

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Lucie Nováková

## **ANALÝZA HISTORICKÝCH LÉKOVÝCH FOREM KOFEINU A SANTONINU**

Analysis of Historical Pharmaceutical Preparations  
of Caffeine and Santonin

Bakalářská práce

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

Konzultant: RNDr. Martin Štícha

Praha 2013

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

## Prohlášení

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

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

V Praze dne 15. května 2013

# Abstrakt a klíčová slova

## **Abstrakt:**

Historické léčivé formy kofeinu a santoninu byly analyzovány hmotnostní spektrometrií, vzorek kofeinu byl kvantifikován spektrofotometricky, vzorek santoninu byl kvantifikován acidobazickou titrací. V analyzované historické injekční formě „Coffeinum natriosalicylicum“ (datované přibližně 1945) bylo stanoveno  $110 \pm 1$  % deklarovaného množství kofeinu a  $94,33 \pm 0,02$  % deklarovaného množství salicylanu sodného. Nebyly pozorovány žádné rozpadové produkty kofeinu ani salicylanu sodného. Obsah santoninu v historickém vzorku (datovaném asi 1918) byl stanoven titračně na  $104 \pm 4$  %, jednalo se o čistý santonin bez příměsí. Nebyly nalezeny žádné rozpadové produkty santoninu. Analyzované vzorky byly stabilní i po více jak sedmdesáti, resp. devadesáti, letech skladování.

## **Klíčová slova:**

hmotnostní spektrometrie, historické léčivé formy, kofein, santonin

## **Abstract:**

Historical pharmaceutical preparations of caffeine and santonin were analyzed by mass spectrometry, the sample of caffeine was quantified by spectrophotometry, the sample of santonin was quantified by acid-base titration. In the analyzed historical injection solution „Coffeinum natriosalicylicum“ (dated circa 1945) was determined  $110 \pm 1$  % of the declared amount of caffeine and  $94.33 \pm 0.02$  % of the declared amount of sodium salicylate. There were observed neither degradation products of caffeine nor sodium salicylate. The content of santonin in the historical sample (dated prior 1918) was determined by titration to  $104 \pm 4$  %, sample was pure santotnin with no additions. No degradation products of santonin was observed. The analyzed samples were stable for more than seventy, ninety resp., years of storage.

## **Key words:**

mass spectrometry, historical pharmaceutical preparations, caffeine, santonin

## Poděkování

Ráda bych touto cestou velice poděkovala RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D. za skvělé vedení, vstřícnost, podporu, ochotu, cenné rady, velikou trpělivost a za pomoc při získávání potřebných informací a podkladů pro sepisování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Martinu Štíchovi za pomoc a rady při měření, za trpělivost, vstřícnost, pomoc při interpretaci výsledků, konzultace a ochotu.

Za poskytnutí historické lékové formy kofeinu děkuji Mgr. Janu Babicovi z Českého farmaceutického muzea v Kuksu.

# Obsah

|  |    |
|--|----|
| 1 Úvod .....   | 7  |
| 2 Teoretická část.....   | 8  |
| 2.1 Stabilita léčiv a lékových forem .....                         | 8  |
| 2.2 Kofein.....  | 10 |
| 2.2.1 Struktura a vlastnosti .....                                 | 10 |
| 2.2.2 Výroba .....   | 10 |
| 2.2.3 Farmakologie kofeinu .....                                   | 11 |
| 2.2.4 Distribuce v organismu a metabolismus.....                   | 12 |
| 2.2.5 Analytická stanovení.....                                    | 13 |
| 2.3 Santonin.....  | 15 |
| 2.3.1 Struktura a vlastnosti .....                                 | 15 |
| 2.3.2 Výroba .....   | 15 |
| 2.3.3 Farmakologie santoninu .....                                 | 15 |
| 2.3.4 Distribuce v organismu a metabolismus.....                   | 16 |
| 2.3.5 Analytická stanovení.....                                    | 17 |
| 3 Experimentální část.....   | 19 |
| 3.1 Analyzované látky a standardy.....                             | 19 |
| 3.2 Použité chemikálie.....  | 20 |
| 3.3 Postupy měření a vyhodnocování výsledků.....                   | 20 |
| 3.3.1 Hmotnostní spektrometrie.....                                | 20 |
| 3.3.2 Spektrofotometrická měření.....                              | 21 |
| 3.3.3 Odměrné stanovení santoninu .....                            | 21 |
| 4 Výsledky a diskuse.....  | 22 |
| 4.1 Analýza historického vzorku kofeinu a salicylanu sodného ..... | 22 |
| 4.1.1 Hmotnostní spektrometrie.....                                | 22 |
| 4.1.2 Kvantifikace složek ve vzorku .....                          | 23 |
| 4.2 Analýza historického vzorku santoninu.....                     | 25 |
| 4.2.1 Hmotnostní spektrometrie.....                                | 25 |
| 4.2.2 Kvantifikace santoninu ve vzorku.....                        | 27 |
| 5 Závěr .....  | 28 |
| Literatura.....  | 29 |

## Seznam zkratek a symbolů

|       |  |
|-------|--|
| APCI  | atmospheric pressure chemical ionization |
| APPI  | atmospheric pressure photoionization     |
| CA    | Chemical Abstracts                       |
| CASN  | CAS registry number                      |
| DAD   | detekce diodovým polem                   |
| ESI   | electrospray ionization                  |
| FAB   | fast atom bombardment                    |
| MF    | mobilní fáze                             |
| Q-TOF | quadrupole-time-of-flight                |
| UV    | ultrafialové záření                      |

# 1 ÚVOD

Cílem této bakalářské práce bylo provést analýzu historických lékových forem kofeinu a santoninu metodou hmotnostní spektrometrie. Úkolem bylo zjistit přítomnost či naopak nepřítomnost původní léčivé látky, případně rozpadových produktů a kvantifikace nalezených látek.

Léčiva jsou důležitou a nedílnou součástí každodenního života, ale jako každá chemická látka, i léčiva mohou časem podléhat chemickým změnám nejrůznějšího druhu. Z toho důvodu bylo zajímavé podívat se na dlouhodobou stabilitu chemických látek v lékových formách starších sedmdesáti let právě jejich analýzou. Vhodným materiálem pro takovou analýzu jsou zejména injekční roztoky zatavené ve skleněných ampulích, jelikož jsou od okolního prostředí izolovány a navíc se u nich dá předpokládat vysoká čistota původní látky v době vzniku lékové formy.

# 2 TEORETICKÁ ČÁST

## 2.1 Stabilita léčiv a lékových forem

Fyzikální a chemická degradace léčivých látek mohou změnit jejich účinky, což může mít za následek změnu terapeutické účinnosti, stejně jako toxické důsledky [1]. Vzhledem k tomu musí léčivé látky, resp. jejich lékové formy být stabilní a udržet si svoji kvalitu až do doby použití, nebo do vypršení jejich data spotřeby. Kvalita by měla být zachována za různých podmínek, se kterými se léčiva a léčivé formy setkávají při výrobě, skladování ve skladech, dopravě, skladování v nemocnicích a lékárnách, stejně jako v domácnostech.

K faktorům ovlivňujícím chemickou stabilitu léčivých látek patří vnitřní faktory, jako je například molekulární struktura látky samotné, a faktory prostředí, jako je například teplota, pH, tlumivé roztoky, iontová síla, světlo, přítomnost kyslíku a vlhkosti, aditiva a pomocné látky.

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

Nejsnadněji pochopitelná a nejvíce prostudovaná nestabilita lékových forem je kvantitativní ztráta látky vedoucí ke snížení účinnosti. Nejen, že snížením množství účinné látky dochází ke snížení účinnosti léku, navíc mohou degradací léčivé látky vznikat toxické látky. Proto je důležité určit nejen to, kolik látky se časem ztrácí, ale také jaké jsou degradační produkty. Degradace léčiva může učinit produkt esteticky nepřijatelný, například změnou barvy nebo zápachu. Některé léčivé látky se mohou degradovat pH gastrointestinálního traktu, proto je třeba, aby byla zajištěna stabilita přípravku za podmínek pH gastrointestinálního traktu v případě, že je léková forma určena k perorálnímu podání.

Léčivé látky mají různé molekulární struktury, a proto jsou náchylné k variabilním cestám rozkladu. Mezi možné degradační cesty patří hydrolyza, dehydratace, izomerizace a racemizace, oxidace, fotodegradace a komplexní interakce buď



s pomocnou látkou, nebo s jinými léčivými přípravky. Léčivé látky obsahující skupinu karboxylové kyseliny jsou někdy také citlivé k dekarboxylaci.

Asi nejčastějším reakčním mechanismem degradace léčivých látek je hydrolyza [2]. Je to proto, že většina léčivých látek, dokonce i ty, které nejsou zvláště citlivé k hydrolyze, se stává méně stabilními při zvýšené vlhkosti. Většina léčivých přípravků přichází do styku s vodou, a to i pevné lékové formy [1]. Hydrolyza je jednou z hlavních degradačních cest pro léčivé látky obsahující ve své struktuře esterové a amidové funkční skupiny.

Další velmi častou cestou degradace léčiv je oxidace. Kyslík, který se podílí na většině oxidačních reakcí, je bohatě zastoupen v prostředí, kterému jsou léčiva vystavena, buď v průběhu zpracování, nebo při dlouhodobém skladování. Oxidační mechanismy léčivých látek závisí na chemické struktuře léčivé látky a přítomnosti reaktivních forem kyslíku nebo jiných oxidantů. Například i atomy síry, které jsou stále běžnější v nových léčivech, mají sklony oxidovat se na odpovídající sulfoxidy.

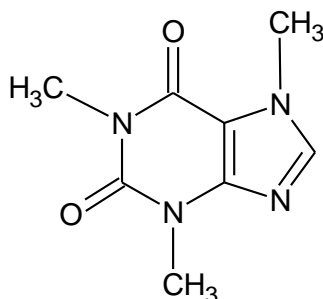
Fotodegradace byla prokázána u velkého množství látek [3]. Fotodegradace je často doprovázená oxidací v přítomnosti kyslíku [1]. Obvykle je pozorována jako blednutí barevných sloučenin, či naopak jako zbarvení původně bezbarvých výrobků [3]. Mechanismy pro tyto reakce jsou obecně velmi složité [1]. Nejvýznamnějším důsledkem fotodegradace je ztráta účinnosti přípravku, která může vést i k terapeuticky inaktivnímu přípravku [3]. Léčivá látka může však také způsobit světlem vyvolané nežádoucí účinky interakcí s endogenními látkami.

Lékové formy jsou zřídka tvořeny pouze samotnou léčivou látkou, obvykle jsou v nich přítomny aditivní nebo pomocné látky [1]. Často mohou reagovat léčivá látka s pomocnou látkou nebo spolu mohou reagovat dvě různé léčivé látky nacházející se v jednom přípravku. Pomocné látky mohou ovlivňovat stabilitu léčiva různými mechanismy, například se přímo podílejí na degradaci léčivé látky, mohou vykazovat katalytické účinky vůči degradaci léčivé látky (například kovové ionty). Jiné mechanismy zahrnují vliv vlhkosti přítomné v pomocných látkách, účinek změny pH způsobené pomocnými látkami, barevné pomocné látky mohou zvýšit oxidaci a fotodegradaci léčivé látky a další.

Většina studií zabývajících se stabilitou lékových forem se zaměřuje na časové období několika měsíců či let [4–6]. Existují však i studie zabývajících se analýzou historických lékových forem starých přes sedmdesát let, obsahující mimo jiné závěry týkající se stability [7, 8].

## 2.2 Kofein

### 2.2.1 Struktura a vlastnosti



Obr. 2.1: Chemická struktura kofeinu.

Kofein, chemicky 1,3,7-trimethyl-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion (CASN: [58-08-2]), je alkaloid patřící mezi *N*-methyl deriváty xantinu, mezi které se řadí i theofylin a theobromin [9]. Chemická struktura je znázorněna na obr. 2.1. Sumární vzorec je  $C_8H_{10}N_4O_2$  a relativní molekulová hmotnost je 194,191. Je to bílá krystalická látka s teplotou tání 234–238 °C a teplotou sublimace 178 °C [10]. Kofein je vysoce rozpustný ve vodě ( $37,5 \pm 1,0 \text{ g l}^{-1}$  [11]). V roztoku je slabě citlivý na světlo. Rozpustnost kofeinu ve fyziologickém rozmezí pH je poměrně na pH nezávislá ( $50 \text{ mg ml}^{-1}$  při 37 °C) [12]. Má nízký rozdělovací koeficient ( $\log P = -0,07$ ) a disociační konstanta při 25 °C je  $10^{-14}$  [10].

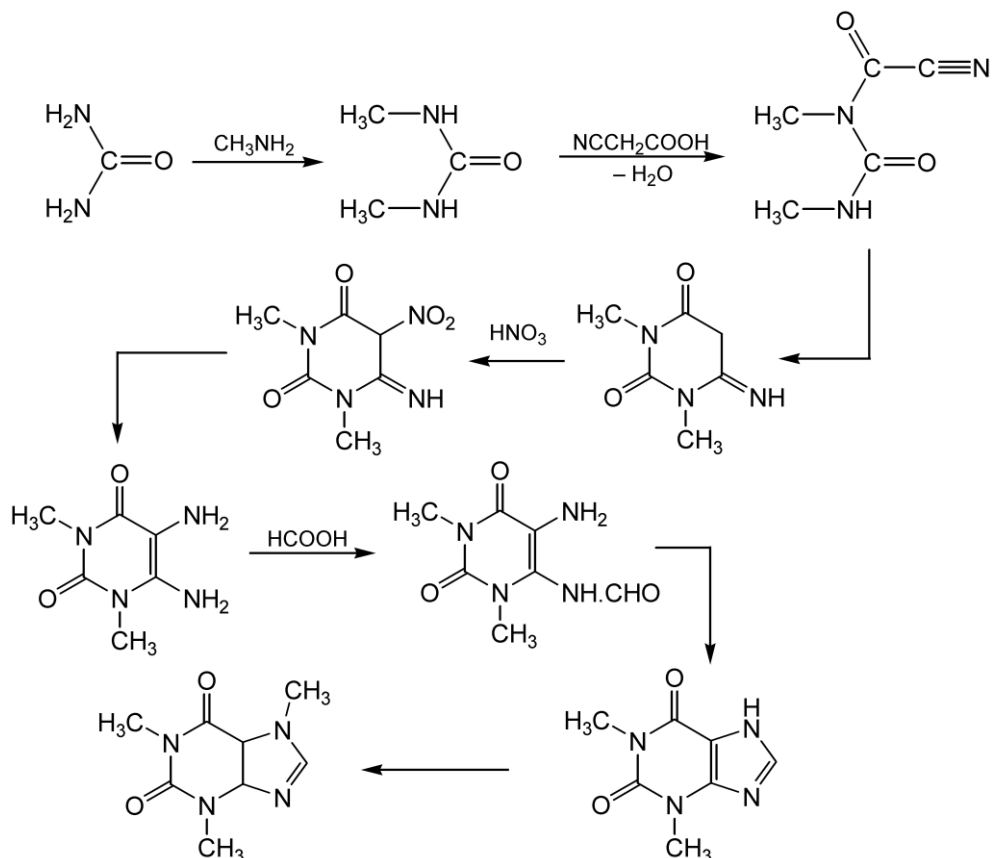
### 2.2.2 Výroba

Kofein je značně rozšířen v přírodních produktech a běžně je používán v nápojích jako stimulant a aromatizující přísada [13, 14].

Alkaloid kofein je součástí kávových zrn (*Coffea arabica*) a mnoha dalších druhů kávy, čokolády (*Theobroma cacao*), čaje (*Camellia thea*), ořechů kola (*Cola acuminata*) a několika dalších druhů *Cola* [13]. Je součástí i dalších rostlin, jako je čajovník čínský (*Camellia sinensis*), rostlin mořenovitých (*Rubiaceae*) nebo lejnícovitých (*Streculiaceae*). Také se vyskytuje jako metabolit plísně *Claviceps sorghicola*.

Poprvé byl kofein izolován v roce 1820 ze zelených kávových zrn německým chemikem F. F. Rungem [15]. Ve stejném roce byl tento objev potvrzen von Giesem. Oudry v roce 1827 izoloval kofein z čaje a W. F. Daniell v roce 1865 objevil, že ořechy kola také obsahují kofein.

Kofein může být připravován i synteticky [9] (obr. 2.2). Výchozí látkou je močovina, která reaguje s methylaminem za vzniku 1,3-dimethylmočoviny. Ta reakcí s kyanooctovou kyselinou za současného odštěpení vody poskytne 1-(2-kyanoacetyl)-1,3-dimethylmočovinu, která je cyklizována v alkalickém prostředí. Dále se takto vzniklá cyklická sloučenina nitruje kyselinou dusičnou, následuje redukce, reakce s mravenčí kyselinou a následně v alkalickém prostředí vzniká theofylin, jehož methylací nakonec vzniká kofein.



Obr. 2.2: Syntéza kofeinu (upraveno podle [9]).

### 2.2.3 Farmakologie kofeinu

Kofein má mnoho fyziologických účinků, jako je stimulace centrálního nervového systému, diurézy a sekrece žaludečních kyselin [14]. Kofein stimuluje všechny úrovně centrálního nervové soustavy, zejména však mozkovou kůru, výrazně vede k rychlejšímu a jasnějšímu myšlení, lepší psychomotorické koordinaci a bdělosti [9]. Pomáhá při stimulaci dýchacích center, vede k větší práci srdce a především k většímu srdečnímu výdeji. Je prokázáno, že vyvíjí mírnou diurézu tím, že zvyšuje průtok krve

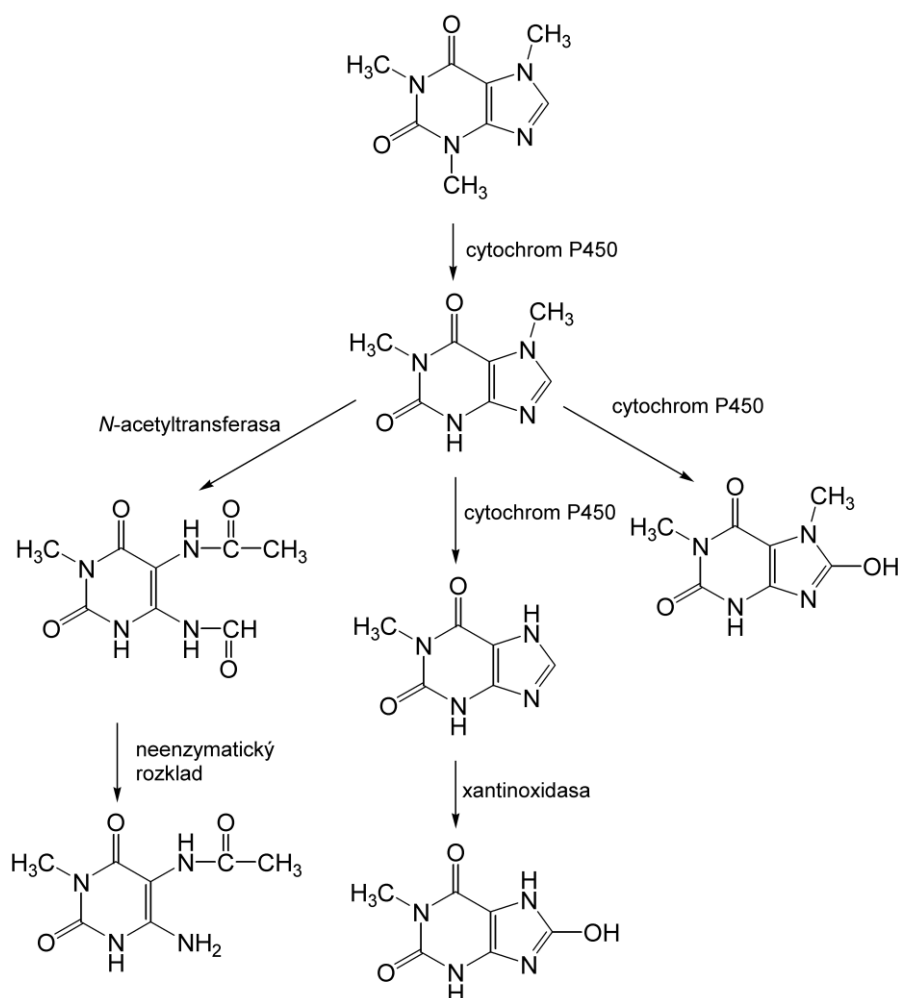
ledvinami, zvyšuje glomerulární filtraci, ale především snižuje normální proximální tubulární resorpci sodných iontů a vody [9]. Kofein je používán v kombinaci s ergotaminem k léčbě migrény (vazokonstrikce mozkových cév působením kofeinu výrazně přispívá k jeho výjimečné schopnosti zmírnit bolesti hlavy [9]), nebo v kombinaci s nesteroidními protizánětlivými léky v analgetických přípravcích [14]. Nepochybně stimuluje i parietální buňky, které zvyšují vylučování žaludečních šťáv v žaludku – způsobuje zvýšení kyselosti v žaludku [9]. Je antagonistou adenosinového receptoru [13].

Jako mírný stimulant je kofein podáván v dávce 50–200 mg, maximálně však 1 g [10]. Většinou se podává 100–500 mg, obvykle však 200 mg [9]. Toxické účinky jsou zaznamenávány při koncentraci kofeinu v krvi vyšší než 15 mg l<sup>-1</sup> a úmrtí při koncentraci v krvi vyšší než 80 mg l<sup>-1</sup> [10]. Příznaky toxicity kofeinu zahrnují srdeční arytmií, záchvaty, metabolické poruchy a závažný plicní edém.

#### **2.2.4 Distribuce v organismu a metabolismus**

Kofein je po perorálním požití rychle absorbován, jeho biologická dostupnost je téměř 100 % [10]. Je široce distribuován, prochází placentou, vstupuje do centrální nervové soustavy a slin, malé množství se vylučuje do mateřského mléka.

V lidském organismu je kofein odbouráván cytochromem P450, *N*-acetyltransferasou a xantinoxidasou [16]. Metabolické reakce zahrnují *N*-demethylaci, acetylaci a oxidaci na deriváty močové kyseliny (obr. 2.3). Přibližně 85 % podané dávky kofeinu se do 48 hodin vyloučí do moči, z toho asi 40 % jako kyselina 1-methylmočová, 10–15 % jako 1-methylxantin a až 35 % jako 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil a 5-acetylamino-6-amino-3-methyluracil. Ostatní metabolity vylučované močí zahrnují theofylin, 1,7-dimethylxantin (paraxantin), 7-methylxantin, a kyselinu 1,3-dimethylmočovou. Přibližně 1 % z podané dávky se vylučuje močí v nezměněné formě. Míra *N*-acetylce je určena geneticky. U novorozenců je kofein vylučován močí především v nezměněné formě, protože schopnost metabolizovat tuto látku je snížena až přibližně do šestého měsíce věku.



Obr. 2.3: Metabolismus kofeinu (upraveno podle [16]).

## 2.2.5 Analytická stanovení

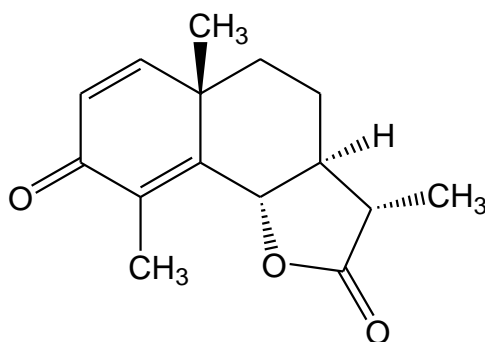
Pro stanovení kofeinu v lékových formách se využívá titrace kyselinou chloristou v prostředí bezvodé kyseliny octové [17] nebo spektrofotometrické měření [10]. Ke stanovení degradačních produktů je však potřeba použít metody kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí. Tato metoda se využívá i pro stanovení kofeinu a jemu příbuzných látek v biologických matricích je plasma, krev či moč [18, 19]. Vybrané HPLC-MS metody pro stanovení kofeinu v nejrůznějších vzorcích jsou uvedeny v tab. 2.1.

Tab. 2.1: Analytická stanovení kofeinu metodou HPLC-MS.

| typ vzorku     | metoda, podmínky měření  | limit detekce ng/ml | reference |
|----------------|--|---------------------|-----------|
| moč            | HPLC-MS/MS, kolona C30, gradientová eluce 0,5% octová kyselina-acetonitril   | neuveđen            | [16]      |
| plasma         | LC-frit-FAB-MS, kolona ODS-HG-5, gradientová eluce 17M octová kyselina-glycerol-voda (0,1:0,5:99,4 v/v) a 17M octová kyselina-glycerol-methanol-voda (0,5:0,5:10-99::89-0 v/v) | 5                   | [19]      |
| mateřské mléko | LC/MS/MS, kolona C8, gradientová eluce 50mM mravenčan amonný-acetonitril   | 1,6                 | [20]      |
| voda           | UPLC-MS/MS, kolona C18, gradientová eluce acetonitril s 0,1% mravenčí kyselinou-30mM mravenčanový pufr o pH = 3,5  | neuveđen            | [18]      |
|                | LC-Q-TOF-MS, kolona C18, gradientová eluce 0,1% mravenčí kyselina v acetonitrilu-voda (95:5, v/v)  | < 5                 | [21]      |
|                | LC-Q-TOF-MS, kolona C8, gradientová eluce acetonitril-0,1% mravenčí kyselina   | neuveđen            | [22]      |
| tablety léčiv  | LC-ESI-MS-MS, kolona C18, gradientová eluce 10mM mravenčanový pufr-acetonitril   | 500,0               | [23]      |
| čaje           | LC/APCI-MS, kolona C18, gradientová eluce 0,05% vodný roztok trifluoroctové kyseliny-0,05% acetonitrilový roztok trifluoroctové kyseliny                                       | neuveđen            | [24]      |

## 2.3 Santonin

### 2.3.1 Struktura a vlastnosti



Obr. 2.4: Chemická struktura santoninu.

Santonin, chemicky (3*S*,3*aS*,5*aS*,9*bS*)-3,5*a*,9-trimethyl-3*a*,4,5,9*b*-tetrahydro-3*H*-benzo[*g*][*l*]benzofuran-2,8-dion (CASN: [481-06-1]) je krystalický lakton získaný ze sušených květů pelyňku cicvárového (*Artemisia cina*) a dalších druhů *Artemisia* [10]. Chemická struktura je znázorněna na obr. 2.4. Sumární vzorec je C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub> a relativní molekulová hmotnost je 246,307. Jsou to bílé, lesklé krystalky nebo prášek, bez zápachu, hořké chuti, vlivem světla žloutne [10, 25]. Bod tání je okolo 173 °C. Ve vodě je prakticky nerozpustný, rozpustný 1:50 v ethanolu, 1:4 v chloroformu a 1:125 v etheru [10]. Rozdělovací koeficient *n*-oktanol–voda (log *P*) je 1,8. [26, 27].

### 2.3.2 Výroba

Santonin patří mezi seskviterpenové laktony, které jsou důležitou třídou přírodních produktů nalézajících se v rostlinách čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*), tvořené kondenzací tří isoprenoidních jednotek a následnou cyklizací a oxidační transformací [28]. Poprvé byl santonin izolován Kahlerem v roce 1830 z *Artemisia santonica* [26].

Santonin se dá také syntetizovat, například z bicyklického malonového esteru [27], nebo z trienonu odvozeného od thujonu [29].

### 2.3.3 Farmakologie santoninu

Santonin se dříve používal jako anthelmintikum (léčivá látka používaná v boji proti parazitickým červům) [9, 25]. Vyskytoval se ve formě tablet, cicvárového semínka (sušené květy pelyňku cicvárového) či cukroví (santoninová čokoláda). Santonin je křečový jed, který působí na centrální nervovou soustavu. Vyvolává nejprve

modrofialové (kyanopsie a ianthinopsie) a pak žlutfialové vidění (xanthopsie) drážděním a následným ochrnutím sítnice v částech, které vnímají barvu. Také na škrkavky působí nejprve dráždivě. Santonin v ledvinách zvyšuje glukosový práh a zbarvuje moč do intenzivní žlutozelené barvy, v alkalickém prostředí pak červená.

Santonin byl dříve podáván v dávkách 60–200 mg denně po dobu tří dnů [10]. Nejvyšší jednotlivá dávka byla 100 mg, nejvyšší denní dávka byla 300 mg [25]. Obvyklá terapeutická jednorázová dávka byla 50 mg a denní 200 mg.

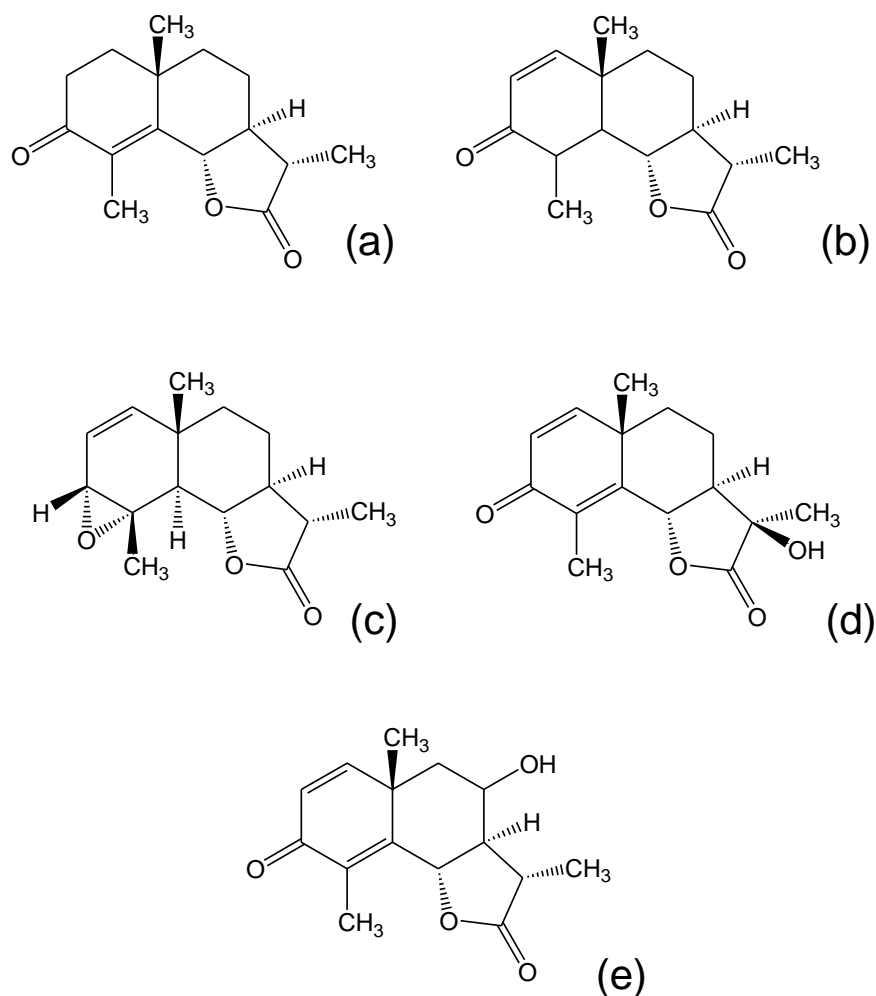
Lehká otrava se projevuje úzkostí, pocením a xanthopsií [25]. Prudká otrava santoninem se projevuje xanthopsií, závratí, bolestí hlavy, zvýšenou slinivostí či zvracením. Takovýto člověk je bledý, objevuje se studený pot, těžce dýchá, nastávají úzkostlivé stavy a neklid, které mohou vyústit v duševní poruchu s halucinacemi. Ve svalstvu se objevují opakující se záškuby, mohou vypuknout křeče, také však může nastat až bezvědomí či smrt.

### 2.3.4 Distribuce v organismu a metabolismus

Největší část santoninu se v nezměněné podobě vylučuje stolicí, menší část se vstřebává a vylučuje ledvinami [25, 30]. Žaludeční kyselina podporuje resorpci [25]. Biotransformace santoninu v lidském organismu nebyla v literatuře popsána.

Byly provedeny studie zabývající se biotransformací santoninu pomocí různých druhů plísní, bakterií a buněčných kultur rostlin [31–33]. Bakterie *Bacillus cereus* přeměnila santonin z 64 % na metabolit 1,2-dihydrosantonin, který oproti santoninu postrádal anthelmintické i antimikrobiální účinky [32]. Na stejný metabolit přeměnily santonin i vláknité houby *Cunninghamella bainieri*, *Cunninghamella echinulata* a *Mucor plumbeus* [33]. Vlákňitá houba *Rhizopus stolonifer* metabolizovala santonin na 3,4-epoxysantonin a 4,5-dihydrosantonin [33] a vláknitá houba *Abisidia coerulea* na 11-hydroxysantonin a 8-hydroxysantonin [31]. Struktury biotransformačních produktů santoninu jsou zobrazeny na obr. 2.5.

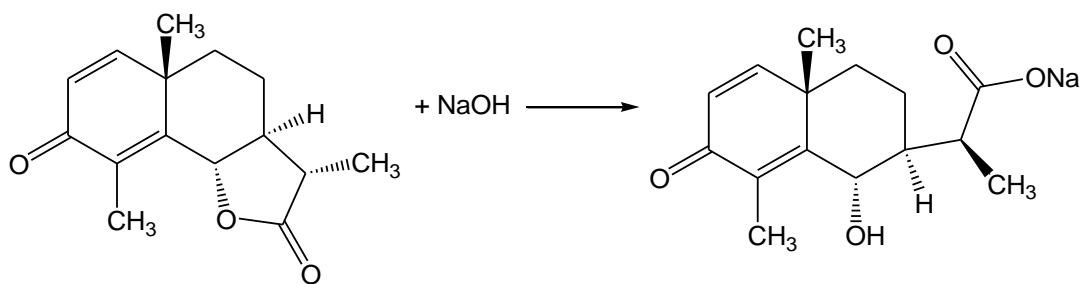




Obr. 2.5: Chemické struktury identifikovaných produktů biotransformace santoninu:  
 (a) 1,2-dihydrosantonin, (b) 4,5-dihydrosantonin, (c) 3,4-epoxysantonin, (d) 11-hydroxysantonin  
 a (e) 8-hydroxysantonin.

### 2.3.5 Analytická stanovení

Santonin se podle literatury [34] stanovoval acidobazickou titrací, při které se roztok santoninu s methanolem a nadbytkem hydroxidu sodného nechá projít varem, čímž ze santoninu vznikne kyselina santoninová (obr. 2.6). Nespotřebovaný hydroxid sodný se po zchladnutí směsi zpětně titruje roztokem kyseliny chlorovodíkové.



Obr. 2.6: Reakce santoninu s hydroxidem sodným v nadbytku za varu (upraveno podle [34]).

Analýza se dále provádí také pomocí kapalinové chromatografie použitím běžných reverzních stacionárních fází [35]. Existuje několik článků zabývajících se stanovením santoninu v sušených rostlinách, tabletách nebo roztocích, několik jich je uvedeno v tabulce 2.2.

Tab. 2.2: Analytická stanovení santoninu.

| typ vzorku                                     | metoda, podmínky měření   | reference |
|--|---|-----------|
| rostlinný materiál                             | LC-MS, kolona C18, gradientová eluce acetonitril-voda (2:98 v/v) s 1 mmol octanu amonného a acetonitril-voda (95:5 v/v) s 1 mmol octanu amonného                | [35]      |
|  | HPLC, MS, kolona RP 8, gradientová eluce methanol-voda  | [36]      |
| siláž, med, krmivo pro prasata, doplněk stravy | HPLC-Orbitrap MS, kolona 3 $\mu\text{m}$ Atlantis T3, gradientová eluce methanol-voda (95:5, v/v) oba obsahující 2mM mravenčan amonný a 0,5mM mravenčí kyselinu | [37]      |
| roztok standardů hořkých látek                 | HPLC, 1. kolona C18, 2. kolona ODS-Hypersil, gradientová eluce methanol-voda  | [38]      |
| anthelmintické tablety                         | HPLC, kolona Si60, izokratická eluce chloroform-ethanol (95:5, v/v)   | [39]      |
| roztok terpenů                                 | HPLC, kolona C18, izokratická eluce 0,05M fosfátový pufr (pH 3)-acetonitril (50:50, v/v)  | [40]      |

# 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 3.1 Analyzované látky a standardy

Analyzovaným vzorkem kofeinu byl čirý bezbarvý roztok uchovávaný v 1ml zatavené skleněné ampulce. Ampulka byla uložena v papírové krabičce označené „Coffeinum natriosalicylic., Dr. Heisler“ (obr. 3.1) vyrobené Spolkem pro chemickou a hutní výrobu (Čechy). Rok výroby lze odhadovat kolem roku 1945, protože etiketa přípravku je z období protektorátu, ale je opatřena poznámkou „Německý text je neplatný“, a protektorátní cena v korunách je přetištěna cenou v korunách československých. Vzorek byl poskytnut ze sbírek Českého farmaceutického muzea v Kuksu. V analyzovaném vzorku bylo podle etikety deklarováno 25 % coffeinum natriosalicylicum, podle v období Protektorátu platného 6. vydání německého lékopisu [41] obsahuje tato směs 40 % kofeinu, obsah kofeinu v ampulce měl tedy být  $0,1 \text{ g ml}^{-1}$ , obsah salicylanu sodného pak  $0,15 \text{ g ml}^{-1}$ .

Analytický standard kofeinu (Coffeinum anhydricum, šarže 201005019) s deklarovaným obsahem 99,8 % byl zakoupen od firmy Zentiva (Česká republika).



Obr. 3.1: Originální obal analyzovaného vzorku kofeinu.

Analyzovaným vzorkem santoninu byly bezbarvé krystalky uchovávané v tmavé láhvi se zábrusem. Láhev byla označena papírovou etiketou s předtištěným textem „Chemisches Institut der k. k. deutschen Universität Prag.“ a ručně dopsaným textem „Santonin“ (obr. 3.2). Dataci vzorku lze vzhledem k etiketě položit mezi lety 1881–1918. Vzorek pocházel ze sbírek katedry analytické chemie UK PŘF.



Obr. 3.2: Originální obal vzorku santoninu.

## 3.2 Použité chemikálie

Ostatní použité chemikálie byly (pokud není udáno jinak) analytické čistoty: acetonitril pro HPLC (Lab-Scan), methanol pro HPLC (Lab-Scan), hydroxid sodný (Lachema), kyselina chlorovodíková 35% (Lachema), kyselina šťavelová dihydrát (Lachema), tetraboritan sodný dekahydrát (Lachema), salicylan sodný (Fluka), kyselina sírová 98% (Lachema), dusičnan železitý (Lachema).

## 3.3 Postupy měření a vyhodnocování výsledků

### 3.3.1 Hmotnostní spektrometrie

Ampulka analyzované historické lékové formy kofeinu byla otevřena a bylo odebráno 50  $\mu\text{l}$  roztoku, který byl zředěn acetonitrilem 10 000krát. Vzorku santoninu bylo naváženo 2,4 mg, rozpuštěno a zředěno methanolem celkově 200krát.

K analýze vzorků byl použit hmotnostní spektrometr Bruker Esquire 3000 s iontovou pastí a elektrosprejovou ionizací. Rozsah měření byl pro kofein nastaven 50–600 Da a pro santonin 50–700 Da. Zmlžovacím plynem byl pro oba vzorky dusík (38 psi pro kofein a 35 psi pro santonin). Průtok sušícího plynu o teplotě 325 °C pro kofein byl 7,5 l  $\text{min}^{-1}$ . Průtok sušícího plynu o teplotě 315 °C pro santonin byl 6,0 l  $\text{min}^{-1}$ . Oba vzorky byly měřeny v pozitivním módu.

### 3.3.2 Spektrofotometrická měření

Spektrofotometrická měření byla realizována na spektrofotometru Hawlett Packard HP 8453. Byly připraveny standardní roztoky salicylanu sodného a kofeinu (0,1000 g standardu v 250,0 ml destilované vody).

Pro kvantifikaci salicylanu sodného bylo ze standardního roztoku salicylanu sodného připraveno do 25ml odměrných baněk šest kalibračních roztoků v rozmezí výsledných koncentrací salicylanu sodného  $1,6-9,6 \times 10^{-5} \text{ g ml}^{-1}$ . Do baňky byl odpipetován příslušný alikvot standardního roztoku salicylanu sodného a přidáno 5,00 ml vybarvovacího činidla (5mM roztok dusičnanu železitého ve 12mM kyselině sírové) a doplněno na 25,00 ml destilovanou vodou. Jako slepý vzorek byl použit roztok obsahující 5,00 ml vybarvovacího činidla doplněný destilovanou vodou na objem 25,00 ml. Kalibrační roztoky byly proměřeny proti slepému vzorku na spektrofotometru při vlnové délce 527 nm a byla vynesena kalibrační závislost. Poté byly změřeny tři roztoky vzorku připravené z 10  $\mu\text{l}$  analyzovaného injekčního roztoku s 5,00 ml vybarvovacího činidla a doplněné na 25,00 ml destilovanou vodou.

Kvantifikace obsahu kofeinu v analyzovaném vzorku byla provedena metodou standardního přídatku. Z analyzovaného historického injekčního roztoku bylo odpipetováno 50  $\mu\text{l}$  a zředěno destilovanou vodou v odměrné baňce na 50,00 ml. Do šesti 100ml odměrných baněk bylo odpipetováno 2,00 ml zředěného roztoku vzorku. Do pěti baněk bylo postupně přidáno 0,50, 1,00, 1,50, 2,00 a 2,50 ml standardního roztoku kofeinu. Všechny baňky byly následně doplněny po rysku destilovanou vodou a tyto roztoky byly proměřeny na spektrofotometru při vlnové délce 275 nm proti destilované vodě a hodnoty byly vyneseny do grafů.

### 3.3.3 Odměrné stanovení santoninu

Kvantifikace santoninu byla provedena acidobazickou titrací podle literatury [34]. Bylo odváženo přesně přibližné množství 0,5 g na analytických vahách, přidáno 30 ml methanolu a 30,00 ml 0,1M odměrného roztoku hydroxidu sodného (faktor roztoku byl 0,9417). Tato směs se nechala vařit přesně dvě minuty a po zchlazení se přebytek hydroxidu sodného retiroval 0,1M odměrným roztokem kyseliny chlorovodíkové (faktor roztoku byl 0,8849). Objem 1,00 ml 0,1M odměrného roztoku hydroxidu sodného odpovídá 0,02463 g santoninu. Stanovení bylo provedeno třikrát.

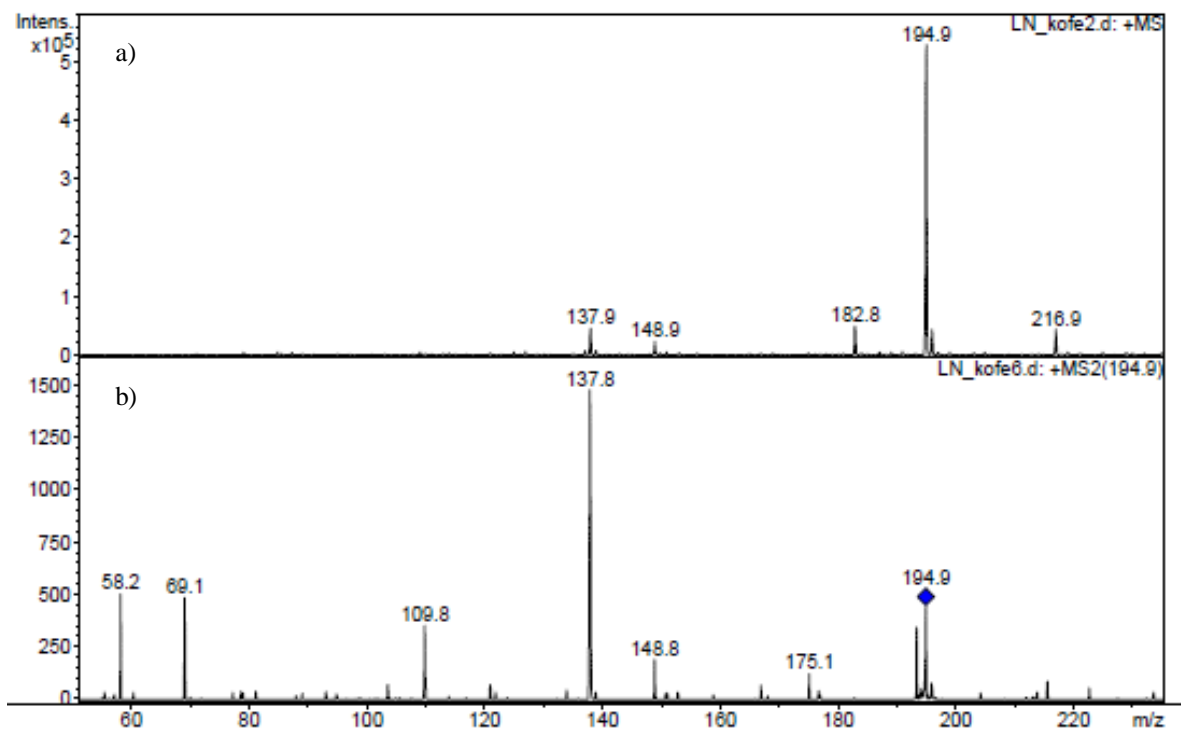
## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Analýza historického vzorku kofeinu a salicylanu sodného

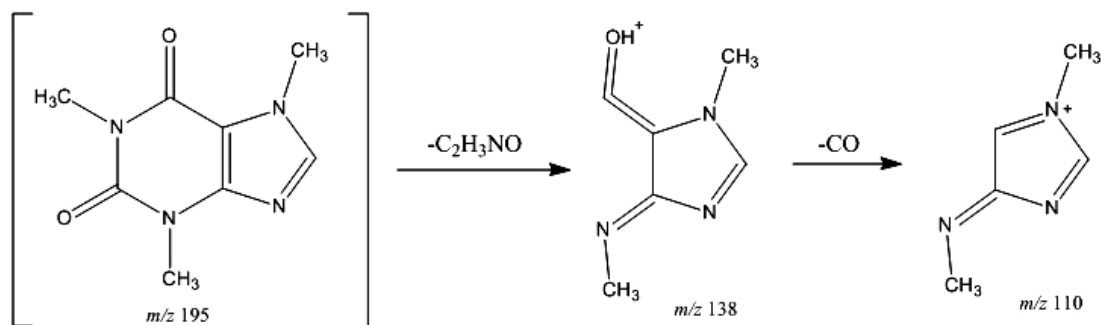
#### 4.1.1 Hmotnostní spektrometrie

Hledání případných degradačních produktů kofeinu v analyzované lékové formě bylo zahájeno přímým nástřikem naředěného vzorku do hmotnostního spektrometru nastaveného na pozitivní mód. Ve změřeném spektru byl majoritně zastoupen očekávaný iont  $m/z$  194,9, který odpovídal protonované molekule kofeinu  $[M + H]^+$ , iont  $m/z$  216,9 jakožto adukt se sodíkem  $[M + Na]^+$  (obr. 4.1 a) a iont  $m/z$  411 odpovídající dimeru  $[2M + Na]^+$ . Nebyly patrné žádné rozpadové produkty kofeinu ani salicylanu. Při měření v negativním módu byl patrný iont  $m/z$  136,6 odpovídající aniontu salicylové kyseliny.

Z prekursorového iontu  $m/z$  194,9 byla provedena fragmentace (obr. 4.1 b). Hlavním produktem rozpadu molekulárního iontu byl iont  $m/z$  137,8, který podle literatury [20, 21] odpovídá  $[M + H - C_2H_3NO]$  (obr. 4.2). Další iont  $m/z$  109,8 podle literatury [20] vzniká odštěpením skupiny  $-CO$  z iontu  $m/z$  139. Ionty  $m/z$  69,1 a  $m/z$  58,2 nebyly zatím v literatuře popsány a jejich identifikace by byla nad rámec této práce.



Obr. 4.1: MS/MS spektrum kofeinu: a) izolace prekurzorového iontu  $m/z$  195 b) dceřiné spektrum vznikající z iontu  $m/z$  195.

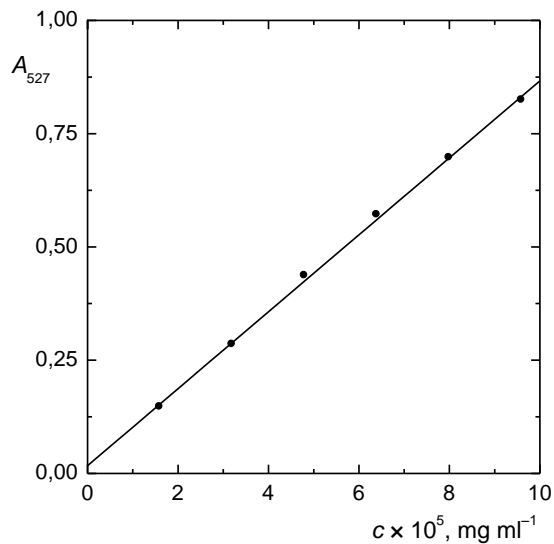


Obr. 4.2: Fragmentační cesta pro molekulární iont protonované molekuly kofeinu  $[M + H]^+$ .

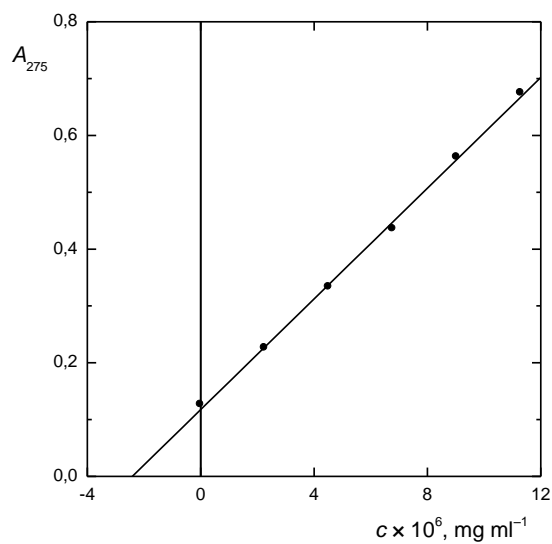
#### 4.1.2 Kvantifikace složek ve vzorku

Kvantifikace složek vzorku byla provedena spektrofotometricky. Z kalibrační závislosti salicylanu sodného (obr. 4.3) bylo vypočteno množství salicylanu ve vzorku  $0,141 \text{ g ml}^{-1}$ , což odpovídá  $94,33 \pm 0,02 \%$  deklarované hodnoty. Obsah kofeinu ve vzorku byl stanoven metodou standardního přídávku (obr. 4.4). Bylo nalezeno  $0,110 \text{ g ml}^{-1}$ , což odpovídá  $110 \pm 1 \%$  deklarované hodnoty. Výsledek byl zatížen malou pozitivní chybou, způsobenou pravděpodobně ředěním potřebným pro spektrofotometrické stanovení.

Jelikož nebyly hmotnostní spektrometrií nalezeny žádné rozpadové produkty a obě složky vzorku byly nalezeny odpovídající deklarovaným hodnotám, lze uzavřít, že historická léková forma kofeinu a salicylanu sodného byla stabilní i po sedmdesáti letech.



Obr. 4.3: Kalibrační přímka pro stanovení salicylanu sodného v historickém vzorku lékové formy (rovnice kalibrační přímky:  $A_{527} = 8400 c [\text{mg ml}^{-1}] + 0,017$ ,  $r = 0,9994$ ).



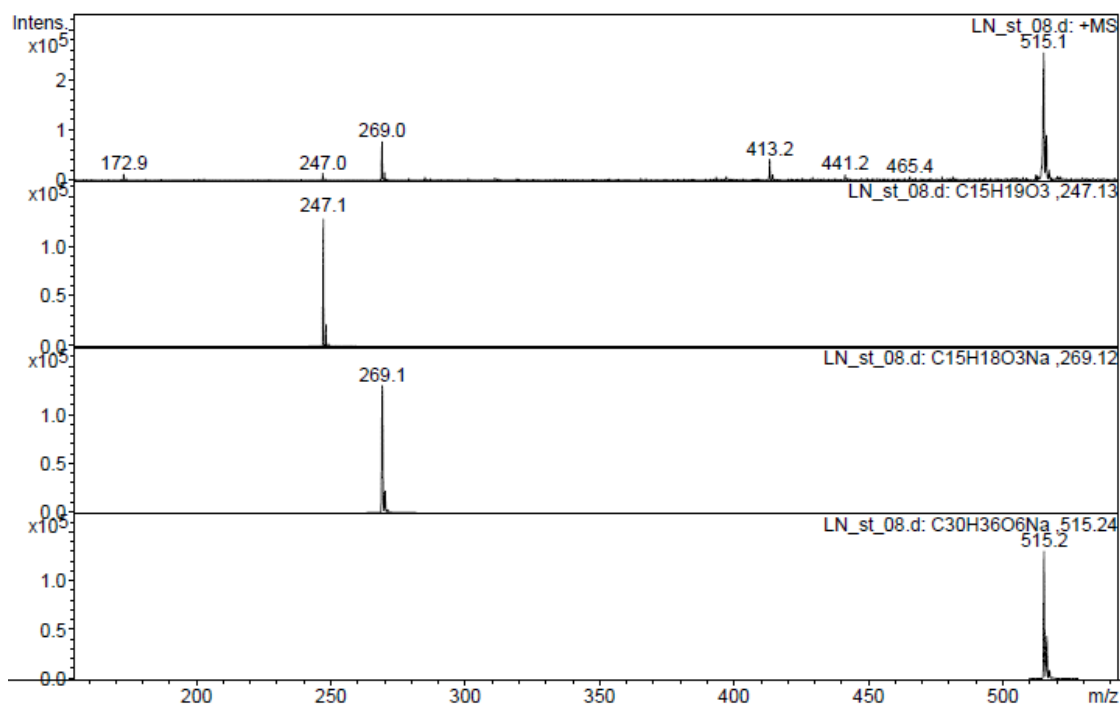
Obr. 4.4: Stanovení obsahu kofeinu v historickém vzorku lékové formy metodou standardního přídatku (rovnice kalibrační přímky:  $A_{275} = 48700 c [\text{mg ml}^{-1}] + 0,118$ ,  $r = 0,9993$ ).



## 4.2 Analýza historického vzorku santoninu

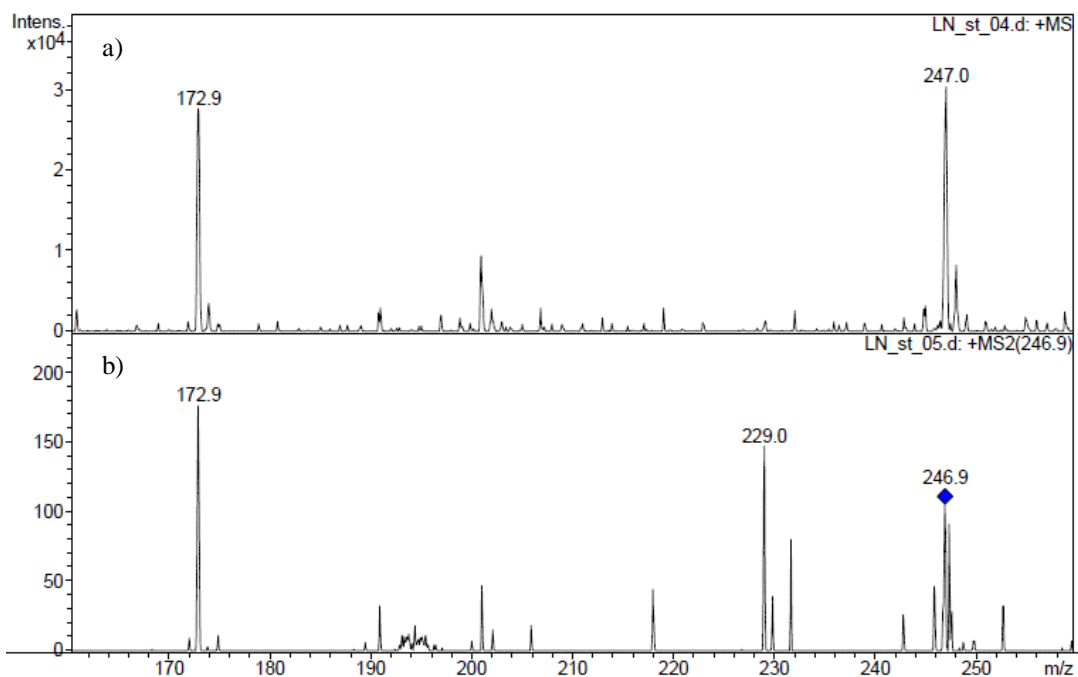
### 4.2.1 Hmotnostní spektrometrie

Hledání případných degradačních produktů vzorku bylo zahájeno jeho přímým nástřikem do hmotnostního spektrometru v pozitivním módu. Ve změřeném spektru byly jasně patrné očekávané ionty  $m/z$  515,1 odpovídající dimeru  $[2M + Na]^+$ ,  $m/z$  247,1 jakožto protonovaná molekula santoninu  $[M + H]^+$  a  $m/z$  269,1, který dopovídá aduktu se sodíkem  $[M + Na]^+$  (obr. 4.5). Pík  $m/z$  413,2, patrný v naměřeném spektru, patří nečistotě z rozpouštědla methanolu (diisooktylfalát).



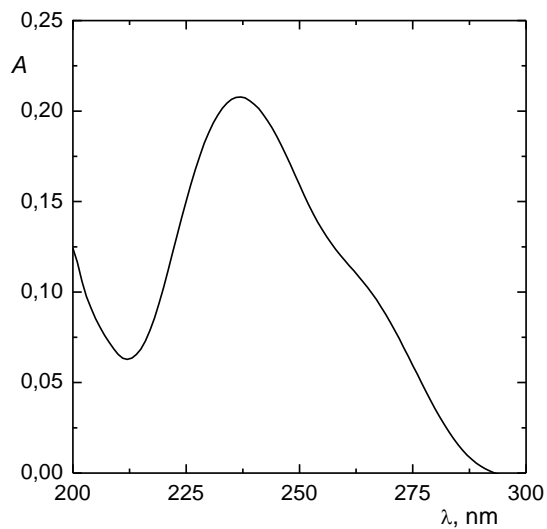
Obr. 4.5: MS spektrum santoninu měřeného v pozitivním módu.

Následně byla provedena fragmentace prekurzorových iontů  $m/z$  515,1 a 247,1. Dimer  $m/z$  515,1 se fragmentoval na monomer  $m/z$  269,1  $[M + Na]^+$  a  $m/z$  246,0  $[M]$ . Při fragmentaci prekurzorového iontu  $m/z$  247,0 vzniká ion  $m/z$  172,9 (obr. 4.6), který podle [33] odpovídá iontu  $[M + H - C_3H_5O_2]^+$ . Dále byl patrný ion  $m/z$  229,0, který však v literatuře nebyl popsán.



Obr. 4.6: MS/MS spektrum santoninu: a) izolace prekurzorového iontu  $m/z$  247 b) dceřinné spektrum vznikající z iontu  $m/z$  247.

Jelikož nebylo známo deklarované množství santoninu ve vzorku ani jeho čistota a vzorek byl uchovávan pouze v láhvi se zábrusem, bylo dále provedeno měření teploty tání na Koflerově bloku. Měření bylo provedeno třikrát, mediánem z těchto měření byla stanovena teplota tání 172,0 °C (relativní směrodatná odchylka byla 0,2 %). V literatuře bývá uváděna teplota tání kolem 173 °C [10], nebo v rozmezí 170–173 °C [42], z čehož vyplývá, že vzorek santoninu byl pravděpodobně čistá látka bez příměsí. To také prokazuje naměřené UV spektrum vzorku (obr. 4.7), které je shodné s UV spektrem uvedeným v literatuře [10].



Obr. 4.7: UV spektrum analyzovaného historického vzorku santoninu v methanolu ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $l = 1 \text{ cm}$ ).

#### 4.2.2 Kvantifikace santoninu ve vzorku

Byla provedena čtyři titrační stanovení, z nichž byl spočítán obsah santoninu ve vzorku jako  $104 \pm 4 \%$  teoretické hodnoty. Výsledek byl zatížen malou pozitivní chybou v mezích normy. Analýzou hmotnostní spektrometrií nebyly nalezeny žádné rozpadové produkty a výsledek stanovení také ukazuje na závěr, že vzorek byl skutečně čistý santonin, který se ani po více než devadesáti letech chemicky nezměnil.

## 5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na analýzu historických vzorků kofeinu a santoninu. Cílem bylo provést MS analýzu vzorků, zjistit přítomnost či nepřítomnost rozpadových produktů léčivých látek a kvantifikovat nalezené látky.

Na hmotnostním spektrometru nebyly nalezeny žádné rozpadové produkty kofeinu ani salicylanu sodného. Kofein byl kvantifikován spektrofotometricky metodou standardního přídávku, salicylan sodný byl kvantifikován spektrofotometricky metodou kalibrační přímky. Byl zjištěn obsah kofeinu ve vzorku  $110 \pm 1$  % deklarované hodnoty, obsah salicylanu sodného byl  $94,33 \pm 0,02$  % deklarované hodnoty.

Analýzou na hmotnostním spektrometru nebyly nalezeny žádné rozpadové produkty santoninu. Vzorek santoninu byl kvantifikován acidobazickou titrací s výsledkem obsahu santoninu ve vzorku  $104 \pm 4$  % teoretické hodnoty, která, podle údajů teploty tání a naměřeného UV spektra vzorku, byla 100 %.

Z výsledků je patrné, že oba historické vzorky lékových forem jsou stabilní i po dobu skladování desítek let.

# Literatura

- [1] Yoshioka, S.; Stella, V.J.: *Stability of Drugs and Dosage Forms*. New York, Kluwer 2002.
- [2] Smith, R.J.; Webb, M.L.: *Analysis of Drug Impurities*. Blackwell 2007.
- [3] Tønnesen, H.H.: *Photostability of Drugs and Drug Formulations*. 2nd ed. Boca Raton, CRC Press 2004.
- [4] 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).
- [5] 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).
- [6] Mohl, S.; Winter, G.: Continuous release of rh-interferon  $\alpha$ -2a from triglyceride implants: Storage stability of the dosage forms. *Pharmaceutical Development and Technology* **11**, 103–110 (2006).
- [7] Nesměrāk, K.; Štícha, M.; Čvančarová, M.: HPLC/MS analysis of historical pharmaceutical preparations of heroin and cocaine. *Analytical Letters* **43**, 2572–2581 (2010).
- [8] Gonzalez, J.R.: Study of atique medicines. *Farmacía Clinica* **6**, 451–2, 454, 457–8 (1989). *CA* **113**:218335.
- [9] Kar, A.: *Medicinal Chemistry*. 4th ed. New Delhi, New Age International 2007.
- [10] *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material*. 4th ed. Pharmaceutical Press 2011.
- [11] Rosal, R.; Rodríguez, A.; Perdigón-Melón, J.A.; Petre, A.; García-Calvo, E.; Gómez, M.J.; Agüera, A.; Fernández-Alba, A.R.: Degradation of caffeine and identification of the transformation products generated by ozonation. *Chemosphere* **74**, 825–831 (2009).
- [12] Williams, H.D.; Barrett, D.A.; Ward, R.; Hardy, I.J.; Melia, C.D.: A liquid chromatography method for quantifying caffeine dissolution from pharmaceutical formulations into colloidal, fat-rich media. *Journal of Chromatography B* **878**, 1739–1745 (2010).
- [13] Buckingham, J.; Baggaley, K.H.; Roberts, A.D.; Szabó, L.F.: *Dictionary of Alkaloids*. 2nd ed. Boca Raton, Taylor & Francis 2010.
- [14] Tsvetkova, B.; Kostkova, B.; Pencheva, I.; Zlatkov, A.; Rachev, D.; Peikov, P.: Validated LC method for simultaneous analysis of paracetamol and caffeine in model tablet. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **4**, 680–684 (2012).
- [15] *Caffeine. Perspectives from Recent Research*. Dews, P., B. (Ed.), Springer 1984, p. 3–38.
- [16] Weimann, A.; Sabroe, M.; Poulsen, H.E.: Measurement of caffeine and five of the major metabolites in urine by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **40**, 307–316 (2005).
- [17] *Český Lékopis 2009*. Praha, Grada 2009.

- [18] Huerta-Fontela, M.; Galceran, M.T.; Ventura, F.: Ultrapformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of stimulatory drugs of abuse in wastewater and surface waters. *Analytical Chemistry* **79**, 3821–3829 (2007).
- [19] Hieda, Y.; Kashimura, S.; Hara, K.; Kageura, M.: Highly sensitive and rapid determination of theophylline, theobromine and caffeine in human plasma and urine by gradient capillary high–performance liquid chromatography – frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **667**, 241–246 (1995).
- [20] Pellegrini, M.; Marchei, E.; Rossi, S.; Vagnerelli, F.; Durgbanshi, A.; García-Algar, Ó.; Vall, O.; Pichini, S.: Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry assay for determination of nicotine and metabolites, caffeine and arecoline in breast milk. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**, 2693–2703 (2007).
- [21] Gómez, M.J.; Gómez-Ramos, M.M.; Malato, O.; Mezcua, M.; Fernández-Alba, A.R.: Rapid automated screening, identification and quantification of organic micro-contaminants and their main transformation products in wastewater and river waters using liquid chromatography–quadrupole–time–of–flight mass spectrometry with an accurate–mass database. *Journal of Chromatography A* **1217**, 7038–7054 (2010).
- [22] Ferrer, I.; Thurman, E.M.: Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1259**, 148–157 (2012).
- [23] Bogusz, M.J.; Hassan, H.; Al-Enazi, E.; Ibrahim, Z.; Al-Tufail, M.: Application of LC–ESI–MS–MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**, 554–564 (2006).
- [24] Zeeb, D.J.; Nelson, B.C.; Albert, K.; Dalluge, J.J.: Separation and identification of twelve catechins in tea using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **72**, 5020–5026 (2000).
- [25] Riedl, O.; Vondráček, V.: *Klinická toxikologie*. 4. vyd. Praha, Avicenum 1971.
- [26] Birladeanu, L.: The stories of santonin and santonic acid. *Angewandte Chemie International Edition* **42**, 1202–1208 (2003).
- [27] Corey, E.J.: The stereochemistry of santonin,  $\beta$ -santonin and artemisin. *Journal of American Chemical Society* **77**, 1044–1045 (1955).
- [28] Arantes, F.F.P.; Barbosa, L.C.A.; Maltha, C.R.A.; Demuner, A.J.; Marçal da Costa, P.M.; Ferreira, J.R.O.; Costa-Lotufo, L.V.; Moraes, M.O.; Pessoa, C.: Synthesis of novel  $\alpha$ -santonin derivatives as potential cytotoxic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **45**, 6045–6051 (2010).
- [29] Kutney, J.P.; Singh, A.K.: The chemistry of thujone. XI. Thujone as a chiral synthon for the preparation of sesquiterpene lactones. Synthesis of (1)- $\alpha$ -santonin. *Canadian Journal of Chemistry* **62**, 2813–2817 (1984).
- [30] Morishima, E.: The fate of santonin in rabbit and man and the influence of dehydrocholic acid on it. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **57**, 353–362 (1961). *CA* **58**:5101.
- [31] Yang, L.; Dai, J.; Sakai, J.-I.; Ando, M.: Biotransformation of  $\alpha$ - and  $6\beta$ -santonin by fungus and plant cell cultures. *Journal of Asian Natural Products Research* **8**, 317–326 (2006).

- [32] Badria, F.A.; Zaghoul, A.M.; Maatooq, G.T.; El-Sharkawy, S.H.: Biotransformation of  $\alpha$ -santonin. *International Journal of Pharmacognosy* **35**, 375–378 (1997).
- [33] Ata, A.; Nachtigall, J.A.: Microbial transformations of  $\alpha$ -santonin. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* **59**, 209–214 (2004).
- [34] Hrdý, O.; Jindra, A.; Jung, Z.; Šlouf, A.; Zýka, J.: *Kvantitativní analýza léčiv*. Praha, Státní zdravotnické nakladatelství 1957.
- [35] Montsko, G.; Boros, B.; Takatsy, A.; Ohmacht, R.; Glasl, S.; Krenn, L.; Mark, L.; Reznicek, G.: Separation of sesquiterpenes from yarrow (*Achillea millefolium* L. s. I.) by LC-MS on non-porous columns. *Chromatographia* **67**, 467–470 (2008).
- [36] Glasl, S.; Kastner, U.; Jurenitsch, J.; Kubelka, W.: Qualitative and quantitative determination of sesquiterpenoids in *Achillea* species by reversed-phase high-performance liquid chromatography, mass-spectrometry and thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography B* **729**, 361–368 (1999).
- [37] Mol, H.G.J.; Van Dam, R.C.J.; Zomer, P.; Mulder, P.P.J.: Screening of plant toxins in food, feed and botanicals using full-scan high-resolution (Orbitrap) mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants* **28**, 1405–1423 (2011).
- [38] Semenova, O.P.; Timerbaev, A.R.; Bonn, G.K.: Application of high-performance liquid chromatography to the determination of bitter principles of pharmaceutical relevance. *Journal of Chromatography A* **667**, 327 – 333 (1994).
- [39] Aitzetmüller, K.: HPLC of santonin and phenolphthalein in anthelmintic tablets. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications* **1**, 220 (1978).
- [40] Kang, L.; Yap, C.W.; Lim, P.F.C.; Chen, Y.Z.; Ho, P.C.; Chan, Y.W.; Wong, G.P.; Chan, S.Y.: Formulation development of transdermal dosage forms: Quantitative structure-activity relationship model for predicting activities of terpenes that enhance drug penetration through human skin. *Journal of Controlled Release* **120**, 211–219 (2007).
- [41] *Deutsches Arzneibuch*. 6. Ausgabe. Berlin 1926, s. 166.
- [42] Yanagita, M.; Tahara, A.: Santonin and related compounds. IV. Tetrahydrosantonins. *Journal of Organic Chemistry* **20**, 959–970 (1955).