

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Centrální analeptika a možnosti jejich analytického stanovení

Anna Veverková

Bakalářská práce

2018

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Anna Veverková**  
Osobní číslo: **C14104**  
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**  
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**  
Název tématu: **Centrální analeptika a možnosti jejich analytického stanovení**  
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na účinky vybraných centrálních analeptik na organismus. Dále se věnujte využití moderních analytických technik pro jejich analýzu.
2. Experimentálně stanovte obsah kofeinu v černém a zeleném čaji s využitím kapalinové chromatografie v systémech s obrácenými fázemi.
3. Výsledky experimentálně zjištěné a prezentované v literatuře porovnejte a kriticky zhodnoťte.
4. Sepište závěrečnou zprávu.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Všechna dostupná chemická literatura.**

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

**28. února 2018**


Termín odevzdání bakalářské práce:

**3. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

**Prohlašuji:**

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 29. června 2018

Anna Veverková

**Poděkování:**

Mé poděkování patří doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, a především za věnovaný čas nejen při zpracování své bakalářské práce, ale i při práci v laboratoři.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce je zaměřena na dvě vybraná analeptika s centrálně stimulačním účinkem, jedná se o kofein a methylfenidát. První část je věnována jejich příznivým i negativním účinkům na organismus, dále je popsáno využívání moderních analytických metod pro jejich stanovení. Druhá část bakalářské práce se zabývá experimentálním stanovením obsahu kofeinu v černém a zeleném čaji pomocí kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi, což je jedna z nejčastěji využívaných separačních metod analytické chemie.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Kofein, methylfenidát, analytické separační metody

## **TITLE**

Central analeptics and the possibilities of their analytical determination

## **ANNOTATION**

The bachelor thesis is focused on two selected analeptics with central stimulation effect, caffeine and methylphenidate. The first part is devoted to their positive and negative effects on the organism, and the application of modern analytical methods for their determination. The second part of the bachelor thesis deals with experimental determination of caffeine content in black and green tea by reversed-phase high performance liquid chromatography, which is one of the most frequently used separation methods of analytical chemistry.

## **KEYWORDS**

Caffeine, methylphenidate, analytical separation methods

# Obsah

Seznam ilustrací a tabulek .....	10
Seznam použitých zkratk .....	11
Úvod.....	12
1 Centrální analeptika .....	13
2 Rozdělení centrálních analeptik.....	14
2.1 Základní rozdělení centrálních analeptik .....	14
2.1.1 Přírodní .....	14
2.1.2 Syntetická.....	15
2.2 Rozdělení centrálních analeptik podle mechanismu účinku .....	16
2.2.1 Látky tlumící inhibiční neurony .....	16
2.2.2 Látky stimulující excitační neurony .....	16
3 Kofein .....	17
3.1 Vlastnosti kofeinu .....	17
3.2 Zdroje kofeinu.....	17
3.3 Farmakokinetika kofeinu .....	18
3.4 Metabolismus kofeinu .....	18
3.5 Mechanismus účinku kofeinu .....	19
3.5.1 Antagonismus adenosinových receptorů .....	20
3.5.2 Inhibice fosfodiesterázy .....	20
3.5.3 Mobilizace intracelulárního vápníku .....	20
3.6 Účinky kofeinu na lidské zdraví .....	20
3.6.1 Příznivé účinky kofeinu na lidský organismus .....	21
3.6.2 Nežádoucí účinky kofeinu na lidský organismus .....	22
3.7 Analytické metody ke stanovení kofeinu .....	23
3.7.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	24
3.7.2 Kapilární elektroforéza .....	24

3.7.3	Plynová chromatografie .....	25
3.7.4	Infračervená spektroskopie .....	25
4	Methylfenidát .....	27
4.1	Vlastnosti methylfenidátu .....	27
4.2	Zdroje methylfenidátu .....	27
4.3	Farmakokinetika methylfenidátu .....	28
4.4	Metabolismus methylfenidátu .....	28
4.5	Mechanismus účinku methylfenidátu .....	28
4.6	Účinky methylfenidátu na lidské zdraví .....	29
4.6.1	Nežádoucí účinky methylfenidátu na lidský organismus .....	29
4.7	Analytické metody ke stanovení methylfenidátu .....	30
4.7.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	30
4.7.2	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií .....	30
4.7.3	Plynová chromatografie .....	31
4.7.4	Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí .....	31
4.7.5	Kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií .....	31
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	32
5.1	Přístroje a chemikálie .....	32
5.1.1	Přístroje .....	32
5.1.2	Chemikálie .....	32
5.1.3	Pomůcky .....	32
5.1.4	Vzorky černého a zeleného čaje .....	33
5.2	Příprava roztoků .....	33
5.2.1	Příprava standardního roztoku kofeinu .....	33
5.2.2	Příprava vzorků zeleného a černého čaje .....	33
5.3	Podmínky stanovení kofeinu metodou HPLC .....	34
6	Výsledky a diskuze .....	35



7	Závěr .....	39
8	Použité literární zdroje.....	40
9	Přílohy.....	48

## Seznam ilustrací a tabulek

**Obrázek 1:** Struktura kofeinu

**Obrázek 2:** Metabolismus kofeinu v játrech za vzniku tří hlavních produktů

**Obrázek 3:** Struktura methylfenidátu

**Obrázek 4:** Metabolismus methylfenidátu v játrech za vzniku kyseliny ritalinové

**Obrázek 5:** Chromatogram separace kofeinu ve vzorku **C1** černého čaje

**Obrázek 6:** Chromatogram separace kofeinu ve vzorku **Z1** zeleného čaje

**Obrázek 7:** Kalibrační přímka pro stanovení obsahu kofeinu

**Tabulka 1:** Analeptika vyskytující se od počátku 20. století až po současnost

**Tabulka 2:** Vzorky černého a zeleného čaje

**Tabulka 3:** Obsah kofeinu ve vzorcích černého a zeleného čaje

**Příloha 1:** Chromatogram separace kofeinu ve vzorku černého čaje **C2**

**Příloha 2:** Chromatogram separace kofeinu ve vzorku černého čaje **C3**

**Příloha 3:** Chromatogram separace kofeinu ve vzorku černého čaje **C4**

**Příloha 4:** Chromatogram separace kofeinu ve vzorku zeleného čaje **Z2**

**Příloha 5:** Chromatogram separace kofeinu ve vzorku zeleného čaje **Z3**

**Příloha 6:** Chromatogram separace kofeinu ve vzorku zeleného čaje **Z4**

## Seznam použitých zkratek

CNS	Centrální nervová soustava
GABA	Kyselina gama-aminomáselná
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CE	Kapilární elektroforéza
GC	Plynová chromatografie
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
IR	Infračervená spektroskopie
ADHD	Porucha pozornosti s hyperaktivitou
MPH	<i>d-threo</i> -methylenfenidát-hydrochlorid

## Úvod

Centrální analeptika jsou léčiva se stimulačním účinkem působící na kardiovaskulární a dechové centrum. V současné době je toto označení již příležitostně používané, neboť v medicíně mají téměř zanedbatelný význam a spíše se používají pro experimentální pokusy, ale i přesto jsou často zneužívána.

První dostupnou a do dnešní doby nejrozšířenější přírodní látkou s centrálně analeptickým účinkem je kofein. Popularitu si získal hlavně díky svým rozmanitým příznivým účinkům, jedná se především o dočasné zlepšení nálady, pozornosti a potlačení únavy. Kofein je běžně dostupný v mnoha nápojích, největší procento jeho obsahu je v kávě, v černých a zelených čajích, dále ve slazených a energetických nápojích.

Methylfenidát je významný díky své indikaci v léčbě ADHD neboli poruchy pozornosti s hyperaktivitou. Tato látka je velmi často zneužívána pro své stimulační účinky.

# 1 Centrální analeptika

Centrální analeptika je souslovné pojmenování z původního řeckého termínu *analepsis*, jehož významem bylo vyléčení, uzdravení, ale také obnova. Centrální analeptika je již starší a příležitostně používané označení pro stimulanty dechového centra. Případně je lze nazvat také jako *konvulziva*, neboť vyvolávají křeče při vysokých dávkách. Dříve se tato skupina léčiv používala při dechovém útlumu, dnes je použití značně limitované kvůli velmi nízkému terapeutickému indexu [1]. V současné medicíně mají téměř zanedbatelný význam, nicméně jsou důležitým experimentálním nástrojem pro studium farmak, jako jsou zejména antiepileptika [2].

Centrální analeptika patří do základní skupiny *psychofarmak*, léčiv se stimulačním účinkem na centrální nervovou soustavu (CNS), do které spadá společně s *neuroleptiky* – léčivy s účinkem proti psychotickým onemocněním, zejména schizofrenie, *tymoleptiky* neboli antidepresivy zlepšující náladu při depresích různého původu a *anxiolyticky* – léčivy potlačující úzkost, pocit napětí a strach [3].

Jedná se o látky stimulující některé životně důležité funkce v určitém dávkovém rozmezí, přesněji řečeno stimulují kardiovaskulární a dechové centrum [2, 4]. Ve vysokých dávkách vyvolávají generalizované křeče s odpovídajícími motorickými reakcemi. Tento účinek je přímo spojen s následným zvýšením metabolismu vedoucím ke zvýšené spotřebě kyslíku [5]. Mezi nežádoucí účinky patří záchvaty, zmatenost, halucinace, nevolnost, arytmie, ischemie myokardu, hypertenze a dysfunkce moči [6].

Centrální analeptika se primárně používají jako antagonisté při předávkování hypnotiky a narkotiky [7]. Obsahují různorodou skupinu látek, jejichž užívání v medicíně nepřetržitě klesá na významu, z důvodu jejich velmi častého zneužívání a závislosti [8].

## 2 Rozdělení centrálních analeptik

V průběhu 20. století probíhaly diskuze ohledně používání analeptik na léčbu otravy sedativy nebo hypnotiky, neboť měly toxický účinek na organismus. Používání analeptik charakterizují čtyři fáze rozdělené dle časového období (*tabulka 1*). Zpočátku se vyskytovaly pouze analeptika přírodního charakteru, dále probíhal postupný vývoj syntetických látek s analeptickým účinkem [9].

**Tabulka 1:** Analeptika vyskytující se od počátku 20. století až po současnost [9]

Fáze	Období	Příklady analeptik
Přírodní analeptika	1900–1925	Kofein Kafr Strychnin
Zlatý věk analeptik	1925–1950	Nikethamid (Coramin®) Penthylentetrazol (Cardiazol®) Pikrotoxin
Analeptika druhé generace	1950–1975	Amifenazol (Daptazol®) Bemegrid (Megimide®) Doxapram (Dopram®) Ethamivan (Emivan®) Methylfenidát (Ritalin®)
Věk Ritalinu®	1975–současnost	

### 2.1 Základní rozdělení centrálních analeptik

#### 2.1.1 Přírodní

Mezi nejznámější přírodní látky s analeptickým účinkem, které existovaly jako jediná dostupná analeptika až do konce 20. let 20. století, patří kafr, strychnin a kofein (*tabulka 1*). Zdrojem jsou rostliny subtropických a tropických oblastí. **Kofein** je jedním z prvních známých přírodních analeptik, který má počátky již v 6. století v Indii. Nikdy ale nebyl považován za spolehlivé analeptikum a jeho použití se výrazně snížilo zavedením syntetických analeptik.

Nejvýznamnějším rostlinným druhem produkce kofeinu je kávovník arabský *Coffea arabica* a čajové listy čajovníku čínského *Camelia siniensis*. **Kafr** získávaný ze dřeva a kůry stromu Kafrovníku lékařského *Cinnamomum camphora* se jako přírodní analeptikum používal rovněž od 6. století v čínské medicíně a byl jedním z hlavních terapeutických činidel lékopisu z 19. století. **Strychnin** byl původně používán jako pesticid určený k hubení hlodavců. Počátkem 20. století byl ovšem rozšířen také jako analeptikum, jehož přírodním zdrojem jsou semena keře indického původu Kulčiby dávnivé *Strychnos nux vomica* [9]. Dnes již nemá terapeutický význam, je však zajímavý pro experimentální farmakologii [3].

### 2.1.2 Syntetická

V roce 1925 nastartovala první fáze nazývaná se „Zlatým věkem analeptik“ (*Tabulka 1*), která je významná vývojem prvních syntetických analeptik. Mezi nejvýznamnější můžeme zařadit pentylenetetrazol, nikethamid a pikrotoxin. Prvním syntetickým analeptikem byl **pentylenetetrazol**, známý také pod komerčním názvem Cardiazol®. Tento lék byl syntetizován Schmidtem v roce 1924 během hledání efektivní náhrady kafru. **Nikethamid** známý pod komerčním názvem Coramin® je dalším syntetickým analeptickým, ale méně účinným prostředkem, který byl představen v polovině 20. let 20. století. **Pikrotoxin**, který je význačný složením jako ekvimolární směs pikrotoxininu a pikrotinu, je jedním z nejsilnějších stimulantů dechového centra [9].

I přes terapeutické odklonění od předchozích stimulačních látek byla zavedena druhá generace syntetických analeptik (*Tabulka 1*), která byla představena během let 1950 až 1960. Do této skupiny jsou zařazeny **amifenazol**, známý pod komerčním názvem jako Daptazol®, dále **bemegrid**, nazývaný také jako Megimide® [9]. Dalším syntetickým analeptikem této fáze je **doxapram** neboli Dopram®, který se používá při hypoventilaci plic s hypoxemií a hyperkapnií, a také prevenci útlumu dýchání při celkové anestézii navozené opioidy [4]. Mimo medicínské použití se využívá v laboratorních modelech k vyvolávání panického záchvatu [10]. V současné době se ale používá spíše ve veterinární medicíně [11]. Poslední místo v tabulce si nese **methyfenidát**, také známý jako Ritalin®, který je rovněž zařazen do posledního období, neboť v té době měl začínající významnou indikaci v léčbě ADHD neboli poruchy pozornosti s hyperaktivitou. Tato terapie je rozšířena až do současnosti [9].

## **2.2 Rozdělení centrálních analeptik podle mechanismu účinku**

### **2.2.1 Látky tlumící inhibiční neurony**

Mezi látky s analeptickým účinkem tlumící inhibiční neurony patří strychnin a pikrotoxin. Hlavním mechanismem účinku strychninu je antagonismus inhibičního neurotransmiteru glycinu. Výrazně ovlivňuje celou CNS, především míchu. Velké dávky strychninu způsobují nekoordinované křeče celého organismu, až smrt organismu, která nastává udušením dýchacího svalstva při plném vědomí. Pikrotoxin jako antagonist postsynaptických receptorů působí na supraspinálních neuronech, kde má za následek snížení inhibičního působení neurotransmiteru kyseliny gama-aminomáselné (GABA). Obě látky mají za následek snížení postsynaptické hyperpolarizace a následné snížení inhibičních účinků neuronálního přenosu neurotransmiterů. Vlivem těchto účinků vznikají křeče s charakterem závislým na místě působení [2].

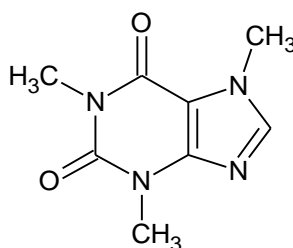
### **2.2.2 Látky stimulující excitační neurony**

Mezi látky stimulující excitační neurony patří pentetrazol, nikethamid a doxapram, jejichž mechanismus působení není zcela objasněn. Pentetrazol má spíše experimentální použití při testování antiepileptik na vyvolávání tonicko-klonických křečí. Doxapram má hlavní použití jako krátkodobé analeptikum [2].



### 3 Kofein

Kofein (*Obrázek 1*) je organická molekula složená ze čtyř základních prvků, a to uhlíku, vodíku, dusíku a kyslíku ( $C_8H_{10}N_4O_2$ ). Chemicky je známý jako *3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl-1H-purin-2,6-dion*. Jedná se o přírodní analeptikum patřící do hlavní skupiny methylovaných xantinových alkaloidů neboli methylxantinů, mezi které patří společně s teobrominem, teofylinem a paraxantinem [12]. Xantinový skelet kofeinu je odvozen z purinových nukleotidů [13].



*Obrázek 1:* Struktura kofeinu [14]

#### 3.1 Vlastnosti kofeinu

Čistý kofein se nachází buď ve formě bílého jemného prášku, nebo tvoří bílé dlouhé jehlicovité krystalky. Jedná se o látku bez zápachu s jemně hořkou chutí. Teplota sublimace kofeinu je 178 °C a bod tání je 238 °C. Při zvyšování teploty nedochází k tání, ale rovnou k sublimaci [12]. Je dobře rozpustný ve vodě, lépe za horka, dále v organických rozpouštědlech zahrnující alkohol, aceton, chloroform, ether, benzen, pyrrol, tetrahydrofuran a ethylacetát. Je rovněž dobře rozpustný v oleji [14]. Rozpustnost ve vodě může být zvýšena přidáním alkalických benzoátů, cinnamátů, citrátů nebo salicylátů do vodného roztoku. Kofein sám o sobě nepolymerizuje a nereaguje s jinými látkami [12].

#### 3.2 Zdroje kofeinu

Kofein se nachází v různém množství ve fazolích, listech a plodech mnoha rostlinných druhů převážně rostoucích v tropických nebo v subtropických oblastech světa. Mezi nejběžnější přírodní zdroje kofeinu patří ořech kolovníku zašpičatělého *Cola acuminata*, kakaový bob kakaovníku pravého *Theobroma cacao*, listy cesmíny paraguajské *Ilex paraguariensis*, známé také pod názvem yerba maté a plody paulinie nápojné *Paullinia cupana*, známé jako guarana.

Pražená kávová zrna kávovníku arabského *Coffea arabica*, kávovníku statného *Coffea robusta* a čajové listy čajovníku čínského *Camelia siniensis* jsou světovými zdroji kofeinu [15]. U rostlin obsahujících kofein slouží zároveň jako přírodní pesticid vůči hmyzu a jiným škůdcům. Rostliny si tak výrazně zvyšují svoji odolnost a růst [16].

Nejčastěji ho přijímáme z nealkoholických a energetických nápojů a čaje, ale také je obsažen v čokoládě a doplňcích stravy [15].

Kofein má dokonce i léčebné využití jako dechové a oběhové analeptikum [2]. Dále je obsažen ve volně prodejných analgetických léčivech ve směsi s aspirinem, paracetamolem a kyselinou askorbovou pro léčbu bolesti hlavy, migrény a bolesti související s poporodní, pooperační a zubní chirurgií [17]. Také nachází uplatnění v přípravcích potlačujících chuť k jídlu [18].

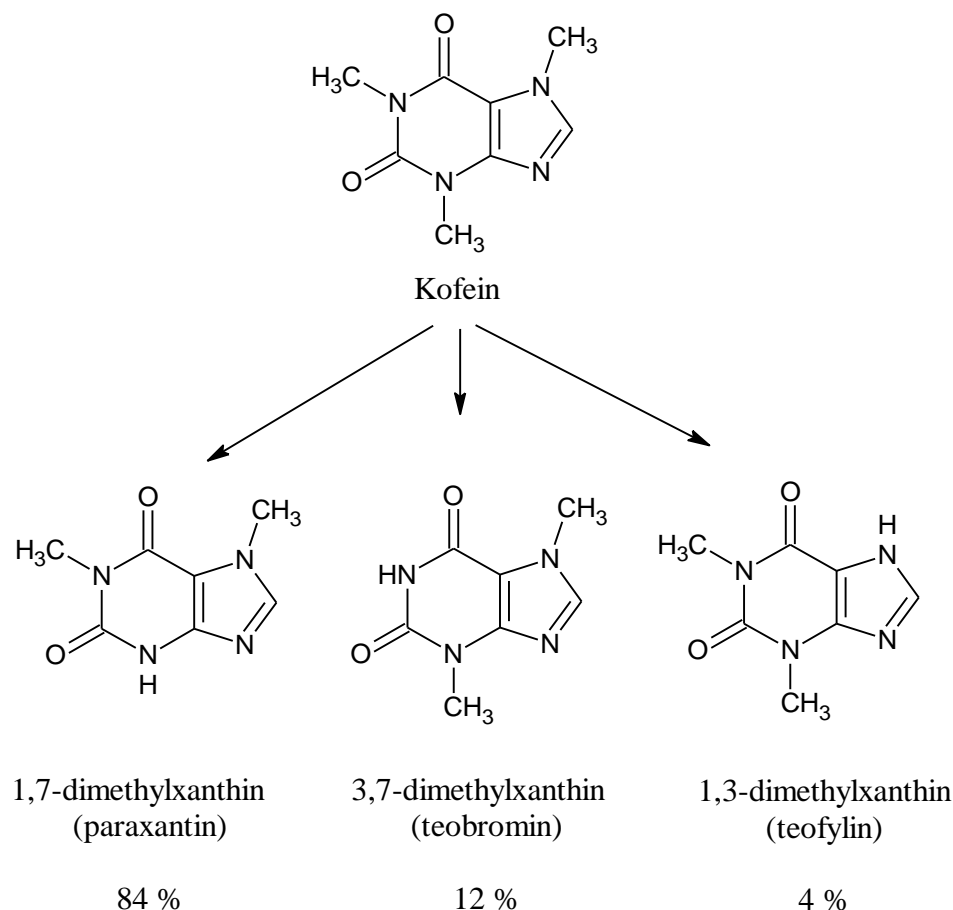
### **3.3 Farmakokinetika kofeinu**

Kofein se po požití rychle a v podstatě zcela absorbuje z gastrointestinálního traktu do krevního oběhu. Maximální koncentrace kofeinu v krvi se dosahuje během 1 až 1,5 hodiny po požití. Absorbovaný kofein je snadno distribuován po celém těle. Snadno přechází přes hematoencefalickou bariéru, přes placentu, kde se dostane až k plodu, a proto by se měl příjem kofeinu v těhotenství omezit. Poločas eliminace kofeinu se pohybuje v rozmezí od 3 do 7 hodin a je ovlivňován mnoha faktory včetně pohlaví, věku, těhotenství a kouření [19].

### **3.4 Metabolismus kofeinu**

Po vstřebání kofeinu z gastrointestinálního traktu do krevního oběhu jsou játra primárním místem jeho následného metabolismu [19]. Kofein zde metabolizuje ve velké míře za vzniku tří hlavních metabolitů *1,7-dimethylxanthinu*, *3,7-dimethylxanthinu*, a *1,3-dimethylxanthinu* (Obrázek 2). Na této látkové přeměně se především podílí enzym cytochromu P450, N-acetyltransferaza a xantinoxidáza [15].

U dospělých je kofein prakticky zcela metabolizován na 1-methylxantin a kyselinu 1-methylurovou z paraxantinového meziproduktu. Pouze 1-1,5 % požitého kofeinu se vylučuje v moči v nezměněné podobě. Děti do 1 roku mají výrazně sníženou schopnost metabolizovat kofein a vylučují ho z 85 % v moči [19].



**Obrázek 2:** Metabolismus kofeinu v játrech za vzniku tří hlavních produktů [15]

### 3.5 Mechanismus účinku kofeinu

Kofein prostupuje po celém organismu a rychle proniká do mozku. Díky vysoké rozpustnosti v tucích velmi rychle difunduje hematoencefalickou bariérou [18]. Má za následek nespočet farmakologických odpovědí včetně stimulace CNS, srdeční stimulace, relaxace hladkých svalů, zvýšené sekrece žaludeční kyseliny HCl, uvolňování katecholaminů a zvýšené metabolické aktivity [20].

V literatuře jsou popsány tři hlavní mechanismy účinku kofeinu na buněčné úrovni. Jedná se o mobilizaci intracelulárního vápníku, inhibici fosfodiesterázy a antagonismus na úrovni adenosinových receptorů. Také je formulována hypotéza naznačující čtvrtý mechanismus účinku kofeinu na CNS, a to vazba kofeinu na benzodiazepinové receptory [18]. Pro inhibici vazby benzodiazepinového receptoru je zapotřebí relativně vysokých dávek kofeinu. Dále může potencionálně změnit nukleotidový metabolismus inhibicí aktivity 5-nukleotidázy a alkalické fosfatázy nebo inhibicí absorpce adenosinu, ovšem za stejných podmínek [20].

### **3.5.1 Antagonismus adenosinových receptorů**

Nejdůležitějším mechanismem působení kofeinu je antagonismus adenosinových receptorů. Adenosin je lokálně uvolněný purin, který působí na různé receptory, které mohou zvýšit nebo snížit buněčnou koncentraci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Kofein selektivně blokuje adenosinové receptory a kompetitivně inhibuje účinek adenosinu, což vede k uvolnění norepinefrinu, dopaminu a serotoninu v mozku, ke zvýšení cirkulace katecholaminů, a hlavně ke zvýšení buněčné aktivity [19]. Kofein obsazuje především adenosinové receptory  $A_1$  a  $A_{2a}$ . Adenosinové receptory  $A_1$  se nacházejí ve všech částech mozku s největší koncentrací v hipokampu, v mozkové kůře, thalamickém jádře a receptory  $A_{2a}$  se nacházejí v oblastech mozku bohatých na dopamin [15].

### **3.5.2 Inhibice fosfodiesterázy**

Kofein je širokospektrální inhibitor řady fosfodiesteráz, ale jde o poměrně slabý inhibitor, který obecně vyžaduje koncentrace 0,1-1 mmol/l k dosažení tohoto účinku. Tyto koncentrace se obvykle nevyskytují v organismu při normálních dávkovacích režimech [20]. Blokáda enzymu fosfodiesterasy způsobí zvýšení intracelulární koncentrace cAMP a blokaci adenosinových receptorů  $A_1$  i  $A_2$ . Jelikož je adenosin jeden z hlavních inhibičních neurotransmiterů, ještě společně s GABA, jeho blokáda způsobí stimulaci CNS [19].

Kofein způsobuje zvýšení glykogenolýzy z důvodu inhibice fosfodiesterázy, která aktivuje dekompozici 3', 5'-cAMP, která způsobuje zvyšování lipolýzy. Dále se uvolňuje noradrenalin v centrální nervové soustavě a adrenalin z nadledvin [21].

### **3.5.3 Mobilizace intracelulárního vápníku**

Kofein může mobilizovat  $Ca^{2+}$  z intracelulárních úložných míst v kosterním a srdečním svalu a nervové tkáni. Uvolnění  $Ca^{2+}$  nastává prostřednictvím ryanodin-senzitivního kalciového kanálu. K vyvolání tohoto účinku je zapotřebí vysoké koncentrace kofeinu větší než 1 mmol/l [20].

## **3.6 Účinky kofeinu na lidské zdraví**

Kofein společně s kahweolem, kafestolem, chlorogenovou kyselinou a nezbytnými prvky včetně hořčičku, draslíku, niacinu a vitamínu E obsažené v kávové směsi mohou ovlivnit lidské zdraví [22].

### **3.6.1 Příznivé účinky kofeinu na lidský organismus**

Studie prokázaly příznivý vliv kofeinu na lidské zdraví se schopností zlepšení nálady, bdělosti a výkonnosti, rychlosti zpracování informací, podvědomí, pozornosti a celkové stimulace CNS [15]. Může být použit k uvolnění bronchiálních hladkých svalů při léčbě astmatu [23], apnoe u novorozenců [18], ale i jako stimulant diurézy a lipolýzy [24]. V současné době je jeho primární použití v kombinaci s ergotaminem pro léčbu migrénových bolestí hlavy [20].

Nejrozšířenějším nápojem spojeným s příjmem kofeinu je káva, ve které jsou obsaženy další látky, a to sacharidy, lipidy, vitamíny, dusíkaté látky, minerály, alkaloidy a fenolické sloučeniny. Mnohé studie prokázaly, že spotřeba kávy snižuje rizika několika chronických onemocnění. Dále jsou zahrnuty fyziologické účinky, a to stimulace CNS, akutní zvýšení krevního tlaku, zvýšená rychlost metabolismu a diuréza [22].

#### **Prevence Diabetes mellitus II. typu**

Dlouhodobé požívání kofeinu formou kávové směsi snižuje riziko vzniku cukrovky II. typu neboli *Diabetes mellitus II. typu*, nebo alespoň slouží jako prostředek prevence, neboť pomáhá udržet normální glukózovou toleranci a zvyšuje citlivost na inzulín, také díky hořčíku, který je obsažen v kávě [22].

#### **Prevence Parkinsonovy nemoci**

Příjem kofeinu snižuje riziko výskytu a symptomů neurodegenerativní Parkinsonovy nemoci, která má za následek úbytek nervových buněk produkujících dopamin zajišťující přenos signálů mezi nimi a má tak za následek degeneraci dopaminergních neuronů v mozku [22].

#### **Prevence rakoviny**

Kofein hraje pozitivní roli u mnoha typů rakoviny, zejména jako prevence rakoviny kůže vyvolané slunečním zářením, kde hlavním mutagenním účinkem UV záření je poškození DNA [15], ale i jako prevence rakoviny tlustého střeva a konečníku [22].

#### **Příjem kofeinu spojený se ztrátou hmotnosti**

Kofein má lipolytické a termogenní účinky a byl zkoumán pro potenciální použití při redukci tělesné hmotnosti. V kombinaci s efedrinem kofein způsobuje u obézních jedinců

mírné, ale významné ztráty tělesné hmotnosti. Ztráta tělesné hmotnosti byla také pozorována při kombinaci efedrinu, kofeinu a aspirinu [20].

### **3.6.2 Nežádoucí účinky kofeinu na lidský organismus**

U zdravé dospělé populace není mírná konzumace kofeinu (400 mg/den) spojena s nepříznivými účinky na zdraví. Dokonce i konzumace kofeinu pod 300 mg/den nemá nepříznivé účinky na výsledek těhotenství [25]. Naopak při nadměrném požívání se objevují příznaky nervozity, nespavosti, úzkosti, bolesti hlavy, pocit nevolnosti až zvracení, poruchy srdečního rytmu a svalový třes, ale poškození organismu příjmem kofeinu je neprokazatelné [11]. Akutní letální dávka u dospělých lidí byla odhadnuta až na 10 g/osobu [19]. Po odtržení příjmu kofeinu se pouze jako abstinenční příznak objeví bolest hlavy, který zmizí opět po přívodu kofeinu. Jiné abstinenční příznaky se nevyskytují [11]. Při dlouhodobém požívání kofeinu ve vyšších dávkách vede k návyku označovaný jako *kofeinismus* [2].

Negativní účinky spojené s příjmem kofeinu je třeba uvažovat nejen u dospělých, ale i u dětí, u kterých kofein také narušuje spánek a zhoršuje jejich normální vývoj. Navíc je kofein součástí mnoha cukrem slazených nápojů, které přispívají ke zvyšování hmotnosti a zubních kazů [15]. Toxicita kofeinu u dětí se projevuje rozrušeným chováním, závažným zvracením, tachykardií a zvýšeným vylučováním moči [19].

### **Kardiovaskulární onemocnění**

Vysoký příjem kofeinu společně s biologicky aktivní složkou derivátů kyseliny chlorogenové obsažené v kávě mají za následek zvyšování koncentrace aminokyseliny homocysteinu v plazmě, která je spojena s rizikem vzniku kardiovaskulárních onemocnění.

Konzumace kofeinu v dávkách v rozmezí 200 až 250 mg, což odpovídá množství 2 až 3 šálků kávy, zvyšuje systolický i diastolický krevní tlak u normotenzních a hypertenzních jedinců. Vyšším příjmem kofeinu v podobě 5 a více šálků kávy denně zvyšuje riziko koronárního onemocnění srdce a infarktu myokardu. Těžká konzumace kofeinu v podobě více než 10 šálků kávy je spojena s rizikem náhlé srdeční zástavy u pacientů se závažným onemocněním koronárních tepen. Dále může vzniknout riziko srdeční arytmie a mrtvice, ale toto riziko nastává spíše u pacientů s hypertenzí. Diterpeny kafestol a kahwol přijímané společně s kofeinem formou nefiltrované kávy zvyšují aktivitu proteinu CETP transportující

estery cholesterolu z HDL, který má za hlavní následek zvyšování hladiny celkového a LDL cholesterolu [22].

### **Účinek kofeinu na trávicí ústrojí**

Káva v některých případech dráždí žaludeční sliznici a stimuluje žaludeční sekreci podstatně silněji než čistý kofein. Podráždění žaludku způsobují produkty pražení, které lze očekávat i v kávě bezkofeinové. Černý čaj na rozdíl od kávy nepůsobí nepříznivě na žaludek, protože čajové listy obsahují třísloviny, které zpomalují resorpci kofeinu [21].

### **Vznik kostních problémů a osteoporózy**

Spotřebou kofeinu je způsoben mírný pokles účinnosti absorpce vápníku, a proto při vysoké spotřebě kofeinu nastává riziko úbytku kostní minerální hustoty, osteoporózy a osteoporotické zlomeniny [22].

### **Minerální nedostatky – zhoršená absorpce železa a zinku**

Polyfenoly obsažené v kávě vážou nehemové železo a potlačují tak jeho střevní vstřebávání, což vede ke zhoršené absorpci železa. Podobně se děje i u zinku, kde kávová směs obsahuje chelatační činidlo fytát inhibující biologickou dostupnost zinku a má za následek jeho nedostatek [22].

## **3.7 Analytické metody ke stanovení kofeinu**

Kofein má velmi běžné použití a významné účinky v lidském organismu, a proto jsou pro stále vzrůstající počet vzorků nezbytné nové a perspektivní analytické metody zajišťující jeho rychlé, citlivé a spolehlivé stanovení s nejnižší možnou časovou a ekonomickou náročností [17].

Mezi moderní analytické separační metody pro stanovení kofeinu patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [26-35], kapilární elektroforéza (CE) [35-37], plynová chromatografie (GC) [35, 38-40] a infračervená spektrometrie (IR) [41-45].

Kofein se z analytického hlediska stanovuje v rozličných matricích, jako jsou různé druhy kávy [28, 30-32, 35, 37, 41], čaje [26, 27, 30, 32, 33, 36, 42], energetické nápoje [32], potraviny [30, 31] a léčivé formy [29, 36, 45].

Obsah kofeinu v běžně dostupných zelených a černých čajích se stanovuje společně s důležitými čajovými složkami s antioxidačními vlastnostmi, jedná se o katechiny [26]

a fenolové kyseliny. Hlavní fenolovou kyselinou pozorovanou v čajových extraktech je kyselina gallová. Obsah těchto čajových složek souvisí s kvalitou listů čaje a stupněm fermentace při výrobním procesu. Proto je velmi důležité stanovit jednoduchou a zároveň spolehlivou analytickou metodou pro konkrétní stanovení obsahu těchto sloučenin v čajových vzorcích [27].

### **3.7.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

Jedná se o jednoduchou, rychlou, přesnou a nejčastěji používanou analytickou separační metodu pro identifikaci a kvantifikaci kofeinu [26, 27]. Při chromatografické analýze se nejvíce využívají spektrofotometrické detektory pracující v UV/VIS oblasti [27-30] a fluorescenční detektory [31, 32]. Pro stanovení kofeinu v nápojích se ve většině případů využívá vysokoúčinné kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi (RP-HPLC) [30, 31, 33], kde se používají nepolární stacionární fáze, například oktadecylsilikagel (C18) nebo oktylsilikagel (C8) a polární mobilní fáze, jako je vodný roztok acetonitrilu [26], methanolu [29-31, 34] nebo ethanolu [30]. V některých případech je upraveno pH mobilní fáze přidáním citrát-fosfátového pufru [33], kyseliny mravenčí [26, 34] nebo kyseliny octové [30]. Metoda RP-HPLC se také využívá pro stanovení kofeinu v některých typických nesteroidních protizánětlivých léčivech, jako jsou například indoprofen a ibuprofen [29]. Vzorky kávy [28, 30, 31], čaje [26, 27, 30, 33, 35], kakaa [31], čokolády [30] a léků ve formě tablet [29] se pro větší účinnost připravují rozemletím, rozpuštěním v rozpouštědle a přefiltrováním a následně se injekčně dávkuje přímo do systému [30].

Extrémně rychlé separace s vysokou účinností poskytuje ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC), která využívá chromatografické kolony plněné částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$ . Pro větší efektivnost separace látek na koloně se dosahuje vysokých pracovních tlaků pohybujících se až do 110 MPa [34].

### **3.7.2 Kapilární elektroforéza**

Kapilární elektroforéza (CE) je účinná analytická separační metoda pro analýzu nabitých molekul s vysokou účinností, krátkým časem analýzy, nízkou spotřebou vzorku a nízkými provozními náklady. Aplikace této metody byla rozšířena o zavedení elektroforetické techniky nazývané micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) pro separaci a kvantifikaci neutrálních molekul. Metoda umožňuje separaci neutrálních molekul v kapilární elektroforéze na základě jejich hydrofobní a elektroforetické mobility mezi pseudostacionární



a vodnou fází. Kofein je neutrální hydrofobní molekulou a významně tak interaguje s micelami. Proces probíhá buď za použití borátového pufru při hodnotě pH 8,1, vyšší hodnoty způsobují nerozpuštění, případně přeměnu kofeinu, nebo při pH 11 za použití fosfátového pufru, u kterého je lepší účinnost, rozlišovací schopnost a citlivost. Důležitý je přídavek fixní koncentrace surfaktantu dodecylsulfátu sodného do pufru pro provádění elektroforézy v koncentracích dostatečných k vytvoření micel. Má tak zásadní vliv na dobu migrace kofeinu s následným rozdělením do micel, s jeho absencí kofein migruje elektroosmotickým tokem a nerozpustí se od jiných neutrálních sloučenin ve vzorku [36].

MEKC se používá pro analýzu kofeinu a jeho metabolitů v nápojích, jako je káva [35, 37], čaj [36] a ve farmaceutických tabletách [36]. K detekci se nejčastěji využívá spektrofotometrických detektorů [37]. Tato metoda se také využívá pro stanovení obsahu kyselin vyskytujících se v zelených kávových zrnech, které se v průběhu pražení snižují nebo naopak zvyšují. Jedná se především o kyselinu jablečnou, citronovou, jantarovou, fosforečnou a chinovou [35].

### **3.7.3 Plynová chromatografie**

Plynová chromatografie (GC) je jednoduchá a rychlá metoda pro kvantitativní stanovení kofeinu [38] ve vybraných nápojích [39], při které se využívá helia jako nosného plynu [39]. K detekci se nejčastěji používá alkalický plamenový ionizační detektor [39] nebo hmotnostní spektrometr [40].

Spojením plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) vzniká snadnější varianta pro stanovení kofeinu v nealkoholických nápojích [40], ale také pro analýzu obsahu kofeinu a kyselin v kávových extraktech [35]. Vzorek kávy pro analýzu je čištěn metodou extrakce v pevné fázi s ethylacetátem, acetonem a methanolem jakožto s možnými elučními roztoky, nejúčinnější je však methanol [35].

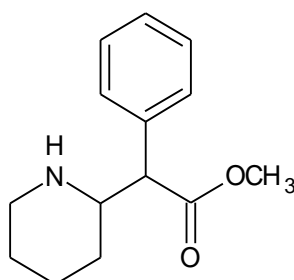
### **3.7.4 Infračervená spektroskopie**

Mezi spektroskopické metody pro stanovení kofeinu ve vzorcích kávy [41], černých čajů [42], nealkoholických nápojů [43, 44] a farmaceutických výrobků, jako jsou například kyselina acetylsalicylová, paracetamol a propyfenazon [45] patří jednoduchá, rychlá a selektivní infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, která je založena na absorpci infračerveného záření v rozsahu vlnových čísel 1800-1300  $\text{cm}^{-1}$  při průchodu analyzovaným vzorkem. Tato metoda nevyžaduje předběžné složité přípravy vzorků kávy

a listů černého čaje, jedná se pouze o extrakci vzorku chloroformem s malým přídavkem amoniaku a následné dávkování takto připraveného vzorku do systému [42]. Vzorky farmaceutických přípravků se připravují rozdrčením a přidáním práškového KBr. Následně se pro takto připravenou směs využívá reflektanční techniky, označované jako difuzní reflektance, která je vhodná pro rutinní analýzu práškových vzorků [45]. Pro detekci je využíváno pyroelektrického detektoru DTGS (deuterovaný triglycinsulfát) [41-43, 45].

## 4 Methylfenidát

Methylfenidát (*Obrázek 3*) je rovněž organická molekula složená ze čtyř základních prvků ( $C_{14}H_{19}NO_2$ ). Je známý jak pod komerčním názvem Ritalin®, tak i pod chemickým názvem *methylester kyseliny  $\alpha$ -fenyl-2-piperidinoctové* [46]. Jedná se o syntetické analeptikum patřící do hlavní skupiny amfetaminů společně s amfetaminem a metamfetaminem [3]. Počátek má v Severní Americe a je široce používán od 60. let 20. století k léčbě dětí trpící poruchou pozornosti s hyperaktivitou, označované také pod zkratkou ADHD [47].



*Obrázek 3:* Struktura methylfenidátu [46]

### 4.1 Vlastnosti methylfenidátu

Molekula methylfenidátu má dvě chirální centra [47]. Jedná se o racemickou směs skládající se z *d-threo* a *l-threo* enantiomerů v stejném poměru, ovšem farmakologicky účinnější je *d-threo* izomer. Léčivou složkou pro terapii ADHD je *d-threo*-methylfenidát-hydrochlorid (MPH) [48]. Nachází se ve formě bílého jemného krystalického prášku bez zápachu. Teplota tání MPH je 224-226 °C. Je dobře rozpustný v několika rozpouštědlech, nejvíce však ve vodě, kyselině chlorovodíkové, methanolu, ethanolu, acetonitrilu a chloroformu. Méně v n-hexanu, ethylacetátu a etheru [49].

### 4.2 Zdroje methylfenidátu

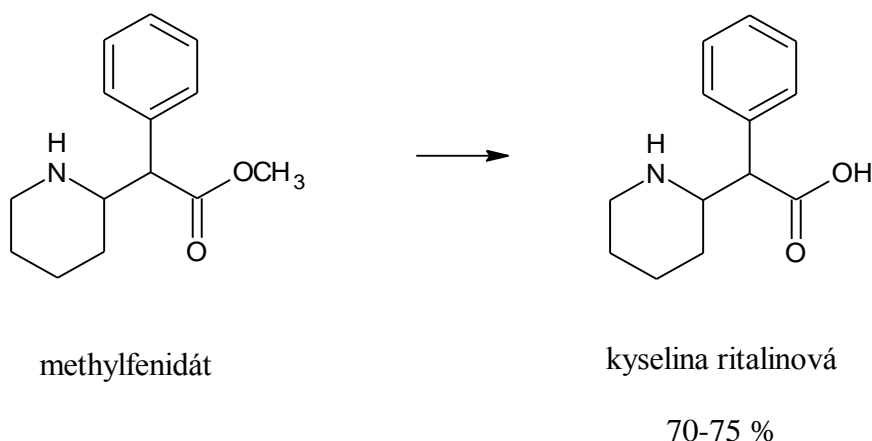
Methylfenidát se získává synteticky, v literatuře můžeme najít několik možných způsobů přípravy [49, 50, 51].

### 4.3 Farmakokinetika methylfenidátu

Vstřebávání methylfenidátu je úplné a rychlé s dobou trvání účinku od 1 do 4 hodin, neboť se dobře absorbuje z gastrointestinálního traktu a snadno prochází do mozku přes hematoencefalickou bariéru. Maximálních koncentrací léku v krvi se po perorálním podání methylfenidátu dosáhne přibližně za 2 hodiny [47].

### 4.4 Metabolismus methylfenidátu

Metabolismus methylfenidátu probíhá v játrech, kde převládající metabolickou cestou je hydrolýza esterové skupiny za vzniku kyseliny ritalinové (*Obrázek 4*) [47].



**Obrázek 4:** Metabolismus methylfenidátu v játrech za vzniku kyseliny ritalinové [47]

Dále je možné upozorovat zanedbatelné množství hydroxylovaných metabolitů, kterých je přítomno méně než 2 %. Tyto sloučeniny se poté vyloučí ve formě esterů, volných kyselin a konjugátů. Žádný z těchto metabolitů methylfenidátu významně nepřispívá k jeho farmakologické aktivitě [47].

### 4.5 Mechanismus účinku methylfenidátu

Methylfenidát můžeme označit nepřímým antagonistou, neboť přímo nestimuluje, ale spíše usnadňuje působení katecholaminů, zejména dopaminu a noradrenalinu. Tohoto procesu můžeme dosáhnout následujícími mechanismy účinku [52].

Hlavním mechanismem účinku methylfenidátu je blokáce zpětného vychytávání dopaminu a noradrenalinu na presynaptických neuronech, čímž se hromadí jejich koncentrace

v synaptické štěrbině a má tak za následek zvýšení bdělosti [47]. Dále se jedná o blokaci katabolické aktivity monoaminoxidázy [52].

#### **4.6 Účinky methylfenidátu na lidské zdraví**

Methylfenidát formou léčiva navozuje pocity pohody a euforie, kterými je ale velmi často zneužíván a vede tak k riziku vzniku toxické psychózy [53]. Je podáván formou tablet, kde jedna tableta obsahuje 10 mg aktivní složky methylfenidát-hydrochloridu [54].

#### **Porucha pozornosti s hyperaktivitou**

Methylfenidát je indikován pro hyperaktivitu s poruchou pozorností u dětí starších 6 let, trpící syndromem poruchy chování s příznaky zahrnující těkavost, vznětlivost, emoční labilitu a nezpůsobnost udržet pozornost s narušenou schopností učení [54].

#### **Narkolepsie**

Dále může pozitivně ovlivňovat příznaky narkolepsie, což je chronická neurologická porucha, která je charakteristická nadměrnou spavostí, projevující se náhlými a krátkými záchvaty spánku během dne [54].

#### **4.6.1 Nežádoucí účinky methylfenidátu na lidský organismus**

Mezi nežádoucí účinky, které se mohou vyskytovat během užívání Ritalinu®, patří výrazné změny nálad až psychotické poruchy včetně halucinací a bludů, dále bušení srdce a dušnost. Také se velmi často objevují poruchy metabolismu a výživy se sníženou chutí k jídlu. Po dlouhodobém užívání se mohou u dětí vyskytnout negativní účinky na jejich růst a vývoj. Dále bolest hlavy, bolest zubů a suchost v ústech. [54]. Také zvyšuje vylučování adrenalinu [53].

#### **Kardiovaskulární systém**

Methylfenidát zvyšuje krevní tlak a rychlost dýchání [53], proto je velmi důležité provést základní vyšetření kardiovaskulárního systému včetně vyhodnocení srdeční akce před předepsáním Ritalinu®, neboť tento lék nesmí být podáván se současným kardiovaskulárním onemocněním, včetně hypertenze, arytmie, anginy pectoris a infarktu myokardu [54].

## **Psychické poruchy**

Užívání methylfenidátu způsobuje psychické poruchy, mezi které patří výrazné změny nálady nebo osobnosti zahrnující deprese, úzkost, nervozita, napětí a nespavost. V některých případech dochází k poruchám chování a myšlení, včetně sebevražedných myšlenek, až k rozvoji agresivního a nepřátelského chování [54].

## **Gastrointestinální poruchy**

Se začínající léčbou methylfenidátem nastávají trávící obtíže zahrnující bolest břicha, žaludeční obtíže, zvracení a průjem [54].

### **4.7 Analytické metody ke stanovení methylfenidátu**

Methylfenidát se z analytického hlediska stanovuje pomocí analytických metod zejména v biologických matricích, jako je krev [49], lidská plazma [49, 55-57], moč [49, 56], ústní tekutina [56] a pot [56], ale i v tabletové formulaci [49].

Mezi moderní analytické separační metody pro stanovení methylfenidátu patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie [49, 55], spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) [56, 57], plynová chromatografie [49, 58], spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií [49, 58] a kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií [59, 60].

#### **4.7.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je jednoduchá, rychlá a citlivá metoda pro měření methylfenidátu v lidské plazmě. Často je využíváno metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi [55]. Pro detekci se nejčastěji využívá spekrofotometrických detektorů [49, 55]. Jako vnitřní standard se nejčastěji používá ethylfenidát [55] nebo 4,5-difenylimidazol [49]. Mezi nejčastěji používané mobilní fáze patří směs acetonitrilu, triethylaminu a kyseliny fosforečné [55] nebo fosfátový pufr s acetonitrem [49]. Stanovení probíhá při laboratorní teplotě [55], popřípadě při 40 °C [49].

#### **4.7.2 Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií**

Kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi ve spojení s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem byla využita pro stanovení methylfenidátu a jeho hlavního metabolitu kyseliny ritalinové. Stanovení bylo provedeno v různých biologických

matricích, zejména v plazmě, moči, ústní tekutině a potu s jednoduchou přípravou vzorků a krátkou dobou analýzy. Při této metodě se nejčastěji používá 3,4-methyldioxypropylamfetaminu jako vnitřní standard a směs octanu amonného a acetonitrilu jako mobilní fáze [56].

Dále je v literatuře popsána [57] metoda rychlé enantioselektivní kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) pro stanovení enantiomerů methylfenidátu. Stanovení probíhá v lidské plazmě. Pro detekci se používá hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem ve spojení s chemickou ionizací za atmosférického tlaku probíhající při teplotě 400 °C. Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu a vody obsahující trifluoroacetát amonný. Pro zlepšení účinnosti zpracování vzorků se využívá metody extrakce kapalina-kapalina [57].

#### **4.7.3 Plynová chromatografie**

Pro analýzu léčivé látky v krvi a krevní plazmě, dále pro identifikaci léku v moči a v tabletové formulaci ve vzorcích hydrochlorid-methylfenidátu se používá plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem. Při této metodě se používá dusík jako nosný plyn [49]. Dále jsou popsány metody s detekcí elektronového záchyty [58].

#### **4.7.4 Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí**

Hydrochlorid methylfenidátu a jeho degradační sloučeniny byly stanoveny ve vzorcích krve a moči pomocí GC-MS v režimu snímání vybraných iontů. Jako nosný plyn bylo využito helium a jako vnitřní standard ethylfenidát [49]. Metoda využívá ethylfenidát jako vnitřní standard. Extrakce vzorku se provádí směsí benzenu a hexanu, po odpaření se vzorek derivatizuje přidáním anhydridu kyseliny trifluoroctové a poté je vzorek dávkován do systému pro následnou analýzu [58].

#### **4.7.5 Kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií**

Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií bylo využito pro stanovení methylfenidátu v lidské moči [59, 60]. Tato metoda má vysokou separační účinnost, krátký čas analýzy a nízkou spotřebu vzorku. Vzorky pro analýzu byly připravené extrakcí kapalina-kapalina a následně nadávkovány do systému [59].

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Přístroje a chemikálie

#### 5.1.1 Přístroje

- digitální analytické váhy (Sartorius, Ústí nad Labem)
- rychlovarná konvice
- kapalinový chromatograf LC-30AD složený z degaseru DGU-20 A<sub>5</sub>, čerpadel LC-30AD, UV/VIS detektoru SPD-20A (vše Shimadzu, Kyoto, Japonsko) s dávkovacím systémem s vnější dávkovací smyčkou 2  $\mu$ l (Valcovici, Schenkon, Švýcarsko) a termostatem kolon LCO 102 (Ecom, České Meziříčí, ČR)
- kolona Ascentis Express C18 (100 x 2,1 mm; 2,7  $\mu$ m) (Supelco, USA)

#### 5.1.2 Chemikálie

- deionizovaná voda (Mili-Q, Merck, Německo)
- methanol (Sigma Aldrich, USA)
- kofein (Zdravotnické zásobování, Praha)

#### 5.1.3 Pomůcky

- laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce, tyčinky, odměrné baňky, filtrační nálevka)
- hmoždíř
- mikropipety
- váženka
- plastová lžička
- skládané filtrační papíry
- injekční stříkačky, 2 ml
- stříkačkové hydrofobní filtry PTFE, 0,45  $\mu$ m
- vialky



#### 5.1.4 Vzorky černého a zeleného čaje

K analytickému stanovení obsahu kofeinu v černém a zeleném čaji pomocí kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi bylo použito 8 vzorků, z toho 4 vzorky černého čaje a 4 vzorky zeleného čaje (*tabulka 2*).

**Tabulka 2:** Vzorky černého a zeleného čaje

Druh	Značka	Název	
Černé čaje	Lord Nelson	Černý čaj s lesními plody	<b>C1</b>
	Jemča	Pigi čaj	<b>C2</b>
	Ahmad Tea	English Breakfast	<b>C3</b>
	Pickwick	Ranní čaj	<b>C4</b>
Zelené čaje	Sir Winston Tea	Zelený čaj	<b>Z1</b>
	Jemča	Pravý zelený čaj	<b>Z2</b>
	Oxalis <sup>®</sup>	China Sencha – čínský sypaný pravý zelený čaj	<b>Z3</b>
	Oxalis <sup>®</sup>	Joongjak – korejský sypaný pravý zelený čaj	<b>Z4</b>

## 5.2 Příprava roztoků

### 5.2.1 Příprava standardního roztoku kofeinu

Navážením 10 mg kofeinu, který byl převeden do 10 ml odměrné baňky a doplněn po rysku 20 % methanolem, byl připraven zásobní roztok kofeinu o koncentraci 1 mg/ml. Následným zředěním zásobního roztoku byly připraveny kalibrační roztoky o koncentraci 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,12; 0,14 a 0,16 mg/ml, které byly proměřeny.

### 5.2.2 Příprava vzorků zeleného a černého čaje

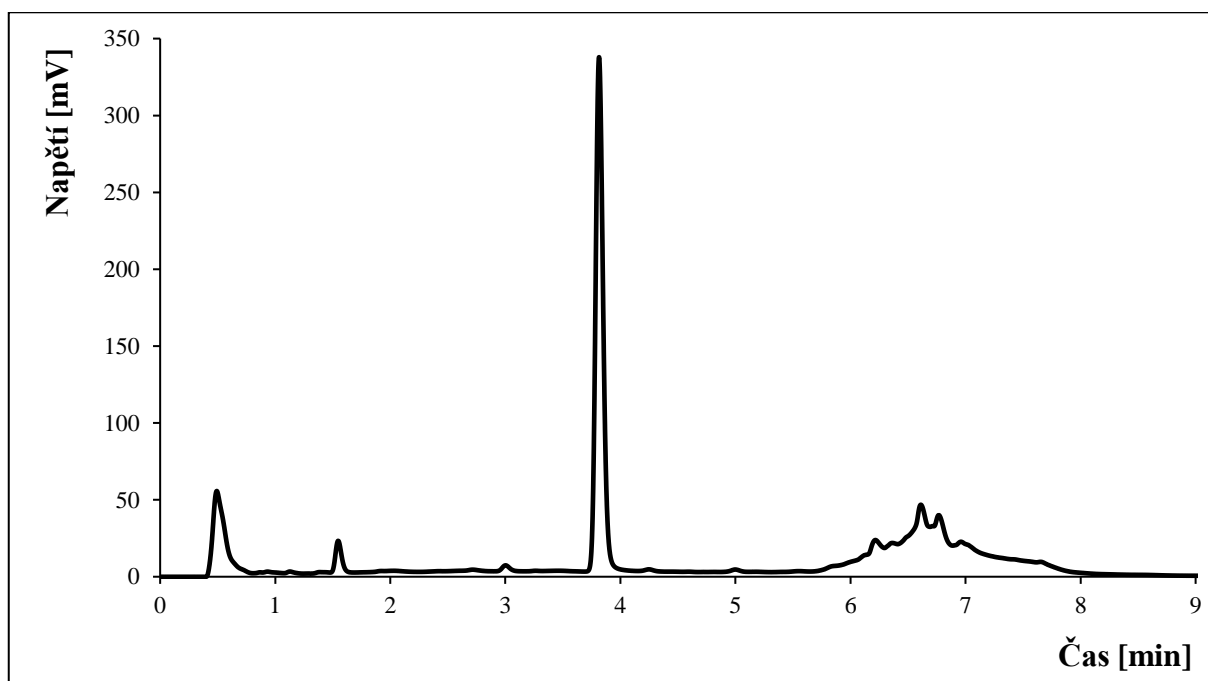
Vzorky byly připraveny rozmělněním a odvážením 1 g směsi jednotlivých čajů na analytických vahách s přesností na čtyři desetinná místa. Odvážená směs byla v kádince zalita vodou o objemu 200 ml vyhřátou na 80 °C a extrahována po dobu 4 minut. Následně byla takto připravená směs přefiltrována přes skládaný filtr a poté ještě přes stříkačkový PTFE filtr. Po vychladnutí byl takto připravený vzorek nadávkován přímo do systému.

### **5.3 Podmínky stanovení kofeinu metodou HPLC**

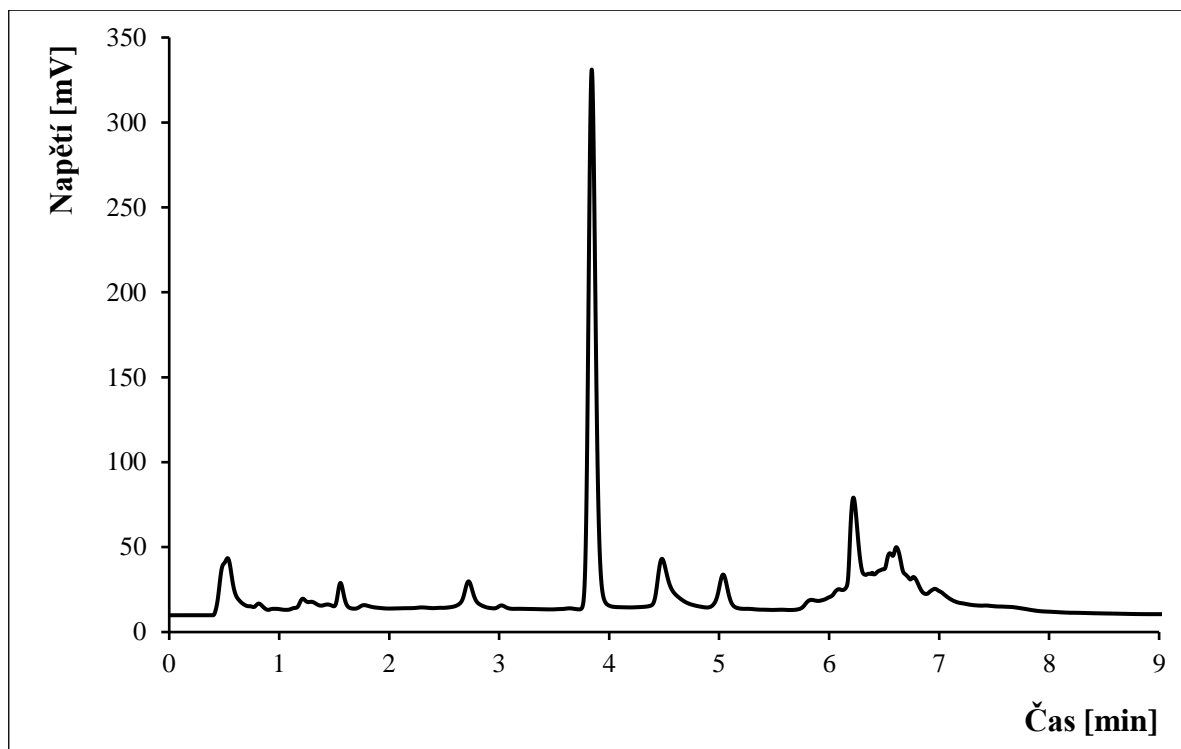
Kofein byl stanovován ve vzorcích černého a zeleného čaje pomocí kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi. Mobilní fází byla směs methanol-voda s nastaveným průtokem 0,5 ml/min. Separace probíhala na chromatografické koloně Ascentis Express C18 při teplotě 40 °C. Pro detekci bylo využito spektrofotometrického detektoru při vlnové délce 273 nm, která odpovídá absorpčnímu maximu kofeinu. Optimalizovaný gradient pro separaci kofeinu byl 0 minut – 10 %; 5 minut – 20 %; 7 minut – 80 %. Dávkované množství vzorků bylo 2 µl.

## 6 Výsledky a diskuze

Nejprve byla provedena optimalizace separačních podmínek s cílem oddělit kofein od ostatních látek obsažených v zeleném a černém čaji v co nejkratším čase. Optimalizované separace vzorků černého čaje **C1** a zeleného čaje **Z1** jsou uvedené na *obrázcích 5 a 6*. Retenční čas kofeinu při optimalizované chromatografické separaci byl 3,8 minut. Jednotlivé vzorky byly proměřeny celkem dvakrát.

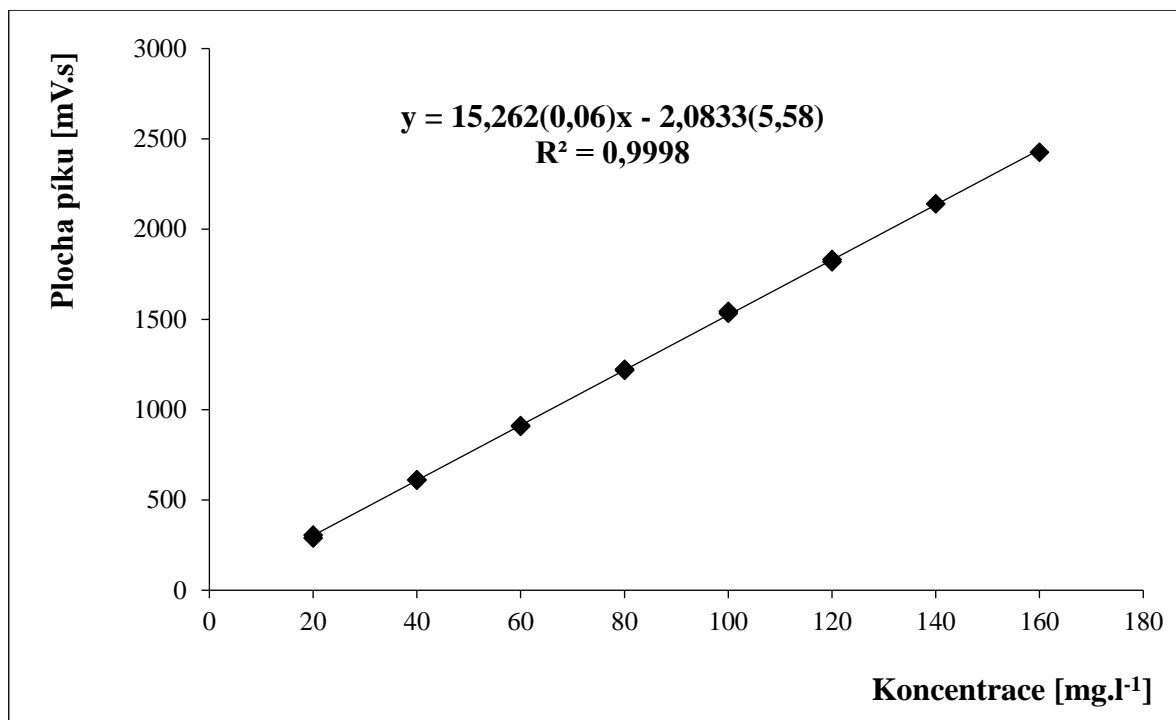


**Obrázek 5:** Chromatogram separace kofeinu ve vzorku C1 černého čaje



**Obrázek 6:** Chromatogram separace kofeinu ve vzorku **Z1** zeleného čaje

Stanovení obsahu kofeinu ve vybraných vzorcích černého a zeleného čaje bylo zjištěno pomocí metody kalibrační křivky. Kalibrační křivka (*Obrázek 7*), která je vyjádřena jako závislost plochy píku na koncentraci kofeinu je spolu s rovnicí regrese uvedená na *obrázku 7*. Z hodnoty koeficientu determinace ( $R^2 = 0,9998$ ) je patrná vysoká linearita kalibrační závislosti. Při testování významnosti absolutního členu byla prokázána jeho nevýznamnost ( $p = 0,715$ ) na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Na základě kalibrační závislosti byl vypočítán obsah kofeinu v jednotlivých vzorcích zeleného a černého čaje (*Tabulka 3*).



**Obrázek 7:** Kalibrační přímka pro stanovení obsahu kofeinu

**Tabulka 3:** Obsah kofeinu ve vzorcích černého a zeleného čaje

Vzorek	Plocha [mV.s]	Koncentrace [mg/l]	Obsah kofeinu [mg/200 ml]
<b>C1</b>	1524,18	100,00	20,00
<b>C2</b>	1311,64	86,08	17,22
<b>C3</b>	2233,21	146,46	29,29
<b>C4</b>	1746,64	114,58	22,92
<b>Z1</b>	1460,46	95,83	19,17
<b>Z2</b>	1682,97	110,41	22,08
<b>Z3</b>	1455,05	95,47	19,09
<b>Z4</b>	2004,24	131,46	26,29

Provedenou analýzou bylo zjištěno odlišné množství kofeinu obsaženého v jednotlivých vzorcích. Nejvíce kofeinu černého čaje bylo zjištěno ve vzorku **C3** (29,29 mg/200 ml), naopak nejméně obsahoval vzorek **C2** (17,22 mg/200 ml). Analyzované vzorky zeleného čaje obsahovaly podobné hodnoty, až na vzorek **Z4**, který obsahoval kofeinu nejvíce (26,29 mg/200 ml).

Značná variabilita obsahu kofeinu v černém a zeleném čaji záleží na druhu rostliny, podmínkách růstu či životním prostředí, ale také na jeho způsobu přípravy a době louhování. Také záleží na typu čaje, zda je sypaný nebo sáčkový. V sáčkovém jsou čajové lístky hodně rozdrceny a uvolní se tak více kofeinu. Naopak sypané čaje obsahují větší lístky čajovníku, a proto je dobré je před analýzou nejprve rozmělnit pro větší účinnost. Dle uváděné literatury největší podíl kofeinu obsahuje čaj yerba maté (78 mg/240 ml) v porovnání s černým čajem (55 mg/240 ml) a se zeleným čajem (35 mg/240 ml) [15]. Podíl kofeinu je ovlivňován čerstvostí lístků čajovníku připravovaného čaje, čerstvé lístky obsahují více kofeinu na rozdíl od lístků starších [61].

## 7 Závěr

Byla vypracována rešerše zabývající se centrálními analeptiky s konkrétním zaměřením na kofein a methylfenidát. Tato skupina léčiv působí stimulačně na kardiovaskulární a dechové centrum a v současné medicíně má téměř zanedbatelný význam a používají se spíše pro experimentální pokusy.

Značná část bakalářské práce byla věnována pozitivním i negativním účinkům kofeinu a methylfenidátu na organismus. Bylo zjištěno, že kofein prokazuje příznivý vliv na lidský organismus se schopností dočasné zlepšení nálady, pozornosti a potlačení únavy. Nejčastěji kofein přijímáme formou kávy, čaje, energetických nápojů, ale také formou čokolády a doplňků stravy. Dlouhodobé užívání kofeinu snižuje rizika výskytu několika onemocnění, zejména Parkinsonovy nemoci, cukrovky II. typu, rakoviny, ale i příjem kofeinu může napomáhat při redukci tělesné hmotnosti. Ovšem při vysokých dávkách každodenního příjmu kofeinu (nad 400 mg/den) se objevují příznaky nervozity, úzkosti, nespavosti a nevolnosti a hrozí riziko vzniku koronárního onemocnění srdce a infarktu myokardu. Dále se může zvýšit riziko vzniku kostních problémů, osteoporózy a minerálních nedostatků. U působení methylfenidátu na lidský organismus bylo zjištěno, že navozuje pocity pohody a euforie a z tohoto důvodu je velmi často zneužíván toxikomany. Methylfenidát je známý pod komerčním názvem jako Ritalin® a používá se hlavně při léčbě ADHD u dětí starších 6 let, ale může pozitivně ovlivňovat i příznaky narkolepsie. Methylfenidát má řadu nežádoucích účinků zahrnující psychotické poruchy, halucinace, poruchy metabolismu a výživy, dále může negativně ovlivňovat gastrointestinální systém. Dále bylo popsáno využívání moderních analytických metod pro stanovení kofeinu a methylfenidátu. Bylo zjištěno, že obě látky se dají stanovit pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, plynové chromatografie a pomocí kapalinové elektroforézy. Kofein lze navíc stanovit pomocí infračervené spektroskopie.

Experimentální část bakalářské práce se zabývá stanovením obsahu kofeinu v černém a zeleném čaji pomocí kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi, neboť je to jedna z nejčastěji používaných metod analytické chemie. Měřením bylo zjištěno, že vybrané vzorky černých a zelených čajů neprokazovaly značné rozdíly v obsahu kofeinu. Variabilita obsahu kofeinu záleží na druhu rostliny, způsobu přípravy a době louhování čaje. Rozdílný obsah kofeinu je také ovlivňován rozmělněností čajových lístků ať už ve formě sáčkového či sypaného čaje.

## 8 Použité literární zdroje

- [1] HRDINA, R., FENDRICH, Z., HRDINA, V., VIŠŇOVSKÝ, P., VLČEK, J. *Farmakologický slovník: Výkladový slovník pro širokou lékařskou a farmaceutickou veřejnost*. Praha: Maxdorf, **1997**. ISBN 80-85800-42-X.
- [2] HYNIE, S. *Speciální farmakologie – Díl 3: Látky ovlivňující CNS*. Praha: Karolinum, **2000**. ISBN 80-246-0122-2.
- [3] LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. Praha: Grada Publishing, **2002**. 696 s. ISBN 80-7169-976-4.
- [4] HYNIE, S. *Základy farmakologie*. Praha: Triton, **1999**. ISBN 80-7254-048-3.
- [5] COPER, H., HERRMANN, W. M. Psychostimulants, Analeptics, Nootropics: An Attempt to Differentiate and Assess Drugs Designed for the Treatment of Impaired Brain Functions. *Pharmacopsychiatry*. **1988**, 21(5), 211-217. ISSN 0176-3679.
- [6] BRAND, J., ARROWSMITH, J. E. Respiratory system: applied pharmacology. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*. **2017**, 18 (12), 609-613. ISSN 1472-0299.
- [7] VARDANYAN, R. S., HRUBY V. J. Central Nervous System Stimulants. *Synthesis of Essential Drugs*. Amsterdam: **2006**, 117-124. ISBN 978-0-444-52166-8.
- [8] HOFMEISTER, A. Analeptics. In: ELVERS, B., ed. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 7th completely rev. ed. Weinheim: Wiley-VCH, **2012**, s. 1-2. Vol. 3. ISBN 978-3-527-32943-4.
- [9] WAX, P. M. Analeptic use in clinical toxicology: A historical appraisal. *Journal of Toxicology – Clinical Toxicology*. **1997**, 35 (2), 203-209. ISSN 0731-3810.



- [10] Doxapram. *The Merck Index\* online* [online]. Whitehouse Station (New Jersey): Royal Society of Chemistry, ©2018. Last Revised 2013. [cit. 4. 1. 2018]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m4751/doxapram?q=authorize>
- [11] LINCOVÁ, D., FARGHALI H. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, **2007**. 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0.
- [12] PREEDY, V. R. *Caffeine: Chemistry, Analysis, Function and Effects*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, **2012**. ISBN 978-1-84973-367-0.
- [13] ASHIHARA, H., CROZIER, A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. *Trends in Plant Science*. **2001**, 6 (9), 407-413. ISSN 1360-1385.
- [14] Caffeine. *The Merck Index\* online* [online]. Whitehouse Station (New Jersey): Royal Society of Chemistry, ©2017. Last Revised 2013. [cit. 26. 10. 2017]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m2909/caffeine?q=authorize>
- [15] HECKMAN, M. A., WEIL J., de MEJLA, E. G. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters. *Journal of Food Science*. **2010**, 75 (3), R77-R87. ISSN 0022-1147.
- [16] HIROSHI, A., HIROSHI, S., ALAN, C. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry*. **2008**, 69 (4), 841-856. ISSN 0031-9422.
- [17] SVORC, L. Determination of caffeine: a comprehensive review on electrochemical methods. *International Journal of Electrochemical Science*. **2013**, 8 (4), 5755-5773. ISSN 1452-3981.
- [18] NEHLIG, A. Y., DAVAL, J. L., DEBRY, G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews*. **1992**, 17 (2), 139-170. ISSN 0165-0173.

- [19] NAWROT, P., JORDAN, S., EASTWOOD, J., ROTSTEIN, J., HUGENHOLTZ, A., FEELEY, M. Effects of caffeine on human health. *Food Additives & Contaminants*. **2003**, 20 (1), 1-30. ISSN 0265-203X.
- [20] SAWYNOK, J. Pharmacological Rationale for the Clinical Use of Caffeine. *Drugs*. **1995**, 49 (1), 37-50. ISSN 0012-6667.
- [21] LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M. Farmakologie a toxikologie. Praha: Grada Publishing, **2002**. 696 s. ISBN 80-7169-976-4.
- [22] HIGDON, J. V., FREI, B. Coffee and health: a review of recent human research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2006**, 46 (2), 101-123. ISSN 1040-8398.
- [23] OFLUOGLU, E., PASAOGLU, H., PASAOGLU, A. The Effects of Caffeine on L-Arginine Metabolism in the Brain of Rats. *Neurochemical Research*. **2009**, 34 (3), 395-399. ISSN 0364-3190.
- [24] FREDHOLM, B. B. On the Mechanism of Action of Theophylline and Caffeine. *Journal of Internal Medicine*. **1985**, 217 (2), 149-153. ISSN 0001-6101.
- [25] MITCHELL, D. C., KNIGHT, C. A., HOCKENBERRY, J., TEPLANSKY, R., HARTMAN, T. J. Beverage caffeine intakes in the U.S. *Food and Chemical Toxicology*. **2014**, 63, 136-142. ISSN 0278-6915.
- [26] FERNÁNDEZ, P. L., MARTÍN, M. J., GONZÁLEZ, A. G., PABLOS, F. HPLC determination of catechins and caffeine in tea. Differentiation of green, black and instant teas. *Analyst*. **2000**, 125 (3), 421-425. ISSN 0003-2654.
- [27] ZUO, Y., CHEN, H., DENG, Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine, and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*. **2002**, 57 (2), 307-316. ISSN 0039-9140.

- [28] CASAL, S., OLIVEIRA, M. B., FERREIRA, A. HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee. *Food Chemistry*. **2000**, 68 (4), 481-485. ISSN 0308-8146.
- [29] MARTÍN, M. J., PABLOS, F., GONZÁLEZ, A. G. Simultaneous determination of caffeine and non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceutical formulations and blood plasma by reversed-phase HPLC from linear gradient elution. *Talanta*. **1999**, 49 (2), 453-459. ISSN 0039-9140.
- [30] BISPO, M. S., VELOSO, M. C. C., PINHEIRO, H. L. C., DE OLIVEIRA, R. F. S., REIS J. O. N, DE ANDRADE, J. B. Simultaneous determination of caffeine, theobromine, and theophylline by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science* **2002**, 40 (1), 45-48. ISSN 0021-9665.
- [31] BRUNETTO, M. d. R., GUTIÉRREZ, L., DELGADO, Y., GALLIGNANI, M., ZAMBRANO, A., GÓMEZ, A., RAMOS, G., ROMERO, C. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*. **2007**, 100 (2), 459-467. ISSN 0308-8146.
- [32] ROSTAGNO, M. A., MANCHÓN, N., D'ARRIGO, M., GUILLAMÓN, E., VILLARES, A., GARCÍA-LAFUENTE, A., RAMOS, A., MARTÍNEZ, J. A. Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. *Analytica Chimica Acta*. **2011**, 685 (2), 204-211. ISSN 0003-2670
- [33] HOEFLER, A. C., COGGON, P. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of tea constituents. *Journal of Chromatography A*. **1976**, 129, 460-463. ISSN 0021-9673.
- [34] ZACHARIS, C. K., KIKI, F. S., TZANAVARAS, P. D., FYTIANOS, K. Development and validation of a rapid ultra high pressure liquid chromatographic method for the determination of methylxanthines in herbal infusions. *Journal of Chromatography B:*

*Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **2013**, 927, 218-222. ISSN 1570-0232.

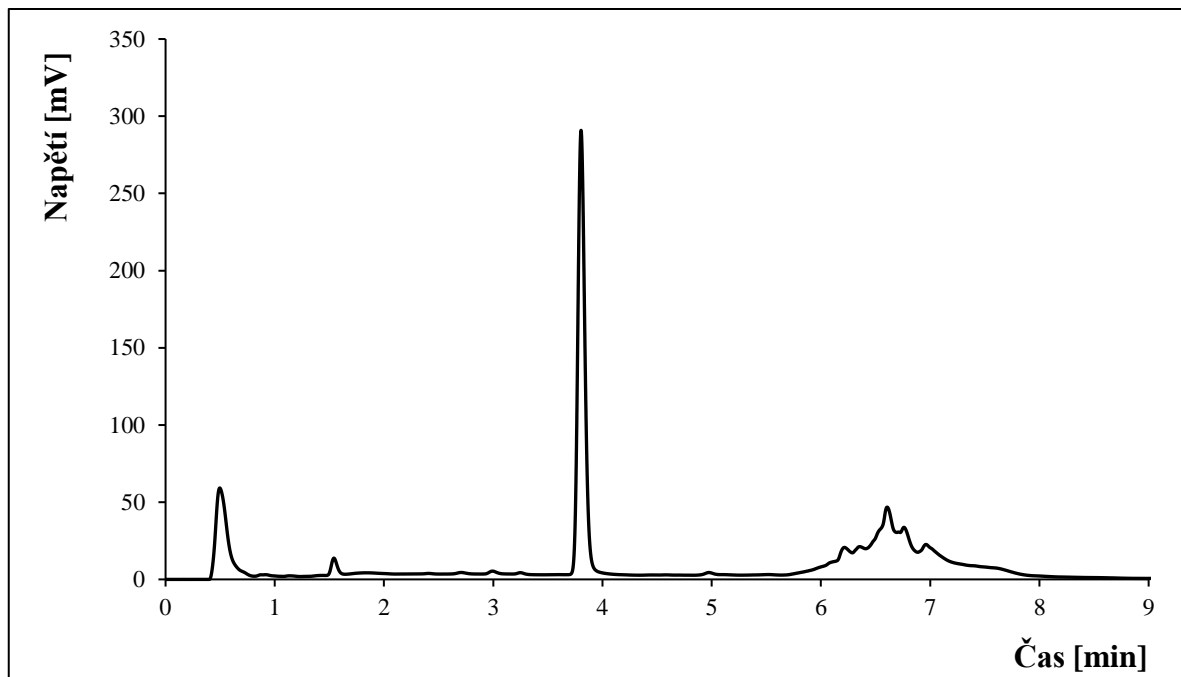
- [35] RODRIGUES, C. I., MARTA, L., MAIA, R., MIRANDA, M., RIBEIRINHO, M., MAGUAS, C. Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2007**, 20 (5), 440-448. ISSN 0889-1575.
- [36] ZHAO, Y., LUNTE, C. E. Determination of caffeine and its metabolites by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **1997**, 688 (2), 265-274. ISSN 0378-4347.
- [37] MAESO, N., del CASTILLO, C., CORNEJO, L. GARCÍA-ACICOLLAR, M., ALGUACIL, L. F., BARBAS, C. Capillary electrophoresis for caffeine and pyroglutamate determination in coffees. Study of the in vivo effect on learning and locomotor activity in mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2006**, 41 (4), 1095-1100. ISSN 0731-7085.
- [38] SHRIVAS, K., WU, H.-F. Rapid determination of caffeine in one drop of beverages and foods using drop-to-drop solvent microextraction with gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2007**, 1170 (1-2), 9-14. ISSN 0021-9673.
- [39] CONTE, E. D., BARRY, E. F. Gas chromatographic determination of caffeine in beverages by alkali aerosol flame ionization detection. *Microchemical Journal*. **1993**, 48 (3), 372-376. ISSN 0026-265X.
- [40] ZOU, J., LI, N. Simple and environmental friendly procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric determination of caffeine in beverages. *Journal of Chromatography A*. **2006**, 1136 (1), 106-110. ISSN 0021-9673.
- [41] BOUHSAIN, Z., GARRIGUES, J. M., GARRIGUES, S., de la GUARDIA, M. Flow injection Fourier transform infrared determination of caffeine in coffee. *Vibrational Spectroscopy*. **1999**, 21 (1-2), 143-150. ISSN 0924-2031.

- [42] MASHKOURI NAJAFI, N., HAMID, A. S., AFSHIN, R. K. Determination of caffeine in black tea leaves by Fourier transform infrared spectrometry using multiple linear regression. *Microchemical Journal*. **2003**, 75 (3), 151-158. ISSN 0026-265X.
- [43] DAGHBOUCHE, Y., GARRIGUES, S., VIDAL, M. T., de la GUARDIA, M. Flow Injection Fourier Transform Infrared Determination of Caffeine in Soft Drinks. *Analytical Chemistry*. **1997**, 69 (6), 1086-1091. ISSN 0003-2700.
- [44] PARADKAR, M. M., IRUDAYARAJ, J. Rapid determination of caffeine content in soft drinks using FTIR-ATR spectroscopy. *Food Chemistry*. **2002**, 78 (2), 261-266. ISSN 0308-8146.
- [45] BAUCCELLS, Montserrat, FERRER, Nuria, GOMEZ, Pilar, LACORT, Gloria, ROURA, Montserrat. Determination of caffeine in solid pharmaceutical samples by FTIR spectroscopy. *Mikrochimica Acta*. **1993**, 112 (1-4), 87-98. ISSN 0026-3672.
- [46] Methylphenidate. *The Merck Index\* online* [online]. Whitehouse Station (New Jersey): Royal Society of Chemistry, ©2018. Last Revised 2013. [cit. 19. 2. 2018]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m7453/methylphenidate?q=authorize>
- [47] KIMKO, H. C., CROSS, J. T., ABERNETHY, D. R. Pharmacokinetics and clinical effectiveness of Methylphenidate. *Clinical Pharmacokinetics*. **1999**, 37 (6), 457-470. ISSN 0312-5963.
- [48] SILVA R., TILKER H. A., CECIL J. T., KOWALIK S., KHETANI V., FALECK H., PATIN J. Open-label study of dexamethylphenidate hydrochloride in children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder. *Journal of child and adolescent psychopharmacology*. **2004**, 14 (4), 555-563. ISSN 1044-5463.
- [49] PADMANABHAN, G. R. Methylphenidate Hydrochloride. *Analytical Profiles of Drug Substances*. **1981**, 10, 473-497.

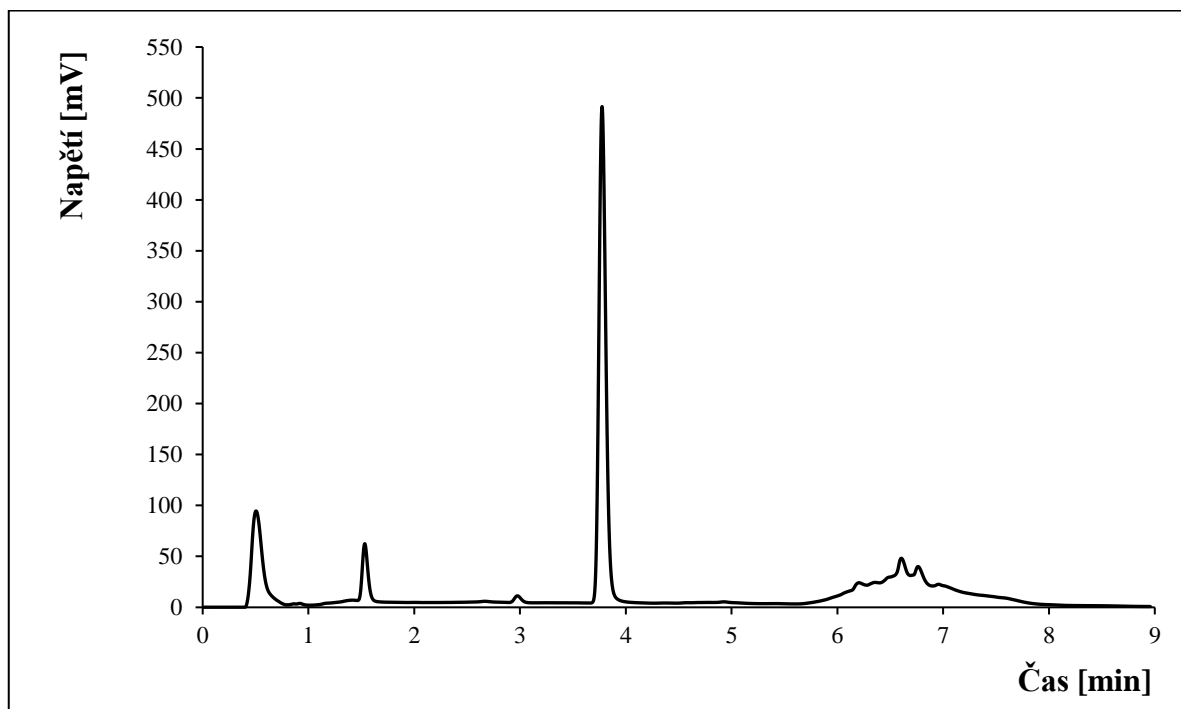
- [50] AXTEN, J. M., IVY, R., KRIM, L., WINKLER, J. D. Enantioselective Synthesis of D-threo-Methylphenidate. *Journal of the American Chemical Society*. **1999**, 121 (27), 6511-6512. ISSN 0002-7863.
- [51] PRASHAD, M., KIM, H.-Y., LU, Y., LIU, Y., HAR, D., REPIC, O., BLACKLOCK, T. J., GIANNOUSIS, P. The First Enantioselective Synthesis of (2R,2'R)-threo-(+)-Methylphenidate Hydrochloride. *Journal of Organic Chemistry*. **1999**, 64 (5), 1750-1753. ISSN 0022-3263.
- [52] SOLANTO, M. V. Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. *Behavioural Brain Research*. **1998**, 94 (1), 127-152. ISSN 0166-4328.
- [53] MARTIN, W. R., SLOAN, J. W., SAPIRA, J. D., JASINSKI, D. R. Physiologic, subjective, and behavioral effects of amphetamine, methamphetamine, ephedrine, phenmetrazine, and methylphenidate in man. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. **1971**, 12 (2), 245-258. ISSN 0009-9236.
- [54] Ritalin. *Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]*. Praha: SÚKL, ©2010. [cit. 11. 5. 2018]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0015622&tab=texts>
- [55] LALANDE, M., WILSON, D. L., MCGILVERAY, I. J. HPLC determination of methylphenidate in human plasma. *Journal of Liquid Chromatography*. **1987**, 10 (10), 2257-2264. ISSN 0148-3919.
- [56] MARCHEI, E., FARRE, M., PELLEGRINI, M., ROSSI, S., GARCIA-ALGAR, O., VALL, O., PICHINI, S. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry determination of methylphenidate and ritalinic acid in conventional and non-conventional biological matrices. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2009**, 49 (2), 434-439. ISSN 0731-7085.

- [57] RAMOS, L., BAKHTIAR, R., TSE, L. S. Liquid-liquid extraction using 96-well plate format in conjunction with liquid chromatography/tandem mass spectrometry for quantitative determination of methylphenidate (Ritalin®) in human plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2000**, 14, 740-745.
- [58] CHAN, Y. M., SOLDIN, S. J., SWANSON, J. M., DEBER, C. M., HIESSEN, J. J., MACLEOD, S. Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of methylphenidate (ritalin) in serum. *Clinical Biochemistry*. **1980**, 13 (6), 266-72. ISSN 0009-9120.
- [59] BACH, G. A., HENION, J. Quantitative capillary electrophoresis-ion-trap mass spectrometry determination of methylphenidate in human urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **1998**, 707 (1+2), 275-285. ISSN 0378-4347.
- [60] CHEN, S.-H., CHEN, Y.-H. Pharmacokinetic applications of capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. **1999**, 20 (15-16), 3259-3268. ISSN 0173-0835.
- [61] LIN, Y.-S., TSAI, Y.-J., TSAY, J.-S., LIN, J.-K. Factors Affecting the Levels of Tea Polyphenols and Caffeine in Tea Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51 (7), 1864-1873. ISSN 0021-8561.

## 9 Přílohy

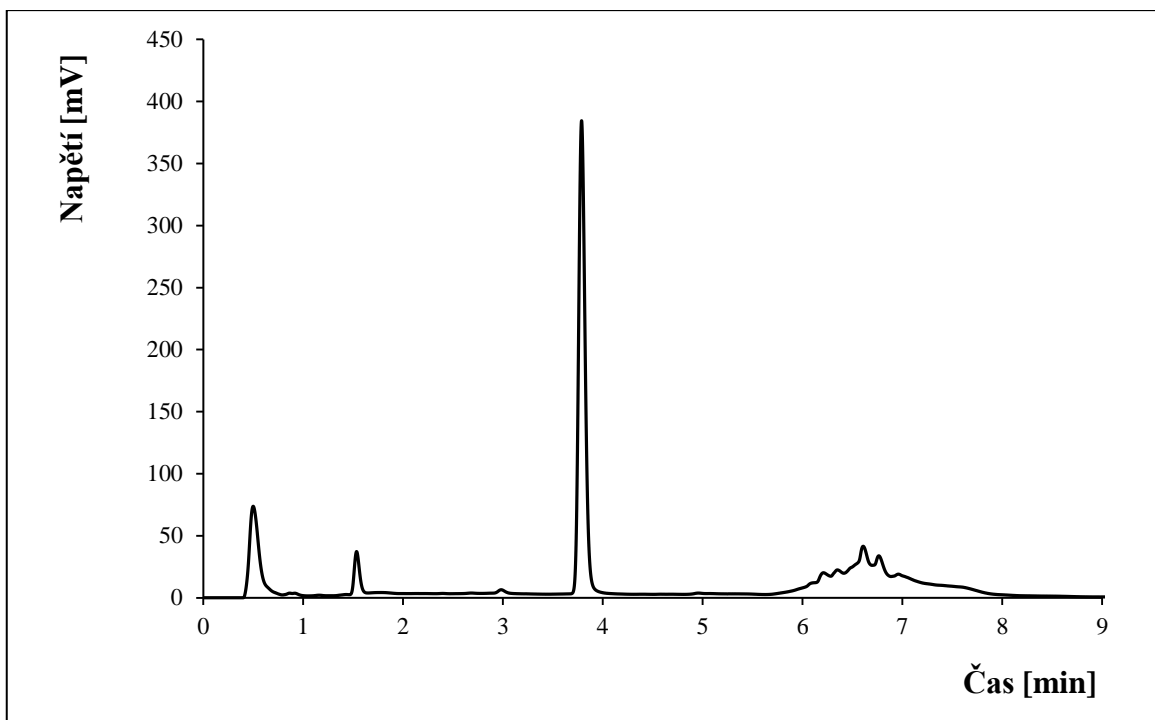


*Příloha 1:* Chromatogram separace kofeinu ve vzorku černého čaje C2

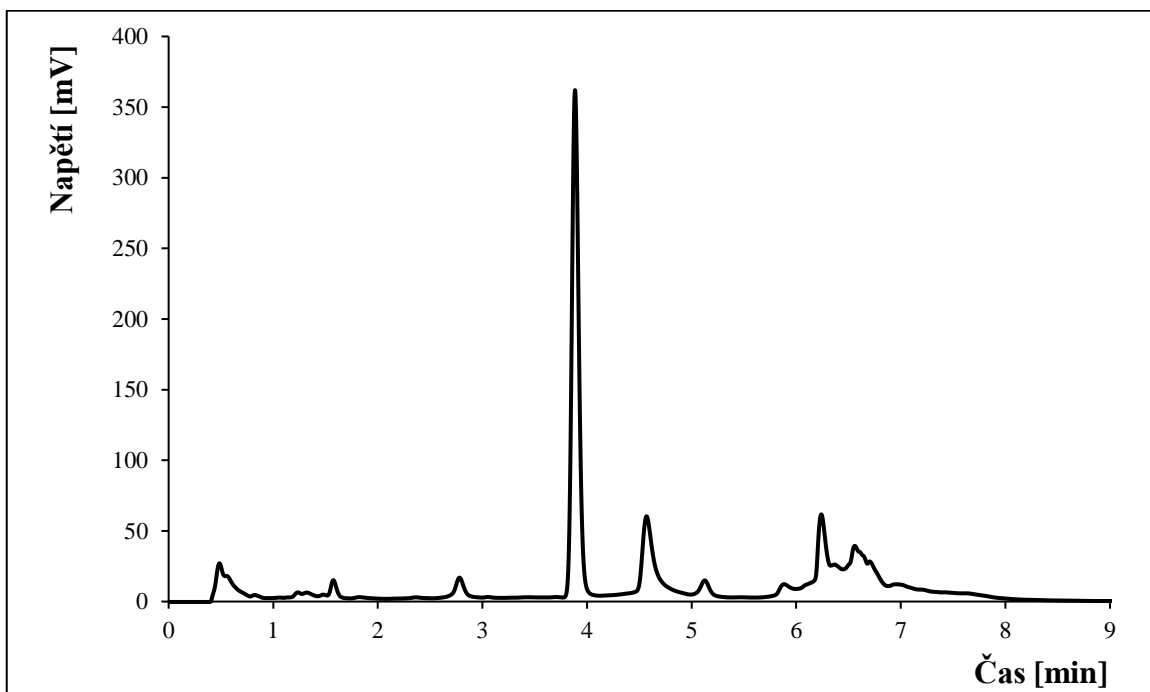


*Příloha 2:* Chromatogram separace kofeinu ve vzorku černého čaje C3

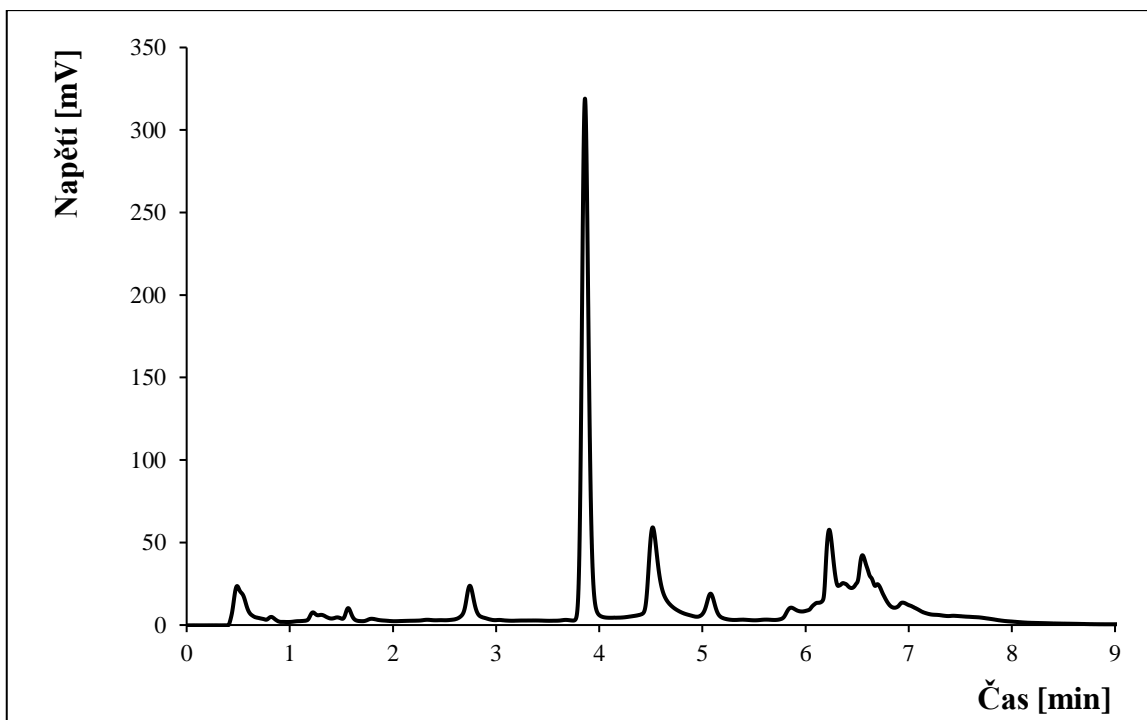




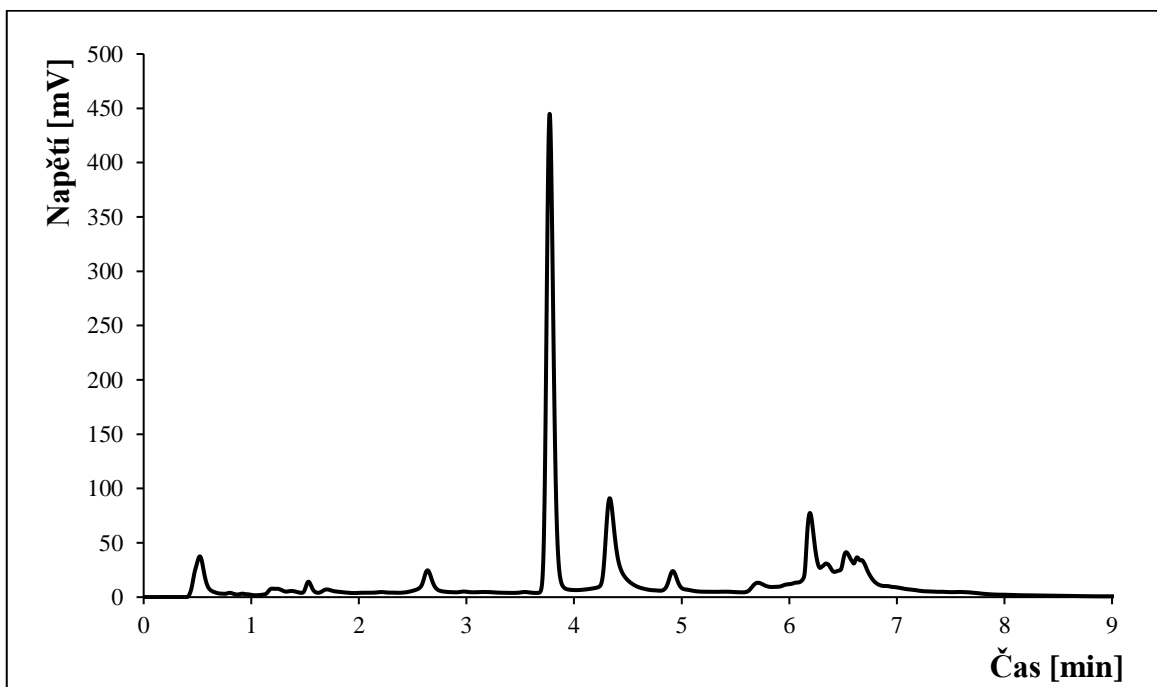
**Příloha 3:** Chromatogram separace kofeinu ve vzorku černého čaje C4



**Příloha 4:** Chromatogram separace kofeinu ve vzorku zeleného čaje Z2



**Příloha 5:** Chromatogram separace kofeinu ve vzorku zeleného čaje **Z3**



**Příloha 6:** Chromatogram separace kofeinu ve vzorku zeleného čaje **Z4**