

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Klára Ulbertová

**Stanovení účinných látek a jejich případných degradačních produktů
v přípravku *Gelonida antineuralgica* ze 40. let 20. století**

Determination of Active Substances and Their Possible Degradation Products in
Medicinal Product *Gelonida antineuralgica* From the 40. Decade 20. Century

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. srpna 2024

Klára Ulbertová

Abstrakt

Bakalářská práce byla zaměřena na stanovení účinných látek a jejich případných degradačních produktů v přípravku *Gelonida antineuralgica* ze 40. let 20. století. Tento přípravek, podávaný jako analgetikum, antineuralgikum a antipyretikum, tvoří kombinace tří účinných látek: acetylsalicylová kyselina, fenacetin a kodein. Kodein byl v některých šaržích tohoto přípravku nahrazen noskapinem. Pro analýzu historického vzorku byla zvolena metoda RP-HPLC s UV detekcí na koloně XBridge® BEH C18. Pomocí standardů všech čtyř možných účinných látek byla nejprve optimalizována gradientová eluce využívající jako vodnou složku 0,1% vodný roztok octanu amonného o pH = 6,00 a jako organickou složku methanol. Stanovení látek bylo provedeno metodou kalibrační závislosti, a bylo zjištěno, že analyzovaný přípravek obsahuje (ve vztahu k množství deklarovanému výrobcem): 84,9 % acetylsalicylové kyseliny, 94,8 % fenacetinu a 112 % noskapinu. Dále byla zjištěna přítomnost salicylové kyseliny v množství 16,0 mg v tabletě, která je nejspíše degradačním produktem acetylsalicylové kyseliny.

Klíčová slova: acetylsalicylová kyselina, degradace, fenacetin, kodein, noskapin, RP-HPLC, salicylová kyselina

Abstract

The bachelor thesis was focused on the determination of active substances and their possible degradation products in medical preparation *Gelonida antineuralgica* from the 1940s. This preparation, prescribed as an analgesic, antineuralgic and antipyretic, constitutes a combination of three active pharmaceutical ingredients: acetylsalicylic acid, phenacetin, and codeine. Codeine was replaced by noscapine in some batches of this preparation. For the analysis of the historical sample, the method chosen was RP-HPLC with UV detection on an XBridge® BEH C18 column. Using standards of all four possible active substances, a gradient elution was first optimized using 0.1% aqueous ammonium acetate solution with pH = 6.00 as the aqueous phase and methanol as the organic one. The determination of the compounds was carried out by the calibration dependence method, and it was found that the preparation analysed contains (in relation to the quantity declared by manufacturer): 84.9% acetylsalicylic acid, 94.6% phenacetin, 112% noscapine. Further, salicylic acid was found to be present in an amount of 16.0 mg per tablet, which is probably a degradation product of acetylsalicylic acid.

Keywords: acetylsalicylic acid, degradation, codeine, noscapine, phenacetin, RP-HPLC, salicylic acid

Poděkování

Chtěla bych poděkovat panu doc. RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost, trpělivost a cenné rady při vypracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za všechnu podporu během studia.

Obsah

1	Cíl práce.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Stabilita léčivých přípravků.....	8
2.2	Analyzovaný léčivý přípravek <i>Gelonida antineuralgica</i>	9
2.3	Účinné látky přípravku <i>Gelonida antineuralgica</i>	10
2.3.1	Acetylsalicylová kyselina.....	11
2.3.2	Fenacetin.....	12
2.3.3	Kodein.....	13
2.3.4	Noskapin.....	16
2.4	Stabilita účinných látek přípravku <i>Gelonida antineuralgica</i>	18
2.5	Stanovení účinných látek přípravku <i>Gelonida antineuralgica</i>	19
2.5.1	Stanovení acetylsalicylové kyseliny.....	19
2.5.2	Stanovení fenacetinu.....	19
2.5.3	Stanovení kodeinu.....	20
2.5.4	Stanovení noskapinu.....	20
3	Experimentální část.....	22
3.1	Analyzovaný vzorek tablet <i>Gelonida antineuralgica</i>	22
3.2	Použité chemikálie.....	22
3.3	Příprava roztoků.....	23
3.3.1	Příprava mobilní fáze.....	23
3.3.2	Příprava zásobních roztoků standardů.....	23
3.3.3	Příprava kalibračních roztoků standardů.....	23
3.3.4	Příprava roztoku autentického vzorku tablety <i>Gelonida antineuralgica</i>	23
3.4	Měření pomocí HPLC-UV.....	24
3.5	Měření pomocí HPLC-MS.....	24
3.6	Zpracování naměřených dat.....	24
4	Výsledky a diskuse.....	25
4.1	Optimalizace gradientového programu pro RP-HPLC separaci.....	25
4.2	Kalibrační závislosti pro stanovení účinných látek.....	29
4.3	Analýza historického vzorku léčivého přípravku <i>Gelonida antineuralgica</i> metodou HPLC-UV.....	31
4.4	Analýza historického vzorku léčivého přípravku <i>Gelonida antineuralgica</i> metodou HPLC-MS.....	33
5	Závěr.....	34
	Literatura.....	35

Seznam zkratek a symbolů

a	směrnice lineární regrese kalibrační závislosti [$\mu\text{AU min mg}^{-1}\text{dm}^3$]
A	plocha chromatografického píku [$\mu\text{AU min}$]
b	úsek lineární regrese kalibrační závislosti [$\mu\text{AU min}$]
c	koncentrace [mg dm^{-3}]
LOD	limit detekce [mg dm^{-3}]
LOQ	limit stanovitelnosti [mg dm^{-3}]
m	hmotnost [g]
$R_{1,2}$	rozlišení chromatografických píků
R^2	determinační koeficient
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie na obrácených fázích
t_r	retenční čas píku [min]
TIC	celkový proud iontů (angl. total-ion current)
w	šířka píku při základně [min]
λ	vlnová délka absorpčního maxima [nm]

1 Cíl práce

Základní předpokladem pro bezpečné a účinné používání léčivých přípravků je jejich stabilita, tedy předpoklad, že látky obsažené v léčivém přípravku se nebudou po jistý čas rozkládat na méně účinné či dokonce toxické produkty. Tento čas se označuje jako doba použitelnosti, doba expirace, a obvykle má délku tři až pět let. V posledních letech se intenzivně diskutuje možnost prodloužení doby expirace, což by mělo řadu ekonomických i ekologických dopadů¹.

V této bakalářské práci byla provedena analýza účinných látek přípravku *Gelonida antineuralgica*, od jehož výroby uplynulo v době analýzy zhruba 80 let. Pro tyto účely byla zvolena metoda RP-HPLC, pro níž byla optimalizována gradientová eluce umožňující separaci všech účinných látek tablety i jejich případných degradačních produktů. Obsah účinných látek byl stanoven metodou kalibrační závislosti.

2 Teoretická část

2.1 Stabilita léčivých přípravků

Stabilita léčivého přípravku, respektive účinných a pomocných látek v něm obsažených, je definována jako schopnost zachovat si deklarované složení a tím i účinnost a bezpečnost po dobu jeho použitelnosti, za stanovených podmínek skladování ve stanovených mezích^{2, 3}.

Faktory, jež ovlivňují stabilitu léčiv a léčivých přípravků lze dělit na vnější a vnitřní. Za vnější faktory můžeme považovat vliv teploty, UV záření, vzduchu (kyslíku a oxidu uhličitého), vlhkosti prostředí, použitý obal, vliv mikroorganismů apod. Tyto faktory, spolu s technologickým zpracováním konečné lékové formy mohou stabilitu léčiva výrazně ovlivnit. Vnitřní faktory, které souvisí se stabilitou léčiva, jsou fyzikální a chemické vlastnosti účinných a pomocných látek, respektive jejich degradace⁴.

Fyzikální a chemická degradace léčivého přípravku může způsobit například ztrátu účinnosti, zvýšení koncentrace účinné látky (ztráta rozpouštědla u vodného léčiva zvýší koncentraci účinné látky; například některé gely s obsahem lidokainu), změnu biologické dostupnosti, ztrátu jednotnosti obsahu nebo vznik derivátů účinných či pomocných látek, které mohou mít toxický účinek na lidský organismus⁵. Proto je třeba sledovat nejen čas, za jaký se látka přemění, ale také finální degradační produkt. Stabilitu léčiva a degradační produkty léčivých látek je třeba vzít v potaz i třeba při likvidaci léčiv⁶.

Fyzikální stabilitu, nebo také fyzikální znak jakosti léčivého přípravku, lze definovat jako stav, kdy léčivo, či léčivý přípravek splňuje, ve stanovených mezích a v dané formě, kritéria na vzhled a dané fyzikální atributy jako jsou: barva, fáze, resuspendovatelnost⁷. Fyzikální degradace může být způsobena mnoha faktory jako třeba nárazem, vibracemi, fluktuací teploty a tím způsobené zmražení, tání⁵.

Chemická stabilita, nebo také chemický znak jakosti léčivého přípravku lze definovat jako stav, kdy je obsah účinných a pomocných látek a jejich degradačních produktů ve stanovených mezích³. Chemická stabilita léčivé látky je dána molekulovou strukturou látky. Chemická degradace může být způsobena například oxidací, hydrolýzou, dehydratací, izomerací, polymerizací⁸.

Léčivé přípravky musí odpovídat určitým jakostním požadavkům, aby byly kvalitní, účinné, ale hlavně bezpečné. Proto je třeba stabilitu léčiva, účinných a pomocných látek, sledovat nejen po dobu použitelnosti. Účinné látky v léčivech, respektive jejich lékové formy, musí být natolik stabilní, aby u nich neproběhla nežádoucí degradace při stresových podmínkách, například při výrobě léčiva, skladování léčiva v nestálých podmínkách (změna vlhkosti, teploty v daném prostředí atd.), distribuci a přepravě léčiva.

2.2 Analyzovaný léčivý přípravek *Gelonida antineuralgica*

Gelonida antineuralgica je léčivý přípravek, dříve používaný jako analgetikum, antineuralgikum a antipyretikum. Do klinické praxe byl zaveden ve 30. letech 20. století. Léčivý přípravek *Gelonida antineuralgica* byl distribuován v balení po deseti bílých tabletách (obr. 2.1), a jelikož se jednalo o léčivo s obsahem více účinných látek, bylo vydáváno pouze na lékařský předpis⁹.



Obr. 2.1 Balení analyzovaného přípravku *Gelonida antineuralgica* ze 40. let 20. století

V Německu byla *Gelonida antineuralgica* hojně používána při léčbě otorinolaryngologických bolestí spojených například s anginou pectoris, nebo při léčbě akutního zánětu bloudivého nervu a jazykohltanového nervu¹⁰. Dále se *Gelonida antineuralgica* používala pro léčbu porodních a poporodních bolestí a jako účinnější a méně toxická náhražka 1% roztoku

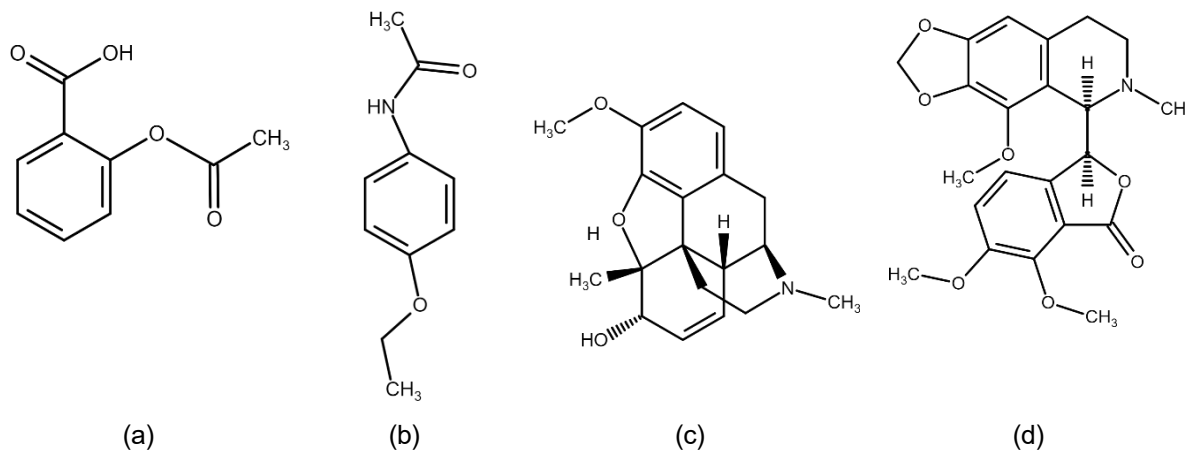
morfinu, jehož účinky byly neadekvátní a u pacientek vyvolával řadu vedlejších efektů jako nauzeu a závratě¹¹. Mimoto se léčivý přípravek *Gelonida antineuralgica* předepisoval i na bolesti hlavy spojené s migrénou¹².

Jako účinné látky tableta *Gelonida antineuralgica* obsahovala acetylsalicylovou kyselinu, fenacetin a kodein fosfát. Při výrobě v této práci analyzované tablety ovšem výrobce kodein fosfát nahradil účinnou látkou noskapin hydrochlorid. Záměna byla uvedena na obalu léčiva přetiskem (obr. 2.1).

Přípravek *Gelonida* dodnes vyrábí firma Pfizer, která z názvu vypustila přívlastek *antineuralgica*, a jako účinné látky obsahuje kodein a paracetamol, který nahradil fenacetin¹³.

2.3 Účinné látky přípravku *Gelonida antineuralgica*

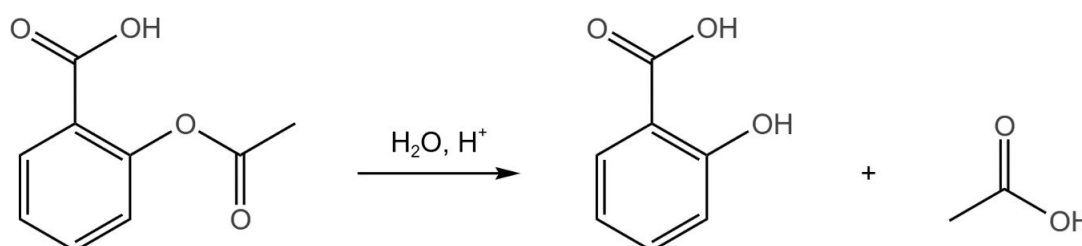
Přípravek *Gelonida antineuralgica* analyzovaný v této práci obsahoval celkem tři účinné látky: acetylsalicylovou kyselinu, fenacetin a noskapin. V původní verzi tablety byl jako třetí účinná látka použit kodein. Struktury všech těchto čtyř látek jsou uvedeny na obr. 2.2.



Obr. 2.2 Chemické struktury možných účinných látek přípravku *Gelonida antineuralgica*: (a) acetylsalicylová kyselina, (b) fenacetin, (c) kodein, (d) noskapin

2.3.1 Acetylsalicylová kyselina

Acetylsalicylová kyselina je derivát salicylové kyseliny se systematickým názvem 2-acetyloxybenzoová kyselina. Známa je především pod svými triviálními názvy aspirin a acylpyrin. Její CASRN je 50-78-2 a její relativní molekulová hmotnost je 180,16. Acetylsalicylová kyselina má podobu bezbarvých až bílých krystalků, nebo bílého krystalového prášku bez zápachu a nakyslou chuti. Acetylsalicylová kyselina je v suchém prostředí poměrně stálá, avšak ve vlhku ochotně hydrolyzuje na octovou kyselinu a salicylovou kyselinu (obr. 2.3) ¹⁴.

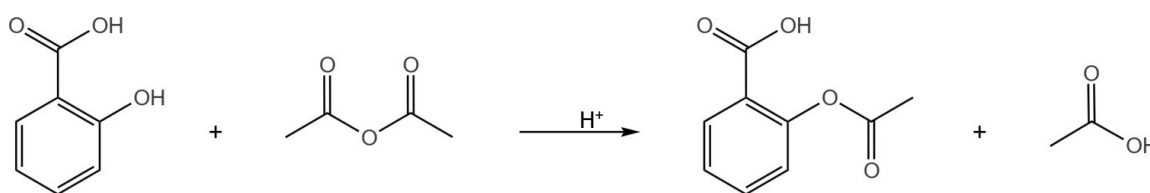


Obr. 2.3 Schéma hydrolyzy acetylsalicylové kyseliny

Acetylsalicylová kyselina je nesteroidní a neopioidní látka, jež má analgetické, antiflogistické a antipyretické účinky. Acetylsalicylová kyselina má ve medicíně široké využití. Užívá se při léčbě bolestí hlavy, zubů, u pacientů s akutním koronárním syndromem, nízké dávky mohou ulevit při erytromelalgii, předepisuje se dětským pacientům s Kawasakiho chorobou a na řadu dalších indikací. Dříve se také používala na léčbu revmatu, ale byla nahrazena vhodnějšími přípravky^{15–17}.

Acetylsalicylová kyselina je inhibitorem cyklooxygenasy 1 a 2, což má za důsledek zvýšenou krvácivost organismu a s tím spojené riziko gastrointestinálního krvácení. Acetylsalicylová kyselina může způsobit alergické reakce jako bronchokonstrikci nebo astmatické záchvaty, závratě, pocit ztráty sluchu¹⁴. Acetylsalicylová kyselina je také prokázaným teratogenem. U plodu může vyvolat renální a kardiologické problémy. Zároveň může zapříčinit vzniku nedostatečného množství plodové vody a tím ohrozit vývoj a zdraví plodu^{18–20}.

Acetylsalicylovou kyselinu poprvé syntetizoval Charles von Gerhart ze salicylové kyseliny a acetanhydridu v roce 1853 a 10. srpna 1897 ji pro německou firmu Friedrich Bayer & Co. připravil Felix Hoffman²¹. Schéma syntézy je uvedeno na obr. 2.4.



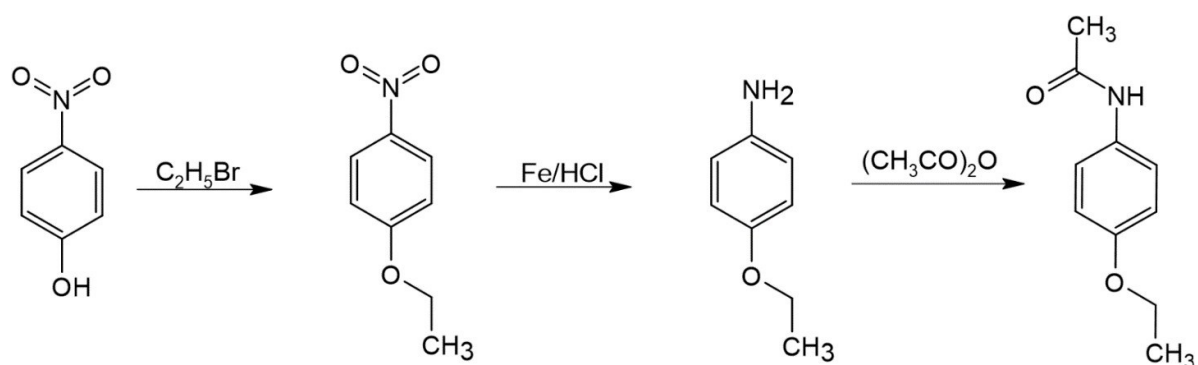
Obr. 2.4 Schéma syntézy acetylsalicylové kyseliny

2.3.2 Fenacetin

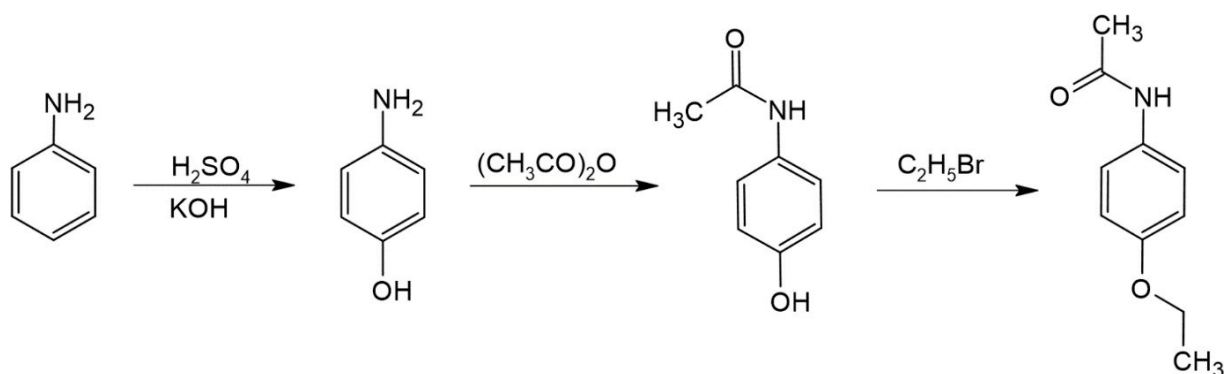
Fenacetin je derivát acetanilidu se systematickým názvem *N*-acetyl-*p*-fenetidín. Jeho CASRN je 62-44-2 a relativní molekulová hmotnost je 179,22. Teplota tání fenacetinu je 134–135 °C. Fenacetin má podobu jemných bílých krystalků bez zápachu a s lehce nahořklou chutí. Patří do skupiny acetamidů a aromatických etherů, ve které je jeden z vodíků připojených k dusíku nahrazen 4-ethoxyfenylovou skupinou.

Jedná se o nenarkotické analgetikum, antipyretikum, antineuralgikum – léčivo periferního nervového systému – a inhibitor cyklooxygenasy 3. Funkčně je podobný s *N*-fenylacetamidem, 4-ethoxyanilinem a paracetamolem. Primárně sloužil jako léčivo na mírné až střední bolesti pohybového systému, jelikož jeho protizánětlivé účinky jsou v porovnání s acetylsalicylovou kyselinou malé^{22–24}. Fenacetin sloužil jako analgetikum a antipyretikum i ve veterinární medicíně²⁵. Fenacetin byl stažen z trhu, kvůli jeho vysoké toxicitě. Dlouhodobé užívání fenacetinu u pacientů způsobuje zejména analgetickou nefropatii, methemoglobinémii, sulfhemoglobinémii, hemolytickou anémií^{26, 27}. Fenacetin je také prokázaným karcinogenem. Nadměrné nebo dlouhodobé užívání podněcuje u pacientů vznik rakoviny ledvinové pánvičky, močovodu, ledvinového parenchymu a močového měchýře²⁶. Chronické otravy fenacetinem byly velmi běžné, neboť vyšší dávky vyvolávaly u pacientů euforické stavy. Viditelné příznaky otravy fenacetinem bylo šedomodré až šedofialové zbarvení kůže, a to především na prstech, tvářích, uších a nosu. Mezi další příznaky chronické otravy pak patřila nespavost, tremor či parestezie. Fenacetin byl proto v medicíně nahrazen paracetamolem^{28, 29}.

Fenacetin byl poprvé syntetizován v roce 1887 německým chemikem Oscarem Hinsbergem, který hledal využití pro *p*-nitrofenol, který vznikal jako vedlejší produkt při barvení. Schéma syntézy je uvedeno na obrázku 2.5.



(a)



(b)

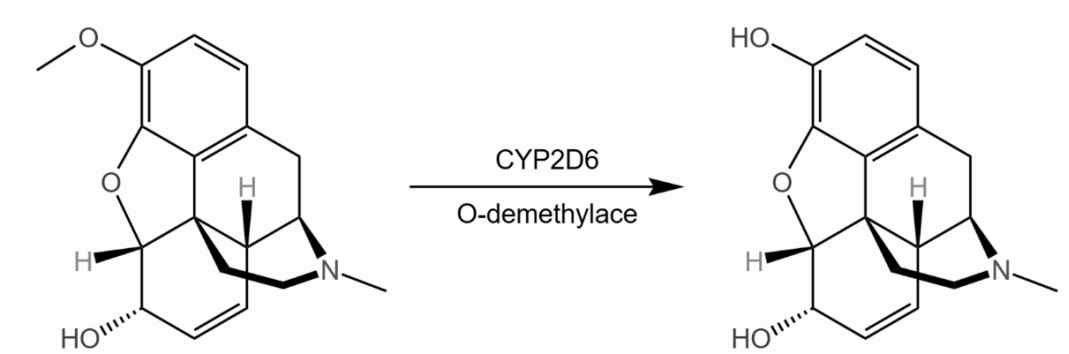
Obr. 2.5 Schéma syntézy fenacetinu z (a) *p*-nitrobenzenu; (b) anilinu^{28, 30}

2.3.3 Kodein

Kodein, nebo také methylnorfin, je látka se systematickým názvem 4,5 α -epoxy-3-methoxy-17-methyl-7,8-didehydromorfinan-6 α -ol. CASRN látky je 76-57-3 s relativní molekulovou hmotností 299,36. Kodein má podobu bezbarvých až bílých jehličkovitých krystalků, nebo bílého prášku bez zápachu s hořkou chutí. Kodein sublimuje při 140 °C a teplota tání je 157 °C.

Kodein je opioidní látka, jež se používá jako antitusikum a analgetikum. Používá se v kombinaci s neopiodními analgetiky, jako je acetylsalicylová kyselina či paracetamol, především na léčbu méně závažných až závažných bolestí. Jakožto opiat se kodein slabě váže

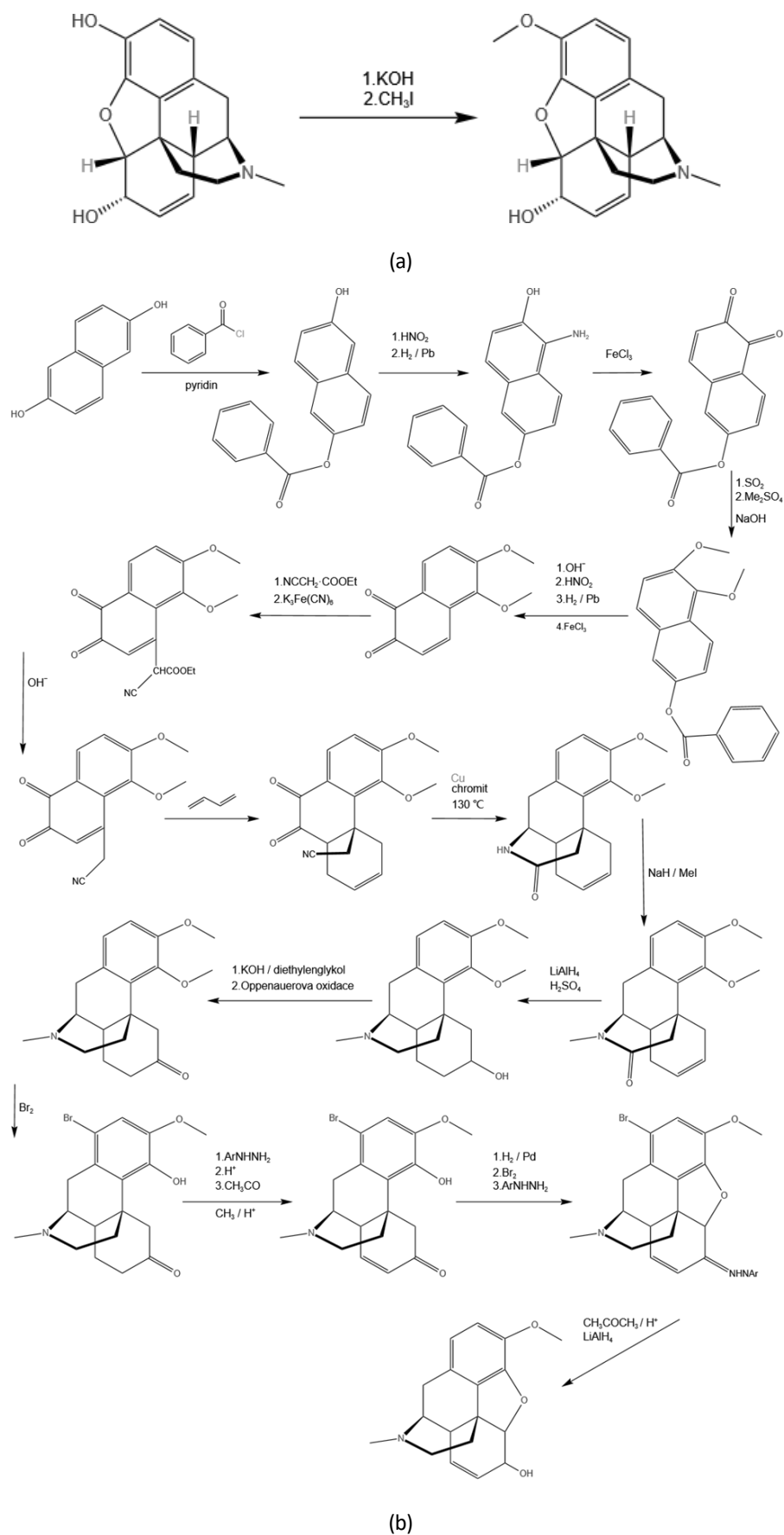
na opiátové receptory centrální nervové soustavy a v gastrointestinálním traktu. Využívá se při bolestech spojených se žlučovou a ledvinovou kolikou, bolestech hlavy, pankreatických bolestech, bolestech při osteoartritidě apod. Kodein lze použít i jako účinnou látku při závažné diarei s rizikem dehydratace^{14, 31, 32}. Analgetické vlastnosti kodeinu jsou podpořeny jeho částečnou metabolickou přeměnou (asi 10 %) na morfin (obr. 2.6).



Obr. 2.6 Schéma metabolické přeměny kodeinu na morfin³³

Kodein je látka, která může u pacienta vyvolat fyzickou i psychickou závislost, stejně jako morfin totiž způsobuje vylití histaminu v těle. Při mírných dávkách má euforické a apatické účinky, což vede ke zneužívání této účinné látky. Kodein je metabolizován cytochromem P450 a tím tlumí dýchací centrum, způsobuje ospalost, obstipaci a další sedativní efekty^{14, 34}.

Kodein byl náhodou objeven v roce 1832 francouzským chemikem Pierre-Jean Robiquetem, při výzkumu derivátů morfinu při jeho extrakci. Látku nazval kodein (z řeckého: codeia = makovice)³⁵. Syntetizován byl až v roce 1868 anglickým chemikem Alexandrem Crum Brownem³⁶. Jednalo se o částečnou syntézu methylací přírodního morfinu³⁷. Totální syntéza byla provedena až v roce 1952 Gatesem a Tschudim. Schéma syntézy kodeinu je zobrazeno na obr. 2.7.



Obr. 2.7 Schéma syntézy kodeinu z (a) morfinu, (b) 2,6-dihydroxynaftalenu^{38,39}

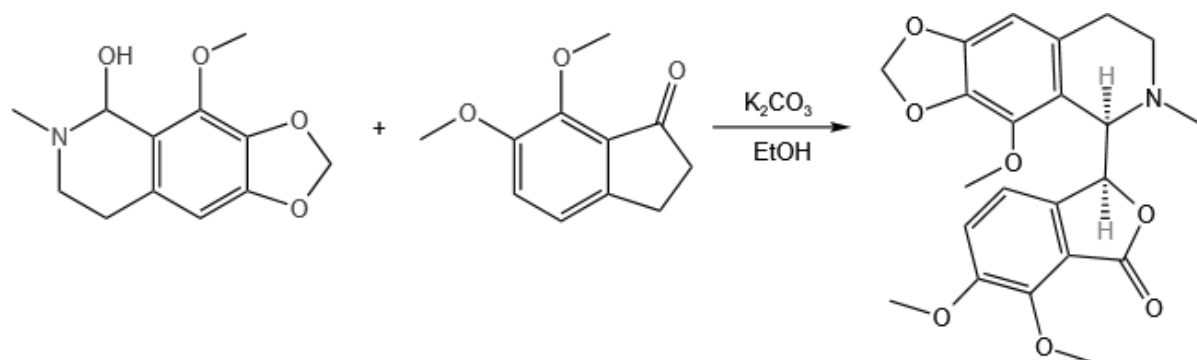
2.3.4 Noskapin

Noskapin známý také jako narkotin je látka se systematickým názvem (3*S*)-6,7-dimethoxy-3-[(5*R*)-4-methoxy-6-methyl-7,8-dihydro-5*H*-[1,3]dioxolo[4,5-*g*]isoquinolin-5-yl]-3*H*-2-benzofuran-1-on. CASRN látky je 128-62-1 s relativní molekulovou hmotností 413,43. Noskapin má podobu bezbarvých až bílých krystalků nebo bílého hygroskopického krystalického prášku bez zápachu a velmi hořkou chutí. Noskapin sublimuje při 150–160 °C a teplota tání je 176 °C.

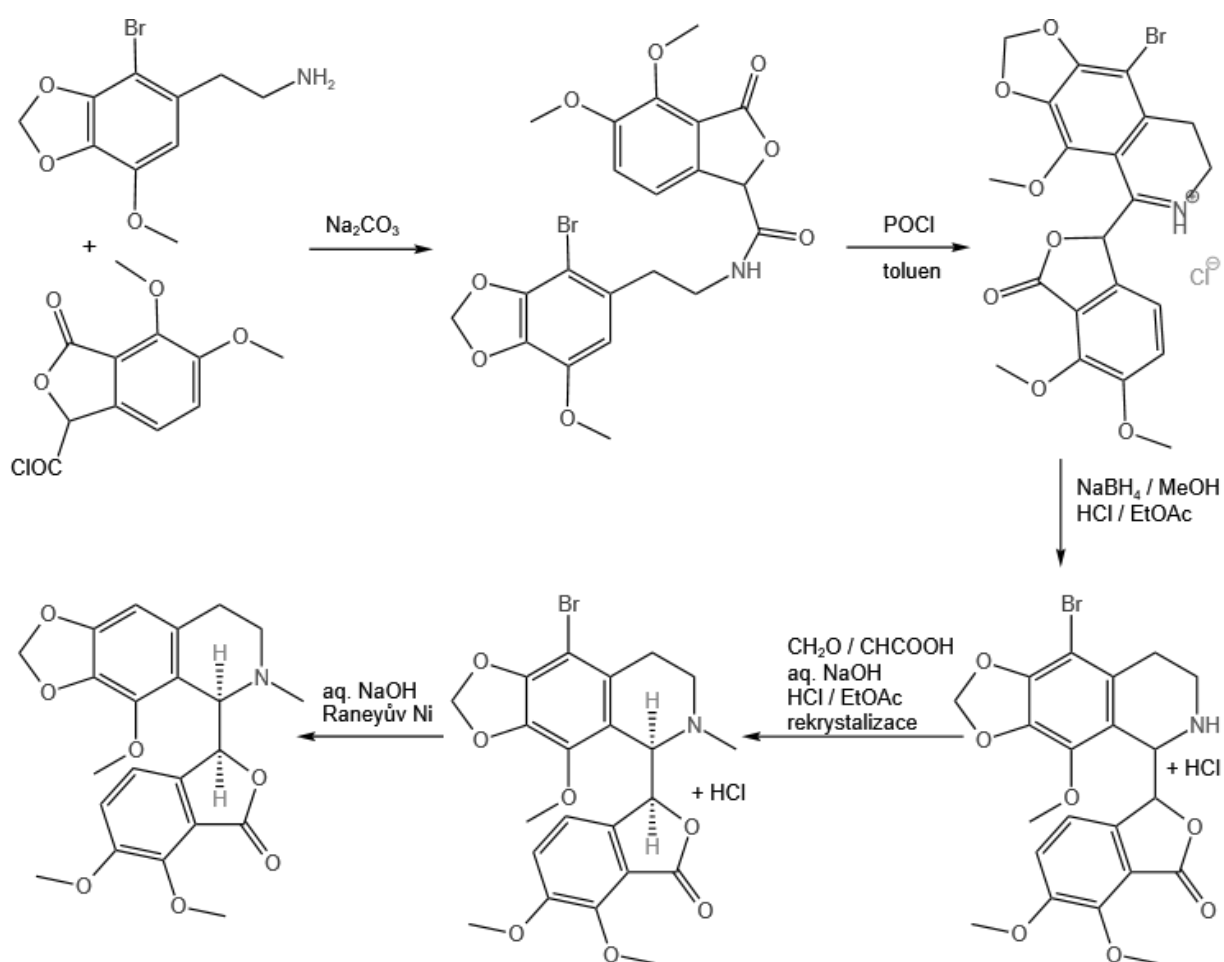
Noskapin je nenarkotický opioidní alkaloid, antineoplastické činidlo, apoptický spouštěč a antitusikum jehož vlastnosti jsou podobné s dextromethrofanem^{40–43}. Analgetické vlastnosti noskapinu nejsou farmakologicky významné, a proto se užívá spíše jako antitusikum. Noskapin se využívá také při léčbě onkologických onemocnění. Noskapin spouští apoptosu v buňkách maligních nádorů a tím napomáhá v boji proti rakovině ovaria, plic, prsu, rekta, střev, žaludku.

Noskapin vykazuje minimální toxicitu jater, kostní dřeně, ledvin, slinivky břišní, srdce a tenkého střeva⁴⁴. Částečně se dostává skrz placentární bariéru a do mléka kojících žen. Kvůli své potenciální mutagenitě se nepředepisuje těhotným a kojícím ženám. U plodu může způsobit aneuploidii nebo polyploidii^{45, 46}.

Noskapin byl náhodou objeven v roce 1817 francouzským chemikem Pierre-Jean Robiquetem, při výzkumu derivátů morfinu při jeho extrakci⁴⁷. Poprvé syntetizován v roce 1911 kondenzací mekoninu a kotarninu⁴⁸. Schéma syntézy noskapinu je zobrazeno na obr. 2.8.



(a)



(b)

Obř. 2.8 Schéma syntézy noskapinu z: (a) kotarninu a mekoninu, (b) 4,5-dimethoxy-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-1-karbonyl chloridu a 2-(4-bromo-7-methoxybenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)ethan-1-aminu

2.4 Stabilita účinných látek přípravku *Gelonida antineuralgica*

Acetylsalicylová kyselina je v suchém prostředí termostabilní. Ve vlhkém prostředí ochotně hydrolyzuje

- v plazmě na salicylovou kyselinu, která v játrech dále metabolizuje na salicylurovou kyselinu, fenol glukoronid a acyl glukoronid;
- pomocí cytochtomu P450 na 2,3-dihydroxybenzoovou kyselinu a na 2,5-dihydroxybenzoovou kyselinu.

Salicylová kyselina rovněž snadno podléhá dekarboxylaci. Mezi její další metabolity patří například pyrokatechol, 2,3-dihydroxybenzoová kyselina a benzen-1,2-diol⁴⁹.

Fenacetin je v suchém prostředí termostabilní⁵⁰. V organismech fenacetin metabolizuje:

- *O*-deethylací na acetaminofen neboli paracetamol který je dále metabolizován na *N*-acetyl-*p*-benzochinin imin, který při reakci s glutationem vytváří *O*-ethyl-*N*-acetyl-*p*-benzochinin imin, jež je hepatotoxickým a karcinogenním metabolitem fenacetinu;
- deacetylací na fenetidin, který je dále metabolizován na *N*-hydroxyfenacetin;
- hydroxylací na 2-hydroxyfenacetin.

Kodein je v suchém a temném prostředí poměrně stálý, avšak degraduje působením UV záření a jednoduše podléhá rozkladu až na NH_4^+ , NO_3^- , H_2O a CO_2 (cit. ^{51, 52}). V organismech kodein metabolizuje:

- hydrolyzou na anisol, (*Z*)-2-hydroxyvinyl-dihydrogen fosfát, ty se dále rozpadají na akrolein, mravenčí kyselinu;
- hydrolyzou na (*Z*)-2-methoxyhexa-1,3,5-trien, ten se rozpadá na acetaldehyd a kyselinu octovou.

Noskapin je v suchém a temném prostředí poměrně stálý, avšak podléhá tepelné degradaci⁵³:

- na 5,6,7,8-tetrahydro-6-methyl-1,3-dioxolo[4,5-*g*] isochinolin-5-ol, který se dále rozpadá na 1,3-benzodioxol-5-karboxaldehyd, dimethylamin a trimethylamin;
- na 6-formyl-2,3-dimethoxybenzoovou kyselinu, ta dále degraduje na 3,4-dimethoxybenzaldehyd z čehož se stává 1,2-dimethoxybenzen a nakonec na 2-methoxyfenol;
- na 3,4-dimethoxytoluen, což se dále rozpadá na 2-methoxy-4-methylfenol.

2.5 Stanovení účinných látek přípravku *Gelonida antineuralgica*

2.5.1 Stanovení acetylsalicylové kyseliny

Acetylsalicylovou kyselinu lze v plazmě detegovat jednu až dvě hodin po užití látky. Poté je v plazmě nedetegovatelná. Renální exkrece je závislá na pH moči a může se pohybovat od 5 % do 80 %. Dávka acetylsalicylové kyseliny se vylučuje ze 75 % jako salicylurová kyselina, z 10 % jako salicylová kyselina, z dalších 10 % jako glukoronidy a z 5 % jako acyl^{50, 54}.

Pro stanovení acetylsalicylové kyseliny byla v literatuře navržena řada metod, nejčastěji na základě módu RP-HPLC. Badea a Vitan⁵⁴ navrhli stanovení izokratickou elucí s použitím kolony Hypersil Duet C18/SAX (250×4,6 mm; 5 µm) a UV detekcí při 284 nm. Mobilní fázi tvořil fosfátový pufr (pH = 7,50) a methanol v poměru 65:35 (v/v). Limit detekce metody pro acetylsalicylovou kyselinu byl 0,018 mg dm⁻³.

Deconinck a kol.⁵⁶ stanovili acetylsalicylovou kyselinu pomocí UHPLC s UV detekcí při 254 nm, za použití kolony Waters Acquity BEH C18 (100×2 mm, 1.7 µm) gradientovou elucí o složení mobilní fáze: pufr octanu amonného (pH = 4) a methanol. Limit detekce acetylsalicylové kyseliny pro tuto metodu byl 0,093 mg dm⁻³.

Mineschita a kol.⁵⁷ navrhli stanovení acetylsalicylové kyseliny pomocí GC s MS detekcí s použitím kolony Restek (5 % difenyl, 95 % dimethylpolysiloxan) a heliem jako nosným plynem. Limit detekce acetylsalicylové kyseliny pro tuto metodu byl 0,345 mg dm⁻³.

2.5.2 Stanovení fenacetinu

Fenacetin lze detegovat v plazmě po orálním požití látky jednu až dvě hodiny po užití látky²⁶. Po orálním podání je fenacetin detegovatelný i v moči. Vyloučení dávky fenacetinu se pohybuje mezi 75–80 % ve formě acetaminofenu a méně než 1 % jako fenacetin.

Dams a Beijits⁵⁸ navrhli pro stanovení fenacetinu v moči a plazmě HPLC stanovení za použití kolony Lichrosorb RP-18 (250×4 mm, 5 µm) izokratickou elucí s UV detekcí při 254 nm. Mobilní fázi tvořil methanol, 1% ledová kyselina octová a 0,1 mol dm⁻³ hydrogenfosforečnan draselný v poměru 33:3:64. Limit detekce pro fenacetin byl 0,02 mg dm⁻³.

Thorn a Klein⁵⁹ popsali stanovení za použití kolony Hypersil BDS Phenyl Rocket (53×7,0 mm, 3 µm) gradientovou elucí s diode-array a fluorescenční detekcí. Mobilní fázi byla

směs vody a methanolu v poměru 90:10 (v/v) jako složka A, a methanol s obsahem $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$ triethylaminu a $0,030 \text{ mol dm}^{-3}$ mravenčí kyseliny (pH = 4,5) jako složka B. Limit detekce metody s diode-array detekcí byl $0,0016 \text{ mg dm}^{-3}$, fluorescenční detekcí byl $0,005 \text{ mg dm}^{-3}$.

Stanovení fenacetinu GC s MS detekcí popsal Mineschita a kol.⁵⁷ za použití kolony Restek (5 % difenyl, 95 % dimethylpolysiloxan) a helia jako nosného plynu dosáhli limitu detekce pro fenacetin je $0,285 \text{ mg dm}^{-3}$.

2.5.3 Stanovení kodeinu

Kodein i jeho metabolity (morfin, norkodein a dihydrokodeinon), lze detegovat ze slin, krevní plazmy a moči⁶⁰. Biologický poločas kodeinu je 2,5 až 3,0 hodiny. Kodein se vylučuje močí z asi 11 %, přičemž asi 15 % této dávky se vylučuje jako morfin a 10–15 % jako norkodein.

Badea a Vitan⁵⁴ navrhli pro stanovení kodeinu HPLC za použití kolony Hypersil Duet C18/SAX (250×4,6 mm; 5 μm) izokratickou elucí s UV detekcí při 284 nm. Mobilní fázi tvořil fosfátový pufr (pH = 7,50) a methanol v poměru 65:35 (v/v). Limit detekce pro kodein u této metody je $0,015 \text{ mg dm}^{-3}$.

Deconinck a kol.⁵⁶ využili pro stanovení kodeinu metodu UHPLC s UV detekcí při 254 nm, za použití kolony Waters Acquity BEH C18 (100×2 mm, 1.7 μm) gradientovou elucí s mobilní fází o složení vodný octan amonný (pH = 4) a methanol. Limit detekce kodeinu pro tuto metodu byl $0,032 \text{ mg dm}^{-3}$.

Kodein lze detegovat i Ramanovou spektroskopií při 785 nm (cit.⁶⁰), přičemž je kodein definován šesti píky při 535, 630, 1250, 1280, 1435 a 1595 cm^{-1} . Limit detekce kodeinu pro tuto metodu je $0,006 \text{ mg dm}^{-3}$.

2.5.4 Stanovení noskapinu

Noskapin lze detegovat z plazmy jednu hodinu po orálním podání⁶¹. Noskapin je v plazmě nedetegovatelný již čtyři hodiny po užití 50 mg látky. Biologický poločas noskapinu je 124 minut.

Thorn a Klein⁵⁹ navrhli pro HPLC stanovení noskapinu použití kolony Hypersil BDS Phenyl Rocket (53×7,0 mm, 3 μm) gradientovou elucí s diode-array a fluorescenční detekcí. Mobilní fázi byla směs vody a methanolu v poměru 90:10 (v/v) jako složka A, a methanol s obsahem

0,025 mol dm⁻³ triethylaminu a 0,030 mol dm⁻³ mravenčí kyseliny (pH = 4,5) jako složka B. Limit detekce metody s diode-array detekcí byl 0,0016 mg dm⁻³, fluorescenční detekcí byl 0,005 mg dm⁻³.

Shamsipur a Fattahi⁶² popsali stanovení noskapinu pomocí HPLC s UV detekcí při 285 nm, za použití kolony H5-ODS C18 (250×4.6 mm, 5 μm) izokratickou elucí. Mobilní fázi tvořil 0,010 mol dm⁻³ fosforečnan sodný a 0,0007 mol dm⁻³ sodný jako složka A a acetonitril jako složka B v poměru 55:45 (pH = 6,56). Limit detekce pro noskapin této metody byl 0,0005 mg dm⁻³.

Noskapin byl detegován také pomocí GC za použití kolony PEG 6,000 (3 m; polyethylen glykol), přičemž jako nosný plyn byl použit vodík⁵⁴. Limit detekce této metody byl 0,001 mg dm⁻³.

3 Experimentální část

3.1 Analyzovaný vzorek tablet *Gelonida antineuralgica*

V této práci analyzovaná tableta léčivého přípravku *Gelonida antineuralgica* byla vyrobena v Německu společností Gödecke & Co., Chemische Fabrik Aktiengesellschaft A.G. Berlin. Vzhledem k nápisu na krabičce lze přípravek datovat do let 1939–1945 (obr. 2.1). Vzorek pochází ze sbírek Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty UK. Před analýzou byl léčivý přípravek uchováván při laboratorní teplotě v temnu. Analyzovaný léčivý přípravek byl ve formě bílých, kulatých tablet. Integrita tablet byla v průběhu času značně narušena a některé tablety se rozpadaly na bílý prášek.

Podle výrobce analyzovaná tableta *Gelonida antineuralgica* obsahuje tři účinné látky s deklarovaným množstvím: acetylsalicylová kyselina (250 mg), fenacetin (250 mg) a noskapin. Výrobce deklaroval množství účinné látky noskapinu přetiskem na obalu léčiva „*Im dieser Packung ist Codein. phosphoric 0,01 durch Narcotic. hydrochloric 0,03 ersetzt*“. Přetisk není zcela čitelný (obr. 2.1).

3.2 Použité chemikálie

Mobilní fáze byla připravena z methanolu LC-MS grade (Fisher Chemical), octanu amonného p.a. (Lach-ner) a 99,9% octové kyseliny p.a. (Lach-ner). Standardy použité k optimalizaci gradientové eluce a ke kvantifikaci účinných látek v analyzovaném vzorku byly: acetylsalicylová kyselina p.a. (Herbacos Recordati), fenacetin for HPLC (Sigma-Aldrich), kodein fosfát ČL2017 (Nemocniční lékárna Fakultní nemocnice v Motole) a salicylová kyselina p.a. (Merck).

3.3 Příprava roztoků

3.3.1 Příprava mobilní fáze

Byla zvolena dvousložková mobilní fáze sestávající z methanolu a 0,1% vodného roztoku octanu amonného o pH = 6,00. Vodný roztok byl připraven z 0,771 g octanu amonného, který byl kvantitativně převeden do jednolitrové odměrné baňky. Ta byla po rysku doplněna Milli-Q vodou. Výsledné pH roztoku bylo upraveno přidáním několika kapek octové kyseliny za kontroly pH-metrem.

3.3.2 Příprava zásobních roztoků standardů

Byly připraveny roztoky standardů účinných látek (acetylsalicylová kyselina, fenacetin, kodein fosfát, noskapin, salicylová kyselina) vždy o koncentraci 500 mg dm^{-3} . Na analytických váhách bylo přibližně přesně naváženo 50,0 mg daného příslušného standardu, který byl následně kvantitativně převeden do sto mililitrové odměrné baňky. Ta následně byla doplněna methanolem po rysku a důkladně promíchána.

3.3.3 Příprava kalibračních roztoků standardů

Ředěním zásobních roztoků standardů byla vytvořena kalibrační řada o koncentracích 10, 50, 80, 120 a 150 mg dm^{-3} každé z látek. Roztoky byly připraveny do deseti mililitrových odměrných baněk. Kalibrační roztoky o koncentraci 10, 50 a 80 mg dm^{-3} byly připraveny do jedné odměrné baňky a kalibrační roztoky o koncentraci 120 a 150 mg dm^{-3} byly připraveny do dvou deseti mililitrových odměrných baněk kvůli omezenému objemu baněk. Analyty byly zvoleny do baněk dle elučních časů tak, aby analyty s blízkým elučním časem ve stejné baňce. V jedné baňce byly acetylsalicylová kyselina, kodein a salicylová kyselina, v druhé baňce byly fenacetin a noskapin.

3.3.4 Příprava roztoku autentického vzorku tablety *Gelonida antineuralgica*

Tableta analyzovaného léčiva *Gelonida antineuralgica* byla odvážena na analytických vahách a zhomogenizována ve třetí misce. Tableta byla kvantitativně převedena do sto mililitrové

odměrné baňky, ta byla doplněna methanolem po rysku a důkladně promíchána. Rozpustnost byla podpořena vložením roztoku do ultrazvukové lázně po dobu deseti minut. Poté byl roztok přefiltrován skrz filtrační papír. Z výsledného filtrátu byl odpipetován 1,00 ml roztoku do dvaceti pěti mililitrové baňky a ta byla následně doplněna methanolem po rysku.

3.4 Měření pomocí HPLC-UV

Byla zvolena dvousložková mobilní fáze ze směsi 0,1% roztoku octanu amonného ve vodě o pH = 6,00 (složka A) a 99,9% methanolu (složka B). Kolona použitá při měření byla XBridge® BEH C18 (150×3,0 mm; 2,5 μm). Měření bylo provedeno na chromatografu UHPLC NexeraXR (Shimadzu, Japonsko) s UV/VIS detektorem s diodovým polem. Teplota kolony při měření byla 30 °C, průtok mobilní fáze byl 0,4 ml min⁻¹ a objem nástřiku vzorku byl 2 μl.

3.5 Měření pomocí HPLC-MS

Měření probíhalo na chromatografu s tandemovým hmotnostním detektorem LCMSMS-8045 (Shimadzu) s ionizací elektrosprejem v pozitivním i negativním módu. Jako zmlžovací i sušící plyn byl použit dusík. Průtoková rychlost dusíku při zmlžování byla 3,00 dm³ min⁻¹, při sušení byla rychlost průtoku dusíku 10,0 dm³ min⁻¹ a teplotě 300 °C. Ostatní parametry byly stejné jako při měření pomocí HPLC-UV (odd. 3.4).

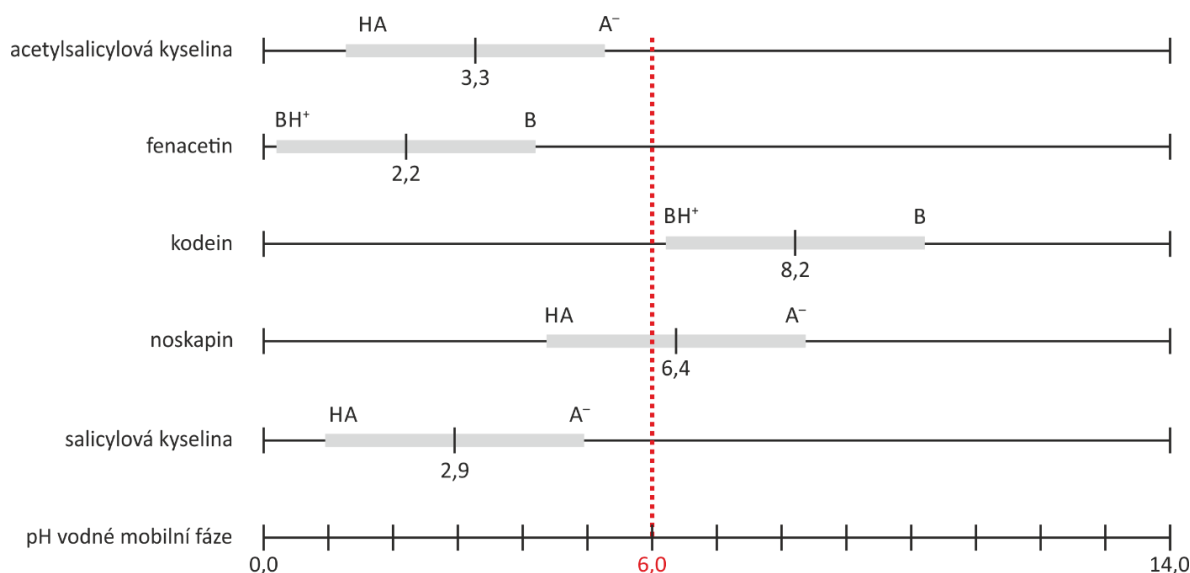
3.6 Zpracování naměřených dat

Všechna měření byla provedena v triplikátech, pokud nebylo uvedeno jinak. Výpočty chromatografických charakteristik byly provedeny podle běžných postupů. Statistické zpracování dat bylo provedeno v intervalu spolehlivosti 95 % běžnými statistickými postupy. Kalibrační závislost byla zpracována metodou nejmenších čtverců a výpočty byly vyhodnoceny pomocí programu MS Excel.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Optimalizace gradientového programu pro RP-HPLC separaci

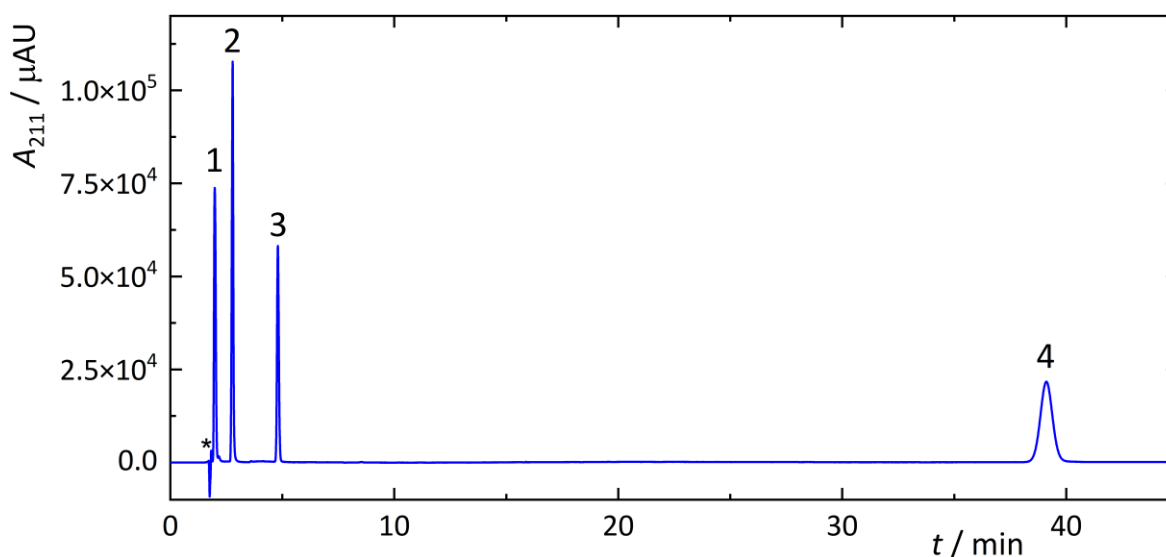
Na základě literatury uvedené v odst. 2.5 byla pro stanovení účinných látek a případných degradačních produktů analyzovaného léčivého přípravku *Gelonida antineuralgica* zvolena vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích. Byla použita kolona XBridge® BEH C18 (150×3,0 mm; 2,5 μm). Jako mobilní fáze byla použita směs 0,1% vodného roztoku octanu amonného o pH = 6,00 (složka A) a methanolu (složka B). Konečné pH vodné složky mobilní fáze bylo zvoleno na základě literatury^{63,64} tak, aby při pH převažovala pouze jedna forma (nabitá nebo nenabitá) příslušného analytu (obr. 4.1). To se bohužel nepodařilo v případě nokapinu, u této látky bylo alespoň zvoleno pH vodné složky mobilní fáze takové, aby poměr nabitě a nenabitě formy analytu blížil 1:1.



Obr. 4.1 Grafické znázornění disociačních konstant acetylsalicylové kyseliny, fenacetinu, kodeinu, noskapinu a salicylové kyseliny a jejich disociačních stavů při různém pH. Červeně vyznačeno pH vodné složky použité mobilní fáze pro RP-HPLC separaci.

Další parametry měření byly zvoleny konstantní, totiž průtok mobilní fáze $0,4 \text{ ml min}^{-1}$, teplota kolony $30 \text{ }^\circ\text{C}$, objem nástřiku vzorku byl $2 \text{ } \mu\text{l}$. Detekce probíhala UV/VIS detekcí s diodovým polem, takže bylo možné pro každý analyt zvolit jinou vlnovou délku detekce.

Pomocí roztoků standardů možných účinných látek přípravku *Gelonida antineuralgica* bylo nejprve potřebné nalézt vhodné poměry obou složek mobilní fáze, aby došlo k dostatečné separaci analytů, tak, aby rozlišení dvou sousedních píků bylo $R_{1,2} \geq 1,5$. Počáteční poměr složek mobilní fáze byl zvolen 50 % složky A a 50 % složky B. Odpovídající chromatogram je zobrazen na obr. 4.2. Je patrné, že jednak nedošlo k rozdělení acetylsalicylové a salicylové kyseliny, které koeluovaly, a jednak, že retenční čas noskapinu je extrémně dlouhý. Následně byly testovány vlivy změny vzájemných objemových poměrů složek mobilní fáze na retenční čas a následně rozlišení analytů. Získané hodnoty retenčních časů a rozlišení analytů jsou uvedeny v tabulce 4.1.



Obr. 4.2 Chromatogram směsi standardů účinných látek a možných degradačních produktů látek obsažených v přípravku *Gelonida antineuralgica*: (1) acetylsalicylová kyselina a salicylová kyselina, (2) kodein, (3) fenacetin, (4) noskapin, při složení mobilní fáze 0,1% octan amonný ($\text{pH} = 6,0$) a methanol v poměru 50:50 (v/v) na koloně XBridge® BEH C18 ($150 \times 3,0 \text{ mm}$; $2,5 \text{ } \mu\text{m}$) při vlnové délce 211 nm. Hvězdička označuje nástřikový pík. Průtok mobilní fáze $0,4 \text{ ml min}^{-1}$, teplota měření $30 \text{ }^\circ\text{C}$, objem nástřiku vzorku $2 \text{ } \mu\text{l}$. Koncentrace všech standardů: 50 mg dm^{-3} .

Tabulka 4.1

Vliv složení mobilní fáze na retenční časy a rozlišení standardů účinných látek a možných degradačních produktů látek obsažených v přípravku *Gelonida antineuralgica* na koloně XBridge® BEH C18 (150×3,0 mm; 2,5 μm). Průtok mobilní fáze 0,4 ml min⁻¹, teplota měření 30 °C, objem nástřiku vzorku 2 μl. Koncentrace všech standardů: 50 mg dm⁻³.

Parametr	A / %	30	35	40	45	50	55	60	65
	B / %	70	65	60	55	50	45	40	35
t_r (acetylsalicylová kyselina) / min	– ^a	– ^a	– ^a	1,92	1,98	2,07	2,19	2,36	2,36
w(acetylsalicylová kyselina) / min	– ^a	– ^a	– ^a	0,100	0,139	0,140	0,141	0,140	0,140
t_r (salicylová kyselina) / min	– ^a	– ^a	– ^a	2,04	2,16	2,33	2,58	2,89	2,89
w(salicylová kyselina) / min	– ^a	– ^a	– ^a	0,131	0,125	0,400	0,141	0,148	0,148
$R_{1,2}$ (acetylsalicylová kyselina, salicylová kyselina)	– ^b	– ^b	– ^b	1,07	0,38	1,97	2,29	3,68	3,68
t_r (salicylová kyselina) / min	– ^a	– ^a	– ^a	2,04	2,16	2,33	2,58	2,89	2,89
w(salicylová kyselina) / min	– ^a	– ^a	– ^a	0,131	0,125	0,140	0,141	0,148	0,148
t_r (kodein) / min	– ^a	– ^a	– ^a	2,59	2,78	3,00	3,41	3,98	3,98
w(kodein) / min	– ^a	– ^a	– ^a	0,119	0,125	0,137	0,151	0,168	0,168
$R_{1,2}$ (salicylová kyselina, kodein)	– ^b	– ^b	– ^b	4,41	1,32	4,87	4,85	6,82	6,82
t_r (fenacetin) / min	– ^a	– ^a	– ^a	3,87	4,80	6,17	8,44	11,77	11,77
w(fenacetin) / min	– ^a	– ^a	– ^a	0,134	0,165	0,201	0,235	0,307	0,307
t_r (noskapin) / min	5,55	8,19	13,04	21,91	39,05	> 60	– ^a	– ^a	– ^a
w(noskapin) / min	0,124	0,153	0,361	0,555	1,023	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a
$R_{1,2}$ (fenacetin, noskapin)	– ^b	– ^b	– ^b	52,4	58,9	– ^b	– ^b	– ^b	– ^b

^a Neměřeno.

^b Nelze vypočítat.

Z tabulky 4.1 je patrné, že s rostoucím objemovým poměrem složky B analyty z kolony eluují rychleji na úkor dostatečného rozlišení, tedy $R_{1,2} \geq 1,5$. Na základě získaných hodnot uvedených v tabulce 4.1, byl navržen následující gradientový program:

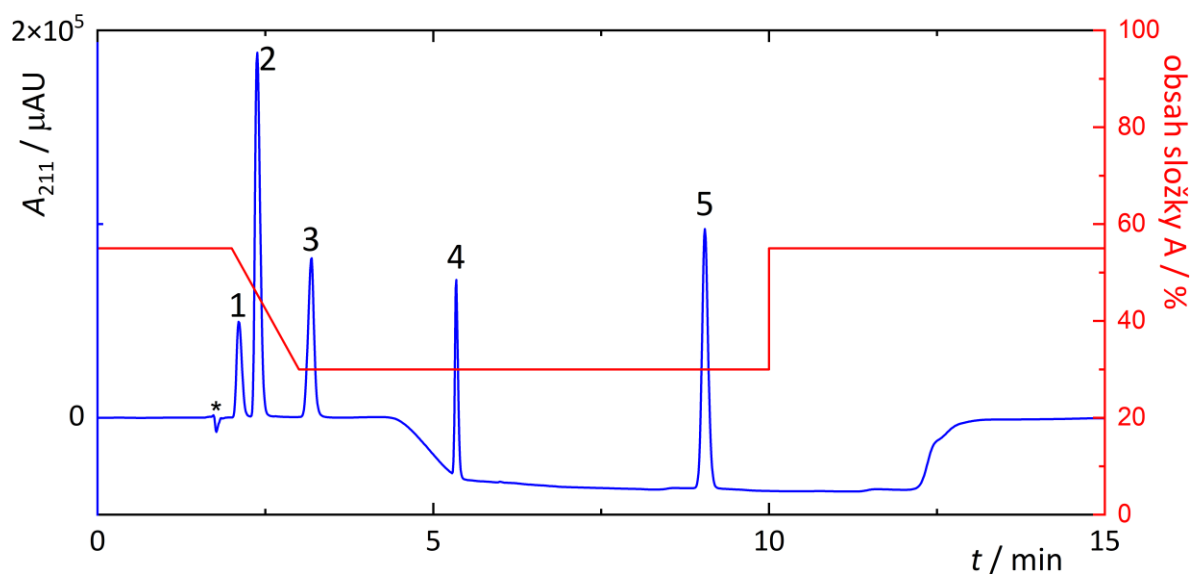
1. na prvních dvou minutách měření bylo 55 % složky A, což umožnilo dostatečnému rozlišení acetylsalicylové a salicylové kyseliny;
2. od 2,0 minuty do 3,0 minut byl pokles objemu složky A na 30 % a do 10,0 minut zůstal konstantní, což umožnilo eluci fenacetinu a noskapinu v dostatečně krátkém čase;
3. v 10,0 minutách měření byl objem složky A skokově zvýšen zpět na 55 % a eluce byla ukončena v 15,0 minutách, což umožnilo ekvilibraci kolony na počáteční stav měření.

Celková doba analýzy byla 15,0 minut. Souhrnně je gradientový program je uveden v tabulce 4.2 a získaný chromatogram standardů účinných látek a degradačních produktů léčivého přípravku *Gelonida antineuralgica* za těchto podmínek je uveden na obr. 4.3.

Tabulka 4.2

Gradientový program použitý pro separaci účinných látek a možných degradačních produktů látek obsažených v přípravku *Gelonida antineuralgica* na koloně XBridge® BEH C18 (150×3,0 mm; 2,5 μm). Průtok mobilní fáze 0,4 ml min⁻¹, teplota měření 30 °C, objem nástřiku vzorku 2 μl.

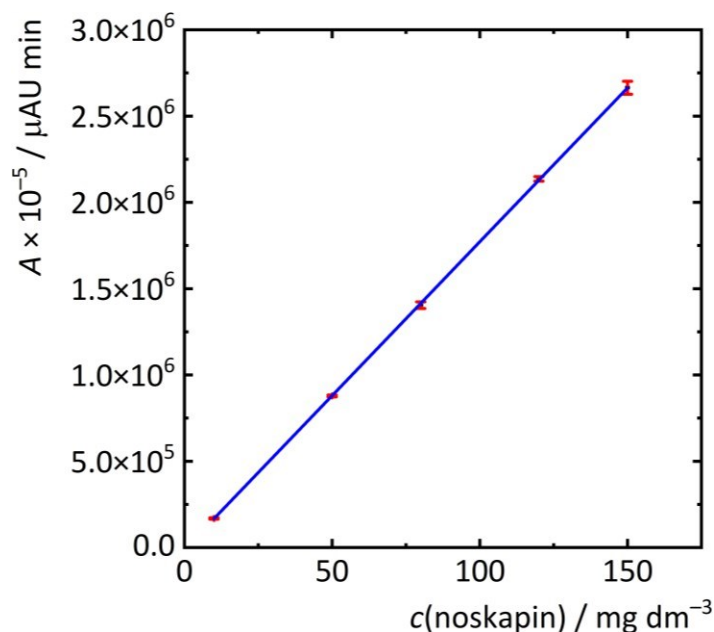
t / min	složka A / %	složka B / %
	(0,1% octan amonný, pH = 6,0)	(methanol)
0,00	55	45
2,00	55	45
3,00	30	70
10,00	30	70
10,01	55	45
15,00	55	45



Obr. 4.3 Chromatogram směsi standardů účinných látek a možných degradačních produktů látek obsažených v přípravku *Gelonida antineuralgica*: (1) acetylsalicylová kyselina, (2) salicylová kyselina, (3) kodein, (4) fenacetin, (5) noskapin, při složení mobilní fáze 0,1% octan amonný (pH = 6,0) a methanol a použití gradientového programu uvedeného v tabulce 4.2, na koloně XBridge® BEH C18 (150×3,0 mm; 2,5 μm) při vlnové délce 211 nm. Hvězdička označuje nástřikový pík. Průtok mobilní fáze 0,4 ml min⁻¹, teplota měření 30 °C, objem nástřiku vzorku 2 μl. Koncentrace všech standardů: 50 mg dm⁻³.

4.2 Kalibrační závislosti pro stanovení účinných látek

Pro zjištění reálného obsahu účinných látek a degradačních produktů, byla zhotovena pětibodová kalibrace v lineárním dynamickém rozsahu koncentrací 10–150 mg dm⁻³. Ilustrativní kalibrační závislost pro noskapin je znázorněna na obr. 4.4. Při vyhodnocení byly použity mediány získaných ploch chromatografických píků při příslušné vlnové délce absorpčního maxima dané látky, které byly zvoleny podle spekter naměřených při chromatografii. K vyhodnocení byla použita metoda lineární regrese. Získané hodnoty kalibračních závislostí vyhodnocené metodou lineární regrese jsou uvedeny v tabulce 4.3 (úseky všech kalibračních závislostí byly statisticky vyhodnoceny jako nevýznamné).



Obr. 4.4 Kalibrační závislost pro stanovení noskapinu metodou HPLC-UV založená na ploše chromatografického píku noskapinu ($t_r = 9,18$ min). Měřeno při složení mobilní fáze 0,1% octan amonný (pH = 6,0) a methanol a použití gradientového programu uvedeného v tabulce 4.2, na koloně XBridge® BEH C18 (150×3,0 mm; 2,5 μm) při vlnové délce 208 nm. Průtok mobilní fáze 0,4 ml min⁻¹, teplota měření 30 °C, objem nástřiku vzorku 2 μl.

Tabulka 4.3

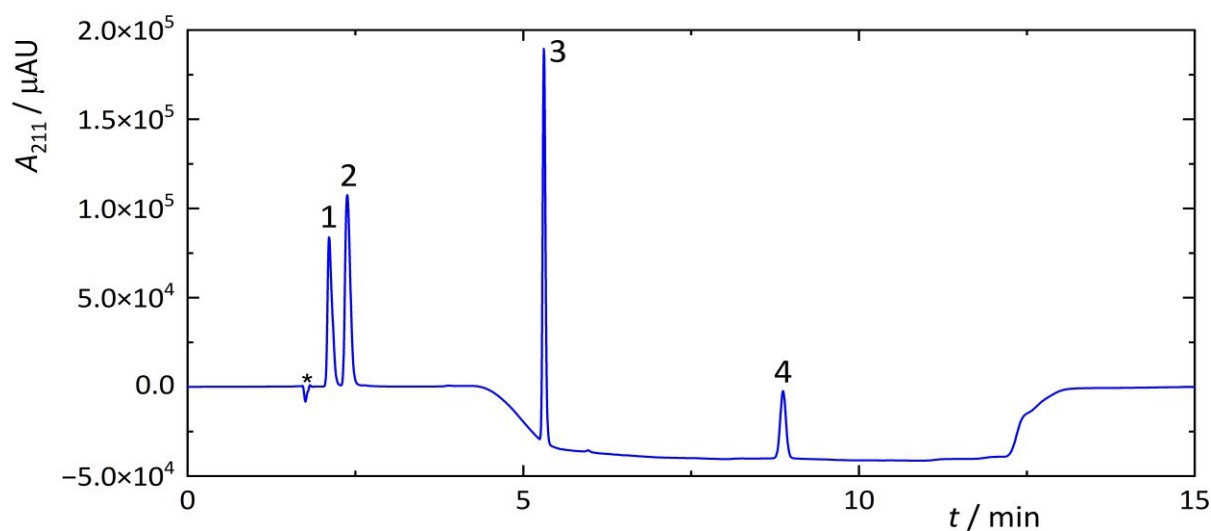
Parametry kalibračních závislostí pro stanovení účinných látek a možných degradačních produktů přípravku *Gelonida antineuralgica* metodou HPLC-UV, dle ploch chromatografických pík (podmínky měření uvedeny v odst. 3.4).

Parametr	Látka				
	Acetylsalicylová kys.	Salicylová kys.	Fenacetin	Kodein	Noskapin
t_r / min	2,12	2,39	5,38	3,23	9,17
λ / nm	224	295	244	211	208
a / $\mu\text{AU min mg}^{-1} \text{ dm}^3$	3680 ± 74	5050 ± 63	12800 ± 100	10390 ± 74	10840 ± 90
b / $\mu\text{AU min}$	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a
R^2	0,9988	0,9995	0,9998	0,9998	1,0000
LOD / mg dm^{-3}	6,7	4,2	2,7	2,4	1,3
LOQ / mg dm^{-3}	22	14	8,8	7,8	4,2

^a Hodnota není statisticky významná.

4.3 Analýza historického vzorku léčivého přípravku *Gelonida antineuralgica* metodou HPLC-UV

Roztok autentického vzorku analyzovaného léčivého přípravku *Gelonida antineuralgica* byl připraven podle odst. 3.3.4. Získaný chromatogram tohoto roztoku je uveden na obr. 4.5. Na chromatogramu jsou viditelné čtyři píky, přičemž první, třetí a čtvrtý pík odpovídají očekávaným účinným látkám podle údajů výrobce, tedy acetylsalicylové kyselině, fenacetinu a noskapinu. Druhý pík na chromatogramu je na základě porovnání retenčních časů i průběhu UV spekter salicylová kyselina, která je degradačním produktem účinné látky acetylsalicylové kyseliny.



Obr. 4.5 Chromatogram roztoku analyzované historické tablety *Gelonida antineuralgica*: (1) acetylsalicylová kyselina, (2) salicylová kyselina, (3) fenacetin, (4) noskapin, při složení mobilní fáze 0,1% octan amonný (pH = 6,0) a methanol a použití gradientového programu uvedeného v tabulce 4.2, na koloně XBridge® BEH C18 (150×3,0 mm; 2,5 μm) při vlnové délce 211 nm. Hvězdička označuje nástřikový pík. Průtok mobilní fáze 0,4 ml min⁻¹, teplota měření 30 °C, objem nástřiku vzorku 2 μl.

Pomocí kalibračních závislostí uvedených v odst. 4.2 byl následně stanoven obsah jednotlivých účinných látek a salicylové kyseliny ve třech vybraných tabletách analyzovaného léčivého přípravku *Gelonida antineuralgica*. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.4 v porovnání s množstvím deklarovaným výrobcem. V době výroby neexistoval žádný oficiální předpis na požadované množství účinných látek v tabletě. Nicméně z naměřených hodnot je patrné, že výrobce dodržel udané množství s maximální výchylkou 12 %, což bylo nejspíše způsobeno nedostatečnou kontrolou při výrobě. Dále byla zjištěna přítomnost salicylové kyseliny v množství 16,0 mg v tabletě, která je pravděpodobným degradačním produktem acetylsalicylové kyseliny.

Tabulka 4.4

Výsledky stanovení množství účinných látek ve třech vybraných tabletách historického léčivého přípravku *Gelonida antineuralgica*

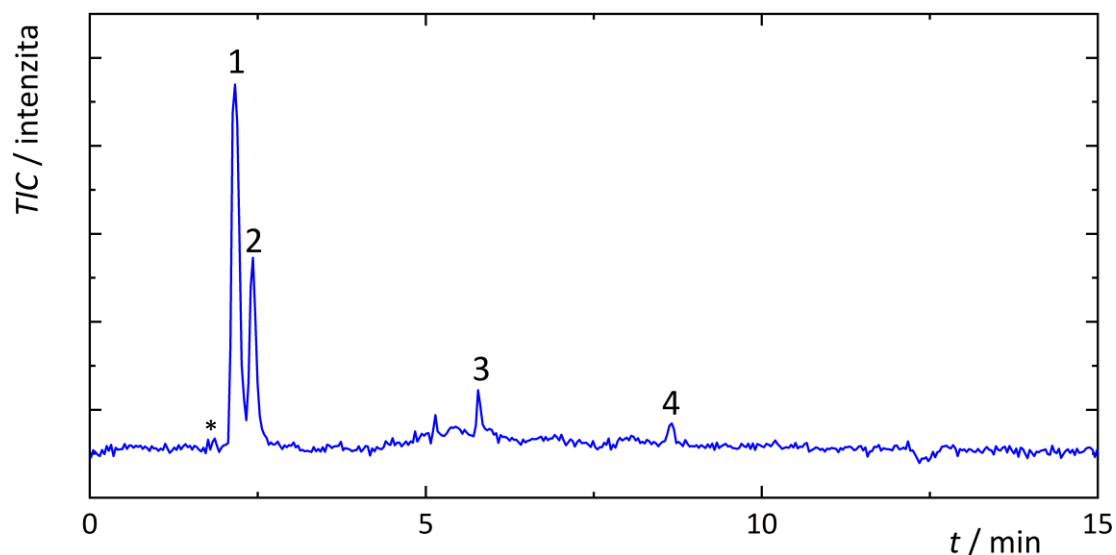
Tableta	$m(\text{tableta}) / \text{g}$	$m(\text{látka}) / \text{mg}$			
		Acetylsalicylová kyselina	Salicylová kyselina	Fenacetin	Noskapin
1.	0,5840	212	11,8	231	32,0
2.	0,5999	213	16,8	241	33,5
3. ^a	0,5920	201	16,0	237	33,6
medián	0,5920	212	16,0	237	33,5
% z deklarovaného množství		84,9	– ^b	94,8	112

^a Třetí tableta byla fyzicky degradovaná, proto byl z hmotností 1. a 2. tablety vypočten průměr a z něj procentuální rozdíl mezi 3. tabletou a tímto průměrem hmotností. Všechny hodnoty v tomto řádku jsou přepočítány na zprůměrovanou hmotnost tablet.

^b Nemá smysl.

4.4 Analýza historického vzorku léčivého přípravku *Gelonida antineuralgica* metodou HPLC-MS

Pro ověření, zda opravdu nedošlo k jiné degradaci účinných látek v analyzovaném léčivém přípravku *Gelonida antineuralgica*, než zjištěný rozpad acetylsalicylové kyseliny na salicylovou kyselinu použita HPLC-MS chromatografie s ionizací elektrosprejem v pozitivním a negativním módu (obr. 4.6). Hmotnostní detekce ukázala na možnou přítomnost další látky s retenčním časem 5,7 minut a s relativní molekulovou hmotností 167. Nicméně vzhledem k jejímu velmi malému množství nebylo možné její strukturu určit. Ostatní hmoty iontů m/z odpovídaly očekávaným hodnotám na základě molekulových hmotností látek.



Obr. 4.6 HPLC-MS chromatogram roztoku analyzované historické tablety *Gelonida antineuralgica*: (1) acetylsalicylová kyselina, (2) salicylová kyselina, (3) fenacetin, (4) noskapiin při složení mobilní fáze 0,1% octan amonný (pH = 6,0) a methanol a použití gradientového programu uvedeného v tabulce 4.2, na koloně XBridge® BEH C18 (150×3,0 mm; 2,5 μm) při vlnové délce 211 nm. Hvězdička označuje nástřikový pík. Průtok mobilní fáze 0,4 ml min⁻¹, teplota měření 30 °C, objem nástřiku vzorku 2 μl.

5 Závěr

Pro analýzu účinných látek a degradačních produktů v přípravku *Gelonida antineuralgica* ze 40. let 20. století – acetylsalicylové kyseliny, fenacetinu, noskapinu a salicylové kyseliny – byla v této práci vyvinuta a optimalizována metoda HPLC na reverzní fázi C18 s binární gradientovou elucí (0,1% vodný roztok octanu amonného a methanolu) s UV detekcí. Stanovení látek ve třech vybraných tabletách léčivého přípravku *Gelonida antineuralgica* bylo provedeno metodou kalibrační závislosti, a bylo zjištěno, že analyzovaný přípravek obsahuje (ve vztahu k množství deklarovanému výrobcem): 84,9 % acetylsalicylové kyseliny, 94,8 % fenacetinu a 112 % noskapinu. Dále byla zjištěna přítomnost salicylové kyseliny v množství 16,0 mg v tabletě, která je nejspíše degradačním produktem acetylsalicylové kyseliny. Ze zjištěného výsledného množství účinných látek lze říct, že degradaci podlehla pouze acetylsalicylová kyselina a nižší obsah fenacetinu a vyšší obsah noskapinu je nejspíše způsoben chybou při výrobě. Pomocí HPLC-MS byla zjištěna přítomnost další látky v analyzovaném přípravku, ale ve velmi malém množství, pravděpodobně se jednalo o nějakou nečistotu.

Literatura

1. M. Zilker, F. Sörgel, U. Holzgrabe: A systematic review of the stability of finished pharmaceutical products and drug substances beyond their labeled expiry dates. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **166** (2019), 22–235.
2. D. Vetchý, K. Frýbortová, M. Rabišková, A. Haring: Testování stability léčivých přípravků. *Chemické listy* **100** (2006), 24–29.
3. M. Chalabala: *Technologie léků*. Praha, Galén 2001.
4. P. Beňo, E. Truplová, V. Ostrovská: *Stabilita liečiv a liekov*. Bratislava, Veda 2003.
5. T. J. Carstensen: *Drug Stability: Principles and Practices*. New York, Marcel Dekker 2000.
6. S. Yoshioka: *Stability of Drugs and Dosage Forms*. New York, Kluwer 2000.
7. European Medicines Agency: *ICH Q1A (R2) Stability Testing of New Drug Substances and Drug Products – Scientific Guideline* 2003. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q1a-r2-stability-testing-new-drug-substances-drug-products-scientific-guideline>
8. H. H. Tønnesen: Formulation and stability testing of photolabile drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **255** (2001), 1–14.
9. S. Loewe: Antineuralgische „Mischpulver“. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **53** (1927), 559.
10. C. Hirsch: Gelonida antineuralgica bei Hals-, Nasen-, Ohrenkrankheiten. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **54** (1928), 656.
11. R. Mey: Gelonida antineuralgica zur Bekämpfung Schmerzhafter Nachwehen. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **53** (1927) 23, 970–971.
12. C. von Kromayer: Pemphigus Heilung durch Terpentineinspritzungen. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **47** (1921), 7, 187–188.
13. Pfizer: *Fachinformation: Gelonida Schmerztabletten*, 2024. Dostupné z: <https://figi.pfizer.de/sites/default/files/FI-7142.pdf>
14. *Martindale, The Complete Drug Reference*. 6th ed. London, Pharmaceutical Press 2009.
15. SUKL: *Databáze léků*. Dostupné z: [https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/#](https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/)
16. P. Thérooux, D. Waters, S. Qui, J. McCans, P. de Guise, M. Juneau: Aspirin versus heparin to prevent myocardial infarction during the acute phase of unstable angina. *Circulation* **88** (1993), 2045–2048.
17. I. Y. Matsui, T. Abe, K. Honda: Aspirin dose and treatment outcomes in Kawasaki disease: A historical control study in Japan. *Frontiers in Pediatrics* **8** (2020), 249.
18. D. G. Corby: Aspirin in pregnancy: Maternal and fetal effects. *Pediatrics* **62** (1978), 930–937.
19. R. J. Sawdy, K. M. Groom, P. R. Bennett: Experience of the use of nimesulide, a cyclooxygenase-2 selective prostaglandin synthesis inhibitor, in the prevention of preterm labour in 44 high-risk cases. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* **24** (2004), 226–229.

20. D E. Hickok, K. A. Hollenbach: The association between decreased amniotic fluid volume and treatment with nonsteroidal anti-inflammatory agents for preterm labor. *American Journal of Obstetrics and Gynaecology* **160** (1989), 1525–31.
21. W. Sneader: The discovery of aspirin: A reappraisal. *The British Medical Journal* **321** (2000), 1591–1594.
22. M. D. Smith, M. Cedric: *Textbook of Pharmacology*. New York, Saunders 1991.
23. J. P. Remington: *Remington's Pharmaceutical Sciences*. 7th ed. Pennsylvania, Mack 1985.
24. A.G. Gilman, T.W. Rall, A.S. Nies, P. Taylor: *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th ed. New York, Pergamon Press 1990.
25. *Some Pharmaceutical Drug: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Lyon, IARC 1996. Dostupné z: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Some-Pharmaceutical-Drugs-1996>
26. *Final Screening Assessment Acetamide, N-(4-ethoxyphenyl)-(phenacetin)*, 2018. Dostupné z: <https://www.canada.ca/en/environment-climate-change/services/evaluating-existing-substances/screening-assessment-phenacetin.html>
27. P. Basset, J. P. Bergerat, J. M. Lang: Hemolytic anemia and sulfhemoglobinemia due to phenacetin abuse: A case with multivisceral adverse effects. *Clinical Toxicology* **18** (1981), 493–499.
28. A. Kar: *Medicinal Chemistry*. New Delhi, New Age International 2007
29. W. Sneader: *Drug Discovery: A History*. Wiley 2005.
30. E. Ravina: *The Evolution of Drug Discovery: From Traditional Medicines to Modern Drugs*. Weinheim, Wiley 2011.
31. J. L. Goodwin, J. J. Kraemer, Z. H. Bajwa: The use of opioids in the treatment of osteoarthritis: when, why, and how? *Current Pain and Headache Reports* **9** (2005), 390–398.
32. C. Ståhl, A. M. Drewes, L. Arendt-Nielsen: Managing pain in chronic pancreatitis: Therapeutic value of opioid treatment. *Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy* **21** (2007), 63–65.
33. Z. R. Chen: Disposition and metabolism of codeine after single and chronic doses in one poor and seven extensive metabolisers. *British Journal of Clinical Pharmacology* **31** (1991), 381–390.
34. S. Kos: Moderní léčba a diferenciální diagnostika kašle. *Medicina pro praxi* **17** (2020), 18–22.
35. *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse: Foundation of Understanding, Tobacco, Alcohol, Cannabinoids and Opioids*. Vi. R Preedy (ed.). London, Academic Press 2016.
36. A. C. Brown, T. R. Fraser: On the physiological action of the salts of the ammonium bases, derived from strychnia, brucia, thebaia, codeia, morphia, and nicotia. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* **25** (1869), 151–203.
37. J. G. Smith: *Organic Chemistry*. McGraw Hill 2016.
38. *Analytical Profiles of Drug Substances, Vol. 10*. K. Florey (ed.). New York, Wiley 1981, p. 93–147.
39. J. Zhou, K. Gupta, J. Yao: Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells undergo c-Jun NH₂-terminal kinase-mediated apoptosis in response to noscapine. *The Journal of Biological Chemistry* **277** (2002), 39777–39785.
40. R. Aneja, M. Lopus, J. Zhou, S. N. Vangapandu, A. Ghaleb, J. Yao, J. H. Nettles, B. Zhou, M. Gupta, D. Panda, R. Chandra, H. C. Joshi: Rational design of the microtubule-targeting anti-breast cancer drug EM015. *Cancer Research* **66** (2006), 3782–3791.

41. A. J. DeBono, J. H. Xie: Synthesis and biological evaluation of *N*-substituted noscapine analogues. *ChemMedChem* **7** (2012), 2122–2133.
42. N. K. Manchukonda, P. K. Naik: Rational design, synthesis, and biological evaluation of third generation α -noscapine analogues as potent tubulin binding anti-cancer agents. *PLOS ONE* **8** (2013), e77970.
43. R. Aneja, M. Lopus, J. Zhou, S. N. Vangapandu, A. Ghaleb, J. Yao, J. H. Nettles, B. Zhou, M. Gupta, D. Panda, R. Chandra, H. C. Joshi: Rational design of the microtubule-targeting anti-breast cancer drug EM015. *Cancer Research* **66** (2006), 3782–3791.
44. M. Schuler, P. Muehlbauer: Noscapine hydrochloride disrupts the mitotic spindle in mammalian cells and induces aneuploidy as well as polyploidy in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* **14** (1999), 51–56.
45. D. G. Gatehouse, G. Stemp: Investigations into the induction of aneuploidy and polyploidy in mammalian cells by the anti-tussive agent noscapine hydrochloride. *Mutagenesis* **6** (1991), 279–273.
46. Ch. Warolin: Pierrwe–Jean Robiquet. *Revue d'Histoire de la Pharmacie* **321** (1999), 97–110.
47. W. H. Perkin, R. Robinson: Synthesis and resolution of gnoscopine (dl-narcotine). *Journal of the Chemical Society, Transactions* **99** (1911), 775–792.
48. R. J. Mourey, T. M. Dawson: [3H]-Noscapine binding sites in brain: Relationship to indoleamines and the phosphoinositide and adenylyl cyclase messenger systems. *Molecular Pharmacology* **42** (1992), 619–626.
49. S. Miles: *xPharm. The Comprehensive Pharmacology Reference: Aspirin*. Amsterdam, Elsevier 2008.
50. N. Taxak, K. Ch. Prasad: Mechanistic insights into the bioactivation of phenacetin to reactive metabolites: A DFT study. *Computational and Theoretical Chemistry* **1007** (2013), 48–56.
51. C. S. Kuo, C. F. Lin: Photocatalytic mineralization of codeine by UV-A/TiO₂—Kinetics, intermediates, and pathways. *Journal of Hazardous Materials* **301** (2016), 137–144.
52. S. Azizi, M. Sarkahosh: Degradation of codeine phosphate by simultaneous usage of e_{aq}⁻ and [•]OH radicals in photo-redox processes: Influencing factors, energy consumption, kinetics, intermediate products and degradation pathways. *Optik* **243** (2021), 167415.
53. M. Yoshimura, M. Deki: Thermal degradation products of narcotine and papaverine identified by gas chromatography. *Bunseki Kagaku* **12** (1963), 941–945 (*Chem. Abstr.* **60**:9066).
54. I. A. Badea, I. Vitan: Simultaneous determination of some analgesic drugs using mixed mode stationary phase. *Chromatographia* **76** (2013), 1459–1465.
55. E. Deconinck, P.Y. Sacré, S. Baudewyns, P. Courselle, J. De Beer: A fast ultra high pressure liquid chromatographic method for qualification and quantification of pharmaceutical combination preparations containing paracetamol, acetyl salicylic acid and/or antihistaminics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **56** (2011), 200–209.
56. B. P. Gumbi, B. Moodley: Target, suspect and non-target screening of silylated derivatives of polar compounds based on single ion monitoring GC-MS. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **16** (2019), 4022.
57. S. Mineschita, R. Eggers, N. R. Kitteringham, E. E. Ohnhaus: Determination of phenacetin and its metabolites in human urine and plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* **380** (1986), 407–413.

-
58. R. Dams, T. Benijts: Simultaneous determination of in total 17 opium alkaloids and opioids in blood and urine by fast liquid chromatography-diode-array detection–fluorescence detection, after solid–phase extraction. *Journal of Chromatography B* **773** (2002), 53–61.
 59. C. F. Thorn, T. E. Klein: Codeine and morphine pathway. *Pharmacogenetics and Genomics* **19** (2009), 556–558.
 60. Ch. Shende, C. Brouillette: Detection of codeine and fentanyl in saliva, blood plasma and whole blood in 5 minutes using a SERS flow-separation strip. *Analyst* **144** (2019), 5449–5454.
 61. P. Rahmanian-Devin, V. B. Rahimi: Noscapine, an emerging medication for different diseases: A mechanistic review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2021**, 8402517.
 62. M. Shamsipur, N. Fattahi: Extraction and determination of opium alkaloids in urine samples using dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* **879** (2011), 2978–2983.
 63. J. Dolan: *A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection*, 2006. Dostupné z: https://www.hplc.eu/Downloads/ACE_Guide_BufferSelection.pdf
 64. *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology. Vol. 33*. G. Harry (ed.). Amsterdam, Elsevier 2007.