

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2025

Bc. Tereza Tichá

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Analýza paracetamolu a jeho oxidačních metabolitů pomocí kapilární  
elektroforézy  
Diplomová práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2024/2025

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza Tichá**  
Osobní číslo: **C23258**  
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**  
Téma práce: **Analýza paracetamolu a jeho oxidačních metabolitů pomocí kapilární elektroforézy**  
Téma práce anglicky: **Analysis of paracetamol and its oxidative metabolites using capillary electrophoresis**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

- V teoretické části diplomové práce podejte přiměřený úvod ke vlastnostem paracetamolu, jeho farmakologickému použití a metabolizaci. Zaměřte se zejména na oxidační metabolickou dráhu. Dále podejte přiměřený popis separační techniky kapilární elektroforézy a proveďte literární rešerši na téma využití této techniky při analýze léčiv a jejich metabolitů.
- Experimentálně ověřte možnosti separace paracetamolu a jeho oxidačních metabolitů pomocí kapilární zónové elektroforézy. Zaměřte se na optimalizaci složení základního elektrolytu, ověření vlivu instrumentálních parametrů na separaci (teplota, napětí).
- 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

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2025**  
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

**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 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Analýza paracetamolu a jeho oxidačních metabolitů pomocí kapilární elektroforézy 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 9.5.2025

Tereza Tichá

## PODĚKOVÁNÍ

V této části bych ráda poděkovala všem, kteří se, ať už přímo či nepřímo, podíleli na vypracování této diplomové práce. Velký vděk patří vedoucímu práce, panu doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D., který mě celou prací provázel a vždy přišel s cennými radami v nesnázích, kterým jsem během vypracování čelila. Dále také všem akademickým pracovníkům Univerzity Pardubice, kteří mi byli rádi nápomoci a jejichž rady a zkušenosti jsem mohla aplikovat v této práci. V neposlední řadě chci také poděkovat mojí rodině, která mě při studiu podporovala, ale také mým kamarádům a příteli, kteří tu pro mě byli při těžkých chvílích a bez kterých bych tuto práci nemohla úspěšně dokončit.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce je zaměřena na separaci acetaminofenu a jeho metabolitů pomocí kapilární zónové elektroforézy. Teoretická část se zabývá látkou acetaminofen, jeho vlastnostmi, mechanismem účinku, metabolismem, syntézou. V další kapitole je pozornost zaměřena na samotnou kapilární elektroforézu a její využití v praxi, zejména v oblasti farmaceutické analýzy. Práce se také zabývá výhodami a srovnáním kapilární elektroforézy s dalšími technikami, jako je například HPLC. V experimentální části práce jsou popsány měření, které umožnily výběr vhodného elektrolytu pro separaci acetaminofenu a jeho metabolitů. Byl zde také zkoumán vliv napětí a teploty a na závěr byla provedena kvantitativní analýza vybraných metabolitů včetně samotného acetaminofenu.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Acetaminofen, paracetamol, metabolity paracetamolu, kapilární elektroforéza, farmaceutické látky

## **TITLE**

Analysis of paracetamol and its oxidative metabolites using capillary electrophoresis

## **ANNOTATION**

This diploma thesis focuses on the separation of acetaminophen and its metabolites using capillary zone electrophoresis. The theoretical part deals with acetaminophen, its properties, mechanism of action, metabolism, and synthesis. The following chapter is dedicated to capillary electrophoresis itself and its practical applications, particularly in the field of pharmaceutical analysis. The thesis also discusses the advantages of this method and compares it with other techniques, such as HPLC. The experimental part describes measurements that enabled the selection of a suitable electrolyte for the separation of acetaminophen and its metabolites. The effects of voltage and temperature were also investigated, and finally, a quantitative analysis of selected metabolites, including acetaminophen, was performed.

## **KEYWORDS**

Acetaminophen, paracetamol, paracetamol metabolites, capillary electrophoresis, pharmaceutical substances

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	11
ÚVOD.....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	14
1.1 Acetaminofen.....	14
1.1.1 Fyzikální a chemické vlastnosti.....	14
1.1.2 Mechanismus účinku .....	15
1.1.3 Syntéza acetaminofenu .....	18
1.1.4 Biotransformace acetaminofenu v organismu .....	20
1.1.5 Hlavní metabolity acetaminofenu a jejich stanovení.....	23
1.1.6 Hepatotoxicita acetaminofenu .....	25
1.2 Kapilární elektroforéza .....	27
1.1.1 Kapilární zónová elektroforéza.....	28
1.1.2 Instrumentace.....	31
1.1.3 Srovnání CE s dalšími technikami.....	35
2.1 Analýza farmaceutik .....	36
1.2.1 Aplikace elektroforézy pro analýzu farmaceutik.....	39
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	42
2.1 Přístrojové vybavení .....	42
2.2 Chemikálie a pomůcky: .....	42
2.3 Pracovní postup.....	43
2.3.1 Příprava standardů .....	43
2.3.2 Příprava základních elektrolytů .....	43
2.3.3 Příprava kapiláry .....	44
2.3.4 Proplach kapiláry .....	44
2.4 Podmínky měření.....	45
3 Výsledky a diskuze .....	46
3.1 Optimalizace základního elektrolytu .....	46

3.2	Vliv teploty .....	53
3.3	Kvantitativní parametry analýzy.....	55
3.4	Směs.....	60
ZÁVĚR .....		61
POUŽITÁ LITERATURA .....		62
SEZNAM PŘÍLOH.....		67

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Struktura fenacetinu (a) a acetaminofenu (b) (Ayoub, 2021). .....	15
Obrázek 2: Analgetický mechanismus acetaminofenu (Ohashi, 2020). .....	16
Obrázek 3: Komerční cesty syntézy acetaminofenu (Joncour, 2014). .....	18
Obrázek 4: Amidace hydrochinonu v kyselině octové (Joncour, 2014). .....	19
Obrázek 5: Koncentrace APAP a jeho konjugátů (Prescott, 1980). .....	20
Obrázek 6: Schéma metabolismu APAP v játrech (Kouznetsov, 2021). .....	21
Obrázek 7: Jednotlivé vrstvy kapiláry siliky (Lodén, 2008). .....	28
Obrázek 8: Instrumentace CZE (Shah, 2022) .....	32
Obrázek 9: Souhrn analytických technik používaných pro farmaceutickou analýzu .....	38
Obrázek 10: Separace směsi .....	60
Tabulka 1: Metabolity APAP detekované pomocí hmotnostní spektrometrie (David, 2021)..	24
Tabulka 2: Rizikové faktory DILI (Wang, 2023). .....	26
Tabulka 3: UV/Vis detekce - výhody a nevýhody (Deeb, 2016; Li, 2001). .....	35
Tabulka 4: Srovnání CE a LC (Shah, 2022). .....	36
Tabulka 5: Příklady využití CE pro analýzu API (Suntornsuk, 2010). .....	40
Tabulka 7: Regresní parametry .....	59
Tabulka 8: Výpočet LOD a LOQ .....	59

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

5-HT <sub>3</sub>	5-hydroxytryptaminový receptor
AD	amperometrická detekce
AM404	N-arachidonoyl-fenolamin
APAP	acetaminofen
API	aktivní složka léčiva
BCS	biofarmaceutický klasifikační systém
Brcp	breast cancer resistance protein
C <sup>4</sup> D	bezkontaktní detekce vodivosti CB1
CCD	bezkontaktní detekce
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
COX	cyklooxygenáza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor diodového pole
DILI	induced liver injury
ECL	elektrochemiluminescence
EOF	elektroosmotický tok
ESI	elektrosprejová ionizace
FAAH	enzym hydroláza amidů mastných kyselin
GC	plynová chromatografie
GSH	glutathion

HPLC	vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií
HQ	hydrochinon
LC	kapalinová chromatografie
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace
MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
Mrp	Multidrug Resistance-associated Protein
MS	hmotnostní spektrometrie
NAC	N-acetylcystein
NAPQI	N-acetyl-p-benzochinoniminu
Nrf2	nukleární erytroidní faktor 2-like 2
NSAID	nesteroidní protizánětlivé léčiva
PAP	p-aminofenol
PG	prostaglandin
RSD	Residual standard deviation
SPE	extrakce na pevné fázi
SULT	sulfotransferáza
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TRPV1	Přechodný receptorový potenciálový kationtový kanál V1
UDPGT	uridin 5'-difosfoglukuronyl-transferáza
UV	ultrafialové
UV/VIS	ultrafialová/viditelná

## ÚVOD

Acetaminofen (paracetamol) patří mezi nejrozšířenější léčiva používaná k tlumení bolesti a snižování horečky. Přestože je při běžném dávkování považován za bezpečný, jeho metabolismus v játrech zahrnuje tvorbu reaktivních oxidačních produktů. Nejvýznamnějším z těchto metabolitů je N-acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI), jenž je zodpovědný za hepatotoxicitu při předávkování acetaminofenem. Stanovení paracetamolu a jeho oxidačních metabolitů v biologickém materiálu je proto klíčové nejen z toxikologického hlediska, ale i pro farmakokinetické a klinické studie. Výhodami kapilární elektroforézy je vysoká účinnost separace, nízká spotřeba vzorku a jednoduchá instrumentace. Z těchto důvodů je zajímavou alternativou k běžně používaným chromatografickým metodám.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Acetaminofen

Acetaminofen (APAP) neboli paracetamol je běžně užívané analgetikum a antipyretikum. Maximální doporučená dávka pro dospělého je 4 g/den, dávka větší než 7 g/den je již považována jako potenciálně toxická pro játra a ledviny, a to konkrétně vlivem vysoce aktivního metabolitu N-acetyl-p-benzochinoniminu (NAPQI). Pro léčebné účely byl APAP poprvé syntetizován Josefem von Meringem, a to reakcí p-nitrofenolu a cínu v ledové kyselině octové. V 80. letech 19. století byl zkoumán paracetamol a fenacetin pro jejich antipyretické a analgetické účinky, přičemž popularitě se nejdříve dostalo fenacetinu roku 1887, který byl ale následně kvůli vedlejším účinkům zakázán. Pozornost se poté obrátila na APAP, který byl 1893 uveden na trh. Později se ukázalo, že je hlavním metabolitem fenacetinu a proto jsou nyní tyto účinky připisovány právě samotnému APAP. V 50. letech 20. století se stal volně dostupným a také nejužívanějším volně dostupným analgetikem pro léčbu lehké až střední bolesti a teploty (Mazaleuskaya, 2015; Ayoub, 2021).

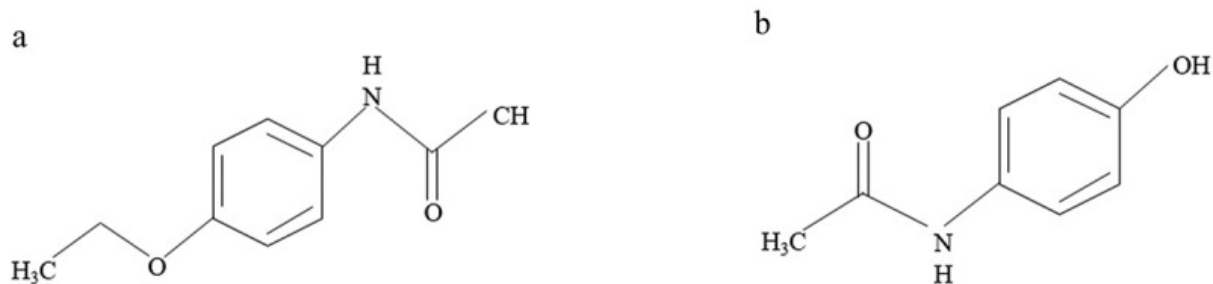
Standardní terapeutická dávka APAP pro dospělé je 2 tablety po 500 mg každé 4 hodiny a až 8 tablet (4 g) za 24 hodin. Pro děti se dávka odvíjí od věku a váhy. Je prodáván jak v samostatné formě, tak v kombinaci s dalšími analgetickými léčivy, jako je aspirin, kofein, nebo opioidy. S předávkováním APAP je spojována hepatotoxicita, což je tématem debat o reklasifikaci tohoto léčiva. Vzhledem k jeho rozšířenosti a také absenci bezpečnější alternativy je jeho stažení z trhu jen těžko představitelné. Proto by pro přecházení předávkování a následného poškození mohlo pomoci alespoň obecné povědomí o riziku, které s sebou nese, pokud nejsou dodrženy dávkovací předpisy (Ayoub, 2021).

### 1.1.1 Fyzikální a chemické vlastnosti

APAP (p-hydroxyacetanilid) je bílá krystalická látka téměř bez zápachu, jejíž molekulová hmotnost je 151,163 g/mol, bod tání je 169 – 170,5°C a disociační konstanta  $pK_a = 9,0 - 9,5$ . Patří do skupiny N-acetylovaných aromatických aminů, které jsou důležitou součástí léků proti bolesti hlavy, a je zároveň posledním dostupným léčivem ze skupiny anilinových derivátů, kam řadíme také acetanilid a fenacetin. Vzhledem k jeho struktuře dále podléhá reakcím fenolů jako je acetylace, oxidace, reaguje s hydroxidem sodným a dává pozitivní test chloridu železitého. Významnou reakcí je také interakce s alkoholem, kdy

může docházet až k akutním toxickým jaterním symptomům u chronických alkoholiků, kteří užívají paracetamol, ač v dávkách obecně považovaných za netoxické (Ogemdi, 2019).

APAP tvoří z nasyceného vodného roztoku krystaly, které mají tvar jednoklonných hranolů. Takový koncentrovaný roztok má pH okolo 5,5 – 6,5. Dle biofarmaceutického klasifikačního systému (BCS) patří do skupiny III, která je charakterizována velkou rozpustností a malou permeabilitou. Ve studené vodě se hůře rozpouští, s rozpustností asi 1,4 g/100 ml. Situace je lepší v horké vodě, kde jeho rozpustnost činí asi 5g/100 ml. V nepolárních rozpouštědlech (toluen, benzen, pentan, petroleum ether) a ve chlorovaných uhlovodících (CCl<sub>4</sub>) má rozpustnost nízkou, naopak ve středně polárních rozpouštědlech (N, N-dimethylformamid; alkoholy; diethylamin) se rozpouští velmi dobře. Vyskytuje se v pěti polymorfních formách, z nichž dvě jsou dosažitelné za vysokého tlaku. Jeho struktura je znázorněna na obrázku č. 1. Ve výrobě farmaceutik je krystalizace z roztoku velmi důležitým krokem, protože přes 90 % všech produktů je formě tablet a kapslí, které obsahují aktivní látku v pevné podobě. Různé postupy krystalizace mohou ovlivnit výslednou formu krystalů, která má poté vliv také na mechanické vlastnosti tablet (Srabovic, 2016).

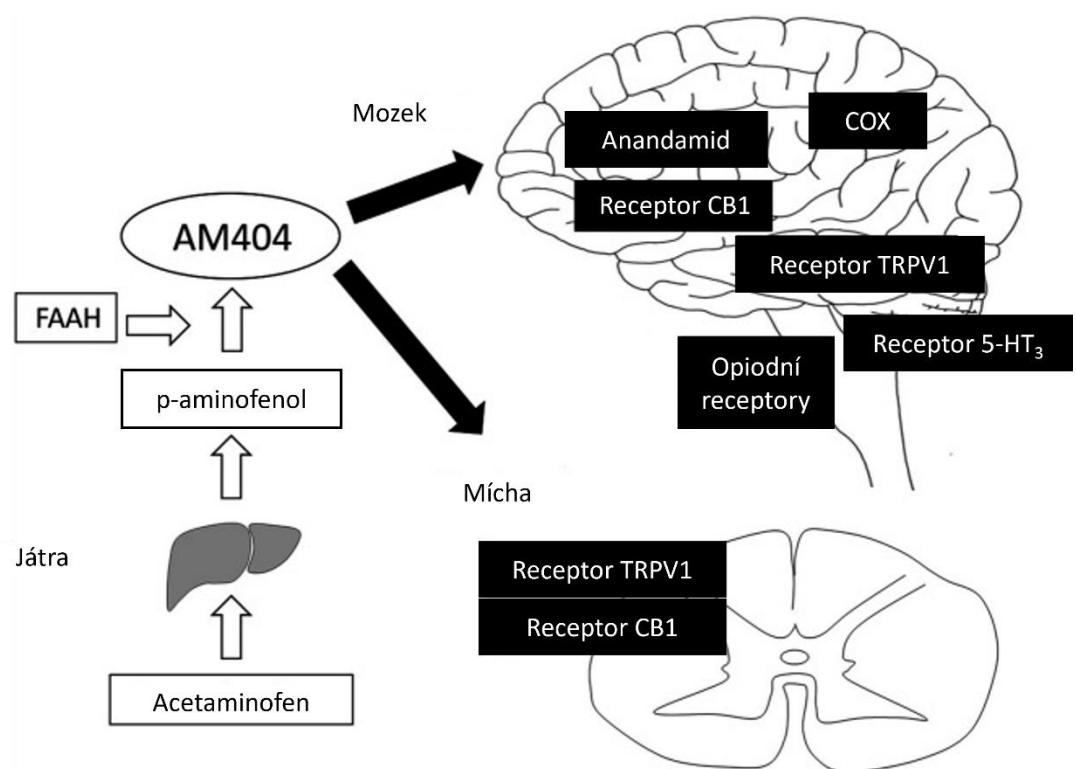


Obrázek 1: Struktura fenacetinu (a) a acetaminofenu (b) (Ayoub, 2021).

### 1.1.2 Mechanismus účinku

Přestože je APAP používán v praxi již několik desítek let, jeho mechanismus účinku nebyl zcela objasněn. Má antipyretické a analgetické účinky obdobné nesteroidním protizánětlivým léčivům (NSAID), ale sám o sobě není protizánětlivý, neindukuje typické gastrointestinální vedlejší účinky. Mimo to však také potlačuje produkci prostaglandinů (PG). Kvůli absenci protizánětlivého účinku se tedy mezi NSAID neřadí, ačkoliv jsou v ostatních aspektech velmi podobné (Józwiak-Bebenista, 2014).

APAP je metabolizován na p-aminofenol, který snadno přechází hematoencefalickou membránou a je přeměněn na N-arachidonoyl-fenolamin (AM404). Ten je známý jako hlavní mediátor APAP zapříčiňující jeho analgetický účinek. Nejdříve bylo známo, že je AM404 pouze strukturně a funkčně podobný anandamidu a působí na kanabinoidní receptory 1 (CB1), ale později bylo zjištěno, že má vliv i na receptory přechodného receptorového potenciálového kationtového kanálu V1 (TRPV1), které jsou v mozku důležité pro modulaci bolesti a jsou také spojovány s kanabidiolem a dipyrone. Tyto mozkové receptory jsou považovány za hlavní mediátory analgesie. Obdobně jako mozek, je i mícha důležitým místem modulace bolesti a dochází zde k nociceptivnímu přenosu pomocí primárních aferentních A $\delta$  a C vláken. CB1 a TRPV1 receptory jsou také zastoupeny i v určité části míchy, což může přispívat k indukci analgesie přímou aktivací v těchto místech. Dalšími důvody analgetického účinku acetaminofenu může být aktivace opioidních drah a serotoninového systému. To může být však potlačováno různými antagonisty opioidních receptorů a látkami, které blokují serotoninové receptory, kterým je například 5-hydroxytryptaminový (5-HT<sub>3</sub>) receptor. Popsané mechanismy jsou znázorněny na obrázku č. 2 (Ohashi, 2020).



Obrázek 2: Analgetický mechanismus acetaminofenu (Ohashi, 2020).

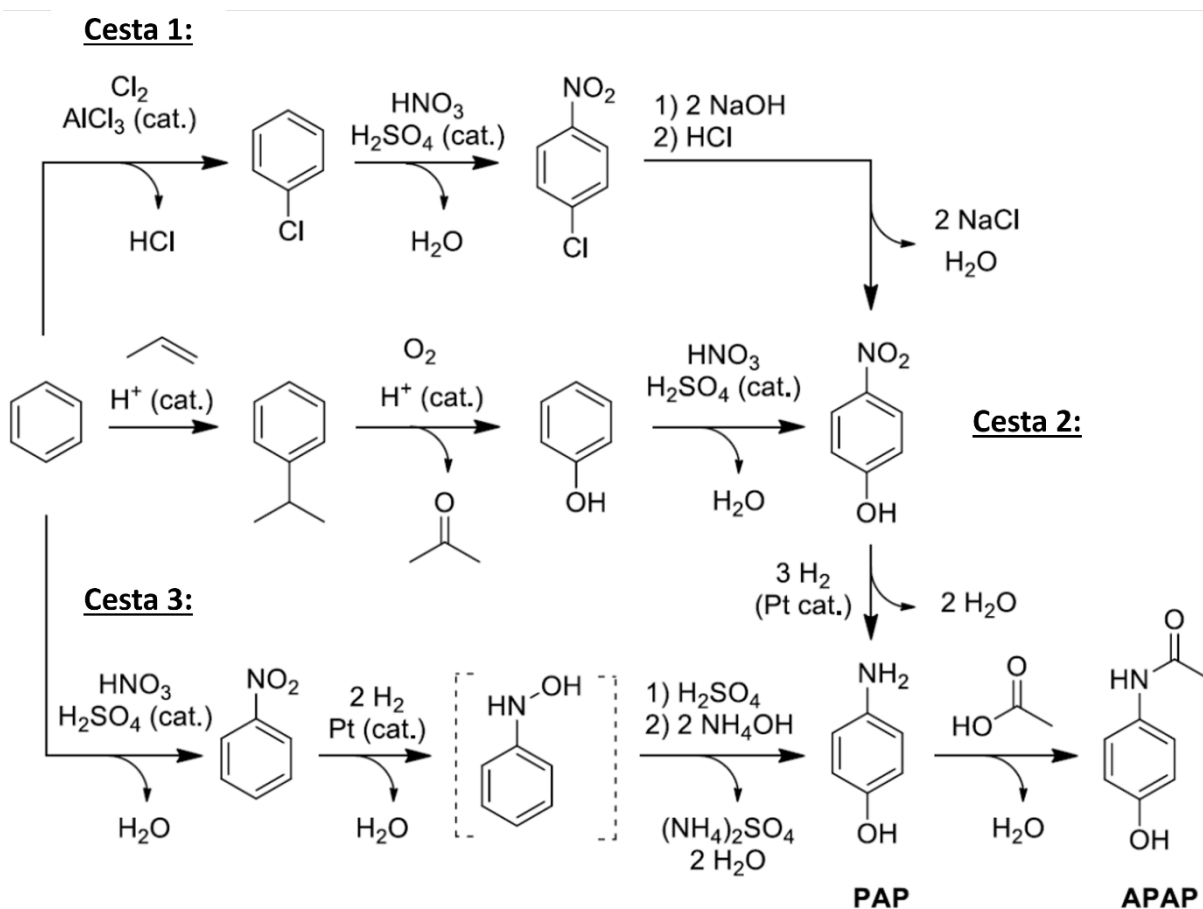
Tyto informace vedou k tomu, že acetaminofenem indukovaná analgesie může být do určité míry závislá na opioidních receptorech a serotoninergních drahách. APAP nebyl považován za látku s protizánětlivými účinky, avšak některé studie ukazují, že právě metabolit AM404 může indukovat analgesii v zánětlivých modelech. Slabě také inhibuje cyklooxygenázu (COX), ale dále neinhibuje aktivaci neutrofilů účastnících se zánětu. K inhibici COX dochází pouze za nízkých koncentrací kyseliny arachidonové a peroxidu, jejichž koncentrace jsou při závažných zánětlivých stavech z pravidla vysoké. V modelech zánětlivé bolesti byly analgetické účinky APAP (a AM404) výraznější v porovnání u zdravých jedinců, což je způsobeno zvýšenou expresí receptorů TRPV1 během zánětlivého procesu (Ohashi, 2020).

Primárním účinkem by mohla být také inhibice PG. Enzym prostaglandin H<sub>2</sub> syntáza je zodpovědný za přeměnu kyseliny arachidonové na nestabilní PGH<sub>2</sub>. Dvě hlavní formy tohoto enzymu jsou konstitutivní PGHS-1 a indukovatelná PGHS-2, jsou také běžně označovány jako COX-1 a COX-2. Aktivita těchto enzymů však závisí na tom, jestli je v oxidované formě. Je možné, že APAP snižuje množství oxidovaných forem těchto enzymů. V přeměně kyseliny arachidonové na PGH<sub>2</sub> dále figuruje APAP jako kosubtrát redukující Fe<sup>4+</sup>, který je klíčový pro regeneraci radikálu Tyr385, na kterém je konverze kyseliny arachidonové závislá. Další variantou inhibice PG by mohla být existence enzymu COX-3, která je velmi citlivá na vliv APAP, avšak později se ukázalo, že COX-3 v lidském organismu nefiguruje. Figuruje tam pouze jeho analog, který se nachází v některých částech centrálního nervového systému a je alternativní variantou COX-1, jež ale není citlivá na APAP (Anderson, 2008; Józwiak-Bebenista, 2014).

Periferními škodlivými stimuly dochází k aktivaci N-metyl-D-aspartátových receptorů, Některé studie naznačují, že právě tato aktivace následně podporuje syntézu NO, který jako spinální neurotransmitter přenáší nociceptivní informace, tedy signály bolesti. APAP a další NSAID do tohoto procesu zasahují a bolest mohou tlumit právě díky ovlivnění NO. Problémem správného porozumění mechanismu NO je, že může bolest jak zesilovat, tak tlumit, a to v závislosti na jeho množství. NO navíc ovlivňuje aktivitu PGHS-1 a PGHS-2, které jsou zodpovědné za tvorbu PG, čímž se jeho účinek ještě více propojuje s cestou účinku APAP (Anderson, 2008).

### 1.1.3 Syntéza acetaminofenu

N-arylamidy jsou biologicky aktivní molekuly, které jsou široce využívány v léčivech a agrochemikáliích. APAP má relativně jednoduchou strukturu a proto jeho syntéza probíhá pouze v několika krocích, které jsou vysoce výtěžné, a má velkou účinnost, takže vzniká minimum odpadních produktů. Pro syntézu APAP bylo již zkoumáno více postupů, ale všechny průmyslově používané jsou založeny na acetylaci p-aminofenolu v konečném kroku syntézy (Joncour, 2014).

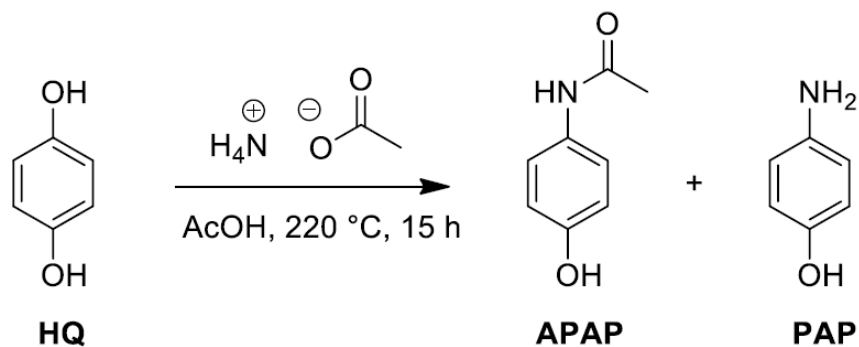


Obrázek 3: Komerční cesty syntézy acetaminofenu (Joncour, 2014).

Prvním krokem syntézy je vznik p-aminofenolu, který můžeme získat třemi způsoby. První způsob je nitrací chlorbenzenu s následnou hydrolyzou za alkalických podmínek (a následném okyselení) a hydrogenací odpovídajícího p-nitrofenolu (viz obrázek č. 3, cesta 1). Tato možnost se skládá ze 4 kroků od počátečního benzenu a vzniká při ní spousta solí, což

zapříčiňuje nižší účinnost, asi 38 %. Alternativní možností je přímá nitrace fenolu za vzniku p-aminofenolu pomocí 4 kroků z benzenu, ale s lepší účinností, a to 54 % (cesta 2). Obě tyto cesty vedou k produkci významného poměru orto-izomeru. Třetí možností je hydrogenace nitrobenzenu na fenylhydroxylamin, který je za kyselých podmínek přeměněn na p-aminofenol pomocí Bambergerova přesmyku (cesta 3). Nevýhodami této možnosti je mírná selektivita, protože jako vedlejší produkt vzniká anilin, a vznik velkého množství sulfátových solí, které snižují celkovou atomovou účinnost na asi 52 %. Vzhledem ke korozivním a znečišťujícím vlastnostem kyseliny sírové byla snaha najít lepší možnost pro životní prostředí (Joncour, 2014; Ogemdi, 2019).

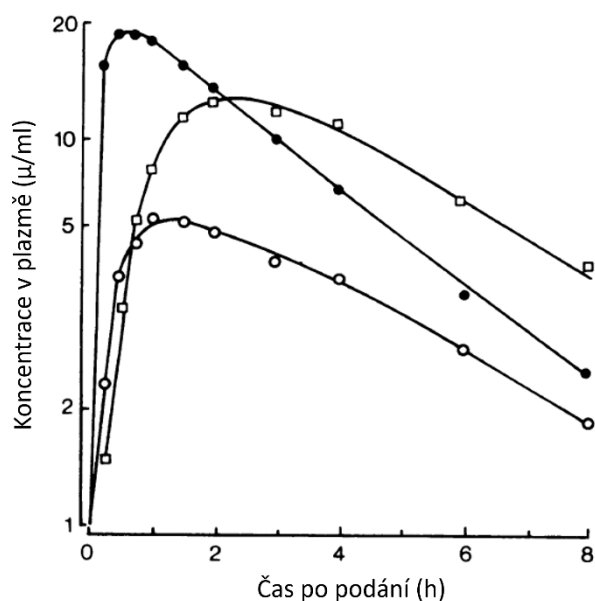
Nejslibnější variantou syntézy se jeví přímá amidace hydrochinonu s acetamidem, neboť jako vedlejší produkt vzniká pouze voda. Hydrochinon (HQ) lze připravit přímou oxidací fenolu, který je zároveň běžnou výchozí látkou při výrobě p-nitrofenolu. Při reakci hydrochinonu s acetamidem za zvýšené teploty a za přítomnosti kyselého katalyzátoru dochází ke vzniku acetaminofenu s výtěžností až 86 %. Alternativní přístup k přímé syntéze acetaminofenu z hydrochinonu využívá octan amonný jako amidační činidlo, viz obrázek č. 4. Tato metoda rovněž produkuje pouze vodu jako vedlejší produkt a nevznikají žádné soli. Reakce navíc vykazuje vysokou selektivitu přesahující 95 % (Joncour, 2014; Ogemdi, 2019).



Obrázek 4: Amidace hydrochinonu v kyselině octové (Joncour, 2014).

### 1.1.4 Biotransformace acetaminofenu v organismu

APAP je slabá organická kyselina ( $pK_a \approx 9,5$ ) rozpustná ve vodě i v tucích a je podávána orálně. Při fyziologickém pH (7,35 – 7,45) je téměř neutrální, absorpce probíhá v gastrointestinálním traktu pasivním transportem, a to primárně v tenkém střevě, s maximální koncentrací v plazmě do 15 – 30 minut po podání nalačno. Poměr koncentrace v červených krvinkách a v plazmě je asi 1,5:1. Metabolismus APAP závisí jak na věku, tak na podané dávce. U zdravých jedinců je poločas rozpadu při terapeutické dávce okolo 1,5 – 2,5 hodiny a do 24 h je vyloučen do moče. Koncentrace APAP a jeho metabolitů po podání v čase je znázorněna na obrázku č. 5 (Prescott, 1980).

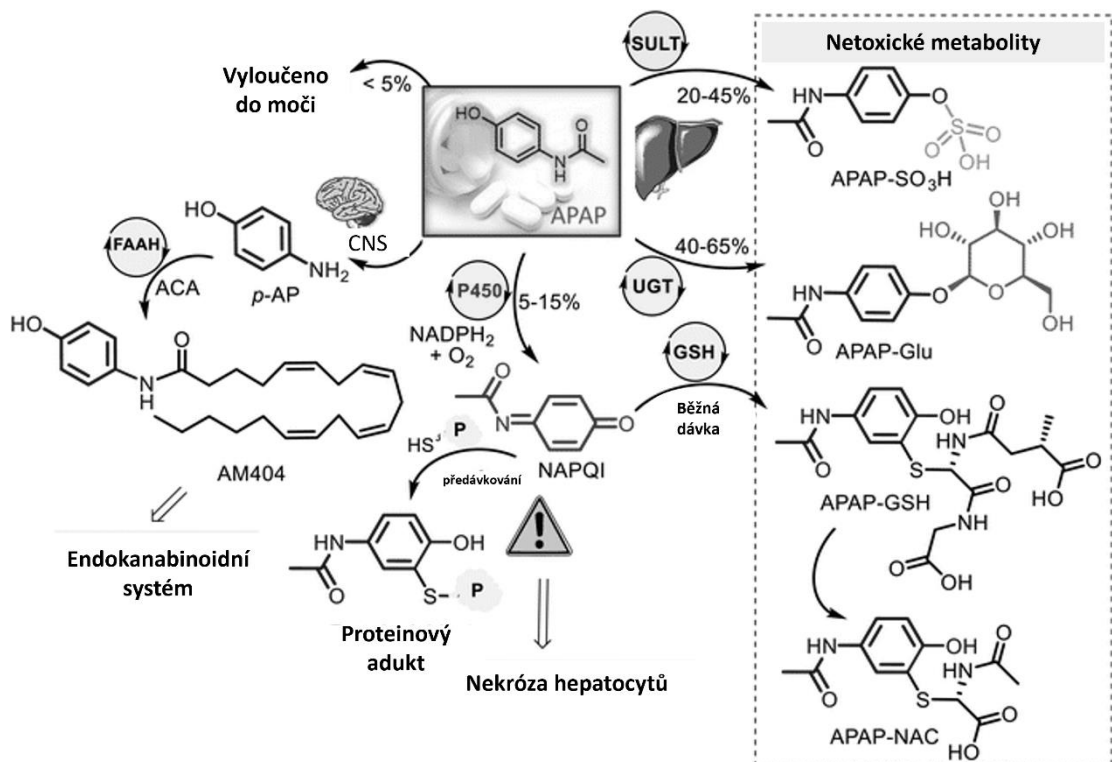


Obrázek 5: Koncentrace APAP a jeho konjugátů v po orální dávce 20 mg/kg. APAP = ●, sulfát = ○, glukuronid = □ (Prescott, 1980).

Třemi hlavními jaterními cestami metabolismu APAP jsou glukuronidace, sulfonace a P450 oxidace. Po podání terapeutické dávky dochází k transformaci APAP na dva inaktivní metabolity. Prvním metabolitem je glukuronid APAP-Glu, který vzniká glukuronidací vlivem enzymu uridin 5'-difosfoglukuronyl-transferázy (UDPGT) a druhým metabolitem jsou sulfátové deriváty APAP-Sul (APAP-SO<sub>3</sub>H), které vznikají vlivem enzymu sulfotransferázy (SULT). Tyto dva kroky odpovídají přibližně 80 – 90 % absorbovaného APAP, přičemž asi 40 – 65 % metabolitů v moči tvoří APAP-Glu a asi 20 - 45 % tvoří APAP-Sul. Méně jak 5 % je vyloučeno v nezměněné podobě a přibližně 5 – 15 % APAP je oxidováno oxidačním systémem cytochrom P450, což dále vede metabolickou aktivací na produkty 3-(cystein-S-yl)acetaminofen (APAP-Cys) a kyselinu merkapturovou, které jsou vyloučeny do moče. Mimo tyto popsané cesty může docházet také k deacylaci APAP vlivem N-acetylázy za vzniku p-aminofenolu. Ten je v mozku a cerebrospinální tekutině konjugován enzymem hydroláza amidů mastných kyselin (FAAH) s kyselinou arachidonovou za vzniku aktivního metabolitu AM404, který je schopen aktivovat kanály podílející se na signalizační dráze bolesti a podílí se

na zprostředkování analgetického účinku APAP (Mazaleuskaya, 2015; Yan, 2018; Kouznetsov, 2021).

Metabolická aktivace APAP je katalyzována enzymy cytochrom P450 (CYP2E1), čímž vzniká minoritní část reaktivního metabolitu NAPQI. Reaktivní NAPQI, který vzniká převážně v játrech, ale také v ledvinách, je primárně zodpovědný za paracetamolem způsobenou hepatotoxicitu. Je to elektrofil, který reaguje s nukleofilní sulfhydrylovou skupinou. Detoxikace tohoto reaktivního metabolitu probíhá rychle konjugací na sulfhydrylovou skupinu glutathionu (GSH) na APAP-SG (také APAP-GSH), který dále přechází s N-acetylcysteinem na APAP-NAC. Sulfátové deriváty a většina glukuronidových derivátů je z jater krevním řečištěm transportována do ledvin, kde jsou eliminovány močí, část APAP-Glu se nachází ve žluči a následným transportem střevy se dostává do krevního řečiště. Ledviny jsou hlavním místem dispozice konjugátů sulfátu, ať už přímou exkrecí do moči, nebo další biotransformací. Pokud je ale dávka > 4 g za den, je cesta vzniku konjugátů saturována a zvýší se vznik APAP-Glu a NAPQI. Při toxické dávce se již APAP vylučuje nezměněný a je následně oxidován na další NAPQI, jehož nadbytek spotřebuje zásoby GSH a začne tak tvořit adukty s proteiny. To může vést k oxidačnímu stresu, disfunkci mitochondrií a následně i k buněčné smrti, tedy k nekróze hepatocytů. Výše popsané metabolické přeměny jsou znázorněny v obrázku č. 6 (Mazaleuskaya, 2015; McGill, 2013; Yan, 2018).



Obrázek 6: Schéma metabolismu APAP v játrech (Kouznetsov, 2021).

Protože metabolická aktivace předchází následným toxickým efektům, je inhibice enzymů P450 efektivní cestou, jak zamezit poškození jater vlivem předávkování APAP. Mezi možnostmi patří etanol, který se ukázal být kompetitivním inhibitorem metabolismu regulovaným P450 v některých zvířecích modelech. Akutní expozice etanolu by mohla redukovat poškození jater vlivem APAP, naopak chronická expozice může zvýšit metabolickou aktivaci a následnou toxicitu, a to pravděpodobně indukcí enzymů P450. Stejně tak je tomu u další možnosti, kterou je izoniazid, který jak inhibuje, tak zvyšuje metabolismus APAP, a to opět v závislosti na tom, zda došlo k současnému užití s APAP nebo chronickému užívání. Mimo inhibici enzymů P450 se na metabolismu APAP podílejí také látky, které jakkoliv spotřebovávají zásoby GSH nebo podporují jeho resyntézu, což má významný vliv na následném poškození jater. Takovou látkou je například buthionin sulfoxid, který je inhibitorem syntézy GSH, nebo opioidy, které se také podílejí na snížené hladině GSH v játrech (McGill, 2013).

K doplnění vyčerpaného GSH při vysokých dávkách APAP efektivně pomáhá N-acetylcystein (NAC), který GSH doplňuje a posiluje tím detoxikaci NAPQI. Má také protektivní účinky při oxidačním poškození, kdy vznikají reaktivní formy kyslíku v mitochondriích, přechází selhání ledvin, může dodávat energetické substráty pro Krebsův cyklus a podporuje vznik APAP-sul. Při podání do 8 – 10 hodin po toxické dávce APAP snižuje riziko hepatotoxicity na méně než 5 %. Pro ochranu mitochondrií jsou studovány i další sloučeniny kromě NAC, například antioxidant 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl nebo methylenová modř. Jako odpověď na hepatotoxicitu vyvolanou APAP jsou aktivovány různé signalizační cesty, dochází například k aktivaci transkripčního faktoru nukleární erytroidní faktor 2-like 2 (Nrf2), ten indukuje syntézu antioxidantních enzymů, které katalyzují první krok syntézy GSH a podílejí se na detoxikaci NAPQI (Yan, 2018; Stahl, 2015; Mazaleuskaya, 2015).

Konjugáty fáze I a II musejí být dále eliminovány. Studie na zvířecím modelu ukázaly, že na rozdíl od APAP, eliminace konjugátů APAP-Glu a APAP-Sul do žluči probíhá pomocí transportérů Multidrug Resistance-associated Protein 2 (Mrp2) a Breast cancer resistance protein (Bcrp) nacházejících se v membráně hepatocytů. Naopak basolaterální vylučování APAP-Glu je spojeno s transportérem Mrp3 a částečně i s Mrp4. Po předávkování APAP dochází ke zvýšení exprese těchto transportérů, tedy jejich hladina se mění v závislosti na jaterním poškození a ukazuje tak na jejich regulační roli. Na regulaci těchto změn se podílí také transkripční faktory, například Nrf2, nebo cytokiny (McGill, 2013).

### 1.1.5 Hlavní metabolity acetaminofenu a jejich stanovení

Plazma, moč a sérum jsou nejběžnějšími biologickými vzorky pro farmakokinetické studie a ke zkoumání expozice metabolitů paracetamolu. Za hlavní metabolity acetaminofenu v moči je považován APAP-Glu (s koncentrací až 100 µg/ml) a APAP-Sul. Konjugát APAP-Cys vzniklý z reaktivního metabolitu NAPQI je společně s katecholovými metabolity považovány za minoritní. Nejčastěji používané techniky pro stanovení a kvantifikaci metabolitů APAP v biologických vzorcích jsou kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Chromatografická metoda může ale narážet na problém se separací. Standardní metodou pro odhad expozice pro posouzení rizika se stanovuje celkový APAP, který zahrnuje volný APAP a konjugáty II. fáze po enzymatické dekonjugaci. Tento přístup však stanoví pouze část metabolické cesty a zachytí pouze krátké časové okno k určení původu APAP, který může být i environmentální. Spolehlivé metody monitoringu jsou klíčové pro určení rizik a standardní metody posuzující expozici pouze na základě některých metabolitů mohou být limitující (Caudet, 2025; David, 2021).

Ve studii (David, 2021) došlo k detekci celkově 13 metabolitů APAP v moči a v krvi a ty zahrnovaly APAP-Glu a APAP-Sul konjugáty, které vznikají v játrech působením enzymy SULT a UDPGT. Dále konjugáty GSH pocházející z NAPQI, a to APAP-Cys a APAP-NAC, který vzniká působením enzymů  $\gamma$ -glutamyltransferázy, dipeptidázy a cystein-S-konjugáty N-acetyltransferázy. Dalšími metabolity detekovanými v této studii byly katecholové metabolity, kterými jsou 3-OH-APAP a 3-OCH<sub>3</sub>-APAP. Mimo tyto také došlo k detekci konjugované formy S-methyl-3-thioacetaminofenu (S-CH<sub>3</sub>-APAP-Sul a S-CH<sub>3</sub>-APAP-Glu) a S-methyl-3-thioacetaminofen sulfoxidu (SO-CH<sub>3</sub>-APAP-Sul and SO-CH<sub>3</sub>-APAP-Glu), které byly dříve známy pouze u hlodavců. Detekovaly se také metabolity, které do té doby nebyly detekovány vůbec, a to NAC-O-APAP and SH-APAP-Glu. Na základě analytické odpovědi těchto 6ti posledních zmíněných metabolitů pouze S-CH<sub>3</sub>-APAP-Sul a SO-CH<sub>3</sub>-APAP-Sul prokázaly potenciál v APAP monitoringu, protože jejich hladina před podáním APAP byla minoritní a naopak 24 – 48 h po podání byla majoritní, mohly by tedy být dobrými markery pro monitoring u lidí. Metabolitem vhodným pro vylepšení sensitivity byl označen 3-OCH<sub>3</sub>-APAP-Glu pro jeho vysokou analytickou odpověď u standardní metody kapalinové chromatografie s elektrospřejovou ionizací (LC-ESI-MS/MS). Všech 14 látek je shrnuto v tabulce č. 1 (David, 2021).

Tabulka 1: Metabolity APAP detekované pomocí hmotnostní spektrometrie ve studii (David, 2021).

	Metabolit	Sumární vzorec
<b>Původní sloučenina</b>	APAP	$C_8H_9NO_2$
<b>Reakce II. fáze</b>	APAP-Sul	$C_8H_9NO_5S$
	APAP-Glu	$C_{14}H_{17}NO_8$
<b>Katecholová dráha</b>	3-OH-APAP	$C_8H_9NO_3$
	3-OH-APAP-Sul	$C_8H_9NO_6S$
	3-OCH <sub>3</sub> -APAP-Glu	$C_{15}H_{19}NO_9$
<b>Merkapturová dráha</b>	APAP-Cys	$C_{11}H_{14}N_2O_4S$
	NAC-APAP	$C_{13}H_{16}N_2O_5S$
	NAC-O-APAP	$C_{13}H_{16}N_2O_6S$
<b>Thiometylová dráha</b>	SH-APAP-Glu	$C_{14}H_{17}NO_8S$
	S-CH <sub>3</sub> -APAP	$C_9H_{11}NO_2S$
	S-CH <sub>3</sub> -APAP-Sul	$C_9H_{11}NO_5S_2$
	S-CH <sub>3</sub> -APAP-Glu	$C_{15}H_{19}NO_8S$
	SO-CH <sub>3</sub> -APAP-Sul	$C_9H_{11}NO_6S_2$
	SO-CH <sub>3</sub> -APAP-Glu	$C_{15}H_{19}NO_9S$

Ve studii (Caudet, 2025) bylo provedeno stanovení ze séra a plazmy pomocí 2D kapalinové chromatografie a došlo ke stanovení 6 metabolitů paracetamolu: hlavní metabolit APAP-Glu, produkt p-aminofenol (PAP) společně s AM404, NAPQI, APAP-SG a APAP-Cys. Implementace 2D přístupu s UV detekcí nastala pro to, že AM404 má velmi nepolární alkylový řetězec a naopak APAP-Glu je vázán na sacharid a je velmi polární. V klasické 1D chromatografii se tedy analyzovaly polární metabolity APAP-SG a APAP-Cys a pouze výjimečně nepolární metabolity. V tomto případě 2D chromatografie byla použita pro separaci reverzní fáze pro separaci AM404, PAP a NAPQI a ve druhé dimenzi mix separačních mechanismů jako je iontová výměna a hydrofobní interakce pro separaci APAP-Cys, APAP-Glu a APAP-SG (Caudet, 2025).

O analýze APAP a jeho metabolitů, konkrétně metabolitů APAP-gluc, APAP-sul, APAP-merkapturát (konečný produkt merkapturové dráhy) a APAP-Cys v plazmě, plné krvi a ve vysušené kapce krve získané pomocí objemového absorpčního mikrovzorkování píšou také ve studii (Delahaye, 2021). Ke kvantitativnímu stanovení použili metodu LC-MS/MS. Analýza byla provedena u pacientů po terapeutické dávce APAP, a na základě předběžných analýz nebyl APAP-SG zahrnut do kvantitativního stanovení, protože jeho koncentrace byla pravděpodobně

pod limitem detekce. Jeho velmi nízká hladina může být odůvodněna rychlou přeměnou na APAP-Cys a jeho nestabilitou v plazmě (Delahaye, 2021).

### 1.1.6 Hepatotoxicitá acetaminofenu

APAP je jedním z nejvíce užívaných léčiv a to pro jeho kombinaci antipyretických a analgetických účinků, je ale zároveň nejčastější příčinou vzniku léky vyvolaným poškozením jater, z angličtiny „drug-induced liver injury“ (DILI) a je hlavní příčinou akutního selhání ledvin (více než 50 % případů), které je spojenou s vysokou úmrtností a také nutností transplantace ledvin. Akutní jaterní selhání spočívá v jaterní dysfunkci, což potvrzuje následná koagulopatie, žloutenka a encefalopatie. Bezpečná dávka APAP je udávána maximálně 4 g/24 hodin, u lidí s onemocněním jater nebo alkoholismem je tato dávka maximálně 2 g/24 hodin. I přes to je toxicita APAP komplikovanou záležitostí vzhledem k její těžké identifikaci, která je obtížná kvůli rostoucímu užívání kombinace volně prodejných léků proti nachlazení a léků proti bolesti na předpis. Tuto situaci dále komplikuje i užívání alkoholu, který se také podílí na hepatotoxicitě. Jak již bylo zmíněno, metabolismem APAP dochází mimo jiné ke vzniku reaktivních forem kyslíku, které byly dříve považovány za hlavní příčinu poškození jater. Později začala být příčina poškození připisována spíše mitochondriální dysfunkci, jako hlavnímu zdroji volných radikálů a oxidačního stresu při hepatotoxicitě. Mitochondriální dysfunkce souvisí se vznikem NAPQI a s přítomností mitochondriálních proteinů, které jsou zahrnuty v elektronovém transportním řetězci. Mitochondriální superoxid reaguje s NO za vzniku reaktivních peroxynitritů, které jsou hlavním zdrojem oxidačního a nitrosativního stresu. Při podání APAP dochází ke snížení aktivity enzymu GSH-peroxidázy až o 60 %. Tento enzym slouží k detoxikaci reaktivních forem kyslíku za současné oxidace GSH. Při depleci GSH však dochází oxidačním stresem k otevření mitochondriálních pórů, a to vede k destrukci membránového potenciálu a k zastavení syntézy adenosintrifosfátu. Takový krok vede nakonec až k indukci apoptózy, tedy k buněčné smrti a vzniku akutního zánětu (Li, 2023; Rotundo, 2015).

DILI je jaterní poškození způsobené řadou běžně používaných léků, bylinných produktů, nebo dietních suplementů. Ač jsou játra klíčovým faktorem k metabolizaci těchto látek, DILI je jedním z nejčastějších nežádoucích efektů léčiv a jeho vznik je často důvodem k odstranění daného léčiva z trhu. Klinický obraz může být od mírného zvýšení jaterních enzymů bez dalších symptomů, k vážnému jaternímu poškození, transplantaci, či až k smrti v řádu dnů. Většina postižených se uzdraví po vysazení léčiva způsobujícího problém, někteří pacienti ale postoupí

do stádia fatálneho jaterného selhání. Presná patogeneze DILI je zatím ne úplně jasná, proto je k tomuto těžké přistoupit z hlediska prevence. Léčba je také velmi limitovaná a spoléhá pouze na podporující terapii a antidota. Mezi rizikové faktory patří věk, pohlaví, životní styl aj., shrnuté v tabulce č. 2. Diagnostika DILI je složitá pro nedostatek potvrzujících a objektivních laboratorních testů. Vyžaduje také vyloučení jiných příčin poškození jater, jako je virová hepatitida, hepatitida vlivem alkoholu, či autoimunní onemocnění, Wilsonova choroba a dalších. Mezinárodní skupina expertů navrhla některá kritéria pro diagnózu DILI, mezi které patří prahové hodnoty alaninaminotransferázy a alkalické fosfatázy. Mezi další důležité faktory patří sledování časové osy užití léku a vzniku poškození jater. K potvrzení diagnózy se používají také zobrazovací metody a nebo v některých případech jaterní biopsie, která ale není rutinní (Wang, 2023).

Tabulka 2: Rizikové faktory DILI (Wang, 2023).

Rizikový faktor	Důvod
Věk	Starší věk snižuje regenerační schopnost jater a mění farmakokinetiku.
Pohlaví	Ženy mají vyšší riziko imunitně zprostředkované DILI kvůli hormonálním rozdílům.
Komorbidity	Přítomnost hepatitidy B a C zvyšuje prozánětlivé prostředí, což zvyšuje riziko DILI.
Střevní mikrobiota	Některé bakterie mohou ovlivnit metabolismus léků a zvyšovat riziko DILI.
Životní styl	Malnutrice a nadváha zvyšují riziko DILI, stejně jako konzumace alkoholu a drog.
Vlastnosti léčiv	Dávkování a lipofilnost léků ovlivňují riziko DILI; vysoké dávky a lipofilní léky zvyšují riziko.
Genetické faktory	Genetické polymorfismy ovlivňují metabolismus léků a mohou zvyšovat riziko DILI.

Samotná dávka APAP, stejně jako čas mezi dávkou a antidotem NAC, je významným faktorem v závažnosti hepatotoxicity. Závažnost také zvětšuje kombinace s dalšími léky, přítomnost malnutrice, mezi pacienty se zvýšeným rizikem kvůli špatnému nutričnímu stavu řadíme pacienty trpící alkoholismem, nebo také mentální anorexií. Riziko zvyšuje také věk, léčba opiáty při rakovině nebo chronické bolesti a chronické jaterní onemocnění. Užívání APAP je rizikové v těhotenství, kdy mohou být následky předávkování fatální jak pro matku, tak pro plod. Hlavní možností terapie hepatotoxicity je podání NAC, který obnovuje GSH hladinu a tím umožňuje odstraňování NAPQI. NAC je hydrolyzován na cystein, dojde k obnově

GSH a také poskytuje thiolové skupiny, které dále reagují s NAPQI v hepatocytech. Nejlepší výsledky antidota jsou dosaženy při podání do 8 h po předávkování, ale ke snížení úmrtnosti dochází až do 36 h od předávkování. NAC je podáván intravenózně nebo orálně. Pokud je hladina APAP v séru vyšší než 10 µg/ml, nebo pokud je dále zvýšená alaninaminotransferáza, dávkování může pokračovat, obzvláště v případech acidózy, koagulopatie, akutního poškození ledvin a hyperbilirubinémie. Ačkoliv se většina pacientů po léčbě NAC uzdraví kompletně, u některých se může rozvinout chronické DILI a nebo dokonce akutní selhání jater. To nastává u případů, u kterých byla podána extrémně vysoká dávka APAP a nebo nedošlo k včasnému zahájení léčby. (Rotundo, 2015; Sabaté, 2011; Li, 2023).

## 1.2 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je analytická technika, která dovoluje rychlou a efektivní separaci nabitých látek přítomných v malém množství vzorku. Separace je možná díky odlišné elektroforetické pohyblivosti jednotlivých iontů v elektroforetickém médiu nacházejícím se v kapiláře. Výhodou této techniky je jednoduchá instrumentace, která se skládá ze zdroje vysokého napětí, dvou zásobníků pufru, kapiláry a detektoru. Může být doplněna například autosamplerem, dalšími zařízeními pro dávkování, kontrolou teploty kapiláry nebo vzorku a dalšími detektory. S užitím základní instrumentace lze analýzy provádět v několika módech, mezi které patří:

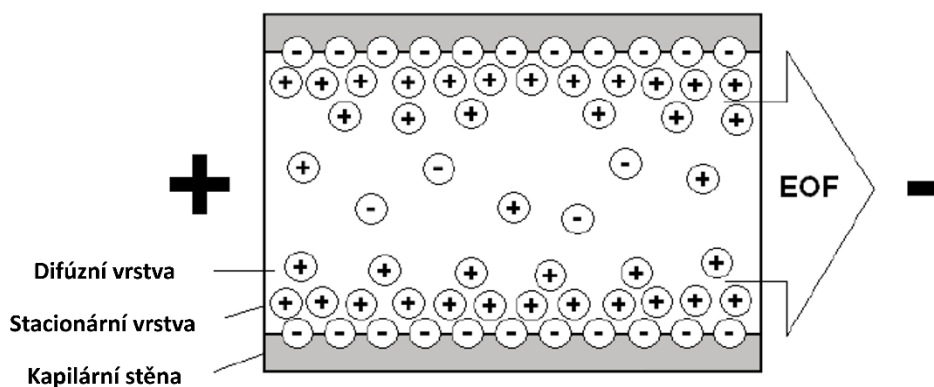
- Kapilární zónová elektroforéza (CZE)
- Kapilární gelová elektroforéza (CGE)
- Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC nebo MECC)
- Kapilární elektrochromatografie (CEC)
- Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)
- Kapilární izotachoforéza (CITP)

V případě kontinuálního elektrolytického systému tvoří elektrolyt jednotný roztok podél migrační cesty, který se nemění v čase a vytváří vodivé prostředí pro tok elektrického proudu a pro vznik elektrického pole. Elektrolytem bývá obvykle pufr, který může selektivně ovlivnit efektivní mobilitu jednotlivých složek separace. V diskontinuálním elektrolytickém systému

dochází k migraci vzorku mezi dvěma různými elektrolyty. Prvním elektrolytem je vedoucí elektrolyt, který tvoří přední zónu, a koncový elektrolyt, který tvoří zadní zónu. Příkladem tohoto typu separace je CITP (Li, 2001).

### 1.1.1 Kapilární zónová elektroforéza

Separace v CZE je založena na rozdílech v elektroforetické mobilitě, která se projeví v rozdílné rychlosti separace iontů v pufru, který se nachází v kapiláře. Tento mechanismus ovlivňuje převážně velikost částic a náboj v daném pH. Kapiláry jsou obvykle z oxidu křemičitého (silika) a obsahují povrchové silanolové skupiny, které mohou být v přítomnosti elektroforetického média ionizovány. Rozhraní mezi stěnou kapiláry a médiem se skládá ze tří vrstev, a to z negativně nabitého povrchu stěny siliky (v  $\text{pH} > 2$ ), imobilní vrstvy a z difúzní vrstvy kationtů, které přiléhá k vrstvě siliky. Na tomto tenkém místě styku pevné části kapiláry a média vzniká elektrická dvojvrstva, jejíž pevná část se nepohybuje, zatímco kapalná část opačného náboje v kapalné části dvojvrstvy se může pohybovat v elektrickém poli, viz obrázek č. 7.



Obrázek 7: Jednotlivé vrstvy kapiláry siliky (Lodén, 2008).

Této migraci kapilárou říkáme elektroosmotický tok (EOF), nebo také elektroosmóza. Během jedné separace mohou být děleny kationty i anionty. Kationty jsou přitahovány ke katodě a jejich rychlost je ovlivněna EOF. Anionty jsou sice přitahovány k anodě, ale vlivem toku elektroforetického média jsou strhnuta směrem ke katodě. Vzhledem k této skutečnosti migrují jako první kationty s největším poměrem náboj/hmotnost, poté kationty s menším poměrem, poté neutrální komponenty s nulovým poměrem a nakonec anionty. První migrují ty anionty, které mají menší poměr náboj/hmotnost, poté ty s větším poměrem. Rychlost migrace lze

ovlivnit změnou pH, vizkozity, iontovou silou, napětím a dielektrickou konstantou pufru (Li, 2001; Gaš, 2001).

Jednou z výhod CZE je, že zde není potřeba tlak pro tok v kapiláře, který by jinak vyústil v parabolický profil toku, čímž by došlo k rozšíření píků. To je minimalizováno také pomocí otevřených tubulárních kapilár malého vnitřního průměru. Jediným faktorem přispívajícím k rozšiřování píků je podélná difúze. Za podmínek, při kterých nemá elektroosmotický tok vliv, je rychlost migrace  $v$  dána:

$$v = \mu_{ep}E = \frac{\mu_{ep}V}{L} \quad (1)$$

Kde:  $\mu_{ep}$  je elektroforetická mobilita

$E$  je intenzita elektrického [V/m]

$V$  je aplikované napětí [V]

$L$  je délka kapiláry [m]

Migrační čas  $t$  je dán:

$$t = \frac{L}{v} = \frac{L^2}{\mu_{ep}V} \quad (2)$$

Elektroosmotický tok je významným ve většině běžně používaných pufrů a je větší, než elektroforetické mobility iontů. Pochází z negativně nabitých skupin kapilární stěny, která způsobuje vytvoření elektrické dvojvrstvy, která se skládá z pevné vrstvy a difúzní vrstvy tvořené mobilními kationty. Elektrický potenciál, který se nachází v těchto vrstvách, se nazývá zeta potenciál  $\zeta$  a je popsán Helmholtzovou rovnicí:

$$\zeta = \frac{4\pi \eta \mu_{eo}}{\varepsilon} \quad (3)$$

Kde:  $\zeta$  je zeta potenciál

$\eta$  je viskozita

$\mu_{eo}$  je mobilita elektroosmotického toku

$\varepsilon$  je permitivita

Pod vlivem aplikovaného elektrického pole se začnou kationty z difúzní vrstvy pohybovat směrem ke katodě a to způsobí, že s sebou začnou strhávat i další molekuly roztoku. Rychlost EOF je dána:

$$v = \frac{\varepsilon}{4\pi\eta} E \zeta \quad (4)$$

Elektrická dvojvrstva je obvykle velmi tenká vrstva (několik stovek nanometrů) a vzhledem k poloměru kapiláry (typicky 50 – 100  $\mu\text{m}$ ), považujeme EOF za jev pocházející ze stěny kapiláry. Svým vlivem nezpůsobuje rozšiřování píků přímo, ale ovlivňuje čas migrace kapilárou, čímž může ovlivňovat jak účinnost, tak rozlišení. V přítomnosti EOF je dána rychlost  $v$  a čas  $t$  migrace rovnicemi:

$$v = \frac{(\mu_{eo} + \mu_{ep})V}{L} \quad t = \frac{L^2}{(\mu_{eo} + \mu_{ep})V} \quad (5,6)$$

Rozptyl a počet teoretických pater je dán:

$$\sigma^2 = \frac{2 DL^2}{(\mu_{eo} + \mu_{ep})V} \quad (7)$$

A

$$N = \frac{\mu_{eo} + \mu_{ep}}{2 D} \quad (8)$$

Kde:  $\sigma^2$  je rozptyl

$N$  je počet teoretických pater

$D$  je difúzní koeficient

Rozlišení dvou píků  $R$  je v elektroforéze dáno rovnicí:

$$R = \frac{1}{4}(\mu_{ep,1} + \mu_{ep,2}) \cdot \sqrt{\frac{V}{2LD(\bar{\mu}_{ep} + \mu_{eo})}}$$

(9)

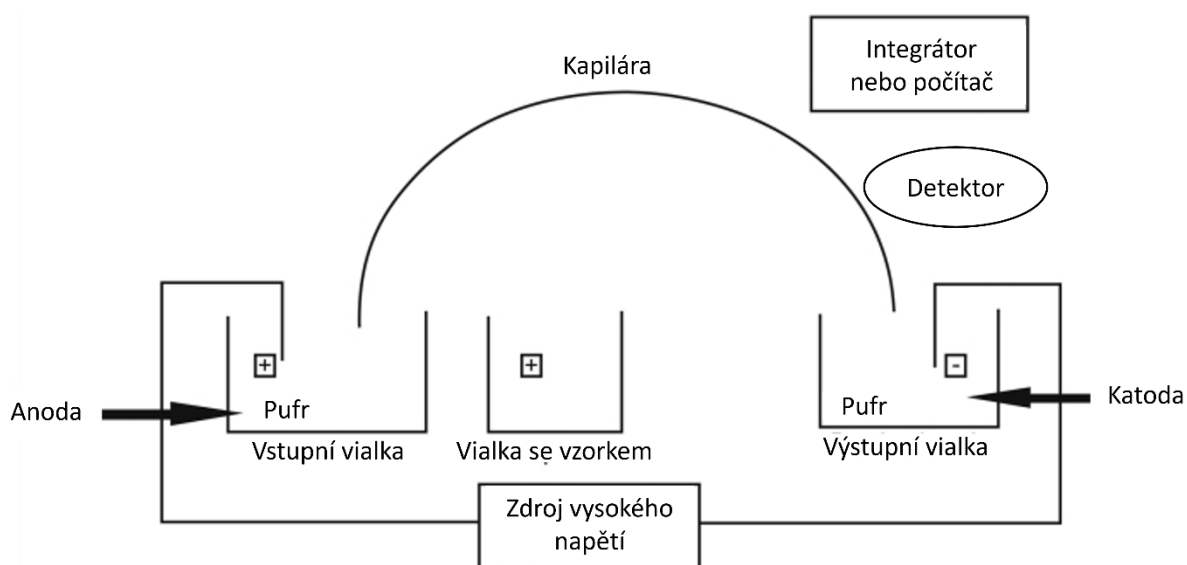
Ovlivnit EOF můžeme složením roztoku, například přidavky povrchově aktivních látek (tenzidy), které pokrývají povrch kapiláry a mohou tak změnit rychlost a nebo i směr toku. Nejjednodušším příkladem jeho úpravy je úprava pH a iontového složení pufru. Další možností je použití aditiv, které mohou měnit zeta potenciál. Přidáním kationtového surfaktantu cetyltrimethylammonium bromidu (CTAB) můžeme elektroosmotický tok obrátit, přidáním methanolu můžeme EOF významně redukovat, naopak acetonitril je schopen EOF zvýšit (Li, 2001)

### 1.1.2 Instrumentace

Základní instrumentaci znázorňuje obrázek č. 8. Dávkování vzorku a jeho reprodukovatelnost je klíčovým aspektem správné kvantitativní analýzy a v případě CE je hlavním problémem velmi malý objem dávkovaného vzorku, který je v rámci nanolitru. Pro dávkování se používá dva základní módy: hydrodynamický a elektrokinetický. V obou těchto případech se dávkování provádí přímo na jeden konec kapiláry, čímž je potlačeno rozšiřování zón, které by mohlo nastat v případě dávkovacích ventilů. Při elektrokinetickém, nebo také jinak elektromigračním módu je elektroda odejmuta z vialky s pufrem a je vložena do vialky se vzorkem. Po krátký časový úsek je aplikováno dávkovací napětí a tím se pomocí elektromigrace přesune vzorek do konce kapiláry. Objem nadávkovaného vzorku může být v tomto případě regulován pomocí času dávkování a také pomocí použitého napětí. Vzhledem k rozdílné pohyblivosti jednotlivých komponent ve vzorku může docházet k tomu, že s větší pohyblivostí komponenty se také zvětší jejich množství v dávkovaném objemu oproti těm méně mobilním. Druhým problémem je rozdíl vodivosti pufru a vzorku, což nastává v případě, že vzorek nebyl připraven z daného použitého pufru. V tomto případě dávkování je vhodné použití interního standardu pro kvalitativní analýzu. Druhým typem dávkování je hydrodynamický, nebo také hydrostatický mód. Ten vylučuje diskriminaci vyskytující se v elektrokinetickém módu a jeho principem je rozdíl tlaku. Těmito dvěma metodami dávkování můžeme dosáhnout reprodukovatelnosti v oblasti 2 – 3 % RSD. Dalšími možnostmi dávkování může být užití

dávkovacích ventilů, rozdělovačů a stříkaček, které jsou podobné jako ty používané ve chromatografii, narážejí ale na problém v oblasti praktičnosti (Ryvolová, 2009; Li, 2001).

Malé kapiláry a objemy v CE mohou být výzvou pro citlivou detekci bez rozptylu zón, který nastává při použití spojek a konektorů, čemuž se můžeme vyvarovat použitím detekce přímo na koloně. Proto jsou UV a fluorescenční detekce nejběžnějšími detekčními technikami pro CE, ale možnosti volby detekční techniky pro CE jsou velmi bohaté. Zajímavou možností je elektrochemická detekce, do které patří nesporně výhodné amperometrické a konduktometrické detekce, obzvláště pro detekci malých anorganických iontů, které nejsou schopny absorpce světla. Obecně populární hmotnostní detekce vzrostla na oblibě ve spojení s CE, a to v on-line spojení s elektrosprejem a off-line spojení s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice (MALDI). Výběr vhodné detekční techniky závisí na konkrétní aplikaci a také na citlivosti, které chceme dosáhnout (Ryvolová, 2009; Li, 2001).



Obrázek 8: Instrumentace CZE (Shah, 2022)

### 1.1.2.1 Detekce

Malé rozměry kapilár a malé detekční objemy jsou důvodem náročnější citlivé detekce bez přítomnosti disperze zón. Rozšíření zón je obvykle způsobeno spojeními a konektory a tomu je předcházeno detekcí přímo na kapiláře (Li, 2001).

Vodivostní detekce byla často používána již v začátcích CE. Je univerzální a vhodná pro detekci například anorganických iontů. Velmi užitečnou je bezkontaktní detekce (CCD), při které jsou dvě nerezové trubičky omotané kolem kapiláry, takzvaná „akční“ a snímací elektroda. Mezi kapalinou uvnitř kapiláry a akční elektrodou je generován kapacitní proud a při průchodu mezerou mezi oběma elektrodami je generován další kapacitní proud, který sleduje snímací elektroda. Pokud je vodivost změněna vlivem analytu, je tato změna zachycena snímací elektrodou. Rozdíl vodivosti mezi samotným elektrolytem a analytem by měl být co největší. Vodivost elektrolytu nesmí být příliš vysoká z důvodu předcházení šumu a zároveň nesmí být příliš nízká z důvodu vzniku elektrodisperze. Při použití tohoto typu detekce byl získán limit detekce až v ng/ml. CCD je lehce použitelný v kombinaci s dalšími detekcemi a je vhodný pro mikrofluidní CE (Guijt, 2004; Jong, 2016).

Další používanou detekcí je hmotnostní spektrometrie (MS). Jedná se o citlivou a selektivní detekci malých i velkých molekul, zároveň je MS a MS/MS vhodná pro identifikaci. Výzvou v optimalizaci této detekce je kombinace kapalinové fáze s detekční technikou probíhající ve vakuu. Na druhou stranu je CE používána při velmi nízkých průtocích (nl/ml) a ionizace elektrosprejem je vhodná pro ionizaci polárních a nabitých molekul, které jsou pomocí CE separovány. Dnes je již CZE-MS téměř rutinní záležitostí (Shen, 2019; Jong, 2016)

V neposlední řadě fluorescenční detekce je velmi citlivá detekční technika, obzvláště v případě použití laseru. Excitační záření by mělo být soustředěno na velmi malý objem a zároveň by měla být následná emise efektivně sbírána ze stejného detekčního objemu. Vnitřní a vnější povrch, který láme pronikající excitační a emisní světlo způsobuje rozptyl, který může být důvodem vysoké šumu. Fluorescence je vyzařována do všech směrů a sběr probíhá pouze určité části tohoto světla, proto je zde optická konfigurace velmi důležitá, aby byla zachována požadovaná citlivost. Vzhledem k tomu, že ne každá molekula fluoreskuje, je tato detekce velmi selektivní. V případech, kdy není tato detekce vhodná právě z těchto důvodů, lze využít řady derivatizačních činidel. Detekce fluorescence probíhá často pomocí fotonásobiče v kombinaci s filtrem (Jong, 2016; Xu, 2007).

UV-Vis je velmi populární detekční technikou pro kapilární elektroforézu i další příbuzné techniky. Výhody a nevýhody UV/Vis jsou shrnuty v tabulce č. 3. Její hlavní výhodou je univerzálnost a rozšířenost. Často se totiž jedná o komerční detektory vytvořené přímo pro HPLC, kde je průtoková cela nahrazena kapilárou pro přímou detekci na kapiláře. Vrstva polyimidu na vnější straně kapiláry musí být pro účel detekce odstraněna v oblasti detekčního okna. Toho je docíleno například jednoduchým spálením polyimidu, poleptáním alkáliemi, či mechanickým odstraněním. Poté je detekční okno očištěno pomocí acetonu a připraveno k detekci (Li, 2001).

Limit detekce pro UV/Vis detekci je však pouze  $10^{-5} - 10^{-6}$  M, proto se využívá pomocných metod zvýšení koncentrace analytu a zvýšení citlivosti detektoru. Pro zvýšení koncentrace se používají prekoncentrační techniky, jako je například on-line extrakce na pevné fázi (SPE) nebo koncentrační vrstvení vzorku. Tyto techniky jsou ale omezeny složením matrix. Pro zvýšení citlivosti detektoru se používají tzv. bublinové cely, nebo Z-cely pro zvětšení délky optické dráhy. Pro složky, které neabsorbují v UV oblasti, lze využít nepřímé UV detekce, při které je absorbující ion přidán do samotného elektrolytu. V místě analytu tak vznikne negativní pík. Optimalizace této detekce je komplexní (Jong, 2016; Xu, 2007).

Pro dosažení co největší detekční citlivosti je důležité zvážit řadu faktorů, mezi které patří typ světelného zdroje, amplifikační systém, světelné pozadí a také délku optické dráhy. Z důvodu obtížnosti soustředění dostatečného množství světla do malého vnitřního průměru kapiláry je potřeba, aby byla intenzita světla co největší. Proto je zde důležité použití lamp s velkou intenzitou, optimální šířky štěrbin, správné a stabilní umístění kapiláry a nebo také použití optických vláken. Větší detekční citlivost může být také dosažena zlepšením elektronických obvodů a zpracování signálu. Dalším faktorem je světelné pozadí kolem kapiláry, které je snaha redukovat pomocí otvorů a štěrbin. Problém ale nastává, když jsou otvory moc malé a redukují tak intenzitu světla nadbytečně a naopak, když jsou štěrbiny moc velké a neefektivní pro minimalizaci světla pozadí a mohou tak dokonce vést až ke ztrátě účinnosti kolony. Optická délka dráhy je při detekci na koloně limitována vnitřním průměrem kapiláry. Pro zvětšení optické dráhy se využívá metod, jako je zavedení Z-cely, multireflexní cely, dalších. Hlavní výhodou použití detekce fotodiodového pole (DAD detektor) je získání spektrálních informací napříč více vlnových délek, což může být výhodné pro identifikaci neznámých složek. Díky využití různých vlnových délek můžeme také odhalit, zda ve chromatogramu nedochází k překryvu několika píků (Li, 2001; Crego, 2005).

Tabulka 3: UV/Vis detekce - výhody a nevýhody (Deeb, 2016; Li, 2001).

<b>Výhody</b>
Vysoká dostupnost a jednoduchost zapojení
Nízké náklady na provoz
Dobrá kvantitativní přesnost a linearita
Možnost multivlnové detekce (DAD)
<b>Nevýhody</b>
Krátká optická dráha → nižší citlivost
Nutnost přítomnosti chromoforu v molekule
Možnost šumu/interference při nízkých koncentracích
<b>Možnost zvýšení detekce</b>
Zvětšení optické dráhy (bublinková nebo Z-cela)
On-line koncentrační techniky
Derivatizace analytu pro zvýšení UV odezvy
Použití DAD detektoru pro více vlnových délek

### 1.1.3 Srovnání CE s dalšími technikami

Kapilární elektroforéza je technika často srovnávaná s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) a s klasickou gelovou elektroforézou. CE má velký potenciál v docílení vysoké účinnosti. Hlavním důvodem je již zmíněný píستový profil toku, který je řízen aplikovaným napětím. Na druhé straně v případě HPLC je tok řízen čerpadlem a má tak profil parabolický, což může mít vliv na rozšíření píků. Tento rozdíl je důvodem velmi vysoké účinnosti dosažitelné pomocí CE, píky tak mohou být v tomto případě užší a mohou mít lepší rozlišení. CE má dále větší píkovou kapacitu než HPLC, což umožňuje rozlišení píků eluovaných velmi blízko sebe a tím separaci směsi velkého počtu komponent. Výhodou HPLC je ale velké množství možností stacionární a mobilní fáze pro systémy HPLC, což zvyšuje selektivitu konkrétních separací. V instrumentaci se CE liší tím, že nemá injektor a čerpadlo (v případě HPLC i více čerpadel či směšovač mobilních fází) a nemá ani speciální detekční celu, protože je zde využíváno jednoho konce kapiláry pro dávkování a detekce je uskutečněna pomocí detekčního okénka na kapiláře. CE nemá ani ventil, jako tomu je u HPLC, vzorky jsou obvykle zaváděny do kapiláry pomocí hydrodynamického nebo elektrokinetického módu. Za běžných podmínek jsou oba konce kapiláry ponořeny v pufru a sbírání frakcí může být provedeno pomocí přerušení aplikovaného napětí a přesunutí konce s detekčním oknem do

vialky s elektrodou a pufrem, který je obvykle stejný jako pufr použitý pro separaci. Nevýhodou CE je omezení v rámci průměru kapiláry, a to z důvodu účinnosti a rozptylu tepla. Teplotní gradient mezi středem a stěnou kapiláry je úměrný druhé mocnině poloměru kapiláry, menší kapiláry umožňují větší rozptyl tepla. HPLC může být na druhou stranu provedena jako makro i mikro separační technika, vzhledem k možnosti značně měnit průměr kolony. V rámci detekce jsou HPLC a CE velmi podobné, k detekci jsou používány UV, fluorescenční, elektrochemické, vodivostní, hmotnostní a další detektory. Ve všeobecnosti je CE technika s významnou účinností a větší schopností separace s vysokým rozlišením oproti jiným separačním technikám. Nevýhodou oproti ostatním může být nedostatečná selektivita. Srovnání technik CE a LC je v tabulce č. 4 (Shah, 2022; Li, 2001).

Tabulka 4: Srovnání CE a LC (Shah, 2022).

Parametr	CE	LC
Doba analýzy	Rychlá (1-20 min)	Střední (10-60 min)
Náklady	Nízké	Střední
Objem vzorku	Velmi nízké	Střední
Objem reagensů	1-100 nl	1-100 µl
Instrumentace	Jednoduchá	Komplexnější
Tvar	Úzké píky	Parabolický

## 2.1 Analýza farmaceutik

Farmaceutická analýza hraje klíčovou roli v zaručení bezpečnosti, kvality a efektivity farmaceutických produktů. Na počátku vývoje léčiva stojí identifikace látky, která vykazuje terapeutický potenciál ve spojitosti s určitým onemocněním. To vede k vytvoření a charakterizaci molekul, označovaných jako aktivní farmaceutické složky (API).

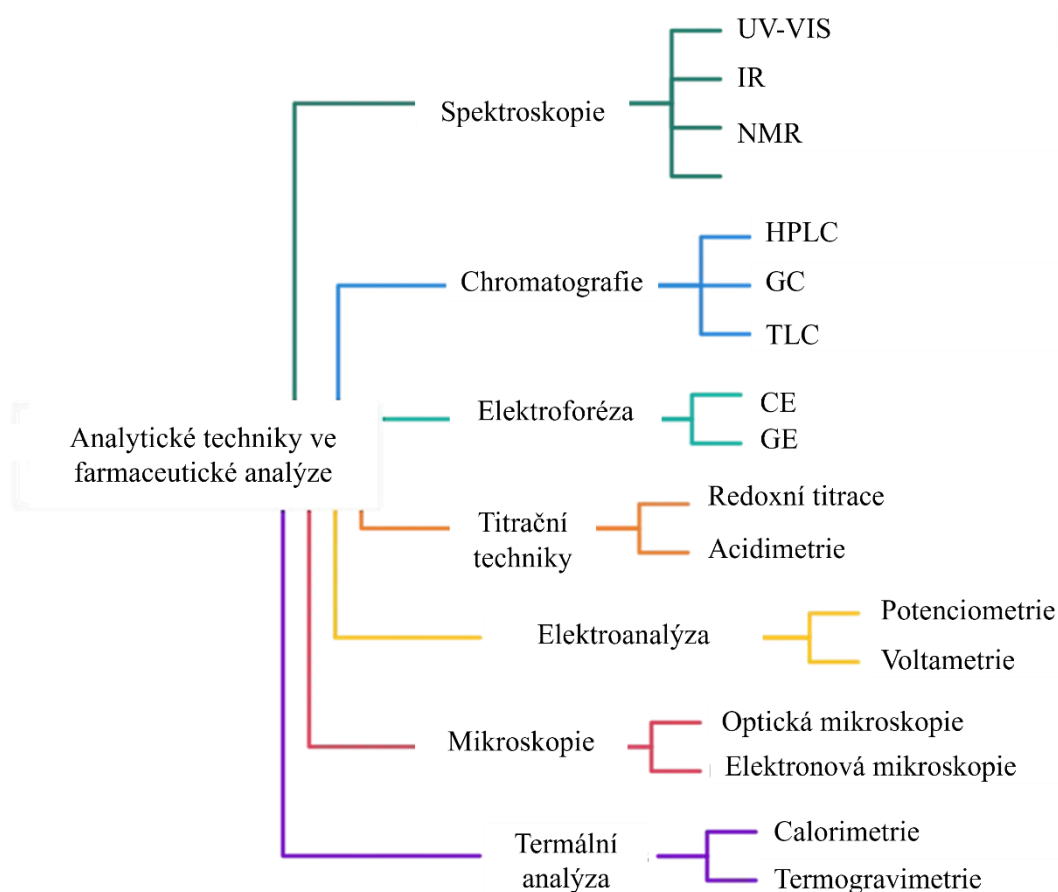
Příkladem analytických technik pro farmaceutickou analýzu jsou titrační techniky. Jejich počátek sahá až do roku 1835, kdy byla poprvé představena volumetrie. Časem došlo k významnému posunu a modernizaci této metody, přes zavedení titračních metod v bezvodném prostředí, rozšíření aplikovatelnosti pro velmi slabé kyseliny a zásady, až po zvýšení přesnosti pomocí potenciometrické detekce. Titrační metody jsou také užitečné pro

měření reakční kinetiky, tedy pro určování reakčních rychlostí. Výhodami jsou zde laboratorní nenáročnost, vysoká přesnost, absence referenčních standardů. Mimo kvantitativní analýzu léčiv se titrační metody používaly také pro hodnocení degradačních produktů farmaceutických sloučenin (Rao, 2023)

Další oblastí jsou chromatografické techniky. Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) stále hraje významnou roli ve farmaceutické analýze a je používána pro širokou řadu organických a anorganických materiálů. Výhodami je zde minimální příprava vzorku, výběr mezi řadou mobilních fází, možnosti rozlišení různých vzorků, vysoká vzorková kapacita, nízké náklady. Své uplatnění nalezne také ve screeningu neznámých látek v drogách. Vysoká specifita TLC umožňuje kvantitativní analýzu pomocí bodové eluce a následného spektrofotometrického měření. Nejdůležitější roli hraje při prvních fázích vývoje léčiva, kdy ještě není známé přesné složení nečistot a degradačních produktů v léčivu. HPLC je moderní analytická metoda, běžně používána pro separaci komplexních směsí a identifikaci komponent. Výhodou HPLC je vysoká specifita a přesnost a je jednou z nejvíce používaných chromatografických technik. Je často kombinována s hmotností spektrometrií a toto spojení se stalo metodou číslo jedna pro kontrolu kvality ve farmaceutickém průmyslu. HPLC-MS je všestranná a výkonná technika, která poskytuje odpovědi na důležité otázky ve farmaceutickém průmyslu. Na druhé straně plynová chromatografie je účinná technika pro separaci a detekci těkavých organických sloučenin, umožňující přesnou kvantitativní analýzu komplexních směsí, a to i v nízkých koncentracích. Její omezení spočívá ve nemožnosti analýzy vysokomolekulárních a tepelně nestabilních látek. Zároveň nízká těkavost farmaceutik zde vyžaduje použití derivatizace (Rao, 2023; Sharma, 2021)

Principem spektrofotometrických metod založených na UV absorpci a chemických reakcích je vlastnost materiálu odrážet či propouštět světlo v závislosti na vlnové délce. Výhodou je časová nenáročnost a výborná přesnost. Derivatizační techniky se využívají jak v UV spektrometrii, tak v infračervené, atomové absorpční fluorescenční spektrometrii a fluorimetrii. Derivatizační metody však přispívají k šumu. Spektrofotometrické metody jsou důležitým nástrojem farmaceutické analýzy, vhodné pro efektivní a přesnou kvantifikaci látek (Sharma, 2021; Rao, 2023).

V posledních letech byl zaznamenán nárůst využití elektrochemických metod pro analýzu farmaceutik. Aplikovány byly různé metody, například pro analýzu imipraminu a trimipraminu byly použity metody s modifikovanou skelnou uhlíkovou pastovou elektrodou a nanočástic oxidu titaničitého. Následně byly použity techniky cyklická voltametrie, chronocoulometrie, elektrochemická impedanční spektroskopie adsorpční stripovací voltametrie. Dalším příkladem je analýza benzokainu a lidokainu kapsaicinem modifikovanou uhlíkovou elektrodou z nanotrubiček. Ke stanovení dopaminu, levedopa, epinefrinu a norepinefrinu byly také použity modifikované elektrody, konkrétně modifikovaná skleněná elektroda s  $\text{Cu}^{2+}$  a nanočásticemi stříbra. Pro stanovení různých farmaceutik byly také vyvinuty metody jako adsorpční stripovací voltametrie a CE s amperometrickou detekcí. Pro studium chování farmaceutických látek se využívá cyklická, diferenčně pulzní a „square-wave“ voltametrie. Přehled analytických technik pro farmaceutické analýzy je na obrázku č. 9 (Sanghavia, 2013; Rao, 2023).



Obrázek 9: Souhrn analytických technik používaných pro farmaceutickou analýzu

### 1.2.1 Aplikace elektroforézy pro analýzu farmaceutik

CE je velmi významnou součástí analytické farmacie a to od vývoje, klinické studie, až po kontrolu kvality léčiv. Abychom zajistili účinnost a bezpečnost léčiv, je důležité, aby byl zaveden systém pro kontrolu kvality jak pro syntézu léčiv, tak pro vývoj nových metod. Nečistoty léčiv jsou všechny ostatní komponenty léčiva, které nepovažujeme za API či látky pomocné. Příklady využití CE v analýze API (Active Pharmaceutical Ingredient) jsou uvedeny v tabulce č. 5. Ke kontaminaci může dojít již ve výrobním procesu vlivem reagensů, meziproductů, vedlejších produktů, katalyzátorů, rozpouštědel, nebo také vlivem degradace finálního léčiva. Přítomnost takových nečistot zvyšuje riziko toxicity, vedlejších efektů, nebo nežádoucích účinků na lidský organismus. V souladu s Mezinárodní radou pro harmonizaci technických požadavků na léčivé přípravky (ICH) je pro léčivo s maximální dávkou 2 g/den stanovena hranice pro zhodnocení toxicity dané nečistoty na 0,15 % z celkového množství léčiva. Pro léky užívané na denní bázi je tato hranice 0,05 %. Detekce, kvantitativní a kvalitativní analýza je tedy důležitou součástí farmaceutického průmyslu. Analýza nečistot, vzhledem k jejich často stopovému množství, může být náročná a vyžaduje efektivní techniku. CE má dobrý potenciál pro aplikaci v této oblasti díky své vysoké separační účinnosti, ale také pro možnost automatizace, jednoduché spojení s řadou detekčních technik, či pro variabilitu dostupných elektroseparačních módů. CE často nevyžaduje výraznou úpravu vzorku, nepřekáží ani vyšší koncentrace solí a dalších látek (Řemínek, 2021; Zhu, 2018).

Analýza léčiv je z velké části prováděna pomocí HPLC, a to včetně analýzy hlavních složek, určení jejich nečistot, chirálních separací, stopové analýzy, kvantitativní analýzy kovových a anorganických iontů. Všechny tyto oblasti jsou proveditelné i pomocí CE a proto je tato technika považována za alternativní či komplementární techniku HPLC pro analýzu farmaceutik. Výhodou CE je vysoká separační účinností, příprava vzorku, krátký čas analýzy a malé objemy jak vzorku, tak pufru. Má také velmi jednoduchou instrumentaci a velkou výhodou je zde řada možných módů, jako je CZE, MEKC, CIP a CGE, což umožňuje separaci různorodých sloučenin. Převážná většina léčiv je bazického charakteru a jsou protonovány při nízkých pH, proto je pro analýzu řady léčiv vhodný například fosforečnanový pufr o pH 2,5. Acidická léčiva mohou být analyzována pomocí borátového nebo fosforečnanového pufru o pH 7 – 10. Neutrální sloučeniny, nebo směsi neutrálních a nabitých komponent mohou vyžadovat analýzu pomocí MEKC nebo MEEKC metody. Validace metod CE pro analýzu farmaceutik je velmi obdobná jako je tomu v případě HPLC a zahrnuje posouzení validačních parametrů jako

je přesnost, správnost, specifita, linearita a sensitivita. Největší překážkou pro analýzu CE jsou nečistoty léčiva, které mají obvykle stejný poměr náboj/hmotnost a tím pádem jsou těžko odlišitelné od hlavního píku léčiva (Montaseri, 2018; Altria, 1999).

Tabulka 5: Příklady využití CE pro analýzu API (Suntornsuk, 2010).

<b>Analyt</b>	<b>Metoda</b>
Alendronát, clodronát, fosfomycin	CZE – nepřímá UV
Kyselina alginová	MEKC – UV
Ketoprofen a indapamid	CZE – DAD
Chondroitin sulfát	CZE – DAD
Ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin, ofloxacin	CZE – DAD
Clenbuterol, salbutamol, procaterol, fenoterol	CZE – DAD
Klindamycin	CE – ECL
Ertapenem	CZE – UV
Ethambutol	CZE – UV
Etoricoxib	CZE – DAD
Kyselina kávová, ferulová a protokatechová; vanilin	CZE – AD
Glukosamin	CZE – C <sup>4</sup> D
Heparin nízkomolekulární	CZE – UV
Inzulín a jeho analoga	MEKC – DAD
Isoniazid, p-aminosalicylová kyselina	CZE – CL
Maprotilin, desipramin, moklobemid	CZE – UV
Mesembrin a příbuzné alkaloidy	CZE – MS
Nadolol, labetalol	CEC – MS
Neomycin	CZE – UV
Oxaliplatin	MEKC – UV
Piperacin	CZE – DAD
Pravastatin	MEKC – DAD
Salbutamol	CZE – DAD
Suxamethonium	CZE – C <sup>4</sup> D
Vitaminy	MEEKC – DAD
Ziprasidon	CZE – DAD

AD = amperometrická detekce, C<sup>4</sup>D = bezkontaktní detekce vodivosti, (E)CL = elektrochemiluminescence

Co se týká léčiv s malou molekulou, jsou elektromigrační techniky používány ve všech oblastech analýzy, a to včetně stanovení obsahu léčiva, analýzy nečistot, organických a anorganických protiiontů, stereochemické čistoty a nebo stanovení fyzikálně-chemických parametrů ( $pK_a$ , lipofilita). Detekce genotoxických nečistot je pro CE náročná, protože jejich koncentrace se pohybuje v oblasti ppm. V takovém případě může pomoci spojení CE-MS a využití derivatizace. Toho bylo využito pro stanovení potenciálně genotoxických alkylačních činidel po derivatizaci, citlivost byla dále také zvýšena použitím elektrokinetického dávkování a po optimalizaci bylo dosaženo hodnoty LOD v rozsahu ppm 0,1 a 0,4 mg/kg, což bylo v tomto případě asi 10x citlivější v porovnání s HPLC-MS. CE je také vhodná pro analýzu stereoizomerů, a to právě díky vysokému rozlišení, což se také odrazilo na řadě publikací separací enantiomerů. Řešen je také rozsah chirální CE-MS a aplikace bezvodné CE v chirální analýze. Výhodou separačních technik pro určení  $pK_a$  je například použití nízkých koncentrací, vzorky nemusí mít vysokou čistotu a dále nízká spotřeba vzorku. Zároveň velkou nevýhodou LC ve stanovení  $pK_a$  je, že pH mobilní fáze a tedy i rozsah stanovitelnosti je omezen stabilitou náplně kolony. Nevýhodou CZE je zde však zdlouhavost a je tak málo užitečná pro výkonný screening. Protiionty hrají důležitou roli ve fyzikálně-chemických vlastnostech léčiva a tím ovlivňují i jeho farmaceutické vlastnosti. Protiionty mají obvykle 2-30 % w/w léčiva a jejich stanovení vyžaduje přesnou kvantifikaci. CE se ke stanovení používá s oblibou, její výhodou je použití nepřímé UV detekce pomocí chromoforu přidaného do pufru (Deeb, 2016).

Nečistoty jsou definovány jako cizí materiál, který je přítomen v léčivu. Tyto látky musí být sledovány i v případě, že jsou inertní či mají dobré farmakologické vlastnosti. Těmito látkami mohou být organické a anorganické sloučeniny (typicky zbytky roztoků) pocházející z výchozích látek, vedlejších produktů, mezi-produktů, degradačních produktů, nebo se může jednat o reagenty, katalyzátory a podobně. Příklady využití analýzy nečistot léčiv jsou uvedeny v tabulce č. 6. Nečistoty mohou ovlivnit biologickou dostupnost léčiva, vést k nežádoucím účinkům, toxicitě, a proto musí být výrobcem sledovány a stanoveny. Identifikace a kvantifikace se provádí pomocí TLC, HPLC, GC nebo také CE (Suntornsuk, 2010).

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Přístrojové vybavení

Všechny analýzy byly provedeny na přístroji kapilární elektroforézy Agilent CE 7100 (Agilent, USA), které je vybaveno autosamplermem s padesáti pozicemi. Spojení mezi přístrojem a počítačem bylo pomocí programu ChemStation Edition, který umožňuje nastavení podmínek, metod, sekvencí a také je zde prováděno vyhodnocení.

Pro experimentální část byly dále použity:

Analytické digitální váhy (Sartorius, Německo)

Mikropipety a špičky (Thermo Scientific, USA)

pH metr (Thermo Scientific, USA)

Třepačka typu vortex (Thermo Scientific, USA)

Křemenná kapilára (Agilent, USA) o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  a délce 50 cm, efektivní délky 41,5 cm

### 2.2 Chemikálie a pomůcky:

#### CHEMIKÁLIE:

Deionizovaná voda – připravená na zařízení Milli-Q Reference	Merck, Německo
Kyselina boritá > 99,5 %	Honeywell, USA
Tetraboritan sodný > 99,5 %	Chemapol, Česká republika
Hydroxid sodný > 98 %	Penta Chemicals, Česká republika
Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát >99,5 %	Sigma-Aldrich, USA
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát > 98 %	Sigma-Aldrich, USA
Thiomočovina	
Etanol	

### Standardy:

Konjugáty APAP-SG, APAP-NAC, APAP-CYS byly použity ze zásob na Fakultě chemicko-technologické Univerzity Pardubice z dřívějších studií (Vanova, 2022).

### Pomůcky:

0,45 µm membránové filtry

Avantor, USA

## **2.3 Pracovní postup**

### **2.3.1 Příprava standardů**

Vzoroky thiomocoviny, APAP, APAP-NAC a APAP-Cys byly připraveny rozpuštěním 1 mg látky v 1 ml vody.

Kalibrační řady byly připraveny s koncentracemi 100, 70, 40, 10, 5, 2 a 1 mg/l. Kalibrační řada APAP byla připravena navážením 10 mg standardu a rozpuštěním ve 100 ml vody, takto vzniklý zásobní roztok měl koncentraci 100 mg/l. Kalibrační řada APAP-NAC byl připravena navážením 0,93 mg a následným rozpuštěním v 1 ml, tento roztok měl koncentraci 930 mg/l a byl z něho dále připraven zásobní roztok o koncentraci 100 mg/l. Poslední kalibrační řada APAP-Cys byla připravena navážením 1,15 mg a rozpuštěním v 1 ml, takový roztok měl koncentraci 1150 mg/ml. Z tohoto roztoku byl připraven zásobní roztok o koncentraci 105,4 mg/l, ze kterého byla udělána kalibrační řada o koncentracích 105,4; 73,8; 42,2; 10,5; 5,3; 2,1 a 1,1 mg/l.

Vzhledem ke špatné dostupnosti čistého standardu nebyl nakonec APAP-SG použit k analýzám kvantitativních parametrů.

### **2.3.2 Příprava základních elektrolytů**

Pro optimalizaci separačních podmínek byly připraveny dva různé pufrы o dvou různých koncentracích, a to:

- 50 mM a 25 mM borátový pufr (kyselina boritá + tetraboritan sodný)
- 50 mM a 25 mM fosfátový pufr (dihydrogenfosforečnan sodný + hydrogenfosforečnan sodný)

Každý pufr byl připraven smícháním kyselé a zásadité složky roztoku příslušného pufru o stejné koncentraci na požadované pH pomocí pH-metru. Ten byl nakalibrován pomocí kalibračních roztoků o pH 4, 7 a 9. Borátový pufr byl upraven na pH 9,5; 8,5 a 7,5. Fosfátový pufr byl upraven na pH 8,5; 7,5 a 6,5.

Takto připravené elektrolyty byly vždy zfiltrvány pomocí 0,45  $\mu\text{m}$  membránového polytetrafluorethylenového filtru a po 1,5 ml pipetovány do tří elektroforetických nádobek.

### **2.3.3 Příprava kapiláry**

K analýzám byla použita křemenná kapilára potažená tenkou vrstvou polyimidu (Agilent, USA). Pro všechny analýzy byla použita kapilára o průměru 50  $\mu\text{m}$  a délce 50 cm, efektivní délky 41,5 cm.

Kapilára byla připravena uříznutím požadované délky kapiláry pomocí keramického nože. V místě detekčního okénka byla pomocí zapalovače odstraněna vrstva polyimidu a nečistoty v tomto místě byly očištěny denaturovaným etanolem. Stejným způsobem byly připraveny i konce kapiláry po vložení do kazety.

### **2.3.4 Proplach kapiláry**

Před první analýzou byly vždy kapiláry kondicionovány 1 M NaOH po dobu 20 minut, následně proplachována redestilovanou vodou 5 minut a na závěr byla propláchnuta separačním pufrem po dobu 10 minut.

Před jednotlivými analýzami byla proplachována 0,1 M NaOH po dobu 5 minut a základním elektrolytem také 5 minut.

## 2.4 Podmínky měření

### Optimalizace základního elektrolytu:

- Teplota kapiláry: 25 °C
- Dávkování: 50 mBar/8 s
- Vkládané napětí: 25 kV a 15 kV v 0,5 min
- Detekce: 246, 244 a 298 nm
- Doba analýzy: 15 – 25 minut

### Vliv teploty na separaci:

- Teplota kapiláry: 20, 25, 30 °C
- Dávkování: 50 mBar/8 s
- Vkládané napětí: 25 kV v 0,5 min
- Detekce: 246, 244 a 298 nm
- Doba analýzy: 15 – 25 minut

### Kvantitativní stanovení:

- Teplota kapiláry: 25 °C
- Dávkování: 50 mBar/8 s
- Vkládané napětí: 25 kV a 20 kV
- Detekce: 246, 244 a 298 nm
- Doba analýzy: 15 – 25 minut

## 3 Výsledky a diskuze

### 3.1 Optimalizace základního elektrolytu

V první části experimentální části byla provedena série měření, která se zaměřovala na výběr optimálního základního elektrolytu (BGE). Správný výběr BGE je klíčový pro úspěšnou separaci a závisí na typu analyzovaných látek, požadovaném pH a iontové síle. Měl by zajišťovat stabilní EOF, vysokou účinnost separace a dobré rozlišení.

Provedená měření zahrnovala dva typy elektrolytů: borátový pufr a fosfátový pufr, oba v kombinaci 50 mM a 25 mM. Dále byly tyto elektrolyty připraveny o různých pH. Analýzy byly prováděny při napětí 25 kV a 15 kV.

- 50 mM borátový pufr: pH 9,5; 8,5; 7,5
- 25 mM borátový pufr: pH 9,5; 8,5; 7,5
- 50 mM fosfátový pufr: pH 8,5; 7,5; 6,5
- 25 mM fosfátový pufr: pH 8,5; 7,5; 6,5

Analyzovány byly látky: thiomocovina, APAP, APAP-SG, APAP-NAC a APAP-CYS. Analýza byla vždy prováděna v dubletu. Ze získaných záznamů byl odečten migrační čas  $t_m$  a šířka výšky v polovině píku  $w_{1/2}$ . Z těchto údajů byla vypočítána efektivní elektroforetická pohyblivost  $\mu_{eff}$  pro každou látku dle vztahu:

$$\mu_{eff} = \frac{L_d \cdot L_t}{V \cdot t_m} - \mu_{tm} \quad (10)$$

Kde:

- $\mu_{eff}$  = efektivní pohyblivost [ $m^2/V \cdot s$ ]
- $\mu_{tm}$  = pohyblivost močoviny – EOF [ $m^2/V \cdot s$ ]
- $L_d$  = délka detekce [m]
- $L_t$  = celková délka kapiláry [m]
- $V$  = aplikované napětí [v]
- $t_m$  = migrační čas [s]

Dále byly provedeny výpočty účinnosti v podobě počtu teoretických pater  $N$  dle vztahu:

$$N = 5,544 \left( \frac{t_m}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (11)$$

Kde:

- $w_{1/2}$  = šířka píku v polovině výšky [min]

A výšky teoretického patra  $H$  dle vztahu:

$$H = \frac{L_d}{N} \quad (12)$$

Získané elektroforetické údaje z analýz v borátovém pufru jsou uvedeny v příloze 1 v tabulkách 1-12 a ve fosfátovém pufru v příloze 2 v tabulkách 13-24. U všech analyzovaných látek byly u většiny elektrolytů zaznamenány vyšší migrační časy než u thiomocoviny, což znamená, že jsou záporně nabitě a migrují jako anionty. Tomu odpovídají i naměřené efektivní pohyblivosti. Nebylo tomu tak ale u analýzy APAP-Cys v těchto elektrolytech:

- 50 mM borátový pufr s pH = 7,5 (25 kV)
- 50 mM fosfátový pufr s pH = 6,5 (25 kV)

Menší migrační čas než thiomocovina byl zaznamenán také při analýze APAP a to v těchto elektrolytech:

- 50 mM borátový pufru s pH = 7,5 (15 kV)
- 50 mM fosfátovém pufru s pH = 6,5 (25 kV)
- 50 mM fosfátový pufr s pH = 7,5 (15 kV)
- 50 mM fosfátový pufr s pH = 6,5 (15 kV)
- 25 mM fosfátový pufr s pH = 6,5 (15 kV)

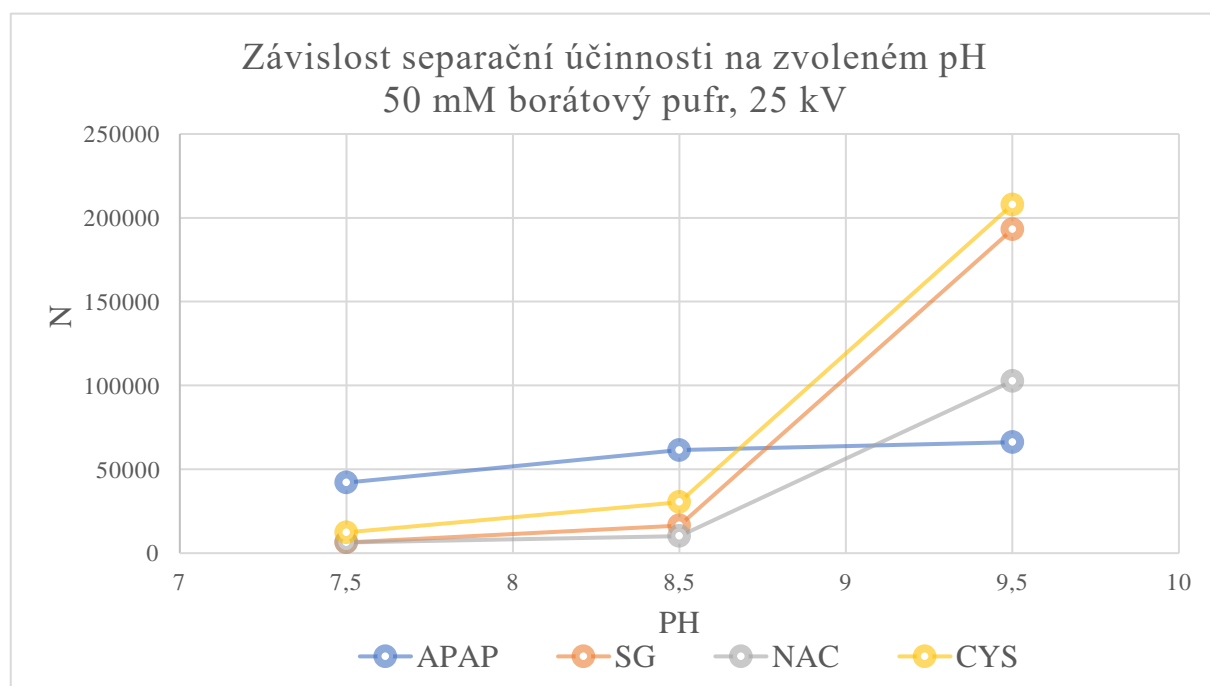
Migrační časy byly v těchto případech skoro shodné s thiomocovinou (byly ve většině menší o setiny minuty) a znamená to, že molekula neměla žádný náboj a migrovala tedy jako neutrální látka. Důvodem mohou být strukturní vlastnosti a nevhodné pH pro separaci, při kterém nedocházelo k nabití molekuly.

Na základě vypočítaných parametrů N a H byl vybrán základní elektrolyt, u kterého bylo dosaženo nejvyšších hodnot účinnosti (počtu teoretických pater N). Závislosti migračního času, pohyblivosti a separační účinnosti na pH pufru ve všech uvedených elektrolytech jsou uvedeny v příloze 1, grafy 1-12 (pro borátový pufr) a v příloze 2, grafy 13-24 (pro fosfátový pufr).

#### Borátový pufr:

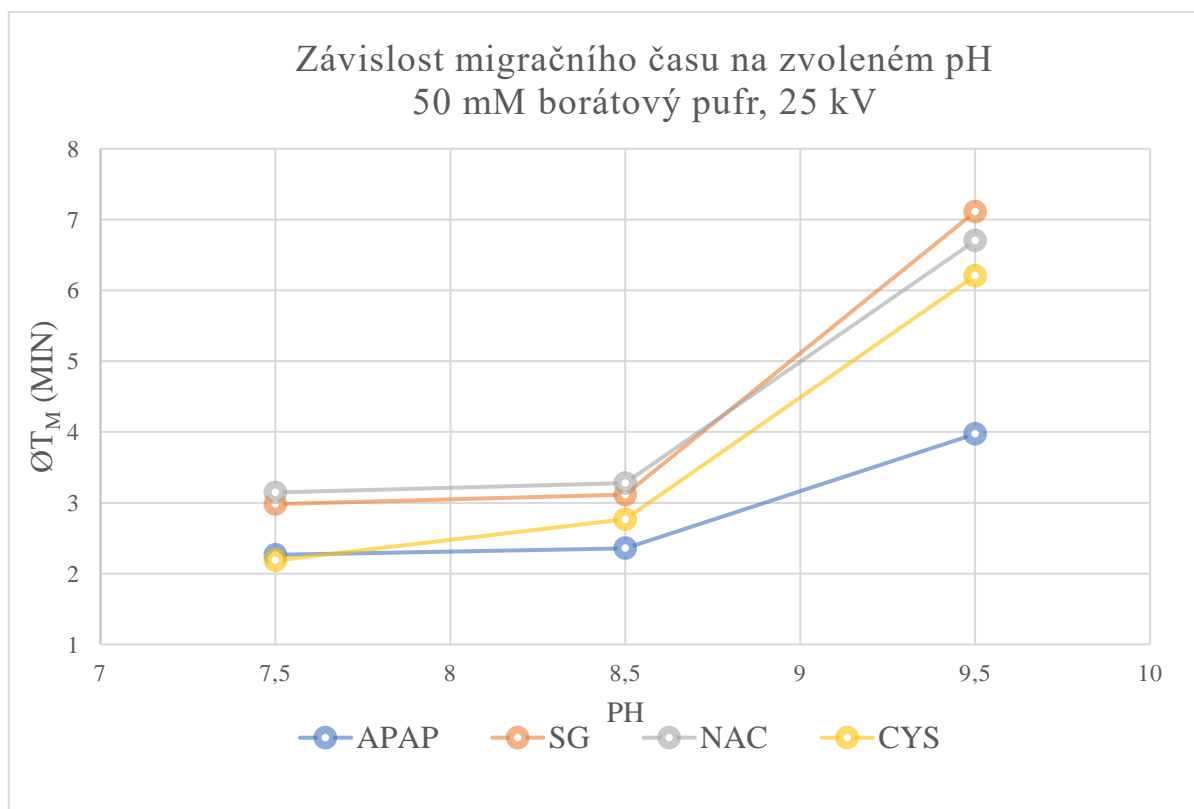
Největší separační účinnosti bylo dosaženo při použití elektrolytu 50 mM borátového pufru při pH 9,5 a 25 kV. Závislost účinnosti na pH 50 mM borátového pufru je znázorněna v grafu č. 1. Separací účinnosti při pH 7,5 a pH 8,5 je téměř srovnatelná u všech analyzovaných látek. Vyšší účinnost zaznamenaná při pH 9,5 může souviset s vyšší vodivostí BGE a tedy i vyšší pohyblivostí EOF.

Graf 1. Závislost separační účinnosti na pH



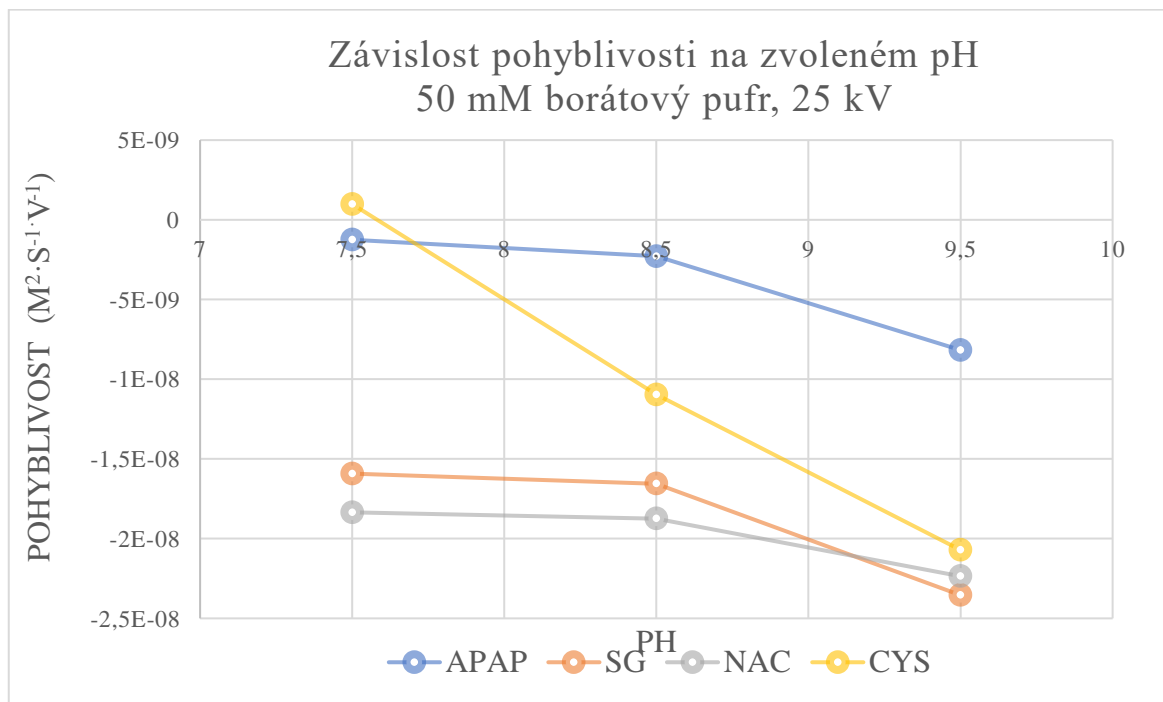
Z grafu č. 2, který popisuje závislost migračního času na pH 50 mM borátového pufru, bylo vyčteno, že pro separaci směsi APAP a jeho metabolitů APAP-SG, APAP-Cys a APAP-NAC bude nejvhodnější pH 9,5. Při tomto pH jsou rozdíly migračních časů největší a bude zde pravděpodobně nejlepší rozlišení v případě analýzy směsi látek.

Graf 2: Závislost migračního času na pH



Graf č. 3 znázorňuje závislost efektivních pohyblivostí látek na pH vybraného elektrolytu 50 mM borátového pufru. Největších pohyblivostí je dosaženo právě při pH 9,5.

Graf 3: Závislost efektivních pohyblivostí na pH

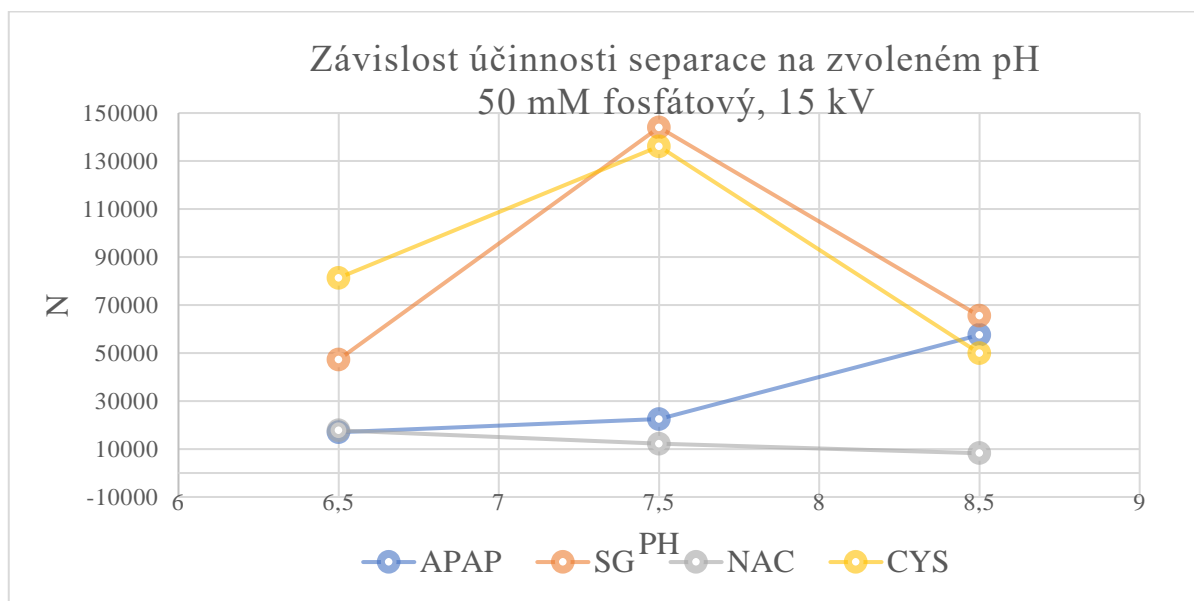


Z porovnání grafů 2 a 3 je zjevné, že při pH 8,5 a 9,5 jsou efektivní pohyblivosti analyzovaných látek nejrozdílnější, avšak migrační časy, a tedy i celkové rozlišení je nejlepší při pH 9,5.

#### Fosfátový pufr:

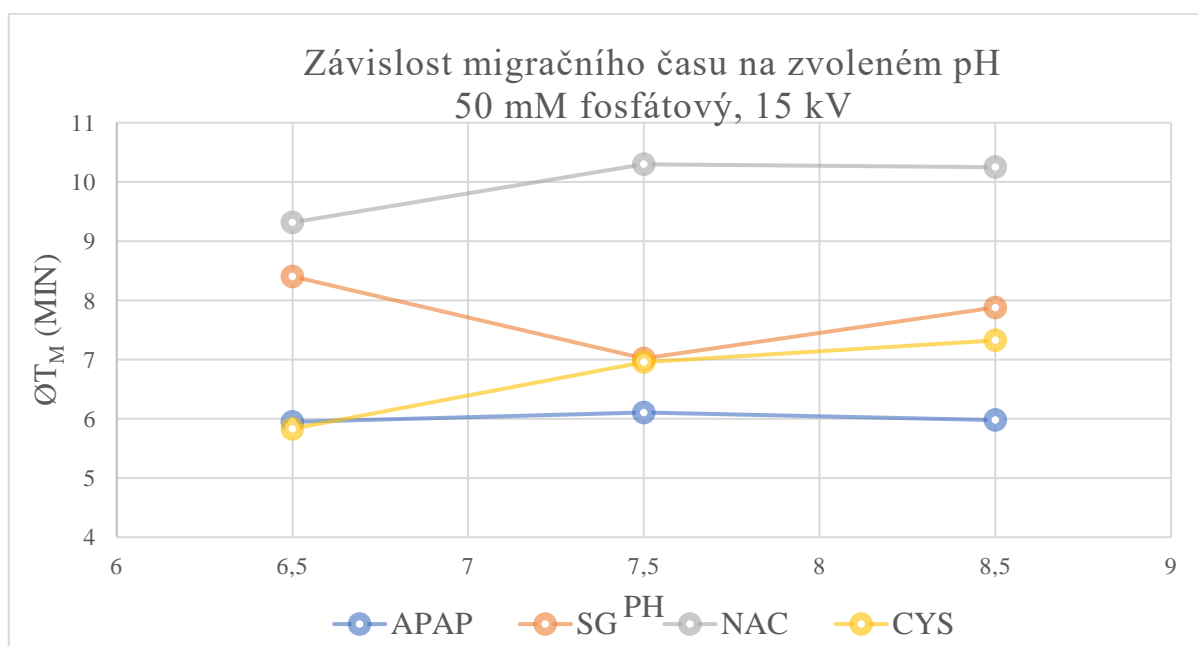
Nejvyšší separační účinnosti v případě fosfátového pufru bylo dosaženo při koncentraci 50 mM při pH 7,5 a 15 kV. Závislost účinnosti na pH 50 mM fosfátového pufru je znázorněna v grafu č. 4.

Graf 4: Závislost účinnosti separace na pH



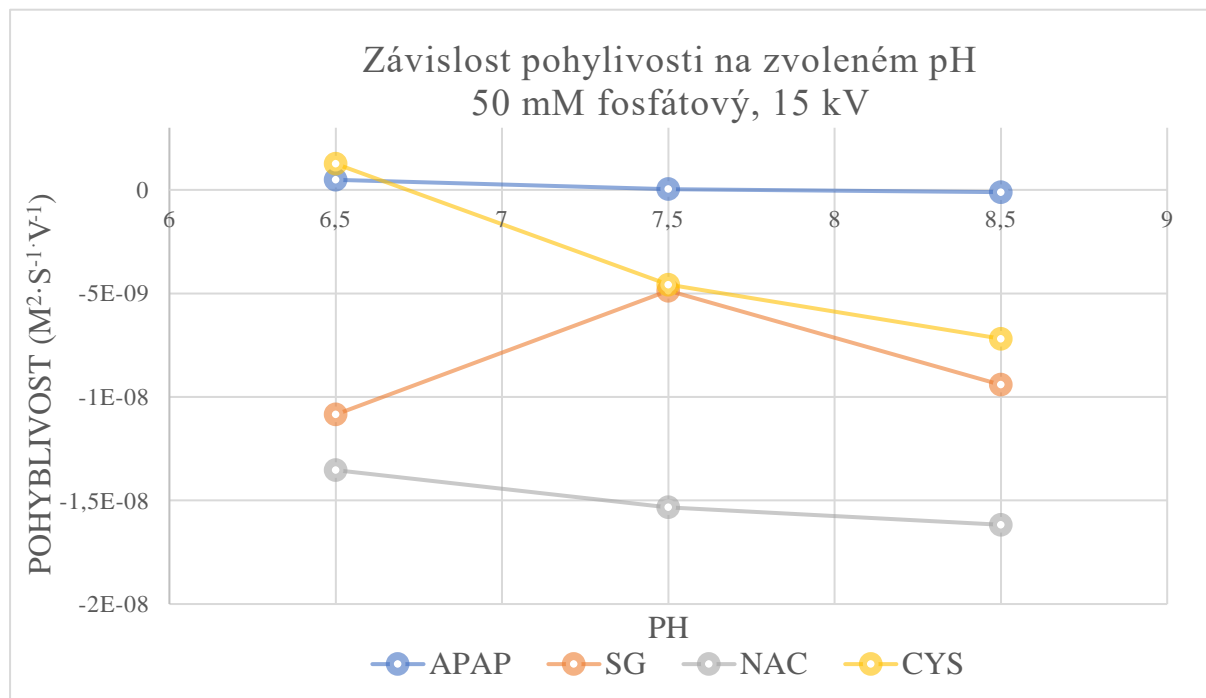
Graf č. 5 popisuje závislost migračního času na pH 50 mM fosfátového pufru při 15 kV. Z tohoto grafu bylo vyčteno, že by bylo pro separaci směsi APAP a jeho metabolitů APAP-SG, APAP-CYS a APAP-NAC při těchto podmínkách nejvhodnější pH 8,5. Při tomto pH jsou rozdíly migračních časů největší a bude zde pravděpodobně největší rozlišení.

Graf 5: Závislost migračních časů na pH



Graf č. 6 znázorňuje závislost efektivních pohyblivostí látek na pH vybraného elektrolytu 50 mM fosfátového pufru při 15 kV. Největších pohyblivostí je dosaženo při pH 8,5.

Graf 6: Závislost efektivní pohyblivosti na pH



Z porovnání grafů 5 a 6 je zjevné, že při pH 8,5 jsou efektivní pohyblivosti analyzovaných látek nejrozdílnější. Migrační časy a tedy i celkové rozlišení je dosaženo také při pH 8.

Závěr:

Jako nejvhodnější elektrolyt pro separaci z pohledu počtu teoretických pater N byl vyhodnocen 50 mM borátový pufr s pH 9,5 při 25 kV. Analýzy s tímto pufrům dosahovaly největší účinnosti. Největší rozdíl v migračních časech byl za těchto podmínek při pH 9,5. Tyto podmínky jsou tedy vhodné i pro separaci směsi látek APAP, APAP-SG, APAP-Cys a APAP-NAC. 50 mM borátový pufr s pH 9,5 byl dále použit pro analýzu vlivu teploty na separaci a také pro kvantitativní analýzu a analýzu směsi.

Jako nejvhodnější elektrolyt v případě fosfátového pufru byl vyhodnocen 50 mM fosfátový pufr při pH 7,5 při 15 kV. Analýzy s tímto elektrolytem však nedosahovaly tak vysoké separační účinnosti, jako tomu bylo v případě 50 mM borátového pufru o pH 9,5 při 25 kV.

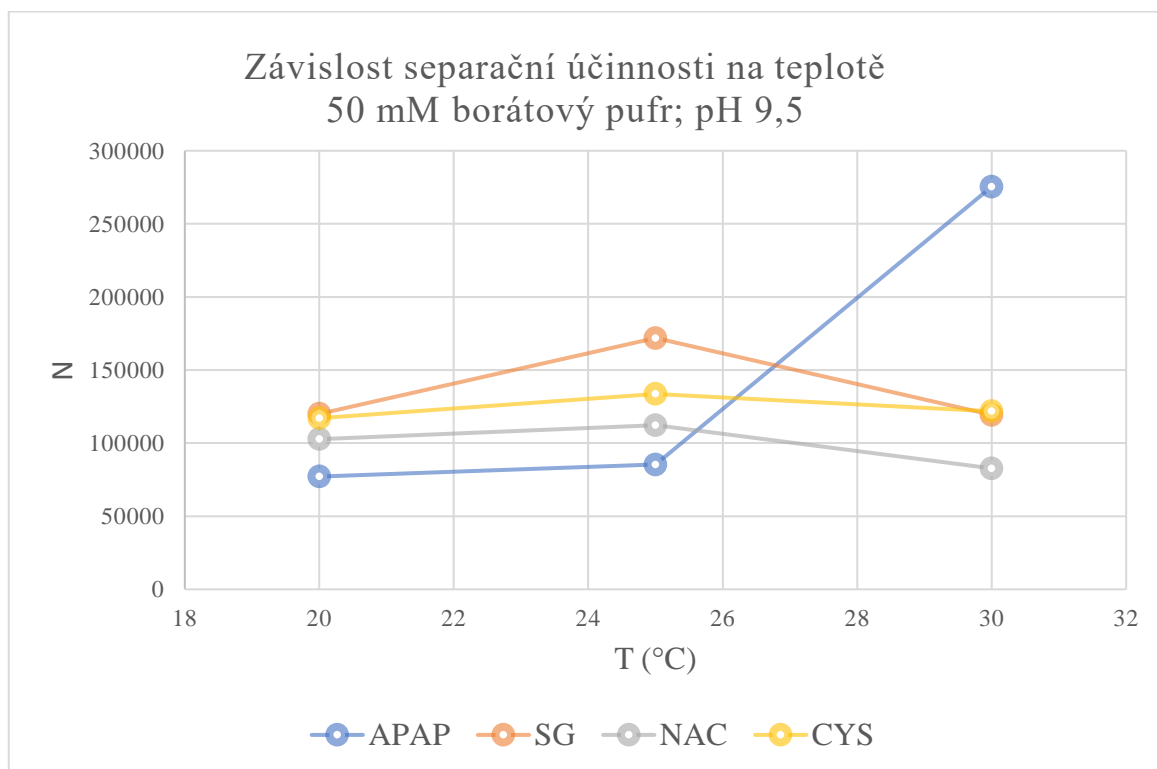
### **3.2 Vliv teploty**

Teplota může mít na průběh separace významný vliv. Se zvyšující se teplotou dochází ke snížení viskozity BGE a tím i k větší elektroforetické pohyblivosti analytů. S teplotou se zvyšuje také vodivost BGE, což vede ke zvýšenému ohřevu a většímu teplotnímu rozptylu v kapiláře, což může mít za následek větší rozšíření zón a ztrátu účinnosti.

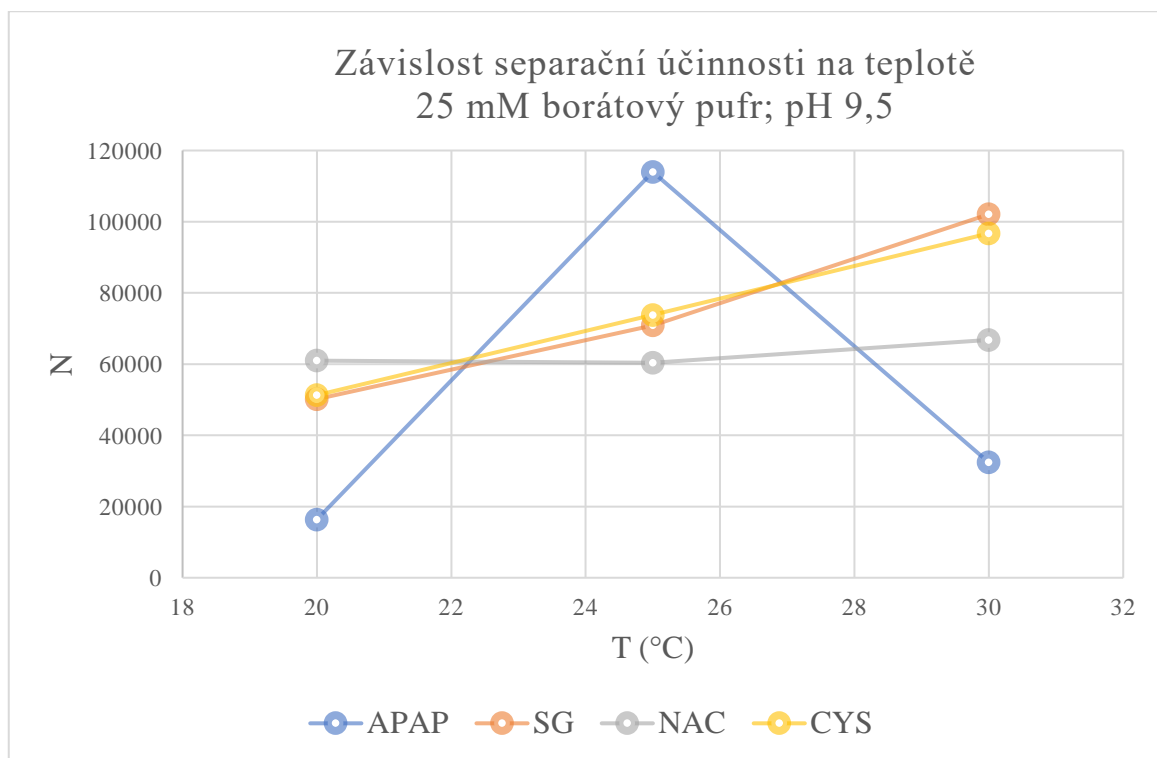
V této části experimentálního měření byl testován vliv teploty na separaci APAP, APAP-SG, APAP-NAC a APAP-Cys. Pro analýzy byl použit jako BGE 50 mM a 25 mM borátový pufr s pH 9,5. Byly testovány teploty 20, 25 a 30 °C při 20 kV.

Z provedených analýz byl zaznamenán čas migrace, šířka píku v polovině výšky a byla vypočtena efektivní pohyblivost látek, počet teoretických pater  $N$  a výška teoretického patra  $H$ . Vše je shrnuto v příloze 3, tabulky č. 25-26. Závislost účinnosti separace na teplotě je znázorněna v grafu č. 7 a 8.

Graf 7: Závislost účinnosti na teplotě – 50 mM



Graf 8: Závislost účinnosti na teplotě - 25 mM



Další grafy popisující závislost migračního času a efektivní pohyblivosti na teplotě jsou uvedeny v příloze 3, grafy č. 27-28.

#### Závěr:

Z naměřených dat je patrná závislost migrace na teplotě, kdy s rostoucí teplotou migrační časy klesají a tím pádem rostou pohyblivosti látek a EOF.

Z grafů lze vyčíst nejideálnější teplotu pro separaci z pohledu počtu teoretických pater N. Při koncentraci 50 mM borátového pufru s pH 9,5 byla nejvhodnější teplota 25°C. Při koncentraci 25 mM borátového pufru s pH 9,5 je nejvhodnější teplota pro separaci 30°C.

### **3.3 Kvantitativní parametry analýzy**

Ověření možnosti kvantitativního stanovení APAP a jeho metabolitů bylo provedeno za různých podmínek:

- 50 mM borátový pufr pH 9,5; 20 kV
- 25 mM borátový pufr pH 9,5; 25 kV

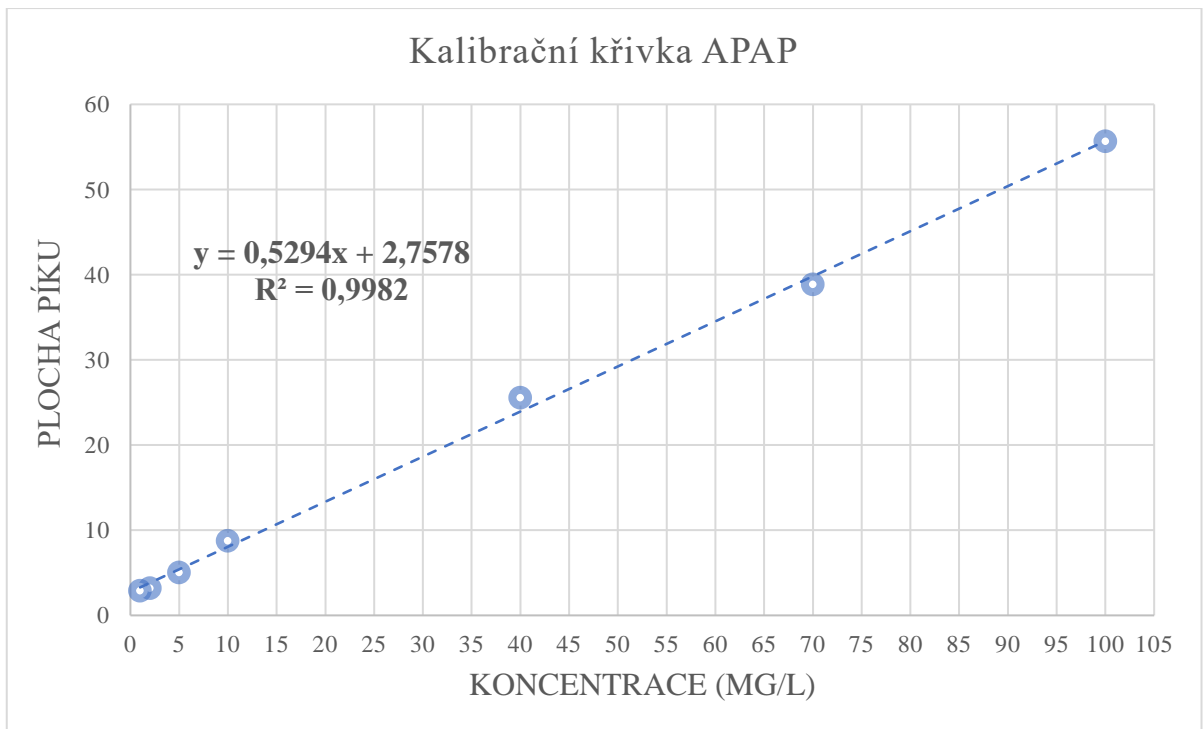
Pro kalibrační řadu byly připraveny následující koncentrace:

- APAP: 100, 70, 40, 10, 5, 2 a 1 mg/l
- APAP-NAC: 100, 70, 50, 40, 20 a 10 mg/l
- APAP-Cys: 105,4; 73,8; 42,2; 10,5; 5,3; 2,1

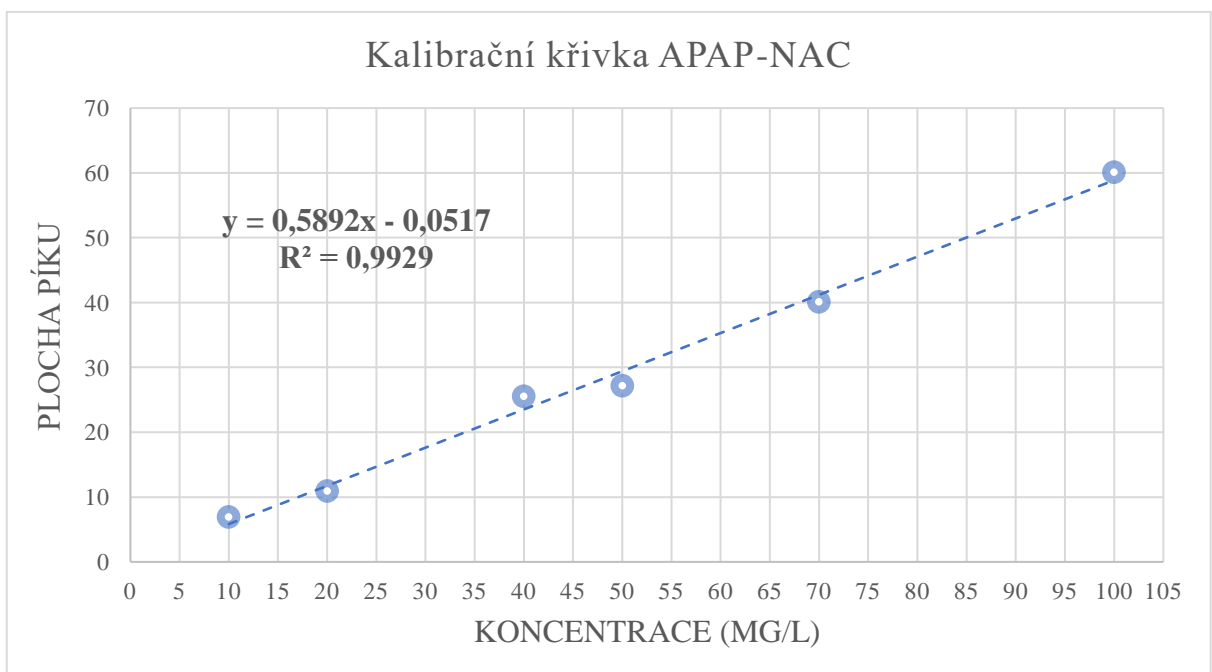
Získané elektroforetické údaje analýz jsou uvedeny v příloze 4 v tabulkách 27-29 (pro koncentraci 50 mM, 20 kV) a 30-32 (pro koncentraci 25 mM, 25 kV).

## Kalibrační grafy 50 mM borátový pufr; pH 9,5

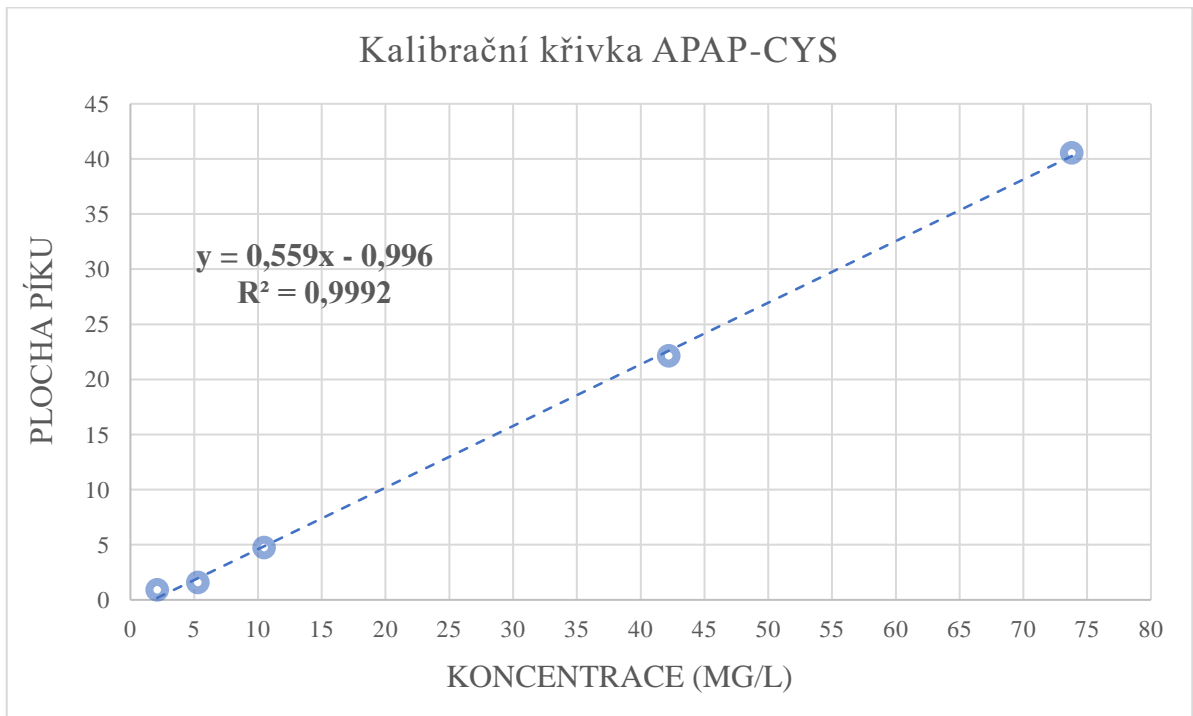
Graf 9: Kalibrační graf APAP



Graf 10: Kalibrační graf APAP-NAC

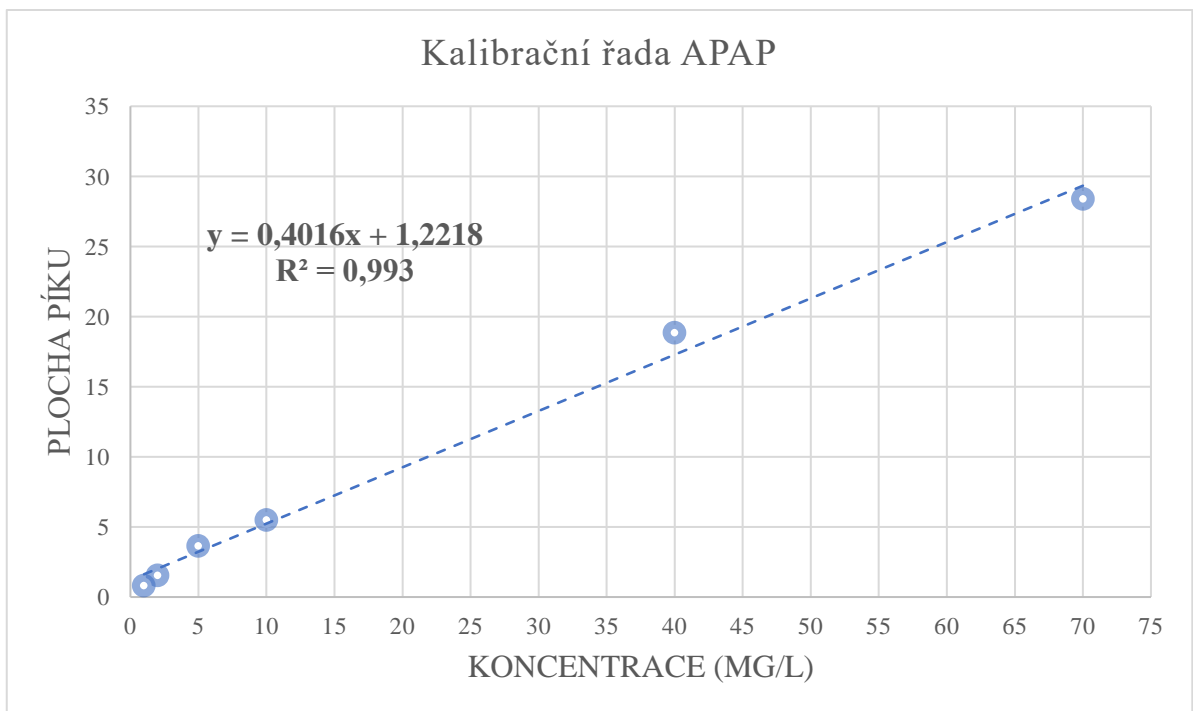


Graf 11: Kalibrační graf APAP-CYS

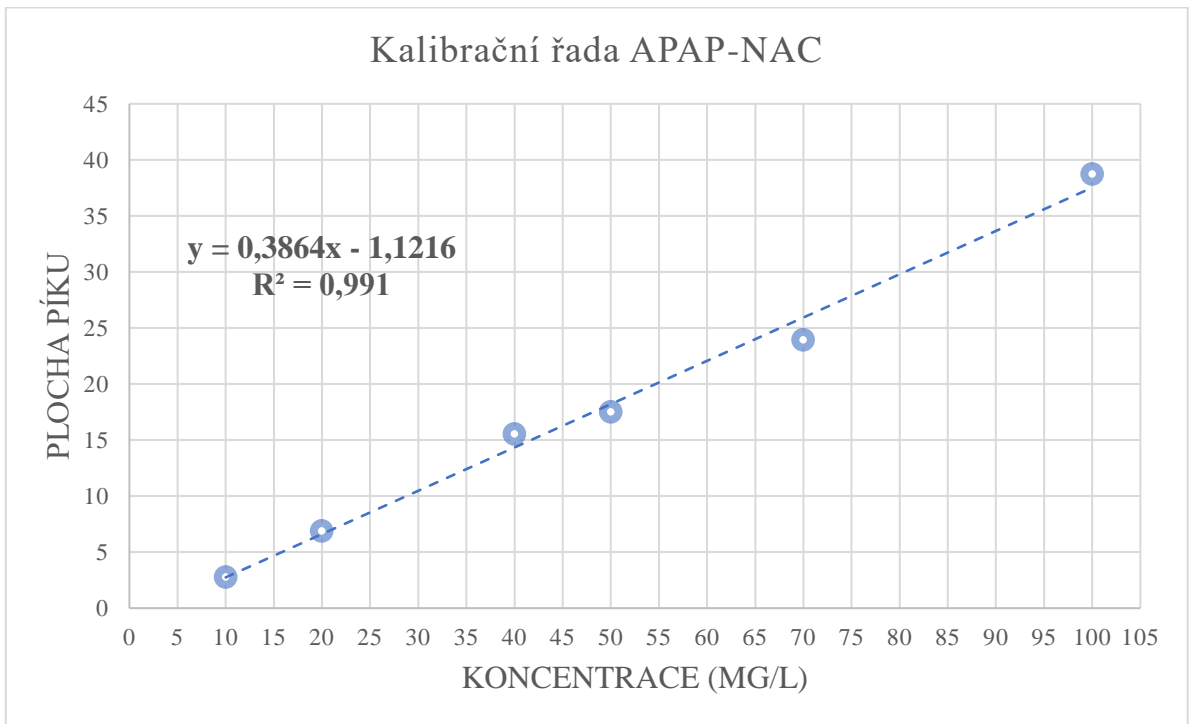


Kalibrační grafy 25 mM borátový pufr; pH 9,5

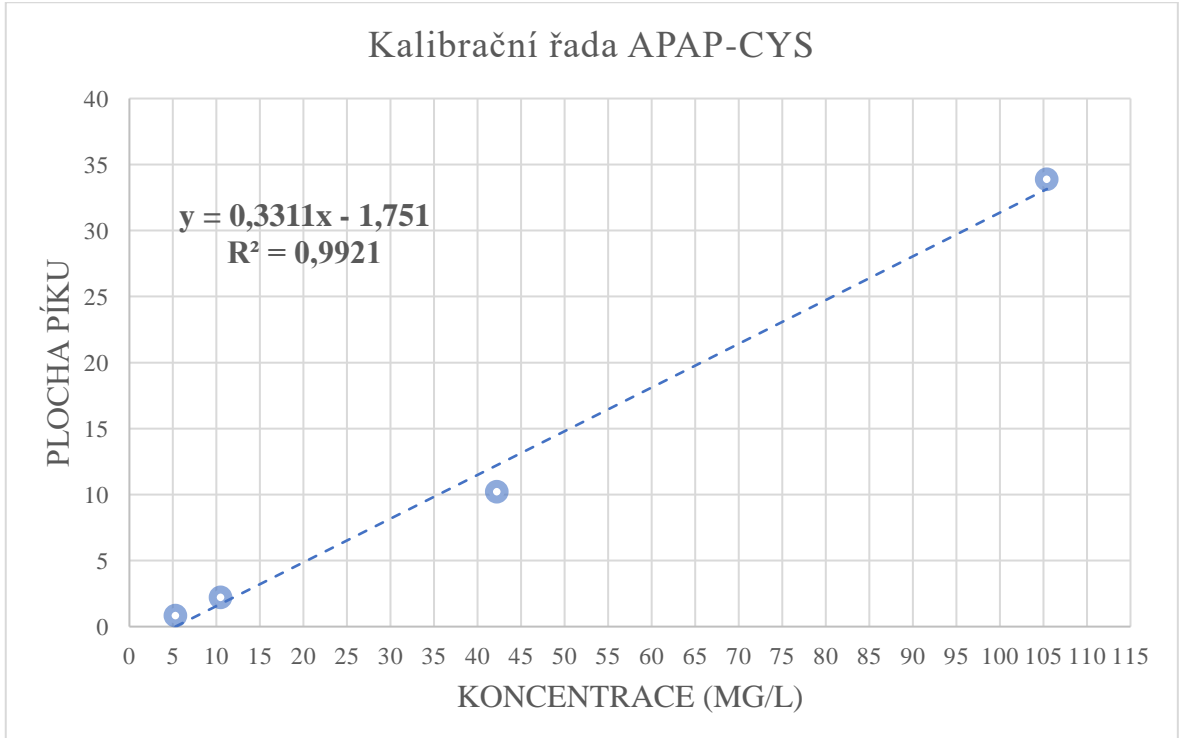
Graf 12: Kalibrační graf APAP



Graf 13: Kalibrační graf APAP-NAC



Graf 14: Kalibrační graf APAP-CYS



Tabulka 6: Regresní parametry

Analyt	50 mM				25 mM			
	Směrnice	Úsek	R <sup>2</sup>	Šum [mAU]	Směrnice	Úsek	R <sup>2</sup>	Šum [mAU]
APAP	0,5294	2,7578	0,9982	0,01812	0,4016	1,2218	0,993	0,00823
NAC	0,5892	-0,0517	0,9929	0,01907	0,3864	-1,1216	0,991	0,007419
CYS	0,559	-0,996	0,9992	0,024231	0,3311	-1,751	0,9921	0,007615

Tabulka 7: Výpočet LOD a LOQ

Analyt	50 mM		25 mM	
	LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]	LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]
APAP	0,14	0,48	0,09	0,29
NAC	0,32	1,06	0,32	1,06
CYS	0,73	2,43	0,81	2,7

#### Závěr:

Bylo provedeno stanovení kvantitativních parametrů látek APAP, APAP-NAC a APAP-Cys. APAP-SG nebyl kvantifikován vzhledem ke špatné dostupnosti čistého standardu.

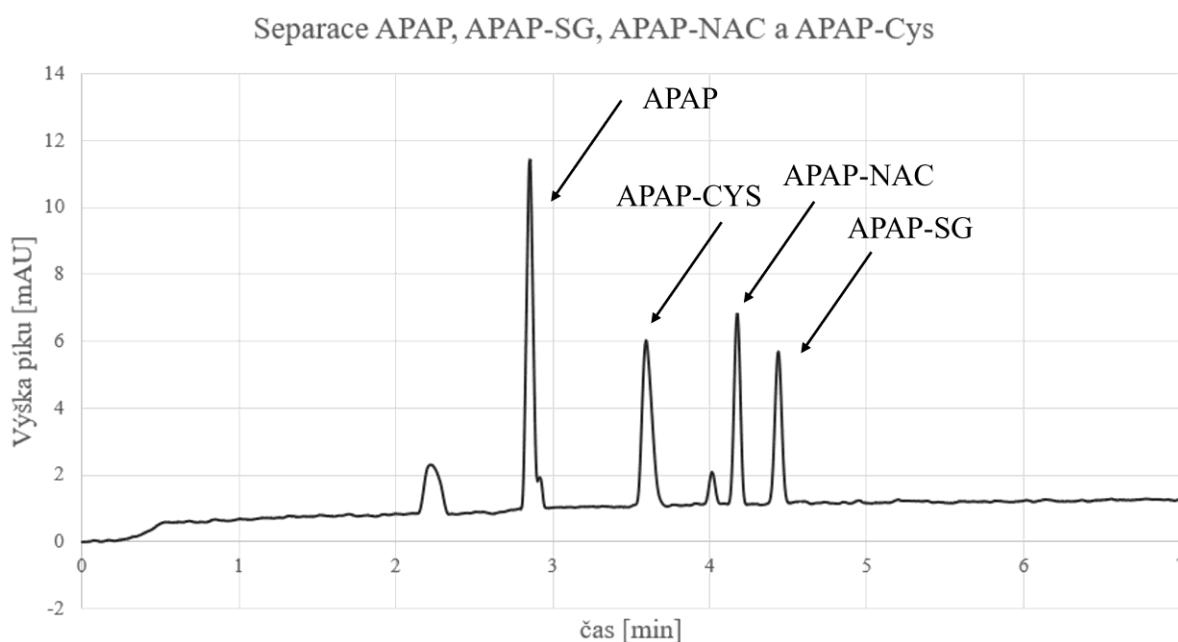
Při srovnání směrnic jednotlivých analýz bylo zjištěno, že směrnice byly obecně větší v 50 mM borátovém pufru. Největší hodnota směrnice, a tedy i nejlepší citlivost, byla získána z regresní rovnice u analýzy v 50 mM borátovém pufru u APAP-NAC. Srovnány byly také hodnoty úseku, který může mít významný vliv na limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ). Důvodem vysokého úseku může být řada faktorů, jako je velký šum, nebo také chyby v ředění. Nejmenší úsek byl určen z regresní rovnice analýzy APAP-NAC. Hodnoty R<sup>2</sup> jsou u kalibračních křivek >0,99, což značí spolehlivou lineární kalibraci.

Dle výpočtu LOD a LOQ analýz lze usoudit, že nejhůře detekovatelným analytem je APAP-Cys (při analýze v 25 mM elektrolytu) protože jeho hodnoty těchto parametrů byly nejvyšší. Naopak nejlépe detekovatelným analytem je APAP, jehož hodnoty LOD a LOQ byly v 25 mM elektrolytu nejmenší. Z porovnání mezi koncentracemi 50 mM a 25 mM lze také vidět, že hodnoty LOD a LOQ jsou obecně nižší u všech analytů v 25 mM elektrolytu.

### 3.4 Směs

V poslední části byla provedena analýza směsi APAP, APAP-SG, APAP-NAC a APAP-Cys. Analýza byla provedena v 50 mM borátovém pufru při pH 9,5 a při napětí 30 kV.

Obrázek 10: Separace směsi



#### Závěr:

Byla provedena separace směsi látek APAP, APAP-SG, APAP-NAC a APAP-Cys. Separace proběhla v 50 mM borátovém pufru při pH 9,5, který byl navrhnutý jako optimální elektrolyt pro separaci APAP a jeho metabolitů na začátku experimentální části této práce. Separace všech čtyř látek proběhla do 5ti minut, migrační časy látek jsou dostatečně odlišné pro spolehlivé rozlišení bez překryvu píků. Lze si všimnout některých menších vedlejších píku, které jsou důsledkem použití standardů, které neměly 100% čistotu.

## ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo ověřit možnost separace APAP a jeho oxidačních metabolitů APAP-SG, APAP-NAC, APAP-CYS pomocí kapilární zónové elektroforézy, která je často komplementární metodou k separacím kapalinovou chromatografií.

V první části této diplomové práce byl zpracován teoretický úvod na téma acetaminofenu, zejména je zde popsána jeho metabolická přeměna a hlavní metabolity. Dále je v práci popsána kapilární elektroforéza, její základní principy a instrumentace a také její využití v oblasti farmaceutické analýzy.

Experimentální část byla nejprve zaměřena na výběr optimálního základního elektrolytu a zároveň byl zkoumán vliv různých parametrů na separaci, včetně napětí a teploty. Bylo zjištěno, že pH má zásadní vliv na separaci APAP a jeho oxidačních metabolitů a významně ovlivňuje účinnost separace. Z provedených analýz byl vybrán jako optimální elektrolyt pro separaci 50 mM borátový pufr při pH 9,5 s napětím 25 kV. Tento elektrolyt byl dále použit pro další analýzy této práce, jako je zkoumání vlivu teploty na separaci, ale také pro určení kvantitativních parametrů. V této části byly stanoveny parametry kalibrační přímky jako je směrnice a úsek, dále byly určeny limity detekce (LOD) a limity kvantifikace (LOQ). V závěru práce byla také provedena analýza směsi APAP, APAP-SG, APAP-NAC a APAP-CYS v 50 mM borátovém pufru při pH 9,5, který byl již na začátku práce vybrán jako optimální elektrolyt.

Dle výsledků všech analýz lze usoudit, že je kapilární zónová elektroforéza vhodná pro účinnou separaci APAP a jeho metabolitů. Velkou výhodou této metody je rychlost analýz a také nízké náklady vzhledem k jednoduchému složení základního elektrolytu a zároveň díky eliminaci použití organických rozpouštědel při srovnání metody s již zmiňovanou kapalinovou chromatografií. Nevýhodou naopak mohou být mírně horší kvantitativní parametry, zejména meze detekce a stanovení, což je dáno obecně obtížnější detekcí v kapilární elektroforéze. Z provedených analýz se dá předpokládat, že by optimalizovaná metoda mohla být prakticky využitelná i pro analýzu vzorků z biologického materiálu, nicméně k její aplikaci by bylo nutné ověřit vlivy matričních efektů vzorků biologického původu na elektroforetickou separaci. Uvedený výzkum však již přesahuje rámeček a cíl diplomové práce.

## POUŽITÁ LITERATURA

ALTRIA, Kevin D., 1999. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*. 856(1-2), 443-463.

ANDERSON, Brian J., 2008. Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. *Pediatric Anesthesia*. 18(10), 915-921.

AYOUB, Samir S., 2021. Paracetamol (acetaminophen): A familiar drug with an unexplained mechanism of action. *Temperature (Austin)*. 8(4), 351-371.

CAUDET, Ana Ballester, Simón Mariño PEREA, Diego García GÓMEZ, José Luis Pérez PAVÓN a Encarnación Rodríguez GONZALO, 2025. Pharmacokinetic profile of metabolites by heart-cutting two-dimensional liquid chromatography: A focus on paracetamol analysis. *Journal of Chromatography A*. 1745(465760), 1-7.

CREGO, Antonio L. a Maria Luisa MARINA, 2005. UV–Vis absorbance detection in capillary electrophoresis. *Comprehensive Analytical Chemistry*. 45(1), 225-304.

DAVID, Arthur, Jade CHAKER, Thibaut LÉGER, et al., 2021. Acetaminophen metabolism revisited using non-targeted analyses: Implications for human biomonitoring. *Environment International*. 149(106388), 1-11.

DEEB, Sami El, Hermann WÄTZIG, Deia Abd EL-HADY, Cari Sängler-van de GRIEND a Gerhard K. E. SCRIBA, 2016. *Recent advances in capillary electrophoretic migration techniques for pharmaceutical analysis (2013–2015)*. 37(12), 1591-1608.

DELAHAYE, Lisa, Luc De BAERDEMAEKER a Christophe P. STOVE, 2021. Determination of paracetamol and its metabolites via LC-MS/MS in dried blood volumetric absorptive microsamples: A tool for pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 206(114361), 1-13.

GAŠ, Bohuslav, 2001. Kapilární elektroforéza. *Vesmír*. 80(370), 370-373.

GUIJT, Rosanne M., Christopher J. EVENHUIS, Miroslav MACKA a Paul R. HADDAD, 2004. Conductivity detection for conventional and miniaturised capillary electrophoresis systems. *Electrophoresis*. 25(23-24), 4032-4057.

- JONCOUR, Roxan, Nicolas DUGUET, Estelle MÉTAY, Amadéo FERREIRA a Marc LEMAIRE, 2014. Amidation of phenol derivatives: a direct synthesis of paracetamol (acetaminophen) from hydroquinone. *Green Chemistry*. 16(6), 2997-3002.
- JONG, Gerhardus de, 2016. *Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry (CE-MS): Principles and Applications*. Wiley-VCH. ISBN 9783527339242.
- JÓZWIAK-BEBENISTA, Marta a Jerzy Z. NOWAK, 2014. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 71(1), 11-23.
- KOUZNETSOV, Vladimir V., 2021. Exploring acetaminophen prodrugs and hybrids: a review. *RSC Advances*. 8(4), 351-371.
- LI, S.F.Y. *Capillary electrophoresis: principles, practice and applications*. In: . s. 582. ISBN ISBN 0-444-89433-0.
- LI, S.F.Y., 2001. *Capillary electrophoresis: principles, practice and applications*. Elsevier. ISBN ISBN 0-444-89433-0.
- LI, Xinghui, Jiaqi a Li CHEN, 2023. Advances in the study of acetaminophen-induced liver injury. *Sec. Gastrointestinal and Hepatic Pharmacology*. 14(1), 1-13.
- LODÉN, Henrik, 2008. *Separation of Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis using Partial Filling and Multiple-injections*. Uppsala, Sweden. Disertační práce. Uppsala University.
- LODÉN, Henrik, 2008. *Separation of Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis using Partial Filling and Multiple-injections*.
- MAZALEUSKAYA, Liudmila L., Katrin SANGKUHL, Caroline F. THORN, Garret A. FITZGERALD, Russ B. ALTMAN a Teri E. KLEIN, 2015. PharmGKB summary: Pathways of acetaminophen metabolism at the therapeutic versus toxic doses. *Pharmacogenet Genomics*. 25(8), 416-426.
- MCGILL, Mitchell R. a Hartmut JAESCHKE, 2013. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharmaceutical Research*. 30(9), 2174–2187.

- MONTASERI, Hanieh a Patricia B.C. FORBES, 2018. Analytical techniques for the determination of acetaminophen: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 108(1), 122-134.
- OGEMDI, Iwuzor Kingsley, 2019. A Review on the Properties and Uses of Paracetamol. *International Journal of Pharmacy and Chemistry*. 5(3), 31-35.
- OHASHI, Nobuko a Tatsuro KOHNO, 2020. Analgesic Effect of Acetaminophen: A Review of Known and Novel Mechanisms of Action. *Front. Pharmacol.* 11(580289), 1-6.
- PRESCOTT, L. F., 1980. Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 10(2), 291-298.
- PubChem Compound Summary for CID 1983, Acetaminophen, 2004. In: *PubChem* [online]. [cit. 2025-02-19]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetaminophen#section=2D-Structure>
- RAO, A. Srinivasa, Battula DILEEP a Bodapati MADHUSUDHAN, 2023. A Review on "Pharmaceutical Analysis in the Modern Era: Advanced Analytical Methods." *International Journal of Novel Research and Development*. 8(10), 876-a881.
- ŘEMÍNEK, Roman a František FORET, 2021. Capillary electrophoretic methods for quality control analyses of pharmaceuticals: A review. *Electrophoresis*. 42(1-2), 19-37.
- ROTUNDO, Laura a Nikolaos PYRSOPOULOS, 2015. Liver injury induced by paracetamol and challenges associated with intentional and unintentional use. *World Journal of Hepatology*. 12(4), 125-136.
- RYVOLOVÁ, Markéta, 2009. *New Instrumentation for Capillary Electrophoresis: Development and Characterization*. Brno. Disertační práce. Masaryk University.
- SABATÉ, Mònica, Luisa IBÁÑEZ, Eulàlia PÉREZ, et al., 2011. Paracetamol in therapeutic dosages and acute liver injury: causality assessment in a prospective case series. *BMC Gastroenterology volume*. 11(80), 1-7.
- SANGHAVIA, Bankim J. a Ashwini K. SRIVASTAVA, 2013. Adsorptive stripping voltammetric determination of imipramine, trimipramine and desipramine employing titanium dioxide nanoparticles and an Amberlite XAD-2 modified glassy carbon paste electrode. *Analyst*. 138(5), 1395-1404.

SHAH, Mansi, Nrupesh PATEL, Nagja TRIPATHI a Vivek K. VYAS, 2022. Capillary electrophoresis methods for impurity profiling of drugs: A review of the past decade. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 12(1), 15-28.

SHARMA, Shivani, Navdeep SINGH, Amar Deep ANKALGI, Arti RANA a Mahendra Singh ASHAWAT, 2021. Modern Trends in Analytical Techniques for Method Development and Validation of Pharmaceuticals: A Review. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 11(1), 121-130.

SHEN, Xiaojing, Zhichang Yang, Elijah N. McCool, et al., 2019. Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry for top-down proteomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 120(115644), 1-12.

SRABOVIC, Majda, Melita HUREMOVIC, Benjamin CATOVIC, Samra MURATOVIC a Aida TALETOVIĆ, 2016. Design synthesis and crystallization of acetaminophen. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*. 7(1), 218-230.

STAHL, Simone H., James W. YATES, Andrew W. NICHOLLS, J. Gerry KENNA, Muireann COEN, Fernando ORTEGA, Jeremy K. NICHOLSON a Ian D. WILSON, 2015. Systems toxicology: modelling biomarkers of glutathione homeostasis and paracetamol metabolism. *Drug Discovery Today: Technologies*. 15(1), 9-14.

SUNTORNUSUK, Leena, 2010. Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 398(1), 29–52.

VANOVA, Jana, David MALINAK, Miroslav Kubat, et al., 2022. 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*. 1669(462956), 1-11.

WANG, Yujie a Wen XIE, 2023. Drug-induced liver injury: An overview and update. *Gastroenterology & Endoscopy*. 1(2), 102-109.

XU, Xiaomi, Ling LI a Stephen G. WEBER, 2007. Electrochemical and optical detectors for capillary and chip separations. *Trends Analyt Chem*. 26(1), 68-79.

YAN, Mingzhu, Yazhen HUO, Shutao YIN a Hongbo HU, 2018. Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions. *Redox Biology*. 17(1), 274–283.

ZHU, Qingfu a Gerhard K.E. SCRIBA, 2018. Analysis of small molecule drugs, excipients and counter ions in pharmaceuticals by capillary electromigration methods – recent developments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 147(1), 425-438.

# **SEZNAM PŘÍLOH**

**Příloha 1: Borátový pufr**

**Příloha 2: Fosfátový pufr**

**Příloha 3: Vliv teploty**

**Příloha 4: Kvantitativní stanovení**

## **PŘÍLOHA 1:**

### **Borátový pufr**

Tabulka 1: 50 mM borátový pufr pH 9,5; 25 kV;

Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\varnothing t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\varnothing w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	3,206	3,228	3,217	4,30007E-08	0,0852	0,0814	0,0833	8269	50,2
APAP	3,976	3,967	3,972	-8,16922E-09	0,0374	0,0353	0,0364	66180	6,3
SG	7,129	7,091	7,110	-2,35446E-08	0,0380	0,0382	0,0381	193069	2,1
NAC	6,712	6,691	6,702	-2,23586E-08	0,0489	0,0496	0,0493	102649	4,0
CYS	6,242	6,170	6,206	-2,07105E-08	0,0323	0,0318	0,0321	207869	2,0

Tabulka 2: 25 mM borátový pufr pH 9,5; 25 kV

Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\varnothing t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\varnothing w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	2,815	2,826	2,821	4,90457E-08	0,0696	0,0692	0,0694	9157	45,3
APAP	3,218	3,217	3,218	-6,05163E-09	0,0296	0,0287	0,0292	67543	6,1
SG	4,691	4,958	4,825	-2,03726E-08	0,0268	0,0289	0,0279	166371	2,5
NAC	4,904	4,906	4,905	-2,08432E-08	0,0499	0,0525	0,0512	50882	8,2
CYS	4,653	4,627	4,640	-1,92325E-08	0,0210	0,0208	0,0209	273254	1,5

Tabulka 3: 50 mM borátový pufr pH 8,5; 25 kV

Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\varnothing t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\varnothing w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	2,267	2,272	2,270	6,09532E-08	0,0701	0,0724	0,0713	5625	73,8
APAP	2,357	2,359	2,358	-2,28768E-09	0,0228	0,0220	0,0224	61435	6,8
SG	3,114	3,117	3,116	-1,65516E-08	0,0555	0,0588	0,0572	16476	25,2
NAC	3,279	3,275	3,277	-1,87398E-08	0,0769	0,0757	0,0763	10227	40,6
CYS	2,767	2,767	2,767	-1,09592E-08	0,0382	0,0365	0,0374	30427	13,6

Tabulka 4: 25 mM borátový pufr pH 8,5; 25 kV

Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\phi t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\phi w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	2,152	2,152	2,152	6,42813E-08	0,0614	0,0643	0,0629	6500	64
APAP	2,214	2,211	2,213	-1,75775E-09	0,0184	0,0164	0,0174	89638	4,6
SG	2,970	2,971	2,971	-1,77122E-08	0,0785	0,0726	0,0756	8571	48,4
NAC	3,136	3,138	3,137	-2,01840E-08	0,1104	0,1073	0,1089	4605	90,1
CYS	2,593	2,586	2,590	-1,08604E-08	0,0626	0,0469	0,0548	12402	33,5

Tabulka 5: 50 mM borátový pufr pH 7,5; 25 kV

Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\phi t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\phi w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	2,190	2,249	2,220	6,23263E-08	0,0389	0,0315	0,0352	22042	18,8
APAP	2,276	2,254	2,265	-1,25203E-09	0,0271	0,0249	0,0260	42074	9,9
SG	2,977	2,985	2,981	-1,59213E-08	0,0830	0,0928	0,0879	6376	65,1
NAC	3,122	3,169	3,146	-1,83482E-08	0,0929	0,0926	0,0928	6376	65,1
CYS	2,189	2,181	2,185	9,84100E-10	0,0459	0,0466	0,0463	12374	33,5

Tabulka 6: 25 mM borátový pufr pH 7,5; 25 kV

Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\phi t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\phi w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	2,182	2,186	2,184	6,33394E-08	0,0313	0,0387	0,0350	21587	19,2
APAP	2,200	2,208	2,204	-5,74768E-10	0,0237	0,0236	0,02365	48149	8,6
SG	2,981	3,029	3,005	-1,73051E-08	0,0927	0,0927	0,0927	5826	71,2
NAC	3,184	3,190	3,187	-1,99339E-08	0,1018	0,1002	0,1010	5520	75,2
CYS	2,275	2,277	2,276	-2,56029E-09	0,0486	0,0473	0,04795	12491	33,2

Tabulka 7: 50 mM borátový pufr pH 9,5; 15 kV

Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\phi t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\phi w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	5,707	5,831	5,769	3,99646E-08	0,1063	0,1135	0,1099	15279	27,2
APAP	5,986	6,028	6,007	-1,5834E-09	0,0577	0,0588	0,0583	58969	7,0
SG	7,991	8,009	8,000	-1,1145E-08	0,0651	0,0670	0,0661	81346	5,1
NAC	10,337	10,311	10,324	-1,7633E-08	0,1923	0,1960	0,1942	15679	26,5
CYS	7,536	7,542	7,539	-9,3828E-09	0,0754	0,0735	0,0745	56859	7,3

Tabulka 8: 25 mM borátový pufr pH 9,5; 15 kV

Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\phi t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\phi w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	2,937	2,945	2,941	7,83936E-08	0,0633	0,0625	0,0629	12122	34,2
APAP	2,991	2,995	2,993	-1,3620E-09	0,0305	0,0307	0,0306	53048	7,8
SG	3,823	3,818	3,821	-1,8047E-08	0,0311	0,0158	0,0235	147183	2,8
NAC	4,747	4,724	4,736	-2,9707E-08	0,1096	0,1097	0,1097	10342	40,1
CYS	3,589	3,590	3,590	-1,4163E-08	0,0421	0,0420	0,0421	40405	10,3

Tabulka 9: 50 mM borátový pufr pH 8,5; 15 kV

Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\phi t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\phi w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	6,459	6,459	6,459	3,56952E-08	0,1282	0,1274	0,1278	14163	29,3
APAP	6,472	6,470	6,471	-6,6194E-11	0,0957	0,0961	0,0959	25247	16,4
SG	7,555	7,548	7,552	-5,1641E-09	0,0486	0,0477	0,0482	136388	3,0
NAC	11,482	11,461	11,472	-1,5597E-08	0,2272	0,2261	0,2267	14205	29,2
CYS	7,087	7,075	7,081	-3,1355E-09	0,0498	0,0513	0,0506	108805	3,8

Tabulka 10: 25 mM borátový pufr pH 8,5; 15 kV

Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\phi t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\phi w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	5,448	5,451	5,4495	4,23077E-08	0,1042	0,1084	0,1063	14573	28,5
APAP	5,496	5,495	5,4955	-3,5414E-10	0,0789	0,0795	0,0792	26697	15,5
SG	6,329	6,325	6,327	-5,8677E-09	0,0448	0,0434	0,0441	114135	3,6
NAC	8,961	8,947	8,954	-1,6559E-08	0,2087	0,2153	0,2120	9892	42,0
CYS	6,008	6,014	6,011	-3,952E-09	0,0478	0,0512	0,0495	81768	5,1

Tabulka 11: 50 mM borátový pufr pH 7,5; 15 kV

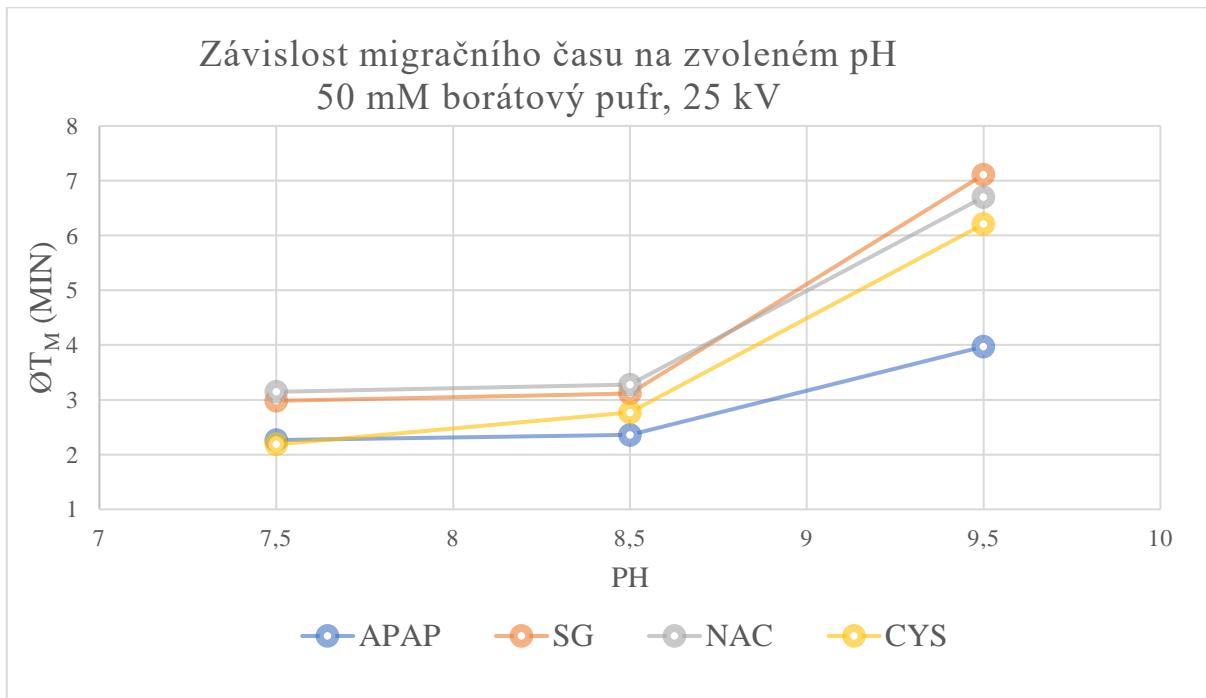
Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\phi t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\phi w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	3,886	3,868	3,8770	5,94675E-08	0,0839	0,0849	0,0844	11701	35,5
APAP	3,858	3,843	3,8505	4,09269E-10	0,0735	0,0750	0,0743	14912	27,8
SG	3,997	3,984	3,9905	-1,6914E-09	0,0384	0,0390	0,0387	58957	7,0
NAC	6,984	6,885	6,9345	-2,622E-08	0,1362	0,1352	0,1357	14480	28,7
CYS	3,928	3,935	3,9315	-8,2436E-10	0,0322	0,0336	0,0329	79182	5,2

Tabulka 12: 25 mM borátový pufr pH 7,5; 15 kV

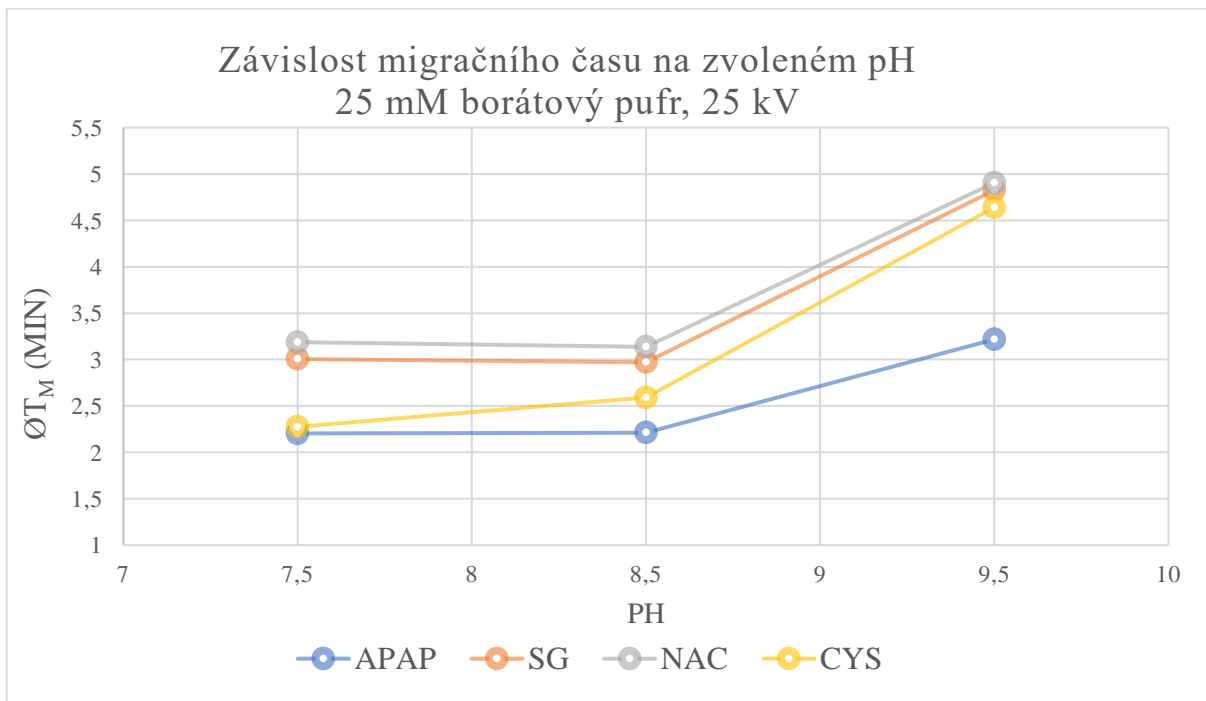
Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\phi t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\phi w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	5,773	5,780	5,777	3,99127E-08	0,1103	0,1115	0,1109	15044	27,6
APAP	5,802	5,798	5,800	-1,6172E-10	0,0937	0,0928	0,0933	21452	19,3
SG	6,025	6,007	6,016	-1,5889E-09	0,0556	0,0559	0,0558	64570	6,4
NAC	11,786	9,785	10,786	-1,8536E-08	0,2320	0,2343	0,2332	11866	35,0
CYS	5,861	5,865	5,863	-5,8885E-10	0,0667	0,0676	0,0672	42272	9,8

## Závislost migračního času na pH

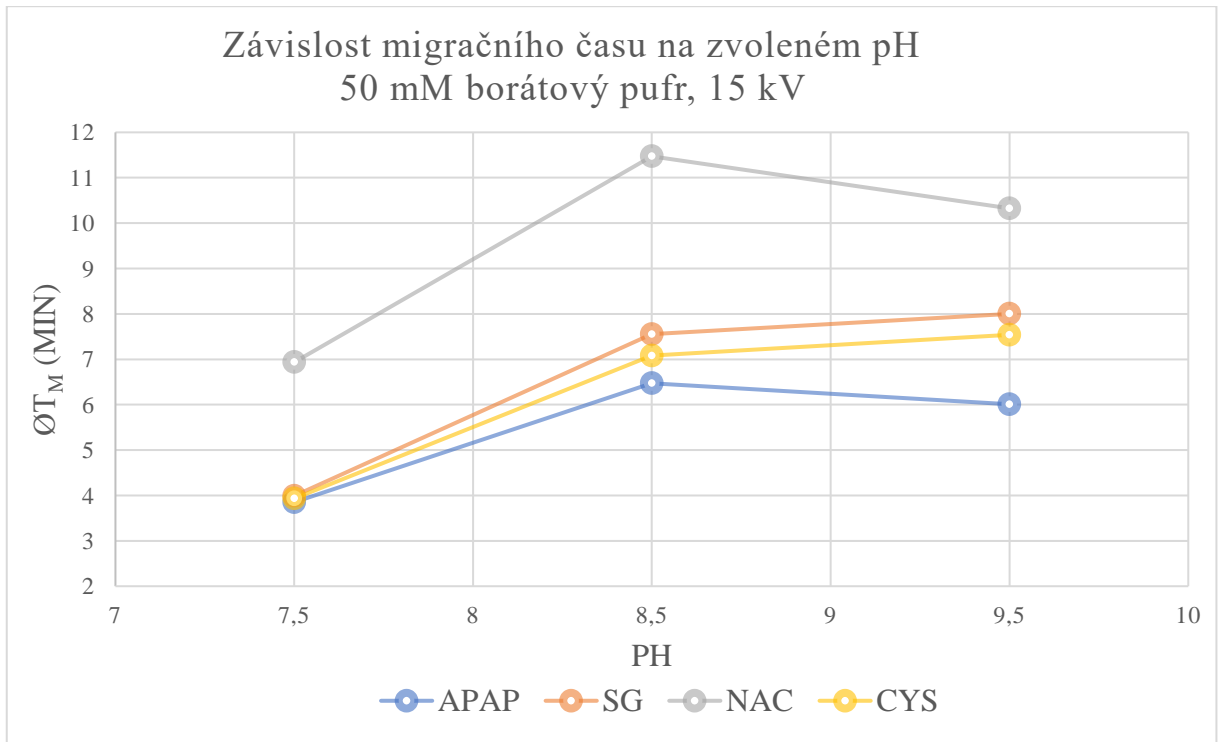
Graf 1: 50 mM borátový pufr, 25 kV



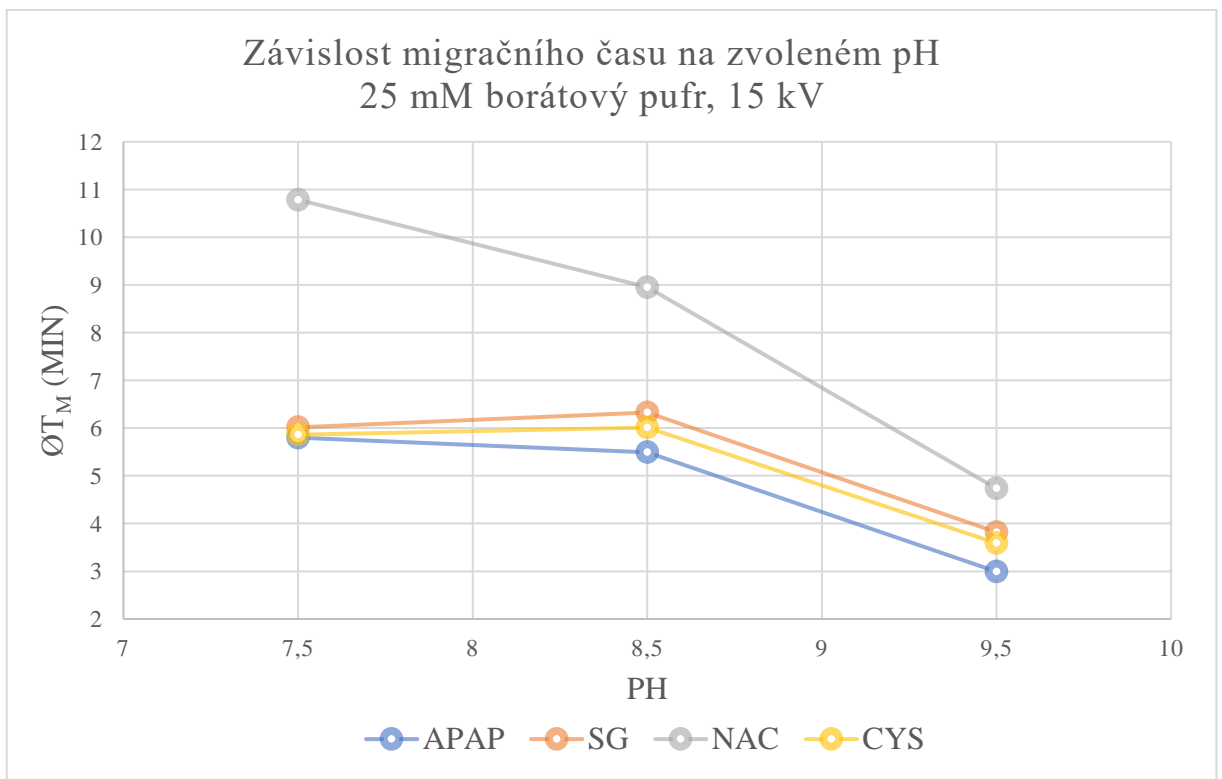
Graf 2: 25 mM borátový pufr, 25 kV



Graf 3: 50 mM borátový pufr, 15 kV

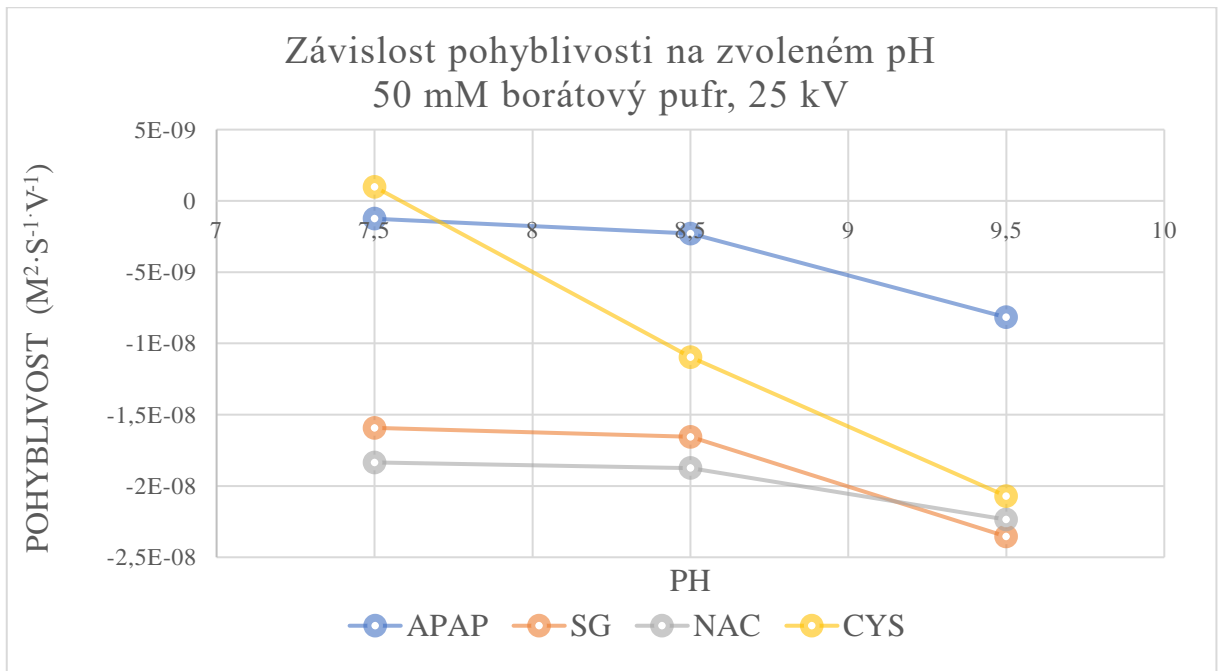


Graf 4: 25 mM borátový pufr, 15 kV

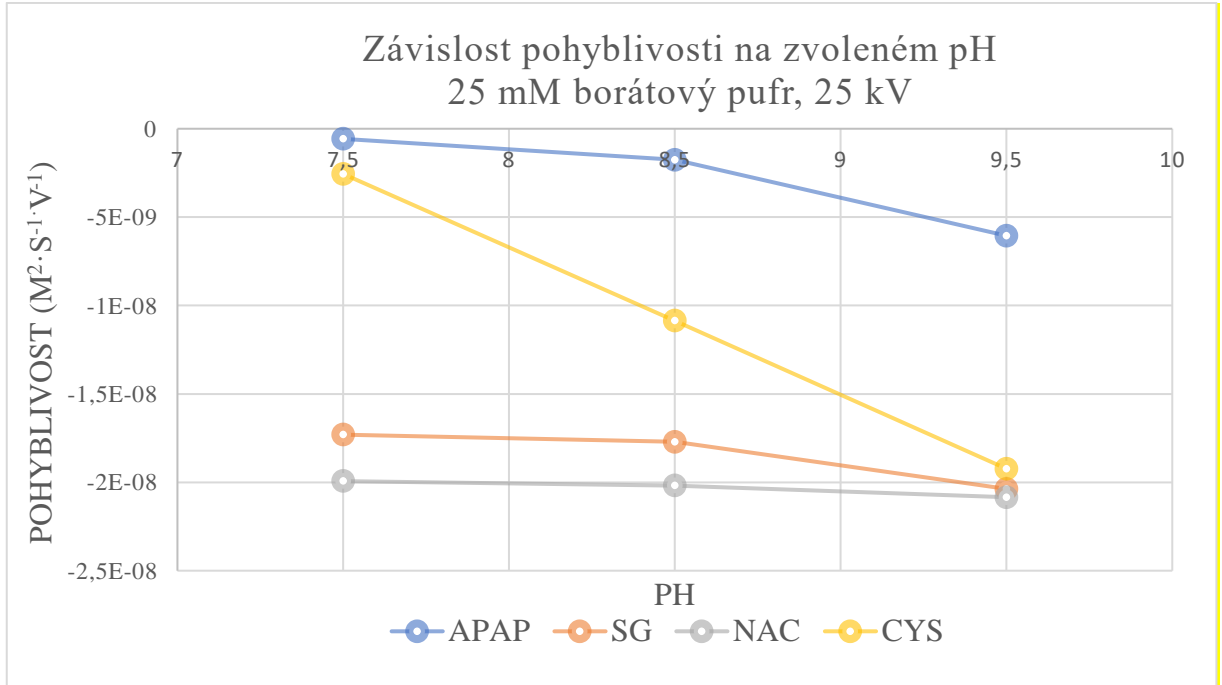


Závislost pohyblivosti na pH:

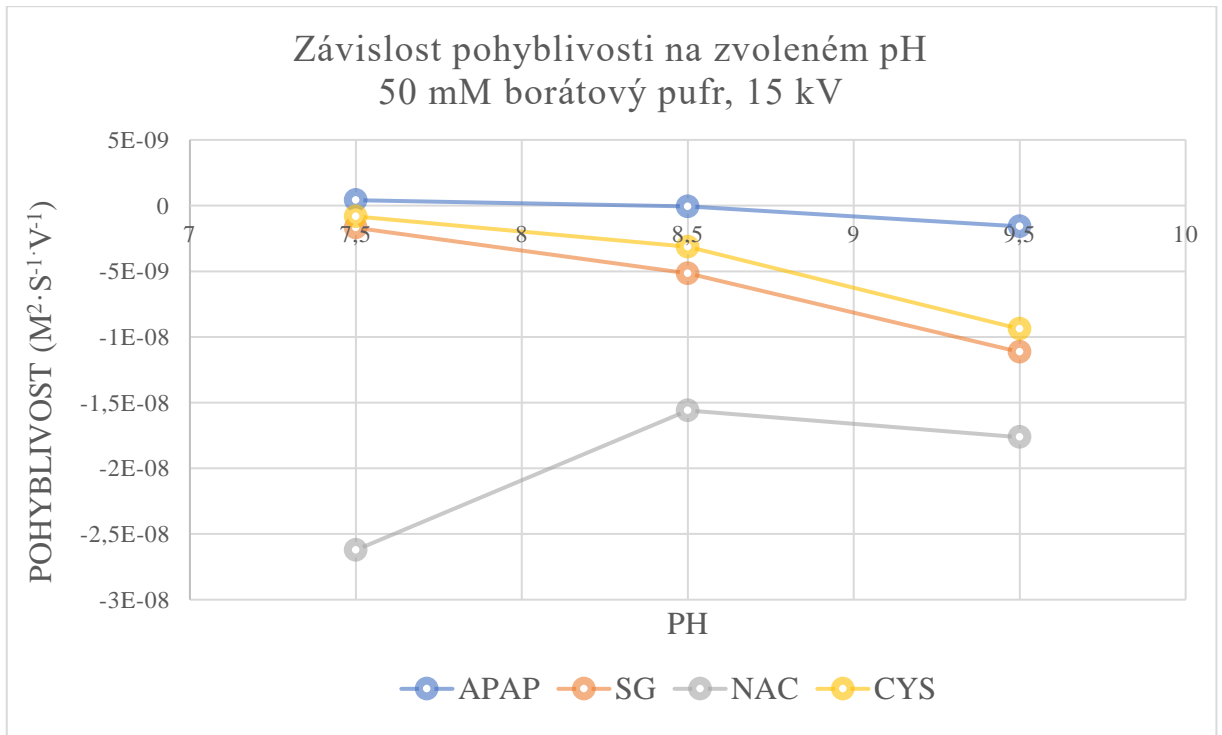
Graf 5: 50 mM borátový pufr, 25 kV



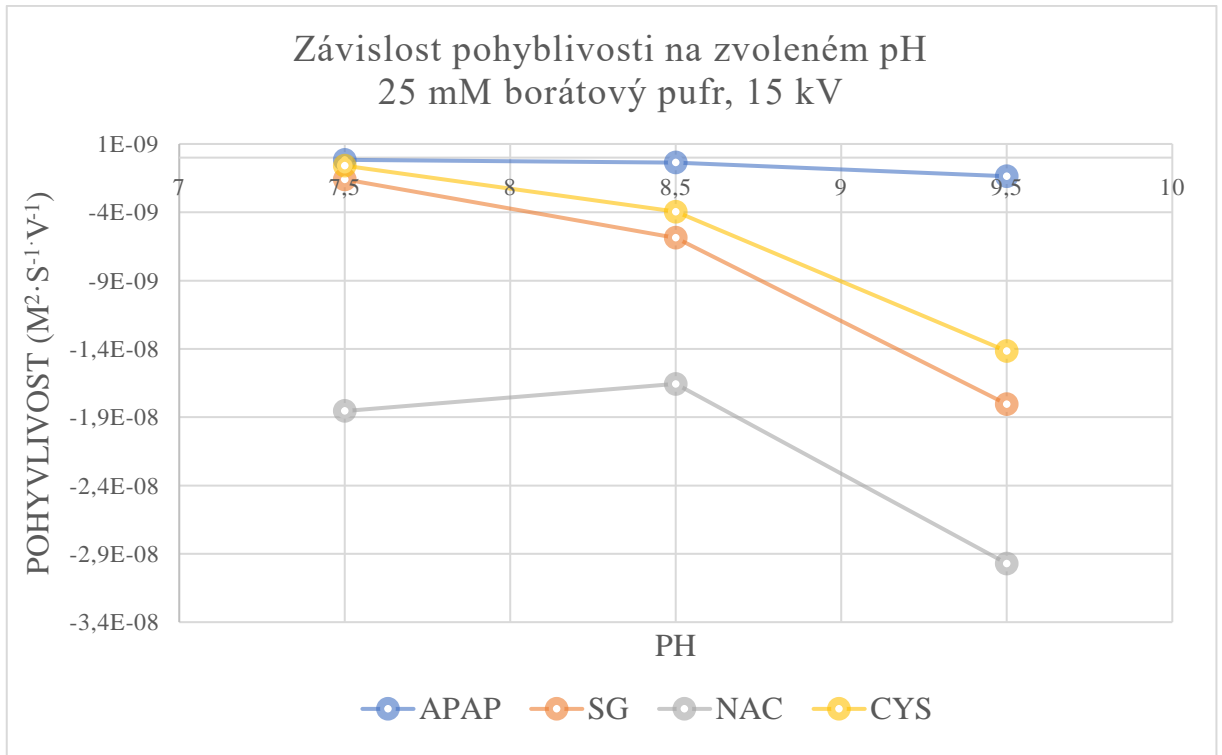
Graf 6: 25 mM borátový pufr, 25 kV



Graf 7: 50 mM borátový pufr, 15 kV

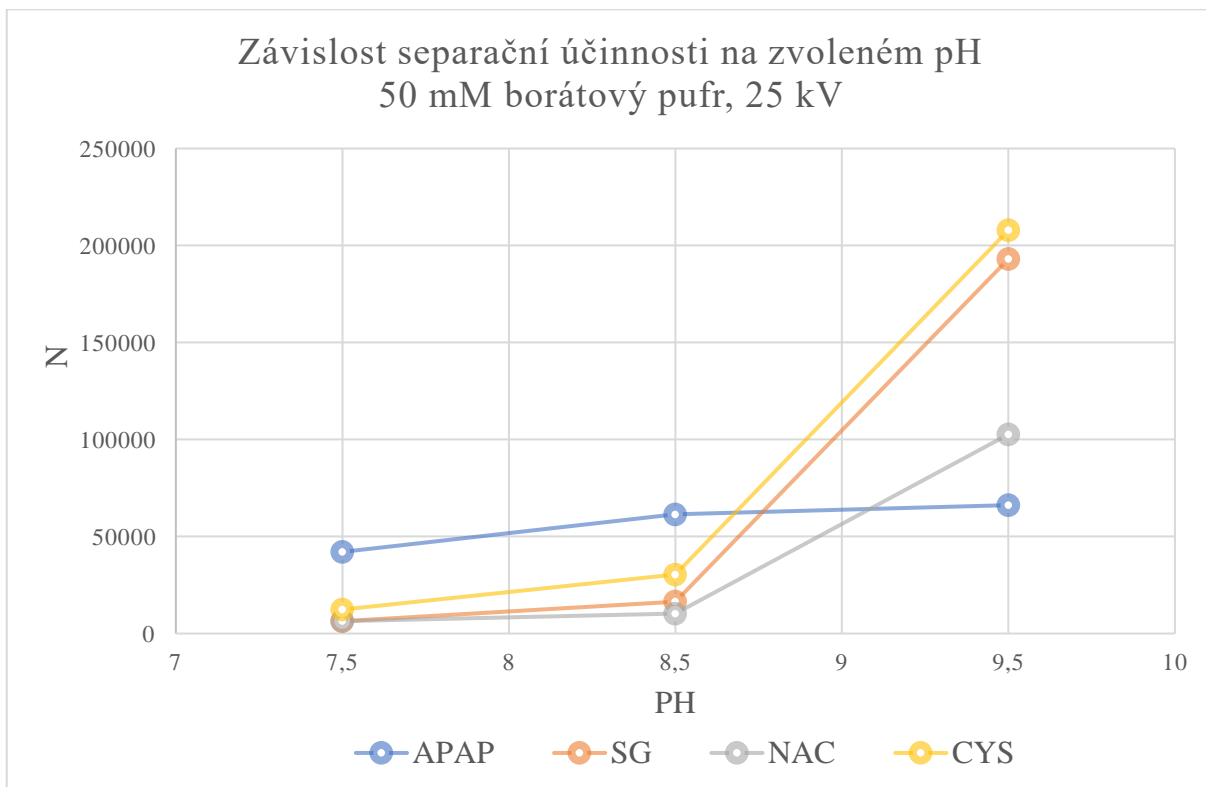


Graf 8: 25 mM borátový pufr, 15 kV

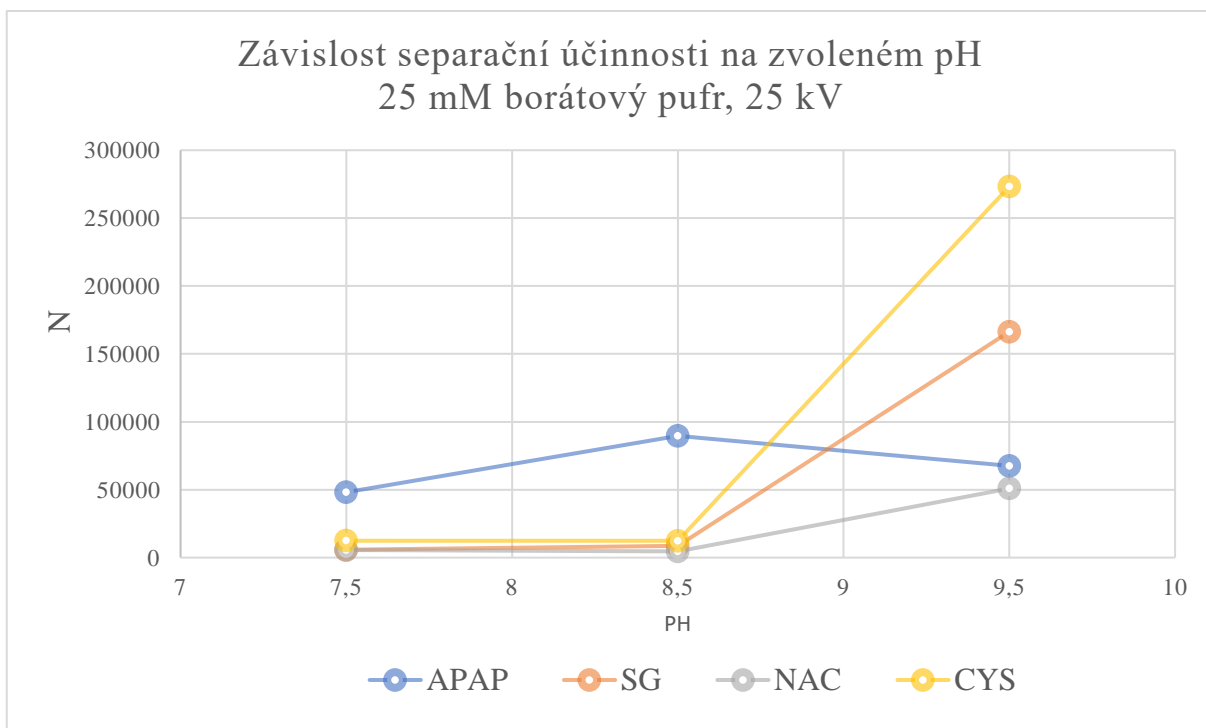


Závislost účinnosti na pH:

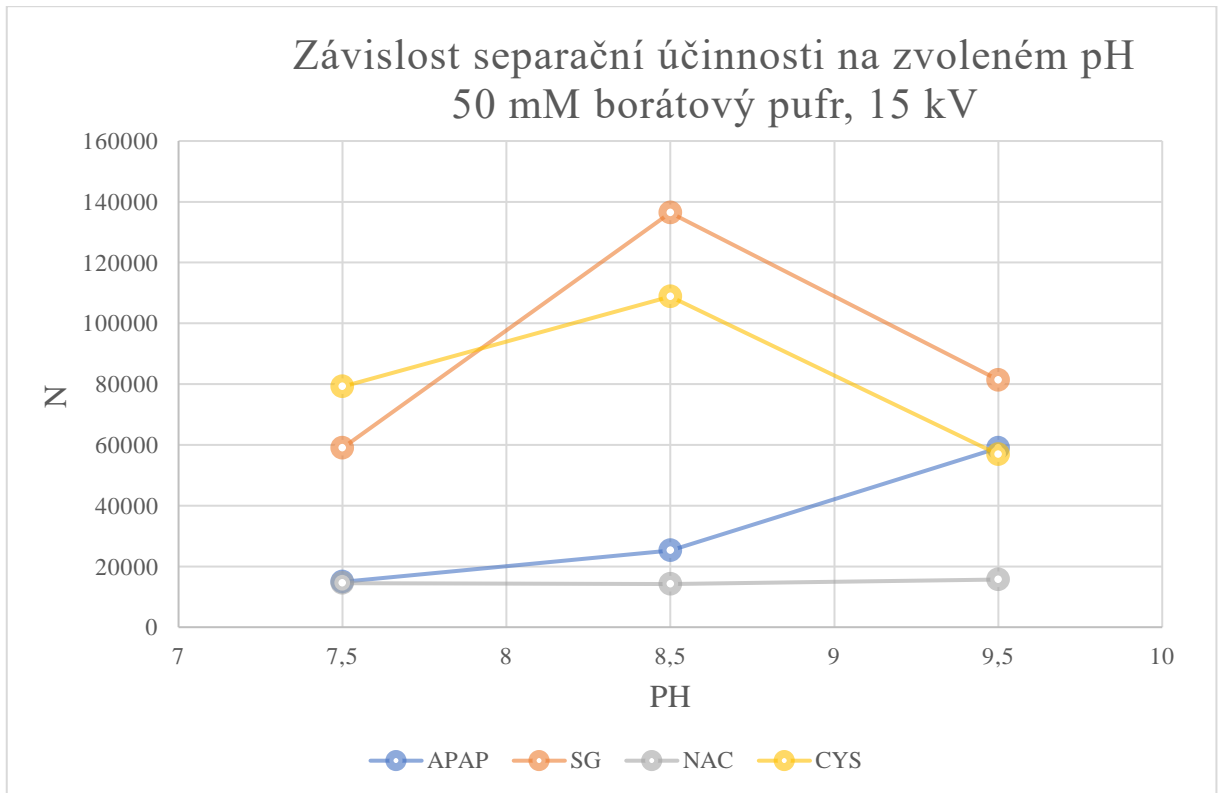
Graf 9: 50 mM borátový pufr, 25 kV



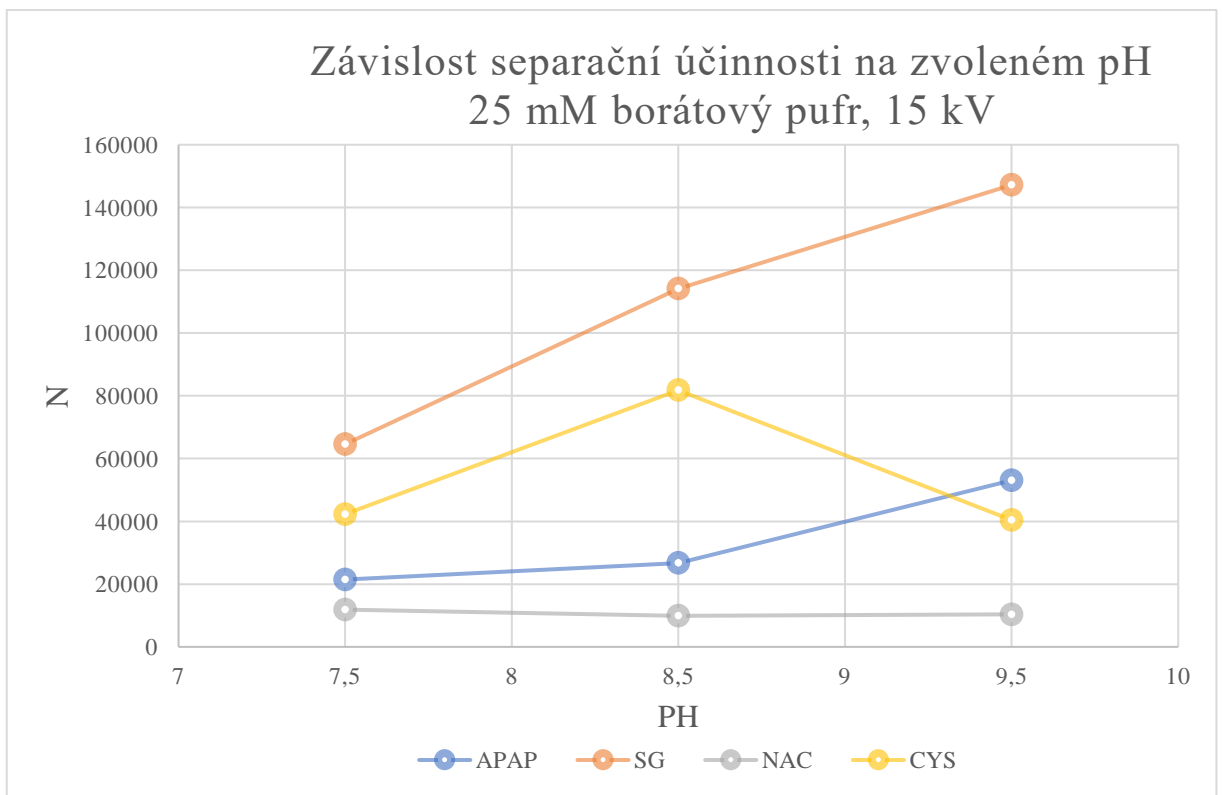
Graf 10: 25 mM borátový pufr, 25 kV



Graf 11: 50 mM borátový pufr, 15 kV



Graf 12: 25 mM borátový pufr, 15 kV



## **PŘÍLOHA 2:**

### **Fosfátový pufr**

Tabulka 13: 50 mM fosfátový pufr pH 8,5; 25 kV

Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\phi t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\phi w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	3,059	3,040	3,050	4,5363E-08	0,065	0,065	0,065	12280	33,8
APAP	3,107	3,116	3,112	-9,0390E-10	0,027	0,027	0,027	74465	5,6
SG	4,864	4,842	4,853	-1,6858E-08	0,059	0,080	0,069	27115	15,3
NAC	5,305	5,482	5,394	-1,9714E-08	0,106	0,143	0,125	10406	39,9
CYS	4,662	0,000	4,662	-1,5690E-08	0,121	0,000	0,121	8204	50,6

Tabulka 14: 25 mM fosfátový pufr pH 8,5; 25 kV

Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\phi t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\phi w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	2,805	2,813	2,809	4,92465E-08	0,0572	0,0575	0,0574	13303	31,2
APAP	2,875	2,882	2,879	-1,189E-09	0,0261	0,0275	0,0268	63968	6,5
SG	4,258	4,215	4,237	-1,6594E-08	0,0706	0,0701	0,0704	20109	20,6
NAC	4,681	4,816	4,749	-2,0114E-08	0,1296	0,1444	0,1370	6662	62,3
CYS	4,019	4,115	4,067	-1,5233E-08	0,1039	0,1057	0,1048	8351	49,7

Tabulka 15: 50 mM fosfátový pufr pH 7,5; 25 kV

Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\phi t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\phi w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	3,525	3,540	3,533	3,91602E-08	0,0722	0,0881	0,0802	10771	38,5
APAP	3,548	3,546	3,547	-1,6009E-10	0,0501	0,0539	0,0520	25800	16,1
SG	5,508	5,511	5,510	-1,4052E-08	0,0904	0,0892	0,0898	20872	19,9
NAC	6,327	6,318	6,323	-1,7281E-08	0,1426	0,1459	0,1443	10652	39,0
CYS	4,232	4,228	4,230	-6,4573E-09	0,0324	0,0324	0,0324	94513	4,4

Tabulka 16: 25 mM fosfátový pufr pH 7,5; 25 kV

Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\phi t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\phi w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	3,199	3,199	3,199	4,32427E-08	0,0645	0,0668	0,0657	13166	31,5
APAP	3,207	3,209	3,208	-1,2132E-10	0,0495	0,0509	0,0502	22645	18,3
SG	4,739	4,735	4,737	-1,404E-08	0,1023	0,0944	0,0984	12864	32,3
NAC	5,333	5,335	5,334	-1,7308E-08	0,1472	0,1471	0,1472	7286	57,0
CYS	3,740	3,742	3,741	-6,265E-09	0,0328	0,0321	0,0325	73697	5,6

Tabulka 17: 50 mM fosfátový pufr pH 6,5; 25 kV

Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\phi t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\phi w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	4,280	4,251	4,266	3,2431E-08	0,0929	0,0908	0,0919	11959	34,7
APAP	4,232	4,219	4,226	3,0700E-10	0,0939	0,0924	0,0932	11410	36,4
SG	7,064	7,022	7,043	-1,2789E-08	0,1248	0,1215	0,1232	18136	22,9
NAC	8,557	8,502	8,530	-1,6213E-08	0,2056	0,2032	0,2044	9656	43,0
CYS	4,377	4,367	4,372	-7,9000E-10	0,0392	0,0386	0,0389	70043	5,9

Tabulka 18: 25 mM fosfátový pufr pH 6,5; 25 kV

Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\phi t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\phi w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	3,658	3,651	3,655	3,78529E-08	0,0752	0,0754	0,0753	13061	31,8
APAP	3,662	3,659	3,661	-6,2045E-11	0,0692	0,0729	0,0711	14718	28,2
SG	5,697	5,691	5,694	-1,3558E-08	0,1159	0,1156	0,1158	13418	30,9
NAC	6,652	6,650	6,651	-1,7054E-08	0,1913	0,1891	0,1902	6780	61,2
CYS	3,801	3,804	3,803	-1,4733E-09	0,0387	0,0376	0,0382	55087	7,5

Tabulka 19: 50 mM fosfátový pufr pH 8,5; 15 kV

Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\varnothing t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\varnothing w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	5,986	5,939	5,9625	3,86676E-08	0,1130	0,0123	0,0626	50257	8,3
APAP	5,984	5,975	5,9795	-1,0993E-10	0,0584	0,0590	0,0587	57538	7,2
SG	7,891	7,869	7,880	-9,4093E-09	0,0747	0,0703	0,0725	65506	6,3
NAC	10,271	10,226	10,249	-1,6171E-08	0,2679	0,2643	0,2661	8225	50,5
CYS	7,339	7,308	7,324	-7,186E-09	0,0775	0,0769	0,0772	49900	8,3

Tabulka 20: 25 mM fosfátový pufr pH 8,5; 15 kV

Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\varnothing t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\varnothing w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	5,065	5,074	5,070	4,5479E-08	0,0974	0,0988	0,0981	14808	28,0
APAP	5,136	5,136	5,136	-5,8885E-10	0,0544	0,0553	0,0549	48618	8,5
SG	6,447	6,436	6,442	-9,6867E-09	0,0540	0,0524	0,0532	81293	5,1
NAC	8,315	8,286	8,301	-1,7703E-08	0,2422	0,2371	0,2397	6652	62,4
CYS	6,057	5,944	6,001	-7,0562E-09	0,0563	0,0457	0,051	76760	5,4

Tabulka 21: 50 mM fosfátový pufr pH 7,5; 15 kV

Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\varnothing t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\varnothing w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	6,121	6,104	6,1125	3,77187E-08	0,1294	0,1210	0,1252	13217	31,4
APAP	6,115	6,097	6,106	4,01526E-11	0,0949	0,0969	0,0959	22479	18,5
SG	7,030	7,007	7,0185	-4,869E-09	0,0437	0,0434	0,0436	144017	2,9
NAC	10,317	10,277	10,297	-1,5328E-08	0,2174	0,2219	0,2197	12186	34,1
CYS	6,955	6,957	6,956	-4,5739E-09	0,0445	0,0443	0,0444	136099	3,0

Tabulka 22: 25 mM fosfátový pufr pH 7,5; 15 kV

Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\varnothing t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\varnothing w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	5,132	5,134	5,133	4,49163E-08	0,1015	0,1005	0,1010	14322	29,0
APAP	5,156	5,152	5,154	-1,8301E-10	0,0746	0,0746	0,0746	26467	15,7
SG	5,844	5,830	5,837	-5,4174E-09	0,0376	0,0375	0,0376	133987	3,1
NAC	8,118	8,061	8,090	-1,6416E-08	0,2062	0,1981	0,202	8880	46,7
CYS	5,788	5,784	5,786	-5,0692E-09	0,0394	0,0397	0,039	118677	3,5

Tabulka 23: 50 mM fosfátový pufr pH 6,5; 15 kV

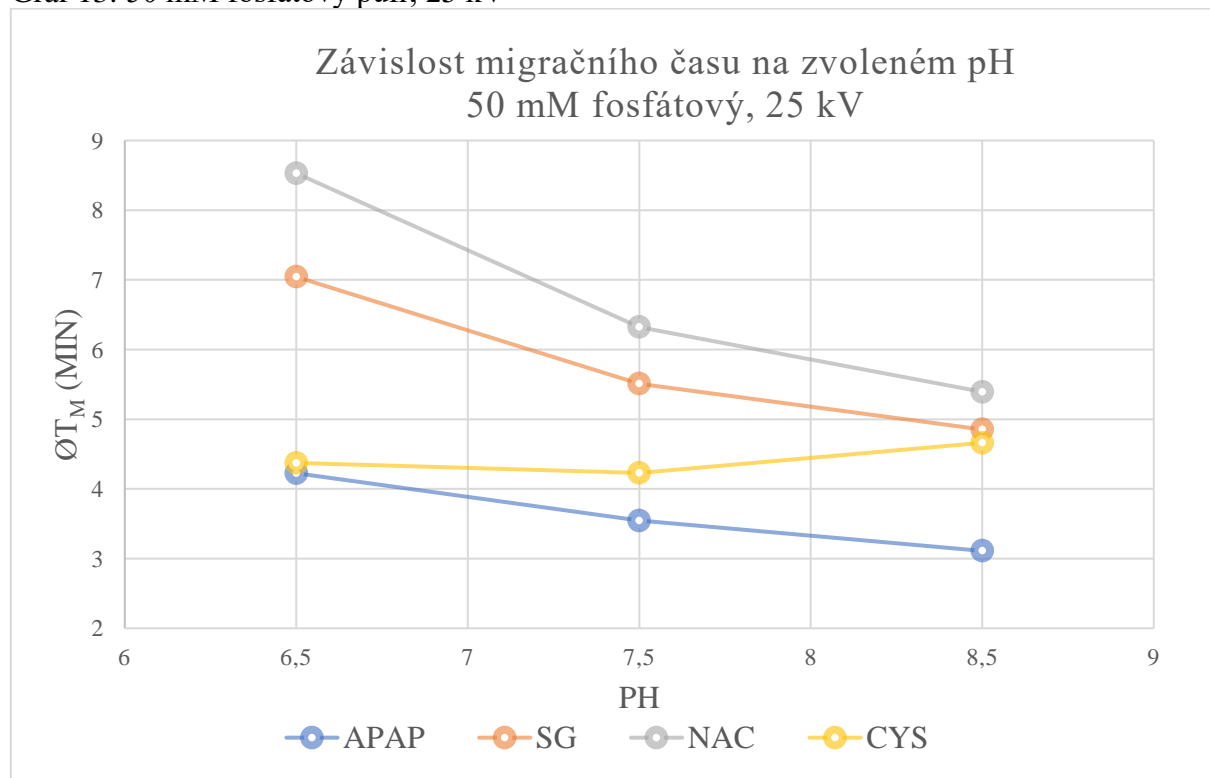
Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\varnothing t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\varnothing w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	6,044	6,001	6,023	3,82824E-08	0,1193	0,1167	0,1180	14444	28,7
APAP	5,966	5,928	5,947	4,86013E-10	0,1081	0,1068	0,1075	16986	24,4
SG	8,463	8,345	8,404	-1,0848E-08	0,0915	0,0906	0,0911	47240	8,8
NAC	9,397	9,235	9,316	-1,3534E-08	0,1655	0,1639	0,1647	17741	23,4
CYS	5,852	5,810	5,831	1,25726E-09	0,0493	0,0470	0,0482	81320	5,1

Tabulka 24: 25 mM fosfátový pufr pH 6,5; 15 kV

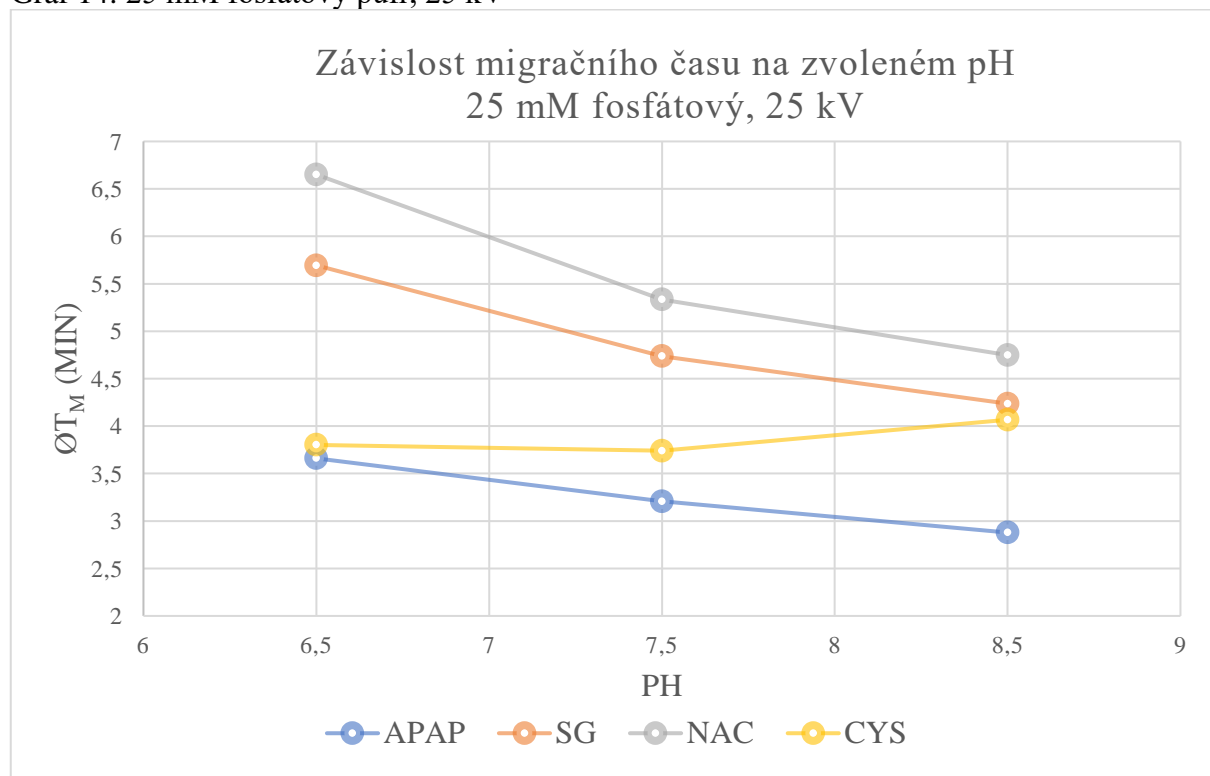
Látka	$t_m$ (min)	$t_m$ (min)	$\varnothing t_m$ (min)	$\mu(m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1})$	$w_{0,5}$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$\varnothing w_{0,5}$ (min)	N	H ( $\mu m$ )
TM	4,798	4,762	4,780	4,82334E-08	0,0959	0,0957	0,0958	13805	30,1
APAP	4,750	4,715	4,7325	4,84117E-10	0,0809	0,0814	0,08115	18858	22,0
SG	4,801	4,761	4,781	-1,0089E-11	0,0424	0,0408	0,0416	73241	5,7
NAC	6,817	6,712	6,7645	-1,415E-08	0,1440	0,1382	0,1411	12744	32,6
CYS	4,637	4,604	4,6205	1,66502E-09	0,0340	0,0343	0,03415	101507	4,1

Závislost migračního času na pH:

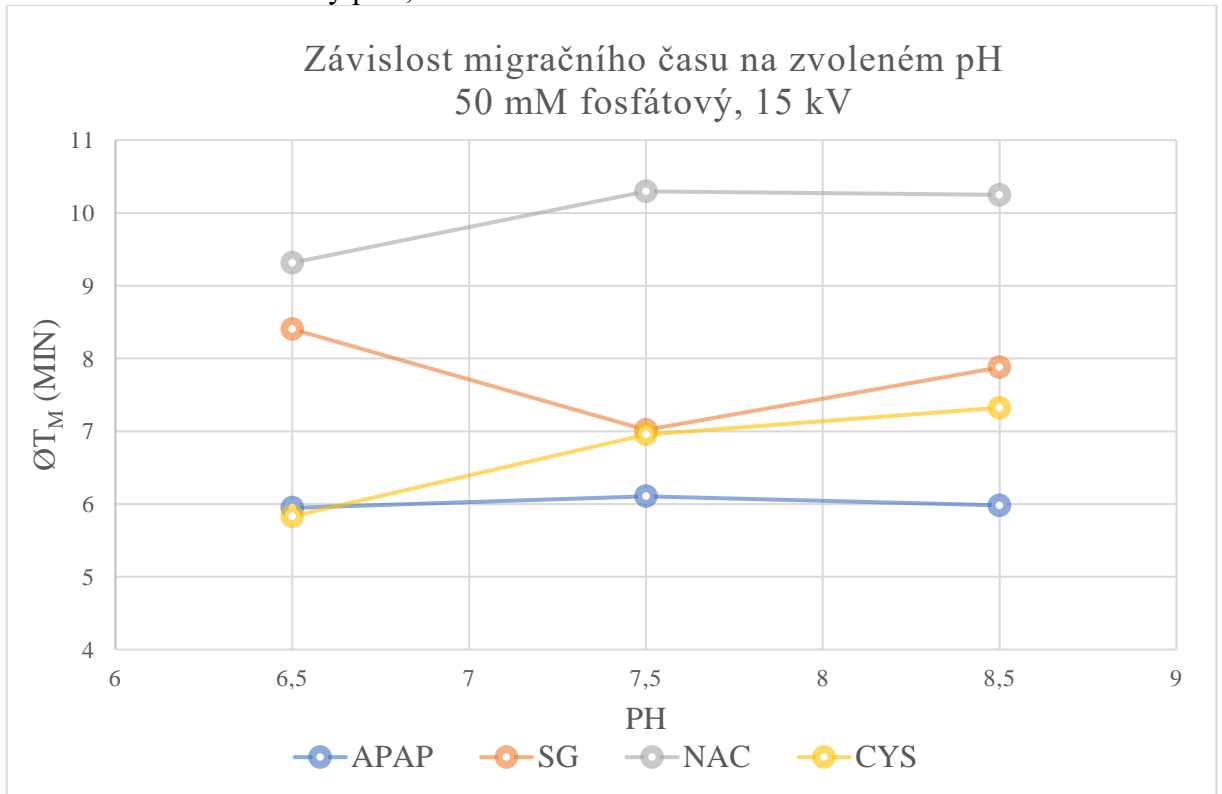
Graf 13: 50 mM fosfátový pufr, 25 kV



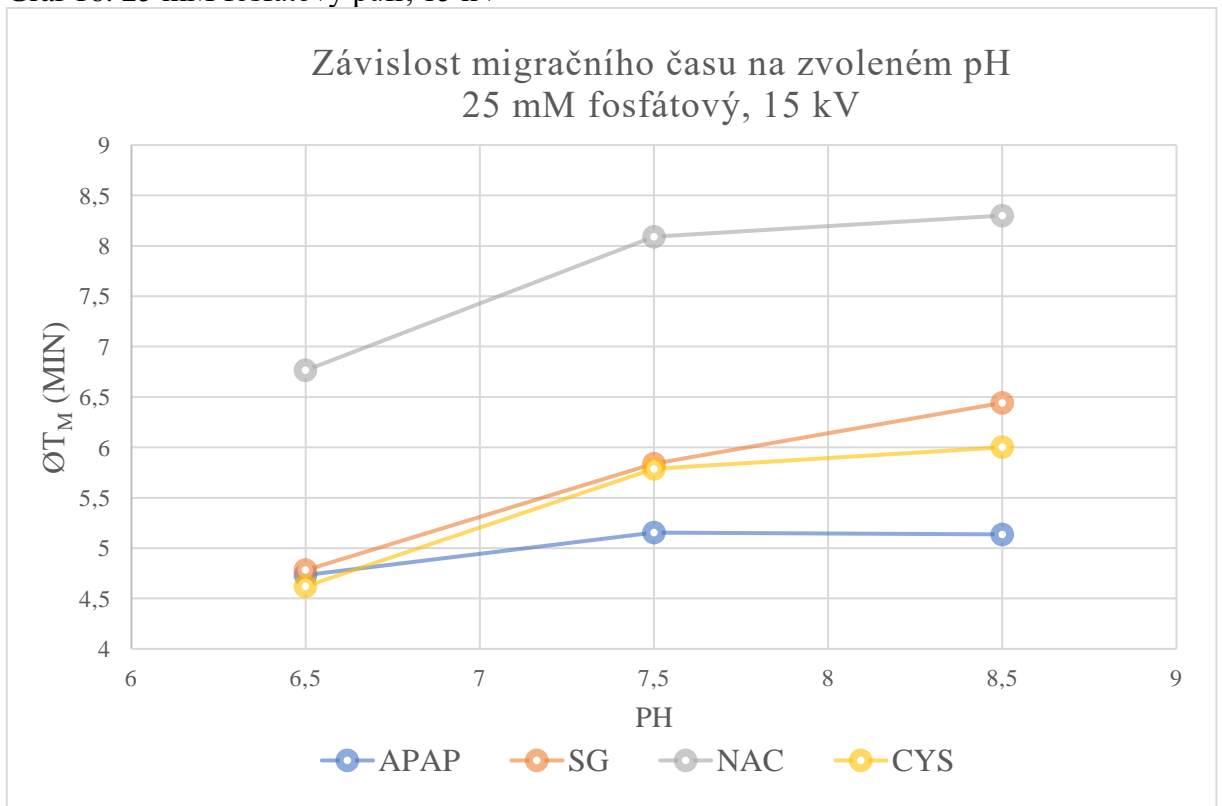
Graf 14: 25 mM fosfátový pufr, 25 kV



Graf 15: 50 mM fosfátový pufr, 15 kV

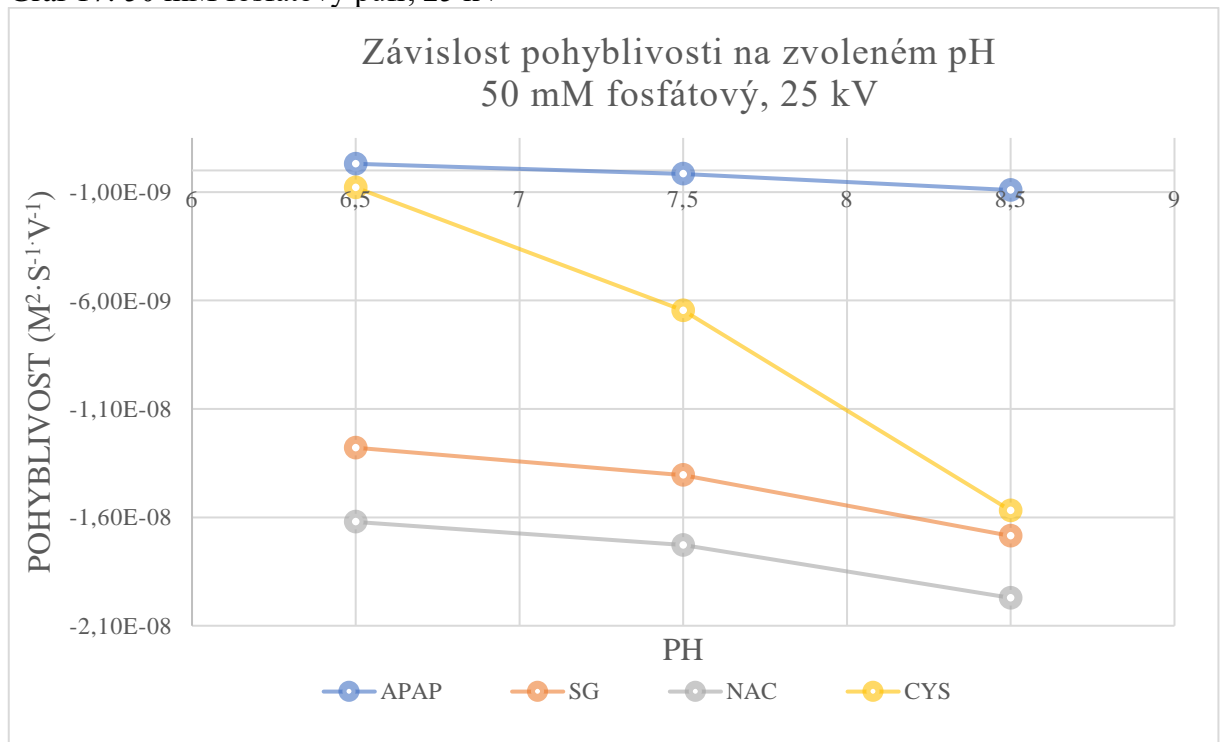


Graf 16: 25 mM fosfátový pufr, 15 kV

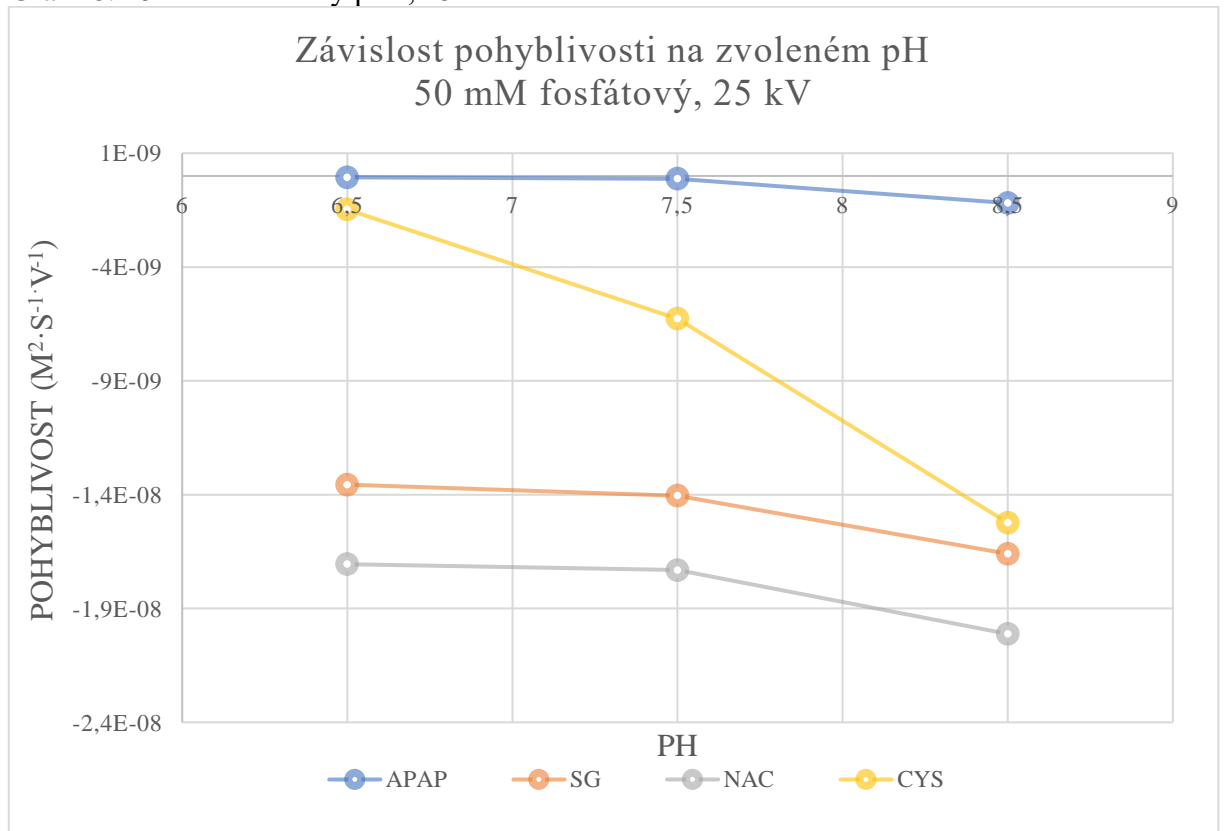


Závislost pohyblivosti na pH:

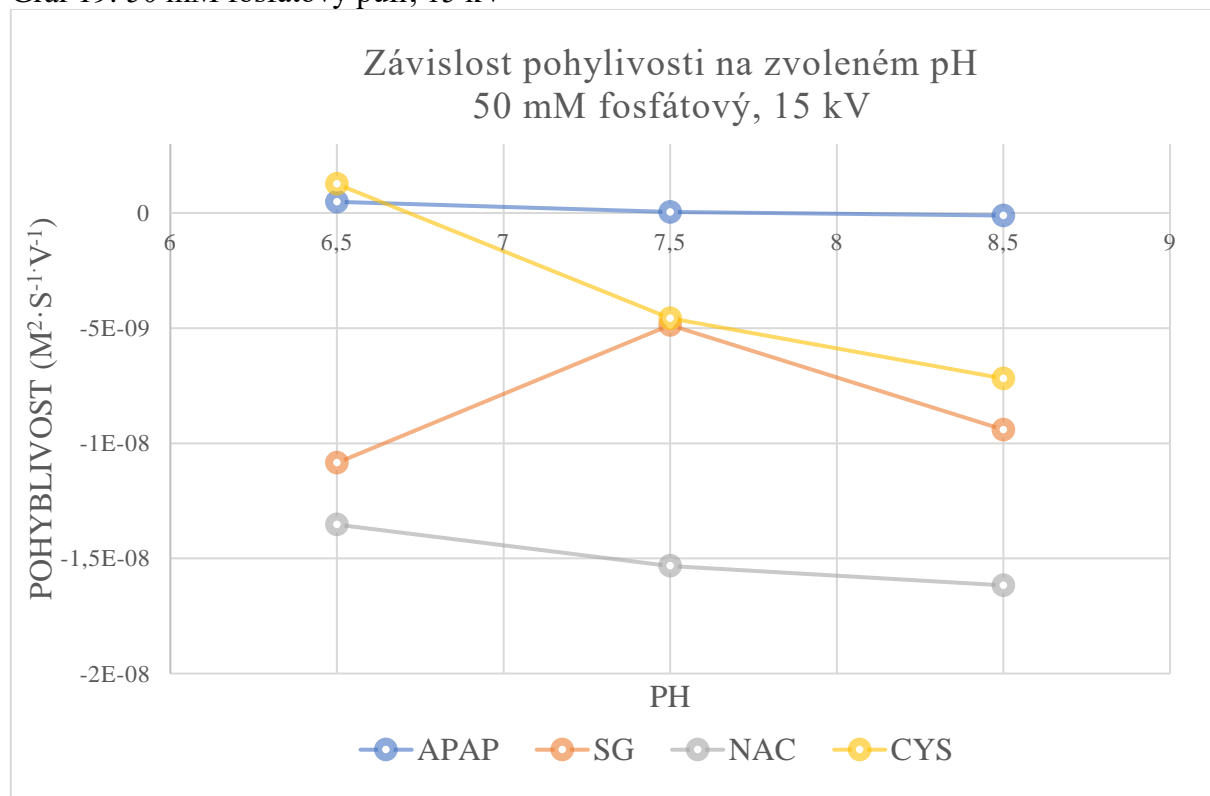
Graf 17: 50 mM fosfátový pufr, 25 kV



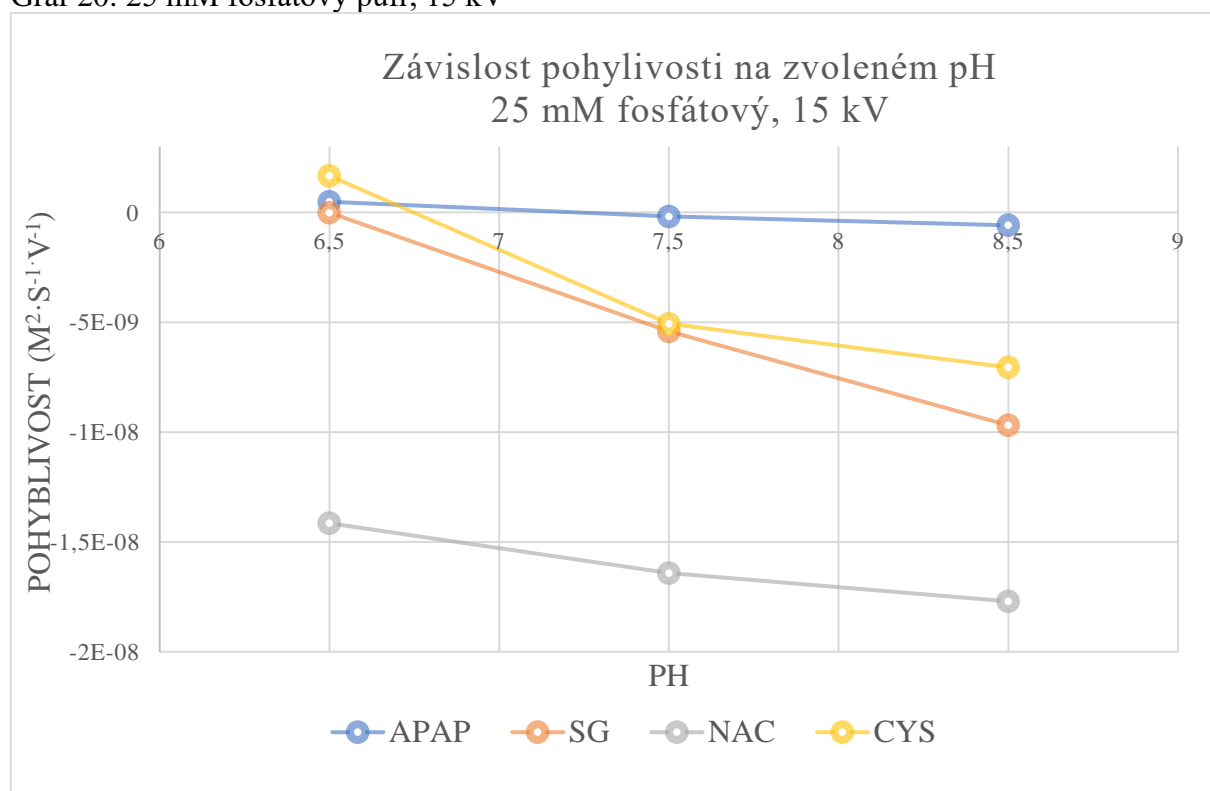
Graf 18: 25 mM fosfátový pufr, 25 kV



Graf 19: 50 mM fosfátový pufr, 15 kV

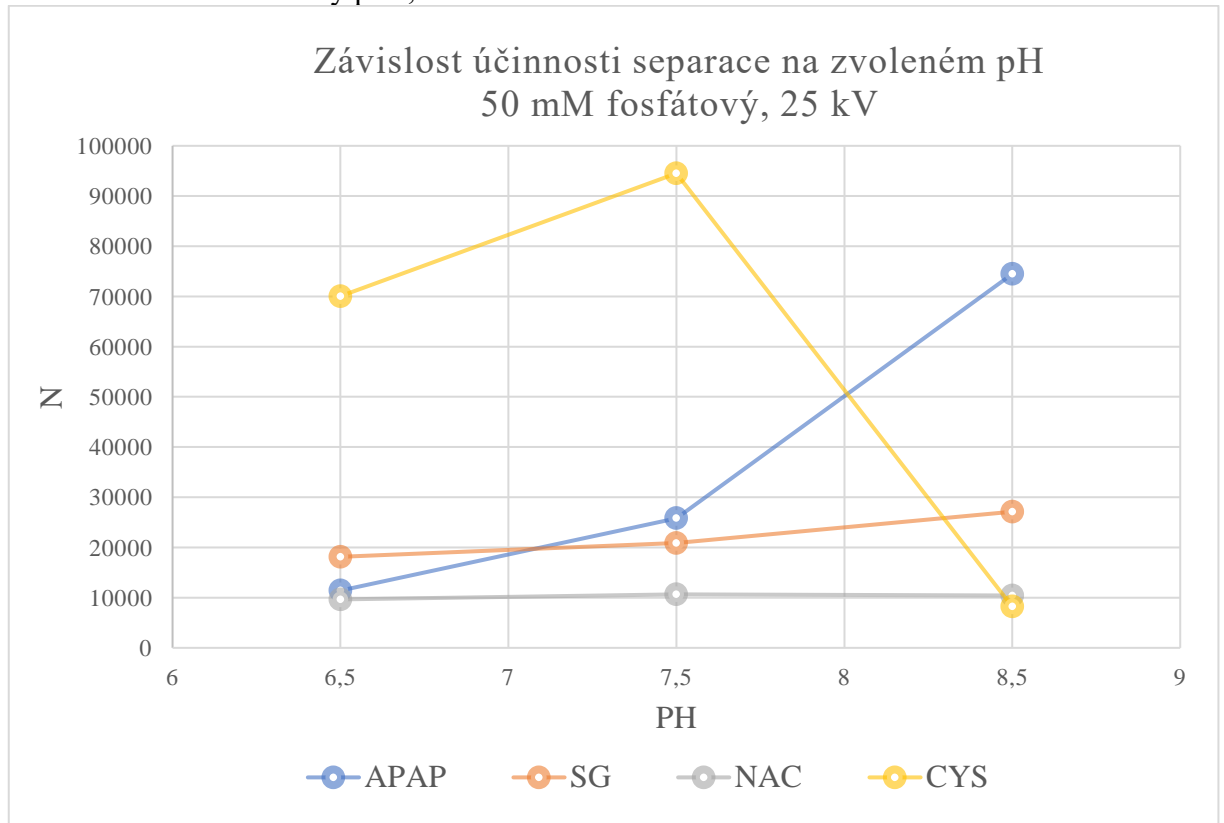


Graf 20: 25 mM fosfátový pufr, 15 kV

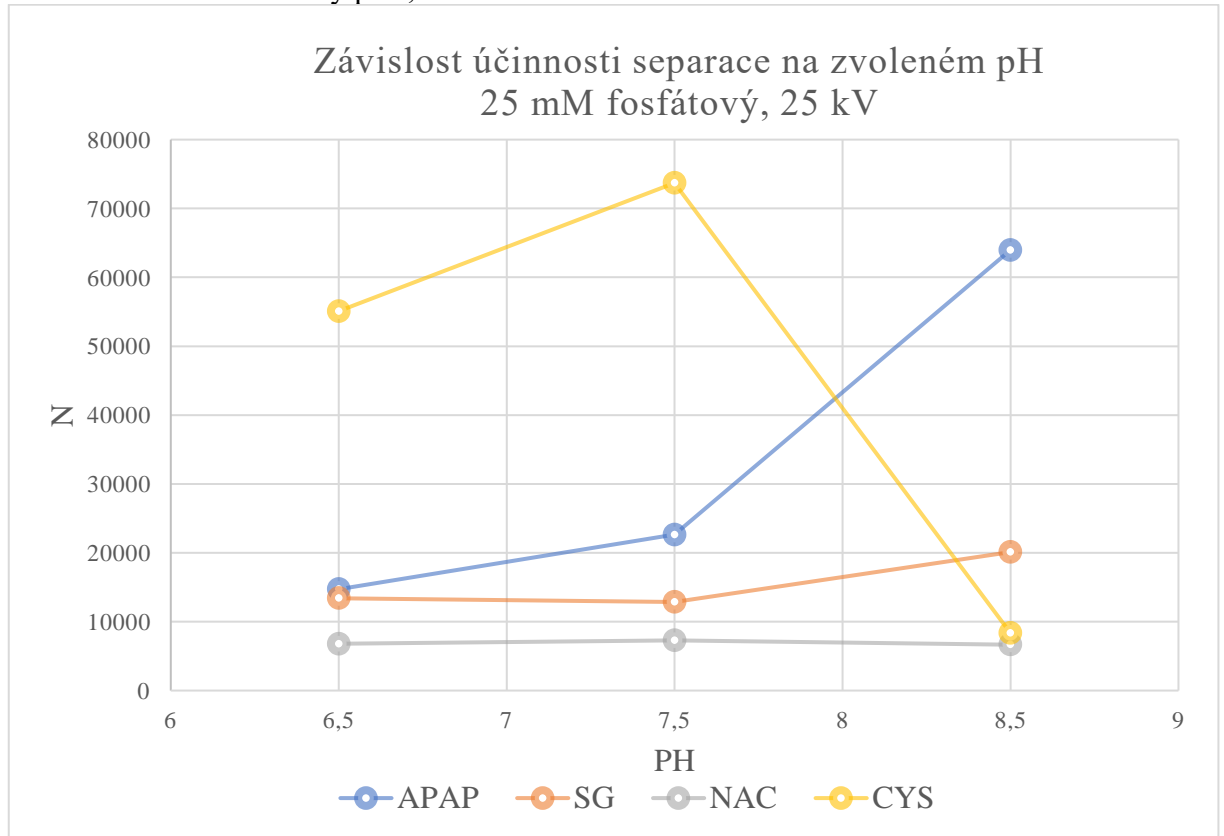


Závislost účinnosti na pH:

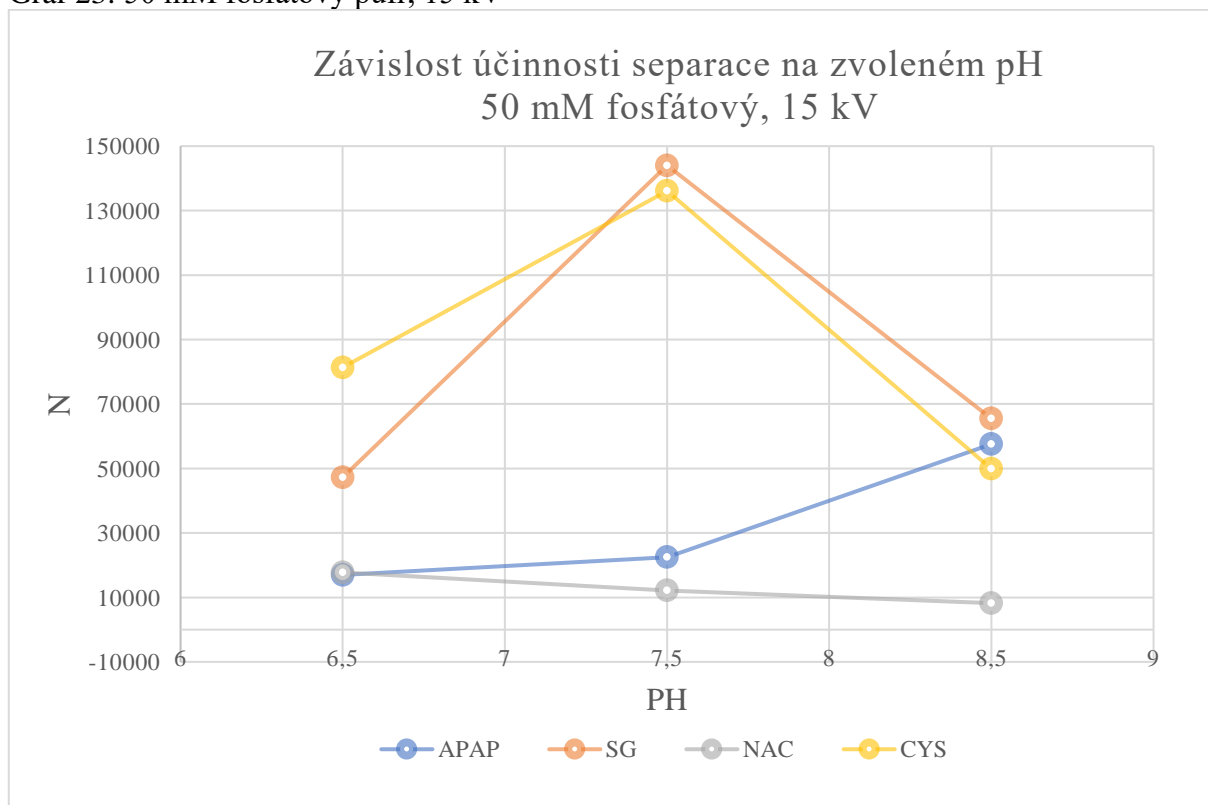
Graf 21: 50 mM fosfátový pufr, 25 kV



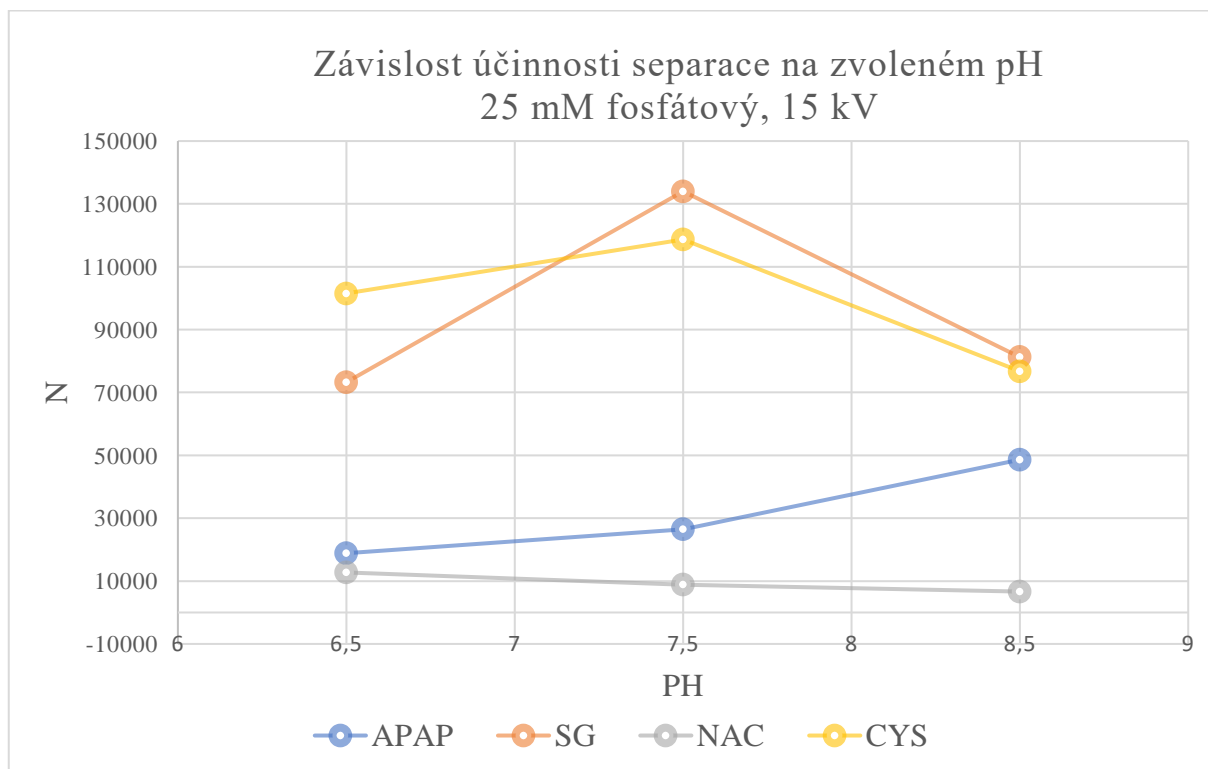
Graf 22: 25 mM fosfátový pufr, 25 kV



Graf 23: 50 mM fosfátový pufr, 15 kV



Graf 24: 25 mM fosfátový pufr, 15 kV



## **PŘÍLOHA 3**

**Závislost na teplotě**

Tabulka 25: 50 mM borátový pufr; pH 9,5

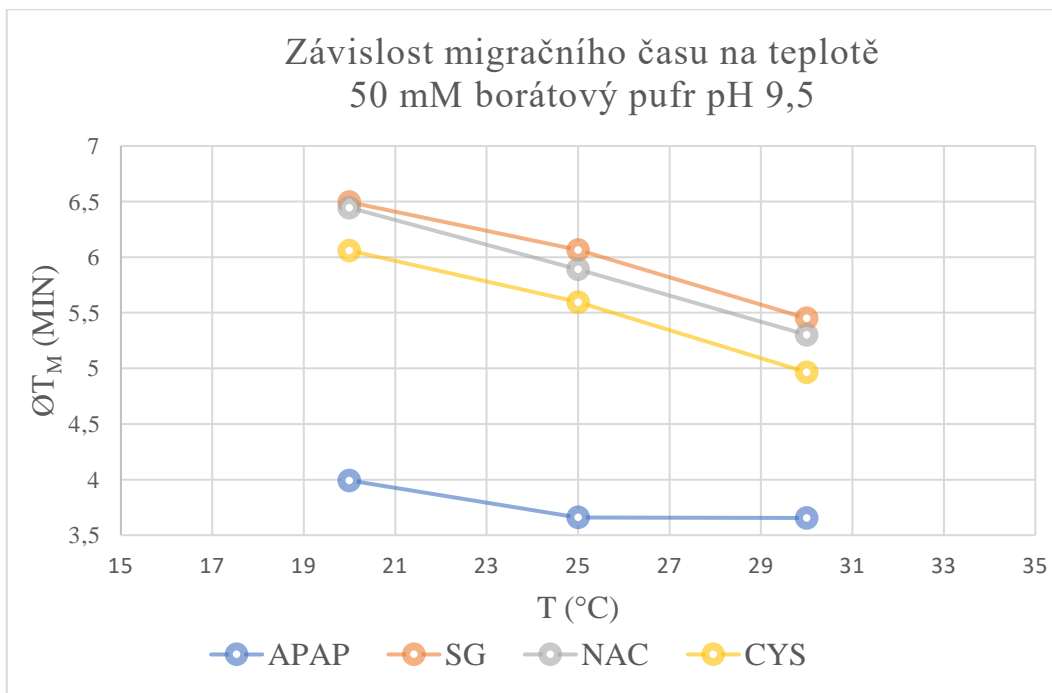
T(°C)	Látka	t <sub>m</sub> (min)	t <sub>m</sub> (min)	øt <sub>m</sub> (min)	μ(m <sup>2</sup> ·s <sup>-1</sup> ·V <sup>-1</sup> )	w0.5 (min)	w0.5 (min)	øw <sub>0,5</sub> (min)	N	H (μm)
25	TM	3,131	3,113	3,122	4,43092E-08	0,0641	0,0651	0,0646	12951	32,0
	APAP	3,660	3,659	3,660	-6,508E-09	0,0299	0,0291	0,0295	85330	4,9
	SG	6,075	6,056	6,066	-2,1503E-08	0,0350	0,0339	0,0346	171892	2,4
	NAC	5,894	5,887	5,891	-2,0825E-08	0,0399	0,0429	0,0414	112255	3,7
	CYS	5,612	5,580	5,596	-1,9589E-08	0,0364	0,0357	0,0361	133612	3,1
20	TM	3,381	3,404	3,393	4,07762E-08	0,0679	0,0679	0,0679	13842	30,0
	APAP	3,993	3,992	3,993	-6,1279E-09	0,0338	0,0339	0,0339	77139	5,4
	SG	6,509	6,481	6,495	-1,9478E-08	0,0436	0,0447	0,0442	120005	3,5
	NAC	6,443	6,448	6,446	-1,9314E-08	0,0471	0,0476	0,0474	102748	4,0
	CYS	6,080	6,039	6,060	-1,7947E-08	0,0407	0,0427	0,0417	117085	3,5
30	TM	2,897	2,878	2,888	4,79076E-08	0,0906	0,0923	0,0915	5528	75,1
	APAP	3,655	3,655	3,655	-1,006E-08	0,0169	0,0159	0,0164	275416	1,5
	SG	5,458	5,442	5,450	-2,2525E-08	0,0368	0,0375	0,0372	119337	3,5
	NAC	5,302	5,302	5,302	-2,1817E-08	0,0438	0,0430	0,0434	82756	5,0
	CYS	4,98	4,951	4,9655	-2,0049E-08	0,0343	0,0327	0,0335	121825	3,4

Tabulka 26: 25 mM borátový pufr; pH 9,5

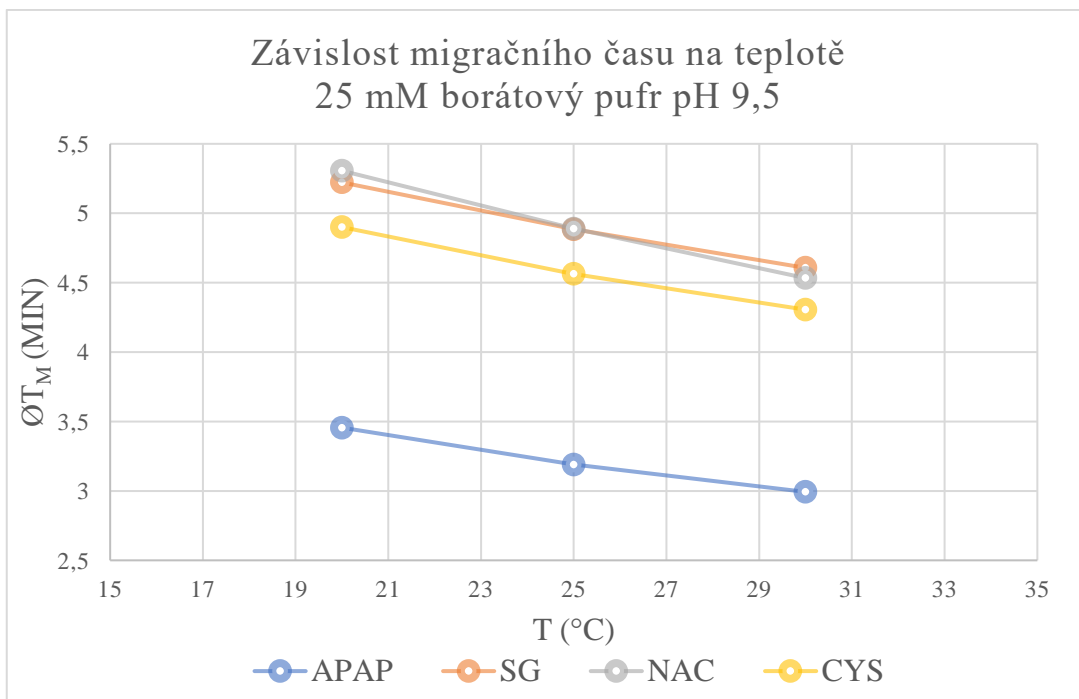
T(°C)	Látka	t <sub>m</sub> (min)	t <sub>m</sub> (min)	øt <sub>m</sub> (min)	μ(m <sup>2</sup> ·s <sup>-1</sup> ·V <sup>-1</sup> )	w0.5 (min)	w0.5 (min)	øw <sub>0,5</sub> (min)	N	H (μm)
30	TM	2,644	2,654	2,649	5,2221E-08	0,0842	0,0842	0,0842	5488	75,6
	APAP	2,991	2,995	2,993	-6,002E-09	0,039	0,0393	0,03915	32408	12,8
	SG	4,616	4,597	4,6065	-2,2191E-08	0,0338	0,0341	0,03395	102086	4,1
	NAC	4,523	4,543	4,533	-2,1704E-08	0,0374	0,0452	0,0413	66799	6,2
	CYS	4,319	4,292	4,3055	-2,0092E-08	0,0335	0,0317	0,0326	96719	4,3
25	TM	2,844	2,862	2,853	4,8487E-08	0,0852	0,0863	0,08575	6138	67,6
	APAP	3,184	3,196	3,19	-5,1223E-09	0,0217	0,0228	0,02225	113978	3,6
	SG	4,883	4,886	4,8845	-2,0166E-08	0,0427	0,0437	0,0432	70888	5,9
	NAC	4,891	4,887	4,889	-2,0192E-08	0,0436	0,0501	0,04685	60384	6,9
	CYS	4,603	4,522	4,5625	-1,8167E-08	0,0406	0,0385	0,03955	73793	5,6
20	TM	3,084	3,105	3,0945	4,4703E-08	0,0892	0,0876	0,0884	6795	61,1
	APAP	3,461	3,45	3,4555	-4,6702E-09	0,0632	0,064	0,0636	16369	25,4
	SG	5,211	5,233	5,222	-1,8212E-08	0,0538	0,056	0,0549	50168	8,3
	NAC	5,304	5,308	5,306	-1,8632E-08	0,048	0,0532	0,0506	60973	6,8
	CYS	4,929	4,871	4,9	-1,6472E-08	0,0511	0,0508	0,05095	51287	8,1

Závislost migračního času na teplotě:

Graf 25: 50 mM borátový pufr, pH 9,5

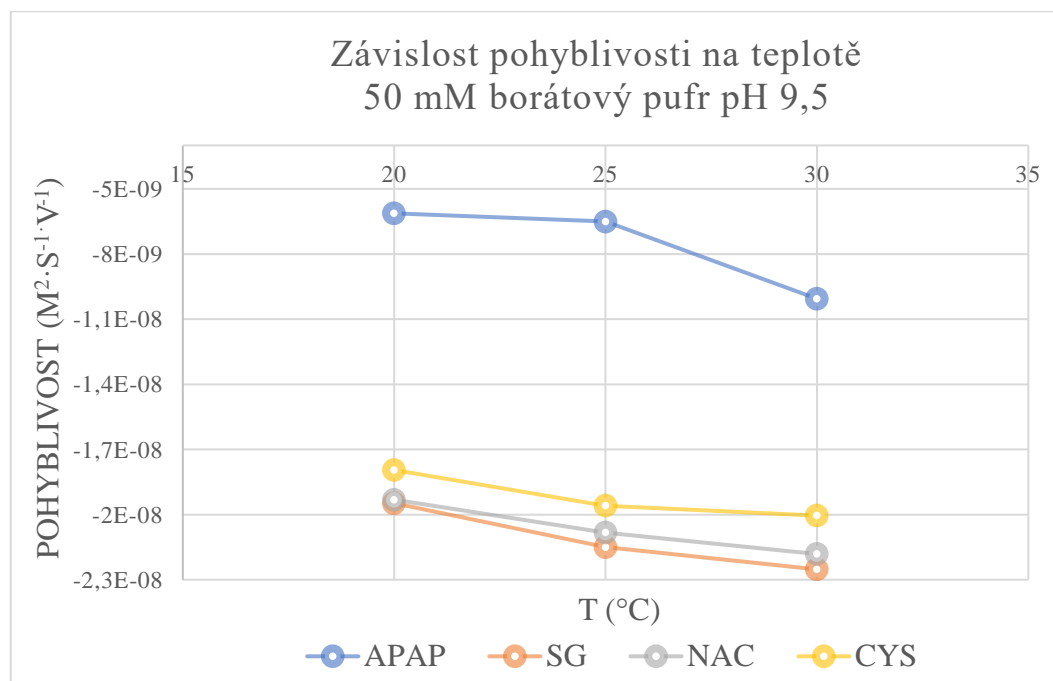


Graf 26: 25 mM borátový pufr, pH 9,5

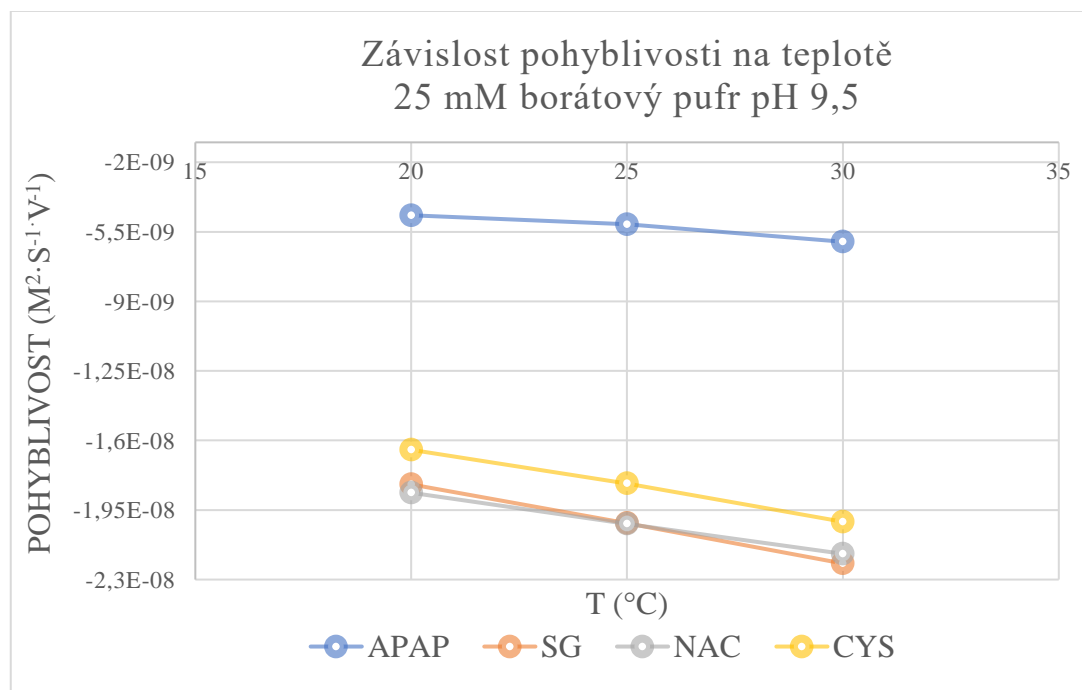


Závislost pohyblivosti na teplotě:

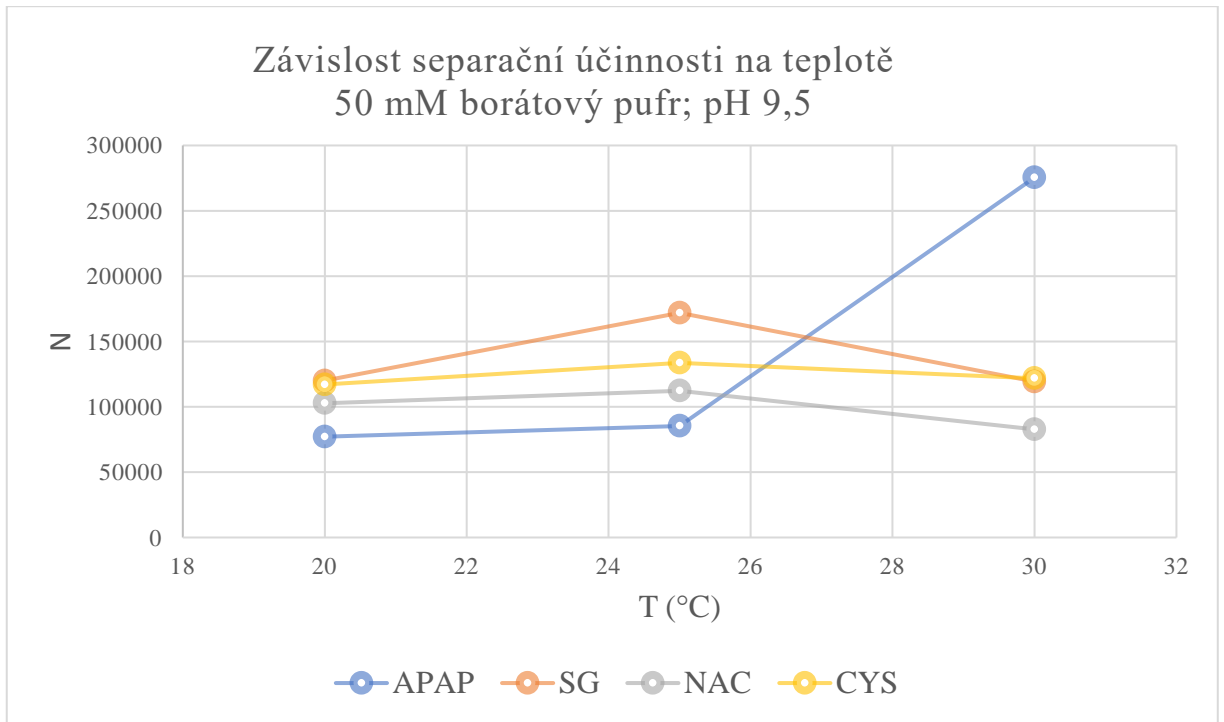
Graf 27: 50 mM borátový pufr, pH 9,5



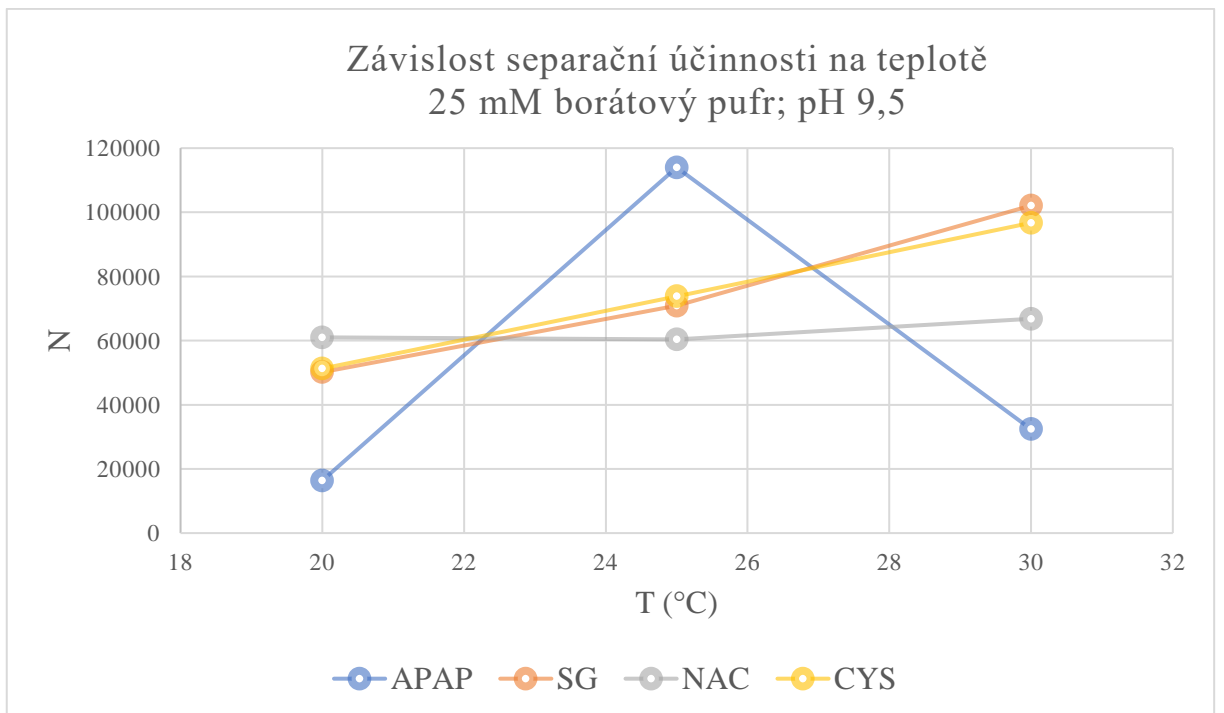
Graf 28: 25 mM borátový pufr, pH 9,5



Graf 29: Závislost účinnosti na teplotě – 50 mM



Graf 30: Závislost účinnosti na teplotě – 25 mM



## **PŘÍLOHA 4:**

### **Kvantitativní parametry analýzy**

50 mM borátový pufr; pH 9,5

Tabulka 27: Elektroforetické údaje APAP

C (mg/l)	Látka	TM (min)			A [min.mAU]			H [mAU]			Ø TM (min)	ø A	ø H
	tm	4,233	4,244	4,252	33,0	32,1	32,1	4,70	4,60	4,60	4,243	32,40	4,63
100	APAP 1	5,196	5,207	5,216	59,5	54,8	52,7	5,80	5,60	5,50	5,206	55,67	5,63
70	APAP 2	5,223	5,230	5,244	41,8	37,7	37,1	4,60	4,40	4,40	5,232	38,87	4,47
40	APAP 3	5,304	5,323	5,359	25,2	25,7	25,8	3,20	3,10	3,10	5,329	25,57	3,13
10	APAP 4	5,538	5,534	5,737	9,7	8,8	7,8	1,40	1,30	1,30	5,603	8,77	1,33
5	APAP 5	5,906	6,164	6,269	5,2	5,1	4,8	0,98	0,86	0,77	6,113	5,03	0,87
2	APAP 6	4,855	5,029	5,198	3,2	3,3	3,1	0,41	0,38	0,38	5,027	3,20	0,39
1	APAP 7	5,131	5,119	5,229	3,0	2,8	2,9	0,37	0,36	0,38	5,160	2,90	0,37

Tabulka 28: Elektroforetické údaje APAP-NAC

C (mg/l)	Látka	TM (min)			A [min.mAU]			H [mAU]			Ø TM (min)	ø A	ø H
	TM	4,450	4,447	4,453	35,2	35,4	35,9	4,60	4,70	4,70	4,450	35,50	4,67
100	NAC 1	9,659	9,719	9,767	64,9	58,8	56,5	15,80	14,30	13,70	9,715	60,07	14,60
70	NAC 2	9,759	9,734	9,718	43,6	39,1	37,5	10,70	9,50	9,20	9,737	40,07	9,80
50	NAC 3	9,940	9,450	9,454	28,6	26,9	25,9	6,70	6,80	6,50	9,615	27,13	6,67
40	NAC 4	9,693	9,774	9,905	26,7	25,3	24,5	6,60	6,10	5,90	9,791	25,50	6,20
20	NAC 5	9,480	9,403	9,410	11,4	10,9	10,4	2,90	2,80	2,70	9,442	10,90	2,80
10	NAC 6	9,923	9,908	10,021	7,6	6,8	6,3	1,80	1,60	1,50	9,951	6,90	1,63

Tabulka 29: Elektroforetické údaje APAP-CYS

C (mg/l)	Látka	TM (min)			A [min.mAU]			H [mAU]			Ø TM (min)	Ø A	Ø H
	TM	4,614	4,629	4,701	32,0	33,1	33,4	4,40	4,40	4,40	4,648	32,83	4,40
73,8	CYS 1	6,508	6,533	0,000	41,4	39,7	0,0	3,20	3,20	0,00	6,521	40,55	3,20
42,2	CYS 2	7,332	7,329	7,318	22,7	21,6	22,1	2,60	2,60	2,60	7,326	22,13	2,60
10,5	CYS 3	7,337	7,341	7,335	5,3	4,5	4,4	0,92	0,81	0,79	7,338	4,73	0,84
5,3	CYS 4	7,356	7,351	7,358	1,7	1,4	1,6	0,33	0,29	0,31	7,355	1,57	0,31
2,1	CYS 5	8,836	8,821	8,857	0,9	1,0	0,8	0,21	0,20	0,17	8,838	0,89	0,19

Kalibrační křivky: 25 mM borátový pufr, pH 9,5

Tabulka 30: Elektroforetické údaje APAP

C (mg/l)	Látka	TM (min)			A [min.mAU]			H [mAU]			Ø TM (min)	Ø A	Ø H
	TM	4,367	4,048	3,615	9,9	9,1	16,9	2,00	2,00	3,30	4,010	11,97	2,43
70	APAP 1	4,521	0	4,382	26,9	0	29,9	7,20	0	7,30	4,452	28,40	7,25
40	APAP 2	0	4,160	4,413	0	20,4	17,3	0	5,80	4,40	4,287	18,85	5,10
10	APAP 3	0	4,676	4,566	0	5,8	5,2	0	2,00	1,60	4,621	5,50	1,80
5	APAP 4	4,360	4,486	4,151	3,5	3,6	3,8	1,40	1,20	1,50	4,332	3,63	1,37
2	APAP 5	4,158	4,574	4,42	1,6	1,5	1,5	0,57	0,54	0,37	4,384	1,53	0,49
1	APAP 6	3,919	4,196	0	0,79	0,85	0	0,30	0,28	0	4,058	0,82	0,29

Tabulka 31: Elektroforetické údaje APAP-NAC

C (mg/l)	Látka	TM (min)			A [min.mAU]			H [mAU]			Ø TM (min)	Ø A	Ø H
	TM	3,031	3,284	3,184	19,5	17,8	18,5	4,00	3,60	3,70	3,166	18,60	3,77
100	NAC 1	5,888	6,496	5,86	41,1	38,2	36,9	12,90	9,10	11,60	6,081	38,73	11,20
70	NAC 2	6,701	6,200	5,691	25,5	22,8	23,5	5,60	6,20	7,70	6,197	23,93	6,50
50	NAC 3	5,646	5,612	5,836	18	17,5	17	5,90	5,70	5,00	5,698	17,50	5,53
40	NAC 4	5,504	5,524	5,552	16	15,8	14,8	5,60	5,40	5,00	5,527	15,53	5,33
20	NAC 5	5,869	5,850	6,555	7,2	6,7	6,7	2,10	1,90	1,40	6,091	6,87	1,80
10	NAC 6	5,746	5,879	5,827	2,8	2,9	2,6	0,84	0,79	0,70	5,817	2,77	0,78

Tabulka 32: Elektroforetické údaje APAP-CYS

C (mg/l)	Látka	TM (min)			A [min.mAU]			H [mAU]			Ø TM (min)	Ø A	Ø H
	tm	3,203	2,941	2,840	17,8	20,1	20,5	3,60	4,20	4,30	2,995	19,47	4,033333
105,4	cys1	4,637	4,405	4,391	34,5	33,6	33,5	5,30	5,80	5,90	4,478	33,87	5,666667
42,2	cys3	5,42	5,513	5,696	11,9	9,8	8,9	2,40	2,00	1,60	5,543	10,20	2
10,5	cys4	5,623	5,116	5,519	2,2	2,3	2,1	0,37	0,48	0,33	5,419	2,20	0,393333
5,3	cys5	5,796	0	0	0,83	0	0	0,15	0	0	5,796	0,83	0,15

Tabulka 33: Parametry regrese

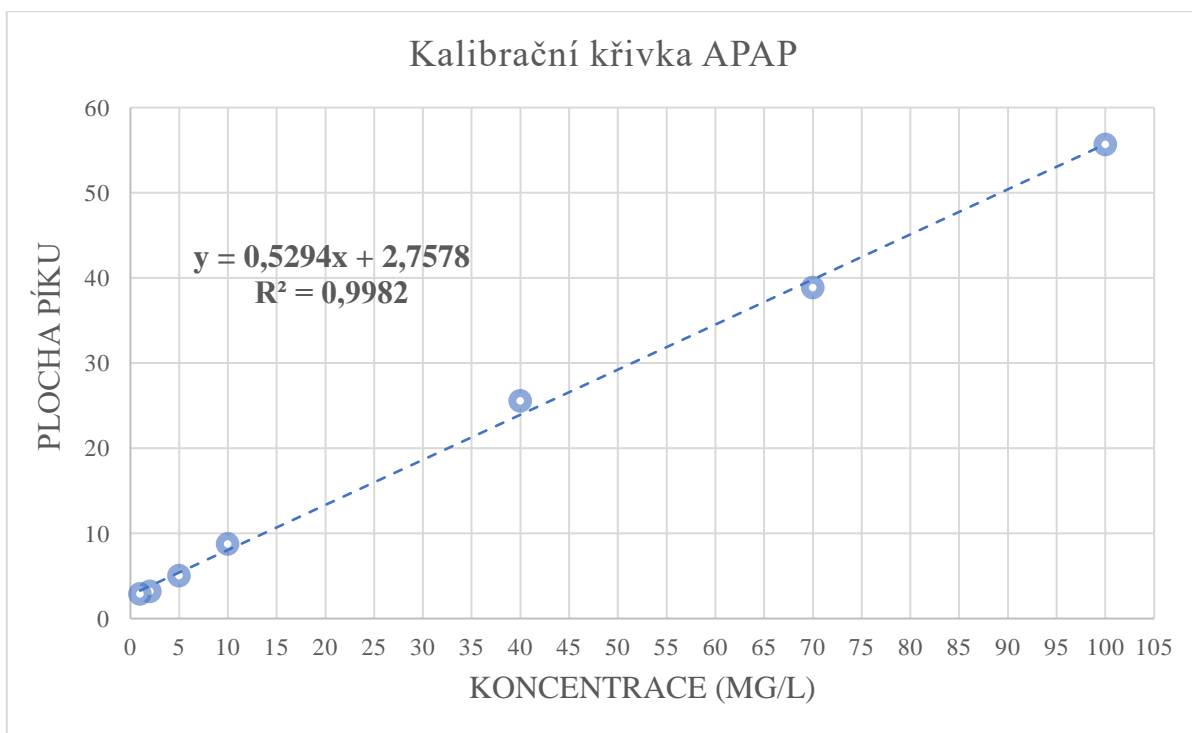
Analyt	50 mM				25 mM			
	směrnice	úsek	R <sup>2</sup>	šum	směrnice	úsek	R2	šum
APAP	0,5294	2,7578	0,9982	0,01812	0,4016	1,2218	0,993	0,00823
NAC	0,5892	-0,0517	0,9929	0,01907	0,3864	-1,1216	0,991	0,007419
CYS	0,559	-0,996	0,9992	0,024231	0,3311	-1,751	0,9921	0,007615

Tabulka 34: Výpočty LOQ a LOD

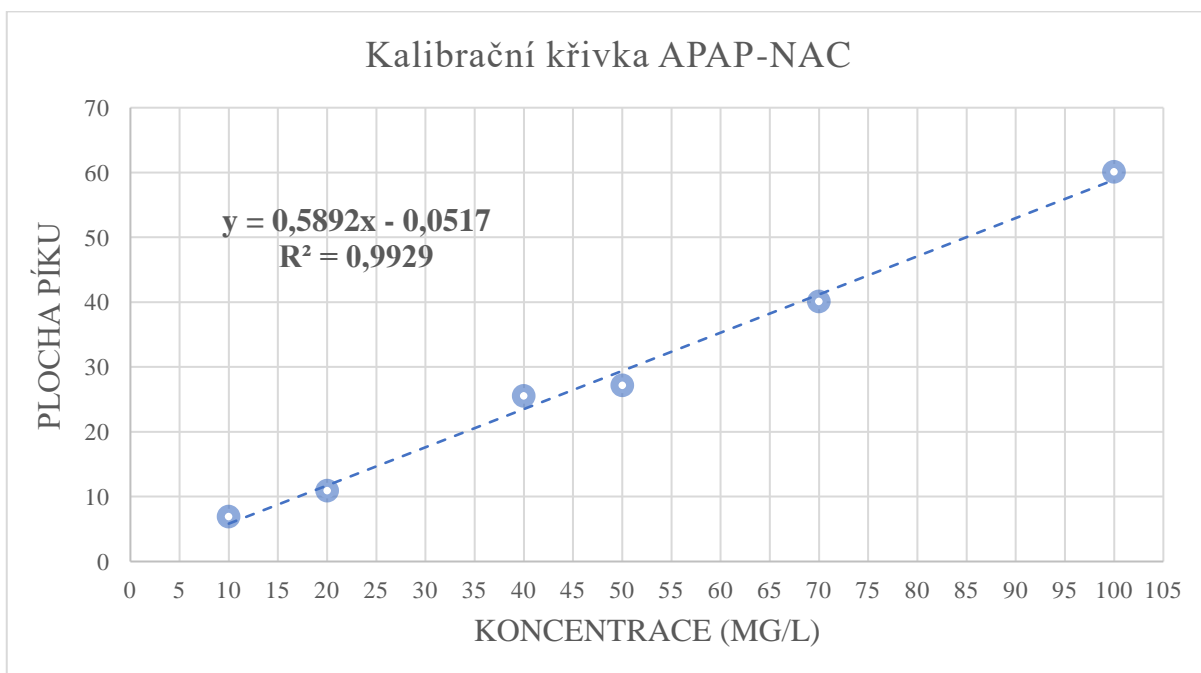
Analyt	50 mM		25 mM	
	LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]	LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]
APAP	0,14	0,48	0,09	0,29
NAC	0,32	1,06	0,32	1,06
CYS	0,73	2,43	0,81	2,7

Kalibrační grafy 50 mM borátový pufr; pH 9,5

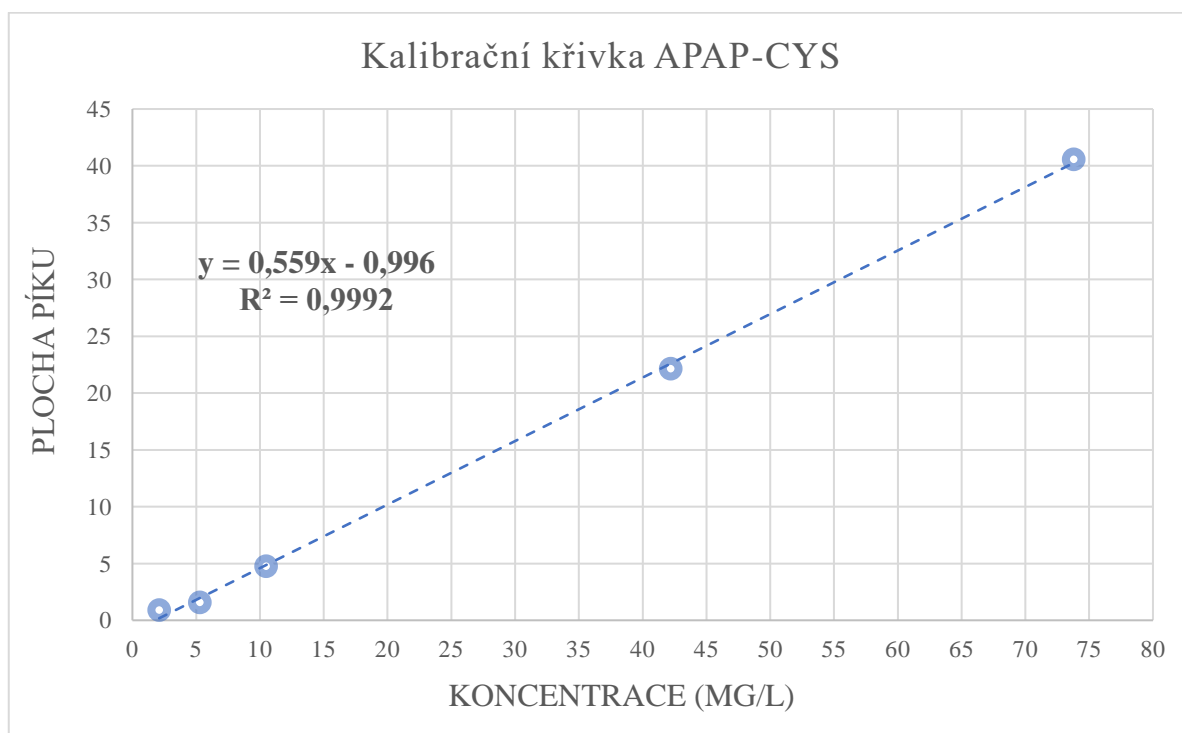
Graf 29: Kalibrační graf APAP



Graf 30: Kalibrační graf APAP-NAC

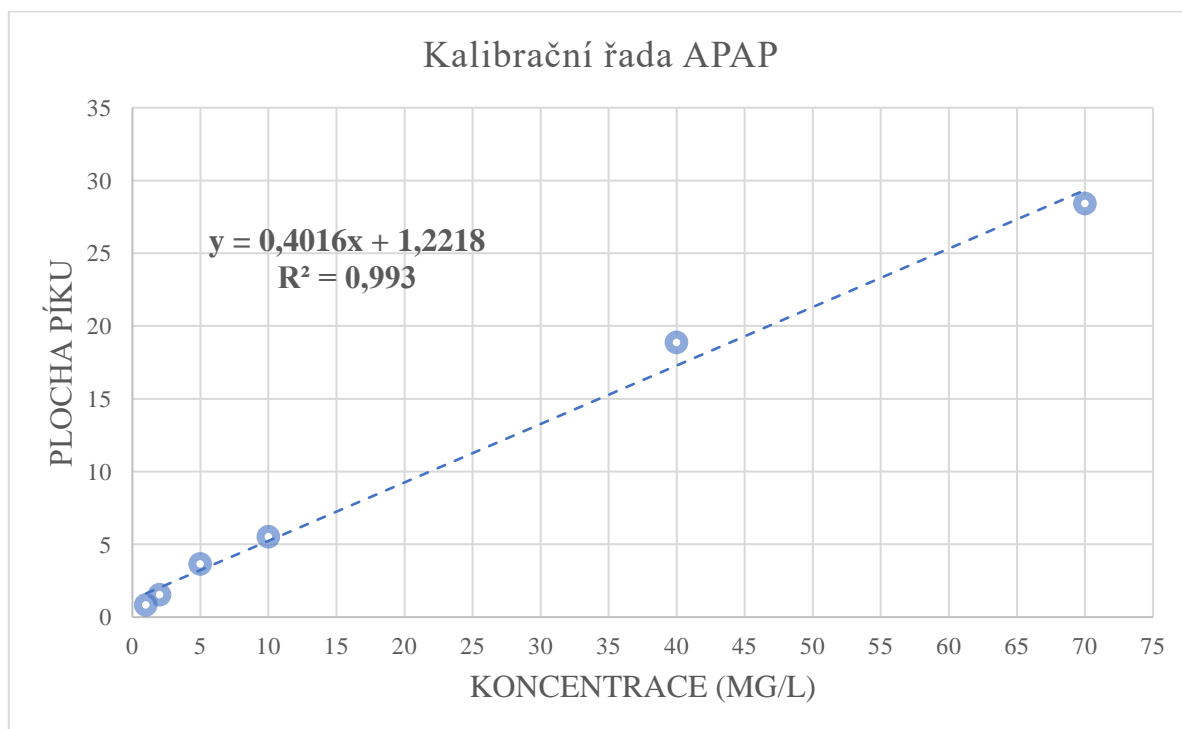


Graf 31: Kalibrační graf APAP-CYS

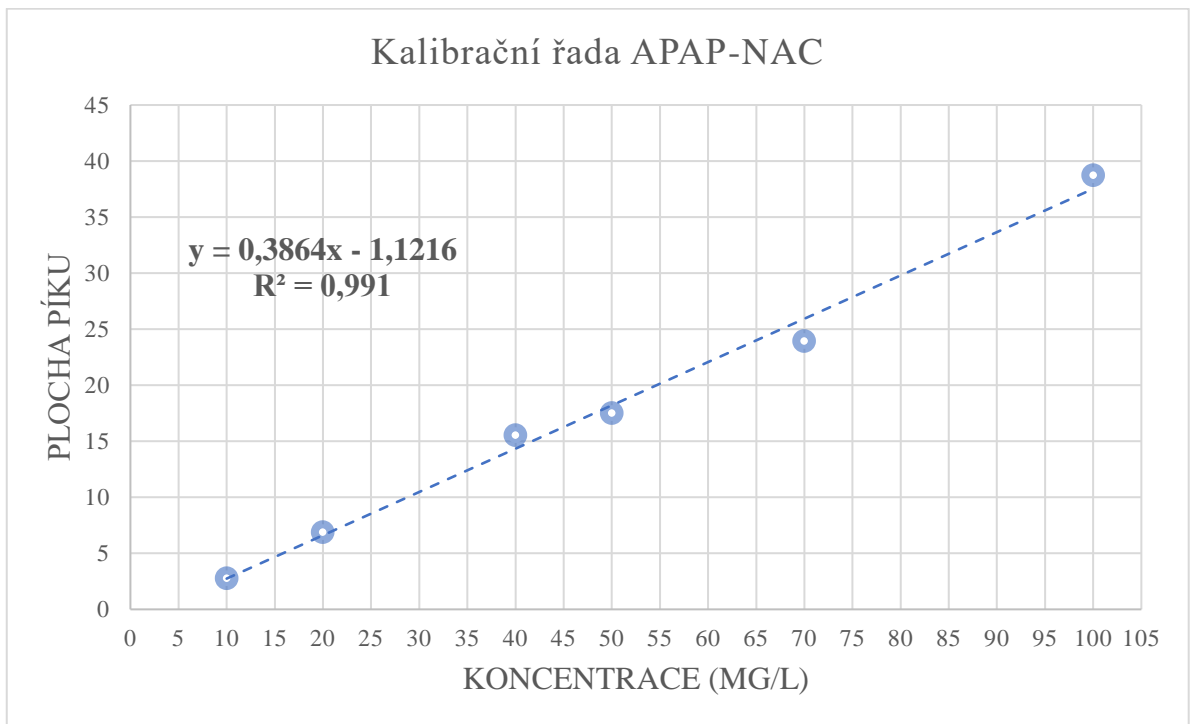


Kalibrační grafy 25 mM borátový pufr; pH 9,5

Graf 32: Kalibrační graf APAP



Graf 33: Kalibrační graf APAP-NAC



Graf 34: Kalibrační graf APAP-CYS

