

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Mikrokolonová a kapilární chromatografie oxidačních metabolitů acetaminofenu

Bc. Michaela Košnářová

Diplomová práce

2024

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela Košnářová**
Osobní číslo: **C22290**
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**
Téma práce: **Mikrokolonová a kapilární chromatografie oxidačních metabolitů acetaminofenu**
Téma práce anglicky: **Microcolumn and capillary chromatography of acetaminophen oxidation metabolites**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

- V teoretické části popište techniky mikrokolonové a kapilární chromatografie, zaměřte se na rozdíly oproti chromatografii na konvenčních kolonách. Zpracujte formou literární rešerše práce zabývající se separacemi metabolitů oxidační dráhy acetaminofenu (paracetamolu).
- V miniaturizovaném systému kapalinového chromatografu otestujte vybrané kolony vhodné pro separaci metabolitů acetaminofenu. Proměřte a sestavte retenční modely na základě gradientových retenčních dat a optimalizujte gradientový profil pro separaci metabolitů.
- Získaná experimentální data kriticky zhodnoťte a diskutujte.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**
Katedra analytické chemie
Konzultant diplomové práce: **Ing. Mgr. Miroslav Kubát**
Katedra analytické chemie
Datum zadání diplomové práce: **7. února 2024**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Mikrokolonová a kapilární chromatografie oxidačních metabolitů acetaminofenu 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

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

V Pardubicích dne 9. 5. 2024

Bc. Michaela Košnářová v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla vyjádřit poděkování vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a cenné rady během jejího vytváření. Dále bych chtěla poděkovat také svému konzultantovi Ing. Mgr. Miroslavu Kubátovi za jeho vstřícnost, trpělivost a poskytnutí pomoci při řešení problémů spojených s diplomovou prací. Díky patří také mé rodině a přátelům.

ANOTACE

Tato diplomová práce je zaměřena na mikrokolonovou a kapilární chromatografii oxidačních metabolitů acetaminofenu. Teoretická část se nejprve zabývá samotným acetaminofenem, především jeho metabolismem a toxicitou, druhá část se pak věnuje vysokoúčinné kapalinové chromatografii, konkrétně mikrokolonové chromatografii a metodám stanovení acetaminofenu a jeho metabolitů. Cíle experimentální práce spočívaly v otestování vybraných kolon vhodných pro separaci acetaminofenu a jeho oxidačních metabolitů, proměřit a sestavit retenční modely na základě izokratických a gradientových dat a optimalizovat gradientový profil pro separaci metabolitů.

KLÍČOVÁ SLOVA

acetaminofen, oxidační metabolity acetaminofenu, mikrokolonová chromatografie, izokratická eluce, gradientová eluce

TITLE

Microcolumn and capillary chromatography of acetaminophen oxidation metabolites

ANNOTATION

This diploma thesis focuses on microcolumn and capillary chromatography of acetaminophen oxidation metabolites. The theoretical part first deals with acetaminophen itself, particularly its metabolism and toxicity, while the second part addresses high-performance liquid chromatography, specifically microcolumn chromatography and methods for determining acetaminophen and its metabolites. The experimental goals included testing selected columns suitable for separating acetaminophen and its oxidative metabolites, measuring and constructing retention models based on isocratic and gradient data, and optimizing the gradient profile for metabolite separation.

KEYWORDS

acetaminophen, acetaminophen oxidation metabolites, microcolumn chromatography, isocratic elution, gradient elution

OBSAH

ÚVOD	13
1 TEORETICKÁ ČÁST	14
1.1 Paracetamol.....	14
1.1.1 Mechanismus účinku	14
1.1.2 Metabolismus.....	15
1.1.2.1 Glukuronidace.....	16
1.1.2.2 Sulfatace.....	17
1.1.2.3 Cytochrom P-450.....	17
1.1.2.4 Glutathionace	17
1.1.3 Toxicita	18
1.1.3.1 Fáze otravy.....	18
1.1.3.2 Rizikové faktory	19
1.1.3.3 Léčba.....	20
1.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	21
1.2.1 Chromatografické systémy	22
1.2.2 Mikrokolonová chromatografie	24
1.2.2.1 Instrumentace.....	25
1.2.3 Stanovení metabolitů acetaminofenu.....	27
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
2.1 Chemikálie	30
2.1.1 Standardy	30
2.1.2 Vzorky a úprava vzorků.....	30
2.2 Přístrojové vybavení	30
2.2.1 Kapalinový chromatograf	31
2.2.2 Kolony	31
2.3 Příprava standardů	31

2.4	HPLC analýza	32
2.4.1	Srovnání kolon dle van Deemterových křivek	32
2.4.2	Izokratická eluce	32
2.4.3	Gradientová eluce	32
2.4.4	Stanovení meze detekce a linearity	33
2.4.5	Separace metabolitů acetaminofenu v reálném vzorku	33
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	34
3.1	Srovnání kolon dle van Deemterových křivek	34
3.1.1	Luna® C18(2)	34
3.1.2	Kinetex® XB-C18	36
3.1.3	Ascentis® Express C18	36
3.1.4	Chromolith® CapRod® RP-18e	37
3.2	Izokratická eluce	38
3.3	Gradientová eluce	44
3.4	Stanovení meze detekce a linearity	52
3.5	Separace metabolitů acetaminofenu v reálném vzorku	53
4	ZÁVĚR	56
5	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	57
6	PŘÍLOHY	63

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura acetaminofenu [1].....	14
Obrázek 2: Metabolizace acetaminofenu [10,12].....	16
Obrázek 3: Instrumentace HPLC [27]	22
Obrázek 4: Graf závislosti výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti toku mobilní fáze (85% acetonitril) pro kolonu Luna® C18(2).....	35
Obrázek 5: Graf závislosti výškového ekvivalentu teoretického patra na rychlosti toku mobilní fáze (50 % methanol) pro kolonu Luna® C18(2).....	35
Obrázek 6: Graf závislosti výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti toku mobilní fáze (85 % acetonitril) pro kolonu Kinetex® XB-C18	36
Obrázek 7: Graf závislosti výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti toku mobilní fáze (85 % acetonitril) pro kolonu Ascentis® Express C18.....	37
Obrázek 8: Graf závislosti výškového ekvivalentu výškového patra na lineární rychlosti toku mobilní fáze (85 % acetonitril) pro kolonu Chromolith® CapRod® RP-18e	38
Obrázek 9: Graf závislosti $\log k_i$ na ϕ_{ACN}	40
Obrázek 10: Graf závislosti $\log k_i$ na ϕ_{MeOH}	41
Obrázek 11: Okénkový diagram pro mobilní fázi s acetonitrilem s průtokem 10 $\mu\text{l}/\text{min}$	42
Obrázek 12: Okénkový diagram pro mobilní fázi s methanolem s průtokem 20 $\mu\text{l}/\text{min}$	42
Obrázek 13: Chromatogram standardů v mobilní fázi 10 % acetonitrilu s 0,2 % kyseliny octové s průtokem MF 10 $\mu\text{l}/\text{min}$	43
Obrázek 14: Chromatogram standardů v mobilní fázi 15 % methanolu s 0,2 % kyseliny octové s průtokem MF 20 $\mu\text{l}/\text{min}$	43
Obrázek 15: Graf strmostí gradientů pro mobilní fázi s acetonitrilem s průtokem MF 10 $\mu\text{l}/\text{min}$	44
Obrázek 16: Graf strmostí gradientů pro mobilní fázi s methanolem s průtokem MF 20 $\mu\text{l}/\text{min}$	45
Obrázek 17: Okénkový diagram pro gradientovou eluci v mobilní fázi s acetonitrilem s průtokem MF 10 $\mu\text{l}/\text{min}$	48
Obrázek 18: Okénkový diagram pro gradientovou eluci v mobilní fázi s methanolem s průtokem MF 20 $\mu\text{l}/\text{min}$	48
Obrázek 19: Graf závislosti normalizovaného produktu rozlišení na strmosti gradientu pro mobilní fázi s acetonitrilem s průtokem MF 10 $\mu\text{l}/\text{min}$	49

Obrázek 20: Graf závislosti normalizovaného produktu rozlišení na strmosti gradientu pro mobilní fázi s methanolem s průtokem MF 20 $\mu\text{l}/\text{min}$	49
Obrázek 21: Graf závislosti V_R/V_M na strmosti gradientu pro mobilní fázi s acetonitrilem s průtokem MF 10 $\mu\text{l}/\text{min}$	50
Obrázek 22: Graf závislosti V_R/V_M na strmosti gradientu pro mobilní fázi s methanolem s průtokem MF 20 $\mu\text{l}/\text{min}$	50
Obrázek 23: Chromatogram standardů s gradientem 5 – 45% acetonitrilu v čase 0 – 12 min s průtokem MF 10 $\mu\text{l}/\text{min}$	51
Obrázek 24: Chromatogram standardů s gradientem 5 - 85 % methanolu v čase 0 – 9,3 min s průtokem MF 20 $\mu\text{l}/\text{min}$	51
Obrázek 25: Chromatogram standardů s gradientem 5 - 85 % methanolu v čase 0 - 12 min s průtokem MF 20 $\mu\text{l}/\text{min}$	52
Obrázek 26: Kalibrační křivky pro APAP, APAP-SG, APAP-NAC a APAP-CYS	53
Obrázek 27: Chromatogram vzorku buněčné linie lidských ledvin HK-2 ovlivněné metabolitem APAP-CYS (odběr po 6 h)	54
Obrázek 28: Chromatogram vzorku buněčné linie lidských ledvin HK-2 ovlivněné acetaminofenem (odběr po 24 h)	55
Obrázek 29: Chromatogram vzorku směsi buněčných linií lidských ledvin HK-2 ovlivněné acetaminofenem	55

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Hodnoty parametrů m a a , jejich směrodatné odchylky a koeficient determinace pro mobilní fázi s acetonitrilem	39
Tabulka 2: Hodnoty parametrů m a a , jejich směrodatné odchylky a koeficient determinace pro mobilní fázi s methanolem.....	40
Tabulka 3: Strmosti gradientů v různých časech separace	44
Tabulka 4: Hodnoty směrnice, úseku, koeficientu determinace R^2 , LOD a rozmezí linearity.....	53

SEZNAM ZKRATEK

ACN	acetonitril
ALT	alanin transamináza
AST	aspartát transamináza
APAP	acetaminofen
APAP-CYS	konjugát acetaminofenu s cysteinem
APAP-NAC	konjugát acetaminofenu s N-acetylcysteinem
APAP-SG	konjugát acetaminofenu s glutathionem
COX	cyklooxygenáza
CYP	cytochrom P-450 monooxygenáza
GPC	gelová permeační chromatografie
GSH	glutathion
GST	glutathion-S-transferáza
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC	iontově výměnná chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidáza
NAPQI	N-acetyl-p-benzochinonimin
NP-HPLC	system s normálními fázemi
NSAID	nesteroidní protizánětlivé léky
MS	hmotnostní spektrometrie
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PGHS	prostaglandin H2 syntáza

POX	peroxidáza
RP-HPLC	system s obráčenými fázemi
SULT	sulfotransferáza
UGT	uridindifosfát glukuronosyltransferáza

ÚVOD

Paracetamol je jedním z nejčastěji používaných léků ve většině zemí světa. Předávkování paracetamolem je způsobeno převládající oxidací acetaminofenu, což může vést v závislosti na dávce až k akutnímu selhání jater. V játrech je oxidovaný acetaminofen konjugován s glutathionem, což vytváří konjugát APAP-glutathionu, který je dále metabolizován na konjugát cysteinu a konjugát N-acetylcysteinu. Tyto sloučeniny mohou sloužit k monitorování metabolismu acetaminofenu u pacientů, kteří byli tímto léčivem předávkováni.

Jedním z aktuálních trendů vědy a technologie, zejména v oblasti analytické chemie, je miniaturizace instrumentace. Mikrokolonová LC přináší několik výhod, zejména co se týče nízké spotřeby rozpouštědel, možnosti analyzovat velmi malé množství vzorku a vyšší hmotnostní citlivosti.

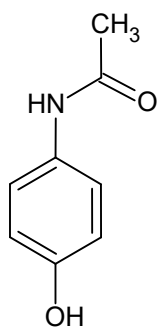
Jedním z cílů této práce bylo otestovat vybrané kolony vhodné pro separaci acetaminofenu a jeho oxidačních metabolitů v miniaturizovaném systému kapalinového chromatografu. Z tohoto důvodu byly vybrané kolony nejprve porovnány podle van Deemterových křivek. Dále byly proměřeny a sestaveny retenční modely na základě izokratických a gradientových retenčních dat. Nakonec byl gradientový profil optimalizován pro separaci acetaminofenu a jeho oxidačních metabolitů.

Teoretická část se zaměřuje na dvě hlavní témata, a to paracetamol a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. První část se zabývá paracetamolem a jeho mechanismem účinku, metabolismu a toxicitě včetně fází otravy, rizikových faktorů a léčby. Druhá část je pak zaměřena na vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, konkrétně na mikrokolonovou chromatografii a její výhody, využití a instrumentaci. Závěr teoretické části byl věnován vybraným metodám stanovení metabolitů acetaminofenu.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Paracetamol

Paracetamol (acetaminofen, N-acetyl-p-aminofenol, APAP) je jedním z nejčastěji používaných léků ve většině zemí světa. V normálních dávkách je bezpečný s ohledem na nežádoucí účinky a interakce s jinými léky dokonce i u pacientů s již existujícím onemocněním jater [1]. Terapeuticky se používá od poloviny 50. let 20. století a stále je hlavním prvkem léčby mírných bolestí a horečky u dětí, těhotných žen, starších dospělých a těch, kteří jsou netolerantní k nesteroidním protizánětlivým lékům (NSAID) [2]. Vyrábí se v různých formách, včetně tablet, kapslí, kapalných přípravků a rektálních čípků [3].



Obrázek 1: Struktura acetaminofenu [1]

1.1.1 Mechanismus účinku

Navzdory popularitě a užívání paracetamolu po mnoho let je jeho mechanismus účinku stále nejasný. V současné době se předpokládá, že paracetamol je vícecestný lék a do jeho analgetického a antipyretického účinku je zapojeno několik metabolických drah. Mechanismus účinku spočívá v inhibici cyklooxygenáz (COX-1, COX-2, COX-3) a zapojení do endokannabinoidního systému a serotoninergních drah [4].

Paracetamol se zdá být inhibítohem prostaglandinu H2 syntázy (PGHS), což je enzym, jehož součástí jsou cyklooxygenázy (COX) a peroxidázy (POX), které společně přeměňují kyselinu arachidonovou na nestabilní prostaglandin PGH₂ [4,5]. Běžná léčba nesteroidními protizánětlivými léky (NSAID) se zaměřuje na inhibici COX-1 a COX-2 v různých poměrech. COX-1 je konstitutivní enzym, který je exprimován v mnoha tkáních, hlavně v žaludeční sliznici a ledvinách. COX-2 projevuje svou aktivitu pouze během probíhající zánětlivé reakce [4]. Velká část výzkumu mechanismu účinku paracetamolu je zaměřena na inhibici COX, protože jeho analgetické a antipyretické účinky jsou podobné aspirinu (archetypu NSAID),

nicméně paracetamol nevykazuje významnou protizánětlivou aktivitu. Je tedy rozumné předpokládat, že i když může mít určitý vliv na enzymy COX, jeho účinek bude odlišný od toho, co je pozorováno u NSAID [6].

V této souvislosti je třeba poznamenat, že pomocí oxidace přispívá COX-2 k metabolismu endokannabinoidů. Paracetamolem způsobená inhibice COX-2 přispívá k rozkladu endokannabinoidů nebo blokáde transportérů endokannabinoidů, a to může vést k lékově indukované analgezií [4].

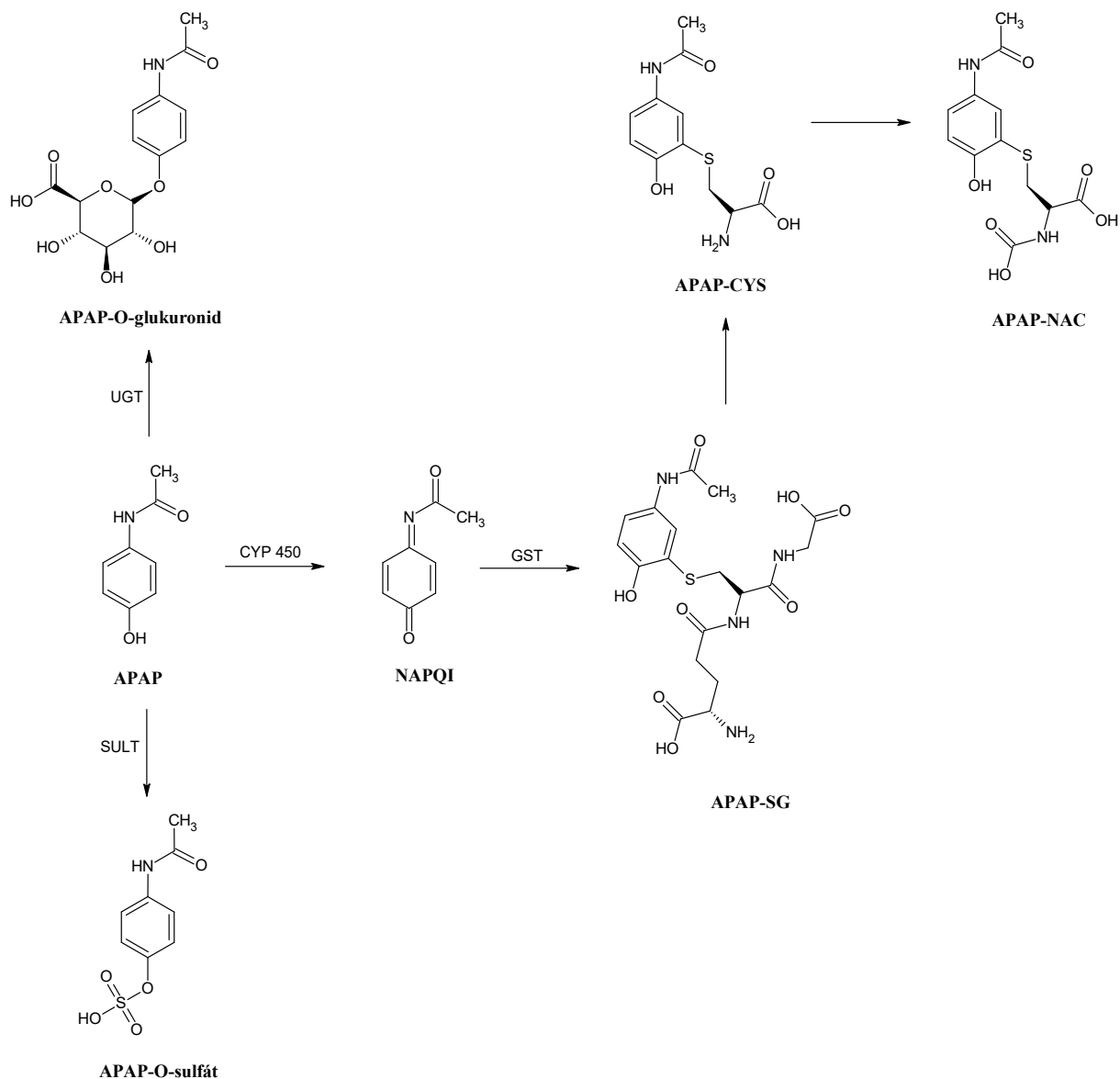
V terapeutickém použití se paracetamol rychle vstřebává a dosahuje terapeutických hladin po 30 minutách a vrcholových koncentrací v plazmě do 2 hodin. Paracetamol s okamžitým uvolňováním lze užívat každých 4-6 hodin a paracetamol s modifikovaným/rozšířeným uvolňováním (MR/ER) každých 8 hodin [3].

1.1.2 Metabolismus

Absorpce acetaminofenu z gastrointestinálního traktu probíhá pasivním transportem, je zanedbatelná z žaludku, ale velmi rychlá z tenkého střeva (dvanáctníku) [7,8]. Rychlost absorpce tedy závisí na rychlosti žaludečního vyprazdňování. Pokud je vyprazdňování žaludku zpožděno např. jídlem, nemocí nebo léky, jako je propanterin a narkotická analgetika, tak se sníží i rychlost absorpce. Acetaminofen je rozsáhle metabolizován a pouze 2 – 5% terapeutické dávky se vylučuje v nezměněné formě močí. Primárně se metabolizuje v játrech enzymy I a II fáze [7,9].

Reakce fáze I mohou probíhat oxidací, redukcí nebo hydrolýzou a vedou k vytvoření polárních metabolitů původních látek a buď k aktivaci nebo k inaktivaci léku. Oxidační reakce typicky zahrnují cytochrom P-450 monooxygenázu (CYP), nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidázu (NADPH) a kyslík [10].

Reakce fáze II, obvykle známé jako konjugace (např. s kyselinou glukuronovou, síranem nebo glutathionem), jsou obvykle detoxikační reakce a zahrnují interakce polárních funkčních skupin (v případě paracetamolu je to fenolová skupina) metabolitů fáze I s konjugovanými skupinami [10,11].



Obrázek 2: Metabolizace acetaminofenu [10,12]

1.1.2.1 Glukuronidace

Glukuronidace je odpovědná za více než 50 % metabolizace paracetamolu [10]. Je katalyzována enzymy uridindifosfát glukuronosyltransferázy (UGT), které jsou umístěny převážně v membránách endoplazmatického retikula v mikrozomech jater [13]. Tyto enzymy přenášejí glukuronosylovou skupinu z kyseliny uridindifosfátglukuronové (UDP-glukuronová kyselina) na cílové molekuly, čímž je činí více rozpustnými ve vodě [8]. Do glukuronidace jsou zapojeny různé UGT a těmi nejvýznamnějšími jsou zřejmě izoformy UGT1A9 a UGT1A6 [14]. Produkty glukuronidace (APAP-O-glukuronidy) jsou neaktivní, netoxické a jsou vylučovány ledvinami [10].

1.1.2.2 Sulfatace

Přibližně 30-44 % podaného paracetamolu je vylučováno močí ve formě síranových konjugátů (APAP-O-sulfát) [10]. Sulfatace je katalyzována enzymy sulfotransferázy (SULT), které obvykle přenášejí sulfátovou skupinu z 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS) na paracetamol [8].

U lidí je známo minimálně 13 izoform SULT. Bylo prokázáno, že SULT1A1 a SULT1A3/4 mohou katalyzovat sulfataci paracetamolu [8]. SULT1A1 se považuje za nejdůležitější SULT při metabolismu xenobiotik a to kvůli její široké preferenci substrátů, vysoké afinitě k mnoha fenolickým sloučeninám a je známá jako fenolová sulfotransferáza, která přednostně katalyzuje sulfataci paracetamolu. Stejně jako produkty glukuronidace, i síranové konjugáty jsou neaktivní a netoxické [10].

1.1.2.3 Cytochrom P-450

Další cesta metabolismu paracetamolu (přibližně 5-10 % z celkové metabolizace) je zprostředkovaná cytochromem P-450 (CYP450). Paracetamol je metabolicky aktivován cytochromem P-450 a vytváří vysoce reaktivní metabolit NAPQI (N-acetyl-p-benzochinonimin), který se kovalentně váže na proteiny. NAPQI je toxický metabolit paracetamolu a vzniká jako oxidační produkt pomocí CYP450 (především CYP2E1 a CYP3A4) a je rychle redukován zpět na paracetamol pomocí NADPH a NADPH-cytochrom P450 reduktázy, což vysvětluje, proč je koncentrace NAPQI v plazmě příliš nízká na detekci [3,10]. NAPQI se vytváří v malém množství při terapeutických dávkách a je snadno detoxikován konjugací s glutathionem [3].

1.1.2.4 Glutathionace

Glutathionace je reakce II fáze, avšak v kontextu s paracetamolem se vyskytuje až po metabolismu I. fáze. Reaktivní metabolit paracetamolu (NAPQI) se může vázat na thiolovou skupinu glutathionu (GSH), a to je klíčovým mechanismem detoxikace. Bylo prokázáno, že reakce NAPQI s GSH probíhá jak spontánně, tak enzymaticky. Enzymatická konjugace GSH je katalyzována skupinou enzymů nazývaných glutathion-S-transferázy (GST) [8].

Konjugát acetaminofenu s glutathionem (APAP-SG) je při transportu z jater do žluči enzymaticky rozkládán na konjugát cysteinu (APAP-CYS), který může být dále acetylován na APAP-N-acetylcystein (APAP-NAC) v ledvinách [12].

1.1.3 Toxicita

Při předávkování dochází k tzv. depleci GSH v důsledku konjugace s NAPQI, což způsobí hromadění přebytečného NAPQI a projevy jeho toxického působení v hepatocytech. To je spojeno s nevratnou hepatocelulární nekrózou, která v závažných případech může vést k nutnosti transplantace jater nebo smrti [15]. NAPQI se váže převážně na cysteinové zbytky v buněčných proteinech a tvoří adukt acetaminofenu s proteiny (APAP-CYS). Tento produkt je detekovatelný v krevním séru několik dní po akutním předávkování a bylo navrženo, že detekce APAP-CYS může sloužit jako diagnostický marker pro toxicitu paracetamolu [16].

Mitochondrie jsou hlavním cílem NAPQI pro tvorbu aduktů. Tvorba reaktivních sloučenin kyslíku způsobuje oxidativní stres v mitochondriích a vede k aktivaci JNK kinázy v cytosolu. Přesun aktivované JNK z cytosolu do mitochondrií vede k dysfunkci mitochondrií, zastavení tvorby ATP a prasknutí mitochondriální membrány a následuje nekróza hepatocytů [3,17].

Doporučené dávkování acetaminofenu u dospělých je 325 – 650 mg perorálně každých 4 – 6 hodin s maximální denní dávkou 4 g/den, doporučená maximální dávka u pacientů se zvýšeným rizikem hepatotoxicity jsou 2 g/den. U dětí je doporučená dávka 10 – 15 mg/kg každých 4 – 6 hodin s maximální denní dávkou 50 – 75 mg/kg [18].

Hepatotoxicitu vyvolává přibližně 12 – 13% akutních předávkování, přičemž u 2 – 5% dochází k selhání jater a 0,2 – 0,5% končí smrtí [3].

1.1.3.1 Fáze otravy

Klinické příznaky toxicity acetaminofenu jsou rozděleny do čtyř fází [19]. Je však důležité mít na paměti, že ačkoli je každá fáze označena časovým rozsahem po nadměrném požití acetaminofenu, klinické symptomy závisí na formě (kombinované přípravky obsahující opiáty a APAP, přípravky s prodlouženým uvolňováním atd.), na dávkách požitého APAP a přítomnosti předchozí jaterní choroby [20].

První fáze, která se vyskytuje v prvních 24 hodinách po požití APAP, je především charakterizována gastrointestinálními symptomy, jako jsou nauzea, zvracení a bolest břicha, dále pak malátností a nadměrným pocením [19].

Druhá fáze obvykle nastává 24-72 hodin po požití a zahrnuje počáteční projevy toxicity jater. Dochází k ústupu symptomů první fáze, ale k nástupu bolesti břicha v pravém horním

kvadrantu a zvýšení hladiny bilirubinu [19]. Začínají se objevovat vyšší hladiny jaterních transamináz, aspartát transaminázy (AST) a alanin transaminázy (ALT) [20].

Ve třetí fázi (72-96 hodin po požití) se symptomy liší podle závažnosti poškození jater. Hladiny AST a ALT dosahují vrcholu a mohou být až 100× vyšší než horní limit normálního rozsahu. Tato fáze má nejvyšší riziko úmrtnosti, která je nejčastěji způsobena multiorgánovým selháním [19,20].

Pacienti, kteří přežijí hepatotoxicitu třetí fáze, postupují do poslední, čtvrté fáze rekonvalescence, která může trvat až 2 týdny po požití. Během čtvrté fáze ustupují klinické symptomy a hladiny jaterních transamináz se vrací k normálu [19].

1.1.3.2 Rizikové faktory

Existuje řada faktorů ovlivňující riziko vývoje hepatotoxicity po akutním předávkování. Podvýživa a hladovění zvyšují riziko hepatotoxicity snížením zásob glutathionu [18].

Hepatotoxicita paracetamolu je ovlivněna věkem pacientů. Obecně platí, že mladší pacienti jsou schopni lépe překonat akutní selhání jater v důsledku hepatotoxicity paracetamolu, pravděpodobně kvůli většímu množství jaterních buněk, jejich zlepšené regeneraci a také díky větší schopnosti těchto buněk metabolizovat látky bezpečně. Pacienti starší 40 let, kteří se předávkují paracetamolem, mají vyšší riziko akutního selhání jater, transplantace jater a úmrtí [20].

Dále pak bylo se zvyšováním hepatotoxicity spojeno mnoho léků. Mezi ně patří antiepileptika (fenytoin, karbamazepin), antibiotika (izoniazid, rifampicin), antivirotika (zidovudin), urikosurika a lansoprazol. Mechanismy zodpovědné za zvýšenou hepatotoxicitu jsou různé a zahrnují indukci enzymů cytochromu P-450 (fenytoin), snížení zásob glutathionu (zidovudin) a snížení glukuronidace (fenytoin) [21].

Konzumace alkoholu je dalším známým rizikovým faktorem hepatotoxicity. Způsob, jakým je alkohol konzumován, má významný vliv na to, kdo může či nemusí utrpět hepatotoxicitu spojenou s acetaminofenem. Dlouhodobá konzumace alkoholu zvyšuje hepatotoxicitu paracetamolu tím, že zvyšuje syntézu a aktivitu CYP2E1 a snižuje zásoby a syntézu glutathionu, což vede k rozvoji nekrózy jater. Akutní příjem alkoholu však může sloužit jako obranný mechanismus proti hepatotoxicitě paracetamolu. Mechanismem je pravděpodobně konkurenční využívání substrátu CYP2E1 ethanol, což vede ke snížení tvorby NAPQI. Další navržená hypotéza je, že ethanol může přímo zvyšovat aktivitu NAD(P)H:chinon reduktázy,

kteřá slouží k přeměně metabolitů chinonu zpět na původní acetaminofen a tím omezuje hromadění toxických metabolitů [20].

Určité zdravotní stavy pravděpodobně též zhoršují toxicitu acetaminofenu, avšak jejich mechanismy nejsou zcela vysvětleny. Gilbertův syndrom (benigní chronická nepřímá hyperbilirubinémie) může snižovat schopnost glukuronidace. Diabetes mellitus zřejmě zvyšuje aktivitu CYP2E1, stejně jako obezita [21]. U pacientů s cirhózou jater je metabolismus paracetamolu nižší než u těch s normální funkcí jater. Přestože by bylo ideální zvolit jiné antipyretikum nebo analgetikum, užívání paracetamolu v množství menším než 4000 mg denně u pacienta s cirhózou jater může být v krátkodobém horizontu bezpečné. Jsou však doporučovány obezřetnější dávky, jako je například 2000 mg denně, zejména u pacientů, u nichž je onemocnění jater charakterizováno hepatickou dekompenzací nebo aktivním pitím alkoholu [20].

1.1.3.3 Léčba

Včasná diagnostika je klíčová pro léčbu předávkování acetaminofenem, protože časná intervence může významně snížit riziko akutního selhání jater [18]. Intervence zahrnují inhibici absorpce, odstranění acetaminofenu z krve, prevenci přeměny acetaminofenu na NAPQI, detoxifikaci NAPQI a transplantaci jater. Volba terapie závisí na časování projevu a míře dekompenzace jater [22].

Žaludeční výplach, požití aktivního uhlí a vyvolání zvracení pomocí hlavěnyky dávivé mohou snížit absorpci v prvních několika hodinách po požití paracetamolu [22]. Pomocí aktivního uhlí může být paracetamol absorbován i z krevního řečiště, což může vést k preferenci užití aktivního uhlí oproti žaludečnímu výplachu nebo hlavěnyky dávivé [23].

K detoxifikaci NAPQI lze použít methionin, cystein a N-acetylcystein (NAC). I když bylo prokázáno, že všechny snižují riziko poškození, methionin a cystein vyvolávají více nepříznivých účinků na trávicí systém a centrální nervový systém ve srovnání s NAC. NAC je nyní široce uznáván jako nejlepší antidotum schopné snížit riziko hepatotoxicity. NAC funguje tak, že doplňuje zásoby GSH, váže se přímo na toxický metabolit acetaminofenu a zvyšuje netoxickou konjugaci sulfátu v jaterních buňkách [22]. Může se podávat intravenózně nebo perorálně v závislosti na duševním stavu pacienta a jeho schopnosti snést perorální léky. Intravenózně se podává jako nárazová dávka 150 mg/kg během 1 hodiny, poté 50 mg/kg během následujících 4 hodin a 100 mg/kg po dobu 16 hodin. Při perorálním podání se nejprve podává nárazová dávka 140 mg/kg, po 4 hodinách následuje podání 70 mg/kg každé 4 hodiny

v celkovém počtu 18 dávek [18]. Byl vytvořen Rumack-Matthewův nomogram s cílem předpovědět, zda dojde u pacientů po předávkování acetaminofenem k hepatotoxicitě a má sloužit jako vodítko pro včasnou léčbu jednorázového akutního předávkování, nikoliv pro případy chronického užívání. Podle nomogramu se hepatotoxicita předpovídá, když koncentrace acetaminofenu v plazmě leží nad pravděpodobnou linií hepatotoxicity, což je přímka spojující koncentraci APAP 200 mg/l za 4 hodiny s koncentrací 50 mg/l za 12 hodin [22].

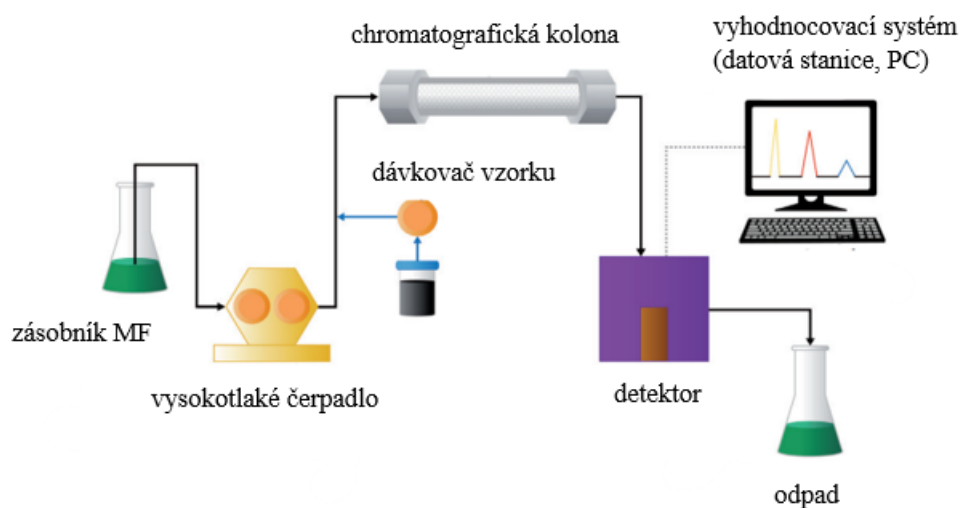
Byly vyvinuty systémy podpory jater s cílem nahradit jejich funkčnost u pacientů s akutním selháním jater a prodloužit přežití až do spontánního zotavení nebo jako přechodná fáze k transplantaci [22]. K dispozici jsou umělé a bioumělé podpůrné systémy. Umělé podpůrné systémy využívají k odstranění toxinů hemodialýzu s adsorcí na uhlí nebo albumin, zatímco bioumělé systémy využívají k filtraci plazmy lidské nebo prasečí hepatocyty [18].

Transplantace jater je konečnou léčbou pro pacienty, u kterých předávkování acetaminofenem postoupilo k akutnímu selhání jater i přes léčbu NAC. Nejtěžší a zároveň klíčovou otázkou je určit, pro které pacienty bude transplantace nezbytná. Při výběru pacientů jsou nejpoužívanější kritéria z King's College Hospital. Ty mají vysokou specifitu pro identifikaci pacientů, kteří transplantaci jater vyžadují, ale nízkou negativní prediktivní hodnotu, kdy až 26 % pacientů není způsobilých k operaci v době, kdy tato kritéria splní [18,22]. Dárce orgánu je buď pacient v kómatu nebo živý dárce. Mezi hlavní výhody dárcovství od žijících osob patří absence orgánového deficitu a čekací doby, možnost plánování, kvalita jater a krátká doba ischemie [24]. U vybraných pacientů se pomocná transplantace jater jeví jako strategie umožňující přežití bez nutnosti imunosupresivní terapie. V této proceduře je obvykle transplantován pravý lalok ortotopně po provedení pravé hepatektomie u příjemce. Tímto se ponechává levý lalok na svém místě s cílem dosáhnout regenerace původního játra. Úspěch pomocné transplantace závisí na schopnosti původních jater regenerovat. Tato procedura je nejvhodnější pro pacienty s hyperakutním selháním jater v důsledku toxicity APAP, a to bez předchozích onemocnění jater [18].

1.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC) je analytická separační technika, kde dochází k oddělování složek vzorku distribucí (oddělováním, adsorcí nebo jinými interakcemi) mezi kapalnou mobilní fází (MF) a pevnou stacionární fází (SF) [25]. K separaci dochází za optimálních podmínek, kdy každá složka ve směsi interaguje s oběma fázemi odlišně ve srovnání s ostatními

složkami ve směsi [26]. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je moderní varianta LC, která využívá kolony s malými částicemi, skrz které je mobilní fáze čerpána pod vysokým tlakem. Typický kapalinový chromatograf se skládá z několika modulů – čerpadla, dávkovacího zařízení (mikrostříkačka nebo autosampler), chromatografické kolony umístěné v termostatu a detektoru [25].



Obrázek 3: Instrumentace HPLC [27]

1.2.1 Chromatografické systémy

Systémy s normálními fázemi (NP-HPLC) využívají polární stacionární fázi (silikagel, alumina) a pro eluci analytů je použita méně polární mobilní fáze (např. hexan, heptan). Je založena buď na adsorpci analytu na stacionární fázi (adsorpční chromatografie) nebo na míře rozpustnosti analytu ve stacionární fázi ve srovnání s fází mobilní (rozdělovací chromatografie) [25,26,28]. Retence látek v adsorpční chromatografii je dána kompetitivní adsorpcí mezi molekulami analytu a mobilní fází k nosiči stacionární fáze. Síla, se kterou se mobilní fáze váže na nosič stacionární fáze se nazývá eluotropní síla. Mobilní fáze s vyšší eluotropní silou se pevněji váží na nosič, což vede k rychlejší eluci analytů z kolony [28]. Neutrální látky v roztoku jsou separovány na základě jejich polarity. Čím je látka polárnější, tím více se pak zadržuje na koloně. NP-HPLC se používá při separaci nepolárních sloučenin a izomerů, při frakcionaci vzorků podle funkčních skupin nebo při čištění vzorků [25,26].

Systémy s obrácenými fázemi (RP-HPLC) jsou založeny na izolaci molekul prostřednictvím hydrofobních interakcí mezi mobilní a stacionární fází. U RP-HPLC je mobilní fáze polární a

stacionární fáze nepolární [29]. Jako mobilní fáze se využívá polárního rozpouštědla, typicky vody, do kterého se přidává méně polární rozpouštědlo, jako je acetonitril nebo methanol [26]. Se stoupajícím podílem méně polárního rozpouštědla pak jednotlivé látky eluují. Eluce může probíhat za dvou různých podmínek, buď jako gradientová eluce, při níž se koncentrace organického rozpouštědla postupně zvyšuje, nebo jako izokratická eluce, která probíhá za konstantní koncentrace organického rozpouštědla [29]. Nejběžnější stacionární fáze jsou ty, u kterých jsou hydrofobní skupiny (např. oktadecylové) kovalentně vázány k silikagelu. RP-HPLC je nejčastěji využívaná metoda HPLC, která se uplatňuje u více než 70 % všech HPLC analýz. Je vhodná pro analýzu polárních, středně polárních a některých nepolárních látek [25,26].

Iontově výměnná chromatografie (IEC) je typ chromatografie, která zahrnuje výměnu nabitých složek vzorku (iontů) za protiiony, které jsou elektrostaticky vázány na chemické skupiny kovalentně navázané k stacionární fázi. Tento proces vede k vázání složek vzorku na chemickou skupinu pomocí elektrostatické interakce [30]. IEC lze rozdělit do dvou kategorií podle náboje stacionární fáze – kation výměnná a anion výměnná chromatografie. Kation výměnná chromatografie využívá stacionární fáze obsahující negativně nabitě skupiny, což může být např. konjugovaná báze silné kyseliny (sulfonát) nebo konjugovaná báze slabé kyseliny (karboxylátová skupina) a slouží k separaci kationtů. V anion výměnné chromatografii mají stacionární fáze kladně nabitě skupiny a slouží k separaci aniontů. Stacionární fáze může být konjugovaná kyselina silné zásady (protonovaná kvartérní aminoskupina) nebo konjugovaná kyselina slabé zásady (protonovaná forma diethylaminoethyl skupiny). V IEC jsou používány různé typy nosičů, například silikagel, celulóza a agaróza [28]. Jako mobilní fáze se používají pufry, často s postupně rostoucí iontovou silou (např. vyšší koncentrace NaCl). IEC se využívá v analýze iontů a biologických komponent, jako jsou aminokyseliny, proteiny/peptidy a polynukleotidy [25].

Gelová permeační chromatografie (GPC) používá k separaci nosič s různě velkými póry. Látky jsou separovány na základě jejich schopnosti proniknout do různých částí těchto pórů. Vysokomolekulární látky nebudou schopny proniknout do žádného nebo jen do několika pórů a většinu času zůstanou v mobilní fázi mimo nosič. Nízkomolekulární látky mohou proniknout do většiny pórů a potřebují tak více času na průchod kolonou. Výsledkem je separace založená na velikosti, tvaru a molární hmotnosti analyzovaných látek [28]. Jako mobilní fáze musí být vybráno vhodné rozpouštědlo, ve kterém se vzorek dobře rozpustí a zároveň musí být kompatibilní se stacionární fází [31]. GPC se využívá při čištění biologických vzorků, například

k odstranění malých rozpuštěných látek z velkých biologických makromolekul, jako jsou proteiny [28].

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) je vhodná pro analýzy vysoce polárních a hydrofilních sloučenin. Separační mechanismus v HILIC je uváděn jako komplikovanější než u RP-HPLC, a to kvůli více mechanismům retence, které mohou ovlivňovat celkovou retenci analytů. Hlavní mechanismy retence jsou rozdělování analytů mezi adsorbovanou vrstvou obohacenou o vodu na povrchu stacionární fáze a mobilní fázi s nízkým obsahem vody, adsorpce (dipól – dipól interakce, tvorba vodíkových můstků) a elektrostatické interakce. Skutečný mechanismus retence závisí na složení mobilní fáze, vlastnostech analytů (polarita a nabití) a funkčních skupinách stacionárních fází [32]. HILIC používá polární stacionární fáze podobné těm, které se aplikují v NP-HPLC a jsou převážně tvořeny nemodifikovaným silikagelem nebo chemicky vázaným silikagelem (např. amidové a diolové fáze). Mobilní fáze obsahují vodu a více aprotickou složku. Vyznačují se vysokým obsahem organického modifikátoru, který přesahuje 80 %. Tento vysoký podíl organické složky umožňuje mobilní fázi být méně hydrofilní než stacionární fáze, což je odlišné od více hydrofilních mobilních fází používaných v RP-HPLC. Nejpoužívanějším organickým modifikátorem je acetonitril. Vzhledem k tomu, že je HILIC používán pro nabitě a vysoce polární analyty, iontové přísady mají významný vliv na retenci, selektivitu a tvar píku. Běžně používaná iontová aditiva jsou mravenčan amonný nebo octan amonný [33].

1.2.2 Mikrokolonová chromatografie

Jedním z aktuálních trendů vědy a technologie, zejména v oblasti analytické chemie, je miniaturizace instrumentace. Hlavním cílem miniaturizace je dosažení nižších limitů detekce (LOD), zlepšení selektivity a urychlení analýzy při zachování propustnosti a nízkých nákladů na systémy, aniž by byla obětována kvalita analýzy [34,35]. Mikrokolonová chromatografie se stala uznávanou doplňkovou technikou k tradičním LC kolonám, které se běžně používají v HPLC. To je způsobeno určitými výhodami, které se projevují v rostoucím počtu aplikací, kde běžná HPLC není dostačující nebo nedokáže konkurovat mikrokolonové LC [36]. Zavedení mikrokolonové LC je připisováno Horváthovi a jeho spolupracovníkům v roce 1967, kteří použili nerezové ocelové kolony s průměrem 0,5 – 1 mm naplněné pelikulárními částicemi pro separaci ribonukleotidů [35].

Mikrokolonová LC přináší několik výhod, zejména co se týče nízké spotřeby rozpouštědel [35]. Velká pozornost byla zaměřena na zmenšování separační kolony s cílem snížit provozní

náklady a minimalizaci enviromentálních dopadů v podobě znečištění prostředí rozpouštědly a chemikáliemi. Za předpokladu stejné lineární rychlosti mobilní fáze a stejné délky kolony se požadovaný objem organického rozpouštědla jako mobilní fáze bude snižovat úměrně druhé mocnině poloměru kolony, přičemž účinnost separace zůstane zachována. Výhoda nízké spotřeby rozpouštědel však není omezena pouze na snížení nákladů na rozpouštědlo, ale týká se také problematiky likvidace odpadů [37]. Další výhodou může být možnost analyzovat velmi malé množství vzorku. Mikrokolonovou LC lze také dosáhnout lepší separační účinnosti a rychlejší doby analýzy díky nižším průtokovým rychlostem. Navíc, nízké průtoky mobilní fáze jsou vhodné pro případné spojení s hmotnostní spektrometrií a malé dávkované objemy minimalizují rozptyl zóny a riziko přetížení kolony [35].

Mikrokolonová LC nachází uplatnění v několika oblastech, jako jsou životní prostředí, biologie a potravinářství. Zvláštní pozornost je věnována právě biologické oblasti, a to kvůli jednomu z benefitů mikrokolonové LC – malému objemu vzorku potřebného k analýze, což je pro tento specifický obor klíčové. Pro biologické nebo biomedicínské aplikace se pak často využívá spojení mikrokolonové LC s hmotnostní spektrometrií. V analýze potravin se mikrokolonová LC využívá pro monitorování reziduí a kontaminantů na nízkých koncentračních úrovních. Dále ji lze použít ke kontrole bezpečnosti a kvality potravin s cílem ověřit autenticitu a původ, a také k posouzení výživových a toxikologických vlastností [38]. Mikrokolonová LC lze také využít pro separaci enantiomerů, protože umožňuje využití nových typů stacionární fáze, jako jsou např. monoklonální protilátky nebo receptorové proteiny, které jsou obvykle drahé. Výhodou je i nižší spotřeba drahých chirálních aditiv jako mobilní fáze [36].

1.2.2.1 Instrumentace

V mikrokolonové LC se používají kolony s průměrem 0,5 – 1 mm s průtokem mobilní fáze 10 – 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, v kapilární LC kolony s průměrem 100 – 500 μm a s průtokem mobilní fáze 1 – 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ a v nanokolonové LC pak kolony s průměrem 10 – 100 μm s průtokem mobilní fáze 10 – 1000 n/min . Ve všech případech lze použít tři typy kolon – náplňové, monolitické a otevřené kapilární. Náplňové a monolitické kolony jsou zcela naplněny stacionární fází, zatímco u otevřených kapilárních kolon pokrývá tenká vrstva stacionární fáze pouze povrch kapiláry. Otevřené kapilární kolony jsou nejméně využívané, protože parabolické rozložení rychlosti toku kolonou poskytuje nižší účinnost separace [35].

Náplňové kolony jsou v současnosti nejvíce využívané kolony v LC. Jejich hlavními výhodami jsou různé typy částic s odlišnými vlastnostmi, které mohou zlepšit selektivitu a účinnost

separace [38]. Velice často používanými částicemi jsou plně porézní silikagelové částice o velikosti 3 – 5 μm . V posledních letech byly však na trh uvedeny částice o menší velikosti. Snížení průměru částic vede ke zvýšení účinnosti, rozlišení, citlivosti a rychlosti separace. Tyto výhody však způsobují nárůst zpětného tlaku. Povrchově porézní částice mají neporézní pevné jádro, které je potažené porézní vrstvou. Objem této porézní vrstvy obvykle představuje 60 – 75 % celkového objemu částice. Povrchově porézní částice mají ve srovnání s plně porézními částicemi kratší difúzní dráhu, a to je důsledkem rychlejšího přenosu hmoty analytu z mobilní fáze do porézní vrstvy částice a zpět [35,39]. Běžně jsou používány ve velikostech 2,5 – 5 μm a využívají se pro dosažení vysoké účinnosti a rychlých separací s relativně nízkým tlakem [40]. V posledních letech se na trhu objevily kolony s povrchově porézními částicemi 1,3 μm [41].

Monolitické kolony jsou tvořeny jediným kusem porézního materiálu, který zcela vyplňuje vnitřek kolony [39]. Díky své porézní struktuře vykazují nízký odpor průtoku mobilní fáze, což umožňuje využití vysokých průtoků. Tato výhoda přispívá ke zkrácení doby analýzy [40]. Další výhodou monolitických kolon oproti náplňovým kolonám jsou jejich hydrodynamické vlastnosti. Makropóry s velikostí přibližně 2 μm umožňují rychlý konvektivní tok mobilní fáze skrze monolit a výrazně zvyšují přenos hmoty analytu mezi mobilní a stacionární fází. Mezopóry s velikostí kolem 13 nm poskytují velký povrch monolitu a tím zajišťují vysokou účinnost separace [39].

V současné době jsou pístová a injekční čerpadla preferovanými systémy dodávky rozpouštědla pro tradiční i mikrokolonovou chromatografii. Pístová čerpadla jsou však výhodnější, a to díky jejich rychlému ustálení průtoku, stabilitě, schopnosti kompenzovat vysoký zpětný tlak kolony a schopnosti účinně tvořit mikrogradienty [34,36].

Pro kolony s vnitřním průměrem 50 – 100 μm se dávkovací objemy pohybují od několika nl až po přibližně 1 μl pro kolony s vnitřním průměrem 1 mm. Manuální dávkování v rozmezí od několika μl po přibližně 20 nl lze provádět pomocí mikroinjekčních ventilů vybavených vyměnitelnou vnitřní smyčkou. Automatizované dávkování vzorku v rozmezí μl lze snadno provést pomocí autosamplerů, avšak pro jejich použití v rozmezí nl je třeba provést důkladné úpravy [34,36].

Vzhledem k tomu, že kapiláry, které se používají k propojení různých částí HPLC, přispívají k mimokolonovému příspěvku, je výběr rozměru propojovacích trubec velmi důležitý. Pro kolony s vnitřním průměrem 500 μm – 1 mm lze použít speciálně navržené trubky z nerezové

oceli o vnitřním průměru 0,25 – 0,125 mm. U kolon s menším průměrem se použití spojovacích kapilár minimalizuje a je preferováno přímé spojení kolony s detektorem a dávkovacím zařízením [34,36].

Detekce analytického signálu v mikrokolonové LC lze provádět pomocí stejných detektorů jako v běžné HPLC. Nejpoužívanějším detektorem je UV/Vis detektor díky své snadné použitelnosti a široké oblasti aplikace. Fluorescenční detektor nabízí vyšší citlivost a v některých případech lepší specifitu ve srovnání s UV/Vis detektorem. Oba tyto detektory však musí mít přizpůsobenou velikost detekční cely, aby minimalizovaly rozšiřování chromatografického píku. Dále se používají elektrochemické detektory – amperometrické, potenciometrické a konduktometrické, přičemž nejvíce využívaným je amperometrický detektor [34,40].

1.2.3 Stanovení metabolitů acetaminofenu

Pro analýzu metabolismu acetaminofenu bylo popsáno několik metod. Jejich výsledky jsou zásadní pro studie toxicity, farmakokinetiky a farmakodynamiky. Tyto metody obvykle využívají spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) [42] nebo s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) [43-46] a kapalinovou chromatografií s UV detekcí (LC-UV) [47-49]. Většina metod LC-MS a LC-UV byla vyvinuta primárně pro stanovení hlavních metabolitů APAP, konkrétně pro APAP-O-glukuronidy a APAP-O-sulfáty [43,44,46-48], zatímco metody pro stanovení metabolitů oxidační dráhy jsou méně běžné [45]. Většina separací byla provedena na systémech s obrácenými fázemi s použitím kolon obsahujících oktadecylsilikagel (C18). Mobilní fáze jsou obvykle acetonitril [43,45,47] nebo methanol [42,44,46,48,49] s vodnými roztoky iontových aditiv, jako jsou kyselina octová [48], kyselina mravenčí [43,46,49], octan nebo hydroxid amonný [44] nebo trifluoroctová kyselina [42,47] poskytující těkavé mobilní fáze, které jsou vhodné pro ionizaci elektrosprejem v MS [12].

Váňová a spol. [12] vyvinuli RP-HPLC/MS metodu pro stanovení oxidačních metabolitů APAP (APAP, APAP-SG, APAP-CYS, APAP-NAC) pomocí gradientové eluce. Gradientové eluční podmínky byly optimalizovány pomocí okénkových diagramů. Dále byly zkoumány účinky složení mobilní fáze a aditiv na separaci, citlivost detekce a účinnost ionizace, které byly vyhodnoceny pomocí lineárního a nelineárního izokratického modelu retence. K vývoji metody s gradientovou elucí byla použita kolona typu Kinetex C18 s povrchově porézními částicemi. Retence sloučenin byla nejprve zkoumána pomocí izokratických analýz v mobilních fázích voda/methanol s přísávkou 0,1 – 0,3 % (v/v) kyseliny octové do vody a současně do vody i

methanolu. Na základě provedených analýz bylo zjištěno, že přidání více než 0,2 % (v/v) kyseliny octové potlačuje ionizaci sloučenin, a proto byla pro další optimalizaci gradientu vybrána mobilní fáze voda s přidavkem 0,2 % (v/v) kyseliny octové/methanol. Vyvinutá metoda byla demonstrována na analýze HK-2 buněk lidské ledviny s použitím optimalizovaného gradientu, tj. mobilní fáze voda s 0,2 % (v/v) kyseliny octové/methanol, průtok 0,5 ml/min, optimalizovaný profil gradientu 0 min – 0 % (v/v) methanol, 6,9 min – 100 % (v/v) methanol.

An, Lee a Jung [45] vyvinuli a validovali analytickou metodu pro stanovení APAP a jeho šesti metabolitů – APAP-O-glukuronid, APAP-O-sulfát, APAP-SG, APAP-NAC, APAP-CYS a 3-methoxyacetaminofen (APAP-OMe) v plazmě krys z hlediska specifity, linearity a přesnosti. Látky byly odděleny na koloně Capcell Pak MG II C18 (5 μ m, 2,0 \times 150 mm) a kvantitativně změřeny pomocí hmotnostní spektrometrie s trojitým kvadrupólem. Na rozdíl od UV detekce může MS detekce selektivně analyzovat každý analyt. Mobilní fáze obsahovala 0,1 % kyseliny mravenčí buď v 95 % vody (složka A) nebo 95 % acetonitrilu (složka B). Při průtoku 0,3 ml/min byl použit následující gradient: počáteční čas při 100 % vody, lineární zvýšení na 80 % acetonitrilu v čase 0 – 8 min, dále byl průtok udržován na 80 % acetonitrilu po dobu 1 minuty (8 – 9 min) a zpětně vrácen na 100 % vody v čase 9 – 9,5 min, 100 % vody bylo udržováno do konce analýzy (9,5 – 16 min). Teplota kolony byla udržována na hodnotě 35 °C a vzorky byly po celou dobu analýzy uchovávány při 4 °C v autosampleru. Analýza byla provedena dvakrát v režimu pozitivní a negativní ionizace a detekční režim byl vybrán tak, aby byla zlepšena citlivost látek. APAP a metabolity fáze I byly lépe detekovány v režimu pozitivní ionizace, zatímco metabolity fáze II byly detekovány pouze v režimu negativní ionizace.

Gicquel a spol. [46] představili metodu LC-MS/MS pro simultánní kvantifikaci acetaminofenu a jeho metabolitů APAP-O-glukuronidu a APAP-O-sulfátu v plazmě. Oproti jiným technikám má tato metoda výhodu vysoké citlivosti, což umožňuje analýzu malých objemů plazmy (25 μ l). Separace analytů byla dosažena na koloně Thermo Fisher Hypersil Gold C18 (3 μ m, 2,1 \times 100 mm) vybavenou ochrannou filtrační kolonou HyPURITY AQUASTAR (3 μ m, 2,1 \times 10 mm). Mobilní fáze se skládala z 1 % kyseliny mravenčí a methanolu (80:20 v/v) při průtoku mobilní fáze 200 μ l/min za izokratických podmínek. Látky byly detekovány pomocí hmotnostního spektrometru s trojitým kvadrupólem a elektrosprejem. Tyto podmínky poskytly uspokojivou a rychlou separaci s vyhovujícími tvary píků pro všechny analyty.

Di Girolamo, O'Neill a Wainer [47] se zabývali stanovením APAP a jeho glukuronidových a sulfátových metabolitů ve vzorcích moči infikovaných HIV. Vzhledem k biologické povaze vzorků a jejich složitému složení vyžadovala metoda minimální manipulaci se vzorkem a maximální specifitu a citlivost. Látky byly separovány na koloně Phenomenex ODS (25 cm × 4,6 mm) vybavenou ochrannou kolonou C18. Mobilní fáze se skládala z pufru octanu sodného (50 mM, pH 3,5), acetonitrilu (96:4 v/v) s 0,35 % trifluoroctové kyseliny, ve 25. minutě byl obsah acetonitrilu zvýšen na 25 %, ve 30 minutách byla mobilní fáze vrácena do původního složení a kolona byla re-ekvilibrována po dobu 15 minut. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml/min. Sloučeniny byly detekovány pomocí UV detekce s programem přepínání vlnových délek. UV detektor byl nastaven na vlnovou délku 260 nm v čase 0 – 14 min, poté byl přepnut na 240 nm a automaticky provedl nulování, přičemž pokračoval v detekci na této vlnové délce až do 25 minut. Ve 25. minutě se UV detektor opětovně přepnul na 260 nm. APAP-O-glukuronid a APAP-O-sulfát byly detekovány při 260 nm do 10 minut a samotný APAP při 240 nm s retenčním časem 19 min. Tato validovaná metoda může být použita ve fenotypizačních studiích k určení metabolismu fáze II in vivo.

Vertzoni, Archontaki a Galanopoulou [48] vyvinuli, optimalizovali a ověřili RP-HPLC metodu s detekcí při 242 nm pro stanovení acetaminofenu a jeho dvou hlavních metabolitů APAP-O-glukuronidu a APAP-O-sulfátu v plazmě a moči králíka po podání toxické dávky. Byla použita kolona Hypersil BDS RP-C18 (5 μm, 250 × 4,6 mm) a mobilní fáze se skládala z vodného pufru obsahujícího 0,05 M KH₂PO₄ s 1 % kyseliny octové (pH 6,5) a methanolu (95:5 v/v) s průtokem 1,5 ml/min. Tato metoda může být využita v rutinním monitorování léčiv a farmakokinetických studií a je slibná pro objasnění hepatotoxických účinků acetaminofenu při vyšších dávkách.

V dostupné literatuře nebyla nalezena studie, která by se zabývala separacemi APAP a oxidačních metabolitů pomocí mikrokolonové chromatografie, kterou se zabývá tato diplomová práce.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Chemikálie

Aceton (Acros Organics, USA)

Acetonitril ($\geq 99,9$ % Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)

Deionizovaná voda připravená zařízením Milli-Q® (Merck, Darmstadt, Německo)

Kyselina octová (≥ 99 %, Sigma Aldrich, Burlington, USA)

Methanol (Merck, Darmstadt, Německo)

Thiomčovina (Merck, Darmstadt, Německo)

2.1.1 Standardy

Všechny konjugáty acetaminofenu byly nasyntetizovány na Katedře chemie Fakulty Přírodovědecké Univerzity Hradec Králové dle podmínek uvedených v publikaci [12]. Všechna reakční činidla a roztoky pro syntézu APAP konjugátů byla nejvyšší možné čistoty (Merck, Praha, Česká republika). Po syntéze následovala izolace a přečištění pomocí preparativní HPLC separace na reverzních fázích (provedeno na Katedře analytické chemie Fakulty Chemicko-technologické Univerzity Pardubice) se získáním konečných produktů. Struktury konečných produktů byly potvrzeny analýzou pomocí ^1H , ^{13}C , 2D NMR a HRMS [12].

2.1.2 Vzorky a úprava vzorků

Pro demonstraci separace byly použity vzorky buněčné linie lidských ledvin HK-2. Tyto buňky byly kultivovány v prostředí 100 mmol/l acetaminofenu a 100 mmol/l metabolitu APAP-CYS na Katedře biologických a biochemických věd Fakulty Chemicko-technologické Univerzity Pardubice za podmínek uvedených v publikaci [12]. Poté, co bylo kultivační médium odstraněno, byla přidána ledová 5% metafosforečná kyselina. Buňky byly seškrabány a buněčné lyzáty filtrovány skrz 0,1 μm filtr a centrifugovány (4 °C; 18000 rpm; 5 min). Takto připravené vzorky byly zamrazeny při -20 °C do doby, než byly analyzovány.

2.2 Přístrojové vybavení

Analytické digitální váhy (Sartorius, Ústí nad Labem, Česká republika)

Mikropipety (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

Ultrazvuková lázeň (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

2.2.1 Kapalinový chromatograf

RSLCnano kapalinový chromatograf Thermo Scientific UltiMate 3000 skládající se z:

- čerpadla NCP-3200RS: binární vysokotlaký gradient, 1 nl/min – 50 μ l/min, 800 bar
- autosampleru pro nanoLC WPS-3000(T)PLRS NanoCap: 0,001 – 20 μ l
- UV/Vis detektoru VWD-3400RS: sběr dat 200 Hz, 190 – 900 nm

2.2.2 Kolony

Luna® C18(2) 100 Å (150 × 0,5 mm, velikost částic 3 μ m, Phenomenex, USA)

Kinetex® XB-C18 100 Å (150 × 0,5 mm, velikost částic 2,6 μ m, Phenomenex, USA)

Ascentis® Express C18 (5 cm × 200 μ m, velikost částic 2,7 μ m, Supelco, USA)

Chromolith® CapRod® RP-18e (150 × 0,2 mm, Supelco, Německo)

2.3 Příprava standardů

Ze zásobních roztoků jednotlivých metabolitů o koncentraci 1 mg/ml bylo od každého roztoku odpipetováno 40 μ l do vialky (každý zvlášť a směs) a doplněno destilovanou vodou na konečný objem 1 ml.

Kalibrační řada standardů APAP-NAC a APAP-SG pro stanovení meze detekce a linearity byla připravena ze zásobních roztoků standardů o koncentraci 1 mg/ml z nichž bylo do vialky odpipetováno 10 μ l a doplněno destilovanou vodou na objem 1 ml. Z tohoto roztoku bylo dále odpipetováno 0,5 ml do vialky a opět doplněno destilovanou vodou na 1 ml. Takto připravený roztok měl koncentraci 5 μ l/ml. Stejným způsobem byla připravena kalibrační řada s koncentracemi standardů 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,313; 0,156 a 0,078 μ g/ml.

Standardy APAP a APAP-CYS, které byly použity pro přípravu kalibračních roztoků, neobsahovaly žádné nečistoty. Ze zásobních roztoků standardů o koncentraci 1 mg/ml bylo odpipetováno 12,5 μ l do vialky a doplněno destilovanou vodou na objem 1 ml. Z tohoto roztoku bylo dále odpipetováno 0,5 ml do vialky a opět doplněno destilovanou vodou na 1 ml. Takto připravený roztok měl koncentraci 6,25 μ l/ml. Stejným způsobem byla připravena kalibrační řada s koncentracemi standardů 12,5; 6,25; 3,125; 1,563; 0,781; 0,391; 0,195 a 0,098 μ g/ml.

2.4 HPLC analýza

2.4.1 Srovnání kolon dle van Deemterových křivek

Při proměřování acetonu pro sestavení van Deemterových křivek byla pro všechny kolony použita mobilní fáze obsahující 85 % acetonitril, pro kolonu Luna® C18(2) byla proměřena navíc thiomočovina v mobilní fázi obsahující 50 % methanol. Vlnová délka byla pro aceton nastavena na 275 nm a pro thiomočovinu na 245 nm, dávkovaný objem byl 0,1 µl. Teplota kolony byla udržována na hodnotě 30 °C.

2.4.2 Izokratická eluce

Izokratická analýza standardů o koncentraci 40 µg/ml byla provedena na koloně Luna® C18(2). Pro analýzu byla zvolena vlnová délka 245 nm, při které je možné detekovat všechny látky. Dávkovaný objem látek byl nastaven na 0,1 µl. Teplota kolony byla udržována na hodnotě 30 °C. Byly zkoumány dvě mobilní fáze, první mobilní fáze byla tvořená směsí vody s 0,2 % kyseliny octové (složka A) a acetonitrilu s 0,2 % kyseliny octové (složka B). Druhá mobilní fáze obsahovala směs vody s 0,2 % kyseliny octové (složka A) a methanolu s 0,2 % kyseliny octové (složka B). Při použití první MF byl nastaven průtok na 10 µl/min a při použití druhé MF byl průtok 20 µl/min z důvodu silnější retence při využití methanolu. Nejprve byly standardy dvakrát proměřeny za použití mobilní fáze s acetonitrem při koncentracích složky B při izokratických podmínkách v rozsahu 50 – 5 % s krokem po 5 %. Poté byly standardy dvakrát změřeny i pro druhou mobilní fázi s methanolem při koncentracích složky B při izokratických podmínkách v rozsahu 50 – 10 % s krokem po 5 %. Pro obě mobilní fáze byl také změřen roztok thiomočoviny pro určení mrtvého retenčního času. Mrtvý retenční čas pro mobilní fázi s acetonitrem je 3,447 min a pro mobilní fázi s methanolem 2,612 min.

2.4.3 Gradientová eluce

Při gradientové eluci byly proměřovány standardy o koncentraci 40 µg/ml na koloně Luna® C18(2). Vlnová délka byla nastavena na 245 nm, dávkovaný objem byl 0,1 µl a teplota kolony byla udržována na 30 °C. Opět byly zkoumány dvě mobilní fáze, a to ty stejné jako v případě izokratické analýzy i se stejnými průtoky – při použití mobilní fáze s acetonitrem byl nastaven průtok 10 µl/min, při použití mobilní fáze s methanolem 20 µl/min. Standardy byly proměřeny při dvou různých gradientech pro obě mobilní fáze, pro oba gradienty byly testovány tři časové strmosti. Pro mobilní fázi s acetonitrem byl použit gradient 5 – 45 % acetonitrilu v časech 0 –

8 min, 0 – 10 min a 0 – 12 min a gradient 10 – 50 % acetonitrilu ve stejných časech separace. Pro mobilní fázi s methanolem pak byly měřeny gradienty 5 – 70 % methanolu v časech 0 – 9 min, 0 – 12 min a 0 – 15 min a 10 – 75 % methanolu opět ve stejných časech.

2.4.4 Stanovení meze detekce a linearity

Pro stanovení meze detekce a linearity metabolitů APAP-SG a APAP-NAC byla proměřena kalibrační řada o koncentracích 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,313; 0,156 a 0,078 µg/ml, pro APAP a APAP-CYS byla připravena kalibrační řada se standardem bez nečistoty o koncentracích 12,5; 6,25; 3,125; 1,563; 0,781; 0,391; 0,195 a 0,098 µg/ml. Kalibrační řady byly proměřeny při vlnové délce 245 nm s průtokem mobilní fáze 20 µl/min, dávkovaný objem byl 0,1 µl a teplota kolony byla udržována na 30 °C.

2.4.5 Separace metabolitů acetaminofenu v reálném vzorku

Pro stanovení acetaminofenu a jeho metabolitu APAP-CYS v reálných vzorcích byla nastavena vlnová délka na 245 nm, dávkovaný objem byl 0,1 µl, teplota kolony byla udržována na 30 °C a průtok mobilní fáze byl 20 µl/min. Po změření vzorků následovalo proměření kalibrační řady standardů o koncentracích 12,5; 6,25; 3,125; 1,563; 0,781; 0,391; 0,195 a 0,098 µg/ml při stejných podmínkách.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Srovnání kolon dle van Deemterových křivek

Na jednotlivých kolonách byly nejprve proměřeny roztoky acetonu při různých průtocích pro jejich následné srovnání dle jejich van Deemterových křivek. Kolony Luna® C18(2), Kinetex® XB-C18, Ascentis® Express C18 a Chromolith® CapRod® RP-18e byly testovány v mobilní fázi 85 % acetonitrilu a kolona Luna® C18(2) navíc pak ještě v 50 % methanolu.

Ze změřených chromatogramů byly odečteny hodnoty mrtvých časů t_M acetonu a účinností chromatografické kolony N pro jednotlivé průtoky. Tato data byla následně použita pro výpočet výškového ekvivalentu teoretického patra H pomocí *Rovnice 1* a lineární rychlosti toku mobilní fáze u dle *Rovnice 2*. Vypočtené hodnoty H a u byly následně použity pro sestavení grafů.

Rovnice 1: Výpočet výškového ekvivalentu teoretického patra

$$H = \frac{L}{N}$$

kde L je délka kolony a N je počet teoretických pater (účinnost).

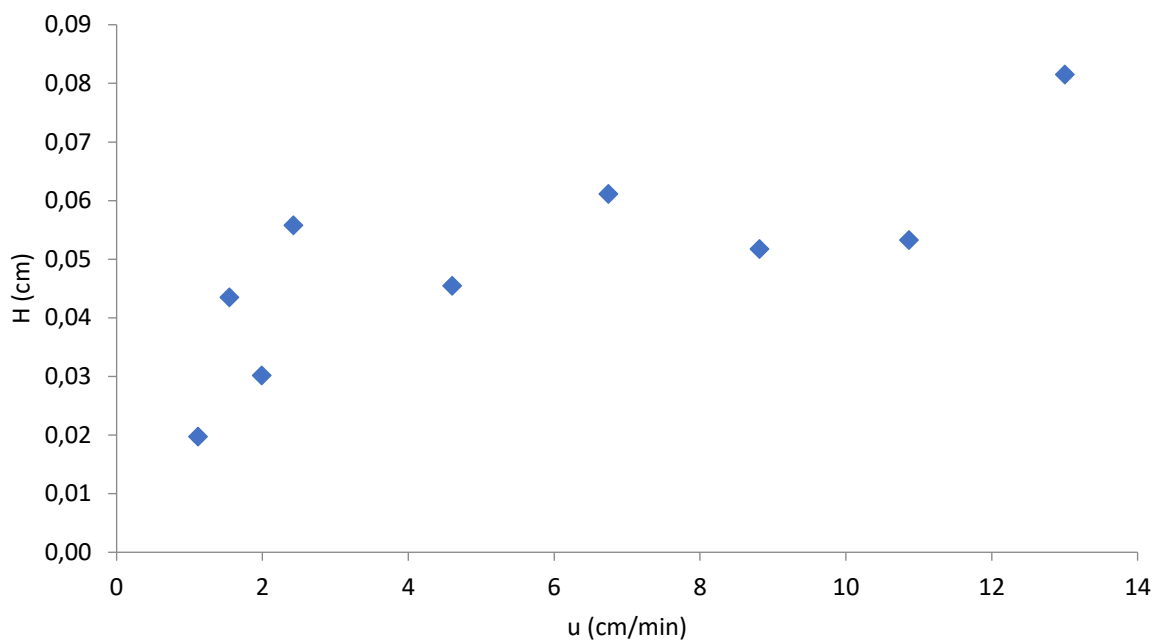
Rovnice 2: Výpočet lineární rychlosti toku mobilní fáze

$$u = \frac{L}{t_M}$$

kde L je délka kolony a t_M je mrtvý retenční čas.

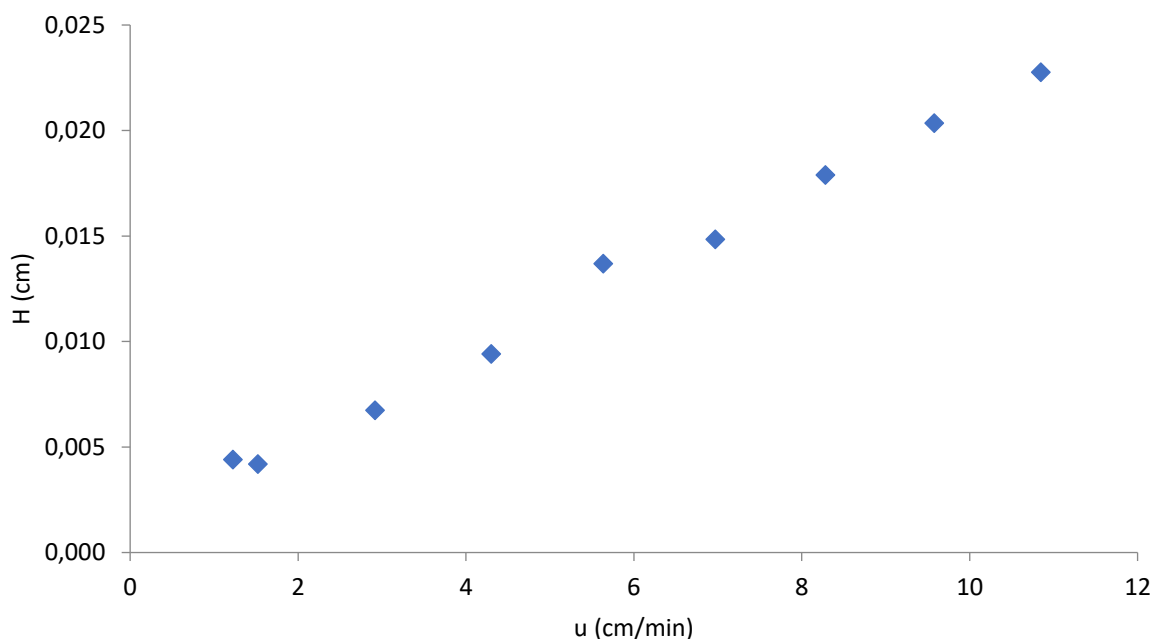
3.1.1 Luna® C18(2)

Tato kolona byla testována jak v mobilní fázi obsahující 85 % acetonitrilu, tak v mobilní fázi 50 % methanolu. Při použití 85 % acetonitrilu byl proměřován roztok acetonu při průtocích mobilní fáze 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3 a 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ (*Obrázek 4*). Z grafu závislosti výškového ekvivalentu teoretického patra H na lineární rychlosti toku mobilní fáze je zřejmé, že účinnost klesá (tzn. měření probíhalo v oblasti dominantního členu C van Deemterovy rovnice, tedy v oblasti dominantního odporu vůči převodu hmoty na fázovém rozhraní). Zároveň je také patrné, že při nižších průtocích dochází k fluktuaci naměřených dat, které byly způsobeny problémy s modulem měření průtoku u mikrokapalinového chromatografu.



Obrázek 4: Graf závislosti výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti toku mobilní fáze (85% acetonitril) pro kolonu Luna® C18(2)

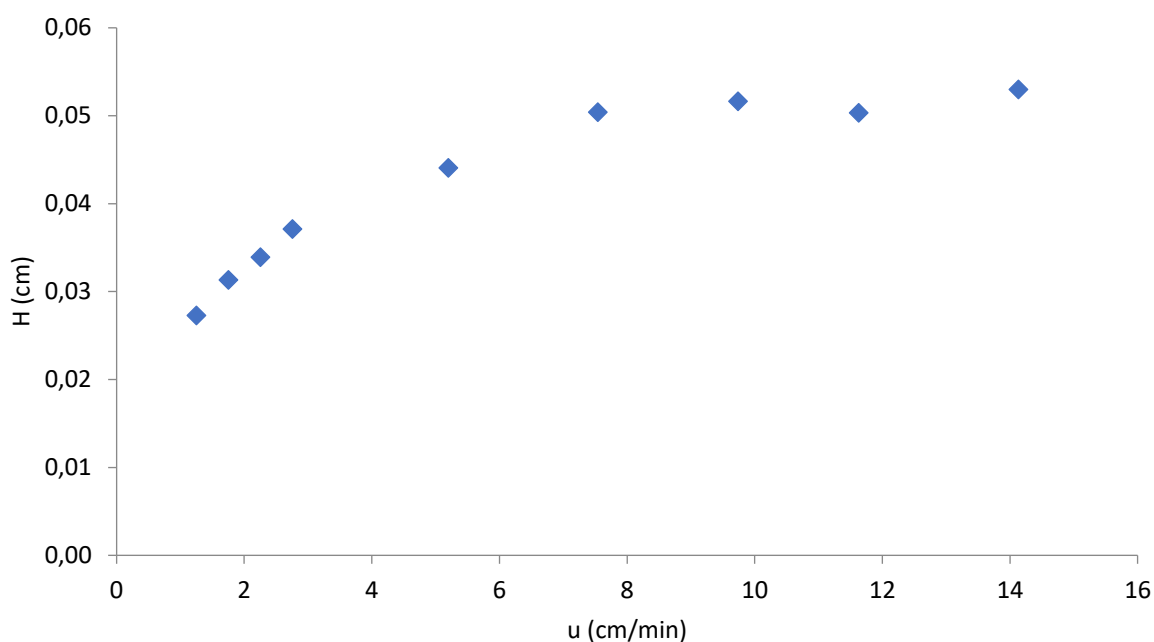
Při použití mobilní fáze obsahující 50 % methanol byl proměřován roztok thiomocoviny při průtocích 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 a 4 $\mu\text{l}/\text{min}$. V grafu (*Obrázek 5*) není patrné žádné jasné otočení trendu křivky a nelze tedy vyčíst optimální rychlost toku mobilní fáze. Opět se tedy jedná o oblast dominantního odporu vůči převodu hmoty na fázovém rozhraní. Je tedy pravděpodobné, že optimální průtoková rychlost bude menší než 4 $\mu\text{l}/\text{min}$.



Obrázek 5: Graf závislosti výškového ekvivalentu teoretického patra na rychlosti toku mobilní fáze (50 % methanol) pro kolonu Luna® C18(2)

3.1.2 Kinetex® XB-C18

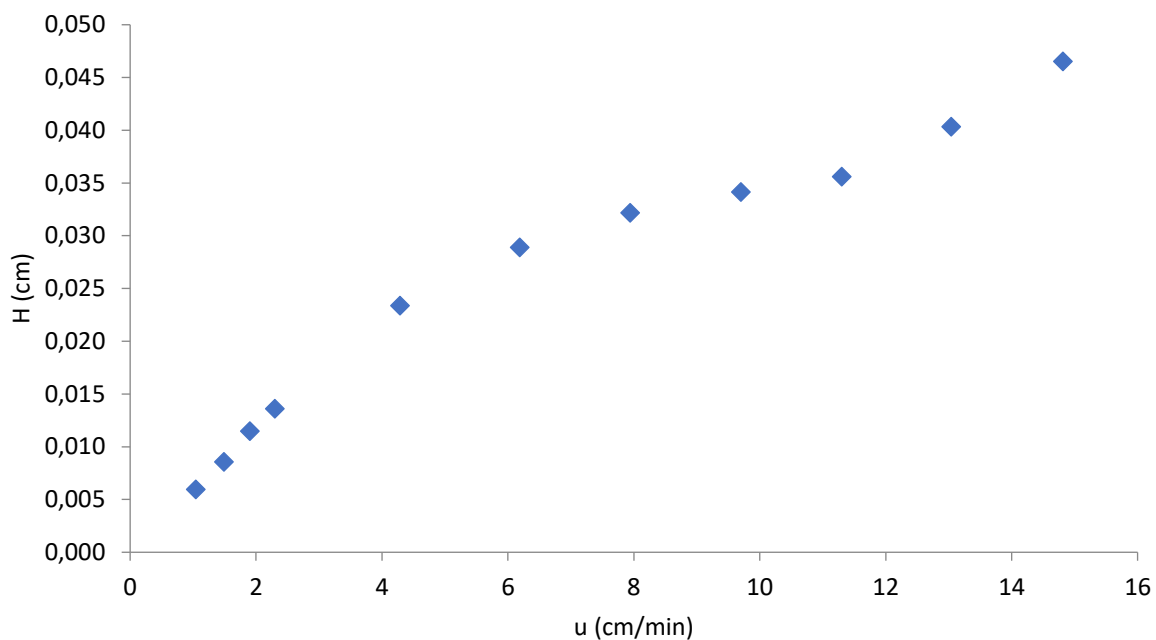
Při použití kolony Kinetex® XB-C18 byla použita mobilní fáze obsahující 85 % acetonitril a byl proměřován roztok acetonu při průtocích mobilní fáze 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3 a 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. V grafu (*Obrázek 6*) opět není viditelné žádné minimum křivky a optimální průtoková rychlost mobilní fáze je pravděpodobně tedy menší než 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Křivka je v tomto případě mírně deformovaná a má mírný konkávní tvar. Na uvedený průběh opět může mít vliv funkce modulu pro měření objemového průtoku mobilní fáze.



Obrázek 6: Graf závislosti výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti toku mobilní fáze (85 % acetonitril) pro kolonu Kinetex® XB-C18

3.1.3 Ascentis® Express C18

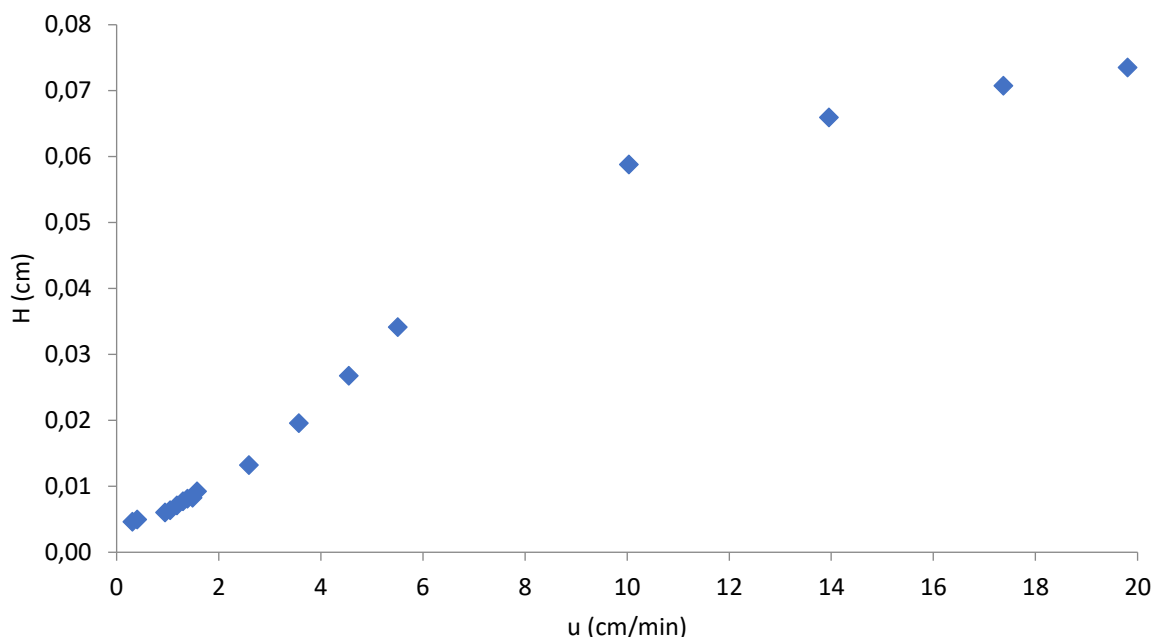
Při měření acetonu s kolonou Ascentis® Express C18 byla použita mobilní fáze obsahující 85 % acetonitril a byly prověřovány průtoky mobilní fáze 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3 a 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Stejně jako u kolony Kinetex® XB-C18 není v grafu (*Obrázek 7*) vidět minimální hodnota křivky a optimální rychlost průtoku je tedy menší než 2 $\mu\text{l}/\text{min}$.



Obrázek 7: Graf závislosti výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti toku mobilní fáze (85 % acetonitril) pro kolonu Ascentis® Express C18

3.1.4 Chromolith® CapRod® RP-18e

Při použití kolony Chromolith® CapRod® RP-18e byl proměřen roztok acetonu za použití mobilní fáze 85 % acetonitril a při průtocích mobilní fáze 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Z grafu (Obrázek 8) opět vyplývá, že optimální průtoková rychlost mobilní fáze je pravděpodobně menší než 0,2 $\mu\text{l}/\text{min}$.



Obrázek 8: Graf závislosti výškového ekvivalentu výškového patra na lineární rychlosti toku mobilní fáze (85 % acetonitril) pro kolonu Chromolith® CapRod® RP-18e

Ze všech uvedených H/u křivek je patrné, že optimální průtokové rychlosti jsou nižší než uvedená testovaná rozmezí. Testování ještě nižších průtoků by vyžadovalo speciální moduly měření průtoku pro kapilární, případně až nanoLC, které však nebyly k dispozici. Ze všech uvedených H/u křivek vyplývá, že s nižší lineární rychlostí separace roste účinnost separace. V praxi by však optimální průtokové rychlosti znamenaly až příliš dlouhé analýzy v řádu až desítek hodin, proto musel být zvolen kompromis co nejnižšího průtoku a zároveň přijatelného času analýzy. Při porovnání křivek mezi jednotlivými kolonami vyplývá z naměřených dat, že nejnižší výškový ekvivalent, a tedy nejvyšší separační účinnosti bylo dosaženo pro kolonu Luna® C18(2) v mobilní fázi s methanolem.

3.2 Izokratická eluce

Z naměřených chromatogramů byly odečteny retenční časy t_R jednotlivých látek včetně jejich nečistot (APAP-NAC (n) a APAP-CYS (n)). Z hodnot retenčních časů pak byly vypočítány retenční faktory k podle Rovnice 3, jehož logaritmické hodnoty sloužily k sestrojení retenčních modelů (Rovnice 4). Lineární regresi experimentálních dat byly určeny parametry a a m , byly spočítány jejich směrodatné odchylky $SD(a)$ a $SD(m)$ a koeficient determinace R^2 . Tyto hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 1 pro mobilní fázi s acetonitrem a v Tabulce 2 pro mobilní fázi s methanolem. Zároveň byly pro obě mobilní fáze sestrojeny grafy (Obrázek 9, Obrázek 10) závislosti $\log k_i$ na φ_{ACN} (případně φ_{MeOH}). Pomocí sestrojených izokratických retenčních

modelů byly spočítány retenční faktory k pro koncentrace acetonitrilu od 5 do 50 % a methanolu od 10 do 50 %, které byly použity pro výpočet selektivity separace $r_{2,1}$ pomocí Rovnice 5 pro vybrané dvojice látek. Na závěr byla pro vybrané dvojice látek vypočítána rozlišení $R_{1,2}$ dle Rovnice 6 a byly sestrojeny okénkové diagramy. Pro výpočet rozlišení $R_{1,2}$ byla použita teoretická hodnota $N = 10000$.

Rovnice 3: Výpočet retenčního faktoru

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

kde t_R je retenční čas látky a t_M je mrtvý čas kolony.

Rovnice 4: Izokratický retenční model

$$\log k = a - m \cdot \varphi_{ACN}$$

kde a je retence ve vodné složce mobilní fáze, m je síla organického rozpouštědla a φ_{ACN} je koncentrace acetonitrilu.

Rovnice 5: Výpočet selektivity separace

$$r_{2,1} = \frac{k_2}{k_1}$$

kde k_1 je retenční faktor látky 1 a k_2 je retenční faktor látky 2.

Rovnice 6: Výpočet rozlišení pro látky 1 a 2

$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{N_1}}{4} \cdot \left(\frac{r_{2,1} - 1}{r_{2,1}} \right) \cdot \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right)$$

kde N je počet teoretických pater (účinnost), $r_{2,1}$ je selektivita separace a k je retenční faktor.

Tabulka 1: Hodnoty parametrů m a a , jejich směrodatné odchylky a koeficient determinace pro mobilní fázi s acetonitrilem

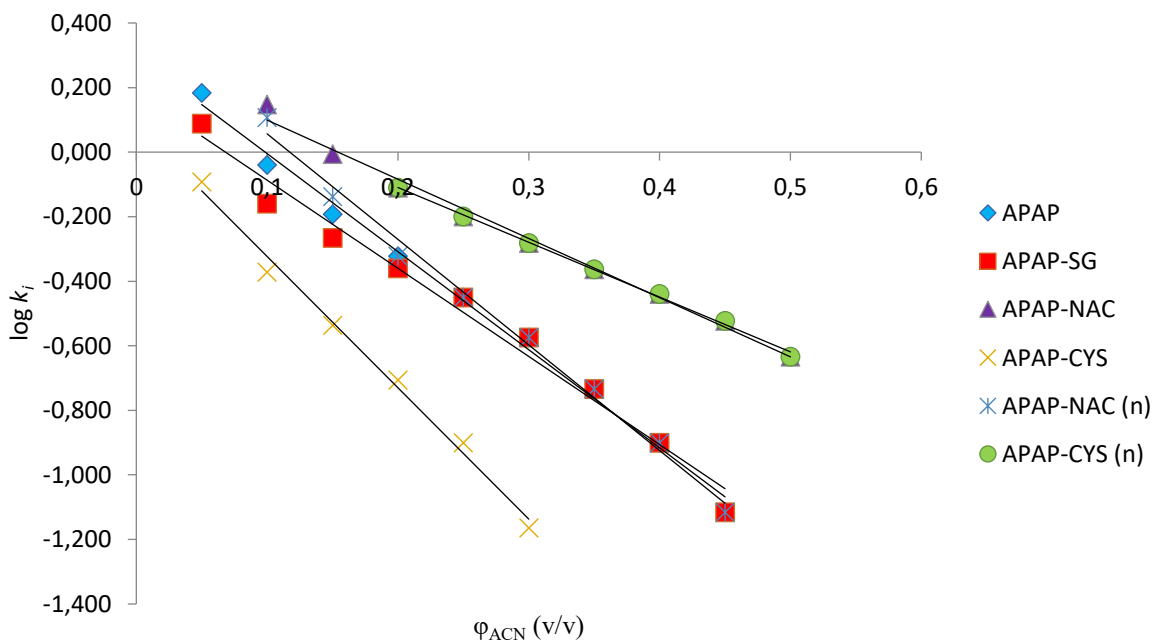
látka	m	$SD(m)$	a	$SD(a)$	R^2
APAP	3,038	0,076	0,299	0,012	0,993
APAP-SG	2,730	0,028	0,186	0,009	0,982
APAP-NAC	1,834	0,037	0,283	0,000	0,991
APAP-CYS	4,068	0,068	0,083	0,013	0,992
APAP-NAC (n)	3,270	0,081	0,384	0,014	0,992
APAP-CYS (n)	1,698	0,071	0,230	0,013	0,998

Tabulka 2: Hodnoty parametrů m a a , jejich směrodatné odchylky a koeficient determinace pro mobilní fázi s methanolem

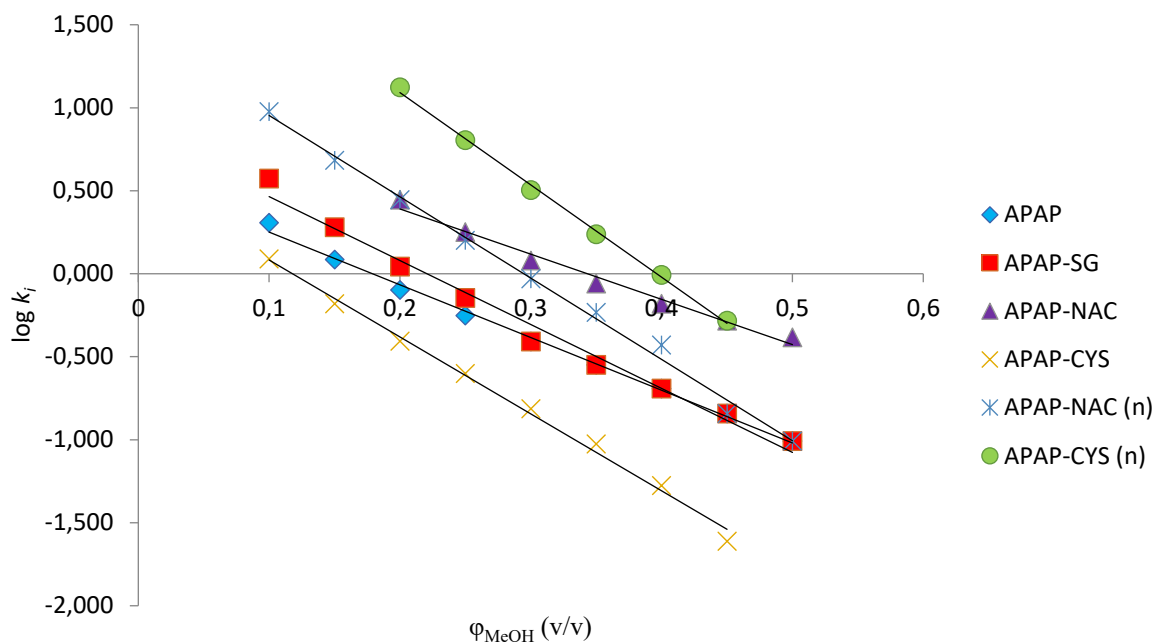
látka	m	$SD(m)$	a	$SD(a)$	R^2
APAP	3,176	0,021	0,568	0,004	0,996
APAP-SG	3,852	0,028	0,850	0,007	0,985
APAP-NAC	2,724	0,009	0,935	0,001	0,983
APAP-CYS	4,634	0,089	0,546	0,015	0,995
APAP-NAC (n)	4,898	0,028	1,443	0,007	0,995
APAP-CYS (n)	5,560	0,009	2,201	0,003	0,998

Z grafů (Obrázek 9 a Obrázek 10) vyplývá, že pro separaci APAP metabolitů je lepší mobilní fáze obsahující směs vody s 0,2 % kyseliny octové a methanolu s 0,2 % kyseliny octové. Při použití acetonitrilu byla retence látek velmi nízká, látky měly podobné retenční faktory a neseperoaly se. Přijatelných retenčních faktorů bylo dosaženo až při velmi nízkém podílu acetonitrilu v mobilní fázi.

Při použití mobilní fáze s methanolem byly retenční faktory vyšší i při vyšším podílu methanolu v mobilní fázi. Methanol tedy poskytuje širší dynamické rozmezí vlivu na retenci těchto látek, což indikuje, že bude lepší volbou pro separaci.



Obrázek 9: Graf závislosti $\log k_i$ na ϕ_{ACN}

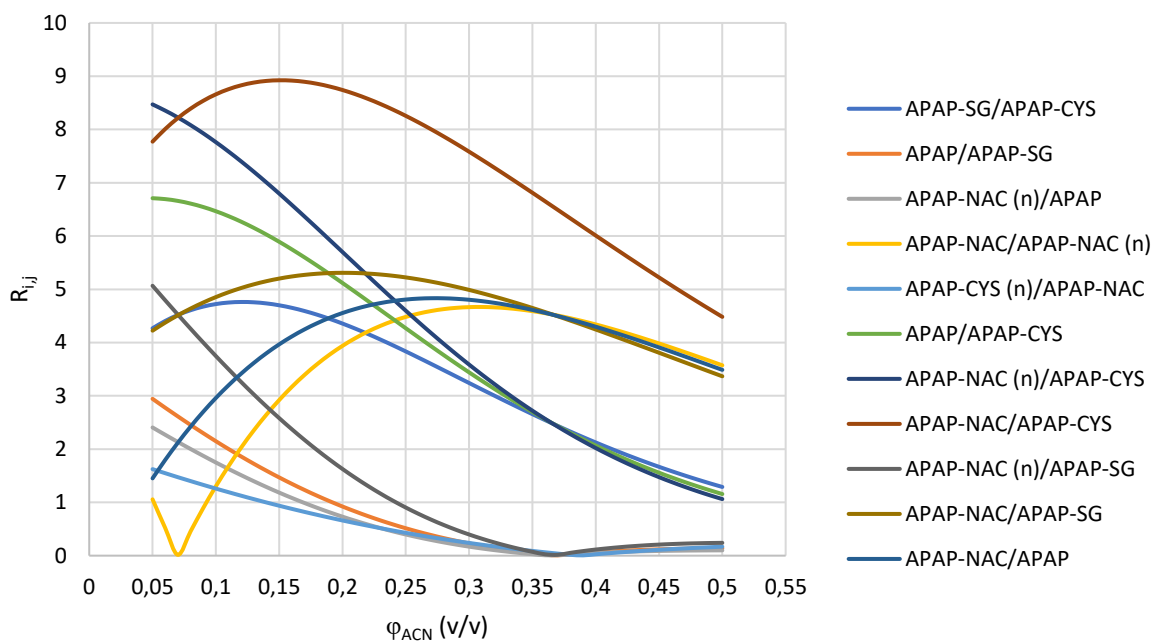


Obrázek 10: Graf závislosti $\log k_i$ na φ_{MeOH}

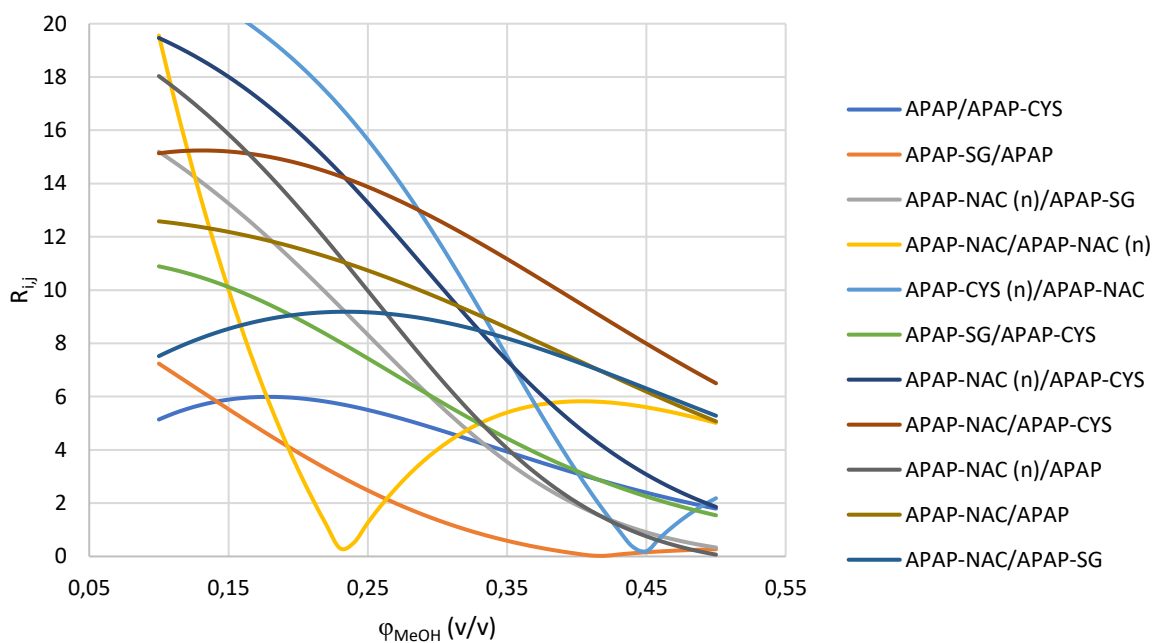
Z okénkového diagramu pro mobilní fázi s acetonitrilem (Obrázek 11) vyplývá, že optimální rozlišení pro kritické dvojice látek – APAP-NAC/APAP-NAC (n) a APAP-CYS (n)/APAP-NAC je při koncentraci acetonitrilu 10 % (v/v). Jedná se však o poměrně strmé a nepřilíš robustní maximum (v úzkém rozmezí koncentrací od maximálního rozlišení klesá). Rozlišení pro všechny sledované látky je v tomto případě vyšší než 1,26. Reálný chromatogram separovaných látek s použitím mobilní fáze 10 % (v/v) acetonitrilu je na Obrázku 13. U této separace je zjevné, že optimálního rozlišení všech látek nebylo dosaženo (kritickým párem je zde APAP-NAC a nečistota APAP-NAC(n)) a to díky nižší účinnosti kolony, než byla použita při výpočtu okénkového diagramu.

Při použití mobilní fáze s methanolem byla z okénkového diagramu (Obrázek 12) odvozena koncentrace methanolu $\varphi_{\text{MeOH}} = 14$ % (v/v) při optimálním rozlišení pro kritické dvojice látek – APAP/APAP-CYS a APAP-SG/APAP. Rozlišení pro všechny látky je v tomto případě vyšší než 5,87. Oblast maximálního rozlišení je poměrně plochá a jedná se tak o robustní podmínky separace (malá změna koncentrace nepovede k velké změně rozlišení). Další možností separace s rozlišením vyšším než 2 je mobilní fáze s koncentrací 26 % (v/v), které však není robustní a v praxi by díky nižší separační účinnosti, než uvažované při výpočtu nebyla směs za těchto podmínek rozdělena. Na Obrázku 14 je znázorněn reálný chromatogram při použití mobilní fáze 15 % (v/v) methanolu, při kterém je rozlišení pro všechny látky vyšší než 5,53. V tomto případě došlo k úspěšnému dělení všech látek, díky použití izokratické eluce je však retenční

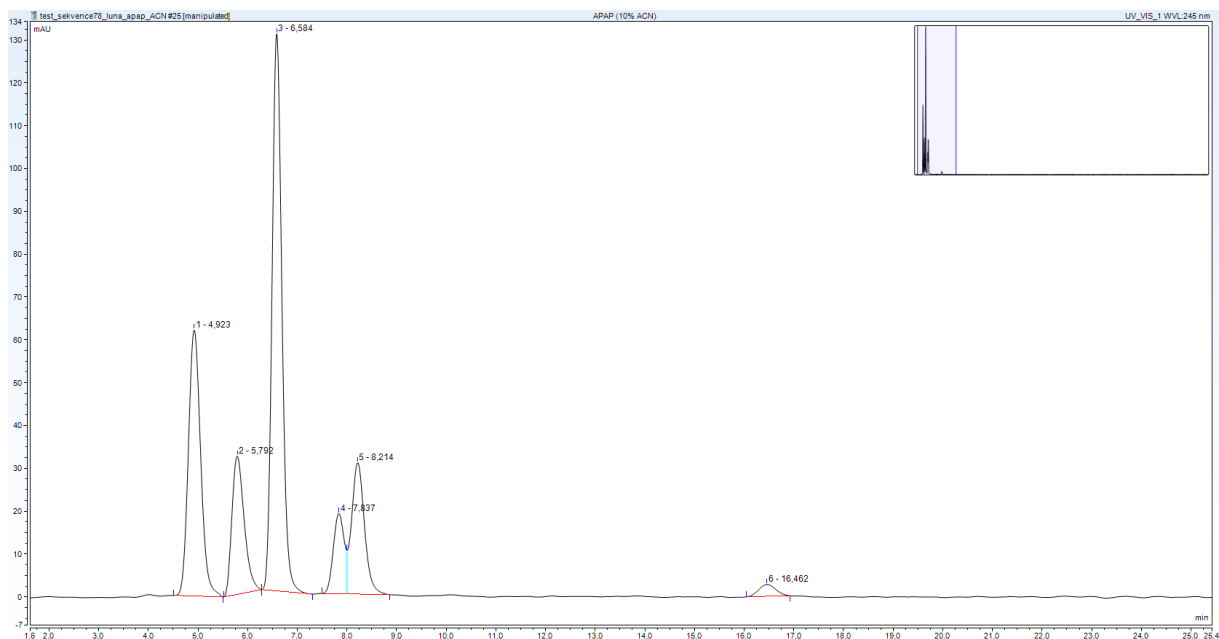
čas nečistoty APAP-CYS(n) příliš velký. Proto byly následné experimenty věnovány gradientové eluci.



Obrázek 11: Okénkový diagram pro mobilní fázi s acetonitrilem s průtokem 10 µl/min

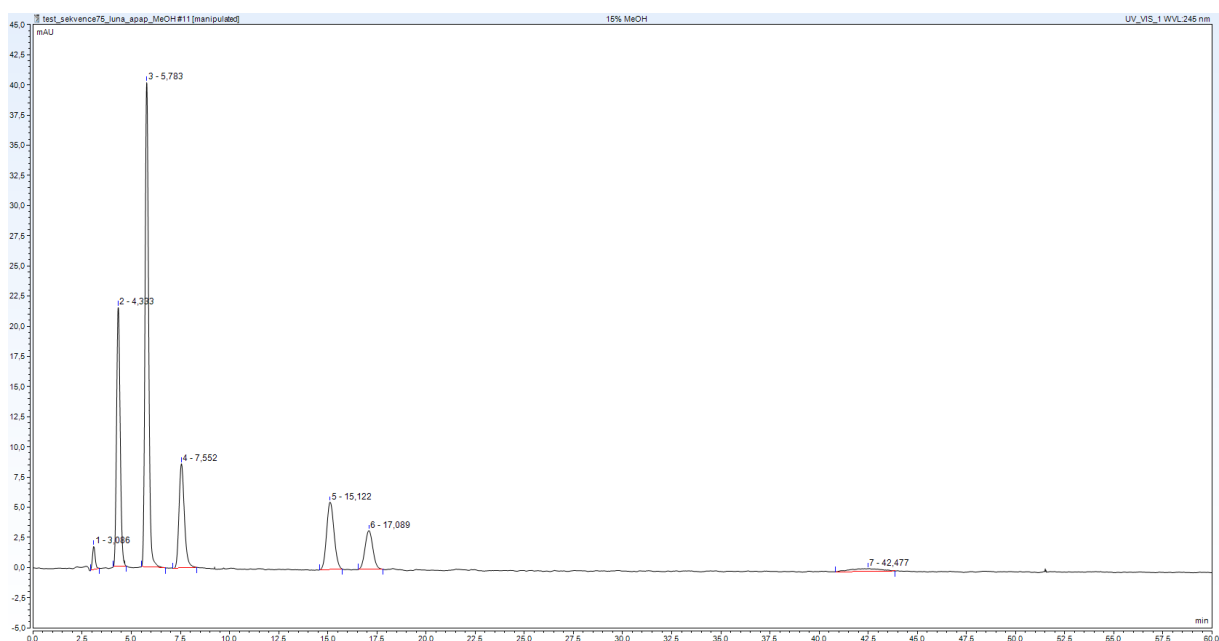


Obrázek 12: Okénkový diagram pro mobilní fázi s methanolem s průtokem 20 µl/min



Obrázek 13: Chromatogram standardů v mobilní fázi 10 % acetonitrilu s 0,2 % kyseliny octové s průtokem MF 10 μ l/min

pořadí eluce: APAP-CYS, APAP-SG, APAP, APAP-NAC (n), APAP-NAC, APAP-CYS (n)



Obrázek 14: Chromatogram standardů v mobilní fázi 15 % methanolu s 0,2 % kyseliny octové s průtokem MF 20 μ l/min

pořadí eluce: neznámá látka, APAP-CYS, APAP, APAP-SG, APAP-NAC, APAP-NAC (n), APAP-CYS (n)

3.3 Gradientová eluce

Testované sloučeniny byly separovány pomocí gradientové eluce se šesti gradientovými profily, a to jak s acetonitrilem, tak i s methanolem v mobilní fázi. Z parametrů použitých gradientů byly sestrojeny dva grafy závislosti koncentrace acetonitrilu (nebo methanolu) na čase separace pro obě mobilní fáze a byly vypočítány strmosti gradientů podle *Rovnice 7*, které jsou uvedeny v *Tabulce 3*.

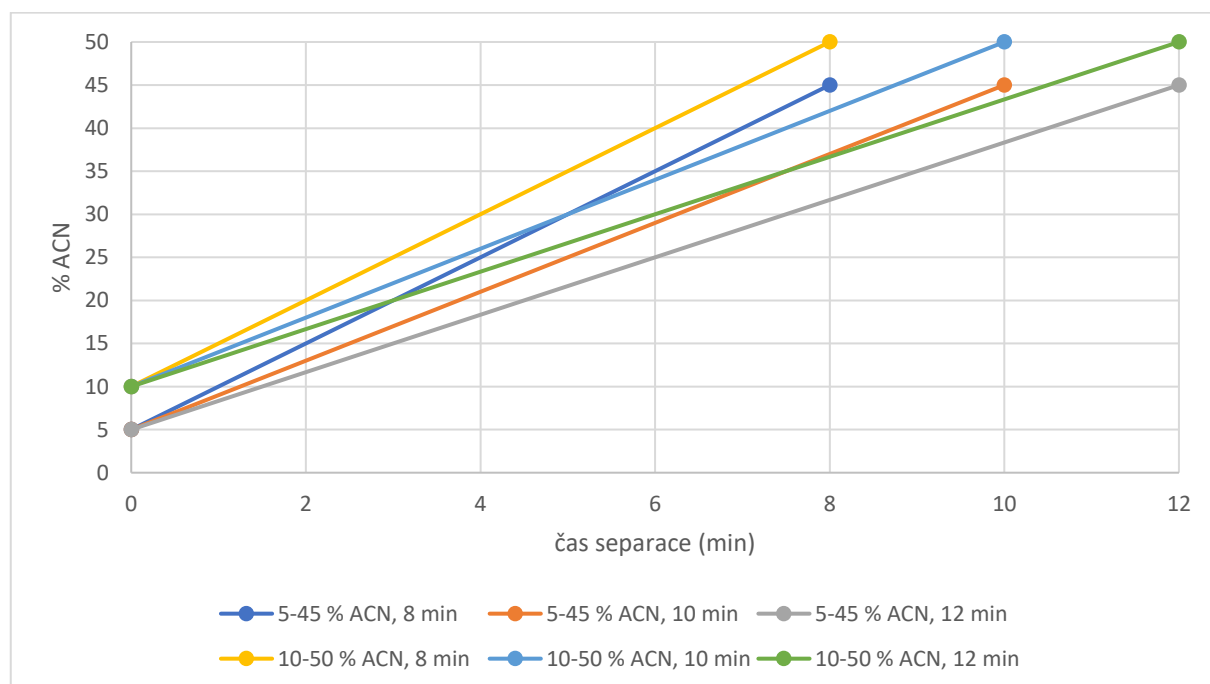
Rovnice 7: Výpočet strmosti gradientu

$$B = \frac{\varphi_G - A}{t_G}$$

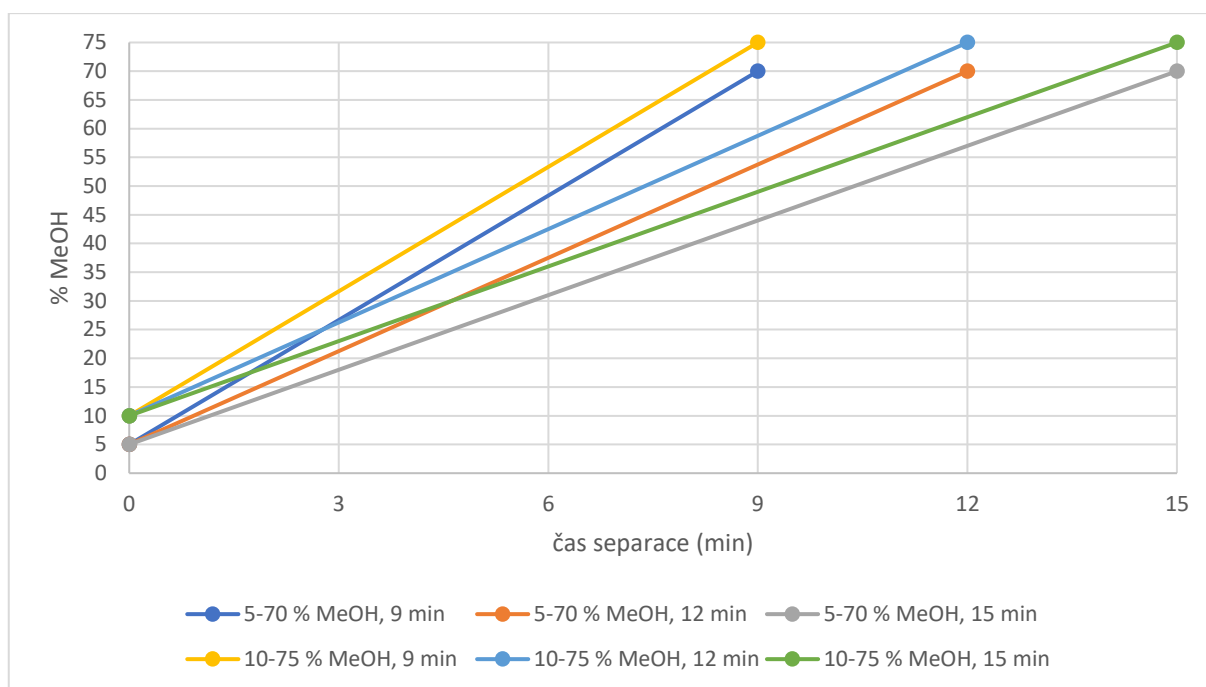
kde φ_G je konečná koncentrace gradientu, A je počáteční koncentrace gradientu a t_G je čas separace.

Tabulka 3: Strmosti gradientů v různých časech separace

acetonitril		methanol	
strmost (min ⁻¹)	čas separace (min)	strmost (min ⁻¹)	čas separace (min)
5,00	8	7,22	9
4,00	10	5,42	12
3,33	12	4,33	15



Obrázek 15: Graf strmosti gradientů pro mobilní fázi s acetonitrilem s průtokem MF 10 μ l/min



Obrázek 16: Graf strmostí gradientů pro mobilní fázi s methanolem s průtokem MF 20 $\mu\text{l}/\text{min}$

Pro sestavení gradientových okénkových diagramů byl vybrán jeden profil gradientu na jednu mobilní fázi (tj. acetonitril a methanol) a byly vypočítány retenční objemy jednotlivých látek $V_{R,g}$ v těchto gradientech podle Rovnice 8. Pro mobilní fázi s acetonitrem s průtokem 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ byl vybrán gradient 5 – 45 % ACN a pro mobilní fázi s methanolem s průtokem 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ gradient 5 – 85 % MeOH v teoretických časech gradientu od 1 do 25 min (okénkový diagram tedy postihuje různou strmost gradientu). Nejprve byly pro všechny časy gradientu t_G spočítány jejich objemy V_G podle Rovnice 9, dále pak strmosti gradientu B podle Rovnice 10. Parametry a a m byly vypočítány z řady izokratických analýz, viz. Tabulka 1 a Tabulka 2. Dále byly vypočítány okamžité retenční faktory v bodě eluce k_e pomocí Rovnice 11 a šířky pík látek v gradientu w_G pomocí Rovnice 12. Na závěr byla vypočítána rozlišení $R_{1,2}$ pro vybrané dvojice látek podle Rovnice 13. Pro výpočet rozlišení $R_{1,2}$ byla použita hodnota $N = 10000$.

Rovnice 8: Výpočet retenčních objemů látek v gradientu

$$V_{R,g} = \frac{1}{mB} \log(2,31 \cdot mB \cdot V_M \cdot 10^{(a-mA)}) + V_M$$

kde m a a jsou parametry z Rovnice 4, B je strmost gradientu, V_M je mrtvý objem a A je začátek gradientu.

Rovnice 9: Výpočet objemů mobilní fáze v gradientu

$$V_G = t_G \cdot F_m$$

kde t_G je čas separace a F_m je průtok mobilní fáze.

Rovnice 10: Výpočet strmosti gradientu

$$B = \frac{\varphi_G - A}{V_G}$$

kde φ_G je konec gradientu, A je začátek gradientu a V_G je objem mobilní fáze v gradientu.

Rovnice 11: Výpočet okamžitého retenčního faktoru

$$k_e = \frac{1}{2,31 \cdot mB \cdot V_M + 10^{(mA-a)}}$$

kde m a a jsou parametry z *Rovnice 4*, B je strmost gradientu, V_M je mrtvý objem a A je začátek gradientu.

Rovnice 12: Výpočet šířky píku v gradientu

$$w_G = \frac{4 \cdot V_M}{\sqrt{N_{iso}}} (1 + k_e)$$

kde V_M je mrtvý objem, N_{iso} je počet izokratických teoretických pater (účinnost) a k_e je okamžitý retenční faktor.

Rovnice 13: Výpočet rozlišení pro látky 1 a 2 v gradientu

$$R_{1,2} = \frac{2 (V_{R,2} - V_{R,1})}{w_{G,1} + w_{G,2}}$$

kde $V_{R,2}$ je retenční objem látky 2, $V_{R,1}$ je retenční objem látky 1, $w_{G,1}$ je šířka píku v gradientu látky 1 a $w_{G,2}$ je šířka píku v gradientu látky 2.

Kromě rozlišení kritických dvojic látek byl také pro obě mobilní fáze vyhodnocen normalizovaný produkt rozlišení r , který byl vypočítán pomocí *Rovnice 14*.

Rovnice 14: Výpočet normalizovaného produktu rozlišení

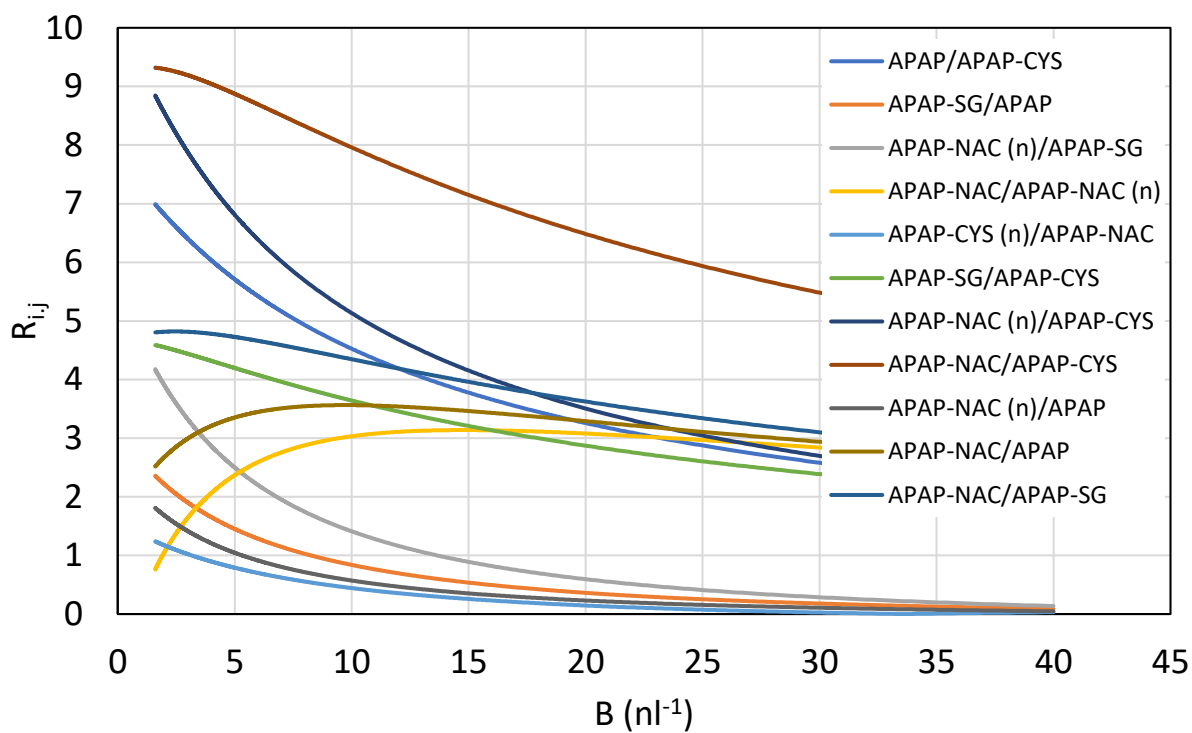
$$r = \prod_{i=1}^{n-1} \frac{R_{Si,i} + 1}{\bar{R}_S}$$

kde $R_{Si,i}$ je rozlišení dvojice látek a \bar{R}_S je průměrné rozlišení všech dvojic látek.

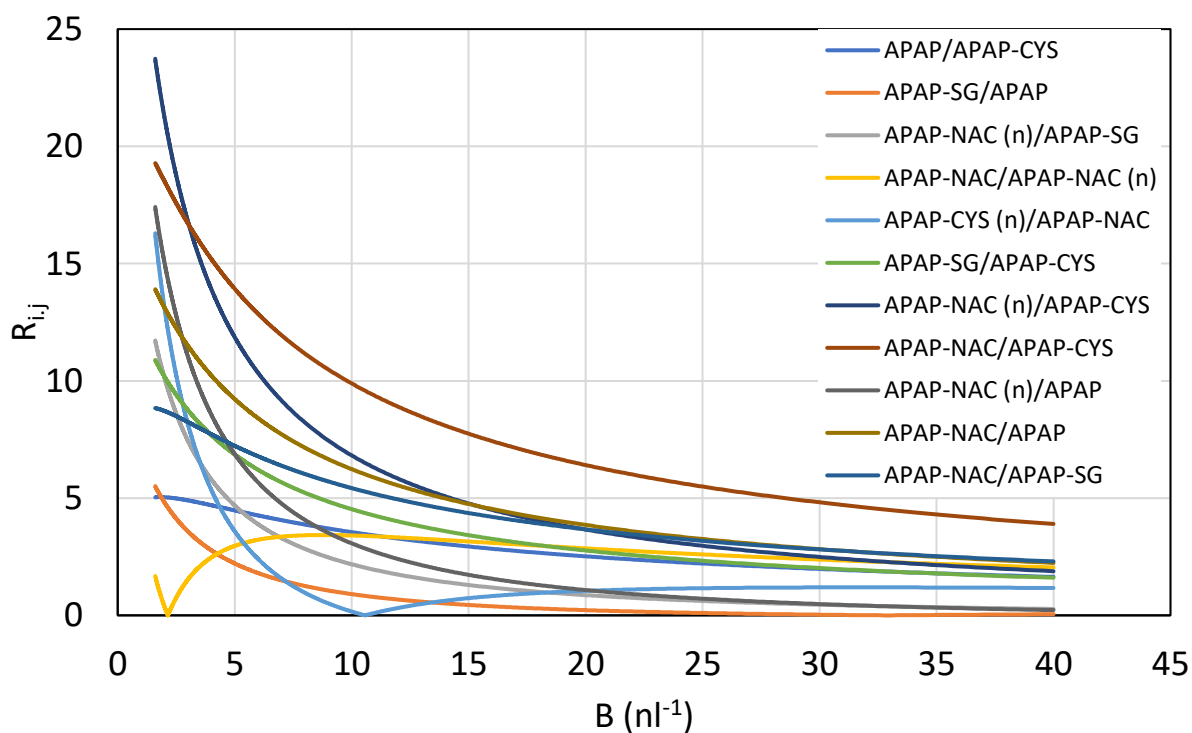
Okénkové diagramy (*Obrázek 17* a *Obrázek 18*) zobrazují významné rozdíly při použití mobilních fází s acetonitrilem a methanolem. Z okénkového diagramu (*Obrázek 17*) je patrné, že vypočtené optimální rozlišení kritických dvojic látek – APAP-NAC/APAP-NAC (n) a APAP-CYS (n)/APAP-NAC v mobilní fázi s acetonitrilem je při hodnotě $B = 1,9 \text{ nl}^{-1}$. Tato hodnota odpovídá času gradientu $t_G = 21 \text{ min}$ a rozlišení $R \geq 1,2$ pro všechny sledované látky. Optimální strmost gradientu z grafu normalizovaného produktu rozlišení (*Obrázek 19*) byla $B = 3,2 \text{ nl}^{-1}$, což odpovídá rozlišení $R \geq 1,0$ pro všechny látky (*Obrázek 17*), tato strmost odpovídá času gradientu $t_G = 12 \text{ min}$. Tento gradient ($B = 3,2 \text{ nl}^{-1}$) byl změřen také experimentálně a jeho chromatogram je na *Obrázku 23*.

Při použití mobilní fáze s methanolem bylo optimální rozlišení kritických dvojic látek – APAP-NAC/APAP-NAC (n) a APAP-SG/APAP nalezeno při hodnotě $B = 4,3 \text{ nl}^{-1}$, což odpovídá času gradientu $t_G = 9,3 \text{ min}$ s rozlišením $R \geq 2,65$ pro všechny látky. Tento gradient byl poté testován experimentálně a jeho chromatogram je znázorněn na *Obrázku 24*, ze kterého je patrné, že separace APAP a APAP-SG není úplná. V praxi byla optimální strmost gradientu o něco nižší ($B = 3,3 \text{ nl}^{-1}$) a odpovídala času gradientu $t_G = 12 \text{ min}$, prodloužením celkové doby analýzy také pravděpodobně vzrostla píková kapacita. Reálný chromatogram tohoto gradientu je na *Obrázku 25*. Optimální strmost gradientu z grafu normalizovaného produktu rozlišení (*Obrázek 20*) byla $B = 4,74 \text{ nl}^{-1}$, tato hodnota odpovídá času gradientu $t_G = 8,5 \text{ min}$ a rozlišení $R \geq 2,8$ pro všechny látky, tato strmost je však posunuta ve prospěch ostatních látek a ze stejných výše uvedených důvodů byla v praxi použita již zmíněná strmost ($B = 3,3 \text{ nl}^{-1}$) odpovídající $t_G = 12 \text{ min}$.

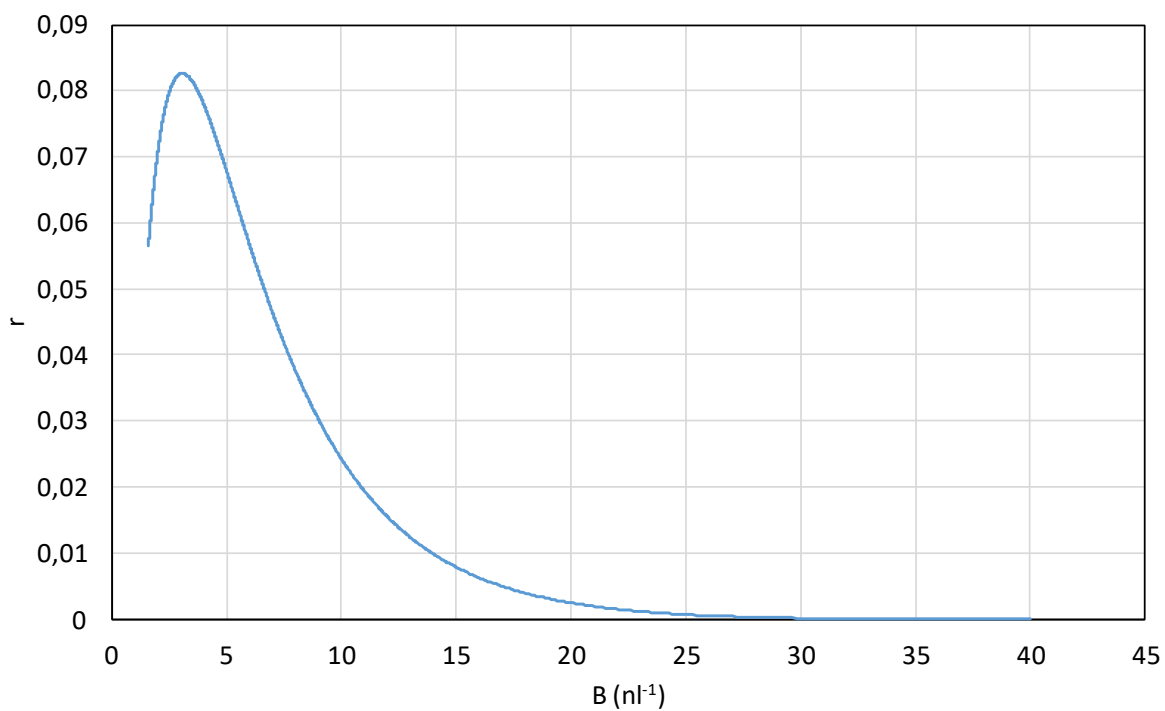
Následně byly vytvořeny grafy závislosti V_R/V_M na strmosti gradientu B pro obě mobilní fáze. Z těchto grafů (*Obrázek 21* a *Obrázek 22*) lze vyvozovat, že s menší strmostí gradientu roste retence látek. V případě mobilní fáze s methanolem retence látek končí na vyšších hodnotách (V_R/V_M (APAP-SG) = 3) než u mobilní fáze s acetonitrilem (V_R/V_M (APAP-SG) = 1,93). Methanol tedy poskytuje širší dynamické rozmezí vlivu na retenci těchto látek.



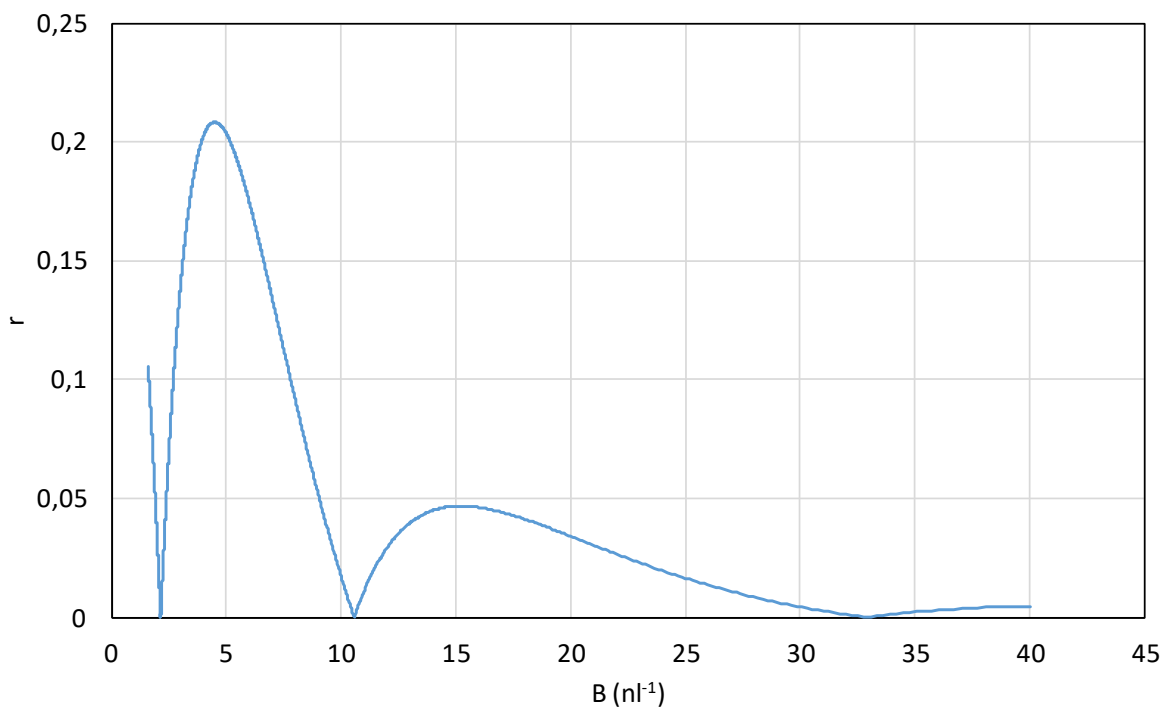
Obrázek 17: Okénkový diagram pro gradientovou eluci v mobilní fázi s acetonitrilem s průtokem MF 10 $\mu\text{l}/\text{min}$



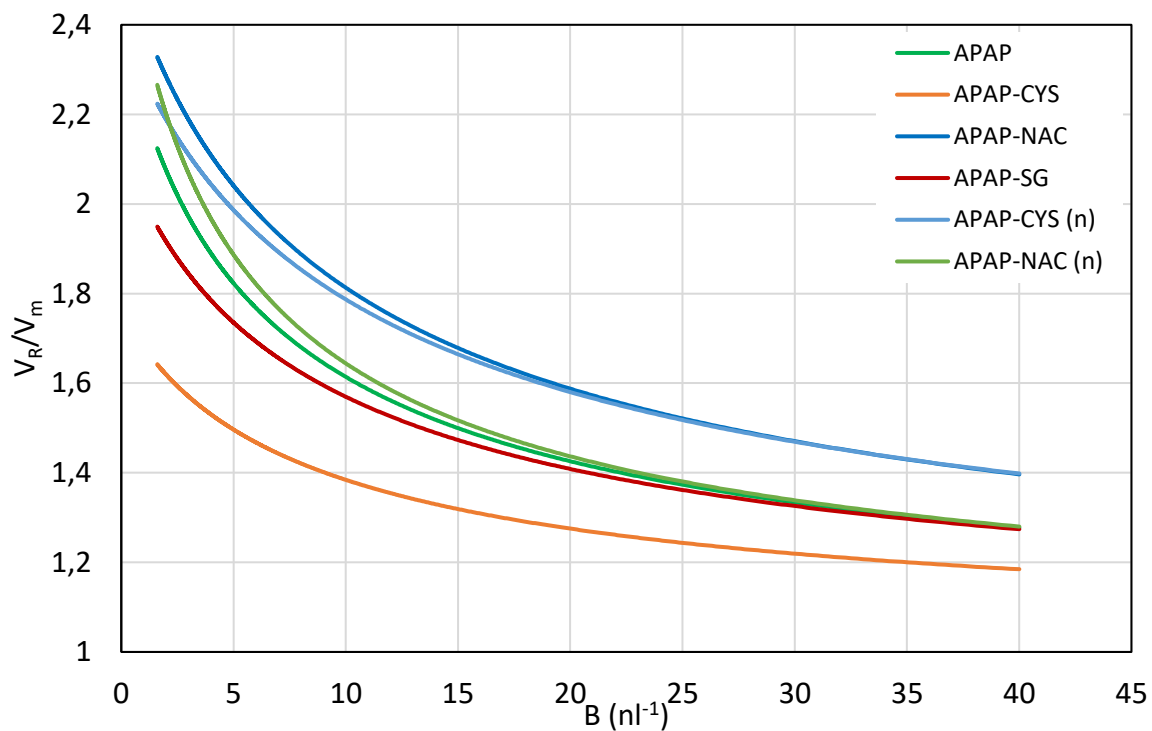
Obrázek 18: Okénkový diagram pro gradientovou eluci v mobilní fázi s methanolem s průtokem MF 20 $\mu\text{l}/\text{min}$



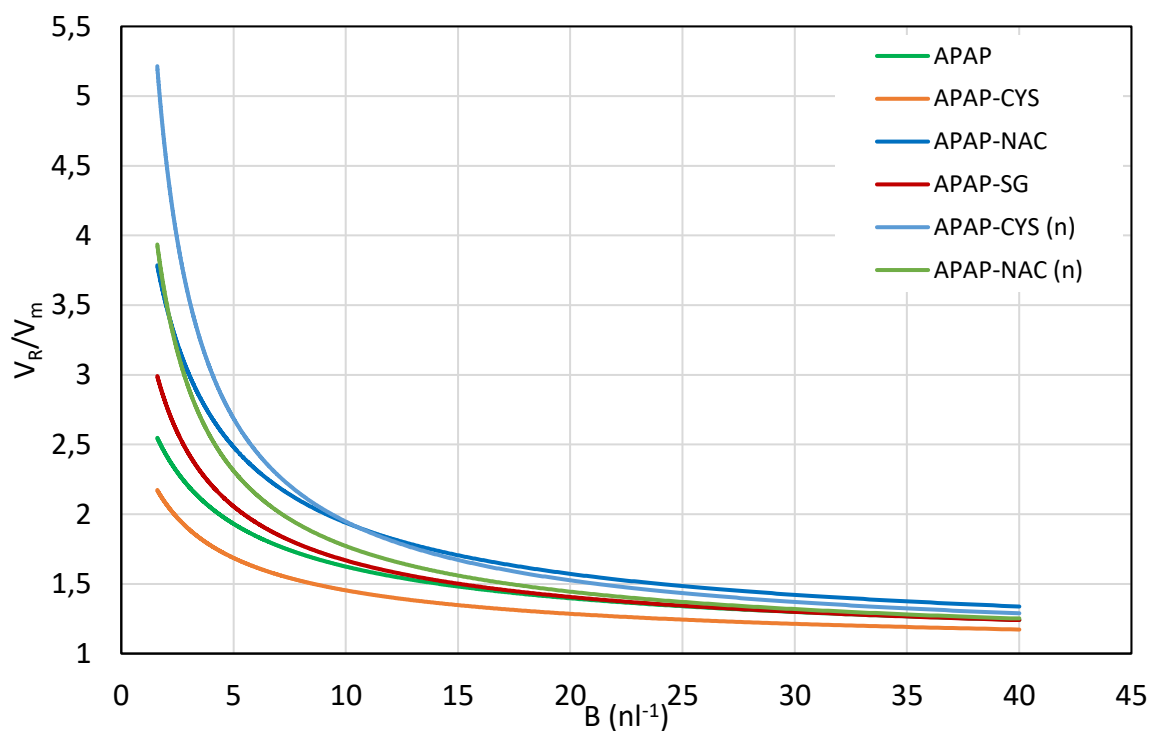
Obrázek 19: Graf závislosti normalizovaného produktu rozlišení na strmosti gradientu pro mobilní fázi s acetonitrilem s průtokem MF 10 $\mu\text{l}/\text{min}$



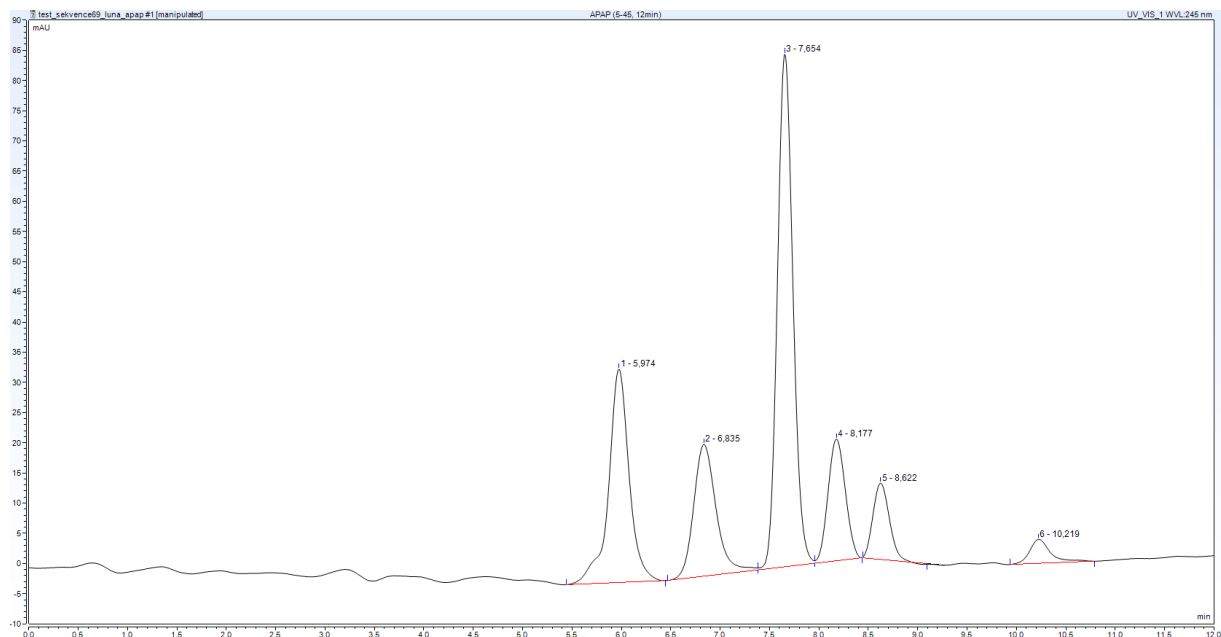
Obrázek 20: Graf závislosti normalizovaného produktu rozlišení na strmosti gradientu pro mobilní fázi s methanolem s průtokem MF 20 $\mu\text{l}/\text{min}$



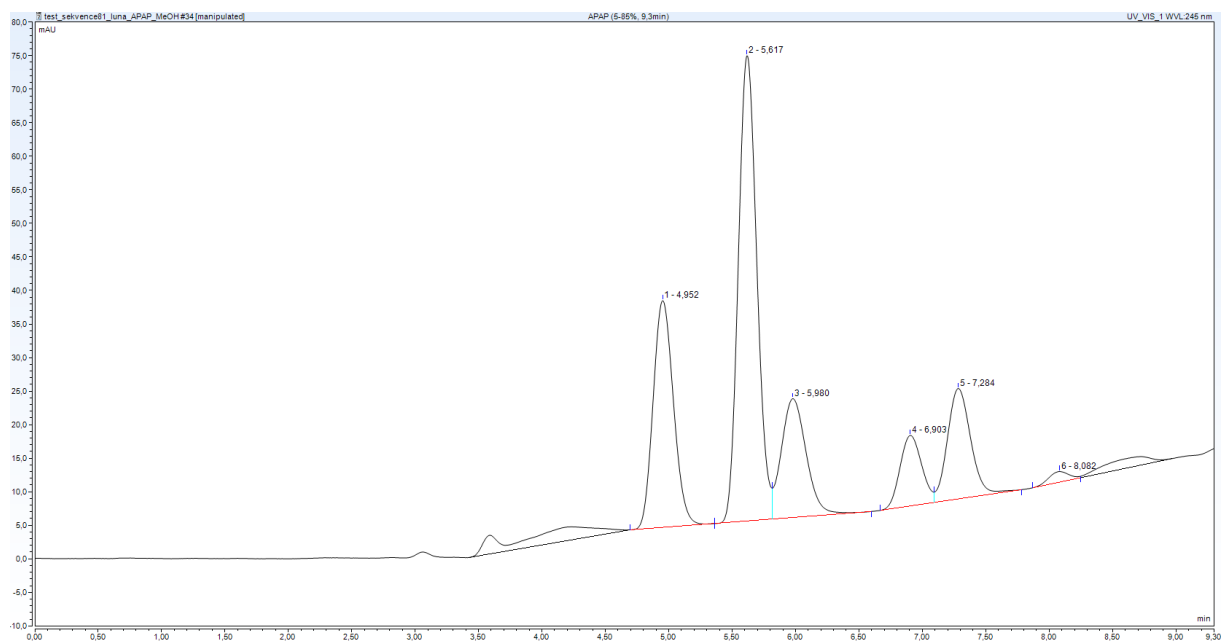
Obrázek 21: Graf závislosti V_R/V_M na strmosti gradientu pro mobilní fázi s acetonitrilem s průtokem MF 10 $\mu l/min$



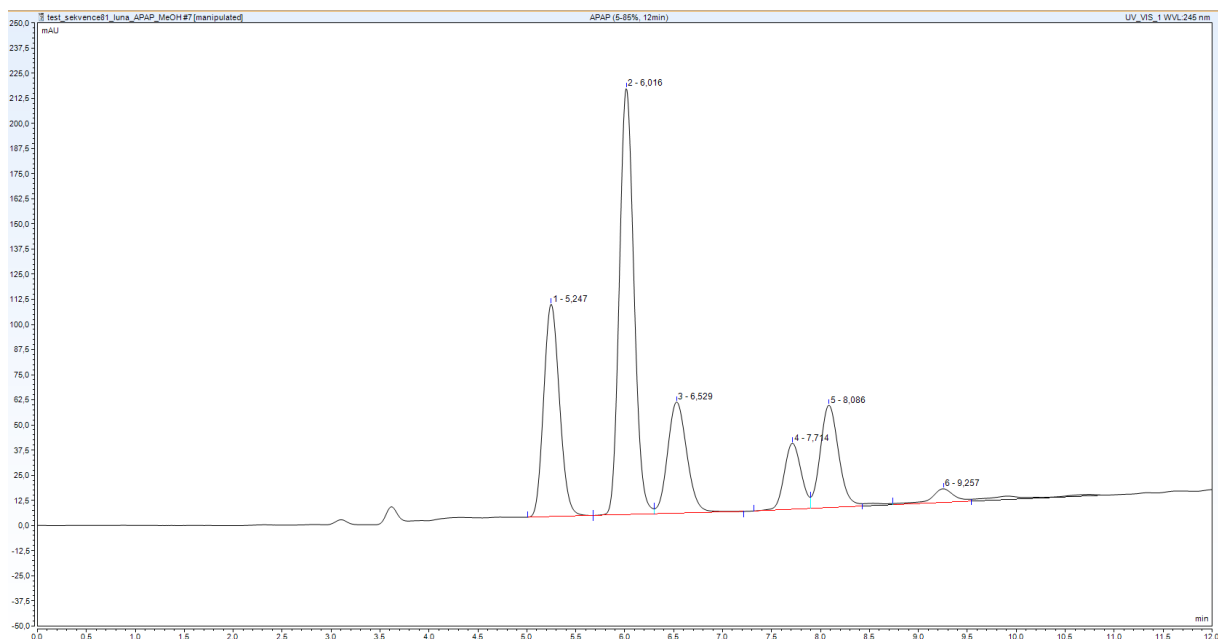
Obrázek 22: Graf závislosti V_R/V_M na strmosti gradientu pro mobilní fázi s methanolem s průtokem MF 20 $\mu l/min$



Obrázek 23: Chromatogram standardů s gradientem 5 – 45% acetonitrilu v čase 0 – 12 min s průtokem MF 10 μ l/min
 pořadí eluce: APAP-CYS, APAP-SG, APAP, APAP-NAC, APAP-NAC (n), APAP-CYS (n)



Obrázek 24: Chromatogram standardů s gradientem 5 - 85 % methanolu v čase 0 – 9,3 min s průtokem MF 20 μ l/min
 pořadí eluce: APAP-CYS, APAP, APAP-SG, APAP-NAC (n), APAP-NAC, APAP-CYS (n)

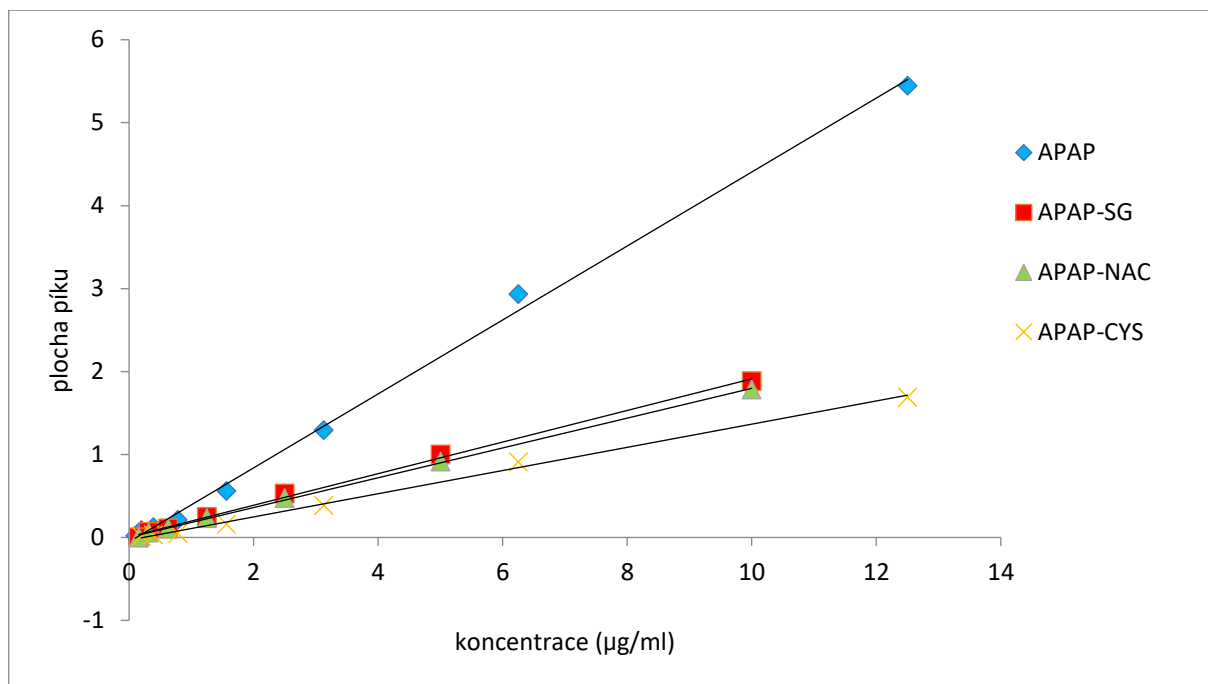


Obrázek 25: Chromatogram standardů s gradientem 5 - 85 % methanolu v čase 0 - 12 min s průtokem MF 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ pořadí eluce: APAP-CYS, APAP, APAP-SG, APAP-NAC (n), APAP-NAC, APAP-CYS (n)

3.4 Stanovení meze detekce a linearity

Pro stanovení meze detekce a linearity látek byla vybrána kolona Luna® C18(2) a mobilní fáze obsahující směs vody s 0,2 % kyseliny octové (složka A) a methanolu s 0,2 % kyseliny octové (složka B) s gradientem 5 – 85 % methanolu v čase 0 – 12 min a s průtokem MF 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Z naměřených kalibračních křivek (*Obrázek 26*) byly vyhodnoceny meze detekce (*LOD*) a linearita pro každou z látek. Pro APAP-CYS bylo stanoveno $LOD = 0,195 \mu\text{g}/\text{ml}$ a z grafu kalibrační křivky (*Obrázek 26*) linearita v rozmezí koncentrací 0,195 – 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Pro APAP bylo určeno $LOD = 0,098 \mu\text{g}/\text{ml}$ a z grafu (*Obrázek 26*) linearita v rozmezí koncentrací 0,098 – 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Pro APAP-SG bylo stanoveno $LOD = 0,156 \mu\text{g}/\text{ml}$ a z grafu (*Obrázek 26*) je vidět lineární závislost v rozmezí 0,156 – 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. APAP-NAC obsahoval podstatný podíl nečistoty, *LOD* tedy nelze přesně určit, ale pouze odhadnout, nicméně křivka APAP-NAC z grafu (*Obrázek 26*) značí jasnou lineární závislost. Všechny hodnoty jsou také uvedeny v *Tabulce 4*.



Obrázek 26: Kalibrační křivky pro APAP, APAP-SG, APAP-NAC a APAP-CYS

Tabulka 4: Hodnoty směrnice, úseku, koeficientu determinace R^2 , LOD a rozmezí linearity

látka	směrnice	úsek	R^2	LOD (µg/ml)	rozmezí linearity (µg/ml)
APAP	0,4458	-0,0526	0,9975	0,098	0,098 – 12,5
APAP-SG	0,1905	0,0075	0,9977	0,156	0,156 – 10
APAP-NAC	0,1796	0,0013	0,9992	-	-
APAP-CYS	0,1398	-0,0317	0,9968	0,195	0,195 – 12,5

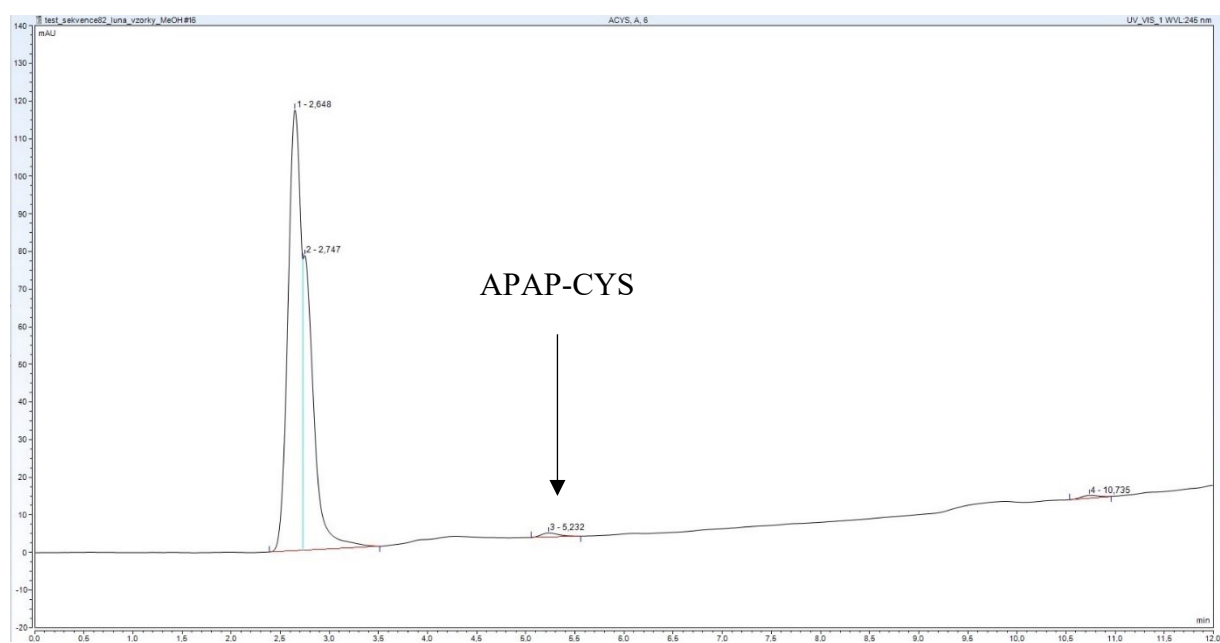
3.5 Separace metabolitů acetaminofenu v reálném vzorku

Pro demonstraci separace byly použity vzorky buněčné linie lidských ledvin HK-2, připravené na Katedře biologických a biochemických věd. Pro separaci byla použita kolona Luna® C18(2) a mobilní fáze obsahující směs vody s 0,2 % kyseliny octové (složka A) a methanolu s 0,2 % kyseliny octové (složka B) s gradientem 5 – 85 % methanolu v čase 0 – 12 min s průtokem MF 20 µl/min. Ukázkový chromatogram vzorku, který obsahoval směs HK-2 buněk ovlivněných acetaminofenem je na *Obrázku 29*.

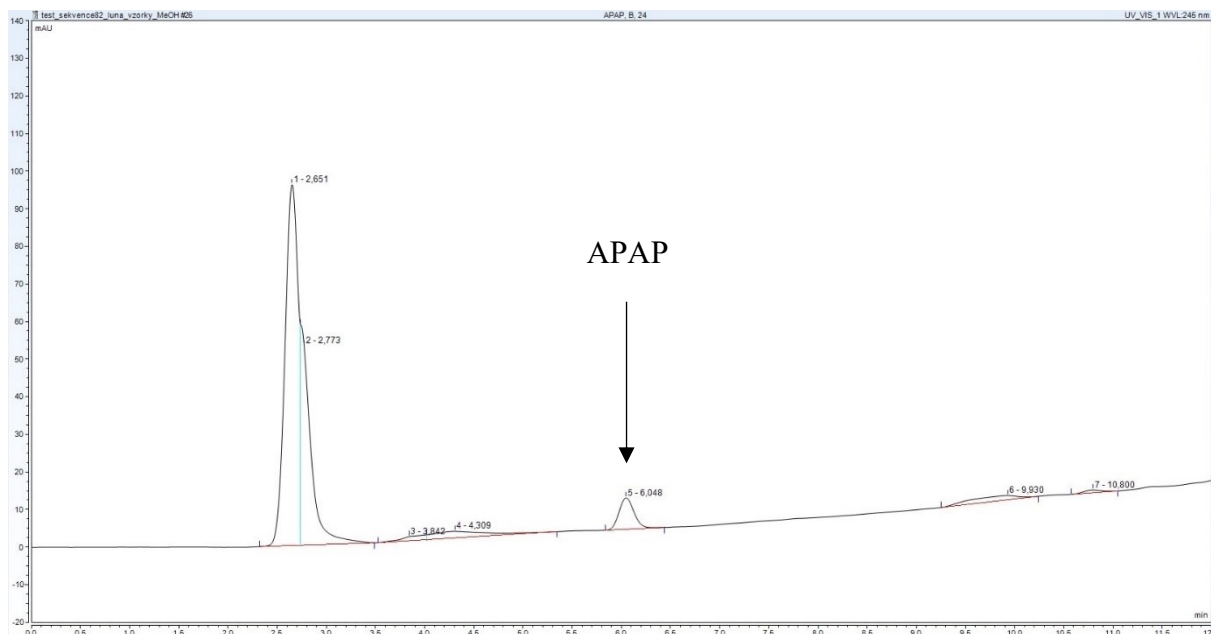
Ve vzorcích byly nalezeny APAP a APAP-CYS, ostatní metabolity (APAP-SG, APAP-NAC) ve vzorcích přítomny nebyly, nebo byla jejich koncentrace menší než mez detekce. Z naměřených chromatogramů byly odečteny plochy píků a pomocí grafu kalibračních křivek

(Obrázek 26) závislosti plochy píku na koncentraci nalezených metabolitů APAP a APAP-CYS byly vypočítány koncentrace APAP a APAP-CYS v reálných vzorcích.

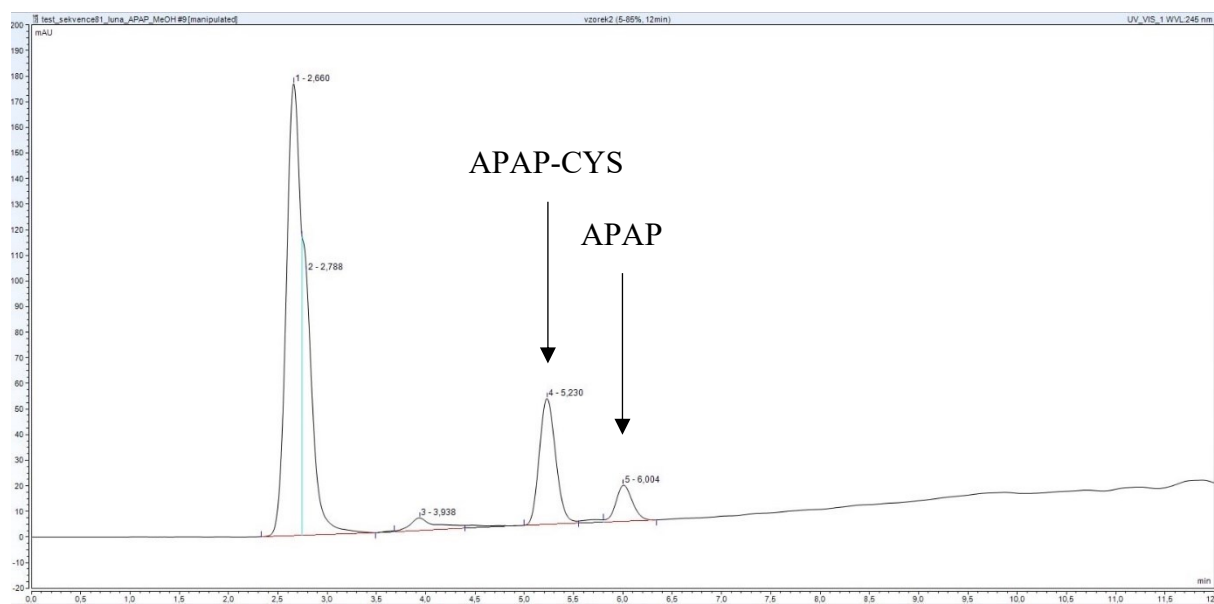
Vzorky buněčné linie lidských ledvin HK-2 ovlivněné metabolitem APAP-CYS byly odebrány po 6 a 24 hodinách od podání. Ve vzorku odebraném po 6 hodinách byla nalezena koncentrace $c_{APAP-CYS} = 1,84 \mu\text{g/ml}$, ve vzorku odebraném po 24 hodinách již APAP-CYS nebyl nalezen, tedy byl plně metabolizován nebo byla koncentrace menší než jeho LOD. Vzorky buněčné linie lidských ledvin HK-2 ovlivněné acetaminofenem byly odebrány taktéž po 6 a 24 hodinách od podání. Ve vzorku odebraném po 6 hodinách nebyl nalezen žádný metabolit (nebo byly jejich koncentrace pod jejich mezí detekce), ve vzorku odebraném po 24 hodinách byla nalezena koncentrace $c_{APAP} = 3,425 \mu\text{g/ml}$. Ukázkové chromatogramy vzorků jsou na Obrázku 27 (HK-2 ovlivněné APAP-CYS) a Obrázku 28 (HK-2 ovlivněné APAP).



Obrázek 27: Chromatogram vzorku buněčné linie lidských ledvin HK-2 ovlivněné metabolitem APAP-CYS (odběr po 6 h)



Obrázek 28: Chromatogram vzorku buněčné linie lidských ledvin HK-2 ovlivněné acetaminofenem (odběr po 24 h)



Obrázek 29: Chromatogram vzorku směsi buněčných linií lidských ledvin HK-2 ovlivněné acetaminofenem

4 ZÁVĚR

Diplomová práce pojednává o mikrokolonové a kapilární chromatografii oxidačních metabolitů acetaminofenu v systému s obrácenými fázemi s izokratickou a gradientovou elucí.

Byla vypracována literární rešerše, která se zabývá paracetamolem a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Nejprve byla pozornost věnována paracetamolu a jeho mechanismu účinku, metabolismu a toxicitě včetně fází otravy, rizikových faktorů a léčby. Druhá půlka teoretické části byla zaměřena na vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, přičemž byla podrobně rozebrána mikrokolonová chromatografie a její výhody, využití a instrumentace. Závěr byl věnován metodám stanovení metabolitů acetaminofenu.

Cíle experimentální práce spočívaly v otestování vybraných kolon vhodných pro separaci acetaminofenu a jeho oxidačních metabolitů, proměřit a sestavit retenční modely na základě izokratických a gradientových dat a optimalizovat gradientový profil pro separaci metabolitů.

Vybrané kolony Luna® C18(2), Kinetex® XB-C18, Ascentis® Express C18 a Chromolith® CapRod® RP-18e byly v experimentální části nejprve porovnány dle van Deemterových křivek. Následně byly proměřeny a sestaveny retenční modely z izokratických a poté i z gradientových dat. Optimalizovaný gradientový profil byl na závěr demonstrován na separaci oxidačních metabolitů acetaminofenu ve vzorcích buněčné linie lidských ledvin HK-2. Použití mikrokolonové LC přineslo významnou výhodu v podobě nižší spotřeby rozpouštědel při analýze v porovnání s konvenčními kolonami, což přispívá k ekonomicky udržitelnějšímu procesu separace.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] THOMAS, S.H. Paracetamol (acetaminophen) poisoning. *Pharmacology & Therapeutics*. **1993**, 60 (1), str. 91 – 120. ISSN 0163-7258
- [2] BLOUKH, S.; WAZAIFY, M.; MATHESON, C. Paracetamol: unconventional uses of a well-known drug. *International Journal of Pharmacy Practice*. **2021**, 29 (6), str. 527 – 540. ISSN 2042-7174
- [3] CHIDIAC, A.S; BUCKLEY, N.A.; NOGHREHCHI, F.; CAIRNS, R. Paracetamol (acetaminophen) overdose and hepatotoxicity: mechanism, treatment, prevention measures, and estimates of burden of disease. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. **2023**, 19 (5), str. 297 – 317. ISSN 1744-7607
- [4] PRZYBYLA, G.W.; SZYCHOWSKI, K.A.; GMINSKI, J. Paracetamol - An old drug with new mechanisms of action. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. **2021**, 48 (1), str. 3 – 19. ISSN 1440-1681
- [5] REMY, C.; MARRET, E.; BONNET, F. State of the art of paracetamol in acute pain therapy. *Current Opinion in Anesthesiology*. **2006**, 19 (5), str. 565 – 565. ISSN 0952-7907
- [6] ANDERSON, B.J. Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. *Pediatric Anesthesia*. **2008**, 18 (10), str. 915 – 921. ISSN 1460-9592
- [7] PRESCOTT, L.F. Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. *British Journal of Clinical Pharmacology*. **1980**, 10 (Suppl 2), str. 291S – 298S. ISSN 1365-2125
- [8] MCGILL, M.R.; JAESCHKE, H. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharmaceutical Research*. **2013**, 30 (9), str. 2174 – 2187. ISSN 1573-904X
- [9] TWYLCROSS, R.; PACE, V.; MIHALYO, M.; WILCOCK, A. Acetaminophen (paracetamol). *Journal of Pain and Symptom Management*. **2013**, 46 (5), str. 747 – 755. ISSN 1873-6513
- [10] ZHAO, L.; PICKERING, G. Paracetamol metabolism and related genetic differences. *Drug Metabolism Reviews*. **2011**, 43 (1), str. 41 – 52. ISSN 1097-9883

- [11] MEREDITH, T.J.; GOULDING, R. Paracetamol. *Postgraduate Medical Journal*. 1980, 56 (657), str. 459 – 473. ISSN 1469-0756
- [12] VÁŇOVÁ, J.; MALIŇÁK, D.; ANDRÝS, R.; KUBÁT, M.; MIKYSEK, T.; ROUŠAROVÁ, E.; MUSÍLEK, K.; ROUŠAR, T.; ČESLA, P. Optimization of gradient reversed phase high performance liquid chromatography analysis of acetaminophen oxidation metabolites using linear and non-linear retention model. *Journal of Chromatography A*. **2022**, 1669. ISSN 1873-3778
- [13] BOLDT, P.; ROTHSCHILD, M.A.; KAEFERSTEIN, H. Glucuronidation of paracetamol by human liver microsomes in vitro / enzyme kinetic parameters and interactions with short-chain aliphatic alcohols and opiates. *Arzneimittelforschung*. **2007**, 57 (12), str. 787 – 794. ISSN 0004-4172
- [14] KLOTZ, U. Paracetamol (acetaminophen) - a popular and widely used nonopioid analgesic. *Arzneimittelforschung*. **2012**, 62 (8), str. 355 – 359. ISSN 0004-4172
- [15] KALSI, S.S.; WOOD, D.M.; WARING, W.S.; DARGAN, P.I. Does cytochrome P450 liver isoenzyme induction increase the risk of liver toxicity after paracetamol overdose? *Open Access Emergency Medicine*. **2011**, 3, str. 69 – 76. ISSN 1179-1500
- [16] HEARD, K.J.; GREEN, J.L.; JAMES, L.P.; JUDGE, B.S.; ZOLOT, L.; RHYEE, S.; DART, R.C. Acetaminophen-cysteine adducts during therapeutic dosing and following overdose. *BMC Gastroenterology*. **2011**, 11. ISSN 1471-230X
- [17] RAMACHANDRAN, A.; JAESCHKE, H. A mitochondrial journey through acetaminophen hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*. **2020**, 140. ISSN 1873-6351
- [18] LANCASTER, E.M.; HIATT, J.R.; ZARRINPAR, A. Acetaminophen hepatotoxicity: an updated review. *Archives of Toxicology*. **2015**, 89 (2), str. 193 – 199. ISSN 1432-0738
- [19] ZED, P.J.; KRENZELOK, E.P. Treatment of acetaminophen overdose. *American Journal of Health-System Pharmacy*. **1999**, 56 (11), str. 1081 – 1091. ISSN 1079-2082
- [20] YOON, E.; BABAR, A.; CHOUDHARY, M.; KUTNER, M.; PYRSOPOULOS, N. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: a Comprehensive Update. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. **2016**, 4 (2), str. 131 – 142. ISSN 2310-8819

- [21] AMAR, P.J.; SCHIFF, E.R. Acetaminophen safety and hepatotoxicity - where do we go from here? *Expert Opinion on Drug Safety*. **2007**, 6 (4), str. 341 – 355. ISSN 1744-764X
- [22] CHUN, L.J.; TONG, M.J.; BUSUTTIL, R.W.; HIATT, J.R. Acetaminophen hepatotoxicity and acute liver failure. *Journal of Clinical Gastroenterology*. **2009**, 43 (4), str. 342 – 349. ISSN 1539-2031
- [23] BROK, J.; BUCKLEY, N.; GLUUD, C. Interventions for paracetamol (acetaminophen) overdose. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. **2006**. ISSN 1469-493X
- [24] LACAILLE, F. Liver transplantation and liver cell transplantation. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. **2012**, 36 (3), str. 304 – 307. ISSN 2210-741X
- [25] DONG, M.W. *HPLC and UHPLC for practicing scientists*. 2. vyd. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2019. ISBN 9781119313779
- [26] WESTON, Andrea; BROWN, Phyllis R. *HPLC and CE: Principles and Practice*. Academic Press, 1997. ISBN 978-0-12-136640-7
- [27] BLUM, F. High performance liquid chromatography. *British Journal of Hospital Medicine*. **2014**, 75 (2), str. C18 – 21. ISSN 1750-8460
- [28] KUTZ, Myer. *Handbook of measurement in science and engineering*. 3. vyd. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2013. ISBN 9781118647240
- [29] TORRES, Maria Dolores; KRAAN, S.; DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ, Herminia. *Sustainable seaweed technologies: cultivation, biorefinery, and applications*. Amsterdam: Elsevier, 2020. ISBN 9780128179437
- [30] SHEEHAN, David; O'SULLIVAN, Siobhan. Ion Exchange Chromatography. *Encyclopedia of Life Sciences*. **2001**. ISSN 9780470015902
- [31] MEYER, Veronika. *Practical high-performance liquid chromatography*. 5.vyd. Chichester: Wiley, 2010, 412 s. ISBN 9780470688427
- [32] ZHANG, Q.; YANG, F.Q.; GE, L.; HU, Y.J.; XIA, Z.N. Recent applications of hydrophilic interaction liquid chromatography in pharmaceutical analysis. *Journal of Separation Science*. **2017**, 40 (1), str. 49 – 80. ISSN 1615-9314

- [33] MEYERS, Robert A. *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory, and instrumentation*. Chichester, New York: Wiley, 2000. ISBN 0471976709
- [34] ZOTOU, Anastasia. An overview of recent advances in HPLC instrumentation. *Central European Journal Of Chemistry*. **2012**, 10 (3), str. 554 – 569. ISSN 1895-1066
- [35] ANDERSON, Jared L.; BERTHOD, Alain; ESTÉVEZ, Verónica Pino; STALCUP, Apryll M. *Analytical Separation Science*. 5. vyd. Weinheim: John Wiley & Sons, 2015. ISBN 978-1-5231-1058-2
- [36] VISSERS, J.P.C.; CLAESSENS, H.A.; CRAMERS, C.A. Microcolumn liquid chromatography: Instrumentation, detection and applications. *Journal Of Chromatography A*. **1997**, 779 (1-2), str. 1 – 28. ISSN 0021-9673
- [37] SAITO, Y.; JINNO, K.; GREIBROKK, T. Capillary columns in liquid chromatography: between conventional columns and microchips. *Journal of Separation Science*. **2004**, 27 (17-18), str. 1379 – 1390. ISSN 1615-9306
- [38] VASCONCELOS SOARES MACIEL, E.; DE TOFFOLI, A.L.; SOBIESKI, E.; DOMINGUES NAZARIO, C.E.; LANCAS, F.M. Miniaturized liquid chromatography focusing on analytical columns and mass spectrometry: A review. *Analytica Chimica Acta*. **2020**, 1103, str. 11 – 31. ISSN 1873-4324
- [39] KUCEROVA, B.; KRCMOVA, L.; SOLICHOVA, D.; PLISEK, J.; SOLICH, P. Comparison of a new high-resolution monolithic column with core-shell and fully porous columns for the analysis of retinol and alpha-tocopherol in human serum and breast milk by ultra-high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*. **2013**, 36 (14), str. 2223 – 2230. ISSN 1615-9314
- [40] NAZARIO, C.E.; SILVA, M.R.; FRANCO, M.S.; LANCAS, F.M. Evolution in miniaturized column liquid chromatography instrumentation and applications: An overview. *Journal of Chromatography A*. **2015**, 1421, str. 18 – 37. ISSN 1873-3778
- [41] FEKETE, S.; GUILLARME, D. Kinetic evaluation of new generation of column packed with 1.3 mm core-shell particles. *Journal of Chromatography A*. **2013**, 1308, str. 104 – 113. ISSN 1873-3778
- [42] TEFFERA, Y.; ABRAMSON, F. Application of high-performance liquid chromatography/chemical reaction interface mass spectrometry for the analysis of

- conjugated metabolites: a demonstration using deuterated acetaminophen. *Biological Mass Spectrometry*. **1994**, 23 (12), str. 776 – 783. ISSN 1052-9306
- [43] HEWAVITHARANA, A.K.; LEE, S.; DAWSON, P.A.; MARKOVICH, D.; SHAW, P.N. Development of an HPLC-MS/MS method for the selective determination of paracetamol metabolites in mouse urine. *Analytical Biochemistry*. **2008**, 374 (1), str. 106 – 111. ISSN 0003-2697
- [44] LI, W.; DOHERTY, J.P.; KULMATYCKI, K.; SMITH, H.T.; TSE, F.L. Simultaneous LC-MS/MS quantitation of acetaminophen and its glucuronide and sulfate metabolites in human dried blood spot samples collected by subjects in a pilot clinical study. *Bioanalysis*. **2012**, 4 (12), str. 1429 – 1443. ISSN 1757-6199
- [45] AN, J.H.; LEE, H.J.; JUNG, B.H. Quantitative analysis of acetaminophen and its six metabolites in rat plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. **2012**, 26 (12), str. 1596 – 1604. ISSN 1099-0801
- [46] GICQUEL, T.; AUBERT, J.; LEPAGE, S.; FROMENTY, B.; MOREL, I. Quantitative analysis of acetaminophen and its primary metabolites in small plasma volumes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*. **2013**, 37 (2), str. 110 – 116. ISSN 1945-2403
- [47] DI GIROLAMO, A.; O'NEILL, W.M.; WAINER, I.W. 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 detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **1998**, 17 (6-7), str. 1191 – 1197. ISSN 0731-7085
- [48] VERTZONI, M.V.; ARCHONTAKI, H.A.; GALANOPOULOU, P. 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**, 32 (3), str. 487 – 493. ISSN 0731-7085
- [49] FLORES-PEREZ, C.; CHAVEZ-PACHECO, J.L.; RAMIREZ-MENDIOLA, B.; ALEMON-MEDINA, R.; GARCIA-ALVAREZ, R.; JUAREZ-OLGUIN, H.; FLORES-PEREZ, J. A reliable method of liquid chromatography for the quantification of acetaminophen and identification of its toxic metabolite N-acetyl-p-

benzoquinoneimine for application in pediatric studies. *Biomedical Chromatography*.
2011, 25 (7), str. 760 – 766. ISSN 1099-0801

6 PŘÍLOHY

Příloha 1: Hodnoty F_m , t_M , N , u , H použité k sestrojení van Deemterové křivky pro kolonu Luna® C18(2) s mobilní fází s acetonitrilem

F_m ($\mu\text{l}/\text{min}$)	t_M (min)	N	u (cm/min)	H (cm)
30	1,154	184	13,004	0,0815
25	1,381	282	10,866	0,0533
20	1,702	290	8,816	0,0517
15	2,225	246	6,743	0,0611
10	3,260	330	4,601	0,0455
5	6,190	269	2,423	0,0558
4	7,541	498	1,989	0,0302
3	9,690	345	1,548	0,0435
2	13,432	761	1,117	0,0197

Příloha 2: Hodnoty F_m , t_M , N , u , H použité k sestrojení van Deemterové křivky pro kolonu Luna® C18(2) s mobilní fází s methanolem

F_m ($\mu\text{l}/\text{min}$)	t_M (min)	N	u (cm/min)	H (cm)
40	1,383	659	10,846	0,0228
35	1,566	737	9,579	0,0204
30	1,811	838	8,283	0,0179
25	2,152	1010	6,970	0,0149
20	2,662	1095	5,635	0,0137
15	3,489	1593	4,299	0,0094
10	5,142	2225	2,917	0,0067
5	9,860	3572	1,521	0,0042
4	12,276	3407	1,222	0,0044

Příloha 3: Hodnoty F_m , t_M , N , u , H použité k sestrojení van Deemterové křivky pro kolonu Kinetex® XB-C18 s mobilní fází s acetonitrilem

F_m ($\mu\text{l}/\text{min}$)	t_M (min)	N	u (cm/min)	H (cm)
30	1,062	283	14,131	0,0530
25	1,290	298	11,628	0,0503
20	1,541	291	9,737	0,0516
15	1,989	298	7,541	0,0504
10	2,885	341	5,199	0,0441
5	5,443	404	2,756	0,0371
4	6,660	443	2,252	0,0339
3	8,569	479	1,750	0,0313
2	12,006	550	1,249	0,0273

Příloha 4: Hodnoty F_m , t_M , N , u , H použité k sestrojení van Deemterové křivky pro kolonu Ascentis® Express C18 s mobilní fází s acetonitrilem

F_m ($\mu\text{l}/\text{min}$)	t_M (min)	N	u (cm/min)	H (cm)
40	0,338	108	14,815	0,0465
35	0,384	124	13,038	0,0403
30	0,443	141	11,299	0,0356
25	0,516	147	9,699	0,0341
20	0,630	156	7,943	0,0322
15	0,809	173	6,184	0,0289
10	1,167	214	4,284	0,0234
5	2,175	368	2,299	0,0136
4	2,627	436	1,903	0,0115
3	3,361	585	1,488	0,0086
2	4,789	842	1,044	0,0059

Příloha 5: Hodnoty F_m , t_M , N , u , H použité k sestrojení van Deemterové křivky pro kolonu Chromolith® CapRod® RP-18e s mobilní fází s acetonitrilem

F_m ($\mu\text{l}/\text{min}$)	t_M (min)	N	u (cm/min)	H (cm)
25	0,758	204	19,802	0,0735
20	0,864	212	17,371	0,0708
15	1,075	228	13,953	0,0659
10	1,495	255	10,033	0,0588
5	2,725	440	5,505	0,0341
4	3,301	561	4,545	0,0268
3	4,203	766	3,569	0,0196
2	5,792	1136	2,590	0,0132
1	9,509	1628	1,577	0,0092
0,9	10,068	1818	1,490	0,0083
0,8	10,798	1848	1,389	0,0081
0,7	11,550	1946	1,299	0,0077
0,6	12,712	2120	1,180	0,0071
0,5	14,302	2361	1,049	0,0064
0,4	15,777	2495	0,951	0,0060
0,3	37,177	3018	0,403	0,0050
0,2	48,400	3236	0,310	0,0046

Příloha 6: Hodnoty použité k sestrojení retenčního modelu APAP-CYS v mobilní fází s acetonitrilem

φ_{ACN} (v/v)	$t_{R,1}$	$t_{R,2}$	k_1	k_2	$\log k_1$	$\log k_2$	$\log k$ (průměr)
0,05	6,130	6,346	0,778	0,841	-0,109	-0,075	-0,092
0,10	4,923	4,900	0,428	0,422	-0,368	-0,375	-0,372
0,15	4,448	4,453	0,290	0,292	-0,537	-0,535	-0,536
0,20	4,137	4,114	0,200	0,194	-0,699	-0,713	-0,706
0,25	3,884	3,877	0,127	0,125	-0,897	-0,904	-0,900
0,30	3,682	3,684	0,068	0,069	-1,166	-1,163	-1,165

Příloha 7: Hodnoty použité k sestrojení retenčního modelu APAP-SG v mobilní fázi s acetonitrilem

φ_{ACN} (v/v)	$t_{R,1}$	$t_{R,2}$	k_1	k_2	$\log k_1$	$\log k_2$	$\log k$ (průměr)
0,05	7,684	7,665	1,229	1,224	0,090	0,088	0,089
0,10	5,792	5,878	0,680	0,705	-0,167	-0,152	-0,159
0,15	5,252	5,385	0,524	0,562	-0,281	-0,250	-0,266
0,20	4,843	5,073	0,405	0,472	-0,393	-0,326	-0,359
0,25	4,668	4,674	0,354	0,356	-0,451	-0,449	-0,450
0,30	4,343	4,391	0,260	0,274	-0,585	-0,562	-0,574
0,35	4,083	4,085	0,185	0,185	-0,734	-0,733	-0,733
0,40	3,873	3,888	0,124	0,128	-0,908	-0,893	-0,901
0,45	3,695	3,728	0,072	0,082	-1,143	-1,089	-1,116

Příloha 8: Hodnoty použité k sestrojení retenčního modelu APAP v mobilní fázi s acetonitrilem

φ_{ACN} (v/v)	$t_{R,1}$	$t_{R,2}$	k_1	k_2	$\log k_1$	$\log k_2$	$\log k$ (průměr)
0,05	8,775	8,648	1,546	1,509	0,189	0,179	0,184
0,10	6,584	6,603	0,910	0,916	-0,041	-0,038	-0,040
0,15	5,648	5,672	0,639	0,645	-0,195	-0,190	-0,192
0,20	5,106	5,073	0,481	0,472	-0,318	-0,326	-0,322
0,25	4,668	4,674	0,354	0,356	-0,451	-0,449	-0,450
0,30	4,343	4,391	0,260	0,274	-0,585	-0,562	-0,574
0,35	4,083	4,085	0,185	0,185	-0,734	-0,733	-0,733
0,40	3,873	3,888	0,124	0,128	-0,908	-0,893	-0,901
0,45	3,695	3,728	0,072	0,082	-1,143	-1,089	-1,116

Příloha 9: Hodnoty použité k sestrojení retenčního modelu nečistoty APAP-NAC v mobilní fázi s acetonitrilem

φ_{ACN} (v/v)	$t_{R,1}$	$t_{R,2}$	k_1	k_2	$\log k_1$	$\log k_2$	$\log k$ (průměr)
0,10	7,837	7,878	1,274	1,285	0,105	0,109	0,107
0,15	5,960	5,958	0,729	0,728	-0,137	-0,138	-0,137
0,20	5,106	5,073	0,481	0,472	-0,318	-0,326	-0,322
0,25	4,668	4,674	0,354	0,356	-0,451	-0,449	-0,450
0,30	4,343	4,391	0,260	0,274	-0,585	-0,562	-0,574
0,35	4,083	4,085	0,185	0,185	-0,734	-0,733	-0,733
0,40	3,873	3,888	0,124	0,128	-0,908	-0,893	-0,901
0,45	3,695	3,728	0,072	0,082	-1,143	-1,089	-1,116

Příloha 10: Hodnoty použité k sestrojení retenčního modelu APAP-NAC v mobilní fázi s acetonitrilem

φ_{ACN} (v/v)	$t_{R,1}$	$t_{R,2}$	k_1	k_2	$\log k_1$	$\log k_2$	$\log k$ (průměr)
0,10	8,214	8,367	1,383	1,427	0,141	0,155	0,148
0,15	6,796	6,907	0,972	1,004	-0,013	0,002	-0,005
0,20	6,089	6,156	0,766	0,786	-0,116	-0,105	-0,110
0,25	5,610	5,642	0,628	0,637	-0,202	-0,196	-0,199
0,30	5,222	5,276	0,515	0,531	-0,288	-0,275	-0,282
0,35	4,934	4,948	0,431	0,435	-0,365	-0,361	-0,363
0,40	4,687	4,715	0,360	0,368	-0,444	-0,434	-0,439
0,45	4,462	4,501	0,294	0,306	-0,531	-0,515	-0,523
0,50	4,201	4,297	0,219	0,247	-0,660	-0,608	-0,634

Příloha 11: Hodnoty použité k sestrojení retenčního modelu nečistoty APAP-CYS v mobilní fázi s acetonitrilem

φ_{ACN} (v/v)	$t_{R,1}$	$t_{R,2}$	k_1	k_2	$\log k_1$	$\log k_2$	$\log k$ (průměr)
0,20	6,089	6,156	0,766	0,786	-0,116	-0,105	-0,110
0,25	5,610	5,642	0,628	0,637	-0,202	-0,196	-0,199
0,30	5,222	5,276	0,515	0,531	-0,288	-0,275	-0,282
0,35	4,934	4,948	0,431	0,435	-0,365	-0,361	-0,363
0,40	4,687	4,715	0,360	0,368	-0,444	-0,434	-0,439
0,45	4,462	4,501	0,294	0,306	-0,531	-0,515	-0,523
0,50	4,201	4,297	0,219	0,247	-0,660	-0,608	-0,634

Příloha 12: Hodnoty použité k sestrojení retenčního modelu APAP-CYS v mobilní fázi s methanolem

φ_{MeOH} (v/v)	$t_{R,1}$	$t_{R,2}$	k_1	k_2	$\log k_1$	$\log k_2$	$\log k$ (průměr)
0,10	5,801	5,847	1,221	1,239	0,087	0,093	0,090
0,15	4,333	4,339	0,659	0,661	-0,181	-0,180	-0,180
0,20	3,645	3,628	0,395	0,389	-0,403	-0,410	-0,406
0,25	3,272	3,260	0,253	0,248	-0,597	-0,605	-0,601
0,30	3,019	3,009	0,156	0,152	-0,807	-0,818	-0,813
0,35	2,863	2,853	0,096	0,092	-1,017	-1,035	-1,026
0,40	2,752	2,748	0,054	0,052	-1,271	-1,283	-1,277
0,45	2,680	2,672	0,026	0,023	-1,584	-1,639	-1,612

Příloha 13: Hodnoty použité k sestrojení retenčního modelu APAP v mobilní fázi s methanolem

φ_{MeOH} (v/v)	$t_{R,1}$	$t_{R,2}$	k_1	k_2	$\log k_1$	$\log k_2$	$\log k$ (průměr)
0,10	7,878	7,948	2,016	2,043	0,305	0,310	0,307
0,15	5,783	5,796	1,214	1,219	0,084	0,086	0,085
0,20	4,706	4,687	0,802	0,794	-0,096	-0,100	-0,098
0,25	4,076	4,065	0,560	0,556	-0,251	-0,255	-0,253
0,30	3,639	3,627	0,393	0,389	-0,405	-0,411	-0,408
0,35	3,356	3,342	0,285	0,279	-0,545	-0,554	-0,550
0,40	3,145	3,140	0,204	0,202	-0,690	-0,694	-0,692
0,45	2,993	2,983	0,146	0,142	-0,836	-0,848	-0,842
0,50	2,870	2,867	0,099	0,098	-1,005	-1,010	-1,008

Příloha 14: Hodnoty použité k sestrojení retenčního modelu APAP-SG v mobilní fázi s methanolem

φ_{MeOH} (v/v)	$t_{R,1}$	$t_{R,2}$	k_1	k_2	$\log k_1$	$\log k_2$	$\log k$ (průměr)
0,10	12,290	12,456	3,705	3,769	0,569	0,576	0,573
0,15	7,552	7,608	1,891	1,913	0,277	0,282	0,279
0,20	5,489	5,492	1,101	1,103	0,042	0,042	0,042
0,25	4,475	4,482	0,713	0,716	-0,147	-0,145	-0,146
0,30	3,639	3,627	0,393	0,389	-0,405	-0,411	-0,408
0,35	3,356	3,342	0,285	0,279	-0,545	-0,554	-0,550
0,40	3,145	3,140	0,204	0,202	-0,690	-0,694	-0,692
0,45	2,993	2,983	0,146	0,142	-0,836	-0,848	-0,842
0,50	2,870	2,867	0,099	0,098	-1,005	-1,010	-1,008

Příloha 15: Hodnoty použité k sestrojení retenčního modelu nečistoty APAP-NAC v mobilní fázi s methanolem

φ_{MeOH} (v/v)	$t_{R,1}$	$t_{R,2}$	k_1	k_2	$\log k_1$	$\log k_2$	$\log k$ (průměr)
0,10	27,094	27,521	9,373	9,536	0,972	0,979	0,976
0,15	15,122	15,333	4,789	4,870	0,680	0,688	0,684
0,20	9,898	9,902	2,789	2,791	0,446	0,446	0,446
0,25	6,779	6,744	1,595	1,582	0,203	0,199	0,201
0,30	5,067	5,029	0,940	0,925	-0,027	-0,034	-0,030
0,35	4,147	4,127	0,588	0,580	-0,231	-0,237	-0,234
0,40	3,590	3,579	0,374	0,370	-0,427	-0,432	-0,429
0,45	2,993	2,983	0,146	0,142	-0,836	-0,848	-0,842
0,50	2,870	2,867	0,099	0,098	-1,005	-1,010	-1,008

Příloha 16: Hodnoty použité k sestrojení retenčního modelu APAP-NAC v mobilní fázi s methanolem

$\varphi_{MeOH} (v/v)$	$t_{R,1}$	$t_{R,2}$	k_1	k_2	$\log k_1$	$\log k_2$	$\log k$ (průměr)
0,20	9,898	9,902	2,789	2,791	0,446	0,446	0,446
0,25	7,262	7,295	1,780	1,793	0,250	0,254	0,252
0,30	5,747	5,759	1,200	1,205	0,079	0,081	0,080
0,35	4,882	4,893	0,869	0,873	-0,061	-0,059	-0,060
0,40	4,333	4,342	0,659	0,662	-0,181	-0,179	-0,180
0,45	3,971	3,979	0,520	0,523	-0,284	-0,281	-0,282
0,50	3,687	3,702	0,412	0,417	-0,386	-0,380	-0,383

Příloha 17: Hodnoty použité k sestrojení retenčního modelu nečistoty APAP-CYS v mobilní fázi s methanolem

$\varphi_{MeOH} (v/v)$	$t_{R,1}$	$t_{R,2}$	k_1	k_2	$\log k_1$	$\log k_2$	$\log k$ (průměr)
0,20	37,495	37,066	13,355	13,191	1,126	1,120	1,123
0,25	19,277	19,183	6,380	6,344	0,805	0,802	0,804
0,30	11,016	10,902	3,217	3,174	0,508	0,502	0,505
0,35	7,148	7,089	1,737	1,714	0,240	0,234	0,237
0,40	5,202	5,153	0,992	0,973	-0,004	-0,012	-0,008
0,45	3,971	3,979	0,520	0,523	-0,284	-0,281	-0,282