

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Markéta Bauerová

**Stanovení účinných látek a případných degradačních produktů  
v historickém vzorku přípravku Algena z roku 1981**

Determination of active substances and possible degradation  
products in a historical sample of Algena from 1981

Bakalářská práce

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

Praha 2024

## **Prohlášení**

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

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

V Praze dne 15. května 2024

Markéta Bauerová

## Abstrakt

Tableta Algena bylo léčivo volně dostupné na trhu v druhé polovině dvacátého století v Československu. Algena byla užívána především proti bolestem. Tableta obsahuje čtyři účinné látky: aminofenazon, aprobarbital, fenaacetin a kofein. Cílem této práce bylo analyzovat účinné látky v historické tabletě Algeny z roku 1981, stanovit jejich koncentrace a případné rozkladné produkty. Aby byly tyto cíle splněny, bylo třeba vyvinout a optimalizovat RP-HPLC metodu s UV detekcí. Dále byla použita HPLC-MS, která měla sloužit k odhalení případných degradačních produktů. Separace probíhala na koloně XBridge® BEH C18 (150×3,0 mm; 2,5 μm), byla použita binární gradientová eluce, kdy první složkou byl 0,1% roztok octové kyseliny ve vodě, druhou složkou byl methanol. Stanovené obsahy účinných látek (vzhledem k deklarovanému obsahu výrobcem) byly: aminofenazon 97,0 %, aprobarbital 89,2 %, fenaacetin 96,0 % a kofein 93,2 %. Hmotnostní detekcí nebyly prokázány žádné degradační produkty stanovovaných látek.

**Klíčová slova:** Algena, aminofenazon, aprobarbital, degradace, fenaacetin, kofein, RP-HPLC

## Abstract

The Algena tablet was an over-the-counter drug in the second half of the twentieth century in Czechoslovakia. Algena was mainly used against pain. The tablet contains four active substances: aminophenazone, aprobarbital, phenacetin, and caffeine. The aim of this thesis was to analyse the active substances in the Algena tablet from 1981, determine their content, and possible degradation products. To complete these goals the RP-HPLC method with UV detection had to be involved and optimized. HPLC-MS was used to detect possible degradation products. Separation was performed on the XBridge® BEH C18 column (150×3.0 mm; 2.5 μm), binary elution was used. The first component of the mobile phase was 0.1% aqueous solution of acetic acid and the second component was methanol. The determined contents of active substances (decelerated by the manufacturer) were: aminophenazone 97.0%, aprobarbital 89.2%, phenacetin 96.0% and caffeine 93.2%. Degradation products of the active substances were not detected by HPLC with MS detection.

**Key words:** Algena, aminophenazone, aprobarbital, caffeine, degradation, phenacetin, RP-HPLC

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D. za odborné vedení práce, ochotu, vstřícnost a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za všechnu podporu během studia.

## Obsah

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Cíl práce .....  | 7  |
| 2     | Teoretická část .....                                    | 8  |
| 2.1   | Stabilita léčiv a lékových forem .....                   | 8  |
| 2.2   | Léčivý přípravek Algena .....                            | 9  |
| 2.3   | Účinné látky Algeny .....                                | 9  |
| 2.3.1 | Aminofenazon .....                                       | 10 |
| 2.3.2 | Aprobarbital .....                                       | 11 |
| 2.3.3 | Fenacetin .....  | 11 |
| 2.3.4 | Kofein .....   | 13 |
| 2.4   | Stabilita účinných látek Algeny .....                    | 15 |
| 2.5   | Stanovení účinných látek Algeny .....                    | 16 |
| 3     | Experimentální část .....                                | 18 |
| 3.1   | Analyzovaný vzorek tablety Algena .....                  | 18 |
| 3.2   | Použité chemikálie .....                                 | 19 |
| 3.3   | Příprava mobilní fáze .....                              | 19 |
| 3.4   | Příprava zásobních roztoků standardů .....               | 19 |
| 3.5   | Příprava kalibračních roztoků .....                      | 19 |
| 3.6   | Příprava roztoku autentického vzorku Algena .....        | 20 |
| 3.7   | Měření pomocí HPLC-UV .....                              | 20 |
| 3.8   | Měření pomocí HPLC-MS .....                              | 20 |
| 3.9   | Statistické zpracování naměřených dat .....              | 20 |
| 4     | Výsledky a diskuse .....                                 | 21 |
| 4.1   | Optimalizace separačních podmínek .....                  | 21 |
| 4.2   | Kalibrační závislosti pro stanovení účinných látek ..... | 24 |
| 4.3   | Opakovatelnost stanovení .....                           | 26 |
| 4.4   | Analýza autentického vzorku tablet Algena .....          | 26 |
| 5     | Závěr .....  | 29 |
|       | Literatura.....  | 30 |

---

## Seznam zkratk a symbolů

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <i>a</i>              | směrnice lineární regrese kalibrační závislosti [ $\mu\text{AU min mg}^{-1}\text{dm}^3$ ] |
| <i>A</i>              | plocha chromatografického píku [ $\mu\text{AU min}$ ]                                     |
| <i>b</i>              | úsek lineární regrese kalibrační závislosti [ $\mu\text{AU min}$ ]                        |
| <i>c</i>              | koncentrace [ $\text{mg dm}^{-3}$ ]   |
| <i>LOD</i>            | limit detekce [ $\text{mg dm}^{-3}$ ]   |
| <i>LOQ</i>            | limit stanovitelnosti [ $\text{mg dm}^{-3}$ ]   |
| <i>R</i>              | rozlišení chromatografických píků   |
| <i>R</i> <sup>2</sup> | koeficient determinace  |
| <i>RSD</i>            | relativní směrodatná odchylka   |
| <i>t<sub>r</sub></i>  | retenční čas píku [min]   |
| TIC                   | celkový proud iontů (angl. total-ion current)   |
| <i>w</i>              | šířka píku při základně [min]   |

## **1 Cíl práce**

Tato bakalářská práce se zaměřuje na analýzu účinných látek v historické tabletě Algena, od jejíž výroby uplynulo v době analýzy 43 let. Práce byla zaměřena zejména na kvalitativní a kvantitativní obsah účinných látek v tabletě a na prozkoumání jejich dlouhodobé stability. Aby byly tyto cíle splněny, bylo potřeba vyvinout a optimalizovat metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie a bylo třeba provést identifikaci případných degradačních produktů pomocí hmotnostní detekce.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Stabilita léčiv a lékových forem

Fyzikální a chemická degradace léčiv a léčivých forem může mít za následek nejen změnu terapeutické účinnosti, ale v extrémních případech se mohou objevovat také toxické účinky<sup>1</sup>. Proto je třeba vždy udržovat léčivé látky, respektive jejich lékové formy, dostatečně stabilní a v odpovídající kvalitě do doby jejich použití nebo do stanoveného data jejich expirace. Kvalita lékové formy musí být zachována vzhledem ke všem podmínkám, kterým bude léčivo vystaveno ať už během výroby, skladování na skladech s různými podmínkami, přepravě či v domácnosti.

Nejvíce studovaná je nestabilita především účinné (někdy také pomocné) látky, kdy se při její degradaci nejenže sníží účinnost léčivého přípravku, ale hrozí i vznik toxické látky. Proto je velice důležité se zabývat nejen tím kolik látky se časem přemění, ale také tím, jaký bude výsledný degradační produkt.

Některá léčiva jsou velice citlivá na změnu pH, proto je třeba zajistit, a to především u léčiv podávaných perorálně a tím pádem procházejících celým gastrointestinálním traktem, aby byly dostatečně stabilní po celou dobu působení.

Jednou ze stabilit léčivých látek, která je studována, je fyzikální stabilita, kdy může časem a vlivem vnějších faktorů docházet k přechodu léčivé, či pomocné látky na jejich termodynamicky stabilnější produkty.

Druhou zkoumanou stabilitou je chemická stabilita daných léčivých látek. Ovlivňuje ji samotná molekulová struktura, která může poskytnout přístup degradačním procesům, z nichž je to nejčastěji oxidace, hydrolýza, dehydratace, izomerace a fotodegradace<sup>2</sup>. Tyto degradační procesy jsou často ovlivněny vnějšími faktory jako jsou teplota, pH, světlo, vlhkost, přítomnost vzduchu (kyslíku) a iontová síla.

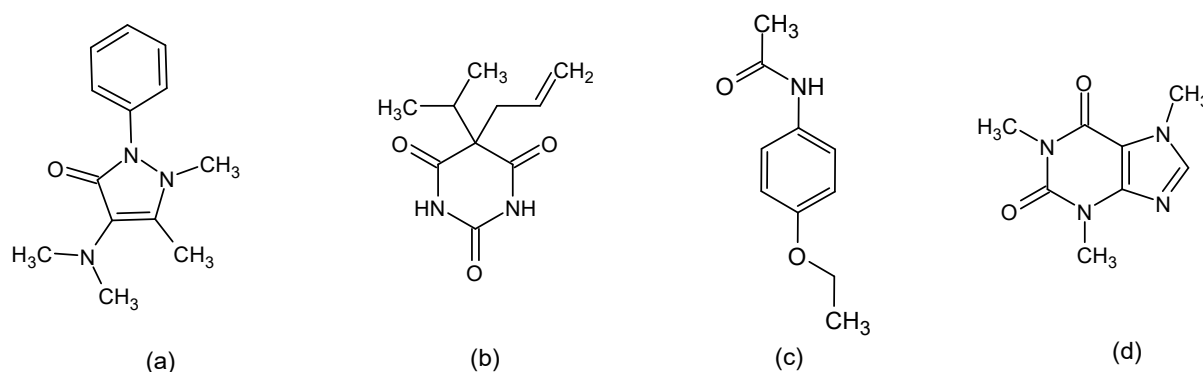
Léčiva, která podlehla degradaci lze často rozpoznat od stabilních léčiv estetickou změnou jako je jiná barva či zápach.

## 2.2 Léčivý přípravek Algena

Léčivý přípravek Algena byl distribuován v podobě tablet. Každá tableta obsahovala čtyři účinné látky: aminofenazon, aprobarbital, fenacetin a kofein. Tento léčivý přípravek byl používán v 60. až 90. letech dvacátého století v Československu jako analgetikum, které bylo nejprve dostupné k volnému prodeji<sup>3</sup>. Dvě z účinných látek obsažených v Algeně, aprobarbital a fenacetin, mohou působit jako euforické látky<sup>4</sup>, což vedlo postupně ke zneužívání tohoto léčivého přípravku, kvůli čemuž si na něm řada lidí vypěstovala závislost. Bylo odhadováno, že drogová závislost zasáhla až 3 % populace Československa<sup>5</sup>. Byla snaha prodej Algeny zmírnit, a proto byl na trh uveden nový produkt Algenol. Ten obsahoval místo fenacetinu acetylsalicylovou kyselinu, avšak byl přidán i kodein, který je z 10 % metabolizován na morfin. Algena byla dostupná k volnému prodeji do roku 1971, kdy byla převedena na výdej na lékařský předpis. Téměř okamžitě byla nahrazena volně prodejným přípravkem Dinyl, který ale měl téměř stejné složení: aminofenazon 200 mg, allobarbital 18 mg, butobarbital 12 mg, fenacetin 200 mg a kofein 50 mg.

## 2.3 Účinné látky Algeny

Algena obsahovala celkem čtyři účinné látky: aminofenazon, aprobarbital, fenacetin a kofein, jejichž struktury jsou znázorněny na obr. 2.1.

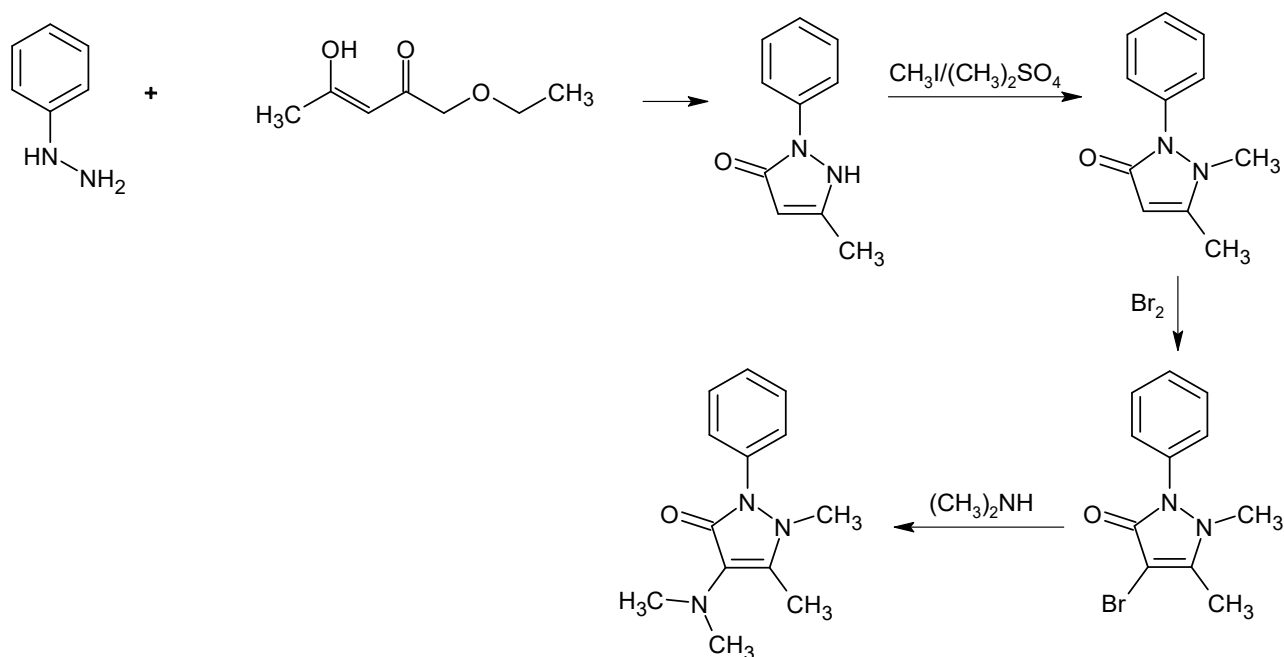


Obr. 2.1 Chemické struktury účinných látek Algeny: (a) aminofenazon (b) aprobarbital (c) fenacetin (d) kofein.

### 2.3.1 Amionfenazon

*Chemické vlastnosti.* Systematický název aminofenazonu je 4-(dimethylamino)-1,2-dihydro-1,5-dimethyl-2-fenyl-3H-pyrazol-3-on. Dále je také znám pod triviálním názvem aminopyrin. Jeho CASRN je 58-15-1 a jeho struktura je uvedena na obr. 2.1. Relativní molekulová hmotnost aminofenazonu je 231,29. Jedná se o malý bezbarvý krystal nebo bílý krystalický prášek, bez zápachu a s typickou hořkou chutí. Teplota tání je 107–109 °C. Je to derivát fenazonu.

*Objev a syntéza.* Fenazon byl poprvé syntetizován Ludwigem Knorrem z fenylylhydrazinu a ethylacetoacetátu jejichž kondenzací vzniká 1-fenyl-3-methylpyrozolon a následnou methylovací vzniká právě fenazon<sup>6,7</sup>. Bromací fenazonu a následnou reakcí produktu s dimethylaminem lze získat aminofenazon. Aminofenazon poprvé připravil roku 1893 německý chemik Friedrich Stolz<sup>8</sup>. Schéma přípravy aminofenazonu je na obr. 2.2.



Obr. 2.2 Schéma syntézy aminofenazonu.

*Farmakologické vlastnosti.* Aminofenazon a fenazon vykazují nejen antipyretické a analgetické vlastnosti, ale také protizánětlivé účinky<sup>6</sup>. Aminofenazon byl velice populární do šedesátých let dvacátého století, kdy byl jeho výskyt na trhu značně omezen pro jeho nepříznivé vedlejší účinky, jako je agranulocytóza<sup>8</sup>. Aminofenazon je podáván orálně a asi 30 až 50 % podané dávky se vyloučí močí během tří dnů (cit.<sup>6,9</sup>). Denní dávka se pohybuje mezi 300–500 mg (cit.<sup>6</sup>). Nejnižší zjištěná letální dávka je 5 g (cit.<sup>9</sup>).

### 2.3.2 Aprobarbital

*Chemické vlastnosti.* Syntetický název aprobarbitalu je 5-(1-methylethyl)-5-(2-propen-1-yl)-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-pyrimidintrion). Jeho CASRN je 77-02-1. Struktura aprobarbitalu je uvedena na obr. 2.1. Jeho relativní molekulová hmotnost je 210,23. Teplota tání je 140–141,5°C.

*Objev a syntéza.* Aprobarbital patří do skupiny barbiturátů, což jsou deriváty barbiturové kyseliny, kterou poprvé syntetizoval Adolf von Baeyer roku 1864 kondenzací malonové kyseliny s močovinou<sup>8,10</sup>. Aprobarbital poprvé syntetizoval roku 1922 švýcarský chemik Ernst Preiswerk<sup>11</sup>.

*Farmakologické vlastnosti.* Barbituráty mají mnoho terapeutických využití<sup>10,12</sup>. Během dvacátého století jich bylo syntetizováno více než 2500, avšak v klinické praxi jich bylo využito okolo padesáti. Byly používány k léčbě poruch spánku, epileptických záchvatů, nebo sloužily k intravenózní anestezii. Používání návykových barbitalů začalo upadat po objevu benzodiazepinů. Aprobarbital se dnes používá na insomnii neboli nespavost.

### 2.3.3 Fenacetin

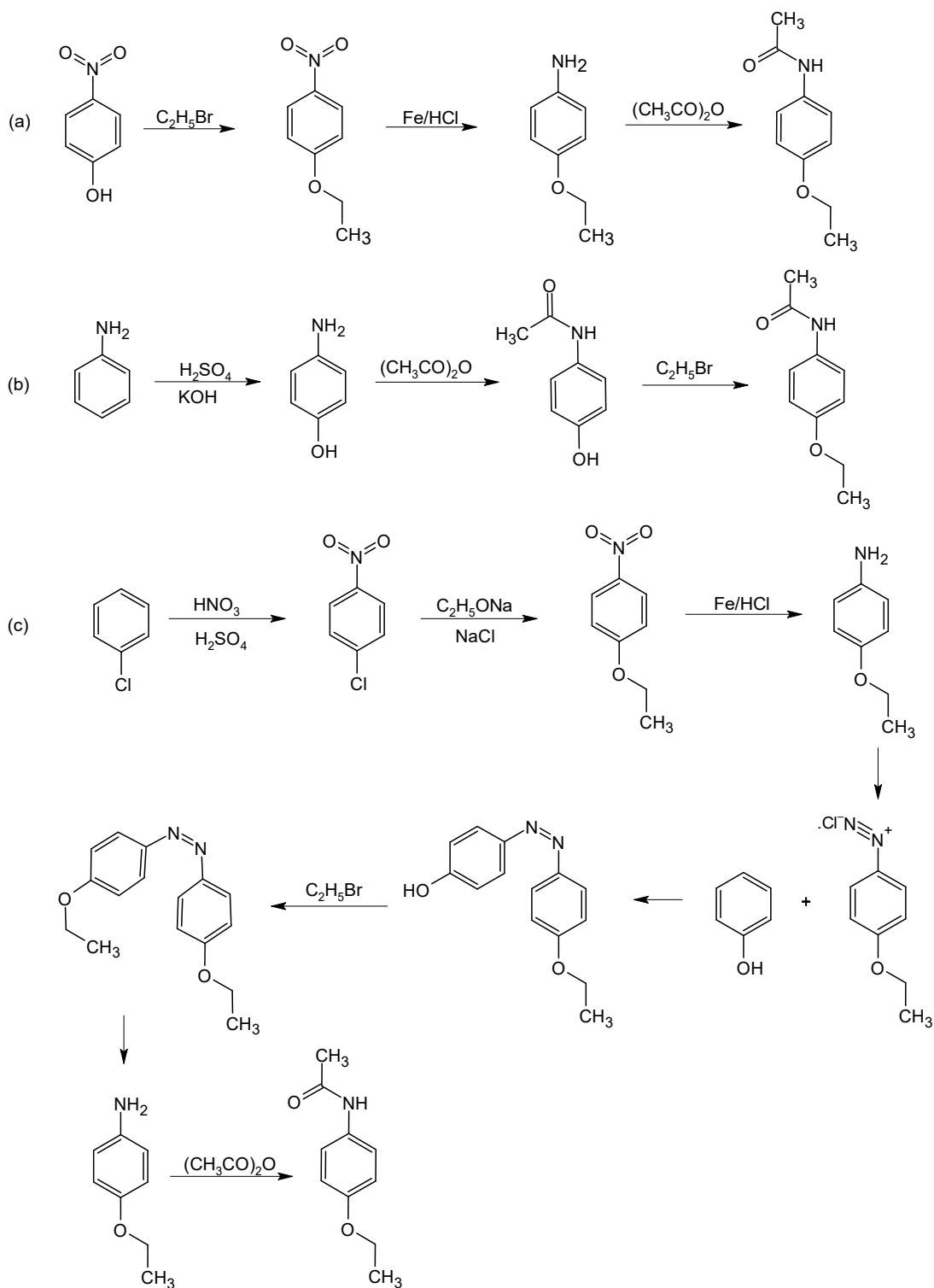
*Chemické vlastnosti.* Syntetický název této látky je *N*-(4-ethoxyfenyl)-acetamid, jeho CASRN je 62-44-2 a jeho struktura je uvedena na obr. 2.1. Molekulová relativní hmotnost fenacetinu je 179,22. Je to jemná bílá krystalická látka bez zápachu s lehce nahořklou chutí. Fenacetin spadá do třídy acetamidů a aromatických etherů. Teplota tání je 134–135 °C.

*Objev a syntéza.* Poprvé fenacetin připravil německý chemik Oscar Hinsberg roku 1887, který hledal využití pro *p*-nitrofenol, který byl vedlejším produktem barvení<sup>8</sup>.

Fenacetin lze připravit třemi způsoby<sup>6</sup>, které jsou znázorněny na obr. 2.3:

- (a) Kondenzací *p*-nitrofenolu s ethylbromidem. Následuje redukce meziprojektu a poté acetylace pomocí anhydridu octové kyseliny na fenacetin.
- (b) Reakcí anilinu rozpuštěného v kyselině sírové s hydroxidem draselným na *p*-aminofenol. Následuje acetylace pomocí anhydridu octové kyseliny na *p*-hydroxyacetanilid. Posledním krokem syntézy je ethylace pomocí ethylbromidu na fenacetin.

(c) Nitrací chlorbenzenu a následnou reakcí meziprojektu s ethoxidem sodným vzniká *p*-ethoxynitrobenzen. Následuje redukce a diazotace s fenolem za přítomnosti kyseliny dusičné při 0 °C, acetylace ethylbromidem a následná redukce. Acetylací pomocí anhydridu octové kyseliny vzniká fenacetin.



Obr. 2.3 Syntéza fenacetinu z (a) *p*-nitrofenolu; (b) anilinu; (c) chlorbenzenu.

*Farmakologické vlastnosti.* Fenacetin byl používán jako analgetikum a antipyretikum<sup>4</sup>. Ve vyšších dávkách působil až euforicky, a to především v kombinaci s kofeinem. Právě díky euforickým účinkům byly časté chronické otravy fenacetinem, kdy nejvíce viditelným příznakem této otravy bylo šedomodré až šedofialové zbarvení kůže, nejvíce intenzivní na prstech, uších, nosu a tvářích. Mimo fyzické příznaky se chronická otrava projevovala také nespavostí, třesem či parestezií. Fenacetin byl podáván orálně a jeho denní dávka pro dospělého člověka byla mezi 300 mg až 2 g (cit.<sup>6</sup>). Smrtelná dávka fenacetinu je odhadována na 5 g (cit.<sup>9</sup>). Fenacetin byl stažen z volného prodeje kvůli prokazatelným karcinogenním účinkům a chronickému poškození ledvin<sup>6,7,13</sup>. Na trhu byl fenacetin nahrazen paracetamolem, který je jeho metabolitem<sup>6,7</sup>.

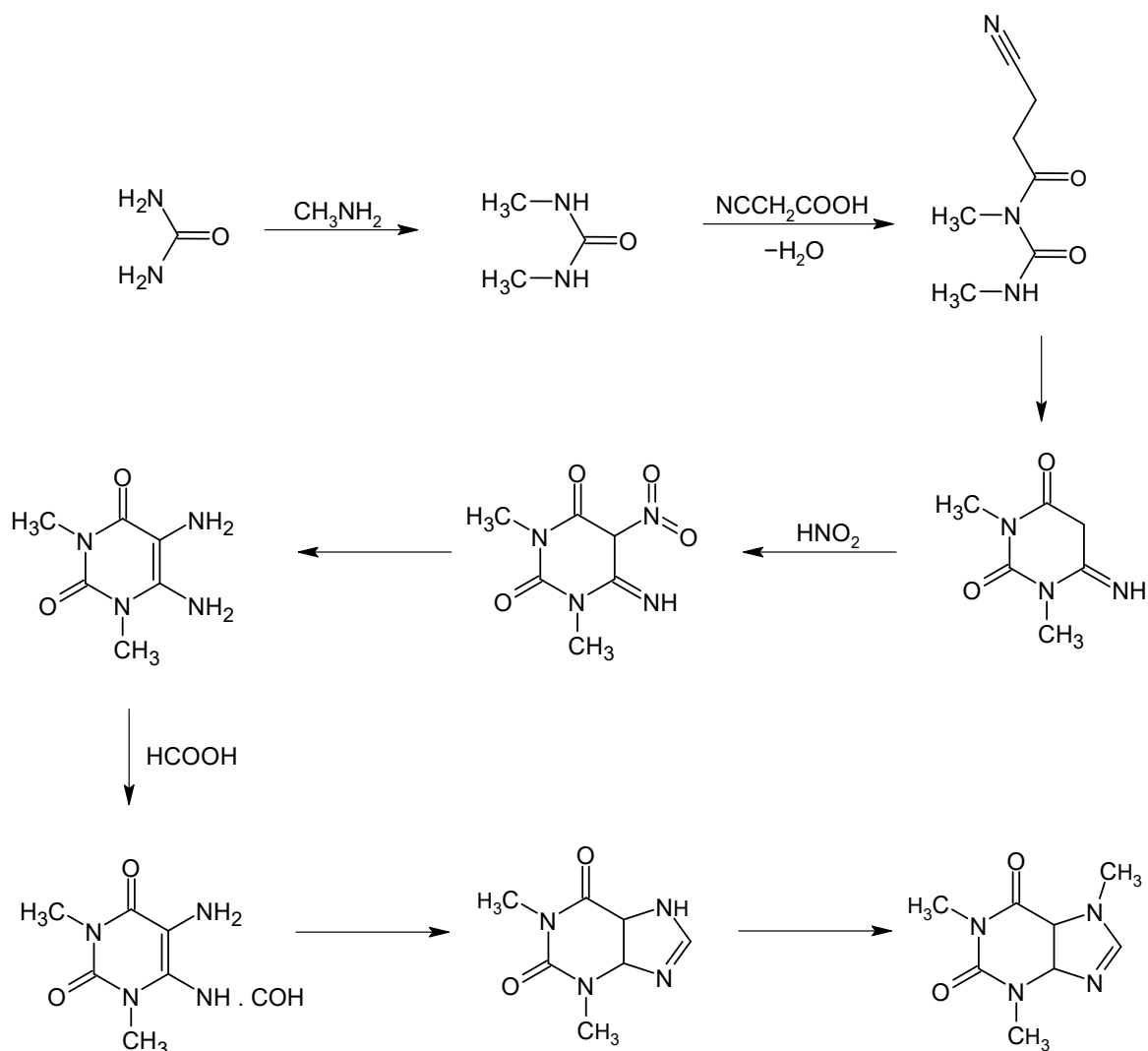
#### 2.3.4 Kofein

*Chemické vlastnosti.* Kofein je alkaloid, který patří mezi *N*-methyl deriváty xantinu tak jako theobromin a theofylin. Systematický název kofeinu je 1,3,7-trimethylxantin. Je to bílý prášek či bílé lesklé krystalky. Kofein je látka bez zápachu s typickou hořkou chutí. Jeho CASRN je 58-08-2, jeho struktura je na obr. 2.1. Jeho relativní molekulová hmotnost je 194,19. Teplota tání je 235–237 °C a teplota sublimace je 178 °C.

*Objev.* Kofein je látka rostlinného původu, která se vyskytuje například v kávovníku arabském, kakaovníku pravém nebo čajovníku čínském<sup>4,7</sup>. Kofein poprvé izoloval Němec Friedlieb Ferdinand Runge z kávových zrn v první polovině devatenáctého století<sup>8</sup>. Chemickou strukturu kofeinu objasnil Emil Fischer roku 1882 a roku 1885 Fischer kofein poprvé syntetizoval<sup>7</sup>.

*Izolace.* Kofein lze extrahovat ze sušených čajových listů pomocí ethanolu v Soxhletově extraktoru<sup>14</sup>. Extrahovaný kofein se adsorbuje na oxid hořečnatý. Po jeho zpracování se desorbuje pomocí 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a je extrahovaný do chloroformu. Kofein je získán v podobě měkkých hedvábných krystalů. Kofein je poté možno rekrystalizovat pomocí horké vody. Dalším zdrojem kofeinu mohou být zelená kávová zrna. Zrna je nejprve třeba napařit vodní parou a kofein samotný je poté extrahován pomocí chloroformu<sup>15</sup>.

*Syntéza.* Kofein lze syntetizovat z močoviny<sup>6</sup> nebo z kyseliny močové<sup>15</sup>. Schéma syntézy z močoviny je znázorněna na obr. 2.4.



Obr. 2.4 Syntéza kofeinu z močoviny.

*Farmakologické vlastnosti.* Kofein je silný stimulant centrální nervové soustavy<sup>4,6,16-18</sup>. Navozuje stavy vyšší bdělosti a vyšší mentální aktivity. Mimo to působí také na srdeční svalstvo, ledviny, může stimulovat dýchací centrum a ovlivnit tak rychlost a hloubku dýchání. Při přímém styku s žaludeční sliznicí zvyšuje kofein sekreci žaludečních šťáv. Diuretický účinek kofeinu je způsobený především snížením normální tubulární reabsorpce sodíku a vody v ledvinách. Oproti theobrominu a theofylinu má kofein diuretické účinky menší, avšak stimulační účinky na CNS větší. Pro stimulaci centrální nervové soustavy se doporučuje užít orální dávku mezi 50 až 200 mg a maximální denní dávka by neměla překročit 1 g. Dávky by neměly být užívány v častějších intervalech než tři hodiny (cit.<sup>9,17</sup>). Letální dávka je 5 až 50 g kofeinu, avšak bylo hlášeno zotavení po požití až 30 g kofeinu<sup>9</sup>. Akutní otrava kofeinem se projeví bušením srdce, úzkostí a těžkým usínáním. Těžší otravy jsou doprovázeny bolestí hlavy, znemožněním koncentrace, třesem a zvracením<sup>4,19</sup>.

## 2.4 Stabilita účinných látek Algeny

*Aminofenazon* se v živých organismech metabolizuje z 20 až 50 % na 4-acetylaminoantipyrin, který je hlavním metabolitem vylučovaným do moči<sup>20</sup>. Mezi další zjištěné metabolity patří rubazonová kyselina a její deriváty, které mají za následek červené zbarvení moči. Aminofenazon podléhá i mikrobiálnímu rozkladu, vedoucímu ke vzniku hydroxyderivátů<sup>21</sup>. Testy stability aminofenazonu v injekčních roztocích po různou dobu a při různých podmínkách prokázaly, že aminofenazon je poměrně rezistentní vůči rozkladu<sup>22</sup>. Doporučuje se však uchovávání při neutrálním pH a ochrana proti světlu.

*Aprobarbital* jako derivát barbiturové kyseliny bude pravděpodobně podléhat podobným degradačním reakcím. Barbituráty se v živých organismech metabolizují třemi hlavními cestami: štěpením kruhu, oxidací nebo přidáním či odstraněním substituentů<sup>23</sup>. Dalo by se předpokládat, že u aprobarbitalu bude prop-2-en-1-yl skupina v poloze 5 podléhat úplné hydroxylaci tak jako u sekobarbitalu. Dále by mohlo proběhnout hydrolytické štěpení struktury kruhu barbiturové kyseliny<sup>24</sup>. O stabilitě aprobarbitalu v lékových formách nebyly nalezeny žádné informace.

*Fenacetin* je v živých organismech metabolizován na dva hlavní metabolity<sup>25</sup>. Deethylací pomocí cytochromu P450 1A2 vzniká acetaminofen neboli paracetamol. Acetaminofen je dále metabolizován na *p*-aminofenol. Druhým metabolitem fenacetinu je, který vzniká hydrolyzou. Ten je poté metabolizován na *N*-hydroxyfenetidín, který je považován za hlavní příčinu selhání ledvin.

*Kofein*. Fischer uvedl, že při oxidaci kofeinu může vzniknout několik degradačních produktů<sup>15</sup>. Prvními jsou 1,3-dimethylalloxan a methylmočovina. Další produkt oxidace po následné hydrolyze poskytl *N*-methylglycin, oxid uhličitý a amoniak. Tímto produktem byl *N*-methylhydantoin. Třetím izolovaným oxidačním produktem byl pak *N,N'*-dimethyloxamid. Tyto degradační produkty napomohly Fischerovi při potvrzení struktury kofeinu. Kofein podléhá v živých organismech oxidačnímu metabolismu a přeměňuje se *N*-demethylací na primární metabolity jako je například theobromin, theofylin a paraxanthin<sup>26</sup>. Sekundární metabolity jsou potom 1-methylmočová kyselina a 1-methylxanthin. Všechny tyto metabolity jsou primárně vylučovány močí. V lékových formách byla pozorována velká stabilita kofeinu, například Zilker a kol.<sup>27</sup> uvádí analýzu injekčního roztoku obsahujícího kofein, který byl stabilní po více než 68 let.

## 2.5 Stanovení účinných látek Algeny

*Aminofenazon* lze stanovit pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie v reverzním módu. Agúndez a kol.<sup>28</sup> vypracovali metodu stanovení aminofenazonu a jeho metabolitů v lidské moči, separace probíhala na koloně Spherisorb ODS 5 (250 × 4,6 mm; 5 μm) s mobilní fází voda a methanol (s přísady triethylaminu a octové kyseliny) s UV detekcí při 254 nm. Tanaka a kol.<sup>29</sup> stanovovali aminofenazon a jeho metabolity v krysí moči na koloně TSKgel ODS-120T (250×4,6 mm, 5-μm) s mobilní fází 10 mM fosfátový pufr:methanol s UV detekcí při 251 nm. Aminofenazon lze stanovit i titračně<sup>30</sup>. Jako rozpouštědlo se používá bezvodá octová kyselina a jako titrační činidlo kyselina chloristá. Bod ekvivalence se indikuje pomocí krystalové violeti, kdy se mění barva z fialové na modrou.

*Aprobarbital* nemá v literatuře popsáno specifické stanovení, nicméně lze pro něj použít metody jako pro ostatní barbituráty. Barbituráty v tabletách byly stanovovány pomocí HPLC na reverzní fází C18 s použitím binární mobilní fáze (acetonitril a voda) a UV detekcí při 206 nm za použití kolony Bio SiL HL C18 (250×4,6 mm, 5 μm)<sup>31</sup>. Barbituráty lze rovněž stanovit vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s UV detekcí ze slin a krve, kdy lze stanovit koncentraci 5 ng ml<sup>-1</sup> (cit.<sup>32</sup>). Barbituráty lze také stanovit v moči pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí na koloně DB-5, na níž je limit detekce 20 ng ml<sup>-1</sup> (cit.<sup>33</sup>). V krevní plasmě lze barbituráty stanovit pomocí plynové chromatografie a to již o koncentraci 2 mg l<sup>-1</sup> (cit.<sup>34</sup>). Pomocí UHPLC-HRMS lze stanovit barbituráty ze vzorku vlasů na koloně Phenomenex KinetexVR EVO C-18 (100×2.1 mm, 2.6 μm) s mobilní fází 10 mM octan amonný a acetonitril, kdy lze detekovat v rozmezí 0,02 až 20 ng mg<sup>-1</sup> (cit.<sup>35</sup>).

*Fenacetin* lze stanovit HPLC metodou s reverzní fází C18 (250×4.6 mm, 5 μm) za použití binární mobilní fáze (vodný roztok dihydrogenfosforečnanu draselného a methanol) a UV detekce při 260 nm (cit.<sup>36</sup>). Fenacetin lze stanovit z plasmy pomocí GLC-MS, limit citlivosti této metody je 1 ng ml<sup>-1</sup> (cit.<sup>37</sup>). V plazmě potkanů lze stanovit fenacetin pomocí UHPLC-MS metody s ESI ionizací, na koloně Zorbax Eclipse Plus C18 (50×2.1 mm; 1.8 μm) s gradientovou elucí 0,1% mravenčí kyselina a acetonitril. Limit detekce byl 10 ng ml<sup>-1</sup> (cit.<sup>38</sup>).

---

*Kofein* v tabletách lze stanovit pomocí HPLC na reverzní fázi C18 Bio SiL HL C18 (250×4,6 mm; 5 μm) s použitím binární mobilní fáze (acetonitril a voda) a UV detekcí<sup>31</sup>. Kofein v nápojích (zelený čaj, bylinný čaj, energetický nápoj) byl kvantifikován pomocí HPLC-DAD na koloně Purospher STAR RP-8 (150×4,6 mm; 5 μm) s isokratickou elucí 0,1% tetrahydrofuran ve vodě (pH = 8,0) a acetonitril<sup>39</sup>. Pro stanovení kofeinu v moči je možno použít HPLC na koloně μBondapak C18 (300×2 mm; 10 μm) s isokratickou elucí methanol-acetonitril-octanový pufr a tandemovou hmotnostní detekcí<sup>40</sup>. Kofein lze rovněž stanovit titrací v nevodném prostředí bezvodé kyseliny octové, jako titrační činidlo slouží kyselina chloristá. Bod ekvivalence se indikuje potenciometricky<sup>41</sup>.

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Analyzovaný vzorek tablet Algena

Léčivý přípravek Algena byl vyroben ve formě tablet. Obal přípravku je uveden na obr. 3.1. Podle výrobní šarže byl vyroben v roce 1981. Vzorek pocházel ze sbírek katedry analytické chemie PŘF UK, před analýzou byl uchováván při laboratorní teplotě v temnu. Analyzované léčivo bylo ve formě bílých (na okrajích lehce nažloutlých), kulatých tablet s dělicí rýhou uprostřed. Tableta Algena obsahovala čtyři účinné látky s deklarovaným obsahem: aminofenazon (300 mg), aprobarbital (50 mg), fenacetin (150 mg) a kofein (50 mg).



Obr. 3.1 Přední a zadní strana balení analyzovaných tablet Algena.

### 3.2 Použité chemikálie

K přípravě mobilní fáze byl použit methanol LC-MS grade (Fischer Chemical) a 99,9% octová kyselina, p.a. (Lach-ner). Byly použity standardy, které sloužily k optimalizaci a ke kvantifikaci analyzovaných účinných látek: aminofenazon p.a. (Sigma-Aldrich), aprobarbital p.a. (Léčiva Měcholupy), fenacetin for HPLC (Sigma-Aldrich) a kofein extra pure (Fischer Chemicals).

### 3.3 Příprava mobilní fáze

Byla zvolena dvousložková mobilní fáze methanol a 0,1% vodný roztok octové kyseliny o pH = 3,00. Vodný roztok byl připraven z 1 ml 99,9% octové kyseliny. Toto množství bylo odpipetováno do odměrné baňky o objemu jeden litr a ta byla dolita po rysku Milli-Q vodou.

### 3.4 Příprava zásobních roztoků standardů

Byly připraveny roztoky standardů stanovovaných účinných látek (aminofenazonu, aprobarbitalu, fenacetinu a kofeinu) o koncentracích 500 mg dm<sup>-3</sup>. Na analytických vahách bylo odváženo asi 50 mg příslušného standardu přesně, navážka byla kvantitativně převedena do 100,0 ml odměrné baňky a rozpuštěna v methanolu doplněním po rysku.

### 3.5 Příprava kalibračních roztoků

Vhodným naředěním zásobních roztoků standardů bylo v 10,00 ml odměrných baňkách připraveno pět kalibračních roztoků o koncentracích 10, 50, 80, 120 a 150 mg dm<sup>-3</sup> každé z analyzovaných účinných látek. Kalibrační roztok o koncentraci 150 mg dm<sup>-3</sup> byl připraven do dvou 10,00 ml odměrných baněk při použití vždy pouze dvou standardních roztoků vlivem omezeného objemu. Látky byly zvoleny do dvojic podle blízkosti elučního času, první dvojici tvořil aminofenazon a kofein, druhou pak fenacetin a aprobarbital.

### 3.6 Příprava roztoku autentického vzorku tablety Algena

Tableta analyzovaného přípravku Algena byla odvážena na analytických vahách, zhomogenizována v třecí misce kvantitativně převedena do 100,0 ml odměrné baňky a rozpuštěna v methanolu doplněním po rysku. Rozpouštění bylo podpořeno umístěním baňky na 10 minut do ultrazvuku. Následně byl vzniklý roztok zfiltrován. Z filtrátu bylo odpipetováno 1,00 ml roztoku do 25,00 ml odměrné baňky a naředěno methanolem doplněním po rysku.

### 3.7 Měření pomocí HPLC-UV

Na základě literatury<sup>31,36,42,43</sup> byla zvolena dvousložková mobilní fáze. Jako mobilní fáze byla použita směs 0,1% roztoku octové kyseliny ve vodě o pH = 3,0 (složka A) a methanolu (složka B). Byla použita kolona XBridge® BEH C18 (150×3,0 mm; 2,5 μm). Měření probíhalo na kapalinovém chromatografu UHPLC NexeraXR (Shimadzu, Japonsko) s UV/VIS detektorem s diodovým polem. Teplota při měření ve všech částech přístroje byla 30 °C. Objem jednoho nástřiku vzorku byl 2 μl a průtok mobilní fáze byl 0,4 ml min<sup>-1</sup>.

### 3.8 Měření pomocí HPLC-MS

Měření metodou HPLC-MS probíhalo na kapalinovém chromatografu s tandemovým hmotnostním detektorem LCMSMS-8045 (Shimadzu) s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu. Jako zmlžovací plyn byl použit dusík při průtoku 3 dm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> a také byl použit jako sušící plyn při průtoku 10,0 dm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> a teplotě 300 °C. Ostatní parametry byly stejné jako v odd. 3.7.

### 3.9 Statistické zpracování naměřených dat

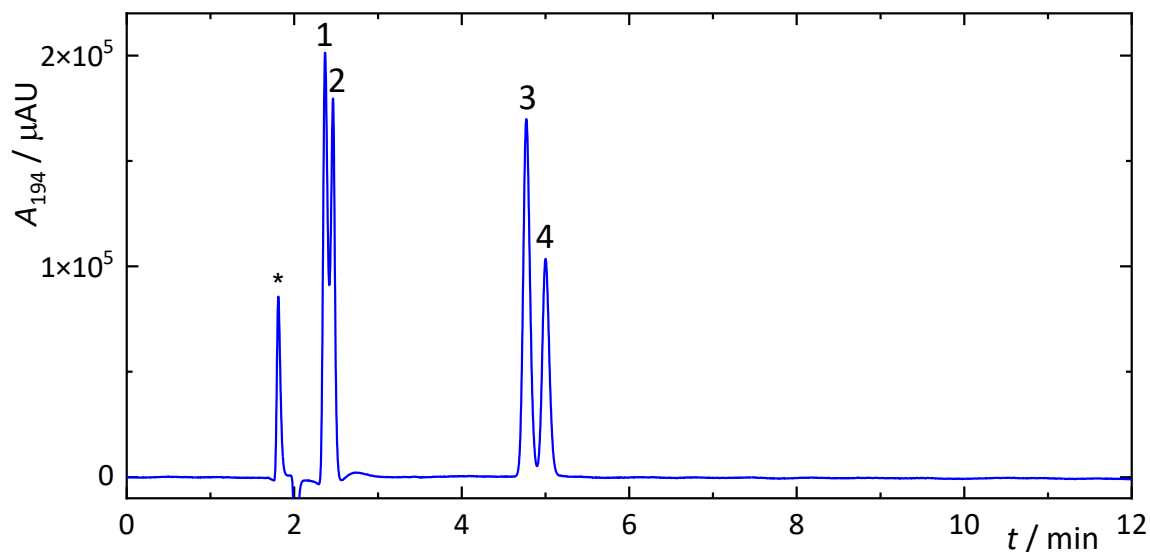
Všechna měření byla, pokud není uvedeno jinak, provedena v triplikátech. Statistické zpracování bylo provedeno na 95% úrovni spolehlivosti běžnými statistickými postupy. Kalibrační závislost byla vyhodnocena metodou nejmenších čtverců. Výpočty byly realizovány pomocí programu MSEXcel.

## 4 Výsledky a diskuse

### 4.1 Optimalizace separačních podmínek

Na základě literatury<sup>31,36,42,43</sup> byla pro stanovení účinných látek přípravku Algena zvolena vysokoúčinná chromatografie na reverzních fázích, jejíž podmínky bylo nutné částečně optimalizovat. Byla použita kolona XBridge® BEH C18 (150×3,0 mm; 2,5 μm). Jako mobilní fáze byla použita směs 0,1% roztoku octové kyseliny ve vodě o pH = 3,0 (složka A) a methanolu (složka B). Teplota při měření ve všech částech přístroje byla 30 °C. Objem jednoho nástřiku vzorku byl 2 μl a průtok mobilní fáze byl 0,4 ml min<sup>-1</sup>. Detekce probíhala pomocí UV/VIS detektoru s diodovým polem.

Nejprve bylo třeba najít vhodný objemový poměr obou složek mobilní fáze tak, aby se všechny přítomné analyty dostatečně rozdělily, tedy aby rozlišení dvou sousedních píků bylo  $R_{1,2} \geq 1,5$ . Byl sledován vliv objemových poměrů složek mobilní fáze na retenčním čase a rozlišení analytů. Při prvním pokusu byla zvolena mobilní fáze s 50 % složky A a 50 % složky B. Chromatogram tohoto měření je na obr. 4.1. Za těchto podmínek eluovaly analyzované látky v pořadí: kofein, aminofenazon, fenacetin a aprobarbital. Následně byl studován vliv složení mobilní fáze v rozpětí obsahu složky A od 40 do 70 % na retenci jednotlivých analytů. Měření vždy proběhlo dvakrát pro zajištění reprodukovatelnosti. Získané hodnoty retenčních časů jsou uvedeny v tabulce 4.1.



Obr. 4.1 Chromatogram směsi standardů účinných látek tablety Algena (1) kofein, (2) aminofenazon, (3) fenacetin, (4) aprobarbital při složení mobilní fáze 0,1% octová kyselina (pH = 3,0) a methanol v poměru 50:50 (v/v) na koloně XBridge® BEH C18 (150×3,0 mm; 2,5 μm) Column XP při vlnové délce 194 nm. Hvězdička označuje nástřikový pik. Podmínky měření: průtok mobilní fáze 0,4 ml min<sup>-1</sup>, teplota měření 30 °C, objem nástřiku vzorku 2 μl. Koncentrace všech standardů 50 mg dm<sup>-3</sup>.

Tabulka 4.1

Vliv složení mobilní fáze na retenční časy a rozlišení analytů.

| Parametr                                | A / % | 40    | 50    | 55    | 60    | 65    | 70    |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|   | B / % | 60    | 50    | 45    | 40    | 35    | 30    |
| $t_r(\text{aminofenazon}) / \text{min}$ |       | 2,31  | 2,46  | 2,52  | 2,70  | 2,93  | 3,35  |
| $w(\text{aminofenazon}) / \text{min}$   |       | 0,103 | 0,164 | 0,066 | 0,133 | 0,154 | 0,192 |
| $t_r(\text{kofein}) / \text{min}$       |       | 2,14  | 2,37  | 2,57  | 2,89  | 3,39  | 4,22  |
| $w(\text{kofein}) / \text{min}$         |       | 0,105 | 0,132 | 0,073 | 0,163 | 0,198 | 0,259 |
| $R(\text{aminofenazon, kofein})$        |       | 1,6   | 0,6   | 0,6   | 1,3   | 2,6   | 3,9   |
| $t_r(\text{fenacetin}) / \text{min}$    |       | 3,23  | 4,77  | 6,17  | 8,36  | 11,72 | 16,98 |
| $w(\text{fenacetin}) / \text{min}$      |       | 0,126 | 0,169 | 0,210 | 0,246 | 0,357 | 0,581 |
| $t_r(\text{aprobarbital}) / \text{min}$ |       | 3,29  | 5,00  | 6,59  | 9,06  | 12,84 | 18,68 |
| $w(\text{aprobarbital}) / \text{min}$   |       | 0,140 | 0,185 | 0,228 | 0,259 | 0,373 | 0,657 |
| $R(\text{fenacetin, aprobarbital})$     |       | 0,4   | 1,3   | 1,9   | 2,8   | 3,1   | 2,7   |

Jak je patrné z tabulky 4.1, s rostoucím objemovým poměrem methanolu (složky B) eluují analyty z kolony rychleji avšak jejich rozlišení klesá. Bylo tedy třeba optimalizovat metodu tak, aby byl čas analýzy co nejrychlejší a rozlišení bylo dostatečné, tedy  $R_{1,2} \geq 1,5$ . Toho bylo docíleno použitím gradientové eluce. Na základě výsledků měření uvedených v tabulce 4.1 byl navržen následující gradientový program (vztažený ke složce A mobilní fáze, tedy 0,1% octové kyseliny s  $\text{pH} = 3,0$ ):

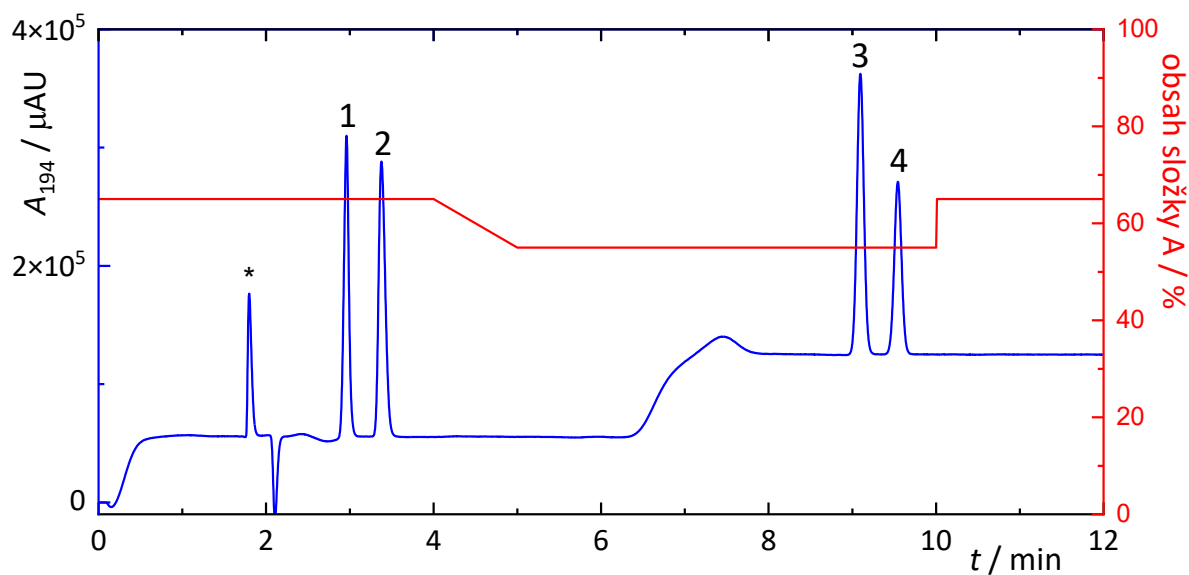
1. na počátku měření 65 % složky A, což umožnilo v dostatečné rychlosti a dostatečném rozlišení rozdělit látky aminofenazon a kofein;
2. od 4,0 min do 5,0 min pokles na 55% A a následně do 10,0 min konstantně při této koncentraci, což umožnilo v dostatečné rychlosti a dostatečném rozlišení rozdělit látky fenacetin a aprobarbital;
3. v 10,0 min skokové zvýšení zpět na 65 % složky A a pokračování do 12,0 min, což umožnilo ekvilibraci kolony na počáteční podmínky měření.

Celková doba analýzy byla 12 min, sumárně je gradientový program uveden v tabulce 4.2. Chromatogram standardů účinných látek tablety Algena za těchto podmínek je znázorněn na obr. 4.2

Tabulka 4.2

Použitý gradientový program pro separaci účinných látek tablety Algena na koloně XBridge® BEH C18 (150×3,0 mm; 2,5  $\mu\text{m}$ ) Column XP, při průtoku 0,4 ml  $\text{min}^{-1}$  a teplotě měření 30 °C, objem nástřiku vzorku 2  $\mu\text{l}$ .

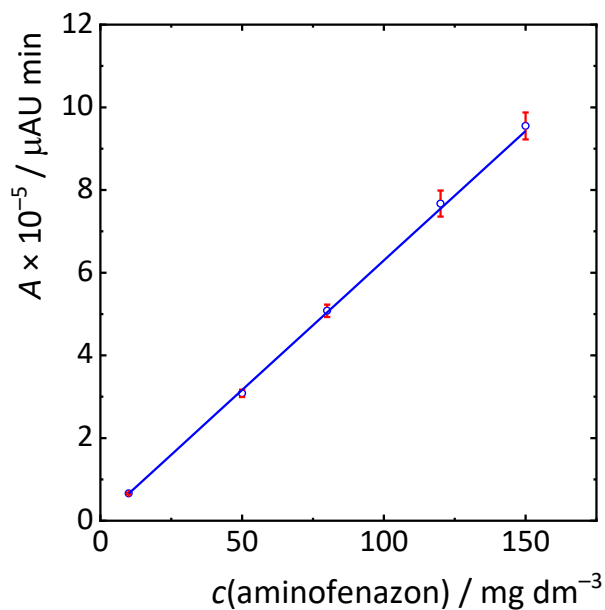
| $t / \text{min}$ | složka A / %<br>(0,1% octová kyselina, $\text{pH} = 3,0$ ) | složka B / %<br>(metanol) |
|------------------|--|---------------------------|
| 0,00             | 65   | 35                        |
| 4,00             | 65   | 35                        |
| 5,00             | 55   | 45                        |
| 10,00            | 55   | 45                        |
| 10,01            | 65   | 35                        |
| 12,00            | 65   | 35                        |



Obr. 4.2 Chromatogram směsi standardů účinných látek tablety Algena (1) aminofenazon, (2) kofein, (3) fenacetin, (4) aprobarbital při použití gradientového programu uvedeného v tabulce 4.2 na koloně XBridge® BEH C18 (150×3,0 mm; 2,5 μm) Column XP při vlnové délce 194 nm. Hvězdička označuje nástřikový pík. Podmínky měření: průtok mobilní fáze 0,4 ml min<sup>-1</sup>, teplota měření 30 °C, objem nástřiku vzorku 2 μl. Koncentrace všech standardů 50 mg dm<sup>-3</sup>.

#### 4.2 Kalibrační závislosti pro stanovení účinných látek

Aby bylo možné zjistit reálný obsah účinných látek v tabletě, byla vyhotovena kalibrační závislost (pětibodová kalibrace) v dynamickém rozsahu koncentrací 10–150 mg dm<sup>-3</sup>. K vyhodnocení byly použity mediány ploch chromatografických píků při vlnové délce absorpčního maxima dané látky (hodnoty absorpčních maxim byly zvoleny podle literatury<sup>9</sup>). K vyhodnocení byla použita metoda lineární regrese. Na obr. 4.3 je znázorněna pro ukázkou kalibrační závislost pro aminofenazon. Získané parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v tabulce 4.3.



Obr. 4.3 Kalibrační závislost pro stanovení aminofenazonu metodou HPLC-UV založená na ploše chromatografického píku aminofenazonu ( $t_r=2,95$  min). Měřeno při použití gradientového programu uvedeného v tabulce 4.2 na koloně XBridge<sup>®</sup> BEH C18 (150×3,0 mm; 2,5 μm) Column XP při vlnové délce 258 nm. Podmínky měření: průtok mobilní fáze 0,4 ml min<sup>-1</sup>, teplota měření 30 °C, objem nástřiku vzorku 2 μl.

Tabulka 4.3

Parametry kalibračních závislostí pro stanovení účinných látek tablety Algina pomocí HPLC-UV, založené na ploše chromatografických píků.

| Parametr                                       | Látka          |                |                |                            |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------------------|
|  | aminofenazon   | Kofein         | Fenacetin      | aprobarbital               |
| $t_r$ / min                                    | 2,95           | 3,37           | 9,10           | 9,54                       |
| $\lambda$ / nm                                 | 258            | 271            | 247            | 194                        |
| $a$ / μAU min mg <sup>-1</sup> dm <sup>3</sup> | 6390 ± 54      | 7980 ± 47      | 12100 ± 540    | 10840 ± 90                 |
| $b$ / μAU min                                  | – <sup>a</sup> | – <sup>a</sup> | – <sup>a</sup> | (24 ± 8,6)×10 <sup>3</sup> |
| $R^2$  | 0,9979         | 0,9999         | 0,9940         | 0,9998                     |
| $LOD$ / mg dm <sup>-3</sup>                    | 2,7            | 1,9            | 14             | 2,8                        |
| $LOQ$ / mg dm <sup>-3</sup>                    | 9,2            | 6,5            | 49             | 9,1                        |

<sup>a</sup> Hodnota není statisticky významná.

### 4.3 Opakovatelnost stanovení

Opakovatelnost metody byla prověřena při kalibračním měření, kdy byl každý bod kalibrační závislosti změřen třikrát. Opakovatelnost byla zjištěna z velikosti ploch analyzovaných látek, které byly odečteny při absorpčních maximech jednotlivých analytů. Hodnoty pro vyhodnocení opakovatelnosti byly získány z kalibrační závislosti pro koncentraci  $80 \text{ mg dm}^{-3}$  a jsou uvedeny v tabulce 4.4. Směrodatná odchylka byla pro plochu píku nejvýše 2,22 %. Opakovatelnost chromatografického systému lze považovat za opakovatelnou pro velikosti plochy píků.

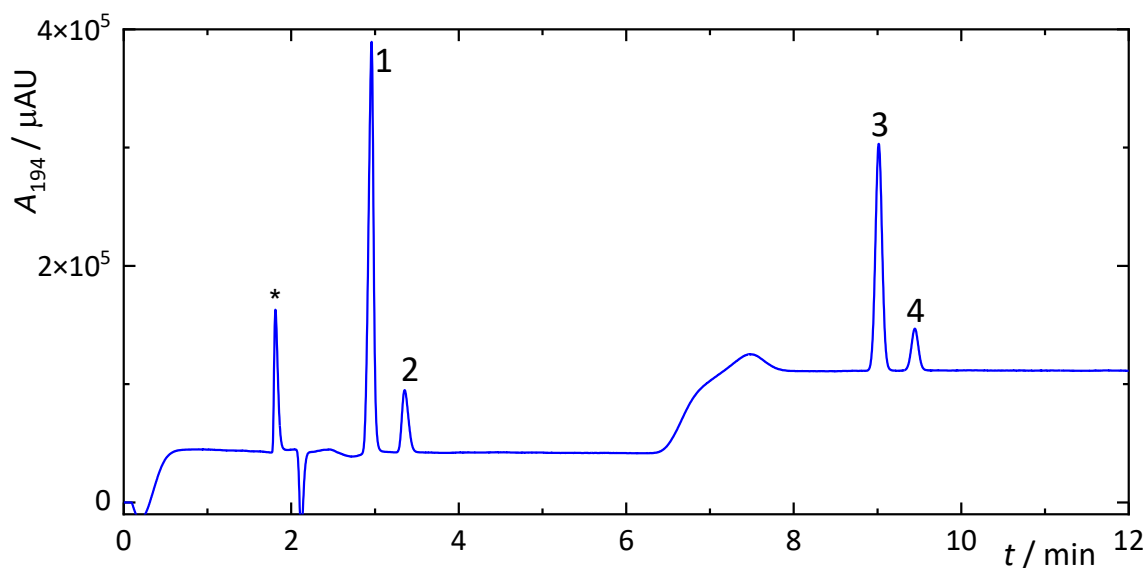
Tabulka 4.4

Výsledky opakovatelnosti chromatografického systému.

| Nástřik        | $A / \mu\text{AU min}$ |                 |                    |                       |
|----------------|------------------------|-----------------|--------------------|-----------------------|
|                | aminofenazon (258 nm)  | kofein (271 nm) | fenacetin (247 nm) | aprobarbital (194 nm) |
| 1              | 516383                 | 642384          | 881888             | 907861                |
| 2              | 507814                 | 631388          | 855048             | 900150                |
| 3              | 504794                 | 627143          | 849828             | 893152                |
| medián         | 507814                 | 631388          | 855048             | 900150                |
| <i>RSD</i> / % | 1,35                   | 1,43            | 2,22               | 0,97                  |

### 4.4 Analýza autentického vzorku tablet Algena

Autentický vzorek tablety byl připraven dle odd. 3.6, získaný chromatogram je uveden na obr. 4.4. Na chromatogramu byly patrné pouze čtyři píky, odpovídající očekávaným účinným látkám. Pomocí kalibračních závislostí byly stanoveny obsahy jednotlivých účinných látek v celkem třech různých tabletách analyzovaného historického vzorku tablet Algena. Výsledky měření jsou uvedeny v tab. 4.5, včetně porovnání s výrobcem deklarovanými hodnotami. V době výroby tablety platný *Československý lékopis ČsL 3* z roku 1970<sup>44</sup> předepisoval pro tablety toleranci 10 % od deklarované hodnoty. Jak je patrné z tabulky 4.5 kromě aprobarbitalu této podmínce vyhovují ostatní tři účinné látky. Stanovené množství aproparbitalu je o 0,8 % pod dovolenou toleranci, což bude spíše chyba výroby, vzhledem k neprokázání žádných degradačních produktů.



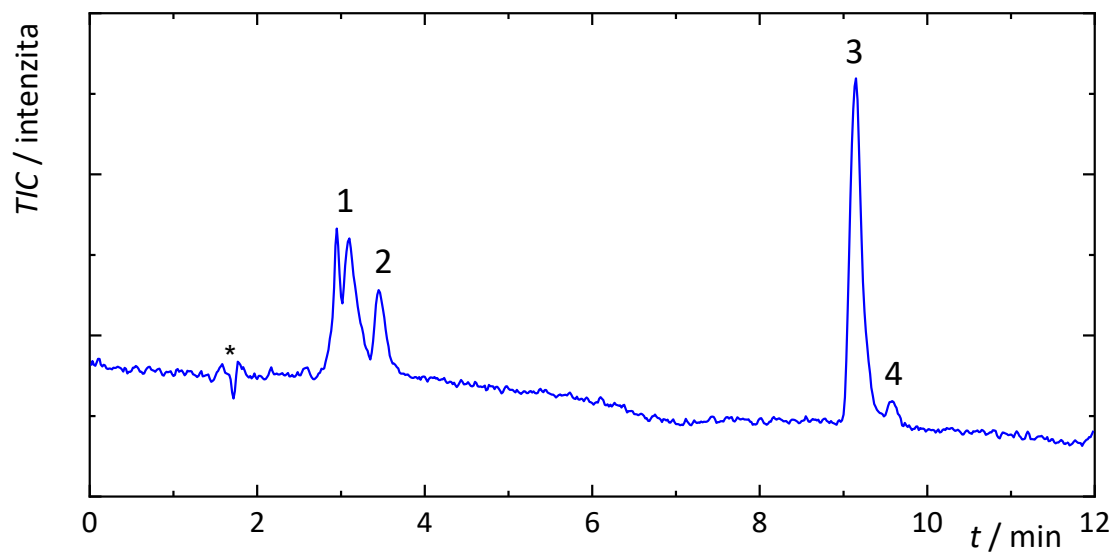
Obr. 4.4 Chromatogram roztoku analyzované historické tablety Algena (1) aminofenazon, (2) kofein, (3) fenacetin, (4) aprobarbital při použití gradientového programu uvedeného v tabulce 4.2 na koloně XBridge® BEH C18 (150×3,0 mm; 2,5 μm) Column XP při vlnové délce 194 nm. Hvězdička označuje nástřikový pík. Podmínky měření: průtok mobilní fáze 0,4 ml min<sup>-1</sup>, teplota měření 30 °C, objem nástřiku vzorku 2 μl. Roztok tablety byl připraven podle odd. 3.6.

Tabulka 4.5

Výsledky koncentrací jednotlivých látek v tabletě Algena.

| Tableta           | $m(\text{tableta}) / \text{g}$ | $m(\text{látka}) / \text{mg}$ |        |           |              |
|-------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------|-----------|--------------|
|                   |                                | Aminofenazon                  | Kofein | fenacetin | aprobarbital |
| 1.                | 0,6232                         | 282                           | 44,1   | 139       | 43,4         |
| 2.                | 0,6703                         | 292                           | 48,0   | 149       | 45,6         |
| 3.                | 0,6442                         | 291                           | 46,6   | 144       | 44,6         |
| medián            | 0,6442                         | 291                           | 46,6   | 144       | 44,6         |
| % z deklarovaného | –                              | 97,0                          | 93,2   | 96,0      | 89,2         |

Pro ověření, zda opravdu nedošlo k degradaci účinných látek v tabletě Algena byly změřeny HPLC-MS chromatogramy s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu. Jak je patrné z obr. 4.5, kromě očekávaných čtyř studovaných látek nebyl detegován žádný další pík, který by naznačoval přítomnost možného degradačního produktu. Hmoty iontů  $m/z$  jednotlivých píků odpovídaly očekávaným hodnotám na základě molekulových hmotností látek. Rozštěpený pík aminofenazonu je zapříčiněn vysokou koncentrací látky.



Obr. 4.5 HPLC-MS chromatogram roztoku analyzované historické tablety Algena (1) aminofenazon, (2) kofein, (3) fenacetin, (4) aprobarbital při použití gradientového programu uvedeného v tabulce 4.2 na koloně XBridge<sup>®</sup> BEH C18 (150×3,0 mm; 2,5 μm) Column XP. Hvězdička označuje nástřikový pík. Podmínky měření uvedeny v odd. 3.8, roztok tablety byl připraven podle odd. 3.6. Rozštěpený pík aminofenazonu je zapříčiněn vysokou koncentrací látky.

## 5 Závěr

Pro analýzu účinných látek v historickém vzorku tablet Algena z roku 1981 – aminofenazonu, aprobarbitalu, fenacetinu a kofeinu – byla v této práci vyvinuta a optimalizována metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi C18 s binární gradientovou elucí (0,1% vodný roztok octové kyseliny a methanol) s UV detekcí. Obsah jednotlivých účinných látek byl stanoven ve třech vybraných tabletách metodou kalibrační závislosti. Nalezený obsah, vzhledem k výrobcem deklarovanému, byl následující: aminofenazon 97,0 %, aprobarbital 89,2 %, fenacetin 96,0 % a kofein 93,2 %. S výjimkou aprobarbitalu vyhovují zjištěné obsahy ustanovením lékopisu. Možné degradační produkty studovaných účinných látek byly hledány pomocí HPLC-MS, nicméně byly prokázány pouze tyto účinné látky a nebyly zjištěny žádné rozpadové produkty. Lze tedy konstatovat, že analyzovaný historický vzorek je i více než 40 let, které uplynuly od jeho výroby, stabilní. Nižší obsah aprobarbitalu je tedy nejspíše způsoben chybou při výrobě.

## Literatura

- 1 Yoshioka S.: *Stability of Drugs and Dosage Forms*. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers 2000.
- 2 Tønnesen H. H.: Formulation and stability testing of photolabile drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **255** (2001), 1–14.
- 3 Brenza J., Gabrhelík R.: Use of opioid and stimulant medications in the Czech Socialist Republic before the “discovery” of the clandestine manufacturing of locally-specific stimulants and opiates. *Adiktologie* **14** (2014), 284–293.
- 4 Riedl O., Vondráček V. a kol.: *Klinická toxikologie. Toxikologie léků, potravin, jedovatých živočichů a rostlin aj.* Praha, Avicenum 1980.
- 5 Drtil J.: *Aktuální drogové závislosti*. Praha, Avicenum 1978.
- 6 Kar A.: *Medicinal Chemistry*. New Delhi, New Age International 2007.
- 7 Sneader W.: *Drug Discovery: A History*. Glasgow, Wiley 2005.
- 8 Ravina E.: *The Evolution of Drug Discovery. From Traditional Medicines to Modern Drugs*. Weinheim, Wiley 2011.
- 9 *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. 4th ed. Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B., Watts J. (Eds.) London, Pharmaceutical Press 2011.
- 10 Dundee J. W., McILROY P. D. A.: The history of the barbiturates. *Anaesthesia*, **37**(1982), 726–734.
- 11 DEPat 539806C: Verfahren zur Darstellung von Isopropylallylbarbitursäure (1920).
- 12 López-Muñoz F., Ucha-Udabe R., Alamo C.: The history of barbiturates a century after their clinical introduction. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* **1** (2005), 329–343.
- 13 World Health Organization: *IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Overall Evaluations of Carcinogenicity. An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42*. Lyon, International Agency for Research on Cancer 1987.
- 14 Harborne J. B.: *Phytochemical Methods: A Guide to mModern Techniques of Plant Analysis*. 3rd ed. London, Chapman and Hall 1998.
- 15 Zubair M. U., Hassan M. M. A., Al-Meshal I. A.: Caffeine. In: *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. Volume 15*. Florey K. (ed.). Orlando, Academic Press 1986, p. 71–150.
- 16 Dewick P. M.: *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. 3rd ed. Chichester, Wiley 2009.
- 17 *Martindale: The complete drug reference*. 36th ed. Sweetman S. C. (Eds.). London, Pharmaceuticale Press 2009.
- 18 Tsvetkova B., Kostova B., Pencheva I., Zlatkov A., Rachev D., Peikov P.: Validated LC method for simultaneous analysis of paracetamol and caffeine in model tablet formulation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* **4** (2012), 680–684.

- 
- 19 Willson C.: The clinical toxicology of caffeine: A review and case study. *Toxicology Reports* **5** (2018), 1140–1152.
- 20 Mitchell S. C., Waring R. H., Smith R. L.: Curiosities in drug metabolism. *Xenobiotica* **44** (2014), 666–676.
- 21 Blecher H., Blecher R., Wegst W., Eberspaecher J., Lingens F.: Bacterial degradation of aminopyrine. *Xenobiotica* **11** (1981), 749–754.
- 22 Chalabala M., Knap J., Burelová A.: Stálost složeného injekčního roztoku amidopyrinu, mesokainu a promethazinu. *Československá farmacie*, **17** (1968), 127–132.
- 23 Briggs M., Briggs M.: *The Chemistry and Metabolism of Drugs and Toxins. an Introduction to Xenobiochemistry*. London, William Heinemann Medical Books 1974.
- 24 Raventós J.: The distribution in the body and metabolic fate of barbiturates. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **6** (1954), 217–235.
- 25 Watanabe A., Fukami T., Takahashi S., Kobayashi Y., Nakagawa N., Nakajima M., Yokoi T.: Arylacetamide deacetylase is a determinant enzyme for the difference in hydrolase activities of phenacetin and acetaminophen. *Drug Metabolism and Disposition* **38** (2010), 1532–1537.
- 26 Huq F.: Molecular modelling analysis of the metabolism of caffeine. *Asian Journal of Biochemistry* **1** (2006) 276–286.
- 27 Zilker M., Sörgel F., Holzgrabe U.: A stability-study of expired ampoules manufactured more than 40 years ago. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **150** (2018), 318–326.
- 28 Agúndez J. A. G., Martínez C., Martín R., Benítez J.: Determination of aminopyrine, dipyrone and its metabolites in urine by high-performance liquid chromatography. *Therapeutic Drug Monitoring* **16** (1994), 316–322.
- 29 Tanaka T., Kaneo Y., Goromaru T., Iguchi S.: Further metabolism of 4-acetylaminoantipyrene, the major metabolite of aminopyrine, in rats. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **35** (1987), 3519–3522.
- 30 *Český lékopis 1997*. Praha, Grada 1997.
- 31 Franeta J. T., Agbaba D., Eric S., Pavkov S., Aleksic M., Vladimirov S.: HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. *Il Farmaco* **57** (2002), 709–713.
- 32 Tjaden U. R., Kraak J. C., Huber J. F.: Rapid trace analysis of barbiturates in blood and saliva by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **143** (1977), 183–194.
- 33 Liu R. H., McKeehan A. M., Edwards C., Foster G., Bensley W. D., Langner J. G., Walia A. S.: Improved gas chromatography/mass spectrometry analysis of barbiturates in urine using centrifuge-based solid-phase extraction, methylation, with d<sub>5</sub>-pentobarbital as internal standard. *Journal of Forensic Sciences* **39** (1994), 1504–1514.
- 34 Flanagan R. J., Berry D. J.: Routine analysis of barbiturates and some other hypnotic drugs in the blood plasma as an aid to the diagnosis of acute poisoning. *Journal of Chromatography A* **131** (1977), 131–146.
- 35 Wen D., Shi Y., Zhang X., Xie B., Liu W., Yu F., Xiang P., Cong B., Ma C.: Determination of barbiturates in hair samples by using a validated UHPLC-HRMS method: application in investigation of drug-facilitated sexual assault. *Forensic Sciences Research* **7** (2022), 78–87.
- 36 Sun S., Liu G., Wang Y.: Simultaneous determination of acetaminophen, caffeine, and chlorphenamine maleate in paracetamol and chlorphenamine maleate granules. *Chromatographia* **64** (2006), 719–724.

- 
- 37 Garland W. A., Hsiao K. C., Pantuck E. J., Conney A. H.: Quantitative determination of phenacetin and its metabolite acetaminophen by GLC–chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **66** (1977), 340–344.
- 38 Wang Z., Sun W., Lin Z.-F., Sun R., Huang C.-K., Ye W.-J., Dong Y.-Y., Zhang X.-D., Chen R.-J.: A UHPLC-MS/MS method coupled with liquid-liquid extraction for the quantitation of phenacetin, omeprazole, metoprolol, midazolam and their metabolites in rat plasma and its application to the study of four CYP450 activities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **163** (2019), 204–210.
- 39 Gonzales-Yépez K. A., Vilela J. L., Reátegui O.: Determination of caffeine, theobromine, and theophylline by HPLC-DAD in beverages commonly consumed in Lima, Peru. *International Journal of Food Science* **2023** (2023), 4323645.
- 40 Tuomi T., Johnsson T., Reijula K.: Analysis of nicotine, 3-hydroxycotinine, cotinine, and caffeine in urine of passive smokers by HPLC-tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry* **45** (1999), 2164–2172.
- 41 *European Pharmacopoeia. 10th edition*, Strasbourg, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe 2019.
- 42 Acheampong A., Gyasi W. O., Darko G., Apau J., Addai-Arhin S.: Validated RP-HPLC method for simultaneous determination and quantification of chlorpheniramine maleate, paracetamol and caffeine in tablet formulation.. *SpringerPlus* **5** (2016), 625.
- 43 Krieger D. J.: Liquid Chromatographic determination of acetaminophen in multicomponent analgesic tablets. *Journal of AOAC International* **67** (1984), 339–341.
- 44 *Československý lékopis. 3. vydání*. Praha, Avicenum 1970.