

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

2022

Lenka Součková

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Zavedení metody na HPLC stanovení diltiazemu
a otestování možnosti jeho fotoiniciované degradace**

Bakalářská práce

Lenka Součková

Školitelka: Doc. RNDr. Šárka Klementová, CSc.

Školitelka – specialistka: Ing. Pavla Fojtíková, PhD.

České Budějovice

2022

Součková, L., 2022: Zavedení metody na HPLC stanovení diltiazemu a otestování možnosti jeho fotoinducované degradace [Introduction of a method for HPLC determination of diltiazem and testing of the possibility of its photoinduced degradation. Bc. Thesis, in Czech.] – 24 pp, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotation

In the theoretical part, the study is focused on summarising information about three main areas concerning the antiarrhythmic drug diltiazem: first, its forms, usage and metabolism in the human body; second, concentrations of diltiazem and other antiarrhythmics in natural waters and their toxicity for aquatic organisms; third, a survey of possibilities of HPLC analysis of diltiazem. In the experimental part, a HPLC method was introduced and a photochemical degradation under light conditions relevant to environmental conditions was performed.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích 6.12.2022

.....

Podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat paní doc. RNDr. Šárce Klementové, CSc. za odborné vedení a konzultace v průběhu vypracovávání mé bakalářské práce, za cenné rady, ochotu a věnovaný čas.

Dále bych ráda poděkovala paní Ing. Pavle Fojtíkové, PhD. za odbornou pomoc při práci s kapalinovým chromatografem a při vývoji HPLC metody, také děkuji za trpělivost a ochotu poradit.

Obsah

1	Cíle práce.....	1
2	Úvod	2
2.1	Charakteristika diltiazemu	2
2.2	HPLC stanovení diltiazemu	3
2.2.1	Možnosti HPLC stanovení diltiazemu.....	4
2.2.2	Kritéria hodnocení metody HPLC stanovení	5
2.3	Diltiazem v přírodních vodách	5
2.4	Toxicita diltiazemu na vodních organismech	6
2.5	Fotochemické odbourávání diltiazemu	7
3	Materiály a metody	9
4	Výsledky a diskuze	11
4.1	Vývoj a optimalizace HPLC stanovení diltiazemu	11
4.2	Fotochemická degradace diltiazemu.....	13
5	Závěr.....	18
6	Seznam použité literatury	19

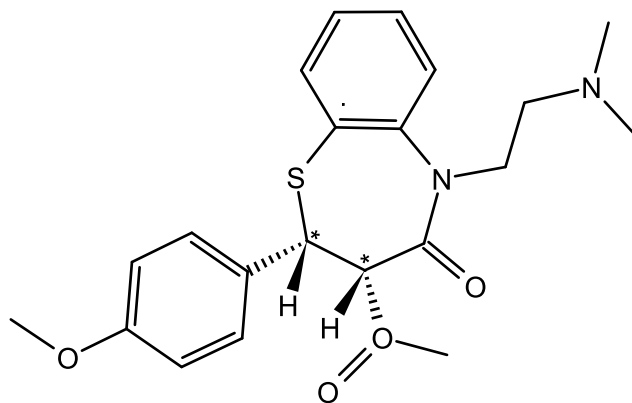
1 Cíle práce

- 1) Provést rešerši na téma použití, formy, metabolismus lékového přípravku diltiazem.
- 2) Vyhledat informace o koncentracích diltiazemu a dalších léků ze skupiny antiarytmik v přírodních povrchových vodách, případně o toxicitě těchto léčiv na vodní organismy.
- 3) Vyhledat možnosti HPLC stanovení diltiazemu.
- 4) Zavést HPLC stanovení pro diltiazem na pracovišti.
- 5) Otestovat možnost fotochemického odbourávání v homogenní fázi.

2 Úvod

2.1 Charakteristika diltiazemu

Diltiazem (Obr. 1), sumárním vzorcem $C_{22}H_{26}N_2O_4S$ a systematickým názvem [(2S,3S)-5-[2-(dimethylamino)ethyl]-2-(4-methoxyphenyl)-4-oxo-2,3-dihydro-1,5-benzothiazepin-3-yl] acetate podle IUPAC¹ (PubChem, 2022), patří mezi benzothiazepinové blokátory vápníkových kanálů. Toto léčivo se vyznačuje vasodilatačními schopnostmi (Andrisano et al., 2001) a používá se především při léčbě hypertenze, anginy pectoris, klasické a vazospastické, a také při léčbě supraventrikulární tachyarytmie (Quaglia et al., 2005).



Obr. 1: Strukturní vzorec diltiazemu (hvězdičky označují chirální centra).

Diltiazem má dvě chirální centra a vykazuje optickou aktivitu. Může se vyskytovat ve formách *cis* a *trans* vzhledem k uspořádání vodíků, přičemž každá z těchto forem má dva enantiomery (+) nebo (-). Látka, která se používá jako léčivo, je (+)-*cis*-diltiazem, další stereoizomery se mohou nacházet v lékovém přípravku jako nečistoty spolu s deacetyldiltiazemem (Quaglia et al., 2005).

Při perorálním podání se diltiazem velmi rychle a zcela vstřebává. Z 80–90 % se váže na proteiny krevní plazmy, hlavně na albumin. Poločas eliminace z těla je při perorálním podání přibližně 4,5 hodiny a při intravenózním podání se pohybuje v rozmezí 2–5 hodin (Buckley et al., 1990). V těle je toto léčivo intenzivně metabolizováno, přičemž maximálně 4 % jsou vyloučena nezměněna močí (Guan et al., 2018). Při perorálním podání je

¹ International Union of Pure and Applied Chemistry

metabolismus diltiazemu ovlivněn efektem prvního průchodu², vstřebává se ve střevní stěně. Při intravenózním podání diltiazem vstupuje přímo do systémového oběhu a je rovněž dále metabolizován. Hlavními metabolity vznikajícími v játrech i v dalších orgánech jsou deacetyldiltiazem, N-demethyl-diltiazem a N-demethyl-deacetyl-diltiazem, zachovávající si v určité míře účinky diltiazemu (Lefebvre et al., 1996; Buckley et al., 1990). Terapeuticky účinná dávka se liší mezi státy, celkově se pohybuje v rozmezí 90–360 mg/den (Buckley et al., 1990).

Biologická dostupnost diltiazemu se liší u jednotlivých jedinců, což může být vysvětleno právě efektem prvního průchodu, který je silně variabilní (Mircioiu et al., 2019), také ji mohou ovlivňovat bakterie, které se běžně nacházejí v mikroflóře střeva tím, že diltiazem deacetyluje (Zhou et al. 2020). Vzhledem k tomu, že je diltiazem velmi rychle metabolizován, byla jeho biologická dostupnost ve studii Hermanna et al. (1983) stanovena v rozmezí 24–74 %.

2.2 HPLC stanovení diltiazemu

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří mezi nejpoužívanější metody ke stanovování diltiazemu ve vzorcích. V praxi se používá pro stanovení diltiazemu, jeho metabolitů a příbuzných látek, nebo jiných léčiv, nejčastěji v kombinaci s UV detekcí nebo s hmotnostní spektrometrií (Shafi et al., 2013). HPLC stanovení diltiazemu se provádí při sledování obsahu této látky v přírodních vodách (Kim et al., 2007), nebo pro zjištění stability a farmakokinetiky diltiazemu a dalších od něho odvozených struktur vznikajících v tělech organismů (Shafi et al., 2013).

Metody stanovení diltiazemu pomocí HPLC se liší použitou chromatografickou kolonou (čili stacionární fází) a složením mobilní fáze. Nejčastěji používanou kolonou ve většině publikací je kolona se stacionární fází C18, popřípadě C8. Nosičem stacionární fáze je v tomto případě silikagel, u stacionární fáze C18 je na silikagel navázán uhlovodíkový zbytek s osmnácti uhlíky, v případě stacionární fáze C8 je uhlovodíkový zbytek osmi-uhlíkatý (Nováková et al., 2021). Kromě stacionárních fází s chemicky vázanými alkylovými řetězci byly publikovány práce s využitím CN (alkylnitrilových) kolon (Zhao & Chow, 1989; Malaya et al., 1990). Mobilní fáze nejčastěji obsahuje různé kombinace a poměry vodných roztoků solí (pufrů) a organického rozpouštědla acetonitrilu či methanolu, důležitou roli hraje

² Efekt prvního průchodu je jev v metabolismu léčiv, kdy je koncentrace léčiva podstatně snížena dříve, než léčivo vstoupí do systémového oběhu – látka je metabolizována již během procesu vstřebávání.

pH mobilní fáze. Pro stanovení je dále důležitá optimální vlnová délka v případě použití UV detekce, která se obvykle pohybuje v rozmezí 230–270 nm, a vhodně zvolený průtok mobilní fáze (Shafi et al., 2013).

2.2.1 Možnosti HPLC stanovení diltiazemu

Lee et al. (1991) provedli analýzu diltiazemu a jeho metabolitu deacetyldiltiazemu v krevní plazmě za použití C18 RP kolony (300 × 3,9 mm; 10 μm). Mobilní fáze se skládala z methanolu, acetonitrilu, 0,04 M bromidu amonného a triethylaminu (40/24/36/0,1, v/v/v/v) (pH = 6,4), průtok činil 1 ml/min a k detekci byla použita vlnová délka 237 nm.

V práci Christensenové et al. (1999) byl stanovován diltiazem a jeho tři metabolity (N-demethyl-diltiazem, deacetyldiltiazem a N-demethyl-deacetyl-diltiazem) v krevní plazmě. Pro separaci byla použita kolona Shandon Hypersil BDS C8 RP (200 × 4 mm; 5 μm). Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu, 0,05 M vodného roztoku fosfátového pufru s hodnotou pH upravenou na 2,9 pomocí triethylaminu a z methanolu (280/598/2/90, v/v/v/v). Průtok činil 1 ml/min a detekce byla provedena při vlnové délce 238 nm.

Metodu na určení farmakokinetiky diltiazemu v plazmě navrhli Li et al. (2003). V metodě byla použita kolona Spherisorb C18 (250 × 4,6 mm; 10 μm). Mobilní fáze se skládala z roztoku methanolu a vody (80/20, v/v) s obsahem 2,8 mM triethylaminu. Průtok činil 1,2 ml/min a vlnová délka detekce byla 239 nm.

Quaglia et al. (2005) ve své práci otestovali několik stacionárních a mobilních fází pro stanovení diltiazemu a doprovodných (znečišťujících látek). Nejlepší separace diltiazemu, a čtyř obvykle přítomných nečistot (stereoizomery diltiazemu), bylo dosaženo s použitím kolony Chromolith Performance Merck RP-18 (100 × 4,6 mm; 5 μm) a mobilní fáze složené z 10 mM octanu amonného s přídavkem 0,2% diethylaminu (pH = 6,58) a z acetonitrilu (60/40, v/v). Průtok mobilní fáze činil 1,5 ml/min a použitá vlnová délka detekce 240 nm.

Naz et al. (2010) provedli stanovení diltiazemu ve vodném roztoku a v krevním séru s použitím kolony Nucleosil 100-10 C18 (250 × 4,6 mm; 10 μm). Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu, methanolu a vody (10/55/35, v/v/v) s úpravou pH na hodnotou 2,65 pomocí kyseliny fosforečné, použitý průtok byl 1 ml/min. UV detekce probíhala při vlnové délce 240 nm.

Pro separaci diltiazemu a šesti jeho doprovodných (znečišťujících) látek v práci Chatpalliwar et al. (2012) bylo vyzkoušeno několik kombinací kolon, mobilních fází a průtoků. Pro následnou validaci byla vybrána metoda s použitím kolony Hypersil BDS C18

(150 × 4,6 mm; 5,0 μm), mobilní fáze A obsahující vodný roztok triethylaminu (0,2%, v/v) (pH = 5,0) a mobilní fáze B obsahující acetonitril, v gradientové eluci se změnou podílu mobilní fáze B v rozmezí 22–38 %. Průtok činil 1 ml/min a detekce probíhala při vlnové délce 240 nm.

Mircioiu et al. (2019) pro stanovení diltiazemu a deacetyldiltiazemu ve vzorku krevní plazmy použili kolonu Ascentis 5 C18 (150 × 2,1 mm; 5 μm), mobilní fázi složenou z 0,025 M fosfátového pufru s 0,2% triethylaminem (pH = 2,2) a z acetonitrilu (72/28, v/v). Průtok činil 0,35 ml/min a detekce probíhala při vlnové délce 235 nm.

2.2.2 Kritéria hodnocení metody HPLC stanovení

Pro zhodnocení vhodnosti použité metody pro HPLC stanovení se používá retenční faktor (k) a faktor asymetrie (A_s), hodnoty těchto faktorů popisují retenci a pík analytu.

Retenční faktor k , udávající poměr rozdílu retenčního času a mrtvého retenčního času k mrtvému retenčnímu času, se vypočte podle rovnice 1,

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

kde t_R je retenční čas a t_M mrtvý retenční čas.

Optimálně má být retenční faktor v rozsahu 2–6.

Symetrii píku určuje faktor asymetrie A_s , který se vypočte podle rovnice 2,

$$A_s = \frac{t_P}{f_P} \quad (2)$$

kde t_P je šířka vzestupné části píku a f_P je šířka sestupné části píku. Šířka je určována zpravidla v 5 nebo 10 % výšky píku.

Faktor asymetrie by měl být v rozmezí 0,8–1,5 (Nováková et al., 2021).

2.3 Diltiazem v přírodních vodách

Běžně používaná léčiva se dostávají do vodního prostředí a mohou představovat riziko pro vodní ekosystémy. Právě diltiazem je často předepisované léčivo, které – ačkoli je z velké části v organismu metabolizováno – bylo detekováno v přírodních vodách po celém světě (Kim et al., 2007).

Diltiazem se dostává do odpadních vod díky vylučování člověkem nebo například kvůli špatné likvidaci zbytků lékových přípravků. Čističky odpadních vod ovšem většinou nedokáží

odstraňovat malá množství velmi různorodých farmaceutických látek, a proto se následně tyto látky dostávají do povrchových vod a mohou negativně ovlivňovat vodní ekosystémy. Naopak vzhledem k desinfekčním procesům čističek mohou být léčiva pozměněna a jejich produkty mohou mít další nežádoucí účinky (de Barros et al., 2018).

Zjištěné koncentrace diltiazemu se na různých místech liší – zatímco v tekoucích vodách mají většinou maximálně hodnotu v jednotkách ng/l, v odpadních vodách mohou přesahovat stovku ng/l (Steinkey et al., 2019).

Kasprzyk-Hordern et al. (2008) ve své práci zkoumali koncentrace různých léčiv v řekách Ely a Taff v jižním Walesu po dobu 10 měsíců. Mezi antiarytmika zkoumaná v této práci patřily diltiazem, propranolol, metoprolol, atenolol. V řece Taff byly zjištěny maximální koncentrace diltiazemu 49 ng/l, propranololu 40 ng/l, metoprololu 11 ng/l a atenololu 560 ng/l. V řece Ely byly zjištěny maximální koncentrace diltiazemu 65 ng/l, propranololu 91 ng/l, metoprololu 12 ng/l a atenololu 527 ng/l.

Scott et al. (2016) ve své práci uvádějí koncentrace léčivých přípravků zjištěných v několika oblastech Mexického zálivu v Texasu. Nejvyšší naměřená koncentrace diltiazemu činila 30,9 ng/l v povrchovém vzorku v zimě roku 2013. Další nalezené antiarytmikum byl atenolol, s koncentrací 130 ng/l na jaře 2013.

V Turecku byla v odpadních vodách zjištěna nejvyšší koncentrace diltiazemu 14,5 ng/l (Komesli et al., 2015).

Batt et al. (2016) ve svém výzkumu vodních toků ve Spojených státech amerických zjistili přítomnost diltiazemu v koncentraci až 56,8 ng/l a také přítomnost jeho metabolitu, demethyl-diltiazemu, v koncentraci 16,8 ng/l. Verapamil, který patří do stejné skupiny léků jako diltiazem, se vyskytoval v maximální koncentraci 35,8 ng/l.

V povodí řeky Paraopeba v Brazílii byla zjištěna nejvyšší koncentrace diltiazemu o hodnotě 170,8 ng/l (de Barros et al., 2018).

2.4 Toxicita diltiazemu na vodních organismech

Funkce léčivých přípravků je většinou stejná nebo podobná u vodních organismů živočišné říše jako u člověka. Diltiazem, nacházející se ve vodním prostředí, tedy velmi pravděpodobně ovlivňuje životní procesy vodních organismů, které jsou závislé na koncentraci vápenatých iontů (Steinkey et al., 2019).

Malý planktonní korýš hrotnatka velká (*Daphnia magna*) je široce používaným organismem ke studiím kontaminace životního prostředí z důvodu dobrých bioindikačních

schopností a citlivosti na mnoho kontaminantů. Jako modelový organismus pro studium vlivu diltiazemu byla použita např. v práci Steinkeyho et al. (2019), kde bylo prokázáno navýšení srdeční frekvence o 12 % u jedinců *D. magna* vystavených koncentraci 500 ng/l diltiazemu po dobu dvou dnů. Od koncentrace diltiazemu 5 µg/l začala srdeční frekvence klesat, přičemž dosáhla snížení až o 14 % při koncentraci 100 µg/l diltiazemu. Při koncentraci diltiazemu 1 µg/l se významně navýšila spotřeba kyslíku (o 48 %) a zvýšila se i rychlost metabolismu. Při vystavení diltiazemu po dobu šestnácti dnů se snížil počet potomků a zvětšilo se jejich tělo.

Kim et al. (2007) ve své studii stanovili u *D. magna* tzv. střední letální koncentraci, označovanou LC₅₀, tedy koncentraci, kdy za stanovené období uhynie 50 % jedinců. Při čtyřdenním vystavení diltiazemu činila LC₅₀ 8,2 mg/l, při dvoudenním vystavení diltiazemu 28 mg/l.

Práce Alloucheho et al. (2022) prokázala u meiobentických³ hlístic, zastoupených ponejvíce druhy *Metoncholaimus pristiurus*, *Oncholaimus campylocercoides* a *Anticoma eberthi*, že při vystavení diltiazemu již v koncentraci 1,8 µg/l došlo k významnému snížení početnosti populace hlístic, dále snížení velikosti potomků a navýšení podílu samic v potomstvu. Zvýšení koncentrace na 1,8 mg/l výsledný efekt výrazně neprohloubilo.

Ve studii Rosové et al. (2018) byly stanoveny akutní hodnoty střední účinné (efektivní) koncentrace EC₅₀ pro organismy *Vibrio fischeri* (světélkující bakterie) 704 mg/l, *Daphnia magna* 165 mg/l, *Selenastrum capricornutum* (zelená řasa) 9,6 mg/l a *Danio rerio* (sladkovodní kaprovitá ryba) 51 mg/l.

U sladkovodní východoasijské ryby medaky japonské (*Oryzias latipes*) byla stanovena akutní letální koncentrace LC₅₀ za 48 hodin 25,6 mg/l (Kim et al., 2007). Při vystavení koncentraci 0,03 µg/l diltiazemu, která se může běžně vyskytovat ve vodním prostředí, v práci Steinbacha et al. (2016), byly u medaky japonské prokázány změny v krvi, žábrech, ledvinách a játrech.

2.5 Fotochemické odbourávání diltiazemu

García et al. (1998) ve své práci vystavili vodný roztok diltiazemu dennímu světlu (v létě), laboratornímu světlu a světlu ze sodíkové výbojky (emituje vlnové délky 589,0 nm a 589,6 nm) po dobu 12 hodin. Ani v jedné případě nebyl zaznamenán žádný úbytek diltiazemu, k fotodegradaci tudíž za těchto podmínek nedocházelo.

³ Malí bezobratlí, kteří žijí v mořském i sladkém vodním prostředí u dna či ve dně.

Andrisano et al. (2001) ve své studii ozařovali vzorky diltiazemu (500 mg/l) v roztocích pufrů o pH = 4,0; 7,4; 9,0 xenonovou výbojkou (vzorky byly umístěné v křemenných kyvetách) po dobu 15 hodin. Zjistili, že hodnota pH významně ovlivňuje fotodegradaci roztoku, rozdíl je v počtu fotoproduktů i v komplexnosti reakce – při vyšším pH se na odbourávání podílejí jak fotodegradace tak hydrolytické procesy. Hlavním produktem fotodegradace se ukázal býti diltiazem-S-oxid.

Sadeghi et al. (2013) vystavili vodný roztok diltiazemu (100 mg/l) záření UV-C oblasti (záření o vlnové délce 254 nm) po dobu 4 hodin. Za těchto podmínek bylo odbouráno cca 52 % diltiazemu. Při nefotochemickém oxidačním odbourávání působením 3% H₂O₂ po dobu 4 hodin, ubylo asi 11 % diltiazemu. Degradacním produktem byl deacetyldiltiazem.

Oxidační degradaci diltiazemu působením 3% peroxidu vodíku popisuje také Chatpalliwar et al. (2012). Při zvýšené teplotě (80 °C) bylo za 1 hodinu odbouráno 57 % diltiazemu, degradačním produktem byl stejně jako v práci Sadeghiho et al. (2013) deacetyldiltiazem.

Zhu et al. (2015) použili k ozařování roztoku diltiazemu o koncentraci 1,0 mg/l a neutrálním pH nízkotlakou rtuťovou lampu (vyzařující záření o vlnové délce 254 nm). Zjistili, že se tvoří celkem čtyři degradační produkty. Všechny se objevily již po 1 minutě ozařování, dva (deacetyldiltiazem a deacetoxý-diltiazem) dosáhly maxima po 15 minutách ozařování, poté docházelo k jejich rozkladu. U zbylých dvou produktů (N-desmethyl-diltiazem a deacetyl-desmethoxyphenyl-diltiazem) docházelo ke kontinuální akumulaci v reakční směsi. Rychlostní konstanta fotolytické degradace diltiazemu byla 0,044 min⁻¹.

3 Materiály a metody

V experimentální části práce byly použity následující chemikálie:

- diltiazem hydrochlorid – $\geq 99\%$ (pH = 5,95) (Sigma Aldrich)
- methanol pro HPLC (Merck)
- acetonitril pro HPLC (Merck)
- octan amonný p. a. pro HPLC (Fluka)
- kyselina mravenčí p. a. 98–100% (Merck)
- milli-Q® voda
- chlorid železitý hexahydrát čistý (Penta)
- 1,10-fenantrolin (Lach-ner).

Stanovení diltiazemu probíhalo na kapalinovém chromatografu Dionex UltiMate 3000 Thermo Scientific, který byl vybaven spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem PDA 3000 RS. V průběhu měření a vyhodnocování naměřených dat byl používán ovládací program Chromeleon. V průběhu vývoje metody byly použity dvě různé kolony – kolona ARION PLUS C18 (150 × 3 mm; 5 μ m), výrobce Chromservis a kolona LUNA C18 (250 × 4,6 mm; 5 μ m), výrobce Phenomenex. HPLC stanovení probíhalo při teplotě kolonového prostoru 30 °C, s průtokem 0,75 ml/min nebo 1 ml/min, velikost nástřiku byla 20 μ l a eluce byla izokratická. UV detektor byl nastaven na detekci ve vlnových délkách 230, 240, 250 a 260 nm (Shafi et al., 2013).

Pro vývoj metody a další pokusy byl použit roztok standardu diltiazemu v ultračisté vodě o koncentraci 50 mg/l.

V průběhu vývoje a optimalizace metody, byla použita následující složení mobilní fáze (MF) A, B, C:

- MFA:
 - voda okyselená kyselinou mravenčí (pH = 2,0; 2,6; 2,9)
 - 10 mM octan amonný ve vodě (pH = 6,5)
- MFB:
 - methanol, resp. methanol + 1 obj. % kyseliny mravenčí
 - acetonitril
- MFC:
 - acetonitril.

UV-VIS spektra byla měřena na přístroji Shimadzu UV-1601 s použitím softwaru UV Probe.

Ozařování bylo prováděno v reaktoru Rayonet RPR 100, který byl osázen 14 lampami RPR 3000 Å, emitujícími záření v rozmezí 250–350 nm. Vzorby byly ve skleněných kyvetách, opatřených víčkem, které odstraňují záření o vlnových délkách kratších než 300 nm.

Fotoredukce železitých iontů byla sledována spektrofotometricky pomocí tvorby komplexu s komplexačním činidlem 1,10-fenantrolinem. Absorbance byla měřena na spektrofotometru JEN-WAY 6300.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Vývoj a optimalizace HPLC stanovení diltiazemu

Vývoj a optimalizace metody byly provedeny na základě již publikovaných metod (Quaglia et al., 2005, Shafi et al., 2013).

Cílem bylo najít takové podmínky separace, to znamená takovou kombinaci stacionární fáze, složení a průtoku mobilní fáze, teploty kolonového prostoru, velikosti nástřiku a vlnové délky UV detekce, aby bylo dosaženo optimálního retenčního faktoru analytu, a aby byl pík analytu úzký a symetrický. V případě této analýzy bylo vhodnější zvolit vyšší retenční faktor (4–6), z důvodu tvorby fotodegradačních produktů, které mohou mít nižší retenční čas než diltiazem.

Protože v pracích zabývajících se HPLC stanovením diltiazemu byla používána především kolona C18 (Lee et al., 1991; Li et al., 2003; Quaglia et al., 2005; Naz et al., 2010; Chatpalliwar et al., 2012; Mircioiu et al., 2019), byla v předložené bakalářské práci pro vývoj a optimalizaci HPLC stanovení diltiazemu jako první použita patnácticentimetrová kolona ARION PLUS C18 s teplotou kolonového prostoru 30 °C, průtokem mobilní fáze 0,75 ml/min. Nástřik vzorku činil 20 µl a jako první mobilní fáze byla použita voda okyselená kyselinou mravenčí na pH = 2,9 a 100% methanol (Sultana et al., 2010). Byl sledován vliv obsahu methanolu (50–20 obj. %) na retenční faktor analytu a na tvar píku. Snižování obsahu organické mobilní fáze vedlo ke zvyšování hodnoty retenčního faktoru z hodnoty 0,4 pro mobilní fázi s 50 obj. % methanolu až na hodnotu větší než 16,3 pro mobilní fázi s 20 obj. % methanolu. Nižší obsah organické fáze však vedl k výraznému rozšiřování píku analytu a k deformaci tvaru píku.

Použití 40 obj % okyseleného methanolu vedlo ke zvýšení retenčního faktoru na hodnotu 2,8. Faktor asymetrie byl pro analýzy s přijatelnou retencí analytu vysoký, což znemožňovalo využití metody pro analytické účely.

Použití kyselejší vodné mobilní fáze (pH = 2,0) v kombinaci s okyseleným methanolem vedlo k výraznému zvýšení retenčního času analytu, retenční faktor byl větší než 13,4 při použití 30 obj. % methanolu. Optimálního snížení retenčního faktoru nebylo dosaženo ani zvyšováním podílu organické mobilní fáze, ani kombinací vodné mobilní fáze (pH = 2,0) s neokyseleným methanolem.

Ani přidavek acetonitrilu jako mobilní fáze C (MFC) (Naz et al. 2010) do mobilní fáze nevedl k dosažení optimálního retenčního faktoru a symetrie píku. Proto bylo rozhodnuto použít jinou kolonu.

Pro kolonu LUNA C18 byly při průtoku 1 ml/min použity dvě různé kombinace MFA a MFB. Voda s obsahem kyseliny mravenčí (50 obj. %, pH = 2,6) a methanol (50 obj. %) vedly k retenčnímu faktoru 4,3, faktor asymetrie (1,8) nebyl vyhovující.

Dále byl na základě publikace Quaglia et al. (2005) zvolen jako MFA 10 mM roztok octanu amonného (pH = 6,5) s podílem v mobilní fázi 60 obj. % a acetonitril jako mobilní fáze B (MFB). Retenční faktor činil 4,0. Při použití methanolu jako MFB byl retenční faktor větší než 10.

Toto složení mobilní fáze (roztok octanu amonného v kombinaci s acetonitrilem či methanolem) se ukázalo jako vhodné složení pro zajištění dostatečného retenčního faktoru, ale protože pro kolonu o délce 25 cm byl retenční čas analytu příliš vysoký, bylo rozhodnuto zkusit toto složení pro kratší kolonu.

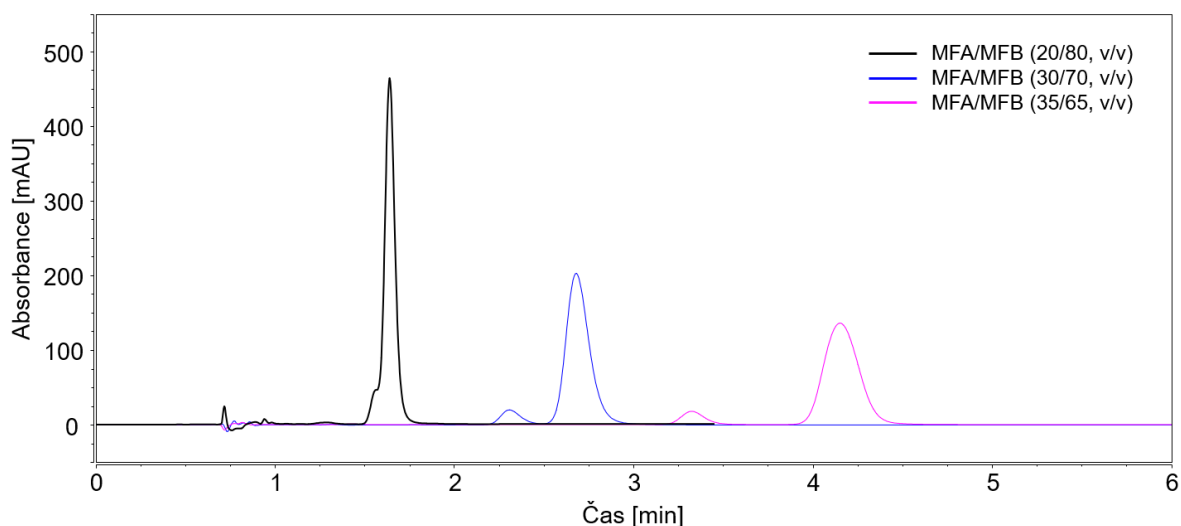
Pro další optimalizaci metody byla použita patnácticentimetrová kolona ARION PLUS C18, s průtokem mobilní fáze 1 ml/min a nástřikem 20 μ l. Byl sledován vliv poměru mobilních fází A a B na retenční čas analytu, tedy na hodnotu retenčního faktoru.

Při použití 40 obj. % acetonitrilu jako mobilní fáze B (MFB) bylo dosaženo optimálního retenčního faktoru 4,9. Z ekonomického hlediska i z hlediska životního prostředí by byla žádoucí náhrada acetonitrilu za methanol (Sadeghi et al., 2013). Proto byl sledován vliv obsahu methanolu jako MFB (40–80 obj. %) na retenční faktor a tvar a intenzitu píku. Zvyšování obsahu methanolu v mobilní fázi vedlo ke zvyšování intenzity píku, ale současně ke snižování retenčního faktoru (Obr. 2).

Kromě intenzivního píku diltiazemu byl v chromatogramech přítomen vždy i druhý pík. Tento pík může představovat některou, resp. některé z doprovodných látek diltiazemu (Quaglia et al., 2005; Chatpalliwar et al., 2012; Mircioiu et al., 2019).

Všechna měření v průběhu optimalizace metody byla prováděna při čtyřech různých vlnových délkách a na základě intenzity píku pro různé vlnové délky a absorpční spektra byla pro vlastní analýzy vybrána vlnová délka 240 nm.

Závislost retenčního faktoru na složení mobilní fáze pro metodu s použitím MFA 10 mM roztoku octanu amonného a MFB 100% methanolu na koloně ARION PLUS C18 je znázorněna na Obr. 2.



Obr. 2: Vliv složení mobilní fáze na retenční faktor a faktor asymetrie. MFA – 10 mM roztok octanu amonného (pH = 6,5); MFB – 100% methanol. Vlnová délka detekce 240 nm.

Parametry finální zvolené optimalizované metody, kde bylo dosaženo retenčního faktoru 4,2 a faktoru asymetrie 1,1, s mobilní fází s 35 obj. % MFA – 10 mM roztok octanu amonného a MFB – 100% methanol, která byla použita pro další experimentální práci, jsou uvedeny v Tab. I.

Tab. I: Parametry zvolené metody pro HPLC analýzu vodného roztoku diltiazemu.

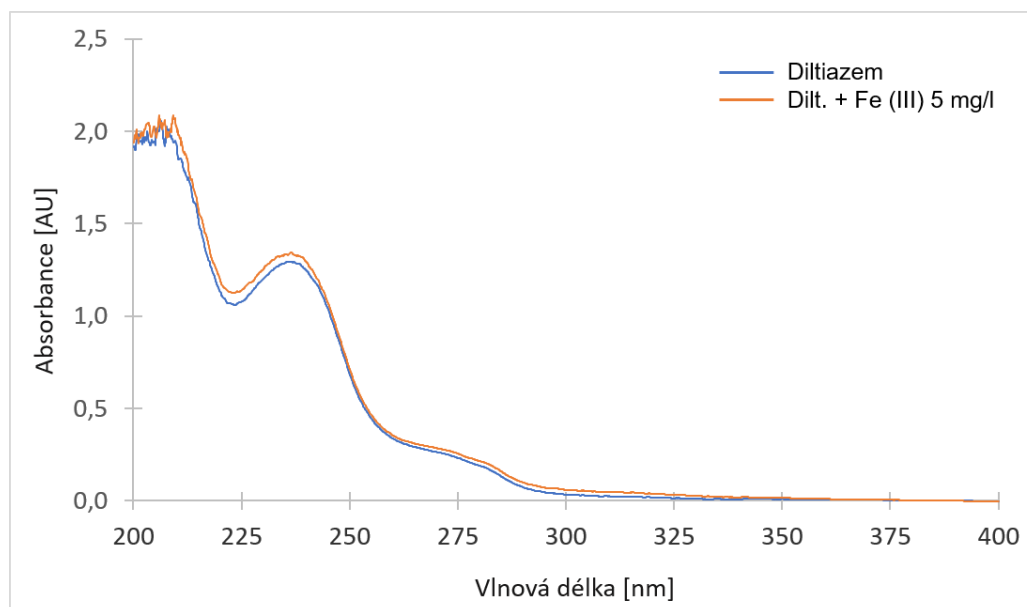
Název parametru	Parametr
Kolona	ARION PLUS C18 (150 × 3 mm; 5 μm)
Teplota kolonového prostoru	30 °C
MFA	10 mM roztok octanu amonného
MFB	100% methanol
poměr MFA/MFB	35/65 (v/v)
Průtok MF	1 ml/min
Objem nástřiku	20 μl
Vlnová délka detekce	240 nm

4.2 Fotochemická degradace diltiazemu

Pro fotochemickou degradaci diltiazemu byly zvoleny světelné podmínky relevantní přírodním podmínkám, kterým jsou vystaveny povrchové přírodní vody. Na zemský povrch dopadá hlavně infračervené a viditelné sluneční záření, ultrafialové záření tvoří jen cca 8 % celkového slunečního záření (Fondriest, 2014). Z fotochemického hlediska je nejdůležitější záření o vysokých energiích (tedy krátkých vlnových délkách), na zemský povrch se ale

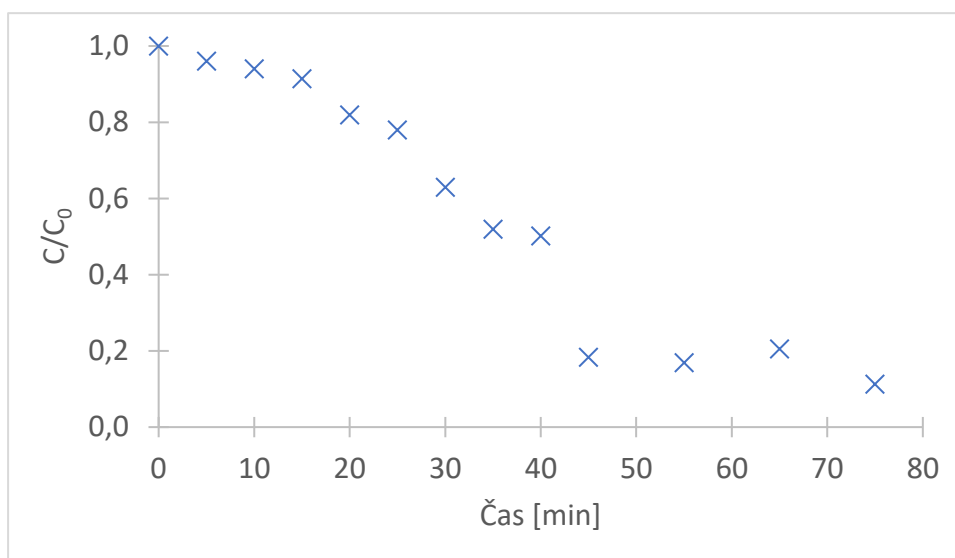
dostane z krátkovlnného záření pouze UV-B záření, tedy záření o vlnové délce nad 280 nm (Fondriest, 2014), kratší vlnové délky jsou pohlceny atmosférickým ozónem. Proto byla k ozařování použita jen část oblasti vyzařované lampami fotochemického reaktoru v rozmezí 300–350 nm (ozařování v kyvetách z optického skla uzavřených víčkem).

Z absorpčního spektra, zobrazeného na Obr. 3, je patrné, že samotný diltiazem má v UV oblasti několik absorpčních maxim, ovšem v oblasti nad 300 nm absorbuje minimálně. V přírodních vodách se vyskytují ionty kovů. Z katalyticky aktivních je nejhojnějším kovem železo, které se vyskytuje v povrchových vodách až do koncentrací jednotek mg/l (Dojlido & Best, 1993) a často tvoří s organickými substráty komplexy. Absorpční spektrum diltiazemu s přidavkem železitých iontů (5 mg/l) je jen nepatrně vyšší než spektrum pro samotný diltiazem (Obr. 3).



Obr. 3: Absorpční spektrum vodného roztoku diltiazemu o koncentraci 50 mg/l a absorpční spektrum téhož roztoku s přidavkem železitých iontů (5 mg/l).

Při ozařování vodného roztoku samotného diltiazemu nedošlo k úbytku diltiazemu ani po 60 minutách, diltiazem se neodbourával. Proto bylo ozařování provedeno s roztokem diltiazemu s přidávanými železitými ionty o koncentraci 5 mg/l. V tomto případě se diltiazem odbourával. Průběh odbourávání je zobrazen na Obr. 4.



Obr. 4: Průběh fotochemické degradace roztoku diltiazemu (50 mg/l) s přidáním železitými ionty (5 mg/l).

Z Obr. 4 je vidět, že v prvních 15 minutách je odbourávání pomalé (pokles koncentrace diltiazemu na 90 % původní hodnoty), pak se odbourávání zrychluje, nejrychlejší je mezi 30. a 45. minutou, poté dojde prakticky k zastavení reakce na hodnotě 20 % původního množství diltiazemu.

Železité ionty v reakční směsi mohou být fotochemicky redukovány (za přítomnosti organických látek jako donoru elektronu), čímž se tvoří katalyticky aktivní redukováná forma, tedy Fe^{2+} ionty (Klementová, 2018). Za pomalý začátek fotochemického odbourávání diltiazemu s přidáním železitými ionty by mohla být zodpovědná pomalá fotoredukce železitých iontů. Proto byla testována rychlost fotochemické redukce železitých iontů v dané reakční směsi. Výsledky jsou uvedeny v Tab. II.

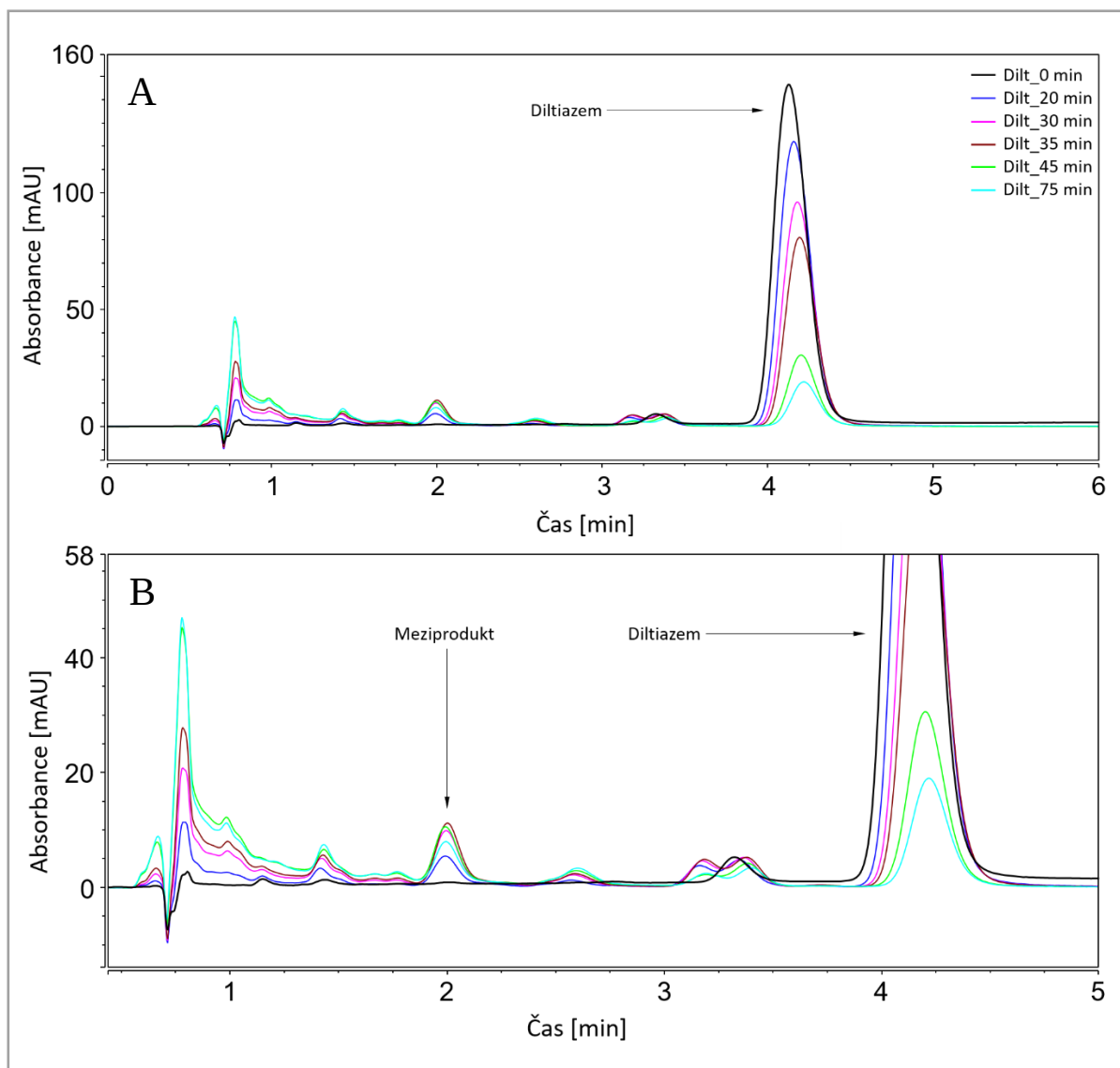
Tab. II: Rychlost fotoredukce železitých iontů v roztoku diltiazemu.

Doba ozařování (min)	Množství Fe^{2+} iontů (% z celkového přidaného Fe)
1	11
3	13,5
5	13,8

Z Tab. II je vidět, že již v první minutě dojde k redukci cca 1/10 přidaného železa a toto množství se s dalším ozařováním příliš nemění, rovnovážná koncentrace je necelých 14 % z celkového přidaného množství. Za dlouhou prodlevu na počátku fotochemické degradace diltiazemu tedy není zodpovědná pomalá redukce železa. Možným vysvětlením může být autokatalýza či fotosenzitizace produktem fotodegradace, která je zmiňována např. u degradace antiarytmika verapamilu (Klementová et al., 2017).

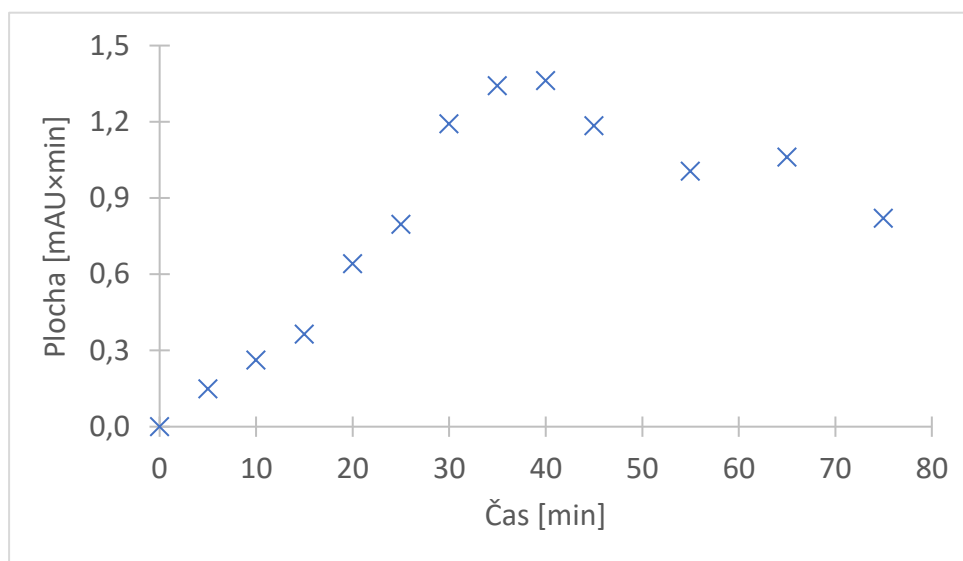
Důvod pro zastavení reakce po 45 minutách ozařování na 20 % zbývajících množství diltiazemu není jasný, jednou možností je vznik produktu se silnou absorpcí o vlnových délkách nad 300 nm, a tedy následným vnitřním stíněním.

Chromatogramy reakční směsi diltiazemu v průběhu ozařování jsou znázorněny na Obr. 5.



Obr. 5: Chromatogramy reakční směsi diltiazem + Fe(III) v jednotlivých ozařovacích časech, A – celkový chromatogram, B – zvýrazněné produkty degradace.

Z Obr. 5 je vidět, že při odbourávání diltiazemu vzniká několik produktů. Jako „Meziprodukt“ je označen pík, k jehož eluci dochází přibližně ve 2. minutě – jeho podíl ve vzorku v průběhu ozařování roste, až dosáhne maxima v čase ozařování 40 minut, a při delším ozařování klesá. Kinetiku tvorby meziproduktu zobrazuje Obr. 6.



Obr. 6: Průběh množství meziproduktu (eluční čas 2,1 min) v závislosti na době ozařování.

U ostatních produktů viditelných při UV detekci nebyl jejich průběh v závislosti na době ozařování vyhodnocován, protože jejich píky jsou velmi malé a často se překrývají.

Analýza chemické struktury nebyla součástí této práce, nelze tedy říci, zda odpovídají produktům uváděným v pracích autorů Andrisano et al. (2001), Chatpalliwar et al. (2012), Sadeghi et al. (2013) a Zhu et al. (2015).

5 Závěr

V průběhu experimentální části předložené bakalářské práce byla zavedena analytická metoda pro HPLC stanovení diltiazemu.

Fotochemická degradace ukázala, že samotný diltiazem se ani po 60 minutách ozařování neodbourává. S přidanými železitými ionty k odbourávání dochází, a to tak, že diltiazem ze začátku degraduje pomaleji, přibližně kolem 30. minuty dochází ke zrychlení a odbourávání diltiazemu se po 45 minutách ozařování téměř zastavuje na 20 % původního obsahu látky.

Při fotoredukci železitých iontů v roztoku diltiazemu je koncentrace ustáleného stavu necelých 14 % přidaných železitých iontů, dosaženo již po 3 minutách, příčinou pomalé degradace na počátku ozařování tedy není malá rychlost tvorby redukované formy katalyzátoru.

Bylo zjištěno, že při odbourávání diltiazemu vniká několik degradačních produktů, přičemž byl rozpoznán i jeden meziprodukt.

6 Seznam použité literatury

Allouche, M., Ishak, S., ben Ali, M., Hedfi, A., Almalki, M., Karachle, P. K., Harrath, A. H., Abu-Zied, R. H., Badraoui, R., & Boufahja, F. (2022). Molecular interactions of polyvinyl chloride microplastics and beta-blockers (Diltiazem and Bisoprolol) and their effects on marine meiofauna: Combined in vivo and modeling study. *Journal of Hazardous Materials*, 431, 128609. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128609> [14.8.2022].

Andrisano, V., Hrelia, P., Gotti, R., Leoni, A., & Cavrini, V. (2001). Photostability and phototoxicity studies on diltiazem. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25, 589–597. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00588-4](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00588-4) [9.2.2022].

Batt, A. L., Kincaid, T. M., Kostich, M. S., Lazorchak, J. M., & Olsen, A. R. (2016). Evaluating the extent of pharmaceuticals in surface waters of the United States using a National-scale Rivers and Streams Assessment survey. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4), 874–881. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/etc.3161> [2.8.2022].

Buckley, M. M.-T., Grant, S. M., Goa, K. L., McTavish, D., & Sorkin, E. M. (1990). Diltiazem. *Drugs*, 39(5), 757–806. Dostupné z: <https://doi.org/10.2165/00003495-199039050-00009> [19.8.2022].

de Barros, A. L. C., Schmidt, F. F., de Aquino, S. F., & Afonso, R. J. de C. F. (2018). Determination of nine pharmaceutical active compounds in surface waters from Paraopeba River Basin in Brazil by LTPE-HPLC-ESI-MS/MS. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(20), 19962–19974. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2123-y> [2.8.2022].

Dojlido, J., & Best, G. A. (1993). Elements of group VII – Iron. In *Chemistry of water and water pollution*. Ellis Horwood Limited, Bodmin (UK). ISBN 978-0138789190.

Fondriest Environmental, Inc. (2014). Solar Radiation and Photosynthetically Active Radiation. *Fundamentals of Environmental Measurements*. 21 Mar. 2014. Web. Dostupné z: <https://www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/weather/photosynthetically-active-radiation/> [10.11.2022].

García, M. A., Soláns, C., Aramayona, J. J., Fraile, L. J., Bregante, M. A., & Castillo, J. R. (1998). A common method for the determination of several calcium channel blockers using an HPLC system with ultraviolet detection. *Talanta*, 47, 1245–1254. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(98\)00210-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(98)00210-0) [11.10.2022].

Guan, X. feng, Li, D. yang, Yin, W. jun, Ding, J. jie, Zhou, L. yun, Wang, J. lin, Ma, R. R., & Zuo, X. cong. (2018). Population Pharmacokinetic Modeling of Diltiazem in Chinese Renal Transplant Recipients. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 43(1), 55–62. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13318-017-0425-y> [4.8.2022].

Hermann, P., Rodger, S. D., Remones, G., Thenou, J. P., London, D. R., & Morselli, P. L. (1983). Pharmacokinetics of Diltiazem After Intravenous and Oral Administration. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 24, 349–352. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF00610053> [4.8.2022].

Chatpalliwar, V. A., Porwal, P. K., & Upmanyu, N. (2012). Validated gradient stability indicating HPLC method for determining Diltiazem Hydrochloride and related substances in bulk drug and novel tablet formulation. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2(3), 226–237. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2012.01.003> [9.2.2022].

Christensen, H., Carlson, E., Asberg, A., Schram, L., & Berg, K. J. (1999). A simple and sensitive high-performance liquid chromatography assay of diltiazem and main metabolites in renal transplanted patients. *Clinica Chimica Acta*, 283, 63–75. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(99\)00042-x](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(99)00042-x) [9.2.2022].

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., & Guwy, A. J. (2008). The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research*, 42(13), 3498–3518. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.04.026> [14.8.2022].

Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P. G., & Park, J. (2007). Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their

potential ecological risks in Korea. *Environment International*, 33(3), 370–375. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.11.017> [9.2.2022].

Klementova, S. (2018): Photochemical Degradation of Organic Xenobiotics in Natural Waters. *Photochemistry and Photophysics – Fundamentals to Applications*. Eds: Satyen Saha & Sankalan Mondal, IntechOpen. ISBN 978-1-78923-784-9. Dostupné z: <http://mts.intechopen.com/articles/show/title/photochemical-degradation-of-organic-xenobiotics-in-natural-waters> [21.11.2022].

Klementova, S., Kahoun, D., Doubkova, L., Frejlichova, K., Dusakova, M., & Zlamal, M. (2017): Catalytic photodegradation of pharmaceuticals – homogeneous and heterogeneous photocatalysis. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 16(1), 67–71. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/c6pp00164e> [1.12.2022].

Komesli, O. T., Muz, M., Ak, M. S., Bakirdere, S., & Gokcay, C. F. (2015). Occurrence, fate and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in Turkish wastewater treatment plants. *Chemical Engineering Journal*, 277, 202–208. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.04.115> [9.2.2022].

Lee, Y. H., Lee, M. H. & Shim, Ch. K. (1991). Pharmacokinetics of diltiazem and deacetyldiltiazem in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 76, 71–76. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(91\)90345-O](https://doi.org/10.1016/0378-5173(91)90345-O) [4.8.2022].

Lefebvre, M., Homsy, W., Caillé, G., & du Souich, P. (1996). First-pass metabolism of diltiazem in anesthetized rabbits: Role of extrahepatic organs. *Pharmaceutical Research* 13, 124–128. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/A:1016097805003> [19.8.2022].

Li, K., Zhang, X., Zhao, F. (2003). HPLC determination of diltiazem in human plasma and its application to pharmacokinetics in humans. *Biomedical Chromatography*, 17(8), 522–525. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bmc.270> [10.8.2022].

Malaya, L. T., Brovkovich, V. M., & Andrievskii, G. V. (1990). Analysis of diltiazem and its metabolites by HPLC and mass spectrometry, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 24(8), 535–537. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF00766467> [1.12.2022].

Mircioiu, C., Anuta, V., Mircioiu, I., Nicolescu, A., & Fotaki, N. (2019). In vitro–in vivo correlations based on in vitro dissolution of parent drug diltiazem and pharmacokinetics of its metabolite. *Pharmaceutics*, 11(7), 344–358. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070344> [4.8.2022].

Naz, S., Sultana, N., Arayne, M. S., & Shafi, N. (2010). Simultaneous determination of prazosin and calcium channel blockers in raw materials, pharmaceutical formulations and human serum by RP-HPLC. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 2(9), 6–10. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/52005458_Simultaneous_Determination_of_Prazosine_and_Calcium_Channel_Blockers_in_Raw_Materials_Pharmaceutical_Formulations_and_Human_Serum_by_RP-HPLC [4.10.2022].

Nováková, L., Douša, M., & Česla, P. (2021). Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek. ISBN 978-80-270-8559-0.

PubChem. (2022): Diltiazem. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/39186> [3.8.2022].

Quaglia, M. G., Donati, E., Fanali, S., Bossù, E., Montinaro, A., & Buiarelli, F. (2005). Analysis of diltiazem and its related substances by HPLC and HPLC/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37(4), 695–701. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.11.050> [9.2.2022].

Ros, N., Lomba, L., Pilar Ribate, M., Zuriaga, E., B. García, C., & Giner, B. (2018). Acute lethal and sublethal effects of diltiazem and doxepin for four aquatic environmental bioindicators covering the trophic chain. *AIMS Environmental Science*, 5(4), 229–243. Dostupné z: <https://doi.org/10.3934/environsci.2018.4.229> [2.8.2022].

Sadeghi, F., Navidpour, L., Bayat, S., & Afshar, M. (2013). Validation and uncertainty estimation of an ecofriendly and stability-indicating HPLC method for determination of

diltiazem in pharmaceutical preparations. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2013, 1–10. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2013/353814> [24.8.2022].

Scott, W. C., Du, B., Haddad, S. P., Breed, C. S., Saari, G. N., Kelly, M., Broach, L., Chambliss, C. K., & Brooks, B. W. (2016). Predicted and observed therapeutic dose exceedances of ionizable pharmaceuticals in fish plasma from urban coastal systems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4), 983–995. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/etc.3236> [14.8.2022].

Shafi, N., Siddiqui, F. A., Naseem, H., Sher, N., Zubair, A., Hussain, A., Sial, A. A., & Baig, M. T. (2013). An overview of analytical determination of diltiazem, cimetidine, ranitidine, and famotidine by UV spectrophotometry and HPLC technique. *Journal of Chemistry*, 2013, 1–16. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2013/184948> [9.2.2022].

Steinbach, C., Burkina, V., Schmidt-Posthaus, H., Stara, A., Kolarova, J., Velisek, J., Randak, T., & Kroupova, H. K. (2016). Effect of the human therapeutic drug diltiazem on the haematological parameters, histology and selected enzymatic activities of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Chemosphere*, 157, 57–64. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.137> [16.8.2022].

Steinkey, D., Lari, E., Woodman, S. G., Steinkey, R., Luong, K. H., Wong, C. S., & Pyle, G. G. (2019). The effects of diltiazem on growth, reproduction, energy reserves, and calcium-dependent physiology in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 232, 424–429. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.176> [2.8.2022].

Sultana, N., Arayne, M. S., & Shafi, N. (2010). In vitro interaction studies of diltiazem with H₂ receptor antagonists. *Medicinal Chemistry Research*, 19(7), 698–716. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00044-009-9224-6> [9.2.2022].

Zhao, H., & Chow, M. S. S. (1989). Analysis of diltiazem and deacetyldiltiazem in plasma using modified high-performance liquid chromatography: improved sensitivity and reproducibility. *Pharmaceutical Research*, 6(5), 428–430. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/a:1015943801775> [20.11.2022].

Zhou, S., Ko, T. P., Huang, J. W., Liu, W., Zheng, Y., Wu, S., Wang, Q., Xie, Z., Liu, Z., Chen, C. C., Guo, R. T. (2020). Structure of a gut microbial diltiazem-metabolizing enzyme suggests possible substrate binding mode. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 527(3), 799–804. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.04.116> [4.8.2022].

Zhu, B., Zonja, B., Gonzalez, O., Sans, C., Pérez, S., Barceló, D., Esplugas, S., Xu, K., & Qiang, Z. (2015). Degradation kinetics and pathways of three calcium channel blockers under UV irradiation. *Water Research*, 86, 9–16. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.028> [23.8.2022].