

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Mgr. Karel Kudláček

**Analýza složení a degradace léčivých látek
a léčivých přípravků z 18. a 20. století**

**Analysis of the composition and degradation
of pharmaceutical substances and pharmaceutical preparations
from the 18th and 20th centuries**

Dizertační práce

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

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 5. prosince 2020

Poděkování

Poděkování patří především doc. RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D. za cenné rady a odborné vedení po celé doktorské studium. Děkuji také RNDr. Martinu Štíchovi, Ph.D. a RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D. za odborné konzultace při analýze hmotnostní spektrometrií, dále italským kolegům Dr. Jacopovi La Nasa a Prof. Marii Perle Colombini za umožnění analýz historických pozůstatků mastí a v neposlední řadě také PharmDr. Janu Babicovi, Ph.D. z Českého farmaceutického muzea a Mgr. Janě Kunešové z Národního muzea v Praze za poskytnutí vzorků.

Abstrakt

Dizertační práce se zaměřila na analýzu dvaceti historických pozůstatků léčivých látek a léčivých přípravků datovaných do 18. a 20. století metodami kapalinové a plynové chromatografie s UV spektrometrickou a hmotnostní detekcí. Analytický přístup byl zvolen s ohledem na stáří a lékovou formu analyzovaného léčivého přípravku. Autenticita historických léčivých látek a léčivých přípravků byla ověřena identifikací účinných látek, jejich možných degradačních produktů a dalších pomocných látek tandemovou hmotnostní spektrometrií a případně porovnáním s novodobými referenčními materiály. Tandemovou hmotnostní spektrometrií byla rovněž studována fragmentace vybraných analytů. Stabilita historických pozůstatků léčiv z 20. století byla hodnocena na základě poklesu koncentrace účinných látek v porovnání s obsahem deklarovaným výrobcí nebo v případě historických pozůstatků léčiv z 18. století na základě porovnání koncentrací účinných látek stanovených v historickém pozůstatku a v současném referenčním materiálu. K analýze historických pozůstatků mastí byl použit multianalytický přístup kombinující pět analytických metod, jejichž výsledky se vzájemně doplňují. Zatímco účinné látky identifikované v droze ipekakuanhy byly nalezeny částečně degradované, v extraktu senny byly degradovány zcela. V případě léčivých přípravků alkaloidů opia byl navržen marker určující stáří těchto přípravků na základě poměru stanovených koncentrací noskapinu a jeho přímého degradačního produktu kotarninu. Pro analýzu historických injekčních přípravků z 20. století byly vyvinuty nové separační metody; HILIC-UV pro analýzu g-strofantinu, který degradoval z poloviny a HPLC-MS pro analýzu neosalvarsanu, který byl nalezen zcela degradovaný. Multianalytickým přístupem pro studium historických pozůstatků mastí z 18. století byl nejen identifikován masťový základ a některé z účinných látek, ale také byla odhalena úprava postupů přípravy některých mastí. Stejným přístupem bylo odhaleno složení mastí z 20. století, jejichž recepty se nedochovaly. Z výsledků byl odhadnut původní pravděpodobný účel těchto mastí. Byly tak vyvinuty nové analytické metody, jejichž výsledky přispívají k rozšíření informací o stabilitě chemických sloučenin v dlouhodobém časovém měřítku. Práce rovněž přinesla nové poznatky v oboru historie farmacie.

Klíčová slova: dlouhodobá stabilita, degradace, GC-MS, hmotnostní spektrometrie, HPLC-MS, rozklad

Abstract

The dissertation focused on the analysis of twenty historical remains of pharmaceutical substances and pharmaceutical preparations dating to the 18th and 20th century by liquid and gas chromatography with UV-spectrometric or mass spectrometric detection. The analytical approach was chosen with regards to the age and pharmaceutical forms of the analyzed historical remain. The authenticity of the sample was verified by identifying the active ingredients, their possible degradation products and other excipients by tandem mass spectrometry. The fragmentation of some analytes was also studied by tandem mass spectrometry. The stability of historical pharmaceutical preparations from the 20th century was assessed on the basis of a decrease in the concentration of active substances compared to the content declared by the manufacturer or, in case of historical pharmaceutical remains from the 18th century, on the basis of active substance concentrations determined in the historical residue and current reference material. A multi-analytical approach combining five analytical methods, the results of which complement each other, was used to analyze the historical remains of ointments. While the active substances identified in ipecacuanha were found to be partially degraded, they were completely degraded in senna extract. In the case of pharmaceutical preparations containing opium alkaloids, a marker based on the ratio of the determined concentrations of noscapine and its direct degradation product cocarnine was designed to determine the age of these products. New separation methods for the analysis historical injection preparations from the 20th century have been developed. Ouabain analyzed by HILIC-UV method was found a half degraded and neosalvarsan analyzed by HPLC-MS method was found to be completely degraded. A multi-analytical approach for the study of historical ointment residues from the 18th century not only identified the ointment base and some of the active substances, but also revealed the modification of the procedures for the preparation of some ointments. The same approach revealed the composition of ointments from the 20th century, whose recipes have not been preserved. The original probable purpose of these ointments was estimated from the results. Thus, new analytical methods have been developed, the results of which contribute to the dissemination of information on the stability of chemical compounds in the long term. The work also brought new knowledge in the field of pharmacy history.

Key-words: decomposition, degradation, GC-MS, long term stability, mass spectrometry, HPLC-MS

Obsah

| | |
|---|-----------|
| Seznam zkratk a veličin..... | 10 |
| Seznam zkratk triacylglycerolů | 11 |
| 1 Úvod, cíl a rozvržení práce..... | 14 |
| 2 Teoretická východiska..... | 16 |
| 2.1 Analytická chemie při studiu historických farmaceutik | 16 |
| 2.1.1 Prehistorie | 17 |
| 2.1.2 Starověk | 18 |
| 2.1.2.1 Starověký Blízký východ..... | 18 |
| 2.1.2.2 Starověký Egypt..... | 19 |
| 2.1.2.3 Období helénismu..... | 20 |
| 2.1.2.4 Předkolumbovská Amerika..... | 21 |
| 2.1.2.5 Starověká Čína..... | 22 |
| 2.1.3 Středověk | 23 |
| 2.1.4 Renesance, baroko a osvícenství | 23 |
| 2.1.4.1 Dobové látky používané ve farmacii | 23 |
| 2.1.4.2 Analýza mastí | 24 |
| 2.1.4.3 Iatrochemické preparáty | 25 |
| 2.1.5 Farmaka z 19. a 20. století | 26 |
| 2.1.5.1 Patentní přípravky..... | 26 |
| 2.1.5.2 Hromadně vyráběné léčivé přípravky..... | 27 |
| 2.1.6 Shnutí..... | 28 |
| 2.2 Stabilita a degradační cesty léčivých látek a léčivých přípravků..... | 31 |
| 2.2.1 Studium stability farmak, stabilitní testy | 31 |
| 2.2.2 Degradální cesty farmak | 32 |
| 2.3 Původ a kontext studovaných vzorků | 33 |
| 2.4 Literatura ke 2. kapitole..... | 33 |
| 3 Materiály a metody..... | 39 |
| 3.1 Použité chemikálie..... | 39 |
| 3.1.1 Standardy účinných látek..... | 39 |
| 3.1.2 Ostatní použité chemikálie..... | 40 |
| 3.2 Použité přístroje | 40 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.3 | Metody pro zpracování a analýzu naměřených dat..... | 41 |
| 3.4 | Literatura ke 3. kapitole..... | 42 |
| 4 | Alkaloidy ipekakuanhy | 43 |
| 4.1 | Chemické složení, historie využití ipekakuanhy | 43 |
| 4.2 | Degradační cesty alkaloidů ipekakuanhy..... | 44 |
| 4.3 | Popis vzorků | 45 |
| 4.4 | Výsledky a diskuse | 46 |
| 4.4.1 | Optimalizace extrakce..... | 46 |
| 4.4.2 | Příprava vzorku k analýze..... | 47 |
| 4.4.3 | Optimalizace HPLC separace | 47 |
| 4.4.4 | Aplikace optimalizované metody na historické vzorky | 48 |
| 4.4.5 | Hmotnostní spektrometrie alkaloidů ipekakuanhy | 50 |
| 4.5 | Závěr | 53 |
| 4.6 | Literatura ke 4. kapitole..... | 54 |
| 5 | Alkaloidy opia | 56 |
| 5.1 | Chemické složení, historie využití alkaloidů opia | 56 |
| 5.2 | Degradační cesty alkaloidů opia | 57 |
| 5.3 | Popis vzorků | 57 |
| 5.4 | Výsledky a diskuse | 58 |
| 5.4.1 | Optimalizace extrakce alkaloidů opia..... | 59 |
| 5.4.2 | Příprava vzorku k analýze..... | 59 |
| 5.4.3 | Optimalizace HPLC separace | 59 |
| 5.4.4 | Aplikace optimalizované metody na historické vzorky..... | 60 |
| 5.4.5 | Kvantifikace vybraných alkaloidů | 64 |
| 5.4.6 | Hmotnostní spektrometrie vybraných alkaloidů opia | 66 |
| 5.5 | Závěr | 69 |
| 5.6 | Literatura k 5. kapitole..... | 70 |
| 6 | Glykosidy senny | 72 |
| 6.1 | Chemické složení senny a historie jejího využití..... | 72 |
| 6.2 | Degradační cesty sennosidů..... | 73 |
| 6.3 | Popis vzorku | 74 |
| 6.4 | Výsledky a diskuse | 74 |
| 6.4.1 | Optimalizace extrakce glykosidů senny..... | 75 |
| 6.4.2 | Příprava vzorku k analýze..... | 75 |
| 6.4.3 | Optimalizace HPLC separace | 75 |
| 6.4.4 | Aplikace optimalizované metody na historický vzorek..... | 76 |
| 6.4.5 | Hmotnostní spektrometrie sennosidu A a sennosidu B | 79 |
| 6.5 | Závěr | 81 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 6.6 | Literatura k 6. kapitole..... | 82 |
| 7 | Srdeční glykosidy | 84 |
| 7.1 | Chemické složení, historie využití..... | 84 |
| 7.2 | Degradační cesty g-strofantinu | 85 |
| 7.3 | Popis vzorku | 85 |
| 7.4 | Výsledky a diskuse | 86 |
| 7.4.1 | Příprava vzorku..... | 86 |
| 7.4.2 | Optimalizace HPLC separace | 86 |
| 7.4.3 | Aplikace metody na historický vzorek | 87 |
| 7.4.4 | Kvantifikace g-strofantinu | 89 |
| 7.4.5 | Hmotnostní spektrometrie g-strofantinu..... | 90 |
| 7.5 | Závěr | 93 |
| 7.6 | Literatura k 7. kapitole..... | 93 |
| 8 | Neosalvarsan | 95 |
| 8.1 | Chemické složení, historie využití..... | 95 |
| 8.2 | Degradační cesty salvarsanu a neosalvarsanu..... | 96 |
| 8.3 | Popis vzorku | 96 |
| 8.4 | Výsledky a diskuse | 97 |
| 8.4.1 | Příprava vzorku..... | 97 |
| 8.4.2 | Optimalizace HPLC separace | 97 |
| 8.4.3 | Aplikace optimalizované metody na historický vzorek..... | 98 |
| 8.4.4 | Hmotnostní spektrometrie nalezených analytů..... | 99 |
| 8.5 | Závěr | 101 |
| 8.6 | Literatura k 8. kapitole..... | 102 |
| 9 | Analýza historických pozůstatků mastí | 104 |
| 9.1 | Chemické složení mastí | 104 |
| 9.2 | Degradace masťových základů | 105 |
| 9.3 | Metody analýzy pozůstatků historických mastí..... | 106 |
| 9.3.1 | Metoda GC-MS screeningu | 106 |
| 9.3.2 | Analýza těkavých komponent metodou SPME-GC-MS | 107 |
| 9.3.3 | Charakterizace triacylglycerolů metodou RP-HPLC-MS ² | 108 |
| 9.3.4 | Charakterizace metodou FIA-MS | 110 |
| 9.3.5 | Stanovení účinných látek mastí metodou HPLC-UV | 110 |
| 9.4 | Analyzované vzorky a materiály | 110 |
| 9.4.1 | Vzorky historických pozůstatků mastí z 18. století | 111 |
| 9.4.2 | Vzorky historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století..... | 115 |
| 9.4.3 | Vzorky novodobých referenčních materiálů masťových základů | 116 |
| 9.5 | Experimentální část | 117 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 9.5.1 | Metoda GC-MS screeningu | 117 |
| 9.5.2 | Analýza těkavých komponent metodou SPME-GC-MS | 118 |
| 9.5.3 | Charakterizace triacylglycerolů metodou RP-HPLC-MS ² | 118 |
| 9.5.4 | Charakterizace metodou FIA-MS | 119 |
| 9.5.5 | Stanovení účinných látek mastí metodou HPLC-UV | 119 |
| 9.6 | Výsledky a diskuse | 121 |
| 9.6.1 | Triacylglycerolové profily | 121 |
| 9.6.2 | Analýza historických pozůstatků mastí z 18. století | 129 |
| 9.6.2.1 | Metoda GC-MS screeningu | 129 |
| 9.6.2.2 | Analýza těkavých látek metodou SPME-GC-MS | 133 |
| 9.6.2.3 | Charakterizace triacylglycerolů metodou RP-HPLC-MS ² | 135 |
| 9.6.2.4 | Charakterizace metodou FIA-MS | 139 |
| 9.6.3 | Analýza historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století | 144 |
| 9.6.3.1 | Metoda GC-MS screeningu | 144 |
| 9.6.3.2 | Analýza těkavých látek metodou SPME-GC-MS | 148 |
| 9.6.3.3 | Charakterizace triacylglycerolů metodou RP-HPLC-MS ² | 151 |
| 9.6.3.4 | Charakterizace metodou FIA-MS | 155 |
| 9.6.3.5 | Kvantifikace vybraných účinných a pomocných látek metodou HPLC-UV | 159 |
| 9.7 | Závěr | 160 |
| 9.7.1 | Analýza historických pozůstatků mastí z 18. století | 160 |
| 9.7.2 | Analýza historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století | 161 |
| 9.8 | Literatura k 9. kapitole | 163 |
| 10 | Závěr | 167 |
| | Přílohy | 169 |

Seznam zkratek a veličin

| | |
|-----------|--|
| AAS | atomová absorpční spektrometrie |
| A | rozdíl retenčního času píku a retenčního času v 10% výšce píku na jeho vzestupné části [min] |
| A_s | faktor symetrie píku |
| B | rozdíl retenčního retenčního času v 10% výšce píku na jeho sestupné části a retenčního času píku [min] |
| F | průtok mobilní fáze [$\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$] |
| FT | Fourierova transformace |
| GC | gas chromatography (plynová chromatografie) |
| h | výška šumu |
| H | výška píku |
| HILIC | hydrophilic interaction chromatography (hydrofilní interakční chromatografie) |
| HPLC | high performance liquid chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie) |
| ChA | chemická analýza |
| ICP | inductively coupled plasma (indukčně vázané plasma) |
| IR | infrared spectrometry (infračervená spektrometrie) |
| LC | liquid chromatography (kapalinová chromatografie) |
| MS | mass spectrometry (hmotností spektrometrie) |
| MxA | multianalytický přístup |
| n | počet teoretických pater |
| NMR | nukleární magnetická resonance |
| PC | paper chromatography (papírová chromatografie) |
| $R_{1,2}$ | rozlišení píků |
| RIA | radioimmunoassay (radioimunologické stanovení) |
| RP | reverse phase (technika na obrácených fázích) |
| S/N | signal-to-noise ratio (podíl signálu k šumu) |
| SEM | skenovací elektronová mikroskopie |
| SERS | surface-enhanced Raman scattering (povrchem zesílený Ramanův rozptyl) |
| SPME | solid-phase microextraction (mikroextrace z tuhé fáze) |
| TLC | thin-layer chromatography (tenkovrstevná chromatografie) |
| TOF | time-of-flight mass spectrometry (český výraz se nepoužívá) |
| t_r | retenční čas [min] |
| UHPLC | ultra-high performance liquid chromatography (ultravysokoučinná kapalinová chromatografie) |
| UV | ultraviolet (ultrafialový) |
| w | šířka píku při základně [min] |
| $w_{1/2}$ | šířka píku v polovině výšky [min] |
| XPS | X-ray photoelectron spectroscopy (rentgenová fotoelektronová spektroskopie) |
| XRD | X-ray diffraction (rentgenová difrakce) |
| XRF | X-ray fluorescence (rentgenová fluorescence) |

Seznam zkratek triacylglycerolů

| | |
|--------|--|
| ALO | arachidoyllinoleoyloleoylglycerol |
| AOO | arachidoyldioleoylglycerol |
| AOP | arachidoyleoylpalmitoylglycerol |
| APPa | arachidoypalmitoylpentadecoylglycerol |
| APS | arachidoypalmitoylstearylglycerol |
| BPS | behenoylpalmitoylstearylglycerol |
| CaLO | kaprinoyllinoleoyloleoylglycerol |
| CaLP | kaprinoyllinoleoylpalmitoylglycerol |
| CaMO | kaprinoylmyristoyloleoylglycerol |
| CaMP | kaprinoylmyristoylpalmitoylglycerol |
| CaOO | kaprinoyldioleoylglycerol |
| CaOP | kaprinoyleoylpalmitoylglycerol |
| CaOS | kaprinoyleoylstearylglycerol |
| CaPS | kaprinoypalmitoylstearylglycerol |
| CyOP | kaproyloleoylpalmitoylglycerol |
| CyPP | kaproyldipalmitoylglycerol |
| ErErL | dierukoyllinoleoylglycerol |
| ErErLn | dierukoyllinolenoylglycerol |
| ErErO | dierukoyleoylglycerol |
| ErGL | erukoylgondooyllinoleoylglycerol |
| ErGLn | erukoylgondooyllinolenoylglycerol |
| ErGO | erukoylgondooyloleoylglycerol |
| ErLO | erukoyllinoleoyloleoylglycerol |
| ErLP | erukoyllinoleoylpalmitoylglycerol |
| ErOO | erukoylidioleoylglycerol |
| ErOP | erukoyleoylpalmitoylglycerol |
| ELP | eikosatrienoyllinoleoylpalmitoylglycerol |
| GGO | digondooyloleoylglycerol |
| GGP | digondooylpalmitoylglycerol |
| GOS | gondooyloleoylstearylglycerol |
| GPS | gondooylpalmitoylstearylglycerol |
| LaMO | lauroylmyristoyloleoylglycerol |
| LaMP | lauroylmyristoylpalmitoylglycerol |
| LaOP | lauroyleoylpalmitoylglycerol |
| LaPP | lauroyldipalmitoylglycerol |
| LaPPo | lauroylpalmitoylpalmitooleoylglycerol |
| LaPS | lauroylpalmitoylstearylglycerol |
| LiPP | lignoceroyldipalmitoylglycerol |
| LiPPa | lignoceroylpalmitoylpentadecoylglycerol |
| LLaO | linoleoyllauroyleoylglycerol |
| LLaP | linoleoyllauroylpalmitoylglycerol |
| LLL | trilinoleoylglycerol |
| LLLn | dilinoleoyllinolenoylglycerol |

| | |
|--------|--|
| LLM | dilinoleoylmyristoylglycerol |
| LLMo | dilinoleoylmyristooeoylglycerol |
| LLnM | linoleoyllinolenoylmyristoylglycerol |
| LLnO | linoleoyllinolenoyloeoylglycerol |
| LLnP | linoleoyllinolenoylpalmitoylglycerol |
| LLnPo | linoleoyllinolenoylpalmitooeoylglycerol |
| LLO | dilinoleoyloleoylglycerol |
| LLP | dilinoleoylpalmitoylglycerol |
| LLPo | dilinoleoylpalmitooeoylglycerol |
| LLRn | dilinoleoylricinoeoylglycerol |
| LMM | linoleoyldimyrystoylglycerol |
| LMO | linoleoylmyristoyloeoylglycerol |
| LMoP | linoleoylmyristooeoylpalmitoylglycerol |
| LMPo | linoleoylmyristoylpalmitooeoylglycerol |
| LnLnP | dilinolenoylpalmitoylglycerol |
| LnLnS | dilinolenoylstearylglycerol |
| LnMP | linolenoylmyristoylpalmitoylglycerol |
| LnOP | linolenoyloeoylpalmitoylglycerol |
| LnOPo | linolenoyloeoylpalmitooeoylglycerol |
| LnPP | linolenoyldipalmitoylglycerol |
| LnPPo | linilenoylpalmitoylpalmitooeoylglycerol |
| LOO | linoleoyldioeoylglycerol |
| LOP | linoleoyloeoylpalmitoylglycerol |
| LOPo | linoleoyloeoylpalmitooeoylglycerol |
| LORn | linoleoyloeoylricinoeoylglycerol |
| LOS | linoleoyloeoylstearylglycerol |
| LPoPo | linoleoyldipalmitooeoylglycerol |
| LPP | linoleoyldipalmitoylglycerol |
| LPS | linoleoylpalmitoylstearylglycerol |
| LRnRn | linoleoyldiricinoeoylglycerol |
| LRnS | linoleoylricinoeoylstearylglycerol |
| MaLS | margaroyllinoleoylstearylglycerol |
| MaMaMa | trimargaroylglycerol |
| MaMaPa | dimargaroylpentadecoyleoylglycerol |
| MaOO | margaroyldioeoylglycerol |
| MaOP | margaroyloeoylpalmitoylglycerol |
| MaOS | margaroyloeoylstearylglycerol |
| MaPaPa | margaroyldipentadecoyleoylglycerol |
| MaPP | margaroyldipalmitoylglycerol |
| MaPPa | margaroylpalmitoylpentadecoyleoylglycerol |
| MaPS | margaroylpalmitoylstearylglycerol |
| MaSS | margaroyldistearoylglycerol |
| MMaPo | myristoylmargaroylpalmitooeoylglycerol |
| MmMaMa | heptadecenoyldimargaroylglycerol |
| MMO | dimyrystoyloeoylglycerol |
| MMoP | myristoylmiristooleoylpalmitoylglycerol |
| MMP | dimyrystoylpalmitoylglycerol |
| MMPo | dimyrystoylpalmitooeoylglycerol |
| MmPP | heptadecenoyldipalmitoylglycerol |
| MmPPo | heptadecenoylpalmitoylpalmitooeoylglycerol |
| MMS | dimyrystoylstearylglycerol |

| | |
|--------|---|
| MOO | myristoyldioleoylglycerol |
| MOP | myristoyloleoylpalmitoylglycerol |
| MOPa | myristoyloleoylpentadecoylglycerol |
| MOPo | myristoyloleoylpalmitooleoylglycerol |
| MoPP | myristooleoyldipalmitoylglycerol |
| MOS | myristoyloleoylstearyl glycerol |
| MPaPa | myristoyldipentadecoylglycerol |
| MPaPo | myristoylpentadecoylpalmitoylglycerol |
| MPP | myristoyldipalmitoylglycerol |
| MPPa | myristoylpalmitoylpentadecoylglycerol |
| MPPo | myristoylpalmitoylpalmitooleoylglycerol |
| MPS | myristoylpalmitoylstearyl glycerol |
| NPS | nonadecoylpalmitoylstearyl glycerol |
| OOO | trioleoylglycerol |
| OOP | dioleoylpalmitoylglycerol |
| OOPo | dioleoylpalmitooleoylglycerol |
| OOS | dioleoylstearyl glycerol |
| OPoPo | oleoyldipalmitooleoylglycerol |
| OPP | oleoyldipalmitoylglycerol |
| OPPa | oleoylpalmitoylpentadecoylglycerol |
| OPPo | oleoylpalmitoylpalmitooleoylglycerol |
| OPS | oleoylpalmitoylstearyl glycerol |
| ORnRn | oleoyldiricinoleoylglycerol |
| OSS | oleoyldistearoylglycerol |
| PaPaPa | tripentadecoylglycerol |
| PaPaPo | dipentadecoylpalmitooleoylglycerol |
| PaPaS | dipentadecoylstearyl glycerol |
| PMMa | palmitoylmyristoylmargaroylglycerol |
| PoPoS | dipalmitooleoylstearyl glycerol |
| PoSS | palmitooleoyldistearoylglycerol |
| PPaPa | palmitoyldipentadecoylglycerol |
| PPaPo | palmitoylpentadecoylpalmitooleoylglycerol |
| PPaS | palmitoylpentadecoylstearyl glycerol |
| PPoPo | palmitoyldipalmitooleoylglycerol |
| PPoS | palmitoylpalmitooleoylstearyl glycerol |
| PPP | tripalmitoylglycerol |
| PPPa | dipalmitoylpentadecoylglycerol |
| PPPo | dipalmitoylpalmitooleoylglycerol |
| PPS | dipalmitoylstearyl glycerol |
| PpSS | pentadecenoyldistearoylglycerol |
| PSS | palmitoyldistearoylglycerol |
| RnRnRn | triricinoleoylglycerol |
| SSS | tristearoylglycerol |

1 Úvod, cíl a rozvržení práce

Chemická analýza historických materiálů a artefaktů je velmi atraktivním zaměřením analytické chemie, protože výjimečnost a jedinečnost vzorků vyžaduje pro získání relevantních výsledků použití multianalytického přístupu kombinovaného se znalostmi z jiných oborů. Výsledkem je nejen znalost složení vzorku, ale zejména získání informací o vědeckých a kulturních znalostech našich předků.

Předkládaná dizertační práce se zabývá studiem historických pozůstatků léčivých látek a léčivých přípravků z 18. a 20. století. Analýzy takových vzorků umožňují (1) odhalit vědecko-technologický pokrok v oblasti chemie a farmacie, (2) posoudit kontext historických uměleckých předmětů z vybavení lékáren a farmaceutických provozů (například stojatky pro uchovávání farmaceutik), (3) nahlížet na léčivé látky a léčivé přípravky v dobovém sociálním kontextu. Vzorky historických pozůstatků léčiv a léčivých přípravků vyžadují rozdílné analytické přístupy podle doby, kdy byly vyrobeny, a v případě léčivých přípravků také podle použité lékové formy. Historické léčivé přípravky staršího data byly často připravovány mísením řady ingrediencí a obvykle mají – narozdíl od novodobých léčivých přípravků – velmi komplikované chemické složení. Podobně lze komplexnost chemického složení dělit podle lékové formy. Zatímco injekční přípravky jsou poměrně jednoduchými roztoky účinných látek, masti a pasty obsahují daleko složitější směsi aktivních látek s pomocnými látkami.

Cílem této dizertační práce je analýza řady historických pozůstatků léčivých látek a léčivých přípravků, včetně návrhu a optimalizace analytických metod pro tento účel. První, teoretická část práce, prezentovaná ve 2. kapitole dizertace, podrobně diskutuje rozdílné přístupy k analýze léčivých látek a léčivých přípravků a podává přehled dosud publikovaných prací na toto téma. Třetí kapitola práce, obecná experimentální část, přináší popis použitých chemikálií, přístrojů a základních postupů použitých při vypracování dizertační práce. Následující kapitoly přináší dosažené výsledky pro jednotlivé skupiny účinných látek, seřazených podle datace vzorků.

První skupinu léčivých látek a přípravků datovaných do 18. století tvoří vzorky, které byly připraveny především z přírodních materiálů. Ve 4. kapitole jsou prezentovány výsledky analýz dvou dochovaných vzorků drogy ipekakuanhy. V 5. kapitole je pojednáno o výsledcích analýz léčivých přípravků s obsahem opiových alkaloidů, které byly připravovány složitějšími postupy, jako je mísení více ingrediencí nebo extrakce účinných látek alkoholem. Dosažené výsledky navíc umožnily navrhnout kritérium pro datování stáří takových vzorků. Extrakcí, resp. vyloučením, vodou byl připraven léčivý přípravek s obsahem glykosidů senny, jehož analýza je námětem 6. kapitoly práce.

Druhou skupinu analyzovaných vzorků tvoří léčivé přípravky vyrobené v první polovině 20. století, které se od přípravků z 18. století poměrně liší. Účinné látky byly po izolaci z přírodních materiálů vyčištěny a bylo možné je podávat pacientovi v dokonalejších lékových formách. Významnou lékovou formou, v předchozích dobách neznámou, jsou injekční přípravky, jejichž studium je zajímavé

vzhledem k dobře izolovanému prostředí vzorku díky skleněným ampulím, ve kterých byly přípravky dodávány. Příkladem takového injekčního roztoku je přípravek s obsahem srdečních glykosidů, jehož analýza je popsána v 7. kapitole dizertační práce. Zvláštním injekčním případem je pak analýza injekce neosalvarsanu uvedená v 8. kapitole. Jedná se o přípravek, dodávaný kvůli stabilitě jako suchý prášek, který byl rozpouštěn až před podáním pacientovi.

Poslední, devátá kapitola dizertační práce je zaměřena na analýzu mastí z 18. a 20. století. Komplexní chemické složení těchto léčivých přípravků totiž vyžaduje multianalytický přístup, při němž se výsledky jednotlivých metod vzájemně doplňují.

V příloze dizertační práce jsou uvedeny publikační výstupy, které při jejím řešení vznikly.

2 Teoretická východiska

Jak bylo definováno v předchozí kapitole, je cílem této dizertační práce analýza historických léčivých látek a léčivých přípravků. V této kapitole jsou proto nejprve shrnuty dosud v literatuře popsány případy analýz historických farmaceutik, následně je podán základní přehled možných degradačních cest léčivých látek a konečně je popsán původ a kontext vzorků analyzovaných v této dizertační práci.

2.1 Analytická chemie při studiu historických farmaceutik

Chemické analýzy archeologických nálezů a historických relikvií byly sice prováděny již na konci 18. století¹, s analýzou historických farmaceutických přípravků se setkáváme až koncem 19. století. Pravděpodobně první byla analýza kosmetického přípravku starověkých Egyptanů, kterou provedl v roce 1892 farmaceut Xaver Fischer z University v Erlangenu².

Pro analýzu historických pozůstatků léčivých látek a léčivých přípravků existuje několik důvodů. Prvotním je samozřejmě zjištění chemického složení analyzovaného objektu, aby bylo možné určit jeho význam a účel jak v historickém, tak farmaceutickém kontextu.

Dalším významným účelem takových analýz je objasnění původních receptur, kdy je analýza historického vzorku doprovázena simultánní analýzou čerstvě zhotoveného přípravku, reprodukováného podle dobových předpisů (za přesně dodržovaných původních podmínek, například za použití měděné misky namísto skleněné). Důvodem je, že historická farmaceutická literatura není vždy jednoznačně srozumitelná. Přístup je podobný trendům v experimentální archeologii či historii chemie a alchymie^{3,4}, a je někdy nazýván experimentálně-analytickou metodou. Poprvé byl použit Wolfgangem Schneiderem a jeho spolupracovníky z Univerzity v Braunschweigu koncem 50. let 20. století^{5,6}, je ale používán zřídka. Výsledky těchto experimentů mohou navíc napomoci při znovuobjevování nových léčiv ve starověké literatuře⁷.

Studium stability a identifikace možných degradačních produktů je rovněž podstatným důvodem proč analyzovat historické pozůstatky léčivých látek a léčivých přípravků. Analýzou lze posoudit, jak se mění jejich složení v průběhu desetiletí či dokonce staletí. Stabilita léčivých přípravků je obvykle studována v řádu měsíců, případně několika let od jejich výroby^{8,9}. Podle některých studií je ale zřejmé, že mnoho léčivých přípravků neztrácí svůj účinek ani po několika desetiletích. Například Zilker a kol.¹⁰ analyzovali titračně a chromatograficky padesát léčivých přípravků stáří dvacet až třicet let (místy i více) ze sbírky Farmaceutického ústavu ve Würzburgu. Účinné látky patří mezi β -blokátory, β -sympatomimetika, anticholinergika, protiinfekční přípravky, nesteroidní protizánětlivé přípravky, antipsychotika, antihistaminika a jedno antiarytmikum. Bylo zjištěno, že 44 ze 49 testovaných látek stále vyhovuje specifikacím dnešních lékopisů. Cantrell a kol.¹¹ analyzovali osm léčivých

přípravků s odlišnými účinnými látkami z maloobchodních lékáren, které expirovaly před 28 až 40 lety. Pomocí RP-HPLC-TOF našli u 86 % testovaných látek koncentraci nejméně 90 % z deklarovaného množství. Autoři se domnívají, že prodloužení expirace by mohlo přinést úspory ve zdravotnictví. Na degradaci léčivých látek a léčivých přípravků ale nemá vliv jen doba uplynulá od jejich výroby, ale také podmínky skladování. Běžně se sleduje vliv teploty a relativní vlhkosti na léčivý přípravek. V různých časových intervalech se pak stanovuje obsah účinné látky a případný nárůst rozkladných produktů¹² (podrobněji odd. 2.2). Jak ukazuje publikace Du a kol.¹³, stabilitu mohou určovat i jiné vlivy. V této výjimečné studii autoři porovnávali obsah účinných látek dvou skupin léčivých přípravků. První skupina byla uskladněna na vesmírné stanici ISS, druhou skupinu tvořily kontrolní vzorky, které byly uskladněny na Zemi. Analyzované léčivé přípravky navrácené z vesmírné mise vykazovaly ve větším množství případů nižší obsah účinné látky, než příslušné pozemské kontrolní vzorky. Zatímco teplota a vlhkost byly po dobu skladování na vesmírné stanici konstantní, kumulativní expozice ionizačního záření s časem narůstala. Jedním z možných vysvětlení narušení stability tedy může být radiace, druhým vysvětlením pak může být přebalování léčivých přípravků do specifických obalů vhodných k použití ve vesmíru.

V neposlední řadě výsledky analýz historických pozůstatků léčivých látek a léčivých přípravků mohou napomoci při konzervaci objektů a jejich uchování v muzejních sbírkách. Tento důležitý, ale často podceňovaný aspekt je diskutován literaturou^{14,15}.

Následuje přehled analýz historických pozůstatků léčivých látek a léčivých přípravků popsaných dosud v literatuře. Studie jsou seřazeny podle stáří vzorků, a jsou především zdůrazněny použité metody. Jsou porovnávány a diskutovány zejména výhody použitých analytických metod a metodologických postupů. Přehled vychází z přehledového článku¹⁶ (příloha A), jehož je autor této práce spoluautorem.

2.1.1 *Prehistorie*

Z období od počátků lidstva do prvních historických záznamů (asi do 3000 př. Kr.) přirozeně neexistují žádné písemné zmínky o preparátech, které se používaly při léčení. Nicméně za nejčastěji používané lze označit mák, alkohol, marihuanu a tabák (samozřejmě v závislosti na geografickém regionu a čase). Použití bylo zprvu rekreační, nebo náboženské při rituálech. Z toho důvodu můžeme jen odhadovat, zda byly preparáty používány i pro svůj léčivý účinek. Jako příklad může posloužit analýza artefaktů, které byly nalezeny společně s přírodně mumifikovaným mužem Ötzim. Jde o tělo člověka zemřelého mezi 3239 a 3105 př. Kr., které bylo objeveno v roce 1991 v Ötzalských alpách. Mezi pozůstatky byly identifikovány i usušené plodnice houby březovník obecný (*Piptoporus betulinus* Bull.), která má laxativní a antibiotické účinky, pro které mohla být houba používána¹⁷.

Jediným léčivem, které bylo s jistotou terapeuticky užíváno už v prehistorické době, byl alkohol¹⁸. Alkohol byl nejspíš poprvé užíván ve formě kvašeného hroznového vína. Při archeologických vykopávkách ve vesnici Hadži Firuz Tepev západním Íránu bylo nalezeno šest nádob datovaných do 5. tisíciletí př. Kr. Uvnitř nádob byla nalezena žlutá usazenina, která byla analyzována metodami FT-IR a HPLC-UV¹⁹. Byl identifikován tartarát vápenatý, jehož zdrojem může být jediné šťáva hroznového vína, společně s pryskyřicí řečiku terebintového (*Pistacia terebinthus* L.), která sloužila

jako konzervant chránící před bakteriálním octovým kvašením. Na základě těchto zjištění lze předpokládat pravěké používání alkoholu. Podobně McGovern a kol.²⁰ publikovali výsledky analýz organických látek, které byly absorbovány do stěn nádob antické keramiky z raně neolitické vesnice Jiahu v čínské provincii Che-nan. Pro identifikaci organických komponent použili několik extrakčních a analytických metod (GC-MS, HPLC-MS, FT-IR, stabilní izotopová analýza a selektivní kapkovací analýza podle Feigla). Je zřejmé, že šlo o směs fermentovaných nápojů rýže, medu a ovoce (hloh, hroznové víno). Nápoj, který byl pravděpodobně připraven k léčebným účelům, byl tedy vyráběn již v sedmém tisíciletí př. Kr.

2.1.2 Starověk

S ohledem na počet publikovaných studií patří k nejčastěji analyzovaným historickým pozůstatkům léčivých látek a léčivých přípravků farmaceutické a kosmetické preparáty, které pocházejí z období starověku, tedy z období od prvních písemných záznamů do přibližně 5. století po Kr. Kosmetické přípravky můžeme považovat za specifický typ přípravků pro péči o zdraví. Analytické techniky používané pro studium složení těchto přípravků jsou podrobně popsány v přehledových článcích^{21,22}.

2.1.2.1 Starověký Blízký východ

Nejčastěji byly na Blízkém východě ve starověku používány antimonové léčivé přípravky na minerální bázi²³. V sumerském městě Girru (současné Tello v jižním Iráku) byla nalezena část nádoby z čistého antimonu, pravděpodobně farmaceutického významu. Nález tak dokazuje znalost antimonu a jeho využití. Analýzou nádoby se zabýval Berthelot již v roce 1887²⁴. Nádoba byla datována do období Mezopotámské civilizace ve třetím tisíciletí př. Kr. Sloučeniny antimonu byly později také používány staroegyptskou medicínou (viz níže).

Connan a Deschesne²⁵ analyzovali archeologické vzorky (datované mezi 1600 a 1200 př. Kr.) pocházející z blízkého východu, které obsahovaly živici. Autoři vyvinuli souhrn metod, které zahrnují chloroformovou extrakci následovanou isotopovou a molekulovou analýzou s použitím GC-MS. Jejich postup umožňuje určit původ archeologického nálezu. Živice je považována za desinfekční prostředek s insekticidními účinky, její farmaceutické využití je ale pouze hypotetické²⁶.

Možné farmaceutické využívání konopí popsali Zias a kol.²⁷, kteří studovali vzorky z Blízkého východu datované do 4. století po Kr. V rodinné hrobce poblíž Jeruzaléma byla nalezena kostra ženského pohlaví. Dívka se dožila přibližně 14 let. Zemřela během těhotenství. Z břišní oblasti kosterního pozůstatku byl analyzován šedivý karbonizovaný vzorek. Pomocí metod GC-MS a NMR spektroskopii byl identifikován jako konopí, tedy léčivě použitou rostlinu konopí setého (*Cannabis sativa* L.). Hlavní identifikovanou složkou byl Δ^6 -tetrahydrokanabinol. V čerstvém konopí jde sice o minoritní komponentu, její přítomnost v historickém vzorku ale indikuje inhalační podání. Ke konverzi hlavních látek (Δ^9 -tetrahydrokanabinol a kanabidiol) na zmíněnou látku Δ^6 -tetrahydrokanabinol dochází během procesu spalování. Předpokládá se proto, že konopí bylo ženě podáno inhalačně pro potlačení bolestí při porodu.

Další nepřímý důkaz farmaceutické aplikace rostlinných látek popisují Steckoll a kol.^{28,29}. Zkoumali červeně zbarvené kosterní pozůstatky jedenácti lidí, které byly nalezeny při archeologických vykopávkách na hřbitově kumránského společenství od Mrtvého moře, které vzkvétalo přibližně od druhého století př. Kr. do prvního století po Kr. Po rozpuštění kostí v kyselině chlorovodíkové určili infračervenou spektroskopii původ červeného barviva v kostech jako alizarin. Charakteristické umístění pigmentu v kostní dřeni je v souladu s intravitálním ukládáním v kostech v důsledku stravy, která obsahovala kořen mořený barviřské (*Rubia tinctorum* L.), jehož významným barvivem je právě alizarin. Členi zmíněného společenství požívali tento kořen jako lék pro odvrácení zlých duchů. Tento společenský zvyk přetrval přes dvě tisíciletí až do dnešních dnů.

2.1.2.2 Starověký Egypt

Otázka, zda se mohlo opium používat již ve starověku, byla otevřena roku 1929 Muziem, který se pokusil nepřesvědčivě prokázat přítomnost opia ve staroegyptských artefaktech^{18,30}. V 60. letech 20. století Merrillees³¹ navíc postulovat hypotézu o uchovávání opia ve zvláštních džbánech, které připomínaly obrácenou makovici. Tato domněnka ale nebyla podpořena věrohodnou analytickou studií. V roce 1996 Koschel³² prezentoval analýzu žlutohnědé substance o hmotnosti 300 mg nalezené ve starověkých egyptských džbánech, které pocházely ze sbírky Martin von Wagner Museum (Würzburg, Německo). Pomocí TLC, GC-MS a radioimunologického stanovení ve vzorku stanovil 0,1 % podíl opiových alkaloidů (z toho 0,05 % morfinu) a jejich oxidačních produktů. Autor však upozorňuje, že jde pouze o výsledek jediné analýzy. Podobně Bisset a kol.³³ analyzovali obsah sedmi nádob, ve kterých byly uchovávány pravděpodobně oleje. Nádoby pocházejí z hrobky staroegyptského architekta Kha, který zemřel kolem roku 1405 př. Kr. Autoři k analýze použili mikroskopii, radioimunologické metody, TLC, GC a LC metody samostatně a také v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Zjistili, že vzorky neobsahují morfin a usuzují, že neobsahovaly ani opium. Na druhou stranu Chovanec a kol.³⁴ popsali degradaci opiových alkaloidů. Pomocí zvýšené teploty (70 °C) a intenzivního UV-záření simulovali možnou degradaci vzorků opia z čerstvé sklizně a společně s historickými vzorky opia je analyzovali metodou GC-MS. Morfin, který byl v předchozích pracích používán jako marker pro identifikaci opia, není ale podle zjištění autorů stabilní. Navrhli zaměřit se při budoucí identifikaci opia na jiné alkaloidy: papaverin, thebain a rozpadové produkty noskapinu.

Proslulým očním kosmetickým přípravkem starověku je kohl, který byl připravován smícháním práškových minerálů černé barvy s tukem. Přípravek byl používán již v době předdynastického starověkého Egypta (přibližně 3200 př. Kr.) pro ztmavení očních řas a víček, nebo pro malování očních linek. Přípravek má nejen kosmetický, ale také léčivě-ochranný účinek³⁵. Jednou z prvních analýz kohlů provedl Fischer již v roce 1882². Ve třiceti analyzovaných vzorcích, datovaných do období XIX. dynastie (1292–1189 př. Kr.), našel jako hlavní komponentu galenit (sulfid olovnatý). V jiné práci byly ve vzorcích kohlů prokázány další černé či tmavé minerály: oxidy mědi, manganu a železa, malachit ($\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$), chryzokol a antimonit (sulfid antimonitý)³⁶. Tyto výsledky potvrdily analýzy dalších 52 vzorků z kosmetických nádob muzea v Louvre (stáří mezi lety 2000 a 1200 př. Kr.). Vzorky byly analyzovány elektronovou mikroskopií a kvantitativní rentgenovou difrakcí³⁷. Krystalografická a chemická analýza dokázala přítomnost galenitu ve směsi s cerusitem

(PbCO_3), lauronitem (PbOHCl) nebo fosgenitem ($\text{Pb}_2\text{Cl}_2\text{CO}_3$). Tapsoba a kol.³⁸ předpokládají, že analyzovaný kosmetický přípravek mohl zároveň ochraňovat před bakteriální infekcí očí díky nespecifickému účinku mikromolárních množství olovnatých kationtů, které se uvolňují z přípravku (autoři vzorky analyzovali ampérometrií na ultramikroelektrodě).

Dalším kosmetickým přípravkem starověkého Egypta byla olovnatá mýdla. Vzorky těchto mýdel byly analyzovány metodou celkové zeslabené reflexe FT-IR, která nevyžaduje úpravu vzorku. Cotte a kol.³⁹ se snažili reprodukovat přípravu těchto mýdel podle dochovaného receptu na papyru datovaného okolo 1500 př. Kr. Ačkoliv se autoři pokoušeli experimentálně odhadnout rychlost saponifikace, nelze s jistotou určit, zda starověcí Egyptané záměrně připravili olovnatá mýdla, nebo jde o proces pomalé degradace původního materiálu.

Farmaceutický význam vína je jen částečně popsán dochovanými staroegyptskými papyry. Důkaz přinesli až McGovern a kol.⁴⁰, kteří užitím multianalytického přístupu, zahrnujícího SPME, LC-MS a GC-MS, analyzovali starověké organické pozůstatky, které byly absorbovány do stěn keramických nádob (datovaných kolem roku 3150 př. Kr.). Výsledky naznačují přítomnost různých bylin a pryskyřic rozpuštěných ve víně, což lze považovat za důkaz staroegyptských organických léčiv.

Užívání návykových látek je další zajímavou otázkou staroegyptské farmacie, o které se již velmi dlouho diskutuje. V roce 1992 Balabanova a kol.^{41,42} publikovali identifikaci drog (kokain, konopí a nikotin) v devíti egyptských mumiiích z období mezi 1070 př. Kr. až 395 po Kr. Analyzovali vlasy, kosti a měkké tkáně pomocí radioimunologického stanovení a GC-MS, přičemž našli nezanedbatelné množství kokainu a konopí ve všech devíti vzorcích. Nikotin byl identifikován v osmi vzorcích. Autoři předpokládají, že se jednalo o terapeutické užívání těchto látek. Protože se koka (*Erythroxylum coca* Lam.) přirozeně vyskytuje pouze v Jižní Americe, nálezy by znamenaly, že docházelo k transatlantickému obchodu již v době předkolumbovské. Tato zjištění jsou ale v literatuře kriticky diskutována³⁰, jako problematické se uvádí zejména vzorkování vlasů mumiiích uchovávaných v muzejních sbírkách. Mohlo totiž dojít k sekundární kontaminaci⁴³. Counsell³⁰ upozorňuje, že mumie, ze kterých Balabanova a kol. získali vzorky, byly součástí sbírky excentrického krále Ludvíka II. Bavorského. Není nepravděpodobné, že mumie byly sekundárně kontaminovány kokainem v době, kdy byly v jeho vlastnictví. Balabanova s kolegy pokračovala v dalším hledání drog v jiných vzorcích mumiiích. V roce 1997 publikovali možnost užívání kokainu jako léčivého stimulantu křesťanskou populací v nubijské oblasti Sayala⁴⁴. Pomocí radioimunologického stanovení a GC-MS autoři studovali přítomnost kokainu ve vzorcích kostí a vlasů 71 přirozeně mumifikovaných lidských ostatků datovaných mezi lety 600 a 1100 po Kr. Autoři našli kokain v 79 % případů. Navíc předpokládají přítomnost nikotinu v mumiiích ze stejné Sayalské populace⁴⁵. Tento výsledek je rovněž předmětem kritiky³⁰.

2.1.2.3 Období helénismu

Dochované starořímské nádoby určené pro uchovávání léčiv jsou relativně vzácné a jejich analýzy přináší zajímavý pohled na v té době ve farmacii používané látky.

Stacey⁴⁶ analyzovala pozůstatky léčivých přípravků ze sedmi bronzových nádob pro uchovávání farmak, které pocházejí ze sbírek British Museum a byly datovány do 2. století po Kr. Pomocí GC-MS

byly identifikovány pozůstatky lipidů a rentgenovou fluorescencí a Ramanovou spektroskopií byly charakterizovány anorganické složky. Mezi přísadami analyzovaných přípravků byl identifikován včelí vosk, tuk, pryskyřice jehličnanů a slizové polysacharidy. Vzorky navíc obsahovaly elementární uhlík a soli olova a zinku. Bylo zjištěno, že použitý včelí vosk byl upraven jako takzvaný punský vosk, jehož přípravu popsal už Plinius Starší (23–79 po Kr.). Stacey rovněž provedla srovnávací analýzu historického a čerstvě připraveného punského vosku.

Giachi a kol.⁴⁷ studovali přes 2000 let starý vzorek léčiva z cínové pixidy objevené ve vraku potopené lodi ze zálivu Barrati (Itálie). Autoři použili multianalytický přístup: skenování elektronovým mikroskopem v kombinaci s disperzní rentgenovou spektroskopií, FT-IR, práškovou rentgenovou difrakci a GC-MS. Nádoba obsahovala šest plochých, diskových tablet šedé barvy. Analýzy v tabletách prokázaly hydrozincit ($Zn_5(CO_3)_2(OH)_6$) a smithsonit ($ZnCO_3$), dále škrob, živočišné a rostlinné tuky a borové pryskyřice. Složení indikuje, že preparát byl používán zevně, nejspíše jako oftalmologický přípravek.

Colombini a kol.⁴⁸ aplikovali na historické vzorky kombinaci dvou analytických postupů založených na FT-IR a GC-MS. Analyzovali obsah původem egyptské nádoby datované mezi roky 150 až 100 př. Kr. z etruského pohřebiště v Chiusi (Toskánsko, Itálie). Pro identifikaci organických komponent a jejich degradačních produktů byla použita metoda GC-MS. Byly identifikovány tři složky: rostlinný olej, pravděpodobně z myrobalánu (*Prunus cerasifera* Ehrh.), mastix (pryskyřice řečiku lentišku, *Pistacia lentiscus* L.) a pryskyřice borovice (*Pinus* L.). Přítomnost myrobalánového oleje, který byl používán terapeuticky používán, naznačuje, že analyzovaný obsah nádoby byl určen spíše pro farmaceutické, než kosmetické účely.

Podobně studovali Ribechini a kol.⁴⁹ obsah sedmi skleněných nádobek k uchování mastí, datovaných mezi 1. stoletím př. Kr. a 1. stoletím po Kr., které byly nalezeny při vykopávkách římské vily ve starověkém městě Oplontis (Neapol, Itálie). Autoři využili GC s hmotnostní detekcí s přímým vstupem kombinovanou s vysokoteplotní hmotnostní spektrometrií. Byly nalezeny mastné kyseliny se středním a dlouhým uhlíkovým řetězcem, hydroxylované kyseliny s dlouhým uhlíkovým řetězcem, *n*-alkanoly a alkandiol, *n*-alkeny, monoestery s dlouhým uhlíkovým řetězcem, fytosteroly a diterpenické kyseliny. Navíc byla dokázána přítomnost včelího vosku, pryskyřic čeledi borovicovité (*Pinaceae*) a dalších vosků jako hlavních organických komponent. Přítomnost fytosterolů a monoesterů s dlouhým uhlíkovým řetězcem, ve kterých nebyla hlavní součástí palmitová kyselina, indikuje vosky pocházející z rostlin.

2.1.2.4 Předkolumbovská Amerika

Musshoff a kol.⁵⁰ analyzovali pomocí GC-MS vzorky vlasů osmi předkolumbovských mumií, které byly datovány do období mezi roky 100 př. Kr. a 140 po Kr. Testování prokázalo pouze přítomnost nikotinu. Autoři ale upozorňují, že mohlo dojít ke kontaminaci vzorků během návštěv expozice v 19. století ze strany návštěvníků či zaměstnanců (kouření cigaret v expozici). Interpretace podobných zjištění je proto náročná a nejistá. Užívání nikotinu ale dokazuje práce Loughmiller-Cardinalové se Zagorevskim⁵¹, kteří studovali malé mayské nádoby ve tvaru baněk z období 550 až 900 po Kr. Nádoby mohly hypoteticky sloužit pro uchování léčiv nebo jedů. Analýzou pomocí GC-MS a

LC-MS našli uvnitř nádob nikotin a jeho oxidační produkt nikotin-*N*-oxid. Podle hieroglyfů zdobících nádoby a na základě výsledků analýzy lze tedy předpokládat, že nádoba byla používána k uchování tabáku.

Nepřímý důkaz žvýkání listů koky (*Erythroxylum coca* Lam.), které bylo nedílnou součástí životního stylu předkolumbovských populací obývajících pohoří And, přinesli Cartmell a kol.^{52,53} a Rivera a kol.⁵⁴. Jako marker byl vybrán metabolit kokainu, benzoylekgonin, který byl dokazován metodou GC-MS ve vzorcích skalpu osmi mumií pocházejících z Chile (datovaných mezi roky 2000 př. Kr. a 1500 po Kr.). Výsledky poukazují na intravitální užívání listů koky a prokázaly, že benzoylekgonin nalezený ve vlasech mumií je velmi stabilní. Podobné výsledky prezentovali Springfield a kol.⁵⁵, kteří pomocí GC-MS analyzovali vzorky vlasů starověkých Peruánců z doby kolem roku 1000 po Kr. Nicméně tyto studie kritizují Báez a kol.⁵⁶, kteří hodnotili přítomnost drog v 19 vzorcích vlasů z archeologických nalezišť v severním Chile (datovány mezi roky 100 před a 140 po Kr.). Vzorky byly negativně testovány na přítomnost kokainu, opiátů i konopí. Autoři přicházejí se dvěma možnými vysvětleními. Buď byly hodnoceny vzorky jedinců, kteří drogy neužívali, což ale nevylučuje, že jiní drogy užívali, nebo analyzovaný rozsah známých drog neobsáhl drogy lokální, které mohly být připraveny z místních, nebo dovezených bylin.

Indrati a Buikstra⁵⁷ publikovali dentální důkazy žvýkání koky na základě radioimunologického stanovení. Pozitivně analyzovali zuby 86 jedinců ze čtyř pobřežních peruánských nalezišť (800 až 1350 po Kr.).

2.1.2.5 Starověká Čína

Používání keřů rodu chvojník (*Ephedra*) pro náboženské obřady ve starověké Číně bylo potvrzeno paleobotanickými důkazy. Nálezy větviček chvojníku na hřbitově v regionu Luo-pu-po v severozápadní Číně byly datovány kolem roku 3800 př. Kr.⁵⁸. Metodou GC-MS byly porovnávány historické vzorky se současnými vzorky větviček chvojníku a bylo identifikováno několik látek, včetně benzaldehydu, tetramethylpyrazinu a fenmetrazinu. Ačkoliv nebyl podán žádný přímý důkaz o farmaceutickém využití artefaktů nalezených v hrobech, přesto silně připomínají náboženský a medicínský význam chvojníku.

Quin a Li⁵⁹ analyzovali okolo 100 surových minerálních léčiv pocházejících z Čeng-čou (provincie Che-nan, středojižní Čína) pomocí Mössbauerovy spektroskopie, rentgenové difrakce a AAS. Objasnili klasifikaci, druh a jednotlivé komponenty léčiv a diskutovali jejich léčivé účinky a mechanismy.

2.1.3 *Středověk*

Ve středověku, jehož období bývá udáváno mezi 5. a 15. stoletím po Kr., byla farmacie stále založena především na řecko-římské medicíně. Náboženské smýšlení středověku považovalo nemoci za boží trest či zkoušku, což vedlo k terapeutickému nihilismu a brzdilo rozvoj farmacie.

Analýza středověkých historických farmaceutických artefaktů je velmi řídká. Tak Pérez-Arantegui a kol.⁶⁰ analyzovali multianalytickým přístupem (mikroskopie, skenovací elektronová mikroskopie s rentgenovou spektrometrií, rentgenová difrakce a pyrolyzní GC-MS) obsah glazované nádoby nalezené v Zaragoze (Španělsko) datované do 11. století, tedy do doby arabské nadvlády nad Iberským poloostrovem. Identifikovali minerální, organické a rostlinné složky vzorku: auripigment, fiky (plody fíkovníku smokvoně, *Ficus carica* L.), semena révy vinné (*Vitis vinifera* L.) spolu s malým množstvím sádry. Autoři předpokládají, že se jedná o léčivý preparát, protože auripigment, tedy sulfid arsenitý, byl jedním z nejčastěji užívaných léčiv arabské farmacie.

2.1.4 *Renesance, baroko a osvícenství*

Začátek této epochy lidských dějin charakterizují dvě zásadní události, které významně ovlivnily i farmacii: vynález knihtisku, který umožnil rychlejší šíření poznání, a objevení Ameriky, které vedlo k dovozu nových, farmaceuticky využitelných látek.

2.1.4.1 Dobové látky používané ve farmacii

Pozoruhodně zachovalou sbírkou dobových látek používaných ve farmacii (označovaných rovněž latinským názvem *materia medica*) je Viganí's Cabinet v Queen's College (Cambridge, UK). Sbíрка byla sestavena Giovanni Francescem Viganim (asi 1650–1712), který byl v letech 1703–1712 prvním profesorem chemie univerzity v Cambridge. Kabinet obsahuje více než 570 rostlinných, živočišných a minerálních substancí, jako jsou pigmenty, horniny, kovy a díle více než 50 léků a olejů v téměř nedotčeném stavu. Vybrané předměty sbírky byly poprvé analyzovány Eversem v roce 1933⁶¹, který analyzoval vzorek peruánského balzámu a tří olejů (anýzový, hřebíčkový a terpentýnový) a porovnával je s čerstvě připravenými vzorky. V roce 2011 Steigenberger a Herm⁶² studovali jiné vzorky z Viganího kabinetu, konkrétně pryskyřice, mastix, sandarak, balzám kopaiva a burgundská smůla (tavená a vyčištěná smůla borovic, *Piniaceae*). Společně s historickými vzorky analyzovali také materiály novodobého původu. K analýze použili GC-MS metodu s derivatizací trimethylsulfonium hydroxidem. Výsledky poskytly detailní molekulové složení studovaných materiálů. Autoři identifikovali markery pryskyřic. Porovnáním GC-MS profilů historických vzorků a referencí bylo možné určit botanický původ a pojmenovat tak historické vzorky, což umožnilo objasnit nomenklaturu starých vzorků pryskyřic z Viganího kabinetu.

Edwards a kol.⁶³ aplikovali pro identifikaci léčivých preparátů nedestruktivní metodu Ramanovy spektroskopie. Analyzovali obsah deseti nádob z příruční truhličky ranhojiče, která byla objevena ve vřaku lodi Mary Rose potopené roku 1545 v Port Solentu (Portsmouth, UK). Pět vzorků bylo

organického původu a dalších pět anorganického. Organické vzorky sestávaly ze směsi pryskyřic na bázi terpenoidů. Naopak anorganické vzorky poskytovaly jednoduchá spektra odpovídající síranům, uhličitánům a oxidům. Výsledky dávají nahlédnout do *materia medica* 16. století používané zejména pro ošetřování zranění.

Ceněným dobovým léčivem byla mumie (*Mumia vera aegyptica*), tedy části staroegyptských balzamovaných těl. Působení bylo založeno na účincích asfaltu a dalších živičných látek používaných při balzamacii, v kombinaci s vírou v magické účinky. Mumie byly předmětem rozsáhlého obchodu a nedostatek autentických mumií z Egypta vedl až k produkci padělků. Scholz-Böttcher a kol.⁶⁴ analyzovali historické vzorky mumie z Deutsche Apotheken-Museum (Heidelberg), kde byly skladovány v historických farmaceutických nádobách z 18. století. Pomocí pyrolyzní GC-MS identifikovali přítomnost mastných kyselin, terpenů, triterpenoidů, *n*-alkanů, *n*-alkenů a voskových esterů, což poukazuje na autentičnost mumie. Podle autorů složení mumií a přítomnost asfaltu z Mrtvého moře naznačuje, že alespoň část analyzovaných vzorků nejspíš pochází z období vlády Ptolemaů.

Analýzou mumifikovaných lidských ostatků z období konce 16. a začátku 20. století se zabývali Musshoff a kol.⁶⁵. V tomto případě se nejednalo o mumie používané pro farmaceutické účely, právě naopak. Autoři analyzovali metodou LC-MS vzorky vlasů celkem 38 mumií z katakomb pod kapucínským klášterem v Palermu (Itálie), kde bylo pohřbeno více než 1800 těl. Nalezli ethylglukuronid, který dokazuje dlouhodobou intravitální konzumaci alkoholu.

2.1.4.2 Analýza mastí

V oblasti analýzy historických pozůstatků farmak ze 16. až 18. století byla poměrně značná pozornost věnována analýze mastí. Nejčastěji používanými metodami analýzy jsou chromatografické techniky ve spojení s hmotnostní spektrometrií.

Baeten a kol.⁶⁶ aplikovali multianalytický přístup pro studium mastí ze 16. století. V průběhu archeologických vykopávek na hradě v Middelburgu (Belgie) byly nalezeny malé keramické nádoby. Pomocí GC-MS bylo zjištěno, že organický základ masti obsahuje včelí vosk a menší množství triacylglycerolových lipidů. Infračervenou analýzou byla dokázána přítomnost vápenatých solí karboxylových kyselin (vápenné mýdlo). Anorganické přísady jako síran vápenatý (sádra) a síran olovnatý se stopou železa byly stanoveny rentgenovou difrakcí a rentgenovou fotoelektronovou spektroskopií. Jednalo se pravděpodobně o náplast obsahující sloučeniny olova pro léčbu pohmožděnin, ve směsi se včelím voskem, který usnadnil aplikaci přípravku na postižené místo. Autoři předpokládali, že ve vzorku byly původně přítomné olovnaté soli karboxylových kyselin, které v průběhu času reagovaly se sádrou, což mělo za následek tvorbu síranu olovnatého a vápenatých solí karboxylových kyselin.

Riedo a kol.⁶⁷ demonstrovali použití pyrolýzy s tepelně asistovanou methylovanou následovanou GC-MS. Technika byla použita při zkoumání čtyř vzorů mastí ze 16. století pocházejících ze sbírek Aboca Museum (Arezzo, Itálie). Podle historických receptů byly připraveny čerstvé vzorky mastí, které pak byly analyzovány společně se vzorky historickými. Ve všech vzorcích bylo možné identifikovat lipidové složky a přírodní pryskyřice. Složení čerstvě připravených mastí bylo v souladu

s historickými vzorky. Pro rozlišení lipidových materiálů byla použita vícerozměrná analýza dat a to i s ohledem na jejich relativní zastoupení ve vzorcích.

Saliu a kol.⁶⁸ aplikovali RP-HPLC-MS metodu k analýze lipidových komponent historických léčivých mastí ze 17. století, také ze sbírek Aboca Museum (Arezzo, Itálie) a dále z lékárny v Real Cartuja de Valldemossa (Palma de Majorca, Španělsko). Porovnávali triacylglycerolové profily historických vzorků, čerstvých tukových surovin a vzorků, které připravili podle dobových receptů. Distribuce nalezených triacylglycerolů naznačuje, že masti byly připraveny z rostlinných olejů (zejména olivového) a ze zvířecího tuku (především vepřové sádlo). Byly rovněž analyzovány referenční materiály vystavené stresovým vlivům. Ukázalo se, že analýza triacylglycerolů metodou RP-HPLC-MS může být vhodnou metodou pro určení původu, použití i podmínek skladování historických mastí. Stejní autoři později publikovali analýzu jiných historických mastí z 18. století rovněž z Aboca Museum⁶⁹ a provedli rozsáhlý výzkum triacylglycerolů v historických vzorcích, při kterém bylo identifikováno přes 500 molekulových struktur.

Spektrální metody pro analýzu historických mastí použili Gamberini a kol.⁷⁰. Metodami FT-IR, mikro-Ramanovou spektroskopií a povrchem zesíleným Ramanovým rozptylem (SERS) porovnávali výsledky analýz sedmi historických mastí z 18. století ze sbírek Aboca Museum (Itálie) a čerstvých mastí připravených podle dobových receptů. Diskutovali získaná spektra lipidů, včelího vosku a pryskyřic. Ramanova spektra vepřového sádla a včelího vosku autoři popisují jako velmi podobná, liší se ale od spekter zestařených olejů. Metoda SERS byla aplikována na historické vzorky a galbanum (klejoprskyřice z rostlin rodu ločidlo, *Ferula*), přičemž jejich spektra byla poprvé podrobně diskutována.

2.1.4.3 Iatrochemické preparáty

Renesance přinesla počátky iatrochemie, tedy odvětví farmacie uplatňující při léčbě chemické látky vzniklé chemickými reakcemi (tedy nikoliv jen mechanickými operacemi upravené látky přírodní)⁷¹. Největším zastáncem iatrochemie byl Theophrastus Bombastus von Hohenheim, také známý jako Paracelsus (1493–1541), který připravil řadu preparátů s terapeutickým užitkem⁷².

V roce 1957 Dobler připravil některé přípravky podle originálních Paracelsových receptů a podrobil je chemické analýze⁷³. Ve své publikaci uzavírá, že známý *Tartarus emeticus* (dávivý vinný kámen, vlnan antimonylo-draselný) nebyl zaveden až v průběhu druhé poloviny 17. století, jak bylo až do té doby předpokládáno, ale byl připraven již Paracelsem. Dobler ve své další publikaci⁷⁴ připravil a analyzoval šest tinktur podle Paracelsových původních předpisů.

V letech 1958–1980 Schneider a kol.^{5,6} z Technische Universität Braunschweig (Německo) rozpracovali metodu simultánní analýzy historických pozůstatků farmaceutik a čerstvě připravených vzorků podle dobových předpisů a aplikovali ji na řadu iatrochemických přípravků. K analýzám využili klasické metody analytické chemie (gravimetrii a volumetrii)^{75–77}, dále UV spektrometrii⁷⁸, infračervenou spektroskopi⁷⁹, TLC a papírovou chromatografií a rentgenové spektrální metody⁸⁰. Výsledky analýz vedly k širšímu pochopení postupného vývoje iatrochemie⁸¹.

2.1.5 *Farmaka z 19. a 20. století*

Počátkem 19. století nastal prudký rozvoj fyziologie a chemie, díky tomu byly izolovány nebo syntetizovány nové, farmaceuticky aktivní látky (zejména alkaloidy). Dále se během 19. století produkce léčiv postupně přesunula do továren, kde byla léčiva masivně vyráběna.

Podrobně se historii farmaceutických objevů a inovací uplynulých dvou století věnuje Raviña⁸², přičemž rozeznává dvě časová období. První období, od začátku 19. století do 30. let 20. století, charakterizuje především izolace a čištění léčivých látek z přírodních materiálů, následovaná jednodušší chemickou syntézou a studiem chemických a fyzikálních vlastností takto získaných individuů. Během tohoto období byly zavedeny první dvě generace léků. První generace (přibližně datovaná 1820 až 1880) zahrnuje především alkaloidy a některé další organické a anorganické látky. Druhou generaci (přibližně 1880 až 1935) představují vakcíny, séra, analgetika, antipyretika, hypnotika a antiprotozoika. Tato druhá generace je současně dobou zrodu medicíně chemie, když Paul Ehrlich demonstroval léčbu infekčních onemocnění chemicky připravenými léčivými a definoval receptorovou teorii. Druhé období farmaceutických objevů, zahrnující dobu od začátku 2. světové války do současnosti, bývá označováno zlatým věkem objevování léčiv. Začíná ve 30. letech 20. století třetí generací léčiv, kdy byly do terapie zavedeny vitamíny, hormony, sulfonamidová léčiva, antibiotika a jejich deriváty. Čtvrtá generace léčiv (zhruba 1960–1980) zahrnuje mimo jiné semisyntetická antibiotika, psychofarmaka, β -blokátory a léčiva s kardiovaskulárním účinkem. Do poslední páté generace léčiv, ve které se nyní nacházíme, lze zahrnout enzymatické inhibitory (při léčbě virových onemocnění a rakoviny), nebo biotechnologicky získané léky.

2.1.5.1 Patentní přípravky

Ačkoliv již na přelomu 18. a 19. století byly státními orgány vydávány lékopisy a zákonné předpisy pro zvýšení jakosti a bezpečnosti léčiv, bylo na trhu k dispozici množství neregulovaných, tak zvaných patentních přípravků (nazývaných rovněž arkána, z lat. *arcenum* ve významu tajemství, nebo nostra z lat. *noster* ve významu náš). Jejich složení bylo výrobcem utajováno, to ale ještě víc zvyšovalo popularitu u běžné populace. To na druhou stranu vede k tomu, že o jejich složení existuje jen málo údajů.

Diefenbach a kol.⁸³ studovali metodami rentgenové fluorescence elementární složení 25 vzorků patentních léčiv (ve formě tablet nebo pilulek) ze sbírky Henry Ford Museum (Dearborn, Michigan, USA). V sedmi vzorcích semikvantitativně stanovili 16 prvků včetně arsenu a rtuti. Podle autorů některé z přípravků připomínají dnešní potravinové doplňky, neboť obsahují chemické prvky, které jsou dnes známé jako zdraví prospěšné. Maurice a kol.⁸⁴ použili protonovou magnetickou rezonanci (¹H NMR) k analýze pěti kapalných vzorků ze sbírek stejného muzea. Autoři si byli vědomi, že zvolená technika neposkytuje kompletní nebo kvantitativní informace o vzorcích, ale za výhodu považovali malou spotřebu vzorku: k analýze postačila malá kapka vzorku ředěná na objem 1 cm³ těžkou vodou nebo deuterovaným chloroformem. Ve čtyřech vzorcích byl identifikován ethanol, ve dvou vzorcích se autoři pokoušeli dokázat opiové alkaloidy (heroin, morfin a kodein) srovnávací

analýzou se simultánně připravenou referencí. Na základě výsledků autoři popisují stabilitu opiových preparátů po dobu 120 let.

Torbenson a kol.⁸⁵ publikovali analýzu patentního léku Lash's Bitters. Neporušená lahev přibližně z roku 1918 byla nalezena v Shadyside (Pittsburgh, USA). Pomocí AAS a GC-MS autoři stanovili obsah ethanolu na 19,2 % objemových procent a našli také stopové množství methanolu. Rovněž našli potenciálně toxickou koncentraci olova (295 mg dm^{-3}).

Spinner a kol.⁸⁶ analyzovali obsah neporušených lahví a džbánek z přelomu 19. a 20. století, které byly nalezeny během archeologického průzkumu při stavbě dálnice v Dandpoint (Idaho, USA). Pomocí multianalytického přístupu (FT-IR, fluorescenční spektrometrie, UV-VIS spektrometrie a ICP-MS) autoři identifikovali v lahvích patentní léčiva, včetně přípravků na vlasy a pokožku.

Voss a kol.⁸⁷ identifikovali obsah deseti skleněných lahviček z 19. století nalezených v Market Street Chinatown v San Jose (California, USA). Vzorky byly analyzovány chemickými i instrumentálními metodami, zejména AAS. Přírodními vlivy patrně došlo ke změnám v chemickém složení, což vnáší nejistotu při identifikaci analytů. Sedm lahví obsahovalo pravděpodobně zbytky minerálních léčiv, které se používaly v tradiční čínské medicíně. Tři lahve obsahovaly kalamínové mléko, preparát obsahující zinek pro lokální použití.

Fishel a kol.⁸⁸ analyzovali dvě patentní léčiva Thomson's Compound Syrup of Tara Wood Naphta, která byla objevena při archeologických vykopávkách domu z padesátých let 19. století v Burning Sands v Meredosia (Illinois, USA). Analýzy zahrnovaly stanovení jedenácti kovů pomocí ICP-MS a AAS, analýzu polyaromatických uhlovodíků a celkovou charakterizaci vzorků pomocí GC-MS a screening čtyř v současnosti nelegálních drog pomocí GC-MS s vysokým rozlišením. Kromě identifikace látek pocházejících z dehtu bylo identifikováno také konopí. Podle autorů jde o preparáty s antiseptickými, analgetickými, protizánětlivými a antitusickými účinky.

2.1.5.2 Hromadně vyráběné léčivé přípravky

Hromadně vyráběné léčivé přípravky, které v dnešní farmacii převládají, začaly být produkovány od poloviny 19. století. Při produkci větších objemů je charakteristické jednodušší a přesněji formulované složení. Přestože jde o artefakty z poměrně nedávné historie, bylo již publikováno několik analýz takových objektů, navíc – jak bylo uvedeno výše – mohou jejich výsledky přispět ke studiu dlouhodobé stability látek⁸⁹.

Velmi atraktivní pro takové analýzy je zejména injekční forma léčiv, která začala být používána od druhé poloviny 19. století⁹⁰. Tyto roztoky se obvykle dodávaly v malých, hermeticky uzavřených ampulích, nejčastěji vyráběných ze skla, které jen velmi málo ovlivňuje kvalitu přípravku. Přípravek uvnitř skleněné ampule může proto být chráněn před degradací po mnoho let^{8,9}. Chemické změny historických injekčních roztoků jsou proto zajímavé jak ve farmaceutickém, tak i historickém kontextu⁹¹. Jako první v této oblasti publikoval výsledky v roce 1989 Gonzales⁹², který analyzoval pomocí UV spektroskopie 0,02% injekční roztok kokainu z roku 1917. Po 72 letech našel obsah preparátu snížený o 39 %. Nicméně Nesměrák a kol.⁹³ analyzovali pomocí HPLC-MS³ jiný injekční roztok kokainu o deklarovaném obsahu 0,5 % (vyrobený mezi roky 1932 a 1938, analyzovaný v roce 2010), jehož původní koncentrace klesla o 70,4 %. Autoři rovněž identifikovali tři různé degradační

produkty: benzoylekgonin, ekgonin a ekgonin methylester. Degradální produkty mají podobná UV spektra, z čehož vyplývá důležitost použití separačních technik ve spojení s hmotnostní detekcí. V tomto případě je proto analýza UV spektroskopii zavádějící. Podobný metodologický problém může být demonstrován na analýze injekčních roztoků chininu. Yalcindag a Onur⁹⁴ použili k analýze papírovou chromatografii, přičemž nenalezli žádný pokles v koncentraci původně 25% roztoku. Naopak při naší analýze⁹⁵ dvou injekčních roztoků stáří 77, resp. 79 let, pomocí RP-HPLC ve spojení s MS jsme zjistili pokles obsahu chininu o 13 % v 79 let a o 8 % v 77 let starém vzorku. Jako degradační produkt jsme identifikovali chinotoxin. Další v literatuře popsání analýzy injekčních přípravků podává souhrnně tabulka 2.1. Z publikovaných studií je zřejmé, že stabilita komplexních organických látek je odlišná. Závisí zejména na reaktivitě molekuly⁹⁶. Jak bylo uvedeno výše, na základě těchto zjištění byla nedávno otevřena diskuse o prodloužení expirace léčivých přípravků^{11, 96, 97}.

Tabulka 2.1

Publikované výsledky analýz aktivních komponent v historických injekčních roztocích, které byly v době analýzy více než padesát let staré (upraveno podle⁹⁸).

| aktivní komponenta | stáří / roky | zjištění | ref. |
|--------------------------|--------------|--|-------|
| epinefrin | 83 | pokles na aktivní komponenty 70 %; nalezeny nečistoty: norepinephrin, adrenochrom a neidentifikovaná | 99 |
| etilefrin | 55 | bez degradace, nalezena neidentifikovaná nečistota | 99 |
| furosemid | 53 | bez degradace, nalezeno malé množství saluaminu | 99 |
| heroin | 77 | zcela deacetylován na morfin | 93 |
| chinin | 79 | pokles aktivní komponenty na 87 %; degradační produkt chinotoxin | 95 |
| kokain | asi 70 | pokles aktivní komponenty na 27 %; nalezeny degradační produkty: benzoyl-ekognin, ekognin a ekogninmethylester | 92,93 |
| metamizol | 53 | bez degradace | 99 |
| prokain a kofein | 68 | pokles aktivní komponenty na 79 %, nalezena 4-aminobenzoová kyselina | 99 |
| salycilan sodný a kofein | 72 | bez degradace, nalezeno malé množství theobrominu | 99 |
| synefrin | 55 | bez degradace, nalezeny neznámé nečistoty | 99 |

2.1.6 *Shrnutí*

Obecně platí, že pokud jsou ve vzorku předpokládány organické látky, jsou nejpoužívanější technikou separační metody ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Infračervená a Ramanova spektroskopie umožňují analyzovat anorganické komponenty a mohou být nápomocny také při detailním studiu organických součástí vzorku. Interpretace získaných dat je pak snazší, pokud je k dispozici dobová farmaceutická literatura.

Tabulka 2.2

Analyzované aktivní komponenty ve vzorcích historických léčivých látek a léčivých přípravků popsané v literatuře, matrice vzorku (pokud je známa), datace vzorku a použitá analytická metoda (upraveno podle¹⁶). Použité zkratky: ChA chemická analýza, FT-IR Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, GC-MS plynová chromatografie s hmotnostní detekcí, LC-MS kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí, MxA multianalytický přístup, PC papírová chromatografie, RIA radioimunologické stanovení, SEM skenovací elektronová mikroskopie, SPME mikroextrakce na tuhou fázi, TLC tenkovrstvá chromatografie, XPS rentgenová fotoelektronová spektroskopie, XRD rentgenová difrakce, XRF rentgenová fluorescence

| aktivní komponenta | matrice vzorku, datování | analytická metoda, ref. |
|------------------------------|---|---|
| <i>Anorganické substance</i> | | |
| anorganické soli | římský medikament, 1.–2. století | XRS, Ramanova spektroskopie ⁴⁶ |
| | čínská minerální léčiva | AAS, XRD, Mössbauerova spektroskopie ⁵⁹ |
| | iatrochemické medikamenty (replikované) | ChA ^{75–77} ; UV spektrometrie ⁷⁸ ; IR ⁷⁹ ; TLC, XRS ⁸⁰ |
| | patentní přípravek, 19. století | XRF ⁸³ ; AAS ⁸⁸ |
| | renesanční mast, 16. století | XRD, XPS ⁶⁶ |
| | renesanční medikament, 16. století | Ramanova spektroskopie ⁶³ |
| antimon | antická nádoba, 3000 př. Kr. | ChA ²⁴ |
| | iatrochemický medikament (replikovaný) | ChA ⁷³ |
| auripigment | islámská nádobka, 11. století | MxA ⁶⁰ |
| galenit | kohl, 1292–1189 př. Kr. | ChA ² |
| hydrozincit | římský medikament, 2. století | MxA ⁴⁷ |
| kalamín | patentní přípravek, 19. století | ChA, AAS ⁸⁷ |
| různé pigmenty | kohl, Starověký Egypt | ChA ³⁶ ; SEM, XRD ³⁷ |
| sádra | islámská nádobka, 11. století | MxA ⁶⁰ |
| | renesanční mast, 16. století | XRD, XPS ⁶⁶ |
| smithsonit | římský medikament, 2. století | MxA ⁴⁷ |
| <i>Organické substance</i> | | |
| absinth | alkohol, 20. století | GC-MS ^{100,101} |
| alizarin | kostí, 2. století | IR ^{28,29} |
| borové pryskyřice | římský medikament, 2. století | MxA ⁴⁷ |
| | Etruská mast, 2.–1. století př. Kr. | FT-IR, GC-MS ⁴⁸ |
| | římská mast | GC-MS ⁴⁹ |
| efedrin | rostlinný materiál, 3800 př. Kr. | GC-MS ⁵⁸ |
| epinefrin | injekční roztok, 20. století | HPLC-MS ⁹⁹ |
| ethanol | bylinné víno, 1850 př. Kr. | MxA ⁴⁰ |
| | mumie, 16.–20. století | LC-MS ⁶⁵ |
| | neolitické víno, 7000 př. Kr. | ChA, FT-IR, HPLC-UV ¹⁹ ; MxA ²⁰ |
| | patentní přípravek, 19. století | NMR ⁸⁴ ; GC-MS ⁸⁵ |
| etilefrin | injekční roztok, 20. století | HPLC-MS ⁹⁹ |
| furosemid | injekční roztok, 20. století | HPLC-MS ⁹⁹ |
| heroin | injekční roztok, 20. století | HPLC-MS ⁹³ |
| chinin | injekční roztok, 20. století | PC ⁹⁴ ; HPLC-MS ⁹⁵ |
| jehličnanové pryskyřice | římský medikament, 1.–2. století | GC-MS ⁴⁶ |

Tabulka 2.2 pokračuje na další straně.

Pokračování tabulky 2.2 z předchozí strany

| aktivní komponenta | matrice vzorku, datování | analytická metoda, ref. |
|------------------------|---|--|
| kofein | injekční roztok, 20. století | HPLC-MS ⁹⁹ |
| kokain | injekční roztok, 20. století | UV spektroskopie ⁹² ; HPLC-MS ⁹³ |
| | lidská tkáň, starověk | GC-MS, RIA ^{41,42,44} |
| | lidská tkáň, 2000–1500 př. Kr. | GC-MS ^{52–57} |
| | patentní přípravek, 19. století | GC-MS ⁸⁸ |
| konopí | lidská tkáň, starověk | GC-MS, NMR ²⁷ ; GC-MS, RIA ^{41,42} |
| mastix | etruská mast, 2.–1. století př. Kr. | FT-IR, GC-MS ⁴⁸ |
| med | pravěké víno | MxA ²⁰ |
| metamizol | injekční roztok, 20. století | HPLC-MS ⁹⁹ |
| nikotin | lidská tkáň, starověk | GC-MS, RIA ^{41,42,45} |
| | lidská tkáň, 100 př. Kr.–140 po Kr. | GC-MS ⁵⁰ |
| | mayské nádoby, 550–900 po Kr. | GC-MS, LC-MS ⁵¹ |
| olovnatá mýdla | reprodukovanný staroegyptský lék | FT-IR ³⁹ |
| opiové alkaloidy | patentní přípravek, 19. století | NMR ⁸⁴ |
| | reziduum, Starověký Egypt | MxA ^{32,33} ; GC-MS ³⁴ |
| peruánský balzám | substance, 17. století | ChA ⁶¹ |
| prokain | injekční roztok, 20. století | HPLC-MS ⁹⁹ |
| pryskyřice | renesanční lék | Ramanova spektroskopie ⁶³ |
| | substance, 17. století | GC-MS ⁶² |
| punský vosk | římský lék, 1–2. století | GC-MS ⁴⁶ |
| salicylan sodný | injekční roztok, 20. století | HPLC-MS ⁹⁹ |
| synefrin | injekční roztok, 20. století | HPLC-MS ⁹⁹ |
| rostlinné materiály | muslimská nádoba, 11. století | MxA ⁶⁰ |
| rostlinné oleje | etruská mast, 2.–1. století př. Kr. | FT-IR, GC-MS ⁴⁸ |
| | mast, 17. stol. | LC-MS ⁶⁸ |
| | substance, 17. stol. | ChA ⁶¹ |
| | bylinné víno, 1850 př. Kr. | MxA ⁴⁰ |
| škrob | římský lék, 2. století | MxA ⁴⁷ |
| terebintová pryskyřice | pravěké víno | ChA, FT-IR, HPLC-UV ¹⁹ |
| tuky | mast, 16. století | GC-MS ⁶⁷ |
| | mast, 17. století | LC-MS ⁶⁸ |
| | mast, 18. století | LC-MS ⁶⁹ |
| | římský lék, 1.–2. století | GC-MS ⁴⁶ ; MxA ⁴⁷ |
| včelí vosk | mast, 16. století | MxA ⁶⁶ |
| | mast, 18. století | MxA ⁷⁰ |
| | římská mast, 1. století př. Kr.–1. století po Kr. | GC-MS ⁴⁹ |
| | římský lék, 1.–2. století | GC-MS ⁴⁶ |
| zvířecí tuk | mast, 16. století | MxA ⁶⁶ |
| | mast, 17. století | LC-MS ⁶⁸ |
| | mast, 18. století | MxA ⁷⁰ |
| živice | různé, 1600–1200 př. Kr. | GC-MS ²⁵ |

2.2 Stabilita a degradační cesty léčivých látek a léčivých přípravků

2.2.1 *Studium stability farmak, stabilitní testy*

Studium stability léčivých látek a léčivých přípravků je nedílnou součástí moderní farmacie^{8, 9, 12, 102}. Při tomto studiu se hodnotí řada faktorů, které mohou mít vliv na stabilitu farmak a tím i na jejich farmaceutický účinek. Nejčastěji je v časovém měřítku analyzován obsah farmaceuticky aktivní ingredience, tedy účinné látky, přičemž jsou sledovány i případné vzniklé degradační produkty. V průběhu času totiž může degradační aktivní ingredience docházet nejen ke snížení účinnosti léčivého přípravku, ale také mohou vznikat produkty s potenciálně toxickým účinkem. Stabilita se posuzuje také z hlediska změny biodostupnosti například disolučním testem, nárůstu mikroorganismů v preparátu, nebo se posuzuje, zda jsou účinné látky v jednotlivých přípravcích zastoupeny stejnoměrně.

Právě analýza obsahu účinných látek, identifikace a kvantifikace potenciálních nečistot a degradačních produktů po stresové zátěži vzorku je hlavním parametrem při hodnocení expirace přípravku. Na základě výsledků lze zaručit požadovaný účinek léčivého přípravku po určitý časový úsek, zpravidla v řádu let. Výsledky stabilitních experimentů dávají také informaci o vhodných podmínkách skladování. Rovněž napomáhají při optimalizaci výrobního procesu (např. volba vhodných aditiv nebo pH prostředí), vývoji vhodné analytické metody pro separaci a identifikaci nečistot nebo při výběru vhodných obalových materiálů přípravku^{12, 102}.

Stabilitní testování lze provést pomocí různých experimentů. Zrychlený stabilitní experiment bývá prováděn při vyšší teplotě a relativní vlhkosti po kratší dobu, než při dlouhodobém experimentu. Kromě zvýšené teploty a relativní vlhkosti lze sledovat světlocitlivost, vliv pH nebo použitých obalů. Výsledky pomáhají určit, jaké degradační produkty lze v léčivém přípravku očekávat při dlouhodobém stabilitním experimentu^{9, 12, 102}. Přestože zrychlený stabilitní experiment umožňuje predikci expirace a degradačních produktů, pouze dlouhodobý experiment při zvolených podmínkách dokáže stabilitu léčivého přípravku přesně určit. Při dlouhodobém stabilitním experimentu je léčivý přípravek skladován při pokojové teplotě a 60% relativní vlhkosti po dobu v řádu jednotek let. V určitých časových intervalech (na začátku a pak zpravidla po třech měsících) se vzorky analyzují a vyhodnocují se trendy, zda dochází ke změnám ve sledovaných parametrech¹². Mezi další stabilitní experimenty patří cyklické testování, které navrhli Carstensen a Rhodes¹⁰³. Testování simuluje změnu teploty během dne. Při 24 hodinových cyklech teplota kolísá v rozmezí 5 °C. Autoři zjistili, že narozdíl od testování při konstantní teplotě je úbytek účinné látky při srovnatelném časovém úseku vyšší.

2.2.2 *Degradační cesty farmak*

Hlavním důvodem sledování koncentrace účinné látky při stabilitních experimentech je tedy předpověď možné změny farmaceutického účinku přípravku. Ačkoliv koncentrace účinné látky může výjimečně také narůstat – například odpařením rozpouštědla z infuzích přípravků¹² –, častěji dochází ke snížení její koncentrace v důsledku různých degradačních mechanismů. Objasnění těchto degradačních mechanismů je důležité z více důvodů:

1. Degradací vzniká toxický produkt. Příkladem může být tvorba epianhydrotetracyklinu z tetracyklinu¹², nebo degradace pralidoximu, který se v zásaditém prostředí rozpadá mimo jiné na kyanidový aniont⁹.
2. Léčivé přípravky by měly být stabilní jak ve své lékové formě, tak po podání přípravku pacientovi. Například peniciliny jsou stabilní při neutrálním pH, které je shodné s prostředím tenkého střeva, ale v kyselém prostředí žaludečních šťáv dochází k jejich rychlé degradaci⁹.
3. Degradací ale také může dojít ke ztrátě estetického vzhledu přípravku. Vznik nepříjemného zápachu nebo změna barvy přípravku znesnadňuje jeho podání pacientovi⁹.

Léčivé látky, resp. jednotlivé komponenty léčivého přípravku, mohou podléhat řadě degradačních mechanismů: hydrolýze, dehydrataci, isomerizaci a racemizaci, eliminaci, oxidaci, fotodegradaci a komplexním interakcím s přítomnými pomocnými látkami^{8,9}.

K hydrolýze dochází při kontaktu léčiva s vodou nebo vzdušnou vlhkostí. Jde o jeden z nejčastějších degradačních mechanismů léčiv obsahující esterovou nebo amidovou funkční skupinu. V případě esterů tvořených karboxylovou, karbamovou, sulfonovou nebo amidosulfonovou kyselinou s alkoholy dochází k hydrolýze nukleofilním atakem hydroxidového aniontu. Rychlost degradace přitom závisí na substituentech zbytku karboxylové a alkoholové části molekuly. Elektron-donorové skupiny hydrolýzu inhibují, elektron-akceptující skupiny naopak hydrolýzu urychlují. Amidové vazby jsou méně náchylné k hydrolýze než esterové, protože karbonylový uhlík amidové vazby je méně elektrofilní. Aminová skupina se proto méně snadno eliminuje. Příkladem degradace léčiva s esterovou vazbou může být kokain, který hydrolyzuje na benzoylekgonin a ekgonin methylester. Mezi léčiva s amidovou vazbou, která mohou hydrolyzovat patří například acetaminofenon nebo β -laktamová antibiotika.⁹

Dehydratace je častá zejména u sacharidů. Příkladem může být glukosa¹⁰⁴ nebo laktosa¹⁰⁵, které poskytují po odštěpení vody jako degradační produkt 5-(hydroxymethyl)furfural. K racemizaci a epimerizaci dochází v případě optických izomerů. Racemizaci podléhají například benzodiazepiny, peniciliny a cefalosporiny. Epimerizaci pak podléhá třeba pilokarpin (bazičnou katalýzou)⁹. Mezi eliminační reakce patří i dekarboxylace, která probíhá například u 4-aminosalicylové kyseliny¹⁰⁶. Atmosférický kyslík se často účastní oxidačních reakcí léčiv. Oxidační mechanismus závisí na struktuře molekuly. V literatuře byla již v první polovině 20. století popsána oxidace askorbové kyseliny¹⁰⁷. Další popsané příklady jsou oxidace 5-aminosalicylové kyseliny¹⁰⁸ nebo morfinu⁹. Fotodegradaci podléhá mnoho léčiv, přičemž mechanismus je velmi komplexní. Je většinou

doprovázena oxidací molekulárním kyslíkem. Světlocitlivé jsou například sennosidy A a B, které při osvětlení izomerizují¹⁰⁹.

2.3 Původ a kontext studovaných vzorků

Vzorky léčivých přípravků studované v této dizertační práci lze na základě jejich stáří rozdělit do dvou skupin. Detailní popis analyzovaných vzorků je uveden v příslušných kapitolách.

Starší skupina léčivých přípravků pochází z někdejší lékárny kapucínského kláštera v Praze na Hradčanech a je datována do 18. století^{110, 111}. Lékárna tohoto kláštera vznikla roku 1680 a byla provozována pravděpodobně do roku 1822, kdy zemřel poslední lékárník. Poté byla lékárna uzavřena a zcela nedotčená (včetně dobových přípravků) objevena roku 1895, kdy byla nejprve vystavena na Národopisné výstavě a posléze se stala součástí sbírek někdejšího Musea království Českého (dnes Národní muzeum). V současnosti je malá část vybavení vystavena ve stálé expozici Českého farmaceutického muzea v Kuksu, většina je uložena v depozitáři na zámku Vrchotovy Janovice. Přestože v barokní době nebyla příprava léčivých přípravků striktně normována závaznými lékopisy, užívalo se jako zdroje receptur v dotčené lékárně nespíše *Dispensatorium pharmaceuticum Austriaco-Viennense* z roku 1729, dodnes dochované v klášterní knihovně¹¹⁰. V této dizertační práci byly z této lékárny analyzovány rostlinný materiál (kořen ipecacuanhy, kap. 4), léčivé přípravky s obsahem opiových alkaloidů (kap. 5), rostlinné extrakty (extrakt ze senny, kap. 6) a masti (kap. 9).

Druhá, mladší skupina vzorků zahrnuje hromadně vyráběné léčivé přípravky z 1. poloviny 20. století pocházející ze sbírek Českého farmaceutického muzea. Jedná se o skleněné ampule s injekčními přípravky ve formě roztoku (srdeční glykosidy, kap. 7) a suché substance určené pro převedení do roztoku před podáním (neosalvarsan, kap. 8). U těchto vzorků se dochovaly originální obaly včetně deklarovaného obsahu účinných látek.

Další studované vzorky z této skupiny pocházely ze sbírek Katedry analytické chemie PřF UK. Jednalo se o pět mastí a jednu pastu připravené v lékárně U zlaté koruny v Moravské Ostravě v době před 2. světovou válkou (kap. 9).

2.4 Literatura ke 2. kapitole

1. Pollard A.M., Heron C.: *Archaeological Chemistry*. 2nd Edition. Cambridge, Royal Society of Chemistry 2008.
2. Fischer X.: Die chemische Zusammensetzung Altägyptischer Augenschminken. *Archiv der Pharmazie* **230** (1892) 9–38.
3. Usselman M. C., Reinhart C., Foulser K., Rocke A. J.: Restaging Liebig: A study in the replication of experiments. *Annals of Science* **62** (2005) 1–55.
4. Fors H., Principe L. M., Sibum H. O.: From the library to the laboratory and back again: Experiment as a tool for historians of science. *Ambix* **63** (2016) 85–97.
5. Hickel E.: The laboratory as an adjunct to historical research. *Pharmacy in History* **10** (1968) 105–108.
6. Hickel E.: The seminary for the history of pharmacy at the Technical University in Braunschweig. *Pharmacy in History* **15** (1973) 18–21.
7. Holland B. K.: Prospecting for drugs in ancient texts. *Nature* **369** (1994) 702.
8. *Drug Stability. Principles and Practices*. 3rd Edition. Carstensen J. T., Rhodes C. New York, Marcel Dekker, 2000.
9. Yoshioka S., Stella V. J.: *Stability of Drugs and Dosage Forms*. New York, Kluwer 2002.

10. Zilker M., Sörgel F., Holzgrabe U.: A long-time stability study of 50 drug substances representing common drug classes of pharmaceutical use. *Drug Testing and Analysis* **11** (2019) 1065–1075.
11. Cantrell L., Suchard J. R., Wu A., Gerona R. R.: Stability of active ingredients in long-expired prescription medications. *Archives of Internal Medicine* **172** (2012) 1685–1687.
12. Bajaj S., Singla D., Sakhuja N.: Stability testing of pharmaceutical products. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **2** (2012) 129–138.
13. Du B., Daniels V. R., Vaksman Z., Boyd J. L., Crady C., Putchala L.: Evaluation of physical and chemical changes in pharmaceuticals flown on space missions. *AAPS Journal* **13** (2011) 299–308.
14. Hamilton M. A., McKellar S.: Learning through objects: Development of the UWO Medical Artifact Collection as a teaching and research resource. *Canadian Bulletin of Medical History* **23** (2006) 219–243.
15. Kondratas R.: Safety issues in medical museums: The preservation and disposition of hazardous substances and controlled drugs in museum Collections. *Caduceus* **7** (1991) 55–62.
16. Nesměrák K., Kudláček K., Babica J.: Analytical chemistry studying historical pharmaceuticals and health care formulations. *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* **148** (2017) 1557–1568.
17. Capasso L.: 5300 years ago, the Ice Man used natural laxatives and antibiotics. *The Lancet* **352** (1998) 1864.
18. Sneader W.: *Drug Discovery: A History*. Chichester, John Wiley 2005.
19. McGovern P. E., Glusker D. L., Exner L. J., Voigt M. M.: Neolithic resinated wine. *Nature* **381** (1996) 480–481.
20. McGovern P. E., Zhang J., Tang J., Zhang Z., Hall G. R., Moreau R. A., Nunez A., Butrym E. D., Richards M. P., Wang C., Cheng G., Zhao Z., Wang C.: Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** (2004) 17593–17598.
21. Pérez-Arantegui J., Cepria G., Ribechini E., Degano I., Colombini M. P., Paz-Peralta J., Ortiz-Palomar E.: Colorants and oils in Roman make-ups—an eye witness account. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry* **28** (2009) 1019–1028.
22. Ribechini E., Modugno F., Pérez-Arantegui J., Colombini M. P.: Discovering the composition of ancient cosmetics and remedies: analytical techniques and materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **401** (2011) 1727–1738.
23. McCallum R. I.: *Antimony in Medical History*. Edinburgh, The Pentland Press 1999.
24. Berthelot M.: Métaux et minéraux provenant de l'antique Chaldée. Sur les origines de l'étain dans le monde ancien. *Comptes rendus hebdomadaires des séances L'académie des Sciences* **104** (1887) 265–271.
25. Connan J., Deschesne O.: Archaeological bitumen: Identification, origins and uses of an ancient near eastern material. *Materials Research Society Symposium Proceedings* **267** (1992) 683–720.
26. Connan J.: Use and trade of bitumen in antiquity and prehistory: Molecular archaeology reveals secrets of past civilizations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **354** (1999) 33–50.
27. Zias J., Stark H., Sellgman J., Levy R., Werker E., Breuer A., Mechoulam R.: Early medical use of cannabis. *Nature* **363** (1993) 215.
28. Steckoll S. H., Goffer Z., Nathan H., Haas N.: Red stained bones from Qumran. *Nature* **231** (1971) 469–470.
29. Steckoll S. H., Goffer Z., Nathan H., Haas N.: Red-stained human bones from Qumran. *Israel Journal of Medical Sciences* **7** (1971) 1219–1223.
30. Counsell D. J.: Intoxicants in ancient Egypt? opium, nymphaea, coca and tobacco. In: *Egyptian Mummies and Modern Science*. David R. A. (ed.). Cambridge, Cambridge University Press 2008, p. 195–215.
31. Merrillees R. S.: Opium trade in the Bronze Age Levant. *Antiquity* **36** (1962) 287–292.
32. Koschel K.: Opium alkaloids in a cypriote Base Ring I Vessel (Bilbil) of the Middle Bronze Age from Egypt. *Ägypten und Levante / Egypt Levant* **6** (1996) 159–166.
33. Bisset N. G., Bruhn J. G., Curto S., Holmstedt B., Nyman U., Zenk M. H.: Was opium known in 18th dynasty ancient Egypt? An examination of materials from the tomb of the chief royal architect Kha. *Journal of Ethnopharmacology* **41** (1994) 99–114.
34. Chovanec Z., Rafferty S., Swiny S.: Opium for the masses. *Ethnoarchaeology* **4** (2012) 5–36.
35. Mahmood Z. A., Azhar I., Ahmed S. W.: Kohl use in antiquity: Effects on the rye. In: *History of Toxicology and Environmental Health: Toxicology in Antiquity*. Vol. 2. Wexler P. (ed.). Amsterdam, Academic Press 2014, p. 68–78.
36. Lucas A., Harris J. R.: *Ancient Egyptian Materials. Ancient Egyptian materials and industries*. 3rd Edition. London, E. Arnold, 1948.

37. Walter P., Martinetto P., Tsoucaris G., Breniaux R., Lefebvre M. A., Richard G., Talabot J., Dooryhee, E.: Making make-up in Ancient Egypt. *Nature* **397** (1999) 483–484.
38. Tapsoba I., Arbault S., Walter P., Amatore C.: Finding out Egyptian Gods' secret using analytical chemistry: biomedical properties of Egyptian black makeup revealed by amperometry at single cells. *Analytical Chemistry* **82** (2010) 457–460.
39. Cotte M., Checroun E., Susini J., Dumas P., Tchoreloff P., Besnard M., Walter P.: Kinetics of oil saponification by lead salts in ancient preparations of pharmaceutical lead plasters and painting lead mediums. *Talanta* **70** (2006) 1136–1142.
40. McGovern P. E., Mirzoian A., Hall G. R.: Ancient Egyptian herbal wines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** (2009) 7361–7366.
41. Balabanova S., Parsche F., Pirsig W.: First identification of drugs in Egyptian mummies. *Naturwissenschaften* **79** (1992) 358.
42. Parsche F., Balabanova S., Pirsig W.: Drugs in ancient populations. *The Lancet* **341** (1993) 503.
43. Cartmell L. W., Weems C.: Overview of hair analysis: A report of hair analysis from Dakhleh Oasis, Egypt. *Chungará (Arica)* **33** (2001) 289–292.
44. Balabanova S., Rösing F. W., Bühler G., Teschler-Nicola M., Strouhal E., Rosenthal J.: Evidence of cocaine in ancient pre-Columbian populations from Christian Sayala (Egyptian Nubia). *Journal of Paleopathology* **9** (1997) 15–21.
45. Balabanova S., Rösing F. W., Teschler-Nicola M., Strouhal E., Bühler G., Michael C., Rosenthal J.: Was nicotine used as stimulant already in the VI century A. D. from the Christian Sayala Population? *Journal of Paleopathology* **8** (1996) 43–50.
46. Stacey R. J.: The composition of some Roman medicines: evidence for Pliny's Punic wax? *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **401** (2011) 1749–1759.
47. Giachi G., Pallecchi P., Romualdi A., Ribechini E., Lucejko J. J., Lippi M. M.: Ingredients of a 2,000-y-old medicine revealed by chemical, mineralogical, and botanical investigations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110** (2013) 1193–1196.
48. Colombini M. P., Giachi G., Iozzo M., Ribechini E.: An Etruscan ointment from Chiusi (Tuscany, Italy): its chemical characterization. *Journal of Archaeological Science* **36** (2009) 1488–1495.
49. Ribechini E., Modugno F., Colombini M. P., Evershed R. P.: Gas chromatographic and mass spectrometric investigations of organic residues from Roman glass unguentaria. *Journal of Chromatography A* **1183** (2008) 158–169.
50. Musshoff F., Rosendahl W., Madea B.: Determination of nicotine in hair samples of pre-Columbian mummies. *Forensic Science International* **185** (2009) 84–88.
51. Loughmiller-Cardinal J. A., Zagorevski D.: Maya flasks: The home of tobacco and godly substances. *Ancient Mesoamerica* **27** (2016) 1–11.
52. Cartmell L. W., Aufderhide A., Weems C.: Cocaine metabolites in pre-Columbian mummy hair. *The Journal of the Oklahoma State Medical Association* **84** (1991) 11–12.
53. Cartmell L. W., Aufderheide A. C., Springfield A., Weems C., Arriaza B.: The frequency and antiquity of prehistoric coca-leaf-chewing practices in Northern Chile: Radioimmunoassay of a cocaine metabolite in human-mummy hair. *Latin American Antiquity* **2** (1991) 260–268.
54. Rivera M. A., Aufderheide A. C., Cartmell L. W., Torres C. M., Langsjoen O.: Antiquity of coca-leaf chewing in the South Central Andes: A 3,000 year archaeological record of coca-leaf chewing from Northern Chile. *Journal of Psychoactive Drugs* **37** (2005) 455–458.
55. Springfield A. C., Cartmell L. W., Aufderheide A. C., Buikstra J., Ho, J. Cocaine and metabolites in the hair of ancient Peruvian coca leaf chewers. *Forensic Science International* **63** (1993) 269–275.
56. Báez H., Castro M. M., Benavente M. A., Kintz P., Cirimele V., Camargo C., Thomas C.: Drugs in prehistory: chemical analysis of ancient human hair. *Forensic Science International* **108** (2000) 173–179.
57. Indriati E., Buikstra J. E.: Coca chewing in prehistoric coastal Peru: Dental evidence. *American Journal of Physical Anthropology* **114** (2001) 242–257.
58. Xie M., Yang Y., Wang B., Wang C.: Interdisciplinary investigation on ancient Ephedra twigs from Gumugou Cemetery (3800b.p.) in Xinjiang region, northwest China. *Microscopy Research and Technique* **76** (2013) 663–672.

59. Quin G., Li S.: Mössbauer study of chinese ancient mineral drug. *Hyperfine Interactions* **70** (1992) 1041–1044.
60. Pérez-Arategui J., Ribechini E., Colombini M. P., Escudero F.: Characterization of an ancient ‘chemical’ preparation: pigments and drugs in medieval Islamic Spain. *Journal of Archaeological Science* **38** (2011) 3350–3357.
61. Evers N.: Some 200 year-old specimens of drugs. *Pharmaceutical Journal* **130** (1933) 219.
62. Steigenberger G., Herm C.: Natural resins and balsams from an eighteenth-century pharmaceutical collection analysed by gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **401** (2011) 1771–1784.
63. Edwards H. G. M., Sibley M. G., Derham B., Heron C. P.: Raman spectroscopy of archaeological samples from the Barber-Surgeon’s medicine chest on the Mary Rose. *Journal of Raman Spectroscopy* **35** (2004) 746–753.
64. Scholz-Böttcher B. M., Nissenbaum A., Rullkötter J.: An 18th century medication ‘Mumia vera aegyptica’: Fake or authentic? *Organic Geochemistry* **65** (2013) 1–18.
65. Musshoff F., Brockmann C., Madea B., Rosendahl W., Piombino-Mascali D.: Ethyl glucuronide findings in hair samples from the mummies of the Capuchin Catacombs of Palermo. *Forensic Science International* **232** (2013) 213–217.
66. Baeten J., Romanus K., Degryse P., De Clercq W., Poelman H., Verbeke K., Luybaerts A., Walton M., Jacobs P., De Vos D., Waelkens M.: Application of a multi-analytical toolset to a 16th century ointment: Identification as lead plaster mixed with beeswax. *Microchemical Journal* **95** (2010) 227–234.
67. Riedo C., Scalarone D., Chiantore O.: Pyrolysis–GC/MS for the identification of macromolecular components in historical recipes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **401** (2011) 1761–1769.
68. Saliu F., Modugno F., Orlandi M., Colombini M. P.: HPLC-APCI-MS analysis of triacylglycerols (TAGs) in historical pharmaceutical ointments from the eighteenth century. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **401** (2011) 1785–1800.
69. Saliu F., Degano I., Colombini M. P.: Identification of triacylglycerols in archaeological organic residues by core-shell reversed phase liquid chromatography coupled to electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1346** (2014) 78–87.
70. Gamberini M. C., Baraldi C., Freguglia G., Baraldi P.: Spectral analysis of pharmaceutical formulations prepared according to ancient recipes in comparison with old museum remains. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **401** (2011) 1839–1846.
71. Lindemann M.: *Medicine and Society in Early Modern Europe*. Cambridge, Cambridge University Press 1999.
72. Pagel W.: *Paracelsus. An Introduction to Philosophical Medicine in the Era of the Renaissance*. 2nd Edition. Basel, Karger 1982.
73. Dobler F.: Die chemische Arzneibereitung bei Theophrastus Paracelsus am Beispiel seiner Antimonpräparate. 2. *Pharmaceutica Acta Helveticae* **32** (1957) 226–252.
74. Dobler F.: Die Tinctura in der Geschichte der Pharmazie. *Pharmaceutica Acta Helveticae* **33** (1958) 765–796.
75. Schröder G. Die Vorträge der Hauptversammlung. *Veröffentlichungen der Internationalen Gesellschaft für Geschichte der Pharm. e. V.* **13** (1958) 177–184.
76. Wietschoreck H.: Aethiops – eine neue Atzneimittelgruppe der Nachchemiatrie – und ihre Bedeutung in Verbindung mit anderen Antimon-Präparaten. (Ein Beispiel für den Einsatz chemischer Untersuchungen bei der Bearbeitung arzneimittelgeschichtlicher Fragen). *Veröffentlichungen der Internationalen Gesellschaft für Geschichte der Pharmazie* **47** (1979) 49–55.
77. Wietschoreck H.: Zur Geschichte und Chemie des „Lapis ophtalmicus“ unter besonderer Berücksichtigung der Entwicklung quantitativer Kupferbestimmungen in der Pharmazie. *Revue d'histoire de la pharmacie* **63** (1975) 535–541.
78. Wietschoreck H.: Einsatz moderner analytischer Methoden zur Lösung pharmazie-historischer Probleme. *Veröffentlichungen der Internationalen Gesellschaft für Geschichte der Pharmazie* **28** (1966) 283–293.
79. Wietschoreck H.: Zur Historik, Chemie und Analytik von Oleum de laretibus. *Veröffentlichungen der Internationalen Gesellschaft für Geschichte der Pharmazie* **35** (1969) 187–193.
80. Wietschoreck H.: Einsatz analytischer Methoden bei der Identifizierung alter Präparate aus Apotheken- und Museumsbeständen, am Beispiel der ‘Pulveres compositi’ erläutert. *Veröffentlichungen der Internationalen Gesellschaft für Geschichte der Pharmazie* **36** (1970) 169–184.

81. Schneider W.: *Geschichte der pharmazeutischen Chemie*. Weinheim, Verlag Chemie 1972.
82. Raviña E.: *The Evolution of Drug Discovery: From Traditional Medicines to Modern Drugs*. Weinheim, Wiley-VCH 2011.
83. Diefenbach A., Garshott D., MacDonald E., Sanday T., Maurice S., Fahey M., Benvenuto M. A.: Examination of a selection of the patent medicines and nostrums at the Henry Ford Museum via energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry. *ACS Symposium Series* **1159** (2014) 87–97.
84. Maurice S., Diefenbach A., Garshott D., McDonald E., Sanday T., Fahey M., Benvenuto M. A.: Analysis of liquid patent medicines archived at the Henry Ford Museum, via 1H NMR spectroscopy. *ACS Symposium Series* **1189** (2015) 181–190.
85. Torbenson M., Kelly R. H., Erlen J., Cropcho L., Moraca M., Beiler B., Rao K. N., Virji M.: Lash's: A Bitter medicine: Biochemical analysis of an historical proprietary medicine. *Historical Archaeology* **34** (2000) 56–64.
86. Spinner M. A., Lustig A. M., Warner M., von Wandruszka R.: Chemical identification of materials recovered in an archaeological excavation at Sandpoint, Idaho. *Journal of the Idaho Academy of Science* **47** (2011) 29–53.
87. Voss B. L., von Wandruszka R., Fink A., Summer T., Harman S. E., Shapovalov A., Kane M. S., De Loney M., Acebo N.: Stone drugs and calamine lotion: Chemical analysis of residue in nineteenth-century glass bottles, Market Street Chinatown, San Jose, California. *California Archaeology* **7** (2011) 93–118.
88. Fishel R. L., Scott J. W., Hedman K. M., Butler T. E.: Chemical analyses of the ingredients of an 1850s Thomson's Compound Syrup of Tar patent medicine bottle. *Technical Briefs in Historical Archaeology* **10** (2016) 9–20.
89. Zilker M., Sorgel F., Holzgrabe U.: A systematic review of the stability of finished pharmaceutical products and drug substances beyond their labeled expiry dates. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **166** (2019) 222–235.
90. Kravetz R. E.: Hypodermic syringe. *American Journal of Gastroenterology* **100** (2005) 2614–2615.
91. Nesměrák K., Kudláček K., Babica J.: Analytical chemistry studying historical pharmaceuticals and health care formulations. *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* **148** (2017) 1557–1568.
92. Gonzales J. R.: Estudio de medicamentos antiguos. *Farmacia Clinica* **6** (1989) 451–458.
93. Nesměrák K., Štícha M., Čvančarova M.: HPLC/MS analysis of historical pharmaceutical preparations of heroin and cocaine. *Analytical Letters* **43** (2010) 2572–2581.
94. Yalcindag O. N., Onur E.: Stability of certain medicines kept at ambient temperature for 34 years. *Türk Hijiyen ve Tecrubi Biyoloji Dergisi* **30** (1970) 239–241.
95. Kudláček K., Nesměrák K., Štícha M., Kozlík P., Babica J.: Historical injection solutions of quinine analyzed by HPLC/MS. *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* **148** (2017) 1613–1618.
96. Lyon R. C., Taylor J. S., Porter D. A., Prasanna H. R., Hussain A. S.: Stability profiles of drug products extended beyond labeled expiration dates. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **95** (2006) 1549–1560.
97. Greene J.: Short expiration dates may exacerbate drug shortages. *Annals of Emergency Medicine* **71** (2018) A13–A15.
98. Kudláček K., Nesměrák K., Štícha M., Kozlík P., Babica J.: Degradation of ouabain in 80-year-old injection solution studied by HILIC–MS. *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* **149** (2018) 1555–1560.
99. Zilker M., Sorgel F., Holzgrabe U.: A stability-study of expired ampoules manufactured more than 40 years ago. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **150** (2018) 318–326.
100. Lachenmeier D. W., Nathan-Maister D., Breaux T. A., Sohnius E. M., Schoeberl K., Kuballa T.: Chemical composition of vintage preban absinthe with special reference to thujone, fenchone, pinocamphone, methanol, copper, and antimony concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56** (2008) 3073–3081.
101. 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** (2009) 2782–2785.
102. *Pharmaceutical Stress Testing. Predicting Drug Degradation*. 2nd Edition. Baertschi S. W., Alsante K. M., Reed R. A. (eds.). London, Informa Healthcare 2011.
103. Carstensen J. T., Rhodes C. T.: Cyclic testing in stability programs. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **12** (1986) 1219–1225.
104. Taylor R. B., Sood V. C.: An h.p.l.c. study of the initial stages of dextrose decomposition in neutral solution. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **30** (1978) 510–511.

105. Brownley C. A., Lachman L.: Browning of spray-processed lactose. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **53** (1964) 452–454.
106. Tanaka N., Nakagaki M.: Physicochemical studies on the decomposition of *p*-aminosalicylic acid and its salts. I. Effect of pH, and addition of trimethylene glycol, polyvinylpyrrolidone, and some surface-active agents on the decarboxylation of *p*-aminosalicylic acid in solution. *Yakugaku Zasshi* **81** (1961) 591–596. *Chem. Abstr.* **55**:111915.
107. Dekker A. O., Dickinson R. G.: Oxidation of ascorbic acid by oxygen with cupric ion as catalyst. *Journal of the American Chemical Society* **62** (1940) 2165–2171.
108. Palsmeier R. K., Radzik D. M., Lunte C. E.: Investigation of the degradation mechanism of 5-aminosalicylic acid in aqueous solution. *Pharmaceutical Research* **9** (1992) 933–938.
109. Merle J., Barthes D., Besson J.: High-performance liquid chromatographic study on sennoside A and B changes in solution. *Farmaco, Edizione Pratica* **39** (1984) 233–242.
110. Nesměrác K., Kunešová J.: Farmaceutická historie kapucínského kláštera v Praze na Hradčanech část I. Klášterní lékárna. *Česká a Slovenská farmacie* **64** (2015) 79–94.
111. Nesměrác K.: Farmaceuti mezi členy českomoravské kapucínské provincie. *Česká a Slovenská farmacie* **68** (2019) 243–262.

3 Materiály a metody

Tato kapitola zahrnuje obecný přehled v následujících kapitolách použitých analytických a farmaceutických standardů a chemikálií, instrumentace a softwaru a metod pro zpracování a analýzu naměřených dat. Specifické podmínky měření jsou uvedeny v příslušné kapitole, kde jsou případně uvedeny konkrétní podmínky měření.

3.1 Použité chemikálie

3.1.1 *Standardy účinných látek*

Farmaceutický standard drogy ipekakuanhy (sušený kořen *Cephaelis acuminata* H. Karst) pocházel z farmakognosické sbírky Farmaceutické fakulty Univerzity v Ankaře v Turecku (inv. č. AEF 27031). Celkový obsah alkaloidů rovný $1,71 \pm 0,94$ % hmotnostního podílu sušiny byl stanoven potenciometrickou titrací odměrným roztokem kyseliny chloristé o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ v ledové octové kyselině¹.

Farmaceutický standard opia s deklarovaným obsahem morfinu 9,8 % pocházel ze sbírek Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

Farmaceutický standard drogy senny byl zakoupen v místní lékárně jako čajové sáčky s názvem „Sennae Folium“ (Megafyt Pharma, Česká republika). Obsah sennosidů A a B byl určen metodou podle Evropského lékopisu 8.0 (cit.³) na 1,59 %.

Referenční standardy podle Evropského lékopisu 8.0 emetin hydrochloridu a cefalin hydrochloridu byly od firmy Sigma-Aldrich.

Analytické standardy kotarninu, morfinu, mekoninu, papaverinu a noskapinu pocházely ze sbírek Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Identita jednotlivých standardů byla ověřena hmotnostní spektrometrií a čistota byla ověřena potenciometrickou titrací odměrným roztokem kyseliny chloristé o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ v ledové octové kyselině².

Analytické standardy acetylsalicylové kyseliny, benzokainu, benzoové kyseliny, fenolu, D-limonenu, oktahydrátu strofantinu, salicylové kyseliny, sennosidu A, sennosidu B, resorcinolu, vanilinu byly od firmy Sigma-Aldrich.

3.1.2 *Ostatní použité chemikálie*

Ostatní použité chemikálie byly čistoty HPLC nebo p. a. a pocházely od firmy Sigma-Aldrich: acetonitril, diethylether, 1-hexansíran sodný, chloroform, methanol, mravenčan sodný, mravenčan amonný, mravenčí kyselina ($\geq 95\%$), octan amonný trihydrát, octová kyselina ($\geq 99,5\%$), vodný roztok amoniaku ($\geq 25\%$).

Dále byly použity chemikálie čistoty p. a. nebo LC-MS od firmy Carlo Erba Reagents (Itálie): acetonitril, diethylether, ethanol, hexan, hexadekan, hydroxid draselný, chloroform, isooktan, isopropanol, kyselina chlorovodíková ($\geq 35\%$), methanol, *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid, tridekanová kyselina.

Pro kalibraci detektoru HPLC-MS² sloužil standard Agilent mix HP0321 (Agilent Technologies, USA).

3.2 **Použité přístroje**

Pro separaci alkaloidů ipekakuanhy, alkaloidů opia, glykosidů senny, srdečních glykosidů a neosalvarsanu byl použit kapalinový chromatograf UHPLC NexeraXR (Shimadzu, Japonsko) s diode-array detektorem a hmotnostním spektrometrem Compact QTOF Bruker (Bruker, Německo) s elektrosprejovou ionizací.

Při saponifikaci historických pozůstatků masť byl použit přístroj Ethos One High Performance Microwave Digestion System (Milestone Srl, Itálie). Vzorky historických pozůstatků masť byly analyzovány metodou GC-MS screeningu pomocí plynového chromatografu HP 6890 GC Systems s hmotnostně spektrometrickým detektorem HP 5973 (obojí Hewlett Packard). Těkávé organické látky byly při analýze historických pozůstatků masť extrahovány pomocí mikroextrakčního vlákna Stable Flex Divinylbenzen/Carboxen/PDMS (Supelco, USA). Těkávé organické látky byly separovány pomocí plynového chromatografu 6890N (Agilent, USA) s hmotnostně spektrometrickým detektorem HP 5973 (Hewlett Packard). Analýza triacylglycerolů a esterů specifických pro včelí vosk byla realizována na kapalinovém chromatografu HPLC 1260 Infinity ve spojení s Jet Steam ESI interface s Q-TOF hmotnostním spektrometrem 6530 Infinity Q-TOF (obojí Agilent Technologies, USA). Kvantifikace vybraných účinných a pomocných látek historických pozůstatků masť byla provedena pomocí kapalinového chromatografu UHPLC NexeraXR (Shimadzu, Japonsko) s diode-array detektorem.

Pro přípravu vzorků byly použity: analytické váhy R 200 D (Sartorius, Německo), laboratorní centrifuga, pH-metr 3510 Jenway (UK) kalibrovaný na tři standardní pufrů a ultrazvuková lázeň SonorexRK 100 (Bandelin Electronic, Německo).

3.3 Metody pro zpracování a analýzu naměřených dat

Chromatografická data byla zpracována běžnými postupy⁴. Faktor asymetrie píku (A_s) byl vypočítán podle vztahu

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

kde A je rozdíl retenčního času píku a retenčního času v 10% výšce píku na jeho vzestupné části (min), B je rozdíl retenčního času v 10% výšce píku na jeho sestupné části a retenčního času píku (min).

Počet teoretických pater (n) byl vypočítán podle vztahu

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

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

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

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

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

Podíl signálu k šumu (S/N) byl vypočítán podle vztahu

$$S/N = \frac{2H}{h} \quad (3.4)$$

kde H je výška píku měřená od středu základní linie po vrchol píku a h je výška šumu základní linie.

Naměřená data byla statisticky zpracována na hladině významnosti 0,95 (cit.⁵). Případné odlehle výsledky jednotlivých stanovení byly vyhodnoceny Deanovým-Dixonovým testem. Výsledek byl vyjádřen jako medián s intervalem spolehlivosti.

Výpočty byly prováděny programem Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA). Grafy a kalibrační rovnice byly zpracovány programem OriginPro 8.5 (Microcal Software, USA). Chemické struktury byly vytvořeny programem ChemDraw Ultra 8.0 (Perkin Elmer, USA). Data získaná kapalinovými chromatografy byla vyhodnocena programy LabSolutions LC (Shimadzu, Japonsko) a MassHunter Workstation (Agilent Technologies, USA). Data získaná plynovými chromatografy byla vyhodnocena programem MSDChemStationD.02.00.275 (Agilent Technologies, USA) s knihovnami spekter NIST/EPA/NIH MassSpectral Library (verze NIST 05), NIST MassSpectral Search Program

(v. 2.0d), NIST 1.7 mainEI MS Library (vše od National Institute of Standards and Technology, USA) a WILEY 275 MS Library.

3.4 Literatura ke 3. kapitole

1. Feyns L. V., Grady L. T.: Emetin hydrochloride. In> *Analytical Profiles of Drug Substances. Vol. 10.* Florey K. (Ed.). New York, Academic Press, 1981, p. 289–335
2. Šafařík L., Stránský Z.: *Titrimetric Analysis in Organic Solvents.* Amsterdam, Elsevier 1986.
3. *European Pharmacopoeia 9.0.* Strasbourg, Council of Europe 2013.
4. Snyder L. R., Kirkland J. J., Dolan J. W.: *Introduction to Modern Liquid Chromatography.* 3rd Edition. Hoboken, Wiley 2009.
5. Miller J. N., Miller J. C.: *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry.* 5th Edition. Harlow, Pearson Education 2005.

4 Alkaloidy ipekakuanhy

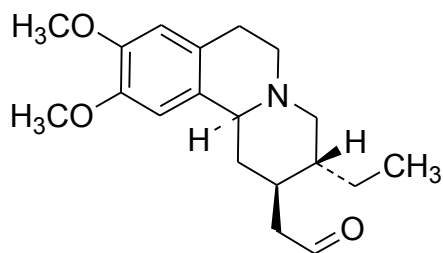
Ipekakuanha je významná rostlinná droga, známá evropské medicíně díky transatlantickým expedicím do Jižní Ameriky v počátcích novověku¹. V této kapitole jsou prezentovány výsledky analýzy dvou vzorků drogy z 18. století, pocházející z hradčanské kapucínské lékárny.

4.1 Chemické složení, historie využití ipekakuanhy

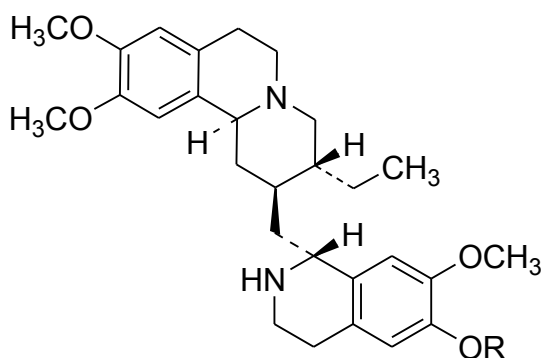
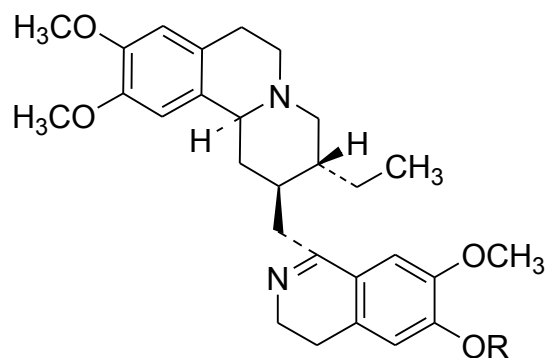
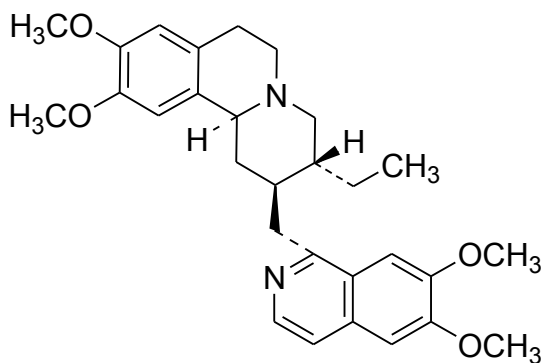
Jako ipekakuanha se označují sušené kořeny a oddenky rostliny *Cephaelis ipecacuanha* Brot. (hlavěnka dávivá)², případně podobných druhů rodu *Cephaelis* (hlavěnka). Ve větších dávkách vyvolává droga emetický účinek, v nižších pak působí jako expektorans. Považuje se také za léčivo proti úplavici³. Poprvé byla ipekakuanha v evropské medicíně použita na konci 17. století, nejprve pro léčbu úplavice, později v 18. století pak ve směsi s opiem jako Doverův prášek, který byl široce používán proti horečce a malarické zimnici po dalších dvěstě let⁴.

Hlavními alkaloidy ipekakuanhy jsou emetin a cefaelin, které doprovází několik strukturně podobných alkaloidů⁵⁻⁷. Struktura hlavních a některých vybraných alkaloidů ipekakuanhy je uvedena na obr. 4.1.

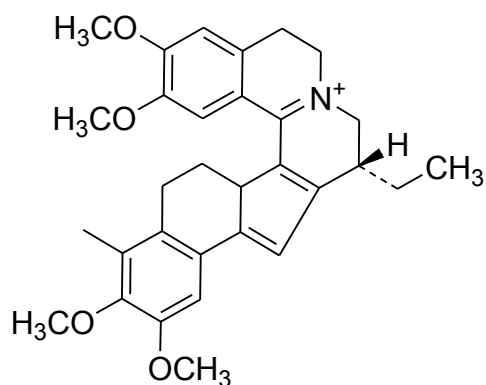
Léčba emetinem, a podobně i ipekakuanhou byla z důvodu toxicity ukončena a nahrazena bezpečnějšími a účinnějšími farmaky⁸. Léčivé účinky alkaloidů ipekakuanhy jsou ale v současnosti intenzivně studovány v oblasti léčby rakoviny⁹ nebo proti virovým onemocněním¹⁰.



protoemetin

emetin, R = -CH₃
cefaelin, R = -HO-methylpsychotrin, R = -CH₃
psychotrin, R = -H

emetamin



rubremetin

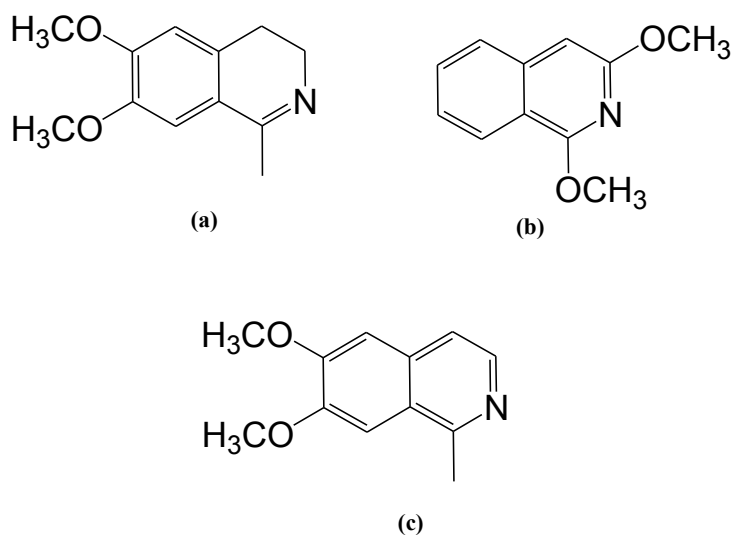
Obr. 4.1 Strukturní vzorce emetinu, cefaelinu a strukturně podobných alkaloidů ipekakuanhy.

4.2 Degradční cesty alkaloidů ipekakuanhy

V literatuře je popsán především vliv světla a teploty na stabilitu alkaloidů ipekakuanhy, zejména pak injekčních roztoků čistého emetinu. Nejstarší práce zmiňují zbarvení injekčních roztoků emetinu, které byly ponechány na rozptýleném slunečním světle a pouze předpokládají nějaké degradační

produkty^{11,12}. Degradaci injekčního roztoku emetin hydrochloridu studoval Bayraktar-Alpmen¹³ při teplotách 8, 20 a 37 °C a za vlivu světla. Pomocí tenkovrstvé chromatografie našel jako degradační produkty *O*-methylpsychotrin, psychotrin, cefaelin, emetamin a rubremetin (jejich struktury jsou zobrazeny na obr. 4.1). Rovněž zjistil, že se zvyšujícím se pH roztoku stabilita alkaloidů ipekakuanhy klesá. Vliv zvýšené teploty studovali také Adamski a Sawicka¹⁴, kteří zahřívali ethanolický extrakt kořene ipekakuanhy pod zpětným chladičem po dobu pěti hodin, což vedlo ke snížení obsahu alkaloidů o 27 %. Termolýzou emetinu při 220 °C se zabývali Stahl a Schmidt¹⁵, zjistili vznik 1-methyl-3,4-dihydro-6,7-dimethoxyisochinolinu, dimethoxyisochinolinu a 1-methyl-6,7-dimethoxyisochinolinu (struktury jsou zobrazeny na obr. 4.2). Schuijt a kol.¹⁶ identifikovali při thermochemickém a fotochemickém rozpadu emetinu celkem deset produktů. Při osvětlení UV zářením se tvoří oxidační produkty, přičemž nejvíce je zastoupen *O*-methylpsychotrin.

Na základě těchto zjištění byly pro stabilizaci injekčních roztoků emetinu používány cyklodextriny¹⁷ nebo organické aminy^{18,19}. V literatuře stabilita samotné drogy ipekakuanhy není popsána. Lékopisy pouze doporučují její uchovávání v dobře uzavřených nádobách chráněných před slunečním světlem²⁰.



Obr. 4.2 Strukturní vzorce produktů termolýzy emetinu: (a) 1-methyl-3,4-dihydro-6,7-dimethoxyisochinolin, (b) dimethoxyisochinolin, a (c) 1-methyl-6,7-dimethoxyisochinolin¹⁵.

4.3 Popis vzorků

Oba studované vzorky byly uchovávány v původních barokních farmaceutických skleněných nádobách, které byly uzavřeny originálním koženým víčkem (obr. 4.3). Nádoby jsou datovány do 18. století, pocházejí z hradčanské kapucínské lékárny a v současnosti jsou uloženy v depozitáři Národního muzea v Praze²¹. Vzorek H2-9550 byl uchováván v nádobě o výšce 9,0 cm a průměru 6,5 cm s latinsky psaným štítkem „R. Hypeocan“, což v překladu znamená „Kořen ipekakuanhy“. Vzorek H2-9556 byl uchováván v nádobě o stejných rozměrech opatřené latinsky psaným štítkem

„⊕ R: Hypocoaco“, což v překladu znamená „Práškový kořen ipekakuanhy“. Každá nádoba byla opatrně otevřena a pomocí skleněné lžice byly odebrány tři díly vzorku; jeden ze středu nádoby a po jednom z protilehlých míst u stěny nádoby. Odebrané vzorky byly uchovávány v temnu ve skleněných nádobách. Těsně před analýzou byl každý vzorek homogenizován v porcelánové třecí misce a prášek byl po dobu 24 hodin sušen v exikátoru nad oxidem fosforečným.



Obr. 4.3 Barokní stojatky obsahující (a) vzorek H2-9556, kořen ipekakuanhy a (b) vzorek H2-9550, práškový kořen ipekakuanhy.

4.4 Výsledky a diskuse

Pro extrakci a následnou HPLC separaci alkaloidů ipekakuanhy z analyzovaných vzorků byly použity a optimalizovány analytické metody vycházející z literatury.

4.4.1 *Optimalizace extrakce*

Pro extrakci alkaloidů ze vzorků ipekakuanhy existuje řada metod²², například extrakce diethyletherem^{23,24}, methanolem²⁵, methanolem a následnou extrakcí chloroformem⁵ nebo směsí diethyletheru a chloroformu²⁶. Extrakční činidlo se obvykle používá v alkalickém prostředí, protože alkaloidy ipekakuanhy jsou slabými bázemi.

K extrakci alkaloidů ipekakuanhy z analyzovaného vzorku byly zvoleny diethylether a methanol, oba bez i s přidavkem vodného roztoku amoniaku. Výtěžnost extrakce byla testována na farmaceutickém standardu drogy ipekakuanhy se známým obsahem alkaloidů. Nejvyššího výtěžku bylo dosaženo extrakcí diethyletherem a 5% vodným roztokem amoniaku v poměru 4:1. Výtěžek extrakce činil $98,0 \pm 3,5$ %. Tento postup byl také použit v případě analyzovaných historických vzorků.

4.4.2 Příprava vzorku k analýze

K navážce 100 mg homogenizovaného vzorku bylo do Erlenmeyerovy baňky přidáno 5 cm³ 5% vodného roztoku amoniaku a 20 cm³ diethyletheru. Extrakce probíhala po dobu 24 hodin. Organická fáze byla poté zfiltrována přes 0,2μm injekční filtry (Whatman). Těsně před HPLC analýzou byl objem 1 cm³ extraktu odpařen při 40 °C a znovu rozpuštěn v 1 cm³ methanolu.

4.4.3 Optimalizace HPLC separace

Separace alkaloidů ipekakuanhy pomocí HPLC byly popsány nejčastěji na reverzní fázi při použití methanolu a vodných pufrů^{22,27} nebo acetonitrilu a vodných pufrů²⁸ jako mobilní fáze.

Jako výchozí metoda pro analýzu historického vzorku byla použita separace Elvidge a kol.^{29,30} probíhající na oktadecylové stacionární fázi s mobilní fází obsahující vodný pufr 1-hexansíranu sodného a methanolu. Pro zvýšení účinnosti separace analytů byl optimalizován podíl methanolu a pufru v mobilní fázi v poměrech 40:60, 50:50, 60:40 a 70:30 (v/v). Dále byl testován vliv průtoku mobilní fáze v rozmezí 0,1 až 0,3 cm³ min⁻¹ (tabulka 4.1). Na základě získaných výsledků byla pro analýzu vzorků zvolena isokratická eluce s mobilní fází obsahující vodný pufr 0,02M 1-hexansíran sodný pH = 4,00 a methanol v poměru 50:50 (v/v), $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$.

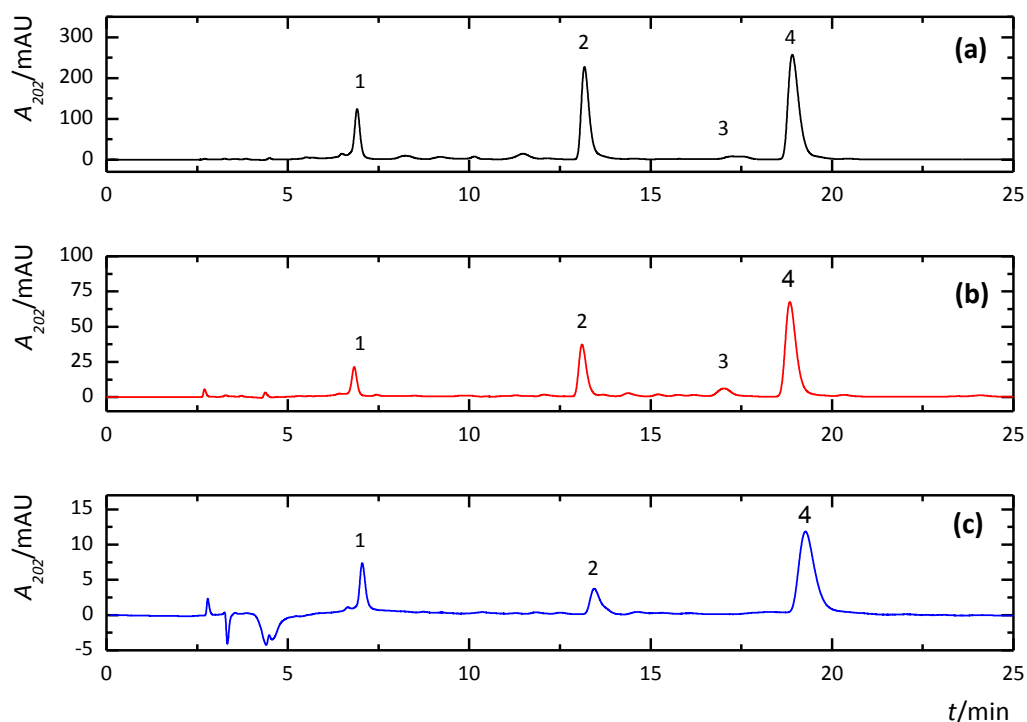
Tabulka 4.1

Optimalizace metody pro separaci alkaloidů ipekakuanhy. Závislost retenčních charakteristik emetinu (retenční čas, symetrie píku v 10 % výšky, počet teoretických pater a rozlišení píků emetinu a *O*-methylpsychotrinu) na složení mobilní fáze (solvent A: methanol, solvent B: 0,02M 1-hexansíranový vodný pufr pH = 4,00) a průtoku mobilní fáze na koloně XBridge[®] BEH C18 (150×3,0 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters. Teplota kolony byla 40 °C a objem nástřiku vzorku byl 5 mm³. Analyty byly detegovány při vlnové délce 202 nm.

| solvent A/% | solvent B/% | $F/\text{cm}^3 \text{ min}^{-1}$ | t_r/min | A_s | n | $R_{1,2}$ |
|-------------|-------------|----------------------------------|------------------|-------|-------|-----------|
| 40 | 60 | 0,3 | 30,88 | 1,13 | 22300 | 33,06 |
| 50 | 50 | 0,3 | 10,14 | 1,58 | 17200 | 1,46 |
| 60 | 40 | 0,3 | 4,51 | 1,33 | 12100 | 3,23 |
| 70 | 30 | 0,3 | 4,78 | 1,88 | 11800 | 4,32 |
| 50 | 50 | 0,2 | 18,96 | 1,36 | 21200 | 1,99 |
| 50 | 50 | 0,1 | 33,87 | 1,40 | 20900 | 1,86 |

4.4.4 Aplikace optimalizované metody na historické vzorky

Pomocí optimalizované HPLC metody byly analyzovány jak oba historické vzorky, tak – jako kontrola – novodobý farmaceutický standard této drogy (obr. 4.4). Pravost historických vzorků byla potvrzena porovnáním retenčních časů a UV spekter se standardy emetinu a cefaelinu a následně využitím HPLC-MS. Emetin a cefaelin byly rovněž kvantifikovány na základě plochy píků HPLC-UV, metodou vnějšího standardu. Kalibrační parametry jsou uvedeny v tabulce 4.2.



Obr. 4.4 HPLC-UV chromatogramy analyzovaných vzorků ipekakuanhy: (a) novodobý farmaceutický standard drogy, (b) historický vzorek H2-9556, kořen ipekakuanhy a (c) historický vzorek H2-9550, práškový kořen ipekakuanhy. Identifikované analyty: (1) protoemetin, (2) cefaelin, (3) *O*-methylpsychotrin a (4) emetin. Analýza probíhala na koloně XBridge® BEH C18 (150×3,0 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters. Mobilní fáze sestávala z methanolu (solvent A) a 0,02M 1-hexansíranového pufru pH = 4,00 (solvent B), $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Teplota kolony byla 40 °C a objem nástřiku vzorku činil 5 mm³. Analyty byly detegovány při vlnové délce 202 nm.

Tabulka 4.2

Parametry HPLC-UV kalibrační závislosti emetinu a cefaelinu založené na ploše píku. Analýza byla realizována na koloně XBridge® BEH C18 (150×3,0 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters. Mobilní fáze obsahovala methanol (solvent A) a 0,02M 1-hexansíranový pufr pH = 4,00 (solvent B). $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Teplota kolony byla 40 °C a objem nástřiku vzorku činil 5 mm³. Analyty byly detegovány při vlnové délce 202 nm.

| analyt | emetin | cefaelin |
|---|-------------|------------|
| lineární dynamický rozsah / mg dm ⁻³ | 0,5–15,0 | 0,5–15,0 |
| směrnice kalibrace / mAU min mg ⁻¹ dm ³ | 126,31±1,89 | 92,97±0,24 |
| úsek / mAU min | -29,3±13,6 | -2,39±1,64 |
| R^2 | 1,00 | 1,00 |
| limit kvantifikace / mg dm ⁻³ | 1,60 | 0,31 |
| limit detekce / mg dm ⁻³ | 0,48 | 0,09 |

Koncentrace hlavních alkaloidů ipekakuanhy, emetinu a cefaelinu, byla v obou analyzovaných historických vzorcích stanovena nižší, než v novodobém farmaceutickém standardu této drogy (tabulka 4.3). Podíl jednotlivých alkaloidů v době přípravy analyzovaných historických vzorků není přirozeně známý. Obsah alkaloidů v daném historickém vzorku lze proto srovnávat jedině s novodobým farmaceutickým standardem drogy ipekakuanhy. Vzorek H2-9556, práškový kořen ipekakuanhy, obsahuje pouze 5,6 % emetinu vzhledem k obsahu emetinu ve farmaceutickém standardu drogy ipekakuanhy. Podíl cefaelinu ve vzorku pak činí jen 1,6 % vzhledem k obsahu cefaelinu ve farmaceutickém standardu drogy ipekakuanhy. Více než dvakrát vyšší byla ale stanovena koncentrace *O*-methylpsychotrinu ve vzorku H2-9550 (kořen ipekakuanhy), ve srovnání s farmaceutickým standardem. *O*-Methylpsychotrin proto lze považovat za hlavní degradační produkt emetinu, což je v souladu s literaturou¹⁶. Koncentrace *O*-methylpsychotrinu ve vzorku H2-9556 (práškový kořen ipekakuanhy) byla nicméně pod detekčním limitem. Ve všech třech analyzovaných vzorcích byl dále identifikován i protoemetin, prekurzor všech alkaloidů ipekakuanhy^{31,32}.

Poměr emetinu a cefaelinu byl v literatuře navržen jako chemotaxonomické kritérium původu ipekakuanhy³³. Podle poměru koncentrací emetinu a cefaelinu (2–3:1) pocházely oba analyzované historické vzorky z *Cephaelis ipecacuanha* Brot. Použitý novodobý farmaceutický standard pochází podle zmíněného poměru alkaloidů z rostliny *Cephaelis acuminata* H. Karst. (podíl emetin:cephaelin = 1:1).

Tabulka 4.3

Identifikace a kvantifikace analytů v analyzovaných historických vzorcích H2-9550 a H2-9556 a ve farmaceutickém standardu drogy ipekakuanhy (retenční čas analytu, název analytu, relativní plocha píku a koncentrace ve vzorku). Analyzováno na koloně XBridge® BEH C18 (150×3,0 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters. Mobilní fáze sestávala z methanolu (solvent A) a 0,02M 1-hexansíranového pufru pH = 4,00 (solvent B), $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Teplota kolony byla 40 °C a objem nástřiku vzorku byl 5 mm³. Analyty byly detegovány při vlnové délce 202 nm.

| t_r /min | analyt | farm. standard | | vzorek H2-9550 | | vzorek H2-9556 | |
|------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | plocha/% | konc./% | plocha/% | konc./% | plocha/% | konc./% |
| 6,9 | protoemetin | 11,7 | – ^a | 8,4 | – ^a | 14,6 | – ^a |
| 13,2 | cefaelin | 33,8 | 0,80 ± 0,10 | 23,4 | 0,16 ± 0,02 | 15,2 | 0,013 ± 0,004 |
| 17,2 | O-Methylpsychotrin | 2,3 | – ^a | 5,6 | – ^a | <LOD | ^a |
| 19,0 | emetin | 52,1 | 0,89 ± 0,03 | 62,4 | 0,29 ± 0,02 | 70,3 | 0,05 ± 0,01 |

^aNestanoveno.

4.4.5 Hmotnostní spektrometrie alkaloidů ipekakuanhy

Hmotnostní spektrometrie byla použita pro potvrzení identifikace alkaloidů v analyzovaných vzorcích nalezených pomocí HPLC-UV. Tandemovou hmotnostní spektrometrií v pozitivním ESI módu byly detailně studovány čtyři alkaloidy ipekakuanhy.

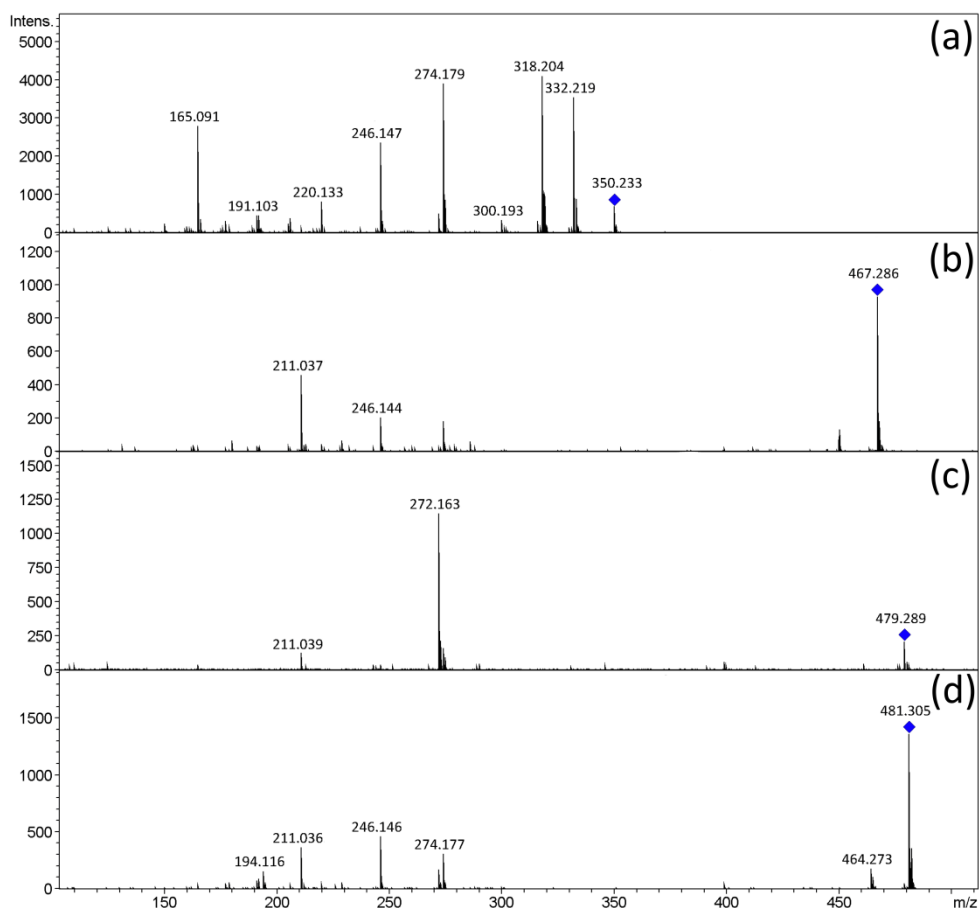
Ionizace analytů probíhala při kapilárním napětí 4,5 kV. Dusík byl použit jako nebulizační plyn při tlaku 0,40 bar a jako sušící plyn při průtoku 4,0 dm³ min⁻¹ a teplotě 250 °C. Kolizní energie byla 35,0 eV.

Ion $m/z = 350,233$, odpovídající protoemetinu, byl zvolen jako prekurzorový. Jeho MS² spektrum je na obr. 4.5a. Literatura popisuje pouze molekulový ion protoemetinu bez fragmentačního mechanismu^{32,34}. Mechanismus ESI⁺ fragmentace protoemetinu je navržen na obr. 4.6. Při srovnání molekulové hmotnosti protoemetinu a prekurzorového iontu je zřejmé, že prekurzorový ion je aduktem protoemetinu s vodíkovým protonem a methanolem $[M + \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}]^+$, který pochází z mobilní fáze. Hlavní produktový ion z tohoto produktového iontu vzniká v důsledku odštěpení methanolu, a má $m/z = 318,205$. Eliminací vody dále vzniká velmi nestabilní ion $m/z = 300,193$, jak je zřejmé z jeho nízké intenzity. Druhý velmi intenzivní ion je $m/z = 274,195$, který vzniká eliminací ethynu, což podle intenzity iontu zvyšuje jeho stabilitu. Fragmentací tohoto iontu po odstoupení ethenu, vzniká důležitý ion $m/z = 246,147$, který se vyskytuje rovněž při fragmentaci ostatních alkaloidů ipekakuanhy. Fragmentace tohoto iontu vede skrze dvě paralelní cesty. První dává vzniknout iontu $m/z = 191,103$ eliminací skupiny NC₃H₂. Druhou cestou vzniká nejprve po ztrátě ethynu ion $m/z = 220,133$, ze kterého pak eliminací skupiny NC₃H₅ vzniká 1,2-dimethoxy-4-ethenylfenylový ion s $m/z = 165,091$.

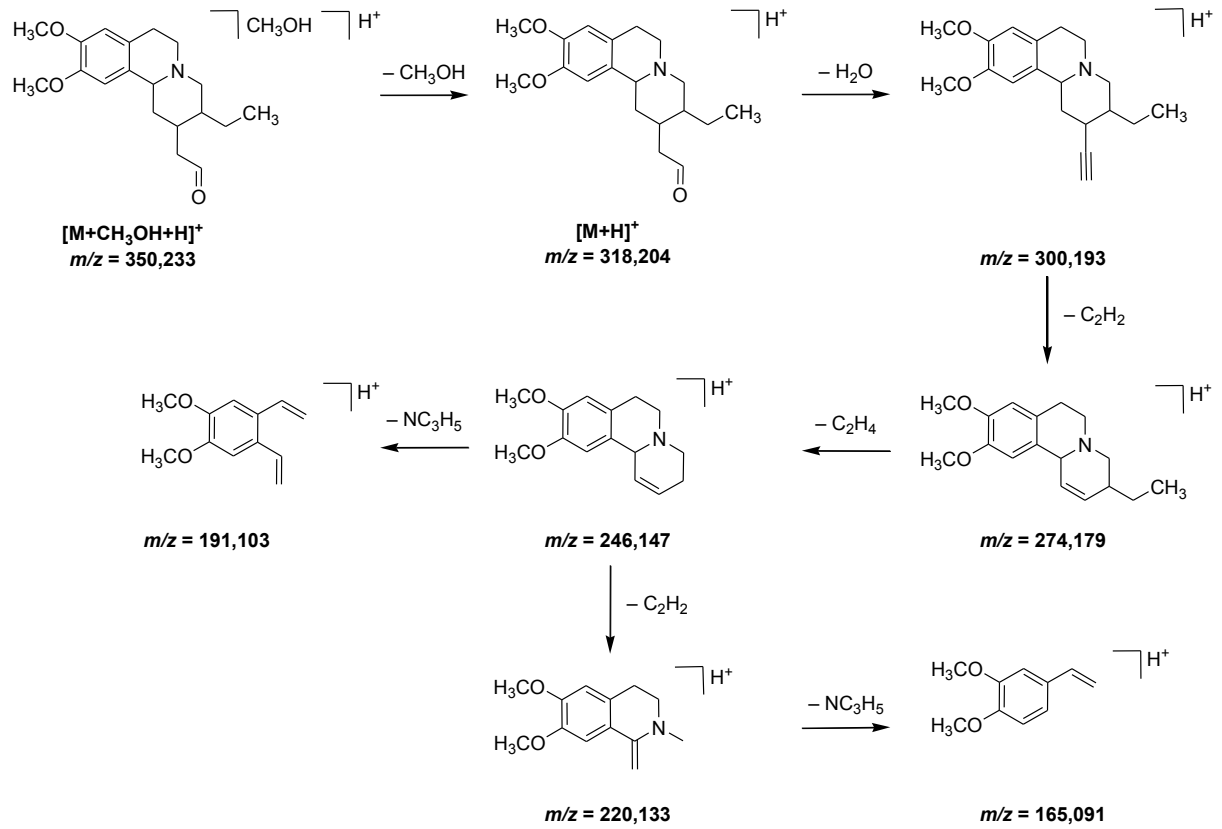
Strukturně podobné alkaloidy cefaelin a emetin se fragmentují (obr. 4.5b, d) podobnými mechanismy, fragmentační schéma je zobrazeno na obr. 4.7. K jedné z fragmentací dochází vlivem lokalizace náboje na atomu dusíku sekundárního aminu isochinolinu, což má za následek odštěpení molekuly amoniaku. Následuje eliminace ethylu nebo methylu. Druhou fragmentační cestou se štěpí vazba mezi oběma cykly molekuly, což vede k tvorbě páru iontů (**d**, **e** nebo **f**, **g** na obr. 4.7.).

Odštěpením ethylu, případně i methenylu, vzniká důležitý ion $m/z = 246,146$, který je běžný pro fragmentaci všech ipekakuanhových alkaloidů. Jeho další fragmentace probíhá stejně, jako v případě protoemetinu. Navržená fragmentace je analogická interpretaci hmotnostních spekter, která měřili Budzikiewicz a kol.³⁵, Spiteller a Spiteller-Friedmann³⁶ a elektronovou ionizací Thesima a kol.³⁷.

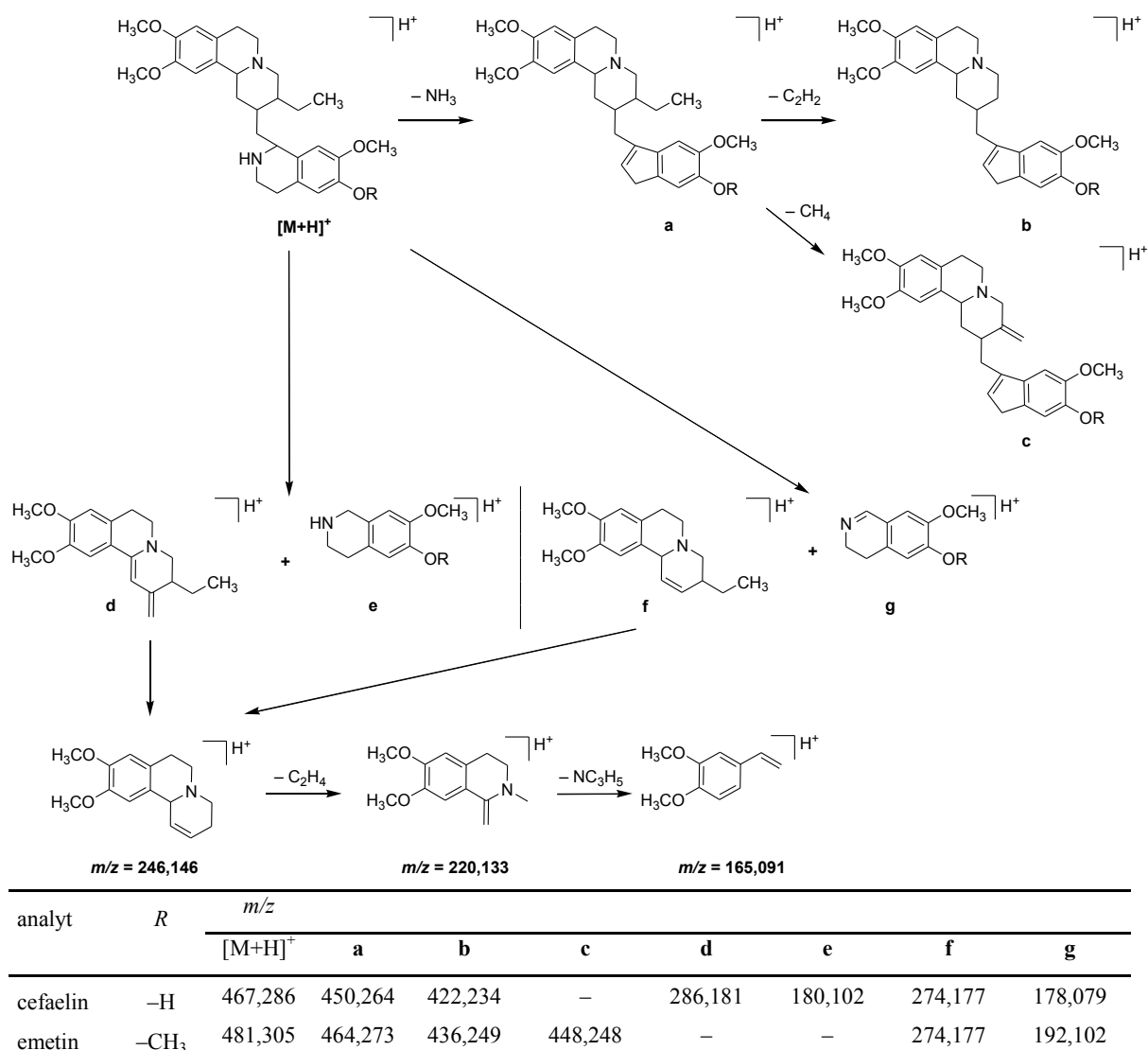
Hmotnostní spektrum posledního studovaného alkaloidu, *O*-methylpsychotrinu, je zobrazeno na obr. 4.5c. Fragmentace probíhá plně v souladu s literaturou³⁸.



Obr. 4.5 ESI⁺-MS² spektra produktových iontů (a) protoemetinu, (b) cefaelinu, (c) *O*-methylpsychotrinu a (d) emetinu. Ionizace analytů probíhala při kapilárním napětí 4,5 kV. Dusík byl použit jako nebulizační plyn při tlaku 0,40 bar a jako sušící plyn při průtoku 4,0 dm³ min⁻¹ a teplotě 250 °C. Kolizní energie byla 35,0 eV.



Obr. 4.6 ESI⁺-MS² fragmentační schéma protonovaného protoemetinu.



Obr. 4.7 ESI⁺-MS² fragmentační schéma protonovaného emetinu a cefaelinu.

4.5 Závěr

Pomocí HPLC-UV a MS² byly studovány dva historické vzorky drogy ipekakuanhy, jejich stáří bylo více než dvě stě let. Byly identifikovány oba hlavní alkaloidy (emetin a cefaelin) a tím byla ověřena autenticita vzorků. Zjištěný podíl obou uvedených alkaloidů v analyzovaných historických vzorcích je mnohonásobně nižší ve srovnání s farmaceutickým standardem drogy ipekakuanhy. Jako možný degradační produkt emetinu byl identifikován *O*-methylpsychotrin. Tato zjištění doplňují informace o stabilitě alkaloidů ipekakuanhy publikované v literatuře. Bylo rovněž navrženo ESI⁺-MS² fragmentační schéma protoemetinu, které nebylo dosud v literatuře publikováno. Získané výsledky byly publikovány v práci³⁹ (příloha B).

4.6 Literatura ke 4. kapitole

1. Sneader W.: *Drug Discovery: A History*. Chichester, John Wiley 2005.
2. Fisher H. H.: Origin and uses of ipecac. *Economic Botany* **27** (1973) 231–234.
3. Trease G. E., Evans W. C.: *Trease and Evans' Pharmacognosy*. 16th Edition. Edinburgh, Saunders 2009.
4. Lee M. R.: Ipecacuanha: The South American vomiting root. *The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh* **38** (2008) 355–360.
5. Itoh A., Ikuta Y., Baba Y., Tanahashi T., Nagakura N.: Ipecac alkaloids from *Cephaelis acuminata*. *Phytochemistry* **52** (1999) 1169–1176.
6. Wiegrebé W., Kramer W. J., Shamma M.: The emetine alkaloids. *Journal of Natural Products* **47** (1984) 397–408.
7. Fujii T., Ohba M.: The ipecac alkaloids and related bases. In: *The alkaloids: chemistry and biology*. Vol. 51. Cordell G. A. (ed.). San Diego, Academic Press 1998, p. 271–321.
8. Manno B. R., Manno J. E.: Toxicology of ipecac. *Clinical Toxicology* **10** (1977) 221–242.
9. Akinboye E. S., Rosen M. D., Bakare O., Denmeade S. R.: Anticancer activities of emetine prodrugs that are proteolytically activated by the prostate specific antigen (PSA) and evaluation of in vivo toxicity of emetine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **25** (2017) 6707–6717.
10. Khandelwal N., Chander Y., Rawat K. D., Riyesh T., Nishanth C., Sharma S., Jindal N., Tripathi B. N., Barua S., Kumar N.: Emetine inhibits replication of RNA and DNA viruses without generating drug-resistant virus variants. *Antiviral Research* **144** (2017) 196–204.
11. Lowdell D. P.: The decomposition of emetine in emetine bismuth iodine. *The Pharmaceutical Journal* **157** (1948) 124–125.
12. Machovičová F., Parrák V.: Odkryvanie porušenej stability injekčného roztoku chloridu emetína cestou chromatografie. *Československá farmacie* **13** (1964) 200–203.
13. Bayraktar-Alpmen G.: Stability of emetine hydrochloride injectable solutions. *Eczacılık Bulteni* **13** (1971) 1–15.
14. Adamski R., Sawicka J.: Effect of temperature rise on the stability of alkaloids in the tincture of ipecacuanha root. *Farmacja Polska* **25** (1969) 349–351.
15. Stahl E., Schmitt W. TAS-Verfahren und Thermofraktographie zur Schnellanalyse von Alkaloiddrogen. *Archiv der Pharmazie (Weinheim)* **308** (1975) 570–578.
16. Schuijt C., van Henegouwen G. M. J. B., Gerritsma K. W.: Isolation and identification of decomposition products of emetine. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition* **1** (1979) 186–195.
17. Teshima D., Otsubo K., Hirayama F., Uekama K., Aoyama T.: Effects of cyclodextrins on degradations of emetine and cephaeline in aqueous solution. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **37** (1989) 1591–1594.
18. Špringer V., Struhár M., Zembiaková Z., Mandák M.: Příprava stabilních vodných roztokov dichloridu emetína. *Farmaceutický obzor* **45** (1976) 391–398.
19. Struhár M., Kubec F., Špringer V., Chalabala M., Mandák M.: Untersuchungen zur Stabilität und Stabilisierung wässriger Emetindichloridlösungen. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae* **31** (1977) 7–27.
20. *European Pharmacopoeia 9.0*. Strasbourg, Council of Europe 2013.
21. Nesměrác K., Kunešová J.: Farmaceutická historie kapucínského kláštera v Praze na Hradčanech část I. Klášterní lékárna. *Česká a Slovenská farmacie* **64** (2015) 79–94.
22. Feys L. V., Grady L. T.: Emetin hydrochloride. In: *Analytical Profiles of Drug Substances*. Vol. 10. Florey, K. (ed.). New York, Academic Press, 1981, p. 289–335.
23. Sahu N. P., Mahato S. B.: Determination of emetine and cephaeline in ipecac roots by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **238** (1982) 525–529.
24. Hatfield G. M., Arteaga L., Dwyer J. D., Arias T. D., Gupta, M. P.: An investigation of Panamanian ipecac: Botanical source and alkaloid analysis. *Journal of Natural Products* **44** (1981) 452–456.
25. Jha S., Sahu N. P., Mahato S. B.: Production of the alkaloids emetine and cephaeline in callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha*. *Planta Medica* **54** (1988) 504–506.
26. Habib M. S., Harkiss K. J.: Quantitative determination of emetine and cephaeline in ipecacuanha root. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **21** (1969) 57S–59S.

27. Scharman E. J., Hutzler J. M., Rosencrance J. G., Tracy, T. S.: Single dose pharmacokinetics of syrup of ipecac. *Therapeutic Drug Monitoring* **22** (2000) 566–573.
28. Han G., Wang Y., Feng S., Jia Y.: Simultaneous determination of cephaeline and emetine in ipecac and its preparations using RP-HPLC. *Chinese Herbal Medicines* **5** (2013) 286–291 (2013).
29. Elvidge D. A., Johnson G. W., Harrison J. R.: Selective, stability-indicating assay of the major ipecacuanha alkaloids, emetine and cephaeline, in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography using spectrofluorimetric detection. *Journal of Chromatography* **463** (1989) 107–118.
30. Asano T., Sadakane C., Ishihara K., Yanagisawa T., Kimura M., Kamei H.: High-performance liquid chromatographic assay with fluorescence detection for the determination of cephaeline and emetine in human plasma and urine. *Journal of Chromatography B* **757** (2001) 197–206 (2001).
31. Nagakura N., Hoefle G., Coggiola D., Zenk M. H.: The biosynthesis of the ipecac alkaloids and of ipecoside and alangiside. *Planta Medica* **34** (1978) 381–389.
32. Nomura T., Kutchan T. M.: Three new *O*-methyltransferases are sufficient for all *O*-methylation reactions of ipecac alkaloid biosynthesis in root culture of *Psychotria ipecacuanha*. *The Journal of Biological Chemistry* **285** (2010) 7722–7738.
33. Kraus L., Carstens J., Richter R.: HPLC-Bestimmung von Emetin und Cephaelin in *Ipecacuanhae radix*. *Deutsche Apotheker Zeitung* **125** (1985) 863–864.
34. Xie C., Luo J., Zhang Y., Zhu L., Hong R.: A chiral pentenolide-based unified strategy toward dihydrocorynantheal, dihydrocorynantheol, protoemetine, protoemetinol, and yohimbane. *Organic Letters* **19** (2017) 3592–3595.
35. Budzikiewicz H., Pakrashi S. C., Vorbrüggen H.: Die Isolierung von Emetin, Cephaelin und Psychotrin aus *Alangium Lamarckii* und die Identifizierung von Almarckine mit *N*-methylcephaelin. *Tetrahedron Letters* **20** (1963) 399–408.
36. Spitteller G., Spitteller-Friedmann M.: Schlüsselbruchstücke in der Massenspektren von Alkaloiden. *Tetrahedron Letters* **4** (1963) 153–158.
37. Teshima D., Ikeda K., Shimomura K., Aoyama T.: Simultaneous determination of emetine and cephaeline in ipecac syrup. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **37** (1989) 197–199.
38. Schuij C., van Henegouwen G. M. J. B., Greeitsma K. W.: Structure of didehydroemetine and *O*-methylpsychotrine. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* **1** (1979) 970–975.
39. Nesměrák K., Kudláček K., Štícha M., Červený V., Kunešová J., Yldiz I.: HPLC–MS analysis of ipecacuanha alkaloids in pharmaceutical relics from eighteenth century. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **149** (2018) 1535–1542.

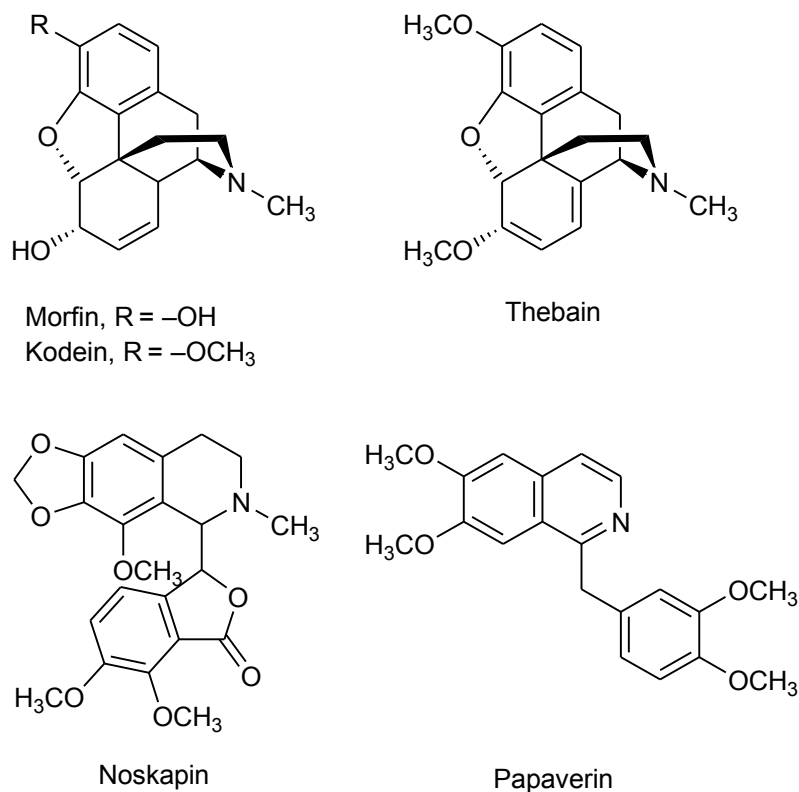
5 Alkaloidy opia

Opium, zaschlá šťáva z nezralých makovic máku setého (*Papaver somniferum* L.), je jedním z nejstarších a nejčastěji užívaných léčiv s analgetickým účinkem^{1,2}. Tato kapitola shrnuje výsledky analýzy třech historických pozůstatků léčivých přípravků s obsahem opia, datovaných do 18. století a zachovaných v hradčanské kapucínské lékárně.

5.1 Chemické složení, historie využití alkaloidů opia

Opium je směsí více než čtyřiceti alkaloidů, přičemž nejvíce zastoupené jsou benzyliochinolinové alkaloidy morfin, kodein a thebain^{3,4}. Tyto alkaloidy tvoří až 25 % celkové hmotnosti opia. Obsah jednotlivých alkaloidů ale v droze různého původu značně kolísá: podíl morfinu se pohybuje v rozmezí 4–21 %, podíl noskapinu pak v rozmezí 2–8 % a papaverinu 0,5–1,3 %. Struktury hlavních alkaloidů opia jsou zobrazeny na obr. 5.1.

Již v době neolitu byl mák setý lidmi používán⁵, ale pravděpodobně jen k výrobě oleje². Písemný doklad o používání opia pochází až ze starověké Asýrie z doby 2000 let př. Kr.¹. V antice byly mytologické postavy bohů spojovány s účinky opia a často jsou vyobrazeny s makovicemi. Ve středověku byly také zkoušeny nové způsoby podávání opia. Paracelsus například objevil, že opium je lépe rozpustné v alkoholu než ve vodě. Připravená tinktura, kterou nazval *laudanum*, se používala ještě ve 20. století. Paracelsus také z opia připravil specificky působící lék proti bolesti (*Specificum anodynum*). V barokní době bylo *laudanum* ještě zdokonaleno Thomasem Sydenhamem (1624–1689). Přípravek *Laudanum liquidum Sydenham* tlumil díky použitým přísadám nepříjemnou chuť opia¹. Léčivé přípravky s obsahem alkaloidů opia se objevují také koncem 19. století jako patentní léčiva⁶ a v první polovině 20. století jako injekční roztoky⁷.



Obr. 5.1 Strukturní vzorce hlavních alkaloidů opia.

5.2 Degradční cesty alkaloidů opia

Detailně je problematika stability alkaloidů opia uvedena v odst. 2.1.2.2, kromě autorů tam uvedených se degradací alkaloidů opia dále zabývali také Vermeire a Remon⁸. Degradace morfinu ve farmaceutických přípravcích je podle autorů urychlena přítomností kyslíku a zásaditým prostředím roztoku, přičemž vliv teploty a světla je minimální. Smith a kol.⁹ popisují metodu extrakce alkaloidů opia z keramiky pozdní doby bronzové. Představují také stabilitní experiment vzorku oleje z makových semen. Podle výsledků dochází k degradaci morfinu i kodeinu.

5.3 Popis vzorků

Prvním v této práci analyzovaným historickým vzorkem léčivého přípravku, obsahujícího alkaloidy opia, byla opiová tinktura (vzorek H2-4372) podle receptury Thomase Sydenhama¹⁰⁻¹². Léčivý přípravek vzniká rozpuštěním opia ve španělském víně, které bylo svařeno se skořicí (*Cinnamomum verum* J. Presl), hřebíčkem (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry) a šafránem (*Crocus sativus* L.). Přípravek, ve kterém je obsah opia přibližně 14 %, byl používán jako analgetikum. Nádoba pro uchování přípravku je vyrobená z tzv. lesního skla ve tvaru kapky o výšce 14,0 cm a průměru 6,0 cm s popiskem v latinském jazyce „Laud. Liquid. Syd.“ (obr. 5.2a). Víko nádoby chybí a uvnitř byl na stěnách nalezen suchý pozůstatek někdejší tekutiny, který byl odebrán špachtlí.

Druhý analyzovaný vzorek (H2-9576) byl podle nápisu na historické stojatce *Theriaca coelestis*, v překladu Nebeský dryák. Jde o léčivo připravené z mnoha rostlinných a živočišných ingrediencí, jako například z kafry, jeleních parohů, zmijí páteře, bezoáru, muškátového oleje, nebo z extraktů puškvorce, anděliky, šafránu či benediktu. V receptech je značná variabilita¹³. Obsah opia je zhruba 5 %. Přípravek byl používán pro svůj analgetický a diaforetický účinek. Nádoba pro uchovávání léčiva je vyrobená z čirého skla tvaru hrnku o výšce 12,0 cm a průměru 5,0 cm. Nádoba je natřena světle hnědou barvou a opatřena popiskem v latinském jazyce „Theriac: Cœlest:“ (obr. 5.2b). Originální kožené víko nádoby připevněné k nádobě provázkem bylo opatrně sejmuto a skleněnou lžící byly odebrány tři vzorky; jeden ze středu nádoby a dva z protilehlých míst na okraji nádoby.

Třetím analyzovaným historickým přípravkem (vzorek H2-9637) byl *Pulvis anodynus*, v překladu prášek na bolest. Byl připravován ze semen máku, cukru a mnoha dalších rostlinných (například škrob, arabská guma, skořice) a živočišných (například jelení paroh) ingrediencí^{13,14}. Prášek byl používán jako mírné analgetikum. Nádoba je tvořená z čirého skla cylindrického tvaru o výšce 14,0 cm a průměru 6,0 cm. Nádoba byla opatřena latinským popiskem „ ⚠ Anodinus“ (obr. 5.2c). Víko nádoby chybí a její obsah je volně přístupný. Vzorek byl odebrán špachtlí.

Odebrané vzorky byly uchovávány v temnu ve skleněných nádobách.



Obr. 5.2 Barokní stojatky obsahující (a) vzorek H2-4372 (Opiová tinktura podle Sydenhama), (b) vzorek H2-9576 (Nebeský driák) a (c) vzorek H2-9637 (Prášek na bolest).

5.4 Výsledky a diskuse

Extrakční a separační HPLC metody pro analýzu historických léčivých přípravků obsahujících alkaloidy opia vycházely z prací publikovaných v literatuře. Obě metody byly ale před aplikací na historické vzorky optimalizovány.

5.4.1 *Optimalizace extrakce alkaloidů opia*

Vzhledem k dobré rozpustnosti alkaloidů opia v organických rozpouštědlech^{3,15}, byly pro další optimalizaci extrakce vybrány methanol a acetonitril. Výtěžnost extrakce byla testována na farmaceutickém standardu opia s deklarovaným obsahem morfinu. Extrakce byla testována nejprve v čistých rozpouštědlech, v jejich směsi v poměru 1:1 (v/v) a pak ve vodných roztocích obou rozpouštědel v různých poměrech. Nejvyššího výtěžku 97,2±4,5 % morfinu bylo dosaženo při extrakci vzorku směsí acetonitrilu a vody v poměru 85:15 (v/v).

5.4.2 *Příprava vzorku k analýze*

Před analýzou byl každý vzorek homogenizován v porcelánové třecí misce a prášek byl sušen v exsikátoru po dobu 24 hodin. Pro extrakci alkaloidů bylo naváženo 5 mg vzorku do zkumavky. Byl přidán 1,0 cm³ extrakčního činidla (směs acetonitrilu a vody v poměru 85:15, v/v) a po dobu 30 minut byla směs třepána. Výsledný extrakt byl filtrován 0,2μm injekčním filtrem (Whatman) a příslušně ředěn mobilní fází.

5.4.3 *Optimalizace HPLC separace*

Separace alkaloidů opia pomocí HPLC jsou popsány nejčastěji na reverzní stacionární fázi s mobilní fází založenou na směsi vodných pufrů s acetonitrem nebo methanolem^{16,17}. S ohledem na kompatibilitu hmotnostní detekce byla vybrána metoda podle Bogusz a kol.¹⁸, která je využívá kolonu s oktadecylovou stacionární fází a mobilní fází obsahující mravenčan amonný s acetonitrem. Protože při zvolených podmínkách docházelo ke koelucím analytů, bylo složení mobilní fáze dále optimalizováno. Testování (1) vlivu složení mobilní fáze a (2) vlivu pH její vodné složky na retenci (tabulka 5.1) nejintenzivnějšího píku v chromatogramu (papaverinu) probíhalo při 250 nm. Záměnou acetonitrilu za methanol (solvent A) a použitím mravenčanového pufru (solvent B; 0,01 M HCOONH₄ a HCOOH, pH = 3,00) již nedocházelo ke koelucím. Ve srovnání s použitím acetonitrilu (solvent A) se však zároveň snížila účinnost separace. Záměnou mravenčanového pufru za acetátový (solvent B; 0,01 M CH₃COONH₄ a CH₃COOH, pH = 3,00) se účinnost separace zvýšila téměř dvojnásobně. Také píky v chromatogramu byly lépe rozlišeny, ale současně se symetrie píku papaverinu snížila.

Podle literatury¹⁹ mají alkaloidy opia hodnotu záporného dekadického logaritmu disociační konstanty vyšší než 6 (tabulka 5.2). Pro separaci je proto vhodné spíše kyselější prostředí. Zvýšením pH pufru se symetrie píku zvyšuje, ale účinnost separace i rozlišení se výrazně snižují.

Úpravou gradientového programu (tabulka 5.3a) bylo dosaženo účinnější separace i zvýšení symetrie píku papaverinu. Jako optimální byla zvolena binární gradientová eluce sestávající z methanolu (solvent A) a acetátového pufru (solvent B: 0,01 M CH₃COONH₄ a CH₃COOH, pH = 3,00). Podíl solventu A začíná na 10 % a je ponechán konstantní po dobu čtyř minut, poté se během deseti minut zvyšuje na 80% podíl, při kterém setrvává dvě minuty. Během následující minuty se podíl solventu A navrácí na počáteční 10% podíl (tabulka 5.3b). Doba analýzy je 30 minut.

Tabulka 5.1

Závislost retenčních charakteristik papaverinu (symetrie píku v 10 % výšky, počet teoretických pater a rozlišení píků papaverinu a noskapinu) na (1) složení mobilní fáze, (2) pH vodné složky a (3) gradientovém programu. Separace probíhala na koloně XBridge BEH C18 (3,0×150 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters, $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, teplota kolony 40 °C a objem nástřiku vzorku 2 mm³. Mobilní fáze: methanol nebo acetonitril (solvent A) a acetátový (solvent B: 0,01 M CH₃COONH₄ a CH₃COOH pH = 3,00 nebo pH = 6,00) nebo mravenčanový pufr (solvent B; 0,01 M HCOOH a HCOONH₄ pH = 3,00), gradient viz tabulka 5.3. Detekce proběhla při 250 nm.

| gradient | solvent A | solvent B, pH pufru | | A_s | n | $R_{1,2}$ |
|----------|-------------|---------------------|-----------|-------|--------|-----------|
| | | mravenčanový | acetátový | | | |
| a | acetonitril | 3,00 | – | 0,77 | 124800 | 0,88 |
| a | methanol | 3,00 | – | 0,76 | 87400 | 0,67 |
| a | methanol | – | 3,00 | 1,45 | 196300 | 1,02 |
| a | methanol | – | 6,00 | 1,11 | 93900 | 0,77 |
| b | methanol | – | 3,00 | 1,32 | 209600 | 1,05 |

Tabulka 5.2

Hodnoty záporného dekadického logaritmu disociační konstanty vybraných alkaloidů opia při dané teplotě (podle ¹⁹).

| název | $pK_a (t / ^\circ\text{C})$ |
|-----------|-----------------------------|
| kodein | 8,2 (20) |
| papaverin | 6,4 (25) |
| morfin | 8,0 (20) |
| noskapin | 6,2 (20) |

Tabulka 5.3

Testované gradientové programy pro separaci alkaloidů opia v historických farmaceutických vzorcích. Podmínky separace: kolona XBridge BEH C18 (3,0×150 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters, $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, teplota kolony 40 °C a objem nástřiku vzorku 2 mm³. Mobilní fáze: methanol (solvent A) a acetátový pufr (solvent B; 0,01 M CH₃COONH₄ a CH₃COOH, pH = 3,00).

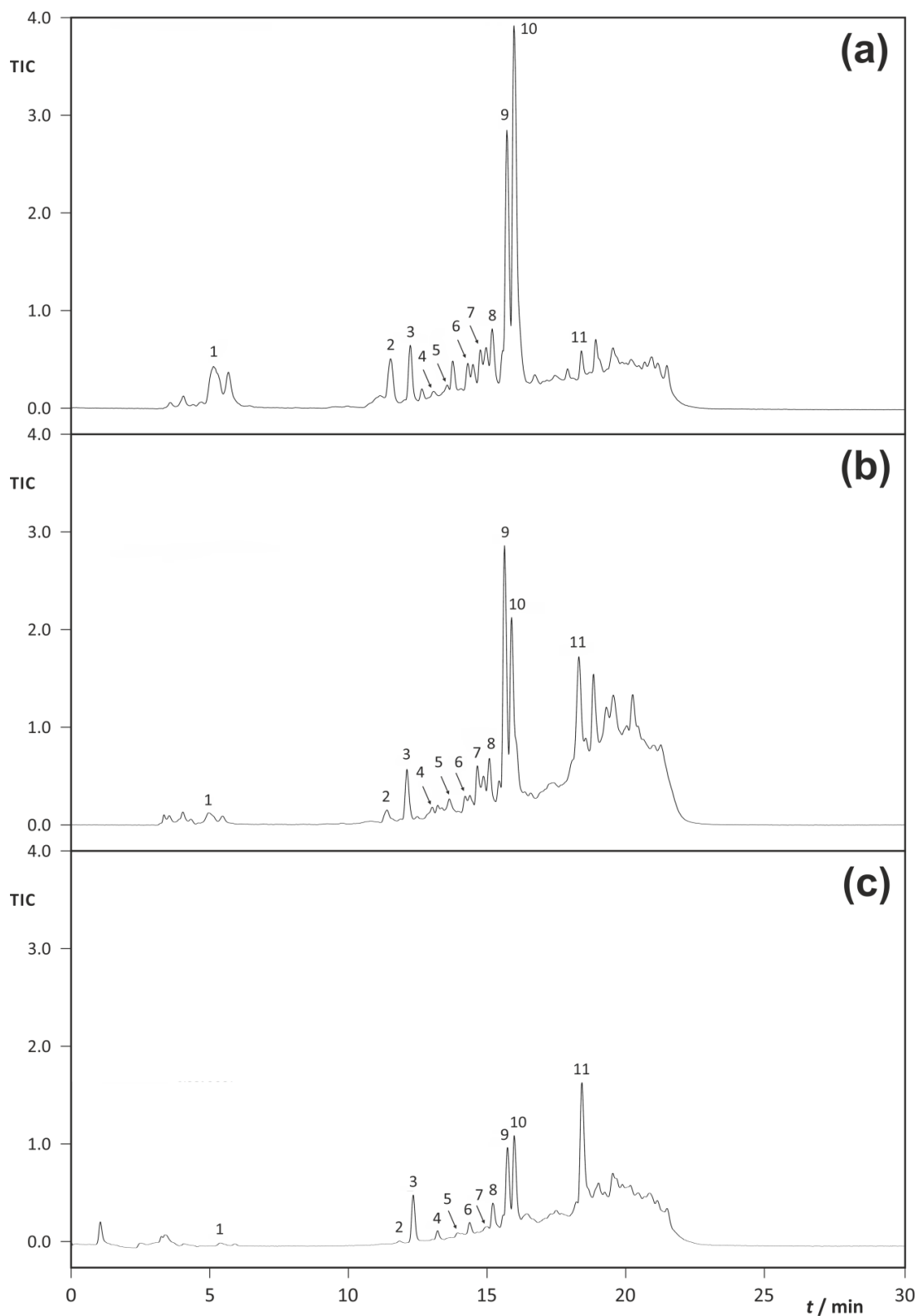
| gradient (a) | | | | | | | gradient (b) | | | | | | |
|------------------|----|----|----|----|----|----|------------------|----|----|----|----|----|----|
| t_r/min | 0 | 7 | 12 | 17 | 18 | 25 | t_r/min | 0 | 4 | 14 | 16 | 17 | 30 |
| solvent A/% | 10 | 10 | 80 | 80 | 10 | 10 | solvent A/% | 10 | 10 | 80 | 80 | 10 | 10 |

5.4.4 Aplikace optimalizované metody na historické vzorky

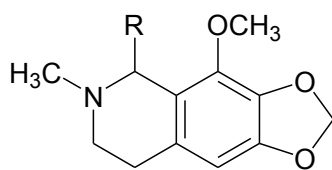
Optimalizované extrakční a separační metody byly následně využity k analýze třech historických pozůstatků léčivých přípravků s obsahem opia (obr. 5.3). Identifikace analytů byla založena na porovnání retenčních časů a UV spekter se standardy morfinu, kotarninu, mekoninu, papaverinu a noskapinu. Identifikace všech analytů byla následně ověřena tandemovou hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením. Získaná fragmentační hmotnostní spektra byla porovnána se spektry publikovanými v literatuře (tabulka 5.4).

Ze získaných výsledků je zřejmé, že kromě přirozeně se vyskytujících alkaloidů opia byly ve všech analyzovaných vzorcích detegovány také degradační produkty alkaloidů opia. Většina degradačních produktů pochází z papaverinu a noskapinu. V případě papaverinu jde v souladu s literaturou²⁰

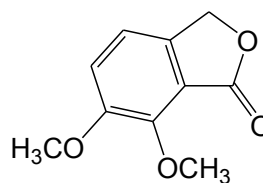
o oxidační produkt papaverinol a papaverinaldin (struktury uvedeny na obr. 5.4). Degradací noskapinu vznikají kotarnin, hydrokotarnin, methylhydrokotarnin a mekonin (struktury uvedeny na obr. 5.4). Degradace noskapinu je podobná oxidačnímu metabolismu, který popsali Tsunoda a Yoshimura²¹. Uvedené degradační produkty (vyjma mekoninu) nebyly identifikovány ve farmaceutickém standardu opia, který byl použit jako referenční materiál.



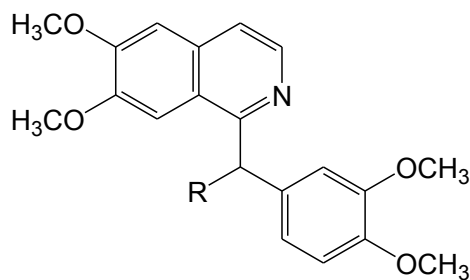
Obr. 5.3 HPLC-MS chromatogramy analyzovaných historických pozůstatků léčivých přípravků s obsahem opia (a) vzorek H2-4372, opiová tinktura podle Thomase Sydenhama, (b) vzorek H2-9576, Nebeský dryák, (c) vzorek H2-9637, prášek na bolest. Identifikace píků je provedena v tabulce 5.4. Podmínky separace: kolona XBridge BEH C18 (3,0×150 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters, $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, teplota kolony 40 $^\circ\text{C}$, objem nástřiku vzorku 2 mm^3 . Mobilní fáze: methanol (solvent A) a acetátový pufr (solvent B; 0,01 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ a CH_3COOH , pH = 3,00), gradientový program popsán v tabulce 5.3b.



Kotarnin, R = -OH
 Hydrokotarnin, R = -H
 Methylhydrokotarnin, R = -CH₃



Mekonin



Papaveronol, R = -OH
 Papaverinaldin, R = =O

Obr. 5.4 Strukturní vzorce identifikovaných degradačních produktů noskapinu (kotarnin, hydrokotarnin, methylhydrokotarnin a mekonin) a papaverinu (papaverinol a papaverinaldin).

Tabulka 5.4

Identifikace alkaloidů opia v chromatogramech analyzovaných historických pozůstatků léčivých přípravků s obsahem opia (retenční časy, vzorec $[M+H]^+$ ionu a jeho m/z , diagnostické ionty, název identifikované látky a její CASRN a literatura použitá pro potvrzení identifikace dle hmotnostního spektra). Podmínky separace: kolona XBridge BEH C18 (3,0×150 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters, $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, teplota kolony 40 °C, objem nástřiku vzorku 2 mm^3 . Mobilní fáze: methanol (solvent A) a acetátový pufr (solvent B; 0,01 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ a CH_3COOH , pH = 3,00), gradient uveden v tabulce 5.3b.

| číslo piku | t_r/min | vzorec $[M+H]^+$ | m/z ionu $[M+H]^+$ | | Δ/ppm | diagnostické ionty m/z | název, CASRN | ref. |
|------------|------------------|---|----------------------|------------|---------------------|--------------------------|------------------------------------|-------|
| | | | experimentální | teoretická | | | | |
| 1 | 5,12 | $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{NO}_3$ | 286,1439 | 286,1437 | 0,1 | 268, 229, 201 | morfin, 57-27-2 | 22,23 |
| 2 | 11,38 | $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NO}_3$ | 300,1596 | 300,1594 | -0,2 | 181, 165, 153 | kodein, 76-57-3 | 22,24 |
| 3 | 12,20 | $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{NO}_3$ | 220,0968 | 220,0968 | -0,1 | 205, 176, 148, 118 | dehydrogenhydrokotamin, 57991-02-3 | 25 |
| 4 | 13,18 | $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_3$ | 236,1281 | 236,1281 | -0,1 | - ^a | methylhydrokotamin, 109506-42-5 | - |
| 5 | 13,50 | $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}_3$ | 222,1122 | 222,1122 | -0,1 | 205, 178, 163 | hydrokotamin, 550-10-7 | 26 |
| 6 | 14,33 | $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}_4$ | 238,1074 | 238,1074 | -0,1 | 220, 205, 203 | kotamin, 82-54-2 | 26 |
| 7 | 14,69 | $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{NO}_3$ | 312,1595 | 312,1594 | -0,3 | 255, 266, 249 | thebain, 115-37-7 | 22,23 |
| 7 | 15,14 | $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$ | 195,0657 | 195,0189 | 2,6 | 194, 177, 165, 147 | meconin, 569-31-3 | 27,28 |
| 8 | 15,14 | $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{NO}_5$ | 356,1492 | 356,1493 | 0,1 | - ^a | papaverinol, 482-76-8 | - |
| 9 | 15,68 | $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{NO}_4$ | 340,1543 | 340,15433 | 0,1 | 324, 296, 202, 171 | papaverin, 58-74-2 | 29 |
| 10 | 15,93 | $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{NO}_7$ | 414,1550 | 414,1547 | 0,8 | 353, 323, 205 | noskapiin, 128-62-1 | 30 |
| 11 | 18,33 | $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{NO}_5$ | 354,1334 | 354,1336 | 0,5 | - ^a | papaveraldin, 522-57-6 | - |

^a Diagnostické ionty nejsou popsány v literatuře, detailní studie spektra provedena v odst. 5.4.6.

5.4.5 Kvantifikace vybraných alkaloidů

Obsah alkaloidů v jednotlivých sklizních opia značně kolísá a je závislý na mnoha faktorech během kultivace rostliny máku setého i následného zpracování surového opia³. Z toho důvodu není původní obsah alkaloidů opia v historických vzorcích v době jejich přípravy známý.

Pro kvantifikaci alkaloidů opia ve studovaných historických vzorcích byly vybrány hlavní alkaloidy zastupující fenantrenový (morfin), benzylochinolinový (papaverin) a ftalatochinolinový typ (noskapiin). Pro ověření pravosti historických vzorků se podle literatury doporučuje^{9,31} zaměřit analýzu také na rozpadové produkty noskapiinu, proto bylo ve studovaných vzorcích provedeno stanovení mekoninu a kotarninu. Vybrané alkaloidy opia byly kvantifikovány metodou HPLC-UV na základě ploch chromatografických píků, byla použita metoda kalibrace s vnějším standardem. Zastoupení alkaloidů pak bylo vypočítáno jako hmotnostní podíl daného alkaloidu ve vzorku a navážky vzorku vyjádřeno procenty. Parametry příslušných kalibračních závislostí jsou uvedeny v tabulce 5.5.

Tabulka 5.5

Parametry kalibračních závislostí (vlnová délka stanovení, lineární dynamický rozsah, směrnice a úsek kalibrační přímky, koeficient determinace, limit kvantifikace a limit detekce) pro kotarnin, morfin, mekonin, papaverin a noskapin. Podmínky separace: kolona XBridge BEH C18(3,0×150 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters, $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, teplota kolony 40 °C, objem nástřiku vzorku 2 mm³. Mobilní fáze: methanol (solvent A) a acetátový pufr (solvent B; 0,01 M CH₃COONH₄ a CH₃COOH, pH = 3,00), gradient uveden v tabulce 5.3b.

| analyt | kotarnin | morfin | mekonin | papaverin | noskapin |
|---|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| vlnová délka / nm | 250 | 250 | 308 | 250 | 240 |
| lineární dynamický rozsah / mg dm ⁻³ | 5–40 | 40–320 | 2–35 | 5–40 | 10–140 |
| směrnice kalibrace / mAU min mg ⁻¹ dm ³ | 14,11±0,01 | 0,62±0,01 | 6,17±0,04 | 46,5±0,6 | 9,30±0,09 |
| úsek / mAU min | 0,25±0,31 | 3,4±2,5 | 0,89±0,67 | 6,6±1,3 | 5,6±7,0 |
| R^2 | 1,000 | 0,9985 | 0,9999 | 0,9997 | 0,9996 |
| limit kvantifikace / mg dm ⁻³ | 0,25 | 4,72 | 1,59 | 3,19 | 10,6 |
| limit detekce / mg dm ⁻³ | 0,08 | 1,43 | 0,48 | 0,97 | 3,2 |

Z výsledků kvantifikace alkaloidů opia v analyzovaných historických vzorcích (tabulka 5.6) je zřejmé, že nejvyšší podíl morfinu je ve vzorku H2-4372, protože jde o odparek ethanolického roztoku opia. Naopak podíl morfinu ve vzorku H2-9637, který nebyl připraven z opia, ale ze semen máku, je pod detekčním limitem. Jak bylo navrženo v literatuře^{9,31}, pro ověření pravosti opia je vhodné v historických pozůstatcích analyzovat stabilnější alkaloidy opia, jako jsou papaverin a noskapin, případně degradační produkty noskapinu (kotarnin a mekonin). Obsah papaverinu a noskapinu ve všech vzorcích odpovídá rozsahu, který uvádí literatura^{3,32}. Nemohou být tedy použity pro odhad stáří vzorku, ikdyž by jejich koncentrace byla snížena tvorbou degradačních produktů. Mekonin je obsažen v surovém opiu³³, proto rovněž nemůže být použit pro odhad stáří vzorku. Koncentrace kotarninu je ale ve všech historických vzorcích jednoznačně vyšší ve srovnání s novodobým farmaceutickým standardem opia. Odhad stáří vzorku na základě jediného alkaloidu je obtížný, jak bylo zmíněno, kvůli variabilnímu obsahu jednotlivých alkaloidů. Naopak koncentrační poměr mezi noskapinem a jeho přímým degradačním produktem kotarninem umožňuje srovnání mezi vzorky různého stáří. Tento poměr by mohl posloužit jako marker stáří analyzovaného vzorku. Jak je patrné z tabulky 5.6, pro historické vzorky je tento poměr padesátkrát nižší než pro novodobý farmaceutický standard opia. Pro ověření této hypotézy by ale bylo potřeba většího souboru dat.

Tabulka 5.6

Stanovené obsahy vybraných alkaloidů opia v analyzovaných historických vzorcích a referenčním novodobém vzorku farmaceutického standardu opia a vypočítaný podíl koncentrací noskapinu a kotarninu v těchto vzorcích. Podmínky separace: kolona XBridge BEH C18 (3,0×150 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters, $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, teplota kolony 40 °C, objem nástřiku vzorku 2 mm³. Mobilní fáze: methanol (solvent A) a acetátový pufr (solvent B; 0,01 M CH₃COONH₄ a CH₃COOH, pH = 3,00), gradient uveden v tabulce 5.3b.

| alkaloid | změřená koncentrace / % | | | farmaceutický standard opia |
|-------------------------------------|-------------------------|-------------|-------------|-----------------------------|
| | H2-4372 | H2-9576 | H2-9637 | |
| kotarnin | 1,55±0,01 | 0,25±0,02 | 0,048±0,002 | 0,019±0,005 |
| morfin | 21±1 | 0,7±0,2 | <LOD | 10±4 |
| mekonin | 0,496±0,006 | 0,081±0,001 | <LOQ | 0,141±0,004 |
| papaverin | 2,76±0,02 | 0,537±0,008 | 0,021±0,001 | 0,885±0,007 |
| noskapin | 5,83±0,03 | 0,32±0,02 | 0,021±0,002 | 2,617±0,001 |
| podíl koncentrací noskapin:kotarnin | 3,76 | 1,28 | 0,44 | 137,8 |

5.4.6 Hmotnostní spektrometrie vybraných alkaloidů opia

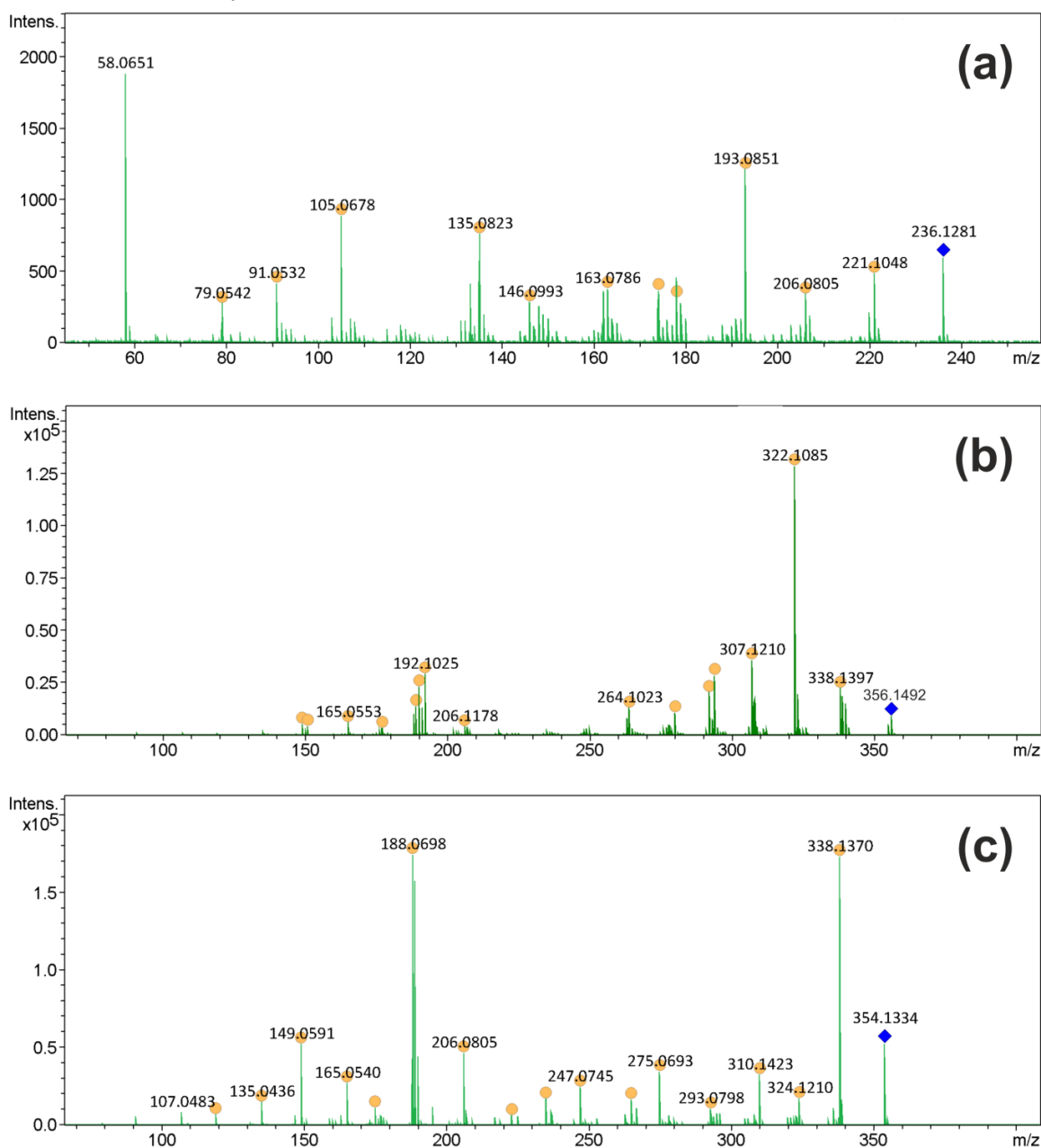
Pro identifikaci methylhydrokotarninu, papaverinolu a papaverinaldinu byla použita metoda tandemové hmotnostní spektrometrie. Protože hmotnostní spektra těchto alkaloidů opia nejsou dostatečně popsána v literatuře, byla jejich ESI⁺-MS² spektra studována podrobněji a byly navrženy příslušné fragmentační mechanismy.

Ionizace proběhla při napětí kapiláry 4,5 kV. Kolizní energie byla 40,0 eV. Tlak nebulizačního plynu dusíku byl 0,30 bar. Dusík při průtoku 3,0 dm³min⁻¹ a teplotě 220 °C byl použit i jako sušící plyn.

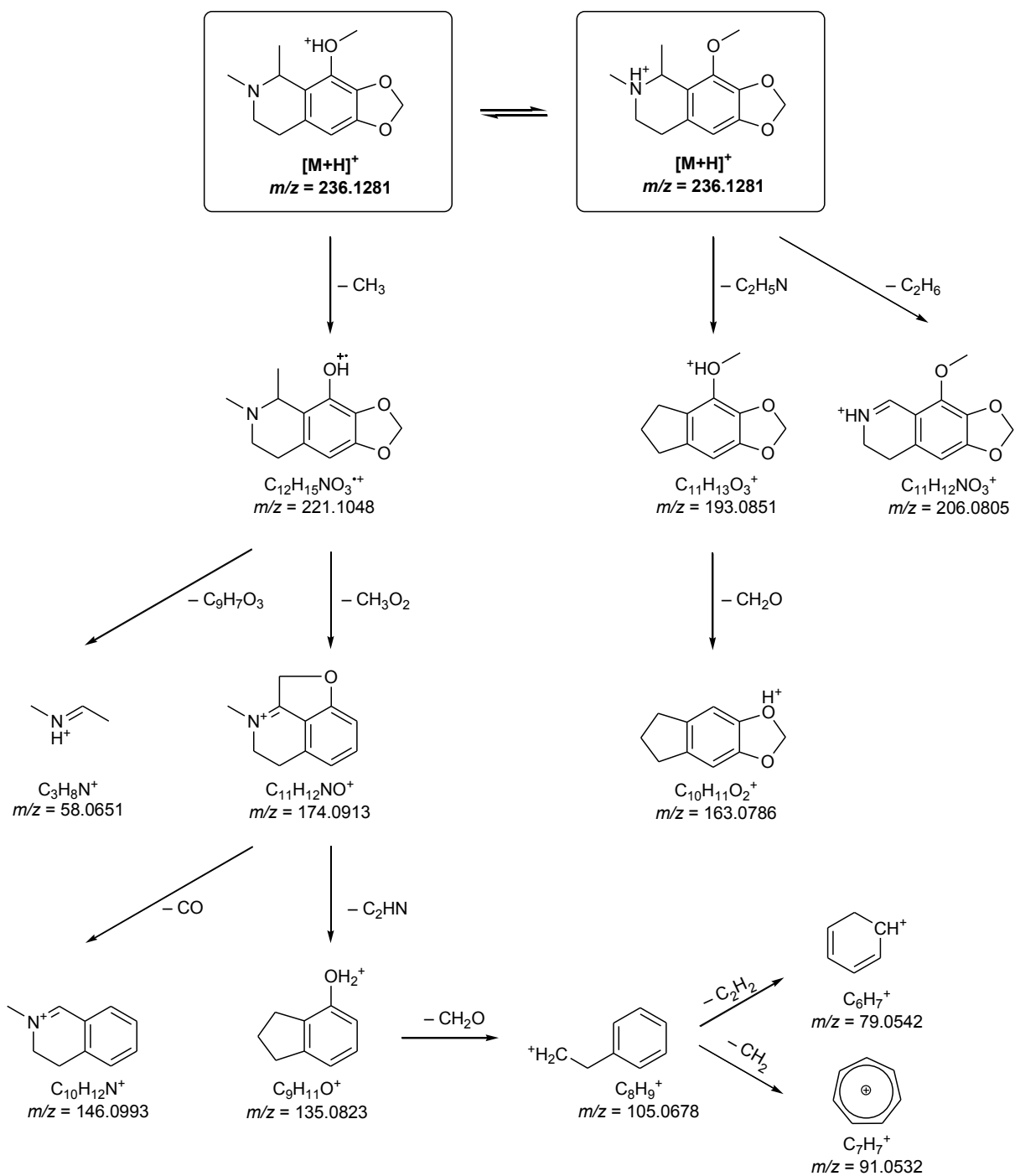
Pro methylhydrokotarnin byl jako prekurzorový ion vybrán $m/z = 236,1284$. Jeho fragmentační hmotnostní spektrum je zobrazeno na obr. 5.5a. Navržený fragmentační mechanismus je prezentován na obr. 5.6. Methylhydrokotarnin je derivátem kotarninu, resp. hydrokotarninu. Z toho důvodu je většina fragmentačních iontů methylhydrokotarninu analogická literaturou popsaným fragmentačním iontům těchto dvou látek^{26,34,35}. Fragmentační spektrum methylhydrokotarninu ale poskytuje navíc ionty $m/z = 174,0913$ a 58,0651. Mohou proto být použity pro rozlišení hmotnostního spektra methylhydrokotarninu od hmotnostních spekter kotarninu a hydrokotarninu.

Strukturní podobnost papaverinolu a papaverinaldinu vede k podobným fragmentačním spektrům (obr. 5.5b, c). V literatuře jsou popsány pouze molekulární ionty papaverinolu^{36,37} a papaverinaldinu^{38,39}. Fragmentací prekurzorového iontu papaverinolu $m/z = 356,1492$ vzniká fragmentační spektrum, které je uvedeno na obr. 5.5b. Mechanismus fragmentace papaverinolu je navržen na obr. 5.7a. Pro fragmentaci papaverinaldinu byl vybrán prekurzorový ion $m/z = 354,1658$. Fragmentační spektrum papaverinaldinu je uvedeno na obr. 5.5c a jeho fragmentační mechanismus je navržen na obr. 5.7b. Při fragmentaci obou analytů dochází k odštěpení dimethoxyfenylové části molekuly. Vzniká tak ion $m/z = 165,0556$ a jeho další fragmentové produkty shodné pro oba analyty. Eliminace vody v papaverinolu nebo eliminace kyslíku v papaverinaldinu vede v obou případech

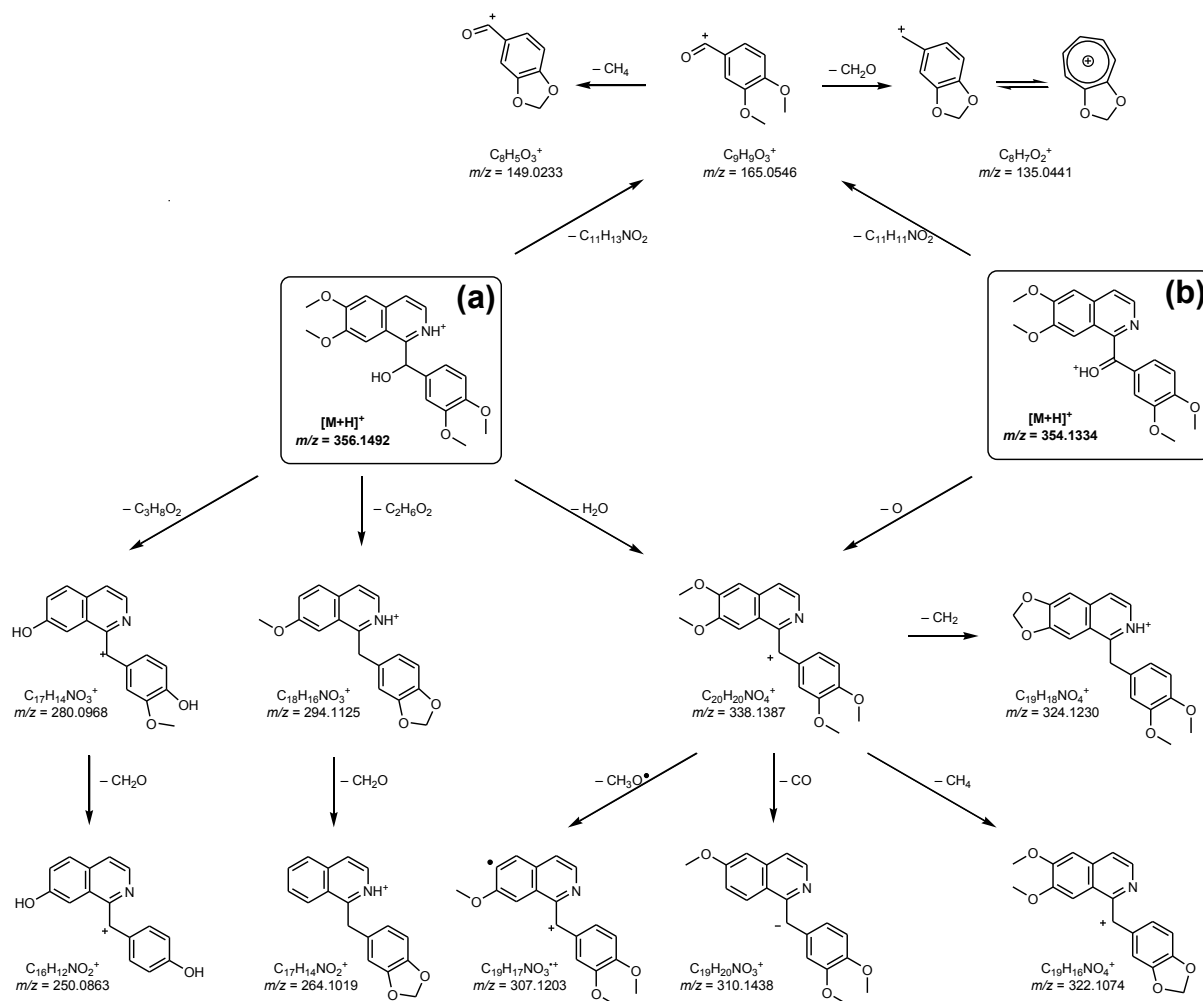
k tvorbě fragmentového iontu $m/z = 338,1397$. Tento fragmentový ion rovněž vzniká při fragmentaci papaverinu. Jedná se totiž o stejnou benzylisochinolinovou skupinu, která se nachází ve všech studovaných derivátech papaverinu. Fragmentací tohoto iontu dochází k tvorbě dalších fragmentových iontů $m/z = 324,1210$; $322,1085$; $310,1423$ a $307,1210$. Tyto ionty vznikají také při fragmentaci papaverinu^{22,29,40}. Fragmentace papaverinolu oproti fragmentaci papaverinaldinu poskytuje navíc ionty $m/z = 294,1134$ a $280,0981$, které mohou být použity pro rozlišení obou analytů. Důvodem vzniku těchto iontů je pravděpodobně rozdílná lokalizace náboje prekurzorových iontů. Zatímco na molekule papaverinolu je náboj lokalizován na atomu dusíku, na molekule papaverinaldinu je náboj lokalizován na atomu ketonového kyslíku.



Obr. 5.5 ESI⁺-MS² spektra produktových iontů (a) methylhydrokotarninu, (b) papaverinolu a (c) papaverinaldinu (prekurzorový ion označen modrým kosočtvercem). Ionizace proběhla při napětí kapiláry 4,5 kV. Kolizní energie byla 40,0 eV. Tlak nebulizačního plynu dusíku byl 0,30 bar. Dusík při průtoku 3,0 dm³ min⁻¹ a teplotě 220 °C byl použit také jako sušící plyn.



Obr. 5.6 Návrh ESI⁺-MS² fragmentace protonovaného methylhydrokotarninu (uvedené hodnoty m/z jsou vypočítané).



Obr. 5.7 Návrh ESI⁺-MS² fragmentace protonovaného (a) papaverinolu a (b) papaverinaldinu (uvedené hodnoty m/z jsou vypočítané).

5.5 Závěr

Analýzou tří historických vzorků farmaceutických přípravků s obsahem alkaloidů opia metodami HPLC-UV a MS² byly ve všech vzorcích identifikovány alkaloidy opia. Tyto vzorky, staré více než dvě stě let, obsahovaly i degradační produkty alkaloidů opia, především papaverinu a noskapinu. Struktury nalezených degradačních produktů, tedy methylhydrokotarninu, papaverinolu a papaverinaldinu, byly potvrzeny pomocí MS², a byly navrženy dosud v literatuře neuvedené mechanismy MS² fragmentace. Tato zjištění doplňují informace o degradačních produktech alkaloidů opia v literatuře. Byly stanoveny podíly hlavních alkaloidů opia (morfinu, papaverinu a noskapinu) a vybraných degradačních produktů (mekoninu a kotarninu). Koncentrační poměr mezi noskapinem a jeho přímým degradačním produktem kotarninem byl navržen jako marker pro odhad stáří vzorku. Získané výsledky byly publikovány v práci⁴¹ (příloha C).

5.6 Literatura k 5. kapitole

1. Nesměrák K.: Historie analgetik. *Bolest* **19** (2016), 103–112
2. Sneader W.: *Drug Discovery: A History*. Chichester, Wiley 2005.
3. Trease G. E., Evans W. C.: *Trease and Evans' Pharmacognosy*. 16th Edition. Edinburgh, Saunders 2009.
4. Beaudoin G. A. W., Facchini P. J.: Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta* **240** (2014) 19–32.
5. Merlin M. D.: Archaeological evidence for the tradition of psychoactive plant use in the old world. *Economic Botany* **57** (2013) 295–323.
6. Maurice S., Diefenbach A., Garshott D., McDonald E., Sanday T., Fahey M., Benvenuto M.: Analysis of liquid patent medicines archived at the Henry Ford Museum, via ¹H NMR spectroscopy. *ACS Symposium Series* **1189** (2015) 181–190.
7. Nesměrák K., Štícha M., Čvančarova M.: HPLC/MS analysis of historical pharmaceutical preparations of heroin and cocaine. *Analytical Letters* **43** (2010) 2572–2581.
8. Vermeire A., Remon J. P.: Stability and compatibility of morphine. *International Journal of Pharmaceutics* **187** (1999) 17–51.
9. Smith R. K., Stacey R. J., Bergström E., Thomas-Oates J.: Detection of opium alkaloids in a Cypriot base-ring juglet. *Analyst* **143** (2018) 5127–5136.
10. Warolin C.: La pharmacopée opiacée en France des origines au XIXe siècle. *Revue d'histoire de la pharmacie* **58** (2010) 81–90.
11. Sigerist H. E.: Laudanum in the works of Paracelsus. *Bulletin of the History of Medicine* **9** (1941) 530–544.
12. Macht D. I.: The history of opium and some of its preparations and alkaloids. *JAMA, the Journal of the American Medical Association* **64** (1915) 477–481.
13. Triller D. W.: *Dispensatorium pharmaceuticum universale: tomus secundus*. Varrentrapp, Francofurtum 1764.
14. Collegium Pharmaceuticum: *Dispensatorium pharmaceuticum Austriaco-Viennense*. Kürner, Vienna 1729.
15. Baggsgaard-Rasmussen H., Reimers F.: Die Löslichkeit des Morphins in verschiedenen Lösungsmitteln. *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft* **273** (1935) 129–139.
16. Kursinszki L., Hank H., Kery A., Szoke E.: HPLC of isoquinoline alkaloids. *Chromatographic Science Series* **102** (2011) 769–801.
17. Bosch M. E., Sánchez A. R., Rojas F. S., Ojeda C. B.: Morphine and its metabolites: Analytical methodologies for its determination. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **43** (2007) 799–815.
18. Bogusz M. J., Maier R. D., Krüger K. D., Kohls U.: Determination of common drugs of abuse in body fluids using one isolation procedure and liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical- ionization mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* **22** (1998) 549–558.
19. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 4th Edition. Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B. (Eds.) London, Pharmaceutical Press, 2011.
20. Hermann T. W., Girreser U., Michalski P., Piotrowska K.: Oxidation and degradation products of papaverine. Part I: Gadamer and Schulemann's papaverinol synthesis revisited. *Archiv der Pharmazie (Weinheim)* **335** (2002) 167–169.
21. Tsunoda N., Yoshimura H.: Metabolic fate of noscapine. II. Isolation and identification of novel metabolites produced by C–C bond cleavage. *Xenobiotica* **9** (1979) 181–187.
22. Zhang Z., Yan B., Liu K., Bo T., Liao Y., Liu H.: Fragmentation pathways of heroin-related alkaloids revealed by ion trap and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22** (2008) 2851–2862.
23. Raith K., Neubert R., Poeknapo C., Boettcher C., Zenk M. H., Schmidt J.: Electrospray tandem mass spectrometric investigations of morphinans. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **14** (2003) 1262–1269.
24. 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** (2011) 865–875.

25. Göber B., Pankow K., Pfeifer S., Kraft R.: Zur Biotransformation von 1-substituierten Hydrocotamin-derivaten. *Pharmazie* **30** (1975) 754–755.
26. Habermehl G., Schunck J., Schaden G.: Thermisches und massenspektroskopisches Verhalten von Berberin und anderen Pseudobasen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **742** (1970) 138–144.
27. Tsunoda N., Yoshimura H.: Metabolic fate of noscapine.; III. Further studies on identification and determination of the metabolites. *Xenobiotica* **11** (1981) 23–32.
28. Ashour A., Hegazy M. A. M., Moustafa A. A., Kelani K. O., Fattah L. E. A.: Validated stability-indicating TLC method for the determination of noscapine. *Drug Testing and Analysis* **1** (2009) 327–338.
29. Peng Z., Song W., Han F., Chen H., Zhu M., Chen Y.: Chromatographic tandem mass spectrometric detection of papaverine and its major metabolites in rat urine. *International Journal of Mass Spectrometry* **266** (2007) 114–121.
30. Fang Z. Z., Krausz K. W., Li F., Cheng J., Tanaka N., Gonzalez F. J.: Metabolic map and bioactivation of the anti-tumour drug noscapine. *British Journal of Pharmacology* **167** (2012) 1271–1286.
31. Chovanec Z., Rafferty S., Swiny S.: Opium for the masses. *Ethnoarchaeology* **4** (2012) 5–36.
32. Mohana M., Reddy K., Jayshanker G., Suresh V., Sarin R. K., Sashidhar R. B.: Principal opium alkaloids as possible biochemical markers for the source identification of Indian opium. *Journal of Separation Science* **28** (2005) 1558–1565.
33. Neumann H.: Analysis of opium and crude morphine samples by capillary gas chromatography: Comparison of impurity profiles. *Journal of Chromatography A* **315** (1984) 404–411.
34. Göber B., Bauer G., Pfeifer S., Dube G., Engelhardt G., Jancke H.: Zur Reaktion von Carbinolaminen mit aliphatischen Diazoverbindungen. *Pharmazie* **28** (1973) 221–232.
35. Göber B., Pfeifer S., Pankow K., Kraft R.: Biotransformation und Stabilität von Hydrocotamin und Diazocarbonylhydrocotamin- bzw.-hydrohydrastininverbindungen. *Pharmazie* **34** (1979) 830–837.
36. Melzer B., Bracher F.: A divergent approach to benzyloisoquinoline-type and oxoaporphine alkaloids via regioselective direct ring metalation of alkoxy isoquinolines. *Organic & Biomolecular Chemistry* **13** (2015) 7664–7672.
37. Rideau M., Morard P., Gansser C., Chenieux J. C., Viel C.: Biotransformation et comportement inducteur de la papavérine sur diverses souches végétales. Structure des composés obtenus. *Pharmazie* **43** (1988) 332–334.
38. Choe S., Kim S., Lee C., Yang W., Park Y., Choi H., Chung H., Lee D., Hwang B. Y.: Species identification of Papaver by metabolite profiling. *Forensic Science International* **211** (2011) 51–60.
39. Liu C., Hua Z., Bai Y.: Classification of illicit heroin by UPLC-Q-TOF analysis of acidic and neutral manufacturing impurities. *Forensic Science International* **257** (2015) 196–202.
40. Wood G. W., Mak N., Hogg A. M.: Field desorption mass spectrometry of biogenic amines and isoquinoline alkaloids: some comparisons with chemical ionization results. *Analytical Chemistry* **48** (1976) 981–984.
41. Nesměrák K., Kudláček K., Štícha M., Kozlík P., Červený V., Kunešová J.: Degradation of the opium alkaloids in pharmaceutical relics from the eighteenth century. *Monatshefte für Chemie–Chemical Monthly* **150** (2019) 1593–1602.

6 Glykosidy senny

V literatuře je popsáno pouze několik analýz vzorků historických extraktů, zejména pak alkoholických extraktů (léčivá vína)¹⁻³. V této kapitole jsou prezentovány výsledky analýzy historického vzorku léčivého přípravku připraveného v 18. století extrakcí listů senny. Glykosidy, které jsou hlavní součástí senny, nebyly v historických farmaceutických pozůstatcích doposud analyzovány⁴. Extrakt ze senny byl podle dobových lékopisů (Vídeňský z roku 1729⁵ a Pražský z roku 1739⁶, obr. 6.1) připravován macerací vhodného množství očištěných listů senny v čisté vodě.

EXTRACTUM FOLIORUM SENÆ.

Rx. Fol. Senæ mundator. q. p.
Macerentur in f. q. aquæ simpli-
cis in loco calido per viginti qua-
tuor horas, Extractum tinctum
effunde, & residuum foliorum ex-
prime, utrumque conjunge, &
Balnei calore blandè ad Extracti
consistentiam evapora. Ex fo-
liis expressis calcinatis falem ex-
trahe, quem Extracto commi-
fcc.

EXTRAKT LISTŮ SENNY

Vezmi očištěných listů senny kolik potřebuješ
maceruj je v dostatečném množství čisté vody
na chladném místě po čtyřadvacet
hodin. Odlij barevný extrakt, a zbývající
listy vymačkej. Obě dvě [tekutiny] spoj a
opatrně odpař na teplé [vodní] lázni na
konzistenci extraktu. Z vymačkaných listů
získej kalcinací [= spálením] sůl [= popel],
kterou smíchej s extraktem.

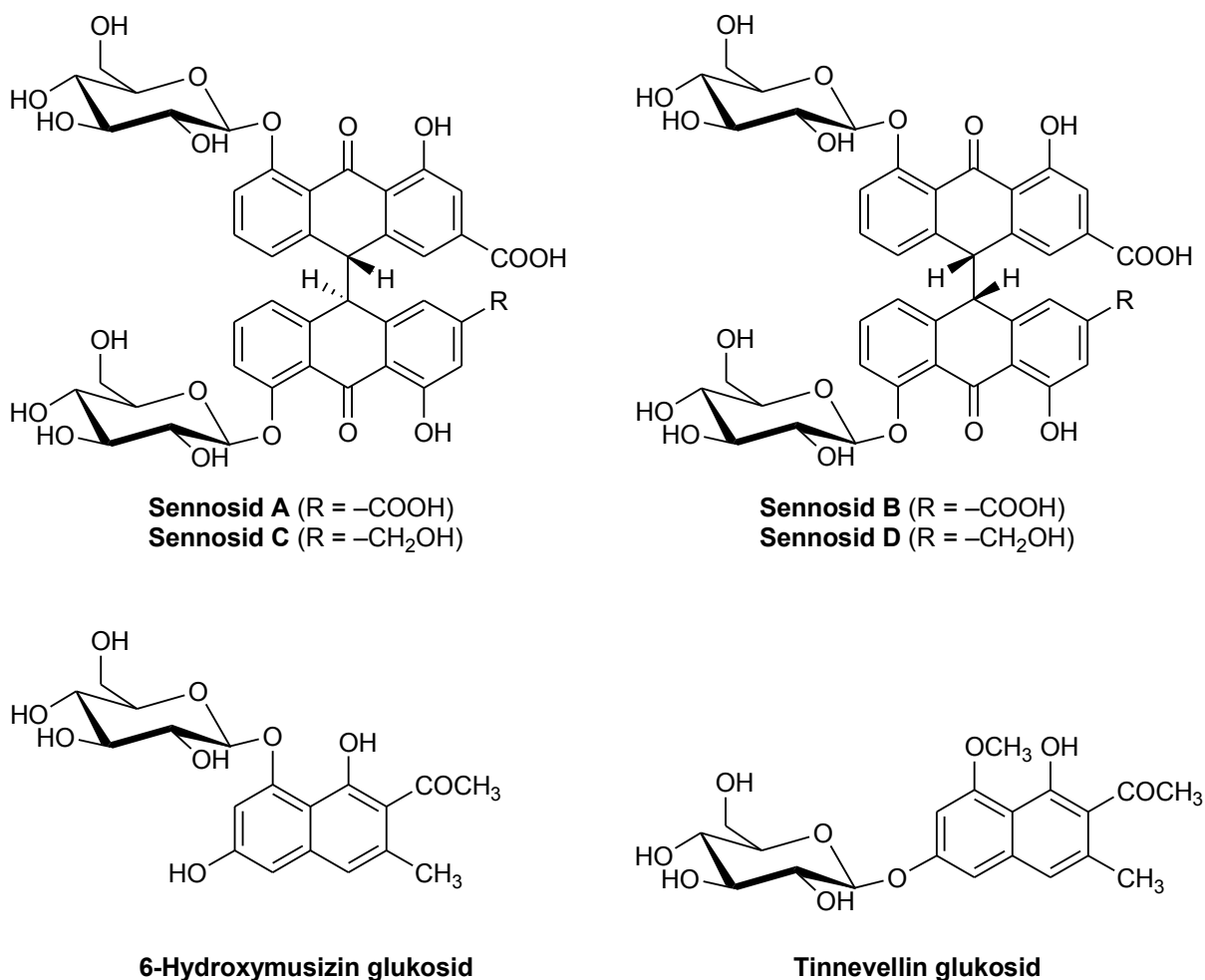
Obr. 6.1 Originální latinský předpis na *Extractum foliorum senne* z *Dispensatorium medico-pharmaceuticum Pragense* 1739 (cit.⁶) a jeho český překlad.

6.1 Chemické složení senny a historie jejího využití

Počátky farmaceutického využití rostlinné drogy senny jako projímadla při léčbě obstipace se datují do 9. nebo 10. století⁷⁻⁹. V současnosti se k tomuto účelu odvar senny připravuje z přibližně 3 g drogy na šálek horké vody. Senna se louhuje po dobu 15–20 minut a pak je extrakt zcezen. Dostupné jsou rovněž suché extrakty, tablety a sirupy.

Jako senna se označují sušené listy a případně lusky rostliny rodu *Cassia*. Existují dva hlavní druhy: (1) *Cassia senna* L. pochází ze severovýchodní Afriky (synonymně *Senna alexandrina* P. Mill.) a je známá jako Alexandrijská nebo Nubijská senna, (2) *Cassia angustifolia* Vahl. pochází z Indie, proto je známá jako Indická, nebo také jako Tinnevely senna. Chemické složení obou rostlinných druhů je podobné. V droze senny jsou obsaženy především anthrachinonové deriváty, které jsou zodpovědné za projímavý účinek. Jedná se hlavně o dva dianthronní glukosidy, sennosid A

a sennosid B (obr. 6.2). Jde o optické izomery lišící se konfigurací na uhlíku C-10 a C-10'. Sennosid A je pravotočivý, sennosid B je mesoformou. Jejich celkový hmotnostní podíl v sušené droze činí 1,5–3,0 %. V menším zastoupení se v droze vyskytují další anthrachinonové deriváty, jako třeba sennosidy C a D, palmidin A, aloe-emodin dianthronglukosid, aloe-emodin-8-glukosid, rhein-8-glykosid a emodin-8-sophorosid. Droga senny obsahuje také dva naftalenové glykosidy: 6-hydroxymusizin glukosid a tinnevellin glukosid (obr. 6.2)¹⁰. Dále jsou přítomny žlutý flavonol kaempferol, jeho glukosidy kaempferin a isorhamnetin; také jsou přítomny steroly a jejich glukosidy, sliz, oxalát vápenatý a pryskyřice. Droga senny obsahuje rovněž mnoho těkavých látek (mono- a seskviterpeny, fenypropány, mastné kyseliny a estery)¹¹, tyto jsou ale v extraktu senny nepravděpodobné, protože během jeho přípravy unikají.



Obr. 6.2 Chemické struktury hlavních komponent drogy senny.

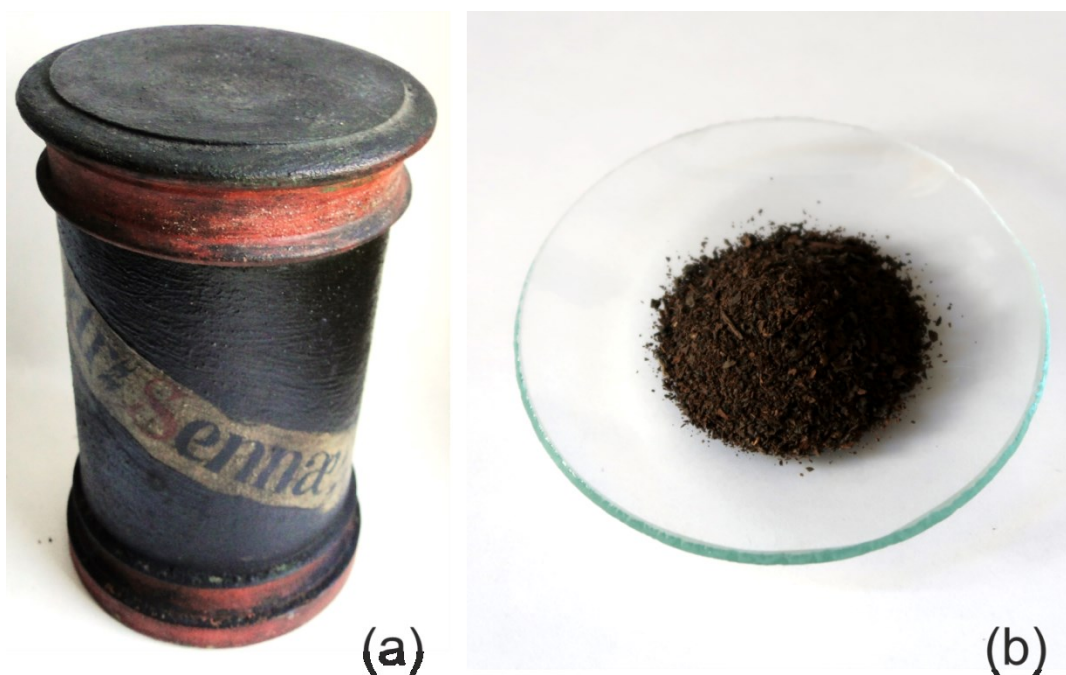
6.2 Degradční cesty sennosidů

Sennosidy jsou výrazně světlocitlivé. Droga senny proto musí být uchovávána v temnu, jinak dochází k urychlení isomerizace sennosidů A a B¹². Sennosidy A a B snadno podléhají hydrolýze za vzniku jejich aglykonů sennidinu A a sennidinu B. Hydrolýza *O*-β-vazby a redukce dianthronové struktury (rozštěpení vazby mezi uhlíky 10-10') mohou probíhat také enzymaticky¹³. Sennosidy A a B nejsou

stabilní ve vodných roztocích. Degradují nejčastěji na rhein a rhein 8-*O*-glukosid^{14,15}. Degradací sennosidů nedochází ke snížení laxativního účinku, protože anthrachinonová struktura zůstává zachována.

6.3 Popis vzorku

Analyzovaný vzorek historického extraktu senny byl odebrán z původní barokní stojatky (Národní muzeum, inv. č. H2-4653) z 18. století¹⁶. Stojatka je vyrobena ze dřeva ve tvaru válce o výšce 14,0 cm a průměru 9,0 cm (obr. 6.3a). Popisek v latinském jazyce „Extractum Sennae“ znamená extrakt ze senny. Nádoba byla opatrně otevřena a skleněnou lžící byly odebrány tři vzorky; jeden ze středu a dva z protilehlých krajů při stěnách nádoby. Odebrané vzorky (obr. 6.3b) byly uchovávány v temnu ve skleněné nádobě.



Obr. 6.3 (a) Barokní stojatka obsahující extrakt senny z 18. století (Národní muzeum, inv. č.H2-4653), (b) vzhled reprezentativního vzorku obsahu nádoby.

6.4 Výsledky a diskuse

Analytické postupy pro extrakci glykosidů senny z analyzovaného vzorku a jejich následnou HPLC separaci vycházely z prací publikovaných v literatuře. Obě metody byly před aplikací na historický vzorek optimalizovány.

6.4.1 *Optimalizace extrakce glykosidů senny*

Ačkoliv jsou sennosidy a další očekávané látky obsažené v droze senně dobře rozpustné ve vodě, pro analytické účely je vhodnější použít organické rozpouštědlo. Sennosidy A a B jsou totiž ve vodném prostředí nestabilní^{15,17,18}. Jako výchozí extrakční metoda byl zvolen postup vyvinutý Ohshimou a kol.¹⁹. Extrakce byla optimalizována na novodobém farmaceutickém standardu drogy senny s deklarovaným obsahem sennosidů 1,59 %. Testována byla extrakce čistým methanolem a směsí methanolu a vody v různých poměrech. Nejvyšší výtěžnosti (95,2±5,9 %) bylo dosaženo trojnásobnou extrakcí vzorku směsí methanolu a vody v poměru 70:30 (v/v).

6.4.2 *Příprava vzorku k analýze*

Vzorek byl těsně před analýzou homogenizován ve třecí misce a pak uložen do exsikatoru nad oxid fosforečný po dobu 24 hodin. Pro extrakci bylo naváženo do zkumavky 200 mg vzorku. Bylo přidáno 5 cm³ rozpouštědla (směs methanolu a vody v poměru 70:30; v/v) a extrakce probíhala po dobu 20 minut v ultrazvukové lázni. Po centrifugování (10 min při 5000 ot. min⁻¹) byl supernatant odebrán a vzorek byl extrahován dalším objemem (2 cm³) rozpouštědla po dobu 5 minut v ultrazvukové lázni. Tento krok byl ještě jednou opakován. Tři získané extrakty byly spojeny a doplněny na celkový objem 10 cm³ rozpouštědlem. Roztok byl před HPLC analýzou příslušně ředěn mobilní fází.

6.4.3 *Optimalizace HPLC separace*

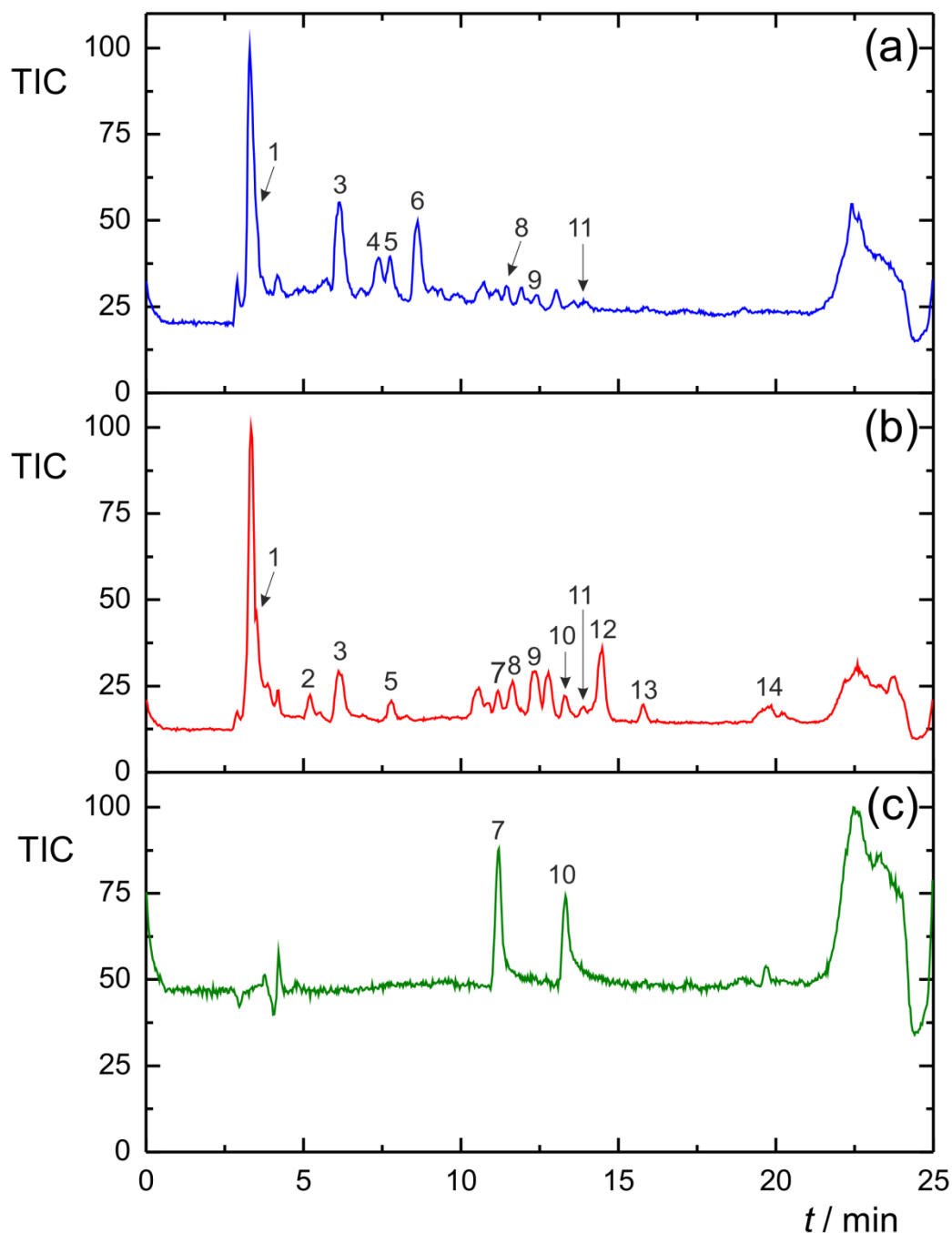
V literatuře jsou nejčastěji popisovány HPLC analýzy složek senny na reverzní fázi. Jako mobilní fáze je používán methanol s vodou¹⁷, methanol s pufrý^{14,18,20}, methanol s vodou a iontově párovými aditivý²¹, acetonitril s pufrý^{15,22,23} a tetrahydrofuran s pufrý¹⁹. S ohledem na kompatibilitu mobilní fáze s hmotnostní detekcí byla jako výchozí zvolena metoda, kterou publikovali Verma a kol.²⁴ a doplnili Bala a kol.¹⁸. Separace je založena na koloně s C18 stacionární fází a na mobilní fázi, která sestává z methanolu (solvent A) a vodného roztoku octové kyseliny (solvent B). Pro zvýšení účinnosti a rozlišení separovaných látek byla (1) optimalizována koncentrace octové kyseliny (solvent B) v rozsahu koncentrací 0,0–0,5 % (v/v), (2) původní isokratický mód byl nahrazen gradientovou elucí, jejíž program byl optimalizován. Při koncentraci 0,2% octové kyseliny ve vodě nedocházelo ke koeluci píků sennosidu B a analytu později identifikovaného jako kvercetin 3-*O*-glukosid. Oba píky byly nejlépe rozlišeny. Vhodného rozlišení ostatních komponent bylo dosaženo gradientovým programem, který začínal na 25% podílu methanolu (solventu A), který vzrůstal během 17,5 minut na 65% podíl. Následující půl minuty podíl methanolu vzrůstal na 80 %, při kterém je následující dvě minuty udržován. Po další půl minuty podíl methanolu klesá na výchozích 25 %. Doba analýzy je 25 minut. Analyty byly detegovány hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací v negativním módu.

6.4.4 *Aplikace optimalizované metody na historický vzorek*

Chromatogramy historického vzorku extraktu senny, novodobého farmaceutického standardu drogy senny a směsi standardů sennosidů A a B jsou zobrazeny na obr. 6.4. Identifikace analytů byla založena na porovnání retenčních časů standardů (pro sennosid A a B) a na porovnání tandemových hmotnostních spekter vysokého rozlišení s literaturou (tabulka 6.1).

Kalibrační závislosti pro kvantifikaci sennosidu A a sennosidu B byly založeny na plochách píků získaných pomocí HPLC-MS při $m/z = 861,1925$. Sennosidy A a B ale nebyly v historickém vzorku nalezeny. Kalibrační parametry jsou uvedeny v tabulce 6.2.

V historickém extraktu senny bylo nalezeno mnoho analytů. Ačkoliv sennosidy A a B nebyly nalezeny ani ve stopových množstvích, autenticita vzorku byla ověřena pomocí dalších identifikovaných analytů (tabulka 6.1). Při porovnání chromatogramů farmaceutického standardu drogy senny a analyzovaného historického vzorku je patrné, že historický vzorek obsahuje navíc píky 4 a 6, které jsou pravděpodobnými degradačními produkty obou sennosidů. Degradační produkty se nepodařilo identifikovat, ale podle literatury by pík 6 mohl být epicatechinem²⁵. Jiným degradačním produktem obou sennosidů je v souladu s literaturou^{14,15} rhein (pík 1). Ačkoliv byly oba hlavní glykosidy nalezené zcela degradovány, jiné přítomné glykosidy byly shledány stabilní i po více než dvou stoletích od přípravy extraktu.



Obr. 6.4 HPLC-MS chromatogramy (a) historického vzorku extraktu sennyH2-4653, (b) novodobého farmaceutického standardu drogy senny a (c) směsi standardů sennosidu A a sennosidu B. Identifikace píků je uvedena v tabulce 6.1. Podmínky separace: kolona XBridge[®] BEH C18 (150×3,0 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters, gradientová eluce methanolu (solvent A) a 0,2% octové kyseliny (solvent B), $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, teplota kolony 40 $^\circ\text{C}$, objem nástřiku vzorku 3 mm^3 . Rozsah $m/z = 50\text{--}1000$. Ionizace ESI^- při napětí na kapiláře $-2,8 \text{ kV}$. Tlak nebulizačního plynu dusíku byl 0,50 bar. Sušící plyn (dusík) měl teplotu 250 $^\circ\text{C}$ a průtok 4,0 $\text{dm}^3 \text{ min}^{-1}$.

Tabulka 6.1

Identifikace analytů nalezených v historickém vzorku H2-4653 extraktu senny, novodobého farmaceutického standardu drogy senny a směsi standardů sennosidu A a sennosidu B (retenční časy, vzorec iontu $[M-H]^-$ a jeho m/z , název a CASRN analytu, literatura použitá pro potvrzení identifikace dle hmotnostního spektra a přítomnost analytu ve vzorku). Podmínky separace: kolona XBridge® BEH C18 (150×3,0 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters, gradientová eluce methanolu (solvent A) a 0,2% octové kyseliny (solvent B), $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, teplota kolony 40 °C, objem nástřiku 3 mm^3 . Rozsah $m/z = 50-1000$. Ionizace ESI^- při napětí na kapiláře $-2,8 \text{ kV}$. Tlak nebulizačního plynu dusíku byl 0,50 bar. Sušící plyn (dusík) měl teplotu 250 °C a průtok 4,0 $\text{dm}^3 \text{ min}^{-1}$.

| číslo píku | t_r/min | vzorec $[M-H]^-$ | m/z iontu $[M-H]^-$ | | | název, CASRN | ref. | přítomen v | |
|------------|------------------|---|-----------------------|------------|---------------------|---|---------------|---------------------------|------------------------------------|
| | | | experimentální | teoretická | Δ/ppm | | | historický vzorek H2-4653 | farmaceutický standard drogy senny |
| 1 | 3,90 | $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_6$ | 283,0252 | 283,0243 | -1,3 | Rhein, 478-43-3 | ²⁵ | ano | ano |
| 2 | 5,02 | $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_6$ | 285,0413 | 285,0400 | 2,9 | Luteolin, 491-70-3 | ²⁶ | ne | ano |
| 3 | 6,15 | $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{13}$ | 479,0829 | 479,0826 | 0,5 | Myricetin 3-O-glukosid, 19833-12-6 | ²⁷ | ano | ano |
| 4 | 7,36 | – | 195,0873 | – | – | Neidentifikováno | – | ano | ne |
| 5 | 7,72 | $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{O}_{15}$ | 593,1497 | 593,1507 | -1,5 | Kaempferol-O-rhamnosid-O-hexosid, 2392-95-2 | ²⁸ | ano | ano |
| 6 | 8,61 | $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{O}_{10}$ | 441,0837 | 441,0822 | 3,2 | Neidentifikováno | – | ano | ne |
| 7 | 11,19 | $\text{C}_{42}\text{H}_{37}\text{O}_{20}$ | 861,1925 | 861,1884 | -4,3 | Sennosid B, 128-57-4 | ^{-a} | <LOD | ano |
| 8 | 11,89 | $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{12}$ | 463,0889 | 463,0877 | -1,6 | Kvercetin 3-O-glukosid, 482-35-9 | ²⁵ | ano | ano |
| 9 | 12,14 | $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{O}_{16}$ | 609,1457 | 609,145 | 0,6 | Rutin, 153-18-4 | ²⁵ | ano | ano |
| 10 | 13,33 | $\text{C}_{42}\text{H}_{37}\text{O}_{20}$ | 861,1925 | 861,1884 | -4,3 | Sennosid A, 81-27-6 | ^{-a} | <LOD | ano |
| 11 | 13,90 | $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{O}_{15}$ | 593,1497 | 593,1507 | -1,5 | Kaempferol-3-O-rutinosid, 17650-84-9 | ²⁹ | ano | ano |
| 12 | 14,29 | $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$ | 447,0947 | 447,0922 | -3,1 | Kvercetin 3-O-rhamnosid, 522-12-3 | ²⁵ | ne | ano |
| 12 | 14,29 | $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{O}_9$ | 393,1204 | 393,1186 | 3,2 | 6-Hydroxymusizin glukosid, 23566-96-3 | ³⁰ | ne | ano |
| 13 | 15,79 | $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_9$ | 407,1357 | 407,1343 | 2,3 | Tinnevellin 8-O-glukosid, 80358-06-1 | ³¹ | ne | ano |
| 14 | 19,58 | $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_6$ | 285,0413 | 285,0399 | 2,9 | Kaempferol, 520-18-3 | ²⁵ | ne | ano |

^adetailně analyzováno MS^2 , odst. 6.4.5

Tabulka 6.2

Parametry kalibrační HPLC-MS závislosti sennosidů A a B založené na ploše píku při $m/z = 861,1925$ (lineární dynamický rozsah, směrnice a úsek kalibrace, koeficient determinace, kvantifikační a detekční limit). Podmínky analýzy: kolona XBridge[®] BEH C18 (150×3,0 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters, gradientová eluce methanolu (solvent A) a 0,2% octové kyseliny (solvent B), $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, teplota kolony 40 °C, objem nástřiku vzorku 3 mm³. Rozsah $m/z = 50\text{--}1000$. Ionizace ESI⁻ přinapětí na kapiláře -2,8 kV. Tlak nebulizačního plynu dusíku byl 0,50 bar. Sušící plyn (dusík) měl teplotu 250 °C a průtok 4,0 dm³ min⁻¹.

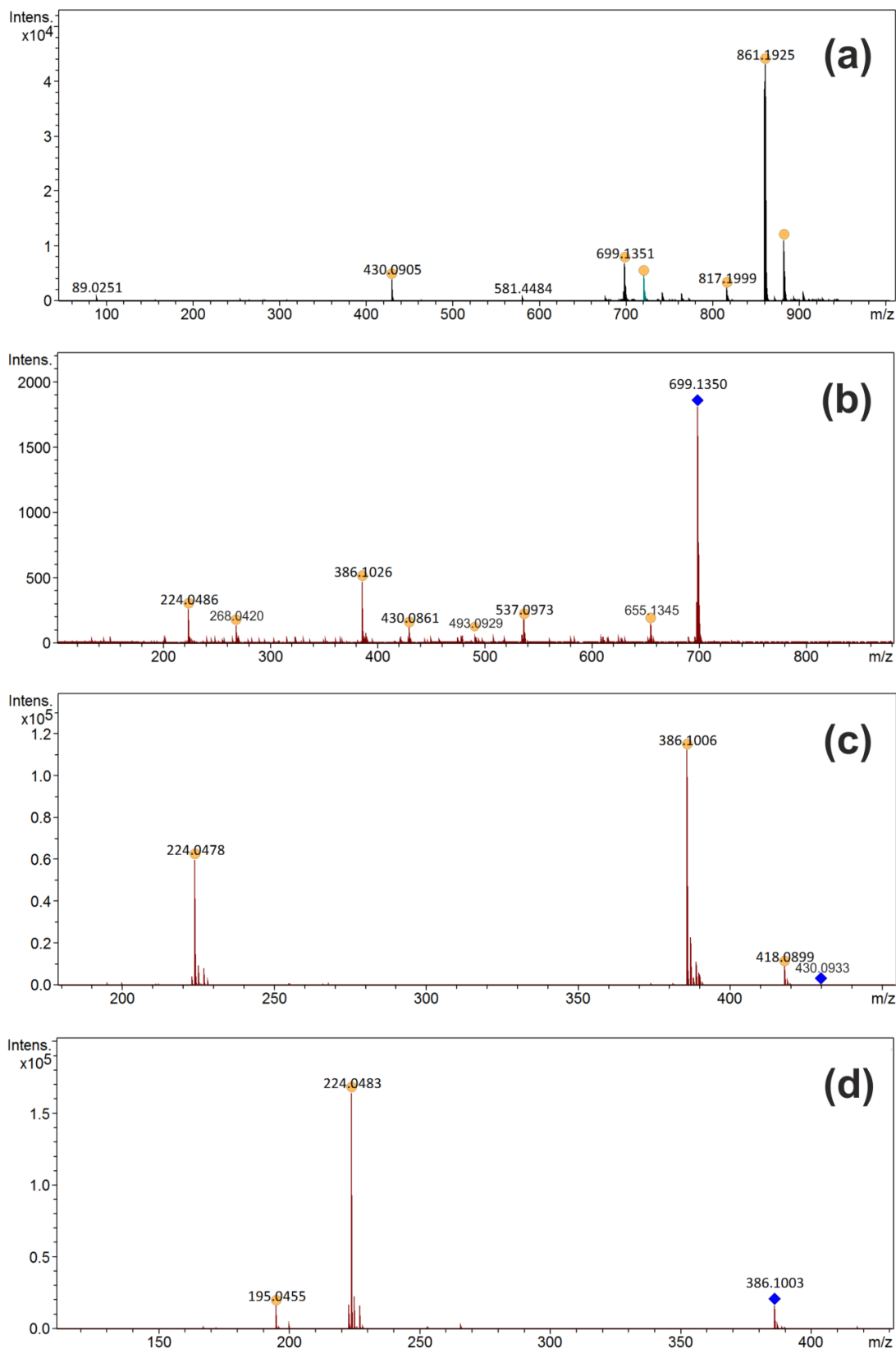
| analyt | sennosid A | sennosid B |
|--|------------|------------|
| lineární dynamický rozsah / mg dm ⁻³ | 5–40 | 5–40 |
| směrnice kalibrace / 10 ⁶ plocha mg ⁻¹ dm ³ | 1,6±0,2 | 1,09±0,02 |
| úsek / 10 ⁶ plocha | 7±4 | 0,8±0,4 |
| R^2 | 0,9763 | 0,9994 |
| limit kvantifikace / mg dm ⁻³ | 2,31 | 0,23 |
| limit detekce / mg dm ⁻³ | 0,70 | 0,07 |

6.4.5 Hmotnostní spektrometrie sennosidu A a sennosidu B

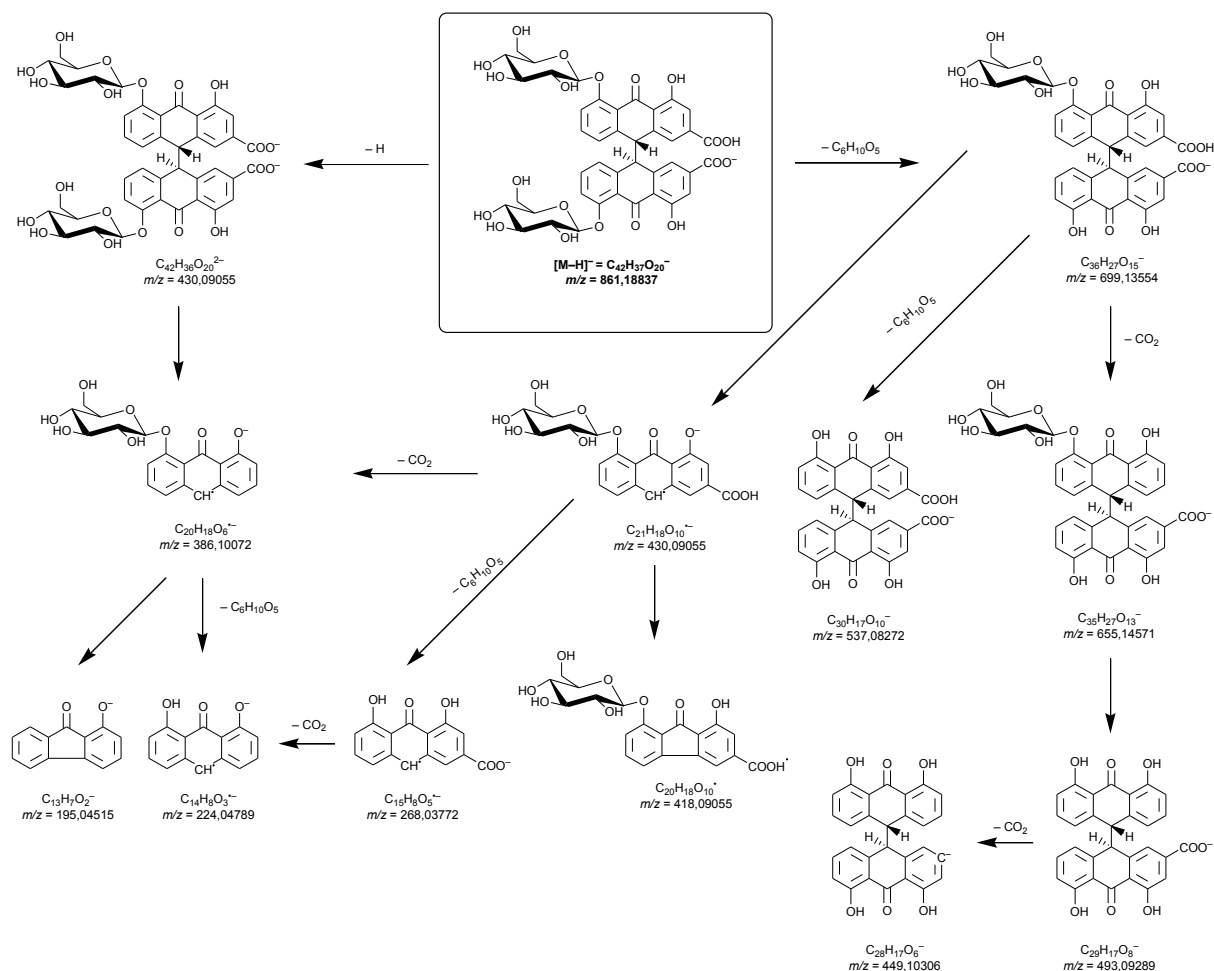
Fragmentační mechanismy sennosidu A a sennosidu B jsou v literatuře^{32–34} popsány jen částečně, proto byla jejich ESI⁻-MSⁿ spektra detailněji studována.

Ionizace proběhla při napětí na kapiláře -2,8 kV. Kolizní energie byla 30,0 eV. Tlak nebulizačního plynu dusíku byl 0,30 bar. Dusík při průtoku 3,0 dm³ min⁻¹ a teplotě 220 °C byl použit také jako sušící plyn.

Protože jsou oba sennosidy strukturně podobné (jde o isomery), jejich hmotnostní spektra se neliší (obr. 6.5). Oba sennosidy poskytují fragmentací produktový ion $m/z = 699,0523$ (C₃₆H₂₇O₁₅), který odpovídá molekule po ztrátě glukosidové jednotky (162,0523 Da). Fragmentový ion $m/z = 537,0973$ je aglykonem sennosidu, což odpovídá ztrátě obou glukosidových jednotek²⁵. Navržený mechanismus fragmentace sennosidu A (obr. 6.6) je v souladu s literaturou kromě iontů $m/z = 655,1345$; 493,0929; 418,0899 a 195,0455, které nebyly dosud v literatuře popsány.



Obr. 6.5 ESF hmtnostní spektra (a) precursorového iontu $[M-H]^-$ $m/z = 861,1925$ sennosidu A, (b) MS^2 spektrum precursorového iontu $m/z = 699,1350$, (c) MS^2 spektrum precursorového iontu $m/z = 430,0933$ a (d) MS^3 spektrum precursorového iontu $m/z = 386,1003$. Precursorové ionty jsou označeny modrou značkou. Ionizace proběhla při napětí na kapiláře $-2,8$ kV. Kolizní energie byla $30,0$ eV. Tlak nebulizačního plynu dusíku byl $0,30$ bar. Dusík při průtoku $3,0$ dm^3 min^{-1} a teplotě 220 $^\circ C$ byl použit také jako sušící plyn.



Obr. 6.6 Navrhovaná ESI⁻-MS² fragmentace sennosidu A (m/z hodnoty jsou vypočteny).

6.5 Závěr

Metodami RP-HPLC a ESI⁻-MSⁿ bylo možné ověřit autenticitu přes dvě stě let starého historického vzorku extraktu senny. Přestože v analyzovaném historickém vzorku nebyly identifikovány hlavní glykosidy senny (sennosid A a sennosid B), autenticita byla potvrzena na základě přítomnosti dalších látek, které droga senny přirozeně obsahuje. Historický vzorek extraktu senny obsahuje oproti farmaceutickému standardu senny tři degradační produkty sennosidů: rhein a dva analyty s neidentifikovanou strukturou. Přestože byly sennosid A i sennosid B v historickém vzorku extraktu senny zcela degradovány, byly identifikovány glykosidy, které zůstaly stabilní po více než dvě století od přípravy analyzovaného extraktu. Bylo rovněž navrženo fragmentační ESI⁻-MSⁿ schéma pro sennosid A a sennosid B. Získané výsledky byly publikovány v práci³⁵ (příloha D).

6.6 Literatura k 6. kapitole

1. McGovern P. E., Zhang J., Tang J., Zhang Z., Hall G. R., Moreau R. A., Nunez A., Butrym E. D., Richards M. P., Wang C., Cheng G., Zhao Z., Wang C.: Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** (2004) 17593–17598.
2. McGovern P. E., Mirzoian A., Hall G. R.: Ancient Egyptian herbal wines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** (2009) 7361–7366.
3. McGovern P. E., Glusker D. L., Exner L. J., Voigt M. M.: Neolithic resinated wine. *Nature* **381** (1996) 480–481.
4. Nesměrák K., Kudláček K., Babica J.: Analytical chemistry studying historical pharmaceuticals and health care formulations. *Monatshefte für Chemie–Chemical Monthly* **148** (2017) 1557–1568.
5. Collegium Pharmaceuticum: *Dispensatorium pharmaceuticum Austriaco-Viennense*. Kürner, Vienna 1729.
6. Facultas Medica: *Dispensatorium medico-pharmaceuticum Pragense*. Vetero-Praga 1739.
7. Trease G. E., Evans W. C.: *Trease and Evans' Pharmacognosy*. 16th Edition. Edinburgh, Saunders 2009.
8. Issekutz B.: *Die Geschichte der Arznenittelforschung*. Budapest, Akadémia Kiadó 1971.
9. Lemli J.: Senna – an old drug in modern research. *Pharmacology* **36**(Suppl 1) (1988) 3–6.
10. Lemli J., Toppet S., Cuveele J., Janssen G.: Naphthalene glycosides in *Cassia senna* and *Cassia angustifolia*. *Planta Medica* **43** (1981) 11–17.
11. Schultze W., Jahn K., Richter R.: Volatile constituents of the dried leaves of *Cassia angustifolia* and *C. acutifolia* (Sennae folium). *Planta Medica* **62** (1996) 540–543.
12. Merle J., Barthes D., Besson J.: High-performance liquid chromatographic study on sennoside A and B changes in solution. *Farmaco, Edizione Pratica* **39** (1984) 233–242.
13. de Witte P.: Metabolism and pharmacokinetics of anthranoids. *Pharmacology* **47** (1993) 86–97.
14. Lainonen H., Marvola M., Hietala P., Parviainen T.: The effect of different storage conditions on the chemical stability, laxative effect and acute toxicity of sennoside solutions. *Pharmacology & Toxicology* **63** (1988) 37–41.
15. Goppel M., Franz G.: Stability control of senna leaves and senna extracts. *Planta Medica* **70** (2004) 432–436.
16. Nesměrák K., Kunešová J.: Farmaceutická historie kapucínského kláštera v Praze na Hradčanech část I. Klášterní lékárna. *Česká a Slovenská farmacie* **64** (2015) 79–94.
17. Demirezer L. O., Karahan N., Ucakturk E., Kuruuzum-Uz A., Guvenalp Z., Kazaz C.: HPLC fingerprinting of sennosides in laxative drugs with isolation of standard substances from some senna leaves. *Records of Natural Products* **5** (2011) 261–270.
18. Bala S., Uniyal G. C., Dubey T., Singh S. P.: An improved method for the analysis of sennosides in *Cassia angustifolia* by high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis* **12** (2001) 277–280.
19. Ohshima Y., Takahashi K.: Separation method for sennosides. **258** (1983) 292–296.
20. Hayashi S., Yoshida A., Tanaka H., Mitani Y., Yoshizawa K.: Analytical studies on the active constituents in crude drugs. IV. Determination of sennosides in senna and formulations by high-performance liquid chromatography. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **28** (1980) 406–412.
21. Komolafe O. O.: Ion-pair partition chromatography analysis of anthraquinone glycosides of senna and pharmaceutical preparations of senna. *Journal of Chromatographic Science* **16** (1978) 496–499.
22. Sun S. W., Su H. T.: Validated HPLC method for determination of sennosides A and B in senna tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **29** (2002) 881–894.
23. Rosenthal I., Wolfram E., Meier B.: An HPLC method to determine sennoside A and sennoside B in *Sennae fructus* and *Sennae folium*. *Pharmeuropa bio & scientific notes* **2014** (2014) 92–102.
24. Verma R. K., Uniyal G. C., Singh S. P., Sharma J. R., Gupta M. M.: Reverse-phase high performance liquid chromatography sennosides in *Cassia angustifolia*. *Phytochemical Analysis* **7** (1996) 73–75.
25. Tan J., Zheng M., Duan S., Zeng Y., Zhang Z., Cui Q., Zhang J., Hong T., Bai J., Du S.: Chemical profiling and screening of the marker components in the fruit of *Cassia fistula* by HPLC and UHPLC/LTQ-Orbitrap MSⁿ with chemometrics. *Molecules* **23** (2018) 1501.
26. Schmidt J.: Negative ion electrospray high-resolution tandem mass spectrometry of polyphenols. *Journal of Mass Spectrometry* **51** (2016) 33–43.

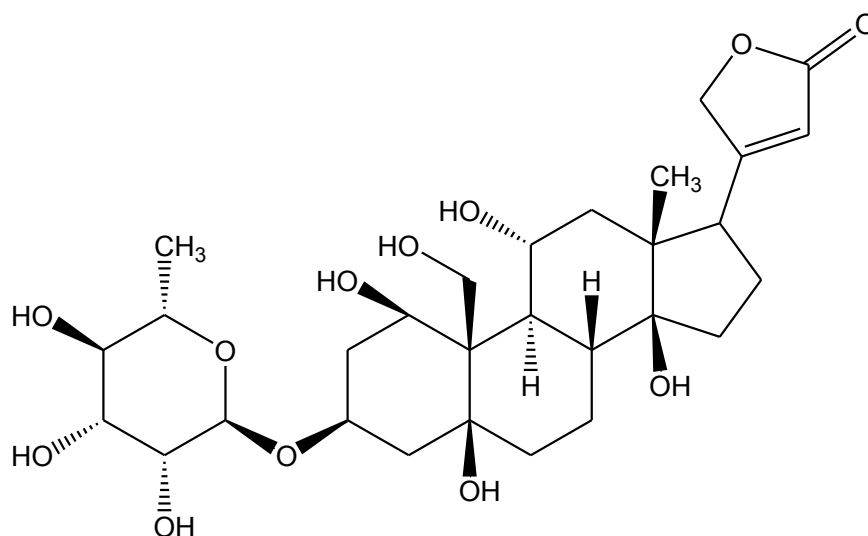
27. Lin L. Z., Chen P., Ozcan M., Harnly J. M.: Chromatographic profiles and identification of new phenolic components of Ginkgo biloba leaves and selected products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56** (2008) 6671–6679.
28. Barroso W. A., Abreu I. C., Ribeiro L. S., da Rocha C. Q., de Souza H. P. de Lima T. M.: Chemical composition and cytotoxic screening of *Musa cavendish* green peels extract: Antiproliferative activity by activation of different cellular death types. *Toxicology In Vitro* **59** (2019) 179–186.
29. Afzan A., Abdullah N. R., Halim S. Z., Rashid B. A., Semail R. H. R., Abdullah N., Jantan I., Muhammad H., Ismail Z.: Repeated dose 28-days oral toxicity study of *Carica papaya* L. leaf extract in Sprague Dawley rats. *Molecules* **17** (2012) 4326–4342.
30. Jin W., Wang Y., Ge R., Shi H., Jia C., Tu P.: Simultaneous analysis of multiple bioactive constituents in *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. by high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21** (2007) 2351–2360.
31. Terreaux C., Wang Q., Ioset J., Ndjoko K., Grimminger W., Hostettmann K.: Complete LC/MS analysis of a tinneveli senna pod extract and subsequent isolation and identification of two new benzophenone glucosides. *Planta Medica* **68** (2002) 349–354.
32. Liao W., Chiu K., Mabuni C., Soliman M.: Analysis of sennosides A and B from Dieter's tea by HPLC-diode array spectrophotometry and negative ion electrospray mass spectrometry. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **61** (1998) 317–324.
33. Gao L. L., Guo T., Xu X. D., Yang J. S.: Rapid identification and simultaneous analysis of multiple constituents from *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. by UPLC/Q-TOF-MS. *Natural Product Research* **31** (2017) 1529–1535.
34. Wu H., Feng F., Jiang X., Hu B., Qiu J., Wang C., Xiang Z.: Pharmacokinetic and metabolic profiling studies of sennoside B by UPLC-MS/MS and UPLC-Q-TOF-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **179** (2020) 112938 (2020).
35. Nesměrāk K., Kudláček K., Čambal P., Štícha M., Kozlík P., Červený V.: Authentication of senna extract from the eighteenth century and study of its composition by HPLC–MS. *Monatshefte für Chemie–Chemical Monthly* **151** (2020) 1241–1248.

7 Srdeční glykosidy

Tato kapitola přináší výsledky analýzy injekčního roztoku obsahujícího srdeční glykosid g-strofantin. Přípravek tedy již patří mezi hromadně vyráběné léčivé přípravky, které se od léčivých přípravků z 18. století, jimž byly věnovány předchozí kapitoly, liší především jednodušším složením, vyšší čistotou a hlavně hermetickým oddělením od okolí po dobu od výroby k analýze. Výsledky analýzy takového přípravku tedy mohou, jak je podrobně diskutováno v odst. 2.1.5.2, přinést zajímavé informace o dlouhodobé stabilitě léčivých látek.

7.1 Chemické složení, historie využití

G-strofantin (CASRN 630-60-4, známý také jako ouabain) je srdeční glykosid, který neselektivně inhibuje sodno-draselnou pumpu v srdečním svalu^{1,2}. V nižších dávkách léčí hypotenzi, atriální fibrilaci nebo srdeční selhání. G-strofantin se nachází v kořenech, stoncích, listech a semenech rostliny *Strophanthus gratus* (Wallich & Hook. ex Benth.) Baill. nebo *Acokanthera schimperi* (A. DC.) Schweinf., které přirozeně rostou ve východní Africe^{3,4}. G-strofantin je vysoce toxická látka⁵, která bývá tradičně používána jako šípový jed. Do evropské medicíny byl g-strofantin zaveden ve druhé polovině 19. století⁶. Poprvé byl z rostliny izolován roku 1882. Úplné syntézy bylo dosaženo v roce 2008⁷. V roce 1991 byl objeven tzv. endogenní g-strofantin, který reguluje kontrakce srdečního svalu⁸. Strukturální vzorec g-strofantinu je uveden na obr. 7.1.



Obr. 7.1 Strukturální vzorec srdečního glykosidu g-strofantinu.

7.2 Degradční cesty g-strofantinu

Stabilitou g-strofantinu, jak jako pevné substance, tak v roztoku se poprvé zabývali Haskell a Doeppers⁹. Zjistili, že pevná substance i vodný roztok jsou při expozici světlu za přítomnosti vzduchu stabilní po dobu dvou let. Další autoři navrhovali pro zvýšení stability rozpuštění g-strofantinu v 0,02M roztoku fosforečnanu o pH = 7,0 a použití ampulí z tvrdého skla¹⁰⁻¹². Vliv pH prostředí na stabilitu vodného roztoku g-strofantinu popsal Berry¹³. V rozsahu pH = 3,0–9,0 nepozoroval žádnou degradaci g-strofantinu. Roztok g-strofantinu o pH = 7,0 (které je vhodné pro intravenózní podání) byl uložen na dobu pěti hodin v autoklávu, nebyly ale zjištěny žádné změny v jeho koncentraci. Tajiri a kol.¹⁴ zjistili, že ani přímé osvětlení injekčního roztoku g-strofantinu nemá vliv na jeho stabilitu. Při studiu úplné syntézy g-strofantinu se Overman a Rucker¹⁵ zabývali také jeho stabilitou a zjistili, že kyselá hydrolyza poskytuje řadu degradačních produktů.

7.3 Popis vzorku

Historický vzorek injekčního roztoku byl vyroben společností Dr. Robert Heisler v tehdejší Československu roku 1938, v době analýzy provedené v roce 2018 bylo tedy jeho stáří osmdesát let. Originální balení (obr. 7.2) představují zatavené ampule s injekčním roztokem, v němž je deklarován obsah g-strofantinu 0,25 mg cm⁻³. Léčivý přípravek pocházel ze sbírky Českého farmaceutického muzea v Kuksu, kde byl uchováván v temnu při pokojové teplotě.



Obr. 7.2 Balení a ampule analyzovaného injekčního roztoku g-strofantinu s názvem „Strophosan“, který byl vyroben firmou Dr. Heisler (tehdejší Československo) v roce 1938.

7.4 Výsledky a diskuse

7.4.1 Příprava vzorku

Ampule analyzovaného historického vzorku injekčního roztoku byla otevřena těsně před analýzou. Změřené pH analyzovaného roztoku bylo 6,9. Pro analýzu byl odebrán alikvot roztoku, který byl příslušně ředěn mobilní fází.

7.4.2 Optimalizace HPLC separace

Metody pro stanovení g-strofantinu nebo strukturně podobného k-strofantinu, které jsou popsány v literatuře, jsou založeny na reverzní fázi a gradientové eluci. Mobilní fáze se nejčastěji skládá z vodného roztoku mravenčanu amonného a acetonitrilu či methanolu^{16,17}, nebo z vodného roztoku mravenčí kyseliny či mravenčanu amonného a acetonitrilu^{18,19}. Vzhledem k polárnímu charakteru g-strofantinu byla v této práci vyvinuta nová isokratická HILIC metoda na koloně XBridge[®] BEH Amide (150×3,0 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters. Tato metoda ve srovnání s RP-HPLC s výhodou používá vyšší podíl acetonitrilu v mobilní fázi. To má za následek efektivnější ionizaci při hmotnostní detekci.

Při optimalizaci navržené HILIC metody byl testován vliv (1) složení mobilní fáze a (2) průtoku mobilní fáze na retenci g-strofantinu. Nejprve byl testován podíl acetonitrilu (solvent A) a vody (solvent B) v poměrech 90:10, 85:15 a 80:20 (v/v), $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Jak je patrné z tabulky 7.1, nejúčinnější separace a zároveň dostatečného rozlišení píků g-strofantinu a dříve eluujícího analytu (později identifikovaného jako derivát cholesterolu) bylo dosaženo při poměru acetonitrilu a vody 85:15 (v/v). Záměnou vody (solvent B) za vodný pufr mravenčanu amonného (solvent C; 0,02M-HCOONH₄ a HCOOH, pH = 4,00) bylo sice dosaženo účinnější separace, ale současně došlo ke zvýšení šumu. Zatímco pro mobilní fázi používající vodu byl $S/N = 1084$, záměnou za pufr se podíl snížil na 115 (vypočítáno pro pík g-strofantinu). Zvýšení šumu základní linie může zabránit identifikaci případných degradačních produktů. Vliv průtoku mobilní fáze na rozlišení g-strofantinu a dalších analytů studovaného vzorku byl optimalizován v rozmezí 0,2–0,8 $\text{cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Průtok 0,2 $\text{cm}^3 \text{ min}^{-1}$ je optimální vzhledem k rozlišení analytů i celkovému času analýzy. Zvýšení průtoku nevedlo k účinnější separaci.

Teplota kolony byla nastavena na 40 °C a objem nástřiku vzorku činil 2 mm³. Hmotnostní detekce při optimalizaci metody proběhla v pozitivním ESI módu přinapětí kapiláry 2,8 kV. Dusík byl použit jako nebulizační plyn při tlaku 0,40 bar a také jako sušící plyn (4,0 dm³ min⁻¹; 250 °C). Rozsah skenu m/z byl nastaven na 50–1000.

Tabulka 7.1

Optimalizace HILIC metody pro separaci g-strofantinu. Závislost retenčních charakteristik g-strofantinu (retenční čas, symetrie píku v 10 % výšky, počet teoretických pater a rozlišení píků g-strofantinu a dříve eluujícího analytu) na složení mobilní fáze: acetonitril (solvent A), voda (solvent B), mravenčanový pufr (solvent C; 0,02M-HCOONH₄ a HCOOH, pH = 4,00). Podmínky separace: kolona XBridge[®] BEH Amide (150×3,0 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters, $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, isokratická eluce, teplota kolony 40 °C, objem nástřiku vzorku 2 mm³. Podmínky hmotnostní detekce: elektrosprejová ionizace v pozitivním módu při napětí kapiláry 2,8 kV, dusík nebulizační (tlak 0,40 bar) a sušič (4,0 dm³min⁻¹; 250 °C) plyn. Rozsah skenu m/z 50–1000.

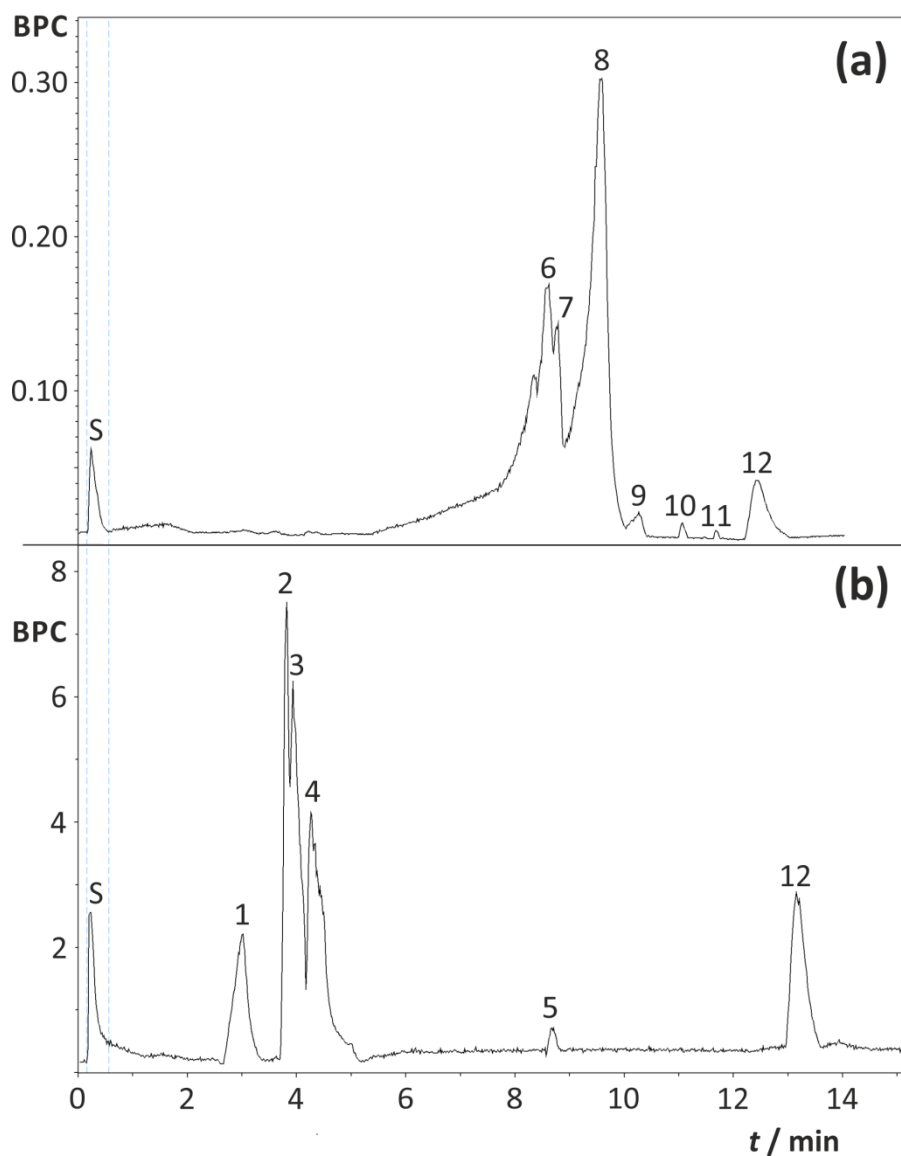
| solvent | | | t_r / min | A_s | n | $R_{1,2}$ |
|---------|----|----|-------------|-------|-------|-----------|
| A | B | C | | | | |
| 80 | 20 | 0 | 7,61 | 1,28 | 23400 | 4,63 |
| 85 | 15 | 0 | 12,43 | 1,17 | 23800 | 6,85 |
| 90 | 10 | 0 | 22,28 | 1,28 | 22900 | 37,58 |
| 85 | 0 | 15 | 12,37 | 1,19 | 24800 | 5,49 |

7.4.3 Aplikace metody na historický vzorek

Chromatogram HILIC-MS historického vzorku injekčního roztoku g-strofantinu, zobrazený na obr. 7.3, byl naměřen za optimalizovaných separačních podmínek uvedených v odst. 7.4.2 v pozitivním i negativním módu. Je zřejmé, že retenční časy píků obou chromatogramů jsou mírně posunuté. Relativní standardní odchylka činí 7 %, což je pro HILIC metody běžné²⁰. G-strofantin byl identifikován na základě porovnání retenčního času se standardem a zároveň analýzou MS² spektra látky, ostatní analyty byly identifikovány hmotnostní spektrometrií (tabulka 7.2).

Analyt eluující v chromatogramu pod číslem 5 je pravděpodobným degradačním produktem g-strofantinu. Jde o oxidovaný derivát g-strofantinu, pravděpodobně v pozici 10 na steroidové části molekuly. Koncentrace degradačního produktu v analyzovaném vzorku byla příliš nízká pro detailní určení struktury pomocí MS² a jde proto pouze o hypotézu vytvořenou na základě literatury^{21,22}.

Další nalezené látky ve vzorku pravděpodobně pochází z výroby přípravku. Zejména salicyláty a chlorid sodný byly přidány nejspíš kvůli udržení osmotické koncentrace injekčního roztoku. Některé z analytů nebyly identifikovány s ohledem na jejich stopovou koncentraci.



Obr. 7.3 HILIC-MS chromatogramy analyzovaného historického vzorku injekčního roztoku „Strophosan“ v ESI (a) pozitivním a (b) negativním módu. Identifikace píků je uvedena v tabulce 7.2. *S* značí hmotnostní kalibrační standard mravenčan sodný. Podmínky separace: kolona XBridge[®] BEH Amide (150×3,0 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters, $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, isokratická eluce, mobilní fáze acetonitril:voda = 85:15 (v/v), teplota kolony 40 °C, objem nástřiku vzorku 2 mm³. Podmínky hmotnostní detekce: elektrosprejová ionizace v pozitivním a negativním módu přínapětí kapiláry ±2,8 kV, dusík nebulizační (tlak 0,40 bar) a sušící (4,0 dm³ min⁻¹; 250 °C) plyn. Rozsah skenu m/z 50–1000.

Tabulka 7.2

Identifikace analytů v HILIC-MS chromatogramu analyzovaného historického vzorku injekčního roztoku „Strophosan“. Podmínky separace: kolona XBridge® BEH Amide (150×3,0 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters, $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, isokratická eluce, mobilní fáze acetonitril:voda = 85:15 (v/v), teplota kolony 40 °C, objem nástřiku vzorku 2 mm³. Podmínky hmotnostní detekce: elektrosprejová ionizace v pozitivním a negativním módu při napětí kapiláry ±2,8 kV, dusíknebulizační (tlak 0,40 bar) a sušící (4,0 dm³ min⁻¹; 250 °C) plyn. Rozsah skenu m/z 50–1000.

| číslo píku | t_r /min | ESI mód | typ iontu | vzorec iontu | m/z | | | analyt |
|------------|------------|---------|----------------------|--|----------------|------------|---------------|--------------------------------|
| | | | | | experimentální | teoretická | Δ /ppm | |
| 1 | 2,98 | neg. | [M-H] ⁻ | CH ₃ O ₄ S | 110,9774 | 110,9758 | -14,5 | neidentifikováno |
| 2 | 3,77 | neg. | [M-H] ⁻ | C ₁₀ H ₁₁ O ₃ | 179,0718 | 179,0714 | -2,6 | propyl salicylát |
| 3 | 3,89 | neg. | [M-H] ⁻ | C ₈ H ₇ O ₃ | 151,0406 | 151,0401 | -3,4 | methylosalicylová kyselina |
| 4 | 4,21 | neg. | [M-H] ⁻ | C ₇ H ₅ O ₃ | 137,0250 | 137,0244 | -4,0 | salicylová kyselina |
| 5 | 8,60 | neg. | [M+Cl] ⁻ | C ₂₉ H ₄₂ O ₁₁ Cl | 601,2408 | 601,2421 | -2,2 | oxidační produkt g-strofantinu |
| 6 | 8,63 | pos. | [M+H] ⁺ | C ₁₆ H ₃₆ NO | 258,2787 | 258,2791 | 1,9 | neidentifikováno |
| 7 | 8,79 | pos. | [M+H] ⁺ | C ₁₄ H ₃₂ NO | 230,2474 | 230,2478 | 1,7 | neidentifikováno |
| 8 | 9,29 | pos. | [M+H] ⁺ | C ₈ H ₂₀ N | 130,1571 | 130,1590 | 14,6 | neidentifikováno |
| 9 | 10,25 | pos. | [M+H] ⁺ | – | 396,0410 | – | – | neidentifikováno |
| 10 | 11,06 | pos. | [M+2H] ²⁺ | – | 455,5170 | – | – | neidentifikováno |
| 11 | 11,67 | pos. | [M+2H] ²⁺ | C ₃₃ H ₅₄ O ₂ | 241,2040 | 241,2056 | 7,0 | derivát cholesterolu |
| 12 | 12,43 | pos. | [M+H] ⁺ | C ₂₉ H ₄₅ O ₁₂ | 585,2903 | 585,2901 | 0,4 | g-strofantin |
| 12 | 13,00 | neg. | [M+Cl] ⁻ | C ₂₉ H ₄₄ O ₁₂ Cl | 619,2541 | 619,2527 | -2,3 | g-strofantin |

7.4.4 Kvantifikace g-strofantinu

Kvantifikace obsahu g-strofantinu v analyzovaném historickém vzorku injekčního roztoku „Strophosan“ byla založena na šestibodové kalibraci metodou vnějšího standardu. Spektrometrická UV detekce proběhla při vlnové délce 218 nm. Parametry kalibrační závislosti jsou uvedeny v tabulce 7.3. Kalibrace byla ověřena hmotnostní spektrometrií v SIM módu pro iont [M-H]⁻ o $m/z = 583,2760$. HILIC-UV metodou bylo ve vzorku nalezeno $56 \pm 2 \%$ ($s_r = 1,75 \%$) deklarovaného obsahu g-strofantinu, což odpovídá koncentraci $0,14 \text{ mg cm}^{-3}$.

Tabulka 7.3

Parametry HILIC-UV kalibrační závislosti pro stanovení g-strofantinu založeném na ploše píku. Analýza proběhla na koloně XBridge® BEH Amide (150×3,0 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters, při isokratické eluci, $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Mobilní fáze obsahovala acetonitril a vodu v poměru 85:15 (v/v). Teplota kolony byla 40 °C a objem nástřiku vzorku činil 2 mm³. Detekce proběhla při vlnové délce 218 nm.

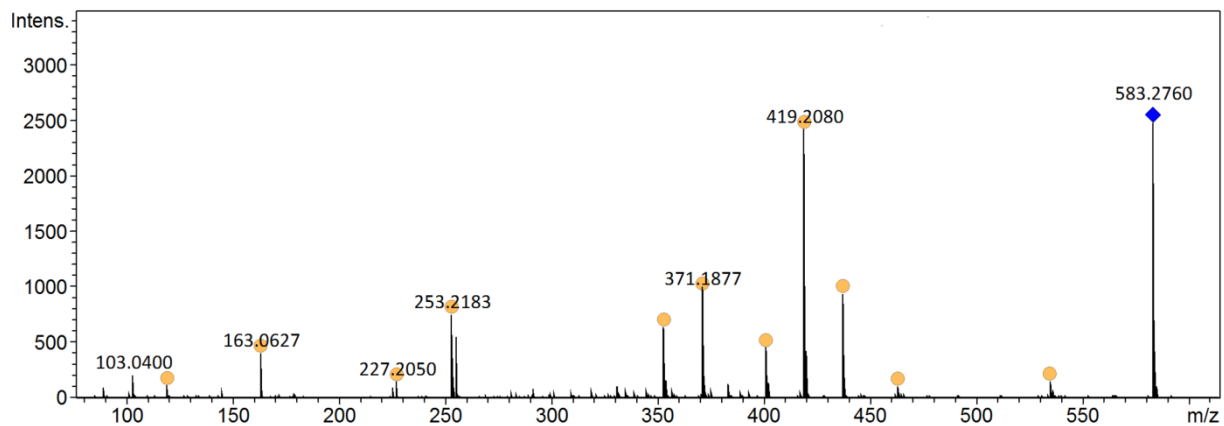
| analyt | g-strofantin |
|--|--------------|
| lineární dynamický rozsah / mg dm^{-3} | 4,0–160,4 |
| směrnice kalibrace / $\text{mAU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$ | 7,07±0,02 |
| úsek / mAU min | 3,52±1,49 |
| R^2 | 0,9999 |
| limit kvantifikace / mg dm^{-3} | 2,11 |
| limit detekce / mg dm^{-3} | 0,63 |

7.4.5 Hmotnostní spektrometrie g-strofantinu

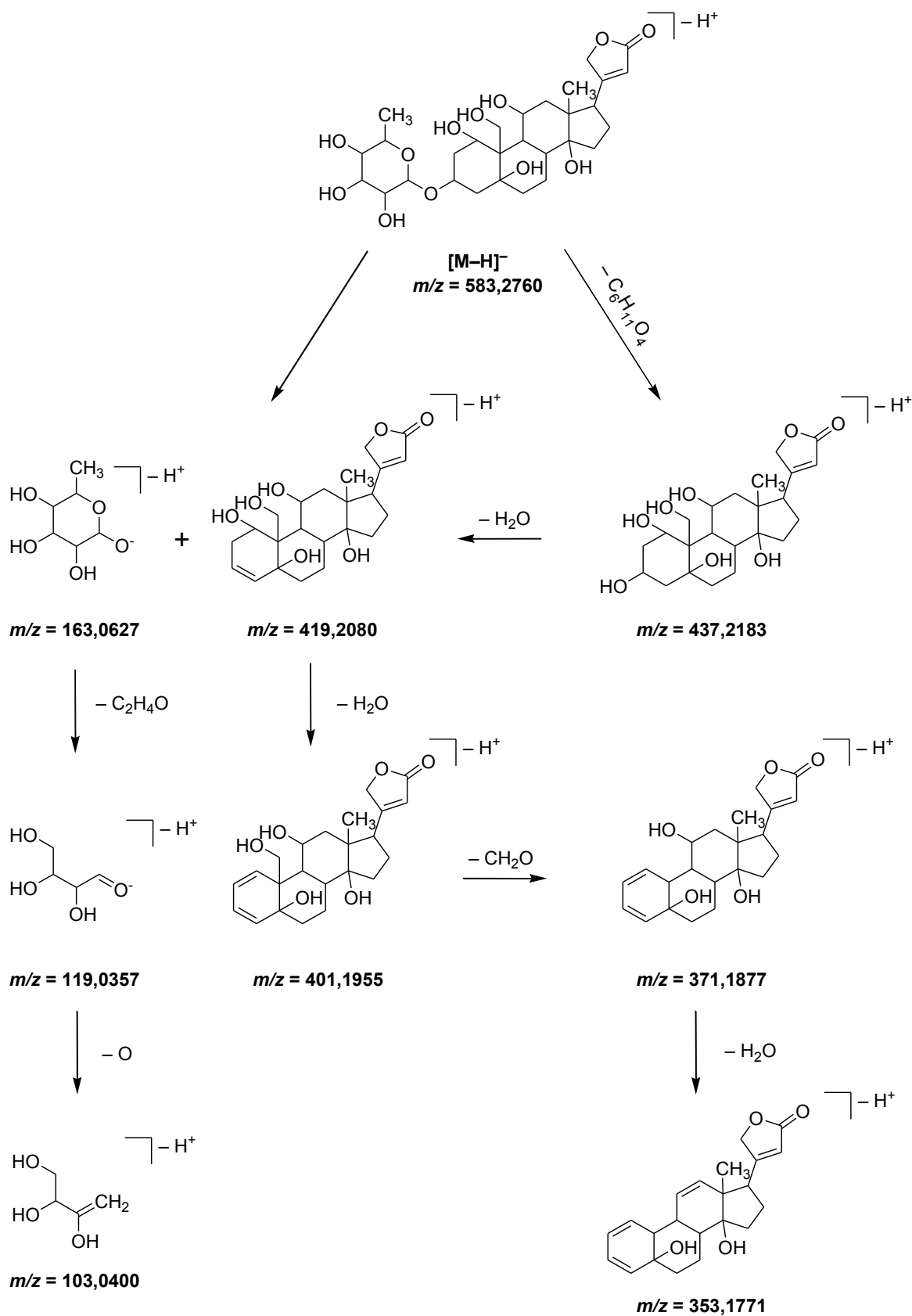
Bylo detailně studováno ESI-MS² spektrum g-strofantinu v negativním módu ionizace. Fragmentační mechanismy g-strofantinu jsou literaturou totiž popisovány jen částečně. Light a kol.²³ charakterizují vybrané srdeční glykosidy technikou hmotnostní spektrometrie s desorpční ionizací draselným iontem. Popisují pouze ionty $[\text{M}+\text{K}]^+ m/z = 623$ a $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{K}]^+ m/z = 605$. Tracqui a kol.¹⁹ publikovali pouze hlavní ionty g-strofantinu pomocí ionsprejové hmotnostní spektrometrie: $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 585$, $[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z = 607$ a $[\text{M}+\text{K}]^+ m/z = 623$.

Fragmentační hmotnostní spektrum g-strofantinu v negativním módu poskytuje více iontů než v pozitivním. Pro fragmentaci byl vybrán ion $[\text{M}-\text{H}]^- m/z = 583,2760$ jako prekurzorový. Jeho MS² spektrum je zobrazeno na obr. 7.4. Tandemový hmotnostní experiment proběhl při na kapiláře –2,8 kV, kolizní energie byla nastavena na 28,0 eV, dusík nebulizační (tlak 0,30 bar) a sušící ($3,0 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$; 220 °C) plyn. Rozsah skenu m/z 50–1500.

Ion $[\text{M}-\text{H}]^-$ g-strofantinu se fragmentuje zejména eliminací rhamnosylové skupiny a jedné nebo více molekul vody. Mechanismus fragmentace g-strofantinu je navržen na obr. 7.5. Navržená fragmentace rhamnosylové skupiny na ionty $m/z = 119,0357$ a $m/z = 103,0400$ je analogicky popisována literaturou²⁴. Lokalizace dvojnásobné vazby v produktovém iontu $m/z = 419,2080$ je pouze hypotetická. Tato vazba může být lokalizována rovněž mezi atomy uhlíku C2 a C3.



Obr. 7.4 ESI-MS² spektrum iontu $[M-H]^-$ g-strofantinu. Ionizace proběhla v negativním módu při napětí kapiláry $-2,8$ kV, kolizní energie byla nastavena na $28,0$ eV, dusíknebulizační (tlak $0,30$ bar) a sušící ($3,0$ dm³ min⁻¹; 220 °C) plyn. Rozsah skenu m/z 50–1500.

Obr. 7.5 Navržené ESI-MS² fragmentační schéma iontu $[M-H]^-$ g-strofantinu.

7.5 Závěr

Vyvinutá HILIC metoda se spektrometrickou UV a hmotnostní detekcí byla použita pro separaci analytů historického injekčního roztoku vzorku g-strofantinu. Téměř polovina množství účinné látky g-strofantinu po osmdesáti letech od přípravy injekčního roztoku degradovala. Pravděpodobně dochází k oxidaci hydroxylové skupiny v pozici 10 na steroidové části molekuly g-strofantinu. Tato zjištění doplňují informace o stabilitě látky doposud publikované v literatuře. Bylo také navrženo fragmentační ESI-MS² schéma g-strofantinu, které nebylo doposud v literatuře publikováno. Získané výsledky byly publikovány v práci²⁵ (příloha E).

7.6 Literatura k 7. kapitole

1. Doggett N. S., Spencer P. S. J.: Pharmacological properties of centrally administered ouabain and their modification by other drugs. *British Journal of Pharmacology* **42** (1971) 242–253.
2. *Cardiac Glycosides 1785–1985: Biochemistry, Pharmacology, Clinical Relevance*. Erdmann E., Greef K., Skou J. C. (Eds.). New York, Springer 1986.
3. Reichsten T.: Chemische Rassen in *Acokanthera*. *Planta Medica* **13** (1965) 382–399.
4. Geiger U. P., Weiss E., Reichstein, T.: Die Cardenolide der Samen von *Strophanthus gratus* (Wall. et Hook.) Franch. 2. Mitteilung. Glykoside und Aglykone, 284. Mitteilung. *Helvetica Chimica Acta* **50** (1967) 179–193.
5. Klaassen C. D.: Comparison of the toxicity of chemicals in newborn rats to bile duct-ligated and sham-operated rats and mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **24** (1973) 37–44.
6. Osseo-Asare A. D.: Bioprospecting and resistance: Transforming poisoned arrows into strophanthin pills in colonial Gold Coast, 1885-1922. *Social History of Medicine* **21** (2008) 269–290.
7. Reddy M. S., Zhang H., Phoenix S., Deslongchamps P.: Total synthesis of ouabagenin and ouabain. *Chemistry – An Asian Journal* **4** (2009) 725–741.
8. Hamlyn J. M., Blaustein M. P.: Endogenous ouabain. *Hypertension* **68** (2016) 526–532.
9. Haskell C. C., Doepfers W. A.: The stability of ouabain in aqueous solution. *Journal of the American Pharmacists Association* **3** (1914) 646–648.
10. Pomeroy C. A., Heyl F. W.: On the stability of strophanthus extracts. *The American Journal of Pharmacy* **94** (1922) 479–486.
11. Levy R. L., Cullen G. E.: Deterioration of crystalline strophanthin in aqueous solution: Its relation to hydrogen ion concentration and a method for its prevention. *Journal of Experimental Medicine* **31** (1920) 267–273.
12. Haag H. B., Hatcher R. A.: The stability of digitalis and its preparations. *The Journal of the American Medical Association* **93** (1929) 26–29.
13. Berry H.: The stability of aqueous solutions of ouabain and k-strophanthin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **8** (1935) 464–471.
14. Tajiri Y., Dosako K., Matsumoto Y., Goya Y., Kurata M., Shinohara C.: Light effects on injection solutions. *Hiroshima-ken Byoin Yakuzaisaikai Gakujutsu Nenpo* **13** (1978) 54–59. *Chem. Abstr.* **90**:92336.
15. Overman L. E., Rucker P. V.: Investigations directed at the total synthesis of ouabain: Lessons learned from degradation studies. *Heterocycles* **52** (2000) 1297–1314.
16. Vaclavik L., Krynitsky A. J., Rader J. I.: Targeted analysis of multiple pharmaceuticals, plant toxins and other secondary metabolites in herbal dietary supplements by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-orbital ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **810** (2014) 45–60.

17. Yamaguchi H., Miyamori K., Sato T., Ogura J., Kobayashi M., Yamada T., Mano N., Iseki K.: Quantification of intracellular and extracellular digoxin and ouabain by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **972** (2014) 73–80.
18. Grosa G., Allegrone G., Del Grosso E.: LC-ESI-MS/MS characterization of strophanthin-K. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **38** (2005) 79–86.
19. Tracqui A., Kintz P., Ludes B., Mangin P.: High-performance liquid chromatography-ion spray mass spectrometry for the specific determination of digoxin and some related cardiac glycosides in human plasma. *Journal of Chromatography B* **692** (1997) 101–109.
20. *Gradient HPLC for Practitioners*. Kormidas S. (Ed.). Weinheim, Wiley-VCH 2019.
21. Templeton J. F., Hamlyn J. M., Hamilton B. P., Ayotte J., Majgier-Baranowska H., Lester A., Marat K., Perreault H.: Regioselective derivatization of ouabain with trialkylsilyl reagents and selective oxidation of the unprotected alcohols. *Steroids* **65** (2000) 379–386.
22. Strobach H., Wirth K. E., Rojsathaporn K.: Absorption, metabolism and elimination of strophanthus glycosides in man. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **334** (1986) 496–500.
23. Light K. J., Kassel D. B., Allison J.: Mass spectrometric analysis of cardiac glycosides by the desorption/ionization technique potassium ion ionization of desorbed species. *Biomedical & Environmental Mass Spectrometry* **18** (1989) 177–184.
24. Carroll J. A., Willard D., Lebrilla C. B.: Energetics of cross-ring cleavages and their relevance to the linkage determination of oligosaccharides. *Analytica Chimica Acta* **2670** (1995) 431–447.
25. Kudláček K., Nesměrák K., Štícha M., Kozlík P., Babica J.: Degradation of ouabain in 80-year-old injection solution studied by HILIC–MS. *Monatshefte für Chemie–Chemical Monthly* **149** (2018) 1555–1560.

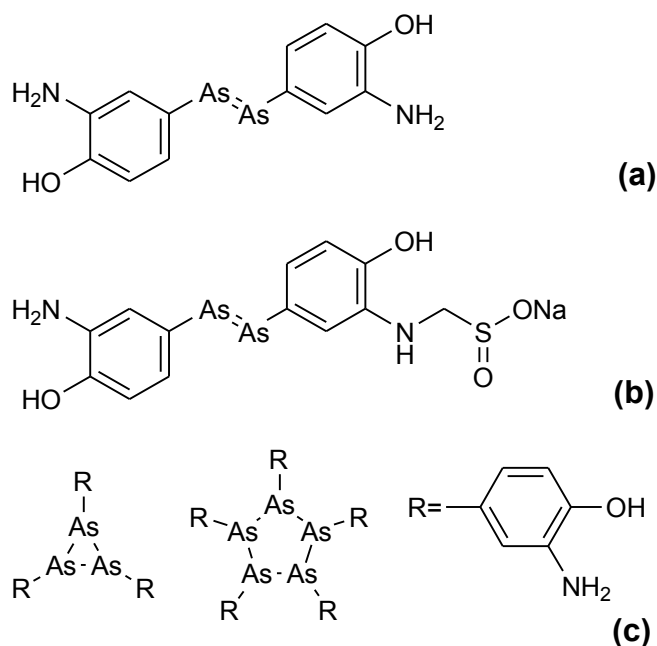
8 Neosalvarsan

Jedním z největších farmaceutických objevů počátku 20. století byl nepochybně salvarsan (známý také jako látka 606 nebo arsfenamin)^{1,2}. Přípravek pro léčbu syfilidy byl svým objevitelem Paulem Ehrlichem nazván „magická střela“, protože zasahoval přímo původce nemoci. Poprvé byl salvarsan podán nemocným v roce 1911. Tato kapitola přináší výsledky analýzy historického vzorku suché injekce derivátu salvarsanu – neosalvarsanu, od jehož přípravy uplynulo v době analýzy 76 let.

8.1 Chemické složení, historie využití

Historie objevu salvarsanu a jeho aplikace byla v literatuře již několikrát popsána³⁻⁵. Struktura salvarsanu ale byla předmětem diskusí téměř po celé století následující po objevu látky^{6,7}. Ehrlich popisoval strukturu salvarsanu jako analogii k azosloučeninám (obr.8.1a). Tato struktura byla později přejímána i literaturou⁸. Nicméně v roce 2005 Lloyd a kol.⁹ analyzovali strukturu salvarsanu pomocí ESI-MS a popsali ji jako směs dvou cyklických struktur (obr. 8.1c).

Ačkoliv byla léčba salvarsanem provázena mnoha nežádoucími účinky, do doby před objevením antibiotik šlo o jedinou účinnou léčbu syfilidy^{3,10}. Problematické bylo samo podání pacientovi. Z chemického hlediska byla nevhodná nízká rozpustnost salvarsanu ve vodě. Rovněž snadná oxidace salvarsanu vedla ke snížení léčivého účinku. Ehrlich se svými spolupracovníky proto připravil derivát, který byl ve vodě snáze rozpustný – neosalvarsan (CASRN 457-60-3, obr. 8.1b). Látka byla připravena kondenzací salvarsanové aminoskupiny s hydroxymethansulfátem sodným, který se jako antioxidant používal v barvířském průmyslu^{10,11}. Neosalvarsan měl sice nižší účinnost než salvarsan, jeho podání pacientům bylo ale snazší a také jeho toxicita byla ve srovnání se salvarsanem nižší. Přípravek byl také stabilnější než salvarsan.



Obr. 8.1 Chemické struktury (a) salvarsanu a (b) neosalvarsanu navržené Ehrlichem analogicky k azosloučeninám⁸ a (c) trimeru nebo pentameru salvarsanu popsaná Lloydem a kol.⁹

8.2 Degradční cesty salvarsanu a neosalvarsanu

Hlavním problémem při používání salvarsanu, resp. neosalvarsanu, byla postupná degradace těchto účinných látek. Masucci¹² studoval stabilitu roztoku salvarsanu, přičemž jej ponechal po dobu čtyř měsíců při teplotě 0 °C v dusíkové atmosféře. Nepozoroval změnu barvy, oxidaci a ani zvýšení toxicity přípravku. Naproti tomu roztoky salvarsanu ponechané v dusíkové atmosféře při pokojové teplotě již po dvou týdnech změnilly barvu ze žluté na červenou. Koncem osmého týdne pak bylo již 10 % salvarsanu oxidováno, přičemž toxicita se velmi zvýšila. Podobně Roth¹³ zjistil, že neosalvarsan snadno degraduje zejména při vyšších teplotách. Degradace neosalvarsanu se projevuje změnou barvy, zvýšením toxicity a zápachem¹⁴. Z těchto důvodů bylo doporučováno uchovávat přípravek jako suchou substanci, která se až těsně před injekčním podáním převedla do roztoku. Probey a Harrison¹⁵ ale uvádějí, že stabilita suchého prášku se snižuje úměrně s rostoucím stářím a vlhkostí. Podle autorů jsou přípravky obsahující méně než 1,5% vlhkost stabilní po dobu 3 let, pokud jsou skladovány při teplotě do 20 °C.

Oxidační produkty salvarsanu byly popsány více autory jako 2-amino-4-arsenosofenol (CASRN 306-12-7)¹⁶⁻¹⁸ nebo As-(3-amino-4-hydroxyfenyl)arseničná kyselina^{19,20}. V publikacích ale chybí přesvědčivé důkazy o vzniku těchto degradačních produktů.

8.3 Popis vzorku

Analyzovaný vzorek historického léčivého přípravku pocházel ze sbírky Českého farmaceutického muzea v Kuksu. Byl vyroben firmou Bayer (Německo) dne 5. září 1942 a podle dochovaného

originálního balení označeného názvem „Neosalvarsan“ (obr. 8.2) je deklarovaný obsah v jedné ampuli 0,45 g účinné látky. Jde o práškovou substanci nažloutlé barvy, která je uzavřena v ampuli z čirého skla. Vzorek byl uchováván na temném místě v originálním balení za pokojové teploty.



Obr. 8.2 Ampule a balení analyzovaného historického preparátu „Neosalvarsan“ vyrobené firmou Bayer (Německo) v roce 1942.

8.4 Výsledky a diskuse

8.4.1 Příprava vzorku

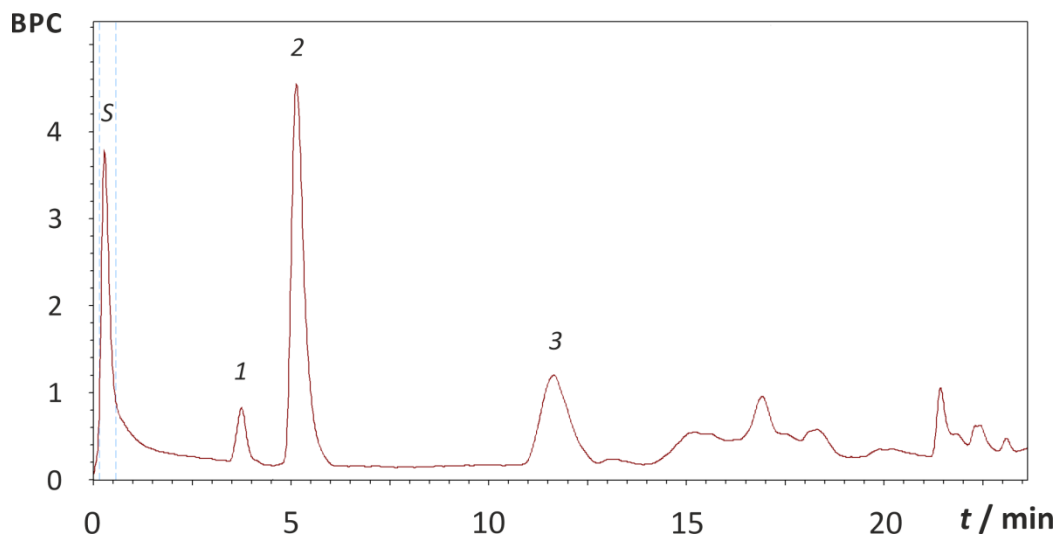
Ampule byla otevřena těsně před analýzou. Navážka 6 mg jejího obsahu byla rozpuštěna ve 25 cm³ methanolu. Roztok vzorku byl dále příslušně ředěn mobilní fází.

8.4.2 Optimalizace HPLC separace

Vzhledem k tomu, že se neosalvarsan již několik desítek let nepoužívá, nebyla popsána žádná separační metoda pro jeho stanovení. V předběžném experimentu byl proto analyzovaný historický vzorek rozpuštěn v methanolu a analyzován hmotnostní spektrometrií přímým nástřikem. Sken proběhl v rozsahu m/z 50–1000. Bylo nalezeno mnoho iontů, ale žádný z nich ani ve stopovém množství neodpovídal molekule neosalvarsanu. Proto byla optimalizována HPLC-MS metoda pro separaci degradačních produktů neosalvarsanu.

Separace byla realizována na koloně XBridge[®] BEH C18 (150×3,0 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters binární gradientovou elucí methanolu (solvent A) a vody (solvent B). Teplota kolony byla nastavena na 40 °C a objem nástřiku vzorku byl 2 mm³, $F = 0,25 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Hmotnostní detekce probíhala v negativním módu ESI při napětí na kapiláře –2,8 kV. Tlak nebulizačního plynu dusíku byl 0,40 bar. Dusík rovněž sloužil jako sušící plyn (4,0 dm³ min⁻¹; 250 °C). Jako hmotnostní kalibrační standard byl použit mravenčan sodný.

Gradientový program byl optimalizován s ohledem na rozlišení píků pravděpodobných degradačních produktů. Optimální gradientový program začíná na 40% podílu methanolu (solvent A), který mezi 2. a 19. minutou vzrůstá na 90% podíl. Tento podíl je udržován po dobu šesti minut. Dosažené rozlišení píků 1 a 2 zobrazených v chromatogramu na obr. 8.3 je dostatečné ($R_{1,2} = 1,51$).



Obr. 8.3 HPLC-MS chromatogram analyzovaného historického přípravku neosalvarsanu (rozpuštěného v methanolu) v ESI⁻ módu. Identifikace jednotlivých píků je uvedena v tabulce 8.1. *S* značí pík hmotnostního kalibračního standardu (mravenčan sodný). Separace proběhla na koloně XBridge[®] BEH C18 (150×3,0 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters, gradientovou elucí methanolu (solvent A) a vody (solvent B). Gradientový program viz text. Teplota kolony byla 40 °C, $F = 0,25 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Objem nástřiku vzorku byl 2 mm³. Hmotnostní detekce proběhla při napětí na kapiláře -2,8 kV. Dusík byl použit jako nebulizační plyn o tlaku 0,40 bar a jako sušící plyn s průtokem 4,0 dm³ min⁻¹ a teplotě 250 °C.

8.4.3 *Aplikace optimalizované metody na historický vzorek*

Jak bylo uvedeno výše (odst. 8.4.2), neosalvarsan nebyl v historickém vzorku identifikován ani ve stopovém množství. Hmotnostní spektrum studovaného vzorku ale obsahuje tři píky (tabulka 8.1), struktura a fragmentace nalezených analytů byla navržena pomocí ESI-MS². Přestože ESI analýzy organoarsenitých látek jsou literaturou popisovány jen vzácně²¹, některé z nalezených produktových iontů jsou blízké iontům, které byly popsány v literatuře.

Tabulka 8.1

Identifikace pík v BPC chromatogramu historického přípravku neosalvarsanu (rozpuštěného v methanolu) v ESI⁻ módu. Všechny ionty jsou [M-H]⁻. Separace proběhla na koloně XBridge[®] BEH C18 (150×3,0 mm, velikost částic 2,5 μm), Waters gradientovou elucí methanolu (solvent A) a vody (solvent B). Gradientový program uveden odst. 8.4.2. Teplota kolony byla 40 °C, $F = 0,25 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Objem nástřiku vzorku byl 2 mm³. Hmotnostní detekce proběhla při napětí na kapiláře -2,8 kV. Dusík byl použit jako nebulizační plyn o tlaku 0,40 bar a jako sušící plyn s průtokem 4,0 dm³ min⁻¹ a teplotě 250 °C.

| píku | t_r/min | sumární vzorec | m/z | | | název, CASRN |
|------|------------------|---|----------------|------------|---------------------|---|
| | | | experimentální | teoretická | Δ/ppm | |
| 1 | 3,78 | C ₇ H ₇ AsNO ₃ | 227,9637 | 227,9647 | -1,1 | 2-(hydroxymethylamino)-4-arsenosofenol, 2379278-92-7 |
| 2 | 5,16 | C ₆ H ₇ AsNO ₃ | 215,9640 | 215,9647 | 3,6 | As-(3-amino-4-hydroxyfenyl)arseničná kyselina, 718604-57-0 |
| 3 | 11,65 | neidentifikováno | 361,1647 | - | - | neidentifikováno |

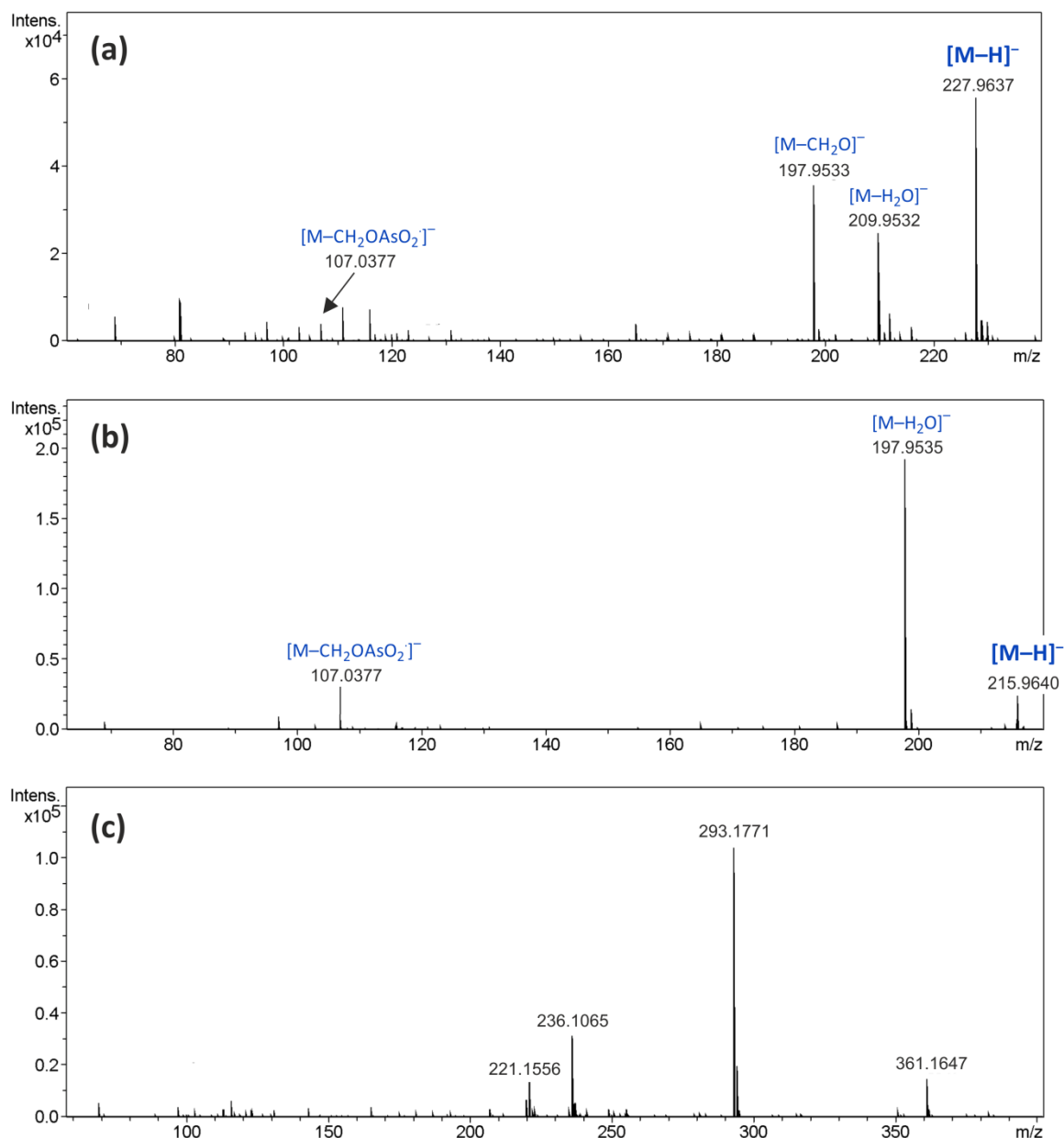
8.4.4 Hmotnostní spektrometrie nalezených analytů

Pík 1 v HPLC-MS chromatogramu (obr. 8.3) byl identifikován jako 2-(hydroxymethylamino)-4-arsenosofenol (CASRN 2379278-92-7). Jeho hmotnostní spektrum je zobrazeno na obr.8.4a a fragmentační schéma je navrženo na obr. 8.5. Odštěpením vody z prekurzorového iontu $m/z = 227,9637$ vzniká produktový ion $m/z = 209,9532$. Tento fragmentační mechanismus je analogicky popsán v literatuře^{22,23}. Následně se eliminuje radikál obsahující atom arsenu, což podobně popisuje literatura²¹. Vznikající radikál anion s $m/z = 107,0377$ je ve shodě s publikacemi autorů Peng a kol.²⁴ a Kirchoff a kol.²⁵.

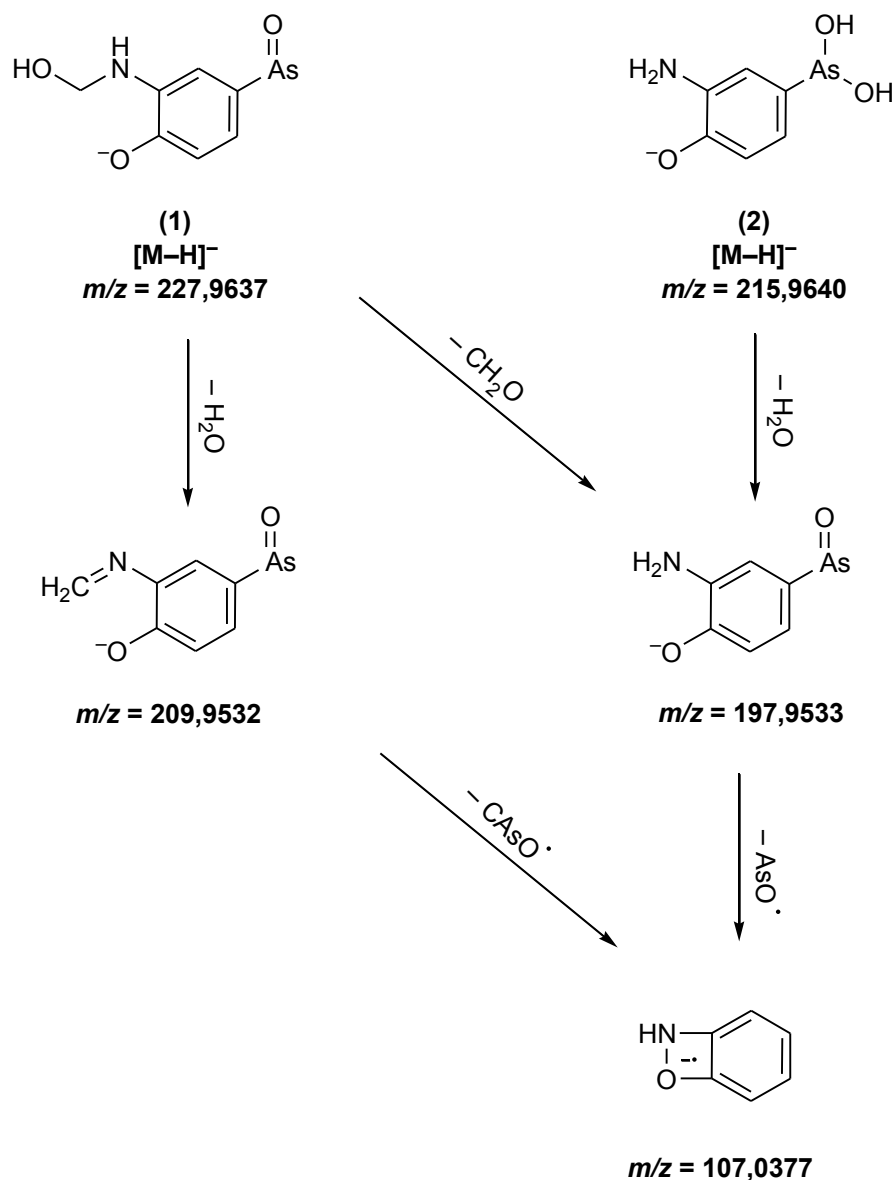
Pík 2 v HPLC-MS chromatogramu (obr. 8.3) byl identifikován jako As-(3-amino-4-hydroxyfenyl)arseničná kyselina (CASRN 718604-57-0). Z naměřeného hmotnostního spektra (obr. 8.4b) je zřejmé, že jde o podobný fragmentační mechanismus, jako byl výše popsán pro 2-(hydroxymethylamino)-4-arsenosofenol. Fragmentační schéma látky je navrženo na obr. 8.5. Z prekurzorového iontu $m/z = 215,9640$ se podobně jako v předchozím případě druhého iontu odštěpuje molekula vody. Vzniká tak produktový ion $m/z = 197,9533$, který rovněž poskytuje výše diskutovaný prekurzorový iont 2-(hydroxymethylamino)-4-arsenosofenolu.

Třetí nalezený píku v HPLC-MS chromatogramu (obr. 8.3) se nepodařilo identifikovat. Jeho naměřené hmotnostní spektrum je uvedeno na obr. 8.4c.

Je zřejmé, že oba identifikované analyty vznikají degradací neosalvarsanu. Druhý identifikovaný produkt (As-(3-amino-4-hydroxyfenyl)arseničná kyselina) koresponduje s oxidačními produkty salvarsanu, které navrhuje literatura^{19,20}.



Obr. 8.4 ESI-MS² spektra produktových iontů (a) 2-(hydroxymethylamino)-4-arsenosofenolu, (b) *As*-(3-amino-4-hydroxyfenyl)arseničné kyseliny a (c) neidentifikovaného analytu nalezeného v píku (3) chromatogramu analyzovaného historického přípravku neosalvarsanu (tabulka 8.1). Ionizace proběhla přinapětí na kapiláře -2,8 kV. Kolizní energie byla 20,0 eV. Dusík byl použit jako nebulizační plyn o tlaku 0,40 bar a jako sušící plyn s průtokem 4,0 dm³ min⁻¹ a teplotě 250 °C.



Obr. 8.5 Návrh ESI-MS² fragmentace $[M-H]^-$ iontů (1) 2-(hydroxymethylamino)-4-arsenosofenolu a (2) *As*-(3-amino-4-hydroxyfenyl)arseničké kyseliny.

8.5 Závěr

Byla vyvinuta HPLC-MS metoda pro separaci degradačních produktů neosalvarsanu. Bylo zjištěno, že účinná látka, neosalvarsan, v historickém injekčním přípravku starém téměř osmdesát let se zcela degradovala. Pomocí ESI-MS² byly identifikovány dva degradační produkty neosalvarsanu, včetně návrhu odpovídajících fragmentačních mechanismů. Jde o první případ historického injekčního přípravku, který se zcela degradoval²⁶. Získané výsledky byly publikovány v práci²⁸ (příloha F).

8.6 Literatura k 8. kapitole

1. Bosch F., Rosich L.: The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: A tribute on the occasion of the centenary of his nobel prize. *Pharmacology* **82** (2008) 171–179.
2. Drews J.: Paul Ehrlich – magister mundi. *Nature Reviews Drug Discovery* **3** (2004) 797–801.
3. Riethmiller S.: From atoxyl to salvarsan: Searching for the magic bullet. *Chemotherapy* **51** (2005) 234–242.
4. Williams K. J.: The introduction of “chemotherapy” using arsphenamine: The first magic bullet. *Journal of the Royal Society of Medicine* **102**, 343–348 (2009).
5. Sneader W.: *Drug Discovery: A History*. Chichester, John Wiley 2005.
6. Levinson A. S.: The structure of salvarsan and the arsenic-arsenic double bond. *Journal of Chemical Education* **54** (1977) 98.
7. Ni Dhubhghaill O. M., Sadler P. J.: The structure and reactivity of arsenic compounds: Biological activity and drug design. *Structure and Bonding* **78** (1991) 129–190.
8. Ehrlich P., Bertheim A.: Über das salzsaure 3.3'- Diamino- 4.4'- dioxy- arsenobenzol und seine nächsten Verwandten. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **45** (1912) 756–766.
9. Lloyd N. C., Morgan H. W., Nicholson B. K., Ronimus R. S.: The composition of Ehrlich's Salvarsan: Resolution of a century-old debate. *Angewandte Chemie – International Edition* **44** (2005) 941–944.
10. Gibaud S., Jaouen G.: Arsenic-based drugs: From Fowler's solution to modern anticancer chemotherapy. In: *Medicinal Organometallic Chemistry*. Jaouen G., Metzler-Nolte N. (Eds.). Berlin, Springer 2010, p. 1–20.
11. Raiziss G. W., Falkov M.: The chemistry of neoarsphenamine and its relation to toxicity. *Journal of Biological Chemistry* **66** (1921) 209–221.
12. Masucci P.: The stability of arsphenamine solution. *American Journal of Pharmacology* **94** (1922) 338–341.
13. Roth G. B.: The deterioration of neo-arsphenamin. *The Journal of the American Medical Association* **78** (1922) 1191–1192.
14. Roth G. B.: Keeping qualities of market samples of neoarsphenamine while in ampule. *Public Health Reports* **36** (1921) 2523–2539.
15. Probey T. F., Harrison W. T.: The effect of moisture and age on stability of neoarsphenamine. *Association of Schools of Public Health* **53** (1939) 939–945.
16. Kraft M. Y., Katyshkina V. V.: Oxidation of arsphenamine and novarsenol by elemental oxygen. *Doklady Akademii Nauk SSSR* **99** (1954) 89–92.
17. Cousin H.: Determination of aminohydroxyphenyl arsenious oxide in arsphenamine. *Journal de Pharmacie et de Chimie* **22** (1920) 390–392. *Chem. Abst.* **15**:7439.
18. Brdička R.: Polarographic studies with the dropping mercury cathode: Part LV. The influence of air on solutions of the salvarsan derivatives. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **7** (1935) 457–466.
19. Kober P. A.: The preparation of arsphenamine (Salvarsan). *The Journal of the American Medical Association* **41** (1919) 422–451.
20. Kraft M. Y., Batshchouk I. A.: Reaction of salvarsan with sulfurous acid. *Doklady Akademii Nauk SSSR* **55** (1947) 723–725.
21. McKnight-Whitford A., Le X. C.: Electrospray mass spectrometry of arsenic compounds and thiol-arsenic complexes. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Meyers R. A. (Ed.). New York, Wiley 2011.
22. Wershaw R. L., Rutherford D. W., Rostad C. E., Garbarino J. R., Ferrer I., Kennedy K. R., Momplaisir G. M., Grange A.: Mass spectrometric identification of an azobenzene derivative produced by smectite-catalyzed conversion of 3-amino-4-hydroxyphenylarsonic acid. *Talanta* **59** (2003) 1219–1226.
23. Florêncio M. H., Duarte M. F., de Bettencourt A. M. M., Gomes M. L., Vilas Boas L. F.: Electrospray mass spectra of arsenic compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **11** (1997) 469–473.
24. Peng H., Hu B., Liu Q., Li J., Li X. F., Zhang H., Le X. C.: Methylated phenylarsenical metabolites discovered in chicken liver. *Angewandte Chemie – International Edition* **56** (2017) 6773–6777.

25. Kirchoff D., Grützmacher H. F., Grützmacher H.: Isomerization and fragmentation reactions of gaseous dimethyl phenylarsane radical cations and methyl phenylarsenium cations. A study by tandem mass spectrometry and density functional theory calculations. *European Journal of Mass Spectrometry* **12** (2006) 171–180.
26. Zilker M., Sörgel F., Holzgrabe U.: A systematic review of the stability of finished pharmaceutical products and drug substances beyond their labeled expiry dates. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **166** (2019) 222–235.
27. Kudláček K., Nesměrác K., Štícha M., Kozlík P., Babica J.: Degradation of ouabain in 80-year-old injection solution studied by HILIC–MS. *Monatshefte für Chemie–Chemical Monthly* **149** (2018) 1555–1560.
28. Nesměrác K., Kudláček K., Štícha M., Kozlík P., Babica J.: HPLC–MS/MS analysis of degradation products of neosalvarsan in a 76-year-old injection preparation. *Monatshefte für Chemie–Chemical Monthly* **150** (2019) 1611–1615.

9 Analýza historických pozůstatků mastí

Masti jsou z chemického hlediska velmi komplexními léčivými přípravky. Vedle účinných látek obsahují také významný podíl masťového základu nejčastěji lipidové povahy. K pochopení původního zamýšleného účelu historických pozůstatků mastí je proto důležité identifikovat nejen účinné látky, ale také složení masťového základu. K řešení tohoto úkolu je zapotřebí použití více analytických metod, jde proto o tzv. multianalytický přístup.

V této kapitole jsou prezentovány výsledky v celkem třech oblastech: (1) srovnávací analýzy čerstvých referenčních lipidových materiálů a vytvoření jejich triacylglycerolových profilů, (2) analýzy šesti vzorků historických pozůstatků mastí z 18. století, a konečně (3) analýzy šesti vzorků historických pozůstatků mastí z doby první poloviny 20. století.

9.1 Chemické složení mastí

Masti jsou polotuhé léčivé přípravky s převážně lokálním účinkem, určené k aplikaci na kůži, popřípadě na sliznice. Při teplotě těla tyto léčivé přípravky obvykle měknou a lze je snáze roztírat na určené místo. Jsou tvořeny masťovým základem a jednou nebo více účinnými látkami, které jsou v tomto základu rozpuštěny, emulgovány či suspendovány^{1,2}. Masti mohou obsahovat také další pomocné látky. Příkladem jsou korigens, tedy látky upravující estetické vlastnosti přípravku, jako třeba vůni upravující silice, kafr či menthol¹.

Masti lze rozdělit podle mísitelnosti masťového základu s vodou na hydrofobní, vodu emulgující a hydrofilní. Základem hydrofobních mastí bývá nejčastěji bílá nebo žlutá vazelína případně vepřové sádlo. Emulgující masti, schopné pojmout až 10 % vody, obsahují vhodné emulgátory jako například tuk z ovčí vlny (lanolin), cholesterol nebo mastné alkoholy. Základem hydrofilních mastí jsou polyethylenglykoly. Zvláštním případem polotuhých přípravků jsou pasty, které obsahují alespoň 25% podíl suspendovaných pevných látek. Umožňují pomalejší uvolňování účinné látky².

Jiným rozdělením mastí je třídění podle zamýšleného účelu přípravku. Resorpční přípravky usnadňují pronikání účinné látky do kůže, naopak krycí přípravky chrání místo před vzduchem. Chladivé masti obsahují více vody, vysušující masti odnímají vlhkost z poraněné tkáně. Dráždivé masti mají specifický účinek, který závisí na složení přípravku¹.

Masti připravované v 18. století podle lékopisů, které se v našich zemích v té době používaly, obsahovaly jako masťový základ oleje, tuky a vosky³. Tukové základy byly nejčastěji živočišného původu, především se jednalo o vepřové sádlo, ale dobové předpisy udávají také sádla jiných živočišných druhů, dokonce i sádlo lidské. Dále bylo běžné použití másla, žluči, loje nebo morku. Vosky se používaly v kombinaci s oleji. Vedle mastí byly oleje používány také samostatně.

Připravovaly se různými postupy. Vařené složené oleje obsahovaly zejména olivový olej, ve kterém se vařily byliny. Oleje se získávaly destilací (jako silice) nebo lisováním semen například broskví, ořechů, blínu, lnu, sezamu či hořčice. Masti z 18. století obsahovaly anorganické i organické přísady. Z anorganických šlo například o oxid a uhličitán olovnatý, oxid zinečnatý, dusičnan draselný, síru, rtuť, sůl a drahokamy. Organické přísady mohly být původu živočišného (např. korály, perleťovina, živí raci) nebo rostlinného (čerstvé rostliny a výluhy drogy do vína, vody nebo tuku)³.

Masťové základy používané před druhou světovou válkou (z tohoto období pochází druhá část studovaných vzorků) popisují Rektořík a Bílek¹ jako různé živočišné tuky, rostlinné oleje, vazelínu, ceresin, glycerin, vosky, pryskyřice či vorvaňovinu (tuk z lebeční dutiny vorvaně). Autoři dále popisují vlastnosti nejčastěji používaných základů. Vepřové sádlo (*Adeps suillus*, *Axungia porci*) se připravuje škvařením vepřového tuku. Vepřové sádlo taje při teplotě 36 až 44 °C, pojme až 19 % vody a poměrně rychle žlukne, čemuž lze zabránit přidávkem pryskyřice benzoe. Lanolin je tuk z ovčí vlny (*Adeps lanae*). Taje při 40 °C a pojme více vody než vepřové sádlo. Bílá a žlutá vazelína (*Vaselineum album*, *Vaselineum flavum*) je čištěná směs polotuhých nasycených uhlovodíků získaných z nafty. Taje při teplotě 35 až 45 °C, nejméně dráždí kůži, ale pojme maximálně 10 % vody. Vedle rostlinných extraktů obsahovaly masti vyráběné v polovině 20. století také čisté chemické sloučeniny, jako třeba jodid draselný nebo hydrochlorid benzoylmethylekgoninu (kokainu)¹.

9.2 Degradace masťových základů

Degradace masťových základů má vedle degradace účinných látek vliv na léčivý účinek přípravku. Především dochází ke žluknutí lipidů, což může vést při aplikaci například k nežádoucímu podráždění pokožky^{1,2}. Oxidací vznikají nejprve peroxidy a později se molekuly štěpí za vzniku nižších aldehydů, které způsobují charakteristický zápach⁴.

Saliu a kol.⁵ provedli stresové experimenty novodobých vzorků olejů (palmový, mandlový a olivový), vepřového sádla a mastí, které byly připraveny podle historických předpisů. Stresové experimenty probíhaly v prostředí zvýšené teploty, oxidačního vlivu ozonu, enzymatického štěpení a alkalické hydrolýzy. Při stresovém experimentu s olivovým olejem dochází vlivem tepla a ozonu ke snížení podílu tří triacylglycerolů s nenasycenými mastnými kyselinami: dilinoleoyloleoylglycerolu, linoleoyldioleoylglycerolu a dilinoleoylpalmitoylglycerolu. Podobné chování bylo pozorováno u vepřového sádla. V souladu s literaturou⁶ je ale vepřové sádlo méně náchylné oxidační degradaci, protože oproti olejům je v polotuhém stavu a kontakt s ozonem při stresování je omezený. Vepřové sádlo proto degraduje pomaleji než oleje. Pokles podílu triacylglycerolů s nenasycenými mastnými kyselinami je při ozonové oxidaci způsoben patrně tvorbou ozonidových dimerů a trimerů⁷, které nejsou metodou HPLC-MS detegovatelné⁵. Při enzymatické a alkalické hydrolýze dochází ke zvýšení podílu diacylglycerolů a monoacylglycerolů. Dochází také k nárůstu nasycených triacylglycerolů, jako jsou tripalmitoylglycerol, dipalmitoylstearyl-glycerol a distearoylpalmitoylglycerol. Satureované triacylglyceroly se totiž pravděpodobně vlivem rozdílné rozpustnosti a polaritativy méně hydrolyzují⁵. Autoři rovněž zjistili, že během přípravy historických mastí podle dobových předpisů nedochází ke kvalitativním změnám v zastoupení triacylglycerolů. Na degradaci se nepodílejí ani jednotlivé

ingredience. Triacylglycerolový profil laboratorně připravených mastí se ozonovým stresováním příliš nemění. Některé ingredience mohou mít antioxidační účinek a brání tak oxidaci triacylglycerolů⁵.

Produkty oxidace triacylglycerolů popísali Neff a kol.⁸ a Winkler-Moser a kol.⁹ Při RP-HPLC separaci na koloně Inertsil ODS-2 (250×4,6 mm; velikost částic 5 μm; L Sciences, Keystone Scientific, USA) za použití gradientové eluce acetonitrilu a dichlormethanu eluují oxidační produkty díky své polaritě dříve než původní neoxidované triacylglyceroly⁸. Oxidační produkty také poskytují v chromatogramu velmi malé signály, protože se vlivem své polaritě zvolenou metodou extrahují méně. Tím je zajištěno, že nedojde k interferencím s neoxidovanými triacylglyceroly⁵.

9.3 Metody analýzy pozůstatků historických mastí

Masti obsahují z chemického hlediska více komponent: účinné, případně i pomocné látky a mast'ový základ. Je proto zapotřebí zvolit vhodný analytický přístup, který poskytne informace o jednotlivých složkách analyzovaného vzorku. Z takových dat pak lze odvodit původ a původní zamýšlené použití historického pozůstatku mastí. Vhodným přístupem je i analýza referenčních materiálů. Pokud je dostupný historický předpis, lze s výhodou porovnat složení historického pozůstatku s novodobě připravenou mastí. V literatuře je popsáno několik takových multianalytických postupů, které jsou podrobněji diskutovány výše, v odst. 2.1.4.2.

Následuje popis analytických metod, které byly v této práci zvoleny pro ověření pravosti mastí v případě znalosti historických předpisů (vzorky mastí z 18. století) nebo které poskytují detailní informace o vzorcích, jejichž složení není známo (vzorky mastí z 20. století).

9.3.1 Metoda GC-MS screeningu

Základním principem tohoto přístupu je provedení saponifikace vzorku a následně jsou vhodným činidlem derivatizovány molekuly s karboxylovou a alkoholovou funkční skupinou. Po separaci analytů plynovou chromatografií jsou hmotnostní spektrometrií detegovány zejména ionty charakteristické pro produkty derivatizačních reakcí. Metodou lze určit, zda vzorek obsahuje lipidovou, resp. voskovou, složku. Podle charakteristických markerů lze rovněž odhalit přítomnost pryskyřic a případně i vybraných účinných látek. Metodou GC-MS screeningu lze tedy odhadnout chemickou povahu vzorku a podle získaných výsledků se zaměřit na vybranou skupinu analytů dalšími technikami.

Přítomnost mastných kyselin poukazuje na přítomnost lipidů, resp. vosků. Pro vosky jsou typické nasycené alkany o počtu 13–39 atomů uhlíku^{8,9}, které lze analyzovat i bez předchozí derivatizace. Mastné alkoholy se sudým počtem uhlíků (v rozmezí počtu 24–36 atomů) jsou charakteristické pro včelí vosk¹⁰. Podobně jsou pro včelí vosk specifickými markery 14-hydroxypalmitová a 15-hydroxypalmitová kyselina^{11,12}.

Na základě charakteristických markerů lze touto metodou identifikovat i pryskyřice. Colombini a kol.¹³ popsali oxidační produkty abietové kyseliny v nátěrech starověkých amfor, které byly provedeny borovicovou pryskyřicí z rostlin čeledi *Pinaceae* (borovicovité). Čeď *Pinaceae*

charakterizují deriváty abietadienových kyselin¹⁴ adehydroabietová, 7-oxo-dehydroabietová, 15-hydroxy-7-oxo-dehydroabietová a 15-hydroxydehydroabietová kyselina^{15–17}. Podobně v jiné práci Colombini a kol.¹⁸ identifikovali v kyselém extraktu vzorku starověké masti několik triterpenoidů a diterpenoidů, mezi nimi i dehydroabietovou a 7-oxo-dehydroabietovou kyselinu. Deriváty pimaradienových kyselin jsou typické pro pryskyřice *Pinaceae* a *Cupressaceae* (cypřišovitě).

Steroly jsou obsaženy v živočišných i rostlinných materiálech, a proto lze na základě jejich identifikace snáze určit povahu studovaného materiálu. Zatímco cholesterol převažuje v živočišných tucích, kampesterol a sitosterol převažují v rostlinných olejích¹⁹.

Metodou GC-MS screeningu lze dále identifikovat i některé účinné látky, které reagují s použitým derivatizačním činidlem. Příkladem může být salicylová kyselina.

9.3.2 Analýza těkavých komponent metodou SPME-GC-MS

Výsledky analýzy těkavých organických látek po předchozí extrakci na tuhou fázi doplňují informace získané metodou GC-MS screeningu. Kromě informací o masťovém základu tato kombinace metod poskytuje informace o těkavých organických účinných a pomocných látkách.

Analýzou včelího vosku z muzejních sbírek se zabývali Lattuati-Derieux a kol.²⁰. Pomocí mikroextrakce na tuhou fázi charakterizují včelí vosk skrze *n*-alkany s lichým počtem uhlíků v rozmezí 25–33 atomů s největším zastoupením *n*-heptakosanu (27 atomů uhlíku). Jako charakteristický analyt autoři také označují tetrakosanovou mastnou kyselinu (24 atomů uhlíku). Dále popisují benzen a deriváty skořicové kyseliny jako markery včelího vosku. Přestože autoři popisují aldehydy *n*-hexanal, *n*-heptanal, *n*-nonanal a *n*-furfural jako charakteristické pro včelí vosk, nemusí jít o specifické markery. Jak ukázali Schmitu a Tschickardt²¹, první tři jmenované lineární aldehydy nemusí pocházet pouze z vosku, protože jsou běžně přítomné v ovzduší. Lattuati-Derieux a kol.²⁰ dále zmiňují deriváty dehydroabietové a pimarové kyseliny indikující přítomnost borových pryskyřic.

Studium pryskyřic metodou SPME-GC-MS v historických vzorcích je popsáno v literatuře^{22,23}. Limonen je obsažen v mnoha pryskyřicích (např. v čeledi *Pinaceae*, nebo v kadidlu). Terpenický α -pinen je především součástí pryskyřice mastix, nalezen byl ale také v kadidlu. Podobně pak α -terpineol je součástí pryskyřic kadidla a labdanum. Copaen je přítomen v pryskyřicích kadidla a galbanum.²²

Použitím SPME-GC-MS pro analýzu olejů se zabývali Jeleń a kol.²⁴ a van Ruth a kol.²⁵. Jako produkty oxidace autoři uvádějí zejména alifatické aldehydy (např. *n*-hexanal, hex-2-enal, *n*-heptanal, hept-2-enal, *n*-nonanal), dále pak také ketony, alkoholy nebo furanony. Jak bylo ale uvedeno výše, *n*-hexanal, *n*-heptanal a *n*-nonanal jsou obsaženy v ovzduší a nelze jejich identifikaci dokázat přítomnost olejů.

Mikroextrakce následovaná plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí je využívána také při studiu stability léčivých látek²⁶. Metodu lze použít při identifikaci účinných látek ve vzorcích různé povahy. Strano-Rossi a kol.²⁷ se zabývali stanovením mnoha stimulantů a narkotik v moči, mezi nimi byl metodou headspace SPME-GC-MS identifikován a stanoven benzokain.

9.3.3 Charakterizace triacylglycerolů metodou RP-HPLC-MS²

Metoda RP-HPLC s tandemovou hmotnostní detekcí je vhodná pro identifikaci a kvantifikaci triacylglycerolů, charakteristických sloučenin pro lipidy. Včelí vosky, které neobsahují žádné triacylglyceroly nelze touto metodou identifikovat⁵. Podle triacylglycerolového profilu je tedy možné určit původ lipidové složky vzorku. Metodou ale nelze rozlišit jednotlivé izomery triacylglycerolů. Pořadí mastných kyselin ve vzorci daného triacylglycerolu je proto dále uváděno podle abecedy. Vzhledem k dlouhým názvům jednotlivých triacylglycerolů jsou kromě názvu dále v textu zároveň užívány tří- až šestipísmenné zkratky založené na použití zkratk pro jednotlivé mastné kyseliny (tabulka 9.1). Potom například oleoyldipalmitoylglycerolu přísluší zkratka OPP.

Tabulka 9.1

Zkratky mastných kyselin užívané pro označení mastných kyselin v názvech triacylglycerolů.

| zkratka | název | vzorec | | CASRN |
|---------|-------------------------------|--|--|-----------|
| | | funkční | sumární | |
| A | arachidová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$ | $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_2$ | 506-30-9 |
| B | behenová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$ | $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{O}_2$ | 112-85-6 |
| C | cerotová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{24}\text{COOH}$ | $\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{O}_2$ | 506-46-7 |
| Ca | kaprinová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$ | $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$ | 334-48-5 |
| Cy | kaprylová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$ | $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2$ | 124-07-2 |
| E | eikosatrienová kyselina | <i>dvojná vazba nelokalizována</i> | $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$ | – |
| G | gondoová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$ | $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_2$ | 5561-99-9 |
| H | heneikosylová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{19}\text{COOH}$ | $\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{O}_2$ | 2363-71-5 |
| L | linolová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ | $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$ | 60-33-3 |
| La | laurová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$ | $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$ | 143-07-7 |
| Li | lignocerová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$ | $\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}_2$ | 557-59-5 |
| Ln | γ -linolenová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ | $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$ | 506-26-3 |
| M | myristová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$ | $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$ | 544-63-8 |
| Ma | margarová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$ | $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$ | 506-12-7 |
| Mo | myristolejová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ | $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_2$ | 544-64-9 |
| Mm | heptadecenylová kyselina | <i>dvojná vazba nelokalizována</i> | $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_2$ | – |
| N | nonadecylová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{17}\text{COOH}$ | $\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_2$ | 646-30-0 |
| O | olejová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ | $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ | 112-80-1 |
| P | palmitová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ | $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$ | 57-10-3 |
| Pa | pentadecylová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$ | $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}_2$ | 1002-84-2 |
| Po | palmitolejová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ | $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_2$ | 373-49-9 |
| Pp | pentadecenylová kyselina | <i>dvojná vazba nelokalizována</i> | $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{O}_2$ | – |
| Rn | ricinolejová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_5(\text{CHOH})(\text{CH}_2)\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ | $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_3$ | 141-22-0 |
| S | stearová kyselina | $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ | $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$ | 57-11-4 |

Podle stupně nenasycenosti mastných kyselin, které jsou součástí triacylglycerolů, lze lipidy rozlišit na rostlinné a živočišné. Rostlinné oleje obsahují vysoký podíl nenasycených mastných kyselin²⁸. Charakteristický je například trilinoleoylglycerol (LLL)^{28–30}. Výjimkou je olivový olej, který obsahuje namísto trilinoleoylglycerolu (LLL) velký podíl trioleoylglycerolu (OOO)^{5,29}.

Saliu a kol.⁵ popisují rozdíly v zastoupení triacylglycerolů v olivovém, mandlovém a palmovém oleji a ve vepřovém sádle. Trioleoylglycerol (OOO) našli také v mandlovém oleji, který ale oproti olivovému obsahuje trilinoleoylglycerol (LLL) v nezanedbatelném množství. Palmový olej obsahuje méně trioleoylglycerolu (OOO), protože většina olejové kyseliny je vázána v dioleoylpalmitoyl-

glycerolu (OOP), nebo dipalmitoylstearyl glycerolu (OPP). V palmovém oleji je pak nejvíce zastoupen tripalmitoyl glycerol (PPP).

Složení triacylglycerolů v živočišném tuku je oproti rostlinnému poněkud odlišné. Triacylglyceroly se skládají především z nasycených mastných kyselin. Podle Craiga a kol.³¹ jsou pro živočišné lipidy charakteristické myristoyldipalmitoyl glycerol (MPP) a palmitoyldistearoyl glycerol (PSS). Lze je proto považovat za markery živočišného tuku. Tristearoyl glycerol (SSS) lze najít ve všech tucích přežvýkavců, zejména pak v ovčím tuku, je tato látka ve vysokých koncentracích³²⁻³⁴. Naopak ve velmi malých koncentracích je tristearoyl glycerol (SSS) přítomen v tuku nepřežvýkavců a nevyskytuje se vůbec ve vepřovém sádle^{32,34}. Vepřové sádlo obsahuje specifický arachidoylpalmitoylstearyl glycerol (APS)³¹ a zároveň obsahuje oproti jiným živočišným tukům zanedbatelné množství myristoylpalmitoylstearyl glycerolu (MPS) a myristoylstearyl palmitoyl glycerolu (MOP)^{31,32,34,35}. Vepřové sádlo dále obsahuje vysoký podíl dioleoylpalmitoyl glycerolu (OOP), oleoylpalmitoylstearyl glycerolu (OPS) a palmitoyldistearoyl glycerolu (PSS)⁵. Charakteristický triacylglycerol pro tuk přežvýkavců je podle literatury³¹ margaroyldistearoyl glycerol (MaSS).

Tuk přežvýkavců lze také identifikovat na základě podílu v triacylglycerolech vázaných kyselin palmitové a stearové. Pro tuk přežvýkavců byl určen podíl palmitylu a stearylů 60:40, zatímco u nepřežvýkavců je poměr blízký 95:5 (cit.³¹).

Souhrnně podává charakteristické triacylglyceroly v jednotlivých druzích lipidů podle jejich původu tabulka 9.2.

Tabulka 9.2

Charakteristické zastoupení triacylglycerolů v lipidech různého původu (podle literatury^{5,28-34}).

| lipidy | zástupce | charakteristické triacylglyceroly (zkratka) |
|-----------|-------------------|--|
| rostlinné | oleje | |
| | – mandlový | trioleoyl glycerol (OOO) trilinoleoyl glycerol (LLL) |
| | – olivový | trioleoyl glycerol (OOO) |
| | – palmový | tripalmitoyl glycerol (PPP) dioleoylpalmitoyl glycerol (OOP) oleoyldipalmitoyl glycerol (OPP) |
| | | |
| živočišné | obecně | myristoyldipalmitoyl glycerol (MPP) palmitoyldistearoyl glycerol (PSS) |
| | tuk přežvýkavců | tristearoyl glycerol (SSS) margaroyldistearoyl glycerol (MaSS) |
| | tuk nepřežvýkavců | |
| | – vepřové sádlo | arachidoylpalmitoylstearyl glycerol (APS) dioleoylpalmitoyl glycerol (OOP) oleoylpalmitoylstearyl glycerol (OPS) palmitoyldistearoyl glycerol (PSS) |

9.3.4 Charakterizace metodou FIA-MS

Studiem včelího vosku metodou FIA-MS se zabývali La Nasa a kol.¹² Hmotnostní spektrum vzorku včelího vosku je velmi komplexní, obsahuje čtyři skupiny (clustery) signálů, které jsou pro včelí vosk charakteristické. První skupina v rozsahu m/z 600–750 byla autory identifikována jako monoesterypalmitové kyseliny s mastnými alkoholy. Druhá skupina v rozsahu m/z 850–1000 zahrnuje diestery palmitové a 15-hydroxypalmitové kyseliny s mastnými alkoholy. Třetí a čtvrtá skupina v rozsahu m/z 1100–1300, resp. 1350–1500, náleží triesterům, resp. tetraesterům palmitové a 15-hydroxypalmitové kyseliny s mastnými mono- a dialkoholy. Metoda FIA-MS je proto vhodná pro důkaz přítomnosti včelího vosku a doplňuje tak informace získané dalšími analytickými metodami.

9.3.5 Stanovení účinných látek mastí metodou HPLC-UV

Podle výsledků metod především GC-MS screeningu a SPME-GC-MS lze v řadě případů odhadnout, jaké účinné látky vzorek historického pozůstatku mastí obsahuje. Množství účinných látek se pak obvykle stanovuje pomocí HPLC-UV kalibrační metodou vnějšího standardu, protože tato metoda poskytuje preciznější výsledky než metody s hmotnostní detekcí.

9.4 Analyzované vzorky a materiály

Vzorky historických pozůstatků mastí analyzovaných v této práci lze rozdělit podle jejich stáří na dvě skupiny. Masti první skupiny vzorků byly vyrobeny v 18. století pro potřeby někdejší lékárny kapucínského kláštera v Praze na Hradčanech³⁶. Jde o šest historických pozůstatků mastí, které se dochovaly v originálních stojátkách opatřených signaturami. Podle dobových názvů bylo v *Dispensatorium pharmaceuticum Austriaco-Viennense* z roku 1729 (cit.³⁷), které bylo v uvedené lékárně používáno, dohledáno složení těchto přípravků. Případně bylo k určení složení přípravků použito *Dispensatorium medico-pharmaceuticum Pragense* z roku 1739 (cit.³⁸) nebo *Dispensatorium pharmaceuticum universale* z roku 1764 (cit.³⁹). V předpisech jsou užívány dobové lékárnické váhové jednotky⁴⁰, jejichž vztah k dnes používaným jednotkám je přibližně následující: 1 libra = 420 g, 1 unce = 35,0 g, 1 drachma = 4,4 g, 1 skrupl = 1,5 g, 1 grán = 0,073 g.

Druhá skupina vzorků pochází z lékárny U zlaté koruny v Ostravě⁴¹. Pět mastí a jedna pasta byly připraveny v první polovině 20. století. Dochovaly se v originálních porcelánových kelímcích včetně některých signatur. Názvy přípravků jsou ale příliš obecné a není tak možné určit složení na základě údajů z literatury.

Konečně byly pro srovnání podrobeny analýze i novodobé lipidové materiály používané jako masťové základy.

9.4.1 Vzorky historických pozůstatků mastí z 18. století

Analyzované vzorky historických pozůstatků mastí z 18. století pochází ze sbírek Národního muzea v Praze. V dalším textu jsou jednotlivé vzorky označovány svým inventárním sbírkovým číslem. Vzorky byly odebírány v červnu 2017 z původních barokních stojatek pomocí skleněné lžice nebo špachtle (vždy tři vzorky: jeden ze středu a dva z protilehlých krajů při stěnách nádoby). Odebrané vzorky byly uchovávány v temnu ve skleněných vzorkovnicích. Analýza vzorků byla provedena na jaře 2019.

Vzorek H2-4943 byl odebrán z původní stojatky vyrobené z mléčného skla ve tvaru pohárku o výšce 12,0 cm a průměru 5,5 cm, opatřené signaturou „Ung: De Apio“ a uzavřené dobovým koženým víčkem (obr. 9.1). Podle signatury lze vzorek identifikovat jako celerovou mast, dobový předpis a jeho překlad je uveden na obr. 9.1.



(a)

Unguentum ex Apio.
Dispens. Lond.
 ℞. Succī Apīi, *libram unam.*
 Mellis, *uncias novem.*
 Farinæ Tritici, *uncias tres.*
 Ex coctis, ad justam Spissitudi-
 nem, Fiat lege Artis, Unguentum. (b)

Mast z celeru

Podle Londýnského dispensatoria

Vezmi šťávy z miříku celeru (*Apium graveolens*) 1 libru (50,0 %),
 medu 9 uncí (37,5 %),
 pšeničné mouky 3 unce (12,5 %).

Vařením se upraví hustota tak, aby podle lékárnického umění vznikla mast.

(c)

Obr. 9.1 (a) Barokní stojatka „Ung: De Apio“ z 18. století (Národní muzeum, inv. č. H2-4943), (b) dobový předpis na mast z celeru podle *Dispensatorium pharmaceuticum universale* z roku 1764 a (c) jeho překlad do češtiny (v závorkách uvedeno procentuální zastoupení jednotlivých ingrediencí ve výsledné masti).

Vzorek H2-4946 byl odebrán z původní stojatky vyrobené z mléčného skla ve tvaru pohárku o výšce 12,0 cm a průměru 5,5 cm, opatřené signaturou „Ung: Pomat:“ (obr. 9.2) a uzavřené dobovým koženým víčkem. Podle signatury lze vzorek identifikovat jako mast z plodů, dobový předpis a jeho překlad je uveden na obr. 9.2.



(a)

UNGUENTUM POMATUM.

℞. Axungia porcina recentis cum pomis citri & aurantiorum ana duobus, & pomis porffensibus quatuor ad humiditatis consumptionem cocta & colata libras tres,

Olei destillati benzoes Cinnamomi Styracis ana guttas decem,

Caryophyllorum Ligni rhodii ana guttas viginti,

Misceantur, ut unguentum inde fiat.

(b)

MAST Z PLODŮ

Vezmi čerstvého vepřového sádla vařeného s plodem citrónovníku (*Citrus limon*) a plodem pomerančovníku (*Citrus sinensis*), každého po dvou kusech, a čtyřmi borsdorfskými jablky (*Malus domestica*) až k odstranění vlhkosti a následně scezeného celkem tři libry, destilovaného oleje pryskyřice benzoe (genus *Styrax*), destilovaného skořicového oleje (*Cinnamomum verum*), destilovaného styraxového oleje (*Styrax platanifolius*), každého deset kapek, destilovaného hřebíčkového oleje (*Eugenia caryophyllata*), destilovaného rozchodnicového oleje (*Rhodiola rosea*), každého dvacet kapek, a vše se smísí, aby z toho vznikla mast.

(c)

Obr. 9.2 (a) Barokní stojatka „Ung: Pomat:“ z 18. století (Národní muzeum, inv. č. H2-4946), (b) dobový předpis na mast z plodů podle *Dispensatorium pharmaceuticum Austriaco-Viennense* z roku 1729 a (c) jeho překlad do češtiny.

Vzorek H2-4948 byl odebrán z původní stojatky vyrobené z mléčného skla ve tvaru pohárku o výšce 12,0 cm a průměru 5,5 cm, opatřené signaturou „Ung: Rosat:“ (obr. 9.3) a uzavřené dobovým koženým víčkem. Podle signatury lze vzorek identifikovat jako jednoduchou růžovou mast, dobový předpis a jeho překlad je uveden na obr. 9.3.



(a)

UNGUENTUM ROSATUM SIMPLEX.

℞. Axungia porcina libras duas, Lavetur sepius aqua rosarum, donec albiſſima & bene odorata fuerit; possunt etiam pro libitu in fine aliquot guttae olei ligni rhodii addi.

(b)

JEDNODUCHÁ RŮŽOVÁ MAST

Vezmi vepřového sádla dvě libry, promývej ho opakovaně růžovou vodou dokud není vybělené a dobře provoněné; můžeš, pokud chceš, nakonec přidat několik kapek rozchodnicového oleje (*Rhodiola rosea*).

(c)

Obr. 9.3 (a) Barokní stojatka „Ung: Rosat:“ z 18. století (Národní muzeum, inv. č. H2-4948), (b) dobový předpis na jednoduchou růžovou mast podle *Dispensatorium pharmaceuticum Austriaco-Viennense* z roku 1729 a (c) jeho překlad do češtiny.

Vzorek H2-4949 byl odebrán z původní stojatky vyrobené z mléčného skla ve tvaru pohárku o výšce 12,0 cm a průměru 5,5 cm, opatřené signaturou „Ung: Popul:“ (obr. 9.4) a uzavřené dobovým koženým víčkem. Podle signatury lze vzorek identifikovat jako mast z topolových pupenů, dobový předpis a jeho překlad je uveden na obr. 9.4.



(a)

UNGUENTUM POPU- LEUM.

ꝛ. Oculorum populi arboris re-
centium libram unam
femis,
Axungia porcinae libras sex,
Oculi populi contundantur, & ma-
cerentur in axungia tam diu, do-
nec sequentes herbae per æstatem
recentes colligi possint, scilicet:
Foliorum hyoscyami uncia sex,
Papaveris albi
Solani
Sempervivi majoris
Minoris
Lactuca
Bardana
Violaria
Umbilici veneris
Cymarum rubi tenerrimarum
ana uncia tres,
Herbae contusa miscantur oculis
populi, & axungia, dein coquan-
tur lento igne ad humiditatis con-
sumptionem, colentur, & expri-
mantur, ut unguentum fiat.

(b)

MAST Z TOPOLOVÝCH PUPENŮ

Vezmi čerstvých pupenů topolového stromu (*Populus nigra*) 1,5 libry (14,6 %), vepřového sádla 6 liber (58,5 %), topolové pupeny rozetři a maceruj v sádle tak dlouho, dokud nemáš k dispozici následující rostliny, čerstvě sebrané v podzimním čase:

listů blínu (*Hyoscyamus niger*) 6 uncí (4,9 %),

listů bílého máku (*Arctomecon merriamii*),

listů lilku (*Solanum nigrum*),

listů netřesku většího (*Sempervivum*),

listů netřesku menšího (*Sempervivum arachnoideum*),

listů lociky (*Lactuca serriola*),

listů lopuchu (*Arctium lappa*),

listů violky (*Viola odorata*),

listů pupence (*Umbilicus rupestris*)

plodů ostružníku (*Rubus*), každého 3 unce (2,4 %)

Rozetřené rostliny smíchej s topolovými pupeny a sádlem, pak vař nad mírným ohněm k odstranění vlhkosti, zced' a propasíruj, abys získal mast.

(c)

Obr. 9.4 (a) Barokní stojatka „Ung: Popul:“ z 18. století (Národní muzeum, inv. č. H2-4949), (b) dobový předpis na mast z topolových pupenů podle *Dispensatorium pharmaceuticum Austriaco-Viennense* z roku 1729 a (c) jeho překlad do češtiny (v závorkách uvedeno procentuální zastoupení jednotlivých ingrediencí ve výsledné masti).

Vzorek H2-9293 byl odebrán z původní stojatky vyrobené z mléčného skla ve tvaru pohárku o výšce 12,0 cm a průměru 5,5 cm, opatřené signaturou „Bals: Jacob: De:“ (obr. 9.5) a uzavřené dobovým koženým víčkem. Podle signatury lze vzorek identifikovat jako balzám podle předpisu Jacoba del Pintho, dobový předpis a jeho překlad je uveden na obr. 9.5.



(a)

BALSAMUS JACOBI DEL PINTHO.

℞. Olibani,
Myrrhæ,
Mastichis,
Aloë,
Sarcocollæ,
Storacis cal.
Benzoë, ana unciam semis.
Olei Hypericonis, libram unam semis.
Cerae Citrinæ, uncias tres.
Colophonii,
Terebinthinæ Venetæ, ana unciam unam.
Colaturæ refrigeratæ adde
Axungię humanæ,
Olei Petræ, ana drachmas sex.
Spicæ, unciam semis.
Olei Juniperi ex baccis, drachmam unam.
M. Fiat Balsamus secundum artem.

(b)

BALZÁM JACOBA DEL PINTHO

Vezmi olibana (genus *Boswellia*), myrrhy (*Commiphora myrrha*), mastixu (*Pistacia lentiscus*), aloe (*Aloe vera*) sarcocolly (*Astragalus sarcocolla*), storaxu (*Liquidambar orientalis*), benzoe (genus *Styrax*), každého 1/2 unce (vždy 1,7 %), třezalkového oleje (*Hypericum perforatum*) 1,5 libry (62,9 %), žlutého vosku 3 unce (10,5 %), kalafuny, benátského terpentýnu (*Larix decidua*), každého 1 unci (vždy 3,5 %), [smíchá se za tepla], procedí, ochladí a přidá se lidského sádla, nafty, každého 6 drachem (vždy 2,6 %), ledvadulového oleje (*Lavandula officinalis*) 1/2 unce (1,7 %), oleje z jalovcových bobulí (*Juniperus communis*) 1 drachma (0,4 %). Smísí se aby z toho vznikl balzám podle umění lékárnického.

(c)

Obr. 9.5 (a) Barokní stojatka „Bals: Jacob: De:“ z 18. století (Národní muzeum, inv. č. H2-9293), (b) dobový předpis na balzám podle předpisu Jacoba del Pintho podle *Dispensatorium medico-pharmaceuticum Pragense* z roku 1739 a (c) jeho překlad do češtiny (v závorkách uvedeno procentuální zastoupení jednotlivých ingrediencí ve výsledné masti).

Vzorek bez inventárního čísla (dále proto označován H2-AC) byl odebrán z původní stojatky vyrobené z mléčného skla ve tvaru válce výšce 12,0 cm a průměru 4,5 cm, opatřené signaturou „Axung: Cunicul:“ (obr. 9.6) a uzavřené dobovým koženým víčkem. Podle signatury lze vzorek identifikovat jako sádlo divokého králíka (*Oryctolagus cuniculus*). V tomto případě se tedy nejedná o historický pozůstatek léčivého přípravku, ale léčivé látky.



Obr. 9.6 Barokní stojatka „Axung: Cunicul:“ z 18. století (Národní muzeum, bez inv. č.).

9.4.2 *Vzorky historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století*

Analyzované historické pozůstatky pěti mastí a jedné pasty z první poloviny 20. století pocházejí ze sbírek Katedry analytické chemie PřF UK. Vzorky se dochovaly v bílých porcelánových nádobách válcového tvaru uzavřených kovovým víčkem. Vzorky byly označeny písmeny A až F (obr. 9.7).

Vzorek A je hnědooranžovou viskózní homogenní substancí. Je uchováván v nádobce vysoké 4,2 cm o průměru 3,0 cm. Nádobka je označena červeným štítkem s hlavičkou lékárny a popiskem „Masť na oči“.

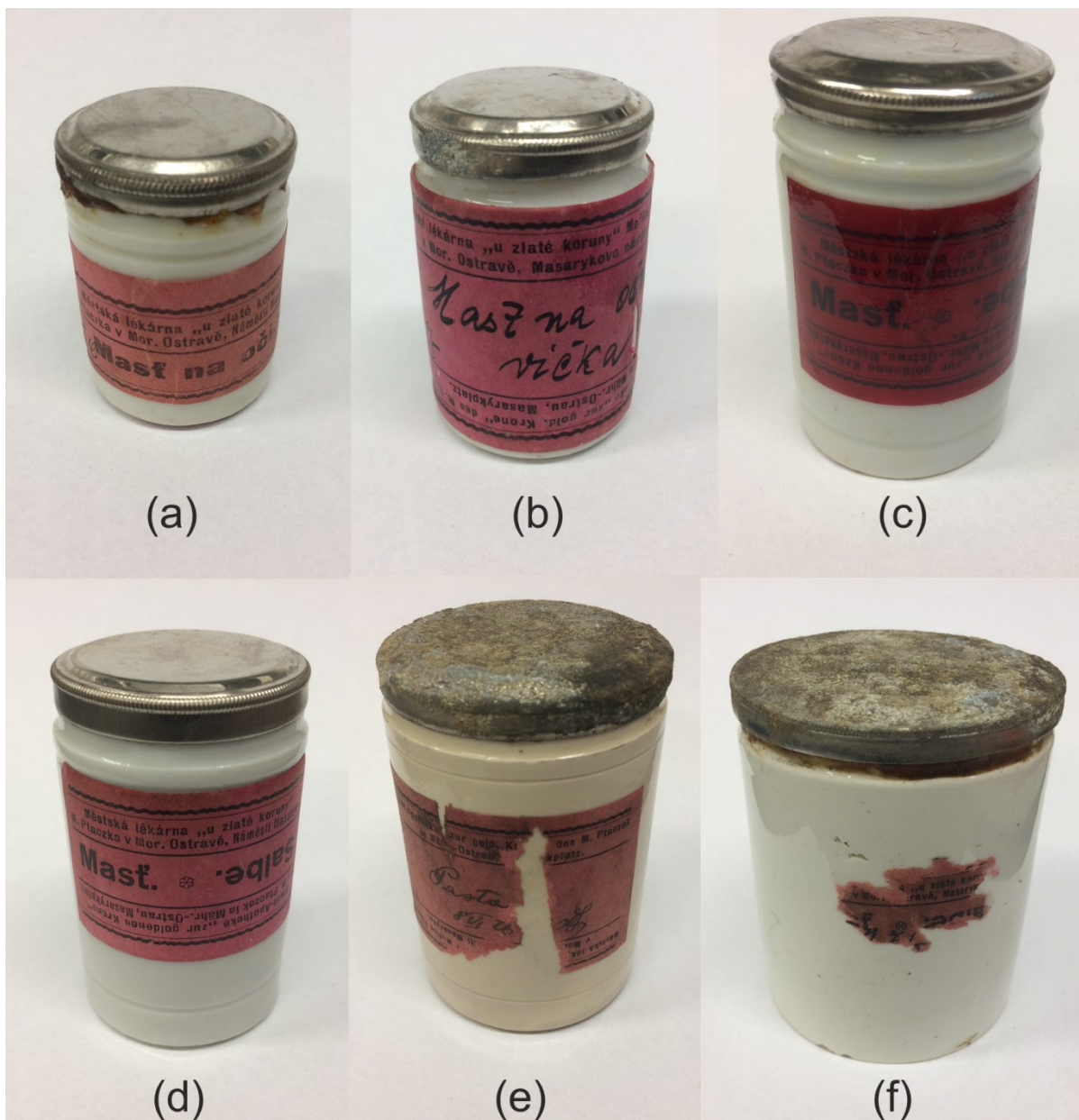
Vzorek B je bíložlutou drolicí se substancí. Je uchováván v nádobce o výšce 6,2 cm a průměru 3,5 cm. Nádobka je označena dvojjazyčným česko-německým červeným štítkem s hlavičkou lékárny a popiskem „Masť na oční víčka“.

Vzorek C je hnědožlutá viskózní homogenní substance. Mast je uchovávána v nádobce o výšce 5,0 cm a průměru 3,2 cm. Nádobka je označena dvojjazyčným česko-německým červeným štítkem s hlavičkou lékárny a dvojjazyčným označením „Masť“ a „Salbe“.

Vzorek D je tmavě hnědá až načervenalá homogenní substance viskóznější konzistence. Mast je uchovávána v nádobce o výšce 6,6 cm a průměru 4,0 cm. Nádobka je opatřena dvojjazyčným česko-německým červeným štítkem s hlavičkou lékárny a dvojjazyčným označením „Masť“ a „Salbe“.

Vzorek E je světle hnědou jílovitou homogenní substancí. Přípravek je uchováván v nádobce výšky 8,0 cm a průměru 5,3 cm. Nádobka je opatřena částečně zachovalým dvojjazyčným česko-německým červeným štítkem s hlavičkou lékárny. Na štítku je čitelný popisek „Pasta“ a pravděpodobně datum „8 VI 26“.

Vzorek F je tmavě hnědá až načervenalá homogenní substance viskózní konzistence. Mast je uchovávána v nádobce o výšce 8,2 cm a průměru 6,7 cm. Dochovala se pouze malá část původního červeného štítku, ze kterého je patrný název lékárny a pravděpodobně popis přípravku v němčině „Salbe“.



Obr. 9.7 Porcelánové nádoby pro uchovávání mastí z lékárny U zlaté koruny v Moravské Ostravě, obsahující masti vyrobené v první polovině 20. století.

9.4.3 Vzorky novodobých referenčních materiálů mast'ových základů

Pro srovnávací analýzu triacylglycerolů byly použity tři referenční materiály: máslo, vepřové a králičí sádlo z jara roku 2019. Máslo (výrobce S. Ginese) a vepřové sádlo (výrobce Brick) byly zakoupeny v lokálních prodejnách potravin. Králičí sádlo bylo získáno z malochovu M. Pudilové (Kostelec, Hluboká nad Vltavou). Obě sádla byla připravena škvářením bez použití dalších přísad.

9.5 Experimentální část

9.5.1 Metoda GC-MS screeningu

Příprava vzorků vycházela z literatury¹⁰. Vzorky byly nejprve saponifikovány a extrahovány a po derivatizaci byly vzorky analyzovány metodou GC-MS.

Navážka 1,5 mg vzorku byla odvážena do plastové nádoby určené pro saponifikaci v přístroji High Performance Microwave Digestion System Ethos One (Milestone). K navážce vzorku bylo přidáno 300 mm³ 10% roztoku hydroxidu draselného v ethanolu a před uzavřením nádoby byl vzduch nad vzorkem nahrazen dusíkem. Uzavřená nádoba byla umístěna do přístroje na dobu 80 minut při teplotě 80 °C a výkonu 200 W. Následovalo ochlazení nádoby a větrání 15 minut dusíkem. Poté byl výsledný roztok z nádoby převeden do skleněné vialky. K roztoku saponifikovaného vzorku byl přidán 1 cm³ destilované vody. Nejprve byly z naředěného vzorku extrahovány neutrální látky pomocí tří opakovaných extrakcí po 400 mm³ hexanu; získané extrakty byly spojeny a později použity pro derivatizaci. Hexan zbylý v extrahovaném roztoku byl odpařen proudem dusíku. Následně byl ke stejnému vodnému roztoku saponifikovaného vzorku přidán 1 cm³ kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 6 mol dm⁻³. Takto okyselený roztok byl extrahován pomocí tří opakovaných extrakcí 400 mm³ diethyletheru; tyto získané extrakty byly spojeny a později použity pro derivatizaci.

Následovala derivatizace neutrálních a okyselených extraktů. Do čisté skleněné vialky bylo odměřeno 20 mm³ extraktu vzorku, ke kterému bylo přidáno 5 mm³ roztoku vnitřního standardu pro derivatizaci tridekanové kyseliny v isooktanu o koncentraci 151 ppm. Extrakční rozpouštědlo vzorku a rozpouštědlo vnitřního standardu byly vysušeny dusíkem a pak bylo do kyvety přidáno 20 mm³ 1% roztoku *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu v isooktanu a 50 mm³ isooktanu. Derivatizační reakce probíhala při teplotě 60 °C po dobu 30 minut. Poté bylo k reakční směsi přidáno dalších 100 mm³ isooktanu a 10 mm³ roztoku hexadekanu v isooktanu o koncentraci 143 ppm (vnitřní standard pro nástřík). Do plynového chromatografu s hmotnostní detekcí (HP 6890 GC systém s MS HP 5973) pak byly dávkovány 2 mm³ roztoku vzorku.

Separace pomocí GC-MS probíhala za následujících podmínek. Pro chromatografickou separaci byla použita kolona z křemenného skla HP-5MS (stacionární fáze 5% difenyl + 95% dimethylpolysiloxan, délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, vrstva filmu 0,25 μm, J&W Scientific, Agilent, USA). Teplota pro transferovou kapiláru detektoru byla nastavena na 280 °C a teplota iontového zdroje na 250 °C. Teplota injektoru (v módu splitless izotermického nástříku s nárůstem tlaku) byla nastavena na 280 °C a nárůst tlaku byl 100 kPa. Teplotní program byl následující: Po dobu 2 minut je teplota 80 °C, pak teplota narůstá rychlostí 10 °C min⁻¹ do hodnoty 200 °C. Teplota dále narůstá rychlostí 30 °C min⁻¹ a po dosažení 330 °C je konstantní po dobu 60 minut. Jako nosný plyn sloužilo helium (čistoty 99,9995 %) při $F = 1,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Elektronová ionizace proběhla při energii 70 eV. Rozsah m/z byl 50–1000. Data byla vyhodnocena pomocí programu MSD ChemStation D.02.00.275 (Agilent Technologies). Analyty byly identifikovány pomocí knihovny spekter NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (NIST 05) a NIST Mass Spectral Search Program v. 2.0d (cit. ⁴²).

9.5.2 *Analýza těkavých komponent metodou SPME-GC-MS*

Extrakce těkavých látek vycházela z literatury⁴³. Navážka 20 mg vzorku byla nanesena na vnitřní stěny 10 cm³ headspace skleněné vialky. Vialka pak byla uzavřena uzávěrem s PTFE/silikonovým septem. Po 30 minutách byla zahájena extrakce pomocí mikroextrakčního vlákna Stable Flex Divinylbenzen/Carboxen/PDMS (Supelco, USA). Sorpce těkavých látek probíhala po dobu 30 minut při konstantní laboratorní teplotě. Bezprostředně po extrakci byly extrahované analyty desorbovány v GC-MS injektoru ve splitless módu při teplotě 250 °C s časem dávkování 0,6 minuty.

Separace probíhala na plynovém chromatografu 6890N se split/splitless injektorem s hmotnostním kvadrupólovým detektorem 5973 (Agilent Technologies, USA). Byla použita kapilární kolona z křemenného skla HP-5MS (stacionární fáze 5% difenyl + 95% dimethyl-polysiloxan, délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, vrstva filmu 0,25 μm, J&W Scientific, Agilent, USA). Jako nosný plyn sloužilo helium (čistoty 99,9995 %), $F = 1,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Teplotní gradient začíná na 40 °C po dobu 1 minuty, pak se teplota zvyšuje rychlostí 10 °C min⁻¹ na 280 °C, kde je následujících 20 minut konstantní. Ionizace EI probíhala při 70 eV, teplota iontového zdroje byla nastavena na 230 °C, rozsah m/z 35–700, teplota interface 280 °C. Píky byly identifikovány podle knihoven hmotnostních spekter (NIST 1.7 main EI MS library, WILEY 275 MS library)⁴². Kvantifikace probíhala metodou vnitřní normalizace.

9.5.3 *Charakterizace triacylglycerolů metodou RP-HPLC-MS²*

Příprava vzorku a podmínky analýzy vycházely z literatury^{44–46}. Navážka 2 mg vzorku byla extrahována 1 cm³ směsí hexanu a chloroformu (2:3, v/v) v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut při teplotě 60 °C. Objem 100 mm³ extraktu byl odpařen proudem dusíku a odparek byl rozpuštěn v mobilní fázi (směs methanolu a isopropanolu, 90:10, v/v). Vzorky byly dále ředěny mobilní fází desetkrát nebo stokrát.

Analýza proběhla na stroji HPLC Agilent 1260 Infinity ve spojení s Jet Stream ESI interfacea Q-TOF hmotnostním detektorem (obojí Agilent Technologies, USA). Pro separaci byla použita kolona InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (3,0×75 mm; velikost částic 2,7 μm). Nástřik vzorku byl v objemu 1 mm³. Jako mobilní fáze sloužil methanol (solvent A) a isopropanol (solvent B). Pro analýzu byl použit následující gradientový program: Po dobu 7,5 minut je podíl solventu A 90%, dále se podíl solventu A během 37,5 minut snižuje na 10 %. Tento podíl je dalších 15 minut konstantní a pak se během 7,5 minut navrácí na původních 90 %, $F = 0,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, teplota kolony byla 45 °C. Detektor s vysokým rozlišením pracoval při jednoduchém i tandemovém skenu v pozitivním ESI módu v rozsahu m/z 100–3000. Jako sušící plyn byl vybrán dusík (čistota >98 %) při teplotě 350 °C a průtok byl nastaven na 10 dm³ min⁻¹. Napětí na kapiláře bylo 4,5 kV, tlak nebulizačního plynu (dusík) 0,024 bar. Teplota přídavného plynu (dusík, čistota >98 %) byla 375 °C, průtok 11 dm³ min⁻¹. Napětí fragmentoru bylo 200 V, napětí na vstřikovací trysce bylo 1000 V, napětí na odlučovací šterbině bylo 65 V, vysokofrekvenční napětí na oktapolu bylo 750 V a kolizní energie pro MS² experimenty byla nastavena na 50 eV. Jako kolizní plyn byl použit dusík (čistota 99,999 %). Data byla shromážděna

pomocí auto-MS² akvizice s rychlostí skenu pro MS 1,06 spekter za sekundu a pro MS² 1,08 spekter za sekundu; pouze jeden prekurzor byl zaznamenán během cyklu (relativní prahová hodnota 0,010 %). Hmotnostní spektrometr byl kalibrován použitím standardu Agilent mix HP0321 (Agilent Technologies, USA) rozpuštěném v acetonitrilu a vodě. Pro vyhodnocení byl použit program MassHunter workstation (B.04.00)⁴⁷. Relativní zastoupení triacylglycerolů bylo vyjádřeno jako procentuální podíl plochy daného píku a součtu ploch všech identifikovaných píků v TIC chromatogramu.

9.5.4 Charakterizace metodou FIA-MS

Analýza i příprava vzorků vycházela z literatury¹². Navážka 1 mg vzorku byla extrahována 1 cm³ hexanu v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut při 60 °C. Bylo odebráno 10 mm³ extraktu a následně přidán 1 cm³ methanolu a hexan byl vysušen proudem dusíku.

Analýza proběhla na přístroji HPLC 1260 Infinity ve spojení s Jet Steam ESI interface a Q-TOF hmotnostním spektrometrem 6530 Infinity Q-TOF (oboje Agilent Technologies, USA). Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu a vody v poměru 85:15 (v/v), $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Objem nástřiku vzorku byl 1 mm³. Jako sušící plyn byl zvolen dusík (čistoty >98%) o teplotě 350 °C a průtoku 10 dm³ min⁻¹. Napětí na kapiláře bylo 4,5 kV. Tlak nebulizačního plynu dusíku byl 0,024 bar. Jako přidavný plyn sloužil dusík (čistoty >98 %) při teplotě 375 °C a průtoku 11 dm³ min⁻¹. Spektra s vysokým rozlišením byla měřena v pozitivním módu ionizace v rozsahu m/z 100–3200. Doba analýzy byla 1,5 minuty. Získaná data byla porovnána s literárními údaji¹².

9.5.5 Stanovení účinných látek mastí metodou HPLC-UV

Navážka 100 mg vzorku byla extrahována 25 cm³ směsí acetonitrilu a vody v poměru 85:15 (v/v). Extrakce probíhala v ultrazvukové lázni při laboratorní teplotě po dobu 4 hodin. Extrakt byl filtrován injekčním filtrem (0,2 μm; Whatman) a příslušně ředěn mobilní fází.

Separace účinných a pomocných látek benzoové (CASRN 65-85-0), salicylové (CASRN 69-72-7) a acetylsalicylové (CASRN 50-78-2) kyseliny, resorcinolu (CASRN 108-46-3), benzokainu (CASRN 94-09-7) a vanilinu (CASRN 121-33-5) vycházela z literatury⁴⁸. Byly optimalizovány (1) gradientový program a (2) průtok. Separace probíhala na koloně XBridge[®] BEH C18 (3,0 × 150 mm; velikost částic 2,5 μm; Waters) za použití mobilní fáze acetonitrilu (solvent A) a 0,1% vodného roztoku fosforečné kyseliny (solvent B). Optimální gradientový program začíná na 15% podílu solventu A a je konstantní po dobu sedmi minut. Během následujících tří minut vzrůstá na 40% podíl, při kterém setrvává pět minut. Během další půl minuty byl podíl solventu A navrácen na počátečních 15 %. Doba analýzy byla 25 minut. Nejúčinnější separace a dostatečného rozlišení píků acetylsalicylové a benzoové kyseliny bylo dosaženo při $F = 0,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Objem nástřiku vzorku byl 2 mm³ a teplota kolony byla 40 °C. Parametry kalibračních závislostí resorcinolu, vanilinu, acetylsalicylové, benzoové a salicylové kyseliny a benzokainu jsou uvedeny v tabulce 9.3.

Tabulka 9.3

Parametry kalibračních závislostí (retenční čas, vlnová délka detekce, lineární dynamický rozsah, směrnice a úsek kalibrační závislosti, koeficient determinace, kvantifikační a detekční limit) pro resorcinol, vanilin, acetylsalicylovou, benzoovou a salicylovou kyselinu a benzokain. Podmínky separace: kolona XBridge[®] BEH C18 (3,0 × 150 mm; velikost částic 2,5 μm; Waters), mobilní fáze sestávala z acetonitrilu (solvent A) a 0,1% vodného roztoku fosforečné kyseliny (solvent B). Gradientový program uvádí odst. 9.5.5. Objem nástřiku byl 2 mm³, $F = 0,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ a teplota kolony byla 40 °C.

| analyt | resorcinol | vanilin | acetylsalicylová kyselina |
|---|-------------|------------|---------------------------|
| retenční čas / min | 4,3 | 9,3 | 12,3 |
| vlnová délka / nm | 273 | 279 | 227 |
| lineární dynamický rozsah / mg dm ⁻³ | 4,7–343,6 | 5,1–360,1 | 4,8–349,7 |
| směrnice kalibrace / mAU min mg ⁻¹ dm ³ | 3,018±0,009 | 13,73±0,03 | 8,98±0,05 |
| úsek / mAU min | 5±2 | -13±5 | 12±9 |
| R^2 | 0,9999 | 0,9999 | 0,9998 |
| limit kvantifikace / mg dm ⁻³ | 5,34 | 3,43 | 9,94 |
| limit detekce / mg dm ⁻³ | 1,6 | 1,03 | 2,98 |

| analyt | benzoová kyselina | salicylová kyselina | benzokain |
|---|-------------------|---------------------|------------|
| retenční čas / min | 12,6 | 13,2 | 13,5 |
| vlnová délka / nm | 229 | 236 | 288 |
| lineární dynamický rozsah / mg dm ⁻³ | 4,8–95,0 | 4,2–303,2 | 5,9–352,8 |
| směrnice kalibrace / mAU min mg ⁻¹ dm ³ | 17,42±0,07 | 11,7±0,2 | 21,08±0,04 |
| úsek / mAU min | 1±4 | 50±31 | -3±8 |
| R^2 | 0,9999 | 0,9984 | 0,9999 |
| limit kvantifikace / mg dm ⁻³ | 2,25 | 26,61 | 3,55 |
| limit detekce / mg dm ⁻³ | 0,67 | 7,98 | 1,07 |

Metoda pro stanovení fenolu (CASRN 108-95-2), benzyl-benzoátu (CASRN 120-51-4) a D-limonenu (CASRN 138-86-3) vycházela rovněž z literatury⁴⁸. Byly optimalizovány (1) gradientový program a (2) průtok. Separace probíhala na koloně XBridge[®] BEH C18 (3,0 × 150 mm; velikost částic 2,5 μm; Waters). Jako mobilní fáze byly zvoleny acetonitril (solvent A) a voda (solvent B). Optimální gradientový program začíná při 70% podílu solventu A, který je pět minut konstantní. Pak se během dalších pěti minut zvyšuje na 90 %, kdy je opět pět minut konstantní. Podíl solventu A se pak během půl minuty navrácí na počáteční 70% podíl. Doba analýzy je 20 minut. Optimálním průtokem 0,25 cm³ min⁻¹ bylo dosaženo nejúčinnější separace. Objem nástřiku byl nastaven na 2 mm³, teplota kolony byla 40 °C. Parametry kalibračních závislostí fenolu, benzyl-benzoátu a D-limonenu jsou uvedeny v tabulce 9.4.

Tabulka 9.4

Parametry kalibračních závislostí (retenční čas, vlnová délka detekce, lineární dynamický rozsah, směrnice a úsek kalibrační závislosti, koeficient determinace, kvantifikační a detekční limit) pro fenol, benzyl-benzoát a D-limonen. Podmínky separace: kolona XBridge® BEH C18 (3,0 × 150 mm; velikost částic 2,5 μm; Waters), mobilní fáze sestávala z acetonitrilu (solvent A) a vody (solvent B). Gradientový program uvádí odst. 9.5.5. Objem nástřiku byl 2 mm³, $F = 0,25 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ a teplota kolony byla 40 °C.

| analyt | fenol | benzyl-benzoát | D-limonen |
|---|------------|----------------|-----------|
| retenční čas / min | 3,0 | 6,6 | 12,6 |
| vlnová délka / nm | 210 | 229 | 200 |
| lineární dynamický rozsah / mg dm ⁻³ | 0,7–27,9 | 9,0–201,6 | 1,3–148,4 |
| směrnice kalibrace / mAU min mg ⁻¹ dm ³ | 13,50±0,04 | 15,98±0,06 | 15,5±0,2 |
| úsek / mAU min | 2,3±0,5 | 8±6 | 70±12 |
| R^2 | 0,9999 | 0,9999 | 0,9996 |
| limit kvantifikace / mg dm ⁻³ | 0,04 | 3,79 | 7,48 |
| limit detekce / mg dm ⁻³ | 0,12 | 1,14 | 2,24 |

9.6 Výsledky a diskuse**9.6.1 Triacylglycerolové profily**

Před analýzou historických pozůstatků mastí byly za účelem vytvoření triacylglycerolových profilů lipidů analyzovány metodou RP-HPLC-MS² vybrané čerstvé referenční materiály vepřového sádla, králíčího sádla a másla, které se používaly jako masťové základy. Podmínky analýzy vycházely z literatury^{44–46}. Při vyhodnocení získaných dat byly v úvahu brány pouze analyty, jejichž relativní zastoupení v TIC chromatogramu vzorku bylo nad 1,0% podíl. Triacylglycerolové profily byly znázorněny jako závislost podílu příslušného analytu na jeho retenčním čase. Dosažené výsledky jsou shrnuty v tabulce 9.5 (která souhrnně zaznamenává výsledky jak referenčních materiálů, tak analyzovaných vzorků historických pozůstatků mastí) a triacylglycerolové profily pro studované referenční materiály na obr. 9.8.

Tabulka 9.5

Identifikace triacylglycerolů ve studovaných vzorcích lipidů (referenčních vzorcích a historických pozůstatcích mastí). Číslo analytu, retenční čas, zkratka triacylglycerolu, sumární vzorec a m/z prekurzorového iontu a fragmentových iontů. Zkratky mastných kyselin (tabulka 9.1): A – arachidová, B – behenová, C – cerotová, Ca – kaprinová, Cy – kaprylová, E – eikosatrienová, G – gondoová, H – heneikosylová, L – linolová, La – laurová, Li – lignocerová, Ln – γ -linolenová, M – myristová, Ma – margarová, Mm – heptadecenyllová, Mo – myristolejová, N – nonadecyllová, O – olejová, P – palmitová, Pa – pentadecyllová, Po – palmitolejová, Pp – pentadecenyllová, Rn – ricinolejová, S – stearová. Separace na koloně kolona Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18 (3,0×75 mm; velikost částic 2,7 μm), teplota kolony 45 °C. Mobilní fáze: methanol (solvent A) a isopropanol (solvent B), $F = 0,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, gradientová eluce popsána v odst. 9.5.3.

| číslo analytu | t_r / min | zkratka triacylglycerolu | sumární vzorec | m/z | prekurzorový produktové ionty | |
|---------------|-------------|--------------------------|---|---------|--|--|
| | | | | | ion[M+Na] ⁺ | |
| 1 | 25,23 | RnRnRn | C ₅₇ H ₁₀₄ O ₉ | 955,763 | 321,234; 657,502 | |
| 2 | 32,53 | ORnRn | C ₅₇ H ₁₀₄ O ₈ | 939,765 | 321,235; 641,508; 657,498 | |
| 3 | 32,66 | LRnRn | C ₅₇ H ₁₀₂ O ₈ | 937,747 | 321,234; 639,499; 657,503 | |
| 4 | 37,15 | LLRn | C ₅₇ H ₁₀₀ O ₇ | 919,734 | 321,236; 599,486; 621,471; 639,492 | |
| 5 | 37,76 | LORn | C ₅₇ H ₁₀₂ O ₇ | 921,744 | 321,234; 601,509; 623,509; 639,495; 641,510 | |
| 6 | 38,44 | LRnS | C ₅₇ H ₁₀₄ O ₇ | 923,758 | 321,232; 603,529; 625,520; 639,499; 643,505 | |
| 7 | 38,97 | CaMP, CyPP | C ₄₃ H ₈₆ O ₆ | 717,604 | 439,379; 461,365; 467,410; 489,389; 523,471; 551,494; 573,481 | |
| 8 | 39,36 | CyOP, CaMO | C ₄₅ H ₈₄ O ₆ | 743,664 | 439,382; 461,371; 465,402; 487,375; 493,425; 515,412; 549,487; 571,461; 577,516; 599,501 | |
| 9 | 39,62 | CaLP | C ₄₇ H ₈₆ O ₆ | 769,636 | 467,399; 489,382; 491,413; 513,400; 575,523; 597,512 | |
| 10 | 39,87 | LaMP | C ₄₅ H ₈₆ O ₆ | 745,635 | 467,395; 489,379; 495,426; 517,421; 523,474; 545,458 | |
| 11 | 40,07 | CaLO | C ₄₉ H ₈₈ O ₆ | 795,651 | 491,409; 513,390; 493,425; 515,403; 601,514; 623,505 | |
| 12 | 40,33 | MMPo, LaPPo, CaOP, MMoP | C ₄₇ H ₈₈ O ₆ | 771,717 | 467,396; 489,383; 493,419; 495,410; 515,397; 517,420; 521,459; 523,472; 543,493; 545,451; 549,484; 571,466; 577,518; 599,501 | |
| 13 | 40,46 | LLnM, LLMo | C ₅₃ H ₉₂ O ₆ | 847,672 | 545,461; 547,501; 567,498; 569,491; 597,501; 599,503; 619,489; 621,510 | |
| 14 | 40,58 | CaOO | C ₄₉ H ₉₀ O ₆ | 797,657 | 493,420; 515,397; 603,527; 625,500 | |
| 15 | 40,59 | LMM, LLaP | C ₄₉ H ₉₀ O ₆ | 797,657 | 495,419; 517,406; 519,401; 541,420; 547,468; 569,457; 575,506; 597,493 | |
| 16 | 40,65 | CaOP, LaMO | C ₄₇ H ₈₈ O ₆ | 771,717 | 467,397; 489,390; 493,422; 515,402; 521,498; 543,495; 549,482; 571,467; 577,514; 599,505 | |
| 17 | 40,91 | CaOO | C ₄₉ H ₉₀ O ₆ | 797,668 | 493,418; 515,397; 603,530; 625,501 | |
| 18 | 40,92 | LLnPo, LnLnP | C ₅₅ H ₉₄ O ₆ | 873,687 | 571,469; 573,470; 593,421; 595,469; 597,503; 617,466; 619,458 | |
| 19 | 40,98 | LLaO, LMPo, LnMP | C ₅₁ H ₉₂ O ₆ | 823,672 | 519,438; 521,450; 523,453; 541,427; 543,429; 545,429; 547,462; 567,438; 569,443; 573,475; 595,460; 601,509; 623,488 | |
| 20 | 41,04 | MPaPo | C ₄₈ H ₉₀ O ₆ | 785,656 | 481,426; 503,412; 521,461; 543,438; 563,505; 585,495 | |
| 21 | 41,10 | LLLn | C ₅₅ H ₉₆ O ₆ | 899,707 | 597,480; 599,491; 619,491; 621,478 | |

Tabulka 9.5 pokračuje na další straně.

Pokračování tabulky 9.5 z předchozí strany.

| číslo analytu | t_r / min | zkratka triacylglycerolu | sumární vzorec | m/z | |
|---------------|-------------|--------------------------|-------------------|-----------------------------|--|
| | | | | prekurzorový ion $[M+Na]^+$ | produktové ionty |
| 23 | 41,16 | MMP | $C_{47}H_{88}O_6$ | 773,657 | 495,436; 517,448; 523,465; 545,446 |
| 24 | 41,24 | MPaPa | $C_{47}H_{88}O_6$ | 773,660 | 509,447; 523,466; 531,502; 545,507 |
| 25 | 41,24 | MMP, MPaPa | $C_{47}H_{88}O_6$ | 773,668 | 495,436; 509,448; 517,450; 523,465; 531,499; 545,446 |
| 26 | 41,29 | LLM | $C_{53}H_{94}O_6$ | 849,668 | 547,456; 569,449; 599,505; 621,497 |
| 27 | 41,30 | LPoPo, LnPPo, LLM | $C_{53}H_{94}O_6$ | 849,658 | 547,463; 549,483; 569,443; 571,477; 573,479; 593,467; 595,501; 599,499; 621,489 |
| 28 | 41,37 | LLaO, LMPo, LMoP | $C_{51}H_{92}O_6$ | 823,682 | 519,442; 521,455; 541,419; 543,437; 545,452; 547,458; 567,428; 569,455; 573,477; 575,509; 595,497; 597,482; 601,517; 623,500 |
| 29 | 41,49 | LnLnP | $C_{55}H_{94}O_6$ | 873,749 | 573,485; 595,464; 617,466 |
| 30 | 41,55 | MMP, LaPP | $C_{47}H_{90}O_6$ | 773,661 | 495,440; 517,451; 523,459; 545,451; 551,492; 573,485 |
| 31 | 41,55 | MPPo, PaPaPo, MoPP | $C_{49}H_{92}O_6$ | 799,674 | 521,449; 523,471; 535,456; 543,422; 545,425; 549,471; 551,495; 557,449; 571,451; 573,483 |
| 32 | 41,62 | LaOP, MMO, CaOS | $C_{49}H_{92}O_6$ | 799,673 | 493,418; 495,435; 515,401; 517,414; 521,450; 543,425; 549,481; 571,462; 605,546; 627,528 |
| 33 | 41,62 | MPPo, PaPaPo | $C_{49}H_{92}O_6$ | 799,676 | 521,450; 523,469; 535,461; 543,431; 545,440; 549,480; 567,462; 571,466 |
| 34 | 41,63 | MPPo, MMO | $C_{49}H_{92}O_6$ | 799,672 | 495,433; 517,411; 521,449; 523,469; 543,419; 545,439; 549,480; 571,470 |
| 35 | 41,68 | LLnP | $C_{55}H_{96}O_6$ | 875,706 | 573,479; 575,494; 595,464; 597,472; 619,468 |
| 36 | 41,69 | MMP, CaPS, LaPP | $C_{47}H_{90}O_6$ | 773,630 | 467,411; 489,388; 495,442; 517,421; 523,467; 545,455; 551,505; 573,493; 579,539; 601,509 |
| 37 | 41,69 | LLnP, LLPo, LnOPo | $C_{55}H_{96}O_6$ | 875,703 | 571,461; 573,479; 575,494; 593,441; 595,464; 597,472; 599,497; 601,504; 619,478; 623,479 |
| 38 | 41,75 | MPPa | $C_{48}H_{92}O_6$ | 787,672 | 509,447; 523,446; 531,421; 537,484; 545,464; 559,445 |
| 39 | 41,76 | MPPa, PaPaPa | $C_{48}H_{92}O_6$ | 787,673 | 509,450; 523,448; 531,433; 537,487; 545,459; 559,431 |
| 40 | 41,81 | MPPo | $C_{49}H_{92}O_6$ | 799,671 | 521,439; 523,464; 543,430; 545,456; 549,465; 571,484 |
| 41 | 41,87 | MMO, MPPo | $C_{49}H_{92}O_6$ | 799,678 | 495,431; 517,411; 521,438; 523,460; 543,435; 545,445; 549,470; 571,480 |
| 42 | 41,87 | MOPo | $C_{51}H_{94}O_6$ | 825,670 | 521,456; 543,436; 549,486; 571,465; 575,503; 579,520 |
| 43 | 41,87 | LLL | $C_{57}H_{98}O_6$ | 901,724 | 599,501; 621,482 |
| 44 | 41,89 | MOPo, LMP | $C_{51}H_{94}O_6$ | 825,716 | 521,449; 523,461; 543,431; 545,445; 547,465; 549,481; 569,449; 571,464; 575,492; 597,476 |
| 45 | 41,95 | LaOP, MMO | $C_{49}H_{92}O_6$ | 799,683 | 495,432; 517,409; 521,441; 543,439; 549,465; 571,483 |
| 46 | 41,95 | LLnO | $C_{57}H_{98}O_6$ | 901,718 | 597,528; 599,504; 601,515; 619,481; 621,477; 623,517 |
| 47 | 42,00 | PPoPo | $C_{51}H_{94}O_6$ | 825,691 | 547,465; 549,481; 569,449; 571,464 |

Tabulka 9.5 pokračuje na další straně.

Pokračování tabulky 9.5 z předchozí strany.

| číslo analytu | t_r / min | zkratka triacylglycerolu | sumární vzorec | m/z | |
|---------------|-------------|--------------------------|--------------------|-----------------------------|---|
| | | | | prekurzorový ion $[M+Na]^+$ | produktové ionty |
| 48 | 42,10 | PPoPo | $C_{51}H_{94}O_6$ | 825,687 | 547,464; 549,480; 569,450; 571,464 |
| 50 | 42,20 | LMO, OPoPo, LnPP | $C_{53}H_{96}O_6$ | 851,704 | 547,469; 549,468; 551,489; 569,472; 571,482; 573,495; 575,494; 595,469; 597,477; 601,527; 623,522 |
| 51 | 42,21 | PPaPo | $C_{50}H_{94}O_6$ | 813,693 | 535,476; 537,487; 549,430; 557,453; 559,472; 571,465 |
| 52 | 42,21 | PPaPo, MMaPo | $C_{50}H_{94}O_6$ | 813,688 | 521,441; 535,477; 537,488; 543,431; 549,431; 557,453; 559,454; 563,505; 571,474; 585,488 |
| 53 | 42,27 | OPoPo | $C_{53}H_{96}O_6$ | 851,703 | 547,473; 569,477; 575,499; 597,469 |
| 54 | 42,40 | MPP | $C_{49}H_{94}O_6$ | 801,693 | 523,454; 545,437; 551,496; 573,475 |
| 55 | 42,46 | LLP | $C_{55}H_{98}O_6$ | 877,722 | 575,496; 597,478; 599,494; 621,478 |
| 56 | 42,46 | LOPo | $C_{55}H_{98}O_6$ | 877,724 | 573,481; 575,498; 595,461; 597,477; 601,497; 623,487 |
| 57 | 42,47 | MOPa | $C_{50}H_{94}O_6$ | 813,698 | 509,441; 531,410; 549,495; 563,507; 571,456; 585,467 |
| 58 | 42,52 | LLP, LnOP | $C_{55}H_{98}O_6$ | 877,720 | 573,481; 575,496; 577,509; 595,461; 597,478; 599,494; 621,478 |
| 59 | 42,52 | LOP | $C_{55}H_{100}O_6$ | 879,812 | 575,501; 577,508; 597,475; 599,494; 601,510; 623,493 |
| 60 | 42,53 | MPP, PPaPa | $C_{49}H_{94}O_6$ | 801,687 | 523,464; 537,481; 545,456; 551,491; 559,464; 573,464 |
| 61 | 42,53 | LMO | $C_{53}H_{96}O_6$ | 851,714 | 547,454; 549,453; 569,456; 571,466; 601,519; 623,494 |
| 62 | 42,60 | MmPPo | $C_{52}H_{96}O_6$ | 839,706 | 549,493; 561,474; 563,504; 571,461; 583,452; 585,486 |
| 63 | 42,60 | LLL, LnLnS | $C_{57}H_{98}O_6$ | 901,776 | 595,518; 599,488; 601,507; 617,485; 621,463; 623,546 |
| 64 | 42,65 | LLO | $C_{57}H_{100}O_6$ | 903,710 | 599,494; 601,511; 621,477; 623,492 |
| 65 | 42,72 | MOP | $C_{51}H_{96}O_6$ | 827,708 | 523,467; 545,448; 549,483; 571,461; 577,512; 599,492 |
| 66 | 42,78 | LLO, ELP | $C_{57}H_{100}O_6$ | 903,736 | 575,495; 597,477; 599,494; 601,511; 621,477; 623,492; 625,506; 647,494 |
| 67 | 42,86 | MMS, LaPS | $C_{49}H_{94}O_6$ | 801,654 | 495,434; 517,413; 523,467; 545,454; 551,494; 573,467; 579,518; 601,508 |
| 68 | 42,92 | MOO | $C_{53}H_{98}O_6$ | 853,741 | 549,487; 571,471; 603,529; 625,518 |
| 69 | 42,98 | PPPa, PMMa | $C_{50}H_{96}O_6$ | 815,713 | 523,461; 537,484; 545,471; 551,503; 559,471; 565,551; 573,503; 587,504 |
| 70 | 43,04 | PPPa | $C_{50}H_{96}O_6$ | 815,708 | 537,484; 551,499; 559,471; 573,503 |
| 71 | 43,04 | OPPo, MOO, LPP | $C_{53}H_{98}O_6$ | 853,658 | 549,488; 551,503; 571,466; 573,467; 575,493; 577,521; 579,528; 597,468; 599,497; 603,509; 625,505 |
| 72 | 43,04 | PPPo | $C_{51}H_{96}O_6$ | 827,717 | 549,479; 551,490; 571,483; 573,484 |
| 73 | 43,11 | LPP | $C_{53}H_{98}O_6$ | 853,732 | 551,503; 573,504; 575,495; 597,467 |

Tabulka 9.5 pokračuje na další straně.

Pokračování tabulky 9.5 z předchozí strany.

| číslo analytu | t_r / min | zkratka triacylglycerolu | sumární vzorec | m/z | |
|---------------|-------------|--------------------------|--------------------|-----------------------------|---|
| | | | | prekurzorový ion $[M+Na]^+$ | produktové ionty |
| 74 | 43,12 | PoPoS | $C_{53}H_{98}O_6$ | 853,732 | 547,475; 569,495; 577,515; 599,497 |
| 75 | 43,25 | MmMmP, LPP | $C_{53}H_{98}O_6$ | 853,726 | 551,502; 563,496; 573,456; 575,488; 585,488; 597,459 |
| 77 | 43,30 | OOP | $C_{55}H_{102}O_6$ | 881,762 | 577,508; 599,491; 603,527; 625,508 |
| 78 | 43,31 | MmPP, OPPa | $C_{52}H_{98}O_6$ | 841,718 | 537,488; 551,522; 559,423; 563,477; 573,512; 577,513; 585,479; 599,490 |
| 79 | 43,31 | LOP, OOPo | $C_{55}H_{100}O_6$ | 879,734 | 575,487; 577,507; 597,520; 599,486; 601,503; 603,508; 623,493; 625,489 |
| 80 | 43,31 | OOPo | $C_{55}H_{100}O_6$ | 879,739 | 575,488; 597,519; 603,508; 625,490 |
| 81 | 43,37 | OPPo, MOO | $C_{53}H_{98}O_6$ | 853,731 | 549,480; 571,485; 575,493; 577,521; 597,468; 599,498 |
| 82 | 43,37 | MaPaPa, PPPa | $C_{50}H_{96}O_6$ | 815,713 | 523,473; 537,484; 545,499; 551,498; 559,465; 573,482 |
| 83 | 43,49 | LOO | $C_{57}H_{102}O_6$ | 905,756 | 601,518; 603,532; 623,498; 625,515 |
| 84 | 43,62 | MPS | $C_{51}H_{98}O_6$ | 829,725 | 523,474; 545,441; 551,499; 573,480; 579,537; 601,501 |
| 85 | 43,62 | PPP | $C_{51}H_{98}O_6$ | 829,722 | 551,500; 573,489 |
| 86 | 43,77 | MaPPa, PaPaS | $C_{51}H_{98}O_6$ | 829,754 | 501,463; 515,477; 523,473; 529,446; 537,489; 543,443; 551,499; 565,478 |
| 87 | 43,82 | OPP | $C_{53}H_{100}O_6$ | 855,739 | 551,503; 573,481; 577,518; 599,501 |
| 88 | 43,88 | OPP, PPOs | $C_{53}H_{100}O_6$ | 855,690 | 549,488; 551,503; 571,470; 573,485; 577,518; 579,526; 599,501; 601,513 |
| 89 | 43,88 | PPS | $C_{53}H_{102}O_6$ | 857,799 | 551,502; 573,485; 579,529; 601,515 |
| 90 | 44,08 | PPaS, MaMaPa, MaPP | $C_{52}H_{100}O_6$ | 843,739 | 537,485; 551,501; 559,471; 565,517; 573,485; 579,837; 587,501; 601,507 |
| 91 | 44,09 | MaPP | $C_{52}H_{100}O_6$ | 843,735 | 551,501; 565,518; 573,468; 587,501 |
| 92 | 44,14 | LPS | $C_{55}H_{102}O_6$ | 881,743 | 575,483; 579,511; 597,458; 601,496; 603,529; 625,503 |
| 93 | 44,14 | OPS | $C_{55}H_{104}O_6$ | 883,764 | 577,510; 579,517; 599,492; 601,497; 605,532; 627,515 |
| 94 | 44,22 | MOS, OPP | $C_{53}H_{100}O_6$ | 855,690 | 549,470; 551,470; 571,490; 573,487; 577,511; 599,492; 605,512; 627,515 |
| 95 | 44,27 | LOS | $C_{57}H_{104}O_6$ | 907,770 | 601,515; 603,528; 605,542; 623,498; 625,509; 627,521 |
| 96 | 44,36 | OOO | $C_{57}H_{104}O_6$ | 907,765 | 603,528; 625,509 |
| 97 | 44,42 | MaPP, PPaS | $C_{52}H_{100}O_6$ | 843,739 | 537,474; 551,494; 559,465; 565,514 579,537; 587,501; 601,524 |
| 98 | 44,59 | MaOO, MaLS | $C_{56}H_{104}O_6$ | 895,767 | 589,535; 591,534; 593,549; 603,530; 611,510; 613,515; 615,527; 625,531 |
| 99 | 44,62 | MaOP, PpSS, MmMaMa | $C_{54}H_{102}O_6$ | 869,764 | 563,496; 565,509; 577,513; 579,520; 585,481; 587,498; 591,526; 599,489; 601,503; 607,509; 613,510; 629,529; |

Tabulka 9.5 pokračuje na další straně.

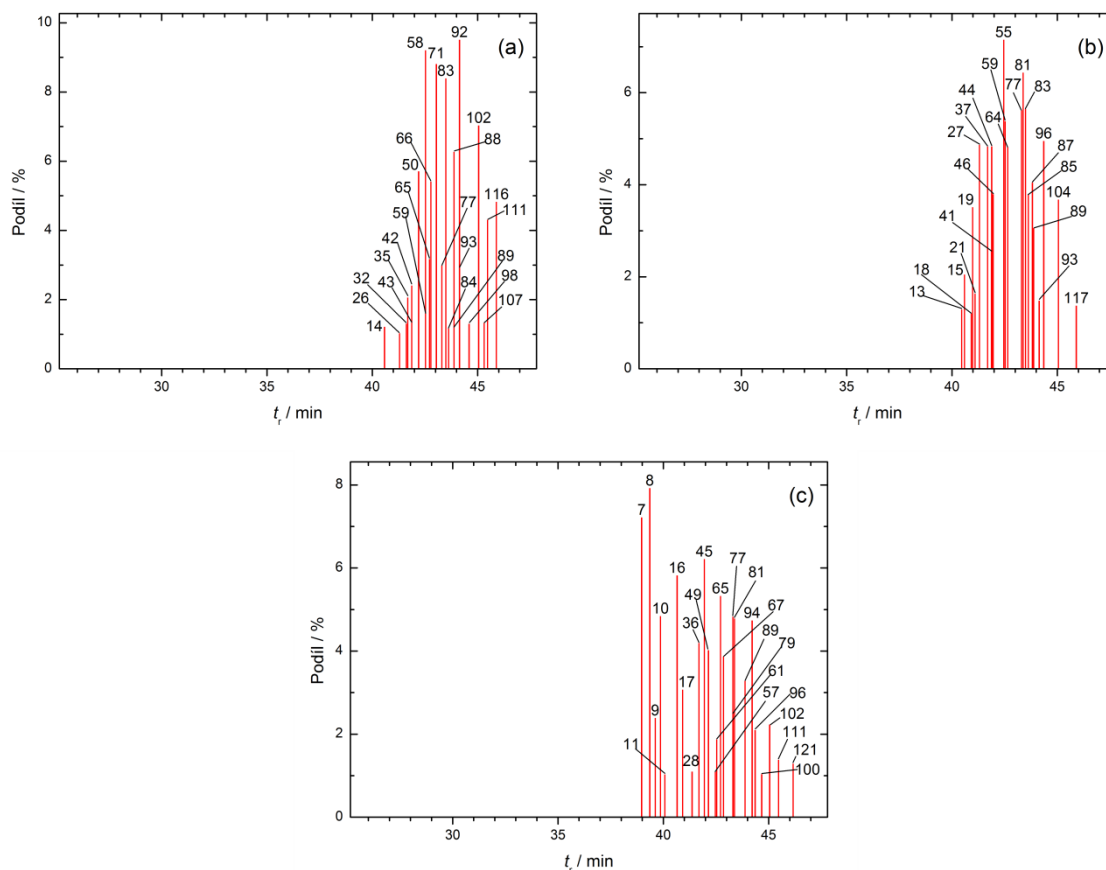
Pokračování tabulky 9.5 z předchozí strany.

| číslo analytu | t_r / min | zkratka triacylglycerolu | sumární vzorec | m/z | |
|---------------|-------------|--------------------------|--------------------|-----------------------------|--|
| | | | | prekurzorový ion $[M+Na]^+$ | produktové ionty |
| 100 | 44,67 | MaOP | $C_{54}H_{102}O_6$ | 869,760 | 565,509; 577,511; 587,501; 591,530; 599,499; 613,521 |
| 101 | 44,85 | PoSS | $C_{55}H_{104}O_6$ | 883,771 | 577,510; 599,492; 607,541; 629,515 |
| 102 | 45,05 | OOS | $C_{57}H_{106}O_6$ | 909,786 | 603,529; 605,545; 625,516; 627,529 |
| 103 | 45,05 | OSS | $C_{57}H_{108}O_6$ | 911,799 | 605,535; 607,568; 627,525; 629,540 |
| 105 | 45,11 | MaPS, MaMaMa | $C_{54}H_{104}O_6$ | 871,770 | 565,519; 579,533; 587,496; 593,558; 601,522; 615,532 |
| 106 | 45,21 | OPS, PoSS | $C_{55}H_{104}O_6$ | 883,771 | 577,510; 579,515; 599,505; 601,491; 605,529; 607,529; 627,533; 629,504 |
| 107 | 45,31 | ALO, GOO | $C_{59}H_{108}O_6$ | 935,797 | 601,506; 603,536; 623,493; 625,501; 631,559; 633,580; 653,521; 655,563 |
| 108 | 45,31 | ErLP | $C_{59}H_{108}O_6$ | 935,800 | 575,508; 597,487; 633,581; 655,564; 657,573; 679,552 |
| 109 | 45,44 | ErLO | $C_{61}H_{110}O_6$ | 961,816 | 601,517; 623,498; 657,584; 659,592; 679,556; 681,570 |
| 110 | 45,45 | MaPS | $C_{54}H_{104}O_6$ | 871,775 | 565,518; 579,528; 587,497; 593,546; 601,511; 615,528 |
| 111 | 45,47 | PSS | $C_{55}H_{106}O_6$ | 885,793 | 579,531; 601,516; 607,558; 629,537 |
| 112 | 45,47 | APPa | $C_{54}H_{104}O_6$ | 871,770 | 537,463; 559,480; 593,546; 607,573; 615,531; 629,516 |
| 113 | 45,60 | MaOS | $C_{56}H_{106}O_6$ | 897,796 | 591,547; 593,548; 605,522; 613,519; 615,525; 627,529 |
| 114 | 45,69 | ErGLn | $C_{63}H_{112}O_6$ | 987,831 | 627,522; 649,510; 655,556; 677,544; 687,630; 709,601 |
| 115 | 45,70 | PSS, APP | $C_{55}H_{106}O_6$ | 885,786 | 551,491; 573,485; 579,527; 601,509; 607,558; 629,540 |
| 116 | 45,89 | OSS, AOP | $C_{57}H_{108}O_6$ | 911,756 | 577,523; 599,480; 605,533; 607,542; 627,518; 629,523; 633,571; 655,562 |
| 117 | 45,90 | AOP, GPS | $C_{57}H_{108}O_6$ | 911,756 | 577,521; 579,519; 599,485; 601,510; 605,525; 607,545; 627,539; 629,523; 633,569; 655,562 |
| 118 | 45,95 | AOO, GOS, ErOP, GGP | $C_{59}H_{110}O_6$ | 937,816 | 577,508; 599,501; 603,529; 605,541; 625,508; 627,522; 631,557; 633,575; 653,540; 655,555; 659,561; 681,572 |
| 119 | 46,08 | ErOO, GGO | $C_{61}H_{112}O_6$ | 963,832 | 603,529; 625,510; 631,559; 653,551; 659,593; 681,574 |
| 120 | 46,08 | MaSS, NPS | $C_{56}H_{108}O_6$ | 899,801 | 579,531; 593,545; 601,509; 607,563; 615,536; 621,591; 629,548; 643,565 |
| 121 | 46,16 | OSS, GPS | $C_{57}H_{108}O_6$ | 911,808 | 571,511; 601,503; 605,542; 607,558; 627,525; 629,538; 633,573; 655,559 |
| 122 | 46,22 | SSS | $C_{57}H_{110}O_6$ | 913,823 | 607,552; 629,551 |
| 123 | 46,28 | ErGL | $C_{63}H_{114}O_6$ | 989,847 | 629,551; 651,528; 657,557; 679,561; 687,625; 709,608 |
| 124 | 46,39 | MaSS | $C_{56}H_{108}O_6$ | 899,801 | 593,545; 607,563; 615,540; 629,545 |
| 125 | 46,60 | ErErLn | $C_{65}H_{116}O_6$ | 1015,863 | 655,562; 677,536; 715,648; 737,649 |

Tabulka 9.5 pokračuje na další straně.

Pokračování tabulky 9.5 z předchozí strany.

| číslo analytu | t_r / min | zkratka triacylglycerolu | sumární vzorec | m/z | |
|---------------|-------------|--------------------------|--------------------|-----------------------------|--|
| | | | | prekurzorový ion $[M+Na]^+$ | produktové ionty |
| 126 | 46,67 | APS | $C_{57}H_{110}O_6$ | 913,813 | 579,531; 601,506; 607,562; 629,545; 635,601; 657,580 |
| 127 | 46,93 | ErGO | $C_{63}H_{116}O_6$ | 991,863 | 631,554; 653,542; 659,593; 681,569; 687,625; 709,608 |
| 128 | 47,05 | LiPPa | $C_{58}H_{112}O_6$ | 927,824 | 537,473; 559,452; 649,592; 663,597; 671,545; 685,659 |
| 130 | 47,12 | ErErL | $C_{65}H_{118}O_6$ | 1017,879 | 657,583; 679,554; 715,657; 737,641 |
| 131 | 47,44 | LiPP | $C_{59}H_{114}O_6$ | 941,844 | 551,507; 573,492; 663,644; 685,617 |
| 132 | 47,46 | LiPP, BPS | $C_{59}H_{114}O_6$ | 941,848 | 551,508; 573,492; 579,531; 601,523; 635,594; 657,569; 663,643; 685,617 |
| 133 | 47,70 | ErErO | $C_{65}H_{120}O_6$ | 1019,894 | 659,595; 681,576; 715,655; 737,637 |
| 134 | 47,71 | BPS | $C_{59}H_{114}O_6$ | 941,853 | 579,530; 601,523; 635,602; 657,569; 663,644; 685,617 |



Obr. 9.8 Triacylglycerolové profily referenčních vzorků (a) vepřového sádla, (b) králíčího sádla a (c) másla. Identifikace jednotlivých triacylglycerolů uvedena v tabulce 9.5. Separace na koloně Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18 (3,0×75 mm; velikost částic 2,7 μm), teplota kolony 45 °C. Mobilní fáze: methanol (solvent A) a isopropanol (solvent B), $F = 0,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, gradientová eluce popsána v odst. 9.5.3.

V triacylglycerolovém profilu referenčního vzorku vepřového sádla (obr. 9.8a) jsou patrné analyty ve významnějších podílech (nad 1,0 %) mezi 40. a 46. minutou. V nejvyšších podílech byly nalezeny linoleoylpalmitoylstearyl-glycerol (LPS, analyt číslo 92) s podílem 9,51 %, dilinoleoylpalmitoyl-glycerol v koeluci s linolenoyl-oleoylpalmitoyl-glycerolem (LLP + LnOP, analyt číslo 58) s podílem 9,20 % a oleoylpalmitoylpalmito-oleoyl-glycerol v koeluci s myristoyldioleoyl-glycerolem a linoleoyldipalmitoyl-glycerolem (OPPo + MOO + LPP, analyt číslo 71) s podílem 8,81 %. Podle literatury³¹ lze vepřové sádlo identifikovat na základě charakteristického markeru arachidoylstearyl-palmitoyl-glycerolu (APS, analyt číslo 126), jehož podíl ve vzorku činil 0,89 %. Živočišné tuky obsahují na rozdíl od jiných také markery palmitoyldistearoyl-glycerol (PSS, analyt číslo 111) a myristoyldipalmitoyl-glycerol (MPP, analyt číslo 54)³¹. První zmíněný analyt je v referenčním vzorku vepřového sádla ve 4,31% podílu, zatímco druhý jmenovaný analyt nebyl identifikován. V souladu s literaturou⁵ byly stanoveny vyšší podíly dalších triacylglycerolů: dioleoylpalmitoyl-glycerol (OOP, analyt číslo 77, podíl 2,98 %), oleoylpalmitoylstearyl-glycerol (OPS, analyt číslo 93, podíl 2,88 %) a palmitoyldistearoyl-glycerol (PSS, analyt číslo 111, podíl 4,31 %). Naopak některé triacylglyceroly jsou ve vepřovém sádle zastoupeny minimálně. Tristearoyl-glycerol (SSS, č. 122) ve shodě s literaturou^{32,34} nebyl identifikován. Naopak myristoylpalmitoylstearyl-glycerol (MPS, analyt číslo 84, podíl 1,16 %) a myristoyl-oleoylpalmitoyl-glycerol (MOP, analyt číslo 65, podíl 3,17 %) uváděné literaturou^{31,32,34,35} rovněž pro vepřové sádlo zanedbatelné, byly stanoveny ve významnějších podílech.

Triacylglycerolový profil referenčního vzorku králíčího sádla je zobrazen na obr. 9.8b, analyty ve významnějších podílech (nad 1,0 %) eluují mezi 40. a 46. minutou. V nejvyšších podílech byly nalezeny dilinoleoylpalmitoyl-glycerol (LLP, analyt číslo 55) s podílem 7,15 % a myristoyldioleoyl-glycerol v koeluci s oleoylpalmitoylpalmito-oleoyl-glycerolem (MOO + OPPo, analyt číslo 81) s podílem 6,43 %. Srovnáním triacylglycerolových profilů je patrné, že králíčí sádlo oproti vepřovému sádlu obsahuje více těch triacylglycerolů, které obsahují nenasycené mastné kyseliny. Příkladem mohou být trioleoyl-glycerol (OOO, analyt číslo 96, podíl 4,95 %) a dilinoleoyl-oleoyl-glycerol (LLO, analyt číslo 64, podíl 4,81 %). Tyto nenasycené triacylglyceroly eluují zejména mezi 40. a 42. minutou. Narozdíl od vepřového sádla referenční vzorek králíčího sádla obsahuje tripalmitoyl-glycerol (PPP, analyt číslo 85, podíl 3,78 %). Markery charakteristické pro živočišné tuky³¹ palmitoyldistearoyl-glycerol (PSS, analyt číslo 111) a myristoyldipalmitoyl-glycerol (MPP, analyt číslo 54) byly v analyzovaném králíčím sádle nalezeny v podílech kolem 1 %. Tristearoyl-glycerol (SSS, analyt číslo 122) a margaroyl-distearoyl-glycerol (MaSS, analyt číslo 124), které jsou charakteristické pro přežvýkavce³¹⁻³⁴, byly nalezeny v zanedbatelných podílech. Podobně jako v referenčním vzorku vepřového sádla byly v referenčním vzorku králíčího sádla stanoveny v nezanedbatelných podílech dioleoylpalmitoyl-glycerol (OOP, analyt číslo 77, podíl 5,61 %), oleoylpalmitoylstearyl-glycerol (OPS, analyt číslo 93, podíl 1,48 %) a palmitoyldistearoyl-glycerol (PSS, analyt číslo 111, podíl 1,15 %).

V triacylglycerolovém profilu referenčního vzorku másla (obr. 9.8c) se vyskytují analyty ve významnějších podílech (nad 1,0 %) mezi 39. a 46. minutou, čímž se tento profil od profilů ostatních dvou analyzovaných referenčních vzorků poměrně liší. Identifikované triacylglyceroly obsahující krátké uhlíkové řetězce mastných kyselin (8, 10 a 12 atomů uhlíku) jsou pro máslo

charakteristické^{49–51}. Nejvíce zastoupenými triacylglyceroly jsou kaproyloleoylpalmitoylglycerol v koeluci s kaprinoylmyristoyloleoylglycerolem (CyOP + CaMO, analyt číslo 8) s podílem 7,92 % a kaprinoylmyristoylpalmitoylglycerol v koeluci s kaproyldipalmitoylglycerolem (CaMP + CyPP, analyt číslo 7) s podílem 7,22 %.

9.6.2 *Analýza historických pozůstatků mastí z 18. století*

Protože u analyzovaných vzorků historických pozůstatků mastí z 18. století byly známé dobové předpisy pro jejich přípravu (odst. 9.4.1), bylo možné porovnávat zjištěné složení vzorků s teoreticky předepsanými přísadami.

9.6.2.1 Metoda GC-MS screeningu

Pomocí metody GC-MS screeningu bylo možné v analyzovaných vzorcích identifikovat několik skupin analytů: volné mastné kyseliny, mastné alkoholy, alkany, pryskyřice a steroly.

Volné mastné kyseliny

Volné mastné kyseliny identifikované metodou GC-MS screeningu v analyzovaných vzorcích historických pozůstatků mastí uvádí tabulka 9.6. Lipidovou část vzorku charakterizují monokarboxylové mastné kyseliny se sudým počtem atomů uhlíku v rozsahu 8–26 atomů. Monokarboxylové mastné kyseliny s lichým uhlíkovým řetězcem byly identifikovány v počtech 9, 15, 17 a 19 atomů uhlíku. Mezi nenasyčenými mastnými kyselinami byly nalezeny kyseliny tetradecenová, pentadecenová, palmitoolejová, oktadecenová, oktadidecenová, ikosenová, ikosandienová a dokosenová. Mastné kyseliny derivatizované trimethylsilylem byly identifikovány prostřednictvím charakteristických fragmentačních iontů $m/z = 117$, který náleží karboxytrimethylsilylovému iontu, a $m/z = 73$, který je trimethylsilylovým iontem. Dále je v hmotnostním spektru přítomný ion $[M-CH_3]^+$, podle kterého lze identifikovat počet uhlíků v řetězci mastné kyseliny¹⁹.

Podle historického předpisu vzorek H2-4943 neobsahuje lipidový základ. Tomu odpovídá nižší zastoupení mastných kyselin, které byly v tomto vzorku identifikovány. V ostatních analyzovaných vzorcích historických pozůstatků mastí je zastoupeno více mastných kyselin a je proto pravděpodobné, že obsahují lipidový základ, jak odpovídá předpokládanému složení těchto vzorků.

Cerotová kyselina, která byla nalezena ve vzorku H2-4949, je ve větším podílu zastoupena ve včelím vosku⁵². Uvedený vzorek ale podle historického předpisu včelí vosk neobsahuje. Pro včelí vosk jsou rovněž specifické hydroxykyseliny 14-hydroxypalmitová a 15-hydroxypalmitová^{11,12}, které byly identifikovány ve všech vzorcích, kromě vzorku H2-AC. V obou případech lze tedy spekulovat o možné kontaminaci vzorků, například z uzávěru stojatek, kdy mohlo být k ošetření kožených víček používáno včelího vosku.

Dále byly ve všech analyzovaných vzorcích identifikovány dikarboxylové kyseliny azelaová a sebaková, obě kyseliny se vyskytují v rostlinném materiálu. Vzorek H2-4943 obsahuje deriváty

skořicové kyseliny *p*-kumarovou (CASRN 501-98-4) a ferulovou (CASRN 1135-24-6). Obě tyto kyseliny obsahuje celer⁵³, který je uveden v historickém předpisu této masti.

Tabulka 9.6

Identifikace mastných kyselin ve vzorcích historických pozůstatků mastí z 18. století metodou GC-MS screeningu. V tabulce jsou uvedeny: zkrácený zápis mastné kyseliny, její sumární vzorec CASRN, změřené *m/z* molekulového iontu ($[M]^+$) a fragmentových iontů po ztrátě trimethylsilylu ($[M-TMS]^+$), oxymethylsilylu ($[M-OTMS]^+$) a methylu ($[M-CH_3]^+$) a přítomnost analytu ve vzorku. Separace na koloně HP-5MS (stacionární fáze 5% difenyl + 95% dimethyl-polysiloxan, délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, vrstva filmu 0,25 μ m, J&W Scientific, Agilent, USA), nosný plyn helium, $F = 1,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Další podmínky měření jsou uvedeny v odst. 9.5.1.

| sumární vzorec | název kyseliny | CASRN | změřené <i>m/z</i> iontu | | | | přítomnost analytu ve vzorku | | | | | |
|--|----------------------|------------|--------------------------|-------------|--------------|--------------|------------------------------|---------|---------|---------|------------------|-------|
| | | | $[M]^+$ | $[M-TMS]^+$ | $[M-OTMS]^+$ | $[M-CH_3]^+$ | H2-4943 | H2-4946 | H2-4948 | H2-4949 | H2-9293 | H2-AC |
| C ₈ H ₁₆ O ₂ | kaprylová | 124-07-2 | 216 | 143 | 127 | 201 | ne | ne | ano | ano | ano | ano |
| C ₉ H ₁₈ O ₂ | pelargonová | 112-05-0 | 230 | 157 | 141 | 215 | ne | ne | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₀ H ₂₀ O ₂ | kaprinová | 334-48-5 | 244 | 171 | 155 | 229 | ne | ne | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₂ H ₂₄ O ₂ | laurová | 143-07-7 | 256 | 183 | 167 | 241 | ne | ne | ano | ne | ano | ano |
| C ₁₄ H ₂₈ O ₂ | myristová | 544-63-8 | 300 | 227 | 211 | 285 | ne | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₄ H ₂₆ O ₂ | myristolejová | 26444-03-1 | 288 | 215 | 199 | 273 | ne | ne | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₅ H ₃₀ O ₂ | pentadecylová | 1002-84-2 | 314 | 241 | 225 | 299 | ne | ne | ne | ano | ano | ano |
| C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | palmitová | 57-10-3 | 328 | 255 | 239 | 313 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₆ H ₃₀ O ₂ | palmitolejová | 373-49-9 | 326 | 253 | 237 | 311 | ano | ne | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | margarová | 506-12-7 | 342 | 269 | 253 | 327 | ne | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | stearová | 57-11-4 | 356 | 283 | 267 | 341 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₈ H ₃₄ O ₂ | olejová | 112-80-1 | 354 | 281 | 265 | 339 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₈ H ₃₂ O ₂ | linolová | 60-33-3 | 352 | 279 | 263 | 337 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₈ H ₃₀ O ₂ | γ -linolenová | 506-26-3 | 350 | 277 | 261 | 335 | ne | ne | ne | ne | ano ^a | ano |
| C ₁₉ H ₃₈ O ₂ | nonadecylová | 646-30-0 | 370 | 297 | 281 | 355 | ne | ne | ne | ano | ano ^a | ano |
| C ₂₀ H ₄₀ O ₂ | arachidová | 506-30-9 | 384 | 311 | 295 | 369 | ne | ne | ne | ano | ano | ano |
| C ₂₀ H ₃₈ O ₂ | gondoová | 5561-99-9 | 382 | 309 | 293 | 367 | ne | ne | ne | ano | ne | ano |
| C ₂₁ H ₄₂ O ₂ | heneikosylová | 2363-71-5 | 398 | 325 | 309 | 383 | ne | ne | ne | ano | ne | ne |
| C ₂₂ H ₄₄ O ₂ | behenová | 112-85-6 | 412 | 339 | 323 | 397 | ne | ano | ano | ano | ano ^a | ano |
| C ₂₄ H ₄₈ O ₂ | lignocerová | 557-59-5 | 440 | 367 | 351 | 425 | ne | ano | ano | ano | ano | ne |
| C ₂₆ H ₅₂ O ₂ | cerotová | 506-46-7 | 468 | 395 | 379 | 453 | ne | ne | ne | ano | ne | ne |
| C ₁₆ H ₃₂ O ₃ | 14-hydroxypalmitová | 59642-38-5 | 416 | – | – | 401 | ano | ano | ano | ano | ano | ne |
| C ₁₆ H ₃₂ O ₃ | 15-hydroxypalmitová | 4552-17-4 | 416 | – | – | 401 | ano | ano | ano | ano | ano | ne |
| C ₉ H ₁₆ O ₄ | azealová | 123-99-9 | 332 | – | – | 317 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₀ H ₁₈ O ₄ | sebaková | 111-20-6 | 346 | – | – | 331 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₉ H ₈ O ₃ | <i>p</i> -kumarová | 501-98-4 | 338 | – | 249 | 323 | ano | ne | ne | ne | ne | ne |
| C ₁₀ H ₁₀ O ₄ | ferulová | 1135-24-6 | 308 | – | 219 | 293 | ano | ne | ne | ne | ne | ne |

^anízká intenzita signálu

Alkany a alkoholy

Metodou GC-MS screeningu byly rovněž identifikovány alkany s délkou uhlíkového řetězce 24–29 a 31 atomů (tabulka 9.7) a alkoholy se sudým počtem uhlíků v rozsahu 22–32 (tabulka 9.8). Alkany byly identifikovány na základě knihovny spekter podle molekulového iontu a charakteristického tvaru spektra. Alkoholové deriváty obsahující trimethylsililovou skupinu byly identifikovány podle charakteristických iontů ve shodě s literaturou⁸. Ion $m/z = 73$ přísluší trimethylsilylu a $m/z = 103$ pak iontu methoxytrimethylsilylu. Dále je ve spektru typický ion $[M-CH_3]^+$ příslušející molekule alkoholu po ztrátě methylu v trimethylsilylové skupině⁸.

Všechny takto identifikované analyty jsou běžné pro rostlinné epikutikulární, živočišné i včelí vosky⁵⁴. Lze proto předpokládat, že všechny vzorky, kromě vzorku H2-AC, obsahují vosk, což je v souladu s výše uvedeným.

Tabulka 9.7

Identifikace alkanů ve vzorcích historických pozůstatků mastí z 18. století metodou GC-MS screeningu. Sumární vzorec, název, CASRN, m/z molekulového iontu a přítomnost analytu ve vzorku. Separace na koloně HP-5MS (stacionární fáze 5% difenyl + 95% dimethyl-polysiloxan, délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, vrstva filmu 0,25 μm , J&W Scientific, Agilent, USA), nosný plyn helium, $F = 1,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Další podmínky měření jsou uvedeny v odst. 9.5.1.

| sumární vzorec | název | CASRN | m/z iontu [M] ⁺ | přítomnost analytu ve vzorku | | | | | |
|---------------------------------|---------------|----------|---------------------------------|------------------------------|---------|---------|---------|---------|-------|
| | | | | H2-4943 | H2-4946 | H2-4948 | H2-4949 | H2-9293 | H2-AC |
| C ₂₄ H ₅₀ | tetrakosan | 646-31-1 | 338 | ne | ano | ne | ne | ne | ne |
| C ₂₅ H ₅₂ | pentakosan | 629-99-2 | 352 | ano | ano | ano | ne | ano | ne |
| C ₂₆ H ₅₄ | hexakosan | 630-01-3 | 366 | ano | ano | ano | ne | ne | ne |
| C ₂₇ H ₅₆ | heptakosan | 593-49-7 | 380 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₂₈ H ₅₈ | oktakosan | 630-02-4 | 394 | ne | ano | ne | ne | ne | ne |
| C ₂₉ H ₆₀ | nonakosan | 630-03-5 | 408 | ano | ano | ano | ano | ano | ne |
| C ₃₁ H ₆₄ | hentriakontan | 630-04-6 | 436 | ano | ne | ano | ano | ne | ne |

Tabulka 9.8

Identifikace alifatických mastných alkoholů ve vzorcích historických pozůstatků mastí z 18. století metodou GC-MS screeningu. Sumární vzorec, název, CASRN, m/z iontu alkoholu derivatizovaného trimethylsilylem po ztrátě methylu a přítomnost analytu ve vzorku. Separace na koloně HP-5MS (stacionární fáze 5% difenyl + 95% dimethyl-polysiloxan, délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, vrstva filmu 0,25 μm , J&W Scientific, Agilent, USA), nosný plyn helium, $F = 1,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Další podmínky měření jsou uvedeny v odst. 9.5.1.

| sumární vzorec | název | CASRN | m/z iontu [M+TMS-CH ₃] ⁺ | přítomnost analytu ve vzorku | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------|-----------|--|------------------------------|---------|---------|---------|---------|-------|
| | | | | H2-4943 | H2-4946 | H2-4948 | H2-4949 | H2-9293 | H2-AC |
| C ₂₂ H ₄₆ O | dokosan-1-ol | 661-19-8 | 384 | ne | ano | ne | ne | ne | ne |
| C ₂₄ H ₅₀ O | tetrakosan-1-ol | 506-51-4 | 412 | ano | ano | ano | ne | ano | ne |
| C ₂₆ H ₅₈ O | hexakosan-1-ol | 506-52-5 | 440 | ano | ano | ano | ano | ano | ne |
| C ₂₈ H ₅₈ O | oktakosan-1-ol | 557-61-9 | 468 | ano | ano | ano | ano | ano | ne |
| C ₃₀ H ₆₂ O | triakontan-1-ol | 593-50-0 | 496 | ano | ano | ano | ano | ano | ne |
| C ₃₂ H ₆₆ O | dotriakontan-1-ol | 6624-79-9 | 524 | ano | ano | ano | ano | ano | ne |

Pryskyřice

Čtvrtou skupinou látek, kterou bylo možné prokázat pomocí GC-MS screeningu jsou pryskyřice. Ve shodě s literaturou^{16,55} byly skrze charakteristický fragmentační ion a podle knihovny spekter identifikovány v analyzovaných vzorcích kyseliny charakteristické pro pryskyřice z čeledi *Pinaceae* (borovicovité). Jak vyplývá z výsledků uvedených v tabulce 9.9, vzorky H2-4943, H2-4949 a H2-9293 obsahují isopimarovou a pimarovou kyselinu a několik produktů oxidace abietové kyseliny. Vzorek H2-4943 byl podle dobového předpisu neměl obsahovat žádnou příměs pryskyřic. Přítomnost mnoha markerů pryskyřic ale dokazuje, že tento předpis nebyl dodržen a byl pravděpodobně pozměněn. Vzorek H2-4949 obsahuje podle dobového předpisu vedle vepřového sádla především listy rostlin a pupeny topolu. Podle literatury může být právě topol zdrojem 7-oxodehydroabietové kyseliny⁵⁶ a pimarové kyseliny⁵⁷, čímž se vysvětluje jejich přítomnost ve vzorku. Vzorek H2-9293 obsahuje podle dobového předpisu mnoho pryskyřic, mezi nimi i kalafunu nebo benátský terpentýn, které se připravují z rostlin čeledi *Pinaceae*. Vzorky H2-4946 a H2-4948 obsahují pouze jeden oxidační produkt abietové kyseliny a vzorek H2-AC neobsahuje žádné markery pryskyřic. V případě vzorků H2-4946 a H2-4948 jde pravděpodobně o kontaminaci. Vzorek H2-AC by podle historického předpisu neměl, v souladu s experimentálním zjištěním, žádné pryskyřice obsahovat.

Tabulka 9.9

Identifikace markerů pryskyřic ve vzorcích historických pozůstatků mastí z 18. století metodou GC-MS screeningu. Sumární vzorec, název, CASRN, *m/z* diagnostických iontů analytu derivatizovaného trimethylsilylem a přítomnost analytu ve vzorku. Separace na koloně HP-5MS (stacionární fáze 5% difenyl + 95% dimethyl-polysiloxan, délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, vrstva filmu 0,25 μm, J&W Scientific, Agilent, USA), nosný plyn helium, $F = 1,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Další podmínky měření odst. 9.5.1.

| sumární vzorec | název kyseliny | CASRN | diagnostické ionty, <i>m/z</i> | přítomnost analytu ve vzorku | | | | | |
|--|---------------------------|------------|--------------------------------|------------------------------|---------|---------|---------|---------|-------|
| | | | | H2-4943 | H2-4946 | H2-4948 | H2-4949 | H2-9293 | H2-AC |
| C ₂₀ H ₂₆ O ₃ | 7-oxodehydroabietová | 18684-55-4 | 253 | ano | ne | ano | ano | ano | ne |
| C ₂₀ H ₂₈ O ₂ | dehydroabietová | 1740-19-8 | 239 | ano | ano | ne | ano | ano | ne |
| C ₂₀ H ₃₀ O ₂ | isopimarová | 5835-26-7 | 241 | ano | ne | ne | ano | ano | ne |
| C ₂₀ H ₃₀ O ₂ | pimarová | 127-27-5 | 121; 257; 359 | ano | ne | ne | ano | ano | ne |
| C ₂₀ H ₂₈ O ₃ | 15-hydroxydehydroabietová | 54113-95-0 | 342 | ano | ne | ne | ne | ano | ne |
| C ₂₀ H ₃₀ O ₂ | abietová | 514-10-3 | 256 | ano | ne | ne | ne | ne | ne |

Steroly

Poslední skupinou látek, které bylo možné pomocí GC-MS screeningu v analyzovaných vzorcích identifikovat, byly steroly (tabulka 9.10). Ve všech studovaných vzorcích byl nalezen cholesterol, který indikuje živočišné materiály. Přítomnost cholesterolu lze ale také vysvětlit kontaminací při používání mastí. Sitosterol byl nalezen ve vzorcích H2-4943, H2-4949 a H2-9293, což v souladu s dobovými předpisy poukazuje na použití rostlinných materiálů. Vzorek H2-9293 obsahuje navíc deriváty androstenonu a estratrienonu. Podle dobového předpisu byla tato mast připravena z lidského sádla, které může být zdrojem zmíněných sterolů.

Tabulka 9.10

Identifikace sterolů ve vzorcích historických pozůstatků mastí z 18. století metodou GC-MS screeningu. Sumární vzorec, název, CASRN, m/z diagnostických iontů analytu derivatizovaného trimethylsilylem a přítomnost analytu ve vzorku. Separace na koloně HP-5MS (stacionární fáze 5% difenyl + 95% dimethyl-polysiloxan, délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, vrstva filmu 0,25 μm , J&W Scientific, Agilent, USA), nosný plyn helium, $F = 1,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Další podmínky měření odst. 9.5.1.

| sumární vzorec | název | CASRN | diagnostické ionty, m/z | přítomnost analytu ve vzorku | | | | | |
|---|-----------------------------------|------------|---------------------------|------------------------------|---------|---------|---------|---------|-------|
| | | | | H2-4943 | H2-4946 | H2-4948 | H2-4949 | H2-9293 | H2-AC |
| C ₂₇ H ₄₆ O | cholesterol | 57-88-5 | 329; 129; 168; 458 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₂₉ H ₅₀ O | sitosterol | 83-46-5 | 357; 396 | ano | ne | ne | ano | ano | ne |
| C ₁₉ H ₂₈ O ₃ | 16 α -hydroxy-testosteron | 63-01-4 | 143; 225; 448 | ne | ne | ne | ne | ano | ne |
| C ₁₉ H ₂₆ O ₃ | 7 α -hydroxy-androstendion | 62-84-0 | 359; 374 | ne | ne | ne | ne | ano | ne |
| C ₂₀ H ₂₇ NO ₃ | derivát estratrienonu | 69833-94-9 | 401; 372 | ne | ne | ne | ne | ano | ne |

9.6.2.2 Analýza těkavých látek metodou SPME-GC-MS

Metodou SPME-GC-MS bylo v analyzovaných historických pozůstatcích mastí z 18. století identifikováno mnoho těkavých organických sloučenin. Příklad získaného chromatogramu pro vzorek H2-AC je uveden na obr. 9.9. Identifikované látky ve všech analyzovaných vzorcích jsou souhrnně uvedeny v tabulce 9.11. Řada z identifikovaných látek je velmi obecná a vyskytuje se v mnoha materiálech přírodního původu.

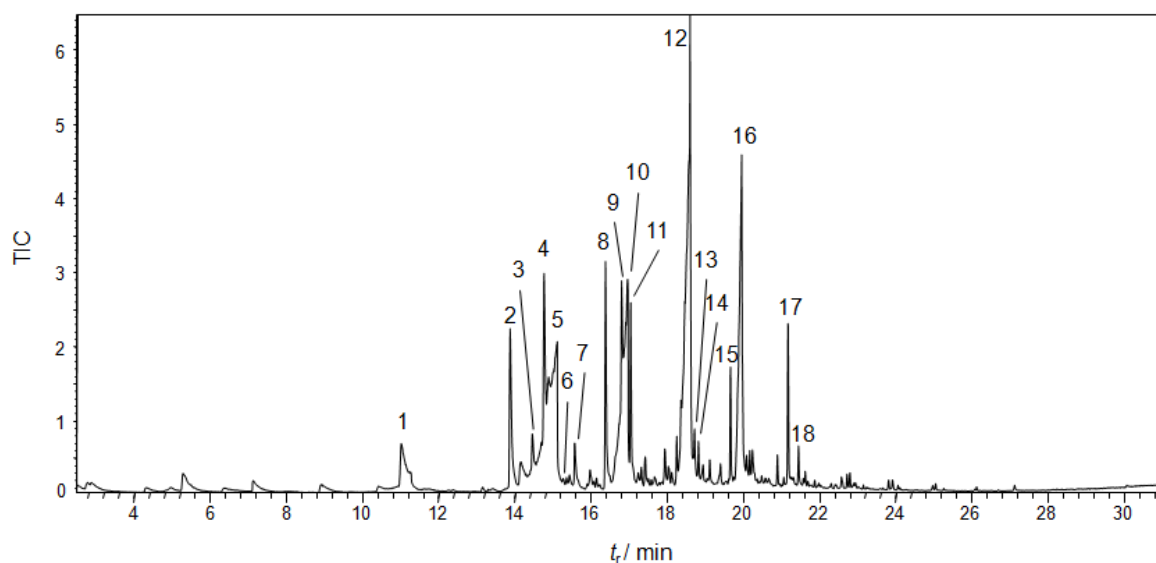
Nálezu markerů včelího vosku metodou GC-MS screeningu (odst. 9.6.2.1) by odpovídala identifikace hexanalů, heptanalů a nonanalů ve vzorcích H2-4946, H2-4948 a H2-9293, protože tyto alkany se vyskytují ve včelím vosku²⁰. Přestože jsou tyto látky běžné i v ovzduší²¹, byly nalezeny pouze v těchto třech vzorcích, lze je proto považovat za možné indikátory přítomnosti včelího vosku.

Podle dobových předpisů jsou pryskyřice obsažené pouze ve vzorcích H2-4946 a H2-9293. Pryskyřice jehličnanů, zejména pak borové obsahují α -pinen⁵⁸, který byl ale identifikován jen ve vzorku H2-4949. Jak bylo uvedeno v odst. 9.6.2.1, ačkoliv tento vzorek podle dobového předpisu neobsahuje borové pryskyřice, mohou pryskyřičné látky pocházet z pupenů topolu. Pupeny topolu jsou pravděpodobně i zdrojem 3-thujen-2-olu, identifikovaném v tomto vzorku.

Přítomnost α -terpineolu, který se nachází v pryskyřicích olibanum a labdanum²², ve vzorku H2-4943 podporuje hypotézu vyslovenou výše v odst. 9.6.2.1, že oproti dobovému předpisu obsahuje tento vzorek pryskyřice. Dalším pozitivním nálezem v tomto směru je i identifikace borneolu v tomto vzorku.

Borneol a strukturně blízký kafr jsou rovněž obsaženy ve vzorcích H2-4946 a H2-9293, jejich zdrojem jsou použité rostlinné ingredience. V případě vzorku H2-4946 by to mohly být citrusové plody, které obě látky obsahují⁵⁹.

Zdrojem kaprylové kyseliny, prokázané v podstatném zastoupení ve vzorcích H2-4948, a H2-AC jsou bezesporu lipidy v těchto vzorcích obsažené.



Obř. 9.9 SPME-GC-MS chromatogram vzorku H2-AC. Identifikace analytů: (1) heptanal, (2) heptanol, (3) oktan-2-on, (4) oktanal, (5) kapronová kyselina, (6) D-limonen, (7) 5-ethyl-2(5*H*)-furanon, (8) pentylyklopropan, (9) nonan-2-on, (10) enanthová kyselina, (11) nonanal, (12) kaprylová kyselina, (13) pentadekan, (14) dekanal, (15) 5-butyldihydro-2(3*H*)-furanon, (16) pelargonová kyselina, (17) dihydro-5-pentyl-2(3*H*)-furanon, (18) methy-3-hydroxystearát. Mikroextrakce na vláknu Stable Flex Divinylbenzen/Carboxen/PDMS (Supelco, USA). Separace na koloně HP-5MS (stacionární fáze 5% difenyl + 95% dimethyl-polysiloxan, délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, vrstva filmu 0,25 μm , J&W Scientific, Agilent, USA), nosný plyn helium, $F = 1,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Další podmínky měření v odst. 9.5.2.

Tabulka 9.11

Identifikace a kvantifikace těkavých organických látek ve vzorcích historických pozůstatků mastí z 18 století metodou SPME-GC-MS. Retenční čas, název, sumární vzorec, CASRN a podíl analytu ve vzorcích. Mikroextrakce na vláknu Stable Flex Divinylbenzen/Carboxen/PDMS (Supelco, USA). Separace na koloně HP-5MS (stacionární fáze 5% difenyl + 95% dimethyl-polysiloxan, délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, vrstva filmu 0,25 μm , J&W Scientific, Agilent, USA), nosný plyn helium, $F = 1,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Další podmínky měření v odst. 9.5.2.

| t_r / min | název | sumární vzorec | CASRN | podíl / % | | | | | |
|-------------|-----------------------------------|--------------------------------------|------------|-----------|---------|---------|---------|---------|-------|
| | | | | H2-4943 | H2-4946 | H2-4948 | H2-4949 | H2-9293 | H2-AC |
| 5,04 | másečná kyselina | $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ | 107-92-6 | – | 1,2 | – | – | – | – |
| 5,35 | hexanal | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}$ | 66-25-1 | – | 3,1 | 1,5 | 1,8 | 3,0 | – |
| 11,01 | heptanal | $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}$ | 111-71-7 | – | 7,6 | 3,3 | – | 3,1 | 3,5 |
| 11,68 | methoxyfenyloxim | $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$ | 67160-14-9 | – | – | 0,7 | – | – | – |
| 12,39 | 1 <i>R</i> - α -pinen | $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$ | 80-56-8 | – | – | – | 1,1 | – | – |
| 13,15 | 3-thujen-2-ol, stereoisomer | $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$ | 3310-03-0 | 2,8 | – | – | 13,9 | 4,4 | – |
| 13,39 | benzaldehyd | $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}$ | 100-52-7 | – | – | – | – | 0,6 | – |
| 13,88 | heptanol | $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{O}$ | 111-70-6 | – | – | 4,0 | 0,9 | – | 4,1 |
| 14,47 | 2-pentylfuran | $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}$ | 3777-69-3 | 2,2 | – | – | 6,7 | – | – |
| 14,47 | oktan-2-on | $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}$ | 111-13-7 | – | 1,9 | – | – | 1,5 | 1,7 |
| 14,77 | oktanal | $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}$ | 124-13-0 | – | 18,5 | 5,8 | 2,4 | 10,2 | 6,6 |
| 14,87 | kapronová kyselina | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2$ | 142-62-1 | – | – | 5,6 | – | – | 4,6 |
| 14,89 | 1,2-dichlorobenzen | $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$ | 95-50-1 | 5,4 | – | – | 3,2 | 1,6 | – |
| 15,28 | 1-methyl-4-(1-methyl-ethyl)benzen | $\text{C}_{10}\text{H}_{14}$ | 99-87-6 | – | 0,7 | – | 1,7 | 0,6 | – |
| 15,38 | D-limonen | $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$ | 5989-27-5 | – | 0,5 | – | – | 0,5 | 0,2 |
| 15,59 | 5-ethyl-2(5 <i>H</i>)-furanon | $\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_2$ | 22122-36-7 | – | – | – | – | – | 1,2 |
| 15,60 | ethylcyklohexan | C_8H_{16} | 1678-91-7 | – | – | – | 1,0 | – | – |

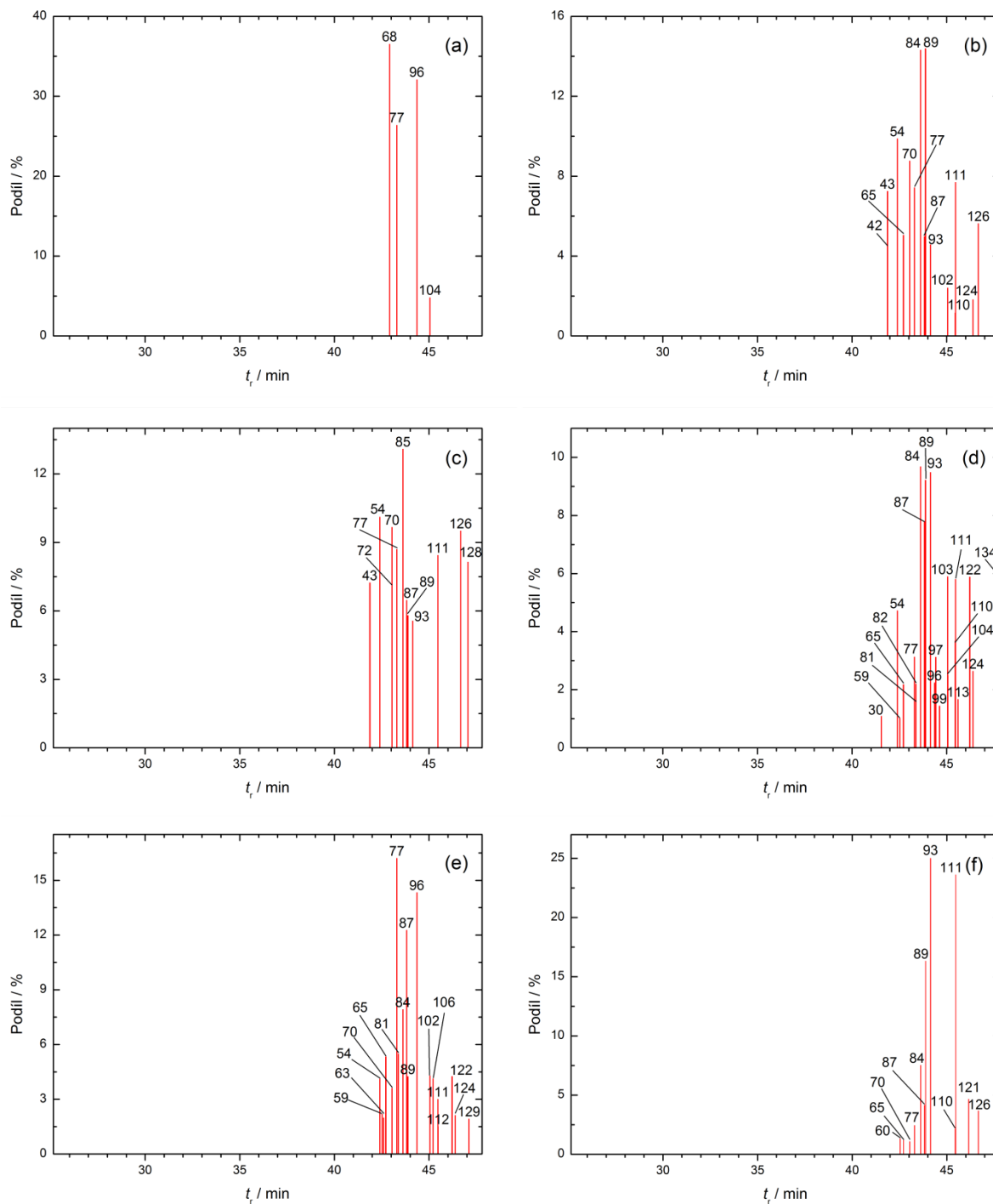
Tabulka 9.11 pokračuje na další straně.

Pokračování tabulky 9.11 z předchozí strany.

| t_r / min | název | sumární vzorec | CASRN | podíl / % | | | | | |
|-----------------|---|--|------------|-----------|---------|---------|---------|---------|-------|
| | | | | H2-4943 | H2-4946 | H2-4948 | H2-4949 | H2-9293 | H2-AC |
| 16,37 | oktan-1-ol | C ₈ H ₁₈ O | 111-87-5 | – | 6,5 | 5,4 | – | 1,0 | – |
| 16,39 | pentylcyklopropan | C ₈ H ₁₆ | 2511-91-3 | – | – | – | – | – | 4,5 |
| 16,70 | enantiová kyselina | C ₇ H ₁₄ O ₂ | 111-14-8 | – | 3,4 | 5,0 | – | – | 5,9 |
| 16,72 | 1-methyl-4-(1-methyl- -ethenyl)-benzen | C ₁₀ H ₁₂ | 1195-32-0 | 1,4 | – | – | 2,2 | – | – |
| 16,81 | nonan-2-on | C ₉ H ₁₈ O | 821-55-6 | – | 1,7 | 4,7 | 1,4 | – | 5,1 |
| 17,05 | nonanal | C ₉ H ₁₈ O | 124-19-6 | – | 11,0 | 2,1 | 2,0 | 32,9 | 3,4 |
| 17,43 | 2-(1-methylethyliden)- -cyklohexanon | C ₉ H ₁₄ O | 13747-73-4 | – | 1,9 | 2,1 | – | – | – |
| 17,69 | 6,6-dimethyl- bicyklo[3.1.1]heptan-3-ol | C ₉ H ₁₆ O | 28664-09-7 | – | – | – | 2,9 | 2,9 | – |
| 17,68 | 2-piperidinmethylamin | C ₆ H ₁₄ N ₂ | 22990-77-8 | – | 0,4 | – | – | – | – |
| 17,79 | (1S)-1,7,7-trimethyl- -bicyklo[2.2.1]heptan-2-on | C ₁₀ H ₁₆ O | 464-48-2 | 1,3 | – | – | – | – | – |
| 17,81 | kafr | C ₁₀ H ₁₆ O | 76-22-2 | – | 1,4 | – | – | – | – |
| 17,95 | dihydro-5-propyl-2(3H)- -furanon | C ₇ H ₁₂ O ₂ | 105-21-5 | – | – | 1,1 | – | – | – |
| 18,19 | borneol | C ₁₀ H ₁₈ O | 507-70-0 | 3,0 | 0,6 | – | – | 2,5 | – |
| 18,37 | terpinen-4-ol | C ₁₀ H ₁₈ O | 562-74-3 | 3,4 | – | – | – | – | – |
| 18,40 | kaprylová kyselina | C ₈ H ₁₆ O ₂ | 127-07-2 | – | 4,9 | 16,2 | – | – | 16,7 |
| 18,60 | α -terpineol | C ₁₀ H ₁₈ O | 98-55-5 | 11,6 | – | – | – | – | – |
| 18,63 | dekan-2-on | C ₁₀ H ₂₀ O | 693-54-9 | – | 1,2 | – | 1,4 | – | – |
| 18,72 | dodekan | C ₁₂ H ₂₆ | 112-40-3 | – | – | – | 1,1 | – | – |
| 18,73 | pentadekan | C ₁₅ H ₃₂ | 692-62-9 | – | – | – | – | – | 1,0 |
| 18,83 | dekanal | C ₁₀ H ₂₀ O | 112-31-2 | – | – | – | – | – | 0,7 |
| 18,93 | neidentifikováno | – | – | – | – | – | 5,0 | 4,8 | – |
| 19,05 | (E)-car-2-en-4-ol | C ₁₀ H ₁₆ O | 4017-82-7 | – | – | – | – | 0,7 | – |
| 19,61 | 4-methoxybenzaldehyd | C ₈ H ₈ O ₂ | 123-11-5 | – | – | – | – | 0,7 | – |
| 19,66 | 5-butyldihydro-2(3H)- -furanon | C ₈ H ₁₄ O ₂ | 104-50-7 | – | 2,4 | 2,3 | – | – | 2,1 |
| 19,82 | pelargonová kyselina | C ₉ H ₁₈ O ₂ | 112-05-0 | – | 1,9 | 7,7 | – | – | 11,0 |
| 20,24 | benzocykloheptatrien | C ₁₁ H ₁₀ | 264-09-5 | – | – | – | 1,0 | – | – |
| 21,18 | dihydro-5-pentyl-2(3H)- -furanon | C ₉ H ₁₆ O ₂ | 104-61-0 | – | 2,6 | 2,6 | – | – | 3,5 |
| 21,42 | α -kopaen | C ₁₅ H ₂₄ | 3856-25-5 | 2,1 | – | – | – | – | – |
| 21,46 | methy-3-hydroxystearát | C ₁₉ H ₃₈ O ₃ | 2420-36-2 | – | – | – | – | – | 0,8 |
| 21,63 | neidentifikováno | – | – | – | – | – | 2,2 | – | – |
| 21,80 | epizonaren | C ₁₅ H ₂₄ | 41702-63-0 | 3,7 | – | – | – | – | – |
| 21,88 | neidentifikováno | – | – | 17,8 | – | – | – | – | – |
| 22,75 | neidentifikováno | – | – | – | – | – | 2,4 | – | – |
| 22,92 | eduesma-4(14)-11-dien | C ₁₅ H ₂₄ | 17066-67-0 | – | – | – | 2,7 | – | – |
| 23,04– 23,34 | naftalenové deriváty | – | – | 5,6 | – | – | 1,1 | – | – |

9.6.2.3 Charakterizace triacylglycerolů metodou RP-HPLC-MS²

Metodou HPLC-MS² byl pro každý studovaný vzorek historických pozůstatků mastí z 18. století sestaven příslušný triacylglycerolový profil (obr. 9.10). Jednotlivé analyty jsou identifikovány v tabulce 9.5.



Obr. 9.10 Triacylglycerolové profily analyzovaných historických pozůstatků mastí z 18. století, vzorky (a) H2-4943, (b) H2-4948, (c) H2-4946, (d) H2-4949, (e) H2-9293, (f) H2-AC. Identifikace jednotlivých triacylglycerolů uvedena v tabulce 9.5 Separace na koloně Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18 (3,0×75 mm; velikost částic 2,7 μm), teplota kolony 45 °C. Mobilní fáze: methanol (solvent A) a isopropanol (solvent B), $F=0,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, gradientová eluce (popsána v odst. 9.5.3).

Ve vzorku H2-4943 bylo podle jeho triacylglycerolového profilu (obr. 9.10a) identifikováno pouze několik triacylglycerolů, což naznačuje v souladu s dobovým předpisem absenci lipidového základu. Přítomnost identifikovaných triacylglycerolů může být způsobena kontaminací vzorku.

Ve vzorku H2-4946 byla podle jeho triacylglycerolového profilu (obr. 9.10c) prokázána přítomnost vepřového sádla. Přítomnost tohoto živočišného tuku indikují myristoyldipalmitoylglycerol (MPP, analyt číslo 54, podíl 10,11 %) a palmitoyldistearoylglycerol (PSS, analyt číslo 111, podíl 8,44 %)³¹. Vzorek dále obsahuje vysoký podíl arachidoylpalmitoylstearyl glycerolu (APS, analyt číslo 126, podíl 9,51 %), který je přímo označován jako marker vepřového sádla³¹. Pro vepřové sádlo je rovněž charakteristický⁵ vysoký podíl dioleoylpalmitoylglycerolu (OOP, analyt číslo 77, podíl 8,70 %), oleoylpalmitoylstearyl glycerolu (OPS, analyt číslo 93, podíl 5,56 %) a palmitoyldistearoylglycerolu (PSS, analyt číslo 111, podíl 8,44 %), které byly nalezeny ve významných podílech. Zároveň vepřové sádlo obsahuje zanedbatelný podíl myristoylpalmitoylstearyl glycerolu (MPS, analyt číslo 84) a myristoyloleoylpalmitoylglycerolu (MOP, analyt číslo 65)^{31,32,34,35}, čemuž odpovídá skutečnost, že obě látky nebyly v analyzovaném vzorku H2-4946 identifikovány.

Ve vzorku H2-4948 naznačuje jeho triacylglycerolový profil (obr. 9.10b) přítomnost kombinace vepřového sádla a tuku přežvýkavců. Přítomnost živočišného tuku naznačují myristoyldipalmitoylglycerol (MPP, analyt číslo 54, podíl 9,88 %) a palmitoyldistearoylglycerol (PSS, analyt číslo 111, podíl 7,70 %)³¹. Vzorek dále vykazuje poměrně vysoký podíl arachidoylpalmitoylstearyl glycerolu (APS, analyt číslo 126, podíl 5,64 %) typického pro vepřové sádlo³¹. Zároveň však obsahuje nezanedbatelné množství margaroyldistearoylglycerolu (MaSS, analyt číslo 124, podíl 1,82 %), který je markerem tuku přežvýkavců³¹. Rovněž byly nalezeny triacylglyceroly, které vepřové sádlo obsahuje ve vyšších podílech: dioleoylpalmitoylglycerol (OOP, analyt číslo 77, podíl 7,43 %), oleoylpalmitoylstearyl glycerol (OPS, analyt číslo 93, podíl 4,57 %) a palmitoyldistearoylglycerol (PSS, analyt číslo 111, podíl 7,70 %)⁵. Vepřové sádlo zároveň ale obsahuje minimální podíl^{31,32,34,35} myristoylpalmitoylstearyl glycerolu (MPS, analyt číslo 84, podíl 14,32 %) a myristoyloleoylpalmitoylglycerolu (MOP, analyt číslo 65, podíl 5,05 %), přesto byly obě látky ve vzorku H2-4948 nalezeny ve významných koncentracích. Tristearoylglycerol se vyskytuje v tuku přežvýkavců, v tuku nepřežvýkavců je jeho podíl nízký a ve vepřovém sádle se nevyskytuje vůbec³²⁻³⁴. Tristearoylglycerol (SSS, analyt číslo 122) nebyl ve vzorku historického pozůstatku masti nalezen. Vzorek historického pozůstatku masti obsahuje poměrně vysoký podíl trilinoleoylglycerolu (LLL, analyt číslo 43, podíl 7,25 %), který je charakteristický pro rostlinný olej. Absence dalších nenasycených triacylglycerolů může znamenat, že jde o kontaminaci.

Ve vzorku H2-4949 indikuje jeho triacylglycerolový profil (obr. 9.10d) přítomnost směsi živočišného tuku pocházejícího pravděpodobně z přežvýkavců a rostlinného oleje (nejspíše olivového). Živočišnému tuku odpovídá přítomnost myristoyldipalmitoylglycerolu (MPP, analyt číslo 54, podíl 4,73 %) a palmitoyldistearoylglycerolu (PSS, analyt číslo 111, podíl 5,81 %)³¹. Vysoký podíl tristearoylglycerolu (SSS, analyt číslo 122, podíl 5,88 %)^{32,34} a margaroyldistearoylglycerolu (MaSS, analyt číslo 124, podíl 2,64 %)³¹ naznačují tuk přežvýkavců. Vyšší podíly dioleoylpalmitoylglycerolu (OOP, analyt číslo 77, podíl 3,13 %), oleoylpalmitoylstearyl glycerolu (OPS, analyt číslo 93, podíl 9,49 %) a palmitoyldistearoylglycerolu (PSS, analyt číslo 111, podíl 5,81 %) ale naznačují vepřové sádlo⁵. Provepřové sádlo charakteristický arachidoylpalmitoylstearyl glycerol (APS, analyt číslo 126)³¹ ale nebyl identifikován. Rovněž nezanedbatelné podíly myristoylpalmitoylstearyl glycerolu (MPS, analyt číslo 84, podíl 9,68 %) a myristoyloleoylpalmitoylglycerolu (MOP, analyt číslo 65, podíl 2,18 %) nejsou pro vepřové sádlo

typické^{31,32,34,35}. Vzorek historického pozůstatku masti obsahuje také některé nenasycené triacylglyceroly, z nichž je nejvíce zastoupený trioleoylglycerol (OOO, analyt číslo 96, podíl 2,24 %). Tento triacylglycerol je součástí olivového oleje^{5,29}.

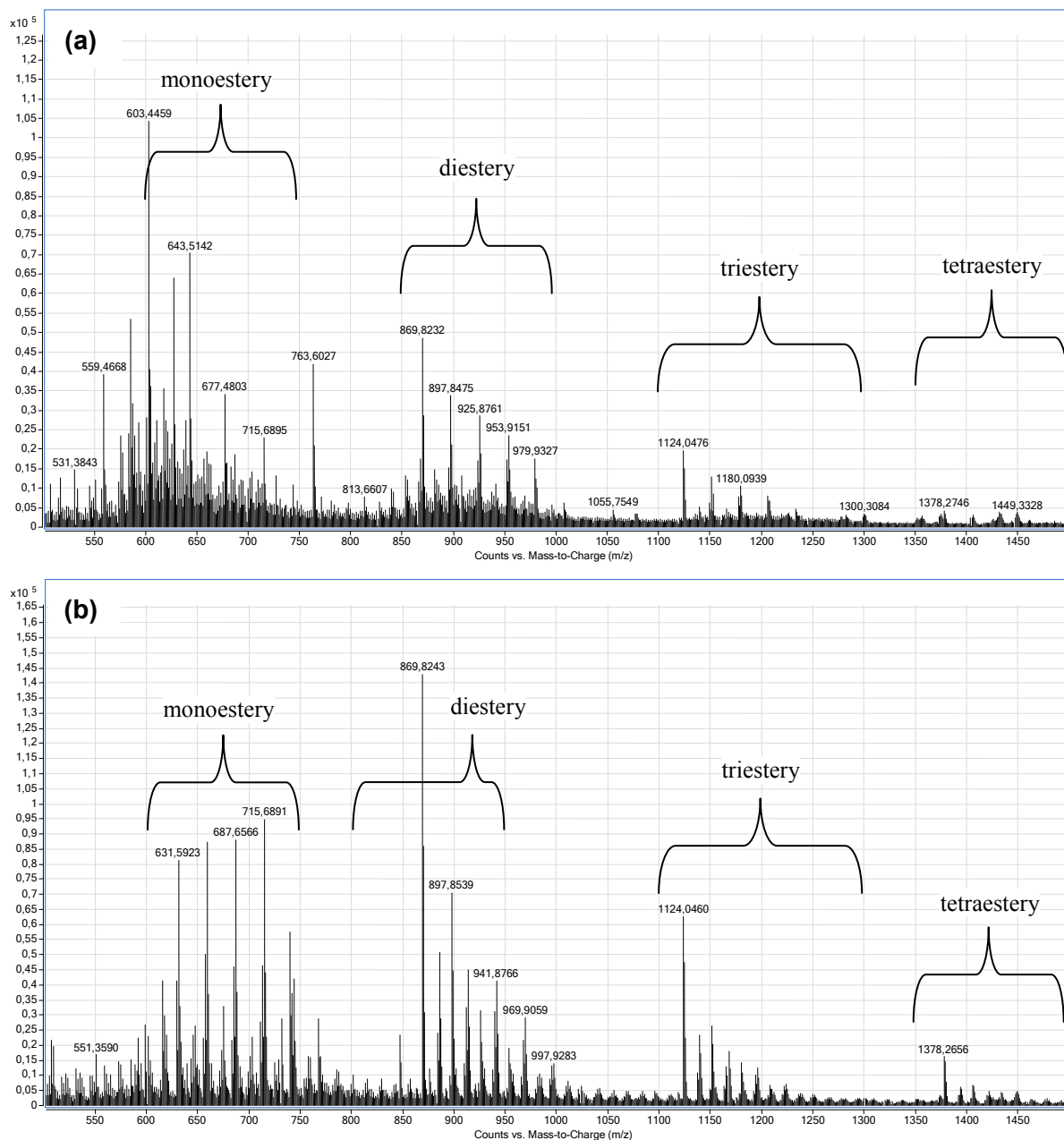
Ve vzorku H2-9293 naznačuje jeho triacylglycerolový profil (obr. 9.10e) v souladu s dobovým předpisem přítomnost rostlinných olejů s příměsí tuku přežvýkavců, případně i tuku lidského. Přítomnost živočišného tuku indikují myristoyldipalmitoylglycerol (MPP, analyt číslo 54, podíl 4,12 %) a palmitoyldistearoylglycerol (PSS, analyt číslo 111, podíl 3,01 %)³¹. Přítomnost margaroyldistearoylglycerolu (MaSS, analyt číslo 124, podíl 2,12 %)³¹ a zároveň tristearoylglycerolu (SSS, analyt číslo 122, podíl 4,26 %)³²⁻³⁴ poukazuje na tuk přežvýkavců. Přítomnost nenasyceného trioleoylglycerolu (OOO, analyt číslo 96, podíl 14,33 %) spolu s dalšími nenasycenými triacylglyceroly naznačuje rostlinný olej, například olivový^{5,60}, nebo slunečnicový, který se používal pro přípravu třezalkového oleje⁶¹. Olivový olej obsahuje také nezanedbatelný podíl dioleoylstearoylglycerolu⁵ (OOS, analyt číslo 102, podíl 4,30 %), který byl ve studovaném vzorku historického pozůstatku masti identifikován. Olivový olej ale neobsahuje vysoký podíl oleoyldipalmitoylglycerolu (OPP, analyt číslo 87, podíl 12,27 %), který je spíše charakteristický pro palmový olej. Palmový olej ale obsahuje také tripalmitoylglycerol (PPP, analyt číslo 85), který nebyl identifikován. Saliu a kol.⁵ analyzovali historické pozůstatky třezalkového oleje (*Oleum hyperici*) a našli kromě nenasycených triacylglycerolů také palmitoyldistearoylglycerol (PSS), který odkazuje vedle rostlinných olejů na příměs živočišného tuku. Je tedy možné, že součástí třezalkového oleje, který byl jednou z ingrediencí studovaného vzorku historického pozůstatku masti, mohl být tuk přežvýkavců. Vysoké podíly nenasycených dioleoylpalmitoylglycerolu (OOP, analyt číslo 77, podíl 16,22 %), linoleoylloleoylpalmitoylglycerolu (LOP, analyt číslo 59, podíl 2,19 %) a výše zmíněného trioleoylglycerolu ale také mohou mít původ v lidském tuku⁶², který by měl být podle dobového předpisu přítomen.

Vzorek H2-AC, historického pozůstatku sádla divokého králíka, podle svého triacylglycerolového profilu (obr. 9.10f) obsahuje myristoyldipalmitoylglycerol v koeluci s palmitoyldipentadecoylglycerolem (MPP + PPaPa, analyt číslo 60, podíl 1,34 %) a palmitoyldistearoylglycerol (PSS, analyt číslo 111, podíl 23,62 %), které jsou charakteristické pro živočišný tuk³¹. Vysoký podíl druhého jmenovaného triacylglycerolu je charakteristický pro vepřové sádlo společně s vyššími podíly dioleoylpalmitoylglycerolu (OOP, analyt číslo 77, podíl 2,45 %) a oleoylpalmitoylstearoylglycerolu (OPS, analyt číslo 93, podíl 25,02 %). Identifikovaný arachidoylpalmitoylstearoylglycerol (APS, analyt číslo 126, podíl 3,68 %) je charakteristickým markerem pro vepřové sádlo³¹. Vepřové sádlo obsahuje zanedbatelné množství myristoylloleoylpalmitoylglycerolu (MOP, č. 65, podíl 1,19 %) a myristoylpalmitoylstearoylglycerolu (MPS, č. 84, podíl 7,53 %), které ale byly v historickém vzorku sádla divokého králíka nalezeny ve významnějších podílech. Margaroyldistearoylglycerol (MaSS) byl nalezen v koeluci s nonadecoylpalmitoylstearoylglycerolem (NPS) v podílu 0,93 % a tristearoylglycerol (SSS) nebyl identifikován vůbec. Oba triacylglyceroly se vyskytují v tuku přežvýkavců³¹⁻³⁴. Čeleď zajícovitých (*Leporidae*), ze kterých podle popisku pochází tuk studovaného historického pozůstatku, je býložravá a nelze proto vyloučit podobnost triacylglycerolového profilu s profily tuku přežvýkavců. Pro tuk přežvýkavců je také charakteristické zastoupení mastných kyselin s lichým počtem uhlíkových atomů (C15, C17 a C19)¹⁴, které byly rovněž identifikovány

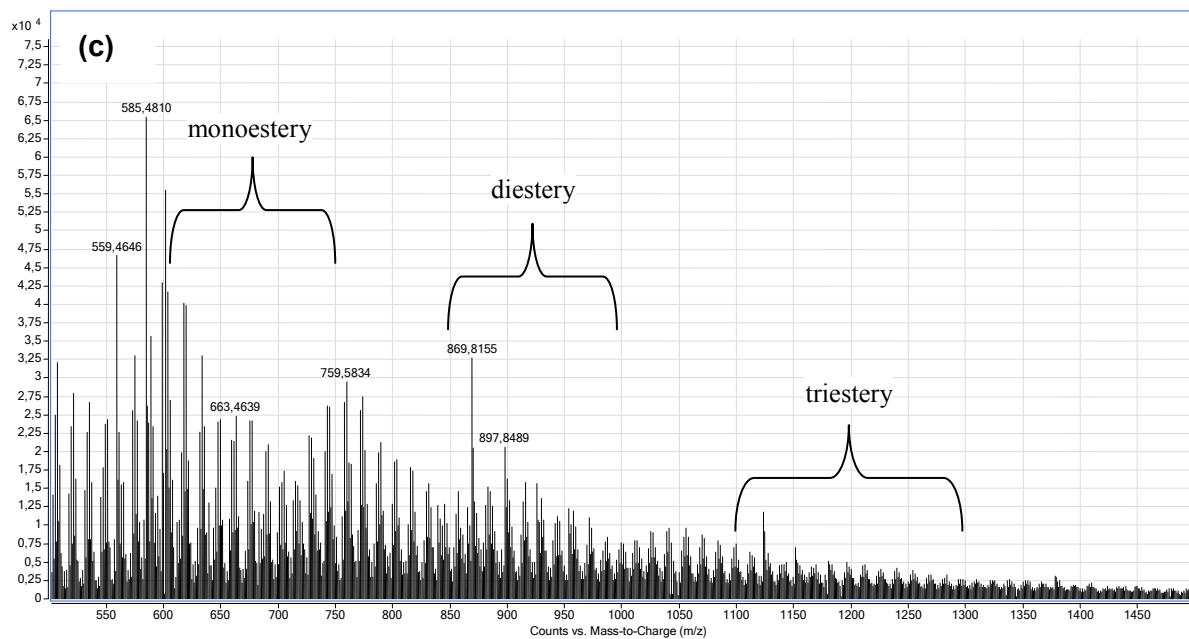
v triacylglycerolech studovaného vzorku historického pozůstatku sádla divokého králíka. Triacylglycerolový profil vzorku H2-AC lze porovnat s triacylglycerolovým profilem referenčního materiálu (obr. 9.8b). Oba vzorky obsahují pouze několik společných triacylglycerolů: dioleoylpalmitoylglycerol (OOP, analyt číslo 77), oleoyldipalmitoylglycerol (OPP, analyt číslo 87), dipalmitoylstearyl glycerol (PPS, analyt číslo 111) a oleoylpalmitoylstearyl glycerol (OPS, analyt číslo 93). Tyto triacylglyceroly se ale s výjimkou oleoyldipalmitoylglycerolu (OPP) rovněž vyskytují v referenčním vzorku vepřového sádla. Referenční vzorek králíčího sádla obsahuje také větší podíl nenasycených triacylglycerolů. Absenci nenasycených triacylglycerolů ve vzorku historického pozůstatku sádla divokého králíka lze ale vysvětlit jeho degradací. Podle literatury⁶ například dioleoyllinoleoylglycerol (OOL), linoleoyldioleoylglycerol (LOO) a dilinoleoylpalmitoylglycerol (LLP) vystavené teplu a ozonu mohou podléhat tvorbě dimerů a trimerů⁵.

9.6.2.4 Charakterizace metodou FIA-MS

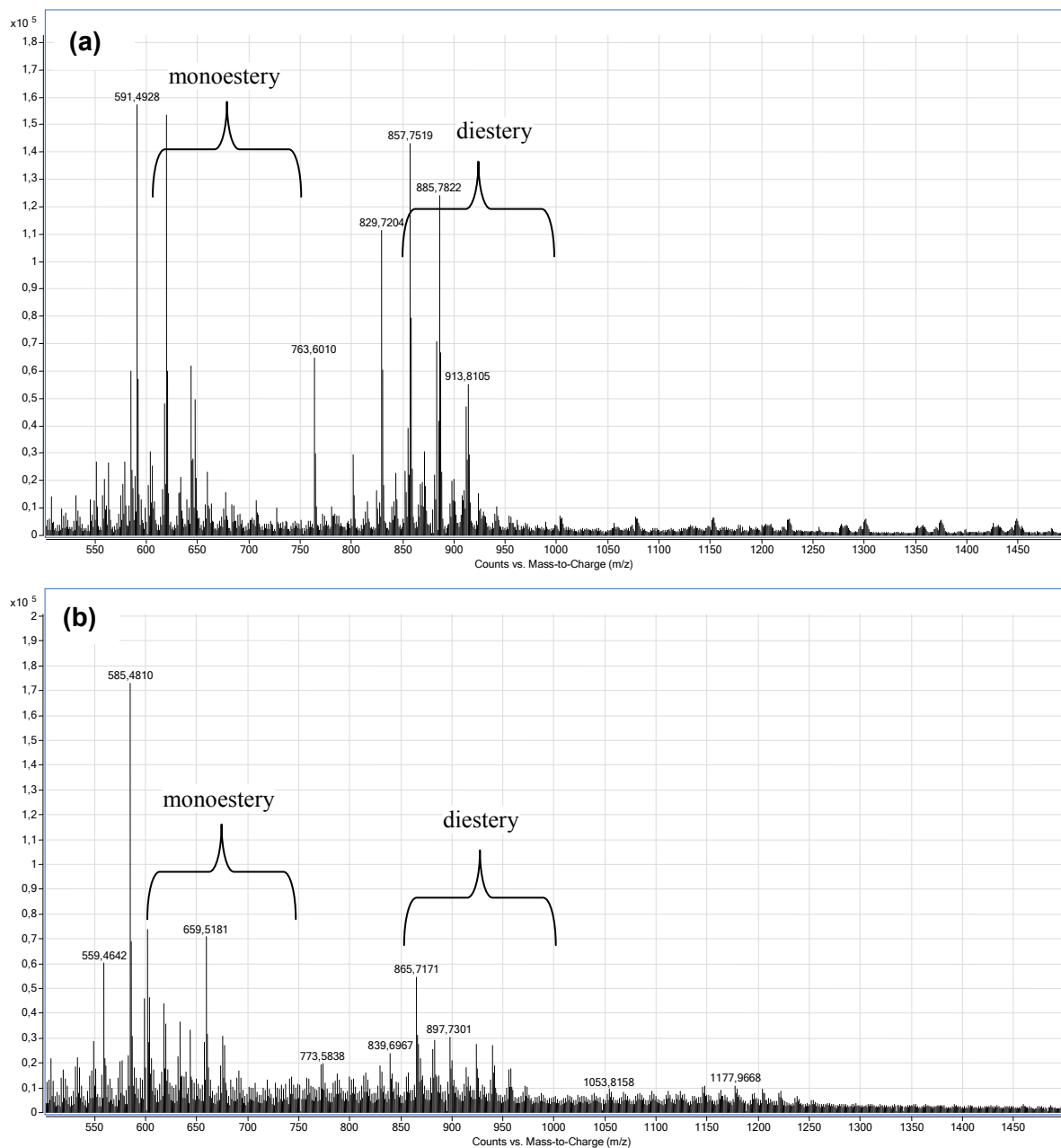
Naměřená hmotnostní spektra pro všechny analyzované vzorky byla porovnána s literaturou¹². Vzorky H2-4943 (obr. 9.11a) a H2-4946 (obr. 9.11b) obsahují všechny čtyři esterové clustery, které byly popsány v odst. 9.3.4. Většina přiřazených iontů se s literaturou shoduje s odchylkou ± 50 ppm. Vzorek H2-4948 (obr. 9.12) obsahuje clustery mono-, di- a triesterů, vzorky H2-4949 (obr. 9.13a) a H2-9293 (obr. 9.13b) obsahují prokazatelně monoestery a diestery. Vzorek H2-AC (obr. 9.14) neobsahuje žádné clustery píků v uvedených rozsazích. Identifikované ionty uvádí tabulka 9.12. Všechny studované vzorky kromě H2-AC obsahují také markery včelího vosku 14-hydroxypalmitovou a 15-hydroxypalmitovou kyselinu^{11,12} a je proto pravděpodobné, že tyto vzorky, jak bylo již dříve diskutováno, včelí vosk obsahují.



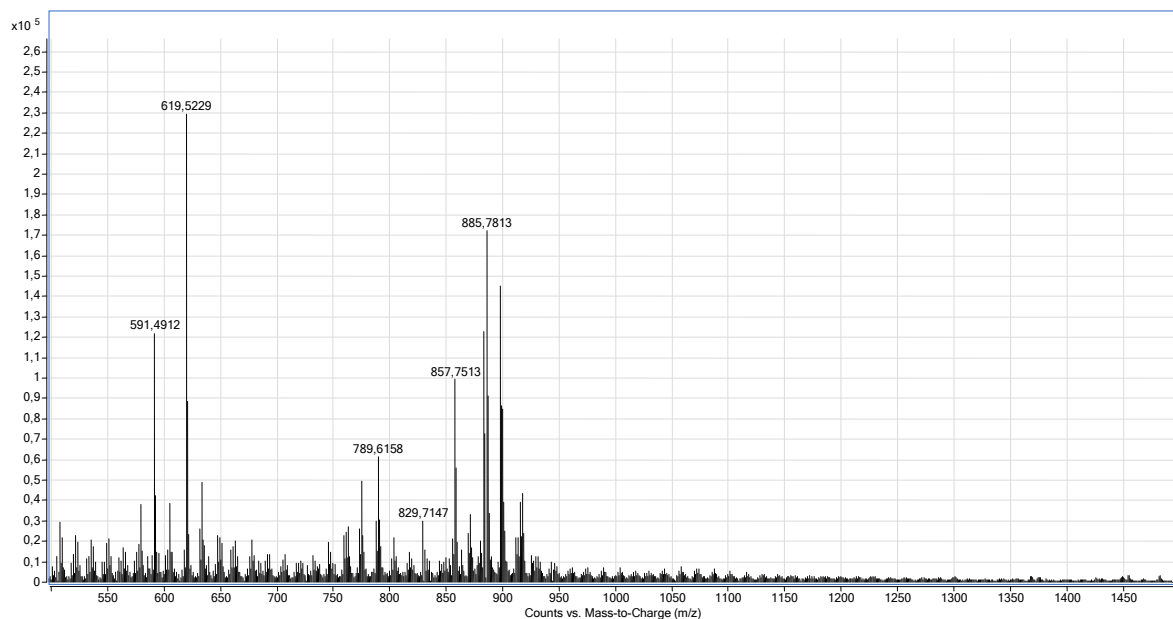
Obr. 9.11 FIA-MS spektra vzorků historických pozůstatků mastí z 18. století, vzorky (a) H2-4943 a (b) H2-4946, které obsahují všechny čtyři esterové clustery. Mobilní fáze sestávala z methanolu a vody v poměru 85:15 (v/v). $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Objem nástřiku vzorku byl 1 mm^3 . Podmínky ionizace jsou uvedeny v odst. 9.5.4.



Obr. 9.12 FIA-MS spektrum vzorku historického pozůstatku masti z 18. století, vzorek H2-4948, který obsahuje tři esterové cluster. Mobilní fáze sestávala z methanolu a vody v poměru 85:15 (v/v). $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Objem nástřiku vzorku byl 1 mm^3 . Podmínky ionizace jsou uvedeny v odst. 9.5.4.



Obr. 9.13 FIA-MS spektra vzorků historických pozůstatků mastí z 18. století, vzorky (a) H2-4949 a (b) H2-9293, které obsahují dva esterové cluster. Mobilní fáze sestávala z methanolu a vody v poměru 85:15 (v/v). $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Objem nástříku vzorku byl 1 mm^3 . Podmínky ionizace jsou uvedeny v odst. 9.5.4.



Obr. 9.14 FIA-MS spektrum vzorku historického pozůstatku mastí z 18. století, vzorek H2-AC, který neobsahuje žádné esterové cluster. Mobilní fáze sestávala z methanolu a vody v poměru 85:15 (v/v). $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Objem nástřiku vzorku byl 1 mm^3 . Podmínky ionizace jsou uvedeny v odst. 9.5.4.

Tabulka 9.12

Identifikace iontů monoesterů palmitové kyseliny s mastnými alkoholy, diesterů palmitové a 15-hydroxypalmitové kyseliny s mastnými alkoholy, triesterů a tetraesterů palmitové a 15-hydroxypalmitové kyseliny s mastnými mono- a dialkoholy ve vzorcích historických pozůstatků mastí z 18. století. V tabulce jsou uvedeny: skupina analytů, m/z iontů podle publikace La Nasa a kol.¹², sumární vzorec prekurzorového iontu $[M+Na]^+$ a odchylka m/z identifikovaných iontů ve vzorcích historických pozůstatků mastí z 18. století od literatury.

| skupina analytů | m/z | sumární vzorec iontu $[M+Na]^+$ | odchylka m/z identifikovaných iontů od literatury / ppm | | | | | |
|-----------------|----------|---------------------------------|---|---------|---------|---------|---------|-------|
| | | | H2-4943 | H2-4946 | H2-4948 | H2-4949 | H2-9293 | H2-AC |
| monoestery | 615,605 | $[C_{40}H_{80}O_2+Na]^+$ | 7,1 | 4,4 | 5,7 | – | 8,3 | – |
| | 631,600 | $[C_{40}H_{80}O_3+Na]^+$ | 19,3 | 8,5 | 14,7 | – | – | – |
| | 687,663 | $[C_{44}H_{88}O_3+Na]^+$ | 10,0 | 54,2 | 23,0 | 17,5 | 30,1 | – |
| | 699,699 | $[C_{46}H_{92}O_2+Na]^+$ | 10,6 | 19,9 | 9,4 | 5,4 | – | – |
| | 715,694 | $[C_{46}H_{92}O_3+Na]^+$ | 6,0 | 23,5 | – | 5,2 | 13,7 | – |
| | 743,725 | $[C_{48}H_{96}O_3+Na]^+$ | 9,5 | – | – | – | 17,1 | – |
| diestery | 869,829 | $[C_{56}H_{110}O_5+Na]^+$ | 3,6 | 2,5 | 3,1 | 44,8 | 9,9 | – |
| | 925,892 | $[C_{60}H_{118}O_4+Na]^+$ | 6,5 | – | 10,3 | 49,7 | 45,0 | – |
| | 953,924 | $[C_{62}H_{122}O_4+Na]^+$ | 7,2 | 6,6 | 8,6 | 29,0 | 16,1 | – |
| | 981,955 | $[C_{64}H_{126}O_4+Na]^+$ | 9,3 | 11,4 | 26,3 | 21,2 | 60,8 | – |
| triestery | 1125,062 | $[C_{72}H_{141}O_6+Na]^+$ | 11,6 | 9,0 | 12,4 | – | 19,6 | – |
| | 1153,093 | $[C_{74}H_{145}O_6+Na]^+$ | 16,0 | – | 18,3 | – | – | – |
| | 1169,088 | $[C_{74}H_{145}O_7+Na]^+$ | 43,1 | – | – | – | – | – |
| | 1181,125 | $[C_{76}H_{149}O_6+Na]^+$ | 18,5 | 5,2 | 29,1 | – | – | – |
| | 1197,119 | $[C_{76}H_{149}O_7+Na]^+$ | 27,0 | 15,5 | 26,0 | – | – | – |
| | 1209,156 | $[C_{78}H_{153}O_6+Na]^+$ | – | 23,4 | –31,8 | –2,0 | –46,8 | – |
| | 1237,187 | $[C_{80}H_{157}O_6+Na]^+$ | 52,5 | 54,2 | 25,5 | 8,4 | 38,0 | – |

Tabulka 9.12 pokračuje na další straně.

Pokračování tabulky 9.12 z předchozí strany.

| skupina analytů | <i>m/z</i> | sumární vzorec iontu [M+Na] ⁺ | odchylka <i>m/z</i> identifikovaných iontů od literatury / ppm | | | | | |
|-----------------|------------|---|--|---------|---------|---------|---------|-------|
| | | | H2-4943 | H2-4946 | H2-4948 | H2-4949 | H2-9293 | H2-AC |
| tetraestery | 1379,287 | [C ₈₈ H ₁₇₁ O ₈ +Na] ⁺ | -7,1 | 13,4 | -3,1 | 17,5 | 1,2 | - |
| | 1407,318 | [C ₉₀ H ₁₇₅ O ₉ +Na] ⁺ | 3,8 | -34,5 | 39,9 | - | -1,6 | - |
| | 1422,305 | [C ₉₀ H ₁₇₄ O ₉ +Na] ⁺ | 2,5 | -37,1 | - | 43,6 | - | - |
| | 1434,341 | [C ₉₂ H ₁₇₈ O ₈ +Na] ⁺ | 11,6 | 5,9 | 15,6 | 21,5 | - | - |
| | 1450,336 | [C ₉₂ H ₁₇₈ O ₉ +Na] ⁺ | -8,5 | -12,0 | -2,8 | -2,9 | -1,9 | -0,1 |
| | 1462,373 | [C ₉₄ H ₁₈₂ O ₈ +Na] ⁺ | 43,3 | 4,1 | - | - | - | -48,9 |
| | 1478,368 | [C ₉₄ H ₁₈₂ O ₉ +Na] ⁺ | - | 2,3 | - | - | - | - |
| | 1492,347 | [C ₉₄ H ₁₈₀ O ₁₀ +Na] ⁺ | 18,6 | -22,7 | - | 48,5 | 11,5 | - |

9.6.3 Analýza historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století

9.6.3.1 Metoda GC-MS screeningu

Metodou GC-MS screeningu byly v analyzovaných vzorcích historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století identifikovány skupiny analytů: mastné kyseliny, alkany a alkoholy, markery pryskyřic a včelího vosku a steroly. Byly také zjištěny některé účinné látky.

Volné mastné kyseliny

Identifikované volné mastné kyseliny jsou uvedeny v tabulce 9.13. Lipidové složky charakterizují monokarboxylové kyseliny se sudým počtem atomů uhlíku v rozsahu 8–26 atomů a monokarboxylové kyseliny s lichým počtem 9, 15, 17, 19 a 21 atomů uhlíku. Mastné kyseliny derivatizované trimethylsilylem byly identifikovány skrze charakteristické fragmentační ionty *m/z* = 117, který náleží karboxytrimethylsilylovému iontu a *m/z* = 73, který odpovídá trimethylsilylovému iontu. Dále je ve spektru patrný ion [M-CH₃]⁺, podle kterého lze rozpoznat počet uhlíků v řetězci mastné kyseliny¹⁹. Ricinolejová kyselina, která je charakteristickým markerem ricinového oleje, byla identifikována skrze charakteristické fragmentové ionty⁶³: *m/z* = 427 náležející [M-CH₃]⁺; 187 pro [M-C₂₇H₁₄O₂Si]⁺ a 73, který odpovídá trimethylsilylovému iontu [C₃H₉Si]⁺.

Všechny analyzované vzorky obsahují mnoho volných mastných kyselin. Je proto pravděpodobné, že obsahují lipidovou složku.

Vzorek B pravděpodobně obsahuje včelí vosk. Obsahuje totiž markery včelího vosku 14-hydroxypalmitovou a 15-hydroxypalmitovou kyselinu a také byla ve vzorku identifikována cerotová kyselina, která je ve větším podílu zastoupena ve včelím vosku⁵².

Eruková kyselina byla nalezena ve všech analyzovaných vzorcích kromě vzorku F. Přítomnost erukové kyseliny charakteristická pro řepkový olej^{14,19}.

Dále byly identifikovány dikarboxylové kyseliny azelaová (vzorky A a B) a sebaková (vzorek B). Obě kyseliny se vyskytují v rostlinném materiálu.

Další identifikované kyseliny benzoová (vzorek C), acetylsalicylová (vzorek D) a salicylová (vzorek F) jsou pravděpodobnými účinnými látkami (tyto látky byly ve vzorcích i kvantifikovány, odst. 9.6.3.5). Benzoová kyselina má antibakteriální a fungicidní účinky⁶⁴. Salicylová kyselina má v závislosti na koncentraci keratolytický nebo keratoplastický účinek na kůži, užívá se při léčbě lupénky, seborhoické dermatitidy, ichtyózy, psoriázy a akné. Tyto přípravky obvykle obsahují 2–6% podíl. Přípravky obsahující až 60 % salicylové kyseliny se používají při odstranění bradavic, kuřích ok nebo mozolů. Má také fungicidní účinek a používá se při léčbě dermatofytní kožní infekce.

Tabulka 9.13

Identifikace mastných kyselin ve vzorcích historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století metodou GC-MS screeningu. V tabulce jsou uvedeny: zkrácený zápis mastné kyseliny, sumární vzorec, název, CASRN, změřené *m/z* molekulového iontu ($[M]^+$) a fragmentových iontů iontu po ztrátě trimethylsilylu ($[M-TMS]^+$), oxymethylsilylu ($[M-OTMS]^+$) a methylu ($[M-CH_3]^+$) a přítomnost analytu ve vzorku. Separace na koloně HP-5MS (stacionární fáze 5% difenyl + 95% dimethyl-polysiloxan, délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, vrstva filmu 0,25 μ m, J&W Scientific, Agilent, USA), nosný plyn helium, $F = 1,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Další podmínky měření jsou uvedeny v odst. 9.5.1.

| sumární vzorec | název kyseliny | CASRN | změřené <i>m/z</i> iontu | | | | přítomnost analytu ve vzorku | | | | | |
|--|----------------------|------------|--------------------------|-------------|--------------|--------------|------------------------------|-----|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | | $[M]^+$ | $[M-TMS]^+$ | $[M-OTMS]^+$ | $[M-CH_3]^+$ | A | B | C | D | E | F |
| C ₈ H ₁₆ O ₂ | kaprylová | 124-07-2 | 216 | 143 | 127 | 201 | ne | ano | ne | ano ^a | ano | ano |
| C ₉ H ₁₈ O ₂ | pelargonová | 112-05-0 | 230 | 157 | 141 | 215 | ano | ano | ne | ano ^a | ano ^a | ano ^a |
| C ₁₀ H ₂₀ O ₂ | kaprinová | 334-48-5 | 244 | 171 | 155 | 229 | ano | ano | ano | ano ^a | ano | ano |
| C ₁₂ H ₂₄ O ₂ | laurová | 143-07-7 | 256 | 183 | 167 | 241 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₄ H ₂₈ O ₂ | myristová | 544-63-8 | 300 | 227 | 211 | 285 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₄ H ₂₆ O ₂ | myristoolejová | 26444-03-1 | 288 | 215 | 199 | 273 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₅ H ₃₀ O ₂ | pentadecylová | 1002-84-2 | 314 | 241 | 225 | 299 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₅ H ₂₈ O ₂ | pentadecenyllová | – | 313 | 240 | 224 | 298 | ne | ne | ne | ne | ne | ano |
| C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | palmitová | 57-10-3 | 328 | 255 | 239 | 313 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₆ H ₃₀ O ₂ | palmitoolejová | 373-49-9 | 326 | 253 | 237 | 311 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | margarová | 506-12-7 | 342 | 269 | 253 | 327 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₇ H ₃₂ O ₂ | heptadecenyllová | – | 363 | 290 | 274 | 348 | ne | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | stearová | 57-11-4 | 356 | 283 | 267 | 341 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₈ H ₃₄ O ₂ | olejová | 112-80-1 | 354 | 281 | 265 | 339 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₈ H ₃₂ O ₂ | linolová | 60-33-3 | 352 | 279 | 263 | 337 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| C ₁₈ H ₃₄ O ₃ | ricinolejová | 141-22-0 | 442 | – | – | 427 | ano | ano | ne | ano | ano | ano |
| C ₁₉ H ₃₈ O ₂ | nonadecylová | 646-30-0 | 370 | 297 | 281 | 355 | ano | ano | ne | ano ^a | ano ^a | ano ^a |
| C ₂₀ H ₄₀ O ₂ | arachidová | 506-30-9 | 384 | 311 | 295 | 369 | ano | ano | ne | ano | ano | ano |
| C ₂₀ H ₃₈ O ₂ | gonodová | 5561-99-9 | 382 | 309 | 293 | 367 | ano | ano | ano ^a | ano ^a | ano | ano |
| C ₂₁ H ₄₂ O ₂ | heneikosylová | 2363-71-5 | 398 | 325 | 309 | 383 | ano | ne | ne | ne | ne | ne |
| C ₂₂ H ₄₄ O ₂ | behenová | 112-85-6 | 412 | 339 | 323 | 397 | ano | ano | ne | ano | ano | ne |
| C ₂₂ H ₄₂ O ₂ | eruková | 112-86-7 | 433 | 360 | 344 | 418 | ano | ano | ano | ano ^a | ano | ne |
| C ₂₄ H ₄₈ O ₂ | lignocerová | 557-59-5 | 440 | 367 | 351 | 425 | ano | ano | ne | ano | ano | ano ^a |
| C ₂₆ H ₅₂ O ₂ | cerotová | 506-46-7 | 468 | 395 | 379 | 453 | ne | ano | ne | ne | ne | ne |
| C ₁₆ H ₃₂ O ₃ | 14-hydroxy-palmitová | 59642-38-5 | 416 | – | – | 401 | ne | ano | ne | ne | ne | ne |
| C ₁₆ H ₃₂ O ₃ | 15-hydroxy-palmitová | 4552-17-4 | 416 | – | – | 401 | ne | ano | ne | ne | ne | ne |
| C ₉ H ₁₆ O ₄ | azealová | 123-99-9 | 332 | – | – | 317 | ano | ano | ne | ne | ne | ne |
| C ₁₀ H ₁₈ O ₄ | sebaková | 111-20-6 | 346 | – | – | 331 | ne | ano | ne | ne | ne | ne |
| C ₇ H ₆ O ₂ | benzoová | 65-85-0 | 194 | – | 105 | 179 | ne | ne | ano | ne | ne | ne |
| C ₉ H ₈ O ₄ | acetylsalicylová | 50-78-2 | 252 | – | 163 | 237 | ne | ne | ne | ano | ne | ne |
| C ₇ H ₆ O ₃ | salicylová | 69-72-7 | 282 | 209 | 193 | 267 | ne | ne | ne | ne | ne | ano |

^a nízká intenzita signálu

Alkany a alkoholy

V analyzovaných vzorcích byly metodou GC-MS identifikovány rovněž alkany s délkou uhlíkového řetězce 19–34 atomů, jejich přehled uvádí tabulka 9.14. Mastné alkoholy, které byly rovněž metodou GC-MS identifikovány se sudým (v rozsahu 18–32) a lichým (21 a 23) počtem atomů uhlíku uvádí tabulka 9.15. Alkany byly identifikovány na základě knihovny spekter podle molekulového iontu a charakteristického spektra. Alkoholy derivatizované trimethylsilylem poskytují ve shodě s literaturou⁸ charakteristické fragmentové ionty $m/z = 73$, který náleží trimethylsilylu a $m/z = 103$, který odpovídá methoxytrimethylsilylu. Podle iontu $[M-CH_3]^+$ příslušejícího molekule analytu po ztrátě methylu lze určit délku uhlíkového řetězce⁸.

Vzorek A obsahuje oproti ostatním vzorkům alkany s kratším řetězcem o 20 a 23–26 atomech uhlíku. Také obsahuje mastné alkoholy s kratšími řetězci o 20–24 atomech uhlíku. Je pravděpodobné, že vzorek A neobsahuje včelí vosk, pro který jsou typické mastné alkoholy se sudým uhlíkovým řetězcem o délce 24–36 atomů uhlíku¹⁰. Naproti tomu ve vzorku B je zastoupeno mnoho alkanů v rozsahu 20 a 22–34 atomů uhlíku a také obsahuje mastné alkoholy s délkou 26–32 atomů uhlíku. Přítomnost včelího vosku je proto ve vzorku B pravděpodobná. Vzorky C až F neobsahují žádné mastné alkoholy v rozsahu 24–36 atomů uhlíku, lze proto předpokládat, že neobsahují včelí vosk.

Tabulka 9.14

Identifikace alkanů ve vzorcích historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století. V tabulce jsou uvedeny: sumární vzorec, název, CASRN, m/z molekulového iontu a přítomnost analytu ve vzorku. Separace proběhla na koloně HP-5MS (stacionární fáze 5% difenyl + 95% dimethyl-polysiloxan, délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, vrstva filmu 0,25 μm , J&W Scientific, Agilent, USA), nosný plyn helium, $F = 1,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Další podmínky měření jsou uvedeny v odst. 9.5.1.

| sumární vzorec | název | CASRN | m/z iontu $[M]^+$ | přítomnost analytu ve vzorku | | | | | |
|----------------|-----------------|------------|---------------------|------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | A | B | C | D | E | F |
| $C_{19}H_{40}$ | nonadekan | 629-92-5 | 268 | ne | ne | ano | ne | ne | ne |
| $C_{20}H_{42}$ | eikosan | 112-95-8 | 282 | ano | ano | ano | ano | ne | ne |
| $C_{21}H_{44}$ | heneikosan | 629-94-7 | 296 | ne | ne | ano | ano | ne | ne |
| $C_{22}H_{46}$ | dokosan | 629-97-0 | 310 | ne | ano | ano | ano | ne | ne |
| $C_{23}H_{48}$ | trikosan | 638-67-5 | 324 | ano | ano | ne | ano | ne | ne |
| $C_{24}H_{50}$ | tetrakosan | 646-31-1 | 338 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| $C_{25}H_{52}$ | pentakosan | 629-99-2 | 352 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| $C_{26}H_{54}$ | hexakosan | 630-01-3 | 366 | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| $C_{27}H_{56}$ | heptakosan | 593-49-7 | 380 | ne | ano | ano | ano | ano | ano |
| $C_{28}H_{58}$ | oktakosan | 630-02-4 | 394 | ne | ano | ano | ano | ano | ano |
| $C_{29}H_{60}$ | nonakosan | 630-03-5 | 408 | ne | ano | ano | ano | ano | ano |
| $C_{30}H_{62}$ | triakontan | 638-68-6 | 422 | ne | ano | ano | ano | ano | ano |
| $C_{31}H_{64}$ | hentriakontan | 630-04-6 | 436 | ne | ano | ano | ne | ano | ne |
| $C_{32}H_{66}$ | dotriakontan | 544-85-4 | 450 | ne | ano | ano | ne | ne | ne |
| $C_{33}H_{68}$ | tritriakontan | 630-05-7 | 464 | ne | ano | ano | ne | ne | ne |
| $C_{34}H_{70}$ | tetratriakontan | 14167-59-0 | 478 | ne | ano | ne | ne | ne | ne |

Tabulka 9.15

Identifikace alifatických mastných alkoholů ve vzorcích historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století. V tabulce jsou uvedeny: sumární vzorec, název, CASRN, m/z iontu alkoholu derivatizovaného trimethylsilylem po ztrátě methylu a přítomnost analytu ve vzorku. Separace proběhla na koloně HP-5MS (stacionární fáze 5% difenyl + 95% dimethylpolysiloxan, délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, vrstva filmu 0,25 μm , J&W Scientific, Agilent, USA), nosný plyn helium, $F = 1,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Další podmínky měření viz odst. 9.5.1.

| sumární vzorec | název | CASRN | m/z iontu $[\text{M}+\text{TMS}-\text{CH}_3]^+$ | přítomnost analytu ve vzorku | | | | | |
|--------------------------------------|-------------------|------------|---|------------------------------|-----|----|-----|-----|----|
| | | | | A | B | C | D | E | F |
| $\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{O}$ | oktadekan-1-ol | 112-92-5 | 327 | ne | ano | ne | ano | ano | ne |
| $\text{C}_{20}\text{H}_{42}\text{O}$ | eikosan-1-ol | 629-96-9 | 355 | ano | ne | ne | ne | ne | ne |
| $\text{C}_{21}\text{H}_{44}\text{O}$ | heneikosan-1-ol | 15594-90-8 | 369 | ano | ne | ne | ne | ne | ne |
| $\text{C}_{22}\text{H}_{46}\text{O}$ | dokosan-1-ol | 661-19-8 | 383 | ano | ne | ne | ne | ne | ne |
| $\text{C}_{23}\text{H}_{48}\text{O}$ | trikosan-1-ol | 3133-01-5 | 397 | ano | ne | ne | ne | ne | ne |
| $\text{C}_{24}\text{H}_{50}\text{O}$ | tetrakosan-1-ol | 506-51-4 | 411 | ano | ano | ne | ne | ne | ne |
| $\text{C}_{26}\text{H}_{58}\text{O}$ | hexakosan-1-ol | 506-52-5 | 439 | ne | ano | ne | ne | ne | ne |
| $\text{C}_{28}\text{H}_{60}\text{O}$ | oktakosan-1-ol | 557-61-9 | 467 | ne | ano | ne | ne | ne | ne |
| $\text{C}_{30}\text{H}_{62}\text{O}$ | triakontan-1-ol | 593-50-0 | 495 | ne | ano | ne | ne | ne | ne |
| $\text{C}_{32}\text{H}_{66}\text{O}$ | dotriakontan-1-ol | 6624-79-9 | 523 | ne | ano | ne | ne | ne | ne |

Pryskyřice

Ve shodě s literaturou^{16,55} byly metodou GC-MS screeningu analyzovány pryskyřice. Trimethylsilylester dehydroabietové kyseliny, která je obsažena v pryskyřicích čeledi *Pinaceae* (borovicovité)^{16,17}, byl nalezen ve všech vzorcích historických pozůstatků mastí, kromě vzorku A. Trimethylsilylester dehydroabietové kyseliny byl identifikován ve shodě s literaturou⁵⁵ podle fragmentového iontu $m/z = 239$. Přítomnost pryskyřice ale nelze na základě jediného markeru potvrdit a pravděpodobně se tak jedná o kontaminaci.

Steroly

Poslední skupinou látek, která byla metodou GC-MS screeningu v analyzovaných vzorcích identifikována byly steroly (tabulka 9.16). Cholesterol, který indikuje živočišné materiály¹⁹, byl nalezen ve všech vzorcích historických pozůstatků mastí kromě vzorku C. Přítomnost cholesterolu lze ale také vysvětlit kontaminací při používání mastí. Rostlinné materiály indikuje β -sitosterol¹⁹, který byl identifikován ve vzorku B. Lanosterol identifikovaný ve vzorku A může pocházet z vosku obsaženého v ovčí vlně¹⁴.

Tabulka 9.16

Identifikace sterolů ve vzorcích historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století. V tabulce jsou uvedeny: sumární vzorec, název, CASRN, m/z diagnostických iontů analytu derivatizovaného trimethylsilylem a přítomnost analytu ve vzorku. Separace proběhla na koloně HP-5MS (stacionární fáze 5% difenyl + 95% dimethyl-polysiloxan, délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, vrstva filmu 0,25 μm , J&W Scientific, Agilent, USA), nosný plyn helium, $F = 1,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Další podmínky měření jsou popsány v odst. 9.5.1.

| sumární vzorec | název | CASRN | diagnostické ionty TMS derivátu, m/z | přítomnost analytu ve vzorku | | | | | |
|--------------------------------------|---------------------|---------|--|------------------------------|-----|----|-----|-----|-----|
| | | | | A | B | C | D | E | F |
| $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$ | cholesterol | 57-88-5 | 329; 129; 168; 458 | ano | ano | ne | ano | ano | ano |
| $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ | β -sitosterol | 83-46-5 | 357; 396 | ne | ano | ne | ne | ne | ne |
| $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ | lanosterol | 79-63-0 | 393; 483; 498; 69 | ano | ne | ne | ne | ne | ne |

9.6.3.2 Analýza těkavých látek metodou SPME-GC-MS

Analýzou těkavých látek metodou SPME-GC-MS bylo ve vzorcích historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století odhaleno mnoho organických látek. Příklad získaného chromatogramu pro vzorek F je uveden na obr. 9.15. Identifikované látky ve všech analyzovaných vzorcích jsou souhrnně uvedeny v tabulce 9.17. Některé z nich jsou pravděpodobnými účinnými a pomocnými látkami.

Fenol, který je hlavní těkavou látkou vzorku F, byl dříve využíván pro desinfekční účinky a používal se také jako lokální anestetikum^{64,65}. V současnosti se využívá jen jako surovina při syntézách farmak.

Kafr se získává se ze skořicovníku kafrovníku (*Cinnamomum camphora* L.). Externě aplikovaný působí kafr jako mírné analgetikum. Používá se jako součást mastí při fibróze, kopřivce, neuralgii a podobných stavech jako protidráždivé léčivo⁶⁴. Kafr byl identifikován ve vzorcích A a C.

Benzoová kyselina, která byla nalezena ve vzorku C, má antibakteriální a fungicidní účinky, využívá se pro léčbu dermatofytoz⁶⁴.

Azulen identifikovaný ve vzorcích A a C se používá se jako desinfekční látka při léčbě kožních onemocnění a pro ústní hygienu⁶⁴. Je obsažen v heřmánku pravém (*Matricaria chamomilla* L.), v řebříčku obecném (*Achillea millefolium* L.) a v některých houbách, například v ryzci indigovém (*Lactarius indigo* L.)^{64,66}.

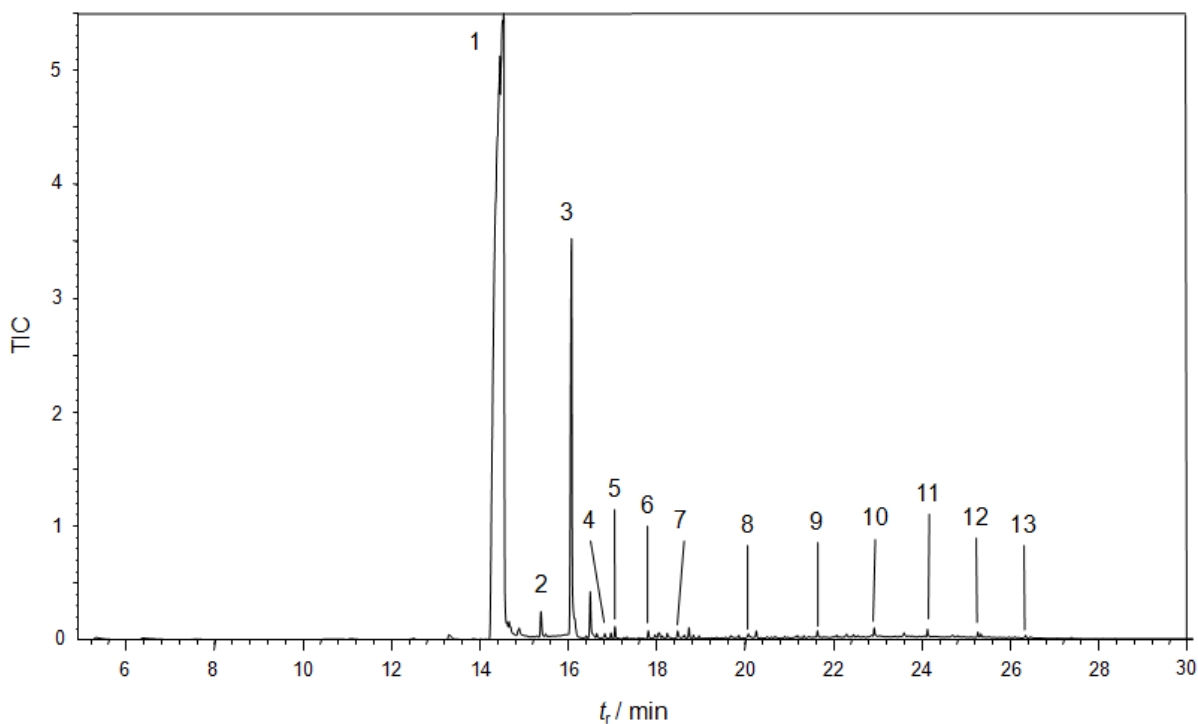
Resorcinol má keratolytické vlastnosti. Topické přípravky se používají pro léčbu akné a seborhoické dermatitidy⁶⁴. Vzorek D obsahuje resorcinol ve velkém podílu. Stopy resorcinolu byly nalezeny také ve vzorku F, může ale jít pouze o kontaminaci.

Benzokain byl nalezen ve větším podílu ve vzorku D, méně pak ve vzorku E. Jako lokální anestetikum je součástí kapek do uší, krémů, mastí, roztoků, sprejů a čípků v koncentraci do 20 % (cit.⁶⁴).

Benzyl-benzoát byl ve větším množství nalezen ve vzorku C, méně pak ve vzorcích D a E. Řadí se mezi akaricidy. Používá se jako repelent proti hmyzu, na léčbu svrabové infekce a proti vším^{64,65}.

Mezi pomocnými látkami byly rovněž identifikovány D-limonen (všechny vzorky), karvon (vzorek E) a vanilin (vzorek C). D-Limonen je obsažen v kůře mnoha citrusů, karvon je součástí oleje z máty peprné (*Mentha piperita* L.) a z kmínu (*Carum carvi* L.), vanilin pochází z vanilovníku (*Vanilla* Plum. ex Mill.). Podle vonného charakteru látek jde pravděpodobně o korigens upravující estetický vzhled léčivých přípravků.

V souladu se zjištěním metodou GC-MS screeningu nebyly nalezeny terpenické látky, které by indikovaly pryskyřice.



Obr. 9.15 SPME-GC-MS chromatogram vzorku F. Identifikace analytů: (1) fenol, (2) D-limonen, (3) *o*-kresol, (4) nonan-2-on, (5) undekan, (6) kafr, (7) azulen, (8) resorcinol, (9) tetradekan, (10) pentadekan, (11) hexadekan, (12) heptadekan, (13) oktadekan. Mikroextrakce na vláknu Stable Flex Divinylbenzen/Carboxen/PDMS (Supelco, USA). Separace na koloně HP-5MS (stacionární fáze 5% difenyl+ 95% dimethyl-polysiloxan, délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, vrstva filmu 0,25 μm , J&W Scientific, Agilent, USA), nosný plyn helium, $F = 1,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Další podmínky měření jsou uvedeny v odst. 9.5.2.

Tabulka 9.17

Identifikace a kvantifikace těkavých organických látek ve vzorcích historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století metodou SPME-GC-MS. V tabulce jsou uvedeny: retenční čas, název, sumární vzorec, CASRN a podíl analytu ve vzorcích. Koncentrace byla stanovena normalizací. Mikroextrakce na vláknu Stable Flex Divinylbenzen/Carboxen/PDMS (Supelco, USA). Separace na koloně HP-5MS (stacionární fáze 5% difenyl + 95% dimethyl-polysiloxan, délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, vrstva filmu 0,25 μm , J&W Scientific, Agilent, USA), nosný plyn helium, $F = 1,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Další podmínky měření jsou uvedeny v odst. 9.5.2.

| t_r / min | název | sumární vzorec | CASRN | podíl / % | | | | | |
|-------------|--|--|------------|-----------|-----|------|-----|------|------|
| | | | | A | B | C | D | E | F |
| 2,94 | propionová kyselina | $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$ | 79-09-4 | 2,4 | – | – | – | – | – |
| 4,34 | pentan-1-ol | $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$ | 71-41-0 | – | 1,5 | – | – | – | – |
| 5,29 | hexanal | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}$ | 66-25-1 | 8,4 | 7,8 | 6,3 | – | – | – |
| 6,91 | máselná kyselina | $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ | 107-92-6 | 10,2 | – | – | – | – | – |
| 8,93 | hexan-1-ol | $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}$ | 111-27-3 | – | 1,7 | – | – | – | – |
| 11,05 | heptanal | $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}$ | 111-71-7 | – | 1,5 | – | – | – | – |
| 12,03 | 2-methylmáselná kyselina | $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_2$ | 116-53-0 | 30,8 | – | – | – | – | – |
| 12,41 | valerová kyselina | $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_2$ | 539-82-2 | 3,3 | – | – | – | – | – |
| 13,22 | 5,5-dimethyl-2(5H)-furanon | $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2$ | 20019-64-1 | 1,7 | – | – | – | – | – |
| 13,36 | 6-methylheptan-2-on | $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}$ | 928-68-7 | 3,5 | – | – | – | – | – |
| 13,39 | benzaldehyd | $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}$ | 100-52-7 | – | – | 16,0 | – | – | – |
| 13,74 | iminostiben | $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}$ | 256-96-2 | 0,9 | – | – | – | – | – |
| 13,88 | heptanol | $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{O}$ | 111-70-6 | – | 3,0 | – | – | – | – |
| 14,15 | 2,2-diethoxy-acetofenon | $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3$ | 6175-45-7 | – | 3,4 | – | – | – | – |
| 14,19 | piperidin-2-on | $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}$ | 675-20-7 | 2,2 | – | – | – | – | – |
| 14,46 | fenol | $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$ | 108-65-2 | – | – | – | – | – | 69,2 |
| 14,46 | 2-fenylfuran | $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}$ | 17113-33-6 | – | 5,9 | 6,2 | – | – | – |
| 14,45 | oktan-2-on | $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}$ | 111-13-7 | 1,3 | – | – | – | – | – |
| 14,88 | kapronová kyselina | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2$ | 142-62-1 | 6,0 | – | – | – | – | – |
| 15,37 | D-limonen | $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$ | 5989-27-5 | 1,2 | 4,0 | 1,2 | 3,7 | 26,9 | 3,4 |
| 15,44 | 3-ethyl-2-methylhexa-1,3-dien | C_9H_{16} | 61142-36-7 | – | – | 1,2 | – | – | – |
| 15,44 | propylidencyklohexan | C_9H_{16} | 2129-93-3 | 0,6 | – | – | – | – | – |
| 15,52 | benzylalkohol | $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}$ | 100-51-6 | – | – | 2,7 | – | – | – |
| 15,98 | 5-ethylidihydro-2(3H)-furanon | $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2$ | 695-06-7 | 1,3 | 2,9 | – | – | – | – |
| 16,05 | <i>o</i> -kresol | $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}$ | 95-48-7 | – | – | – | – | – | 17,6 |
| 16,09 | (<i>E</i>)-okt-2-enal | $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}$ | 2548-87-0 | – | – | 1,1 | – | – | – |
| 16,38 | oktan-1-ol | $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$ | 111-87-5 | – | 5,0 | – | – | – | – |
| 16,82 | nonan-2-on | $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}$ | 821-55-6 | – | – | – | – | – | 0,4 |
| 16,81 | 2-pentylfuran | $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}$ | 3777-69-3 | – | 1,0 | – | – | – | – |
| 16,82 | 5-ethylidihydro-5-methyl-2(3H)-furanon | $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_2$ | 2865-82-9 | 2,2 | – | – | – | – | – |
| 16,96 | undekan | $\text{C}_{11}\text{H}_{24}$ | 1120-21-4 | 0,6 | – | – | – | – | 0,4 |
| 17,05 | nonanal | $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}$ | 124-19-6 | – | 1,4 | 1,4 | – | – | – |
| 17,05 | 3-methylhexan-2-on | $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}$ | 2550-21-2 | 1,0 | – | – | – | – | – |
| 17,80 | (–)-kafr | $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$ | 464-48-2 | – | – | 1,2 | – | – | – |
| 17,81 | kafr | $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$ | 76-22-2 | 1,3 | – | – | – | – | 0,4 |
| 18,26 | benzoová kyselina | $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$ | 65-85-0 | – | – | 5,5 | – | – | – |
| 18,47 | azulen | $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}$ | 275-51-4 | 0,7 | – | 1,5 | – | – | 0,4 |
| 18,62 | dekan-2-on | $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}$ | 639-54-9 | 0,6 | 1,2 | – | – | – | – |
| 19,47 | karvon | $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$ | 99-49-0 | – | – | – | – | 2,4 | – |
| 19,85 | undekan-6-on | $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}$ | 927-49-1 | – | 1,4 | – | – | – | – |

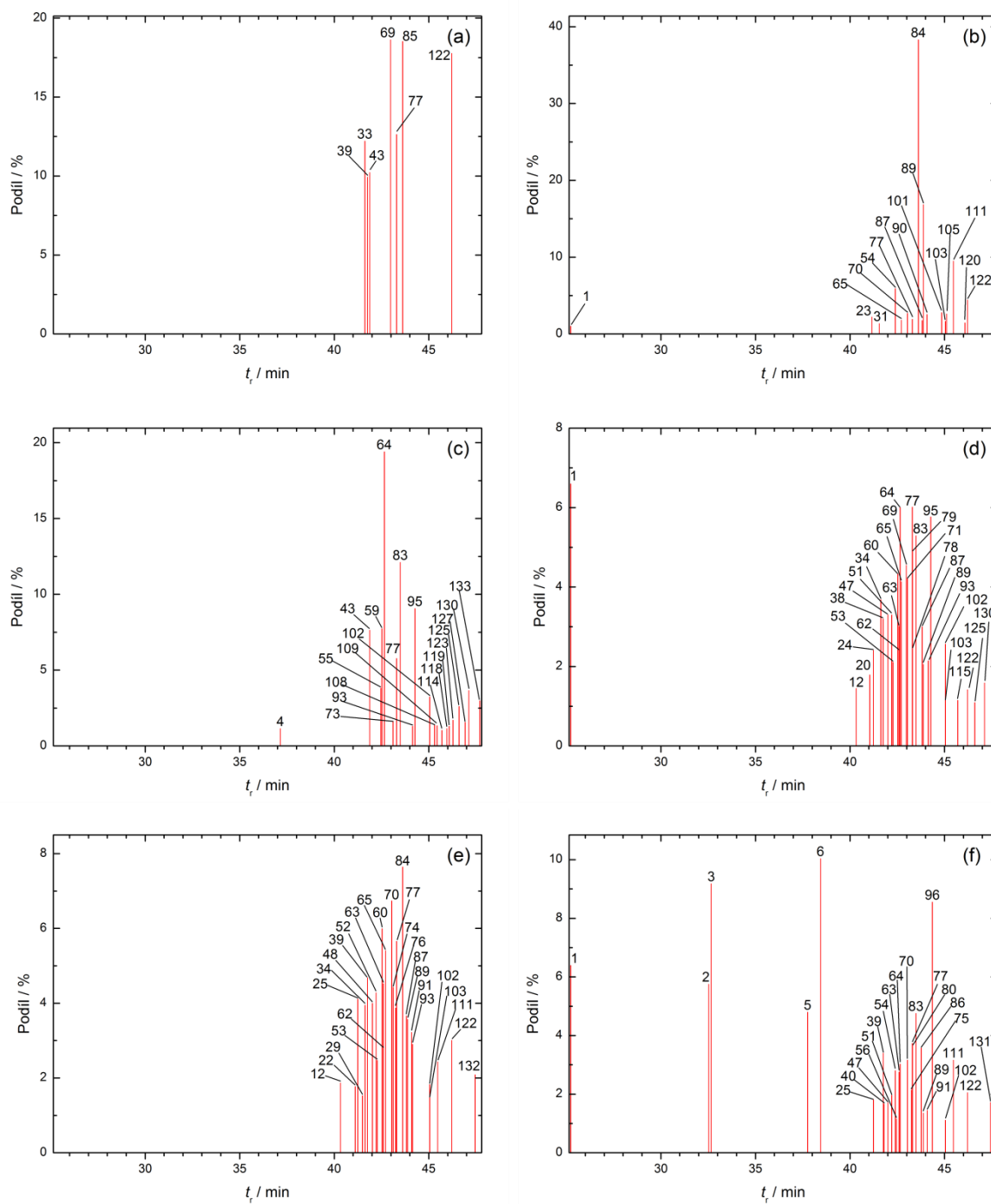
Tabulka 9.17 pokračuje na další straně.

Pokračování tabulky 9.17 z předchozí strany.

| t_r / min | název | sumární vzorec | CASRN | podíl / % | | | | | |
|-------------|---|--|------------|-----------|-----|------|------|-----|-----|
| | | | | A | B | C | D | E | F |
| 19,99 | resorcinol | C ₆ H ₆ O ₂ | 108-46-3 | – | – | – | 65,7 | – | 0,4 |
| 20,23 | 1-methylnaftalen | C ₁₁ H ₁₀ | 90-12-0 | 0,4 | – | – | – | – | – |
| 20,90 | 1-methoxy-4-methylbi cyklo[2.2.2]oktan | C ₁₀ H ₁₈ O | 6555-95-9 | – | – | – | – | – | – |
| 21,17 | dihydro-5-pentyl-2(3 <i>H</i>)-furanon | C ₉ H ₁₆ O ₂ | 104-61-0 | – | 1,9 | – | – | – | – |
| 21,27 | dodekan-6-on | C ₁₂ H ₂₄ O | 6064-27-3 | – | 3,7 | – | – | – | – |
| 21,31 | 2-butyloct-2-enal | C ₁₂ H ₂₂ O | 13019-16-4 | – | 4,5 | – | – | – | – |
| 21,64 | tetradekan | C ₁₄ H ₃₀ | 629-59-4 | – | – | – | – | – | 0,3 |
| 21,67 | vanilin | C ₈ H ₈ O ₃ | 121-33-5 | – | – | 2,2 | – | – | – |
| 22,41 | dimethylftalát | C ₁₀ H ₁₀ O ₄ | 131-11-3 | – | – | – | – | 3,4 | – |
| 22,57 | 2,5-dimethylhex-4-en-3-ol | C ₈ H ₁₆ O | 60703-31-3 | – | 1,7 | – | – | – | – |
| 22,91 | eikosan | C ₂₀ H ₄₂ | 112-95-8 | 0,7 | – | – | – | – | – |
| 22,92 | pentadekan | C ₁₅ H ₃₂ | 629-62-9 | – | – | – | – | – | 0,4 |
| 23,94 | benzokain | C ₉ H ₁₁ NO ₂ | 94-09-7 | – | – | – | 23,1 | 1,8 | – |
| 24,12 | hexadekan | C ₁₆ H ₃₂ | 544-76-3 | 0,4 | – | – | – | – | 0,4 |
| 25,26 | heptadekan | C ₁₇ H ₃₆ | 629-78-7 | 0,3 | – | – | – | – | 0,3 |
| 26,11 | benzyl-benzoát | C ₁₄ H ₁₂ O ₂ | 120-51-4 | – | – | 21,9 | 0,9 | 1,5 | – |
| 26,32 | anthracen | C ₁₄ H ₁₀ | 120-12-7 | – | – | – | 0,8 | – | – |
| 26,34 | oktadekan | C ₁₈ H ₃₈ | 593-45-3 | 0,2 | – | – | – | – | 0,1 |
| 27,13 | dibutyl ftalát | C ₁₆ H ₂₂ O ₄ | 84-74-2 | 0,4 | 3,1 | – | – | – | – |

9.6.3.3 Charakterizace triacylglycerolů metodou RP-HPLC-MS²

Metodou RP-HPLC-MS² byl pro každý studovaný vzorek historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století sestaven příslušný triacylglycerolový profil (obr. 9.16). Jednotlivé analyty jsou identifikovány v tabulce 9.5.



Obr. 9.16 Triacylglycerolové profily vzorků historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století: (a) vzorek A, (b) vzorek B, (c) vzorek C, (d) vzorek D, (e) vzorek E, (f) vzorek F. Identifikace jednotlivých triacylglycerolů uvedena v tabulce 9.5. Separace na koloně Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18 (3,0 × 75 mm; velikost částic 2,7 μm), teplota kolony 45 °C. Mobilní fáze: methanol (solvent A) a isopropanol (solvent B), $F = 0,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, gradientová eluce (popsána v odst. 9.5.3). Podmínky iontového zdroje: teplota sušícího plynu (dusík, čistoty >98 %) byla 350 °C, průtok byl $10 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$.

Triacylglycerolové profily vzorků historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století se od sebe poměrně liší.

Vzorek A obsahuje podle jeho triacylglycerolového profilu (obr. 9.16a) pouze několik triacylglycerolů, z nichž jsou nejvíce zastoupeny v podílech kolem 18 % dipalmitoylpentadecoylglycerol v koeluci s palmitoylmyristoylmargaroylglycerolem (PPPa + PMMa, analyt číslo 69), tripalmitoylglycerol (PPP, analyt číslo 85) a tristearoylglycerol (SSS, analyt číslo 122). Vysoké relativní podíly jsou způsobeny poměrně nízkým zastoupením triacylglycerolů, které naznačuje absenci lipidového základu. Identifikované triacylglyceroly mohou mít původ v kontaminaci.

Ve vzorku B byla podle jeho triacylglycerolového profilu (obr. 9.16b) prokázána přítomnost tuku přežvýkavců. Živočišný tuk indikují myristoyldipalmitoylglycerol (MPP, analyt číslo 54, podíl 5,92 %) a palmitoyldistearoylglycerol (PSS, analyt číslo 111, podíl 9,50 %)³¹. Vysoký podíl myristoylpalmitoylstearoylglycerolu (MPS, analyt číslo 84, podíl 38,31 %) poukazuje na tuk přežvýkavců, který také obsahuje myristoyloleoylpalmitoylglycerol (MOP, analyt číslo 65, podíl 1,82 %), tristearoylglycerol (SSS, analyt číslo 122, podíl 4,43 %)^{32,34,35} a charakteristický margaroyldistearoylglycerol³¹, který byl identifikován v koeluci s nonadekanoylpalmitoylstearoylglycerolem (MaSS + NPS, analyt číslo 120, podíl 1,47 %). Pro tuk přežvýkavců jsou rovněž charakteristické triacylglyceroly, které obsahují mastné kyseliny s lichým počtem 15, 17 a 19 atomů uhlíku¹⁴. Identifikovaný triricinoleoylglycerol (RnRnRn, analyt číslo 1, podíl 1,04 %) je charakteristický pro ricinový olej⁶⁷⁻⁶⁹. Triricinoleoylglycerol byl ale stanoven v poměrně nízkém podílu, nelze proto přítomnost ricinového oleje potvrdit.

Vzorek C podle jeho triacylglycerolového profilu (obr. 9.16c) obsahuje řepkový olej. Absence myristoyldipalmitoylglycerolu (MPP, analyt číslo 54) a palmitoyldistearoylglycerolu (PSS, analyt číslo 111) vylučuje přítomnost živočišného tuku³¹. Byly identifikovány vysoké podíly triacylglycerolů s nenasycenými mastnými kyselinami, jako jsou dilinoleoyloleoylglycerol (LLO, analyt číslo 64, podíl 19,41 %) a linoleoyldioleoylglycerol (LOO, analyt číslo 83, podíl 12,12 %). Tyto nenasycené triacylglyceroly spolu s trilinoleoylglycerolem (LLL, analyt číslo 43, podíl 7,65 %) indikují rostlinný olej²⁸⁻³⁰. Identifikované triacylglyceroly s vázanou erukovou kyselinou, které eluují mezi 45. a 48. minutou, naznačují dierukoyllinoleoylglycerol (ErErL, analyt číslo 130, podíl 3,67 %), dierukoylloleoylglycerol (ErErO, analyt číslo 133, podíl 2,99 %) nebo dierukoyllinolenoylglycerol (ErErLn, analyt číslo 125, podíl 2,62 %) přítomnost řepkového oleje^{14,19}.

Ve vzorku D je podle jeho triacylglycerolového profilu (obr. 9.16d) prokázána přítomnost másla a rostlinných olejů ricinového a řepkového. Na přítomnost tuku živočišného původu poukazují myristoyldipalmitoylglycerol (koelující s palmitoyldipentadecoylglycerolem; MPP + PPaPa, analyt číslo 60, podíl 4,33 %) a palmitoyldistearoylglycerol (koelující s arachidoyldipalmitoylglycerolem, PSS + APP, analyt číslo 115, podíl 1,15 %)³¹. Triacylglyceroly obsahující mastné kyseliny s lichým počtem 15 a 17 atomů uhlíku, které byly ve vzorku D identifikovány, převažují spíše v tuku přežvýkavců¹⁴. Přítomnost tuku přežvýkavců potvrzuje rovněž přítomnost tristearoylglycerolu³⁴ (SSS, analyt číslo 122, podíl 3,01%), dioleoylstearoylglycerolu (OOS, analyt číslo 102, podíl 1,83 %) a oleoyldistearoylglycerolu³⁶ (OSS, analyt číslo 103, podíl 1,50 %). Pro tuk přežvýkavců charakteristický margaroyldistearoylglycerol (MaSS, č. 124) ale nebyl nalezen. Mohlo by se proto jednat o máslo vyrobené z mléka produkovaného přežvýkavci. Identifikované triacylglyceroly (analyt

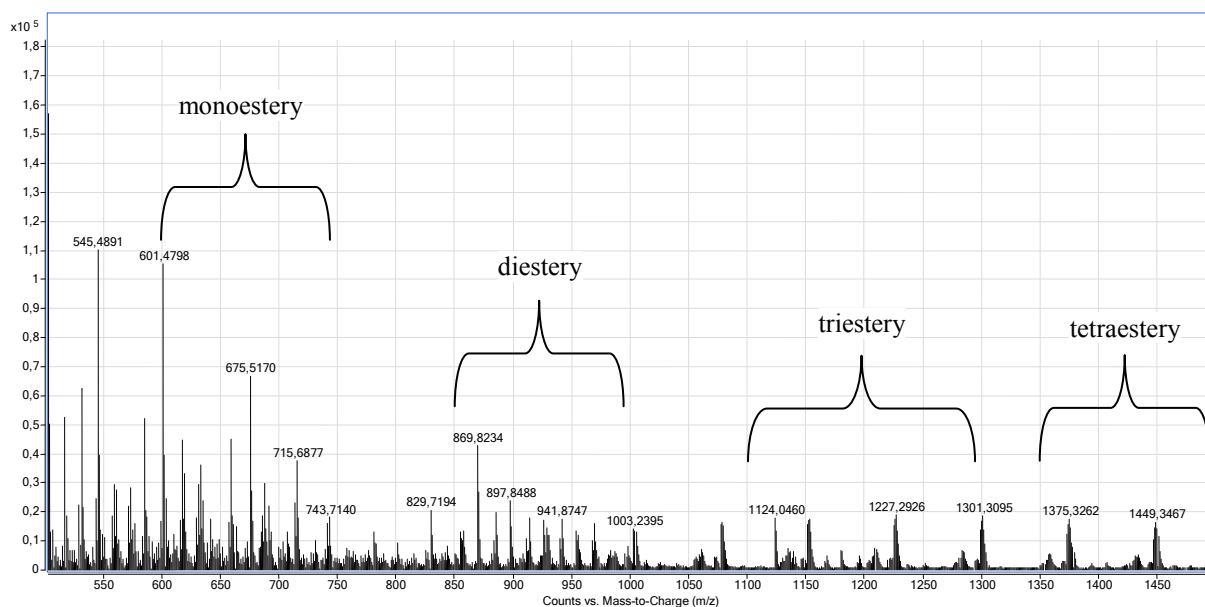
číslo 12, podíl 1,45 %) totiž obsahující kaprinovou (Ca), laurovou (La) a myristovou (M) kyselinu. Tyto triacylglyceroly jsou také obsaženy v referenčním vzorku másla (obr. 9.8c). Některé z identifikovaných nenasyčených triacylglycerolů naznačují přítomnost rostlinných olejů²⁸⁻³⁰. Jde například o trilinoleoylglycerol (v koeluci s dilinolenoylstearoylglycerolem, LLL + LnLnS, analyt číslo 63, podíl 3,01 %) nebo dilinoleoylstearylsterol (LLO, analyt číslo 64, podíl 6,00 %). Triacylglyceroly dierykoyllinoleoylglycerol (ErErL, analyt číslo 130, podíl 1,59 %) a dierykoyllinolenoylglycerol (ErErLn, analyt číslo 125, podíl 1,10 %) indikují řepkový olej^{14,19}. Ve vzorku D byl nalezen také triricinoleoylglycerol ve vysokém podílu (RnRnRn, analyt číslo 1, podíl 6,60 %). Tento triacylglycerol potvrzuje přítomnost ricinového oleje⁶⁷⁻⁶⁹.

Triacylglycerolový profil vzorku E (obr. 9.16e) se podobá triacylglycerolovému profilu vzorku D (obr. 9.16d). Byla potvrzena přítomnost másla v kombinaci s blíže nespecifikovaným rostlinným olejem. Myristoyldipalmitoylglycerol (v koeluci s palmitoyldipentadecoylglycerolem, MPP + PPaPa, analyt číslo 60, podíl 6,00 %) a palmitoyldistearoylglycerol (PSS, analyt číslo 111, podíl 2,44 %) indikují živočišný tuk³¹. Na tuk pocházející z přežvýkavců poukazují identifikované triacylglyceroly s vázanými kyselinami pentadecylovou a margarylovou¹⁴ podobně jako tristearoylglycerol (SSS, analyt číslo 122, podíl 3,01 %)³⁴, dioleoylstearoylglycerol³⁶ (OOS, analyt číslo 102, podíl 1,83 %), oleoyldistearoylglycerol³⁶ (OSS, analyt číslo 103, podíl 1,50 %), myristoylpalmitoylstearoylglycerol^{36,37} (MPS, analyt číslo 84, podíl 7,65 %) a myristoylstearylpalmitoylglycerol³⁷ (MOP, analyt číslo 65, podíl 5,41 %). Margaroyldistearoylglycerol (MaSS, analyt číslo 124) charakteristický pro tuk přežvýkavců ale identifikován nebyl. Mohlo by se proto jednat o máslo vyrobené z mléka produkovaného přežvýkavci. Tuto domněnku potvrzuje nález triacylglycerolů s vázanými kyselinami kaprinovou (Ca), laurovou (La) a myristovou (M) (analyt číslo 12, podíl 1,87 %), které byly rovněž identifikovány v referenčním vzorku másla (obr. 9.8c). Trilinoleoylglycerol v koeluci s dilinolenoylstearoylglycerolem (LLL + LnLnS, analyt číslo 63, podíl 4,54 %) prokazuje přítomnost rostlinného oleje²⁸⁻³⁰. Kvůli absenci dalších nenasyčených triacylglycerolů ale nelze specifikovat původ rostlinného oleje.

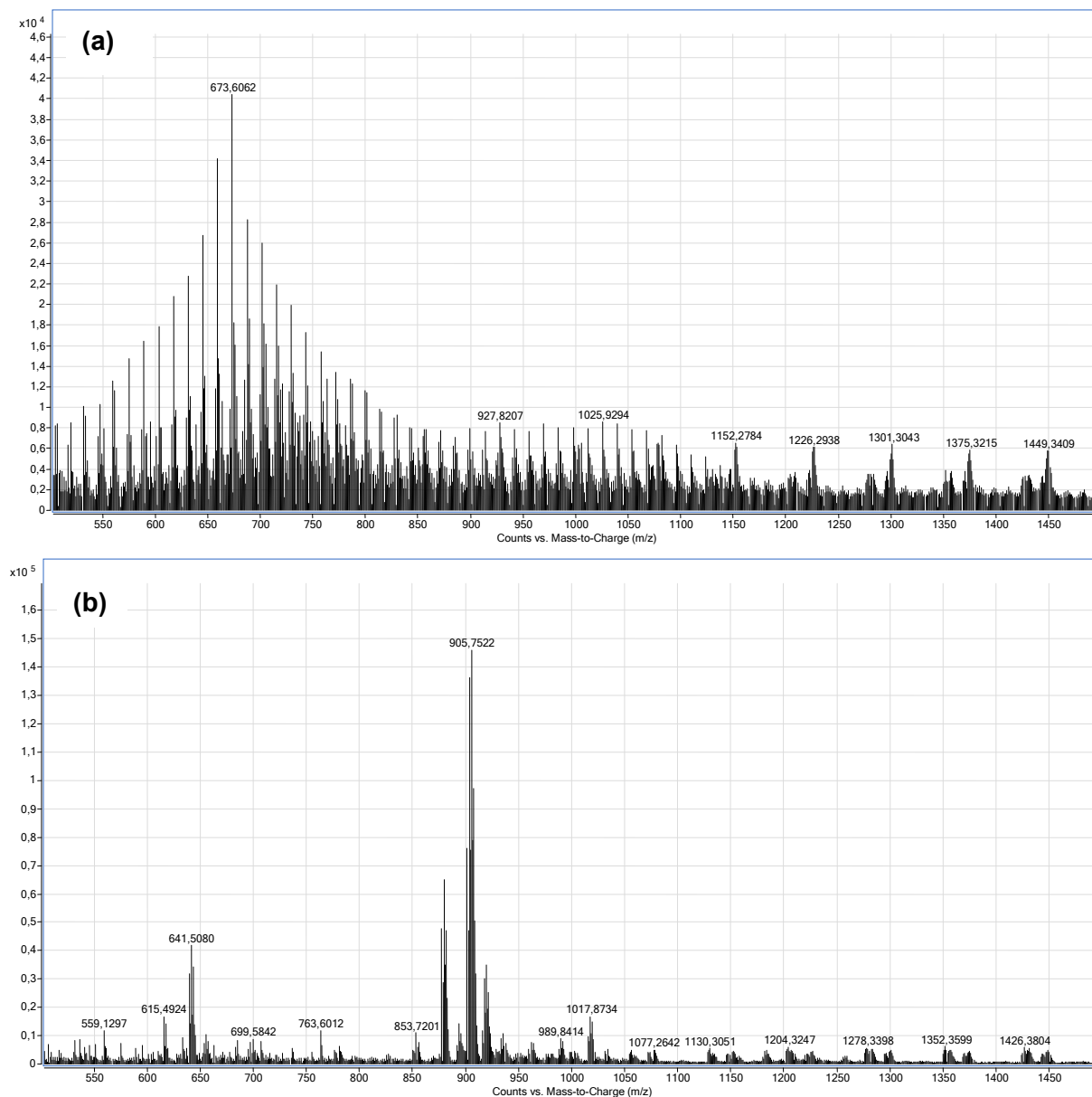
Podle triacylglycerolového profilu (obr. 9.16f) obsahuje vzorek F ricinový olej v kombinaci s blíže nespecifikovaným živočišným tukem. Triacylglyceroly obsahující ricinolejovou kyselinu, které eluují mezi 25. a 38. minutou, jsou charakteristické pro ricinový olej⁶⁷⁻⁶⁹. V největším podílu byl stanoven linoleoylricinoleoylstearoylglycerol (LRnS, analyt číslo 6, podíl 10,04 %). Na přítomnost rostlinného oleje poukazují také nenasyčené triacylglyceroly²⁸⁻³⁰ trilinoleoylglycerol v koeluci s dilinolenoylstearoylglycerolem (LLL + LnLnS, analyt číslo 63, podíl 2,76 %), nebo trioleoylglycerol (OOO, analyt číslo 96, podíl 8,56 %). Vzorek F ale obsahuje také triacylglyceroly myristoyldipalmitoylglycerol (MPP, analyt číslo 54, podíl 2,81 %) a palmitoyldistearoylglycerol (PSS, analyt číslo 111, podíl 3,17 %), které jsou charakteristické pro živočišný tuk³¹. Přítomnost pentadecylové a margarylové kyseliny vázaných v triacylglycerolech může naznačovat tuk přežvýkavců¹⁴, který také indikují tristearoylglycerol³⁴ (SSS, analyt číslo 122, podíl 2,06 %) nebo dioleoylstearoylglycerol³⁶ (OOS, analyt číslo 102, podíl 1,12 %). Absence margaroyldistearoylglycerolu (MaSS, analyt číslo 124) by mohla naznačovat přítomnost másla. Nebyly ale identifikovány triacylglyceroly obsahující kaprinovou (Ca) a laurovou (La) kyselinu, které jsou hojně zastoupené v referenčním vzorku másla (obr. 9.8c).

9.6.3.4 Charakterizace metodou FIA-MS

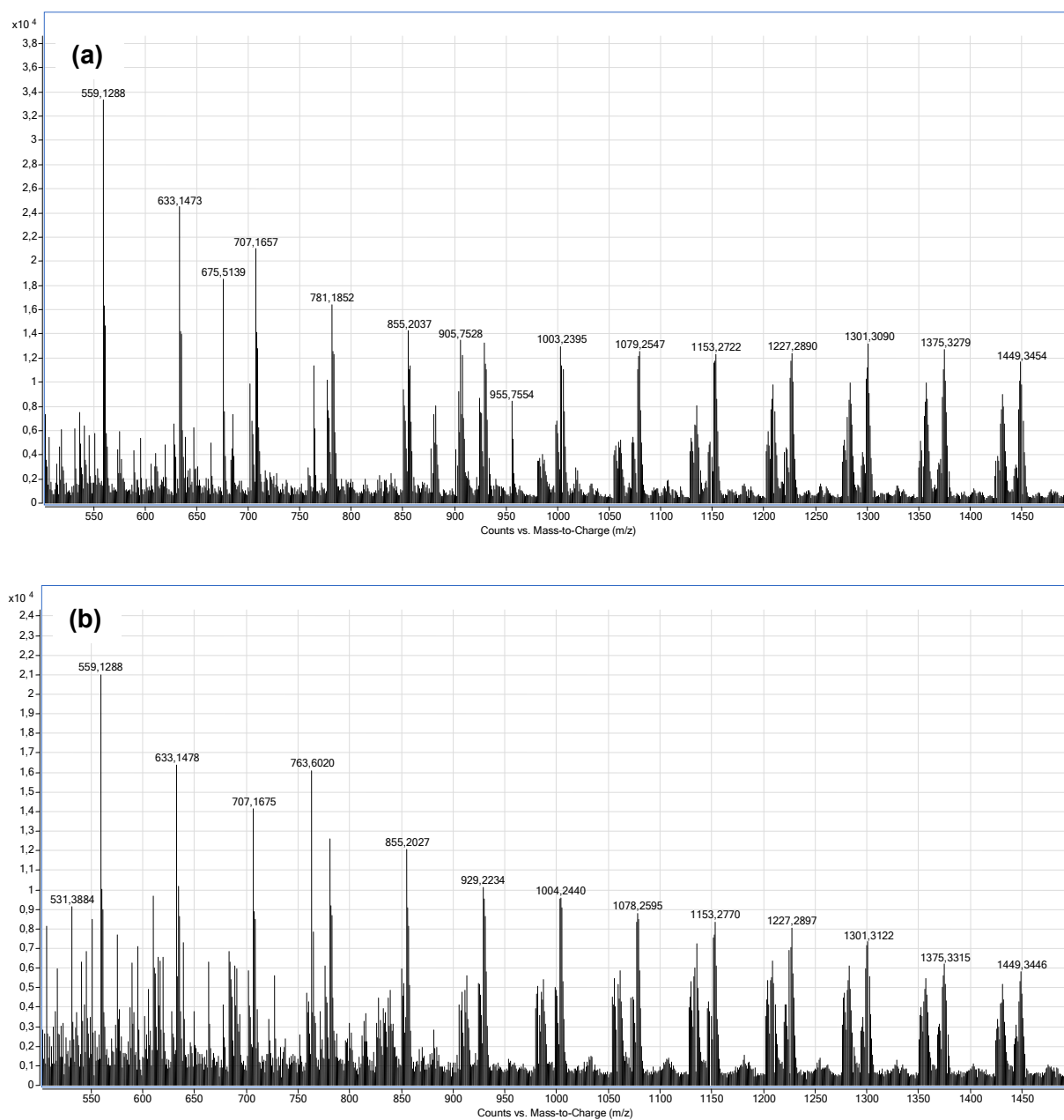
Naměřená hmotností spektra všech vzorků historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století získaná metodou FIA-MS byla porovnána s literaturou¹². Jak je patrné z obr. 9.17, pouze vzorek B obsahuje všechny čtyři esterové clustery, které byly popsány v odst. 9.3.4. Podle tabulky 9.18 se většina iontů identifikovaných ve vzorku B s literaturou shoduje s odchylkou do $m/z \pm 20$ ppm. Přítomnost včelího vosku ve vzorku B potvrzují také kyseliny 14-hydroxypalmitová, 15-hydroxypalmitová a cerotová, které byly identifikovány metodou GC-MS screeningu (odst. 9.6.3.1). Ve vzorcích A a C, jejichž spektra jsou zobrazena na obr. 9.18, byly identifikovány pouze některé ionty příslušející esterům popisovaných literaturou¹² (shoda do $m/z \pm 50$ ppm). Podobně jako vzorky A a C, ani ostatní analyzované vzorky D až F (obr. 9.19 a 9.20) neobsahují žádné další látky indikující přítomnost včelího vosku. Přítomnost včelího vosku je proto v těchto vzorcích neprůkazná.



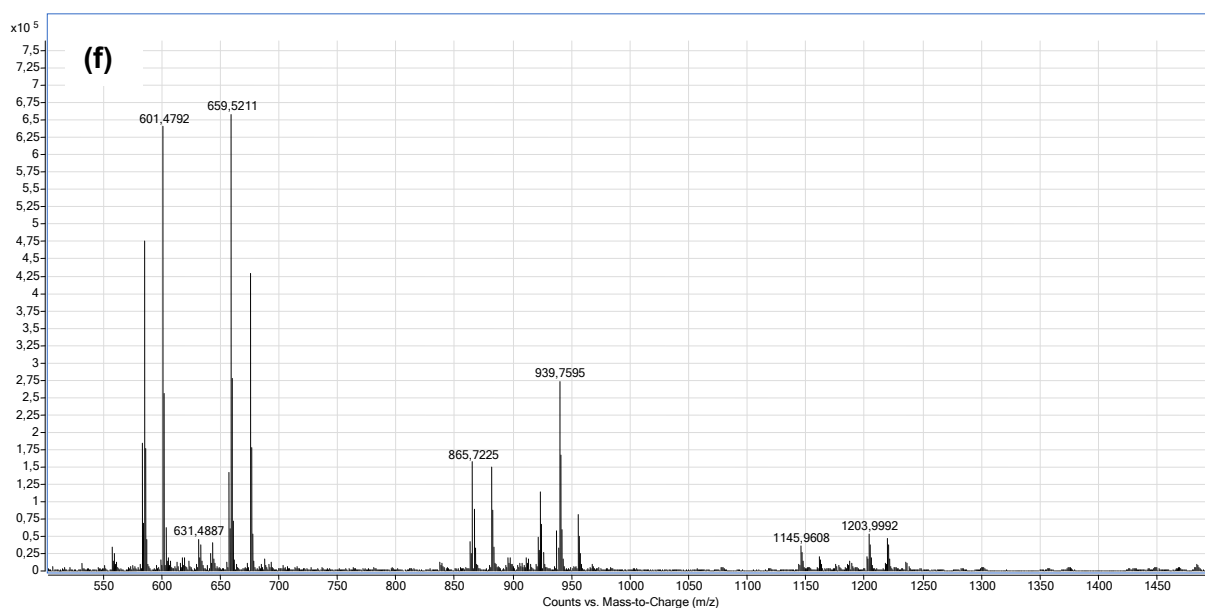
Obr. 9.17 FIA-MS spektrum historického pozůstatku mastí z první poloviny 20. století, vzorek B. Mobilní fáze sestávala z methanolu a vody v poměru 85:15 (v/v), $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Objem nástříku vzorku byl 1 mm^3 . Podmínky ionizace jsou uvedeny v odst. 9.5.4.



Obr. 9.18 FIA-MS spektra vzorků historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století: (a) vzorek A, (b) vzorek C, které neobsahují žádné z esterových clusterů uvedených v odst. 9.3.4. Mobilní fáze sestávala z methanolu a vody v poměru 85:15 (v/v), $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Objem nástřiku vzorku byl 1 mm^3 . Podmínky ionizace jsou uvedeny v odst. 9.5.4.



Obr. 9.19 FIA-MS spektra vzorků historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století: (a) vzorek D, (b) vzorek E, které neobsahují žádné z esterových clusterů uvedených v odst. 9.3.4. Mobilní fáze sestávala z methanolu a vody v poměru 85:15 (v/v), $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Objem nástřiku vzorku byl 1 mm^3 . Podmínky ionizace jsou uvedeny v odst. 9.5.4.



Obř. 9.20FIA-MS spektrum historického pozůstatku mastí z první poloviny 20. století, vzorek F, který neobsahuje žádný z esterových clusterů uvedených v odst. 9.3.4. Mobilní fáze sestávala z methanolu a vody v poměru 85:15 (v/v), $F = 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Objem nástřiku vzorku byl 1 mm^3 . Podmínky ionizace jsou uvedeny v odst. 9.5.4.

Tabulka 9.18

Identifikace iontů monoesterů palmitové kyseliny s mastnými alkoholy, diesterů palmitové a 15-hydroxypalmitové kyseliny s mastnými alkoholy, triesterů a tetraesterů palmitové a 15-hydroxypalmitové kyseliny s mastnými mono- a dialkoholy ve vzorcích historických pozůstatků mastí z první poloviny 20.století. V tabulce jsou uvedeny: skupina analytů, m/z iontů podle La Nasa a kol.¹², sumární vzorec prekurzorového iontu $[M+Na]^+$ a odchylka m/z identifikovaných iontů ve vzorcích historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století od literatury. Vzorky D až F neobsahují žádné ionty příslušející studovaným esterům.

| skupina | m/z | sumární vzorec iontu $[M+Na]^+$ | odchylka m/z identifikovaných iontů od literatury / ppm | | |
|------------|---------|---------------------------------|---|----------|----------|
| | | | vzorek A | vzorek B | vzorek C |
| monoestery | 615,605 | $[C_{40}H_{80}O_2+Na]^+$ | – | 18,4 | – |
| | 631,600 | $[C_{40}H_{80}O_3+Na]^+$ | 52,2 | 10,9 | – |
| | 643,636 | $[C_{42}H_{84}O_2+Na]^+$ | – | 26,3 | – |
| | 659,631 | $[C_{42}H_{84}O_3+Na]^+$ | – | 21,7 | – |
| | 687,663 | $[C_{44}H_{88}O_3+Na]^+$ | – | 17,9 | 25,2 |
| | 715,694 | $[C_{46}H_{92}O_3+Na]^+$ | – | 8,8 | 40,5 |
| | 743,725 | $[C_{48}H_{96}O_3+Na]^+$ | – | 14,8 | – |
| diestery | 869,829 | $[C_{56}H_{110}O_5+Na]^+$ | 49,4 | 6,9 | – |
| | 885,825 | $[C_{56}H_{110}O_5+Na]^+$ | 48,5 | 20,3 | – |
| | 897,861 | $[C_{58}H_{114}O_4+Na]^+$ | – | 14,5 | – |
| | 913,856 | $[C_{58}H_{114}O_5+Na]^+$ | – | 18,6 | – |
| | 925,892 | $[C_{60}H_{118}O_4+Na]^+$ | – | 9,7 | – |
| | 941,887 | $[C_{60}H_{118}O_5+Na]^+$ | – | 12,7 | – |
| | 953,924 | $[C_{62}H_{122}O_4+Na]^+$ | – | 10,5 | – |
| | 969,918 | $[C_{62}H_{122}O_5+Na]^+$ | – | 7,2 | – |
| | 981,955 | $[C_{64}H_{126}O_4+Na]^+$ | – | 18,3 | – |
| | 997,949 | $[C_{64}H_{126}O_5+Na]^+$ | 50,1 | 13,0 | – |

Tabulka 9.18 pokračuje na další straně.

Pokračování tabulky 9.18 z předchozí strany.

| skupina | m/z | sumární vzorec iontu [M+Na] ⁺ | odchylka m/z identifikovaných iontů od literatury / ppm | | |
|-------------|----------|---|---|----------|----------|
| | | | vzorek A | vzorek B | vzorek C |
| triestery | 1125,062 | [C ₇₂ H ₁₄₁ O ₆ +Na] ⁺ | 36,0 | 10,7 | – |
| | 1141,057 | [C ₇₂ H ₁₄₁ O ₇ +Na] ⁺ | – | 15,8 | – |
| | 1153,093 | [C ₇₄ H ₁₄₅ O ₆ +Na] ⁺ | 48,2 | – | – |
| | 1169,088 | [C ₇₄ H ₁₄₅ O ₇ +Na] ⁺ | – | 13,7 | – |
| | 1181,125 | [C ₇₆ H ₁₄₉ O ₆ +Na] ⁺ | – | 10,2 | – |
| | 1197,119 | [C ₇₆ H ₁₄₉ O ₇ +Na] ⁺ | – | 9,2 | – |
| | 1237,187 | [C ₈₀ H ₁₅₇ O ₆ +Na] ⁺ | – | 38,1 | – |
| tetraestery | 1379,287 | [C ₈₈ H ₁₇₁ O ₈ +Na] ⁺ | 26,0 | –7,3 | –0,4 |
| | 1407,318 | [C ₉₀ H ₁₇₅ O ₉ +Na] ⁺ | – | 5,8 | – |
| | 1422,305 | [C ₉₀ H ₁₇₄ O ₉ +Na] ⁺ | – | 4,6 | 0,4 |
| | 1434,341 | [C ₉₂ H ₁₇₈ O ₈ +Na] ⁺ | 32,6 | 13,0 | 5,2 |
| | 1450,336 | [C ₉₂ H ₁₇₈ O ₉ +Na] ⁺ | –0,1 | –4,9 | –10,7 |
| | 1462,373 | [C ₉₄ H ₁₈₂ O ₈ +Na] ⁺ | – | 7,1 | 10,6 |
| | 1478,368 | [C ₉₄ H ₁₈₂ O ₉ +Na] ⁺ | – | 11,9 | 0,9 |
| | 1492,347 | [C ₉₄ H ₁₈₀ O ₁₀ +Na] ⁺ | 38,6 | 7,3 | – |

9.6.3.5 Kvantifikace vybraných účinných a pomocných látek metodou HPLC-UV

Možné účinné a pomocné látky v analyzovaných vzorcích historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století byly vybrány na základě výsledků metod GC-MS screeningu (odst. 9.6.3.1) a SPME-GC-MS (odst. 9.6.3.2). Separační metoda vychází z publikace Mradu a kol.⁴⁸, kteří v léčivých přípravcích analyzovali fenolické a flavonoidní látky. Optimalizace je popsána v odst. 9.5.5.

Jak uvádí tabulka 9.19, účinné látky byly kvantifikovány ve vzorcích C, D a F. Vzorky A, B a E neobsahují žádné z vybraných účinných či pomocných látek. Koncentrace vanilinu, acetylsalicylové kyseliny a D-limonenu byla ve všech vzorcích pod detekčním limitem metody.

Vzorek C obsahuje přibližně 1% podíl benzyl-benzoátu, který se používá jako repelent proti hmyzu, na léčbu svrabové infekce a proti vším^{64,65}. Vzorek historického pozůstatku mastí obsahuje také stopy benzoové kyseliny, která má antibakteriální a fungicidní účinky⁶⁴. Koncentrace benzoové kyseliny je ale pod kvantifikačním limitem metody HPLC-UV, jejím zdrojem může být rovněž hydrolyza benzyl-benzoátu.

Vzorek D obsahuje téměř 5% podíl resorcinolu (jehož přítomnost prozrazuje i načervenalá barva přípravku), více než 5% podíl salicylové kyseliny a 3,7% podíl benzokainu. Resorcinol se používá pro léčbu akné a seborhoické dermatitidy⁶⁴. Salicylová kyselina se v uvedené koncentraci používá rovněž při léčbě akné a seborhoické dermatitidy, dále pak při léčbě lupénky, ichtiózy a psoriázy⁶⁴. Benzokain účinkuje jako lokální anestetikum⁶⁴.

Vzorek F obsahuje téměř 3,8% podíl salicylové kyseliny a téměř 0,1% podíl fenolu. Roztoky fenolu se používají topicky proti svědění. Salicylová kyselina v uvedené koncentraci účinkuje při léčbě kožních onemocnění⁶⁴.

Tabulka 9.19

Podíl vybraných účinných a pomocných látek ve vzorcích historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století stanovený metodou HPLC-UV. Variační koeficient stanovení nepřesáhl 5 %. Podmínky separace pro stanovení resorcinolu, vanilinu, acetylsalicylové, benzoové a salicylové kyseliny a benzokainu: kolona XBridge® BEH C18 (3,0 × 150 mm; velikost částic 2,5 μm; Waters), teplota kolony byla 40 °C. Mobilní fáze: acetonitril (solvent A) a 0,1% vodný roztok fosforečné kyseliny (solvent B), $F = 0,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Podmínky separace pro stanovení fenolu, benzyl-benzoátu a D-limonenu: kolona XBridge® BEH C18 (3,0 × 150 mm; velikost částic 2,5 μm; Waters), teplota kolony byla 40 °C. Mobilní fáze: acetonitril (solvent A) a voda (solvent B), $F = 0,25 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, gradientová eluce. Další podmínky měření jsou uvedeny v odst. 9.5.5.

| analyt | podíl / % | | |
|---------------------|-------------|---------|-------------|
| | C | D | F |
| benzokain | < LOD | 3,7±0,1 | < LOD |
| benzoová kyselina | < LOQ | < LOD | < LOD |
| benzyl-benzoát | 1,073±0,003 | < LOQ | < LOD |
| fenol | < LOD | < LOD | 0,076±0,002 |
| resorcinol | < LOD | 4,8±0,1 | < LOD |
| salicylová kyselina | < LOD | 5,1±0,3 | 3,78±0,06 |

9.7 Závěr

V této části dizertační práce byl využit multianalytický přístup založený na kombinaci pěti různých separačních a spektrometrických metod k analýze dvanácti historických pozůstatků mastí, z nichž šest pocházelo z 18. století a šest z první poloviny 20. století. V případě mastí z 18. století bylo možné výsledky analýz porovnat s dobovými předpisy. V případě mastí z první poloviny 20. století umožnil použitý přístup identifikovat masťové základy a některé účinné látky.

9.7.1 Analýza historických pozůstatků mastí z 18. století

Z výsledků jednotlivých aplikovaných metod plyne, že vzorek H2-4943, mast z celeru, neobsahuje v souladu s dobovým předpisem lipidovou složku. Použití celeru dokazují identifikované kyseliny *p*-kumarová a ferulová. Přítomnost sitosterolu poukazuje na použití rostlinných materiálů. Ve vzorku byla v rozporu s dobovým předpisem prokázána přítomnost včelího vosku, který je nejspíše kontaminací (hypoteticky z koženého víčka uzavírajícího stojatku). Další látkou, která byla oproti dobovému předpisu prokázána navíc, je pryskyřice čeledi *Pinaceae*.

Ve vzorku H2-4946, mast z plodů, bylo na základě triacylglycerolového profilu a přítomnosti cholesterolu jako masťový základ v souladu s dobovým předpisem prokázáno vepřové sádlo. Ve vzorku historického pozůstatku mastí byl v rozporu s historickým předpisem nalezen včelí vosk, který je podobně jako v předchozím případě pravděpodobně kontaminací. Identifikace borneolu a kafru ve vzorku souvisí s citrusovými plody použitými při přípravě masti.

Masťovým základem ve vzorku H2-4948, jednoduchá růžová mast, je v souladu s historickým předpisem vepřové sádlo, což vedle triacylglycerolového profilu dokládá i přítomnost cholesterolu. Navíc byla oproti historickému předpisu prokázána přítomnost tuku přežvýkavců. Vzorek v rozporu s historickým předpisem obsahuje včelí vosk, jedná se velmi pravděpodobně – jako u předchozích

případů – o kontaminaci. Voda z růží obsahuje vonnou látku 2-fenylethan-1-ol⁷⁰, tato látka nebyla v analyzovaném historickém pozůstatku identifikována. Ačkoliv byl nalezen jeden marker pryskyřic, nelze přítomnost pryskyřic potvrdit, což je v souladu s historickým předpisem.

Ve vzorku H2-4949, mast z topolových pupenů, byl prokázán živočišný tuk, pravděpodobně přežvýkavců a rostlinné oleje. Sitosterol prokazuje přítomnost rostlinných materiálů. Ve vzorku byly identifikovány charakteristické markery pryskyřice čeledi *Pinaceae*, která není součástí historického předpisu. Přítomnost těchto látek lze ale vysvětlit původem z pupenů topolu. Topolové pupeny jsou rovněž bohaté na fenolické látky a flavonoidy⁷¹, které ve vzorku historického pozůstatku masti nebyly identifikovány.

Vzorek H2-9293, balzám podle předpisu Jacoba del Pintho, obsahuje podle triacylglycerolového profilu rostlinný olej s příměsí tuku přežvýkavců, na který poukazují cholesterol a sitosterol. Pro přípravu třezalkového oleje mohl být podle literatury⁵ rostlinný olej s příměsí živočišného tuku opravdu použit. Lze proto předpokládat, že základ masti je v souladu s historickým předpisem. Podle triacylglycerolového profilu nelze dokázat přítomnost lidského sádla, nicméně pouze v tomto studovaném vzorku historického pozůstatku masti byly identifikovány deriváty androstenonu, androstendionu a estratrienonu. Přítomnost lidského sádla je proto pravděpodobná. Včelí vosk byl v souladu s historickým předpisem potvrzen. Identifikací markerů byla v souladu s historickým předpisem potvrzena přítomnost pryskyřice čeledi *Pinaceae*. Přestože je třezalkový olej podle dobového předpisu nejvíce zastoupen, ověření jeho pravosti je nesnadné, protože charakteristické látky (zejména hypericin a jeho deriváty) jsou poměrně nestabilní⁷².

Srovnávací analýzou historického pozůstatku H2-AC, sádlo divokého králíka, s novodobým referenčním vzorkem králíčího sádla nebyla nalezena úplná shoda v triacylglycerolových profilech. Vzorek historického pozůstatku sádla divokého králíka obsahuje oproti referenčnímu vzorku králíčího sádla méně nenasycených triacylglycerolů, což může být způsobeno jejich oxidací, nebo mezidruhovými rozdíly. Analýza triacylglycerolového profilu společně s přítomným cholesterolem dokazují přítomnost živočišného tuku. Ve vzorku historického pozůstatku sádla divokého králíka nebyl nalezen včelí vosk, pryskyřice, ani další specifické analyty.

9.7.2 *Analýza historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století*

Masťový základ vzorku A není lipidové povahy, přestože cholesterol a lanosterol naznačují přítomnost živočišných materiálů. Oproti ostatním vzorkům historických pozůstatků mastí z první poloviny 20. století byly ve vzorku identifikovány mastné alkoholy s krátkým uhlíkovým řetězcem (20, a 23–26 atomů) a alkany v rozmezí 20–24 atomů uhlíku. Mohlo by se proto jednat například o vazelínu⁶⁴. Ve vzorku byly nalezeny stopy kafru, azulenu a D-limonenu. Podle popisku nádoby, ve které byl historický pozůstatek masti uchovávan, se jedná o mast na oči, což odpovídá zjištěním.

Masťovým základem vzorku B je tuk pocházející z přežvýkavců v kombinaci se včelím voskem. Ačkoliv byl nalezen sitosterol, žádné další známky ingrediencí rostlinného původu nebyly nalezeny. Vzorek B obsahuje stopy D-limonenu.

Řepkový olej byl podle triacylglycerolového profilu prokázán ve vzorku C. Absence cholesterolu potvrzuje zjištěný lipidový základ. Vanilin a D-limonen byly identifikovány jako pomocné látky.

Z účinných látek byly identifikovány benzoová kyselina, azulen, kafr a benzyl-benzoát, jehož koncentrace byla stanovena v podílu 1,073 %. Původní účel léčivého přípravku není známý, avšak vysoký podíl benzyl-benzoátu poukazuje na možné použití proti svrabu a vším^{64,65}.

Masťovým základem vzorku D je směs másla a řepkového a ricinového oleje. Identifikovaný cholesterol potvrzuje přítomnost živočišného materiálu. Historický pozůstatek masti obsahuje několik účinných a pomocných látek. Zatímco salicylová kyselina (podíl 5,1 %), resorcinol (podíl 4,8 %) a benzokain (podíl 3,7 %) byly stanoveny ve vyšších podílech, benzyl-benzoát, D-limonen a acetylsalicylová kyselina byly nalezeny jen ve stopových množstvích. Historický pozůstatek masti mohl být podle nalezených účinných látek používán pro léčbu akné, seborhoické dermatitidy, lupénky, ichtiózy a psoriázy s anestetickým účinkem⁶⁴.

Podobně jako v případě vzorku D je masťovým základem vzorku E nejspíš máslo v kombinaci s rostlinným olejem. Přítomnost živočišného tuku potvrzuje cholesterol. Je pozoruhodné, že ačkoliv je složení lipidového základu vzorků D a E velmi podobné, v případě vzorku D popis nádobky uvádí masť, kdežto v případě vzorku E by se mělo jednat o pastu. Je tedy možné, že pro přípravu obou vzorků historických pozůstatků byl použit stejný lipidový základ. Ve vzorku E jsou ale nejspíš obsaženy pevné látky anorganické povahy, které nebyly popisovány analytickými metodami studovány. Ve vzorku E byla prokázána přítomnost benzyl-benzoátu, benzokainu a karvonu. Koncentrace benzyl-benzoátu a benzokainu ale byla pod detekčním limitem metody HPLC-UV. Pravděpodobně jde o pastu obsahující anorganické ingredience, které nebyly použitými analytickými metodami identifikovány.

Ve vzorku F byl jako masťový základ prokázán podle triacylglycerolového profilu ricinový olej ve směsi s živočišným tukem. Přítomnost živočišného tuku také potvrzuje identifikovaný cholesterol. Vzorek F obsahuje 3,78 % podíl salicylové kyseliny, 0,076 % podíl fenolu a stopy resorcinolu a D-limonenu, které byly pod detekčním limitem metody HPLC-UV. Stopové množství resorcinolu a D-limonenu naznačuje jako v předchozích případech možnou kontaminaci. Roztok fenolu se dříve používal topicky proti svědění a salicylová kyselina ve zjištěné koncentraci účinkuje při léčbě lupénky, seborhoické dermatitidy, ichtiózy, psoriázy a akné⁶⁴. Právě na základě přítomnosti salicylové kyseliny lze odhadnout původní zamýšlený účel léčivého přípravku.

9.8 Literatura k 9. kapitole

1. Rektořík Z., Bílek L.: *Úvod do přípravy léků a galeník*. Praha, Ústřední svaz lékárníků, 1947.
2. Sklenář Z., Skořepová M., Staněk M., Jirásek R.: *Magistraliter receptura v dermatologii*. Praha, Galén 2009.
3. Drábek P.: Léčivé přípravky v Obnoveném pražském dispensatoriu z roku 1750 II. část – zbylé lékové formy a vyhodnocení. *Česká a slovenská farmacie* **59** (2010) 234–240.
4. Červinka O., Dědek V., Ferles M.: *Organická chemie*. 2. vydání. Praha, SNTL 1982.
5. Saliu F., Modugno F., Orlandi M., Colombini M. P.: HPLC-APCI-MS analysis of triacylglycerols (TAGs) in historical pharmaceutical ointments from the eighteenth century. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **401** (2011) 1785–1800.
6. Rindone B., Saliu F., Bertoa R. S.: Functionalization of the unactivated carbon-hydrogen bond via ozonation. *ozone. Science & Engineering* **30** (2008) 165–171.
7. Sadowska J., Johansson B., Johannessen E., Friman R., Broniarz-Press L., Rosenholm J. B.: Characterization of ozonated vegetable oils by spectroscopic and chromatographic methods. *Chemistry and Physics of Lipids* **151** (2008) 85–91.
8. Regert M.: Direct mass spectrometry to characterise wax and lipid materials. In: *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology*. Colombini M. P., Modugno F. (Eds.). Wiley 2009, p. 97–129.
9. Tulloch A. P.: Beeswax-composition and analysis. *Bee World* **61** (1980) 47–62.
10. Bonaduce I., Colombini M. P.: Characterisation of beeswax in works of art by gas chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry procedures. *Journal of Chromatography A* **1028** (2004) 297–306.
11. Asperger A., Engewald W., Fabian G.: Thermally assisted hydrolysis and methylation: A simple and rapid online derivatization method for the gas chromatographic analysis of natural waxes. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **61** (2001) 91–109.
12. La Nasa J., Nardella F., Andrei L., Giani M., Degano I., Colombini M. P., Ribechini E.: Profiling of high molecular weight esters by flow injection analysis-high resolution mass spectrometry for the characterization of raw and archaeological beeswax and resinous substances. *Talanta* **212** (2020) 120800.
13. Colombini M. P., Modugno F., Ribechini E.: Direct exposure electron ionization mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry techniques to study organic coatings on archaeological amphorae. *Journal of Mass Spectrometry* **40** (2005) 675–687.
14. Colombini M. P., Modugno F., Colombini M. P., Modugno F., Ribechini E.: Organic materials in art and archaeology. In: *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology*. Colombini M. P., Modugno F. (Eds.). Wiley 2009, p. 1–36.
15. Modugno, F. & Ribechini, E. GC/MS in the characterisation of resinous materials. In: *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology*. Colombini M. P., Modugno F. (Eds.). Wiley 2009, p. 215–235.
16. Duce C., Orsini S., Spepi A., Colombini M. P., Tiné M. R., Ribechini E.: Thermal degradation chemistry of archaeological pine pitch containing beeswax as an additive. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **111** (2015) 254–264.
17. Ribechini E.: Direct mass spectrometric techniques: Versatile tools to characterise resinous materials. In: *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology*. Colombini M. P., Modugno F. (Eds.). Wiley 2009, p. 75–96.
18. Colombini M. P., Giachi G., Iozzo M., Ribechini E.: An Etruscan ointment from Chiusi (Tuscany, Italy): Its chemical characterization. *Journal of Archaeological Science* **36** (2009) 1488–1495.
19. Colombini M. P., Modugno F., Ribechini E.: GC/MS in the characterization of lipids. In: *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology*. Colombini M. P., Modugno F. (Eds.). Pisa, Wiley 2009, p. 189–213.
20. Lattuati-Derieux A., Thao S., Langlois J., Regert M.: First results on headspace-solid phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry of volatile organic compounds emitted by wax objects in museums. *Journal of Chromatography A* **1187** (2008) 239–249.

21. Schmitz P., Tschickardt M.: Aldehydes (formaldehyde, acetaldehyde, propionaldehyde, butyraldehyde, glutaraldehyde, pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal) [Air Monitoring Methods, 2002]. In: *The MAK-Collection for Occupational Health and Safety*. Greim H. (Ed.). Weinheim, Wiley-VCH, 2012.
22. Hamm S., Bleton J., Tchaplá A.: Headspace solid phase microextraction for screening for the presence of resins in Egyptian archaeological samples. *Journal of Separation Science* **27** (2004) 235–243.
23. Buckley S. A., Evershed R. P.: Organic chemistry of embalming agents in Pharaonic and Graeco-Roman mummies. *Nature* **413** (2001) 837–841.
24. Jeleń H., Obuchowska M., Zawirska-Wojtasiak R., Wasowicz E.: Headspace solid-phase microextraction use for the characterization of volatile compounds in vegetable oils of different sensory quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48** (2000) 2360–2367.
25. Van Ruth S. M., Roozen J. P., Jansen F. J. H. M.: Aroma profiles of vegetable oils varying in fatty acid composition vs. concentrations of primary and secondary lipid oxidation products. *Nahrung - Food* **44** (2000) 318–322.
26. Jamrógiewicz M., Wielgomas B.: Detection of some volatile degradation products released during photoexposure of ranitidine in a solid state. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **76** (2013) 177–182.
27. Strano-Rossi S., Molaioni F., Botrè F.: Application of solid-phase microextraction to antidoping analysis: Determination of stimulants, narcotics, and other classes of substances excreted free in urine. *Journal of Analytical Toxicology* **29** (2005) 217–222.
28. Mottram H. R., Woodbury S. E., Evershed R. P.: Identification of triacylglycerol positional isomers present in vegetable oils by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **11** (1997) 1240–1252.
29. Parcerisa J., Casals I., Boatella J., Codony R., Rafecas M.: Analysis of olive and hazelnut oil mixtures by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry of triacylglycerols and gas-liquid chromatography of non-saponifiable compounds (tocopherols and sterols). *Journal of Chromatography A* **881** (2000) 149–158.
30. Fasciotti M., Pereira Netto A. D.: Optimization and application of methods of triacylglycerol evaluation for characterization of olive oil adulteration by soybean oil with HPLC-APCI-MS-MS. *Talanta* **81** (2010) 1116–1125 (2010).
31. Craig T., Grave P., Glover S.: HPLC-MS characterisation of adsorbed residues from Early Iron Age ceramics, Gordion, Central Anatolia. In: *New Direction in Archaeological Sciences*. Fairbairn A., O'Connor S., Mawrick B. (Eds.). Canberra, ANU Press 2009. p. 203–212.
32. Kimpe K., Jacobs P. A., Waelkens M.: Mass spectrometric methods prove the use of beeswax and ruminant fat in late Roman cooking pots. *Journal of Chromatography A* **968** (2002) 151–160.
33. Mottram H. R., Crossman Z. M., Evershed R. P.: Regiospecific characterisation of the triacylglycerols in animal fats using high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Analyst* **126** (2001) 1018–1024.
34. Romanus K., Poblome J., Verbeke K., Luypaerts A., Jacobs P., De Vos D., Waelkens M.: An evaluation of analytical and interpretative methodologies for the extraction and identification of lipids associated with pottery sherds from the site of Sagalossos, Turkey. *Archaeometry* **49**, 729–747 (2007).
35. Dugo P., Kumm T., Fazio A., Dugo G., Mondello L.: Determination of beef tallow in lard through a multidimensional off-line non-aqueous reversed phase-argentation LC method coupled to mass spectrometry. *Journal of Separation Science* **29** (2006) 567–575.
36. Nesměrák K., Kunešová J.: Farmaceutická historie kapucínského kláštera v Praze na Hradčanech část I. Klášterní lékárna. *Česká a Slovenská farmacie* **64** (2015) 79–94.
37. Collegium Pharmaceuticum: *Dispensatorium pharmaceuticum Austriaco-Viennense*. Kürner, Vienna 1729.
38. Facultas Medica: *Dispensatorium medico-pharmaceuticum Pragense*. Vetero-Pragae, 1739.
39. Triller D. W.: *Dispensatorium pharmaceuticum universale: tomus secundus*. Varrentrapp, Francofurtum 1764.
40. Michnová V.: Lékárenská závaží 18. a 19. století ve sbírkách Krajského vlastivědného muzea v Olomouci. *Zprávy Krajského vlastivědného Muzea v Olomouci* **216** (1982) 20–25.
41. *Sborník příspěvků k dějinám farmacie severomoravského kraje*. Kolektiv autorů. Ostrava, KUNZ 1976.
42. National Institute of Standards and Technology: *Standard Reference Data* Dostupné z: <https://www.nist.gov/srd>.

43. Krist S., Stuebiger G., Bail S., Unterweger H.: Detection of adulteration of poppy seed oil with sunflower oil based on volatiles and triacylglycerol composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54** (2006) 6385–6389.
44. Degano I., La Nasa J., Ghelardi E., Modugno F., Colombini M. P.: Model study of modern oil-based paint media by triacylglycerol profiling in positive and negative ionization modes. *Talanta* **161** (2016) 62–70.
45. La Nasa J., Ghelardi E., Degano I., Modugno F., Colombini M. P.: Core shell stationary phases for a novel separation of triglycerides in plant oils by high performance liquid chromatography with electrospray-quadrupole-time of flight mass spectrometer. *Journal of Chromatography A* **1308** (2013) 114–124.
46. Saliu F., Degano I., Colombini M. P.: Identification of triacylglycerols in archaeological organic residues by core-shell reversed phase liquid chromatography coupled to electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1346** (2014) 78–87.
47. Agilent: *MassHunter Qualitative Analysis*. Dostupné z: <https://www.agilent.com/en/product/software-informatics/mass-spectrometry-software/data-analysis/qualitative-analysis>
48. Mradu G., Saumyakanti S., Sohini M., Arup M.: HPLC profiles of standard phenolic compounds present in medicinal plants. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* **4** (2012) 162–167.
49. Derewiaka D., Sosińska E., Obiedziński M., Krogulec A., Czaplicki S. Determination of the adulteration of butter. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **113** (2011) 1005–1011.
50. Kalo P., Kempainen A., Ollilainen V.: Determination of triacylglycerols in butterfat by normal-phase HPLC and electrospray-tandem mass spectrometry. *Lipids* **44** (2009) 169–195.
51. Yener S., van Valenberg H. J. F.: Characterisation of triacylglycerols from bovine milk fat fractions with MALDI-TOF-MS fragmentation. *Talanta* **204** (2019) 533–541.
52. Tinto W. F., Elufioye T. O., Roach J.: Waxes. In: *Pharmacognosy. Fundamentals, Applications and Strategies*. Badal S., Delgoda R. B. T. P. (Eds.). London, Academic Press 2017. p. 443–455
53. Yao Y., Wei S., Mengjie Z., Guixing R.: Phenolic composition and antioxidant activities of 11 celery cultivars. *Journal of Food Science* **75** (2010) 9–13.
54. Baeten J., Romanus K., Degryse P., De Clercq W., Poelman H., Verbeke K., Luypaerts A., Walton M., Jacobs P., De Vos D., Waelkens M.: Application of a multi-analytical toolset to a 16th century ointment: Identification as lead plaster mixed with beeswax. *Microchemical Journal* **95** (2010) 227–234.
55. Riedo C., Scalarone D., Chiantore O.: Pyrolysis-GC/MS for the identification of macromolecular components in historical recipes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **401** (2011) 1761–1769.
56. Cao Q., Wang S.-X., Cheng Y.-X.: Abietane diterpenoids with potent cytotoxic activities from the resins of *Populus euphratica*. *Natural Products Communications* **14** (2019) 1–5.
57. Liu Y.-Y., Qin F.-Y., He T.-C., Xiong Y.-P., Yan Y.-M., Cheng Y.-X.: Structurally diverse terpenoids with neuroprotective activities from the resins of *Populus euphratica*. *Fitoterapia* **143** (2020) 104560.
58. Bleton J., Tchaplá A.: SPME/GC-MS in the characterisation of terpenic resins. In: *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology*. Colombini M. P., Modugno F. (Eds.). Wiley 2009, p. 261–302.
59. Espina L., García-Gonzalo D., Laglaoui A., Mackey B. M., Pagán R.: Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituents and their use in preservation of fruit juices. *International Journal of Food Microbiology* **161** (2013) 23–30.
60. Blekas G., Tsimidou M., Boskou D.: Olive oil composition. In: *Olive Oil. Chemistry and Technology*. 2nd edition. Boskou D. (Ed.). AOCS Press 2006. p. 41–72.
61. Lyles J. T., Kim A., Nelson K., Bullard-Roberts A. L., Hajdari A., Mustafa B., Quave C. L.: The chemical and antibacterial evaluation of St. John's wort oil macerates used in Kosovar traditional medicine. *Frontiers in Microbiology* **8** (2017) 1–19.
62. Villar, J. Determination of fatty acid and triacylglycerol composition of human adipose tissue. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **581** (1992) 171–178.
63. Copley M. S., Bland H. A., Rose P., Horton M., Evershed R. P.: Gas chromatographic, mass spectrometric and stable carbon isotopic investigations of organic residues of plant oils and animal fats employed as illuminants in archaeological lamps from Egypt. *Analyst* **130** (2005) 860–871.
64. *Martindale: The Complete Drug Reference*. 36th Edition. Sweetman S. C. (Ed.). London, Pharmaceutical Press, 2009.

65. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 4th Edition. Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B. (Eds.). London, Pharmaceutical Press 2011.
66. Trease G. E, Evans W. C.: *Trease and Evans' Pharmacognosy*. 16th Edition. Edinburgh, Saunders 2009.
67. Degano I, La Nasa J., Ghelardi E., Modugno F., Colombini M. P.: Model study of modern oil-based paint media by triacylglycerol profiling in positive and negative ionization modes. *Talanta* **161** (2016) 62–70.
68. Du J., Gong C., Pei X., Zhao H., Xu X.: Analysis of triacylglycerols in castor oil through liquid chromatography–mass spectrometry based on Fourier transform–ion cyclotron resonance–mass spectrometry and gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* **57** (2019) 108–115.
69. Asid K., Fizikokimia S., Biji M., Ricinus J.: Fatty acid composition and physicochemical properties of malaysian castor bean *Ricinus communis* L. seed oil. *Sains Malaysiana* **39** (2010) 761–764.
70. Sakai M., Hirata H., Sayama H., Sekiguchi K., Itano H., Asai T., Dohra H., Hara M., Watanabe N.: Production of 2-phenylethanol in roses as the dominant floral scent compound from L-phenylalanine by two key enzymes, a PLP-dependent decarboxylase and a phenylacetaldehyde reductase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **71** (2007) 2408–2419.
71. Dudonné S., Poupard P., Coutière P., Woillez M., Richard T., Mérillon J. M., Vitrac X.: Phenolic composition and antioxidant properties of poplar bud (*Populus nigra*) extract: Individual antioxidant contribution of phenolics and transcriptional effect on skin aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59** (2011) 4527–4536.
72. Ang C. Y.W., Hu L., Heinze T. M., Cui Y., Freeman J. P., Kozak K., Luo W., Liu F. F., Mattia A., DiNovi M.: Instability of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and degradation of hyperforin in aqueous solutions and functional beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52** (2004) 6156–6164.

10 Závěr

Cílem této dizertační práce byla analýza dvaceti historických pozůstatků léčivých látek a léčivých přípravků z 18. a 20. století. Pro tento účel byly navrženy a optimalizovány vhodné metody kapalinové a plynové chromatografie ve spojení s UV spektrometrickou a hmotnostní detekcí. Použitý analytický přístup se ale lišil v závislosti na stáří analyzovaných historických pozůstatků. Vzhledem k tomu, že historické léčivé přípravky byly v 18. století připravovány především mísením mnoha přírodních materiálů, muselo vlastní analýze předcházet navržení vhodné extrakční metody a její optimalizace. Autenticita historických pozůstatků léčivých látek a léčivých přípravků byla ověřena identifikací účinných látek, jejich případných degradačních produktů a dalších přítomných pomocných látek v jednotlivých vzorcích hmotnostní spektrometrií a porovnáním (pokud bylo možné) s novodobými referenčními vzorky čistých látek. Hmotnostní fragmentace vybraných analytů byla studována tandemovou hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením a byly navrženy odpovídající fragmentační mechanismy. Stabilita léčivých látek a léčivých přípravků byla v případě vzorků z 20. století posuzována na základě poklesu koncentrace účinných látek v porovnání s údaji deklarovanými výrobcem. Protože v případě vzorků z 18. století původní obsah účinných látek není přirozeně dostupný, byl zvolen postup srovnávací analýzy. Stabilita látek byla ve vzorku posuzována na základě srovnání koncentrací stanovených v historickém vzorku a v současném referenčním materiálu, což umožnilo určit případné degradační produkty a kromě ověření autenticity vzorku také hodnotit stabilitu účinných látek v dlouhodobém časovém měřítku. K analýze historických pozůstatků mastí pak byl zvolen multianalytický přístup založený na kombinaci pěti různých separačních a spektrometrických metod.

Výsledkem analýz historických pozůstatků léčivých přípravků a léčivých látek datovaných do 18. století byla identifikace degradačních produktů účinných látek v droze ipekakuanhy (kap. 4), zjištění úplné degradace hlavních alkaloidů v extraktu ze senny (kap. 6), a v případě léčivých přípravků s obsahem alkaloidů opia (kap. 5) návrh nového markeru stáří takových přípravků na základě stanovení poměru koncentrací alkaloidů noskapinu a kotarninu.

Analýza historických injekčních přípravků z 20. století umožnila posoudit změny v kvalitě léčivých přípravků uchovávaných ve skleněných injekčních ampulích. Pro tento účel byly vyvinuty nové separační metody, zaprvé HILIC-UV metoda pro stanovení srdečních glykosidů (kap. 7), za druhé HPLC-MS metoda pro stanovení neosalvarsanu (kap. 8). Z dosažených výsledků je patrné, že i přes prakticky hermetickou izolaci léčivého přípravku od jeho okolí dochází k degradaci účinné látky. Injekční roztok srdečního glykosidu degradoval po osmdesáti letech téměř z poloviny, neosalvarsan dodávaný jako suchý prášek pak po 76 letech od výroby degradoval zcela.

Odlišný analytický přístup byl zvolen pro analýzu dvanácti historických pozůstatků mastí (kap. 9). Multianalytickým přístupem, založeným na kombinaci pěti různých separačních a spektrometrických

metod, jejichž výsledky se navzájem doplňují, bylo možné identifikovat jak použitý masťový základ, tak některé z účinných látek. Touto strategií byla ověřena autenticita pěti historických léčivých přípravků a jedné léčivé látky z 18. století. Porovnáním zjištěného složení s historickými předpisy byla zároveň odhalena úprava postupů přípravy některých masťů. Stejným multianalytickým přístupem bylo odhaleno složení masťů vyrobených v první polovině 20. století, jejichž historické recepty se nedochovaly. Z dosažených výsledků bylo rovněž možné odhadnout pravděpodobný původní účel těchto masťů.

Výsledky dosažené v dizertační práci vedly nejen k návrhu a optimalizaci nových analytických metod pro analýzy účinných látek v léčivých přípravcích (někdy poměrně komplexního složení), ale přispěly rovněž k rozšíření znalostí o stabilitě chemických sloučenin v dlouhých časových úsecích. Práce tak přinesla nové poznatky jak v oboru analytické chemie, tak v oblasti farmacie.

Přílohy

Prohlášení o autorském podílu na výsledcích zveřejněných v publikacích přikládaných jako součást dizertační práce:

Příloha A

Nesměrák K., Kudláček K., Babica J.: Analytical chemistry studying historical pharmaceuticals and health care formulations. *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* **148**:9 (2017), 1557–1568. DOI: 10.1007/s00706-018-2223-x

Autorský podíl Mgr. Karla Kudláčka činí 10 %, zahrnuje vyhledání některých informací v publikovaných článcích a spolupráci na editaci výsledné verze sepsaného rukopisu.

Příloha B

Nesměrák K., Kudláček K., Štícha M., Červený V., Kunešová J., Yildiz I.: HPLC-MS analysis of ipecacuanha alkaloids in pharmaceutical relics from eighteenth-century. *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* **149**:9 (2018), 1535–1542. DOI: 10.1007/s00706-018-2223-x

Autorský podíl Mgr. Karla Kudláčka činí 40 %, zahrnuje získání dat experimentálním měřením (extrakce, chromatografie, hmotnostní spektrometrie), vyhledání některých informací v publikovaných článcích a spolupráci na editaci výsledné verze sepsaného rukopisu.

Příloha C

Nesměrák K., Kudláček K., Štícha M., Kozlík P., Červený V., Kunešová J.: Degradation of the opium alkaloids in pharmaceutical relics from the 18th century. *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* **150**:9 (2019), 1593–1602. DOI: 10.1007/s00706-019-02461-z

Autorský podíl Mgr. Karla Kudláčka činí 40 %, zahrnuje experimentální získání dat měřením (extrakce, chromatografie, hmotnostní spektrometrie), získání některých současných přírodních referenčních materiálů, vyhledání některých informací v publikovaných článcích a spolupráci na editaci výsledné verze sepsaného rukopisu.

Příloha D

Nesměrák K., Kudláček K., Čambal P., Štícha M., Kozlík P., Červený V.: Authentication of senna extract from the 18th century and study of its composition by HPLC-MS. *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* **151**:8 (2020), 1241-1248. DOI: 10.1007/s00706-020-02630-5

Autorský podíl Mgr. Karla Kudláčka činí 30 %, zahrnuje experimentální získání dat měřením (extrakce, chromatografie, hmotnostní spektrometrie), vyhledání některých informací v publikovaných článcích a spolupráci na editaci výsledné verze sepsaného rukopisu.

Příloha E

Kudláček K., Nesměrák K., Štícha M., Kozlík P., Babica J.: Degradation of ouabain in 80-year-old injection solution studied by HILIC-MS. *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* **149**:9 (2018), 1555–1560. DOI: 10.1007/s00706-018-2216-9

Autorský podíl Mgr. Karla Kudláčka činí 50 %, zahrnuje experimentální získání dat měřením (extrakce, chromatografie, hmotnostní spektrometrie), vyhledání některých informací v publikovaných článcích a spolupráci na editaci výsledné verze sepsaného rukopisu.

Příloha F

Nesměrák K., Kudláček K., Štícha M., Kozlík P., Babica J.: HPLC-MS/MS analysis of degradation products of neosalvarsan in 76-year-old injection preparation. *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* **150**:9 (2019), 1611–1615. DOI: 10.1007/s00706-019-02450-2

Autorský podíl Mgr. Karla Kudláčka činí 40 %, zahrnuje experimentální získání dat měřením (extrakce, chromatografie, hmotnostní spektrometrie), vyhledání některých informací v publikovaných článcích a spolupráci na editaci výsledné verze sepsaného rukopisu.