

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

# **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**2021**

**Bc. Martina Poncarová**

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Analýza produktů fotochemické degradace  
vybraných léčiv (dexametazonu, prednisolonu)  
pomocí LC/MS**

Diplomová práce

**Bc. Martina Poncarová**

Školitelka: doc. RNDr. Šárka Klementová, CSc.

České Budějovice 2021

Poncarová, M., 2021: Analýza produktů fotochemické degradace vybraných léčiv (dexametazonu, prednisolonu) pomocí LC/MS. [The analysis of photoproducts of selected drugs (dexamethasone, prednisolone) by LC/MS. Mgr. Thesis, in Czech] – p.28, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Diplomová práce zkoumá fotoinicovanou degradaci dvou zástupců protizánětlivých léčiv, dexametazonu a prednisolonu, při ozařování UV světlem odpovídajícím vysokoenergetickému slunečnímu záření dopadajícímu na zemský povrch. Studie založená na použití techniky HPLC/MS ukazuje možné cesty fotodegradace vybraných léčiv a navrhuje struktury produktů tvořených při fotochemických přeměnách.

Anotation:

The diploma thesis investigates photoinitiated degradation of two representants of the inflammatory drugs, dexamethasone and prednisolone, when irradiated by UV light corresponding with the high-energy solar radiation reaching the Earth surface. The study based on HPLC/MS technique presents the possible pathways of photodegradation of the drugs and proposes structures of photochemically formed products.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č.111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č.111 / 1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 19.3.2021

### **Poděkování**

Ráda bych věnovala poděkování doc. RNDr. Šárce Klementové, CSc., za její cenné rady nejen v průběhu experimentální práce, ale též při psaní diplomové práce a také za pomoc s kreslením vzorců a schémat. Ing. Davidovi Kahounovi, Ph.D., děkuji za pomoc při vytvoření HPLC/MS metody pro analýzu dexametazonu a prednisolonu a jejich fotodegradačních produktů a za pomoc při obsluze přístroje. Dále bych ráda poděkovala doc. Ing. Romanovi Kubcovi, Ph.D., za konzultace ohledně některých navrhovaných struktur produktů fotodegradace.

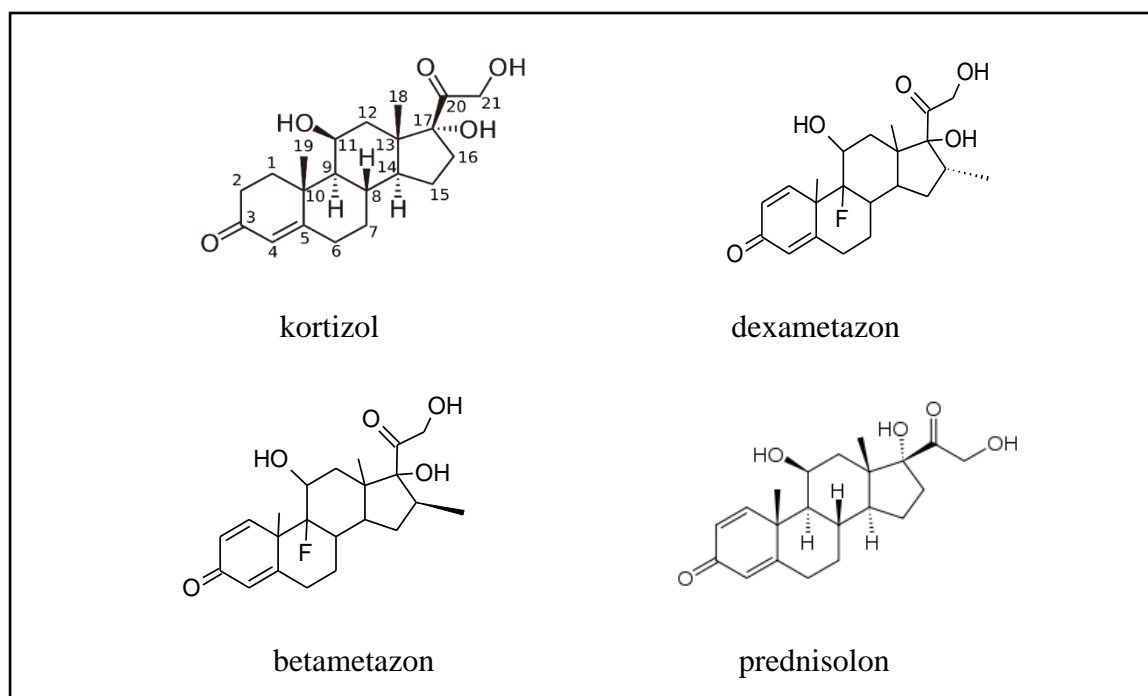
## **OBSAH:**

1 ÚVOD.....	1
2 CÍLE PRÁCE.....	5
3 MATERIÁLY A METODY.....	5
4 VÝSLEDKY.....	5
5 DISKUZE.....	16
6 ZÁVĚR.....	20
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	21
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	25
PŘÍLOHA 1 .....	27
PŘÍLOHA 2 .....	28

## 1 ÚVOD

Dexametazon i prednisolon jsou syntetické hormony odvozené od steroidního hormonu kortizolu. Steroidní hormony, mezi něž řadíme mineralokortikoidy a glukokortikoidy, jsou v lidském a zvířecím organismu syntetizovány v kůře nadledvin z cholesterolu [1]. Mineralokortikoidy jsou důležité zejména pro udržení homeostázi tekutin a solí, regulují tedy vylučování  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$ . Glukokortikoidy mají navíc schopnost řídit metabolismus sacharidů, proteinů a lipidů a potlačovat zánětlivé procesy v organismu [2, 3].

Obě skupiny steroidních hormonů obsahují cyklopentanoperhydrofenantrenové jádro [3]. Struktury čtyř představitelů glukokortikoidů, kortizolu, dexametazonu, betametazonu a prednisolonu, jsou zobrazeny na Obr. 1. Jak je patrné, mají syntetické glukokortikoidy (dexametazon, betametazon, prednisolon) podobnou strukturu jako kortizol, hormon produkovaný kůrou nadledvin, která je tvořena kostrou s 21 uhlíky uspořádanou do formy cyklopentanoperhydrofenantrenového jádra. Modifikace této kostry selektivně ovlivňuje stupeň protizánětlivé aktivity, afinitu vázání proteinů i metabolické důsledky [2].



Obr. 1: Struktura glukokortikoidů [4].

Dvojná vazba mezi atomy uhlíku C3 a C4 kortizolu selektivně zvyšuje protizánětlivou aktivitu z důvodu vyšší afinity sloučeniny k bílkovinám. Dodatečná fluorace pozice C9 zvyšuje jak glukokortikoidní tak mineralokortikoidní aktivitu a z tohoto důvodu jsou ve veterinárním

lékařství používána pro malá zvířata při léčbě adrenokortikální nedostatečnosti. Pokud je fluorovaný derivát substituovaný také na pozici C16 (hydroxylovou nebo methylovou skupinou), nová C16 substituovaná skupina nemá žádný mineralokortikoidní efekt, ale je vysoce účinná proti zánětu. Mezi tato léčiva patří např. triamcinolon, dexametazon a betametazon. Tato léčiva se používají ve velkém rozsahu ve veterinární medicíně, zejména u dobytka a koní <sup>[2,5]</sup>. Při léčbě březích klisen dexametazonem je však riziko, že při porodu zůstane placenta uvnitř zvířete <sup>[2]</sup>.

Synteticky vyrobené glukokortikoidy (glukokortikoidní léčiva) mají široké spektrum působení a používají se i v humánní medicíně. Lékaři je předepisují pro léčbu autoimunitních onemocnění, jako je skleróza, revmatoidní artritida, zánětlivá onemocnění, psoriáza a ekzém <sup>[6]</sup>. Dále také pro léčbu alergií a astmatu, protože zmírňují bolest, pocení, svědění očí (glukokortikoid dexametazon je součástí očních kapek <sup>[7]</sup>), rýmu a ulevují při ztíženém dýchání a otoku hrdla. Předepisovány jsou při nedostatečné činnosti nadledvin, kdy tělo produkuje nedostatečné množství kortizolu. Velmi krátkodobě (max. 7 dní) se můžou užívat při léčbě srdečního selhání a onkologickým pacientům mohou ulevit od nežádoucích účinků chemoterapie. Je prokázáno, že dokáží zabít rakovinné buňky při akutní a chronické lymfoblastické leukémii, Hodgkinově lymfomu a myomu <sup>[6]</sup>. Chirurgové je preventivně podávají pacientům při transplantaci orgánů, aby nedocházelo k odmítnutí darovaného orgánu imunitním systémem pacienta <sup>[6]</sup>.

Na léčbu takových zdravotních problémů (nikoliv pro nárůst svalové hmoty, pro něž atleti užívají anabolické steroidy <sup>[1]</sup>) je užívají také sportovci. Nesmí je však užívat minimálně 3 dny před sportovním výkonem, jelikož je světová antidopingová společnost WADA zakazuje, či alespoň limituje koncentraci těchto léčiv spolu s jejich metabolity v moči na 30 ng/ml <sup>[8]</sup>.

U přípravků z této lékové skupiny je možné orální, intravenózní, intramuskulární i rektální podání <sup>[8]</sup>, nesmí být však předepisovány dlouhodobě kvůli nežádoucím účinkům jako je vznik diabetu, osteoporózy, zvýšení cholesterolu, úbytek svalové hmoty, nepravidelný menstruační cyklus, Cushingův syndrom, deprese, zeslabení kůže a riziku vzniku gastritidy. Nemałym problémem je, že tlumí imunitní systém a tělo je náchylnější k nemocím <sup>[6]</sup>.

V posledním roce se objevily studie potvrzující, že glukokortikoid dexametazon může významně pomoci při léčbě těžkého průběhu nové nemoci COVID-19 <sup>[9]</sup>. Horby et al. <sup>[10]</sup> ve své studii zjistili, že denní dávka 6 mg dexametazonu po dobu 10 dní snižuje riziko úmrtí u pacientů napojených na plicní ventilaci o třetinu. Dále však bylo zjištěno, že tato léčba není vhodná pro pacienty, kteří kyslík nevyžadují, naopak u nich může dojít v důsledku léčby

k poškození. Léčba také není vhodná pro pacienty, kteří trpí nekontrolovaným diabetem, akutním delíriem nebo imunosupresí z důvodu možné kontraindikace <sup>[11]</sup>.

Mnoho studií se zabývá metabolismem syntetických glukokortikoidů v tělech lidí i zvířat.

Katheeri et al. <sup>[12]</sup> studovali výskyt metabolitů dexametazonu metodou LC/MS v moči 4 - letých velbloudů vážících cca 350 kg (dávka dexametazonu 0,2 mg/kg váhy). Byly identifikovány 2 metabolity, jeden s poměrem  $m/z = 394$  (redukovaný dexametazon v důsledku redukce kyslíku) a druhý s poměrem  $m/z = 408$  (hydroxydexametazon, který vznikl v důsledku hydroxylace aromatického kruhu). Dále pak vznikaly produkty o  $m/z = 569$  a  $m/z = 583$ .

Matabosch et al. <sup>[13]</sup> popsali předpokládaný mechanismus metabolismu prednisolonu po orálním podání člověku, kdy v moči pomocí LC/MS identifikovali 20 metabolitů této látky.

Přestože jsou glukokortikoidy přírodní i syntetické v organismu metabolizovány, byly tyto sloučeniny v mnoha lokalitách nalezeny v povrchových vodách, kam se glukokortikoidy a jejich metabolity dostávají z výroby farmaceutických přípravků, z nemocnic, chovných zařízení i ze splaškových vod. Například ve vzorcích z řeky Wenyu (severní Čína) a jejích přítoků bylo v 17 odebraných vzorcích pomocí analýzy LC/MS/MS detekováno 15 přírodních glukokortikoidů a 25 syntetických glukokortikoidů, přičemž jejich koncentrace se pohybovaly v rozmezí od 0,13 ng/l (11-epitetrahydrokortizol) do 433 ng/l (kortizol). Detekovaná koncentrace prednisolonu byla 94 ng/l, respektive 32 ng/l betametazonu a dexametazonu <sup>[14]</sup>.

Poblíž jedné farmaceutické továrny ve Francii byl v říční vodě nalezen dexametazon v koncentraci 10  $\mu\text{g/l}$  <sup>[15]</sup>.

Schriks et al. <sup>[16]</sup> uvádí přítomnost prednisolonu v odpadních vodách nemocnic v rozmezí koncentrací 315 – 1918 ng/l.

Ve vodním ekosystému mohou tyto látky mít za následek např. snížení reprodukce <sup>[17]</sup> či deformaci pohlavních orgánů u vodních živočichů <sup>[15]</sup>. Toxický efekt dexametazonu, prednisolonu a produktů jejich chemické degradace byl studován na modelovém organismu *Daphnia magna* v rámci diplomové práce Dokoupilové <sup>[18]</sup>.

Cacciari et al. <sup>[19]</sup> ve své práci dokládají, že prednisolon absorbuje krátkovlnné UVB záření dopadající na zemský povrch ze slunce, glukokortikoidy tedy mohou podléhat fotodegradačním reakcím. Pro ozařování vodného roztoku prednisolonu (koncentrace  $4 \times 10^{-5}$  mol/l) použili jako zdroj UV záření xenonovou výbojku (150 W)



a zjistili, že rychlost této fotodegradace lze popsat kinetikou 1. řádu s rychlostní konstantou  $1,4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Dále uvádějí, že prednisolon může podléhat přímé fotoinicované reakci, kdy vlivem UVB záření vzniká prednisolon v excitovaném singletovém stavu. Může ale dojít i k procesu mezisystémového přenosu (intersystem crossing, ICS) do stavu tripletového. Ten pak se následně buď přímo štěpí nebo reaguje s dikyslíkem v základním stavu či jeho reaktivními formami (reactive oxygen species, ROS) jako je superoxidový radikál nebo hydroxylový radikál. Vlivem ROS docházelo k rychlejšímu odbourávání.

Fotodegradací glukokortikoidů a identifikací jejich produktů se zabývá řada dalších prací [5,20,21,22,23].

Haneef et al. [5] ve své práci na základě dřívějších experimentů a analýze HPLC/MS/MS předpokládají u prednisolonu fragmentaci, k níž dochází poté, co se nejprve odštěpí tři molekuly vody. U dexametazonu pozorovali fragmentaci po předchozím odštěpení HF a následné dehydrataci.

Della Greca et al. [20] ozařovali roztok prednisolonu xenonovou výbojkou (150 W, 200 - 2400 nm) po dobu 4 h. Pomocí HPLC/MS a NMR vytvořili schéma odbourávání prednisolonu, přičemž identifikovali struktury 8 fotoproduktů.

Resolevandi et al. [21] ozařovali dexametazon-fosfát nízkotlakou rtuťovou výbojkou (11W,  $87 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) poskytující monochromatické záření UVC 254 nm, přičemž zjistili, že rychlostní konstantu odbourávání tohoto léčiva lze popsat kinetikou 1. řádu. Struktury třinácti fotoproduktů a cesty degradačního mechanismu jejich vzniku pak určili s využitím HPLC/MS.

Guo et al. [22] využili jako zdroj gama záření  $^{60}\text{Co}$  ( $1,85 \times 10^{16} \text{ Bq}$ ). Takto ozářený vodný roztok dexametazonu následně podrobili analýze HPLC/MS a identifikovali tak 8 produktů degradace, které vznikaly z dexametazonu dvěma hlavními cestami - atakem hydroxylového radikálu na dexametazon a nahrazením fluoru hydroxylovou skupinou.

V práci da Silvy et al. [23] ozařovali dexametazon UV zářením v přítomnosti fotokatalyzátoru  $\text{TiO}_2$ . V této práci bylo také zjištěno, že při oxidačním procesu na povrchu elektrody (při pokusu byla použita metoda voltametrie) došlo k aldolizaci.

Také Calza et al. [24] ozařovali dexametazon UV/VIS v přítomnosti fotokatalyzátoru  $\text{TiO}_2$ . Pomocí metody HPLC/MS zjistili, že nejprve dochází k odštěpení HF a poté k několikanásobným dehydratacím, přičemž v průběhu reakcí mohou vznikat různé stereoizomery – tedy látky o shodné hodnotě m/z a rozdílném retenčním času.

De Wasch et al. [25] prokázali, že dexametazon a betametazon poskytují devět shodných produktových iontů, z nichž jeden ( $m/z = 373$ ) je majoritním iontem u obou látek.

## **2 CÍLE PRÁCE**

1. Proměřit LC/MS spektra vybraných léčiv (dexametazonu, prednisolonu) a produktů jejich degradace.
2. Pokusit se rozkrýt strukturu nalezených fotoproduktů.
3. Zhodnotit nejpravděpodobnější cesty (mechanismy) při fotochemickém odbourávání.

## **3 MATERIÁLY A METODY**

Dexametazon ( $\geq 97\%$ ) i prednisolon ( $\geq 99\%$ ) byly zakoupeny od firmy Sigma – Aldrich. Roztoky o koncentraci 50 mg/l byly připraveny rozpuštěním dané látky v Milli-Q<sup>®</sup> vodě.

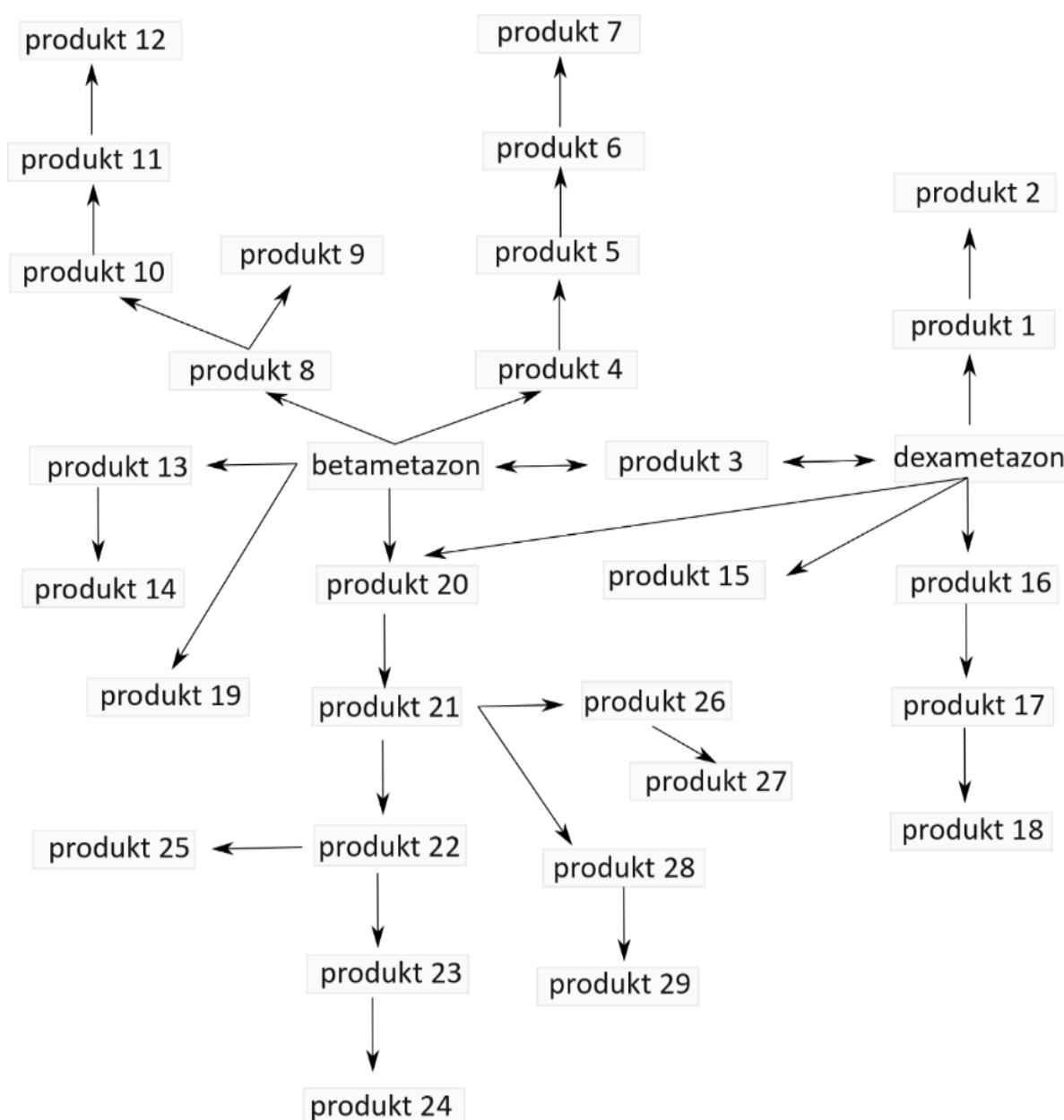
Ozařování bylo prováděno po dobu 5 minut v reaktoru Reyonet RPR 100 osazeném 12 lampami 3000Å, které emitují záření v rozmezí 250 – 350 nm, přičemž záření o vlnových délkách kratších než 300 nm bylo odfiltrováno optickým sklem (vzorky byly umístěny ve skleněných kyvetách opatřených víčkem).

Analýza reakčních směsí po ozáření byla prováděna metodou HPLC/MS na kapalinovém chromatografu Thermo Ultimate 3000 s hmotnostním detektorem Velos Pro s analyzátozem lineární iontovou pastí. Pro oba vzorky byly použity stejné podmínky, a to kolona Phenomenex Kinetex Evo C18 (150 × 3,0 mm; 5 μm) vyhřívána na 30 °C a pod tlakem 327 bar. Mobilní fáze byla tvořena směsí voda : methanol (60:40, v/v). Její průtok v době analýzy činil 1 ml/min. Eluce byla izokratická. Iontovým zdrojem byl vyhříváný elektrosprej HESI, přičemž teplota pro zmlžení vzorků byla 350 °C.

## **4 VÝSLEDKY**

Metodou HPLC/MS byla proměřena spektra ozářených roztoků dexametazonu a prednisolonu. MS/MS spektra dexametazonu a betametazonu jsou znázorněny v Příloze 1, MS/MS spektrum prednisolonu je znázorněno v Příloze 2.

V reakční směsi dexametazonu ozářeného po dobu 5 minut bylo nalezeno 30 produktů, schéma odbourávání dexametazonu znázorňuje Obr. 2.

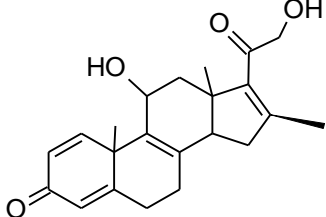
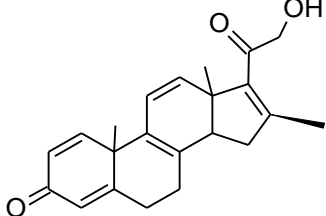
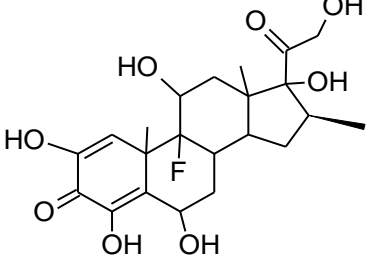
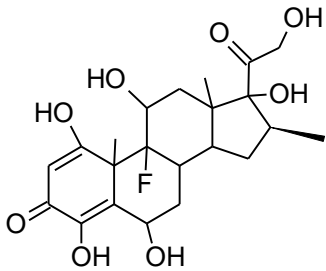
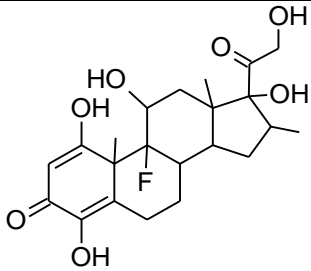
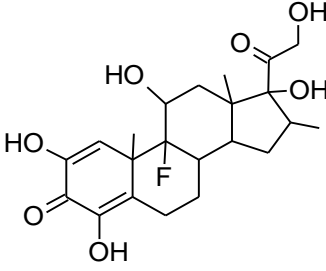


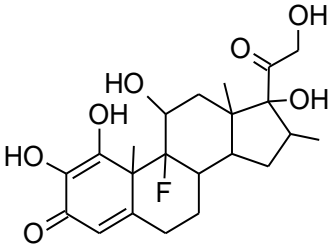
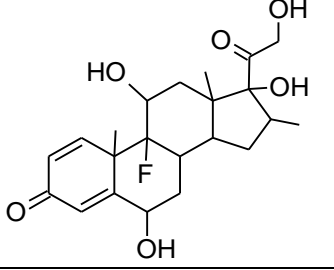
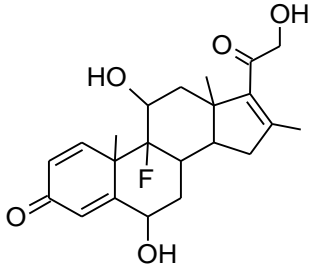
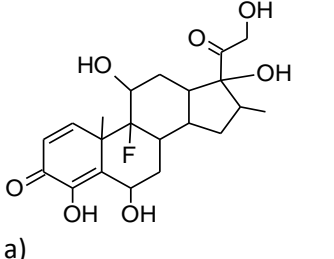
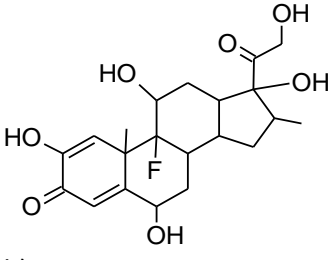
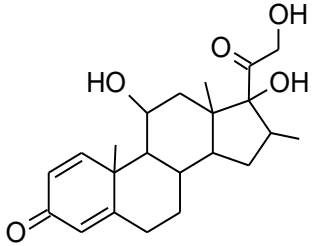
Obr. 2: Schéma fotochemické degradace dexametazonu.

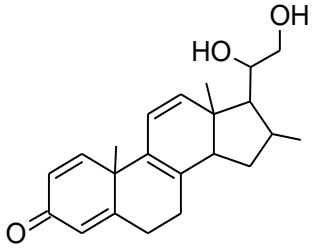
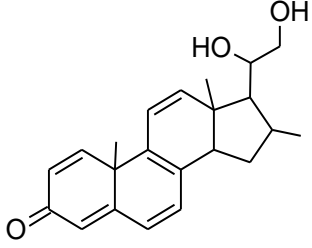
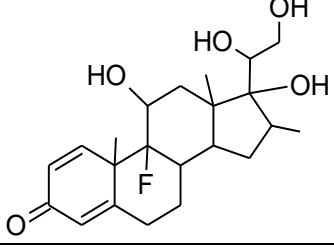
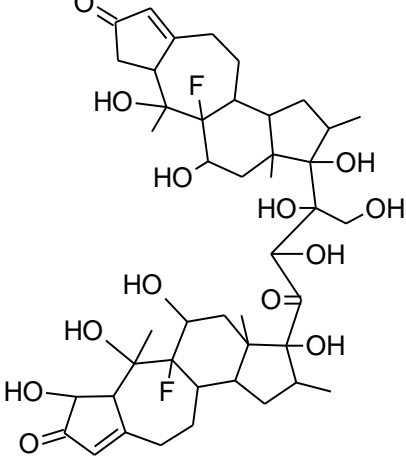
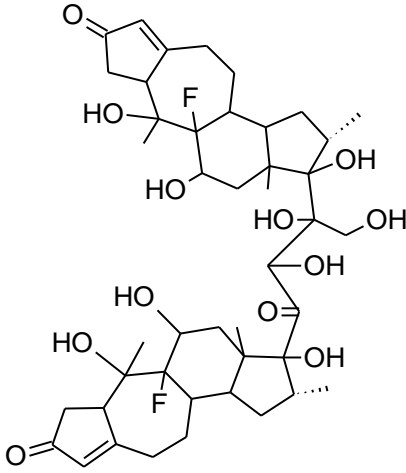
Jeden z produktů v reakční směsi byl identifikován jako betametazon. Pro většinu ostatních produktů se podařilo navrhnout možnou strukturu. Navržené struktury jsou spolu s hodnotami  $m/z$  a retenčních časů uvedeny v Tab. I. U produktů uvedených pod čísly 7, 10, 13, 22, 27 a 29 se nepodařilo na základě změny  $m/z$  oproti předchozí navržené struktuře navrhnout jejich možnou strukturu.

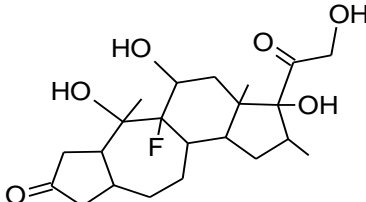
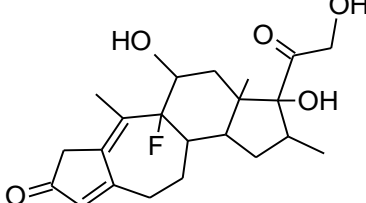
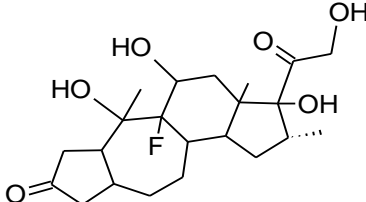
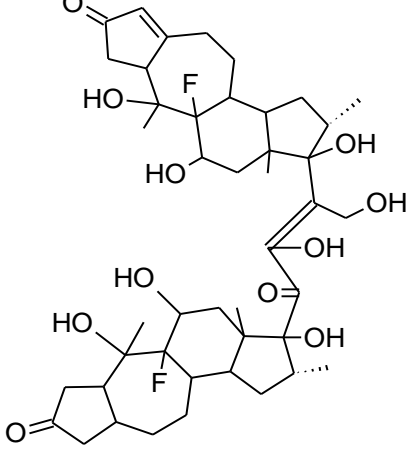
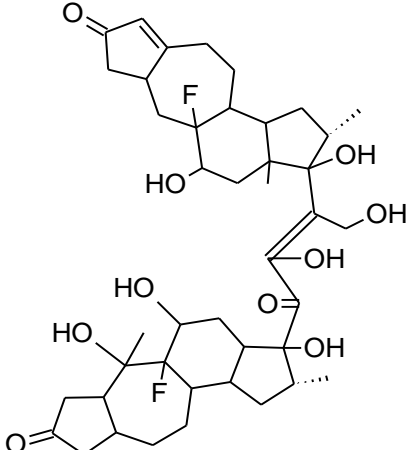
Tab. I: Fotodegradace dexametazonu – hodnoty m/z, retenční časy a navržené struktury nalezených produktů.

Název	m/z; retenční čas / časy (min.)	vzorec (u produktů navržené struktury)
dexametazon	393,26; 8,40	
produkt 1	373,27; 7,26	
produkt 2	355,24; 8,40	
produkt 3 stereoizomery s různou orientací methylových skupin na pětičlenných kruzích	785,45; 8,37 a 12,59	
betametazon	393,26; 12,77	
produkt 4	373,24; 12,86	

produkt 5	355,24; 12,78	
produkt 6	337,20; 12,87	
produkt 7	319,20; 12,83	struktura neidentifikovaná
produkt 8	442,33; 4,35	<p data-bbox="885 952 909 985">a)</p>  <p data-bbox="885 1299 909 1332">b)</p> 
produkt 9	425,31; 4,31	<p data-bbox="885 1612 909 1646">a)</p>  <p data-bbox="885 1915 909 1948">b)</p> 

		 <p>c)</p>
produkt 10	426; 6,67	struktura neidentifikována
produkt 11	409,02; 2,25	
produkt 12	391,22; 3,81	
produkt 13	871,47; 4,34	Struktura neidentifikována
produkt 14	447,23; 2,96; 4,34; 5,28	Struktura neidentifikována
produkt 15	426,3; 4,76	 <p>a)</p>  <p>b)</p>
produkt 16	375,24; 8,39	

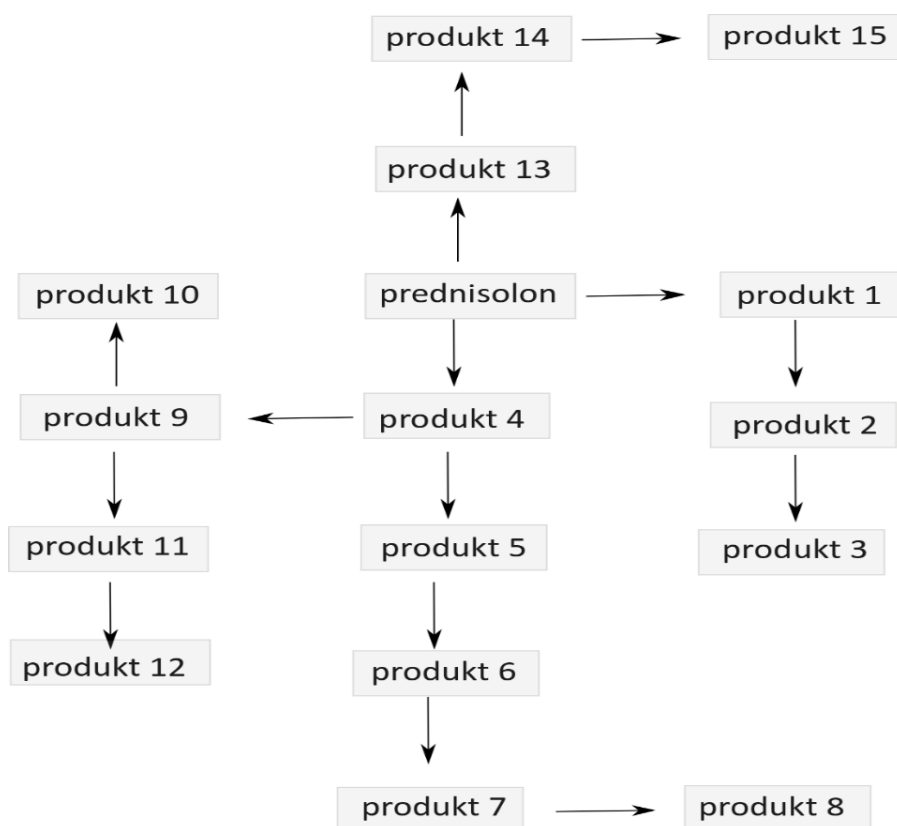
produkt 17	357,22;	
produkt 18	355,24; 3,09	
produkt 19	395,22; 7,26	
produkt 20	839,42; 8,41	
produkt 21	823,44; 8,41	
produkt 22	431,22; 2,56	struktura neidentifikována

produkt 23	411,29; 4,05	
produkt 24	393,24; 4,04	
produkt 25	413,28; 4,04	
produkt 26	807,45; 8,42	
produkt 27	415,26; 8,39	struktura neidentifikována
produkt 28	807,45; 12,84	
produkt 29	415,25; 12,85	struktura neidentifikována



Z navržených struktur vyplývá, že nejčastějšími procesy odbourávání jsou odštěpení fluoru, hydroxylace, dehydratace a vznik sedmičlenného kruhu. U produktů s vysokou hodnotou m/z je předpokládán vznik konjugovaného produktu, který se pak dále v důsledku navázání OH skupin dále rozpadá.

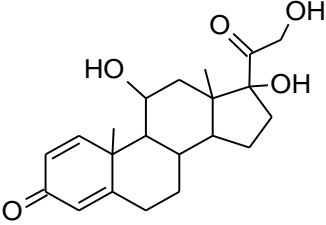
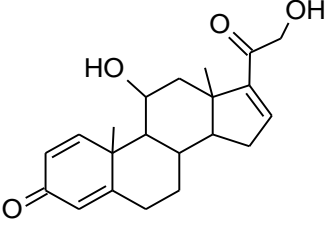
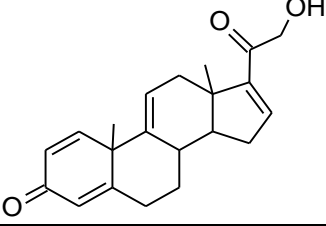
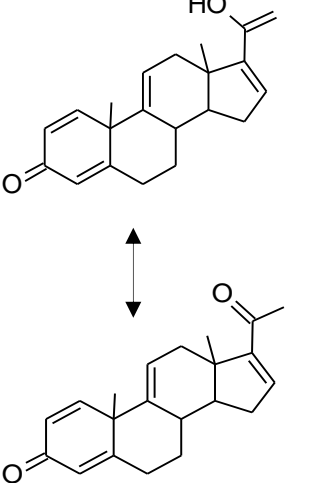
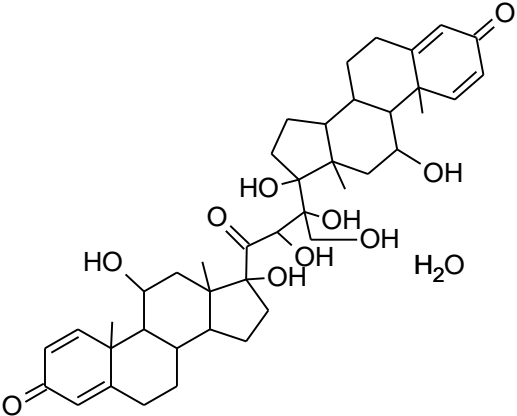
V reakční směsi prednisolonu ozářené po dobu 5 minut bylo nalezeno 15 produktů, schéma odbourávání prednisolonu je znázorněno na Obr. 3.

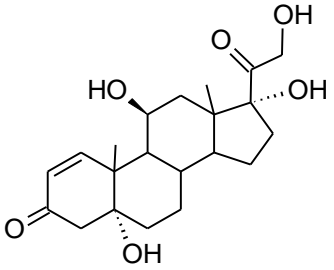
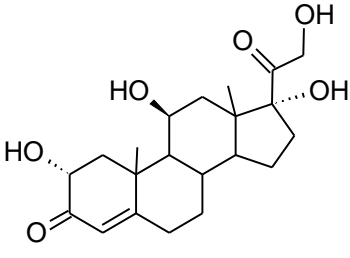
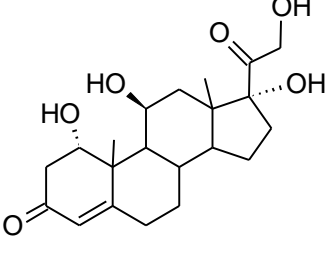
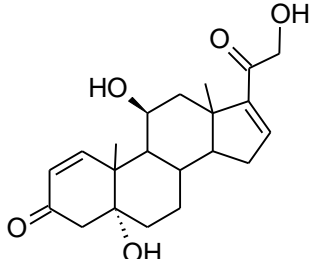
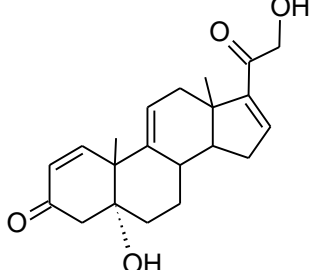
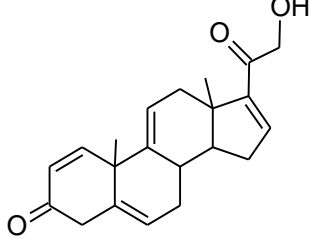


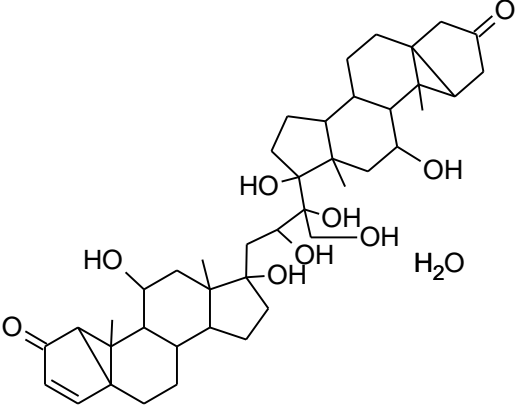
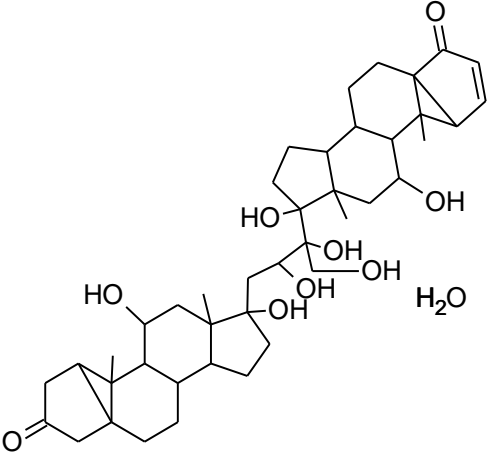
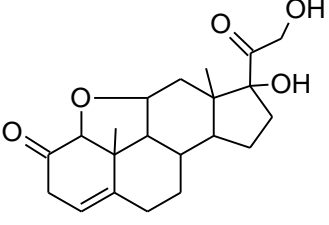
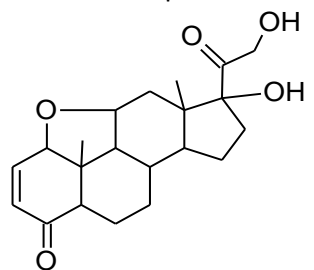
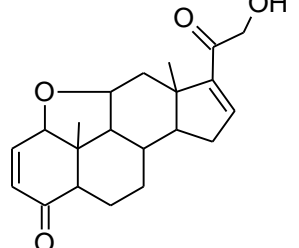
Obr. 3: Schéma fotochemické degradace prednisolonu.

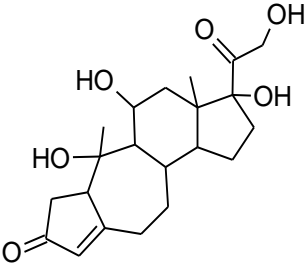
Navržené struktury vzniklých produktů jsou spolu s hodnotami m/z a retenčními časy uvedeny v Tab. II. U produktů 13 a 14 se nepodařilo na základě změny m/z oproti předchozím navrženým strukturám navrhnout jejich strukturu.

Tab. II: Fotodegradace prednisolonu – hodnoty m/z, retenční časy a navržené struktury nalezených produktů.

Název	m/z; retenční čas (min)	struktura
Prednisolon	361,24; 8,86	
produkt 1	343,26; 8,92	
produkt 2	325,22; 8,87	
produkt 3	307,22; 10,99	
produkt 4	738,50; 8,90	

<p>produkt 5</p>	<p>379,27; 3,27; 2,14; 1,23</p>	<p>a) </p> <p>b) </p> <p>c) </p>
<p>produkt 6</p>	<p>361,24; 3,34</p>	
<p>produkt 7</p>	<p>343,26; 3,91</p>	
<p>produkt 8</p>	<p>325,22;3,39</p>	

produkt 9	721,43; 6,71; 7,56	<p>a)</p>  <p>b)</p> 
produkt 10	361,24; 7,56	
produkt 11	361,24; 6,72	<p>stereoizomer produktu 10</p> 
produkt 12	343,20; 6,73	

produkt 13	801,84; 8,88	neidentifikován
produkt 14	743,43; 6,71	neidentifikován
produkt 15	383,24; 6,70	

Z navržených struktur vyplývá, že nejčastějšími procesy odbourávání jsou dehydratace a hydroxylace. U produktů s vysokou hodnotou  $m/z$  je předpokládán vznik konjugovaného produktu, který se pak dále rozpadá za vzniku produktu obsahujícího éterické přemostění mezi uhlíky C4 a C11.

## **5 DISKUZE:**

Fotochemická degradace dexametazonu s použitím záření, které simuluje krátkovlnnou oblast slunečního spektra dopadajícího na zemský povrch vedla k tvorbě 30 různých produktů nalezených pomocí HPLC/MS. Pro 24 z nich byly navrženy možné struktury.

U dexametazonu bylo – jak ukazuje Obr. 2 – identifikováno pět základních cest fotochemického odbourávání. Cesta vedoucí k produktu 1 a 2 začíná odštěpením fluoru a vodíku za vzniku produktu 1 a pokračuje odštěpením vody za vzniku produktu 2. Oba tyto produkty byly identifikovány také v práci Calzy et al.<sup>[24]</sup>, kde ale vzhledem k tomu, že prováděli fotokatalytickou degradaci s použitím  $\text{TiO}_2$  jako katalyzátoru došlo nejprve k hydroxylaci dexametazonu a teprve poté k odštěpení fluoru a vzniku dvojnásobné vazby a následně odštěpení vody.

U cesty vedoucí od dexametazonu k betametazonu je předpokládán vznik konjugátu s hodnotou  $m/z = 785,5$  označeného jako produkt 3. Protože u organických sloučenin k takové reakci běžně nedochází, bylo by možné usuzovat, že při analýze HPLC/MS došlo k dvojnásobnému nabití fragmentů a pozorovaný fragment má ve skutečnosti jen poloviční hmotnost<sup>[26]</sup>. Nicméně da Silva et al.<sup>[23]</sup> identifikovali pomocí HPLC/MS stejně hmotnou sloučeninu, která v jejich práci vznikla na elektrodě při voltametrii stanovení dexametazonu předcházejícího identifikaci pomocí MS. Proto je v této práci předpokládána

možnost takové tvorby i fotoinicovanou reakcí. Produkt 3 v sobě zahrnuje dvě struktury se stejnou hodnotou  $m/z$  (785,5), ale s rozdílnými retenčními časy, 8,37 min a 12,59 min. Je vidět, že sloučeniny mají shodné píky, ale liší se poměr fragmentů v jejich spektrech. Tento výsledek je shodný s pozorováním autorů de Wasch et al.<sup>[25]</sup>. Lze předpokládat, že produkt 3 se může rozpadat jak směrem na betametazon tak na dexametazon, proto jsou v reakčním schématu na Obr. 2 použity obousměrné šipky.

Odbourávání dexametazonu cestou na produkty 1 a 2 a cestou na produkt 3 je z hlediska intenzity signálu možno považovat za majoritní cesty odbourávání. Zbývající tři cesty – cesta na produkt 15, cesta na produkt 20 a na produkty 16 - 18 je pak z tohoto hlediska možné považovat za cesty minoritní. U produktu 15, kde se předpokládá navázání dvou OH skupin, byla navržena struktura dle práce Calzy et al.<sup>[24]</sup>. Produkty poslední cesty vznikly defluorací (produkt 16), následnou dehydratací (produkt 17) a v posledním kroku dehydrogenací (produkt 18).

U betametazonu pak dochází k dalšímu odbourávání, v němž lze, jak je patrné z Obr. 2 rozeznat celkem pět degradačních cest.

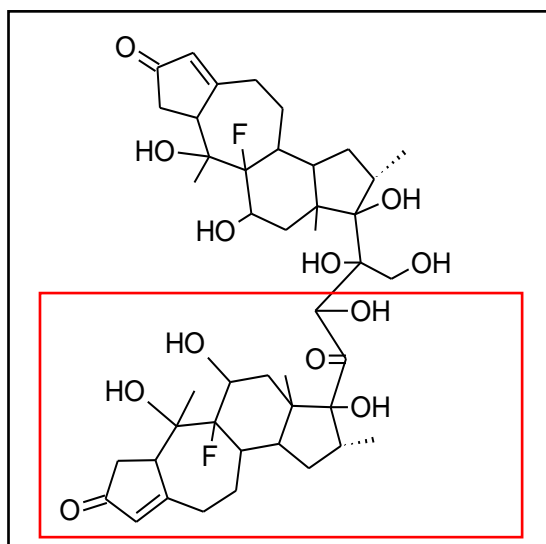
V první cestě vedoucí k produktům 4 - 7 dochází nejprve k odštěpení fluoru a vzniká tak produkt 4, který následně dehydratuje na produkt 5 (dehydratace terciárního alkoholu). Poté dochází k ještě jedné dehydrataci (sekundární alkohol) a vzniká tak produkt 6. To je obdobné jako u Calzy et al.<sup>[24]</sup>, kde stejnou degradační cestu identifikovali u dexametazonu. Produkt 6 se následně rozpadá na produkt 7, jehož struktura však nebyla identifikována.

Druhá cesta vede nejprve k produktu 8. Tento produkt vzniká trojitou hydroxylací (navázání třech skupin OH), v tabulce navržených struktur (Tab. I) jsou uvedeny dvě možnosti a) a b). Struktura 8a) je uváděna v pracích Kaura et al.<sup>[27]</sup> a Al Katheerihho et al.<sup>[12]</sup>, strukturu 8b) ve své práci zmiňuje Calza et al.<sup>[24]</sup>. Autoři Kaur et al.<sup>[27]</sup> a Al Katheeri et al.<sup>[12]</sup> pak uvádějí, že z produktu zde označeného jako 8a) vzniká produkt uvedený v této práci jako produkt 11 s hodnotou  $m/z = 409$  (došlo k dvojímu odštěpení vody). V této práci ovšem nedocházelo přímo ke vzniku produktu 11 z produktu 8a), ale vznikal jako meziprodukt produkt 10, jehož strukturu se nepodařilo navrhnout. Z produktu 11 vznikal dehydratací terciárního alkoholu produkt 12. Z produktu 8 vznikal ještě produkt 9, pro něhož byly navrženy 3 možné struktury označené jako 9a), 9b) a 9c). Všechny tyto struktury jsou uvedeny v publikaci Calzy et al.<sup>[24]</sup>. Autoři Guo et al.<sup>[22]</sup> pak zmiňují jako nejvíce pravděpodobnou strukturu 9b).

Třetí cesta vede z betametazonu na produkt 20 a odtud jednak na produkty 21 až 24, z produktu 21 pak ještě na produkty 26 až 29. U produktu 20 je předpokládáno, že se jedná

o velký adukt ( $m/z = 839,4$ ), který následně dehydroxyluje na produkt 21. V produktu 20 je navržena struktura se sedmičlenným kruhem. To vychází z porovnání s prací Rubina et al.<sup>[28]</sup>, který při ozařování vodného roztoku dexametazonu simulátorem slunečního záření po dobu 8 h pozoroval strukturu 23 a uvádí také strukturu odpovídající poloviční hodnotě  $m/z$  pro produkt 21, jak ukazuje Obr. 4.

Produkt 21 se rozpadá na tři produkty – na produkt 22, jehož struktura nebyla identifikována a na 2 stereoizomery – produkty 26 a 28, kde z produktu 26 vzniká produkt 27 (struktura nenavržena) a dvojice následných produktů 28 (vznik dehydroxylací a demethylací) a produkt 29. Produkt 23 dehydratuje na strukturu 24, přičemž z hlediska organické chemie je velmi pravděpodobné, že dvojná vazba vznikne tak, aby byla v konjugaci s již vytvořenými dvojnými vazbami.



Obr. 4: Struktura produktu 21 v této práci a identifikovaná struktura v práci Rubina et al.<sup>[28]</sup> v červeném rámečku.

Čtvrtá cesta na produkt 19 je z hlediska intenzity signálu zcela minoritní stejně jako pátá cesta na produkty 13 a 14. U produktu 19 lze vzhledem ke změně poměru  $m/z$  o plus 2 předpokládat, že zřejmě došlo k redukci keto skupiny na sekundární alkohol – enol formu betametazonu – v souladu s literaturou Chen et al.<sup>[29]</sup>. Pro produkty páté cesty nebyly navrženy struktury.

Fotochemická degradace prednisolonu s použitím záření, které simuluje krátkovlnnou oblast slunečního spektra dopadajícího na zemský povrch vedla k tvorbě 18 různých produktů nalezených pomocí HPLC/MS. Pro 16 z nich byly navrženy možné struktury. Nalezené

produkty 1, 2, 3 jsou shodné s produkty, které ve své práci popisují Haneef et al.<sup>[4]</sup>, kteří je identifikovali jako metabolity nalezené v lidské moči a plazmě metodou HPLC/MS. Produkty odpovídající v této studii nalezeným produktům (5a), 10 a 15 uvádějí ve své práci Della Greca et al.<sup>[20]</sup>. U produktu 10 je ale v jejich práci prekurzorem jeho vzniku sloučenina s hodnotou  $m/z$  rovnou 361,4, kterou autoři nazývají jako lumiprednisolon. Vznik produktu 10 ve své práci detailně popisuje Rubino et al.<sup>[28]</sup>, který pro identifikaci fotoproduktů prednisolonu použil také metody  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR (kombinace experimentů autory označovaných jako COSY, TOCSY, DEPT, HMQC, HMBC, přičemž právě na základě experimentu TOCSY autoři prokázali éterické přemostění mezi uhlíkem C4 a C11 – autoři číslují uhlíky na rozdíl od struktury uvedené na Obr. 1 od dvojné vazby cyklu).

Pro fotochemickou degradaci prednisolonu lze tedy předpokládat tři základní cesty:

První cesta, kterou lze považovat za majoritní z hlediska intenzity signálu vznikajících produktů, vede k produktům 1, 2, 3 sérií dehydratací (vždy ztráta  $\Delta 18$ ), přičemž jako první dehydratuje terciární alkohol, poté teprve sekundární alkohol a jako poslední primární alkohol.

U produktu 3 se majoritně vyskytuje keto forma. Toto je v souladu s literaturou<sup>[29]</sup>, z organického hlediska nelze úplně vyloučit vznik enol formy (tautomery), nicméně ta nebyla v reakční směsi nalezena.

Druhá cesta vede primárně k produktu 4, kdy z hodnoty  $m/z$  se dá předpokládat struktura odpovídající kondenzaci dvou molekul prednisolonu, která je navíc hydratovaná. Přestože organické sloučeniny hydráty běžně netvoří<sup>[26]</sup>, struktura, kterou lze vysvětlit tvorbou podobného aduktu, byla pozorována i u fotochemické degradace dexametazonu.

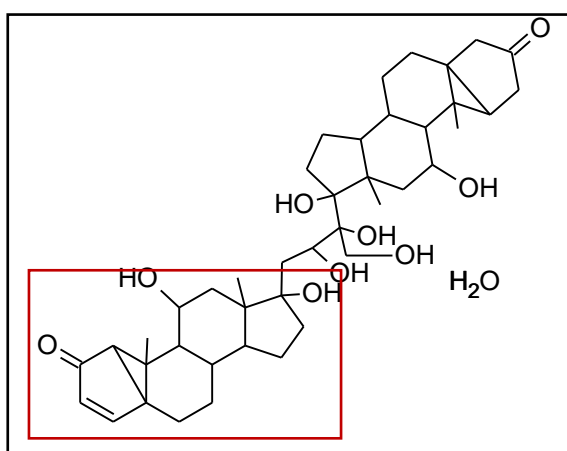
Velká molekula produktu 4 se dále rozpadá na produkt 5, u něhož byly pozorovány tři varianty označené jako 5a), 5b) a 5c), které mají stejnou hodnotu  $m/z$ , ale různé retenční časy. Dle navržených struktur se jedná o hydroxylované stereoizomery s různou polohou navázané OH skupiny (viz. Tab. II). Struktura uvedená v Tab. II jako 5a) je uváděná v práci Della Greca et al.<sup>[20]</sup> a zmiňuje ji také Rubino et al.<sup>[28]</sup>. Z tohoto důvodu byla struktura produktu 6 navržena jako dehydratovaná forma produktu 5a), přičemž další dehydratační kroky vedou ke strukturám navrženým pro produkty 7 a 8, za předpokladu že nejprve dochází k odštěpení vody v místě sekundárního alkoholu a teprve poté k odštěpení vody v místě terciárního alkoholu.

Z produktu 4 dále vznikají struktury produktů 9a) a 9b) s hodnotou  $m/z$  rovnou 721,4. Navrhované struktury těchto produktů vycházejí ze skutečnosti, že v práci Della Greca<sup>[20]</sup> byl



identifikován produkt s hodnotou  $m/z$  360, pro který byla navržena struktura uvedená v červeném rámečku na Obr. 5.

V reakční směsi popisované v této práci meziprodukt s takovou strukturou nalezen nebyl, ale byl nalezen následný produkt (10) vznikající z produktu 9a), který má  $m/z$  totožnou s produktem, který popisuje Della Greca <sup>[20]</sup> ve své práci. Z produktu 9b) pak analogicky jako u vzniku produktu 10 z produktu 9a) vzniká produkt 11, který dále podléhá dehydrataci, přičemž je předpokládáno, že se odštěpuje terciární alkohol vázaný na pětičlenný kruh za vzniku dvojné vazby v tomto kruhu.



Obr. 5: Struktura produktu 9a) v této práci a struktura produktu identifikovaná v práci Della Greca et al.<sup>[20]</sup> znázorněná v červeném rámečku.

Třetí cesta vede přes dvě struktury s  $m/z$  o hodnotách 801,8 (produkt 13) a 743,4 (produkt 14), pro které se nepodařilo navrhnout struktury, na produkt 15. Struktura produktu 15 obsahující sedmičlenný kruh byla navržena podle práce autorů Rubino et al.<sup>[28]</sup>, kteří produkt se shodnou  $m/z$  našli v reakční směsi ozářeného roztoku prednisolonu po čtyřhodinovém ozařování simulátorem slunečního záření.

## **6 ZÁVĚR**

Metodou HPLC/MS bylo v ozářeném roztoku dexametazonu nalezeno 30 produktů fotochemické degradace, pro 24 z nich byly navrženy možné struktury, jedním ze vznikajících produktů je betametazon. Mezi hlavní cesty fotochemické degradace dexametazonu patří odštěpení atomu fluoru, dehydratace a hydroxylace, byly ale pozorovány i fotoprodukty

o hodnotách m/z odpovídajícím velkým aduktům, u nichž dále dochází k hydroxylaci a štěpení na menší molekuly.

U prednisolonu bylo pomocí HPLC/MS nalezeno 15 produktů fotochemické degradace, pro 13 z nich byly navrženy možné struktury. Hlavními degradačními cestami při fotochemickém odbourávání prednisolonu byly dehydratace a hydroxylace. Také u prednisolonu byl pozorován produkt o vysoké hodnotě m/z odpovídající velkému aduktu, jehož rozpadem pak vznikaly struktury s éterickým přemostěním mezi uhlíky dvou cyklů základního skeletu.

Jak u dexametazonu tak u prednisolonu vznikly struktury, pro které se ve shodě s literaturou ukázalo jako vhodné předpokládat vznik sedmičlenného kruhu.

## **7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

[1] Liou S. (2010): Glucocorticoids, Huntington's outreach project for education, at Stanford (stránky nečíslovány).

<https://hopes.stanford.edu/glucocorticoids/> , staženo dne 5.9.2019.

[2] Edwards S.H. (2014): Corticosteroids, *MSD Veterinary Manual*, (stránky nečíslovány).

<https://www.msddvetmanual.com/pharmacology/anti-inflammatory-agents/corticosteroids#>, staženo dne 5.9.2019.

[3] Brueggemeier R.W., Li P-K. (2010): Fundamentals of Steroid Chemistry and Biochemistry, Wiley on-line library.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471266949.bmc053.pub2>, staženo dne 5.9.2019.

[4] Hannef J., Shaharyar M., Husain A., Rashid M., Mishra R., Parveen S., Ahmed N., Pal M., Kumar D. (2013): Application of LC-MS/MS for quantitative analysis of glucocorticoids and stimulants in biological fluids, *Journal of Pharmaceutical Analysis* **3**, 341-348.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5760999/>, staženo dne 24.2.2021

[5] Cuming R.S., Groover E.F., Wooldridge A.A., Caldwell F.J.(2018): Review of glucocorticoid therapy in horses, Part 1: Pharmacology, *Equine veterinary education* **30**, 141-150.

<https://beva.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/eve.12555>, staženo dne 5.9.2019

[6] Case-Lo Ch., Risoldi Cochrane Z. (2020): Glucocorticoids, *Healthline* (stránky nečíslovány).

<https://www.healthline.com/health/glucocorticoids#takeaway>, staženo dne 28.8.2020.

[7] Razuc M.F., Grünhut M., Garrido M., Fernández Band B.S. (2014): Second Order Advantage Applied to the Spectrophotometric Analysis of Ciprofloxacin and Dexamethasone in Ophthalmic Drops; Automatic Green Method Using On-line Photodegradation, *Analytical Sciences* **30**, 1121-1127.

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/30/12/30\\_1121/pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/30/12/30_1121/pdf), staženo dne 5.9.2019.

[8] Verneec A., Slack A., Harcourt P.R., Budgett R., Duclos M., Kinahan A., Mjosund K., Strasburger Ch.J. (2020): Glucocorticoids in elite sport: current status, controversies and innovative management strategies – a narrative review, *British Journal of Sports Medicine* **54**, 8 -12.

<https://bjsm.bmj.com/content/bjsports/54/1/8.full.pdf>, staženo dne 16.12.2020.

[9] Ledford H. (2020): Coronavirus breakthrough: dexamethasone if first drug shown to save lives, *Nature* **582**, 469.

[https://www.nature.com/articles/d41586-020-01824-5?utm\\_source=Nature+Briefin](https://www.nature.com/articles/d41586-020-01824-5?utm_source=Nature+Briefin), staženo dne 18.11.2020.

[10] Horby P., Lim W.S., et al. (2020): Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19 – preliminary report, *The New England Journal of Medicine* **384**, 693 - 704.

<https://www.nejm.org/doi/10.1056/nejmoa2021436>, staženo dne 10.2.2021.

[11] Matthay M.A., Thompson B.T. (2020): Dexamethasone in hospitalised patients with COVID-19: addressing uncertainties, *The Lancet Respiratory Medicine* **8**, 1170-1172.

[https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/pii/S2213-2600\(20\)30503-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/pii/S2213-2600(20)30503-8/fulltext),

staženo dne 10.2.2021.

[12] Al Katheeri N.A., Wasfi I.A., Lambert M., Giuliano Albo A., Nebbia C. (2006): In vivo and in vitro metabolism of dexamethasone in the camel, *The Veterinary Journal* **172**, 532-543.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023305001681?via%3Dihub>,

staženo dne 24.2.2021.

[13] Matabosch X., Pozo O.J., Pérez-Mañá C., Papaseit E., Segura J., Ventura R. (2015): Detection and characterization of prednisolone metabolites in human urine by LC-MS/MS, *Journal of Mass Spectrometry* **50**, 633 - 642.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jms.3571>, staženo dne 5.9.2019.

- [14] Shen X., Chang H., Sun Y., Wan Y. (2020): Determination and occurrence of natural and synthetic glucocorticoids in surface waters, *Environment International* **134**, 105278.  
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0160412019322007?token=3068BF957320C7B94492B58DC117C4AA36E627DC0156EDAF023AECB81EE19EF89EA96A4C0EF6745D45E65D2B9B5B6AC0>, staženo dne 31.1.2021.
- [15] Gilbert N. (2011): Drug waste harms fish, *Nature* **476**, 265.  
<https://www.dhushara.com/Biocrisis/11/oct/drugWaste.pdf>, staženo dne 5.9.2019.
- [16] Schriks M., van Leerdam J.A., van der Linden S.C., van der Burg B., van Wezel A.P., de Voogt P. (2010): High-resolution mass spectrometric identification and quantification of glucocorticoid compounds in various wastewaters in the Netherlands. *Environmental Science & Technology* **44**, 4766 – 4774.  
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es100013x>, staženo dne 5.9.2019.
- [17] Guiloski I.C., Ribas J.L.C., da Silva Pereira L., Perbiche Neves A.P., de Assis H.C.S. (2015): Effect of trophic exposure to dexamethasone and diclofenac in freshwater fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **114**, 204-211.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25645142/>, staženo dne 5.9.2019.
- [18] Dokoupilová E. (2020): Fotoinicovaná degradace vybraných léčiv (dexametazonu, prednisolonu, fluoxetinu) a testování toxicity léčiv a produktů jejich fotodegradace na vodní organismy (*Daphnia magna*) – 58 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.  
<https://wstag.jcu.cz/StagPortletsJSR168/CleanUrl?urlid=prohlizeni-prace-detail&pracIdno=51041>, staženo dne 1.8.2020.
- [19] Cacciari R.D., Reynoso E., Montejano H.A., Biasutti M.A. (2017): Photodegradation of Prednisolone under UVB solar irradiation. Role of ROS – photogenerated in the degradation mechanism, *Photochemical & Photobiological Sciences* **16**, 1717 – 1726.  
[https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/72780/CONICET\\_Digital\\_Nro.b1c3a121-892b-4417-919a-baa62342d34a\\_D.pdf?sequence=5&isAllowed=y](https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/72780/CONICET_Digital_Nro.b1c3a121-892b-4417-919a-baa62342d34a_D.pdf?sequence=5&isAllowed=y), staženo dne 5.9.2019.
- [20] Della Greca M., Fiorentino A., Isidori M., Lavorgna M., Previtiera L., Rubino M., Temussi F. (2004): Toxicity of prednisolone, dexamethasone and their photochemical derivatives on aquatic organisms, *Chemosphere* **54**, 629637.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653503008774>, staženo dne 5.9.2019.

[21] Rasolevandi T., Naseri S., Azarpira H., Mahvi A.H. (2019): Photo-degradation of dexamethasone phosphate using UV/Iodide process: Kinetics, intermediates, and transformation pathways, *Journal of Molecular Liquids* **295**, 111703.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732219326728?via%3Dihub>,

staženo dne 24.2.2021.

[22] Guo Z., Guo A., Guo Q., Rui M., Zhao Y., Zhang H., Zhu S. (2017): Decomposition of dexamethasone by gamma irradiation: Kinetics, degradation mechanisms and impact on algae growth, *Chemical Engineering Journal* **307**, 722-728.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138589471631230X?via%3Dihub>,

staženo dne 24.2.2021.

[23] da Silva W.L., Lancarin M.A., dos Santos J.H.Z., Da Rocha Z.N., Pepe I.M. (2016): Electrochemical and Catalytic Studies of a Supported Photocatalyst Produced from Petrochemical Residue in the Photocatalytic Degradation of Dexamethasone and Guaifenesin Drugs, *Water Air & Soil Pollution* **227**, 242.

<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11270-016-2932-x.pdf>, staženo dne

5.9.2019.

[24] Calza P., Pelizzetti E., Brussino M., Baiocchi C. (2001): Ion Trap Tandem Mass Spectrometry Study of Dexamethasone Transformation Products on Light Activated TiO<sub>2</sub> Surface, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **12**, 1286 -1295.

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1044030501003191?token=BFFF7B15D54265875EEC495BC4913D8C90C50534EBEF414F581E190E239B7E5C20B28342005B805A9564B7DDA98D47>, staženo dne 5.9.2019.

[25] De Wasch K., De Brabander H.F., Van de Wiele M., Vercammen J., Courtheyn D., Impens S. (2001): Differentiation between dexamethasone and betamethasone in a mixture using multiple mass spektrometry, *Journal of Chromatography A* **926**, 79-86.

[http://www.hdb.ugent.be/HDB/Publication\\_A1\\_files/P2001-03%20\(DBm\).pdf](http://www.hdb.ugent.be/HDB/Publication_A1_files/P2001-03%20(DBm).pdf), staženo dne 5.9.2019.

[26] Kubec R., ústní sdělení, říjen 2020.

[27] Kaur J., Bansal Y., Bansal G. (2016): Understanding unconventional routes to impurities from drugs in hydrolytic conditions, *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* **50**, 161 - 190.

<https://www.ijper.org/sites/default/files/10.5530ijper.50.3.28.pdf>, staženo dne 5.9.2019.

[28] Rubino M., Rosaria Iesce M., Previtiera L. (2006): Xenobiotics in the environment: abiotic transformations and toxicity, Università degli Studi di Napoli Federico II, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali. 28-36.

<https://www.fedoa.unina.it/799/1/rubino.pdf>, staženo dne 5.9.2019.

[29] Chen B., Li M., Lin M., Tumambac G., Rustum A. (2009): A comparative study of enol aldehyde formation from betamethasone, dexamethasone, beclomethasone and related compounds under acidic and alkaline conditions, *Steroids* **74**, 30-41.

<https://fddocuments.in/document/a-comparative-study-of-enol-aldehyde-formation-from-betamethasone-dexamethasone.html>, staženo dne 30.1.2021.

[30] Negi A., Gill B.S. (2013): Success Stories of Enolate Formo of Drugs. *Pharmatutor Magazine* **1**, 45-53.

[https://www.researchgate.net/publication/258517314\\_success\\_stories\\_of\\_enolate\\_form\\_of\\_drugs/link/55b7468808ae092e96570c74/download](https://www.researchgate.net/publication/258517314_success_stories_of_enolate_form_of_drugs/link/55b7468808ae092e96570c74/download), staženo dne 5.9.2020.

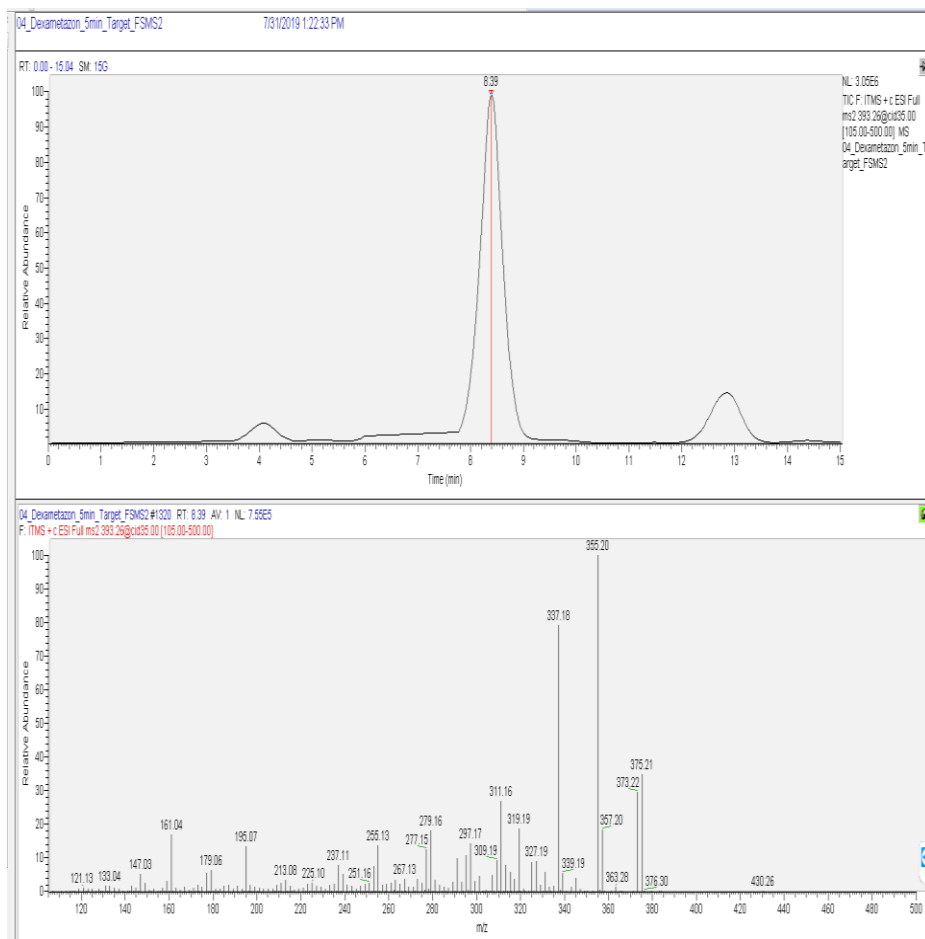
## **8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ**

$^{60}\text{Co}$	$^{60}\text{kobalt}$
COSY	Correlation Spectroscopy experiment
COVID-19	koronavirové onemocnění 2019
$\Delta$	delta, rozdíl
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
HESI	vyhříváný elektrosprej
HF	fluorovodík
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICS	intersystem crossing
$\text{K}^+$	draselný kation
LC	kapalinová chromatografie
LC/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LC/MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
m/z	poměr hmotnosti a náboje
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie

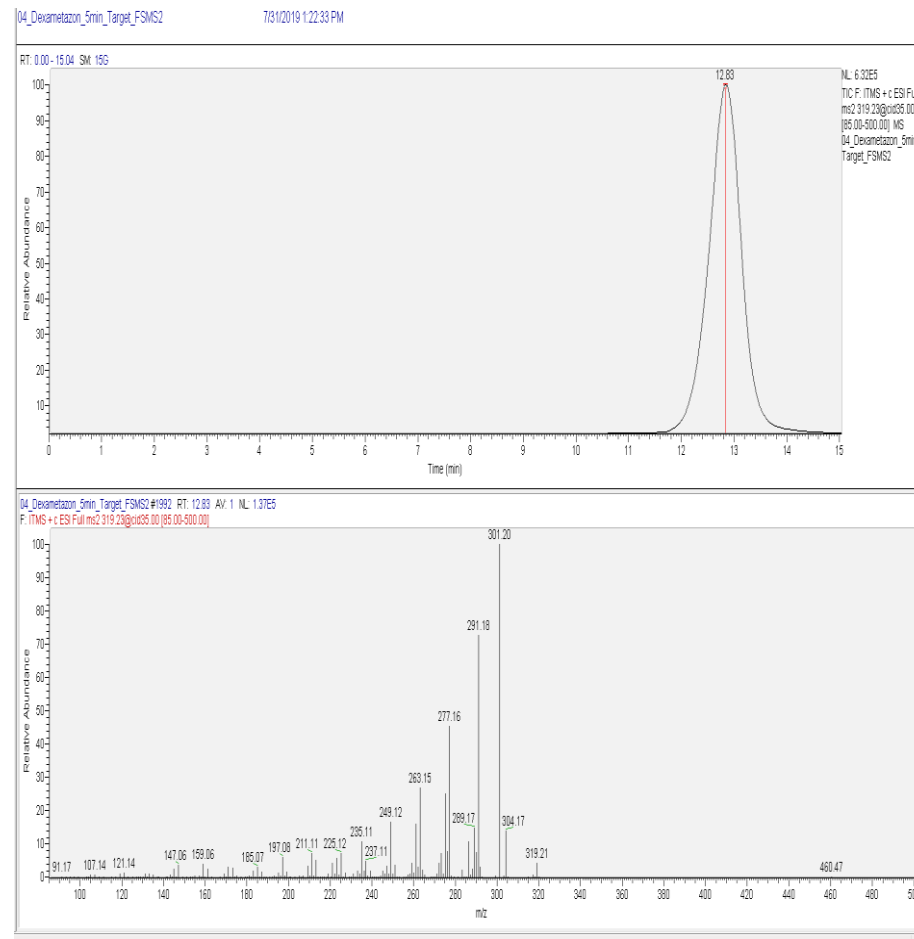
Na <sup>+</sup>	sodný kation
NMR	nukleární magnetická rezonance
ROS	reaktivní formy kyslíku
TiO <sub>2</sub>	oxid titaničitý
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
UV záření	ultrafialové záření (UVA; UVB; UVC)
VIS	viditelné záření
WADA	World Anti-Doping Agency

**PRÍLOHA 1:** Červená čára ve spektrech ukazuje, kterého píku se MS/MS spektrum (znázorněné ve spodní části obrázku) týká - a) MS/MS spektrum dexametazonu, b) MS/MS spektrum betametazonu.

a)



b)





**PRÍLOHA 2:** Červená čára ve spektru ukazuje, kterého píku se MS/MS spektrum, které je vidět ve spodní části obrázku týká. Spodní část obrázku - MS/MS spektrum prednisolonu.

