sodné soli kyseliny methylfosforečné, pro spojení HILIC s hmotnostní detekcí nebo detektory na bázi aerosolu jsou používány těkavé amonné soli mravenčí nebo octové kyseliny.

HILIC má řadu výhod, mezi ty nejhlavnější přednosti patří lepší retence pro vysoce hydrofilní, iontové a polární látky [70], vlivem méně viskózní mobilní fázi bohaté na organickou složku HILIC vykazuje lepší separaci (nižší výškový ekvivalent teoretického patra) pro silně polární látky než u chromatografie s reverzní fází, právě díky složení mobilní fáze [72]. Dalším důvodem pro rostoucí popularitu HILIC je vhodnost pro spojení s hmotnostní spektrometrií [72]. Mezi další výhody patří možnost získat i pro bazické látky vhodné tvary píků, možnost použití vyšších průtoků mobilní fáze opět díky vysokému obsahu organické složky mobilní fáze, či fakt, že HILIC snadno nahradí chromatografii na normálních fázích, oproti které je HILIC metoda lépe reprodukovatelná, nepoužívá toxická organická rozpouštědla a nezpůsobuje problémy s rozpustností polárních analytů ve vysoce nepolárních mobilních fázích [73].

Jak již bylo zmíněno, metoda HILIC je vhodná pro analýzu malých a velmi polárních molekul [71]. V poslední době hraje velmi důležitou roli zejména ve farmaceutickém výzkumu, kde jsou analyzovány léčivé látky ve velmi nízkých koncentracích, a v bioanalytických aplikacích. Mezi standardně stanovované látky patří antibiotika a cytostatika, či například návykové látky. Dále se HILIC využívá při analýzách toxinů, sacharidů, saponinů, glykanů, aminokyselin, peptidů, proteinů, nebo při metabolomice.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Analyzované vzorky a standardy

Analyzovaným vzorkem naloxonu byl čirý bezbarvý roztok uchovávaný v 1 ml zatavené skleněné ampulce. Ampulka byla uložena v papírové krabičce označené „NARCAN (naloxone hydrochloride)“ (obr. 3.1), vyrobeno firmou DuPont (USA). Vzorek byl poskytnut ze sbírek Katedry analytické chemie PřF UK a je datován jen expirací, která vypršela v březnu 1980, stáří vzorku v době analýzy bylo tedy 35 let. V 1 ml analyzovaného roztoku vzorku bylo podle etikety deklarováno 0,4 mg naloxon hydrochloridu.

Standard nebyl k dispozici.



Obr. 3.1: Originální obal analyzovaného vzorku naloxonu.

Analyzovaným vzorkem adrenalinu byl čirý bezbarvý roztok uchovávaný v 1 ml zatavené skleněné ampulce. Ampulka byla uložena v papírové krabičce označené „Adrenalin Hydrochlor., Dr. Heisler“ (obr. 3.2), vyrobeno firmou Dr. Heisler, Chrást u Chrudimi (ČSR). Vzorek byl pravděpodobně vyroben ve 20. až 30. letech 20. století (mezi léty 1917, kdy firma Heisler zahájila výrobu injekčních léčivých přípravků, a 1938, kdy Dr. Heisler prodal svůj podnik Spolku pro chemickou a hutní výrobu) a byl poskytnut ze sbírek Českého farmaceutického muzea v Kuksu. Stáří vzorku v době analýzy bylo tedy nejméně 77 let. Deklarovaný obsah adrenalin hydrochloridu ve vzorku je 1 ‰, tedy 1 mg ml⁻¹.

Analytický standard adrenalinu ((-)-Epinephrine, šarže BCBN4232V), s deklarovaným obsahem ≥ 99 %, byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich.



Obr. 3.2: Originální obal analyzovaného vzorku adrenalinu.

Analyzovaným vzorkem efedrinu byl čirý bezbarvý roztok uchovávaný v 1 ml zatavené skleněné ampulce. Ampulka byla uložena v papírové krabičce označené „Ephedrin“ (obr. 3.3), vyrobeno firmou Dr. Jaroslav Prášek – chemicko-farmaceutický podnik, Praha-Běchovice (ČSR). Vzorek byl vyroben mezi léty 1945 a 1948 a byl poskytnut ze sbírek Českého farmaceutického muzea v Kuksu. Stáří vzorku v době analýzy bylo nejméně 67 let. Deklarovaný obsah efedrinu ve vzorku je $0,05 \text{ g ml}^{-1}$.

Analytický standard efedrinu (Efedrin.HCl) byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich.



Obr. 3.3: Originální obal vzorku efedrinu.

3.2 Použité chemikálie

Ostatní použité chemikálie byly (pokud není uvedeno jinak) analytické čistoty: amoniak p.a. (Lach-ner), chloroform HPLC (Sigma-Aldrich), kyselina mravenčí pure (Lachema), acetonitril HPLC (Lab-scan), acetonitril LC-MS CHROMASOLV (Fluka), methanol $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich), kyselina mravenčí $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich), mravenčan amonný $\geq 95\%$ (Carl Roth), kyselina chlorovodíková 35% p.a. (Lach-ner).

3.3 Postupy měření a vyhodnocování výsledků

3.3.1 Hmotnostní spektrometrie (HPLC-MS)

Ampulka analyzovaného historického léčivého přípravku naloxon hydrochloridu byla otevřena, obsah byl naředěn 1:1 vodou (byl přidán 1 ml destilované vody) a po kapkách byl přidáván amoniak až do pH 10 (kontrola univerzálním indikátorovým pH papírkem). Dále byl přidán chloroform, do kterého se naloxon vyextrahoval, tato fáze se po odstředění odebrala, odpařila proudem argonu a znovu rozpustila v 1 ml chloroformu. Objem 2 μl takto připraveného roztoku se přidal k 1 ml acetonitrilu a tento roztok byl použit k analýze HPLC-MS, či MS.

K analýze byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf HP1100, separace byla prováděna na koloně Watrex RP C18 (250 \times 4,0 mm, 5 μm), sériové číslo SN: 812613. Po optimalizaci podmínek byly vybrány následující parametry: izokratická eluce mobilní fází složenou 50:50 (v/v) acetonitrilu a mravenčanového pufru o pH=3,5, průtok mobilní fáze 0,5 ml min⁻¹, objem nástřiku 10 μl . UV chromatogramy byly snímány DAD detektorem při zvolených vlnových délkách pro naloxon 210 a 230 nm.

Hmotnostní spektra byla snímána dvěma typy hmotnostních spektrometrů. Prvním hmotnostním spektrometrem pro spojení s HPLC byl přístroj Bruker Esquire 3000 s iontovou pastí a elektrosprejovou ionizací. Rozsah měření byl nastaven 50–500 Da, zmlžovacím plynem byl dusík (35 psi). Průtok sušícího plynu o teplotě 330 °C byl 6 l min⁻¹, měření bylo prováděno v pozitivním i negativním módu.

Druhým spektrometrem, na kterém bylo provedeno měření bez použití chromatografie z přímého vstupu DIP (Direct Inlet Probe), byl hmotnostní spektrometr MS Shimadzu GCMS–QP2010, s kvadrupólovým analyzátozem a elektrosprejovou ionizací. Pro analýzu byl nastaven teplotní gradient, při kterém stoukala teplota lineárně od 50 °C do 350 °C rychlostí 150 °C min⁻¹. Nosným plynem bylo helium, vzorek byl vypařován do iontového zdroje (EI), jehož teplota byla 200 °C. Spektrum bylo

zaznamenáváno v intervalu 35–400 Da. Výsledky z této analýzy byly porovnány s knihovnou (EI) NIST Mass Spectral Library.

3.3.2 UHPLC-MS

Ampulka analyzovaného historického léčivého přípravku adrenalinu byla otevřena a roztok vzorku byl přímo použit pro analýzu. Ampulka s historickým vzorkem léčivého přípravku efedrinu byla otevřena a stokrát naředěna 90% acetonitrilem, tento roztok byl dále používán k analýze.

K analýze těchto dvou vzorků (včetně standardů) byl použit přístroj UHPLC Agilent Technologies 1290 Infinity se zabudovaným DAD detektorem ve spojení s hmotnostním spektrometrem Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS s kvadrupólovým analyzátozem a elektrosprejovou ionizací. Rozsah měření byl pro adrenalin nastaven 80–450 Da a pro efedrin 100–1000 Da. Zmlžovacím plynem byl pro obě látky dusík (40 psi), pro adrenalin byl průtok sušícího plynu 10 l min⁻¹ a jeho teplota byla 330 °C, pro efedrin byla nastavena teplota sušícího plynu 320 °C a průtok 8 l min⁻¹. Spektra adrenalinu byla snímána v pozitivním i negativním módu, pro efedrin byl použit jen pozitivní mód.

Po optimalizaci podmínek, jako jsou typ kolony, složení mobilní fáze, objem nástřiku a průtok mobilní fáze, byly pro každou látku zvoleny parametry analýzy uvedené v tabulce 3.1.

Tab. 3.1: Optimalizované podmínky pro analýzu historických vzorků adrenalinu a efedrinu.

	adrenalin	efedrin
kolona	ACQUITY UPLC® BEH Amide 1,7 μm (2,1x100 mm); SN 013434294182 52	
typ eluce	izokratická	
mobilní fáze	90:10 (v/v) acetonitril:60mM mravenčanový pufr o pH=3,0	93:7 (v/v) acetonitril:20mM mravenčanový pufr o pH=3,0
průtok mobilní fáze	0,350 ml min ⁻¹	0,300 ml min ⁻¹
objem nástřiku vzorků	2 μl	1 μl
vlnová délka DAD	280 nm	210 nm

Kvantifikace byla v případě obou vzorků, tj. adrenalinu i efedrinu, provedena metodou kalibrační přímky. Pro kvantifikaci efedrinu byly připraveny čtyři kalibrační roztoky o výsledných koncentracích v rozsahu 4–500 μg ml⁻¹ v 85% acetonitrilu okyseleném kapkou mravenčí kyseliny. Každý kalibrační roztok byl proměřen třikrát a z průměrných ploch píků odpovídajícím adrenalinu byl sestrojen kalibrační graf. Poté

byl čtyřikrát proměřen přímo roztok vzorku adrenalinu, byla vypočtena průměrná hodnota ploch píků odpovídající nezměněnému adrenalinu a dosazením do rovnice regrese byl vypočten obsah adrenalinu ve vzorku.

Pro kvantifikaci efedrinu byly také připraveny čtyři kalibrační roztoky standardu o výsledných koncentracích 12–1500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ v 90% acetonitrilu. Každý kalibrační roztok byl proměřen při optimálních podmínkách čtyřikrát a z průměrných ploch píků byl sestaven kalibrační graf. Poté byl šestkrát proměřen naředěný roztok vzorku, byla vypočtena průměrná hodnota ploch píků odpovídající efedrinu a dosazením do rovnice regrese byl vypočten obsah efedrinu ve vzorku.

3.3.3 Spektrofotometrické sledování rozpadu adrenalinu

Spektrofotometrická měření byla prováděna na spektrofotometru Hewlett-Packard HP 8453. Byly připraveny čtyři roztoky standardu adrenalinu o koncentraci $2 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, které byly ponechány při různých skladovacích podmínkách po dobu 14 dnů (tabulka 3.2). Po navážení standardu adrenalinu byly všechny roztoky naředěny do 250ml odměrných baněk vodou s pH upraveným přídavkem zředěné kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 5,24, pro přípravu roztoků uchovávaných pod argonem se rozpouštědlo před doplněním nechalo probublat 5 minut argonem a po každé manipulaci se standardními roztoky se roztoky nechaly procházet argonem. Všechny roztoky byly proměřovány na spektrofotometru při vlnových délkách 281, 286 a 304 nm ihned po přípravě (0 hodin), po 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48, 72 a 336 hodinách od přípravy roztoků.

Tab. 3.2: Způsoby uchování roztoků adrenalinu při spektrofotometrické studii jeho rozpadu.

roztok	způsob uchování roztoku
1	laboratorní teplota, na světle, s přístupem kyslíku
2	3 °C v lednici, ve tmě, s přístupem kyslíku
3	laboratorní teplota, na světle, uchováno pod argonem
4	3 °C v lednici, ve tmě, uchováno pod argonem

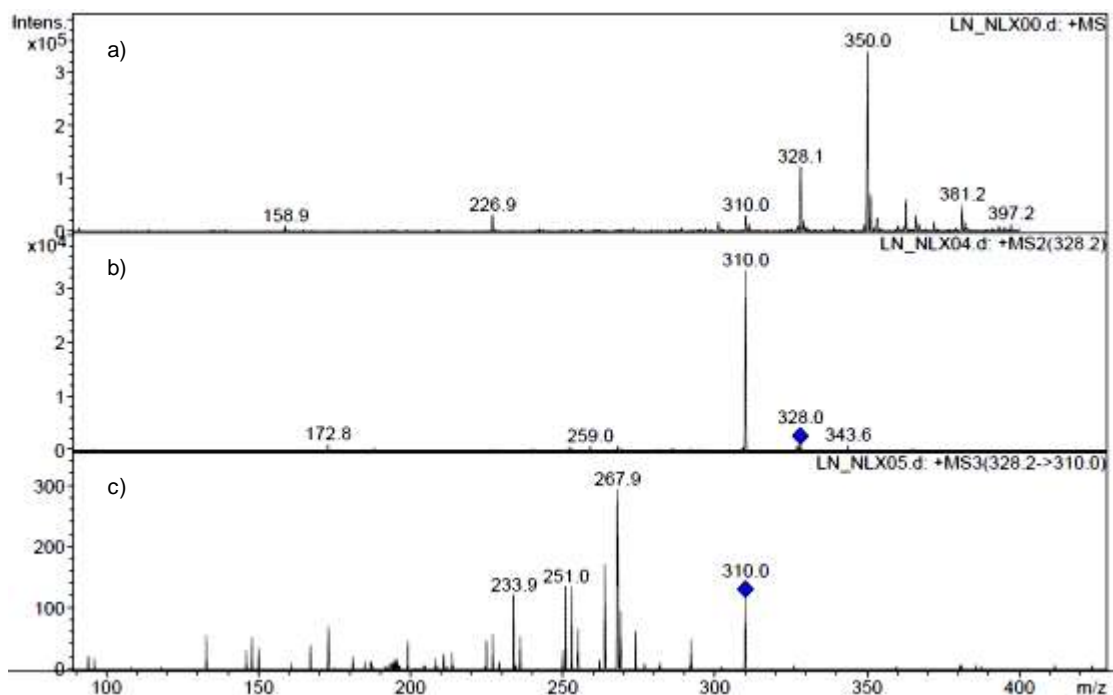
4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Analýza historického vzorku naloxon hydrochloridu metodou MS, HPLC/MS

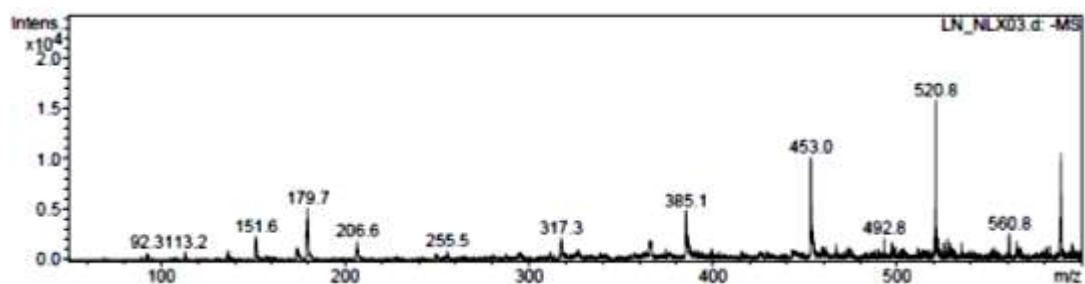
4.1.1 Hmotnostní spektra

Prvním krokem analýzy historického léčivého přípravku naloxonu byla analýza vzorku hmotnostními spektrometry s přímým vstupem roztoku vzorku.

Hledání případných degradačních produktů naloxonu v analyzovaném léčivém přípravku bylo zahájeno přímým nástřikem upraveného vzorku do hmotnostního spektrometru Bruker Esquire 3000 nastaveného na snímání pozitivního i negativního módu. Ve změřeném spektru byl v pozitivním módu majoritně zastoupen ion s m/z 350,0, který odpovídal aduktu naloxonu se sodíkem $[M + Na]^+$, dále ion s m/z 328,1, který odpovídal protonované molekule naloxonu $[M + H]^+$, ion m/z 310,0, který vznikl odštěpením molekuly vody a ion m/z 226,9 odpovídající postupnému odštěpení nejprve molekuly $-H_2C=CH_2$ a následně molekuly $-NH=CHCH_2CH_3$ z iontu m/z 310 (obr. 4.1 a). Nebyly patrné žádné rozpadové produkty naloxonu. Při měření v negativním módu byly patrné ionty m/z 151,6 a 179,7, které odpovídaly methylparabenu, resp. propylparabenu (obr. 4.2).

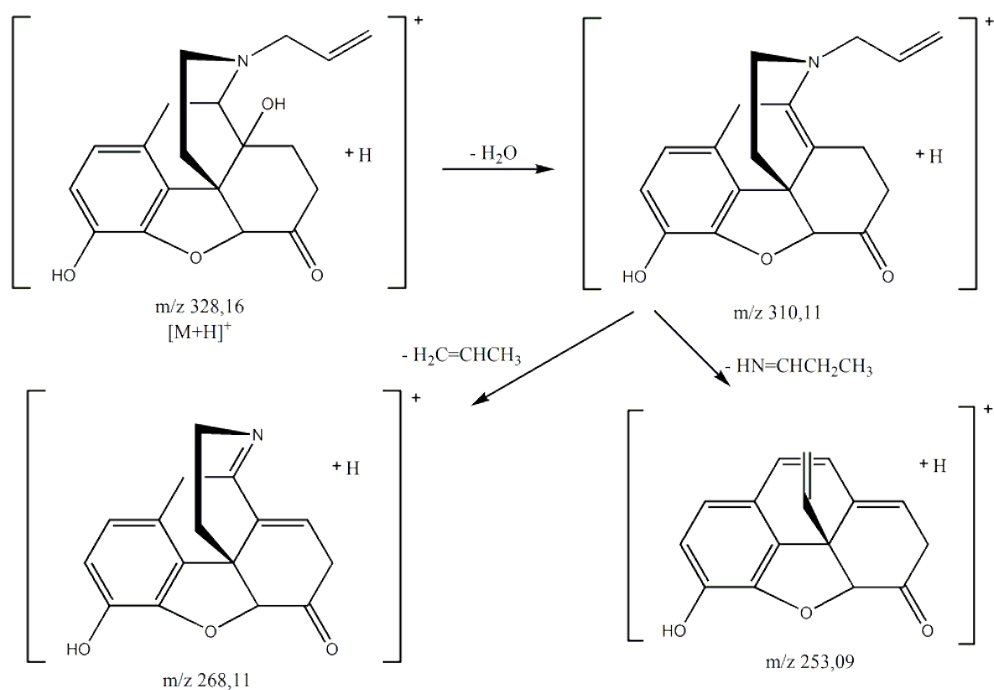


Obr. 4.1 : Hmotnostní spektra analyzovaného vzorku léčivého přípravku naloxonu v pozitivním módu (MS Bruker) z přímého vstupu: a) MS spektrum izolace prekurzorového iontu m/z 328, b) MS² spektrum z iontu m/z 328, c) MS³ spektrum vznikající z iontu m/z 310.



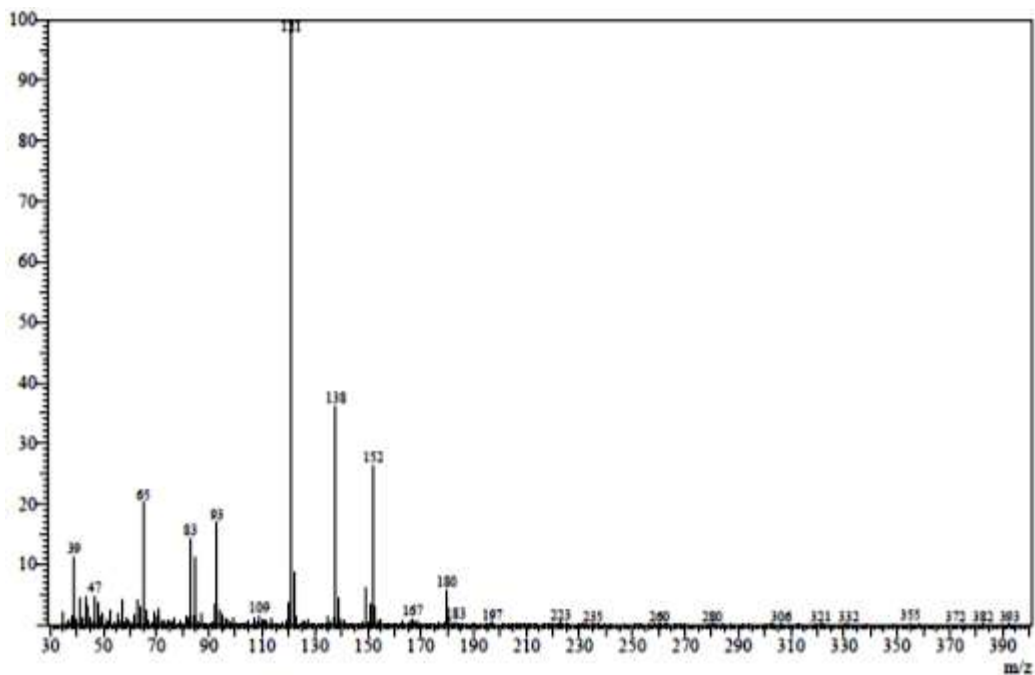
Obr. 4.2: MS spektrum analyzovaného vzorku léčivého přípravku naloxonu v negativním módu z přímého vstupu (MS Bruker).

Z prekurzorového iontu m/z 328,0 byla provedena fragmentace (obr. 4.1 b) a z takto vzniklého iontu m/z 310,0 byla provedena další fragmentace (obr. 4.1 c). Hlavním produktem rozpadu protonované molekuly naloxonu byl ion m/z 310,0, který vznikl, jak již bylo popsáno, odštěpením molekuly vody. Při fragmentaci iontu m/z 310,0 byl hlavním produktem rozpadu ion m/z 267,9, který podle literatury [75] pravděpodobně vznikl z iontu m/z 310,0 McLaffertyho přesmykem zahrnujícím ztrátu molekuly propylenu ($-\text{H}_2\text{C}=\text{CHCH}_3$) (obr. 4.3). Dalším zastoupeným iontem v degračním spektru byl ion m/z 253,0, který podle literatury [75] pravděpodobně vznikl odštěpením molekuly propyliminu ($-\text{HN}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$) z iontu m/z 310,0. Dalším přítomným iontem byl ion m/z 233,9, který zatím nebyl popsán, a jeho identifikace by byla nad rámec této práce.

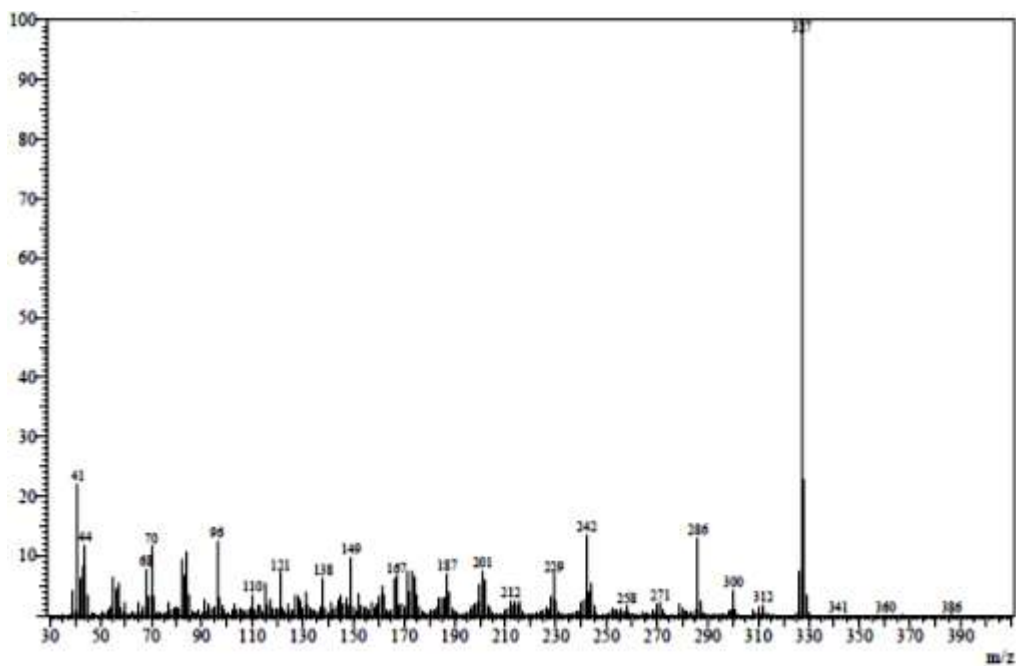


Obr. 4.3: Fragmentační cesta pro molekulární ion protonované molekuly naloxonu $[M+H]^+$, upraveno podle [75].

Dalším krokem analýzy byla analýza na MS Shimadzu GCMS-QP2010 s přímým vstupem vzorku. Byl nastaven teplotní gradient. Hmotnostní spektrum ze začátku gradientu, z 0,1 min analýzy (teplota 54 °C), obsahovalo ionty m/z 152 a 180, které odpovídají methylparabenu, resp. propylparabenu (obr. 4.4), zatímco hmotnostní spektrum vzorku při teplotě vstupu 227 °C již obsahovalo hlavně ion m/z 327, který odpovídá naloxonu (obr. 4.5).



Obr. 4.4.: MS spektrum analyzovaného léčivého přípravku naloxonu na MS Shimadzu při teplotě dávkovacího vstupu 54 °C.

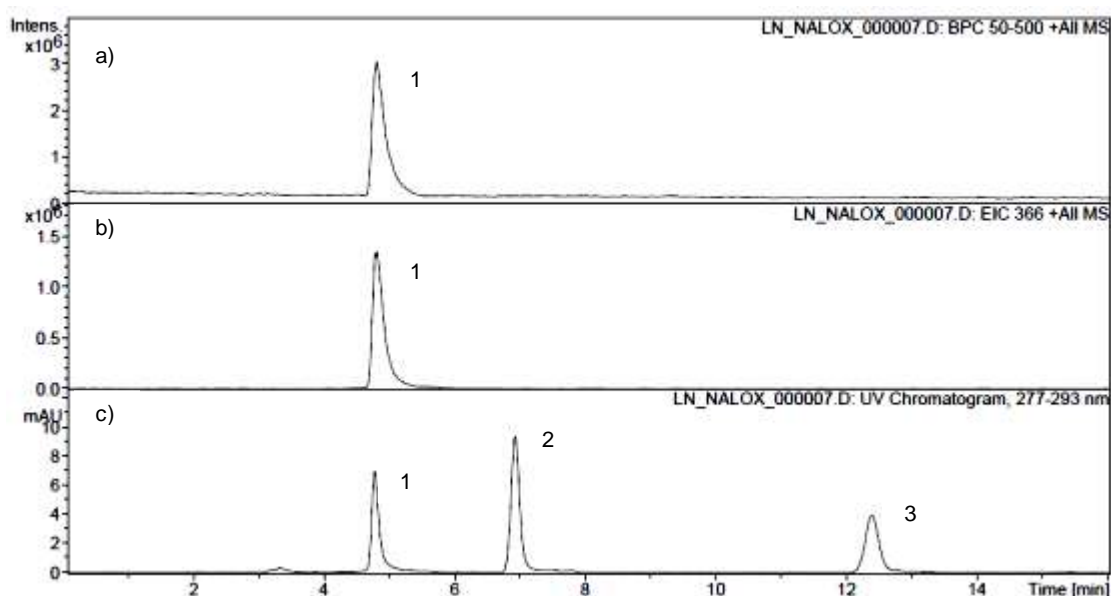


Obr. 4.5.: MS spektrum analyzovaného léčivého přípravku naloxonu na MS Shimadzu při teplotě dávkovacího vstupu 227 °C.

Nalezená spektra byla porovnána s knihovnou spekter (EI) NIST Mass Spectral Library. Při hledání shody spektra naloxonu s knihovnou byla nalezena shoda 82 %, pro spektrum propylparabenu byla shoda s knihovnou také 82 %.

4.1.2 HPLC-MS

Při analýze HPLC-MS (MS Bruker), byl upravený roztok vzorku použit k nástřiku při optimalizovaných podmínkách. Naměřené hmotnostní spektrum obsahovalo pouze jeden pík (obr. 4.6 a), který byl následnými postupy identifikován jako pík naloxonu obsahující ionty m/z 328,1 odpovídající protonované molekule naloxonu $[M + H]^+$ a ion m/z 366,0 jakožto adukt s draslíkem $[M + K]^+$ a spektrum jeho izolované hmoty (EIC 366) je na obr. 4.6 b). Parabeny (methylparaben a propylparaben) v hmotnostním spektru vůbec vidět nebyly, nejspíš nebyly při zvolených podmínkách ionizovány. Byly však jasně viditelné ve dvou oddělených píkách v UV chromatogramu z DAD detektoru (obr. 4.6 c). Ani při této analýze nebyly patrné žádné rozpadové produkty naloxonu.



Obr. 4.6: HPLC-MS chromatogram analýzy vzorku léčivého přípravku naloxonu na koloně Watrex RP C18 (250x4,0 mm, 5 μ m), izokratická eluce mobilní fází složenou 50:50 (v/v) acetonitrilu a mravenčanového pufru o pH=3,5, průtok mobilní fáze 0,5 ml min^{-1} , objem nástřiku vzorku 10 μ l, MS Bruker: a) TIC chromatogram, b) EIC chromatogram pro zvolený ion m/z 366, c) UV chromatogram z DAD detektoru; (1) naloxon, (2) methylparaben, (3) propylparaben.

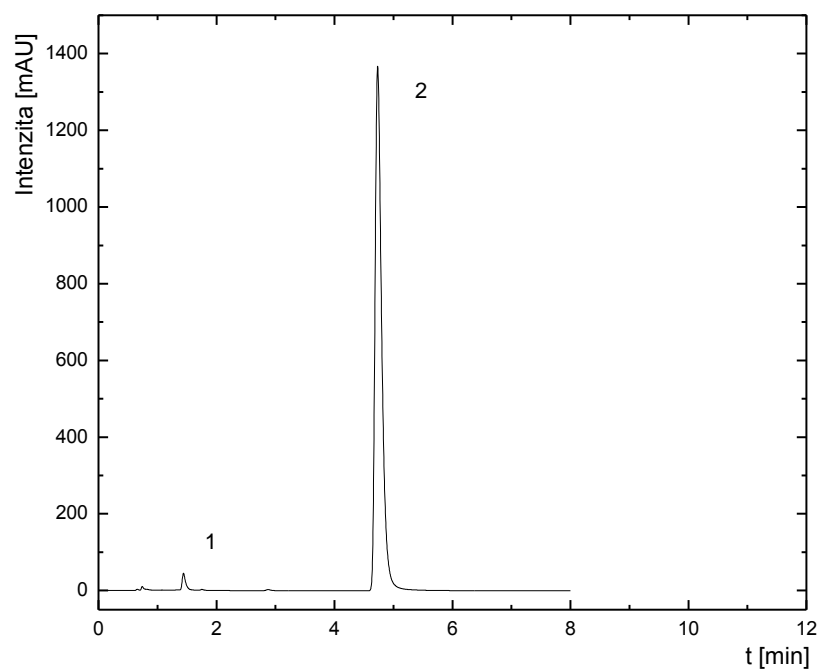
Standard naloxonu nebyl k dispozici, nebylo možné provést kvantifikaci této látky v historickém vzorku. Bylo tedy změřeno UV spektrum vzorku, porovnáno s literaturou [17] a vyvozeno, že UV spektrum vzorku odpovídá UV spektru pro naloxon uvedenému v literatuře. Z nepřítomnosti degradačních produktů a shodnosti UV spektra vzorku lze vyvodit závěr, že historický léčivý přípravek naloxon hydrochloridu obsahoval mimo deklarované parabeny čistý naloxon, který nedegradoval ani po asi 35 letech skladování.

4.2 Analýza historického vzorku adrenalinu

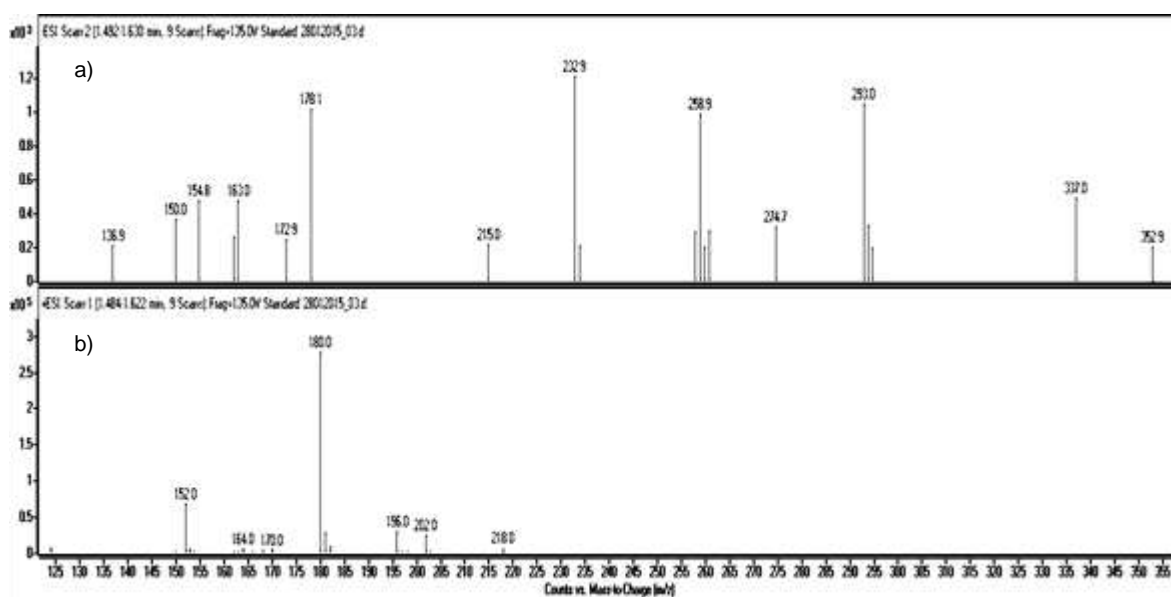
4.2.1 UHPLC-MS analýza

Hledání případných degradačních produktů adrenalinu bylo zahájeno analýzou roztoku standardu adrenalinu rozpuštěného v 85% acetonitrilu okyseleného pár kapkami mravenčí kyseliny o koncentraci $0,38 \text{ mg ml}^{-1}$. Optimalizace podmínek probíhala v průběhu dvou týdnů a během této doby byl používán stále stejný roztok standardu. Souběžně byl připraven roztok standardu rozpuštěného v 50% acetonitrilu okyseleného mravenčí kyselinou pro počáteční podmínky měření. Po dvou týdnech uchování těchto dvou roztoků v průhledných vialkách na světle při laboratorní teplotě byl patrný rozdíl v zabarvení roztoků. Roztok standardu rozpuštěný v 50% acetonitrilu byl bezbarvý, zatímco druhý roztok (rozpuštědlo 85% acetonitril) byl zabarven do lehce nahnědlého odstínu, dá se tedy vyvodit, že při vyšším obsahu organické složky rozpouštědla se adrenalin rychleji degraduje.

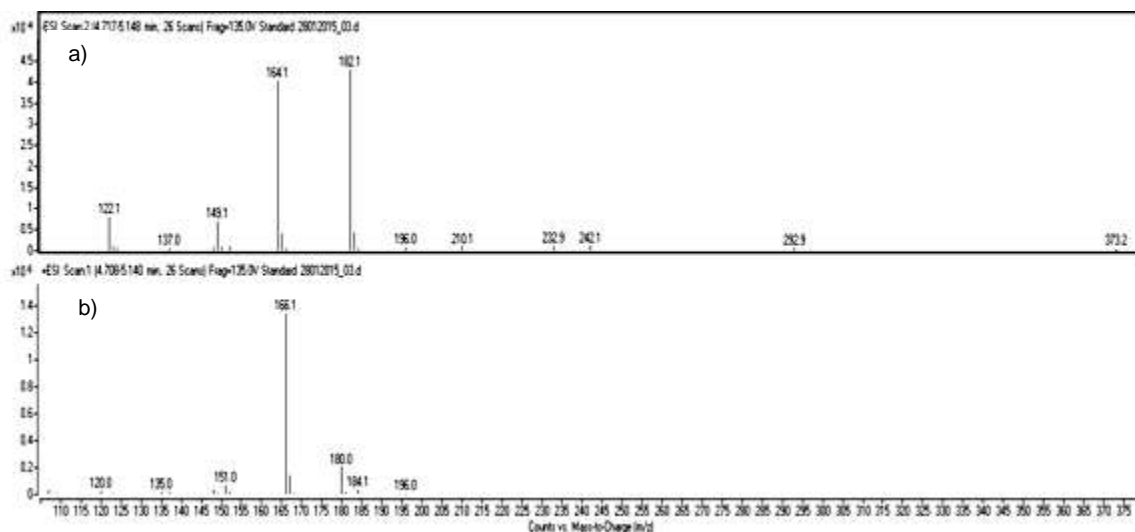
V naměřeném UV chromatogramu z DAD detektoru byly přítomné dva píky (obr. 4.7). První pík s retenčním časem asi 1,5 minuty obsahoval ion m/z 180,0, který se v průběhu dvou týdnů optimalizace zvětšoval (rostlo relativní zastoupení plochy píku vzhledem k ploše píku adrenalinu), tudíž se zřejmě jednalo o degradační produkt adrenalinu (obr. 4.8). Podle literatury [39] se pravděpodobně jedná o adrenochrom (sloučenina 2 z obr. 2.7), která je méně polární než adrenalin a tudíž z kolony vychází dříve než více polární adrenalin. Druhý pík vycházející v retenčním čase asi 4,7 min obsahoval ion m/z 166,1, který odpovídá molekule adrenalinu s odštěpenou molekulou vody $[M + H - H_2O]^+$ (obr. 4.9). Po dvou týdnech byly ve spektru patrné také dva různé píky s hmotou m/z 178,0, které budou pravděpodobně také degradačními produkty. Podle literatury [39] se nejspíš může jednat o sloučeniny 1-methyl-1*H*-Indol-3,5,6(2*H*)-trion (CASN: [551-10-0], sloučenina 3 z obr. 2.7) a 3-hydroxy-1-methyl-1*H*-indol-5,6-dion (CASN: [50976-70-0], sloučenina 4 z obr. 2.7), které odpovídají hmotou a díky rozdílům ve struktuře, tedy i v polaritě, opouští kolonu každý v jiném retenčním čase.



Obr. 4.7: Naměřený UV chromatogram z DAD detektoru z analýzy standardu adrenalinu o koncentraci $0,38 \text{ mg ml}^{-1}$ na koloně ACQUITY UPLC® BEH A mide $1,7 \mu\text{m}$ ($2,1 \times 100 \text{ mm}$), izokratická eluce mobilní fází složenou 90:10 (v/v) acetonitrilu a 60mM mravenčanového pufru o $\text{pH}=3,0$, průtok mobilní fáze $0,350 \text{ ml min}^{-1}$, objem nástřiku vzorku $2 \mu\text{l}$; (1) degradační produkt adrenochrom, (2) adrenalin.

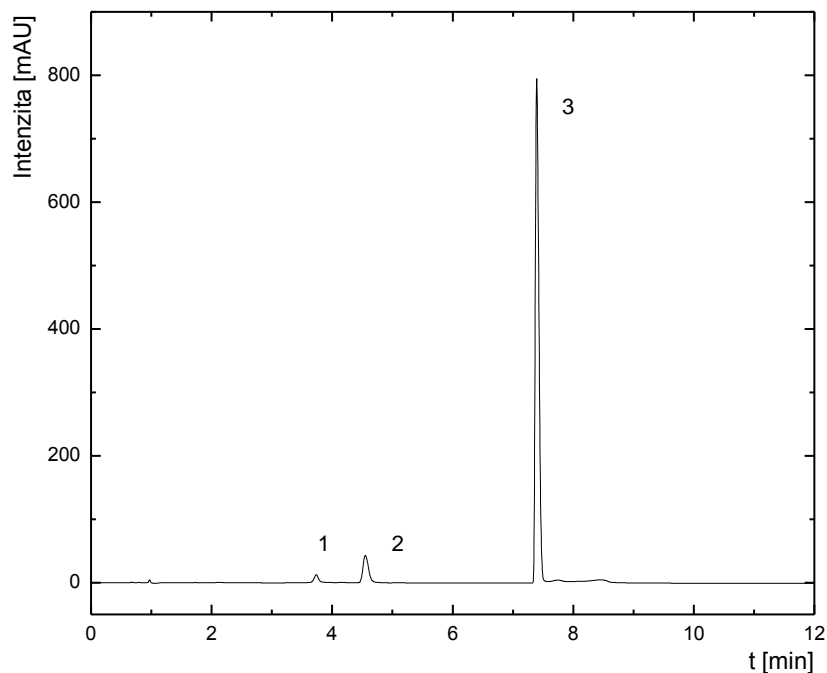


Obr. 4.8: MS spektrum 1. píku z UV chromatogramu DAD detektoru z analýzy standardu adrenalinu v negativním (a) a pozitivním módu (b).

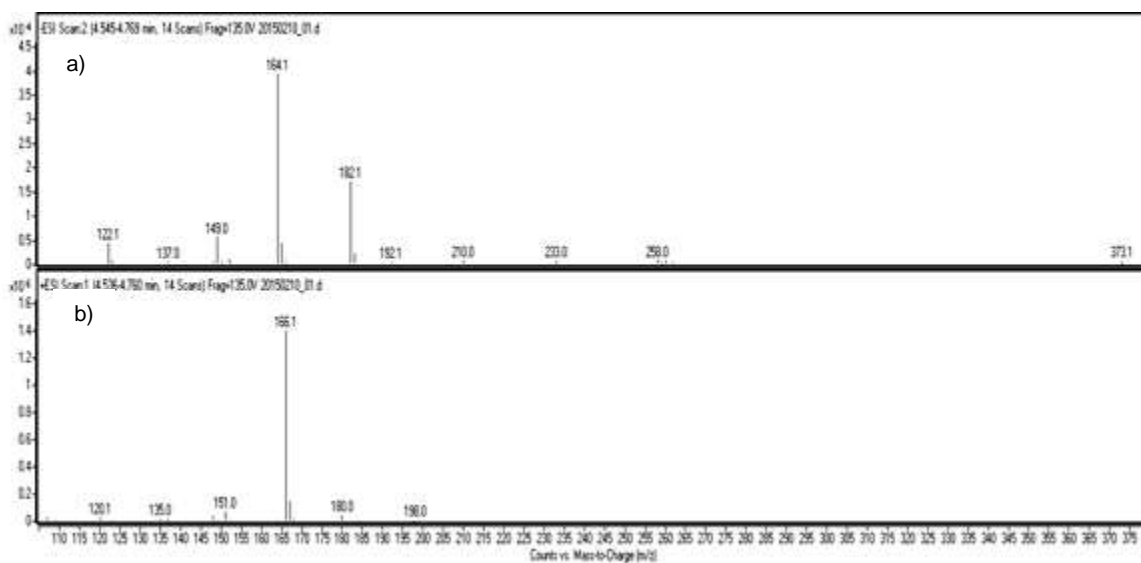


Obr. 4.9: MS spektrum 2. píku z UV chromatogramu DAD detektoru z analýzy standardu adrenalinu v negativním (a) a pozitivním (b) módu.

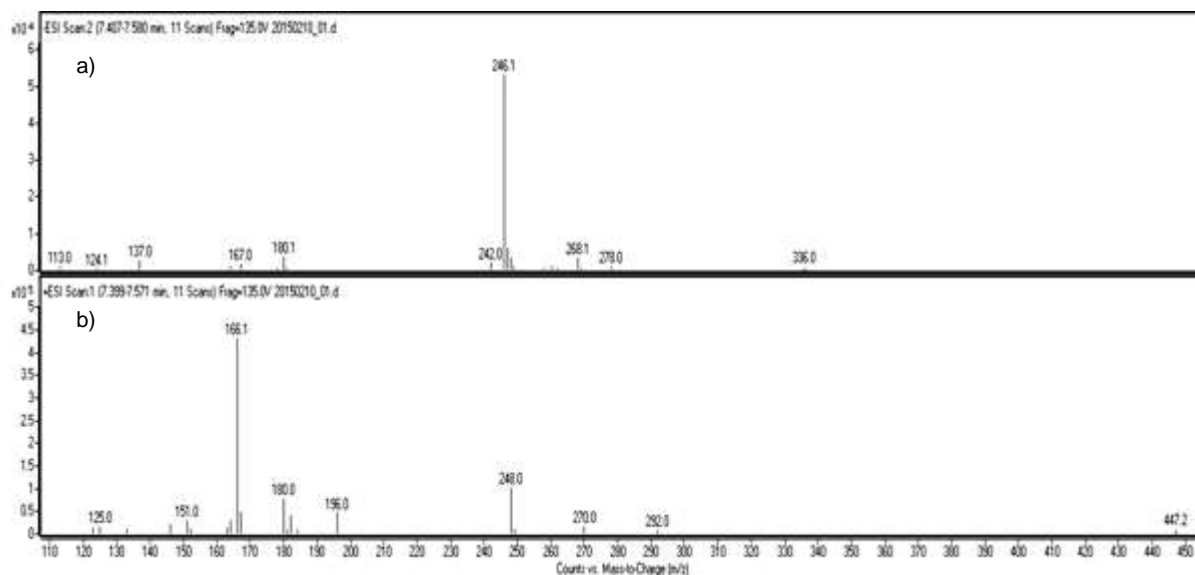
Po optimalizaci podmínek měření byl analyzován již čistý neředěný roztok vzorku. Ve změřeném spektru z DAD detektoru byly zřetelně viditelné tři píky (obr. 4.10). Pík odpovídající adrenalinu eluoval z kolony v obdobném čase (mezi 4. a 5. minutou) a obsahoval stejné hmoty v hmotnostním spektru (obr. 4.11) jako pík adrenalinu ze standardního roztoku. Ostatní píky, včetně nejvíce zastoupeného píku elujícího mezi 7. a 8. minutou, obsahovaly hmoty látek, které neodpovídají žádnému píku nebo iontům v hmotnostním spektru standardního roztoku adrenalinu. Hmotnostní spektrum majoritního 3. píku je znázorněno na obr. 4.12. Degradční produkty z obr. 2.7, které se vyskytovaly ve spektrech standardu adrenalinu, nebyly v historickém vzorku přítomné. Po delší době skladování zřejmě reagují původní degradační produkty na zcela jiné látky, které však zatím v literatuře popsány nebyly a jejich identifikace by byla nad rámec této práce.



Obr. 4.10: Naměřený UV chromatogram z DAD detektoru z analýzy vzorku historického léčivého přípravku adrenalinu na koloně ACQUITY UPLC® BEH A mide 1,7 μm (2,1x100 mm), izokratická eluce mobilní fází složenou 90:10 (v/v) acetonitrilu a 60mM mravenčanového pufru o pH=3,0, průtok mobilní fáze 0,350 ml min^{-1} , objem nástřiku vzorku 2 μl ; (1) degradační produkt, (2) adrenalin, (3) degradační produkt.



Obr. 4.11: MS spektrum v vzorku adrenalinu z píky č. 2 z obr. 4.10 odpovídajícímu adrenalinu v negativním (a) a pozitivním (b) módu.

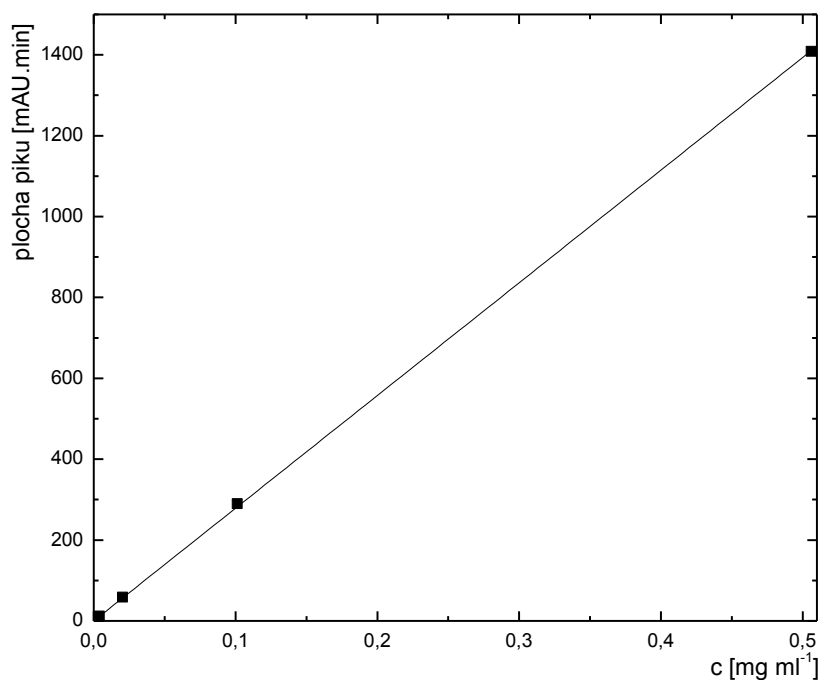


Obr. 4.12: MS spektrum v zorku adrenalinu z píku č. 3 z obr. 4.10 odpovídajícímu neznámému degradačnímu produktu v negativním (a) a pozitivním (b) módu.

4.2.2 Kvantifikace adrenalinu ve vzorku

Kvantifikace adrenalinu v historickém léčivém přípravku bylo provedeno metodou kalibrační přímky. Průměrná plocha píku odpovídající nezměněnému adrenalinu ve vzorku byla 149,78 mAU.min. Z kalibrační závislosti adrenalinu (obr. 4.13) bylo vypočteno množství adrenalinu ve vzorku $0,0526 \text{ mg ml}^{-1}$, což odpovídá $5,26 \pm 0,11 \%$ deklarované hodnoty.

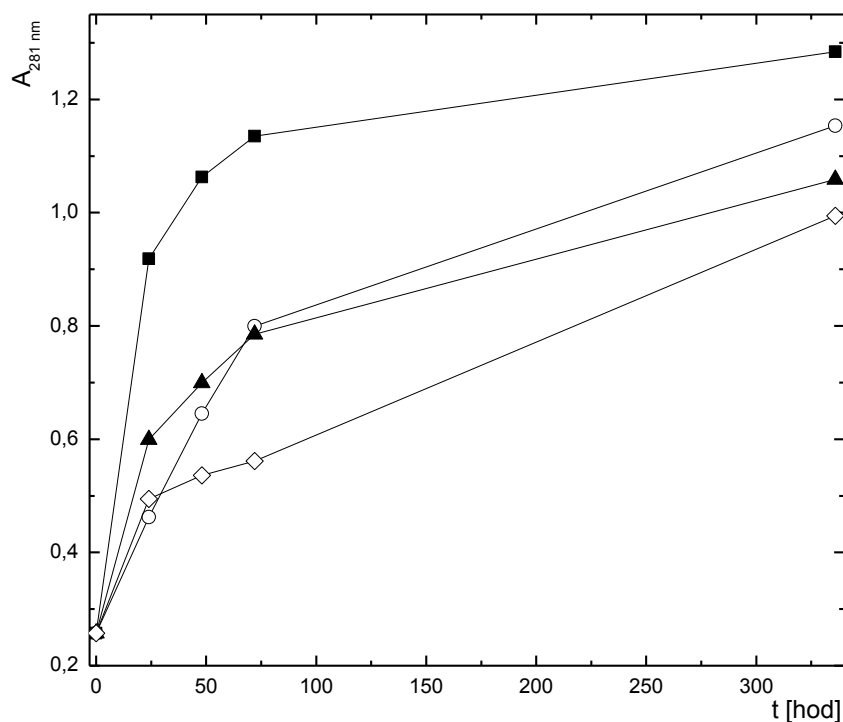
Vzhledem k nízké koncentraci adrenalinu ve vzorku oproti deklarované hodnotě a nalezeným degradačním produktům z UHPLC-MS analýzy lze vyvodit závěr, že historický léčivý přípravek adrenalinu je nestabilní a za cca 90 let skladování je většina účinné látky degradována.



Obr. 4.13: Kalibrační přímka pro stanovení adrenalinu v jeho historické lékové formě (rovnice kalibrační přímky: A [mAU.min] = $2778,7 c$ [mg ml^{-1}] + 3,6, $r = 1,0000$).

4.2.3 Spektrofotometrické sledování rozpadu adrenalinu (stabilitní test)

Stabilita, respektive degradace standardu adrenalinu při různých skladovacích podmínkách byla sledována spektrofotometricky. Očekávalo se, že absorbance roztoků bude s časem klesat, avšak absorbance naopak rostla, což bylo pravděpodobně způsobeno větším molárním absorpčním koeficientem degradačních produktů při daných spektrofotometrických podmínkách, než molární absorpční koeficient adrenalinu. Byl však zcela zjevný trend ve změně absorbance jak s časem, tak pro jednotlivé roztoky (obr. 4.14).



Obr. 4.14: Závislost absorbance při vlnové délce 281 nm na čase pro koncentraci roztoků standardu adrenalinu $2 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (roztoky standardu viz tab. 3.2); ■ - roztok 1, ○ - roztok 2, ▲ - roztok 3, ◇ - roztok 4.

Roztok 1, který byl ponechán na světle v laboratoři při laboratorní teplotě a s přístupem kyslíku, vykazoval daleko větší absorbanci (vyšší degradaci) již po několika hodinách od přípravy roztoku a po celou dobu experimentu. Také již po dvou hodinách od přípravy roztoku bylo zcela patrné růžové zabarvení, které bylo pravděpodobně způsobeno oxidací adrenalinu, čímž vznikl oxidační produkt adrenochrom (obr. 2.7), který je podle literatury [76] červený. Po 24 hodinách byl roztok již červený a postupem experimentu se tato barva prohlubovala a tmavla až do červeno-hnědého zabarvení.

Na roztok 2 působil také kyslík, avšak byl skladován ve tmě při teplotě $3 \text{ }^\circ\text{C}$, což se projevilo menší degradací adrenalinu (menším nárůstem absorbance) oproti roztoku 1. Stejně jako u roztoku 1 se roztok 2 zbarvil nejprve do růžova (po cca 24 hodinách dosáhl přibližně stejného zabarvení jako 1. roztok po dvou hodinách) a následně do červena a ke konci experimentu bylo zabarvení vizuálně stejné jako u prvního roztoku.

Roztok 3 měl podmínky stejné jako roztok 1 až na to, že tento roztok byl chráněn před kyslíkem pomocí argonu. Argonem byl vytěsněn kyslík jak z rozpouštědla, tak z roztoku během měření tak, aby byl argon stále nad hladinou roztoku a nemohl k němu kyslík. Takto se tedy nemohl projevit vliv kyslíku, ale jen vliv světla a laboratorní teploty. U tohoto roztoku je z obr. 4.14 jasně patrný mírnější vzrůst absorbance než

u předchozích roztoků, tedy pomalejší degradace adrenalinu. První zjevné zbarvení roztoku se projevilo až po 48 hodinách od přípravy roztoku, avšak nebylo to zbarvení růžové, nýbrž slabě žluto-oranžové. Na konci experimentu bylo zbarvení oranžovo-nahnědlé, viditelně však odlišné od zbarvení prvních dvou roztoků, pravděpodobně tedy docházelo k tvorbě jiných degradačních produktů, které vznikly jinak než oxidací adrenalinu.

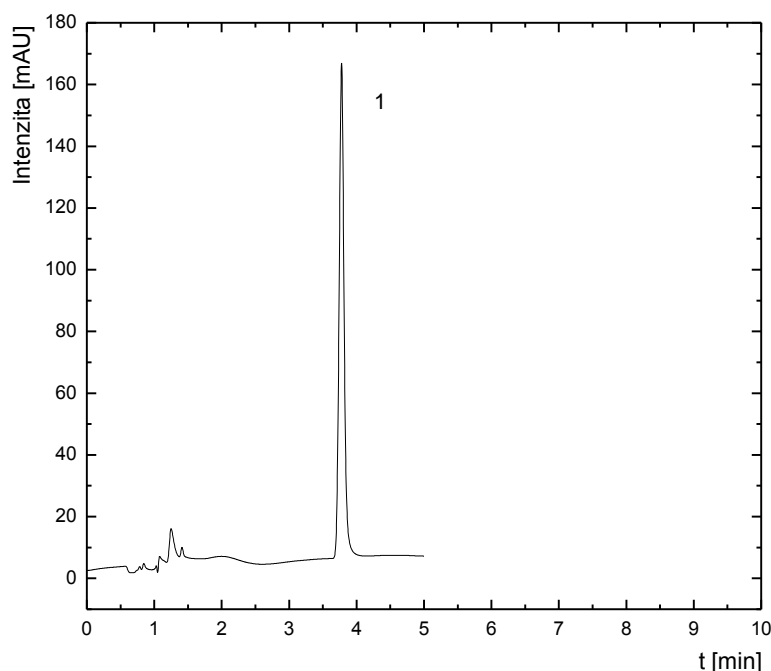
Roztok 4 byl chráněn jak před kyslíkem pomocí argonu, tak před světlem v chladničce při teplotě 3 °C, na degradaci tedy teoreticky neměl vliv kyslík, světlo ani teplota. To se také projevilo na nejnižším nárůstu absorbance, tedy nejnižší degradaci adrenalinu ze všech zkoumaných roztoků. Roztok nebyl zbarven ani po 72 hodinách od přípravy, další kontrola roztoku proběhla až po 240 hodinách a to byl již zbarven podobně jako roztok 3, tedy žluto-oranžově, na konci experimentu také světle oranžovo-nahnědlé zbarvení.

Na obr. 4.14 je vidět, že roztoky, které si byly podobné, mají podobné trendy v nárůstu absorbance. Roztoky 1 a 3, které byly pod vlivem světla a při laboratorní teplotě, vykazovaly po 72 hodinách pozvolnější nárůst absorbance, zatímco roztoky 2 a 4 po 72 hodinách od přípravy měly oproti zbylým roztokům větší nárůst absorbance. Zároveň roztoky 1 a 2, které byly oba pod vlivem kyslíku, vykazují z počátku měření strmější nárůst absorbance oproti roztokům 3 a 4, na které kyslík nepůsobil. Ze všech předchozích poznatků lze vyvodit závěr, že kyslík má na degradaci adrenalinu majoritní vliv. Také teplota a působení světla má na degradaci adrenalinu vliv, ne však tak veliký, jako vliv kyslíku. Dalším parametrem hrajícím roli při degradaci adrenalinu je čas. I přes zamezení přístupu kyslíku, světla a nízké skladovací teplotě k degradaci docházelo.

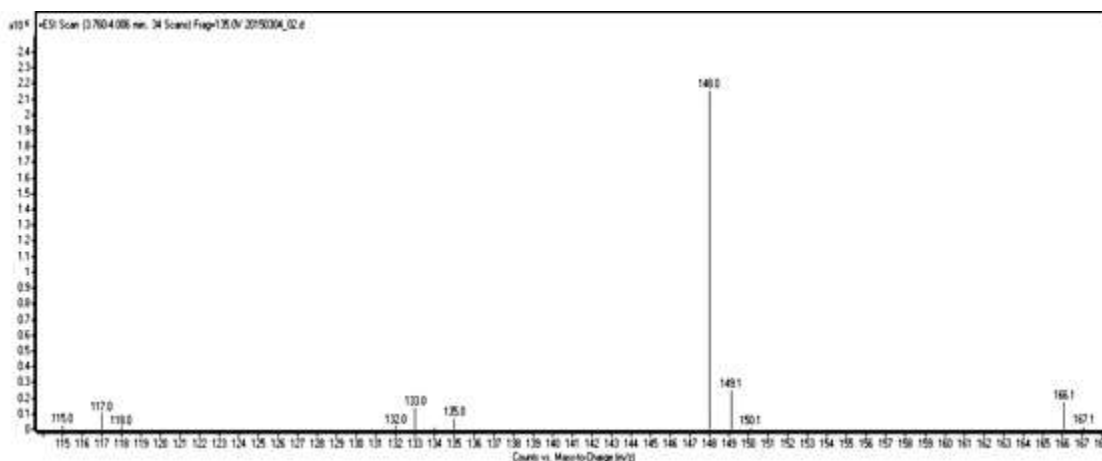
4.3 Analýza historického vzorku efedrinu

4.3.1 UHPLC-MS analýza

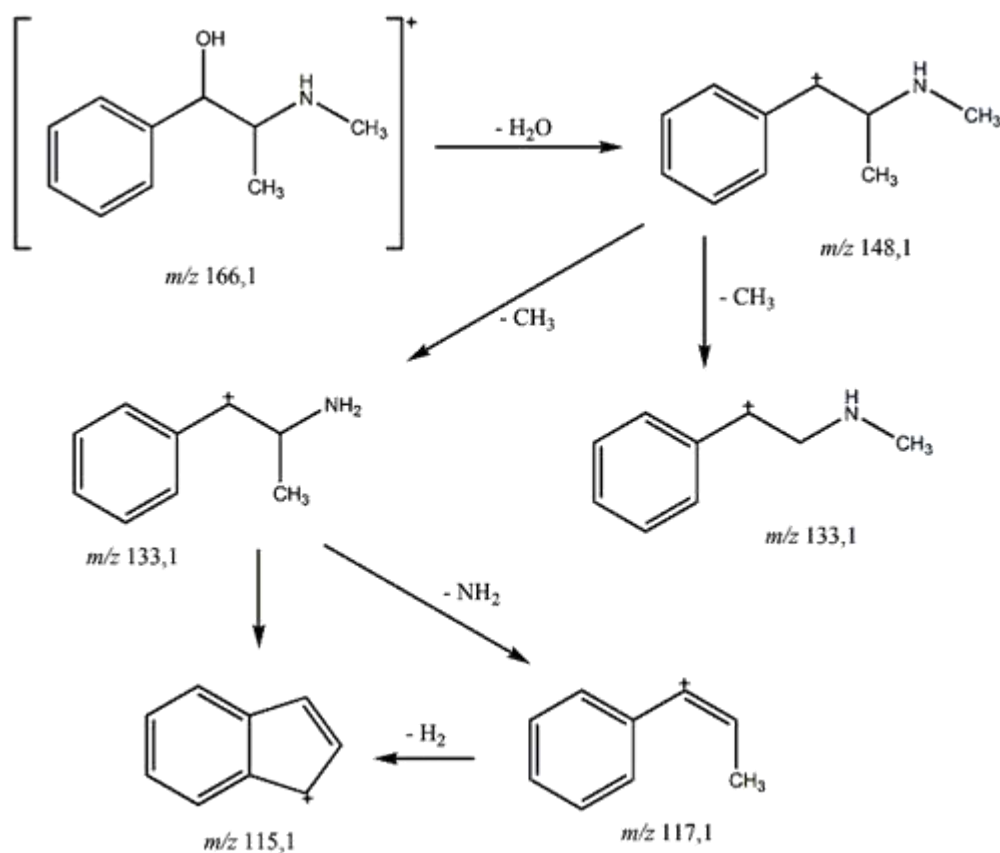
Hledání případných degradačních produktů efedrinu bylo zahájeno analýzou roztoku standardu efedrinu o koncentraci $0,132 \text{ mg ml}^{-1}$ rozpuštěného v 80% acetonitrilu. V naměřeném UV chromatogramu z DAD detektoru byl přítomný majoritně zastoupený pík eluující z kolony v retenčním čase kolem 3,7 minuty a změť píků eluující mezi 1 a 1,5 minutou (obr. 4.15). Tato změť byla po porovnání se spektrem slepého pokusu přiřazena nečistotám z rozpouštědla, jelikož tyto píky byly obsaženy i ve slepém pokusu. Hlavní pík obsahoval v hmotnostním spektru ionty shodné s literaturou pro efedrin, iont s m/z 166,1, který odpovídá protonované molekule efedrinu $[M + H]^+$ ($C_{10}H_{16}NO$), majoritně zastoupený pík iontu m/z 148,0, který podle literatury [67] odpovídá molekule efedrinu s odštěpenou molekulou vody $[M + H - H_2O]^+$ ($C_{10}H_{14}N$), dále hmoty s m/z 133,0 odpovídající odštěpení CH_3 skupiny z iontu m/z 148,0 ($C_9H_{11}N$), m/z 117,0 odpovídající odštěpení NH_2 skupiny z iontu 133,0 a hmota s m/z 115,0, která podle literatury vznikla odštěpením H_2 z iontu m/z 117,0 (obr. 4.16). Schéma vzniku jednotlivých fragmentových iontů efedrinu je znázorněno na obr. 4.17.



Obr. 4.15: Naměřený UV chromatogram z DAD detektoru z analýzy standardu efedrinu o koncentraci $0,132 \text{ mg ml}^{-1}$ na koloně ACQUITY UPLC® BEH A mide $1,7 \mu\text{m}$ ($2,1 \times 100 \text{ mm}$), izokratická eluce mobilní fází složenou 93:7 (v/v) acetonitrilu a 20mM mravenčanového pufru o $\text{pH}=3,0$, průtok mobilní fáze $0,300 \text{ ml min}^{-1}$, objem nástřiku v zorku $1 \mu\text{l}$; (1) efedrin.



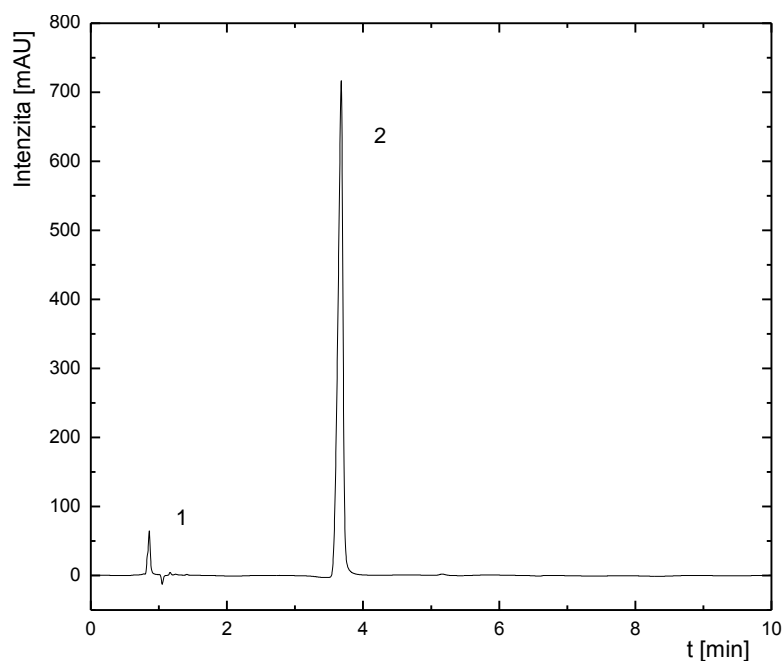
Obr. 4.16: MS spektrum píku odpovídajícímu efedrinu z analýzy standardu efedrinu.



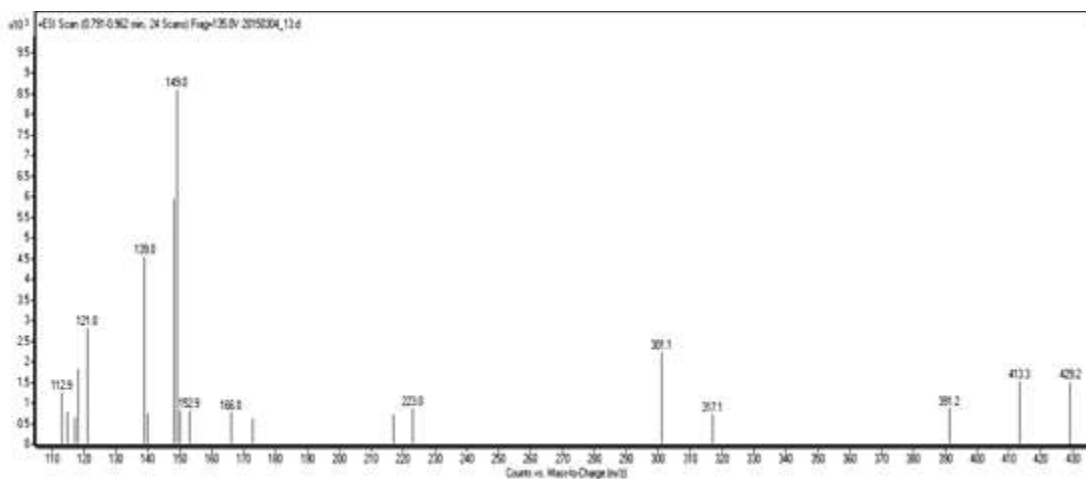
Obr. 4.17: Fragmentační cesta pro molekulární ion protonované molekuly efedrinu $[M + H]^+$, upraveno podle [77].

Následně byl analyzován stokrát naředěný roztok vzorku historického léčivého přípravku efedrinu. V naměřeném hmotnostním spektru byly zřetelně viditelné dva píky (obr. 4.18). První pík, který eluoval z kolony před 1. minutou (v okolí změní píků z rozpouštědla, které však samotný pík neobsahovalo) obsahoval hlavně hmotu s m/z 149,0, nejednalo se však o degradační produkt efedrinu, ale spíše o flaláty, pro něž

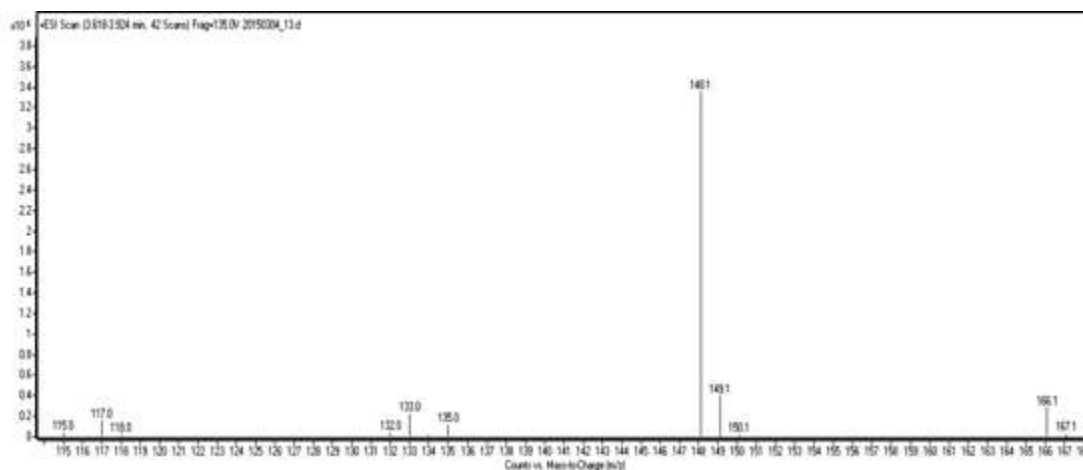
je hmota 149 typická (obr. 4.19). Druhý pík s retenčním časem asi 3,7 minuty odpovídal efedrinu (v porovnání se standardem) jak retenčním časem, tak hmotnostním spektrem, které obsahovalo úplně stejné hmoty jako hmotnostní spektrum standardu efedrinu, tedy hmoty s m/z 166,1, 148,1, 133,0, 117,0 a 115,0 (obr. 4.20). Žádné degradační produkty ve spektrech patrné nebyly.



Obr. 4.18: Naměřený UV chromatogram z DAD detektoru z analýzy historického léčivého přípravku efedrinu na koloně ACQUITY UPLC® BEH Amide 1,7 μm (2,1x100 mm), izokratická eluce mobilní fází složenou 93:7 (v/v) acetonitrilu a 20mM mravenčanového pufru o pH=3,0, průtok mobilní fáze 0,300 ml min^{-1} , objem nástřiku vzorku 1 μl ; (1) fitaláty, (2) efedrin.



Obr. 4.19: Hmotnostní spektrum 1. píku z UV chromatogramu DAD detektoru z obr. 4.17 z analýzy historického léčivého přípravku efedrinu.

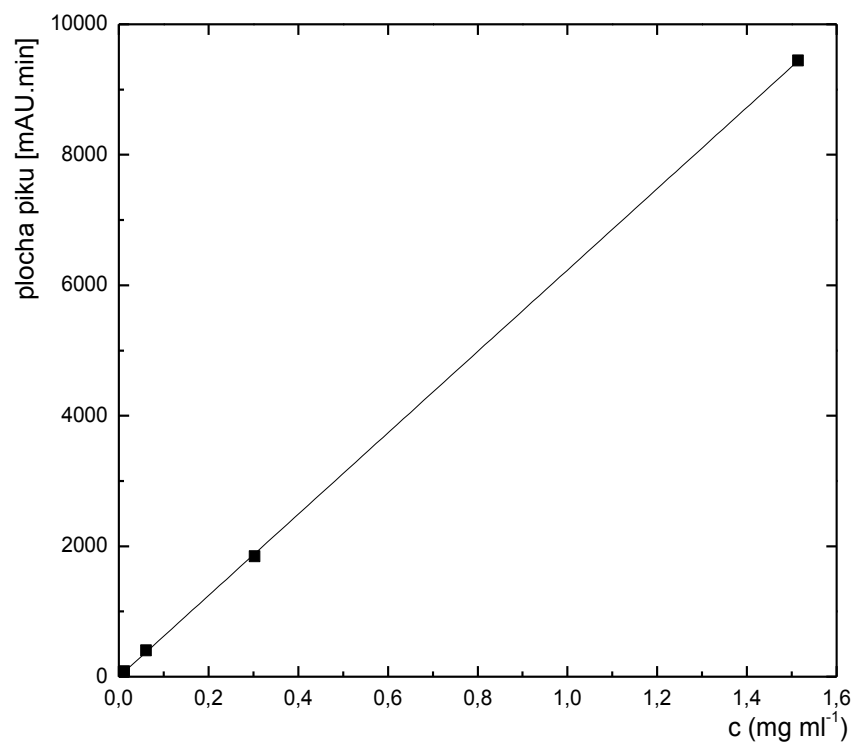


Obr. 4.20: Hmotnostní spektrum 2. píku z UV chromatogramu DAD detektoru z obr. 4.17 z analýzy historického léčivého přípravku efedrinu odpovídajícímu efedrinu.

4.3.2 Kvantifikace efedrinu ve vzorku

Kvantifikace efedrinu v historickém léčivém přípravku byla provedena metodou kalibrační přímky. Průměrná plocha píku odpovídající efedrinu ve stokrát naředěném vzorku byla 3351,56 mAU.min. Z kalibrační závislosti efedrinu (obr. 4.21) bylo vypočteno množství efedrinu ve stokrát naředěném vzorku $0,5379 \text{ mg ml}^{-1}$, v původním neředěném vzorku byl jeho obsah tedy $0,05379 \text{ g ml}^{-1}$, což odpovídá $107,58 \pm 0,39 \%$ deklarované hodnoty. Přestože se injekční roztoky používaly již od 19. století, dostaly se požadavky na jejich kontrolu do textu lékopisů poměrně pozdě [78]. Prvním lékopisem platným na našem území, který injekční roztoky zmiňuje, je až druhé vydání Československého lékopisu z roku 1954 (platný od 1. ledna 1955). Teprve od třetího vydání Československého lékopisu z roku 1970 je na obsah injekčních roztoků uplatněn požadavek v rozsahu 95–105 % deklarované hodnoty.

Vzhledem k tomu, že hmotnostní spektrometrií ani UHPLC-MS analýzou nebyly nalezeny žádné degradační produkty efedrinu a jeho koncentrace ve vzorku odpovídala deklarované hodnotě, lze vyvodit závěr, že historický léčivý přípravek efedrinu byl stabilní i po téměř sedmdesáti letech.



Obr. 4.21: Kalibrační přímka pro stanovení efedrinu v jeho historické léčivé formě (rovnice kalibrační přímky: A [mAU.min] = $6235,2 c$ [mg ml⁻¹] - 2,6, $r = 0,9999$).

5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na analýzu historických vzorků injekčních roztoků naloxonu, adrenalinu a efedrinu. Cílem bylo zjistit přítomnost či nepřítomnost původních léčivých látek a případných degradačních produktů, kvantifikovat nalezené látky, případně provést doplňující zkoušky.

Na hmotnostním spektrometru nebyly nalezeny žádné rozpadové produkty naloxonu. Naměřené hmotnostní i UV chromatogramy vzorku odpovídaly naloxonu, z těchto poznatků byl vyvozen závěr, že historický léčivý přípravek naloxonu byl stabilní i po 35 letech skladování.

Analýzou pomocí UHPLC-MS vzorku adrenalinu byly nalezeny degradační produkty, které však zatím nebyly v literatuře popsány a jejich identifikace byla nad rámec této diplomové práce. Nezměněný adrenalin ve vzorku byl kvantifikován metodou kalibrační přímky a jeho obsah byl $5,26 \pm 0,11$ % deklarované hodnoty. Analyzovaný historický léčivý přípravek adrenalinu byl nestabilní a v průběhu asi devadesáti let byl téměř kompletně degradován. Dále byl se čtyřmi různě skladovanými roztoky standardu adrenalinu proveden stabilitní test, který prokázal vliv kyslíku, světla, teploty i času na degradaci adrenalinu.

Při UHPLC-MS analýze vzorku efedrinu nebyly nalezeny žádné degradační produkty. Efedrin ve vzorku byl kvantifikován metodou kalibrační přímky a jeho obsah byl stanoven $107,58 \pm 0,39$ % deklarované hodnoty. Analyzovaný historický léčivý přípravek efedrinu byl tedy stabilní i po téměř sedmdesáti letech skladování.

Literatura

- [1] Vetchý, D.; Frýbortová, K.; Rabišková, M.; Häring, A.: Testování stability léčivých přípravků. *Chemické Listy* **100**, 24–29 (2006).
- [2] Bajaj, S.; Singla, D.; Sakhuja, N.: Stability testing of pharmaceutical products. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **2**, 129–138 (2012).
- [3] Yoshioka, S.; Stella, V.J.: *Stability of Drugs and Dosage Forms*. New York, Kluwer 2002.
- [4] Smith, R.J.; Webb, M.L.: *Analysis of Drug Impurities*. Blackwell 2007.
- [5] Tønnesen, H.H.: *Photostability of Drugs and Drug Formulations*. 2nd ed. Boca Raton, CRC Press 2004.
- [6] Guo, J.-H.: Aging processes in pharmaceutical polymers. *Pharmaceutical Science & Technology Today* **2**, 478–483 (1999).
- [7] Petereit, H.-U.; Weisbrod, W.: Formulation and process considerations affecting the stability of solid dosage forms formulated with methacrylate copolymers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **47**, 15–25 (1999).
- [8] Stark, G.; Fawcett, J.P.; Tucker, I.G.; Weatherall, I.L.: Instrumental evaluation of color of solid dosage forms during stability testing. *International Journal of Pharmaceutics* **143**, 93–100 (1996).
- [9] Mohl, S.; Winter, G.: Continuous release of rh-interferon α -2a from triglyceride implants: Storage stability of the dosage forms. *Pharmaceutical Development and Technology* **11**, 103–110 (2006).
- [10] Lachenmeier, D.W.; Nathan-Maister, D.; Breaux, T.A.; Kuballa, T.: Long-term stability of thujone, fenchone and pinocamphone in vintage preban absinthe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 2782–2785 (2009).
- [11] Nesměrák, K.; Štícha, M.; Čvančarová, M.: HPLC/MS analysis of historical pharmaceutical preparations of heroin and cocaine. *Analytical Letters* **43**, 2572–2581 (2010).
- [12] Gonzalez, J.R.: Study of antique medicines. *Farmacia Clinica* **6**, 451–458 (1989). *CA* **113**:218335.
- [13] Nováková, L.: Analýza historických lékových forem kofeinu a santoninu. Bakalářská práce. UK PřF, Praha 2013.
- [14] Baeten, J.; Rumanus, 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**, 227–234 (2010).
- [15] Ribechini, E.; Modugno, F.; Pérez-Arantequi, J.; Colombini, M.P.: Discovering the composition of ancient cosmetics and remedies: analytical techniques and materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **401**, 1727–1738 (2011).
- [16] 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**, 1771–1784 (2011).

- [17] *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material*. 4th ed. Pharmaceutical Press 2011.
- [18] Kar, A.: *Medicinal Chemistry*. 4th ed. New Delhi, New Age International 2007.
- [19] Craig, Ch.R.; Stitzel, R.E.: *Modern Pharmacology with Clinical Applications*. 5th ed. Boston, Little, Brown & Company 1997.
- [20] Akkawi, R.; Eksborg, S.; Andersson, Å.; Lundeberg, S.; Bartocci, M.: Effect of oral naloxone hydrochloride on gastrointestinal transit in premature infants treated with morphine. *Acta Paediatrica* **98**, 442–447 (2009).
- [21] Wei-Sheng Lee, C.; Ho, I.-K.: Pharmacological profiles of oligomerized μ -opioid receptors. *Cells* **2**, 689–714 (2013).
- [22] Gil-Alegre, M.E.; Barone, M.L.; Torres-Suárez, A.I.: Extraction and determination by liquid chromatography and spectrophotometry of naloxone in microparticles for drug-addiction treatment. *Journal of Separation Science* **28**, 2086–2093 (2005).
- [23] Crain, S.M.; Shen, K.-F.: Antagonists of excitatory opioid receptor functions enhance morphine's analgesic potency and attenuate opioid tolerance/dependence liability. *Pain* **84**, 121–131 (2000).
- [24] Mycek, M.J.; Harvey, R.A.; Champe, P.C.: *Pharmacology*. 2nd ed. New Jersey, Lippincott-Raven Publishers 1997.
- [25] Mostafavi, A.; Abedi, G.; Jamshidi, A.; Afzali, D.; Talebi, M.: Development and validation of a HPLC method for the determination of buprenorphine hydrochloride, naloxone hydrochloride and noroxy morphine in a tablet formulation. *Talanta* **77**, 1415–1419 (2009).
- [26] Casy, A.F.; Parfitt, R.T.: *Opioid Analgesics: Chemistry and Receptors*. New York, Plenum Press 1986.
- [27] Dawson, M.; Fryirs, B.; Kelly, T.; Keegan, J.; Mather, L.E.: A rapid and sensitive high–performance liquid chromatography–electrospray ionization–triple quadrupole mass spectrometry method for the quantitation of oxycodone in human plasma. *Journal of Chromatographic Science* **40**, 40–44 (2002).
- [28] Li, H.; Ge, Z.H.; Wang, N.: Determination of naloxone hydrochloride and naltrexone hydrochloride in plasma by HPLC with elektrochemical detector. *Yaowu-Fenxi-Zazhi* **16**, 18–22 (1996). *CA* **124**:299074.
- [29] Chiang, T.-Y.; Pao, L.-H.; Hsiong, Ch.-H.; Huang, P.-W.; Lin, K.-W.; Hu, O.-Y.-P.: Simultaneous determination of buprenorphine, nonbuprenorphine and naloxone in human plasma by LC-MS-MS. *Chromatographia* **74**, 575–583 (2011).
- [30] Tawakkol, M.S.; Mohamed, M.E.; Hassan, M.M.A.: Determination of naloxone hydrochloride in dosage form by high-performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography* **6**, 1491–1497 (1983).
- [31] Jiang, H.; Wang, Y.; Shet, M.S.; Zhang, Y.; Zenke, D.; Fast, D.M.: Development and validation of a sensitive LC/MS/MS method for the simultaneous determination of naloxone and its metabolites in mouse plasma. *Journal of Chromatography B* **879**, 2663–2668 (2011).

- [32] Shu-Fang, L.; Hai-Long, W.; A-Lin, X.; Shao-Hua, Z.; Jin-Fang, N.; Yong-Jie, Y.; Ru-Qin, Y.: Quantitative analysis of epinephrine in human plasma samples using kinetic fluorometric method combined with second-order calibration. *Analytical Sciences* **25**, 1231–1236 (2009).
- [33] Hasegawa, T.; Wada, K.; Hiyama, E.; Masujima, T.: Pretreatment and one-shot separating analysis of whole catecholamine metabolites in plasma by using LC/MS. *Analytical & Bioanalytical Chemistry* **385**, 814–820 (2006).
- [34] Yao, H.; Sun, Y.; Lin, X.; Tang, Y.; Liu, A.; Li, G.; Li, W.; Zhang, S.: Selective determination of epinephrine in the presence of ascorbic acid and uric acid by electrocatalytic oxidation at poly(eriochrome black T) film-modified glassy carbon electrode. *Analytical Sciences* **23**, 677–682 (2007).
- [35] Hynie, S.: *Farmakologie v kostce*. 2. přeprac. vyd. Praha, TRITON 2001.
- [36] Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L.: *Barevný atlas farmakologie*. 4. vyd. Praha, Grada Publishing 2012.
- [37] Bannach, G.; Cervini, P.; Cavalheiro, É.T.G.; Massao, I.: Using thermal and spectroscopic data to investigate the thermal behavior of epinephrine. *Thermochimica Acta* **499**, 123–127 (2010).
- [38] Kushnir, M.M.; Urry, F.M.; Frank, E.L.; Roberts, W.L.; Shushan, B.: Analysis of catecholamines in urine by positive-ion electrospray tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry* **48**, 323–331 (2002).
- [39] Hoellein, L.; Holzgrabe, U.: Ficts and facts of epinephrine and norepinephrine stability in injectable solutions. *International Journal of Pharmaceutics* **434**, 468–480 (2012).
- [40] Stepensky, D.; Chorny, M.; Dabour, Z.; Schumacher, I.: Long-term stability study of L-adrenaline injections: Kinetics of sulfonation and racemization pathways of drug degradation. *Journal of Pharmaceutics Sciences* **93**, 969–980 (2004).
- [41] Mellem, H.; Lande, K.; Kjeldsen, S.E.; Westheim, A.; Eide, I.; Ekholt, P.F.; Boye, N.P.: Faster and more reliable absorption of adrenaline by aerosol inhalation than by subcutaneous injection. *British Journal of Clinical Pharmacology* **31**, 677–681 (1991).
- [42] Corona-Avendaño, S.; Alarcón-Angeles, G.; Rojas-Hernández, A.; Romero-Romo, M.A.; Ramírez-Silva, M.T.: Study on the stability of adrenaline and on the determination of its acidity constants. *Spectrochimica Acta Part A* **61**, 305–311 (2005).
- [43] Helin-Tanninen, M.; Lehtonen, M.; Naaranlahti, T.; Venäläinen, T.; Pentikäinen, J.; Laatikainen, A.; Kokki, H.: Stability of an epidural analgesic admixture of levobupivacaine, fentanyl and epinephrine. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* **38**, 104–108 (2013).
- [44] Li, Y.; Yang, H.; Liao, H.; Fan, H.; Liang, Ch.; Deng, L.; Jin, S.: Simultaneous determination of ten biogenic amines in a thymopolypeptides injection using ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **929**, 33–39 (2013).
- [45] Guillarme, D.; Veuthey, J.-L.; Smith, R.M.: *UHPLC in Life Sciences*. Cambridge, The Royal Society of Chemistry 2012.
- [46] Mishra, A.; Upadhyay, A.; Patra, A.; Chaudhury, S.; Chattopadhyay, P.: Simultaneous determination of epinephrine and norepinephrine by high performance liquid chromatography. *Scientia Pharmaceutica* **77**, 367–374 (2009).

- [47] Carrera, V.; Sabater, E.; Vilanova, E.; Sogorb, M.A.: A simple and rapid HPLC-MS method for the simultaneous determination of epinephrine, norepinephrine, dopamine and 5-hydroxy-tryptamine: Application to the secretion of bovine chromaffin cell cultures. *Journal of Chromatography B* **847**, 88–94 (2007).
- [48] Sirén, H.; Karjalainen, U.: Study of catecholamines in patient urine samples by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **853**, 527–533 (1999).
- [49] Gosetti, F.; Mazzucco, E.; Gennaro, M.C.; Marengo, E.: Simultaneous determination of sixteen underivatized biogenic amines in human urine by HPLC-MS/MS. *Analytical & Bioanalytical Chemistry* **405**, 907–916 (2013).
- [50] Van Dam, D.; Vermeiren, Y.; Aerts, T.; De Deyn, P.P.: Novel and sensitive reversed-phase high-pressure liquid chromatography method with electrochemical detection for the simultaneous and fast determination of eight biogenic amines and metabolites in human brain tissue. *Journal of Chromatography A* **1353**, 28–39 (2014).
- [51] Shi, Y.; Sun, Ch.; Gao, B.; Sun, A.: Development of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of eight adulterants in slimming functional foods. *Journal of Chromatography A* **1218**, 7655–7662 (2011).
- [52] Zhu, D.(A.); Zhang, G.G.Z.; George, K.L.S.T.; Zhou, D.: A novel accelerated oxidative stability screening method for pharmaceutical solids. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **100**, 3529–3538 (2011).
- [53] Beyer, J.; Peters, F.T.; Kraemer, T.; Maurer, H.H.: Detection and validated quantification of nine herbal phenalkylamines and methcathinone in human blood plasma by LC-MS/MS with electrospray ionization. *Journal of Mass Spectrometry* **42**, 150–160 (2007).
- [54] Qiu, P.; Chen, X.; Chen, X.; Lin, L.; Ai, Ch.: Simultaneous determination of five toxic alkaloids in body fluids by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **875**, 471–477 (2008).
- [55] Diepvens, K.; Westerterp, K.R.; Westerterp-Plantenga, M.S.: Obesity and thermogenesis related to the consumption of caffeine, ephedrine, capsaicin and green tea. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **292**, 77–85 (2007).
- [56] Lee, K.M.; Kim, H.J.; Jeong, E.S.; Yoo, H.H.; Kwon, O.S.; Jin, Ch.; Kim, D.H.; Lee, J.: Simple and accurate quantitative analysis of seven prohibited threshold substances in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry in doping control. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **25**, 2261–2267 (2011).
- [57] Sørensen, L.K.: Determination of cathinones and related ephedrines in forensic whole-blood samples by liquid-chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **879**, 727–736 (2011).
- [58] Axelrod, J.: Metabolism of epinephrine and other sympathomimetic amines. *Physiological Reviews* **39**, 751–776 (1959).
- [59] Klamann, E.; Schröppel, E.; Blecher, R.; Lingens, F.: Degradation of (-)-ephedrine by *Arthrobacter globiformis*. *European Journal of Applied Microbiology* **2**, 257–265 (1976).

- [60] Zhang, Ch.; Wu, H.; Huang, X.; Zhu, Z.; Luo, H.; Huang, F.; Lin, X.: Simultaneous determination of toxic alkaloids in blood and urine by HPLC-ESI-MS/MS. *Chromatographia* **75**, 499–511 (2012).
- [61] Makhija, S.N.; Vavia, P.R.: Stability indicating HPTLC method for the simultaneous determination of pseudoephedrine and cetirizine in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **25**, 663–667 (2001).
- [62] Yan, Y.; Chai, Ch.-Z.; Wang, D.-W.; Yue X.-Y.; Zhu, D.-N.; Yu, B.-Y.: HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS analysis and HPLC quantitation of chemical constituents in traditional Chinese medicinal formula Ge-Gen Decoction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **80**, 192–202 (2013).
- [63] Fuh, M.-R.S.; Lu, K.-T.: Determination of methylamphetamine and related compounds in human urine by high performance liquid chromatography/electrospray/mass spectrometry. *Talanta* **48**, 415–423 (1999).
- [64] Fernández, M.del M.R.; Wille, S.M.R.; Fazio, V.di; Gosselin, M.; Samyn, N.: Analysis of amphetamines and metabolites in urine with ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **878**, 1616–1622 (2010).
- [65] Liu, L.; Wen, Y.; Liu, K.; Sun, L.; Lu, Y.; Yin, Z.: Simultaneous determination of a broad range of cardiovascular drugs in plasma with a simple and efficient extraction/clean up procedure and chromatography-mass spectrometry analysis. *Royal Society of Chemistry Advances* **4**, 19629–19639 (2014).
- [66] Stanaszek, R.; Piekoszewski, W.: Simultaneous determination of eight underivatized amphetamines in hair by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (HPLC-APCI-MS). *Journal of Analytical Toxicology* **28**, 77–85 (2004).
- [67] Domínguez-Romero, J.C.; García-Reyes, J.F.; Molina-Díaz, A.: Screening and quantitation of multiclass drugs of abuse and pharmaceuticals in hair by fast liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **879**, 2034–2042 (2011).
- [68] Borova, V.L.; Maragou, N.C.; Gago-Ferrero, P.; Pistos, C.; Thomaidis, N.S.: Highly sensitive determination of 68 psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs, and related human metabolites in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **406**, 4273–4285 (2014).
- [69] Cubbon, S.; Antonio, C.; Wilson, J.; Thomas-Oates, J.: Metabolomic applications of HILIC-LC-MS. *Mass Spectrometry Reviews* **29**, 671–684 (2010).
- [70] Nguyen, H.P.; Schug, K.A.: The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications. *Journal of Separation Science* **31**, 1465–1480 (2008).
- [71] Hemström, P.; Irgum, K.: Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* **29**, 1784–1821 (2006).
- [72] Jandera, P.: Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta* **692**, 1–25 (2011).
- [73] Nováková, L.; Douša, M.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha, Europrint 2013.

- [74] Melnikov, S.M.; Höltzel, A.; Seidel-Morgenstern, A.; Tallarek, U.: Evaluation of aqueous and nonaqueous binary solvent mixtures as mobile phase alternatives to water-acetonitrile mixtures for hydrophilic interaction liquid chromatography by molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry C* **119**, 512–523 (2015).
- [75] Joly, N.; Vaillant, C.; Cohen, A.M.; Martin, P.; El Essassi, M.; Massoui, M.; Banoub, J.: Structural determination of the novel fragmentation routes of zwitterionic morphine opiate antagonists naloxonazine and naloxone hydrochlorides using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**, 1062–1074 (2007).
- [76] Heacock, R.A.; Powell, W.S.: 6 adrenochrome and related compounds. *Progress in Medicinal Chemistry* **9**, 275–340 (1973).
- [77] Bijlsma, L.; Sancho, J.V.; Hernández, F.; Niessen, W.M.A.: Fragmentation pathways of drugs of abuse and their metabolites based on QTOF MS/MS and MS^E accurate-mass spectra. *Journal of Mass Spectrometry* **46**, 865–875 (2011).
- [78] Rusek V.: Vývoj injekční formy léčiv II. *Československá farmacie* **12** (1963), 50–59.