UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2025 Michal Haška

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra analytické chemie

Elektrochemické chování syntetických barviv ve farmaceutických přípravcích

Bakalářská práce

AUTOR PRÁCE: Michal Haška
VEDOUCÍ PRÁCE: Ing. Milan Sýs, Ph.D.
(2025)

Univerzity of Pardubice
Faculty of chemical technology
Department of analytical chemistry

Electrochemical behaviour of synthetic colorants in pharmaceutical preparations

Bachelor thesis

AUTHOR: Michal Haška
SUPERVISOR: Ing. Milan Sýs, Ph.D.

(2025)

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Michal Haška**
Osobní číslo:	**C22427**
Studijní program:	**B0531A130012 Farmakochemie a medicinální materiály**
Téma práce:	**Elektrochemické chování syntetických barviv ve farmaceutických přípravcích**
Zadávající katedra:	**Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. Z vědeckých publikací vypracujte literární rešerši týkající se přítomnosti syntetických barviv v léčivech. Zaměřte se především na zdravotní rizika vyplývající z dlouhodobého používání takovýchto léků. Pokuste se stručně popsat syntézu těchto aditivních látek a uveďte stručný přehled nejmodernějších elektroanalytických přístupů vyvinutých pro jejich monitorování ve farmaceutických vzorcích.

2. Pomocí cyklické voltametrie objasněte elektrochemické chování vybraných organických barviv na heterogenních uhlíkových elektrodách ve vodném prostředí. Navrhněte jednoduchou voltametrickou screeningovou metodu pro konkrétní barvivo, která by mohla nalézt své uplatnění ve farmaceutické analýze.

3. Výsledky zpracujte formou závěrečné práce v souladu se Směrnicí UPCE č. 7/2019 "Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací" v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy: **dle potřeby**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Milan Sýs, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce: **doc. Ing. Martin Adam, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2025**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2025**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Elektrochemické chování syntetických barviv ve farmaceutických přípravcích jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 06. 2025

Michal Haška

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Milanovi Sýsovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady při provádění praktických experimentů a trpělivost při konzultacích teoretické části této bakalářské práce.

Děkuji!

ANOTACE

Cílem této bakalářské práce bylo popsat elektrochemické chování syntetických barviv, které se doposud používají jako aditiva v léčivech. Jako vhodný analytický nástroj pro studium vybraných organických barviv byla zvolena cyklická voltametrie na heterogenních uhlíkových elektrodách ve vodném prostředí. Získané poznatky by mohly vést k vývoji voltametrických metod využívající buď katodickou redukci nebo anodickou oxidaci přítomných barviv.

KLÍČOVÁ SLOVA

Organická barviva, léčiva, uhlíková pastová elektroda, cyklická voltametrie.

ANNOTATION

The aim of this bachelor's thesis was to describe the electrochemical behaviour of synthetic dyes, which are currently used as additives in pharmaceutical preparations. Cyclic voltammetry at heterogeneous carbon electrodes in aqueous medium was chosen as a suitable analytical tool for this study of selected organic dyes. The obtained knowledge could lead to develop different voltammetric methods employing either cathodic reduction or anodic oxidation of the dyes present.

KEYWORDS

Organic dyes, pharmaceuticals, carbon paste electrode, cyclic voltammetry.

OBSAH

ÚVOD 14

TEORETICKÁ ČÁST 15

1 Organická barviva v léčivech 15

1.1 Klasifikace organických barviv v léčivech 19

1.2 Přírodní organická barviva v léčivech 19

1.2.1 Syntetická organická barviva 20

1.2.1.1 Azobarviva 23

2 Zdravotní rizika způsobená příjmem organických barviv 25

2.1 Metabolismus organických barviv 25

2.2 Onemocnění vyvolané organickými barvivy 26

3 Analýza organických barviv ve farmacii 28

3.1 Elektroanalýza organických barviv v léčivech 29

3.2 Elektrochemické chování vybraných organických barviv 30

3.2.1 Elektrochemické stanovení Allura red AC 31

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 32

4 Popis laboratorní práce 32

4.1 Použité chemikálie 32

4.2 Přístrojové vybavení 32

4.2.1 Obnovování povrchu elektrody ze skelného uhlíku 33

4.2.2 Příprava uhlíkové pastové elektrody 33

4.2.3 Příprava vzorku 33

4.3 Metodika 34

5 Výsledky a diskuse 35

5.1 Oxidační a redukční dráhy azobarviv 36

5.1.1 Katodické redukční dráhy azobarviv 36

5.1.2 Anodické oxidační dráhy azobarviv 37

5.1.3 Square wave voltametrie azobarviv 40

5.1.4 Elektrochemická detekce Sunset Yellow FCF ve vzorku léčiva 42

6 Závěr 43
Literatura 44
Přílohy 50

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1. Molekuly bisdemethoxykurkuminu a demethoxykurkuminu [19]. 19
Obrázek 2. Reakční schéma vzorové syntézy azobarviv. 24
Obrázek 3. Enzymatická redukce azobarviv. 26
Obrázek 4. Molekula tartrazinu (E 102). 27
Obrázek 5. Balení léku Orasept. 34
Obrázek 6. Struktury zkoumaných azobarviv se zvýrazněnými redukčními centry. 36
Obrázek 7. Opakující se cyklické voltamogramy 1 mmol·l^{-1} (a), AR (b) SY (c), BB (d), CB (e), Tartrazinu a R2G (f) pořízených na GCE v 0.1 mol·l^{-1} fosfátovém pufru (pH 7) při potenciálovém kroku 5 mV a rychlosti skenování 50 mV·s^{-1}. 38
Obrázek 8. Předpokládané oxidační a redukční procesy azobarviv 39
Obrázek 9. Square wave voltamogramy 1 mmol·l^{-1} (a), AR (b) SY (c), BB (d), CB (e), Tartrazinu a R2G (f) pořízených na GCE (černá) a CPE (oranžová křivka) v 0.1 mol·l^{-1} fosfátovém pufru (pH 7) při potenciálovém kroku 5 mV, potenciálové amplitudě 25 mV a frekvenci 10 Hz. 41
Obrázek 10. Square wave voltamogramy vzorku léčiva (modrá) a s následným přidáním 100 µl standardu o koncentraci 0,01 mol·l^{-1} (červená křivka) v 0.1 mol·l^{-1} fosfátovém pufru (pH 7) při potenciálovém kroku 5 mV, potenciálové amplitudě 25 mV a frekvenci 10 Hz. 42

Tabulka 1. Seznam povolených barviv v léčivech. 17
Tabulka 2. Rozdělení syntetických barviv podle chromogenů. 22
Tabulka 3. Přehled vybraných barviv používaných ve farmacii a jejich zdravotní rizika [3]. 28

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

API	Aktivní farmaceutická složka
ADHD	Porucha pozornosti s hyperaktivitou
ADI	Přijatelný denní příjem
ANO	Deriváty 2-amino-1-naftolu
AR	Červená alura
BB	Briliantní čerň BN
BRB	Britton–Robinsonův pufr
CA	Potravinový kodex
CB	Čokoládová hnědá HT
CCFAC	Kodexový výbor pro kontaminanty v potravinách
CI	Barevný index
CPE	Uhlíková pastová elektroda
CV	Cyklická voltametrie
ČOV	Čističky odpadních vod
DPV	Diferenční pulzní voltametrie
ESFA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství Spojených národů
GCE	Elektroda ze skelného uhlíku
GE	Grafitová elektroda
GSFA	Obecné normy pro potravinářské přídatné látky
HLPC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
INO	Deriváty 1,2-naftochinoniminu
INS	Mezinárodní číslovací systém
LC	Kapalinová chromatografie
LC/DAD	Kapalinová chromatografie s diodovou detekcí
LC/MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
OEEHA	Kancelář pro hodnocení zdravotních rizik životního prostředí státu Kalifornie
R2G	Červená 2G
SPCE	Uhlíková tištěné elektrody
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
SWV	Voltametrie se čtvercovým napětím

SY	Žluť SY
UV-VIS	Spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti
WHO	Světová zdravotnická organizace

ÚVOD

Bakalářská práce se zaměřuje na zkoumání elektrochemického chování šesti běžně používaných azobarviv, z nichž čtyři obsahují jednu azo skupinu (Allura Red AC, Red 2G, Sunset Yellow FCF, Tartrazin) a další barviva dvě azo skupiny (Brilliant Black BN a Chocolate Brown HT) pomocí cyklické voltametrie na elektrodě ze skelného uhlíku ve fyziologickém prostředí fosfátového pufru. Hlavním cílem bylo navrhnout mechanismy jejich elektrochemické přeměny, a tím i předpovědět pravděpodobné produkty těchto reakcí.

Tato vědecká práce se skládá ze dvou základních částí, přičemž prví část se věnuje dosavadním znalostem v oblasti používání azobarviv ve farmacii a s tím spojenou legislativou, která respektuje jejich používání v potravinách. Velká část je věnována popisu metabolismu azobarviv s ohledem na potenciální zdravotní rizika, které představují především jejich metabolity vzniklé přirozenou střevní mikroflórou.

Za to druhá část se zabývá oxidačními a redukčními procesy azobarviv, přičemž odpovídající reakce jsou zkoumány pomocí cyklické voltametrie na komerční diskové elektrodě ze skelného uhlíku. Z naměřených dat vyplývá, že azobarviva představují vysoce elektrochemicky aktivní látky podléhající jak anodické oxidaci, tak i katodické redukci, přičemž vzniklé produkty mohou dále podléhat ať už chemickým tak i elektrochemickým reakcím. Doplňková square wave voltametrie pro ověření schopnosti elektrochemické detekce velmi malého množství azobarviva Sunset Yellow FCF v reálném farmaceutické výrobku Orasept určeného k úlevě od bolesti v krku ukázala na možné použití elektrochemického přístupu v monitorování těchto aditiv v léčivech.

Výsledky této práce by mohly nalézt své uplatnění v predikci možných metabolitů azobarviv. Tato znalost může hrál klíčovou rolu i při vývoji analogických aditiv. Zároveň byly ověřeny detekční schopnosti elektrody ze skelného uhlíku a uhlíkové pastové elektrody. Každá z těchto elektrod se vyznačovala svými výhodami, tak i nevýhodami. Z tohoto důvodu lze předpokládat, že pro každé azobarvivo se musí vyvinout originální elektrochemickou metodu.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Organická barviva v léčivech

Farmaceutický průmysl využívá jak přírodní, tak i syntetická barviva v menším množství než potravinářství a kosmetika, ale jejich použití je i zde klíčové [1]. Historicky se vnímal barevný vzhled léčiv jako symbol jejich účinku. Do poloviny 19. století pocházela barviva používaná v kosmetice, léčivech a potravinách z přírodních zdrojů. Objev Mauveinu, prvního syntetického barviva, Williamem Perkinem v roce 1856 však znamenal zásadní milník, který urychlil rozvoj chemického průmyslu a zavedl syntetická barviva jako důležitou součást potravin a léčiv [2].

Přírodní barviva představují látky s rozličnými chemickými strukturami a fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které se získávají z různých částí rostlin, stromů nebo živočišných tkání prostřednictvím extrakce. Mohou pocházet z částí, jako jsou listy, květy, kořeny, kůra či plody, nebo také z produktů živočišného původu, např. schránky bezobratlých organismů. Využívají se v oblastech, jako je farmacie, potravinářství a textilní výroba, kde slouží k dodání požadovaných barevných odstínů [3]. Mezi jedno z nejčastěji proklamovaných důvodu barvení léčiv patří jejich snadné rozpoznání, jak samostatného léku, tak i jeho dávkování. Tento fakt pravděpodobně výrazně snižuje riziko předávkování. Vzhledem k procesu výroby se mohou výsledné léky, šarže od šarže, zdát vzhledově mírně odlišné, což není žádoucí, i proto našla barviva uplatnění ve farmaceutickém průmyslu [4, 5]. Po obarvení vypadají léky různých šarží zcela identicky a působí tak lépe na pacienta, tedy na cílového zákazníka. Odlišný vzhled jednotlivých lékových forem by v něm mohl totiž vzbudit nedůvěru v léčebné účinky. V současné době se považuje za hlavní marketingový důvod barvení lékových forem pouze estetický vzhled, protože barva se často spojuje se značkou výrobce nebo typem léku.

Mezi další vlastnosti organických barviv se řadí jejich používání jako takzvané farmaceutické excipienty neboli farmaceutické pomocné látky. Farmaceutická pomocná látka představuje látku nebo skupinu látek, které zabezpečují správný objem a homogenní distribuci obsahu a zároveň fungují jako nosič aktivní farmaceutické složky (API) v přípravku [6]. Sloučeniny založené na syntetických organických barvivech se dlouhodobě považují za klíčové nástroje pro diagnostiku a léčbu rakoviny, což je oblast medicíny známá jako teranostika [7]. Zde si musí každý uvědomit skutečnost, že barviva používaná ve farmaceutickém průmyslu jsou identická s těmi, které se využívají v potravinářství. Obě skupiny látek procházejí přísným hodnocením, aby se zajistila zdravotní nezávadnost finálního produktu [8].

Již v roce 1962 vznikla mezinárodní iniciativa Codex Alimentarius (CA), kterou založily Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) a Světová zdravotnická organizace

(WHO). Jejím cílem se stalo zavedení globálních standardů pro potraviny. Součást této iniciativy zahrnuje rovněž Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC), tedy výbor zaměřený na přídatné látky a kontaminanty, který vydává doporučení pro jejich použití. Codex Alimentarius spolu s organizacemi WHO/FAO vytvořil všeobecnou normu General Standards on Food Additives (GSFA), která sjednocuje pravidla pro potravinářská aditiva v rámci mezinárodního obchodu.

V rámci Evropské unie musí být všechny přídatné látky nejprve přezkoumány Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA), který funguje pod záštitou Evropské komise. Opatření Codexu Alimentarius týkající se značení potravin vedlo k potřebě jednotného označování potravinářských aditiv. Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC) proto vyvinul Mezinárodní číslovací systém (International Numbering System, INS), který umožňuje identifikaci těchto látek pomocí číselného kódu. Tento systém nahrazuje složité chemické názvy aditiv, čímž usnadňuje jejich evidenci a používání. V Evropské unii se pro označování přídatných látek používá E-kód, což je kombinace písmene E a trojmístného čísla. Barviva s tímto označením prošla důkladným hodnocením a jejich zdravotní nezávadnost se potvrdila klinickými studiemi [8]. Maximální použitelné množství každého barviva označovaného E-kódem se odvíjí od konkrétního typu potraviny i léčiva (Tab. 1).

Z legislativního hlediska EU se musí veškerá barviva přidávaná do léčivých přípravků řídit stejnými pravidly jako barviva přidávaná do potravin. Směrnice Evropského parlamentu a Rady 94/36ES již v roce 1994 vytvořila jednotný seznam povolených barviv pro použití v potravinách [9]. Čistotu přidávaných barviv upravovala směrnice 95/45/EHS. Tato směrnice také upravovala metody pro stanovování čistoty těchto látek, nicméně pozbyla platnosti 29. 1. 2009 [10]. V současné době platí nařízení (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách“, pod které spadají i léčiva [11]. V tabulce níže jsou uvedená všechna v současnosti povolená barviva (potravinářské přídatné látky) v EU.

Tabulka 1. Seznam povolených barviv v léčivech.

E číslo	Název	Barva	Identifikační číslo CI	ADI (mg/kg)	Reference
E 100	Kurkumin	Žlutá/ oranžová	75300	0–3	[12–15]
E 101	Riboflavin	Žlutá/ oranžová	–	Nespecifikováno	[12–15]
E 102	Tartrazin	Žlutá/ oranžová	19140	0–10	[12–15]
E 104	Chinolinová žluť	Zelenožlutá	47005	0–3	[12–15]
E 110	Žluť SY	Žlutá	15985	0–4	[12–15]
E 120	Kyselina karmínová, karmín	Červená	75470	Nepřiřazeno	[12–15]
E 122	Azorubin, Carmoisin	Červená/ fialová	14720	0–4	[12–15]
E 123	Amarant	Červená	16185	0–0.5	[12–15]
E 124	Ponceau 4R (Košenilová červeň A)	Červená	16255	0–4	[12–15]
E 127	Erythrosin	Červená	45430	0–0.1	[12–15]
E 129	Allura Red AC / Červeň AC	–	16035	0–7	[12–15]
E 131	Patentní modř V	Modrá	42051	Nepřiřazeno	[12–15]
E 132	Indigotin (Indigocarmine)	Modrá	73015	0–5	[12–15]
E 133	Brilantní modř FCF	Modrá	42090	0–6	[12–15]
E 140	Chlorofyly a Chlorofyliny	Zelená	75810	Bez limitu	[12–15]
E 141	Měďnaté komplexy chlorofylů	–	75815	0–15	[12–15]
E 142	Zeleň S	Zelená	44090	Nepřiřazeno	[12–15]
E 150a	Karamel	Hnědá	–	Nespecifikováno	[12–15]
E 150b	Kaustický sulfitový karamel	–	–	0–160	[12–15]
E 150c	Amoniakový karamel	–	–	0–200	[12–15]
E 150d	Amoniak-sulfitový karamel	–	–	0–150	[12–15]
E 151	Brilantní čerň BN	Černá	28440	0–1	[12–15]
E 153	Rostlinná uhlíková čerň	Černá	–	Nepřiřazeno	[12–15]
E 155	Hněď HT	Hnědá	20285	0–1.5	[12–15]
E 160a	Karoteny	Žlutá až červená	–	Nespecifikováno	[12–15]

E 160b	Annatto (bixin, norbixin)	Oranžová	75120	Odvoláno	[12–15]
E 160c	Paprikový extrakt	Červená	—	01.5	[12–15]
E 160d	Lykopen	Červená	75125	Nespecifikováno	[12–15]
E 160e	β-apo-8′-karotenal (C30)	Oranžová/ červená	40820	00.3	[12–15]
E 161b	Lutein	Žlutá/ oranžová	—	Nepřiřazeno	[12–15]
E 161g	Kanthaxanthin	Oranžová/ načervenalá	—	0–0.03	[12–15]
E 162	Betanin (Betalainová červeň)	Červená/ fialová	—	Nespecifikováno	[12–15]
E 163	Anthokyany	Červená až modrá	—	Nepřiřazeno	[12–15]
E 170	Uhličitan vápenatý	—	77220	Bez limitu	[12–15]
E 171	Oxid titaničitý	—	77891	Bez limitu	[12–15]
E 172	Oxidy a hydroxidy železa	—	77491	0–0.5	[12–15]
E 172		—	77492	—	[12–15]
E 172		—	77499	—	[12–15]
E 173	Hliník	Stříbrná/ šedá	—	Nepřiřazeno	[12–15]
E 174	Stříbro	Stříbrná	—	Rozhodnutí pozdrženo	[12–15]
E 175	Zlato	Zlatá	—	—	[12–15]
E 180	Litholrubin BK	Červená	—	Nepřiřazeno	[12–15]

Poznámky: ADI – přijatelný denní příjem (mg/kg) – Nejvyšší denní dávka chemické látky, kterou lze po celý život přijímat, aniž by to mělo negativní dopad na zdraví [16].

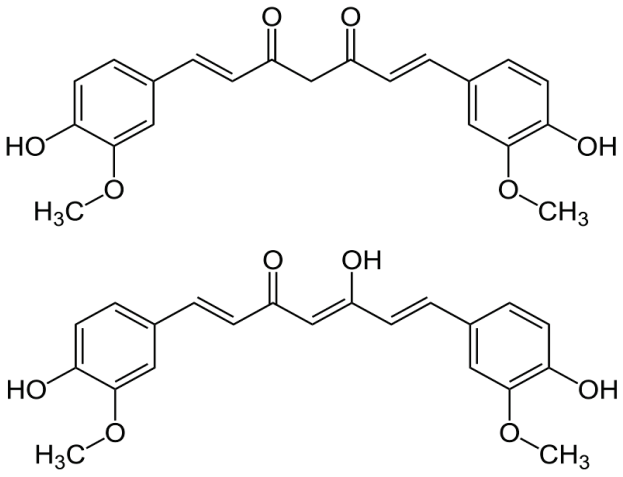
1.1 Klasifikace organických barviv v léčivech

Barviva se mohou klasifikovat podle jejich chemické struktury, způsobu použití nebo metody aplikace. Tato klasifikace umožňuje zohlednit strukturu a bezpečnost barviv, ačkoliv může vést k zjednodušujícím a někdy zavádějícím závěrům. V chemické klasifikaci se barviva třídí na základě společných chemických strukturálních rysů, tzv. chromoforů. Následující text se zaměřuje pouze na barviva, která se používají v potravinách, léčivech a kosmetice. Tato barviva patří do různých chemických skupin, jako jsou azobarviva, karotenoidní barviva, indigoidní barviva, kinoftalony, triarylmethanová barviva a xanthénová barviva [2].

1.2 Přírodní organická barviva v léčivech

Využívání přírodních produktů pro jejich léčivé účinky sahá až do počátků lidské civilizace. Po staletí se léky připravovaly z minerálů, z pletiv rostlin a živočišných tkání či jejich sekretů. I když převážná většina přírodních organických barviv pochází z rostlin anebo aspoň jejich částí jako je třeba kůra, květy nebo kořeny. Najdeme zde i barviva získávána z živočichů nebo dokonce mikrobů. Díky obsahu fyziologicky aktivních látek s farmakologickými vlastnostmi, mohou sloužit nejen k barvení ale také jako přírodní antioxidanty nebo antiartritické účinky a spousty dalších [17].

Například kurkumin, označovaný jako E 100, představuje dvě strukturně velmi podobné látky (Obr. 1), které se získávají z indického šafránu“ jako koření ze sušeného mletého oddenku kurkumovníku dlouhého *(Curcuma longa*). E 100 se řadí mezi jedno z nejvýraznějších přírodních žlutých barviv, jenž působí jako silné antiseptikum, tedy léčivo s dezinfekčními účinky, užívané ke zneškodnění nežádoucích mikroorganismů na kůži nebo sliznici, které rovněž pomáhá obnovovat pokožku [18].



Obrázek 1. Molekuly bisdemethoxykurkuminu a demethoxykurkuminu [19].

Dnes nabývá na tendenci nahrazovat syntetická barviva těmi přírodními, a to především z důvodu předpokládané nižší toxicity, třebaže může zatím kdokoliv vidět pouze marketingový tah výrobců léčiv. Mezi kontroverzní přírodní barviva lze zařadit kyselinu karmínovou a karmín (E 120), jenž se získává ze sušených těl samiček hmyzu Nopálovce karmínového (*Dactylopius coccus*), které žijí na opunciích. Skutečnost, že celosvětová produkce karmínu dosahuje přibližně 800 metrických tun ročně, svědčí o jeho trvalé popularitě a širokém uplatnění v různých průmyslových odvětvích. Pro vysokou poptávku se musel výše zmíněný hmyz vyšlechtit, aby produkoval vyšší výtěžky [19, 20]. Obecně lze konstatovat, že lidé spíše přijmou přírodní barviva než ty umělá, aniž by se pídili po zdravotních rizicích a hlášeních na Státním ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL). Dále se předpokládá, že přírodní barviva by měla být ekologicky šetrná pro svou odbouratelnost v čističkách odpadních vod (ČOV).

1.2.1 Syntetická organická barviva

Syntetická barviva mají oproti většině přírodních barviv významné technologické výhody, protože nabízejí syté a výrazné barvy. Dále vykazují vysokou odolnost vůči působení slunečního záření, oxidačním a redukčním činidlům, změnám pH a zároveň lépe snášejí různé vlivy, kterým jsou materiály vystaveny během výrobního procesu [3]. Díky jejich upravitelné chemické struktuře lze snadno dosáhnout odstínů, kterých se obtížně docílí pomocí jen dostupných přírodních barviv. Syntetická organická barviva tvoří početnou a rozmanitou skupinu látek, které se odlišují svými chemickými strukturami a fyzikálními vlastnostmi [21]. Existují dvě základní metody jejich klasifikace. První vychází z typu jejich chromogenních struktur. Mezi ně patří například akridinová, antrachinonová, azo, azinová, difenylmethanová, indigoidní, methinová, nitro, nitroso, oxazinová, ftalocyaninová, thiazinová, trifenylmethanová a xanthénová barviva (Tab. 2). Druhý přístup barviva rozděluje podle způsobu jejich použití, tedy podle způsobu aplikace. Sem patří například barviva kyselá, zásaditá, přímá, disperzní, pro vlákna, reaktivní, kypová nebo mořidlová [22].

S postupem doby a větším množstvím dat stejně tak, jako propracovanějšími technikami a lepším porozuměním fungování lidského těla a jeho biologických pochodů se nevyhnutelně musí měnit i legislativa ohledně barvení léků a potravin. Barviva, která se ještě před pár lety hojně používala, jsou již v tuto dobu zcela zakázána nebo se zásadně omezilo jejich použití.

Jedna z takových změn přišla i v poměrně nedávné době, kdy bylo v roce 2022 zakázáno přidáváni oxidu titaničitého (TiO_2) do potravin. Toto opatření se zavedlo skrze obavy z genotoxických účinků. Dopad zaznamenal nejen potravinářský průmysl, ale také

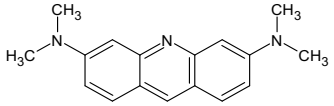
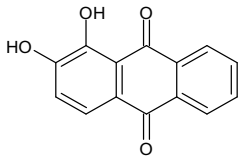
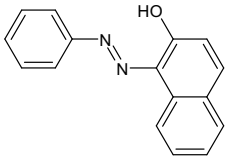
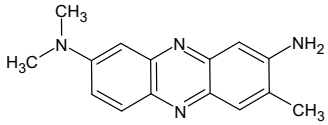
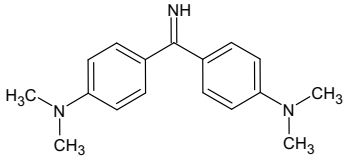
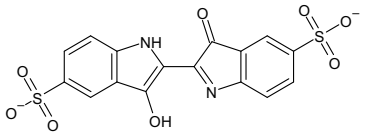
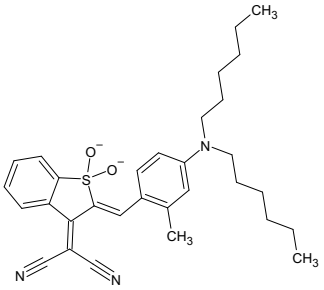
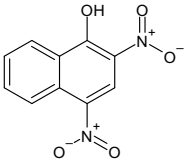
farmaceutický. Kvůli bezpečnostním obavám bude nejspíš TiO_2 zakázán v nejbližších letech i ve farmaceutickém průmyslu [23].

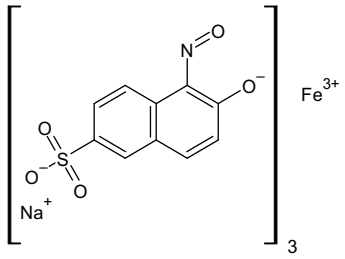
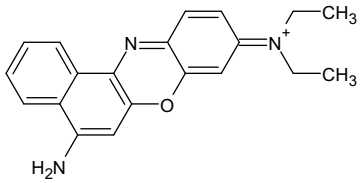
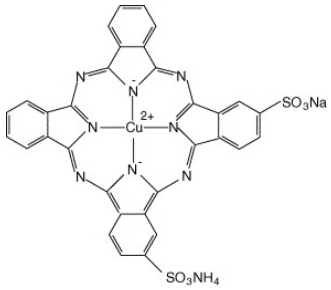
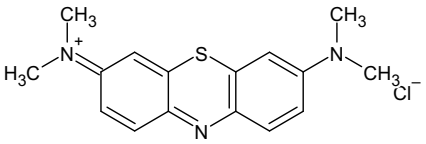
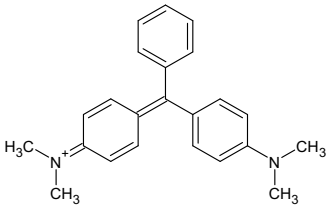
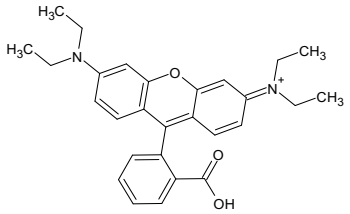
Aktuálně činí celosvětová roční spotřeba oxidu titaničitého přibližně čtyři miliony tun, což z něj dělá nejčastěji používaný pigment na světě. Ve Spojených státech amerických povoluje Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) jeho použití jako potravinářského barviva v koncentraci až do 1 % hmotnosti. V Evropské unii je TiO_2 registrován jako přídatná látka pod označením E 171 a jeho použití je schváleno v režimu *quantum satis*, což znamená, že jeho množství není striktně omezeno, tedy pouze v nejmenším nezbytném množství pro dosažení požadovaného účinku. Podle údajů z potravinářského průmyslu se nejvyšší koncentrace TiO_2 vyskytují ve žvýkačkách (až 16 000 mg/kg), pevných doplňcích stravy (až 12 000 mg/kg), upravených ořeších (až 7 000 mg/kg) a v hotových salátech či pomazánkách (až 3 000 mg/kg) [24].

Oxid titaničitý (TiO_2) nacházel do roku 2022 uplatnění v potravinářském průmyslu, kde sloužil jako bělidlo a stabilizátor, což svědčí o jeho všestranném využití. V oblasti potravin se TiO_2 používal nejen jako přídatná látka, ale také jako zahušťující složka, protispékavý prostředek a stabilizátor. Obdobné využití má dodnes i ve farmaceutickém průmyslu, kde plní navíc další specifické funkce jako činidlo snižující průhlednost (opacifikátor) a také jako potahová látka, což z něj činí klíčovou pomocnou složku v celé řadě léčiv. Toto všestranné použití z něj činí vysoce vhodnou látku pro použití ve farmaceutickém průmyslu. Mimo jiné má vysoký bod tání, nízkou rozpustnost a vysokou stabilitu v širokém rozsahu pH. Kromě toho se nezúčastňuje žádných známých chemických reakcí s léčivy ani jinými pomocnými látkami, což z něj činí inertní složku. Díky svému mimořádně vysokému indexu lomu dokáže pohlcovat UV záření a rozptylovat viditelné světlo, což napomáhá ochraně léčiv před poškozením světlem. Za významnou výhodu lze rovněž považovat efektivní výrobní proces TiO_2, který nezatěžuje životní prostředí vznikem odpadních látek, jak je tomu často u jiných průmyslových výrob. Kvůli těmto vlastnostem se stal jednou z klíčových složek farmaceutického průmyslu, a proto jeho potenciální zákaz bude mít širokosáhlé následky. Nicméně zdraví uživatelů by mělo být vždy na prvním místě. Nalezení náhrady za takto všestrannou látku bude nákladné a zdlouhavé kvůli nedostatku dat. Jedním z mnoha problémů s tímto spojených může být ztráta důvěry zákazníka (pacienta) v produkt kvůli jinému vzhledu nebo také vyšší cena a nižší životnost společně s jistou náročností na skladování [23].

Jelikož tato bakalářská práce bude převážně věnována elektrochemickému chování azobarviv, které se mohou vyskytovat v léčivech, tak je těmto farmaceutickým aditivům věnována pozornost v následujících kapitolách, ať už se jedná o jejich klasifikaci nebo syntézu.

Tabulka 2. Rozdělení syntetických barviv podle chromogenů.

Chromogen	Název barviva	λ_{max} [nm]	Molekulová struktura	Reference
Akridinová	Acridinová oranžová	500		[22, 25]
Antachinonová	Alizarin červený S	609		[22, 26]
Azo	Sudan I	476		[22, 27]
Azinová	Neutrální červená	530		[22, 28]
Difenylmethanová	Auramin O	432		[22, 29]
Indigoidní	Indigo karmín	612		[22, 30]
Methinová	-	610		[22, 31]
Nitro	Martinova žlutá	432		[22, 32]

Nitroso	Naftolová zelená B	714		[22, 33]
Oxazinová	Nil modrý A	638		[22]
Ftalocyaninová	–	610		[22, 34]
Thiazinová	Methylenová modř	660		[22, 35]
Trifenmethanová	Malachitová zelená	615		[22]
Xanthénová	Rhodamin B	550		[22, 36]

1.2.1.1 Azobarviva

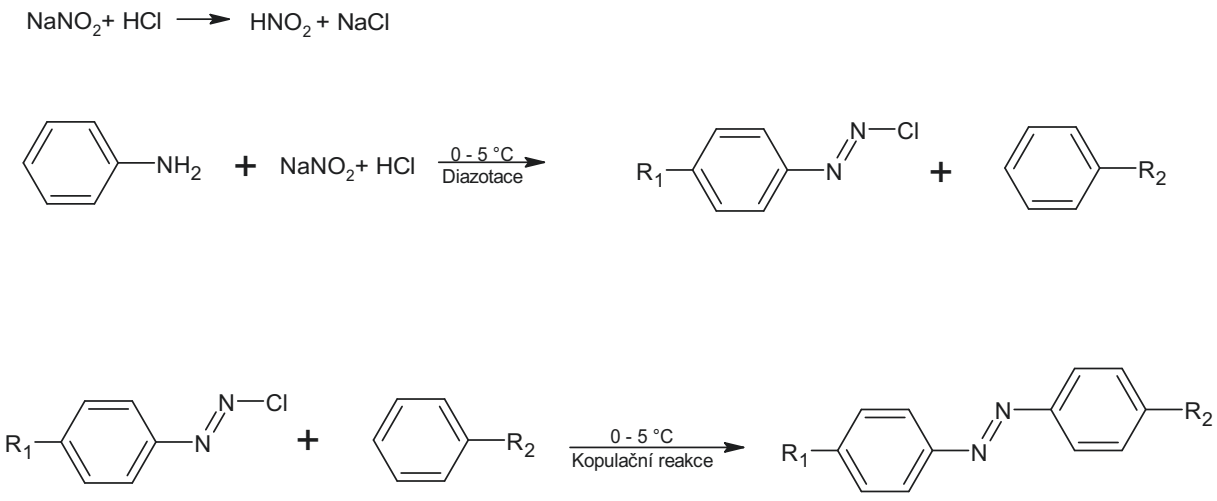
Azobarviva se řadí mezi syntetické sloučeniny, které obsahují dvě aromatické struktury spojené dvojitou vazbou mezi atomy dusíku, označovanou jako azo skupina. Tyto sloučeniny představují největší skupinu barviv a zahrnují například Amaranth, Sunset Yellow FCF a Tartrazin [2]. Mezi nejjednodušší možné rozdělení azobarviv lze považovat klasifikaci dle počtu azovazeb v jedné molekule azobarviva. Jinými slovy můžeme azobarviva dělit na mono-azo, di-azo, atd. Tyto dvě konkrétní skupiny se řadí mezi ty nejdůležitější skupiny

azobarviv. Tri-azo nejsou oproti předchozí skupině tak významná. Polyazobarviva jsou specifická tím, že se jedná o komplexní sloučeniny s opakující se azo skupinou třikrát a více v jedné molekule.

V systému Colour Index (CI) se azobarviva identifikují čísly spadajícími do rozsahu od 11 000 do 39 999. Toto číslování odpovídá jejich chemické struktuře, kdy jsou chronologicky seřazena od mono-azobarviv, kterým náleží čísla do 19 999. Di-azobarvivům čísla od 20 000 do 29 999, tri-azobarviva 30 000 až 34 999 a zbývající část náleží polyazobarvivům [37, 38].

1.2.1.1.1 Syntéza azobarviv

Klasická syntéza azobarviv probíhá ve dvou krocích: diazotace a kopulace (Obr. 2). Nejprve se v kyselém vodném prostředí primární aromatické aminy ošetří ledově vychlazenou kyselinou dusitou, čímž vznikají diazoniové soli. Tyto soli představují slabé elektrofilní látky, a přitom jsou zároveň velmi nestabilní při nízké teplotě v rozmezí 0–5 °C. Jakmile se diazotace dokončí, pokračuje se kopulační reakcí, tedy elektrofilní substitucí s látkami bohatými na elektrony, jako jsou hydroxy nebo amino sloučeniny. Kopulace obvykle probíhá v elektronově bohatých pozicích aromatického jádra, zejména v *ortho* nebo *para* poloze. Pokud se jako substrát používá fenol nebo naftalen, reakce probíhá v zásaditém prostředí s pH mezi 7 a 11. Naproti tomu při reakci s aromatickými aminy se doporučuje provádět kopulační reakce v kyselém prostředí s pH mezi 1 a 5, které zajišťuje stabilitu diazoniové soli, aniž by narušilo reaktivitu nukleofilu [39].



Obrázek 2. Reakční schéma vzorové syntézy azobarviv.

2 Zdravotní rizika způsobená příjmem organických barviv

Podobně jako u potravin používání syntetických barviv ve farmaceutickém průmyslu je ve všech vyspělých zemích podmíněno přísnými legislativními požadavky a rozsáhlým toxikologickým testováním, které zahrnuje hodnocení akutní, subchronické a chronické toxicity, karcinogenity, mutagenity, teratogenity, reprodukční toxicity, schopnosti akumulace v organismu, vlivu na energetický metabolismus a imunitní systém [40].

V posledních letech roste ve společnosti nedůvěra vůči přídatným látkám v potravinách, tak i v léčivech, jako jsou konzervanty, sladidla či syntetická barviva. Spotřeba těchto látek v uplynulých desetiletích výrazně vzrostla, což souvisí se stále vyšší konzumací průmyslově zpracovaných potravin a výrobě léčiv. Tento trend může zároveň souviset s nárůstem zdravotních obtíží, které mohou být způsobeny nadměrným příjmem těchto aditiv.

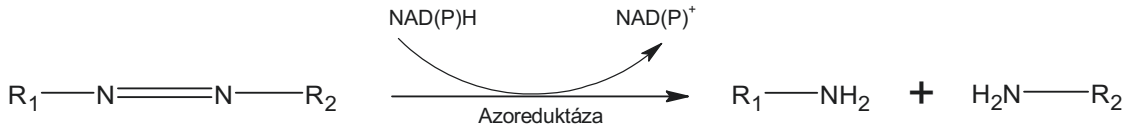
Dlouhodobá konzumace syntetických barviv může mít také závažné dopady na lidské zdraví, přičemž konkrétní rizika závisí na typu použitého barviva. Mezi zdravotní problémy spojené s jejich příjmem patří nejen méně závažné reakce, ale i vážná onemocnění, jako je cirhóza jater nebo možné karcinogenní účinky. Velkou pozornost vzbuzuje také potenciální souvislost mezi příjmem některých barviv a rozvojem ADHD u dětí. Situaci komplikuje skutečnost, že stejné barvivo může být přítomno v různých výrobcích, což může vést k překročení hodnoty přijatelného denního příjmu (ADI). Navíc, pokud člověk během dne zkonzumuje více různých barviv, mohou se jejich toxické účinky navzájem zesilovat, ať už aditivně, nebo potenciací [39].

Značná část barviv používaná v Evropské unii nemá stanovené nejvyšší možné množství nebo je jen stanoven tzv. kombinovaný maximální limit“. Podle článku 11 (ES) č. 1333/2008 se používané množství stanoví na nejnižší možné pro dosažení požadovaného výsledku. Kombinovaný maximální limit znamená, že dané barvivo má stanovené maximální přípustné množství samostatně nebo v kombinaci s jinými barvivy [41]. Právě vzájemné kombinace mohou být dosti problematické, zvláště pro jedince, kteří trpí nějakou chronickou nemocí a jsou odkázáni na celoživotní/dlouhodobé užívání léků. V takovémto případě může velice snadno dojít k překročení doporučeného ADI.

2.1 Metabolismus organických barviv

Střevní mikroflóra hraje důležitou roli v rozkladu různých cizorodých látek (xenobiotik) na příslušné metabolity, přičemž některé z těchto metabolitů mohou přispívat ke genotoxicitě a vzniku rakoviny. Lidé se vystavují působení těchto látek, včetně azobarviv, prostřednictvím stravy, kontaktu s pokožkou nebo vdechováním. Azobarviva se mohou v těle přeměnit na

bezbarvé aromatické aminy. Některé z těchto látek bývají méně škodlivé než původní barviva, ale jiné, jako arylaminy a volné radikály, mohou vyvolat rakovinné bujení. Azobarviva, jako je například Sudan I, II, III, IV se často nelegálně používají ke zlepšení vzhledu potravin nebo jejich stopová množství mohou být součástí legislativně povolených aditiv, jelikož se z nich syntetizují. Nejčastější reakcí, jak vytvořit ze Sudanů netoxické barvivo, je sulfonace jenž zvýší významně jejich rozpustnost ve vodě, a tím i jejich toxicitu. Prvním krokem v anaerobním metabolismu azobarviv střevními mikroby je rozštěpení azo-vazby pomocí NAD(P)H-dependentních azoreduktáz, jak znázorňuje schéma na Obr. 3 [42].



Obrázek 3. Enzymatická redukce azobarviv.

Po rozkladu azobarviv ve střevech se uvolňují aromatické aminy, které se mohou vstřebat přes střevní stěnu do krevního oběhu a následně být vylučovány močí. V tlustém střevě probíhá bakteriální redukce těchto barviv, při které vznikají například sulfanilová kyselina a aminopyrazol. Tyto látky se vstřebávají snadněji než původní barviva a částečně odcházejí stolicí. Množství barviv, které se vyloučí nezměněné močí, bývá velmi malé.

Některé z těchto metabolitů mohou ovlivnit buněčné dělení a podporovat tvorbu nadměrného množství buněk, což může přispívat ke vzniku nádorů. Kromě toho se během metabolismu mohou ze sloučenin odštěpovat určité chemické skupiny, které ovlivňují jejich biologickou aktivitu. Toxické účinky azobarviv se připisují několika mechanismům. Jejich produkty mohou například způsobovat oxidační stres v játrech, poškozovat buňky a narušovat krevní a biochemické pochody. Nebezpečí barviv závisí na tom, jak se v těle vstřebávají, jakým způsobem se metabolizují a jak rychle se z těla vylučují. Důležitou roli hrají i možné interakce barviv s jinými látkami v léčivech. Některá z těchto barviv mohou ovlivňovat nervový vývoj nebo mít karcinogenní účinky, a to zvláště při vyšších dávkách [43].

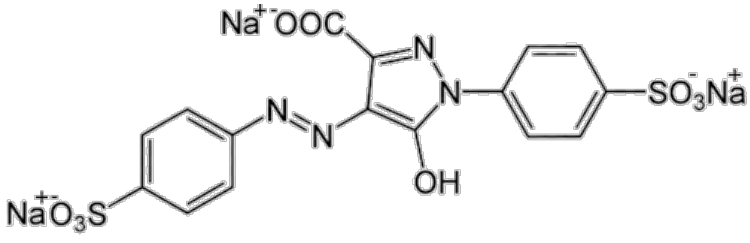
2.2 Onemocnění vyvolané organickými barvivy

Přestože se barviva ve farmaceutických přípravcích používají pouze ve velmi nízkých koncentracích, otázka jejich bezpečnosti zůstává nedostatečně prozkoumána. Z tohoto důvodu je důležité znát jejich bezpečné dávkování a možné účinky na lidský organismus [44]. Tab. 3 uvádí stručný přehled zdravotních komplikací, jež by mohly mít spojitost s užíváním léčiv obsahující jak syntetická, tak i přírodní barviva. Jedním z možných onemocnění spojených s příjmem organických barviv může být porucha pozornosti spojená s hyperaktivitou, jenž se

označuje zkratkou ADHD. Zvyšující se počet diagnostikovaných případů s ADHD způsobuje pravděpodobně přesnější diagnostika a větší povědomí o této poruše. I přesto mohou jisté vnější faktory hrát významnou roli v rozvoji tohoto onemocnění. Jako jeden z těchto faktorů jsou uváděny toxiny přijímané z okolí jako třeba radioaktivita nebo umělá barviva [45].

V roce 2022 se vlivem chování dětí ve spojitost s příjmem syntetických potravinářských barviv rozhodla Kancelář pro hodnocení zdravotních rizik životního prostředí státu Kalifornii (OEHHA) udělat přehledové hodnocení. V rámci tohoto přehledu se identifikovalo 27 klinických studií zaměřených na děti vystavené syntetickým barvivům v potravinách. Jedním z bodů byla také toxikologická studie na zvířatech, která se zaobírala limity ADI, kdy panovala obava o aktuálnosti stanovených limitů americkou FDA. Ze studií vyplynulo, že expozice potravinářským barvivům má negativní vliv na chovaní dětí ať už s existujícími poruchami nebo bez nich. Tuto skutečnost také podpořily testy na zvířatech [46].

S nárůstem výskytu astmatu a alergických reakcí se zkoumal možný vliv syntetických barviv. Avšak studie provedené u erythrosinu (E 127) přinesly protichůdné poznatky [40]. Ovšem některé z organických barviv mohou vyvolat alergické rekce. Například barvivo E 160c (paprikový extrakt) vyvolává alergickou reakci převážně u dospělých. Alergické reakce na koření bývají vzácné, ale podle odhadů tvoří asi 2 % všech potravinových alergií. Tartrazin (E 102) se výjimečně spojuje s vyvoláním kopřivky. Ovšem u 1 z 12 dětí byl příčinou zhoršení ekzému [47]. V jiné studii, která se zabývala vlivem plodů trnky obecné (*Prunus spinosa*) na toxické účinky tartrazinu (E 102) (Obr. 4), kde byl asociován jako spouštěč oxidativního stresu, který následně vede až k metabolickým poruchám. Tento experiment se prováděl na albínských potkanech Wistar. Přitom se zjistilo, že barvivo má nepříznivé účinky na ledviny, játra a slezinu, na kterých se nalezly léze. Tartrazin má tedy schopnost způsobit závažné poškození těchto orgánů [48].



Obrázek 4. Molekula tartrazinu (E 102).

Tabulka 3. Přehled vybraných barviv používaných ve farmacii a jejich zdravotní rizika [3]

Aditivum	Označení	Zdravotní účinky
Chinolinová žluť	E 104	Potenciálně genotoxické a karcinogenní, v kombinaci s aspirinem způsobuje podráždění pokožky.
Žluť SY	E 110	Kopřivka, nádory ledvin, nevolnosti a zvracení, případné alergické reakce.
Karmín	E 120	Přírodní barvivo, které vyvolává alergické reakce, dokonce až anafylaktický šok.
Azorubin	E 122	Vzácně kožní či respirační problémy.
Brilantní modř	E 133	U jedinců se středně těžkým astmatem hrozí vyvolání alergické reakce.
Brilantní černá BN	E 151	U osob s intolerancí na aspirin nejspíše vyvolává alergické reakce. Může také nepříznivě působit na astma.

Některé z barviv mají nepříznivé účinky na děti. Barviva E 104 a E 122 mohou nepříznivě ovlivňovat aktivitu a pozornost u dětí. Naproti tomu Barviva E 104, E 120 a E 151 mohou zvyšovat hyperaktivitu u dětí. Zejména za rizikové se označují barviva E 120 a E 151, u nichž se doporučilo zcela jejich vyloučení z dětské stravy. Z těchto skutečností vyplývá důležitost analytických metod, jenž by rychle a spolehlivě určily přítomnost takových aditiv v léčivech. Tyto podmínky splňují elektrochemické metody. Proto aby se daly v praxi použít, je nezbytné znát elektrochemické vlastnosti barviv.

3 Analýza organických barviv ve farmacii

Stejně tak jako v jiných průmyslových oblastech, tak i ve farmaceutickém průmyslu jsou stanoveny normy, jakými technikami stanovovat látky obsažené v produktech. Předmětem těchto norem jsou postupy, jak odebírat vzorky a analyzovat farmaceutické vzorky. Zde lze nalézt chemikálie používané během stanovení, stejně tak jako instrumentaci, která se pro stanovení používá. Normativní spis, který na celospolečenské úrovni doporučuje nebo stanovuje seznamy léčiv a požadavky na jakost, postup při přípravě, zkoušení, uchovávání a dávkování léčiv, se označuje jako lékopis či farmakopea. Při hledání vhodné analytické metody se musí brát v potaz povaha, tzv. léková formule vzorku, ve kterém budeme toto barvivo stanovovat, protože ne všechny analytické metody mohou být vhodné pro získání věrohodných (správných) výsledků.

Jako jedna z možností pro stanovení organických barviv se nabízí kapalinová chromatografie (LC) s detektorem s diodovým polem (LC/DAD). Samozřejmě v úvahu přichází i univerzální kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem (LC/MS). Před použitím těchto technik se většinou musí analyt ze vzorku extrahovat v činidlech uznané analytické čistoty. Například norma ČSN EN ISO 16373-2 se zabývá stanovením extrahovatelných barviv, a to včetně alergenních a karcinogenních barviv, jejich následném stanovení ve vodě s obsahem pyridinu za použití výše zmíněné LC s detektorem (LC/DAD) nebo hmotnostním detektorem (LC/MS). Tyto metody stanovení barviv se mohou aplikovat také na léčivé přípravky. Zásadní nevýhodu kapalinové chromatografie představuje především časově náročnější příprava vzorku před samotnou analýzou za pomoci extrakce rozpouštědly nebo z pevné fáze [49].

Mezi jednu ze základních vlastností, kterou lze použít při stanovování organických barviv patří jejich schopnost pohlcovat elektromagnetické záření při přesně definovaných vlnových délkách (Tab. 2) v závislosti na zvoleném prostředí. Značný vliv na rozsáhlost interakcí má polarita a pH zvoleného rozpouštědla. Také přítomnost elektronakceptorních a elektrondonorních substituentů v molekulách stanovovaného barviva hraje významnou roli při určení maxim absorpčních pásů. Za nesporné výhody spektrofotometrických metod se považují rychlost analýzy, nenáročná instrumentace a jednoduché (automatické) vyhodnocení. Největší nevýhodu lze spatřit v nízké selektivitě, kdy nelze rozlišit vícero barviv ve vzorku, jenž mají podobná absorpční maxima [50, 51].

3.1 Elektroanalýza organických barviv v léčivech

Tato bakalářská se věnuje převážně studiu elektrochemickému chování syntetických barviv vyskytujících se v běžných léčivech, které nejsou vázány na lékařský předpis, konkrétně zcela syntetických azobarviv. Hlavní důvod spočívá v popisu jejich elektrodových reakcí (drah), které probíhají na elektrodovém povrchu a identifikace vzniklých produktů, jenž mohou simulovat enzymy (NADPH-cytochrom P450 reduktáza a cytochrom P450) katalyzující metabolismus těchto xenobiotik. Navíc tyto poznatky mohou vést k vývoji jednoduchých, ale spolehlivých elektroanalytických metod, kterými by se daly detekovat nízké koncentrace azobarviv i bez složité a ekonomicky náročné instrumentace. Za další nespornou výhodu lze považovat rychlost stanovení samotného elektroanalytického stanovení [49].

Většina jednoduchých léčiv obsahuje jednu či úzkou skupinu farmaceuticky aktivních složek (API), několik pomocných a řadu balastních látek. Většina přítomných komponent není elektrochemicky aktivní, tudíž neposkytuje nebo nepřejímá elektrony z pracovní elektrody, a

tudíž by nemusela rušit vlastní stanovení API či excipientů (organická barviva). Z tohoto důvodu mají elektrochemické metody za průchodu elektrického proudu (*I*), jmenovitě coulometrie, amperometrie a voltametrie [50], ve farmaceutické analýze své opodstatnění.

Aby bylo možné nějakou elektroanalytickou metodu vyvinout a poté zařadit do rutinní praxe, je nutné nejdříve detailně popsat elektrochemické chování stanovovaného analytu, v tomto případě organického barviva v prostředí všech doprovodných komponent. Získané znalosti totiž mohou usnadnit optimalizaci analytických podmínek, které zahrnují postup přípravy vzorku, složení pracovního média, volbu elektrolytu a nastavení parametrů elektrochemické techniky.

3.2 Elektrochemické chování vybraných organických barviv

Azobarviva představují skupinu organických sloučenin obsahujících charakteristickou azo skupinu (–N=N–), která je klíčovým místem jejich elektrochemických dějů, pokud nejsou přítomny další elektrochemicky aktivní funkční skupiny. Pomocí cyklické voltametrie (CV) se již studovaly jejich redoxní vlastnosti, přičemž se popisy reakčních drah místy rozcházejí. Zde je nutné si uvědomit, že jejich elektrochemické chování bývá ovlivněno mnoha faktory, a to polaritou prostředí, pH pro vodné roztoky, přítomností dalších látek (elektrofilů a nukleofilů), volba elektrodového materiálu a v poslední řadě parametry samotné voltametrické techniky.

Na základě informací z literatury v katodickém směru v neutrálním pH dochází především k $2e^-/2H^+$ redukci azo skupiny na příslušný hydrazo derivát (–NH–NH–), což se na voltamogramech projevuje výrazným katodickým píkem přibližně při –0,77 až –0,78 V. Tento hydrazo meziprodukt dále podléhá chemickému štěpení, přičemž výsledné produkty závisí na pH prostředí.

Naproti tomu při anodické voltametrii se považuje za hlavní oxidační děj oxidace fenolové skupiny přítomné ve struktuře některých azobarviv. Tento proces probíhá prostřednictvím $1e^-/1H^+$ oxidace na fenoxyradikál, stabilizovaný mezomerními formami, který dále reaguje s vodou za vzniku dihydroxy derivátu. Ten se následně oxiduje na chinonový derivát v $2e^-/2H^+$ kvazireverzibilní reakci. Pokud se reverzní měření provádí do vyššího záporného vrcholového potenciálu, dochází k redukci těchto chinonových derivátů a k následnému štěpení –N=N– vazby za vzniku dalších redox-aktivních produktů (anilin, hydroxyanilin a aminonaftoly), které se oxidují při dalším anodickém skenu na odpovídající chinoniminy a chinony. Opakované cykly tedy vedou k postupnému snižování intenzity oxidačních i redukčních signálů, což by mohlo být způsobeno zanášením povrchu elektrody polymerními produkty vznikajícími z aromatických aminů a fenolů [52]. Hlavním cílem této

bakalářské práce bylo objasnit elektrochemické chování azobarviv mající fenolovou skupinu ve fyziologickém prostředí fosfátového pufru.

3.2.1 Elektrochemické stanovení Allura red AC

Znalost elektrochemického chování azobarviv může velice pomoci při vývoji elektroanalytických metod, které se poté dají využít při analýze léčiv a životního prostředí. Níže je uvedeno několik příkladů voltametrických senzorů, které se vyvinuly pro monitorování Allura red AC (AR) v potravinách a ve vzorcích odpadních vod z textilního průmyslu.

AR, někdy do češtiny překládána jako "červeň alura" je, jak již z názvu vypovídá, červené azobarvivo. Kvůli obavám z potencionální karcinogenity a možné spojitosti s hyperaktivitou u dětí bylo nutno vyvinou vhodnou analytickou metodu pro stanovení tohoto barviva. Pro stanovení bylo vyvinuto mnoho elektroanalytických metod, kdy například za zmínku stojí různé modifikace diskové elektrody ze skelného uhlíku (GCE) nebo také CPE modifikovanou s oxidem kobaltnatým. Ve studii z roku 2021 se tým vědců pokusil stanovit obsah AR v želatinových bonbónech za pomoci uhlíkové pastové elektrody modifikované křemelinou impregnovanou cetylpyridium chloridem. Z již dřívějších studií vyplývá že, takto modifikovaná elektroda vyhovuje stanovení tohoto barviva ve vodném prostředí. Ve srovnání s nemodifikovanou CPE vykázala zvýšení oxidačního proudu a posun oxidačního vrcholového potenciálu směrem ke katodové oblasti, a to až na hodnotu 950 mV. Tento jev autoři vysvětlují adsorpcí barviva na povrch elektrody díky přítomnosti modifikující křemeliny s impregnovaným tenzidem. Nicméně lze se domnívat, že spíše vznikají iontové páry mezi kationtovým tenzidem a sulfonátem dané azosloučeniny [53].

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4 Popis laboratorní práce

Tato kapitola uvádí seznam použitých chemikálií, laboratorního vybavení a stručný popis metodiky potřebné k dosažení stanovených cílů, tedy k popisu elektrochemického chování vybraných azobariv, jmenovitě Allura red, Black BN (BB), Brown HT (CB), red 2G (R2G), Sunset Yellow FCF (SY), tartrazin a na elektrodě ze skelého uhlíku v prostředí 0,1 mol·l^{-1} fosfátového pufru (PB) o pH 7.

4.1 Použité chemikálie

Standardy azobarviv Allura red, Black BN (BB), Brown HT (CB), Red 2G, Sunset Yellow FCF (SY), tartrazin pro měření poskytl Doc. Martin Adam, Ph.D. ze skladu katedry analytické chemie Univerzity Pardubice. Bohužel nebylo možné dohledat původ výrobce těchto standardů ani jejich čistotu. Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného a dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného pro přípravu 500 ml 0,1 mol·l^{-1} fosfátového pufru byly pořízeny od společnosti Lech:ner Ltd. (Neratovice, Česká republika). Všechny zásobní a pracovní roztoky byly připraveny z deionizované vody získané propuštěním již destilované vody přes jednotku na čištění vody Milli-Q® od společnosti Merck Millipore (Burlington, MA, USA). Všechny zásobní a pracovní roztoky byly připraveny z deionizované vody získané propuštěním již destilované vody přes jednotku na čištění vody Milli-Q® od společnosti Merck Millipore (Burlington, MA, USA).

4.2 Přístrojové vybavení

Všechna voltametrická měření se prováděla s použitím konvenčního tříelektrodového systému, sestávajícího z GCE (typ 6.09395.014) s průměrem disku 3 mm, referenční chloridostříbrné elektrody (typ 6.0726.100) se solným můstkem obsahujícím 3 mol·l^{-1} KCl od společnosti Metrohm Česká republika s.r.o. (Praha, Česká republika) a pomocné elektrody z platinového plíšku od společnosti Elektrochemické detektory, s. r. o. (Turnov, Česká republika). Zvolené elektrody se ponořily do standardní elektrochemické skleněné cely s objemem 10 ml pracovního roztoku a připojeny k potenciostatu/galvanostatu Autolab PGSTAT101 ovládaném softwarem NOVA 1.11, vše od výše zmíněné společnosti Metrohm. Veškerá vážení chemikálií pro přípravu standardních roztoků se uskutečnila na laboratorních vahách KERN 770 od firmy Merck KGaA (Darmstadt, Německo).

4.2.1 Obnovování povrchu elektrody ze skelného uhlíku

Vzhledem k tomu, že produkty elektrochemické přeměny mohou pasivovat aktivní povrch GCE, se musela aktivní plocha pracovní elektrody obnovovat vyleštěním na lešticí podložce s použitím vodné disperze oxidu hlinitého (velikost částic 1,0 μm) po dobu 10 s. Tato doba se uvádí rovněž v přiloženém návodu od výrobce. Po následném opláchnutí povrchu proudem destilované vody lze GCE považovat za připravenou k dalším elektrochemickým experimentům.

4.2.2 Příprava uhlíkové pastové elektrody

Heterogenní uhlíkaté elektrody lze definovat jako zvláštní typ pracovních elektrod, které nejsou vyrobeny pouze z jednoho elektrodového materiálu. Z tohoto hlediska se jedná o kompozitní materiály. Nejčastějším typem jsou uhlíkové pastové elektrody (CPE) a tištěné uhlíkové elektrody (SPCE). Pevné uhlíkové elektrody, jejíž povrch pokrývá kompozit složený z uhlíkových nanočástic (CNPs), lze rovněž považovat za heterogenní uhlíkaté elektrody [54].

V rámci této bakalářské práce se připravila CPE z vysoce chemicky čistotného grafitu a silikonového oleje. Její nesporná výhoda spočívá v možnosti vlastní laboratorní přípravy a opakovaném obnovování elektrodového povrchu pouhým otřením o vlhký filtrační papír. Další výhodu lze spatřit v o řád pomalejším heterogenní přenosu elektronů mezi elektrodou a analytem, nežli tomu je u pevných uhlíkových elektrod. Tudíž lze snadněji sledovat následné chemické reakce vzniklých produktů elektrochemické oxidace či redukce[55].

Pro přípravu konvekční CPE byl použit grafitový prášek o velikost částic ≥2 nm od MAZIVA Týn, spol. s r. o. (Týn nad Vltavou, Česká republika) a silikonového oleje o viskozitě 8000 cSt od Lučební závody a.s. (Kolín, Česká republika). Tato směs se homogenizovala v třecí misce tloučkem po dobu přibližně 10 min. Vzniklá homogenní hmota se následně mechanicky vtlačila do teflonového držáku opatřeného kovovým pístem, který slouží k vodivému spojení. Obnovení elektrodového povrchu se provádělo opatrným vytlačením asi 1 mm pastového válečku za pomocí šroubového pístu a následným leštěním o suchý filtrační papír krouživými pohyby.

4.2.3 Příprava vzorku

Elektrochemická detekce azobarviva Sunset Yellow FCF se prováděla v léčivém přípravku Orasept med a citron 0,6 mg/1,2 mg, který je běžně dostupný v síti lékáren Dr. Max Pharma s.r.o. (Praha, Česká republika). V příbalovém letáku (viz. přílohy) se lze dočíst o obsahu tohoto aditiva (0,01 mg na jednu pastilku). Lékovou formou jsou velké světle žluté pastilky, které jsou určené k postupnému rozpuštění v ústech. Během samostatné přípravy vzorku se vložily 3

tablety do kádinky a zalily fosfátovým pufrem (pH 7). Po rozpuštění se roztok kvantitativně převedl do 25 ml odměrné baňky a doplnil po rysku výše zmiňovaným pufrem. Samotný proces rozpouštění se urychlil vložením kádinky se vzorkem do ultrazvuku. Před kvalitativní analýzou se roztok vzorku ještě přefiltroval přes skládaný filtrační papír, tak aby se odstranily možné nečistoty.

Obrázek 5. Balení léku Orasept.

4.3 Metodika

Cyklická voltametrie se řadí mezi přední elektrochemické techniky preferované ke studiu elektrodových reakcí, kdy se využívá polarizace pracovní elektrody v obou směrech, tedy anodická oxidace analytu a zpětná katodická redukce oxidačních produktů, anebo lze začít katodickou redukcí analytu a pokračovat zpětnou anodickou oxidací redukčních produktů. Pokud dochází pouze k výměně elektronů bez následné chemické reakce, tak takovéto elektrodové reakce považuje za elektrochemicky reverzibilní či quasi-reverzibilní. Všechny ostatní se řadí mezi ireverzibilní reakce. Nicméně toto pravidlo neplatí všeobecně, neboť do elektrochemické reakce promlouvají další faktory, jako rychlost difúze, adsorpce, tvorba iontových párů atd. Potenciálové rozsahy a rychlosti polarizace lze libovolně volit tak, aby bylo možné sledovat pouze konkrétní elektrodovou reakci [56].

Jako nosný elektrolyt byl pro každé elektrochemické měření zvolen odvzdušněný fosfátový pufr o koncentraci 0,1 mol·l^{-1} a pH 7, aby co nejvíce napodoboval fyziologické prostředí. Vlastní odvzdušnění se provedlo probubláváním plynným dusíkem po dobu 15 min. Pro stanovení mechanismu transportu hmoty byl studován vliv rychlosti polarizace (v) na výšky anodických píku (i_p^a) azobarviv v 0,1 mol·l^{-1} fosfátovém pufru (pH 7) na GCE při rychlostech 20, 40, 60, 80, 100, 120 a 140 mV·s^{-1} pomocí lineární voltametrie s lineárním nárůstem napětí (LSV).

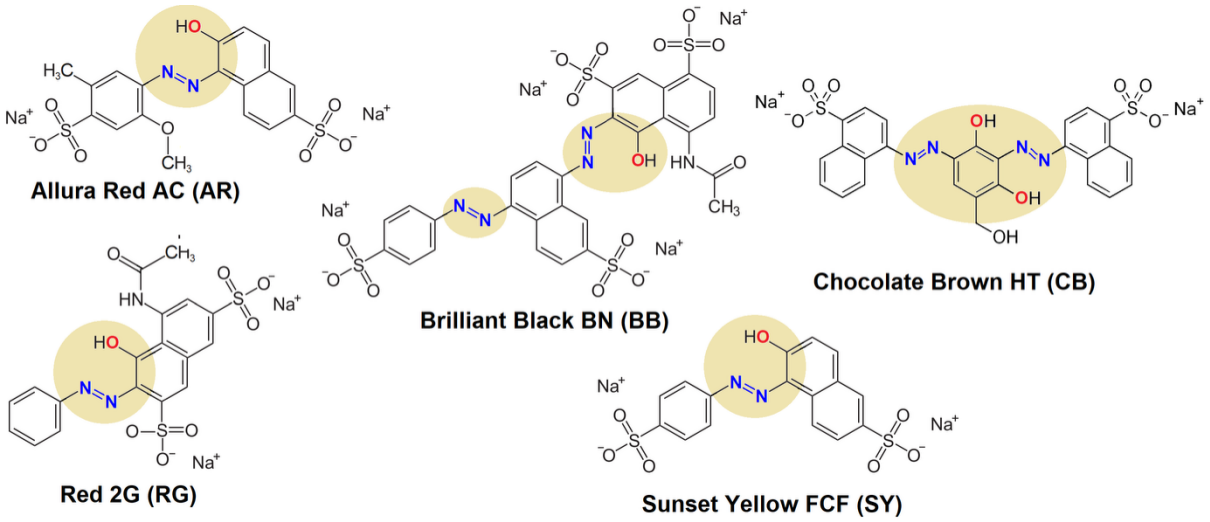
Pro popis katodické i anodické elektrochemické reakční dráhy azobarviv se provedlo několik měření pomocí cyklické voltametrie jejich pufrovaných roztoků o koncentraci 0,1 mmol·l^{-1} ve dvou rozsazích potenciálu od −0,8 do +0,4 V s počátečním potenciálem (E_{start}) 0 V a od −0,4 do +1,4 V s počátečním potenciálem +0,2 V při potenciálovém kroku (E_{step}) 5 mV a rychlosti skenování (v) 50 mV·s^{-1}.

5 Výsledky a diskuse

Praktická část popisuje elektrochemické chování vybraných azobarviv (Obr. 5) v neutrální 0.1 mol·L^{-1} fosfátovém pufru (pH 7) pomocí cyklické voltametrie na GCE a CPE. Byly sledovány jak anodické, tak i katodické reakční dráhy za laboratorních podmínek, tedy při 20-25 °C. Získané výsledky umožnily návrh mechanismů elektrodových reakcí těchto barviv. Současně díky zvoleným barvivům bylo možné porovnat elektrochemické chování látek s jednou a dvěma azo skupinami v molekule.

Pro elektrochemické zkoumání vybraného vzorku léčiva byla použita metoda square wave voltametrie (SWV). Tato pulzní voltametrická technika nabízí vysokou citlivost a rychlost měření díky odečtení rozdílu proudů na konci každého anodického a katodického pulzu, čímž se minimalizuje vliv kapacitního proudu. SWV umožňuje spolehlivě kvantifikovat faradaické děje pomocí proudové odezvy [57].

Pomocí této techniky se v rámci této bakalářské práce zjistilo, zda je možné detekovat i velmi malá množství azobarviva SY v léčivém přípravku. I přes skutečnost, že společně s již zmíněným azobarvivem se v léku nachází celá řada jiných látek, jako například sladidla (maltitol E 965, isomalt E 953 a sodná sůl sacharinu E 954) nebo další barvivo (chinolinová žluť E 104). Tyto přidané látky mohou nepříznivě ovlivnit schopnost elektrochemické detekce sledovaného azobarviva, tím že sami se účastní elektrodových reakcí nebo eliminují velikost elektrochemicky aktivní plochy (A).



Obrázek 6. Struktury zkoumaných azobarviv se zvýrazněnými redukčními centry.

5.1 Oxidační a redukční dráhy azobarviv

Oxidačně-redukční děje představují zásadní součást chemie organických sloučenin i biologických procesů. Často probíhají prostřednictvím složitějších mechanismů, v nichž mezi jednotlivými přenosy elektronů dochází k dalším chemickým přeměnám vznikajících meziproduktů. Tyto reakce mohou vést ke vzniku látek s nežádoucími vlastnostmi. Pochopení těchto obecných principů je důležité nejen při studiu chemie barviv a léčiv, ale také při posuzování jejich toxicity na lidské zdraví. Cyklická voltametrie poté představuje základní elektrochemickou techniku, se kterou lze tyto oxidačně-redukční děje sledovat a navrhnout reakční mechanismy obou drah.

5.1.1 Katodické redukční dráhy azobarviv

V neutrálním prostředí fosfátového pufru vykazovala všechna studovaná azobarviva výrazný nevratný redukční pík při potenciálu v rozmezí od +0,7 do +0,9 V a v opakovaných voltametrických cyklech (Obr. 7) také kvazireverzibilní redoxní pár. Tento jev zřejmě odpovídá elektrochemické oxidaci produktů redukce, tedy derivátů 2-amino-1-naftolu (ANO), na jejich oxidované formy 1,2-naftochinoniminy (INO). Rozdíly v separaci potenciálů (ΔE_p) těchto píků souvisí s vlastnostmi jednotlivých substituentů na molekulách azobarviv.

Ze srovnání katodických proudových odezev (I_p^c) 1 mmol·l^{-1} (c) jednotlivých azobarviv při rychlosti skenování 50 mV·s^{-1} (v), velikosti aktivní plochy GCE (A) a tabulkovaných difuzních koeficientů (D), jmenovitě 6.3 pro Allura Red AC, 5,8 pro Red 2G, 6,1 pro Sunset Yellow FCF a 5.8 × 10^{-6} cm^2·s^{-1}, se pomocí Randles–Ševčíkovy rovnice (1) vypočetly počty elektronů (n). Bohužel pro Chocolate Brown HT a Tartrazin se nepodařilo hodnoty difúzních koeficientů dohledat.

Velikost elektrochemicky aktivní plochy (0,045 cm²) skleněné uhlíkové elektrody (GCE) se vypočetla s proudové odezvy 1 mmol·l^{-1} $K_3[Fe(CN)_6]$, Faradayovy konstanty (9,6485 × 10^4 A·s·mol^{-1}), difuzního koeficientu (7,2 × 10^{-6} cm²·s^{-1}) ve vodném prostředí při 25 °C, univerzální plynové konstanty (8,3144 J·K^{-1}·mol^{-1}) a teploty v jednotkách K.

$$I_p = 0.4463\, nFAC \left(\frac{nF\nu D}{RT}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

Všech šest testovaných azobarviv podstupuje nevratnou čtyř elektronovou redukci, probíhající ve dvou-elektronových krocích. Vznikají přitom hydrazointermediáty, které se dále štěpí na 4-aminobenzensulfonáty a sulfonované deriváty 2-amino-1-naftolu. Výsledné produkty se lišily v závislosti na konkrétní struktuře jednotlivých barviv.

U barviva Brilliant Black BN (BB) byla situace složitější, protože molekula obsahuje dvě azo skupiny, přičemž se dalo pozorovat dvojici redukčních píků, které odpovídaly postupné redukci přítomných azo skupin. Produkty těchto reakcí následně vykazovaly redoxní chování typické pro vznikající deriváty ANO a INO. Analogické elektrochemické chování se ukázalo i v případě Chocolate Brown HT (CB), kdy pravděpodobně finálními produkty budou sulfonované deriváty aromatických aminů a polyaminů, které se rovněž zapojovaly do následných redoxních reakcí.

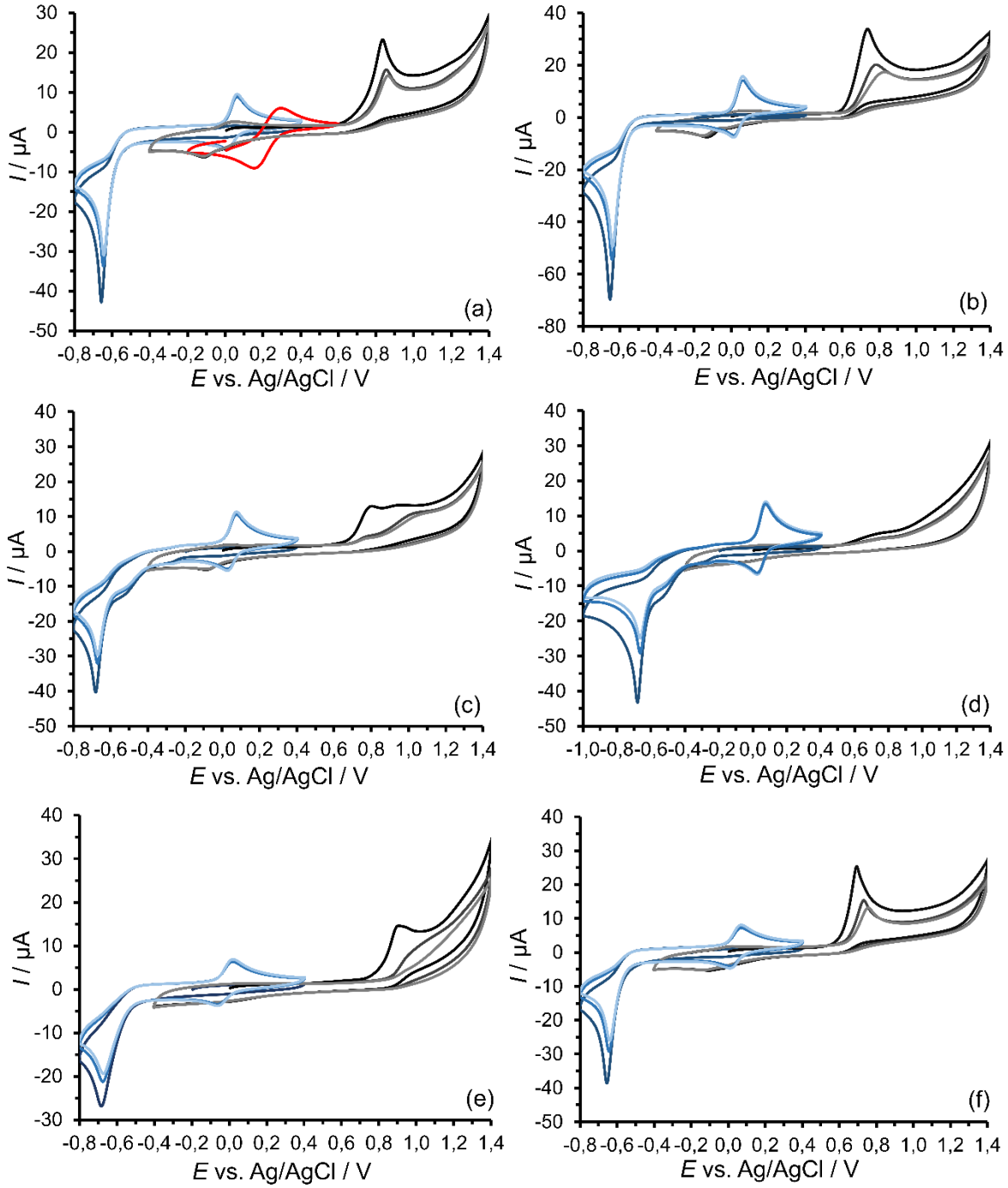
5.1.2 Anodické oxidační dráhy azobarviv

Při anodické oxidaci poskytovaly mono-azobarviva vždy jeden ostrý ireverzibilní anodický pík při hodnotě +0,7 V. Naproti tomu anodická oxidace di-azobarviv dala vzniknout dvojici nevýrazných a překrývajících se píkům při hodnotách +0,8 a +0,9 V. V následujících cyklech lze rozpoznat kvazireverzibilní redoxní páry, které patrně odpovídají přeměně derivátů 2-amino-1-naftolu na 1,2-naftochinoniminy.

Jak je patrné z Obr. 7, barviva Allura red AC (AR) a Sunset Yellow FCF (SY) vykazují jeden ireverzibilní anodický pík při potenciálu +0,836 V a +0,740 V. To znamená, že pokud tyto látky budou přítomny společně v jednom vzorku, nebude možné je elektrochemicky rozpoznat. Tudíž elektrochemické metody využívající jejich anodické přeměny mohou být použity pro vzorky, které obsahují pouze jedno takovéto aditivum.

Mírně vyšší oxidační potenciál u AR lze přičíst přítomnosti elektron-odtahující methoxyskupiny. Jejich elektrodové reakce lze popsat jako dvouelektronový a jedno-protonový proces, během něhož dochází k oxidaci na příslušné kationty. Tyto kationty následně podléhají nukleofilní adici vody za současného odštěpení protonu, čímž vznikají chemicky nestabilní meziprodukty na bázi oximů. Ty se dále rozkládají na sulfonovaný derivát 1,2-naftochinoniminu (INO) a 4-nitrosobenzensulfonát v případě SY (Obr. 8), nebo na analogický

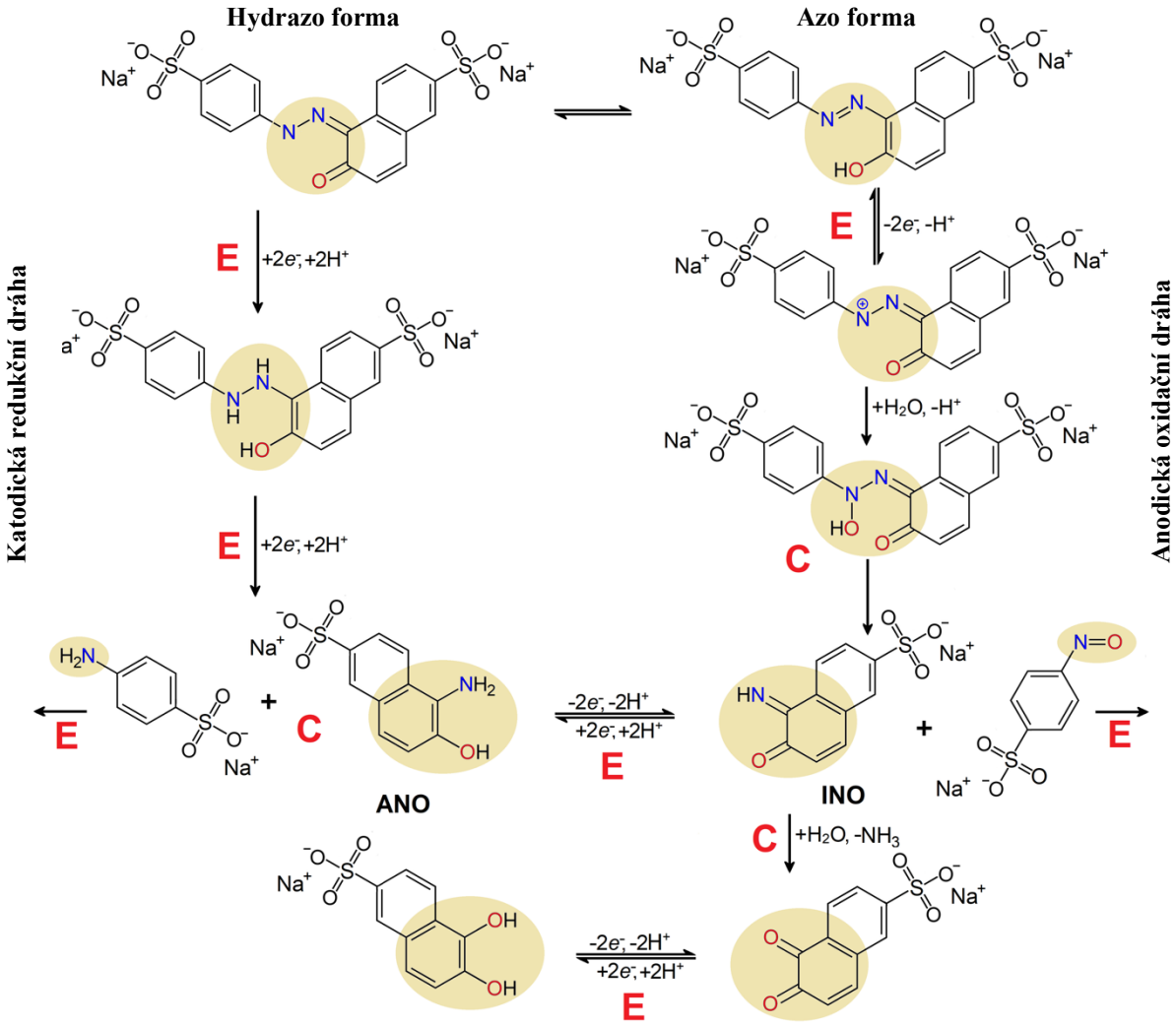
nitrosoderivát substituovaný methoxy a methyl skupinami v druhé a páté pozici u AR. Výše zmíněné deriváty INO mohou dále procházet kvazireverzibilní redukcí za účasti dvou elektronů a protonů na odpovídající deriváty 2-amino-1-naftolu (ANO). Obdobné elektrochemické chování lze očekávat také u RG, kde konečnými produkty budou nitrosobenzen (NB) a sulfonovaný ANO derivát.



Obrázek 7. Opakující se cyklické voltamogramy 1 mmol·l^{-1} (a), AR (b) SY (c), BB (d), CB (e), Tartrazinu a R2G (f) pořízených na GCE v 0.1 mol·l^{-1} fosfátovém pufru (pH 7) při potenciálovém kroku 5 mV a rychlosti skenování 50 mV·s^{-1}.

Podobné elektrochemické vlastnosti vykazují látky obsahující ve své struktuře dvě azo skupiny, kdy je možné rozlišit dva katodické a dva anodické píky, jak ukazuje Obr. 7, porovnávající cyklické voltamogramy Briliant Black BN (BB) a Chocolate Brown HT (CB). Důvodem je převládající hydrazonová forma CB, která má přerušený konjugovaný systém. Mezi pravděpodobné oxidační produkty BB lze zařadit 4-nitrosobenzensulfonát (4-NBS), sulfonovaný 1,4-naftochinonimin a sulfonovaný ANO derivát. Naopak u CB jsou očekávanými produkty derivát chinoniminu a dvě molekuly 1-nitrosonaftalen-4-sulfonátu.

Obdržené výsledky prohlubují nedávno získané poznatky o elektrochemickém chování azobarviv ve fyziologickém prostředí, řízené ECE mechanismem [58], vedoucím ke vzniku typických redoxních párů mezi 1-amino-2-naftoly a odpovídajícími chinoniminy. Dále nelze vyloučit, že v důsledku hydrolýzy dochází k tvorbě *ortho*-chinonů z těchto chinoniminů. V přítomnosti aminů nebo thiolů lze navíc očekávat Michaelovy adiční reakce mezi těmito nukleofily a vznikajícími chinoniminy.



Obrázek 8. Předpokládané oxidační a redukční procesy azobarviv

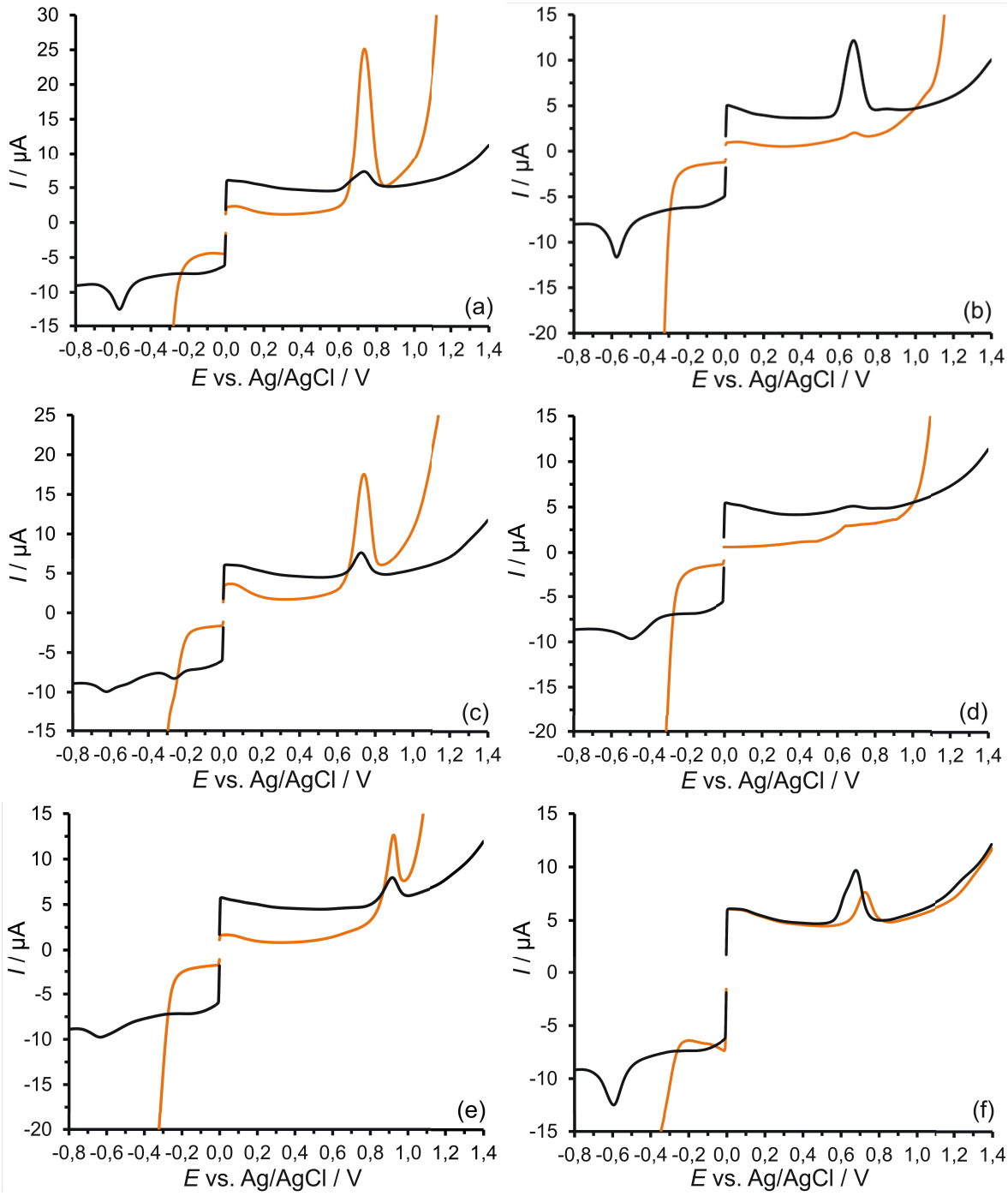
5.1.3 Square wave voltametrie azobarviv

Díky elektroaktivní azo skupině (-N=N-), se kterou lze azobarviva snadno elektrochemicky oxidovat, tak i redukovat, by bylo možné pomocí pulsních elektrochemických technik detekovat i jejich nízký obsah v léčivech. SWV představuje jednu ze dvou nejčastěji používaných technik, jež se otestovala v rámci kvalitativní analýzy zakoupeného léčiva. Tato technika díky vkládání potenciálových pulsů na napěťovou rampu o určité frekvenci dokáže výrazně eliminovat kapacitní proud (I_C), a tím výrazně zvýšit cítivost samotné detekce, tedy určit polohu (E_p) odpovídajícího píku. Naproti tomu výška píku (I_p) bývá velmi často přímo úměrná koncentraci barviva v roztoku a může tedy sloužit ke kvantifikaci.

Během měření se zkoušela jak anodická oxidace, tak i redukce. Oba tyto procesy se zároveň testovaly na GCE i CPE (Obr. 9.). V pravé horní části grafu vidíme oxidační píky a v levé dolní redukční píky. Oranžovou barvou jsou vyznačeny měření na CPE a černě jsou označeny měření s GCE. Z porovnání obdržených voltamogramů je zřejmé, že CPE se nehodí pro monitorování redukčních dějů azobarviv z důvodu přítomnosti vzduchu uvnitř elektrodového materiálu. Voltametrické záznamy na Obr. 9 ukazují výrazné oxidační píky azobarviv AR, BB, Tartrazinu a R2G na CPE. Naopak SY, CB a R2G neposkytují tak vysoké proudové výtěžky příslušných anodických oxidací azo skupin. Zde naopak těmto aditivům svědčí anodická přeměna na pevných elektrodových materiálech. Přítomnost kyslíku v CPE znemožňuje jakékoliv měření v redukční oblasti. Tudíž tento typ heterogenního elektrodového materiálu se zcela nehodí pro vývoj elektroanalytických metod využívající katodickou redukci azo skupiny.

Na GCE můžeme pozorovat jak oxidační, tak redukční píky. V redukční oblasti u di-azobarviv BB a CB lze pozorovat dvojici redukčních píků odpovídajících počtu azo skupin v molekule.

Pro budoucí elektrochemické stanovení AR, BB a Tartrazinu se hodí spíše využít jejich anodickou oxidaci na CPE. V případě R2G se nabízejí oba přístupy. Bohužel, CB za zvolených podmínek (neutrální prostředí) nepředstavuje tak elektroaktivní sloučeninu jako ostatní azobarviva. Na závěr lze podotknout, že neexistují univerzální pracovní podmínky, při kterých by bylo možné v budoucnu monitorovat azobarviva v léčivech.

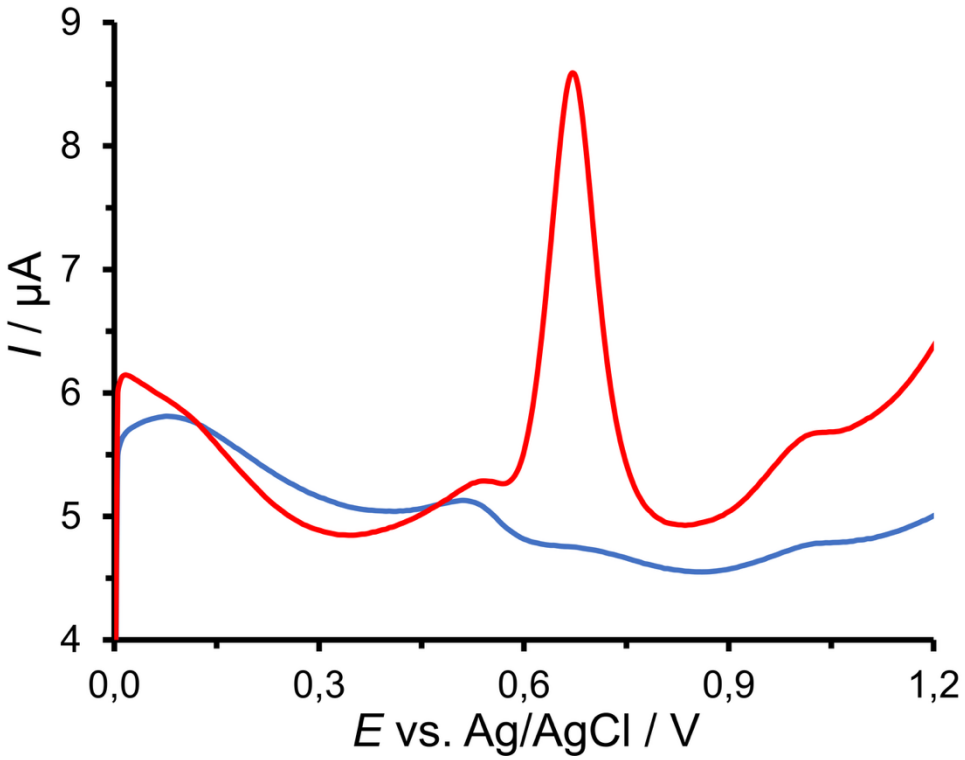


Obrázek 9. Square wave voltamogramy 1 mmol·l^{-1} (a), AR (b) SY (c), BB (d), CB (e), Tartrazinu a R2G (f) pořízených na GCE (černá) a CPE (oranžová křivka) v 0.1 mol·l^{-1} fosfátovém pufru (pH 7) při potenciálovém kroku 5 mV, potenciálové amplitudě 25 mV a frekvenci 10 Hz.

5.1.4 Elektrochemická detekce Sunset Yellow FCF ve vzorku léčiva

Samostatná elektrochemická detekce Sunset Yellow FCF ve vzorku léčiva se prováděla metodou SWV. Parametry elektrochemické detekce nebyly optimalizovány. V Obr. 10 je možné pozorovat modrou křivku léčiva s ne příliš vyvinutými píky. Tento fakt značně zkomplikoval schopnost přisoudit oxidační pík sledovanému aditivu. Proto se do 10 ml analyzovaného roztoku poté přidalo 100 µl zásobního roztoku o koncentraci 0,01 mol·l^{-1}, tak aby byl roztok vzorku obohacen o 100 µmol·l^{-1} SY. Opětovným proměřením vzorku po tomto přídavku se výrazně zvýšil oxidační pík SY při +0,669 V.

Díky tomuto přídavku bylo tak možné detekovat přítomnost aditiva SY. Důvodů, proč byl obdržený anodický pík SY v léčivu tak nevýrazný, může být několik, a to jeho nízký obsah, přítomnost jiných elektroaktivních látek, či negativní vliv matrice vzorku spočívající ve vysokém obsahu sladidel. V samotném léčivu se nachází i syntetické barvivo chinolinová žluť, jenž pravděpodobně rovněž podléhá anodické oxidaci za stejným pracovních podmínek jako SY, a tudíž lze přisoudit, že jeden z dvojce dalších píků přísluší právě tomuto aditivu.



Obrázek 10. Square wave voltamogramy vzorku léčiva (modrá) a s následným přidáním 100 µl standardu o koncentraci 0,01 mol·l^{-1} (červená křivka) v 0.1 mol·l^{-1} fosfátovém pufru (pH 7) při potenciálovém kroku 5 mV, potenciálové amplitudě 25 mV a frekvenci 10 Hz.

6 Závěr

Cyklická voltametrie se ukázala jako vhodná elektrochemická technika pro studium elektrodových reakcí vybraných azobarviv, které podléhají jak anodické oxidaci za vniku nestabilních meziproduktů na bázi oximů. Které se následně rozkládají až na deriváty naftochinonu nebo nitrososulfonáty. Během katodické redukce vznikají hydrazointermediáty, které se také dále štěpí na aminobenzensulfonáty, sulfonové deriváty nebo aminoderiváty naftolu. Ať už různě substituované aminobenzen sulfonáty nebo nitrosobenzen sulfonáty vyvolávají vážné obavy z jejich účinků na lidské zdraví.

V nedávných toxikologických studiích bylo experimentálně prokázáno, že lidské střevní mikroby s azoreduktázami mají schopnost štěpit azo vazby za vzniku identických redukčních produktů, konkrétně sulfonovaných aminobenzenů, naftylaminů a vysoce reaktivních derivátů 2-amino-1-naftolu. Tyto enzymy se podílejí především na biotransformaci xenobiotik s azofunkční skupinou. Bohužel existuje vážné riziko, že výsledné aromatické aminy mohou být dále podrobeny oxidačním reakcím katalyzovaným monooxygenázami za vzniku karcinogenních nitrosometabolitů. Vzhledem ke skutečnosti, že azobarviva nemají žádný terapeutický účinek, převládá ve společnosti názor, že vystavování lidského zdraví toxickým účinkům metabolitů azobarviv je zcela zbytečně riskantní. Legislativa v tomto směru poněkud pokulhává. I přes vědomí o škodlivosti azobarviv je jejich použití stále povoleno v řadě výrobků. Léčiva nejsou v tomto výjimkou. Naštěstí oproti potravinářskému průmyslu se do lékových forem tak často nepřidávají, a proto jejich denní příjem prostřednictvím léčiv není tak markantní.

S ohledem na možnosti elektrochemického stanovení azobarviv lze v roztoku detekovat pouze jedno azobarvivo. V případě, že v léčivu bude více azobarviv není tento přístup zcela vhodný, jelikož se odpovídající píky budou pravděpodobně překrývat, a tudíž jejich vzájemné rozeznání bude téměř nemožné. Stejně tak použití uhlíkových pastových elektrod má svá jistá omezení. Použití těchto heterogenních senzorů pro katodickou redukci není kvůli přítomnosti kyslíku v elektrodovém materiálu vyhovující.

Literatura

[1] MARMION Daniel. Colorants for foods, drugs, and cosmetics. In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 2012, 1–46 https://doi.org/10.1002/0471238961.0315121513011813.a01.pub3

[2] PÉREZ-IBARBIA L, T. MAJDANSKI, S. SCHUBERT, N. WINDHAB a U. S. SCHUBERT. Safety and regulatory review of dyes commonly used as excipients in pharmaceutical and nutraceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Science* ***93***, 2016, 264–273. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.08.026

[3] ŠULEKOVÁ M., M. SMRČOVÁ, A. HUDÁK, M. HEŽELOVÁ a M. FEDOROVÁ. Organic colouring agents in the pharmaceutical industry. *Folia Veterinaria* ***61***(3), 2017, 32–46. https://doi.org/10.1515/fv-2017-0025

[4] BISWAL P. K, MISHAR M. K, BHADOURIYA A. S, YADAV V. K. An updated review on colorants as the pharmaceutical excipients. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences* ***5***(4), 2015, 1004–1017

[5] MARMION D. M. Handbook of U.S. colorants: foods, drugs, cosmetics, and medical devices. 3rd ed. New York: Wiley, 1991. ISBN 0-471-50074-7

[6] SHAH, H., A. JAIN, G. LAGHATE a D. PRABHUDESAI. Chapter 32 - Pharmaceutical excipients. Remington: The science and practice of pharmacy. 2021, 633–643. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820007-0.00032-5

[7] JI CH., W. CHENG, Q. YUAN, K. MÜLLEN a M. YIN. From dyestuff chemistry to cancer theranostics: The rise of rylenecarboximides. *Accounts of Chemical Research* ***52***(8), 2019, 2266–2277. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00221

[8] KUČEROVÁ J. a H. KOTOLOVÁ. Toxicita barviv používaných v léčivých přípravcích. *Farmacie pro praxi* ***9***(2), 2013, 83–89. http://solen.cz/artkey/lek-201302-0008_Toxicita_barviv_pouzivanych_v_lecivych_pripravcich.php

[9] Směrnice číslo 2009/35 o barvivech, která mohou být přidávána do léčivých přípravků. Sbírka směrnic. 2009, číslo 35. s. 10–13. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX%3A32009L0035 [cit. 2025-05-15]

[10] Směrnice číslo 95/45 kterou se stanoví specifická kritéria pro čistotu týkající se barviv pro použití v potravinách. Sbírka směrnic. 1995, číslo 45. s. 1–45. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=celex%3A31995L0045 [cit. 2025-05-15]

[11] Nařízení číslo 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách. Sbírka nařízení. 2008, číslo 1333. s 16–33. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/cs/ALL/?uri=CELEX:32008R1333 [cit. 2025-05-15]

[12] Vyhláška č. 4/2008 Sb. kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. Sbírka vyhlášek. 2008, částka 3, číslo 4. https://mze.gov.cz/public/portal/mze/legislativa/vap65967-14196 [cit. 2025-05-15]

[13] *EUR-Lex - 02008R1333-20241216 - CS - EUR-Lex*. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A02008R1333-20241216#M98-4 [cit. 2025-05-15]

[14] WHO, JECFA. https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database [cit. 2025-05-15]

[15] Food Additives and E Numbers — DermNet. https://dermnetnz.org/topics/food-additives-and-e-numbers [cit. 2025-05-15]

[16] ADI, European Food Safety Authority, https://www.efsa.europa.eu/en/glossary/adi [cit. 2025-05-15]

[17] SINGH T., V. K. PANDEY, K. K. DASH, S. ZANWAR a R. SINGH. Natural bio–colorant and pigments: Sources and applications in food processing. *Journal of Agriculture and Food Research* ***12***, 2023,100628. https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100628

[18] MUTHUMANICKAM A., K. RAO, K. KUMAR a C. CHETTY. *Medicinal importance of natural dyes-a review*. 2nd ed, 2010, 144–154. https://www.researchgate.net/publication/265043367

[19] GRAPE E. S., T. WILLHAMMAR a A. K. INGE. Brilliantly red: the structure of carmine. *ChemRxiv* 2024. https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2024-30t84-v2

[20] SIGURDSON G. T., P. TANG a M. M. GIUSTI. Natural colorants: Food colorants from natural source, *Annual Review of Food Science and Technology* ***8***, 2017, 261–80. https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025923

[21] ALEGBE E. O. a T. O. UTHMAN. A review of history, properties, classification, applications and challenges of natural and synthetic dyes. *Heliyon* ***10***(13), 2024. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e33646

[22] TKACZYK A., K. MITROWSKA a A. POSYNIAK. Synthetic organic dyes as contaminants of the aquatic environment and their implications for ecosystems: A review. *Science of The Total Environment* ***717***, 2020,137222. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137222

[23] DAND Ch., A. BAJAJ a S. WAIRKAR. EFSA prohibits titanium dioxide in food–should pharmaceuticals be next? *Toxicology* ***513***. 2025, 154089. https://doi.org/10.1016/j.tox.2025.154089

[24] WINKLER H. Ch., T. NOTTER, U. MEYER a H. NAEGELI. Critical review of the safety assessment of titanium dioxide additives in food. *Journal of Nanobiotechnology* ***16***(51), 2018. https://doi.org/10.1186/s12951-018-0376-8

[25] *N,N,N',N'*-Tetramethylacridine-3,6-diamine monohydrochloride, compound with zinc dichloride | $C_{17}H_{20}C_{l3}N_3Zn$ | CID 159263 - PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/159263 [cit. 2025-05-15]

[26] Alizarin | $C_{14}H_8O_4$ | CID 6293 – PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6293 [cit. 2025-05-15]

[27] C.I. Solvent Yellow 14 | $C_{16}H_{12}N_2O$ | CID 13297 - PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/13297 [cit. 2025-05-15]

[28] Neutral Red | $C_{15}H_{17}ClN_4$ | CID 11105 - PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11105#section=SMILES [cit. 2025-05-15]

[29] Auramine O | $C_{17}H_{22}ClN_3$ | CID 17170 - PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/17170 [cit. 2025-05-15]

[30] Indigo carmine | $C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$ | CID 2723854 – PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2723854#section=Computed-Descriptors [cit. 2025-05-15]

[31] Propanedinitrile, 2-[2-[[4-(dihexylamino)-2-methylphenyl]methylene]-1,1-dioxidobenzo[b]thien-3(2H)-ylidene]- | $C_{31}H_{37}N_3O_2S_2$ | CID 6441367 – PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6441367#section=3D-Conformer [cit. 2025-05-15]

[32] Martius Yellow | $C_{10}H_6N_2O_5$ | CID 11802 - PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11802#section=3D-Conformer [cit. 2025-05-15]

[33] C.I. Acid Green 1 | $C_{30}H_{15}FeN_3Na_3O_{15}S_3$ | CID 6915910 - PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6915910#section=3D-Conformer [cit. 2025-05-15]

[34] SHU H. Y. a M. Ch. CHANG. Decolorization and mineralization of a phthalocyanine dye C.I. Direct Blue 199 using UV/H_2O_2 process. *Journal of Hazardous Materials* ***125***(1–3), 2005, 96–101. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.05.016

[35] Methylene Blue | $C_{16}H_{18}ClN_3S$ | CID 6099 - PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6099 [cit. 2025-05-15]

[36] Rhodamine B | $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$ | CID 6694 - PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6694 [cit. 2025-05-15]

[37] BENKHAYA S., S. M'RABET a A. EL HARFI. Classifications, properties, recent synthesis and applications of azo dyes. *Heliyon* ***6***(1), 2020. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03271

[38] CHUDGAR R. J. Azo Dyes. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 2003. https://doi.org/10.1002/0471238961.01261503082104.a01.pub2

[39] KHANUM R., R. A. SHOUKAT ALI, H. R. RANGASWAMY, S. R. SANTHOSH KUMAR, A. G. PRASHANTHA a A. S. JAGADISHA. Recent review on synthesis, spectral studies, versatile applications of azo dyes and its metal complexes. *Results in Chemistry* **5**, 2023, 100890. https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.100890

[40] AMCHOVA P., H. KOTOLOVA a J. RUDA-KUCEROVA. Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* ***73***(3), 2015, 914922. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026

[41] Nařízení - 232/2012 - EN - EUR-Lex. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=celex%3A32012R0232 [cit. 2025-05-15]

[42] FENG J., C. E. CERNIGLIA a H. CHEN. Toxicological significance of azo dye metabolism by human intestinal microbiota. *Frontiers in bioscience* ***4***(2), 2012, 568–586. https://doi.org/10.2741/e400

[43] BARCIELA P., A. PEREZ-VAZQUEZ a M. A. PRIETO. Azo dyes in the food industry: Features, classification, toxicity, alternatives, and regulation. *Food and Chemical Toxicology* ***178***, 2023, 113935. https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113935

[44] KANEKAR H., A. KHALE a M. H. KANEKAR. Coloring agents: Current regulatory perspective for coloring agents intended for pharmaceutical & cosmetic use. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research* ***3***(5), 2014, 365–373

[45] PŘÍHODOVÁ I. Porucha pozornosti s hyperaktivitou (attention deficit/hyperactivity disorder – ADHD). *Česká a Slovenská Neurologie a Neurochirurgie* ***74/107***(4), 2011, 408–418.

[46] MILLER M. D., C. STEINMAUS, M. S. GOLUB, R. CASTORINA, R. THILAKARTNE, A. BRADMAN a M. A. MARTY. Potential impacts of synthetic food dyes on activity and attention in children: a review of the human and animal

evidence. *Environmental Health* ***21***(45), 2022, 1–19. https://doi.org/10.1186/s12940-022-00849-9

[47] FEKETEA G. a S. TSABOURI. Common food colorants and allergic reactions in children: Myth or reality? *Food Chemistry* ***230***, 2017, 578–588. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.043

[48] BALTA I., B. SEVASTRE, V. MIREŞAN, M. TAULESCU, C. RADUCU, A. L. LONGODOR, Z. MARCHIŞ, C. S. MARIŞ a A. COROIAN. Protective effect of blackthorn fruits (*Prunus spinosa*) against tartrazine toxicity development in albino Wistar rats. *BMC Chemistry* ***13***(104), 2019, 1–11. https://doi.org/10.1186/s13065-019-0610-y

[49] ČSN EN ISO 16373-2. Textilní výrobky – Stanovení barviva v textilních výrobcích – Část 2: Identifikace barviv extrakcí a tenkovrstvou chromatografií (TLC).

[50] NI Y. a X. GONG. Simultaneous spectrophotometric determination of mixtures of food colorants. *Analytica Chimica Acta* ***354***(1–3), 1997, 163–171. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00297-3

[51] OAKES J., S. N. BATCHELOR a S. DIXON. Azo dye location in textiles: A novel UV-vis approach. *Coloration Technology* ***121***(5), 2005, 237–244. https://doi.org/10.1111/j.1478-4408.2005.tb00279.x

[52] ONDRÁČKOVÁ A., M. STIBOROVÁ, H. DRAČÍNSKÁ, L. HAVRAN, K. SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ a M. FOJTA. A study on redox reactions of the azo dye Sudan I and its hydroxylated metabolites on pyrolytic graphite and boron doped diamond electrodes to support electrochemical studies of metabolic transformations. *Electrochimica Acta* ***468***, 2023, 143162. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2023.143162

[53] PLIUTA K., A. CHEBOTAREV, A. PLIUTA a D. SNIGUR. Voltammetric determination of allura red AC onto carbone-paste electrode modified by silica with embedded cetylpyridinium chloride. *Electroanalysis* ***33***(4), 2021, 987–992. https://doi.org/10.1002/elan.202060367

[54] KALCHER K., I. SVANCARA, M. BUZUK, K. VYTRAS a A. WALCARIUS. Electrochemical sensors and biosensors based on heterogeneous carbon materials. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* ***140***, 2009, 861–889. https://doi.org/10.1007/s00706-009-0131-9

[55] WANG J., Ü. A. KIRGÖZ, J.-W. MO, J. LU, A. N. KAWDE a A. MUCK. Glassy carbon paste electrodes. *Electrochemistry Communications* ***3***(4), 2001, 203–208. https://doi.org/10.1016/S1388-2481(01)00142-4

[56] ELGRISHI N., K. J. ROUNTREE, B. D. MCCARTHY, E. S. ROUNTREE, T. T. EISENHART a J. L. DEMPSEY. A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education* ***95***(2), 2017, 197–206. https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361

[57] MIRCESKI V., S. SKRZYPEK a L. STOJANOV. Square-wave voltammetry. *ChemTexts* ***4***(17), 2018, 1–14. https://doi.org/10.1007/s40828-018-0073-0

[58] M. MOMENI, D. NEMATOLLAHI, New insights into the electrochemical behavior of acid orange 7: Convergent paired electrochemical synthesis of new aminonaphthol derivatives. Scientific Reports *7*, 2017, 41963. https://doi.org/10.1038/srep41963

Přílohy

4.3 Kontraindikace

Hypersenzitivita na léčivé látky nebo na kteroukoli pomocnou látku uvedenou v bodě 6.1.

4.4 Zvláštní upozornění a opatření pro použití

Pediatrická populace
Vzhledem k riziku udušení nemá být přípravek používán dětmi do 6 let.

Nedoporučuje se dlouhodobé používání přípravku. V případě, že nedojde ke zlepšení nebo se příznaky často vracejí, je nutné kontaktovat lékaře.

Přetrvávají-li příznaky onemocnění déle než 3 dny, zhoršují-li se nebo se objevily jiné příznaky jako vysoká horečka, bolest hlavy, nauzea nebo zvracení a kožní vyrážka, má se provést vyšetření na bakteriální infekce (angina, tonzilitida).

Doporučená dávka se nemá překračovat.

Upozornění o pomocných látkách:
Tento léčivý přípravek obsahuje maltitol a isomalt. Pacienti se vzácnými dědičnými problémy s intolerancí fruktózy nemají tento přípravek používat.
Může mít mírný projímavý účinek.
Energetická hodnota maltitolu nebo isomaltu je 9,66 kJ/g (2,3 kcal/g).

Tento léčivý přípravek obsahuje méně než 1 mmol (23 mg) sodíku v jedné dávce, to znamená, že je v podstatě „bez sodíku“.

Tento léčivý přípravek obsahuje oranžovou žluť SY, která může způsobit alergické reakce.

4.5 Interakce s jinými léčivými přípravky a jiné formy interakce

Nejsou známy žádné klinicky významné interakce.

4.6 Fertilita, těhotenství a kojení

Těhotenství
Bezpečnost přípravku Orasept v těhotenství nebyla stanovena.
Nejsou k dispozici žádné údaje o používání amylmetakresolu a dichlorbenzylalkoholu jako farmakologicky účinných látek v průběhu těhotenství. Protože nejsou k dispozici zdokumentované zkušenosti, používání přípravku Orasept se během těhotenství nedoporučuje.

Kojení
Bezpečnost přípravku Orasept během kojení nebyla stanovena.
Nejsou k dispozici žádné údaje o vylučování amylmetakresolu a dichlorbenzylalkoholu do lidského mateřského mléka.
Protože nejsou k dispozici zdokumentované zkušenosti, používání přípravku Orasept se během kojení nedoporučuje.

Fertilita
Nejsou k dispozici žádné údaje o vlivu amylmetakresolu a dichlorbenzylalkoholu na fertilitu.

4.7 Účinky na schopnost řídit a obsluhovat stroje

Přípravek Orasept nemá žádný nebo zanedbatelný vliv na schopnost řídit nebo obsluhovat stroje.

4.8 Nežádoucí účinky

Četnost nežádoucích účinků je definována takto: velmi časté (≥ 1/10); časté (≥ 1/100 až < 1/10); méně časté (≥ 1 000 až < 1/100); vzácné (≥ 1/10 000 až < 1/1 000); velmi vzácné (< 1/10 000), není známo (z dostupných údajů nelze určit).

Poruchy imunitního systému
Vzácné: hypersenzitivní reakce včetně vyrážky, pálení, svědění a otoku v ústech nebo hrdle.

Respirační, hrudní a mediastinální poruchy
Není známo: dyspnoe.

Gastrointestinální poruchy
Není známo: bolestivý jazyk (glosodynie) a gastrointestinální obtíže jako dyspepsie a nauzea.

Poruchy kůže a podkožní tkáně
Není známo: kopřivka, angioedém.

Hlášení podezření na nežádoucí účinky
Hlášení podezření na nežádoucí účinky po registraci léčivého přípravku je důležité. Umožňuje to pokračovat ve sledování poměru přínosů a rizik léčivého přípravku. Žádáme zdravotnické pracovníky, aby hlásili podezření na nežádoucí účinky na adresu:
Státní ústav pro kontrolu léčiv
Šrobárova 48
100 41 Praha 10
Webové stránky: http://www.sukl.cz/nahlasit-nezadouci-ucinek

4.9 Předávkování

S ohledem na povahu a formu přípravku Orasept je náhodné nebo úmyslné předávkování vysoce nepravděpodobné.
Předávkování může vyvolat gastrointestinální diskomfort.
Jiný problém, než je gastrointestinální diskomfort by předávkování nemělo představovat. Léčba má být symptomatická.

5. FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI

5.1 Farmakodynamické vlastnosti

Farmakoterapeutická skupina: krční léčiva, antiseptika
ATC kód: R02AA03
Amylmetakresol a 2,4-dichlorbenzylalkohol mají antiseptické vlastnosti.

5.2 Farmakokinetické vlastnosti

Nejsou dostupné žádné údaje.

5.3 Předklinické údaje vztahující se k bezpečnosti

Neklinické údaje týkající se amylmetakresolu a dichlorbenzylalkoholu neodhalily žádné zvláštní riziko pro člověka. Tyto údaje pocházejí z konvenčních studií toxicity po jednorázovém a opakovaném podání, genotoxicity a reprodukční toxicity. Nebyly provedeny studie týkající se farmakologické bezpečnosti a kancerogenity.

6. FARMACEUTICKÉ ÚDAJE

6.1 Seznam pomocných látek

Silice máty peprné
Chinolinová žluť (E104)
Sodná sůl sacharinu (E954)
Kyselina vinná (E334)
Oranžová žluť SY (E110)
Citronová esence
Tekuté medové aroma
Isomalt (E953)
Maltitol (E965)

6.2 Inkompatibility

Neuplatňuje se.

6.3 Doba použitelnosti

3 roky

6.4 Zvláštní opatření pro uchovávání

Tento léčivý přípravek nevyžaduje žádné zvláštní podmínky uchovávání.

6.5 Druh obalu a obsah balení

PVC-PVDC/Al blistr.
Jedno balení obsahuje 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 40 nebo 48 pastilek.
Na trhu nemusí být všechny velikosti balení.

6.6 Zvláštní opatření pro likvidaci přípravku a pro zacházení s ním

Žádné zvláštní požadavky.
Veškerý nepoužitý léčivý přípravek nebo odpad musí být zlikvidován v souladu s místními požadavky.

7. DRŽITEL ROZHODNUTÍ O REGISTRACI

Dr. Max Pharma s.r.o.
Na Florenci 2116/15
Nové Město
110 00 Praha 1
Česká republika

8. REGISTRAČNÍ ČÍSLO

69/051/16-C

9. DATUM PRVNÍ REGISTRACE/PRODLOUŽENÍ REGISTRACE