

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

ANALYTICKÉ ZPRACOVÁNÍ S-KONJUGÁTŮ AMINOFENOLU
DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Lada Spejchlíková

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

KONZULTANTI: doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.

Ing. Jana Váňová

2018

UNIVERSITY OF PARDUBICE

FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

ANALYTICAL PREPARATION OF AMINOPHENOL S-CONJUGATES

MASTER THESIS

AUTHOR: Bc. Lada Spejchlíková

SUPERVISOR: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

CONSULTANTS: doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.

Ing. Jana Váňová

2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lada Spejchlková**
Osobní číslo: **C16462**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Analytické zpracování S-konjugátů aminofenolu**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

A. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na popis biotransformace a s tím souvisele toxicity acetaminofenolu a jeho derivátů, včetně popisu jejich analgetického a antipyretického využití v humánní medicíně. Stejně tak se v případě acetaminofenolu a jeho derivátů zaměřte na obecný popis fází biotransformace a bioaktivačních cest. Nakonec detailně popište metody, jimiž je možno tyto sloučeniny analyticky stanovit, s důrazem na stanovení metabolitů. Ke zpracování tohoto literárního přehledu využijte elektronické databáze (ScienceDirect, NCBI Pubmed, Web of Science).

B. V rámci praktické části:

- 1) optimalizujte analytické stanovení acetaminofenu a jeho metabolitů (LC/MS, HPLC/UV, popř. jiné) a určete jeho analytické parametry;
- 2) optimalizujte přípravu a purifikaci těchto metabolitů pomocí pHPLC;
- 3) zavedené metody využijte k charakterizaci vlastností, stability a čistoty purifikovaných látek.

C. Získaná experimentální data zpracujte a diskutujte. Svě výsledky následně porovnejte s výstupy jiných autorů.


Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**
Katedra analytické chemie
Ostatní konzultanti: **Ing. Jana Váňová**
Katedra analytické chemie
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**
Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
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 a 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 2. 5. 2018

Bc. Lada Spejchlíková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. a také doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za pomoc, cenné rady a čas, který mi věnovali při zpracování této diplomové práce. Mé poděkování rovněž patří rodině a příteli za skvělou podporu a zázemí v průběhu celého studia.

ANOTACE

Paracetamol je široce používané analgetikum a antipyretikum a v doporučených dávkách je považován za bezpečný lék. Eliminace terapeutických dávek paracetamolu probíhá v játrech třemi hlavními cestami. Přibližně 80 % paracetamolu je konjugováno s kyselinou glukuronovou a 10 % paracetamolu je konjugováno se sulfátem. Zbýlých 10 % je oxidováno pomocí CYP450 za vzniku *N*-acetyl-*p*-benzochinoniminu, který je dále metabolizován. Vzniká tak postupně konjugát paracetamolu s glutathionem, cysteinem a *N*-acetyl-L-cysteinem.

Paracetamol a jeho výše zmíněné metabolity lze stanovit s využitím velkého množství metod. Jednou z nejčastěji používaných metod je v tomto případě vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí. Hlavním cílem této práce bylo optimalizovat stanovení paracetamolu a jeho metabolitů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV a MS detekcí. Námi získané meze detekce byly výrazně nižší s využitím MS. Dalším cílem této práce bylo pomocí preparativní kapalinové chromatografie purifikovat konjugát paracetamolu s glutathionem, cysteinem a *N*-acetyl-L-cysteinem.

KLÍČOVÁ SLOVA

Paracetamol; konjugát paracetamolu; biotransformace; kapalinová chromatografie.

ANNOTATION

Paracetamol is a widely used analgesic and antipyretic drug that is considered to be safe at therapeutic doses. Elimination of therapeutic doses of paracetamol occurs in the liver by three major pathways: approximately 80% of the dose is metabolized by conjugation with glucuronic acid and 10% by conjugation with sulfate. The remaining part of the dose, i.e. 10%, is oxidized by CYP450 to *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine which is further conjugated with glutathione to form glutathione and then cysteine and *N*-acetyl-L-cysteine conjugates.

Paracetamol and its metabolites can be determined by a number of methods. High Performance Liquid Chromatography linked with UV detection is one of the most commonly used methods. The main aim of this thesis was to optimize the determination of paracetamol and its metabolites by HPLC linked with UV or MS detection. The obtained detection limits were significantly lower using MS detection. Another aim of this work was to purify the glutathione, cysteine and *N*-acetyl-cysteine conjugates of paracetamol by the preparative liquid chromatography.

KEYWORDS

Paracetamol; paracetamol conjugate; biotransformation; liquid chromatography.

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ	11
SEZNAM TABULEK.....	11
SEZNAM GRAFŮ	12
SEZNAM ZKRATEK	13
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	16
1.1 ANALGETIKA	16
1.1.1 KYSELINA ACETYLSALICYLOVÁ.....	17
1.1.2 IBUPROFEN.....	18
1.1.3 METAMIZOL.....	19
1.2 PARACETAMOL	21
1.2.1 MECHANISMUS ÚČINKU PARACETAMOLU	22
1.2.2 BIOTRANFORMACE PARACETAMOLU	24
1.2.2.1 II. FÁZE BIOTRANFORMACE	24
1.2.2.2 I. FÁZE BIOTRANFORMACE.....	25
1.2.3 TOXICITA PARACETAMOLU	28
1.2.3.1 HEPATOTOXICITA.....	28
1.2.3.2 NEFROTOXICITA	30
1.2.4 STANOVENÍ PARACETAMOLU A JEHO METABOLITŮ	31
1.2.4.1 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE S UV DETEKČÍ	31
1.2.4.2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE S MS DETEKČÍ	33
1.2.4.3 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA	34
1.2.4.4 OSTATNÍ METODY	35
2. CÍL PRÁCE	38
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	39
3.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY	39
3.2 CHEMIKÁLIE.....	40

3.3	PREPARATIVNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	41
3.3.1	PŘÍPRAVA MOBILNÍ FÁZE	41
3.3.2	POSTUP	41
3.4	OPTIMALIZACE METODY KE STANOVENÍ PARACETAMOLU A JEHO METABOLITŮ POMOCÍ HPLC/UV	42
3.4.1	POSTUP	42
3.4.2	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	44
3.5	OPTIMALIZACE METODY KE STANOVENÍ PARACETAMOLU A JEHO METABOLITŮ POMOCÍ LC-MS/MS	45
3.5.1	POSTUP	45
4.	VÝSLEDKY	47
4.1	PREPARATIVNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	47
4.2	OPTIMALIZACE METODY KE STANOVENÍ PARACETAMOLU A JEHO METABOLITŮ POMOCÍ HPLC/UV	52
4.3	OPTIMALIZACE METODY KE STANOVENÍ PARACETAMOLU A JEHO METABOLITŮ POMOCÍ LC-MS/MS	60
5.	DISKUZE	68
6.	ZÁVĚR.....	71
7.	POUŽITÁ LITERATURA.....	72

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Struktury vybraných analgetik	16
Obrázek 2: Metamizol a jeho metabolity (Campos <i>et al.</i> 1999).....	20
Obrázek 3: Metabolismus paracetamolu.....	26
Obrázek 4: Deacetylace paracetamolu a jeho metabolitů (Galano <i>et al.</i> 2017).....	29
Obrázek 5: Reprezentativní chromatogramy, a – plazmový roztok bez paracetamolu a jeho metabolitů, b – plazmový roztok obsahující paracetamol.....	32

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Meze detekce u vybraných metod	37
Tabulka 2: Podmínky separace	41
Tabulka 3: Gradientový profil pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů	42
Tabulka 4: Podmínky stanovení paracetamolu, HPLC/UV systém č. 1	42
Tabulka 5: Podmínky stanovení paracetamolu, HPLC/UV systém č. 2	43
Tabulka 6: Podmínky stanovení paracetamolu a jeho metabolitů, HPLC/UV systém č. 3	43
Tabulka 7: Příprava kalibračních roztoků APAP	44
Tabulka 8: Příprava kalibračních roztoků APAP s vnitřním standardem.....	44
Tabulka 9: Společné parametry pro měření na LC-MS/MS	46
Tabulka 10: Podmínky pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů.....	46
Tabulka 11: Retenční časy purifikovaných metabolitů paracetamolu.....	47
Tabulka 12: Retenční časy paracetamolu při stanovení pomocí HPLC/UV systému č. 1.....	52
Tabulka 13: Retenční časy analytů při stanovení pomocí HPLC/UV systému č. 3	56
Tabulka 14: Meze detekce a meze stanovitelnosti pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů pomocí HPLC/UV systému č. 3.....	58
Tabulka 15: Retenční časy paracetamolu při stanovení pomocí LC-MS/MS	60
Tabulka 16: Retenční časy analytů při stanovení pomocí LC-MS/MS	62
Tabulka 17: Meze detekce a meze stanovitelnosti pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů pomocí LC-MS/MS.....	63

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Purifikace APAP-SG	47
Graf 2: Purifikace APAP-NAC.....	48
Graf 3: Purifikace APAP-CYS	48
Graf 4: MS spektrum konjugátu paracetamolu s glutathionem.	49
Graf 5: MS spektrum konjugátu paracetamolu s cysteinem.	50
Graf 6: MS spektrum konjugátu paracetamolu s <i>N</i> -acetyl-L-cysteinem.	51
Graf 7: Kalibrační závislost pro APAP (0,11-100 mg/l)	52
Graf 8: Kalibrační závislost pro APAP (0,11-100 mg/l)	53
Graf 9: Kalibrační závislost pro APAP (0,11-100 mg/l)	53
Graf 10: Kalibrační závislost pro APAP (0,11-100 mg/l)	54
Graf 11: Kalibrační závislost pro APAP (0,6-100 mg/l)	55
Graf 12: Kalibrační závislost pro APAP (0,6-100 mg/l)	55
Graf 13: Kalibrační závislost pro APAP (1-100 mg/l)	56
Graf 14: Kalibrační závislost pro APAP-SG (1-100 mg/l).....	57
Graf 15: Kalibrační závislost pro APAP-CYS (1-100 mg/l)	57
Graf 16: Kalibrační závislost pro APAP-NAC (1-100 mg/l)	58
Graf 17: Hodnocení stability paracetamolu a jeho metabolitů	59
Graf 18: Kalibrační závislost pro APAP (0,01-1 mg/l)	60
Graf 19: Kalibrační závislost pro APAP (0,01-1 mg/l)	61
Graf 20: Kalibrační závislost pro APAP (0,01-1 mg/l)	61
Graf 21: Kalibrační závislost pro APAP (0,01-1 mg/l)	62
Graf 22: Kalibrační závislost pro APAP (0,01-1 mg/l)	63
Graf 23: Kalibrační závislost pro APAP-SG (0,01-1 mg/l).....	64
Graf 24: Kalibrační závislost pro APAP-CYS (0,01-1 mg/l)	64
Graf 25: Kalibrační závislost pro APAP-NAC (0,01-1 mg/l)	65
Graf 26: Kalibrační závislost pro APAP (0,01-1 mg/l)	65
Graf 27: Kalibrační závislost pro APAP-SG (0,01-1 mg/l).....	66
Graf 28: Kalibrační závislost pro APAP-CYS (0,01-1 mg/l)	66
Graf 29: Kalibrační závislost pro APAP-NAC (0,01-1 mg/l)	67

SEZNAM ZKRATEK

APAP – paracetamol

APAP-CYS – cysteinový konjugát paracetamolu

APAP-D₄ – deuterovaný paracetamol

APAP-NAC – konjugát paracetamolu s *N*-acetyl-L-cysteinem

APAP-SG – konjugát paracetamolu s glutathionem

C18 – oktadecyl silikagel

CE – kapilární elektroforéza

CNS – centrální nervová soustava

COX-1 – cyklooxygenáza 1

COX-2 – cyklooxygenáza 2

COX-3 – cyklooxygenáza 3

CYP450 – cytochrom P450

GSH – glutathion

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

iNOS – indukibilní NO-syntáza

IS – vnitřní standard

LC – kapalinová chromatografie

LOD – mez detekce

LOQ – mez stanovitelnosti

MRM – Multiple Reaction Monitoring (multiplexní analýza)

MS – hmotnostní spektrometrie

NAPQI – *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin

NSAIDs – nesteroidní protizánětlivé léky

PAPS – 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát

SRM – Selected Reaction Monitoring (sledování vybrané reakce)

UGT – uridindifosfát glukuronosyltransferáza

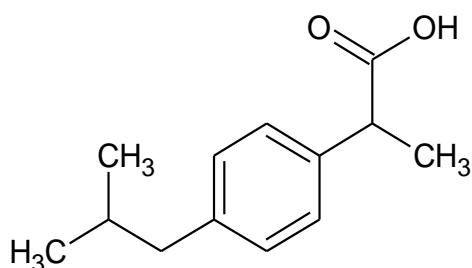
ÚVOD

Paracetamol (acetaminofen) je jedním z nejběžnějších léků používaných ke snižování horečky a utlumení bolesti. Jedná se o volně prodejný a zároveň levný lék, který je dostupný ve formě tablet, kapek či sirupů pod různými obchodními názvy. Kromě perorálního podání je možné paracetamol podávat také *i.v.* či *per rectum*. U dospělého člověka by denní dávka paracetamolu neměla překročit 4 g. Při překročení této dávky může dojít k vážnému poškození jater či ledvin, které může být mnohdy i smrtelné. Důvodem je v tomto případě nadměrná oxidace paracetamolu pomocí CYP450, která vede ke vzniku *N*-acetyl-*p*-benzochinoniminu, vysoce reaktivního a toxického meziproduktu.

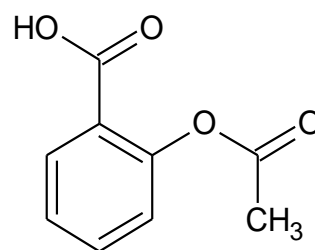
1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 ANALGETIKA

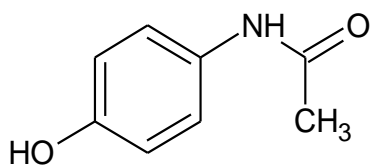
Více než polovinu trhu s volně prodejnými léky tvoří analgetika. Ve vyspělých zemích je spotřeba těchto léčiv odhadována na 20-60 g na osobu za rok (Abbott *et* Hellemans 2000). Mezi nejznámější z nich bezpochyby patří ibuprofen, paracetamol, aspirin a metamizol (obr. č. 1). Tato léčiva působí nejen analgeticky, ale také antipyreticky a některé i antiflogisticky. Liší se svými žádoucími a nežádoucími účinky. Společnou vlastností je princip účinku na bázi inhibice vzniku eikosanoidů (Lüllmann 2004).



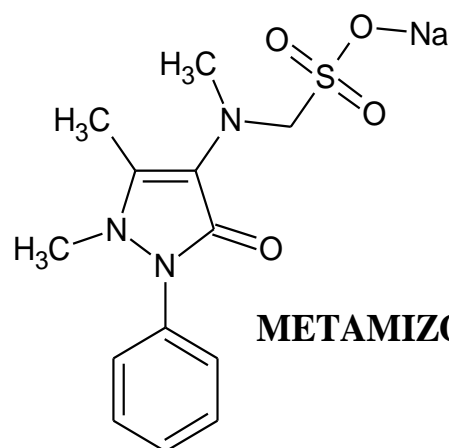
IBUPROFEN



**KYSELINA
ACETYLSALICYLOVÁ**



PARACETAMOL



METAMIZOL

Obrázek 1: Struktury vybraných analgetik

1.1.1 KYSELINA ACETYLSALICYLOVÁ

Stabilní kyselina acetylsalicylová, použitelná pro lékařské účely, byla poprvé syntetizována německým chemikem Felixem Hoffmannem roku 1897. O dva roky později byl tento lék uveden na trh pod obchodním názvem Aspirin společností Bayer. Po mnoho let je aspirin stále jedním z nejrozšířenějších léků na celém světě. Má protizánětlivé, analgetické a antipyretické účinky (Szukiewicz *et al.* 2015). Ve větších dávkách se aspirin používá k léčbě revmatoidní artritidy nebo jako profylaktické činidlo proti trombotickým cévním onemocněním. Aspirin spolu se salicylátem rovněž funguje jako silný zhášec vysoce nebezpečných hydroxylových radikálů, které přispívají k poškození tkáně v místě zánětu (Ingelman-Sundberg *et al.* 1991).

Aspirin způsobuje nevratnou inhibici cyklooxygenázy (COX), enzymu nezbytného pro konverzi kyseliny arachidonové na mediátory známé jako prostanoidy - tromboxan A₂, prostacyklin a ostatní prostaglandiny (Szukiewicz *et al.* 2015). COX je rovněž označována jako prostaglandin H-syntáza a existuje ve dvou hlavních izoformách. První izoforma (COX-1) je konstitutivně exprimována v endoplazmatickém retikulu většiny buněk, včetně trombocytů. Podílí se na syntéze homeostatických prostaglandinů, které jsou zodpovědné za normální buněčné funkce, dále například reguluje aktivaci a agregaci krevních destiček. Oproti tomu druhá izoforma (COX-2) není ve většině buněk běžně přítomna, ale je naopak inducibilní a její koncentrace stoupá působením zánětlivých a růstových faktorů (Fiorucci *et Soldato* 2003). Inhibice COX-1 a COX-2 je v tomto případě způsobena acetylací specifické serinové části (serin 530 a serin 516). Vzhledem k této vlastnosti se aspirin liší od většiny jiných nesteroidních protizánětlivých léků (NSAIDs), které inhibují COX reverzibilně (Szukiewicz *et al.* 2015). Působením aspirinu je COX-1 zcela inaktivována, COX-2 ovšem ne. Ta sice v přítomnosti aspirinu nepřeměňuje kyselinu arachidonovou na prostaglandin H₂, ale přeměňuje ji na 15-R-hydroxyeikosatetraenovou kyselinu, která je dále metabolizována na 15-epi-lipoxin A₄ s protizánětlivými účinky (Fiorucci *et Soldato* 2003).

Veškeré informace o tom, jak je aspirin metabolizován, ještě nejsou zcela známé. Po perorálním podání je kyselina acetylsalicylová v lidském těle rychle hydrolyzována (enzymaticky či neenzymaticky) za vzniku kyseliny salicylové. Poté je vzniklá kyselina salicylová metabolizována různými způsoby, popřípadě může být vyloučena přímo v nezměněné podobě (1-31 % dávky). Hlavní metabolickou cestou je konjugace s glycinem (20-65 %). Touto reakcí vzniká kyselina salicylurová (Sedgeman *et al.* 2015). Dále může být kyselina salicylová konjugována s kyselinou glukuronovu (1-42 %). Tuto reakci katalyzuje

široká škála uridindifosfát glukuronosyltransferáz (UGT), například 1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 2B4 a další (Ingelman-Sundberg *et al.* 1991, Sedgeman *et al.* 2015).

Kyselina 2,3-dihydroxybenzoová a kyselina 2,5-dihydroxybenzoová jsou minoritními metabolity kyseliny salicylové. Tyto metabolity vznikají oxidací za účasti enzymů cytochromu P450 (CYP450). Následnou konjugací kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové s glycinem vzniká kyselina gentisurová (Sedgeman *et al.* 2015).

1.1.2 IBUPROFEN

Ibuprofen ([(+)-(*R,S*)-2-(4-izobutylfenyl)propionová kyselina]) je řazen mezi NSAIDs a běžně se tak užívá pro své antiflogistické, analgetické a antipyretické účinky. Obsahuje chirální centrum a typicky se podává jako racemická směs obsahující S (+) a R (-) enantiomer (Hamman *et al.* 1997, Gomez *et al.* 2011, Tan *et al.* 2002). Poprvé byl ibuprofen představen v roce 1969 jako lepší alternativa ke kyselině acetylsalicylové. Nejčastějším vedlejším účinkem při užívání tohoto léku je bolest žaludku, nevolnost a zvracení. Tyto vedlejší účinky by ale měly být méně intenzivní než u kyseliny acetylsalicylové, což z ibuprofenu činí onu lepší alternativu. Jedná se o takzvaný neselektivní inhibitor COX-1 a COX-2 (Bushra *et al.* 2010). COX-1 a COX-2 je inhibována převážně S-enantiomerem ibuprofenu a to konkrétně v monocytech a trombocytech. Oproti tomu R-ibuprofen inhibuje COX-1 pouze slabě a COX-2 neinhibuje vůbec. V lidském těle je R-ibuprofen (přibližně 68 %) chirálně invertován na S-ibuprofen, který představuje aktivní složku racemické směsi (Brune *et al.* 1998, Tan *et al.* 2002). Ibuprofen rovněž inhibuje inducibilní NO-syntázu (iNOS). Prostřednictvím inhibice iNOS může zabránit imunitně zprostředkované neurodegeneraci a to tím, že sníží syntézu volného radikálu oxidu dusnatého (Stratman *et al.* 1997).

Ibuprofen je dodáván ve formě tablet, kdy se obsah samotné účinné látky pohybuje v rozmezí 200–800 mg. Obvyklá dávka je 400–800 mg třikrát denně. Ve vodě se téměř nerozpouští. Maximální sérové koncentrace ibuprofenu je dosaženo 1-2 hodiny po perorálním podání. Biotransformace je rychlá a lék je zcela eliminován během 24 hodin. Pouze malé množství je vyloučeno v nezměněné podobě (Bushra *et al.* 2010). Oba dva enantiomery ibuprofenu jsou metabolizovány pomocí I. i II. biotransformační fáze xenobiotik. Během I. fáze biotransformace ibuprofenu se uplatňuje především CYP450. Pouze 14 % S-ibuprofenu je přímo konjugováno s kyselinou glukuronovou. Těto konjugaci z části podléhají i vzniklé metabolity, a to 28 % 2-hydroxy-ibuprofenu a 45 % 3-hydroxy-ibuprofenu. Nekonjugovaný 3-hydroxy-ibuprofen je prostřednictvím cytosolových dehydrogenáz biotransformován na 3-karboxy-ibuprofen, který je spolu s nekonjugovaným

2-hydroxy-ibuprofenem vyloučen močí. Konjugaci ibuprofenu a jeho metabolitů s kyselinou glukuronovou katalyzuje enzym uridindifosfát-glukuronosyltransferáza (UGT) 1A9, 1A3, 2B1 a 2B7 (Gomez *et al.* 2011, Tan *et al.* 2002).

V souvislosti s užíváním ibuprofenu bylo hlášeno i mnoho případů předávkování. Po předávkování se mohou objevit záchvaty, hypertenze, apnoe, stejně jako renální či jaterní dysfunkce. Osoby užívající dlouhodobě vysoké dávky ibuprofenu mají zvýšené riziko vzniku infarktu myokardu. Ibuprofen také může způsobit změny ve funkci trombocytů, poškození gastrointestinální sliznice nebo poruchy vodní a elektrolytové rovnováhy (Bushra *et Aslam* 2010).

1.1.3 METAMIZOL

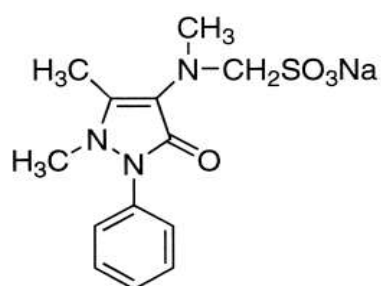
Metamizol (dipyrón) byl zaveden do farmakoterapie v roce 1922. Jedná se o silný neopioidní analgetický lék používaný jak v humánní, tak ve veterinární medicíně. V současnosti je metamizol klasifikován jako neopioidní analgetikum, ačkoli byl po mnoho let řazen k NSAIDs (Jasiecka *et al.* 2014). Na rozdíl od NSAIDs má dipyrón výrazné analgetické a antipyretické účinky, ale velmi slabé protizánětlivé účinky (Malvar *et al.* 2010). V některých zemích byl metamizol stažen z trhu (Švédsko, Japonsko, Velká Británie, USA) vzhledem k možnosti vzniku agranulocytózy, ale v mnoha zemích je stále široce využíván (Jasiecka *et al.* 2014, Rogosch *et al.* 2012).

Dipyrón lze v séru detekovat pouze 15 minut po intravenózním podání, po perorálním podání jeho detekce možná není (Rogosch *et al.* 2012). V zažívacím traktu je dipyrón okamžitě hydrolyzován na 4-methyl-amino-antipyridin, který může být dále metabolizován na 4-amino-antipyridin, 4-formyl-amino-antipyridin nebo 4-acetyl-amino-antipyridin (obr. 2). Z těchto čtyř hlavních metabolitů je farmakologicky účinný 4-methyl-amino-antipyridin, zatímco 4-amino-antipyridin má pouze slabý farmakologický účinek. Ostatní metabolity jsou farmakologicky neúčinné. Maximální sérové koncentrace 4-amino-antipyridinu je dosaženo za 1-2 hodiny (Jasiecka *et al.* 2014, Pierre *et al.* 2007).

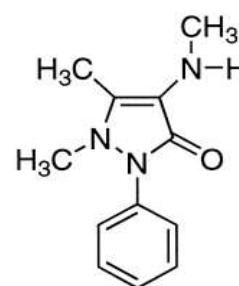
Mechanismus účinku metamizolu však stále není zcela znám. Působí analgeticky na periferní tkáň i centrální nervovou soustavu (Gonçalves *et al.* 2014). Po dlouhou dobu byl metamizol považován za neselektivní inhibitor COX-1 a COX-2. Po objevení třetí izoformy cyklooxygenázy COX-3 je analgetické působení dipyrónu vysvětlováno blokujícím účinkem na tento enzym. COX-3 je vlastně sestřihovou variantou COX-1, která se vyskytuje hlavně v centrální nervové soustavě (CNS). Blokadou COX-3 je blokována syntéza prostaglandinu E2 v CNS. Výsledkem této blokace je potom snížená senzitivita nociceptorů na mediátory bolesti

a tím je dosaženo analgetického účinku. Na analgetickém účinku metamizolu se podílejí i další mechanismy (Jasiecka *et al.* 2014). Jedním z nich je například aktivace kanabinoidních receptorů CB1 a CB2. Kanabinoidní receptory se primárně nacházejí v CNS. Některé studie ale naznačují, že kanabinoidní receptor CB1 je také exprimován v gangliích zadních kořenů míšních (Gonçalves *et al.* 2014). Metabolity metamizolu, 4-methyl-amino-antipyrin a 4-amino-antipyrin, se váží na receptor CB1 (Jasiecka *et al.* 2014).

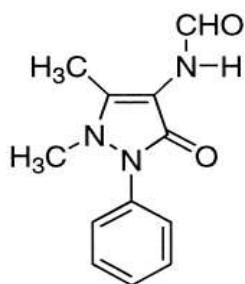
Díky svému analgetickému a spasmolytickému účinku se metamizol často využívá k léčbě spastických stavů, včetně kolik postihujících žlučové či močové cesty. Jedná se tedy o lék první volby při léčbě kolikových bolestí. Naopak se nejedná o lék první volby při léčbě horečky, přestože má antipyretické vlastnosti (Jasiecka *et al.* 2014).



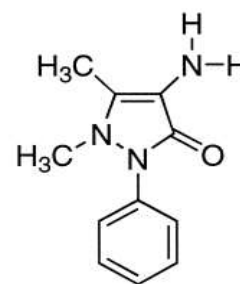
metamizol



4-methylaminoantipyrine



4-formylaminoantipyrine



4-aminoantipyrine

Obrázek 2: Metamizol a jeho metabolity (Campos *et al.* 1999)

1.2 PARACETAMOL

Paracetamol (4-hydroxyacetanilid, *N*-acetyl-*p*-aminophenol, acetaminofen, APAP) je široce používané analgetikum a antipyretikum. APAP byl poprvé syntetizován Morseem v roce 1878 a následně roku 1887 poprvé klinicky použit von Meringem. Byl ovšem velice rychle nahrazen fenacetinem. Pozdější studie prokazující nefrotoxicitu fenacetinu vedly ke znovuobjevení APAP v 50. letech 19. století (Bertolini *et al.* 2006). Roku 1950 byl poprvé uveden na trh ve Spojených státech jako přípravek TRIOGESIC, který obsahoval kromě APAP také aspirin a kofein. Tento přípravek byl ale chybně spojován s agranulocytózou, a proto byl po roce stažen z trhu. Následně byl roku 1955 ve Spojených státech APAP uveden na trh jako TYLENOL, který byl pouze na předpis. Ve Velké Británii byl představen o rok později jako PANADOL (Toussaint *et al.* 2010). Neopodstatněné obavy týkající se bezpečnosti paracetamolu zpozdily jeho rozšířené přijetí až do 70. let (Bertolini *et al.* 2006). Paracetamol se stal ještě více populární v 80. letech, kdy byla objevena souvislost Reyova syndromu s užíváním aspirinu u dětí trpících virovým onemocněním (Toussaint *et al.* 2010). Od té doby se stal APAP jedním z nejpoužívanějších léků k léčbě bolesti a horečky na světě (Bertolini *et al.* 2006).

Paracetamol je snadno dostupný a levný lék. Jedná se o sloučeninu s nízkou molekulovou hmotností a zároveň extrémně slabou kyselinu s hodnotou pKa 9,7. Při fyziologickém pH je tak téměř neutrální, a proto je rychle absorbován z duodena. V žaludku je vstřebáván minimálně a limitujícím krokem absorpce je tedy vyprazdňování žaludku do duodena. Z tohoto důvodu bylo měření plazmatické koncentrace APAP po desetiletí využíváno k posouzení rychlosti vyprazdňování žaludku. Jeho vazba na plazmatické proteiny je nízká, tj. 10-25 %. Chemicky se jedná o fenol, který se podobně jako ostatní fenoly snadno oxiduje (Graham *et al.* 2013, Marzuillo *et al.* 2014, McGill *et al.* Jaeschke 2014).

Perorálně se paracetamol používá k utlumení mírné až středně těžké bolesti nebo horečky a to včetně té postimunizační. Rovněž může být podáván *i.v.* či *per rectum*, a to zejména po operacích ke krátkodobému léčení mírné bolesti (Moriarty *et al.* Carroll 2016). Narozdíl od jiných NSAIDs je paracetamol neúčinný při zánětlivé a intenzivní bolesti. Dále se od NSAIDs liší tím, že nemá negativní účinky na gastrointestinální trakt (Bertolini *et al.* 2006). Po perorálním podání je absorbováno 63-89 % dávky převážně pasivní difúzí. Paracetamol ve formě tablet a kapslí je vstřebáván podstatně pomaleji než ten ve formě šumivých tablet, kapek či sirupů. Vliv na rychlost absorpce má samozřejmě i věk. U novorozenců je absorpce APAP zpožděna vzhledem k pomalejšímu vyprazdňování

žaludku. Maximální sérové koncentrace paracetamolu po perorálním podání je dosaženo přibližně za 45 až 60 minut. Při podání *per rectum* je biologická dostupnost většinou nižší, a proto jsou v tomto případě vyžadovány větší dávky (Marzuillo *et al.* 2014, Moriarty *et Carroll* 2016). Paracetamol je rovnoměrně distribuován ve většině tělesných tekutin, volně prochází placentou a proniká skrze hematoencefalickou bariéru (Bertolini *et al.* 2006). Nejvyšší koncentrace v mozku jsou pozorovány v přední části mozkové kůry 15 minut po podání a v mozečku 120 minut po podání (Toussaint *et al.* 2010).

Perorální dávka APAP u dospělých činí 650–1000 mg každé 4 hodiny dle potřeby. Maximální doporučená denní dávka u dospělých je 4 g. Dávkování APAP u dětí je doporučeno v rozmezí 10-15 mg/kg tělesné váhy každých 4-6 hodin, přičemž počet dávek za den by neměl být vyšší než 5. Účinek APAP se dostaví asi za půl hodiny po perorálním podání na lačno a doba trvání analgetického účinku je přibližně 4 hodiny (Bertolini *et al.* 2006). Biologický poločas APAP je 1,5-3 hodiny (McGill *et Jaeschke* 2014).

1.2.1 MECHANISMUS ÚČINKU PARACETAMOLU

Navzdory popularitě paracetamolu je mechanismus jeho účinku stále diskutován a není zcela znám (Toussaint *et al.* 2010). Mnoho výzkumných prací se soustředilo na paracetamolem zprostředkovanou inhibici cyklooxygenázy, protože jeho analgetické a antipyretické účinky jsou podobné účinkům aspirinu jako zástupci NSAIDs (Anderson 2008). První známý návrh mechanismu účinku paracetamolu zveřejnil John Vane, který rovněž objevil, že aspirin účinkuje skrze inhibici COX. V určitém okamžiku byla každá ze tří izoform COX považována za cíl analgetického působení APAP (Toussaint *et al.* 2010). Paracetamol ovšem nemá významný protizánětlivý účinek, ani neinhibuje syntézu tromboxanů A. Jeho účinek se tak liší od účinků upozorovaných u NSAIDs (Anderson 2008). Hypotéza vysvětlující rozdíl mezi působením paracetamolu a NSAIDs spočívá v tom, že APAP působí centrálně jako inhibitor COX, zatímco ostatní inhibitory COX působí jak centrálně, tak i periferně (Toussaint *et al.* 2010).

Později bylo zjištěno, že antipyretický účinek paracetamolu je opravdu důsledkem inhibice COX v mozku. Dále bylo potvrzeno, že je APAP schopen inhibovat COX, a to za předpokladu, že koncentrace peroxidů v okolí zůstane nízká. Inhibice COX závislá na koncentraci peroxidů by mohla vysvětlit, proč APAP není aktivní v místě zánětu, kde je koncentrace peroxidů vysoká, zatímco je aktivní v mozku, kde je koncentrace peroxidů velmi nízká (Bertolini *et al.* 2006, Mancini *et al.* 2003, Toussaint *et al.* 2010).

Abychom porozuměli mechanismu účinku APAP, je nutné znát enzymologii COX-1 (konstitutivní) a COX-2 (inducibilní). Oba enzymy jsou bifunkční. Mají cyklooxygenázovou a peroxidázovou aktivitu. Cyklooxygenázová aktivita souvisí s oxidací kyseliny arachidonové na prostaglandin G2 (hydroperoxid). Na základě peroxidázové aktivity je poté prostaglandin G2 metabolizován na prostaglandin H2, který je následně konvertován specifickými enzymy na prostanoidy. Aktivita COX-1 a COX-2 je závislá na funkci peroxidázy. Ta může fungovat i nezávisle a oxidovat tak celou řadu organických sloučenin v přítomnosti peroxidu. Při nízkých koncentracích kyseliny arachidonové je COX-2 hlavním izoenzymem, který se podílí na syntéze prostaglandinů. Při vysokých koncentracích kyseliny arachidonové je syntéza prostaglandinů zprostředkována převážně pomocí COX-1 (Graham *et al.* 2013). V poškozených buněčných systémech je APAP slabým inhibitorem syntézy prostaglandinů, naopak je tomu v intaktních buňkách, kde je hladina kyseliny arachidonové nízká. Jak už bylo řečeno, za těchto podmínek jsou prostaglandiny syntetizovány převážně pomocí COX-2. Bylo tedy hypotetizováno, že účinek paracetamolu je způsoben selektivní inhibicí COX-2 (Bertolini *et al.* 2006).

1.2.2 BIOTRANFORMACE PARACETAMOLU

Metabolismus paracetamolu člověka závisí na věku a velikosti dávky (Prescott 1980). Eliminace terapeutických dávek paracetamolu probíhá v jaterních buňkách třemi hlavními cestami, kdy většina léku je buď glukuronidována, nebo sulfatována. Zbývající množství APAP je oxidováno pomocí CYP450 (obr. č. 3). Tato cesta nabývá na významu při předávkování paracetamolem, protože zbývající dvě metabolické cesty jsou v tomto případě zcela nasycené (Nýdlová *et al.* 2014, McGill *et Jaeschke* 2014). Minoritně pomocí hydroxylace vzniká 3-hydroxyparacetamol, metoxylací 3-metoxyparacetamol a v neposlední řadě také 3-thiomethylparacetamol. Malá část APAP (2-5 %) je vyloučena močí v nezměněné podobě. Přestože biotransformace APAP probíhá převážně v játrech, část léčiva může být metabolizována i ve střevě a ledvinách (Prescott 1980).

1.2.2.1 II. FÁZE BIOTRASFORMACE

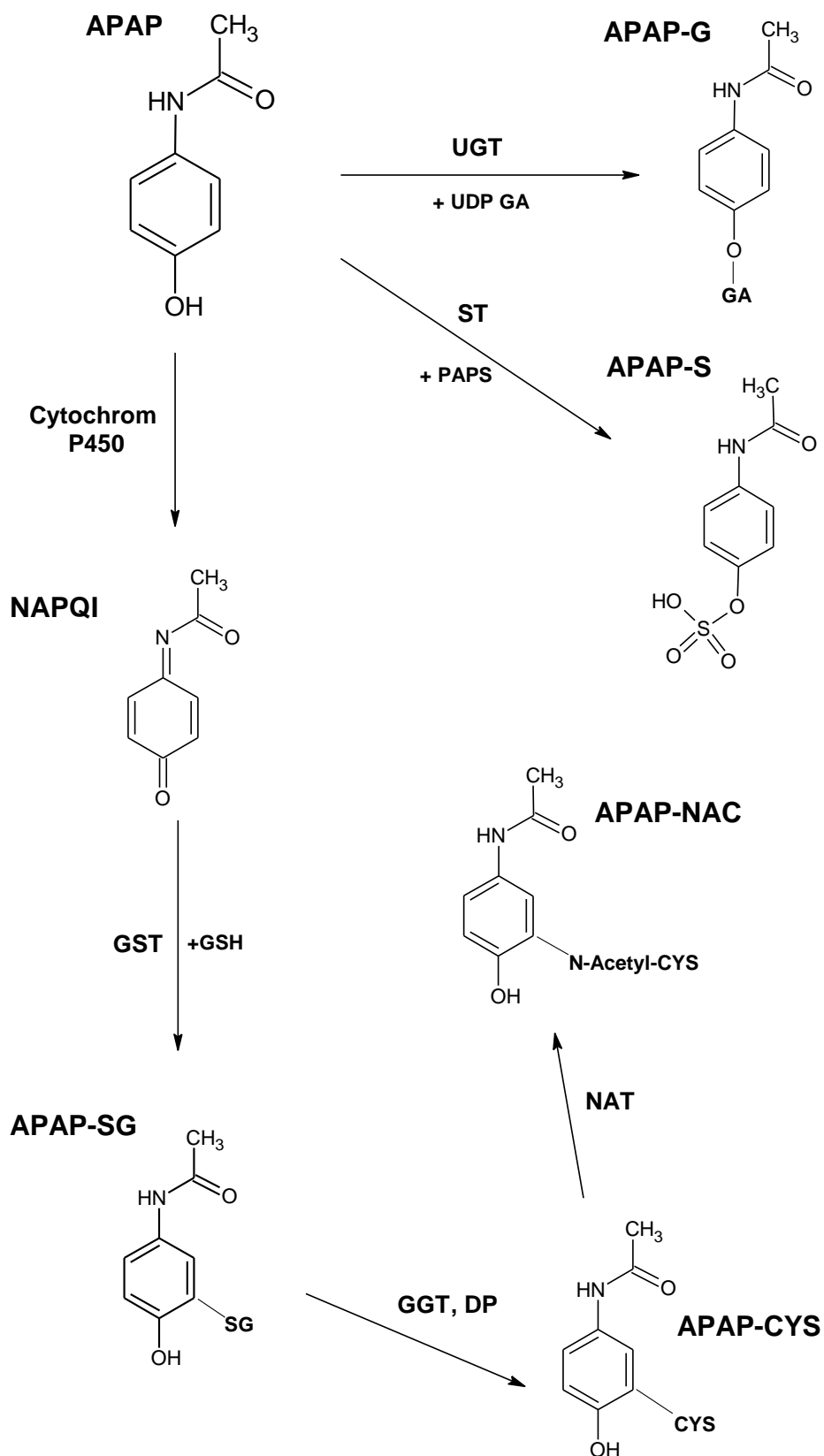
Přibližně 80 % APAP je přímo konjugováno s kyselinou glukuronovou (Roušar *et al.* 2010). Tato reakce je katalyzována pomocí UGT, která přenáší glukuronosylovou skupinu z uridin-5'-difosfoglukuronové kyseliny na cílovou molekulu, kterou je v tomto případě APAP. U lidí i myši byla popsána celá řada UGT patřících do čtyř rodin - UGT1, UGT2, UGT3 a UGT8 (McGill *et Jaeschke* 2014). Glukuronidační cesta se od narození postupně rozvíjí a je plně funkční kolem 2 let věku. Proto u novorozenců převládá sulfatace, která je plně rozvinuta už od narození (Moriarty *et Carroll* 2016, Marzuillo *et al.* 2014).

Přibližně 10 % APAP je konjugováno se sulfátem (Roušar *et al.* 2010). Sulfatace je katalyzována pomocí sulfotransferáz, které obecně přenáší sulfát z 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS) na akceptor. U člověka je známo nejméně 13 izoform sulfotransferáz organizovaných do čtyř rodin. Sulfatace xenobiotik je katalyzována obzvláště těmi cytosolickými. U APAP je tato konjugace katalyzována konkrétně sulfotransferázou 1A1, 1A3 nebo 1A4. Tyto poznatky byly nedávno potvrzeny při testování, ve kterém byly využity vzorky lidských fetálních jater a seznam enzymů katalyzujících sulfataci APAP se rozšířil o sulfotransferázu 1E1 (McGill *et Jaeschke* 2014). Oba dva klíčové metabolity, glukuronid a sulfát paracetamolu, jsou ve vodě rozpustnější než samotný APAP a jsou vylučovány převážně močí a v malém množství také žlučí (Jos *et Nico* 2001).

1.2.2.2 I. FÁZE BIOTRANSFORMACE

V rámci I. fáze biotransformace je malá část terapeutické dávky paracetamolu (5-10 %) bioaktivována prostřednictvím CYP450, což je superrodina monooxygenáz, které jsou zodpovědné za metabolismus různých exogenních i endogenních sloučenin (Chen *et al.* 1998, Moriarty *et Carroll* 2016). Oxidace APAP pomocí CYP450 vede ke vzniku *N*-acetyl-*p*-benzochinoniminu (NAPQI), vysoce reaktivního a toxického meziprojektu. Konkrétně se jedná o dvouelektronovou oxidaci. Bylo prokázáno, že tuto reakci katalyzuje několik různých izoenzymů CYP450, a to 2E1, 1A2, 3A4 a 2A6 (Jack *et al.* 2004, James *et al.* 2003, Patten *et al.* 1993). Primárně je ale APAP oxidován cytochromem 2E1 (Hodgman *et Garrard* 2012). U novorozenců je cytochrom 2E1 přítomen v menším množství než u dospělých. Tím pádem je u nich snižena i tvorba NAPQI (Moriarty *et Carroll* 2016). APAP může být případně metabolizován i jinými oxidačními enzymy – peroxidázami. Například myeloperoxidáza obsažená v bílých krvinkách je schopna bioaktivovat celou řadu léků včetně APAP. Ve tkáních s nízkou aktivitou CYP450 může být bioaktivace APAP katalyzována také pomocí COX. Jednoelektronovou oxidací vzniká reaktivní meziprojekt *N*-acetyl-*p*-benzosemichinonimin (Jos *et Nico* 2001, Potter *et Hinson* 1987).

NAPQI je elektrofilní molekula a snadno tak reaguje s nukleofilními thiolovými skupinami (McGill *et Jaeschke* 2014). Je detoxikován buď spontánně, nebo enzymy katalyzovanou reakcí s redukováným glutathionem (GSH), což vede ke vzniku konjugátu (APAP-SG), 3-(glutathion-*S*-yl)-paracetamolu (Roušar *et al.* 2010). Enzymatická konjugace APAP s GSH je katalyzována glutathion-*S*-transferázami. Přestože je konjugace s GSH reakcí II. fáze biotransformace, v kontextu metabolismu APAP k ní dochází pouze po I. biotransformační fázi. APAP-SG je nejprve vyloučen žlučí a následně je degradován ve střevě a ledvinách (McGill *et Jaeschke* 2014). Oba orgány obsahují γ -glutamyl-transferázu a dipeptidázu, které dále štěpí konjugát paracetamolu s glutathionem na paracetamol-cysteinyglycin a cysteinový konjugát (APAP-CYS). Štěpení glutathionového konjugátu paracetamolu pomocí γ -glutamyl transferázy může rovněž nastat ve žlučníku či žlučovodu (Jos *et Nico* 2001). Degradční produkty, merkapturová kyselina a APAP-CYS, jsou nakonec vyloučeny močí (McGill *et Jaeschke* 2014).



Obrázek 3: Metabolismus paracetamolu (APAP – paracetamol, UGT - uridindifosfát glukuronosyltransferáza, UDP GA - uridin-5'-difosfoglukuronová kyselina, APAP-G –paracetamol glukuronid, ST – sulfotransferáza, PAPS - 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát, APAP-S – paracetamol sulfát, NAPQI - *N*-acetyl-*p*-benzochinon imin, GST – glutathion-*S*-transferáza, GSH – glutathion, APAP-SG – konjugát paracetamolu s glutathionem, GGT – γ -glutamyl transferáza, DP – dipetidáza, APAP-CYS – cysteinový konjugát paracetamolu, NAT – *N*-acetyl transferáza, APAP-NAC – merkapturát)

Zajímavá je otázka týkající se stability NAPQI. Stabilita elektricky vygenerovaného NAPQI v pufru závisí na několika faktorech včetně pH, teploty a koncentrace pufru. V pufru se NAPQI postupně rozkládá a mechanismus tohoto rozkladu je velice složitý. Zdá se, že zahrnuje redukci, hydrolýzu a reakce s radikály. Analýza rozkladových směsí ukázala přítomnost APAP jako redukčního produktu NAPQI, *p*-benzochinonu jako produktu hydrolýzy NAPQI a dále malé množství hydrochinonu jako redukčního produktu *p*-benzochinonu. Existují rovněž důkazy o tvorbě paracetamolového dimeru (Dahlin *et al.* 1982). Další studie dokazují, že NAPQI reaguje s APAP za vzniku *N*-acetyl-*p*-benzosemichinoniminu, který dále reaguje a vznikají tak polymery paracetamolu (Potter *et Hinson* 1987).

1.2.3 TOXICITA PARACETAMOLU

1.2.3.1 HEPATOTOXICITA

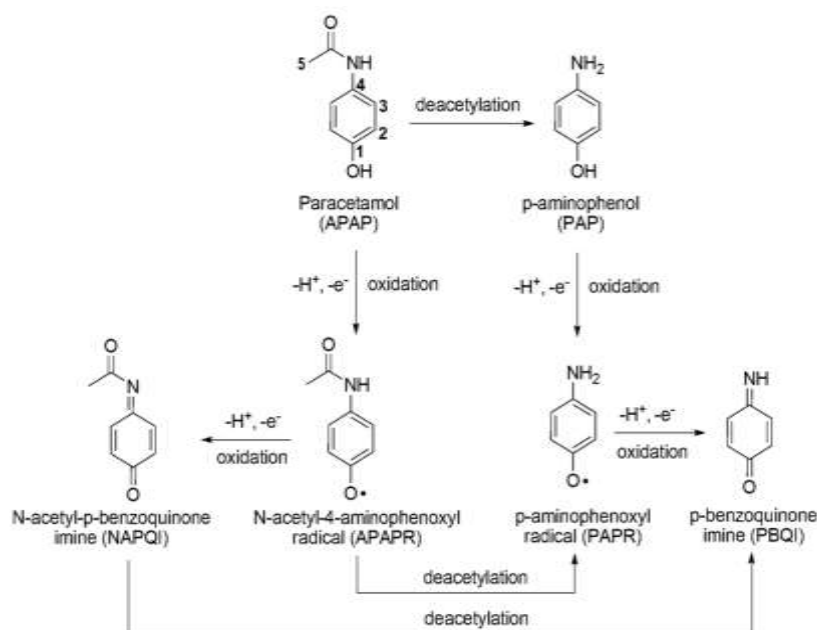
V doporučených dávkách je APAP považován za bezpečný lék. Ovšem při požití velkého množství tohoto přípravku může dojít k masivní jaterní nekróze nejen u pokusných zvířat, ale i u člověka (Zaher *et al.* 1998). Ve Spojených státech a mnoha dalších západních zemích je předávkování paracetamolem hlavní příčinou akutního jaterního selhání. Je známo mnoho případů neúmyslného poškození jater v důsledku vysoké denní dávky paracetamolu, která překročila 4 g. Poškození jater může zabránit *N*-acetylcystein, popřípadě jiný donor thiolové skupiny, pokud je podán do 12-24 hodin po požití paracetamolu. Neúmyslné předávkování je však obvykle rozpoznáno později (Mcgill *et al.* 2012, Kučera *et al.* 2012, Larson *et al.* 2003). Pouze ve Spojených státech amerických zemí následkem předávkování paracetamolem 500 lidí ročně, přičemž polovina těchto případů je výsledkem úmyslného předávkování (Mcgill *et al.* 2012).

První komplexní mechanismus paracetamolem zprostředkované hepatotoxicity byl publikován v roce 1973 (Jaeschke *et al.* 2003). Hepatotoxicky nepůsobí samotný paracetamol, ale jeho reaktivní metabolit *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin (Lancaster *et al.* 2015). Velká část paracetamolu je po intoxikaci metabolizována cytochromem P450 a vzniká právě NAPQI, který je rychle inaktivován pomocí GSH. Následně dochází k depleci glutathionu v jaterních buňkách a nekonjugovaný NAPQI se tak může kovalentně navázat na cysteinové skupiny proteinů za vzniku proteinových aduktů paracetamolu (Kučera *et al.* 2012, Zaher *et al.* 1998). Proteinové adukty paracetamolu jsou po předávkování přítomny také v plazmě (Mcgill *et al.* 2012).

Kovalentní vazba *N*-acetyl-*p*-benzochinoniminu na důležité buněčné proteiny, jako jsou například mitochondriální proteiny či proteiny cytoplazmatické membrány, vede ke ztrátě jejich funkce (Kučera *et al.* 2012). Tvorba aduktů paracetamolu s mitochondriálními proteiny má za následek tvorbu reaktivních forem kyslíku a s tím související oxidační stres. To vše vede k poškození mitochondriální deoxyribonukleové kyseliny, otevření mitochondriálního póru přechodné propustnosti a zastavení produkce adenosintrifosfátu. Uvolnění mitochondriálních proteinů a zástava produkce adenosintrifosfátu způsobí smrt buněk (Lancaster *et al.* 2015). V průběhu toxického působení NAPQI jsou rovněž aktivovány Kupfferovy buňky, které mohou poškození jater buď zmírnit, nebo naopak zhoršit (Kučera *et al.* 2012).

Nedávné studie na myších modelech naznačují, že NAPQI selektivně inhibuje mitochondriální komplex II a podávaná methylenová modř může působit jako ochrana před mitochondriálním poškozením tím, že funguje jako alternativní elektronový nosič, který přenáší elektrony z poškozeného komplexu II na cytochrom c a obnovuje tak tvorbu adenosintrifosfátu (Lancaster *et al.* 2015). Mitochondriální dysfunkce a inhibice mitochondriálního dýchacího řetězce zapříčiněná *N*-acetyl-*p*-benzochinoniminem jsou považovány za klíčové příhody v paracetamolem zprostředkované hepatotoxicitě (Kučera *et al.* 2012). Podvýživa, hladovění a chronická onemocnění jater zvyšují riziko hepatotoxicity prostřednictvím snížené hladiny glutathionu. Dále léčiva, která indukují CYP450 mohou pacienta vystavit zvýšenému riziku hepatotoxicity. Mezi běžně užívané léky indukující CYP450 patří například rifampicin a fenobarbital. Chronické užívání alkoholu rovněž indukuje CYP450, což vede ke zvýšené produkci *N*-acetyl-*p*-benzochinoniminu (Lancaster *et al.* 2015).

Kromě *N*-acetyl-*p*-benzochinoniminu existují i jiné metabolity paracetamolu, které mohou být potenciálně škodlivé. Bylo zjištěno, že dvouelektronová oxidace paracetamolu pomocí CYP450 a jiných enzymů probíhá ve dvou krocích, kdy v prvním kroku prostřednictvím jednoelektronové oxidace vzniká *N*-acetyl-aminophenoxylový radikál. Navíc pokud vezmeme v úvahu deacetylaci, tak potenciálním kandidátem podílejícím se na toxicitě paracetamolu může být i *p*-aminophenoxylový radikál či *p*-benzochinonimin (obr. 4). Deacetylace paracetamolu v živých organismech byla již prokázána (Galano *et al.* 2017).



Obrázek 4: Deacetylace paracetamolu a jeho metabolitů (Galano *et al.* 2017)

Ačkoli bylo doposud shromážděno velké množství informací o toxicitě paracetamolu, existuje mnoho aspektů, které nebyly doposud prozkoumány. Neexistují například žádné kinetické ani termochemické údaje o možných reakcích *N*-acetyl-*p*-benzochinoniminu v lidském těle, ani žádné informace o možné úloze výše zmiňovaných potenciálně škodlivých sloučenin, které mohou vznikat po požití paracetamolu (Galano *et al.* 2017).

1.2.3.2 NEFROTOXICITA

Přestože je nefrotoxicita způsobená paracetamolem méně častá než hepatotoxicita, skutečnost, že se může vyskytnout v nepřítomnosti hepatotoxicity, vyžaduje, aby vždy po předávkování paracetamolem byla sledována funkce ledvin (Stern *et al.* 2005). V některých případech se může po předávkování objevit akutní renální selhání (přibližně u 1-2 % pacientů) jako komplikace hepatotoxicity (Vrbová *et. a l*2016). Existuje několik možných mechanismů toxického působení paracetamolu v ledvinách. Možné mechanismy zahrnují například prostaglandin H syntetázu, která přeměňuje paracetamol na *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin převážně ve dřeni ledvin, dále *N*-deacetylázu jejíž role je ale stále nejasná a CYP450 (Mazer *et al.* 2008).

Ledviny mohou metabolizovat paracetamol na reaktivní meziproduct NAPQI pomocí mikrozomálního cytochromu P450 ale v menší míře než hepatocyty. Oxidace paracetamolu na *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin v ledvinách byla prokázána detekcí proteinových aduktů paracetamolu. Nejvyšší aktivita cytochromu P450 v ledvinách je pozorována v kůře a zejména v proximálních tubulech. Proto je pravděpodobně paracetamolem zprostředkovaná toxicita omezena na tuto část nefronu (Vrbová *et al.*2016).CYP 2E1 je izoenzym cytochromu P450, který se primárně podílí na biotransformaci paracetamolu v ledvinách a je indukovatelný testosteronem. Toto zjištění představuje významné pohlavní rozdíly v metabolismu a nefrotoxicitě paracetamolu u zvířecích modelů. Definitivní souvislost mezi pohlavím a nefrotoxicitou u člověka nebyla zatím zaznamenána (Mazer *et al.* 2008).

Ačkoli je glutathion tradičně považován za důležitou sloučeninu při detoxikaci paracetamolu, jeho konjugáty se také podílí na vzniku nefrotoxických sloučenin. Není ovšem známo, zda je renální poškození způsobeno přímo konjugátem paracetamolu s glutathionem, nebo jedním z jeho dále vznikajících metabolitů. Další možností je deplece glutathionu, která může inhibovat detoxikaci reaktivních metabolitů. Tyto výsledky ale nebyly reprodukovány v játrech, což naznačuje selektivní mechanismus v paracetamolem zprostředkované nefrotoxicitě (Mazer *et al.* 2008).

1.2.4 STANOVENÍ PARACETAMOLU A JEHO METABOLITŮ

Ke studiu metabolismu paracetamolu je zapotřebí vhodná metoda, která umožní stanovení jednotlivých metabolitů i spolu s nezměněným paracetamolem. Pro kvantitativní analýzu paracetamolu (ať už samotného, nebo ve směsích) a jeho metabolitů bylo popsáno již velké množství metod včetně voltametrie, fluorescenční spektroskopie, UV spektrofotometrie, imunologických analýz, chromatografie na tenké vrstvě, kapalinové chromatografie, plynové chromatografie a kapilární elektroforézy (Lau *et al.* 1994, Goyal *et al.* 2010).

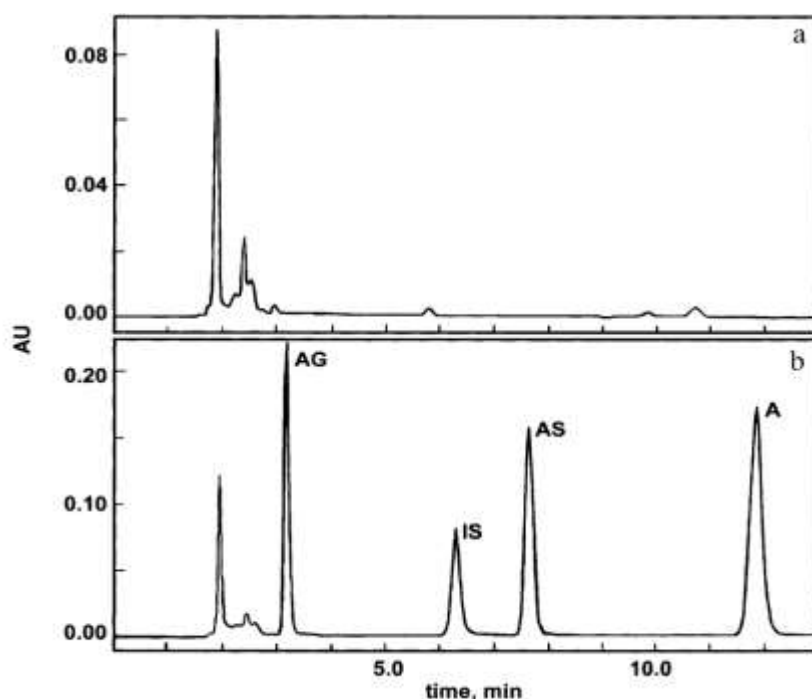
1.2.4.1 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE S UV DETEKČÍ

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s UV detekcí je hlavní, běžně používanou metodou pro kvantifikaci paracetamolu a jeho metabolitů (Hye *et al.* 2012). Existuje velké množství variant HPLC, jak stanovit paracetamol a jeho metabolity v biologickém materiálu (Di Girolamo *et al.* 1998). Není však jednoduché analyzovat několik metabolitů paracetamolu současně pomocí UV detekce vzhledem k jejich podobným strukturám a fyzikálně-chemickým vlastnostem. Lepší volbou je v tomto případě detekce pomocí hmotnostní spektrometrie (MS), díky které můžeme selektivně analyzovat jednotlivé sloučeniny (Hye *et al.* 2012). Většina metod je specifická pro určitý typ vzorku, některé z nich jsou komplikované a mnohé z nich používají vnitřní standard eluovaný po posledním chromatografickém píku (Vertzoni *et al.* 2003).

Autoři Lau a Critchley ve své studii z roku 1994 popisují současné stanovení paracetamolu a jeho 4 hlavních metabolitů (glukuronid, sulfát, cysteinový konjugát a merkapturát) pomocí HPLC v plazmě a moči. Použitá kolona byla naplněná 5 μm částicemi C18 a mobilní fáze obsahovala 0,1 M dihydrogen fosforečnan draselný, kyselinu octovou a propan-2-ol v objemovém poměru 100:0,1:75. Paracetamol i jeho metabolity byly detekovány spektrofotometricky při 254 nm (Lau *et al.* 1994).

Autoři Di Girolamo *et al.* ve své publikaci uvádí současné stanovení paracetamolu spolu s jeho suflátem a glukuronidem v moči s využitím HPLC a UV detekce s přepínáním vlnových délek. Chromatografická separace byla provedena na koloně plněné 5 μm částicemi C18. Mobilní fáze byla složená z octanového pufru (50 mM, pH 3,5) a acetonitrilu (modifikovaného 0,35 % kyseliny trifluoroctové) smíchaných v poměru 96:4 (v/v). Jednalo se o gradientovou eluci. Glukuronid a sulfát paracetamolu byly detekovány při 260 nm a samotný paracetamol při 240 nm (Di Girolamo *et al.* 1998).

Autoři Vertzoni *et al.* popisují stanovení paracetamolu a jeho hlavních metabolitů pomocí HPLC s obrácenými fázemi v králičí plazmě a moči. Separace byla provedena na koloně s 5 μm částicemi C18 a mobilní fáze byla složená z 0,5 M KH_2PO_4 obsahujícího 1 % CH_3COOH (pH 6,5) a CH_3OH (95:5; v/v). Přídavek CH_3COOH měl zabránit chvostování píků. Jednalo se o izokratickou eluci. Absorbance byla měřena při 242 nm, vlnové délce, která byla optimální jak pro paracetamol, tak i pro sulfát a glukuronid paracetamolu včetně vnitřního standardu (*m*-aminofenol). Retenční časy jsou viditelné na obrázku č. 5 (Vertzoni *et al.* 2003).



Obrázek 5: Reprezentativní chromagramy, a – plazmový roztok bez paracetamolu a jeho metabolitů, b – plazmový roztok obsahující paracetamol (A), glukuronid paracetamolu (AG), sulfát paracetamolu (AS) a vnitřní standard (IS) o koncentraci 50, 50, 50 a 20 $\mu\text{g/ml}$ (Vertzoni *et al.* 2003)

Vzhledem k stále rostoucím otravám a úmyslným pokusům o sebevraždu spojených s paracetamolem je nezbytná rychlá analýza jeho hladin. U většiny popsanych metod pro stanovení paracetamolu v séru byla použita časově náročná extrakce z kapaliny do kapaliny. Proto byla vyvinuta selektivní a přesná analytická metoda, která vyžaduje minimální manipulaci se vzorky. Jedná se o HPLC metodu s UV detekcí. Použitím vnitřního standardu naředěného v acetonitrilu dojde k vysrážení bílkovin a centrifugací se odstraní nejen proteiny, ale také další nerozpustné látky ze séra, plazmy a moči. Mobilní fáze byla v tomto případě připravena smícháním acetonitrilu s vodou v poměru 12:88 (v/v) a separace byla provedena

na koloně obsahující C18. APAP byl detekován spektrofotometricky při 254 nm (Soysa *et al.* 2010).

Autoři Ali *et al.* ve své publikaci popisují stanovení paracetamolu pomocí izokratické HPLC s obrácenými fázemi. K separaci zde byla využita kolona obsahující 5 µm částice C18. Mobilní fáze byla složená z vody a methanolu (50:50, v/v) a její pH bylo upraveno pomocí trifluoroctové kyseliny na pH 3,9. Paracetamol byl detekován spektrofotometricky při vlnové délce 210 nm (Ali *et al.* 2013). Skupina autorů Acheampong *et al.* rovněž popisuje stanovení paracetamolu pomocí izokratické HPLC s obráceným fázemi. Použitá mobilní fáze byla ovšem složena z methanolu a 0,05 M fosfátového pufru smíchaných v poměru 30:70 (v/v). APAP byl detekován pomocí UV detekce při 215 nm (Acheampong *et al.* 2016).

Babu *et al.* ve své publikaci uvádí metodu HPLC pro současné stanovení paracetamolu a cefiximu v králičí plazmě. Analýza byla provedena na koloně s 5 µm částicemi C18 a mobilní fáze byla složená z fosfátového pufru (pH 6,4) a acetonitrilu (80:20; v/v). Paracetamol byl detekován při 245 nm (Babu *et al.* 2016).

1.2.4.2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE S MS DETEKČÍ

Během poslední doby se ke stanovení léků a jejich metabolitů nejčastěji používá kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem vzhledem k vysoké výkonnosti, selektivitě a citlivosti při využití tzv. SRM (*Selected Reaction Monitoring*) módu (Tonoli *et al.* 2012).

Autoři Hye *et al.* ve své studii představují jednoduchou a efektivní metodu kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) pro stanovení paracetamolu a jeho šesti metabolitů v plazmě. Tato metoda má vysokou citlivost a lze pomocí ní měřit koncentrace metabolitů paracetamolu v řádech ng/ml v malém množství vzorku. Paracetamol a jeho šest metabolitů bylo separováno na koloně s 5 µm částicemi C18 a kvantifikováno pomocí hmotnostního spektrometru s trojitým kvadrupólem. Mobilní fáze byla složená z kyseliny mravenčí, vody a acetonitrilu. Všechny analýzy byly provedeny v SRM módu (Hye *et al.* 2012).

Autoři Zhu *et al.* ve své studii představují metodu kapalinové chromatografie ve spojení s MS s využitím kvadrupólového hmotnostního spektrometru pro současné stanovení paracetamolu a tramadolu v lidské plazmě. Pro separaci byla využita kolona s 5 µm částicemi kyano-silikagelu a mobilní fáze obsahující 10 mM octanový pufr s 0,5 % kyseliny mravenčí a

methanol (40:60, v/v). Experimentální výsledky ukázaly, že přidavek kyseliny mravenčí zvyšuje citlivost MS vůči analytům a zkracuje jejich retenční časy (Zhu *et al.* 2007).

Metodu kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) pro rychlou a přesnou identifikaci a kvantifikaci paracetamolu a jeho dvou metabolitů (glutathionového a cysteinového konjugátu) ve své publikaci uvádí Česla *et al.* Separace byla v tomto případě provedena na koloně naplněné 2,6 μm částicemi C18. Pro detekci byl využit tandemový hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem operující v tzv. MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) módu. Mobilní fáze byla složena z vody s přidavkem 0,1 % (v/v) kyseliny octové (A) a methanolu (B). Pro kvantifikaci všech sloučenin byl jako vnitřní standard využit deuterovaný paracetamol. MRM přechod pro paracetamol byl 152,0/109,9, pro glutathionový konjugát paracetamolu 454,9/271,9 a pro cysteinový konjugát paracetamolu 271,0/140,0 (Česla *et al.* 2013).

Autoři Flint *et al.* vyvinuli a validovali analytickou metodu pro současné stanovení paracetamolu, glukuronidu paracetamolu, sulfátu paracetamolu, merkapturové kyseliny, cysteinového a glutathionového konjugátu paracetamolu v minimálním objemu lidské plazmy. Jedná se o metodu ultraúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií využívající ionizaci pomocí elektrospreje. Chromatografická separace byla provedena na koloně s reverzní fází obsahující 1,8 μm částice C18. Jednalo se o gradientovou eluci, kdy mobilní fáze obsahovala roztok octanu amonného v kyselině mravenčí, H₂O a methanol. Co se týče MS/MS, detekce a kvantifikace paracetamolu včetně jeho metabolitů byla provedena v SRM a zároveň pozitivním ionizačním módu (Flint *et al.* 2017).

1.2.4.3 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA

Kapilární elektroforéza (CE) je mikroanalytickou technikou, mezi jejíž výhody patří jednoduchost provedení, minimální objem vzorku, vysoká účinnost a selektivita, vznik malého množství organického odpadu, nízká cena a krátká doba analýzy. Látky mohou být v průběhu separace detekovány například pomocí MS, UV spektrofotometrie, amperometrie či chemiluminiscence. Detekce pomocí chemiluminiscence byla prokázána jako jedna z nejcitlivějších detekčních technologií (Perez-Ruiz *et al.* 2005, Zhao *et al.* 2006). Podle informací dostupných v nedávno publikovaných člancích má CE velký potenciál pro analýzu farmakologicky účinných sloučenin.

Heitmeier a Blaschke ve své publikaci prezentují stanovení paracetamolu a jeho metabolitů pomocí kapilární elektroforézy s UV detekcí. Jako elektrolyt byl v tomto případě zvolen 50 mM borátový pufr a APAP byl spolu s jeho metabolity detekován při 254 nm (Heitmeier *et al.* 1999).

Autoři Cunha *et al.* ve své publikaci popisují novou a rychlou metodu pro stanovení paracetamolu - kapilární elektroforézu s využitím kapacitně vázaného bezkontaktního vodivostního detektoru. V počátečních studiích byly testovány elektrolyty různého složení s pufrací kapacitou v rozmezí pH 9-10. Nakonec byl zvolen elektrolyt s pH 9,6 obsahující β -alanin a NaOH. Paracetamol byl separován jako aniont a jeho migrační čas byl 120,7 s (Cunha *et al.* 2017).

Autoři Zhao *et al.* v rámci své studie vyvinuli metodu, kapilární elektroforézu s nepřímou chemiluminiscenční detekcí, pro stanovení paracetamolu v tabletách a lidské moči. Pro kvantifikaci paracetamolu bylo využito zjištění, že inhibuje chemiluminiscenční reakci mezi luminolem a $K_3[Fe(CN)_6]$. Stupeň inhibice chemiluminiscence je tak při stanovení přímo úměrný koncentraci paracetamolu. Jako elektrolyt byl použit 0,5 mM luminol v 30 mM borátovém pufru o pH 9,4 (Zhao *et al.* 2006).

Autoři Hložek *et al.* vyvinuli metodu pro současné stanovení paracetamolu a 5-oxoprolinu v lidském séru. Tato metoda byla úspěšně použita k monitorování hladin paracetamolu a 5-oxoprolinu u řady pacientů. Akumulace organické kyseliny 5-oxoprolinu může způsobit metabolickou acidózu, která často komplikuje otravu paracetamolem. Proto by stanovení 5-oxoprolinu mělo být součástí diferenciální diagnózy u pacientů s klinicky významnou acidózou po předávkování paracetamolem. Jedná se o kapilární elektroforézu s využitím detektoru diodového pole. Všechny separace byly provedeny v elektrolytu obsahujícím *N*-cyklohexyl-2-aminoethansulfonovou kyselinu a NaOH. Paracetamol byl detekován spektrofotometricky při vlnové délce 200 nm (Hložek *et al.* 2017).

1.2.4.4 OSTATNÍ METODY

Metody pro stanovení paracetamolu popisované výše vyžadují drahé přístroje, komplikovaný postup analýzy a vícestupňové přípravy vzorku. Vzhledem k tomu, že je paracetamol elektroaktivní sloučeninou, elektrochemické senzory představují zajímavou alternativu pro kvantifikaci paracetamolu z důvodu vysoké citlivosti, vynikající selektivity, nízkých nákladů, rychlých reakcí a jednoduchých operací (Ejaz *et al.* 2017).

Na základě výše uvedených skutečností bylo cílem práce autorů (Ejaz *et Jeon* 2017) vyvinout jednoduchý a zároveň citlivý elektrochemický senzor pro současné stanovení paracetamolu a kyseliny askorbové. Proto navrhli jednoduchou přípravu kompozitu složeného z oxidu grafenu a 1,4-xylendiaminu upraveného pomocí Mn_2O_3 , který byl použit jako povlakový materiál pro elektrodu ze skelného uhlíku. Navržený nanokompozit byl detailně studován pomocí různých elektrochemických technik včetně cyklické voltametrie, diferenční pulzní voltametrie a chronoamperometrie. Elektrochemická měření byla provedena s použitím tříelektrodové cely (Ejaz *et Jeon* 2017).

Autoři Naeemy *et al.* ve své publikaci popisují přípravu uhlíkové pastové elektrody modifikované nanočásticemi NiO a její elektrokatalytickou aktivitu vůči paracetamolu včetně její validace pro kvantitativní stanovení paracetamolu v tabletách. Množství paracetamolu ve vzorcích bylo stanoveno pomocí cyklické voltametrie a chronoamperometrie a veškerá měření byla provedena v alkalickém médiu. Pomocí této metody je možné stanovit množství paracetamolu v tabletách v přítomnosti jiných sloučenin, které se běžně vyskytují v kombinaci s paracetamolem, jako je například kyselina askorbová, *p*-aminofenol (nečistota), kodein a škrob (Naeemy *et al.* 2017).

Hlavním cílem práce autorů Tanuja *et al.* bylo vyvinout jednoduchou, citlivou a selektivní metodu pro současné stanovení paracetamolu a kyseliny listové. Paracetamol a jiné protizánětlivé léky zvyšují potřebu kyseliny listové, a proto je jejich současné stanovení významné. Pro tento účel byla zhotovena uhlíková pastová elektroda modifikovaná prostřednictvím nevirapinu. Pomocí cyklické voltametrie bylo studováno různé množství nevirapinu v uhlíkové pastové elektrodě při měření v 50 μm roztoku paracetamolu v 0,2 M fofátovém pufru. Přijatelný voltamogram byl získán při použití 5 mg nevirapinu (Tanuja *et al.* 2017).

Mahmoud *et al.* ve své práci zkoumali současné voltametrické stanovení paracetamolu a isoniazidu pomocí sítotiskové uhlíkové elektrody modifikované nanočásticemi oxidu bismutu. Léčba pomocí isoniazidu totiž zvyšuje riziko paracetamolem indukované hepatotoxicity až o 85 %. Bylo zjištěno, že tato modifikovaná elektroda vykazuje větší elektrokatalytickou aktivitu, stabilitu a reprodukovatelnost pro současné stanovení paracetamolu a isoniazidu v pufru o pH 2 než elektroda bez modifikace. Použitelnost této elektrody byla testována v několika reálných vzorcích jako je krev, moč, sliny a farmaceutické tablety (Mahmoud *et al.* 2017).

V neposlední řadě lze pro stanovení paracetamolu využít chromatografii na tenké vrstvě, jejíž výhodou jsou nízké provozní náklady a minimální příprava vzorku. Autoři Farid

a Abdelaleem ve své publikaci popisují současné stanovení paracetamolu, jeho toxické nečistoty 4-aminofenolu, pseudoefedrinu a loratidinu. Separace byla provedena na tenké vrstvě silikagelu a vyvíjecí systém byl složen z hexanu, acetonu a amoniaku. Paracetamol byl detekován denzitometricky při vlnové délce 254 nm (Farid *et* Abdelaleem 2016).

Na závěr této kapitoly jsou v tabulce č. 1 uvedeny vybrané metody pro stanovení paracetamolu od uvedených autorů spolu se získanými hodnotami meze detekce (LOD).

Tabulka 1: Meze detekce u vybraných metod

METODA	DETEKCE	LOD	CITACE
HPLC	UV (242 nm)	0,2 mg/l	Vertzoni <i>et al.</i> 2003
	UV (254 nm)	0,13 mg/l	Soysa <i>et al.</i> 2010
	MS	řádově µg/l	Hye <i>et al.</i> 2012
CE	vodivostní	0,24 mg/l	Cunha <i>et al.</i> 2017
	UV	0,3 mg/l	Hložek <i>et al.</i> 2017
Voltametrie	elektrochemická	0,12 mg/l	Tanuja <i>et al.</i> 2017

2. CÍL PRÁCE

- 1.) Pomocí preparativní kapalinové chromatografie purifikovat konjugát paracetamolu s glutathionem, cysteinem a *N*-acetyl-L-cysteinem.
- 2.) Optimalizovat stanovení paracetamolu a jeho metabolitů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS).
- 3.) Optimalizovat stanovení paracetamolu a jeho metabolitů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí (HPLC/UV).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Analytická kolona Ascentis Express C18 (150 × 3 mm, 5 μm; Supelco, USA)

Analytická kolona Kinetex C18 (100 × 3 mm, 2,6 μm; Phenomex, USA)

Analytické váhy ARJ 120-4M (Kern, SRN)

Exsikátor (Simax, ČR)

Hamilton dávkovací jehla 1 ml (Hamilton, Rumunsko)

HPLC/UV systém č. 1: LC systém Agilent 1290 Infinity II se dvěma pumpami, s autosamplrem, termostatem, UV detektorem (Agilent Technologies, SRN)

HPLC/UV systém č. 2: LC systém s FLASH 10 DAD 800 detektorem (ECOM, ČR), s gradientovou pumpou BETA 50 (ECOM, ČR) degasserem DG 4014 (ECOM, ČR) a přístrojem SPIDER určenému ke sběru frakcí (ECOM, ČR)

HPLC-MS/MS: HPLC/UV systém č. 3 s SPD-20A UV detektorem, s dvěma LC-20ADXR pumpami, autosamplrem SIL-20ADXR (Shimadzu, Japan), kolonový termostat LCO 102 (ECOM, ČR), QTRAP 4500 MS (AB SCEIX, USA)

Laboratorní sklo (baňky, kádinky, lahve; Simax, ČR, Fisherbrand, UK)

Lednice Philco PTL 2352 (Philco, USA)

Pipety Finnpiette (Thermo Scientific, Finsko)

Preparativní HPLC kolona MAG5 C18 (150 × 25 mm, 7 μm; Labio, ČR)

Preparativní HPLC kolona MAG5 C18 (250 × 25 mm, 7 μm; Labio, ČR)

Recirkulační chladič Julabo F500 (Julabo, SRN)

Rotační vakuová odparka (Heidolph, SRN)

Software: ACD/ChemSketch, Clarity, Microsoft Office Word 2007, Microsoft Office Excel 2007, Analyst 1.6.3., 1DLC

3.2 CHEMIKÁLIE

Methanol (CH_4O , $M_r = 32,04$; Merck, USA)

Acetonitril ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$, $M_r = 41,05$; Merck, USA)

Deionizovaná voda ($G < 0,1 \mu\text{S}$)

Deuterovaný paracetamol ($\text{C}_8\text{D}_4\text{H}_5\text{NO}_2$, $M_r = 155,19$; Merck, USA)

Konjugát paracetamolu s cysteinem ($\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$, $M_r = 270$; Ratiochem, ČR)

Konjugát paracetamolu s glutathionem ($\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$, $M_r = 456$; Ratiochem, ČR)

Konjugát paracetamolu s *N*-acetyl-L-cysteinem ($\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, $M_r = 312$; Ratiochem, ČR)

Kyselina octová ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$, $M_r = 60,05$; Merck, USA)

Paracetamol ($\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$, $M_r = 151,16$; Merck, USA)

3.3 PREPARATIVNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

3.3.1 PŘÍPRAVA MOBILNÍ FÁZE

Pro purifikaci metabolitů paracetamolu byla použita mobilní fáze připravená smícháním deionizované vody, methanolu a kyseliny octové v různém poměru. Po namíchání byla mobilní fáze odvzdušněna v ultrazvuku po dobu 20 minut.

3.3.2 POSTUP

Pro purifikaci konjugátu paracetamolu s glutathionem, cysteinem a *N*-acetyl-L-cysteinem byla využita preparativní kapalinová chromatografie s UV detektorem. Konkrétně se jedná o LC systém, který obsahuje jednu pumpu, kolonu se stacionární fází (silikagel s C18), dávkovací smyčkový ventil a přístroj určený ke sběru jednotlivých frakcí.

Na kolonu byl pomocí dávkovacího smyčkového ventilu ručně nadávkován vzorek určený k purifikaci, který byl ještě před nadávkováním přefiltrován. V průběhu separace byly jednotlivé frakce sbírány a následně analyzovány pomocí LC-MS/MS. Frakce obsahující požadovaný metabolit paracetamolu byla následně odpařena pomocí rotační vakuové odparky a vysušena v exsikátoru. Čistota odparky byla poté ještě analyzována pomocí LC-MS/MS. Po skončení každé separace byla kolona vždy promyta čistým methanolem po dobu 20 minut. Podmínky separace jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka 2: Podmínky separace

Kolona	MAG5, C18, 250 × 25 mm, 7 μm (pro APAP-SG), MAG5, C18, 150 × 25 mm, 7 μm (pro APAP-NAC, APAP-CYS)
Mobilní fáze	1 % CH ₃ COOH, 12 % CH ₃ OH, 87 % H ₂ O (pro APAP-SG, APAP-NAC) 1 % CH ₃ COOH, 8 % CH ₃ OH, 91 % H ₂ O (pro APAP-CYS)
Množství dávkovaného vzorku	2 ml (APAP-SG, APAP-NAC) 1 ml (APAP-CYS)
Teplota	25 °C
Průtok mobilní fáze	15 ml/min
Vlnová délka	254 nm

3.4 OPTIMALIZACE METODY KE STANOVENÍ PARACETAMOLU A JEHO METABOLITŮ POMOCÍ HPLC/UV

3.4.1 POSTUP

Pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů jsme použili vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s UV detekcí. Stanovení paracetamolu bylo provedeno na dvou různých HPLC systémech a dvou různých kolonách. Použité kolony se lišily délkou a velikostí částic. Součástí prvního HPLC systému byly dvě pumpy, kolonový termostat a autosampler. Na tomto systému byla provedena izokratická i gradientová eluce. Mobilní fáze pro izokratickou eluci byla složena s čerstvé deionizované vody a acetonitrilu (50:50; v/v). Gradientový profil (lineární) je uveden v tabulce č. 3. Součástí druhého HPLC systému byla jedna pumpa, degasser a dávkovací smyčkový ventil pro ruční dávkování. Na tomto systému byla provedena pouze izokratická eluce a složení mobilní fáze bylo totožné s předchozím složením. Podmínky stanovení paracetamolu pomocí HPLC/UV jsou uvedeny v tabulce č. 4 a 5.

Tabulka 3: Gradientový profil pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů

Čas	CH ₃ CN	H ₂ O
0 min	10 %	90 %
5 min	70 %	30 %
7 min	70 %	30 %
8 min	10 %	90 %

Tabulka 4: Podmínky stanovení paracetamolu, HPLC/UV systém č. 1

Kolona	Kinetex C18, 100 × 3 mm, 2,6 μm	Ascentis Express C18, 150 × 3 mm, 5 μm
Mobilní fáze (izokratika)	50 % CH ₃ CN, 50 % H ₂ O	50 % CH ₃ CN, 50 % H ₂ O
Průtok mobilní fáze	0,4 ml/min	0,4 ml/min
Množství dávkovaného vzorku	5 μl	5 μl
Teplota	30 °C	30 °C
Vlnová délka	254 nm	254 nm

Tabulka 5: Podmínky stanovení paracetamolu, HPLC/UV systém č. 2

Kolona	Kinetex C18, 100 × 3 mm, 2,6 μm	Ascentis Express C18, 150 × 3 mm, 5 μm
Mobilní fáze	50 % CH ₃ CN, 50 % H ₂ O	50 % CH ₃ CN, 50 % H ₂ O
Průtok mobilní fáze	0,2 ml/min	0,4 ml/min
Množství dávkovaného vzorku	3 μl	3 μl
Teplota	25 °C	25 °C
Vlnová délka	254 nm	254 nm

Dále byl paracetamol stanoven současně s jeho třemi metabolity (APAP-SG, APAP-CYS, APAP-NAC). Toto stanovení bylo provedeno na HPLC/UV systému č. 3 a jedné koloně obsahující částice silikagelus C18. Měření bylo provedeno opakovaně. Součástí tohoto HPLC systému byly dvě pumpy, kolonový termostat, UV detektor a autosampler. Na tomto systému byla provedena izokratická i gradientová eluce. Mobilní fáze pro izokratickou eluci byla složena z acetonitrilu, deionizované vody a kyseliny octové (50:49,9:0,1; v/v/v). Gradientový profil byl totožný s předchozím, voda byla ale v tomto případě okyselena přidavkem kyseliny octové (0,1 %). Podmínky stanovení paracetamolu a jeho metabolitů pomocí HPLC/UV systému č. 3 jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Tabulka 6: Podmínky stanovení paracetamolu a jeho metabolitů, HPLC/UV systém č. 3

Kolona	Kinetex C18, 100 × 3 mm, 2,6 μm
Mobilní fáze	50 % CH ₃ CN, 49,9 % H ₂ O, 0,1 % CH ₃ COOH
Průtok mobilní fáze	0,4 ml/min
Množství dávkovaného vzorku	1 μl
Teplota	40 °C
Vlnová délka	254 nm

3.4.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

Příprava kalibračních roztoků paracetamolu

Ve 25 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 25 mg paracetamolu. Získali jsme tak zásobní roztok o koncentraci 1000 mg/l. Takto připravený zásobní roztok jsme dále ředili a připravili si z něj prvních pět kalibračních roztoků. Příprava těchto roztoků je uvedena v tabulce č. 7.

Tabulka 7: Příprava kalibračních roztoků APAP

Koncentrace kalibračního roztoku APAP [mg/l]	Objem zásobního roztoku APAP [1000 mg/l; ml]	Objem deionizované vody [ml]
100	1	9
60	0,6	9,4
40	0,4	9,6
20	0,2	9,8
10	0,1	9,9

Následně bylo z roztoku APAP o koncentraci 10 mg/l ředěním připraveno dalších 5 kalibračních roztoků o nižší koncentraci. Do těchto roztoků byl přidán deuterovaný paracetamol (APAP-D₄) jako vnitřní standard, tak aby jeho výsledná koncentrace v těchto roztocích byla 0,1 mg/l. Tyto roztoky byly využity i pro stanovení APAP pomocí LC-MS/MS. Příprava roztoků je uvedena v tabulce č. 8.

Tabulka 8: Příprava kalibračních roztoků APAP s vnitřním standardem

Koncentrace kalibračního roztoku APAP [mg/l]	Objem roztoku APAP [10 mg/l; ml]	Objem roztoku APAP-D ₄ [10 mg/l; ml]	Objem deionizované vody [ml]
1	1	0,1	8,9
0,5	0,5	0,1	9,4
0,1	0,1	0,1	9,8
0,05	0,05	0,1	9,85
0,01	0,01	0,1	9,89

Příprava kalibračních roztoků metabolitů paracetamolu

Pro přípravu kalibračních roztoků metabolitů paracetamolu (APAP-SG, APAP-CYS, APAP-NAC) byly využity metabolity přečištěné pomocí preparativní kapalinové chromatografie. Od každého z nich bylo naváženo 5 mg a rozpuštěno v 5 ml deionizované vody. Dále bylo naváženo také 5 mg paracetamolu a rovněž rozpuštěno v 5 ml deionizované vody. Získali jsme tak zásobní roztoky o koncentraci 1000 mg/l. Tyto roztoky byly dále ředěny stejným způsobem jako předešlý zásobní roztok paracetamolu (tabulka č. 7 a 8) a bylo tak připraveno celkem 10 kalibračních roztoků obsahujících všechny tři metabolity zároveň včetně samotného paracetamolu. Roztoky o nižší koncentraci (1-0,01 mg/l) obsahující vnitřní standard (APAP-D₄) byly využity i pro stanovení pomocí LC-MS/MS.

3.5 OPTIMALIZACE METODY KE STANOVENÍ PARACETAMOLU A JEHO METABOLITŮ POMOCÍ LC-MS/MS

3.5.1 POSTUP

Pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů byla dále využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Jednalo se o LC systém se dvěma pumpami, autosamplerem, kolonou se stacionární fází (silikagel s C18), kolonovým termostatem a UV detektorem. Kapalinový chromatograf byl propojen s hmotnostním spektrometrem využívajícím ionizaci pomocí elektrospreje.

Stanovení paracetamolu bylo opět provedeno na dvou kolonách lišících se délkou a velikostí částic. Rovněž byla provedena izokratická i gradientová eluce. Mobilní fáze pro izokratickou eluci byla složena z deionizované vody a acetonitrilu (50:50; v/v).

Dále bylo provedeno současné stanovení paracetamolu a jeho třech metabolitů (APAP-SG, APAP-CYS, APAP-NAC). Mobilní fáze pro izokratickou eluci byla složena z acetonitrilu, vody a kyseliny octové (50:49,9:0;1; v/v/v). V tomto případě bylo stanovení provedeno pouze na jedné koloně. Gradientový profil pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů pomocí LC-MS/MS byl totožný s gradientovým profilem pro jejich stanovení pomocí HPLC/UV (0 min – 10 % CH₃CN, 5 min – 70 % CH₃CN, 7 min – 70 % CH₃CN, 8 min – 10 % CH₃CN). Společné parametry pro měření na LC-MS/MS jsou uvedeny v tabulce č. 9 a jednotlivé podmínky pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů v tabulce č. 10.

Tabulka 9: Společné parametry pro měření na LC-MS/MS

Mobilní fáze (izokratika)	50 % CH ₃ CN, 50 % H ₂ O (pro APAP) 50 % CH ₃ CN, 49,9 % H ₂ O, 0,1 % CH ₃ COOH (pro APAP-SG, APAP-CYS, APAP-NAC)
Množství dávkovaného vzorku	1 µl
Teplota	40 °C
Průtok mobilní fáze	0,4 ml/min
Typ experimentu	MRM
Rozsah m/z	100-500
Rychlost skenování	10000 Da/s
Teplota na zdroji	500 °C

Tabulka 10: Podmínky pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů

Sloučenina	APAP	APAP-SG	APAP-CYS	APAP-NAC	APAP-D₄
Polarita	+	-	+	+	+
MRM přechod 1	152/93	455/272	271/140	312/166	156/97
Výstupní potenciál kolizní cely 1	14 V	-9 V	10 V	14 V	14 V
MRM přechod 2	152/110	455/182	-	312/140	156/114
Výstupní potenciál kolizní cely 2	8 V	-7 V	-	12 V	8 V
Vstupní potenciál (EP)	10 V	-10 V	10 V	10 V	10 V
Napětí iontového spreje	4500 V	-4500 V	4500 V	4500 V	4500 V

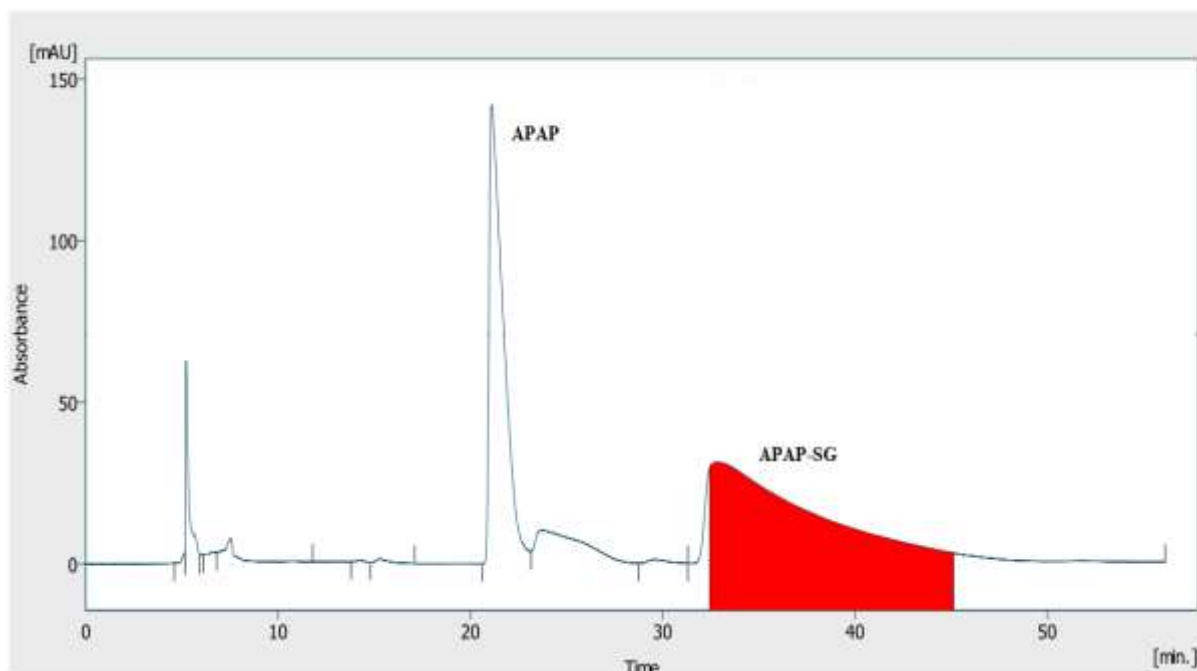
4. VÝSLEDKY

4.1 PREPARATIVNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Pomocí preparativní kapalinové chromatografie se spektrofotometrickým detektorem byly purifikovány tři metabolity paracetamolu – APAP-SG, APAP-CYS a APAP-NAC. Pro purifikaci konjugátu paracetamolu s glutathionem a *N*-acetyl-L-cysteinem byla jako optimální zvolena mobilní fáze obsahující 12 % (v/v) methanolu a 1 % (v/v) kyseliny octové. Pro purifikaci cysteinového konjugátu paracetamolu byla zvolena mobilní fáze obsahující 8 % (v/v) methanolu a 1 % (v/v) kyseliny octové. Retenční časy metabolitů paracetamolu včetně objemu sbíraných frakcí jsou uvedeny v tabulce č. 11. Průběhy separací jsou viditelné v grafech č. 1, 2 a 3. Červenou plochou je zde označena sbíraná frakce obsahující cílový metabolit.

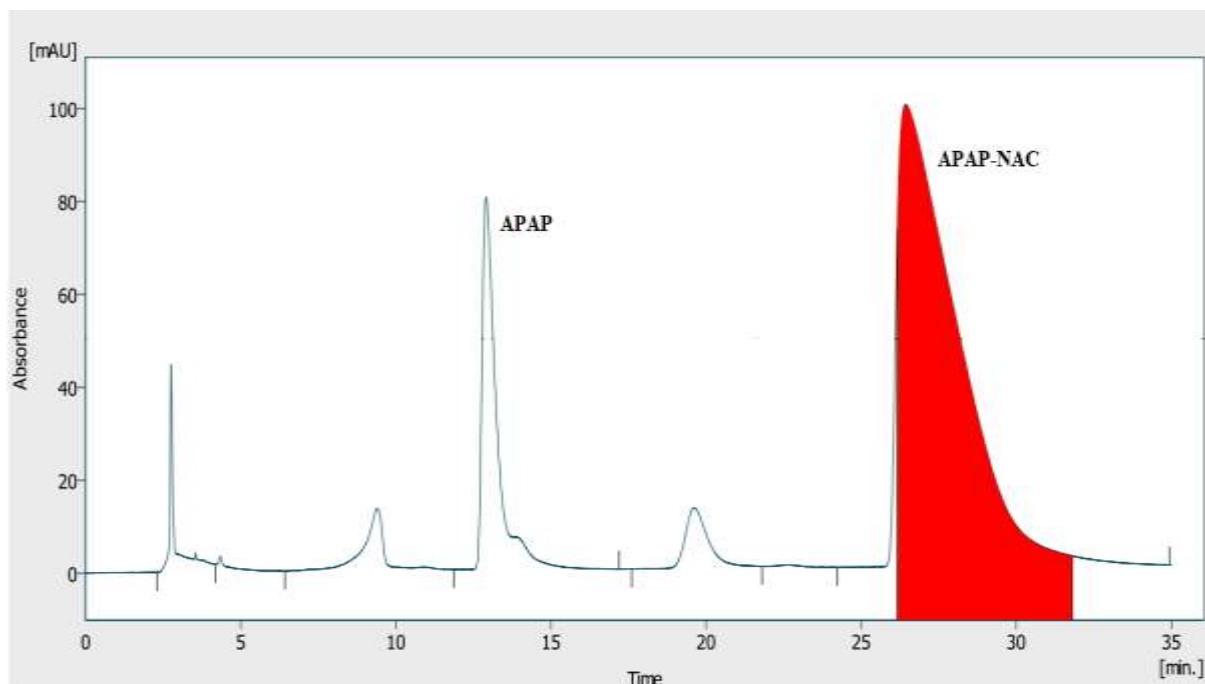
Tabulka 11: Retenční časy purifikovaných metabolitů paracetamolu

Metabolit	Retenční čas (min)	Kolona	Objem frakce (ml)
APAP-SG	32,87	C18, 250 × 25 mm, 7 μm	240
APAP-CYS	32,09	C18, 150 × 25 mm, 7 μm	150
APAP-NAC	26,42	C18, 150 × 25 mm, 7 μm	110



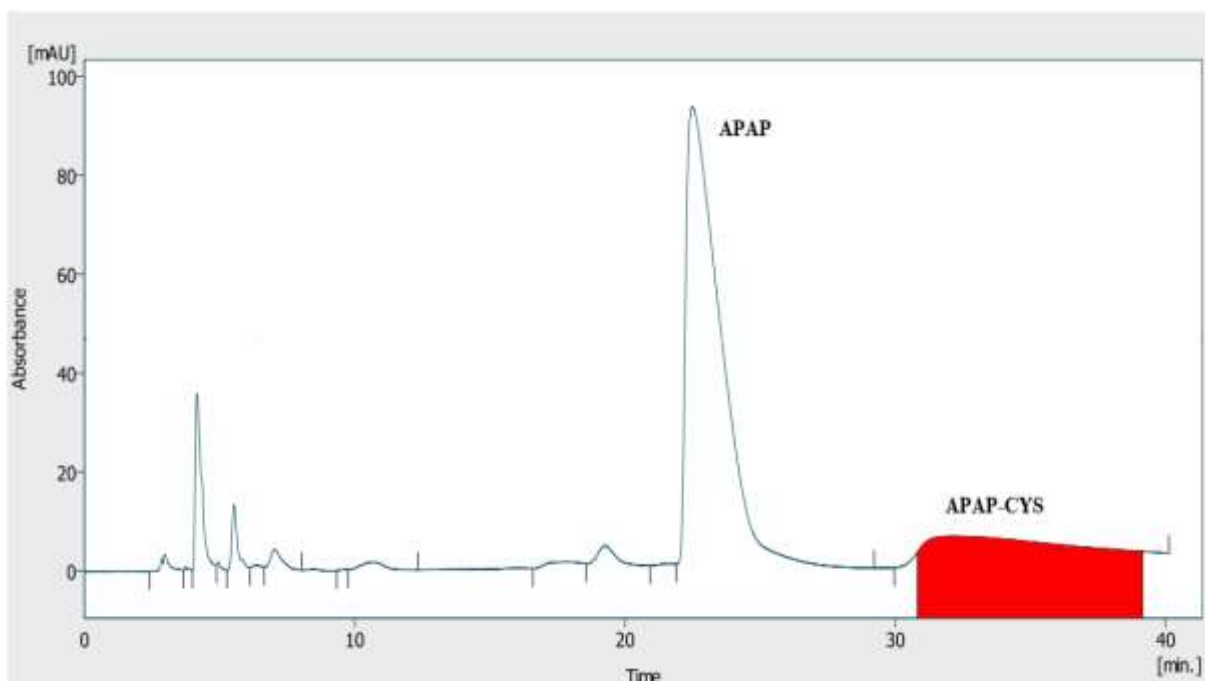
Graf 1: Purifikace APAP-SG

(Doba analýzy 60 min., detekce při 254 nm; MF: 12 % CH₃OH, 1 % CH₃COOH, 87 % H₂O (v/v/v); SF: silikagel s C18; průtok mobilní fáze: 15 ml/min)



Graf 2: Purifikace APAP-NAC

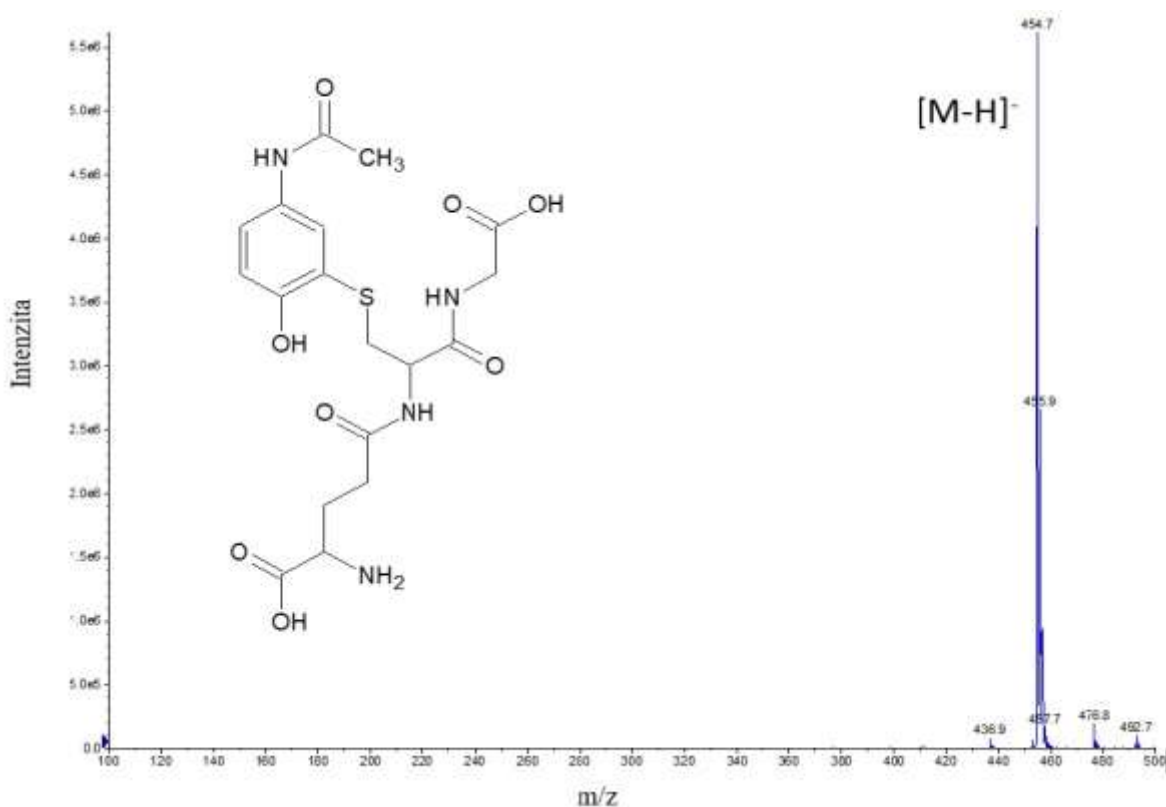
(Doba analýzy 35 min., detekce při 254 nm; MF: 12 % CH₃OH, 1 % CH₃COOH, 87 % H₂O (v/v/v); SF: silikagel s C18; průtok mobilní fáze 15 ml/min)



Graf 3: Purifikace APAP-CYS

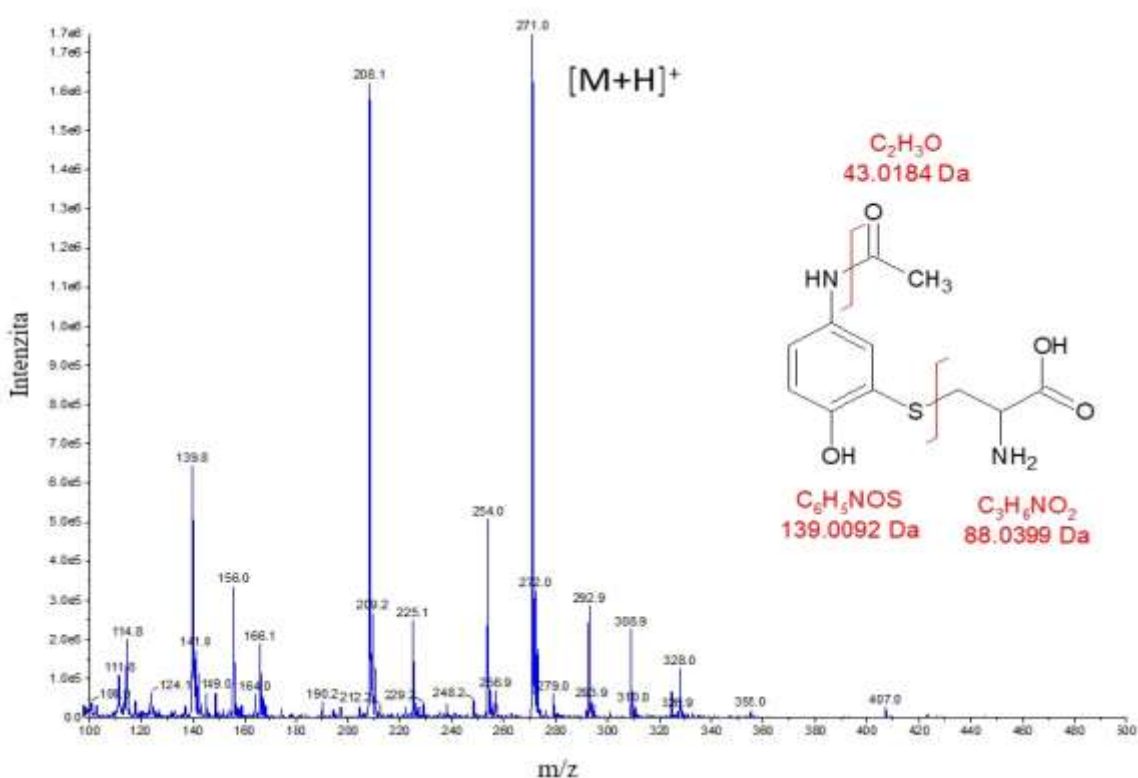
(Doba analýzy 40 min., detekce při 254 nm; MF: 8 % CH₃OH, 1 % CH₃COOH, 91 % H₂O (v/v/v); SF: silikagel s C18; průtok mobilní fáze 15 ml/min)

Pomocí LC-MS/MS byla následně analyzována čistota nasbíraných frakcí a to i po jejich odpaření. MS spektrum konjugátu paracetamolu s glutathionem (zaznamenané v režimu snímání záporných iontů) včetně jeho struktury je viditelné v grafu č. 4. Molekulová hmotnost APAP-SG je 456. Pík s největší intenzitou a s hodnotou m/z 454,7 tak odpovídá deprotonované molekule APAP-SG a pík s hodnotou m/z 476,8 odpovídá aduktovému iontu se sodíkem.



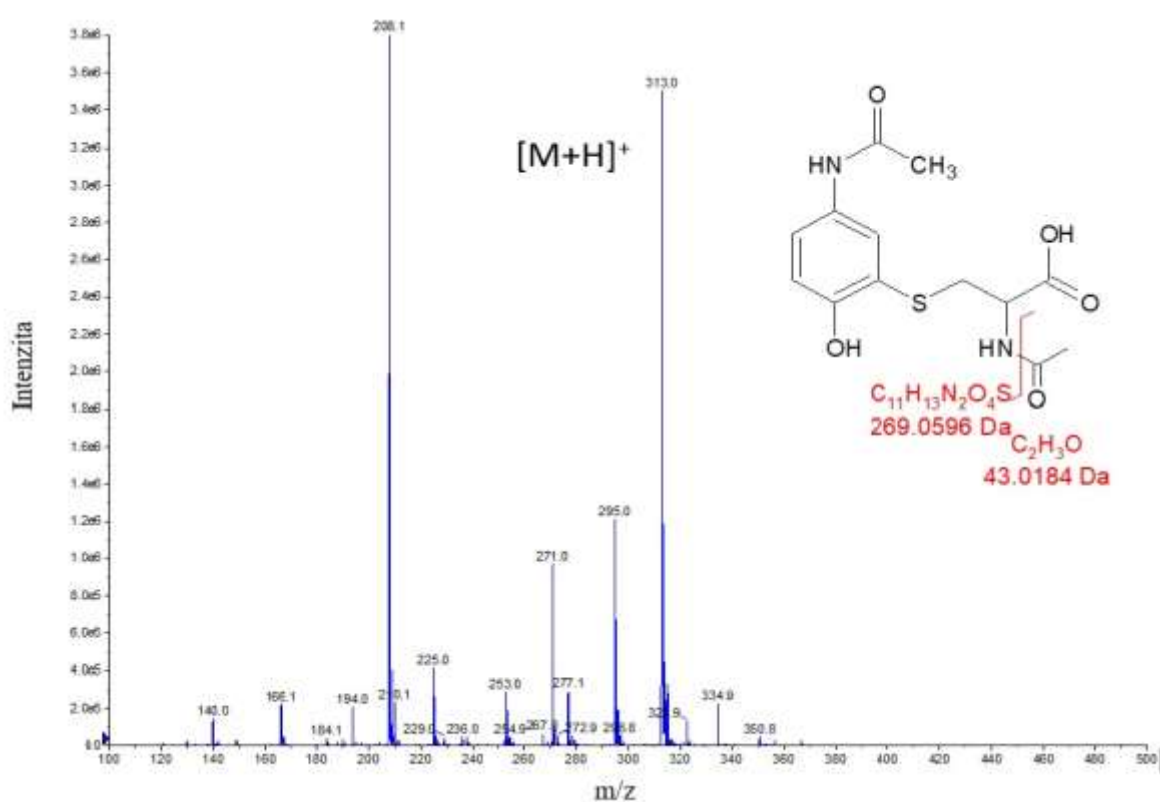
Graf 4: MS spektrum konjugátu paracetamolu s glutathionem.
($M_r = 456$; MF: 50 % CH_3CN , 49,9 % H_2O , 0,1 % CH_3COOH (v/v/v); SF: silikagel s C18)

MS spektrum konjugátu paracetamolu s cysteinem (zaznamenané v režimu snímání kladných iontů) včetně jeho struktury je viditelné v grafu č. 5. Molekulová hmotnost APAP-CYS je 270. Pík s největší intenzitou a s hodnotou m/z 271 tak odpovídá protonované molekule APAP-CYS. Pík s druhou největší intenzitou a s hodnotou m/z 208,1 by měl odpovídat radikálu vzniklému po odštěpení dvou částí z aminokyseliny cysteinu, konkrétně aminoskupiny a karboxylu. Vznik tohoto fragmentu ve své publikaci z roku 2013 popisují autoři Hairin *et al.* Pík s hodnotou m/z 139 odpovídá fragmentované molekule APAP-CYS a to konkrétně po odštěpení acetylu a části aminokyseliny cysteinu. Tato fragmentace je naznačena na struktuře APAP-CYS v grafu č. 5. Pík s hodnotou m/z 254 odpovídá fragmentované molekule po odštěpení aminoskupiny. Pík s hodnotou m/z 292,9 odpovídá aduktovému iontu se sodíkem.



Graf 5: MS spektrum konjugátu paracetamolu s cysteinem.
($M_r = 270$; MF: 50 % CH_3CN , 49,9 % H_2O , 0,1 % CH_3COOH (v/v/v); SF: silikagel s C18)

MS spektrum konjugátu paracetamolu s *N*-acetyl-L-cysteinem (zaznamenané v režimu snímání kladných iontů) včetně jeho struktury je viditelné v grafu č. 6. Molekulová hmotnost konjugátu paracetamolu s *N*-acetyl-L-cysteinem je 312. Intenzivní pík s hodnotou *m/z* 313 tak odpovídá protonované molekule APAP-NAC. Pík s největší intenzitou a hodnotou *m/z* 208,1 by měl, stejně jako v případě APAP-CYS, odpovídat radikálu vzniklému po odštěpení aminoskupiny včetně navázaného acetylu a karboxylu z aminokyseliny cysteinu. Pík s hodnotou *m/z* 295 odpovídá fragmentu vzniklému po odštěpení hydroxylové skupiny a pík s hodnotou *m/z* 271 odpovídá fragmentované molekule po odštěpení acetylu a je tedy shodný s APAP-CYS.



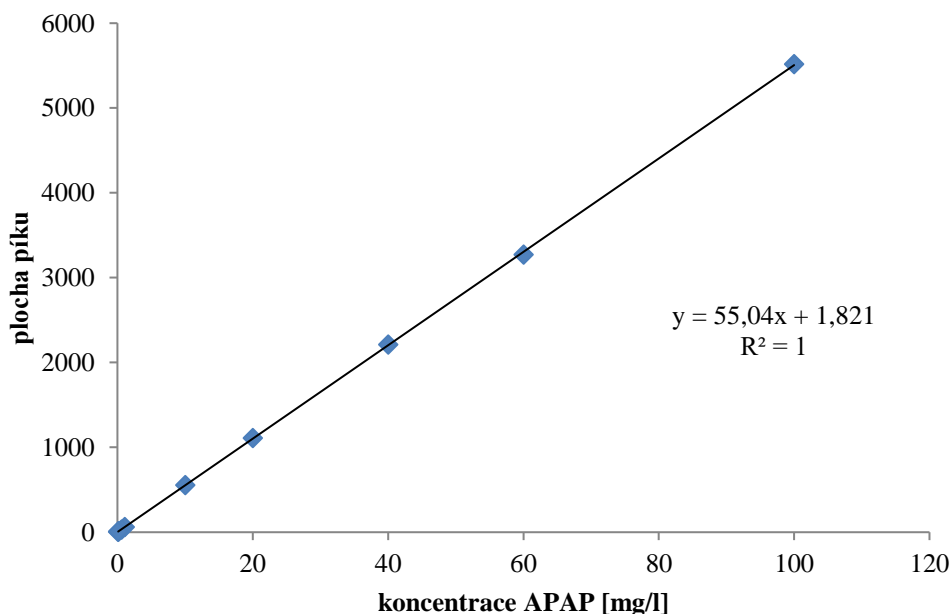
Graf 6: MS spektrum konjugátu paracetamolu s *N*-acetyl-L-cysteinem. (Mr = 312; MF: 50 % CH₃CN, 49,9 % H₂O, 0,1 % CH₃COOH (v/v/v); SF: silikagel s C18)

4.2 OPTIMALIZACE METODY KE STANOVENÍ PARACETAMOLU A JEHO METABOLITŮ POMOCÍ HPLC/UV

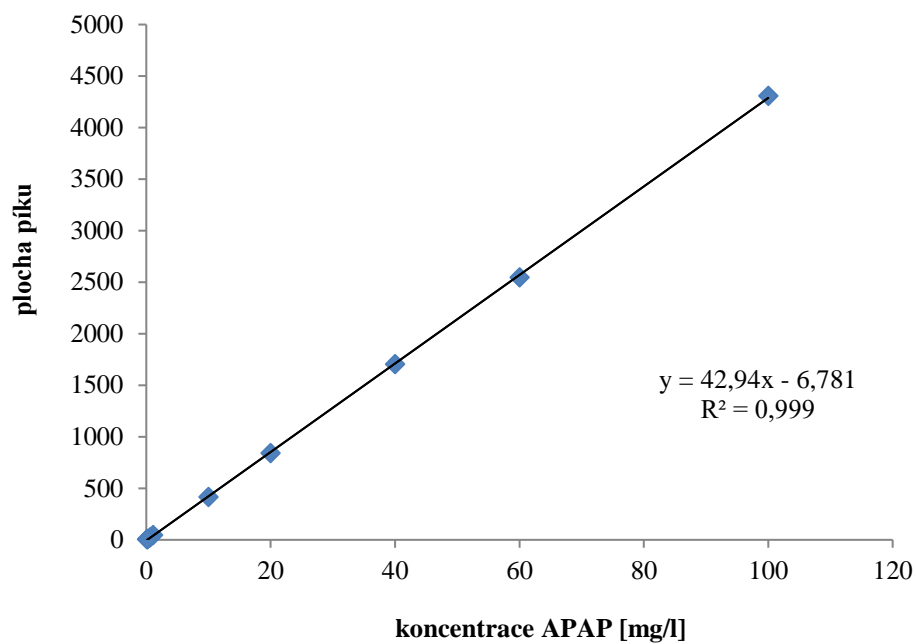
Stanovení paracetamolu samotného pomocí HPLC/UV systému č. 1 bylo provedeno na dvou kolonách s využitím izokratické i gradientové eluce. Součástí tohoto HPLC systému byly dvě pumpy, kolonový termostata autosampler. Jednotlivé kalibrace byly sestrojeny jako závislost plochy píku na koncentraci paracetamolu v kalibračním roztoku (graf č. 7, 8, 9, 10). Retenční časy paracetamolu jsou uvedeny v tabulce č. 12. Ze statistických parametrů (příloha č. 1) a kalibračních přímek vyplývá, že nejlepší volbou je v tomto případě stanovení paracetamolu s využitím izokratické eluce a kolony Ascentis Express obsahující 5 μm částice silikagelu s C18 (graf č. 7).

Tabulka 12: Retenční časy paracetamolu při stanovení pomocí HPLC/UV systému č. 1

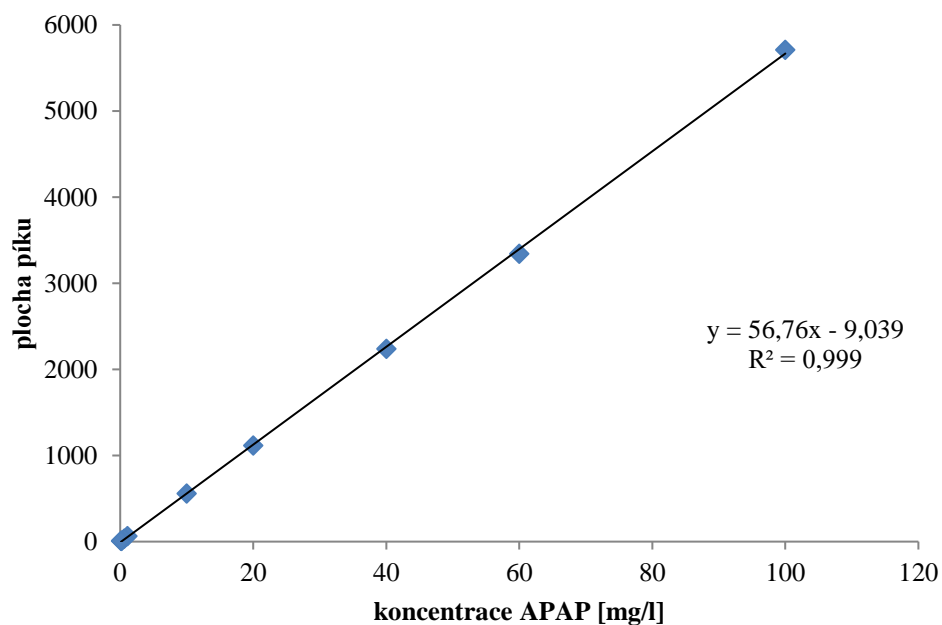
Kolona	Typ eluce	Retenční čas (min)
Ascentis Express C18, 150 \times 3 mm, 5 μm	izokratická	1,50
Ascentis Express C18, 150 \times 3 mm, 5 μm	gradientová	2,55
Kinetex C18, 100 \times 3 mm, 2,6 μm	izokratická	1,16
Kinetex C18, 100 \times 3 mm, 2,6 μm	gradientová	2,23



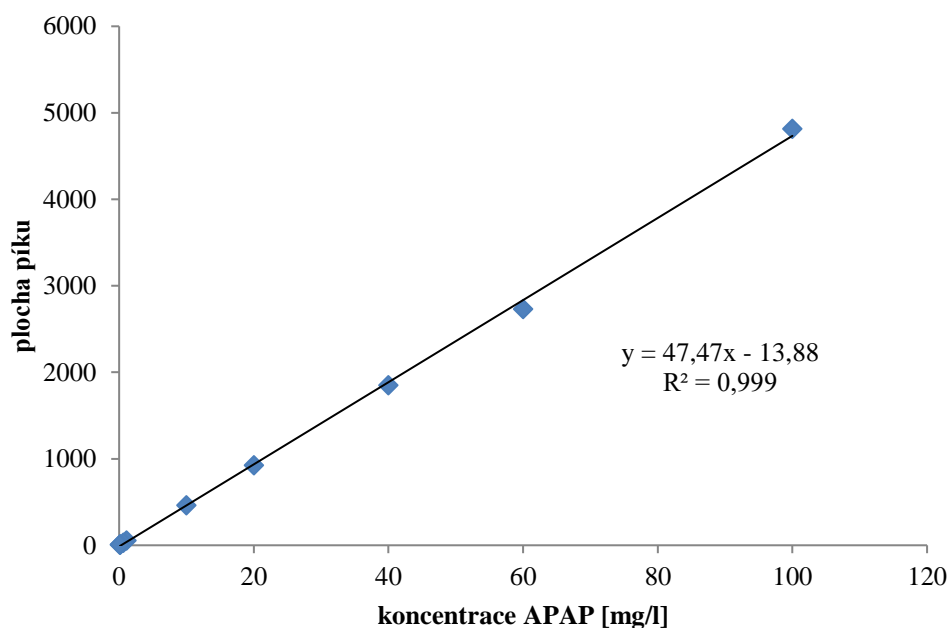
Graf 7: Kalibrační závislost pro APAP (0,11-100 mg/l) (izokratická eluce, MF: 50 % CH_3CN , 50 % H_2O (v/v); kolona Ascentis Express C18, 150 \times 3 mm, 5 μm)



Graf 8: Kalibrační závislost pro APAP (0,11-100 mg/l)
(gradientová eluce, gradientový profil uveden v tabulce č. 3; kolona Ascentis Express C18, 150 × 3 mm, 5 μm)

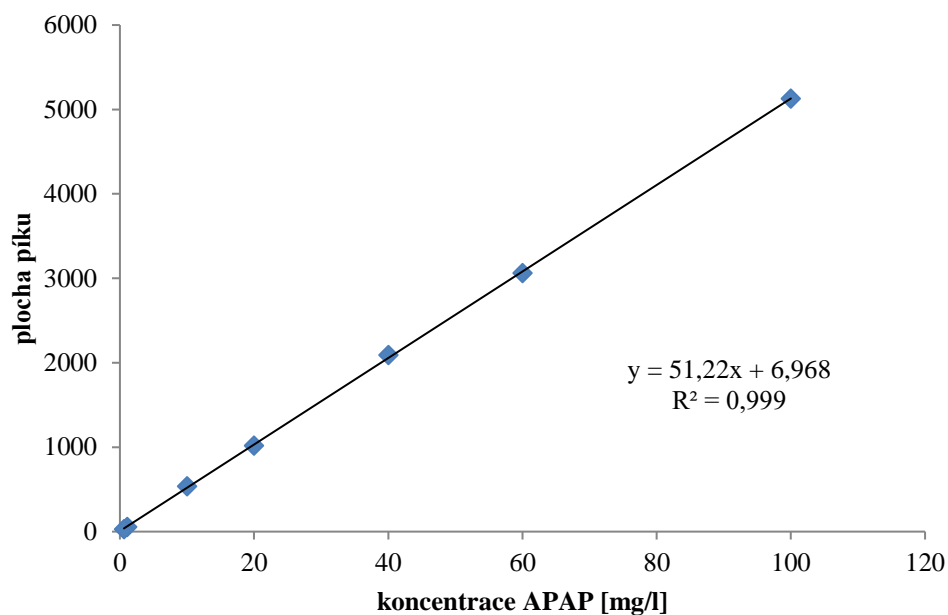


Graf 9: Kalibrační závislost pro APAP (0,11-100 mg/l)
(izokratická eluce, MF: 50 % CH₃CN, 50 % H₂O (v/v); kolona Kinetex C18, 100 × 3 mm, 2,6 μm)

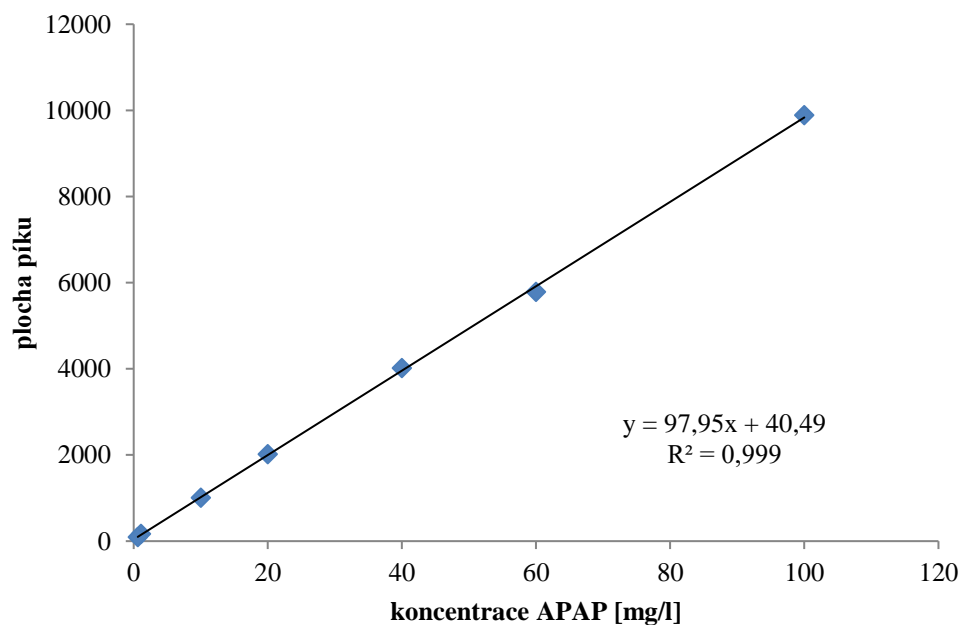


Graf 10: Kalibrační závislost pro APAP (0,11-100 mg/l)
 (gradientová eluce, gradientový profil uveden v tabulce č. 3; kolona Kinetex C18,
 100 × 3 mm, 2,6 μm)

Dále byl paracetamol stanoven pomocí HPLC/UV systému č. 2. Součástí tohoto HPLC systému byla jedna pumpa, degasser a dávkovací smyčkový ventil pro ruční dávkování. Stanovení bylo provedeno na dvou kolonách s využitím izokratické eluce. Stanovení pomocí gradientové eluce nebylo možné provést, protože HPLC/UV systém č. 2 neumožňuje lineární změnu složení mobilní fáze v rámci analytické chromatografie. Statistické parametry jsou uvedeny v příloze č. 2 a kalibrační závislosti v grafu č. 11 a 12. Retenční čas paracetamolu při stanovení na koloně Ascentis Express (C18, 150 × 3 mm, 5 μm) a při průtoku 0,4 ml za minutu byl 1,33 minut. Při stanovení na koloně Kinetex (C18, 100 × 3 mm, 2,6 μm) a při průtoku 0,2 ml za minutu byl retenční čas paracetamolu 2,06 minut. I v tomto případě bylo dosaženo lepších hodnot při stanovení na koloně Ascentis Express (graf č. 11).



Graf 11: Kalibrační závislost pro APAP (0,6-100 mg/l)
(izokratická eluce, MF: 50 % CH₃CN, 50 % H₂O (v/v); kolona Ascentis Express C18,
150 × 3 mm, 5 μm)

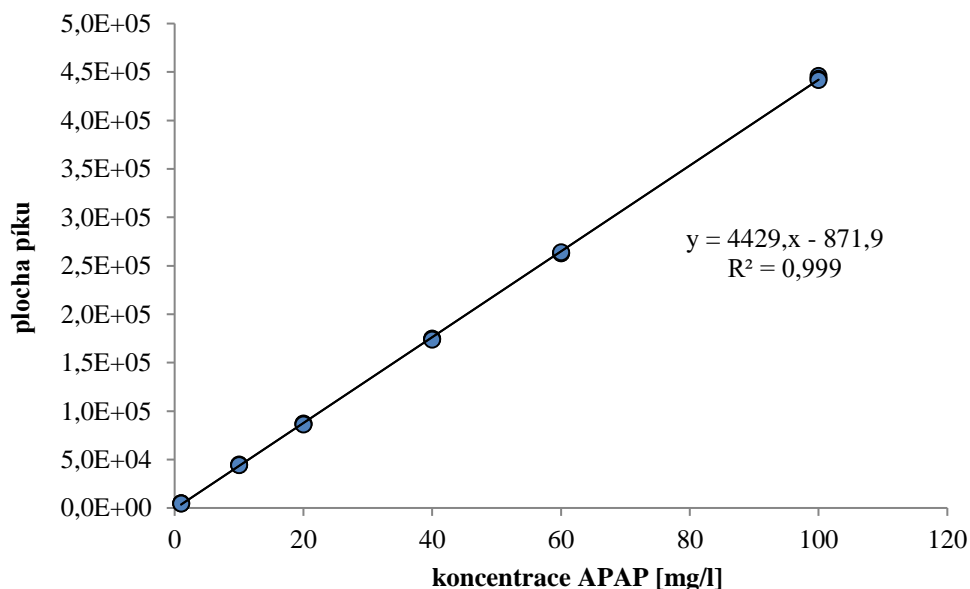


Graf 12: Kalibrační závislost pro APAP (0,6-100 mg/l)
(izokratická eluce, MF: 50 % CH₃CN, 50 % H₂O (v/v); kolona Kinetex C18,
150 × 3 mm, 5 μm)

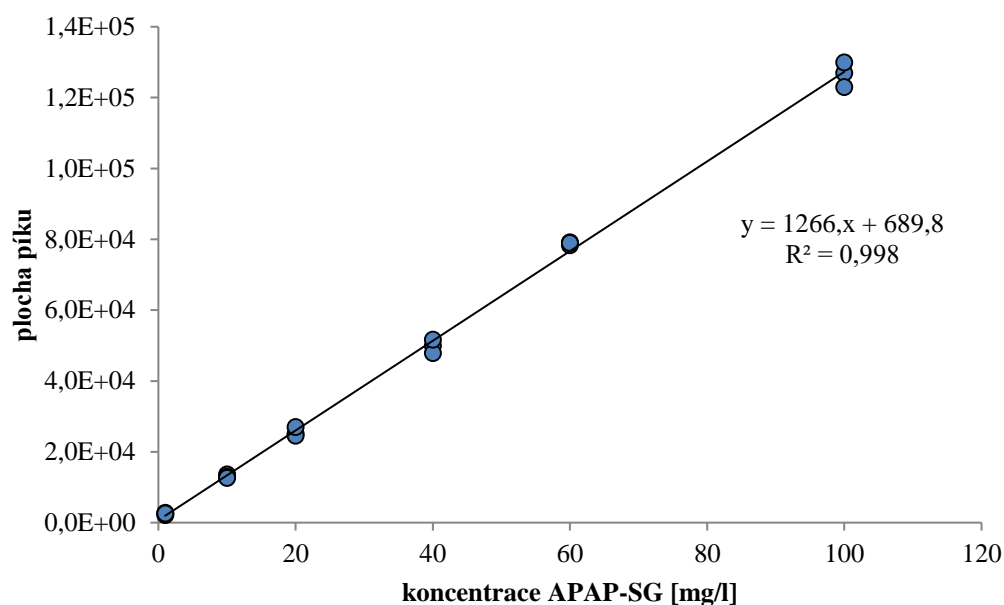
Nakonec bylo provedeno současné stanovení paracetamolu a jeho tří metabolitů (APAP-SG, APAP-CYS, APAP-NAC) pomocí HPLC/UV systému č. 3. Součástí tohoto HPLC systému byly dvě pumpy, kolonový termostat, UV detektor a autosampler. Toto stanovení bylo provedeno na koloně Kinetex (C18, 100 × 3 mm, 2,6 μm) s využitím izokratické i gradientové eluce. V průběhu izokratické eluce ovšem nedošlo k separaci paracetamolu a jeho metabolitů, a proto jsou v následujících grafech uvedeny pouze kalibrační závislosti získané na základě gradientové eluce (graf č. 13, 14, 15, 16). Měření bylo provedeno opakovaně v průběhu několika dní s využitím kalibračních roztoků uchovávaných v lednici při 4 °C. Retenční časy analytů jsou uvedeny v tabulce č. 13. Statistické parametry pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů jsou uvedeny v příloze č. 3.

Tabulka 13: Retenční časy analytů při stanovení pomocí HPLC/UV systému č. 3

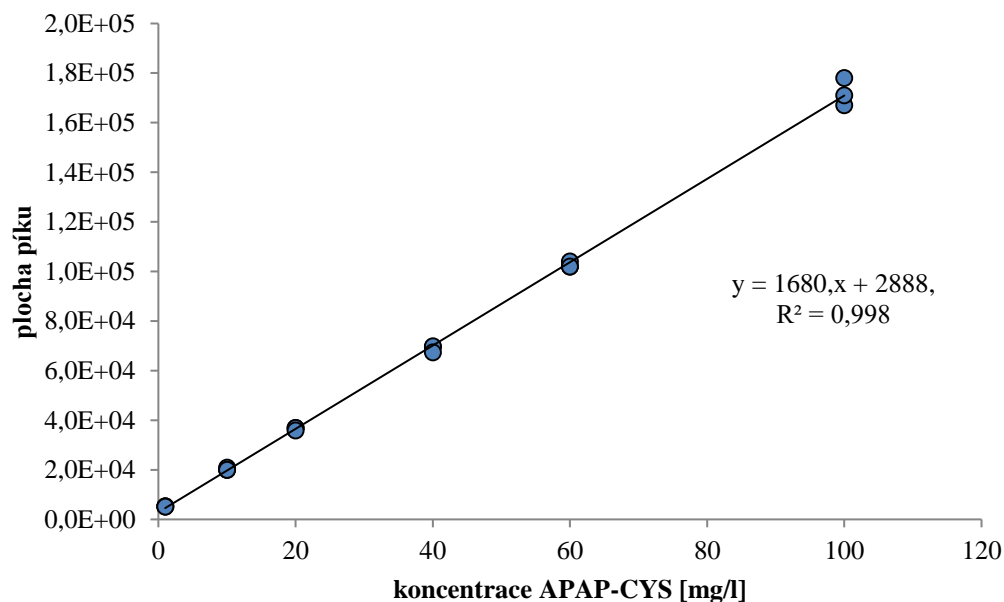
Analyt	Retenční čas (min) gradient
APAP	2,41
APAP-SG	1,94
APAP-CYS	1,57
APAP-NAC	2,77



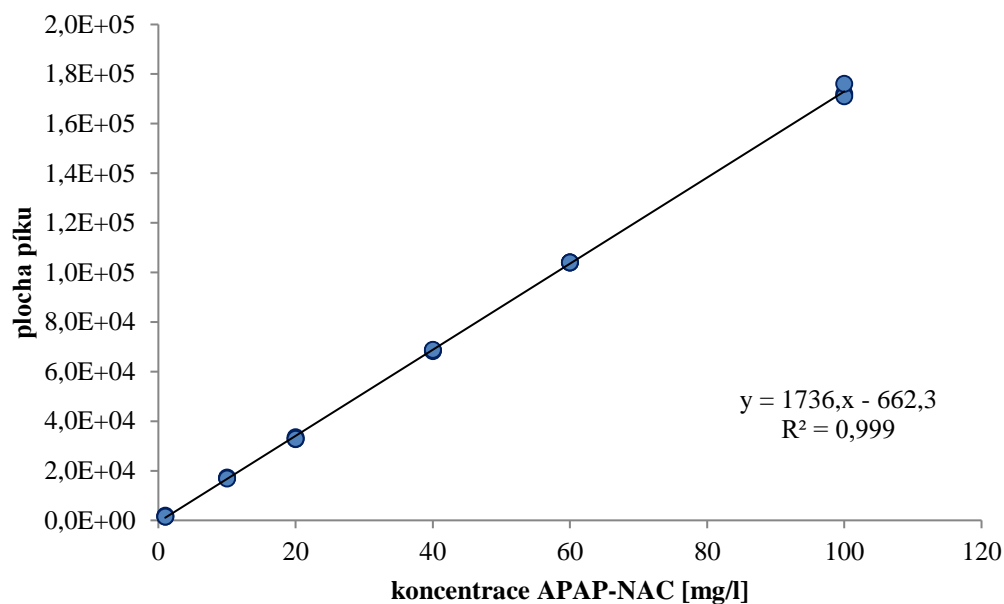
Graf 13: Kalibrační závislost pro APAP (1,1-100 mg/l)
(gradientová eluce, gradientový profil uveden v tabulce č. 3; kolona Kinetex C18,
100 × 3 mm, 2,6 μm)



Graf 14: Kalibrační závislost pro APAP-SG (1-100 mg/l)
(gradientová eluce, gradientový profil uveden v tabulce č. 3; kolona Kinetex C18,
100 × 3 mm, 2,6 μm)



Graf 15: Kalibrační závislost pro APAP-CYS (1-100 mg/l)
(gradientová eluce, gradientový profil uveden v tabulce č. 3; kolona Kinetex C18,
100 × 3 mm, 2,6 μm)



Graf 16: Kalibrační závislost pro APAP-NAC (1-100 mg/l)
(gradientová eluce, gradientový profil uveden v tabulce č. 3; kolona Kinetex C18,
100 × 3 mm, 2,6 μm)

Pro současné stanovení paracetamolu a jeho metabolitů pomocí HPLC/UV systému č. 3 s využitím gradientové eluce byly vypočteny meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) dle následujících vztahů:

$$LOD = \frac{3 \times h_{\xi}}{k}$$

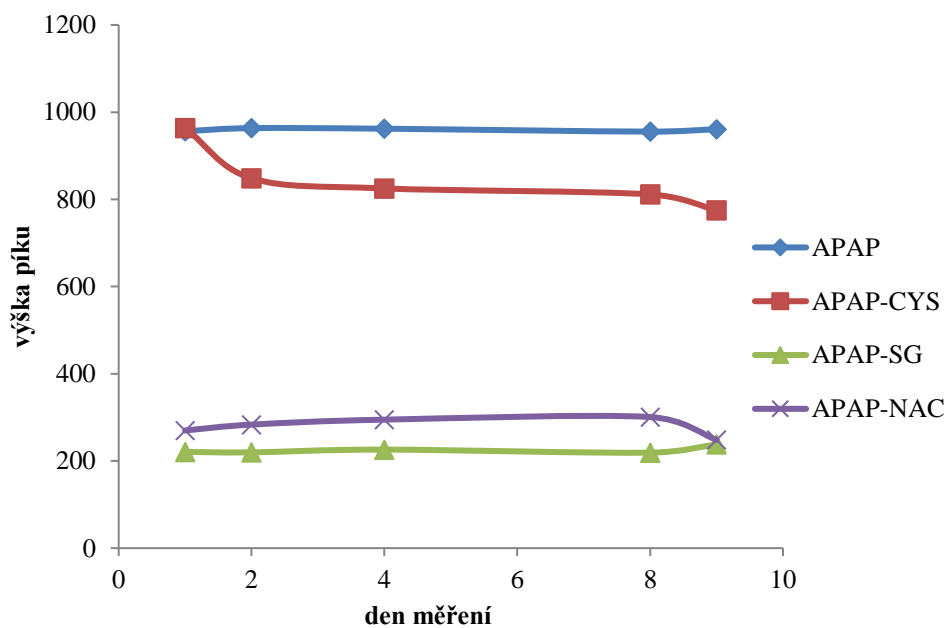
$$LOQ = \frac{10 \times h_{\xi}}{k}$$

kde h_{ξ} je výška šumu a k je směrnice získaná z kalibrace, která byla sestrojena jako závislost výšky píku analytu na jeho koncentraci. Výška šumu byla odečtena z chromatografického záznamu pro kalibrační roztok o koncentraci 10 mg/l. Vypočtené hodnoty LOD a LOQ jsou uvedeny v následující tabulce (tabulka č. 14).

Tabulka 14: Meze detekce a meze stanovitelnosti pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů pomocí HPLC/UV systému č. 3

analyt	LOD	LOQ
APAP	0,05 mg/l	0,15 mg/l
APAP-SG	0,21 mg/l	0,70 mg/l
APAP-CYS	0,07 mg/l	0,24 mg/l
APAP-NAC	0,13 mg/l	0,42 mg/l

V rámci analýz pomocí HPLC/UV systému č. 3 byla také hodnocena stabilita APAP, APAP-SG, APAP-CYS a APAP-NAC v roztoku obsahujícím 12 % (v/v) methanolu a 1 % (v/v) kyseliny octové při uchovávání v lednici. Hodnocení stability proběhlo v průběhu 9 dnů. Pro vyhodnocení stability byla sestavena závislost výšky píku analytu na dni měření (graf č. 17). Z grafu není patrná žádná výrazná nestabilita ani jednoho z analytů.



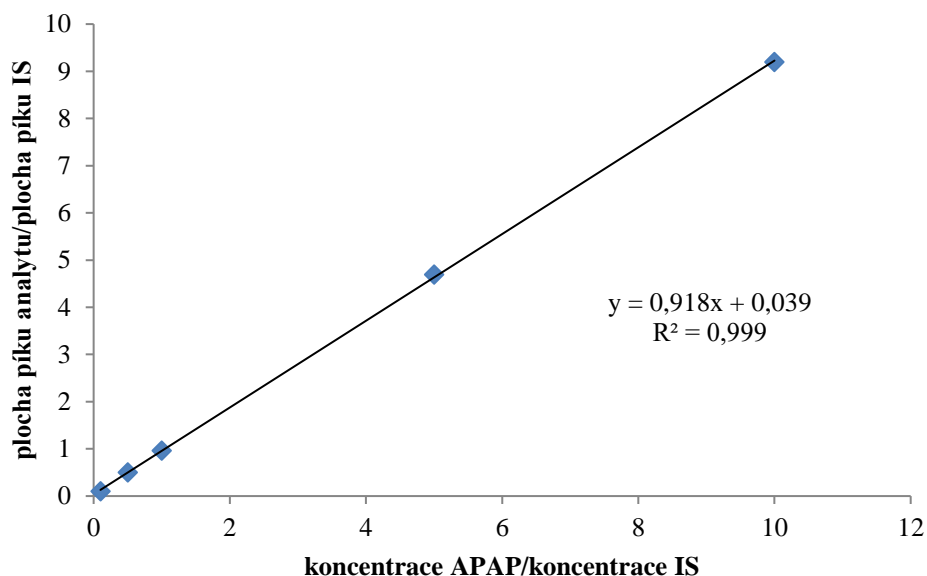
Graf 17: Hodnocení stability paracetamolu a jeho metabolitů (gradientová eluce, gradientový profil uveden v tabulce č. 3; kolona Kinetex C18, 100 × 3 mm, 2,6 μm)

4.3 OPTIMALIZACE METODY KE STANOVENÍ PARACETAMOLU A JEHO METABOLITŮ POMOCÍ LC-MS/MS

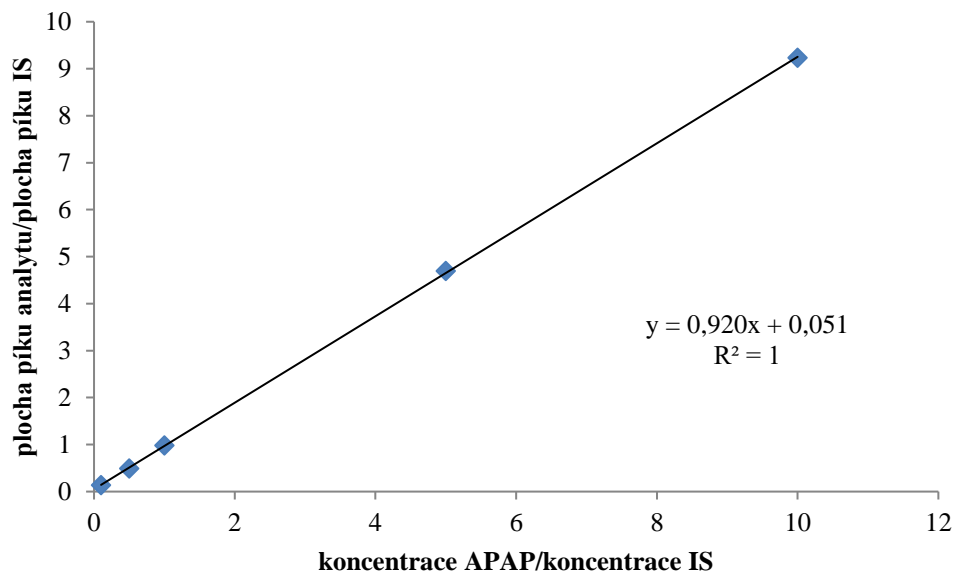
Stanovení paracetamolu samotného pomocí LC-MS/MS bylo provedeno na dvou kolonách s využitím izokratické i gradientové eluce. Jednotlivé kalibrace byly sestrojeny jako závislost poměru plochy píku paracetamolu a plochy píku IS (APAP-D₄) na poměru koncentrace paracetamolu a koncentrace IS v kalibračním roztoku (graf č. 18, 19, 20, a 21). Retenční časy paracetamolu jsou uvedeny v tabulce č. 15. Ze statistických parametrů (příloha č. 4) vyplývá, že nejlepší volbou (stejně jako při stanovení pomocí HPLC/UV systému č. 1) je stanovení na koloně Ascentis Express, s využitím izokratické eluce (graf č. 20).

Tabulka 15: Retenční časy paracetamolu při stanovení pomocí LC-MS/MS

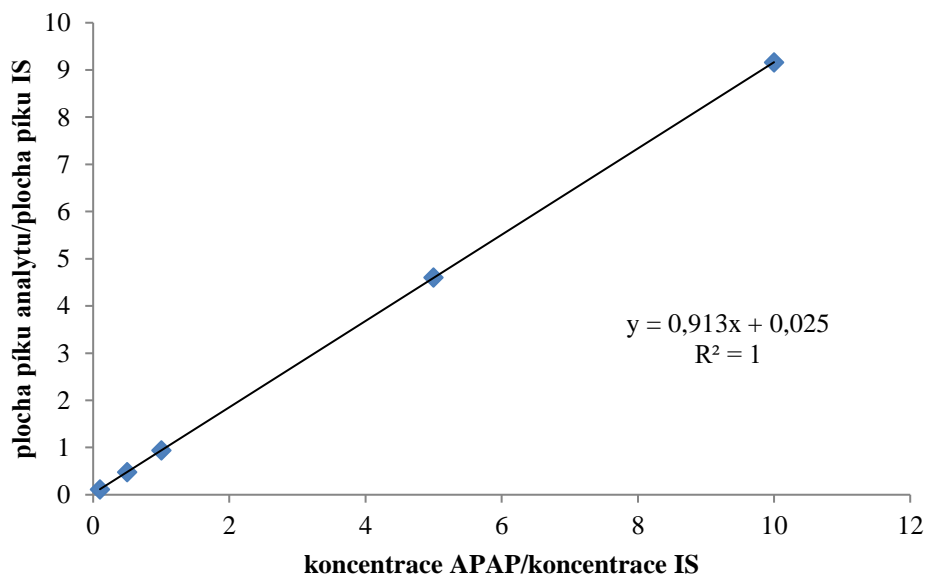
Kolona	Typ eluce	Retenční čas (min)
Ascentis Express C18, 150 × 3 mm, 5 μm	izokratická	1,40
Ascentis Express C18, 150 × 3 mm, 5 μm	gradientová	2,43
Kinetex C18, 100 × 3 mm, 2,6 μm	izokratická	1,08
Kinetex C18, 100 × 3 mm, 2,6 μm	gradientová	2,09



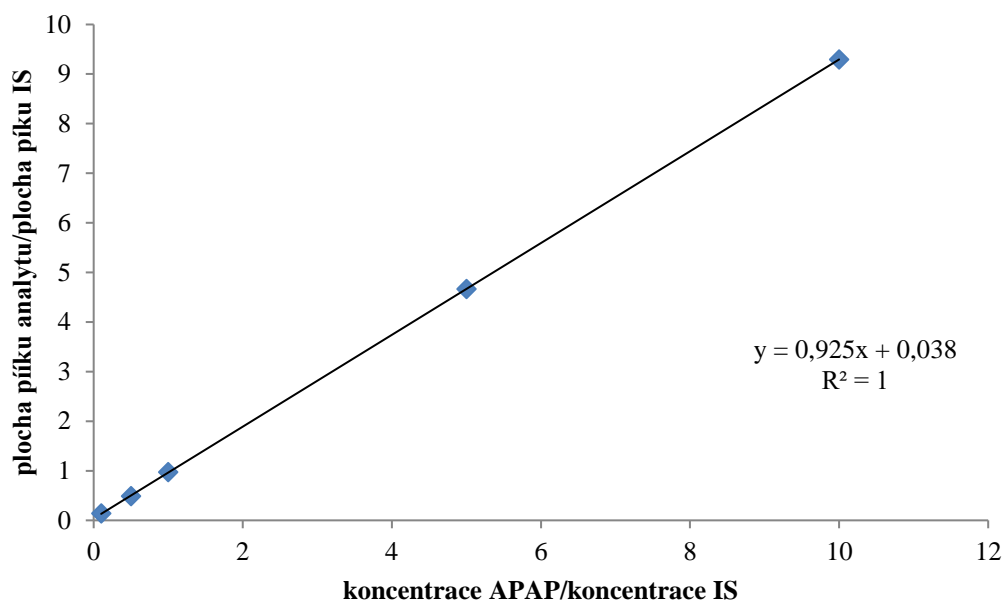
Graf 18: Kalibrační závislost pro APAP (0,01-1 mg/l) s vnitřním standardem APAP-D₄ (0,1 mg/l) (izokratická eluce, MF: 50 % CH₃CN, 50 % H₂O (v/v); kolona Kinetex C18, 100 × 3 mm, 2,6 μm)



Graf 19: Kalibrační závislost pro APAP (0,01-1 mg/l) s vnitřním standardem APAP-D₄ (0,1 mg/l) (gradientová eluce, gradientový profil uveden v tabulce č. 3; kolona Kinetex C18, 100 × 3 mm, 2,6 μm)



Graf 20: Kalibrační závislost pro APAP (0,01-1 mg/l) s vnitřním standardem APAP-D₄ (0,1 mg/l) (izokratická eluce, MF: 50 % CH₃CN, 50 % H₂O (v/v); kolona Ascentis Express C18, 150 × 3 mm, 5 μm)



Graf 21: Kalibrační závislost pro APAP (0,01-1 mg/l) s vnitřním standardem APAP-D₄ (0,1 mg/l) (gradientová eluce, gradientový profil uveden v tabulce č. 3; kolona Ascentis Express C18, 150 × 3 mm, 5 μm)

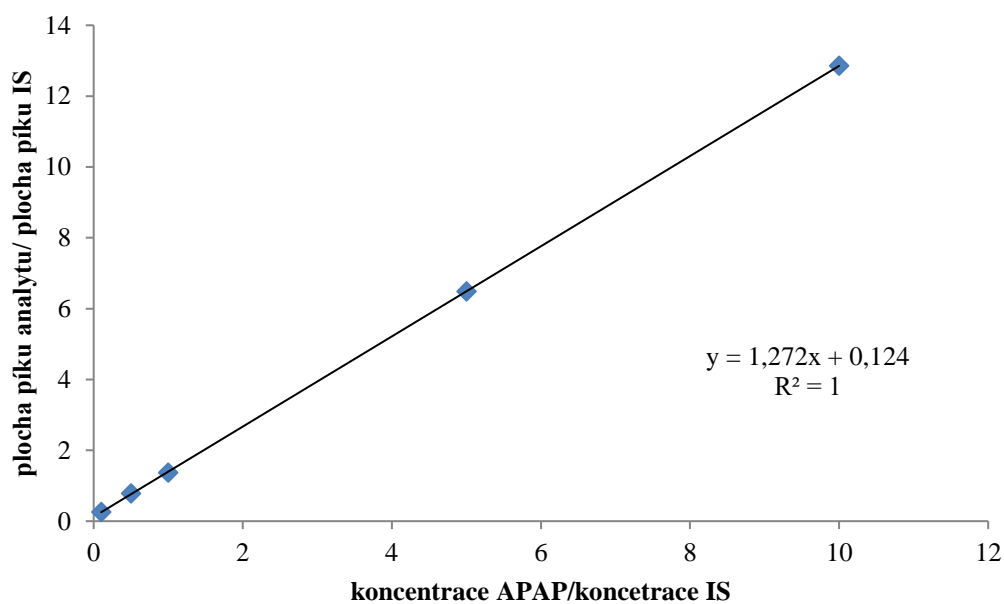
Dále byl APAP stanoven pomocí LC-MS/MS současně s APAP-SG, APAP-CYS a APAP-NAC. Toto stanovení bylo provedeno na koloně Kinetex (C18, 100 × 3 mm, 2,6 μm) s využitím izokratické (graf č. 22, 23, 24 a 25) i gradientové eluce (graf č. 26, 27, 28 a 29). Měření bylo provedeno opakovaně v průběhu několika dnů, kdy pro tato měření byly použity kalibrační roztoky namíchané v první den měření a nadále uchovávané v lednici při 4° C. Retenční časy analytů jsou uvedeny v tabulce č. 16. Statistické parametry pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů s využitím izokratické eluce jsou uvedeny v příloze č. 5 a statistické parametry pro stanovení s využitím gradientové eluce v příloze č. 6. Ze statistických parametrů vyplývá, že lepších hodnot bylo dosaženo v rámci stanovení s izokratickou elucí, což potvrzují i námi vypočtené meze detekce a meze stanovitelnosti uvedené v tabulce č. 17.

Tabulka 16: Retenční časy analytů při stanovení pomocí LC-MS/MS

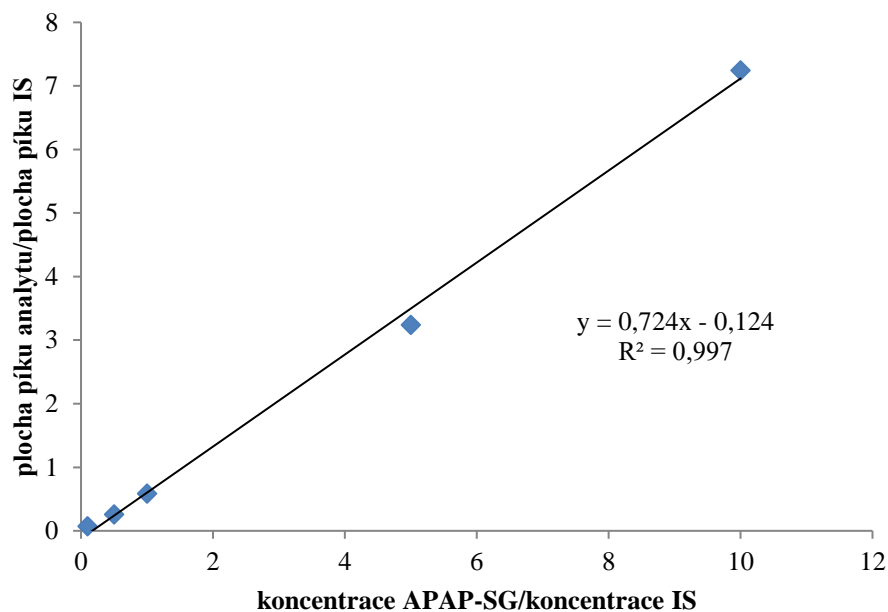
Analyt	Retenční čas (min) izokratika	Retenční čas (min) gradient
APAP	1,35	2,41
APAP-SG	1,18	1,94
APAP-CYS	1,21	1,57
APAP-NAC	1,30	2,77

Tabulka 17: Meze detekce a meze stanovitelnosti pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů pomocí LC-MS/MS

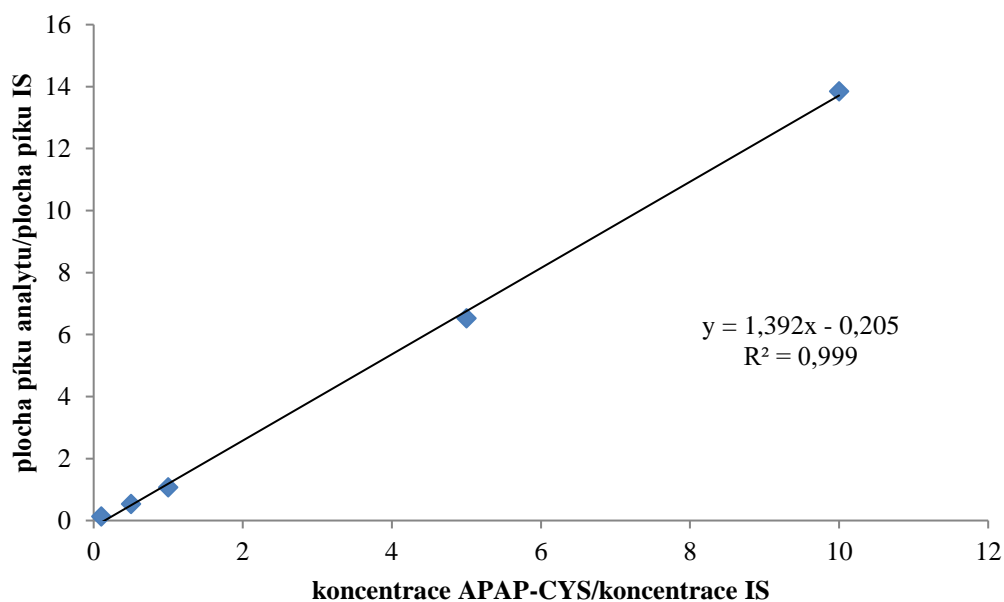
IZOKRATIKA	LOD	LOQ	GRADIENT	LOD	LOQ
APAP	1,37 µg/l	4,56 µg/l	APAP	5,58 µg/l	18,61 µg/l
APAP-SG	0,99 µg/l	3,30 µg/l	APAP-SG	1,32 µg/l	4,40 µg/l
APAP-CYS	0,73 µg/l	2,42 µg/l	APAP-CYS	1,76 µg/l	5,86 µg/l
APAP-NAC	3,22 µg/l	10,75 µg/l	APAP-NAC	3,47 µg/l	11,57 µg/l



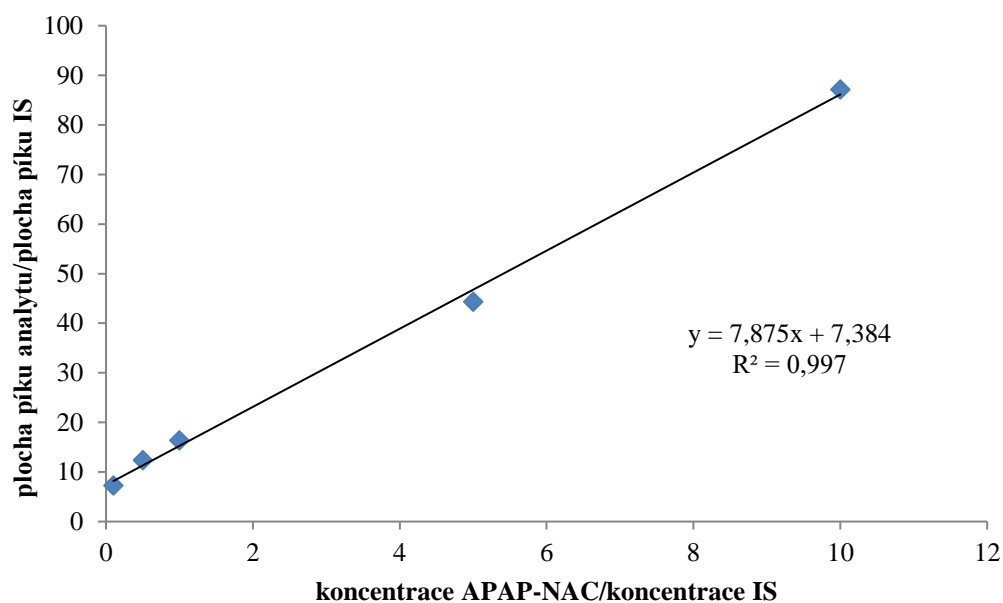
Graf 22: Kalibrační závislost pro APAP (0,01-1 mg/l) s vnitřním standardem APAP-D₄ (0,1 mg/l) (izokratická eluce, MF: 50 % CH₃CN, 49,9 % H₂O, 0,1 % CH₃COOH (v/v/v); kolona Kinetex C18, 100 × 3 mm, 2,6 µm)



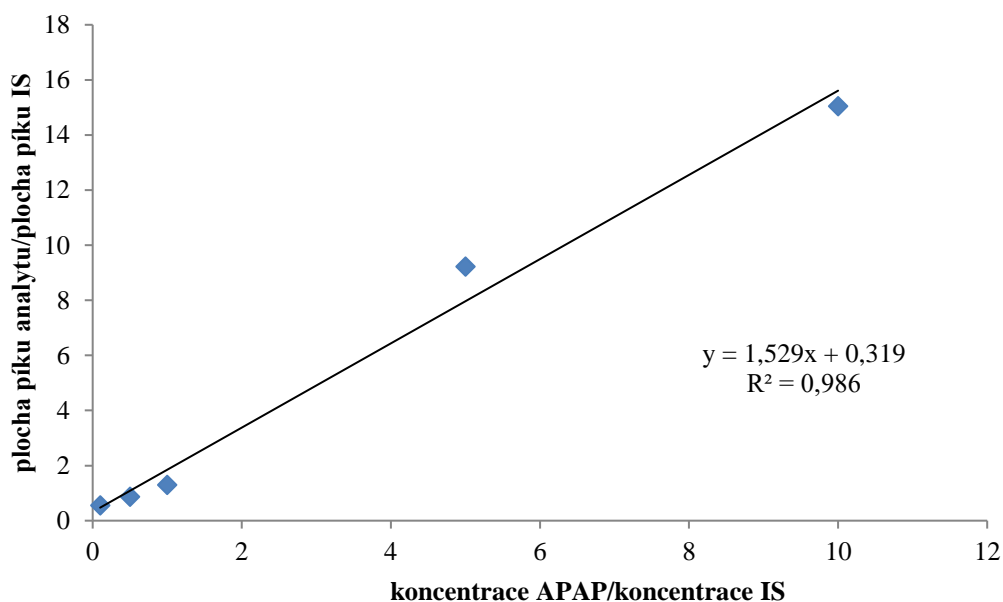
Graf 23: Kalibrační závislost pro APAP-SG (0,01-1 mg/l) s vnitřním standardem APAP-D₄ (0,1 mg/l) (izokratická eluce, MF: 50 % CH₃CN, 49,9 % H₂O, 0,1 % CH₃COOH (v/v/v); kolona Kinetex C18, 100 × 3 mm, 2,6 μm)



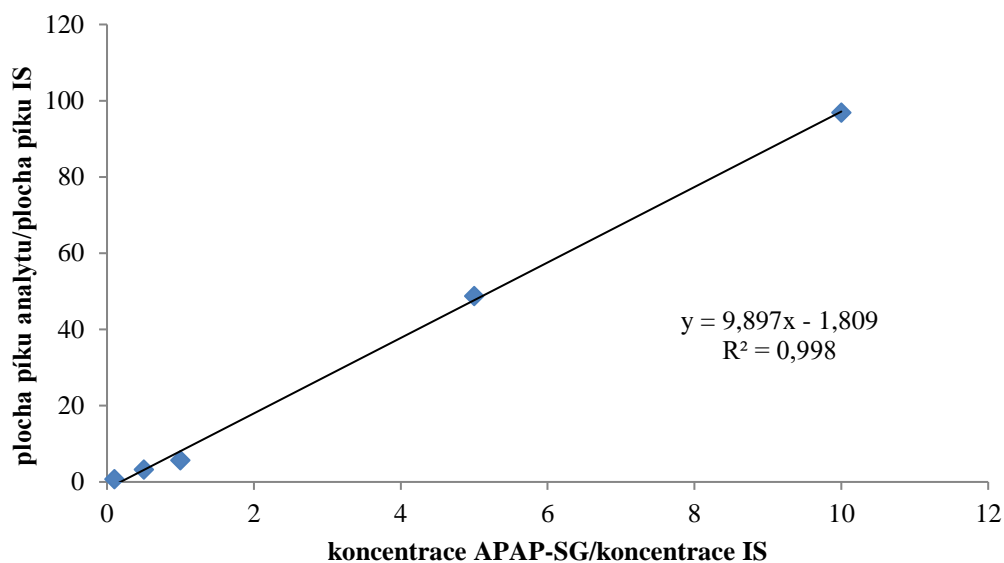
Graf 24: Kalibrační závislost pro APAP-CYS (0,01-1 mg/l) s vnitřním standardem APAP-D₄ (0,1 mg/l) (izokratická eluce, MF: 50 % CH₃CN, 49,9 % H₂O, 0,1 % CH₃COOH (v/v/v); kolona Kinetex C18, 100 × 3 mm, 2,6 μm)



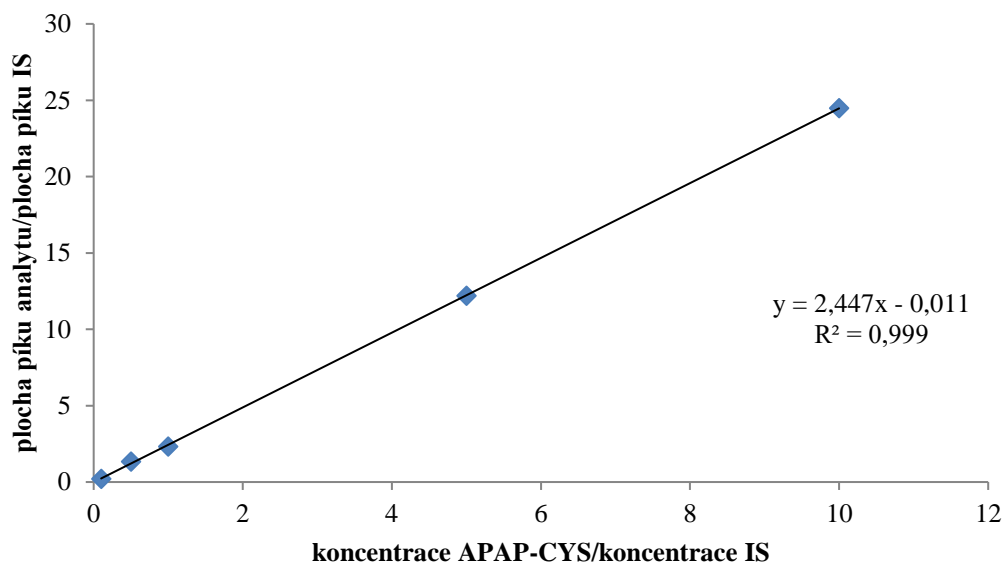
Graf 25: Kalibrační závislost pro APAP-NAC (0,01-1 mg/l) s vnitřním standardem APAP-D₄ (0,1 mg/l) (izokratická eluce, MF: 50 % CH₃CN, 49,9 % H₂O, 0,1 % CH₃COOH (v/v/v); kolona Kinetex C18, 100 × 3 mm, 2,6 μm)



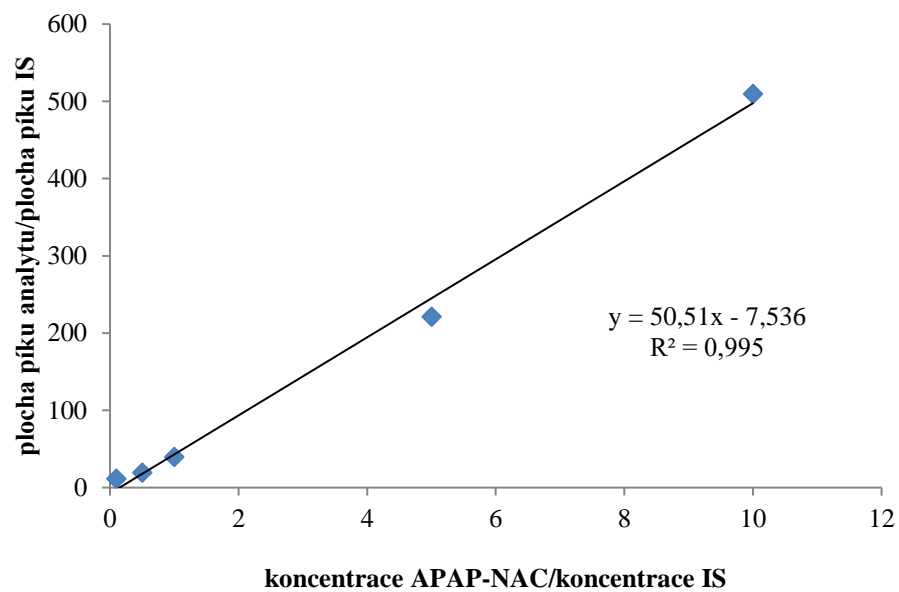
Graf 26: Kalibrační závislost pro APAP (0,01-1 mg/l) s vnitřním standardem APAP-D₄ (0,1 mg/l) (gradientová eluce, gradientový profil uveden v tabulce č. 3; kolona Kinetex C18, 100 × 3 mm, 2,6 μm)



Graf 27: Kalibrační závislost pro APAP-SG (0,01-1 mg/l) s vnitřním standardem APAP-D₄ (0,1 mg/l) (gradientová eluce, gradientový profil uveden v tabulce č. 3; kolona Kinetex C18, 100 × 3 mm, 2,6 μm)



Graf 28: Kalibrační závislost pro APAP-CYS (0,01-1 mg/l) s vnitřním standardem APAP-D₄ (0,1 mg/l) (gradientová eluce, gradientový profil uveden v tabulce č. 3; kolona Kinetex C18, 100 × 3 mm, 2,6 μm)



Graf 29: Kalibrační závislost pro APAP-NAC (0,01-1 mg/l) s vnitřním standardem APAP-D₄ (0,1 mg/l) (gradientová eluce, gradientový profil uveden v tabulce č. 3; kolona Kinetex C18, 100 × 3 mm, 2,6 μm)

5. DISKUZE

Pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů bylo v literatuře popsáno již velké množství metod včetně UV spektrofotometrie, imunologických analýz, voltametrie, kapalinové chromatografie, plynové chromatografie, chromatografie na tenké vrstvě a kapilární elektroforézy. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí je bezpochyby tou nejpoužívanější. Problém může v tomto případě činit analýza několika metabolitů zároveň vzhledem k jejich podobným strukturám a fyzikálně chemickým vlastnostem. Lepší volbou je tak detekce pomocí hmotnostní spektrometrie. Vhodná metoda umožňující současné stanovení paracetamolu a jeho metabolitů je potřebná pro studie týkající se metabolismu paracetamolu (Hye *et al.* 2012, Goyal *et al.* 2010)

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat stanovení paracetamolu a jeho tří metabolitů, konjugátu paracetamolu s glutathionem, cysteinem a *N*-acetyl-L-cysteinem, pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí (HPLC/UV) a také pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Součástí této práce byla také purifikace již zmiňovaných metabolitů pomocí preparativní kapalinové chromatografie.

Pro purifikaci metabolitů paracetamolu pomocí preparativní kapalinové chromatografie byla jako mobilní fáze použita směs vody, methanolu a kyseliny octové. Obsah methanolu v mobilní fázi byl postupně upravován stejně jako množství dávkovaného vzorku. Příliš nízký obsah methanolu prodlužoval dobu separace a při zvýšeném obsahu methanolu nedošlo k separaci daného metabolitu od paracetamolu. Pro purifikaci cysteinového konjugátu paracetamolu byla jako optimální zvolena mobilní fáze obsahující 8 % (v/v) methanolu a 1 % (v/v) kyseliny octové a objem dávkovaného vzorku 1 ml. Při zvýšeném objemu dávkovaného vzorku nebyla separace dokonalá. Pro purifikaci konjugátu paracetamolu s glutathionem a *N*-acetyl-L-cysteinem byla zvolena mobilní fáze obsahující 12 % (v/v) methanolu, 1 % (v/v) kyseliny octové a objem dávkovaného vzorku 2 ml. Dávkování vyššího množství vzorku nebylo možné vzhledem ke smyčce o objemu 2 ml. Z původního množství dávkovaného vzorku jsme při průtoku 15 ml/min získali frakce, které měly mnohonásobně vyšší objem. Získané frakce obsahující cílové metabolity tak bylo nutné odpařit a vysušit v exsikátoru. Purifikované metabolity byly po ověření čistoty pomocí LC-MS/MS dále využity pro přípravu kalibračních roztoků.

Pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů existuje velké množství variant HPLC (Di Girolamo *et al.* 1998). V rámci optimalizace metody ke stanovení paracetamolu a jeho metabolitů pomocí HPLC/UV byl nejprve analyzován samotný paracetamol. Stanovení bylo provedeno na dvou HPLC systémech a dvou kolonách lišících se délkou a velikostí částic. Stanovení paracetamolu pomocí HPLC/UV systému č.1 s autosamplerem a dvěma pumpami nám umožnilo analyzovat nižší koncentrace paracetamolu s využitím izokratické i gradientové eluce na rozdíl od HPLC/UV systému č. 2 s jednou pumpou, kde byla provedena pouze izokratická eluce. HPLC/UV systém č. 2 totiž neumožňuje lineární změnu složení mobilní fáze v rámci analytické chromatografie a nebylo tak možné provést stanovení pomocí gradientové eluce. Při vzájemném porovnání obou systémů na základě statistických parametrů (příloha č. 1 a 2) lze s jistotou říci, že stanovení paracetamolu bylo přesnější s využitím HPLC systému č. 1. Ze statistických parametrů je dále zřejmé, že v obou případech bylo dosaženo lepších hodnot s využitím izokratické eluce a kolony Ascentis Express, 150 × 3 mm obsahující 5 μm částice silikagelu s C18. Paracetamol (+ jeho metabolity) byl po separaci spektrofotometricky detekován při vlnové délce 254 nm. Stejný způsob detekce ve své publikaci uvádí i autoři Soysa *et al.* (2010).

Dále bylo provedeno současné stanovení paracetamolu, konjugátu paracetamolu s glutathionem, cysteinem a *N*-acetyl-L-cysteinem pomocí HPLC/UV systému č. 3. Mobilní fáze byla v tomto případě okyselena přidavkem kyseliny octové. Okyselení mobilní fáze kyselinou octovou pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů ve své práci z roku 2003 využili i autoři Vertzoni *et al.* Přídavek kyseliny octové měl zabránit chvostování píků. Ke stanovení byla využita izokratická i gradientová eluce. V průběhu izokratické eluce ovšem nedošlo k separaci jednotlivých analytů a nebyla tak možná jejich kvantifikace. V rámci stanovení s využitím gradientové eluce tak byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti. Mez detekce pro paracetamol při stanovení pomocí HPLC/UV systému č. 3 byla vypočtena na hodnotu 0,05 mg/l a mez stanovitelnosti na hodnotu 0,15 mg/l. V porovnání s mezemi detekce, které byly uvedeny v pracích jiných autorů (Soysa *et al.* 2010, Vertzoni *et al.* 2013) je námi vypočtená mez detekce nižší. Meze detekce pro APAP-SG, APAP-CYS a APAP-NAC byly vypočteny na hodnoty 0,21; 0,07; 0,13 mg/l. Meze stanovitelnosti byly vypočteny pro tyto metabolity ve stejném pořadí na hodnoty 0,70; 0,24; 0,42 mg/l.

S využitím HPLC/UV systému č. 3 byla také hodnocena stabilita paracetamolu a jeho metabolitů v roztoku obsahujícím 12 % (v/v) methanolu a 1 % (v/v) kyseliny octové. Stabilita byla hodnocena v průběhu 9 dnů. V rámci tohoto krátkodobého hodnocení nebyla zjištěna žádná výrazná nestabilita ani jednoho z analytů. Pro ověření stability by bylo vhodné měření

opakovat v průběhu delšího časového rozmezí. Otázkou stability jiného metabolitu paracetamolu (*N*-acetyl-*p*-benzochinon iminu) se ve své studii zabývali autoři Dahlin *et al.* 1982. Tito autoři prokázali nestabilitu *N*-acetyl-*p*-benzochinoniminu a identifikovali i jednotlivé sloučeniny v rozkladné směsi.

Dalším cílem bylo optimalizovat stanovení paracetamolu, konjugátu paracetamolu s glutathionem, cysteinem a *N*-acetyl-L-cysteinem pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Při tomto stanovení se vycházelo z odborné práce týkající se stanovení paracetamolu a jeho glutathionového a cysteinového konjugátu (Česla *et al.* 2013). Zpočátku byl analyzován samotný paracetamol (stejně jako v případě optimalizace stanovení pomocí HPLC/UV). Stanovení bylo provedeno na dvou kolonách lišících se délkou a velikostí částic s využitím izokratické i gradientové eluce. Ze statistických parametrů (příloha č. 4) vyplývá, že nejlepší volbou bylo stanovení s využitím izokratické eluce na koloně Ascentis Express, 150 × 3 mm obsahující 5 µm částice silikagelu s C18. Standardní chyba pro směrnici (a) i úsek (b) získaných z kalibrace, která byla sestrojena jako závislost plochy píku na koncentraci, byla v tomto případě nejnižší.

Následně bylo provedeno současné stanovení paracetamolu a jeho metabolitů pomocí LC-MS/MS. Mobilní fáze byla na rozdíl od předchozího stanovení okyselena přidávkem kyseliny octové. Byla provedena izokratická i gradientová eluce. V rámci tohoto stanovení byly vypočteny meze detekce a meze stanovitelnosti pro všechny čtyři analyty (tabulka č. 17). Meze detekce a meze stanovitelnosti byly nižší pro stanovení s využitím izokratické eluce. Meze stanovitelnosti pro izokratickou eluci byly následně porovnány s mezemi stanovitelnosti uvedenými v publikaci autorů Hye *et al.* z roku 2012. Námi získaná mez stanovitelnosti pro paracetamol a konjugáty paracetamolu s glutathionem a cysteinem byla nižší. V případě konjugátu paracetamolu s *N*-acetyl-L-cysteinem byla námi vypočtená mez stanovitelnosti srovnatelná s mezí stanovitelnosti uvedenou v této publikaci (10 µg/l).

Meze detekce při stanovení pomocí LC-MS/MS byly řádově nižší než meze detekce při stanovení pomocí HPLC/UV. Dále byly porovnány meze detekce získané při stanovení pomocí LC-MS/MS s mezemi detekce uvedenými v literatuře při stanovení pomocí kapilární elektroforézy (Cunha *et al.* 2017, Hložek *et al.* 2017, Tanuja *et al.* 2017). Námi dosažené meze detekce při stanovení pomocí LC-MS/MS byly opět nižší.

6. ZÁVĚR

V této práci byla optimalizována metoda ke stanovení paracetamolu a jeho konjugátu s glutathionem, cysteinem a *N*-acetyl-L-cysteinem pomocí HPLC/UV a LC-MS/MS. Dále byla provedena purifikace těchto tří konjugátů pomocí preparativní kapalinové chromatografie. Purifikované konjugáty byly využity pro přípravu kalibračních roztoků.

Námi získané meze detekce a meze stanovitelnosti při stanovení pomocí HPLC/UV byly řádově v mg/l a při stanovení pomocí LC-MS/MS řádově v $\mu\text{g/l}$. Stanovení s využitím izokratické eluce bylo v porovnání se stanovením s využitím gradientové eluce v obou případech přesnější a bylo dosaženo nižších hodnot mezí detekce a stanovitelnosti.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. ABBOTT, F. V. a K. G. C. HELLEMANS. Phenacetin, acetaminophen a dipyrrone: analgesic and rewarding effects. *Behavioural Brain Research*. 2000, 112(1), 177–186.
2. ACHEAMPONG, A., W. O. GYASI, G. DARKO, J. APAU a S. A. ARHIN. Validated RP-HPLC method for simultaneous determination and quantification of chlorpheniramine maleate, paracetamol and caffeine in tablet formulation. *SpringerPlus*. 2016, 5(1), 1–8.
3. ALI, N. W., M. GAMAL a M. ABDELKAWY. Simultaneous determination of hyoscine N-butyl bromide and paracetamol in their binary mixture by RP-HPLC method. *Arabian Journal of Chemistry*. 2013, 10(2), 1868–1874.
8. ANDERSON, B. J. Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. *Pediatric Anesthesia*. 2008, 18(1), 915–921.
9. BABU, G. R., A. L. RAO a J. V. RAO. Bioanalytical method development and validation for simultaneous estimation of paracetamol and cefixime by using RP-HPLC in rabbit plasma. *Oriental Journal of Chemistry*. 2016, 32(1), 701–707.
10. BERTOLINI, A., A. FERRARI, A. OTTANI, S. GUERZONI, R. TACCHI a S. LEONE. Paracetamol: New vistas of an old drug. *CNS Drug Reviews*. 2006, 12(3), 250–275.
11. BRUNE, K., A. PAHL, N. SCHEUREN, H. BANG a T. MU. Modulation of transcription factor NF-kappaB by enantiomers of the nonsteroidal drug ibuprofen. *British Journal of Pharmacology*. 1998, 123(4), 645–652.
12. BUSHRA, R. a N. ASLAM. An overview of clinical pharmacology of Ibuprofen. *Oman Medical Journal*. 2010, 25(3), 155–161.
13. CAMPOS, C., R. D. GREGORIO, R. GARCIA-NIETO a F. GAGO. Regulation of cyclooxygenase activity by metamizol. *European Journal of Pharmacology*. 1999, 378(3), 339–347.
14. CUNHA, R. R., M. M. A. C. RIBEIRO, R. A. A. MUÑOZ a E. M. RICHTER. Fast determination of codeine, orphenadrine, promethazine, scopolamine, tramadol, and paracetamol in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*. 2017, 40(8), 1815–1823.
15. ČESLA, P., T. ROUŠAR, E. NÝDLOVÁ, M. VRBOVÁ, L. ČESLOVÁ a J. FISCHER. Development of LC/MS/MS method for determination of acetaminophen metabolites. *Chemické Listy*. 2013, 107(3), 348–350.
16. DAHLIN, D. C., G. T. MIWA, A. Y. H. LU a S. D. NELSON. Synthesis, decomposition, kinetics and preliminary toxicological studies of pure *N*-Acetyl-*p*-benzoquinone imine, a

- proposed toxic metabolite of acetaminophen. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1982, 25(8),1981–1982.
17. DI GIROLAMO, A., W. M. O'NEILL a I. W. WAINER. A validated method for the determination of paracetamol and its glucuronide and sulphate metabolites in the urine of HIV + / AIDS patients using wavelength-switching UV. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1998, 17(6),1191–1197.
 18. EJAZ, A. a S. JEON. A highly stable and sensitive GO-XDA-Mn₂O₃ electrochemical sensor for simultaneous electrooxidation of paracetamol and ascorbic acid. *Electrochimica Acta*. 2017, 245(1), 742–751.
 19. FARID, N. F. a E. A. ABDELALHEEM. HPTLC method for the determination of Paracetamol, Pseudoephedrine and Loratidine in tablets and human plasma. *Journal of Chromatographic Science*. 2016, 54(4), 647–652.
 20. FIORUCCI, S. a P. D. SOLDATO. NO-aspirin: mechanism of action and gastrointestinal safety. *Digestive and Liver Disease*. 2003, 35(2), 9–19.
 21. FLINT, R. B., P. MIAN, B. V. D. NAGEL, N. SLIJKHUIS a B. C. P. KOCH. Quantification of acetaminophen and its metabolites in plasma using UPLC-MS: doors open to therapeutic drug monitoring in special patient populations. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2017, 39(2), 164–171.
 22. GALANO, A. a R. CASTAÑEDA-ARRIAGA. Exploring chemical routes relevant to the toxicity of paracetamol and its meta-analogue at a molecular level. *Chemical Research in Toxicology*. 2017, 30(6), 1286–1301.
 23. GOMEZ, C. F., L. CONSTANTINE, M. MOEN, A. VAZ, W. WANG a D. B.HUGGETT. Ibuprofen metabolism in the liver and gill of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2011, 86(3), 247–251.
 24. GONÇALVES, G., E. V. DIAS, J. M. TEIXEIRA, M. CAROLINA, P. ATHIE, I. JOSÉ, M. BONET, C. H. TAMBELI a C. AMILCAR. The analgesic effect of dipyron in peripheral tissue involves two different mechanisms: Neuronal K_{ATP} channel opening and CB₁ receptor activation. *European Journal of Pharmacology*. 2014, 741(1), 124–131.
 25. GOYAL, R. N., V. K. GUPTA a S. CHATTERJEE. Chemical voltammetric biosensors for the determination of paracetamol at carbon nanotube modified pyrolytic graphite electrode. *Sensors & Actuators*. 2010, 149(1), 252–258.
 26. GRAHAM, G. G, M.J. DAVIES, R. O. DAY, A. MOHAMUDALLY a K. F. SCOTT. The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action,

- metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology*. 2013, 21(3), 201–232.
27. HAIRIN, T., A. R. MARZILAWATI, E. M. H. DIDI, S. MAHADEVA, Y. K. LEE, N. ABD. RAHMAN, A. M. MUSTAFA a Z. CHIK. Quantitative LC/MS/MS analysis of acetaminophen–cysteine adducts (APAP-CYS) and its application in acetaminophen overdose patients. *Analytical Methods*. 2013, 5 (8),1955–1964.
28. HAMMAN, M. A., G. A. THOMPSON a S. D. HALL. Regioselective and stereoselective metabolism of ibuprofen by human cytochrome P450 2C. *Biochemical Pharmacology*. 1997, 54(1), 33–41.
29. HEITMEIER, S. a G. BLASCHKE. Direct determination of paracetamol and its metabolites in urine and serum by capillary electrophoresis with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography B*. 1999, 721(1), 93–108.
30. HLOŽEK, T., M. BURSOVÁ, P. COUFAL a R. CABALA. Quantification of paracetamol and 5-oxoproline in serum by capillary electrophoresis: Implication for clinical toxicology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017, 145(1), 616–620.
31. HODGMAN, M. J. a A. R. GARRARD. A review of acetaminophen poisoning. *Critical Care Clinics*. 2012, 28(4), 499–516.
32. HYE, J., H. J. LEE a B. H. JUNG. Quantitative analysis of acetaminophen and its six metabolites in rat plasma using liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 2012, 26(12), 1596–1604.
33. CHEN, W., L. L. KOENIGS, S. J. THOMPSON, R. M. PETER, A. E. RETTIE, W. F. TRAGER a S. D. NELSON. Oxidation of acetaminophen to its toxic quinone imine and nontoxic catechol metabolites by Baculovirus-expressed and purified human cytochromes P450 2E1 and 2A6. *Chemical Research in Toxicology*. 1998, 11(4), 295–301.
34. INGELMAN-SUNDBERG M., H. KAUR, Y. TERELIUS, J. PERSSON a B. HALLIWELL. Hydroxylation of salicylate by microsomal fractions and cytochrome P-450. *Biochemical Journal*.1991, 276(3), 753–757.
35. JACK, A., A. B. REID, S. S. MCCULLOUGH a P. LAURA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of metabolic activation, reactive oxygen / nitrogen species and mitochondrial permeability transition. *Drug Metabolism Reviews*. 2004, 36(3), 805–822.
36. JAESCHKE, H., T. R. KNIGHT a M. L. BAJT. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology Letters*.2003, 144(3), 279–288.

37. JAMES L. P., P. R. MAYEUX a J. A. HINSON. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metabolism and Disposition*. 2003, 31(12), 1499–1506.
38. JASIECKA, A., T. MAŚLANKA a J. J. JAROSZEWSKI. Pharmacological characteristics of metamizole. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2014, 17(1), 207–214.
39. JOS, G. M. a P. E. NICO. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanism, analogues and protective approaches. *Critical Reviews in Toxicology*. 2001, 31(1), 55–138.
40. KUČERA, O., T. ROUŠAR, P. STAŇKOVÁ, L. HAŇÁČKOVÁ, H. LOTKOVÁ, M. PODHOLA A Z. ČERVINKOVÁ. Susceptibility of rat non-alcoholic fatty liver to the acute toxic effect of acetaminophen. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2012, 27(2), 323–330.
41. LANCASTER, E. M., J. R. HIATT a A. ZARRINPAR. Acetaminophen hepatotoxicity: an updated review. *Archives of Toxicology*. 2015, 89(2), 193–199.
42. LARSON, A. M., J. POLSON, R. J. FONTANA, T. J. DAVERN, E. LALANI, L. S. HYNAN, J. S. REISCH, F. V. SCHIØDT, G. OSTAPOWICZ, A. O. SHAKIL a W. M. LEE. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of United States multicenter, prospective study. *Hepatology*. 2003, 42(6), 1364–1372.
43. LAU, G. S. N. a J. A. J. H. CRITCHLEY. The estimation of paracetamol and its major metabolites in both plasma and urine by a single high-performance liquid chromatography assay. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1994, 12(12), 1563–1572.
44. LÜLLMANN, H., K. MOHR a M. WEHLING. *Farmakologie a toxikologie*. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0836-1.
45. MAHMOUD, B. G., M. KHAIRY, F. A. RASHWAN a C. E. BANKS. Simultaneous voltammetric determination of acetaminophen and isoniazid (hepatotoxicity-related drugs) utilizing bismuth oxide nanorod modified screen-printed electrochemical sensing platforms. *Analytical Chemistry*. 2017, 89(3), 2170–2178.
46. MALVAR, D. C., D. M. SOARES, A. S. C. FABRÍCIO, A. KANASHIRO, R. R. MACHADO, M. J. FIGUEIREDO, G. A. RAE a G. E. P. SOUZA. The antipyretic effect of dipyron is unrelated to inhibition of PGE (2) synthesis in the hypothalamus. *British Journal of Pharmacology*. 2010, 162(6), 1401–1409.
47. MANCINI, F., C. LANDOLFI, M. MUZIO, L. AQUILINI, L. SOLDI, I. COLETTA, A. GUGLIELMOTTI, A. MANTOVANI, M. PINZA a C. MILANESE. Acetaminophen down-regulates interleukin-1beta-induced nuclear factor-kappaB nuclear translocation in a human astrocytic cell line. *Neuroscience Letters*. 2003, 353(2), 79–82.

48. MARZUILLO, P., S. GUARINO a E. BARBI. Paracetamol: a focus for the general pediatrician. *European Journal of Pediatrics*. 2014, 173(4), 415–425.
49. MAZER, M. a J. PERRONE. Acetaminophen-induced nephrotoxicity: pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Toxicology Investigations*. 2008, 4(1), 2–6.
50. MCGILL M. R. a H. JAESCHKE. Recent advances in relation to hepatotoxicity and Diagnosis. *Pharmaceutical Research*. 2014, 30(9), 2174–2187.
51. MCGILL, M. R., M. R. SHARPE, C. D. WILLIAMS, M. TAHA, S. C. CURRY a H. JAESCHKE. The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012, 122(4), 1574–1583.
52. MORIARTY, C. a W. CARROLL. Paracetamol: pharmacology, prescribing and controversies. *Archives of Disease in Childhood. Educacion and Practise Edition*. 2016, 101(6), 331–334.
53. NAEEMY, A., A. MOHAMMADI a N. ASSI. Voltammetric determination of Paracetamol at NiO nanoparticles-modified carbon paste electrode in bulk and tablet dosage forms. *Journal of Analytical Chemistry*. 2017, 72(7), 783–792.
54. NÝDLOVÁ, E., M. VRBOVÁ, P. ČESLA, B. JANKOVIČOVÁ, K. VENTURA a T. ROUŠAR. Comparison of inhibitory effects between acetaminophen–glutathione conjugate and reduced glutathione in human glutathione reductase. *Journal of Applied Toxicology*. 2014, 34(9), 968–973.
55. PATTEN, C. J., P. E. THOMAS, R. L. GUY, M. LEE, F. J. GONZALEZ, S. F. P. GUENGERICH a C. S. YANG. Cytochrome P450 enzymes involved in acetaminophen activation by rat and human liver microsomes and their kinetics. *Chemical Research in Toxicology*. 1993, 6(4), 511–518.
56. PEREZ-RUIZ, T., C. MARTINEZ-LOZANO, V. TOMAS, R. GALERA. Migration behaviour and separation of acetaminophen and *p*-aminophenol in capillary zone electrophoresis: Analysis of drugs based on acetaminophen. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005, 38(1), s. 87–93.
57. PIERRE, S. C., R. SCHMIDT, C. BRENNEIS, M. MICHAELIS, G. GEISSLINGER a K. SCHOLICH. Inhibition of cyclooxygenases by Dipyrone. *British Journal of Pharmacology*. 2007, 151(4), 494–503.
58. POTTER, D.W. a J. A. HINSON. Mechanisms of acetaminophen oxidation to *N*-Acetyl-*p*-benzoquinone imine by horseradish peroxidase and cytochrome P-450. *The Journal of Biological Chemistry*. 1987, 262(3), 966–973.

59. PRESCOTT, L. F. Kinetics and metabolism of Paracetamol and Phenacetin. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1980, 10(2), 291–298.
60. ROGOSCH, T., C. SINNING, A. PODLEWSKI, B. WATZER, J. SCHLOSBERG, A. H. LICHTMAN, M. G. CASCIO, T. BISOGNO, V. DI, R. NÜSING a P. IMMING. Novel bioactive metabolites of dipyron (metamizol). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2012, 20(1), 101–107.
61. ROUŠAR, T., P. PAŘÍK, O. KUČERA, M. BARTOŠ a Z. ČERVINKOVÁ. Glutathione reductase is inhibited by acetaminophen-glutathione conjugate in vitro. *Physiological Research*. 2010, 59(2), 225–232.
62. SEDGEMAN, C. A., L. D. NAGY a F. P. GUENGERICH. Aromatic hydroxylation of salicylic acid and aspirin by human cytochromes P450. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015, 73(1), 49–56.
63. SOYSA, P. a S. KOLAMBAGE. Rapid HPLC / UV method for analysis of urinary and plasma / serum paracetamol concentrations. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*. 2010, 38(2), 131–137.
64. STERN, S. T., M. K. BRUNO, R. A. HORTON, D. W. HILL, J. C. ROBERTS a S. D. COHEN. Contribution of acetaminophen-cysteine to acetaminophen nephrotoxicity II. Possible involvement of the γ -glutamyl cycle. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005, 202(2), 160–171.
65. STRATMAN, N. C., D. B. CARTER a V. H. SETHY. Ibuprofen: effect on inducible nitric oxide synthase. *Molecular Brain Research*. 1997, 50(1-2), 107–112.
66. SZUKIEWICZ, D., M. WOJCIECHOWSKA a A. BILSKA. Aspirin action in endothelial cells: different patterns of response between chemokine CX3CL1/CX3CR1 and TNF- α /TNFR1 signaling pathways. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2015, 29(3), 219–229.
67. TAN, S. C., B. K. PATEL, S. H. D. JACKSON, C. G. SWIFT a A. J. HUTT. Stereoselectivity of ibuprofen metabolism and pharmacokinetics following the administration of the racemate to healthy volunteers. *Xenobiotica*. 2002, 32(8), 683–698.
68. TANUJA, S. B., B. E. K. SWAMY a K. V. PAI. Electrochemical determination of paracetamol in presence of folic acid at nevirapine modified carbon paste electrode: A cyclic voltammetric study. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2017, 798(2), 17–23.
69. TONOLI, D., E. VARESIO a G. HOPFGARTNER. Quantification of acetaminophen and two of its metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography – low and high resolution tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2012, 904(1), 42–50.

70. TOUSSAINT K., X. C. YANG, M. A. ZIELINSKI, K. L. REIGLE, S. D. SACAVAGE, S. NAGAR aR. B. RAFFA. What do we (not) know about how paracetamol (acetaminophen) works? *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2010, 35(6), 617–638.
71. VERTZONI, M. V., H. A. ARCHONTAKI a P. GALANOPOULOU. Development and optimization of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of acetaminophen and its major metabolites in rabbit plasma and urine after a toxic dose. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003, 42(3), 487–493.
72. VRBOVÁ, M., E. ROUŠAROVÁ, L. BRŮČKOVÁ, P. ČESLA a T. ROUŠAR. Characterization of acetaminophen toxicity in human kidney HK-2 cells. *Physiological Research*. 2016, 65(4), s. 627–635.
73. ZAHER, H., J. T. M. BUTERS, J. M. WARD, M. K. BRUNO, A. M. LUCAS, S. T. STERN, S. D. COHEN a F. J. GONZALEZ. Protection against acetaminophen toxicity in CYP1A2 and CYP2E1 double-null mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1998, 152(1), 193–199.
74. ZHAO, S., W. BAI, H. YUAN a D. XIAO. Detection of paracetamol by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta*. 2006, 559(2), 195–199.
75. ZHU, T., L. DING, X. GUO, L. YANG a A. WEN. Simultaneous determination of tramadol and acetaminophen in human plasma by LC–ESI–MS. *Chromatographia*. 2007, 66(3), 171–178.