

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Vývoj metodiky na sledování vybraných léčiv a jejich  
metabolitů v moči pacientů s využitím detekce  
hmotnostní spektrometrií

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2020

Bc. Kateřina Bonczková

UNIVERSITY OF PARDUBICE  
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

Development of a method for monitoring selected drugs  
and their metabolites in the patient's urine using mass  
spectrometry detection

MASTER THESIS

2020

Bc. Kateřina Bonczková

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Bonczková**  
Osobní číslo: **C18480**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Téma práce: **Vývoj metodiky na sledování vybraných léčiv a jejich metabolitů v moči pacientů s využitím detekce hmotnostní spektrometrií**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

#### Teoretická část:

Literární rešerše na téma analýzy biologicky významných látek v moči.

Stopová analýza, hmotnostní spektrometrie.

Farmakokinetika.

Instrumentace kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

#### Experimentální část:

Testování extrakčních metod a úprava vzorku před vlastní analýzou.

Validace analytické metody.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **Ing. Jiří Kwiecien, Ph.D.**  
VÚOS  
Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2019**  
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

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

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

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

V Pardubicích dne

Bc. Kateřina Bonczková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. Mgr. Romanu Kand'árovi, Ph.D. a Ing. Jiřímu Kwiecienovi, Ph.D. za jejich odborné rady, cenné připomínky, pomoc při měření v laboratoři a čas, který mi věnovali v průběhu celé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat celé laboratoři hmotnostní spektrometrie Výzkumného ústavu organických syntéz za vstřícnost při vykonávání experimentální části diplomové práce. Děkuji také své rodině a přátelům za veškerou podporu během studia.

## **ANOTACE**

Tématem této práce byl vývoj metodiky na sledování vybraných léčiv a jejich metabolitů v moči pacientů s využitím detekce hmotnostní spektrometrií.

Teoretická část je věnována vysokoúčinné kapalinové chromatografii jako takové, hmotnostní spektrometrii jako možnosti detekce a zabývá se také přípravou vzorků pro analýzu kapalinovou chromatografií. Dále jsou zde popsána antihypertenziva a jejich rozdělení. Zvláštní pozornost je mimo jiné věnována i jednotlivým léčivům, která byla stanovována.

V experimentální části se práce zabývá přípravou vzorků před vlastní analýzou a nastavením konkrétních podmínek při analýze vzorků.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, antihypertenziva, extrakce

## **ANNOTATION**

The aim of this work was the development of a method for monitoring selected drugs and their metabolites in the patient's urine using mass spectrometry detection.

The theoretical part describes high performance liquid chromatography, mass spectrometry as a means of detection and also deals with the preparation of samples for analysis by liquid chromatography. Furthermore, antihypertensive drugs and their distributions are described. Particular attention is paid, besides, to the individual drugs that have been determined.

In the experimental part, the work deals with sample preparation before analysis, setting of specific conditions in the analysis of patient samples.

## **KEYWORDS**

High performance liquid chromatography, mass spectrometry, antihypertensives, extraction

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACE	Angiotenzin konvertující enzym
ACEI	Inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu
ALT	Alaninaminotransferáza
ANA	Antinukleární protilátky
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
ARBs	Blokátory receptorů pro angiotenzin II
AST	Aspartátaminotransferáza
CI	Chemická ionizace
EI	Elektronová ionizace
ESI	Ionizace elektrosprejem
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
LLE	Extrakce kapalina-kapalina
MALDI	Ionizace laserem za účasti matrice
MF A	Mobilní fáze A
MF B	Mobilní fáze B
MS	Hmotnostní spektrometrie
PPAR $\gamma$	Receptor $\gamma$ aktivovaný proliferátorem peroxisomu
RAAS	Renin-angiotenzin-aldosteron systém
SPE	Extrakce na tuhé fázi
UHPLC	Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie
VSA	Vnitřní sympatomimetická aktivita

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Popis chromatogramu [4]</i> .....	17
<i>Obrázek 2: Schéma přístroje pro vysokoučinnou kapalinovou chromatografii [4]</i> .....	18
<i>Obrázek 3: Obvyklé schéma hmotnostního spektrometru [4]</i> .....	20
<i>Obrázek 4: Uspořádání hmotnostního spektrometru: A) základní, B) tandemové [4]</i> .....	20
<i>Obrázek 5: Hmotnostní spektrometr s kvadrupólem (a – vstup vzorku, b – iontový zdroj, c – kvadrupól, d – detekce, e – vakuum) [4]</i> .....	23
<i>Obrázek 6: 3D iontová past [13]</i> .....	23
<i>Obrázek 7: Příklad hmotnostního spektra amlodipinu</i> .....	26
<i>Obrázek 8: Vzorec acebutololu</i> .....	33
<i>Obrázek 9: Vzorec amlodipinu</i> .....	34
<i>Obrázek 10: Vzorec doxazosinu</i> .....	36
<i>Obrázek 11: Vzorec chlortalidonu</i> .....	37
<i>Obrázek 12: Vzorec hydrochlorthiazidu</i> .....	39
<i>Obrázek 13: Vzorec metoprololu</i> .....	40
<i>Obrázek 14: Vzorec perindoprilu</i> .....	42
<i>Obrázek 15: Vzorec telmisartanu</i> .....	44
<i>Obrázek 16: A) SCAN mód, B) SIM mód, C) MS signál acebutololu</i> .....	54
<i>Obrázek 17: Fragmentace iontu 337,21 Da (acebutolol)</i> .....	55
<i>Obrázek 18: A) SCAN mód, B) SIM mód, C) MS signál amlodipinu</i> .....	56
<i>Obrázek 19: Fragmentace iontu 409,15 Da (amlodipine)</i> .....	57
<i>Obrázek 20: A) SCAN mód, B) SIM mód, C) MS signál doxazosinu</i> .....	58
<i>Obrázek 21: Fragmentace iontu 452,19 Da (doxazosin)</i> .....	59
<i>Obrázek 22: A) SCAN mód, B) SIM mód, C) MS signál hydrochlorthiazidu</i> .....	60
<i>Obrázek 23: Fragmentace iontu 295,96 Da (hydrochlorthiazid)</i> .....	61
<i>Obrázek 24: A) SCAN mód, B) SIM mód, C) MS signál chlortalidonu</i> .....	62
<i>Obrázek 25: Fragmentace iontu 339,02 Da (chlortalidon)</i> .....	63
<i>Obrázek 26: A) SCAN mód, B) SIM mód, C) MS signál metoprololu</i> .....	64
<i>Obrázek 27: Fragmentace iontu 268,19 Da (metoprolol)</i> .....	65
<i>Obrázek 28: A) SCAN mód, B) SIM mód, C) MS signál perindoprilátu</i> .....	66
<i>Obrázek 29: Fragmentace iontu 341,21 Da (perindoprilát)</i> .....	67
<i>Obrázek 30: A) SCAN mód, B) SIM mód, C) MS signál telmisartanu</i> .....	68
<i>Obrázek 31: Fragmentace iontu 515,23 Da (telmisartan)</i> .....	69
<i>Obrázek 32: A) SCAN mód, B) SIM mód, C) MS signál telmisartanglukuronidu</i> .....	70
<i>Obrázek 33: Fragmentace vybraného iontu 691,27 Da (telmisartanglukuronid)</i> .....	71

## SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1: Přehled retenčních časů, hmot látek a jejich fragmentů .....</i>	<i>72</i>
<i>Tabulka 2: Senzitivita a specificita metody pro acebutolol .....</i>	<i>72</i>
<i>Tabulka 3: Senzitivita a specificita metody pro fragmenty acebutololu .....</i>	<i>72</i>
<i>Tabulka 4: Senzitivita a specificita testu pro amlodipin .....</i>	<i>74</i>
<i>Tabulka 5: Senzitivita a specificita metody pro fragmenty amlodipinu .....</i>	<i>74</i>
<i>Tabulka 6: Senzitivita a specificita testu pro doxazosin .....</i>	<i>75</i>
<i>Tabulka 7: Senzitivita a specificita testu pro fragmenty doxazosinu .....</i>	<i>75</i>
<i>Tabulka 8: Senzitivita a specificita testu pro hydrochlorthiazid .....</i>	<i>76</i>
<i>Tabulka 9: Senzitivita a specificita testu pro fragmenty hydrochlorthiazidu .....</i>	<i>76</i>
<i>Tabulka 10: Senzitivita a specificita testu pro chlortalidon .....</i>	<i>78</i>
<i>Tabulka 11: Senzitivita a specificita testu pro fragmenty chlortalidonu .....</i>	<i>78</i>
<i>Tabulka 12: Senzitivita a specificita testu pro metoprolol .....</i>	<i>79</i>
<i>Tabulka 13: Senzitivita a specificita testu pro fragmenty metoprololu .....</i>	<i>79</i>
<i>Tabulka 14: Senzitivita a specificita testu pro perindoprilát .....</i>	<i>80</i>
<i>Tabulka 15: Senzitivita a specificita testu pro fragmenty perindoprilátu .....</i>	<i>80</i>
<i>Tabulka 16: Senzitivita a specificita testu pro telmisartan .....</i>	<i>81</i>
<i>Tabulka 17: Senzitivita a specificita testu pro fragmenty telmisartanu .....</i>	<i>81</i>
<i>Tabulka 18: Senzitivita a specificita testu pro telmisartanglukuronid .....</i>	<i>82</i>
<i>Tabulka 19: Senzitivita a specificita testu pro fragmenty telmisartanglukuronidu .....</i>	<i>82</i>

## SEZNAM GRAFŮ

<i>Graf 1: Graf znázorňující přítomnost/nepřítomnost fragmentů acebutololu v závislosti na ploše píků .....</i>	<i>73</i>
<i>Graf 2: Graf znázorňující přítomnost/nepřítomnost fragmentů amlodipinu v závislosti na ploše píků .....</i>	<i>75</i>
<i>Graf 3: Graf znázorňující přítomnost/nepřítomnost fragmentů doxazosinu v závislosti na ploše píků .....</i>	<i>76</i>
<i>Graf 4: Graf znázorňující přítomnost/nepřítomnost fragmentů hydrochlorthiazidu v závislosti na ploše píků .....</i>	<i>77</i>
<i>Graf 5: Graf znázorňující přítomnost/nepřítomnost fragmentů chlortalidonu v závislosti na ploše píků .....</i>	<i>78</i>
<i>Graf 6: Graf znázorňující přítomnost/nepřítomnost fragmentů metoprololu v závislosti na ploše píků .....</i>	<i>80</i>
<i>Graf 7: Graf znázorňující přítomnost/nepřítomnost fragmentů telmisartanu v závislosti na ploše píků .....</i>	<i>82</i>
<i>Graf 8: Graf znázorňující přítomnost/nepřítomnost fragmentů telmisartanglukuronidu v závislosti na ploše píků .....</i>	<i>83</i>

# OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	9
SEZNAM OBRÁZKŮ .....	10
SEZNAM TABULEK .....	11
SEZNAM GRAFŮ .....	12
OBSAH.....	13
ÚVOD.....	15
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>16</b>
1.1 METODA STANOVENÍ .....	16
1.1.1 Kapalinová chromatografie .....	16
1.1.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	16
1.2 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE .....	19
1.2.1 Instrumentace.....	20
1.3 PŘÍPRAVA VZORKŮ K ANALÝZE.....	26
1.3.1 Odběr moči .....	26
1.3.2 Příprava vzorků před vlastní analýzou .....	27
1.4 ANTIHYPERTENZIVA .....	28
1.4.1 Inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu .....	29
1.4.2 Blokátory receptorů pro angiotenzin II.....	30
1.4.3 $\beta$ -Blokátory .....	30
1.4.4 Diuretika .....	31
1.4.5 Přímá vazodilatancia .....	32
1.5 STANOVOVANÁ LÉČIVA .....	32
1.5.1 Acebutolol.....	32
1.5.2 Amlodipin.....	34
1.5.3 Doxazosin.....	36
1.5.4 Chlortalidon.....	37
1.5.5 Hydrochlorthiazid.....	38
1.5.6 Metoprolol .....	40
1.5.7 Perindopril.....	42
1.5.8 Telmisartan .....	43
<b>2 CÍL.....</b>	<b>46</b>
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>47</b>
3.1 MATERIÁL .....	47
3.1.1 Chemikálie .....	47
3.1.2 Biologické vzorky.....	47
3.1.3 Pomůcky a přístroje .....	47
3.1.4 Pracovní roztoky .....	48
3.2 POSTUP STANOVENÍ VYBRANÝCH LÉČIV A JEJICH METABOLITŮ V MOČI METODOU KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE S HMOTNOSTNÍ DETEKCÍ .....	49
3.2.1 Příprava patientských vzorků.....	49
3.2.2 Chromatografická analýza.....	49
3.2.3 Kalibrace hmotnostního rozsahu .....	51
3.3 SLEDOVANÉ PARAMETRY .....	51
3.3.1 Senzitivita.....	51
3.3.2 Specifická.....	51
3.4 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ .....	51
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>52</b>
4.1 VYHODNOCENÍ KVALITATIVNÍ ANALÝZY SLEDOVANÝCH LÁTEK A JEJICH FRAGMENTŮ .....	71
4.2 METODIKA NA SLEDOVÁNÍ LÉČIV V MOČI .....	84

<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>85</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>86</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>94</b>
<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>I</b>

## ÚVOD

Arteriální hypertenze je řazena mezi nejčastěji se vyskytující onemocnění kardiovaskulárního systému. Zároveň lze říci, že se jedná o nejčastější příčinu mortality a morbidity v České republice. Je to závažná civilizační choroba vedoucí často k ischemické chorobě srdeční, srdečnímu selhání či cévní mozkové příhodě.

Léčba vysokého tlaku je nákladná, ale je důležité, aby ji lidé nepodceňovali. K léčbě hypertenze se užívají antihypertenziva, což jsou léky, bez kterých se většina dnešní populace neobejde.

K podceňování často dochází při dlouhodobém příjmu léčiv v domácím ošetřování, kdy pacient jednoduše zapomene na svou denní dávku léčiv. Z pohledu ošetřujícího lékaře tak může docházet k dojmu, že je léčba neúčinná, zvyšuje dávky a mění medikaci. Tím vlastně dochází k plýtvání léčivy.

Tato práce se zabývá antihypertenzivy, jako jsou acebutolol, telmisartan, hydrochlorthiazid, perindopril či amlodipin. Využita byla technika spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní detekcí, jakožto moderní nástroj pro vysoce selektivní a citlivé analýzy. Výsledná analytická metoda pak může spolu s lékařským vysvětlením fyziologických vlastností poukázat na dodržování léčby pacienty.

Měření bylo prováděno ve Výzkumném ústavu organických syntéz na úseku analytiky v laboratoři hmotnostní spektrometrie.

Navržené podmínky a seznam analytů nejsou rigidní, nýbrž lze vhodnými postupy metodu rozšiřovat, podle potřeby lékařů a v závislosti na měnících se trendech léčby kardiovaskulárních chorob.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 METODA STANOVENÍ

### 1.1.1 Kapalinová chromatografie

V dnešní době jsou užívány tři varianty kapalinové chromatografie. Jedná se o nízkotlakou kolonovou kapalinovou chromatografii, která svým experimentálním uspořádáním odpovídá původnímu Cvětovu návrhu a využívá se nejčastěji při čistění směsí látek. Planární chromatografie se vyznačuje instrumentální jednoduchostí a nenáročností provedení a používá se pro analytické a mikropreparativní účely. V analytické chemii zaujímá však dominantní postavení vysokoúčinná kapalinová chromatografie. [1]

### 1.1.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Jedná se o pokročilou a instrumentálně náročnou techniku kapalinové chromatografie. V současné době je běžně používanou analytickou metodou pro separaci biologicky aktivních látek. Používá se k separaci a analýze sloučenin mechanismem přenosu analytů mezi stacionární a mobilní fází. Vysokých účinností se dosahuje použitím kolon, které jsou naplněny stacionární fází o dobře definované malé velikosti částic. Hlavní příčinou toho, proč menší částice vedou k většímu rozlišení je to, že difúzní dráhy v mobilní a stacionární fází jsou kratší, a to tedy podporuje rychlejší rozdělení látky mezi obě fáze. Metoda se nazývá vysokotlakou kapalinovou chromatografií proto, že průtok mobilní fáze je veden za vysokého tlaku v jednotkách až desítkách MPa. Své uplatnění našla nejen ve farmaceutickém či petrochemickém průmyslu, ale také v potravinářství, toxikologii či zemědělství. [1], [2], [3]

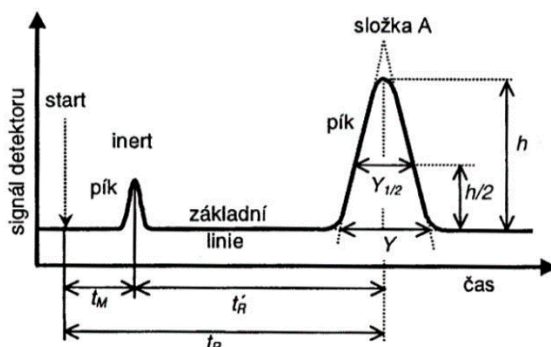
### Základní pojmy používané v HPLC

Za výsledek analýzy při použití kolonového chromatografu se považuje chromatogram, což je záznam odezvy detektoru na čase. Detektory, které se používají v chromatografii, poskytují nejčastěji odezvu úměrnou koncentraci analytu, proto jsou zóny separovaných látek procházející detektorem zaznamenány jako charakteristické koncentrační profily s maximem, tzv. chromatografické píky. Látka, jejíž hladina se stanovuje touto metodou, se nazývá analyt. Vzorek je vnášen mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je fází nepohyblivou a mobilní fáze je pohyblivá, přičemž unáší vzorek kolonou. [1], [4]

### Popis chromatogramu

Při popisu chromatogramu hodnotíme šířku chromatografického píku  $Y$ , což je odečet hodnoty na úrovni základní linie, může být odečtena i v polovině výšky píku, a pak se tedy značí  $Y_{1/2}$ . Dále je hodnocena výška píku  $h$ , tedy vzdálenost mezi maximem píku a nulovou

linií, nebo plocha  $A$ , která je těžko vyhodnotitelná a vymezuje se tečkami jeho vzestupné a sestupné linie a základní, tedy nulové linie. [4], [5]



**Obrázek 1: Popis chromatogramu [4]**

### Retenční charakteristiky

Retenční charakteristiky popisují zadržování eluentu v koloně. Retenční čas  $t_R$ , je základní charakteristika, která představuje určitou dobu, kterou stráví molekula složky v koloně. Jednoduše lze říci, že je to doba od nástřiku vzorku po dosažení vrcholu píku. Tuto dobu můžeme rozdělit na dobu, kterou stráví vzorek v mobilní fázi, což je mrtvý retenční čas  $t_M$  a čas strávený ve stacionární fázi, redukovaný retenční čas  $t'_R$ . Míru retence separovaných látek udává retenční faktor  $k$ . [1], [4], [5]

### Účinnost procesu separace

Úkolem chromatografických metod je dosažení co nejlepší separace složek vzorku, a to v co nejkratším čase. Tedy čím je kolona účinnější, tím dochází k lepší separaci, jelikož účinnost je schopnost separovat složky směsi. V případě rostoucí rychlosti rozmývání zón separovaných látek dochází k poklesu účinnosti chromatografické kolony. Existuje řada teorií, které popisují toto rozmývání zón. [1], [6]

Jednou z těchto teorií je teorie chromatografického patra, která rozděluje kolonu na pomyslná patra, tzv. elementární jednotky. Na každém tomto patře musí dojít k ustanovení rovnováhy. Tedy proběhne zde celý separační krok, jako sorpce vzorku na povrch stacionární fáze a následná desorpce do mobilní fáze. Čím více pater, tím větší má kolona účinnost. [1], [6]

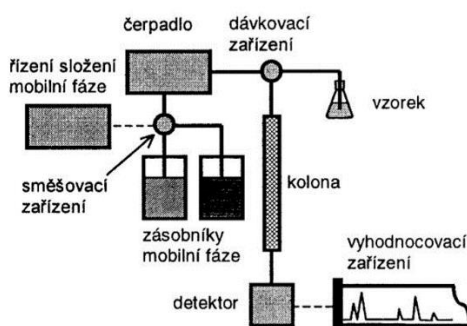
Druhou známou teorií je dynamická teorie van Deemtera, která popisuje procesy, které mohou přispívat k rozmývání zón během separace. Teorie charakterizuje tři nezávislé a adaptivní procesy, které se podílejí na rozmývání zón separovaných látek. Mezi tyto procesy řadíme vířivou (turbulentní) difúzi v mobilní fázi  $H_F$ , molekulární (axiální) difúzi v mobilní fázi  $H_L$  a odpor proti převodu hmoty v mobilní a stacionární fázi  $H_M$ . [1]

## Optimalizace podmínek

Chceme-li co nejefektivněji dosáhnout požadované separace v co nejkratším časovém intervalu, musíme zvolit vhodné pracovní podmínky, tedy optimalizovat pracovní podmínky. Pro optimalizaci HPLC analýzy je důležitá vhodná volba složení mobilní fáze. Pořadí eluujících látek je dáno vzájemným vztahem polarity separovaných látek a polarity mobilní a stacionární fáze. Tedy pokud použijeme polární stacionární fázi, pak jsou v koloně nejméně zadržovány nepolární složky vzorku. [1]

## Instrumentace

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie vyžaduje instrumentálně náročnou techniku. Nezbytnými součástmi této techniky jsou zásobník mobilní fáze, směšovací zařízení, vysokotlaké čerpadlo, dávkovací zařízení, chromatografická kolona, detektor a vyhodnocovací zařízení. [4]



**Obrázek 2: Schéma přístroje pro vysokoučinnou kapalinovou chromatografii [4]**

Vysokotlaké čerpadlo zajišťuje tok mobilní fáze. Provozní tlak čerpadla je několik desítek tisíc kPa a závisí na rozměrech kolony, velikosti částic, průtoku a složení mobilní fáze. Mezi dva základní typy čerpadel používaných v HPLC se řadí lineární čerpadlo, které se skládá z pístu pohybujícího se v pracovním válci o objemu až několik set ml, přičemž mobilní fáze je před analýzou naplněna do válce a posuvem pístu je vytlačena do dávkovacího ventilu a separační kolony. Reciproční uspořádání čerpadla je druhým typem čerpadla, zde píst ve válci o objemu desítek až stovek  $\mu$ l periodicky nasává a poté vytlačuje mobilní fázi. Materiál čerpadla nesmí být narušen mobilní fází a také do ní nesmí uvolňovat žádné látky. [1], [4], [7] Směšovací zařízení se používá při gradientové eluci. Toto zařízení je možné naprogramovat tak, aby se s využitím zásobníků různých kapalin dala připravit směs stálého složení anebo směs, jejíž složení se v průběhu separace bude měnit. [4]

Dávkování vzorku tvoří v HPLC problém, jelikož vzorek o přesně definovaném objemu musí být nadávkován do proudu mobilní fáze, která je protlačována kolonou pod vysokým tlakem. Pokud je dávkování nedokonalé, pak dochází ke snížení účinnosti metody, protože dojde k rozmývání píků v důsledku mimokolonových příspěvků dávkovacího zařízení. Dříve se využívalo k dávkování vzorku injekčních stříkaček, dnes se používá nejčastěji šesticestný ventil s dávkovací smyčkou. [1], [4]

Separční kolony, které se používají v HPLC musí být vyrobeny z materiálu, který je schopen odolávat vysokému tlaku mobilní fáze. Takovýmto materiálem je nejčastěji ocel nebo tlustostěnná skleněná trubice. Chromatografické separční kolony jsou dlouhé 50 až 300 mm s vnitřním průměrem 2 až 5 mm a musí být naplněny vhodnou stacionární fází. Velikost molekul stacionární fáze je 3 až 10  $\mu\text{m}$ . Nosičem vázané stacionární fáze je dnes silikagel. Jako ochrana kolony se mohou používat tzv. předkolony, které chrání samotnou kolonu před nečistotami a nerozpustnými materiály. [1], [4], [7]

Další součástí HPLC jsou detektory. Jsou umístěny za chromatografickou kolonou a registrují rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze, která obsahuje eluovanou složku. Nejčastěji se rozdělují na koncentrační a hmotnostní detektory, dalším způsobem dělení může být na destrukční a nedestrukční detektory. [1], [6]

Ideální detektor pro HPLC by měl být specifický a s dostatečnou citlivostí, neměl by přispívat k rozšiřování chromatografických zón a odezva detektoru by měla být okamžitá. Mimo to by měl být nedestruktivní, spolehlivý a snadno použitelný. Žádný detektor nesplňuje všechny výše uvedené požadavky. [1], [6]

Nejčastěji užívané detektory v kapalinové chromatografii jsou spektrofotometrické, fluorimetrické, refraktometrické a elektrochemické. [6]

V dnešní době se stále více používají hmotnostně spektrometrické detektory, jelikož jsou již cenově dostupnější. [6]

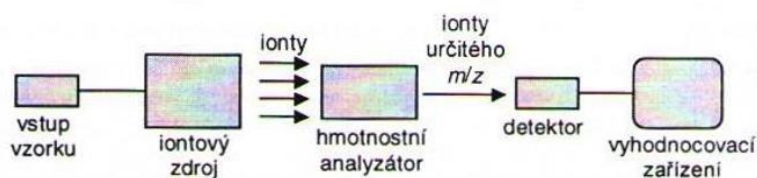
## **1.2 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE**

Hmotnostní spektrometrie je separační technikou, ve které jsou molekuly převedeny na ionty, které jsou rozlišeny podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ).

Již v roce 1913 se Thompson zabýval hmotnostní spektrometrií, dokázal rozlišit isotopy neonu. [8]

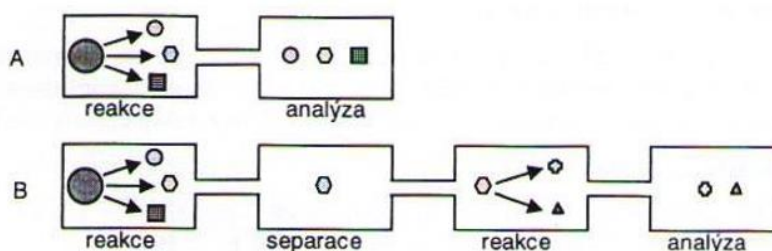
V současnosti patří hmotnostní spektrometrie k nepostradatelným analytickým nástrojům v biochemii, chemii, farmacii a dalších oborech. [9]

Tři základní součásti hmotnostních spektrometrů jsou iontový zdroj, analyzátor a detektor. Mezi primární kroky této techniky patří odpaření vzorku, ionizace, akcelerace iontů do hmotnostního analyzátoru, separace iontů v hmotnostním analyzátoru a detekce iontů. Signál je digitalizován a následně převeden do podoby hmotnostního spektra. [4], [9]



**Obrázek 3: Obvyklé schéma hmotnostního spektrometru [4]**

Ve většině hmotnostních spektrometrů nastává reakce, při které dojde ke vzniku iontů a po této reakci probíhá jejich analýza. V případě, kdy jsou hmotnostní spektrometry spojeny jako tandemové, dochází v první reakci ke vzniku iontů, z kterých se poté separuje požadovaný ion, který je podroben další reakci za vzniku iontů, které jsou následně podrobeny analýze. [4]



**Obrázek 4: Uspořádání hmotnostního spektrometru: A) základní, B) tandemové [4]**

Spojením separačních metod (plynová, kapalinová chromatografie) s hmotnostním spektrometrem dojde k významnému zvýšení selektivity a lze provést identifikaci komponent ve složité matici. Hmotnostní spektrometr tak můžeme považovat za strukturně selektivní detektor, který látky identifikuje na základě hmotnostního spektra. [11]

### 1.2.1 Instrumentace

Mezi základní stavební prvky instrumentace, které najdeme u všech přístrojů, patří vstup, iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor, počítač s programem, který zpracovává hmotnostní spektra, a vakuový čerpací systém.

## IONTOVÉ ZDROJE

V iontovém zdroji dochází k převedení analyzované látky do ionizovaného stavu. Mimo jiné zde také probíhají fragmentační reakce, které následně vedou k destrukci chemických vazeb vzniklého iontu. Způsobů ionizace je více, jako například ionizace nárazem elektronů, chemická ionizace anebo sprejové ionizační techniky. Lze je rozdělit do dvou základních skupin, na ionizační techniky „měkké“ a „tvrdé“. U „měkkých“ ionizačních technik získává molekula menší množství energie a dochází k malé fragmentaci. Kdežto u „tvrdých“ ionizačních technik získává molekula nadbytek vnitřní energie a dojde k velké fragmentaci. [4], [12]

Elektronová ionizace (EI) patří mezi „tvrdé“ ionizační techniky a princip je založen na předávání energie letících elektronů molekulám analytu. Nejčastěji se využívá ve spojení GC-MS. Vznikají při ní kladné ionty a mimo to i bohatá fragmentační spektra, která umožňují identifikaci analyzované sloučeniny, jelikož námi získaná spektra můžeme porovnávat s knihovnou spekter. [12]

Chemická ionizace (CI) se řadí mezi „měkké“ ionizační techniky, tudíž představuje výhodu získání spektra s menší fragmentací. Ve zdroji je navíc přítomen pomocný plyn, přičemž proudem elektronů dochází nejprve k ionizaci molekul tohoto pomocného plynu, a ty poté ionizují molekuly vzorku. Dochází nejčastěji ke vzniku iontů se sudým počtem elektronů. [13] Elektrosprej (ESI) je ionizační technika patřící mezi ionizační techniky probíhající za atmosférického tlaku. Používá se pro látky středně polární až polární. V průběhu ionizace dochází k tvorbě kapiček na výstupu kapiláry, do které vstupuje analyt spolu s mobilní fází. Dojde k rozprášení zmlžovacím plynem, rozpouštědlo se z kapiček postupně odpařuje, a dochází ke kondenzaci povrchového náboje. Po určité době přijde okamžik, kdy dojde k coulombické explozi, což znamená, že se kapičky rozdělí na ještě menší. [12], [14]

První ionizační technika pracující za atmosférického tlaku byla objevena v roce 1973 a o rok později byla objevena její vylepšená varianta jako chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). [15], [16]

APCI je vhodná pro látky nepolární až středně polární. Princip je podobný jako u klasické chemické ionizaci. Na konci kapiláry dojde k rozprášení eluátu pneumatickým zmlžovačem a vzniklý aerosol je rychle odpařen. Na výbojovou jehlu je vloženo napětí a dojde ke vzniku koronárního výboje, jímž jsou následně ionizovány molekuly mobilní fáze. Vzniklé ionty poté ionizují molekuly analytu. [17]

Ionizace laserem za účasti matrice, neboli MALDI, se používá nejčastěji pro analýzu proteinů a jiných makromolekul. Ještě před samotnou ionizací dojde ke smíchání vzorku s organickou

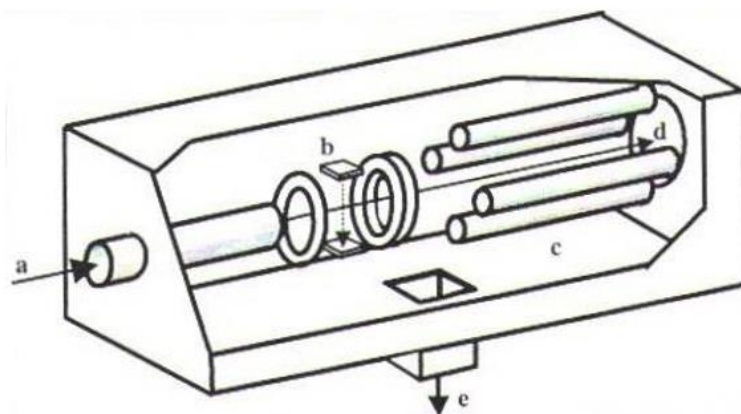
kyselinou. Ionizace zahrnuje krátký intenzivní puls laserem, přičemž energie je absorbována matricí. Poté dojde k desorpci matrice a analytu. Ionizovaná matrice předává energii analytu.

[12]

## HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTORY

Představují důležitou součást hmotnostního spektrometru. Za přítomnosti vakua zde dochází k separaci iontů na základě poměru  $m/z$ , tedy hmotnosti k náboji. Hmotnostní analyzátory lze rozdělit do několika skupin. Do první skupiny můžeme zařadit skenující analyzátory, které nepřetržitě v čase separují a poté vysílají k detektoru ionty s určitou hodnotou  $m/z$ . Jedná se například o kvadrupólový analyzátor. Druhá skupina zahrnuje analyzátory s transmisí všech iontů zároveň do letové trubice, tam následně dojde k separaci díky rozdílné době letu k detektoru. Typickým zástupcem je analyzátor doby letu. Do další skupiny můžeme zahrnout analyzátory, které zachycují ionty v cele nebo pasti. [12]

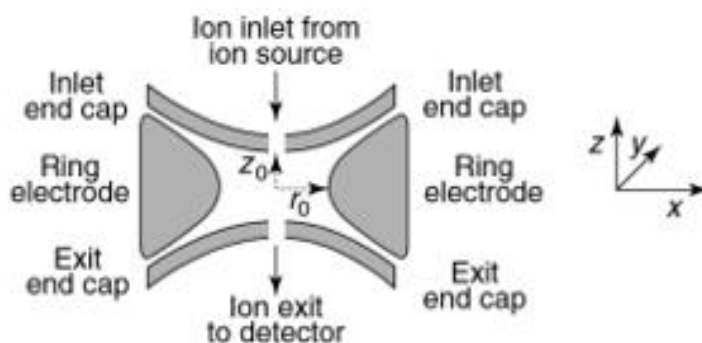
Kvadrupólový analyzátor je patrně jeden z nejvíce rozšířených hmotnostních analyzátorů. Při jeho zavádění byli slibnými vlastnostmi citlivost, mechanická jednoduchost, nízká hmotnost a nepřítomnost těžkopádného magnetu a vysokorychlostní elektronické skenování. Nyní patří mezi jeho výhody nepochybně nižší pořizovací cena, snadná obsluha a spojení s HPLC. Je složen ze čtyř tyčí, na které je vloženo střídavé a stejnosměrné napětí, přičemž protilehlé elektrody mají vždy stejnou polaritu, dvě jsou kladné a dvě záporné. Podle amplitudy střídavého napětí v daném okamžiku a velikosti stejnosměrného napětí se ionty s určitou hodnotou  $m/z$  pohybují po stabilní trajektorii směrem k detektoru. Ionty pohybující se po nestabilní trajektorii jsou vychýleny a na detektor nedopadnou. Tento analyzátor může pracovat ve dvou režimech. Prvním je skenovací, kdy se průběžně mění elektrické pole, což nám umožní proměřit všechny hodnoty  $m/z$  v krátkém čase. Tento režim je méně citlivý, zato umožňuje sledování všech iontů vzniklých v iontovém zdroji. V druhém režimu se nastaví elektrické pole tak, aby procházely pouze ionty o příslušné hodnotě  $m/z$ , je to tzv. SIM režim (z angl. Single Ion Monitoring). Tento režim může být využit pro citlivou kvantifikaci předem zvolených látek. [12], [17]



**Obrázek 5: Hmotnostní spektrometr s kvadrupólem (a – vstup vzorku, b – iontový zdroj, c – kvadrupól, d – detekce, e – vakuum) [4]**

V případě průletového analyzátoru je separace iontů založena na době jejich letu, tedy na vztahu mezi  $m/z$  a rychlostí pohybujících se iontů. Výhodou tohoto analyzátoru oproti kvadrupólovém analyzátoru je lepší rozlišovací schopnost. Významného zlepšení rozlišení iontů lze dosáhnout, použijeme-li reflekttron neboli iontové zrcadlo. V tomto případě se otočí směr letu o  $180^\circ$ , tím pádem se prodlouží dráha a zároveň doba letu iontů. [12]

Iontová past je analyzátor, který jako první popsali Paul a Steinwedel roku 1960. Iontové pasti můžeme rozdělit do dvou typů, 3D a 2D iontová past. Historicky prvními byly 3D iontové pasti. Jak vidíme na obrázku 6, analyzátor je složen z prstencové elektrody, výstupní a vstupní elektrody, někdy označovaných jako koncové. Na elektrody je vloženo napětí, a koncové elektrody jsou uzemněny. Ionty z iontového zdroje se do analyzátoru dostávají skrz otvor ve vstupní elektrodě. V analyzátoru zůstanou do doby, než díky postupné změně napětí dojde k jejich vypuzení na detektor podle hodnot  $m/z$ . Uvnitř pasti se nachází helium, které udržuje ionty ve středu iontové pasti a zvyšuje tak rozlišení. [13], [19]



**Obrázek 6: 3D iontová past [13]**

Principem iontové cyklotronové rezonance s využitím Fourierovy transformace je pohyb iontů v homogenním magnetickém poli. Ionty, které vznikají v iontovém zdroji za atmosférického tlaku, postupně projdou přes několik stupňů se vzrůstajícím vakuem až do ICR cely, tam je tlak v řádech  $10^{-11}$  mbar a teplotou, která se blíží absolutní nule. ICR cela je lokalizována uvnitř prostorově homogenního supravodivého magnetu, který má vysoké statické magnetické pole. Ionty se zde pohybují s  $m/z$  o určité frekvenci. Pokud budeme měřit cyklotronové frekvence všech  $m/z$  v určitém hmotnostním rozsahu, získáme komplexní spektrum všech detekovaných frekvencí proti času. Standardní hmotnostní spektrum získáme díky Fourierově transformaci. [20]

Orbitrap je elektrostatická iontová past, která využívá Fourierovu transformaci pro získávání hmotnostních spekter. Analyzátor je založen na konceptu, který v roce 1996 navrhl a popsal Makarov. První přístroj jako takový byl uveden na trh v roce 2005. Hmotnostní analyzátor je tvořen centrální elektrodou, která je podobná vřetenu a vnější elektrodou podobnou hlavni. Na elektrody je vloženo napětí. Ionty v pasti oscilují ve složitých spirálách kolem centrální elektrody pod vlivem elektrostatického pole. Ion musí mít kinetickou energii okolo 1600 eV. Ionty se otáčejí kolem vnitřní elektrody a společně oscilují podél osy  $z$ , přičemž frekvence je nepřímo úměrná  $m/z$ . [21]

## DETEKTORY IONTŮ

Ionty procházejí hmotnostním analyzátozem a jsou detekovány a transformovány do použitelného signálu detektorem. Detektory jsou schopné generovat elektrický proud z dopadajících iontů. Elektrický proud je úměrný množství dopadajících iontů. V současné době existuje několik typů detektorů. Výběr detektoru závisí na konstrukci přístroje a jeho analytických aplikacích, kterou budou prováděny. K detekci iontů se využívá celá řada přístupů, ale vždy je založena na jejich náboji, hmotnosti nebo rychlosti. Detektory iontů můžeme rozdělit do dvou tříd. Některé detektory jsou vyráběny tak, aby počítaly ionty jedné hmoty najednou. Proto detekují všechny ionty postupně v jednom bodě, jedná se o bodové iontové kolektory. Jiné detektory, kterými jsou fotografické desky, detektory pole nebo detektory proudu, mají schopnost počítat více hmot a detekovat tak všechny ionty současně podél roviny, jedná se o kolektory pole. [13]

### **Fotografická deska**

První hmotnostní spektrometry využívaly jako detektory fotografické desky umístěné za analyzátozem. Ionty, které sdílely stejný poměr  $m/z$  se dostaly na desku na stejné místo a poloha bodů umožňovala po kalibraci stanovení jejich hodnot  $m/z$ . Tento detektor, který umožňuje současnou detekci ve velkém rozsahu  $m/z$ , je dnes považován za zastaralý. [13]

### **„Faraday cup“**

Faradayova miska je vyrobena z válce s malým otvorem. Detektor je uzemněn. Ionty, které se dostanou dovnitř válce, jsou neutralizovány buď přijetím, nebo odevzdáním elektronů, když dopadnou na stěnu. To vede k vytvoření proudu. Výbojový proud je poté zesílen a detekován. Poskytuje míru hojnosti iontů. Nevýhodou jednoduchého a robustního detektoru je nízká citlivost a pomalá doba odezvy. Citlivost je omezena šumem zesilovačů. I přes to jsou takovéto detektory velmi přesné, protože náboj na válci je nezávislý na hmotnosti, rychlosti a energii detekovaných iontů. [13]

### **Elektronový multiplikátor**

Je nejrozšířenějším iontovým detektorem v hmotnostní spektrometrii. Ionty z analyzátoru jsou urychlovány na vysokou rychlost, aby se zvýšila účinnost detekce. Toho se dosahuje udržováním elektrody, zvané konverzní dynoda, na vysokém potenciálu, od  $\pm 3$  do  $\pm 30$  kV, vzhledem k náboji detekovaných iontů. Když kladný iont narazí na dynodu se záporným nábojem, jsou sekundárními částicemi ionty se záporným nábojem a elektrony. Když na kladně nabitou dynodu narazí iont se záporným nábojem, jsou sekundárními částicemi kladné ionty. Sekundární částice jsou přeměněny v první dynodě na elektrony. Ty jsou pak zesíleny kaskádovým efektem v elektronovém multiplikátoru. Elektronové multiplikátory mohou mít buď diskrétní dynody nebo dynody kontinuálního typu. [13]

Diskrétní elektronový multiplikátor je tvořen řadou 12 až 20 dynod, které mají vlastnosti sekundární emise. Sekundární částice tvořené konverzní dynodou dopadnou na první povrch dynody a způsobují emise sekundárních elektronů. Tyto elektrony jsou pak urychlovány na další dynodu, protože mají nižší potenciál. Narazí do druhé dynody a způsobí emisi více elektronů. Tím se vytvoří mnoho elektronů a elektrický proud je tak značně zesílen. [13]

Jedním z typů multiplikátorů s kontinuálním typem dynody je „channeltron“, který je vyroben ze skla dopovaného olovem s tvarem zakřivené trubice. Sekundární částice z konverzní dynody naráží na zakřivenou vnitřní stěnu u vstupu detektoru a vytvoří sekundární elektrony, které jsou pak polem urychleny směrem k výstupu z trubice. Tyto elektrony procházejí dále do multiplikátoru elektronů, opět naráží na stěnu, což způsobí emisi více a více elektronů. [13]

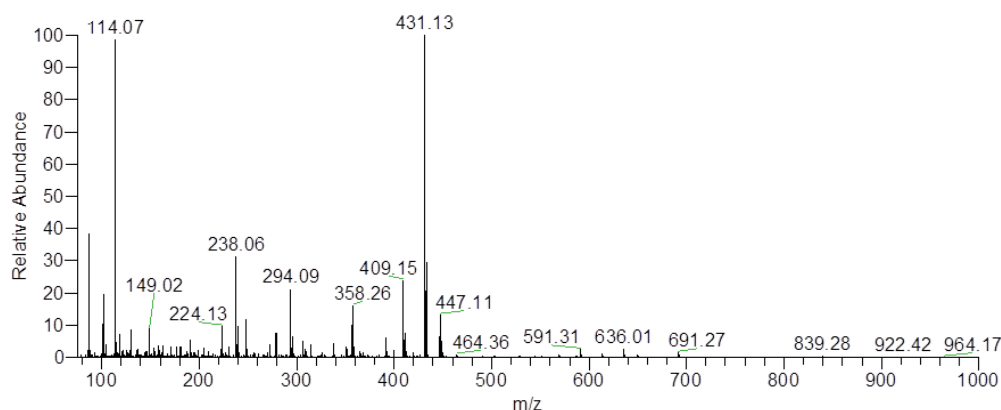
### **Elektrooptický detektor iontů**

Tento detektor kombinuje zařízení pro detekci iontů a fotonů. Převádí ionty na elektrony a poté na fotony. Umožňuje detekci jak pozitivních, tak negativních iontů. V pozitivním režimu jsou ionty urychlovány směrem k dynodě, která má záporné napětí, zatímco v negativním režimu jsou ionty urychlovány směrem k dynodě s kladným napětím.

Sekundární elektrony jsou urychlovány směrem k fosforeskující obrazovce, která emituje fotony. Tyto fotony jsou detekovány fotonásobičem, který je umístěn za fosforeskující obrazovkou. Jeho životnost je delší než životnost elektronových multiplikátorů, protože fotonásobič je utěsněn ve skle a udržován ve vakuu. [13]

## HMOTNOSTNÍ SPEKTRUM

Hmotnostní spektrum je závislost relativní intenzity iontového proudu a podílu  $m/z$ . [4]



**Obrázek 7: Příklad hmotnostního spektra amlodipinu**

## TVORBA ADUKTŮ

Tvorba aduktů je typická pro tzv. měkké ionizační techniky používané při spojení LC-MS.

Adukt je ion vytvořený přímou kombinací neutrální molekuly a „ionizujícího“ iontu jiného než proton. V pozitivním iontovém režimu je nejčastěji pozorovaným aduktem adukt sodíku, který vytváří ion o 23 hmotnostních jednotek vyšší než má původní protonovaná molekula, tedy  $(M+23)^+$  místo  $(M+1)^+$ . [13]

Adukt se sodíkem je dominantní. Pokud je přítomná amonná sůl, může dojít k vytvoření aduktu  $(M+NH_4)^+$ . V negativním iontovém režimu se může objevit adukt s chlórem  $(M+35)^-$  a  $(M+37)^-$ , který je přítomen vždy, když není vzorek odsolen. Pokud jsou přítomné acetátové ionty, vznikají ionty  $(M+59)^-$ . [13]

## 1.3 PŘÍPRAVA VZORKŮ K ANALÝZE

### 1.3.1 Odběr moči

Jednou z největších výhod odběru moči jako biologického materiálu je neinvazivní způsob oděru. Další výhodou je, že organismus disponuje schopností zkoncentrovat stanovanou látku do malého objemu moči. V případě toxikologického vyšetření se může využít možnosti stanovení požadované látky nebo jejího metabolitu delší dobu po jejím podání než například

při stanovení v plazmě, séru nebo krvi. To znamená, že i přestože uplynula dlouhá doba od podání látky a její koncentrace v krvi, séru či plazmě je nízká, v moči může být koncentrace stanovované látky i metabolitů dostačující. Mimo to se jako přednost může počítat i snazší příprava vzorku k analýze, jelikož má moč jednodušší složení v porovnání s plazmou, sérem nebo plnou krví. [22]

Základním kvalitativním stanovením látek v moči můžeme získat informace o přítomnosti glukózy, ketolátek, bilirubinu, urobilinogenu a celkové bílkoviny. Vyšetřením močového sedimentu pak zjišťujeme počet přítomných erytrocytů, leukocytů, krystalů, válců aj. K tomuto vyšetření se používá vzorek první ranní moče, tzv. střední proud do zkumavky o objemu 10 ml. Vzorek moče musí být doručen do laboratoře do 1 hodiny.

Ke kvantitativnímu vyšetření látek v moči je vhodná moč sbíraná za určené časové období, a to nejčastěji za 24 hodin. K mikrobiologickému vyšetření je důležité získat moč aseptickým způsobem, tedy po předchozí hygieně genitálií. Opět se odebírá střední proud moče, a to do sterilní zkumavky, kterou je nutné po odběru ihned zaslat do laboratoře. [22],[23], [24], [25]

### **1.3.2 Příprava vzorků před vlastní analýzou**

Většina biologických vzorků musí být před samotnou analýzou upravena. Většinou proto, že biologické vzorky mají složitou matici, tedy balastní látky, které by mohly interferovat se stanovovanými analyty. Mezi konvenční způsoby úpravy vzorků, které jsou velice rozšířené, můžeme zařadit extrakci na tuhé fázi (SPE, z angl. Solid Phase Extraction), extrakci kapalina-kapalina (LLE, z angl. Liquid-Liquid Extraction), přímou extrakci a dále precipitaci proteinů. [26]

Extrakce kapalina-kapalina je metoda založená na přechodu rozpuštěné látky z jedné kapalně fáze do druhé. V praxi se používá jako jedno rozpouštědlo voda a druhým rozpouštědlem je organické rozpouštědlo, s vodou nemísitelné. Látka, která je rozpuštěna v jedné fázi, přechází do fáze druhé. Poté, co dojde k ustavení rovnováhy, bude poměr koncentrací rozpuštěné látky v obou fázích konstantní. K tomuto účelu se využívají dělicí nálevky, kde nemísitelná rozpouštědla protřepáváme. Rozpouštědlo je voleno tak, aby v něm byl analyt co nejvíce rozpustný. Výhodou této metody je nenáročnost na její provedení a vybavení. Nevýhodou je tvorba emulzí, nepoužitelnost pro polární látky, časová náročnost a vysoká spotřeba organického rozpouštědla. [27], [28], [29]

Extrakce na tuhé fázi je v současné době nejpoužívanější technikou pro odstranění interferujících látek a zkoncentrování analytu ve vzorku, jelikož je snadná na použití a má širokou aplikovatelnost. Tato metoda má dobrou výtěžnost, je snadno automatizována,

spotřeba rozpouštědel je nižší. Nevýhodami je časová a finanční náročnost, nutnost instrumentálního vybavení, a matricové efekty. Princip metody je založen na rovnovážné distribuci analytu mezi tuhou fází (SPE kolonka) a kapalnou (vzorek). V tomto případě je rovnováha posunuta ve prospěch tuhé fáze. Funkcí extrakce na tuhé fázi je zachycení sledovaných analytů z roztoku, dále jejich zkoncentrování a následná eluce. [27], [28], [30]

Precipitace proteinů je metoda založena na faktu, že proteiny jsou méně rozpustné, pokud se nacházejí v prostředí vysokých koncentrací solí. Je to nejrychlejší, nejlevnější a nejjednodušší způsob, jak ze vzorku odstranit interferující proteiny. Používá se celá řada precipitačních činidel, jako jsou methanol, acetonitril, síran zinečnatý, či některé organické a anorganické kyseliny. Výhodou je nízká cena, jednoduchost, rychlost a žádné speciální instrumentální vybavení. Nevýhoda se skrývá v nízké selektivitě, přítomnosti matricových efektů a možnosti vazby analytu na precipitát. Při precipitaci nedochází k odstranění lipidů a solí, což může mít za následek matricový efekt. Acetonitril a methanol slouží jako účinná rozpouštědla asi v 98 % případů, pokud jsou používány v poměru 2:1, nebo vyšším.[26], [28], [31]

Při přímé extrakci dochází k tzv. extrakci analytu z tuhé fáze. Důležitou úlohu hraje úprava vzorku před samotnou extrakcí. Vzorek musí být rozmělněn na malé částice tak, aby došlo ke zvětšení povrchu, který je přístupný rozpouštědлу. Díky tomu dojde k usnadnění přenosu hmoty a homogenizaci. Vzorek, který je takto upraven, může být následně extrahován rychleji a současně i efektivněji. [6]

#### **1.4 ANTIHYPERTENZIVA**

Jedná se o léky, které se podávají při léčbě hypertenze. Cíl těchto léčiv spočívá ve snížení krevního tlaku. Léčba antihypertenzivy je symptomatická. Navzdory tomu, jsou antihypertenziva prevencí aterosklerózy a jejich podáváním se snižuje morbidita a mortalita onemocnění. [32], [33]

Antihypertenziva lze podle účinku rozdělit do 4 hlavních skupin dle tzv. pravidla ABCD.

Do skupiny A patří inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACEI, z angl. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor) a blokátory receptorů pro angiotenzin II (ARBs, z angl. Angiotensin Receptor Blockers), do skupiny B  $\beta$ -blokátory, skupiny C blokátory  $Ca^{2+}$  kanálů a skupiny D diuretika. Dalšími antihypertenzivy mohou být  $\alpha$ -blokátory a centrálně působící látky užívající se především v kombinované léčbě. [32]

V případě lehké hypertenze je léčba zahájena monoterapií, ke které se používají  $\beta$ -blokátory, diuretika, ACEI či blokátory  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů. Při výběru vhodného léčiva se musí postupovat s ohledem na stav nemocného. [32]

ACEI se používají u nemocných, kteří trpí srdečním selháváním, dysfunkcí levé komory srdeční po infarktu myokardu, hypertrofií levé komory srdeční, dále pak u pacientů s hyperlipoproteinemií a diabetem s proteinurií. [32]

$\beta$ -Blokátory jsou vhodné pro nemocné, kteří jsou mladší 70 let a s ischemickou chorobou srdeční. Blokátory  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů jsou indikovány u periferních cévních onemocnění, jako je ischemické onemocnění dolních končetin, dále u pacientů s *angina pectoris*, diabetem a hyperlipidemií. [32]

Diuretika se používají u nemocných nad 70 let s kontraindikací použití  $\beta$ -blokátorů. V monoterapii se užívají kombinované preparáty, aby se předešlo nežádoucí hyperkalemii. Thiazidová diuretika jsou indikována u žen nad 40 let a u starších mužů, přičemž snižují incidenci patologických fraktur, protože dochází k retenci vápníku. [32]

Pokud je monoterapie neúspěšná, pak se volí kombinace diuretikum + ACEI, blokátor  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů +  $\beta$ -blokátor, blokátor  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů + ACEI, ABRs, diuretikum +  $\beta$ -blokátor,  $\beta$ -blokátor +  $\alpha$ -blokátor. [32]

#### **1.4.1 Inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu**

Tato farmaka patří do skupiny kardiofarmak. Užívání způsobuje pokles tvorby angiotenzinu II a vede ke kumulaci bradykininu. Tím dojde k dilataci cév. Současně v ledvinách stoupne vylučování  $\text{Na}^+$  iontů a vody a klesne vylučování iontů  $\text{K}^+$ . ACEI jsou schopny bránit remodelaci myokardu po akutním infarktu myokardu, ale tento mechanismus není zcela objasněn. Při dlouhodobém užívání dochází k regresi rozvinutých hypertrofických změn na cévách a srdci. [34]

Léčiva se dobře vstřebávají z gastrointestinálního traktu, až na jednu výjimku, kterou je kaptopril, jejich absorpce není ovlivněna přítomností potravy. Užívají se ve formě aktivní anebo ve většině případů jako pro-léčiva, ty se v játrech metabolizují na aktivní látku. Jsou vylučovány ledvinami a při poruše renálních funkcí se musí snížit dávkování. [34]

Mezi nejčastější indikaci podávání ACEI patří arteriální hypertenze, srdeční selhání, akutní infarkt myokardu a diabetická nefropatie. Kontraindikací je kardiogenní šok, těhotenství, laktace, výskyt angioneurotického edému a stenóza ledvinné tepny. Nežádoucími účinky jsou

hyperkalemie, angioneurotický edém, dráždivý suchý kašel, zhoršení renálních funkcí a hypotenze. [34]

#### **1.4.2 Blokátory receptorů pro angiotenzin II**

Stejně jako ACEI, patří blokátory receptorů pro angiotenzin mezi inhibitory systému renin-angiotensin-aldosteron (RAAS). Jedná se o antihypertenziva první volby a užívají se při terapii srdečního selhání. Jsou označovány jako sartany, jejich názvy končí příponou „-sartan“. Účinek terapie se dá srovnat s terapií ACEI, ale při užití blokátorů receptorů pro angiotenzin II nedochází k nežádoucím účinkům, které jsou způsobeny kumulací bradykininu ve tkáních. [35]

Účinek sartanů je širší než účinek ACEI, jelikož dokáží inhibovat účinky angiotenzinu II, který vznikl jinou cestou než přeměnou z angiotenzinu I prostřednictvím ACE. Jejich užívání směřuje k poklesu jak systolického, tak i diastolického krevního tlaku, přičemž nedochází k reflexní tachykardii. Po první dávce nedochází k hypotenzi, jelikož nástup účinku je pomalý. [35]

Blokátory receptorů pro angiotenzin II jsou indikovány při chronickém srdečním selhání, arteriální hypertenzi, jako sekundární prevence infarktu myokardu nebo cévní mozkové příhody. Jako kontraindikace se uvádí laktace a těhotenství. Mohou být použity jako alternativa při nemožnosti použití ACEI. Mohou být kombinovány s dalšími antihypertenzivy. Výhodou je, že mají nízký výskyt nežádoucích účinků, nejčastější jsou hypotenze, hyperkalemie či akutní selhání ledvin. Do této skupiny patří např. telmisartan. [35]

#### **1.4.3 $\beta$ -Blokátory**

$\beta$ -Blokátory řadíme do skupiny sympatolytik, která blokují  $\beta$ -adrenergní reakce. Tlumí efekt sympatiku a sympatomimetik na  $\beta$ -adrenergních receptorech. Dochází ke snížení síly kontrakce, snížení srdeční frekvence, snižují vodivost převodního systému a také snižují vzrušivost myokardu. Tím, že dojde ke zpomalení srdeční frekvence, sníží se spotřeba kyslíku myokardem a současně dojde ke sníženému vylučování reninu ledvinami. Krátkodobé podávání  $\beta$ -blokátorů může způsobit snížení srdečního výdeje a zvýšení periferního odporu, naopak dlouhodobé užívání způsobuje snížení periferního odporu. [36]

Tato farmaka jsou první volbou pro pacienty, kteří trpí hypertenzí současně s arytmií, arteriální hypertenzí, ischemickou srdeční chorobou či glaukomem. Dalšími indikacemi mohou být migréna, portální hypertenze, svalový třes či jiné srdeční choroby. Naopak

kontraindikace vyplývají z nežádoucích účinků a nesmí se užívat při bronchiálním astmatu, hypotenzi a *diabetes mellitus*. [36], [33]

Mezi nejčastěji zmiňované nežádoucí účinky patří bradykardie, hypotenze, bronchokonstrikce, srdeční nedostatečnost kvůli ovlivnění srdečního výdeje, chladné končetiny a deprese. Metabolickými nežádoucími účinky jsou hyperkalemie, zvýšení koncentrace triacylglycerolů a snížení HDL-lipoproteinů. [36]

$\beta$ -Blokátory dělíme na selektivní a neselektivní, přičemž obě skupiny mohou mít vnitřní sympatomimetickou aktivitu (VSA). U selektivních  $\beta$ -blokátorů se uvádí méně nežádoucích účinků a jsou vhodné k terapii *angina pectoris* nebo hypertenze. Do této skupiny patří např. metoprolol a acebutolol. [36]

#### 1.4.4 Diuretika

Tyto léky působí přímo na ledviny. Způsobují zvýšení diurézy a mají vliv na transport  $\text{Na}^+$  kationtu. Mimo jiné také inhibují zpětné vstřebávání chloridu sodného a vody z tubulů. Mechanismus účinku se vztahuje na membránový transport. Diuretika mohou inhibovat transportéry nejen v ledvinách, ale i mimo ně. Ovšem v ledvinách mají nejvýraznější účinek díky nejvyšší koncentraci zmiňovaných transportérů. Diuretika se užívají při hypertenzi, edémech, srdečním selhání a jako prevence nedostatečnosti ledvin a snížení funkce jater. [37] Rozdělují se do několika skupin, na diuretika působící v proximálním tubulu (inhibitory karboanhydrázy), diuretika působící v distálním tubulu (thiazidy), diuretika působící v Henleově kličce (diuretika Henleovy kličky), diuretika zabraňující vylučování draslíku (draslík šetřící), diuretika zvyšující vylučování vody (osmotická diuretika). Diuretika se také mohou kombinovat, např. hydrochlorthiazid s amiloridem a chlortalidon s amiloridem. [37]

Podrobněji se zde zmíním o diureticích působících v distálním tubulu, mezi něž patří tzv. thiazidová diuretika mající dva účinky. Renální účinek způsobuje inhibici resorpce chloridu sodného epiteliálními buňkami distálního tubulu do krve a současně dochází ke zvýšené resorpci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, účinek extrarenální vyvolává vazodilataci. Indikují se při arteriální hypertenzi, srdečním selhání, *diabetes insipidus* a nefrolithiáze. Kontraindikací je gravidita, dna, snížená funkce ledvin a hyperkalcemie. Nežádoucí reakcí může být alergická reakce, snížená glukózová tolerance, hyperlipidemie, hyperurikemie a hyperkalemická metabolická alkalóza. Mezi hlavní zástupce patří chlortalidon, hydrochlorthiazid a indapamidum. [37]

Jako antagonisté aldosteronu působí draslík šetřící diuretika. Příímý antagonistá spironolakton působí jako blokátor mineralokortikoidního receptoru. Amilorid inhibuje transport Na<sup>+</sup> kationtů iontovými kanály v luminální membráně, tudíž snižuje resorpci sodíku.

Draslík šetřící diuretika se užívají při sekundárním aldosteronismu, přičemž ten je důsledkem srdečního selhání, jaterní cirhózy či nefrotického syndromu. Mezi nežádoucí účinky patří hyperkalemie, gynekomastie a hyperchloremická metabolická acidóza. Zmíněnými zástupci jsou amilorid a spironolakton. [37]

#### 1.4.5 Příímá vazodilatancia

Jedná se o léky, které dilatují cévy. Lze je dělit na myotropní, neurotropní a ACEI. Myotropní vazodilatancia se dělí na koronární (dusičnany, dusitany či molsidomin) a ostatní, kam řadíme blokátory Ca<sup>2+</sup> kanálů, nitroprussid, deriváty kyseliny nikotinové či puriny. Neurotropní vazodilatancia neboli  $\alpha_1$ -lytika, se dělí na neselektivní, kam řadíme např. fentolamin, a na selektivní, kam řadíme doxazosin a metazosin. Poslední skupinou jsou již zmiňované ACEI. Farmaka je možné také dělit podle místa účinku na ty, které působí převážně na malé tepny, žíly nebo na malé tepny i žíly. [38]

Příímá vazodilatancia snižují krevní tlak dilatačním účinkem na hladký sval cév. Tím také redukují periferní cévní rezistenci, ale zároveň zůstávají zachovány kompenzační mechanismy zprostředkované baroreceptory, systémem RAAS a sympatickými nervy. Tento fakt má svá pozitiva i negativa. Jako výhodu můžeme označit fakt, že nejsou hypotenzivy, neovlivňují sexuální funkce a mohou být indikovány i v těhotenství. Naopak nevýhodou je nežádoucí reflexní tachykardie, retence tekutin a pokles antihypertenzivního efektu. Mezi již zmíněné zástupce patří doxazosin a amlodipin, kterými se budu zabývat i později, dále nitroprussid sodný, minoxidil či dihydralazin. [38]

## 1.5 STANOVOVANÁ LÉČIVA

### 1.5.1 Acebutolol

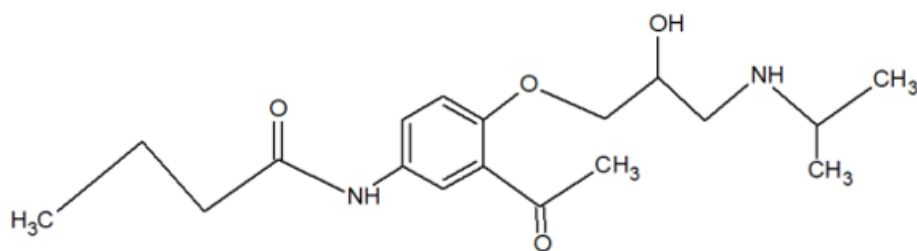
#### Fyzikální a chemické vlastnosti

Sumární vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

M = 336,432 g/mol

Systematický název:

N-(3-acetyl-4-(2-hydroxy-3-(isopropylamino)propoxy)fenyl)butyramid [39]



**Obrázek 8: Vzorec acebutololu**

#### Indikace, kontraindikace a nežádoucí účinky

Acebutolol se užívá pro léčbu hypertenze, *angina pectoris* a komorových a síňových srdečních arytmií, dále při akutním infarktu myokardu u vysoce rizikových pacientů a při Smith-Magenisovu syndromu. Mezi pacienty, kterým nemusí acebutolol vyhovovat, se řadí pacienti s bronchiálním astmatem nebo chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN), jelikož má acebutolol bronchokonstrikční účinky. Mezi další kontraindikace se může řadit laktace, závažné renální selhání, metabolická acidóza či poruchy periferního oběhu. Jako vedlejší účinek se u 10-30 % pacientů léčených acebutololem objevil vývoj antinukleárních protilátek (ANA). Zhruba u 1 % pacientů došlo k výskytu systémového onemocnění s atralgickou bolestí a myalgií. Syndrom podobný *lupus erythematosus* s kožní vyrážkou a vícečetným postižením orgánů se vyskytuje mnohem méně. U žen je vyšší pravděpodobnost, že se rozvinou vedlejší účinky. Také byly prokázány případy, kdy došlo k hepatotoxicitě se zvýšenou aktivitou jaterních enzymů ALT a AST. [40], [41]

#### Mechanismus účinku

Acebutolol je selektivní antagonist  $\beta_1$ -receptoru. Adrenalin aktivuje  $\beta_1$ -receptor, přičemž dojde ke zvýšení srdeční frekvence a krevního tlaku a srdce tak spotřebuje více kyslíku. Acebutolol blokuje tyto receptory, tím dojde ke snížení srdeční frekvence a krevního tlaku. Má tedy opačný účinek než adrenalin. Betablokátory také zabraňují uvolnění reninu, což je hormon, který je produkován ledvinami a vede k zúžení krevních cév. [39]

#### Farmakodynamika

Acebutolol blokuje  $\beta$ -adrenoreceptory. Obecně lze říci, že beta-blokátory snižují práci srdce a umožňují, aby bilo pravidelně. Acebutolol má méně antagonistické účinky na  $\beta_2$ -receptory periferních cév v klidu a po stimulaci adrenalinem než neselektivní beta-antagonisté. [39]

#### Farmakokinetika

Lék je dobře absorbován v gastrointestinálním traktu. Absolutní biologická dostupnost mateřské sloučeniny je 40 %. Acebutolol podléhá biotransformaci, a to primárně na

diacetolol. Renální exkrece je přibližně 30 až 40 % a nerenálními mechanismy 50 až 60 %, vylučováním do žluči a přímým průchodem střevní stěnou. Poločas eliminace v plazmě je 3-4 hodiny a poločas eliminace metabolitu diacetololu je 8-13 hodin. [39]

#### Dávkování

Dávkování v případě acebutololu by mělo být individuální na základě reakcí pacientů. Jako úvodní dávka bývá podáváno 400 mg a doporučuje se užívat celou dávku najednou ráno. Jsou ovšem ojedinělé případy, kdy je lepší užívat dávku dvakrát denně ráno a večer v dávkách 200 mg. [41]

### 1.5.2 Amlodipin

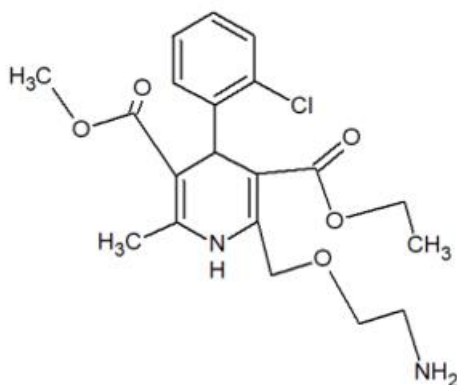
#### Chemické a fyzikální vlastnosti

Sumární vzorec:  $C_{20}H_{25}ClN_2O_5$

M = 408.9 g/mol

Systematický název:

3-O-ethyl 5-O-methyl 2-(2-aminoethoxymethyl)-4-(2chlorfenyl)-6-methyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dikarboxylát [42]



**Obrázek 9: Vzorec amlodipinu**

#### Indikace, kontraindikace a nežádoucí účinky

Amlodipin je indikován při hypertenzi, onemocnění koronárních tepen, chronické stabilní *angina pectoris* a vazospastické anginy. [42]

Kontraindikací jsou alergie na amlodipin, nemoci jater či onemocnění srdeční chlopně. Nemí znám účinek léku na dítě v době těhotenství či laktace. Děti mladší 6 let nesmí amlodipin užívat. [43]

V případě chronické hypertenze v těhotenství je ideálním kandidátem amlodipin-besylát a to díky svému dlouhodobému poločasu, nízkým nákladům, pozitivním vedlejším účinkům a nízkému dávkování. Ovšem neexistuje dostatečné množství studií, které by tohoto kandidáta podpořily. Tento nedostatek informací pravděpodobně brání užívání amlodipinu v době těhotenství či po porodu. [44]

Mezi nežádoucí účinky patří bušení srdce, bolesti na hrudi, ospalost nebo lehký pocit na omdlení. Při závažných příznacích jako je alergická reakce na amlodipin nebo kopřivka, potíže s dýcháním či otok tváře, je nutno vyhledat ihned lékařskou pomoc. [43]

#### Mechanismus účinku

Amlodipin je považován za periferní arteriální vazodilatátor, který svým účinkem působí přímo na hladký sval cév, což vede ke snížení periferní vaskulární rezistence, a to způsobuje snížení krevního tlaku. Inhibuje přítok vápenatých iontů do vaskulárního hladkého a srdečního svalstva. Následkem sníženého přítoku vápenatých iontů na myokard je ionotropní a chronotropní účinek. Amlodipin také blokuje přísun iontů vápníku přes buněčné membrány. [42], [45]

#### Farmakodynamika

Amlodipin má silnou afinitu k buněčným membránám, inhibuje vybrané membránové kanály pro  $\text{Ca}^{2+}$  ionty. Unikátní vazebné vlastnosti tohoto léčiva umožňují jeho dlouhodobý účinek a méně častý dávkovací režim. Po podání terapeutických dávek amlodipinu pacientům s diagnózou hypertenze způsobuje amlodipin vazodilataci, což má za následek snížení krevního tlaku. Při jeho dlouhodobém používání k žádnému klinicky významnému ovlivnění srdeční frekvence nedochází, nemění se ani hladiny katecholaminů v plazmě. Akutní intravenózní podání amlodipinu snižuje arteriální krevní tlak a zvyšuje srdeční frekvenci u pacientů s chronickou stabilní *angina pectoris*, nicméně chronické perorální podávání amlodipinu v klinických studiích nezpůsobilo u pacientů s diagnózou *angina pectoris* významné změny srdeční frekvence ani krevního tlaku. [42]

#### Farmakokinetika

Amlodipin se vstřebává pomalu a téměř úplně z gastrointestinálního traktu. Nejvyšší koncentrace v plazmě dosahuje 6–12 hodin po perorálním podání. Biologická dostupnost je 64-90 %. Absorpce není ovlivněna potravou. Amlodipin je z 10 % vylučován jako nezměněné léčivo močí. [43]

#### Dávkování

Za obvyklou počáteční dávku můžeme u amlodipinu považovat 5 mg jednou denně. V případě, že je třeba zvýšit dávku, může se podávat 10 mg jednou denně. [46]

### 1.5.3 Doxazosin

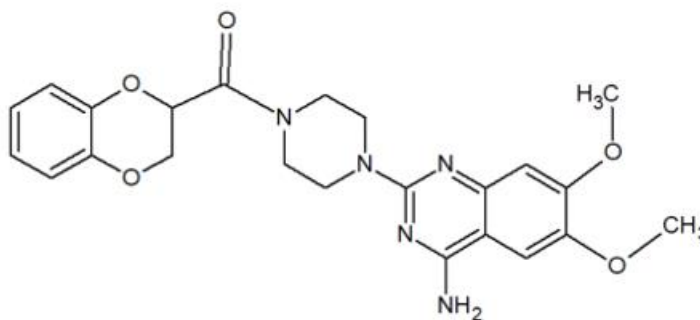
#### Chemické a fyzikální vlastnosti

Sumární vzorec: C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>

M = 451.483 g/mol

Systematický název:

[4-(4-mino-6,7-dimethoxychinazolin-2-yl)piperazin-1-yl]-(2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-3-yl)methanon [47]



*Obrázek 10: Vzorec doxazosinu*

#### Indikace, kontraindikace a nežádoucí účinky

Užívá se pro léčbu hypertenze a symptomů obstrukce močových cest, které jsou způsobené benigní hypertrofií prostaty. Kontraindikací je kojení, těhotenství a alergie na léčivo. Nežádoucím účinkem je hypotenze, synkopa či závratě, ve velmi vzácných případech priapismus čili přetrvávající bolestivá erekce. [48]

#### Mechanismus účinku

Doxazosin selektivně inhibuje postsynaptické alfa-1 receptory hladkého svalstva cév. Tím dochází ke snížení systémové periferní vaskulární rezistence, snižuje se krevní tlak a zároveň má minimální účinky na srdeční frekvenci. Aktivace alfa-1 receptorů buněk prostaty a močového měchýře noradrenalinem vede ke kontrakci svalové tkáně, což brání toku moči a může způsobit benigní hypertrofii prostaty. Antagonismus alfa-1 receptorů vede k relaxaci hladkého svalstva v močovém měchýři a prostatě, výsledkem je nižší frekvence močení a silnější proud moči. [48]

#### Farmakodynamika

Doxazosin snižuje krevní tlak jak ve stoje, tak v leže, zmírňuje příznaky benigní hypertrofie prostaty a může způsobit hypotenzi. Nejčastěji k tomu dojde ve svislé poloze, což u pacienta

působí závratě. Již první dávka může navodit tyto vedlejší účinky. Riziko je tedy vysoké, hlavně při změnách dávkování. Léčba by měla být zahájena dávkou 1 mg nezávisle na hmotnosti pacienta a následně by mělo dojít ke zvyšování dávky až na požadovanou terapeutickou dávku. Překvapující je, že doxazosin má příznivé účinky na plazmatické lipidy. Snižuje hladiny LDL cholesterolu, a naopak zvyšuje hladiny HDL cholesterolu. [48]

#### Farmakokinetika

Doxazosin se rychle vstřebává v gastrointestinálním traktu a maximálních koncentrací dosáhne za 2-3 hodiny po podání. Biologická dostupnost je přibližně 60-70 %. Není prokázáno, že by absorpci narušovala strava. V játrech je demetylován. Mezi enzymy podílející se na biotransformaci doxazosinu patří CYP2C19, CYP2D6, CYP2C19 a CYP3A4. V nezměněné podobě se vylučuje asi 5 % dávky stolicí a močí. [48]

#### Dávkování

Při léčbě hypertenze se doxazosin podává v úvodní dávce 1 mg denně, nejlépe ráno nebo večer. Dávkování lze po dvou týdnech zvýšit na 2 mg a pokud je to nutné, až na 4 mg denně. U většiny pacientů je tato dávka dostačující, ale v případě nezbytné nutnosti je možnost zvýšit dávku na 8 mg. [49]

### **1.5.4 Chlortalidon**

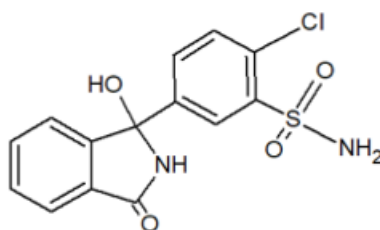
#### Chemické a fyzikální vlastnosti

Sumární vzorec:  $C_{14}H_{11}ClN_2O_4S$

$M = 338.762 \text{ g/mol}$

Systematický název:

2-chlor-5-(1-hydroxy-3-oxo-2H-isoindol-1-yl)benzensulfonamid [50]



**Obrázek 11: Vzorec chlortalidonu**

### Indikace, kontraindikace a nežádoucí účinky

Chlortalidon se užívá při léčbě hypertenze. Může být použit jako jediné léčivo, popřípadě ke zvýšení účinku spolu s jinými antihypertenzivy. Také bývá indikován jako doplňková terapie při edémech, které jsou spojené s městnavým srdečním selháním, jaterní cirhózou, při léčbě kortikosteroidy a estrogeny. [50]

Naopak kontraindikován je při přecitlivělosti na chlortalidon nebo další příbuzné látky, při selhání ledvin či glomerulonefritidě, dále při závažném selhání jater, hypokalemii a během těhotenství. [51]

### Mechanismus účinku

Jedná se o dlouhodobě působící thiazidové diuretikum, které přímo inhibuje resorpci sodíku a chloridů v distálním tubulu. Dochází ke zvýšené sekreci sodíku, chloridů, uhličitanů a draslíku, což následně vede k vylučování vody. Stejně jako jiné thiazidové diuretika, snižuje vylučování kyseliny močové a vápníku. Eliminační čas je přibližně 40 až 50 hodin. [52]

### Farmakodynamika

Chlortalidon zabraňuje tělu, aby vstřebávalo mnoho solí, které by způsobily zadržování vody v těle. Podporuje vylučování chloridů a sodíku. [53]

### Farmakokinetika

Přibližně 75 % léčiva se váže na plazmatické bílkoviny. Zhruba 50 % podané dávky se vylučuje v nezměněné podobě ledvinami, přičemž vylučování je charakterizováno dvoufázovou eliminací s rychlou fází následovanou pomalou sekreční fází. [50]

### Dávkování

Obvyklé dávkování u dospělých pacientů je 12,5 mg denně. V případě, že u pacientů není adekvátní reakce, může se dávka zvýšit na 25 mg denně. Další zvyšování dávky již nemá smysl, jelikož by nedošlo k žádnému nebo pouze malému poklesu krevního tlaku. [53]

## **1.5.5 Hydrochlorthiazid**

### Chemické a fyzikální vlastnosti

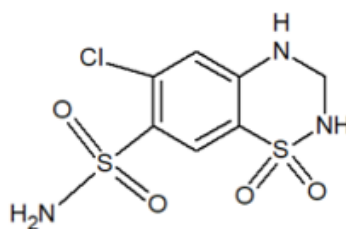
Sumární vzorec:  $C_7H_8ClN_3O_4S_2$

$M = 297,739 \text{ g/mol}$

Systematický název:

6-chlor-3,4-dihydro-2H-1, 2,4-benzothiadiazin-7-sulfonamid 1,1-dioxid

Jedná se o krystalický prášek bílé barvy, bez zápachu, mírně rozpustný ve vodě, ale rozpustný v acetonu a nerozpustný v etheru. [54], [55]



**Obrázek 12: Vzorec hydrochlorthiazidu**

### Mechanismus účinku

Hydrochlorthiazid je thiazidové diuretikum, jehož mechanismus antihypertenzivního účinku není zcela znám. Snižuje objem krve tak, že snižuje reabsorpci Na<sup>+</sup> kationtů v distálním tubulu, zvyšuje tedy vylučování Na<sup>+</sup> kationtů a vody z organismu močí. [56]

### Indikace, kontraindikace a nežádoucí účinky

Hydrochlorthiazid patří do skupiny diuretik, po jehož podání se vylučuje z organismu voda hromadící se při takových stavech jako je srdeční selhání, onemocnění jater nebo onemocnění ledvin. [57]

Mezi nežádoucí vedlejší účinky mohou patřit bolesti hlavy, závratě, nevolnost a zvracení, fotosenzitivita. Pro zmírnění závratí se doporučuje vstávat pomalu. Může dojít i k přílišné ztrátě vody, tedy až k dehydrataci. Pokud se objeví alergická reakce, je třeba vyhledat lékařskou pomoc. [57]

Kontraindikací může být porucha funkce jater, poškození ledvin nebo přecitlivělost na léčiva odvozená od sulfonamidů. Nedoporučuje se podávat v těhotenství, v druhém a třetím trimestru, a u pacientů s cholestázou. [55], [58]

Existují studie, které se zabývají souvislostí mezi použitím tohoto diuretického antihypertenziva a vznikem spinocelulárního karcinomu rtu. Jedná se tedy o látku možná karcinogenní pro člověka. Proto by používání hydrochlorthiazidu mělo být pečlivě zváženo. [59]

### Farmakodynamika

Hydrochlorthiazid brání reabsorpci sodíku a vody z distálního stočeného kanálku, což následně umožňuje zvýšené vylučování vody močí. Má široké terapeutické okno, jelikož

dávky se pohybují od 25 do 100 mg. Měl by být užíván obezřetně u pacientů se sníženou funkcí ledvin nebo jater. [54]

#### Farmakokinetika

V těle není metabolizován a rychle se vylučuje ledvinami, přibližně 60 % je vyloučeno během 48 hodin. Poločas eliminace je 5,6-14,8 hodin. [60]

Vstřebává se rychle v gastrointestinálním traktu a absolutní biologická dostupnost je přibližně 60-80 % dávky po perorálním podání. Váže se na proteiny asi z 67 %. Může procházet placentární bariérou, ale nikoliv hematoencefalickou, vylučuje se do mateřského mléka. [54],[55],[58]

#### Dávkování

Lék se užívá jednou denně ráno s jídlem nebo bez jídla. Užívá se perorálně. Je dobré užívat ho 4 hodiny před spaním, aby se pacient v noci nebudil na močení. Při hypertenzi se užívá 25-50 mg denně. Při otoku je počáteční dávka 50-100 mg denně, poté je dávka snížena na 5 mg/kg týdně. U dětí je doporučená dávka 2,5 mg/kg denně ve dvou dílčích dávkách. [57]

### **1.5.6 Metoprolol**

#### Chemické a fyzikální vlastnosti

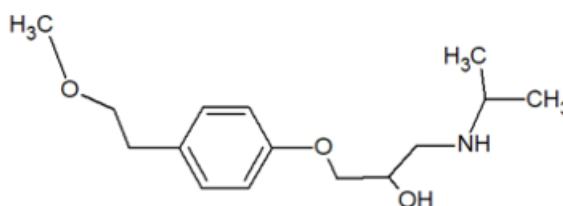
Sumární vzorec:  $C_{15}H_{25}NO_3$

M = 267.369 g/mol

Systematický název:

1-[4-(2-methoxyethyl)fenoxy]-3-(propan-2-ylamino)propan-2-ol

Je to bílý krystalický prášek, bez zápachu a dobře rozpustný ve vodě. [61], [62], [63]



**Obrázek 13: Vzorec metoprololu**

#### Indikace, kontraindikace a nežádoucí účinky

Indikací k užití metoprololu je hypertenze, *angina pectoris* a infarkt myokardu. [63]

Metoprolol je kontraindikován v průběhu gravidity, či laktace, jelikož může přecházet do mateřského mléka. Také není vhodný pro děti mladší 6 let a u lidí trpících bradykardií. Mezi nežádoucí účinky patří závratě, únava, nevolnost, zvracení, bolesti břicha, dále pak zácpa, vyrážky, studené ruce a nohy. Může dojít i k závažnějším nežádoucím účinkům, jako opuchlé ruce a nohy, neobvyklé zvýšení hmotnosti, rychlé bušení srdce a zadýchávání se. [64]

#### Mechanismus účinku

Metoprolol je  $\beta_1$ -selektivním blokátorem adrenergických receptorů. Tento účinek však není absolutní, protože při vyšších koncentracích v plazmě také inhibuje  $\beta_2$ -adrenoreceptory, které se nacházejí hlavně v průduškách a cévní svalovině. [63]

Mechanismus antihypertenzivních účinků beta-blokátorů nebyl zcela objasněn, avšak bylo navrženo několik možných mechanismů, potlačení aktivity reninu a kompetitivní antagonismus na adrenergických receptorech periferních neuronů, což vede ke snížení srdečního výdeje. Antagonistickým účinkem metoprolol snižuje nároky srdce na kyslík, proto je vhodný při *angina pectoris*. [63]

#### Farmakodynamika

Významný účinek beta-blokátoru nastává během jedné hodiny po perorálním podání a jeho trvání závisí na množství dávky. V několika studiích vedlo intravenózní podání metoprololu pacientům s akutním infarktem myokardu k snížení srdeční frekvence, systolického krevního tlaku a srdečního výdeje, zatímco diastolický krevní tlak zůstal stejný. [63]

#### Farmakokinetika

Metoprolol se užívá perorálně a pouze 10 % je v plazmě vázáno na albumin. Je známo, že prochází placentou a také se nachází v mateřském mléce. Rovněž se může dostat přes hematoencefalickou bariéru, a dokonce byly v mozkomíšním moku zaznamenány hladiny blízké hladinám v plazmě. Primárně je metoprolol metabolizován CYP2D6. Eliminace probíhá hlavně v játrech, přičemž poločas je 3-4 hodiny. U většiny pacientů se méně než 5 % perorálně podané dávky vylučuje jako nezměněné léčivo močí. [63]

#### Dávkování

Obvykle se užívá metoprolol 100 mg denně, a to v jedné nebo ve dvou dávkách. U pacientů, kteří užívají tablety s dlouhodobým účinkem, se pohybuje počáteční dávka v rozmezí 25-100 mg jednou za den. [64]

### 1.5.7 Perindopril

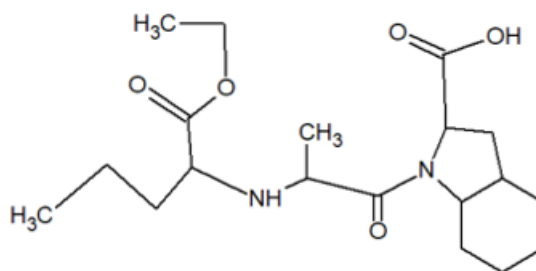
#### Fyzikální a chemické vlastnosti

Sumární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

M = 368.474 g/mol

Systematický název:

(2S,3aS,7aS)-1-[(2S)-2-[[[(2S)-1-ethoxy-1-oxopentan-2-yl]amino]propanoyl]-2,3,3a,4,5,6,7,7a-oktahydroindol-2-karboxylová kyselina [65]



**Obrázek 14: Vzorec perindoprilu**

#### Indikace, kontraindikace a nežádoucí účinky

Perindopril se užívá v terapii mírné až středně závažné esenciální hypertenzi, dále mírného až středně závažného městnavého srdečního selhání a snižuje kardiovaskulární riziko u jedinců s hypertenzí nebo infarktem myokardu. Právě inhibitory ACE, mezi něž perindopril patří, se doporučují jako první léčba u pacientů se srdečním městnavým selháním bez retence tekutin a u pacientů s retencí tekutin se používají v kombinaci s diuretiky. Mimo to je indikován pacientům s ischemickou chorobou srdeční anebo v kombinaci s indapandinem se užívá k prevenci cévní mozkové příhody. [66], [67], [68]

Jedním z nejčastěji se vyskytujících nežádoucích účinků je dráždivý kašel a bývá i důvodem k přerušení léčby. Závažnými nežádoucími reakcemi mohou být alergické reakce či angioneurotický edém. [67]

Kontraindikací je těhotenství, laktace, porfyrie či hyperkalemie, dále přecitlivělost na inhibitory ACE a stenózy obou renálních tepen. [67]

#### Mechanismus účinku

Jedná se o proléčivo, které se po perorálním podání resorbuje a je hydrolyzováno na aktivní metabolit, kterým je perindoprilát. Aktivní metabolit je asi 1000x silnější inhibitor ACE, než je perindopril.

Perindoprilát je kompetitivní inhibitor ACE s vysokou afinitou. Ke zvýšení koncentrace angiotenzinu I a naopak k poklesu koncentrace angiotenzinu II v plazmě dochází v důsledku inhibice ACE. Následkem je pokles cévní rezistence, krevního tlaku, současně se zvyšuje aktivita reninu a poklesne koncentrace aldosteronu v plazmě. [67], [68]

#### Farmakodynamika

Perindoprilát snižuje krevní tlak tím, že má antagonistický účinek na RAAS. Perindoprilát způsobuje zvýšení aktivity reninu. [66]

#### Farmakokinetika

Perindopril se po perorálním podání rychle vstřebává a maximální koncentrace v plazmě dosahuje přibližně za 1 hodinu. Biologická dostupnost se pohybuje v rozmezí 65 až 75 %. Po absorpci dochází k hydrolýze perindoprilu na perindoprilát, jehož biologická dostupnost je 20 %. Strava snižuje míru biotransformace na perindoprilát a jeho biologickou dostupnost. V moči se po perorální dávce objevuje pouze 4 až 12 % dávky v nezměněné podobě. Bylo identifikováno šest metabolitů a to perindoprilát, perindopril-glukuronid, perindoprilát-glukuronid, perindopril-laktam a dva perindoprilát-laktamy, ovšem farmakologicky aktivní je pouze perindoprilát a hlavními cirkulujícími metabolity jsou perindoprilát a perindoprilát-glukuronid. [66]

#### Dávkování

Užívání perindoprilu v případě hypertenze je doporučeno jednou denně, a to ráno před jídlem. Úvodní dávka by měla být 4 mg a po jednom měsíci užívání je možno zvýšit dávku na 8 mg. Jsou ovšem i případy, kdy je doporučeno začít s úvodní dávkou 2 mg denně, například u srdečního selhání či u pacientů s cerebrovaskulárním onemocněním. [67]

### **1.5.8 Telmisartan**

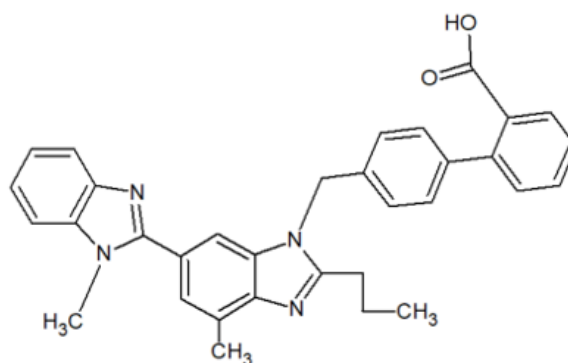
#### Fyzikální a chemické vlastnosti

Sumární vzorec:  $C_{33}H_{30}N_4O_2$

$M = 514,6169\text{g/mol}$

Systematický vzorec:

2-[4-[[4-methyl-6-(1-methylbenzimidazol-2-yl)-2-propylbenzimidazol-1-yl]methyl]fenyl]benzoová kyselina [69]



**Obrázek 15: Vzorec telmisartanu**

### Indikace, kontraindikace a nežádoucí účinky

Nejčastěji se užívá jako látka s antihypertenzivními účinky. Může se používat samostatně nebo v kombinaci s jinými skupinami antihypertenziv. Také se používá při léčbě diabetické nefropatie u hypertenzích pacientů s *diabetes mellitus* 2. typu, stejně jako při léčbě městnavého srdečního selhání. Mimo to se využívá také spolu se statiny ke snížení kardiovaskulární morbidity a mortality. [69], [70]

Jako nejčastější kontraindikace se uvádí známá přecitlivělost na účinnou látku. Ve druhém a třetím trimestru je telmisartan také kontraindikován, jelikož je známo, že léčivo ovlivňuje RAAS a takováto léčiva mohou vést k morbiditě a mortalitě plodu. Mezi další kontraindikace patří těžká biliární cirhóza nebo biliární obstrukce. Mezi nejčastěji se vyskytující nežádoucí účinky při užívání telmisartanu jsou bolesti zad, infekce horních cest dýchacích či průjem. Ovšem výskyt nežádoucích účinků je velmi nízký, dokonce srovnatelný s užíváním placebo. Nebyla prokázána závislost na dávce a ani nepříznivý vliv na metabolismus sacharidů nebo lipidů. Jako antagonistu angiotenzinu II nezasahuje do metabolismu kininů, což vysvětluje nepřítomnost suchého kašle, který se vyskytuje jako nežádoucí účinek při léčbě inhibitory ACE. [71]

### Mechanismus působení

Telmisartan interferuje s vazbou angiotenzinu II na receptor AT1. Jelikož má angiotensin II vazokonstrikční účinky, blokování jeho účinku má za následek snížení rezistence cév. Telmisartan ovšem neinhibuje ACE, iontové kanály či účinek hormonů. Některé studie naznačují, že je částečným agonistou receptoru  $\gamma$ -aktivovaného proliferátorem peroxisomu (PPAR $\gamma$ , angl. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ ). Telmisartan tak může zlepšit metabolismus sacharidů a pozitivně ovlivnit inzulinovou rezistenci, aniž by měl vedlejší účinky, jako aktivátory PPAR $\gamma$ . [69], [70]

### Farmakodynamika

Telmisartan je účinný antagonist angiotensinu II, blokuje jeho vazokonstrikční účinky a sekreci aldosteronu. [69]

### Farmakokinetika

Po perorálním podávání jsou maximální koncentrace telmisartanu dosaženy za 0,5-1,5 hodiny po podání. Absolutní biologická dostupnost v dávce 40 mg a 160 mg byla 42 a 58 %. Vstřebávání telmisartanu je tedy značně závislé na dávkování. Strava mírně snižuje biologickou dostupnost. Dochází k poklesu zhruba o 6 % při podání 40 mg dávky a 19 % po dávce 160 mg s jídlem. [72]

Bývá metabolizován konjugací za vzniku farmakologicky neaktivního acylglukuronidu. Glukuronid mateřské sloučeniny je jediný metabolit, který byl identifikován v lidské plazmě a moči. Na metabolismu telmisartanu se nepodílí isoenzym cytochromu P450. [72], [73]

Po podání značeného C<sup>14</sup> telmisartanu cestou intravenózní nebo perorální, byla většina podané dávky (> 97 %) vyloučena stolicí, v moči bylo zjištěno pouze nepatrné množství (0,91 % a 0,49 % celkové radioaktivity). [72], [74]

### Dávkování

V případě telmisartanu je doporučená denní dávka 40 mg, a to v jedné dávce. Dávku lze snížit na 20 mg, popřípadě navýšit na 80 mg denně. Během 4 až 8 týdnů po zahájení léčby by se měl dostavit maximální terapeutický účinek. [71]

## **2 CÍL**

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout kvalitativní metodu na stanovení vybraných antihypertenziv v moči pacientů, získat jednoduchou analytickou metodu, s co nejjednodušší přípravou vzorku a univerzální analytickou koncovkou a proměřit vzorky moči pacientů metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 MATERIÁL

#### 3.1.1 Chemikálie

Všechny chemikálie jsou stabilní a jsou skladovány podle své povahy. Tyto reagenty jsou uchovávány při pokojové teplotě.

- Acetonitril pro HPLC ( $C_2H_3N$ , Mr 41,05), (Merck, Darmstadt, Německo)
- Butylamin ( $C_4H_{11}N$ , Mr 73,14), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Deionizovaná voda ( $H_2O$ , Mr 18; výroba na místě, výstupní kvalita 18,2 M $\Omega$ /cm)
- Dodecylsulfát sodný ( $C_{12}H_{25}O_4SNa$ , Mr 288,38), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kofein, roztok 1 mg/ml v MeOH, ( $C_8H_{10}N_4O_2$ , Mr 194,19), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina octová ( $C_2H_4O_2$ , Mr 60,05), (Merck, Darmstadt, Německo)
- Methanol ( $CH_4O$ , Mr 32,04) (BioSolve, Valkenswaard, Nizozemí)
- Mravenčan amonný ( $CH_5O_2N$ , Mr 63,06), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- MRFA-Peptid, (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Taurocholát sodný ( $C_{26}H_{44}NNaO_7S \cdot xH_2O$ , Mr 537,68), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Ultramark 1621 ( $C_{36}H_{18}F_{52}N_3O_6P_3$ , Mr 1621, 00), (abcr, Karlsruhe, Německo)

#### 3.1.2 Biologické vzorky

##### Vzorky moči

Vzorky moči pacientů, kteří se léčí antihypertenzivy, uvedené v tabulce v příloze 1, vzorky pocházejí z ordinace MUDr. Zadáka a dalších poraden (Klinika gerontologická a metabolická, Fakultní nemocnice v Hradci Králové). Tyto vzorky byly poskytovány na základě kladného stanoviska Etické komise Fakultní nemocnice Hradec Králové, č. j. 201501 S09P, vydaného pro spolupráci této fakultní nemocnice s VUOS a. s. v rámci společného projektu hledání analytických metod pro stanovování biologických markerů.

Vzorky byly skladovány do prvního měření při teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.1.3 Pomůcky a přístroje

- Automatické pipety Eppendorf Research Plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- PTFE filtry na injekční stříkačky, 13 mm, 0,2  $\mu\text{m}$  (Agilent, Santa Clara, CA, USA)

- Injekční stříkačky BRAUN, 2 ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Kombinovaná chladnička s mrazničkou (Philips, Amsterdam, Nizozemí)
- Krimповací kleště pro uzávěry 11 mm (Hewlett Packard, Kalifornie, USA)
- Krimповací víčka 11 mm (Agilent, Santa Clara, CA, USA)
- Mrazák Dairei ULTF 80 (Biotech, Kodaň, Dánsko)
- Odměrné válce a kádinky
- Ochranné pomůcky: brýle, rukavice
- Plastové pipety (Brand, Praha, ČR)
- Skleněné vialky 2ml (Agilent, Santa Clara, CA, USA)
- Skleněné vialky 5 ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Ultrazvuková lázeň Kraintek K5 (Kraintek.s.r.o., Hradec Králové, ČR)
  
- Hmotnostní analyzátor Q Exactive Focus, (Dionex, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- Iontový zdroj HESI Probe, Mark2 w/32G Metal Needle, (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Kolona Sulpeco C18, 50 mm x 2,1 mm x 2,7 μm (Agilent, Santa Clara, CA, USA)
- Vysokotlaký kapalinový chromatograf Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
  - Autosampler UltiMate3000 RS, (Dionex, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
  - Pumpa UltiMate3000 RS, (Dionex, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

#### Software

- Chromeleon, verze 7.2.10 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Xcalibur, verze 3.0.63 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

### 3.1.4 Pracovní roztoky

#### Zásobní roztok mravenčanu amonného, HCOONH<sub>4</sub> (1 mol/l)

V odměrné baňce o objemu 10 ml bylo rozpuštěno  $0,63 \pm 0,01$  g HCOONH<sub>4</sub> v asi 5 ml vody. Roztok byl poté promíchán a doplněn vodou po rysku.

#### Mobilní fáze A

Mobilní fáze A byla připravena z vody a mravenčanu amonného. Byl smíchán 1 litr vody s 5 ml 1mol/l HCOONH<sub>4</sub>.

### Mobilní fáze B

Mobilní fáze B byla připravena z methanolu a mravenčanu amonného. Byl smíchán 1 litr metanolu s 5 ml 1mol/l HCOONH<sub>4</sub>.

### Kalibrační roztoky pro pozitivní mód měření

Tento kalibrační roztok se skládá z kofeinu, MRFA, Ultramark1621 a n-butylaminu ve směsi acetonitrilu, methanolu a vody obsahující 1% kyselinu octovou.

Do čisté suché 10 ml odměrné baňky chráněné před světlem bylo pipetováno 20 µl zásobního roztoku kofeinu, bylo přidáno 100 µl roztoku MRFA, 100 µl zásobního roztoku Ultramark 1621 a 100 µl zásobního roztoku n-butylaminu. Následně bylo k směsi přidáno 100 µl koncentrované kyseliny octové a 5 ml acetonitrilu. Objem byl doplněn po rysku směsí methanolu a vody v poměru 1:1. Směs byla důkladně promíchána a část pipetována do vialky z hnědého skla.

### Kalibrační roztoky pro negativní mód měření

Kalibrační roztok je směsí dodecylsulfátu sodného, taurocholátu sodného a Ultramark 1621 ve směsi acetonitrilu, methanolu a vody obsahující 1% kyselinu octovou.

Do čisté suché 10 ml odměrné baňky chráněné před světlem bylo pipetováno 100 µl zásobního roztoku dodecylsulfátu sodného, bylo přidáno 100 µl taurocholátu sodného, 100 µl zásobního roztoku Ultramark 1621, 100 µl ledové kyseliny octové a 5 ml acetonitrilu. Směs byla doplněna po rysku vodou a methanolem v poměru 1:1. Směs byla důkladně promíchána a část pipetována do vialky z hnědého skla.

## **3.2 POSTUP STANOVENÍ VYBRANÝCH LÉČIV A JEJICH METABOLITŮ V MOČI METODOU KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE S HMOTNOSTNÍ DETEKCÍ**

### **3.2.1 Příprava patientských vzorků**

Vzorky moči od pacientů v plastových zkumavkách byly vloženy do ultrazvukové lázně, aby došlo k rychlejšímu rozmražení. Poté byl obsah zkumavek promíchán a 1 ml moče byl pipetován do skleněné vialky. K vzorku moči byl přidán 1 ml MeOH, obsah vialky promíchán a následně při pokojové teplotě ponechán 20 minut srážet. Po vysrážení byl supernatant přefiltrován do menší skleněné vialky. Vialka byla uzavřena víčkem a vložena do autosampleru.

### **3.2.2 Chromatografická analýza**

Mobilní fáze A: 5mmol/l mravenčan amonný:voda (1:200, v/v)

Mobilní fáze B: 5mmol/l mravenčan amonný:methanol (1:200 v/v)

Průtok mobilní fáze: 0,400 ml/min

Dávkovaný objem: 1 µl

Teplota kolony: 30 °C

#### HPLC gradient

Čas (minuty)	MF A (%)	MF B (%)
0	60	40
1,0	60	40
4,0	5	95
8,0	5	95
8,1	60	40

Doba analýzy: 12 minut

#### MS parametry pro pozitivní mód

Průtok dusíku: 40 l/min

Průtok pomocného plynu 10 l/min

Teplota iontového zdroje: 350 °C

Napětí na vstupní kapiláře: 3,00 kV

Sken m/z: 50,00 -750,00

Start monitorování MS: 0 minut

Konec monitorování MS: 12 minut

#### MS parametry pro negativní mód

Průtok dusíku: 40 l/min

Průtok pomocného plynu 10 l/min

Teplota iontového zdroje: 350 °C

Napětí na vstupní kapiláře: 2,50 kV

Sken m/z: 50,00 – 750,00

Start monitorování MS: 0 minut

Konec monitorování MS: 12 minut

### 3.2.3 Kalibrace hmotnostního rozsahu

Před každým měřením vzorků byla provedena kalibrace. Hmotnostní spektrometr byl nastaven pro přímý vstup roztoků realizovaný skleněnou stříkačkou o objemu 500 µl s lineárním dávkovačem. Nejprve byl přístroj promyt methanolem a následně byly dávkovány kalibrační roztoky a spuštěn automatický kalibrační program. Kalibrační roztoky byly dva, přičemž jeden sloužil ke kalibraci v pozitivním módu a druhý v negativním módu.

#### Pozitivní mód

Průtok:	15 µl/min
Průtok dusíku:	5 l/min
Průtok pomocného plynu	-
Teplota:	240 °C
Napětí na vstupní kapiláře:	3,00 kV
Rozmezí hodnot:	150,00 – 2000,00 Da

#### Negativní mód

Průtok:	15 µl/min
Průtok dusíku:	8 l/min
Průtok pomocného plynu	-
Teplota:	320 °C
Napětí na vstupní kapiláře:	3,50 kV
Rozmezí hodnot:	150,00 – 2000,00 Da

## 3.3 SLEDOVANÉ PARAMETRY

### 3.3.1 Senzitivita

Jedná se o schopnost metody rozpoznat, zda u člověka, který bere léky, jsou tyto látky analyticky rozpoznány, tedy metoda je pozitivní na tyto látky.

### 3.3.2 Specificita

Specificita metody je schopnost rozpoznat, zda člověk, který léky nebere má výsledky negativní, tedy žádná látka není analyticky rozpoznána.

## 3.4 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Pro zpracování získaných dat byl použit program MS Excel.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této práce bylo vyvinout metodiku pro sledování vybraných léčiv a jejich metabolitů v moči pacientů, za použití metody využívající hmotnostní spektrometrii jako detekci. Jako léčiva byla vybrána antihypertenziva vzhledem k jejich vysoké spotřebě v populaci. Měření probíhalo na úseku analytiky v laboratoři hmotnostní spektrometrie ve Výzkumném ústavu organických syntéz, přičemž byla snaha o zachování stejných podmínek měření jako je realizované při rutinním měření v klinické praxi. Metoda byla verifikována měřením 58 patientských vzorků moči, které byly dodány Fakultní nemocnicí v Hradci Králové. Všechny tyto vzorky a předané informace o nich jsou shrnuty v tabulce, která je součástí přílohy 1.

Jelikož nebyla možnost využít při práci standardy k látkám, které byly stanovovány, jednak proto, že nemusí být vždy dostupné, či by se vývoj metody neúměrně prodražil, tak nejprve muselo dojít k proměření všech vzorků a následnému vytvoření vlastní knihovny spekter. Získala se databáze látek, jejich pozorovaných iontů a retenčních časů. V předběžných experimentech se pro některá léčiva a jejich účinné látky nepodařilo v LC-MS záznamech najít odpovídající hmotnostní pík, ať z důvodu nepřítomnosti předpokládané látky, jejímu rychlému rozkladu, či malého počtu získaných vzorků, kde se mohly vyskytovat, a proto byly vybrány k dalšímu podrobnějšímu studiu jen některé. Mezi tyto vybrané látky patří acebutolol, amlodipin, doxazosin, hydrochlorthiazid, chlortalidon, metoprolol, perindoprilát, telmisartan a telmisartan-glukuronid.

Mimo naměření hmotnostních spekter každé vybrané látky byla i snaha o identifikaci vznikajících fragmentů z vybraných molekulových iontů. Hmoty těchto fragmentů byly následně využity pro vysoce selektivní analytickou metodu, kde kromě hmot daných látek byly zadávány i hmoty jejich fragmentů, které by potvrzovaly správnou identifikaci.

V následujícím textu jsou proto popsána jednotlivá spektra látek i následná fragmentace. Hmotnostní spektra byla extrahována po naměření vzorků moči. Všechny vzorky byly měřeny jak v pozitivním, tak negativním módu, jediný hydrochlorthiazid byl s výhodou hodnocen z negativního módu, ostatní látky z pozitivního módu. U každé látky je publikován TIC vzorku, chromatogram úzkého hmotnostního rozsahu zahrnující iont sledované molekuly a hmotnostní spektrum v retenčním čase maxima píku se zaměřením na vybraný charakteristický iont. Posledním obrázkem je teoretická předpověď signálu. V dalším experimentu šlo o získání fragmentačního spektra. Byly použity kolizní energie o hodnotě 10, 30 a 50 V a spektrum je vlastně součtem spekter získaných z těchto tří hodnot. Při

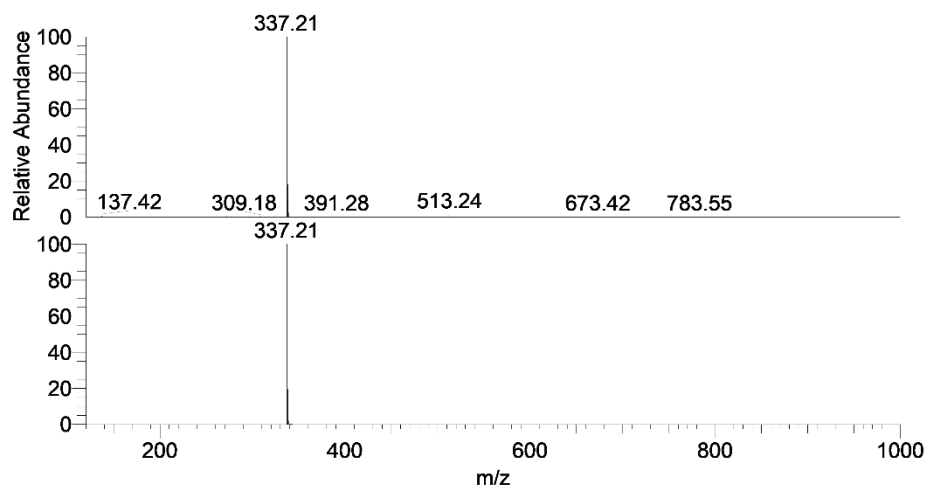
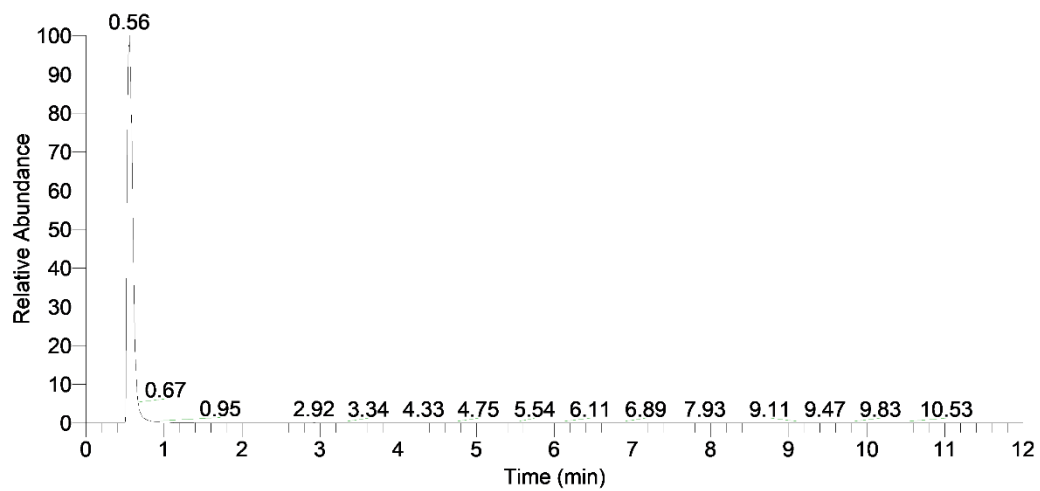
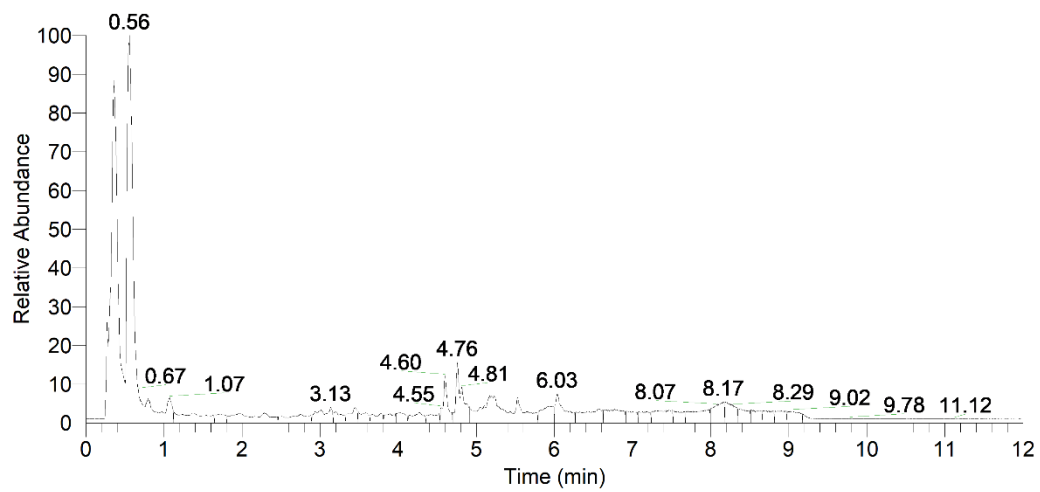
fragmentaci šlo o to zjistit, jaké fragmenty vznikají. Proto postačily tyto kolizní energie, a to i v případě, že vybraný iont nebyl úplně fragmentován.

### **ACEBUTOLOL**

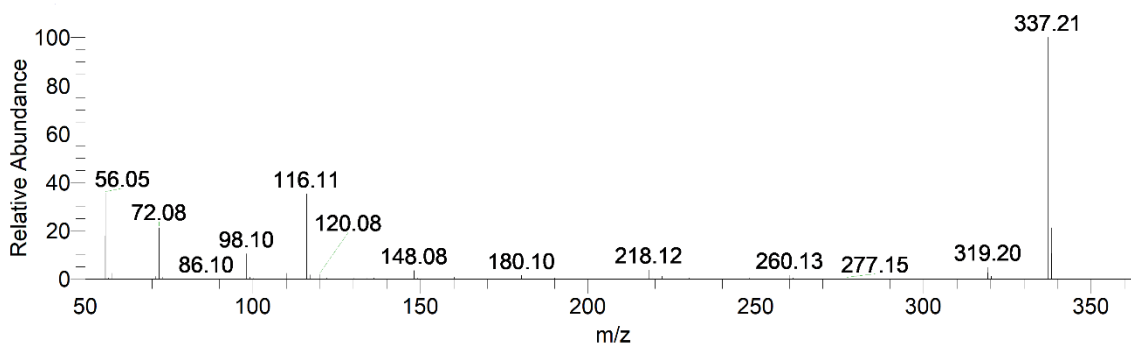
Na obrázku 16A je chromatogram celého iontového toku vzorku moči 7. Jedná se o závislost relativní intenzity (%) součtu všech iontů ze sledovaného hmotnostního intervalu na čase (minuty).

Na obrázku 16B vidíme interval hmot obsahující sledovanou hmotu 337,21 Da, tedy hledaný molekulový iont acebutololu. Jak vidíme v retenčním čase 0,56 minut, má signál s vysokou intenzitou a v hmotnostním okolí ho nenarušují jiné silné signály, které by odpovídaly dané hmotě. Hledaná látka se v moči zřejmě vyskytuje ve vysoké koncentraci, protože má patrný pík již v záznamu TIC, kde je však částečně překryt jiným píkem, odpovídající pravděpodobně kreatininu.

Obrázek 16C znázorňuje hmotnostní spektrum, tedy závislosti relativní intenzity na  $m/z$ . Hmotu 337,21 Da má vysokou intenzitu a odpovídá teoreticky zadané hmotě na základě výpočtu dle sumárního vzorce  $C_{18}H_{28}N_2O_4 + H^+$ .



Obrázek 16: A) SCAN mód, B) SIM mód, C) MS signál acebutololu



**Obrázek 17: Fragmentace iontu 337,21 Da (acebutolol)**

Na obrázku 17 je hmotnostní spektrum vzorku 7. Jedná se o spektrum v retenčním čase 0,56 minut po analýze Full  $ms^2$ , což znamená, že jde o fragmentaci vybraného iontu. Vybraný iont s hmotou 337,21 Da byl izolován a podroben fragmentaci při kolizních energiích 10, 30 a 50 V a fragmenty monitorovány v rozmezí  $m/z$  50,00-365,00 Da.

Jak z obrázku vidíme, tak se zde vyskytuje iont 337,21 Da. Tento iont je stabilní a fragmentuje se obtížně. Jelikož šlo o to zjistit, jaké fragmenty vznikají, tak nebylo zapotřebí použít vyšší kolizní energie, aby vybraný iont úplně fragmentoval.

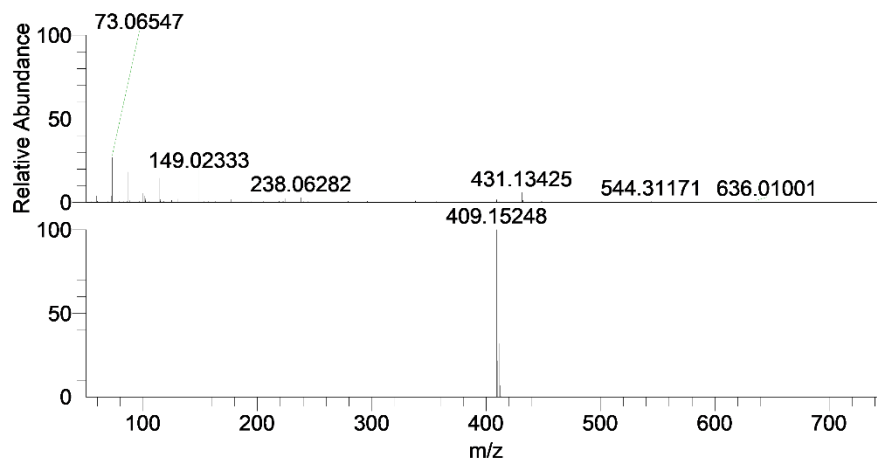
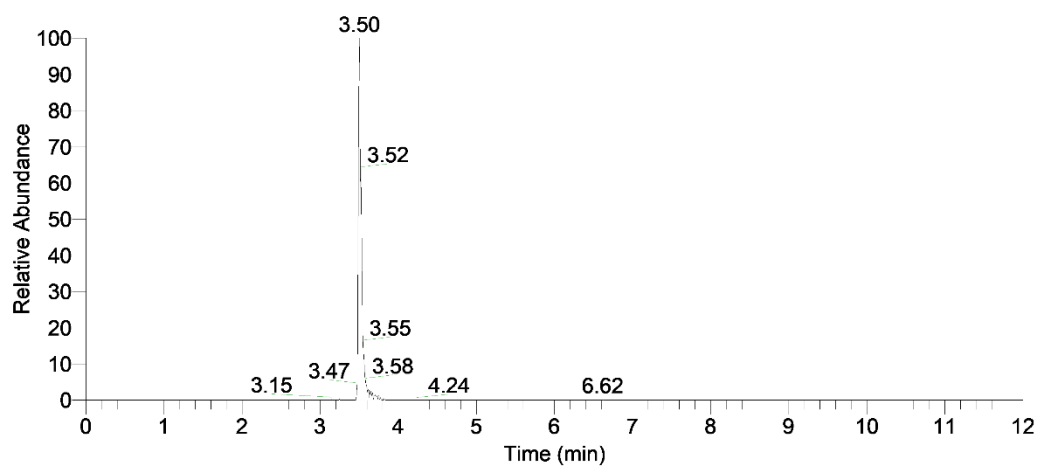
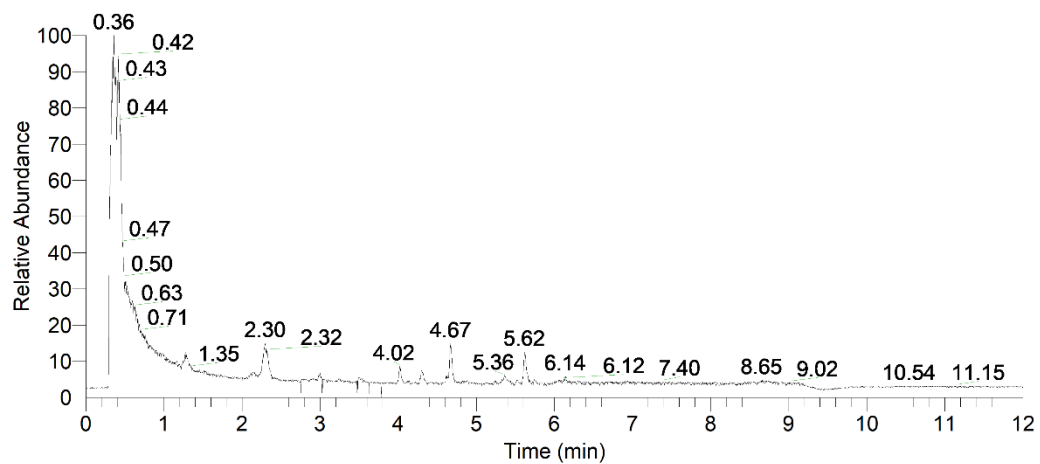
Fragment s hmotou 86,10 Da odpovídá  $C_4H_8NO$ , 72,08 Da  $C_4H_{10}N$ . Při odštěpení  $H_2O$  vznikne fragment odpovídající 319,20 Da. Signál při  $m/z$  116,11 Da byl přiřazen k iontu  $C_6H_{14}NO$ . Ve spektru se nacházejí další fragmenty se slabou intenzitou, které se nepodařilo identifikovat.

## **AMLODIPIN**

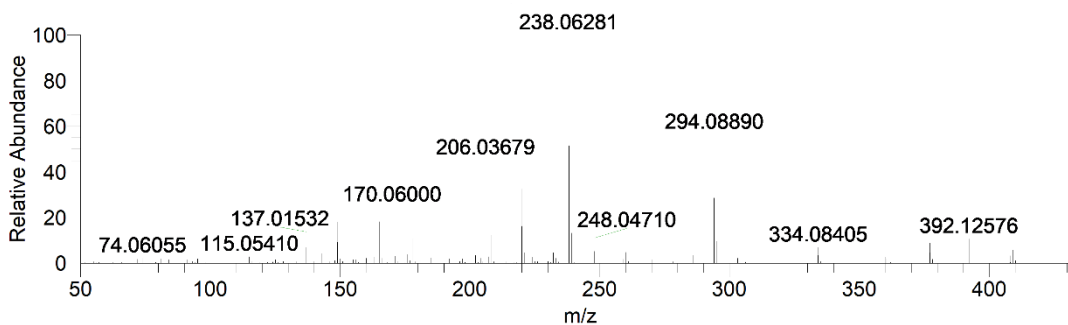
Na obrázku 18A je chromatogram celého iontového toku vzorku 29. Vybraný iont odpovídající  $m/z$  409,15 Da je detekován v retenčním čase 3,48 minut, což můžeme vidět na obrázku 18B, tedy na záznamu v SIM módu.

Proměřením vzorků obsahujících amlodipin se potvrdilo, že v tomto retenčním čase se látka objevuje pravidelně.

Na obrázku 18C vidíme porovnání spekter teoreticky zadané hmoty, vypočítané ze vzorce amlodipinu  $C_{20}H_{25}ClN_2O_5 + H^+$  se spektrem, které bylo získáno analýzou reálného vzorku. Na spektru lze vidět i ionty o jiných hmotách, ovšem hledaný iont 409,15 Da je natolik slabý, že na záznamu není patrný.



**Obrázek 18: A) SCAN mód, B) SIM mód, C) MS signál amlodipinu**



**Obrázek 19: Fragmentace iontu 409,15 Da (amlodipine)**

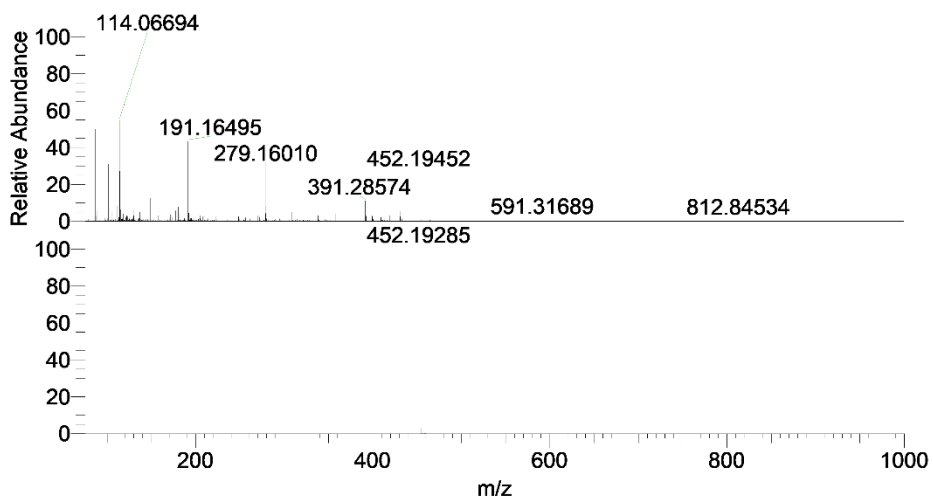
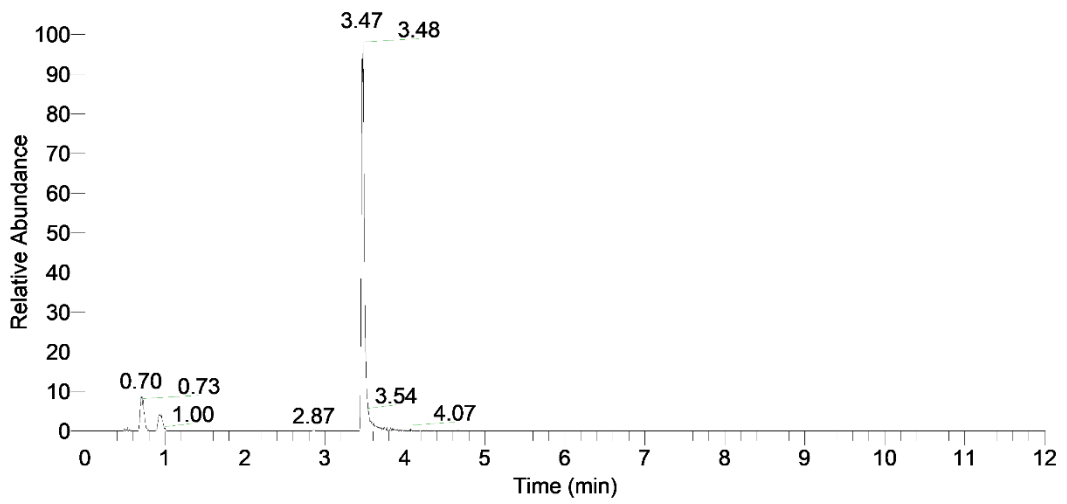
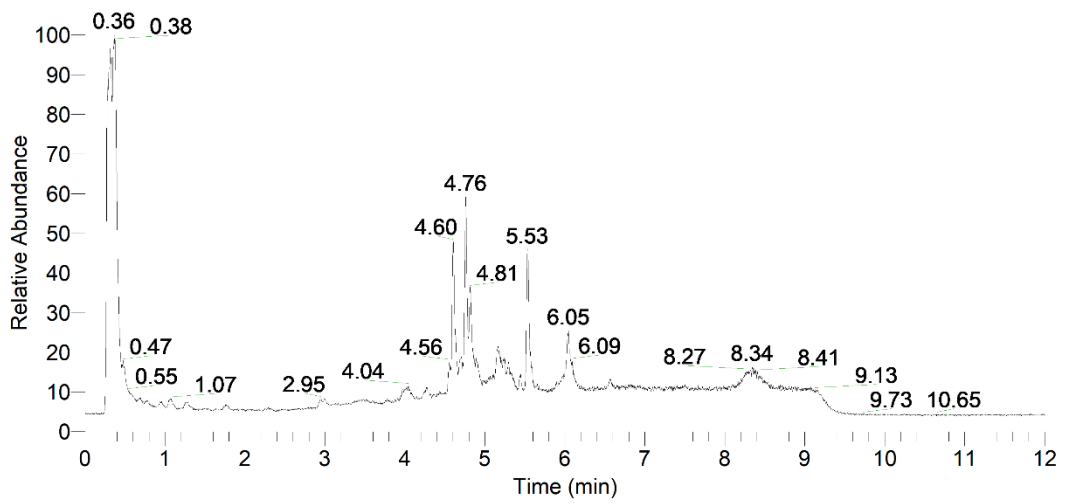
Na obrázku 19 vidíme fragmentaci námi vybraného iontu s hmotností 409,15 Da, který byl izolován a následně podroben fragmentaci. Obrázek byl pořízen při průměrné součtové kolizní energii 30 V. Jak vidíme, tak došlo k úplné fragmentaci, jelikož iont s  $m/z = 409,15$  Da už není pozorovatelný. Monitorování proběhlo v rozmezí  $m/z$  50,00-435,00 Da.

Fragment s hmotou 392,125 Da odpovídá  $C_{20}H_{23}ClNO_5$ , který vznikne po odštěpení  $NH_3$  z molekuly amlodipinu. Rozštěpením další vazby dojde ke vzniku fragmentu  $C_3H_8NO$ , který odpovídá hmotě 74,06 Da a zbylý fragment  $C_{17}H_{17}ClNO_4$  má hmotu 334,084 Da. Některé další fragmenty se nepodařilo identifikovat.

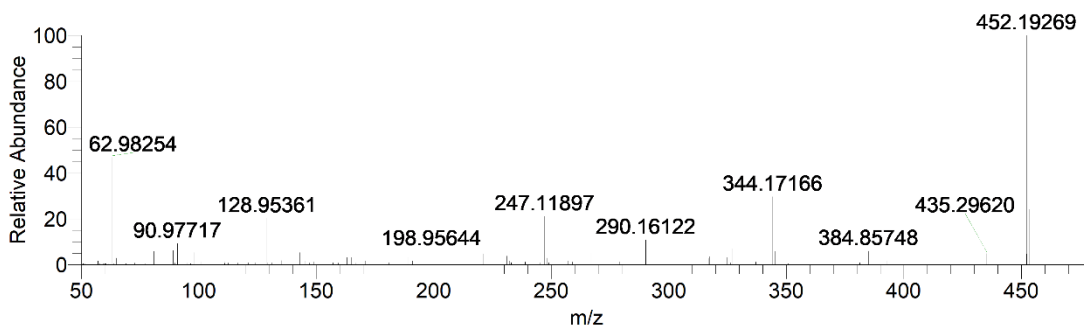
## DOXAZOSIN

Na obrázku 20A je chromatogram celého iontového toku vzorku moči 17. Vybraný iont, který pozorujeme na obrázku 20B hmotnostního spektra v retenčním čase 3,4 minut, má hodnotu  $m/z$  452,19 Da. Ve vzorku moči má slabý signál a v porovnání s teoreticky zadanou hodnotou podle vzorce doxazosinu, který je  $C_{23}H_{25}N_5O_5 + H^+$  se hodnoty hmot liší až na třetím místě za desetinnou částkou, což můžeme vidět na obrázku 20C.

Z obrázku 20B je patrné, že iont lze sledovat v retenčním čase 3,47 minut. V chromatogramu jsou patrné známky izobarických sloučenin, které tvoří píky v retenčním čase 0,73 a 1,00 minuty.



Obrázek 20: A) SCAN mód, B) SIM mód, C) MS signál doxazosinu



**Obrázek 21: Fragmentace iontu 452,19 Da (doxazosin)**

Na obrázku 21 lze vidět hmotnostní spektrum v retenčním čase 3,47 min po analýze full  $ms^2$ , tedy po fragmentaci vybraného iontu 452,19 Da ze vzorku 17. Tento iont fragmentuje na několik fragmentů, které mají poměrně silnou intenzitu, ale některé z nich se nepodařilo identifikovat. Samotný vybraný iont 452,19 Da se ve spektru vyskytuje s vysokou intenzitou, jelikož se obtížně fragmentuje. Monitorování proběhlo v rozmezí  $m/z$  50,00-480,00 Da a spektrum bylo pořízeno při průměrné součtové kolizní energii 30 V.

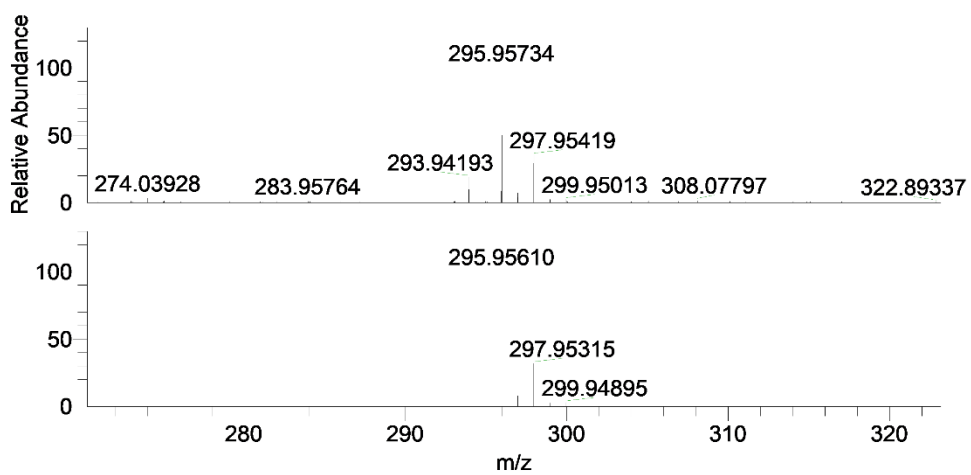
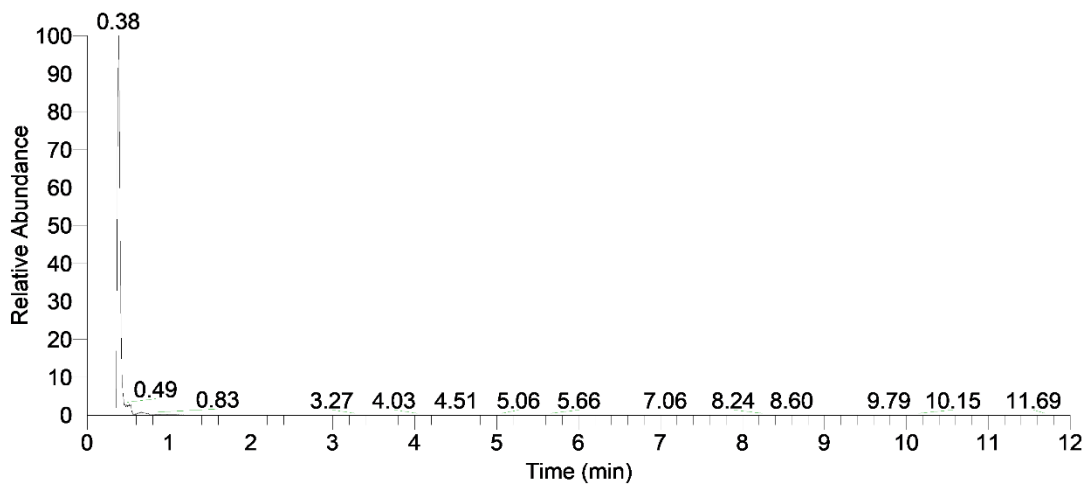
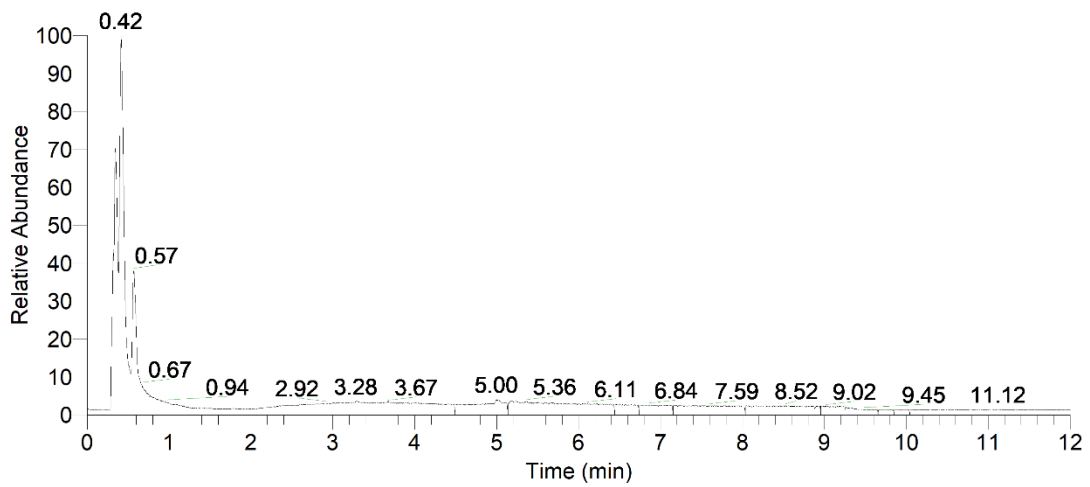
Například iont s  $m/z$  435,29 Da, který má poměrně slabou intenzitu, odpovídá fragmentu  $C_{23}H_{23}N_4O_5$ , vzniklý odštěpením  $NH_3$ . Fragment 247,11 Da, který má již silnější intenzitu, je fragment se sumárním vzorcem  $C_{13}H_{15}N_2O_3$ .

## HYDROCHLORThIAZID

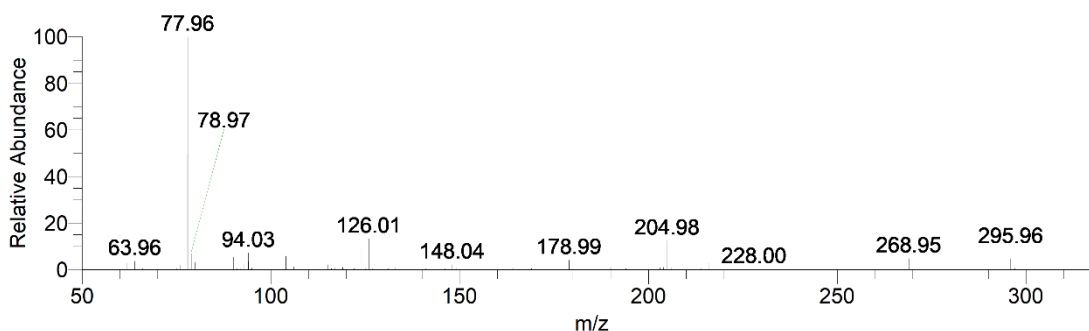
Na obrázku 22A je chromatogram celého iontového toku vzorku 23. Vybraný iont odpovídá  $m/z$  295,96 Da a jedná se o iont hydrochlorthiazidu v deprotonované formě, tedy byl měřen a vyhodnocen v negativním módu.

V chromatogramu je ho možno sledovat v retenčním čase 0,38 minut, jak můžeme vidět na obrázku 22B a jak potvrdily analýzy ostatních vzorků, v nichž byl hydrochlorthiazid přítomen.

Na obrázku 22C je hmotnostní spektrum závislosti relativní intenzity na  $m/z$ . Vidíme, že ve vzorku má tento iont poměrně silný signál ve srovnání se spodní stopou, tedy s teoretickou hodnotou vypočtenou podle sumárního vzorce hydrochlorthiazidu  $C_7H_7ClN_3O_4S_2$ . Spektrum ukazuje i ionty o jiných hmotách, které nejsou fragmenty této látky.



**Obrázek 22: A) SCAN mód, B) SIM mód, C) MS signál hydrochlorothiazidu**



**Obrázek 23: Fragmentace iontu 295,96 Da (hydrochlorothiazid)**

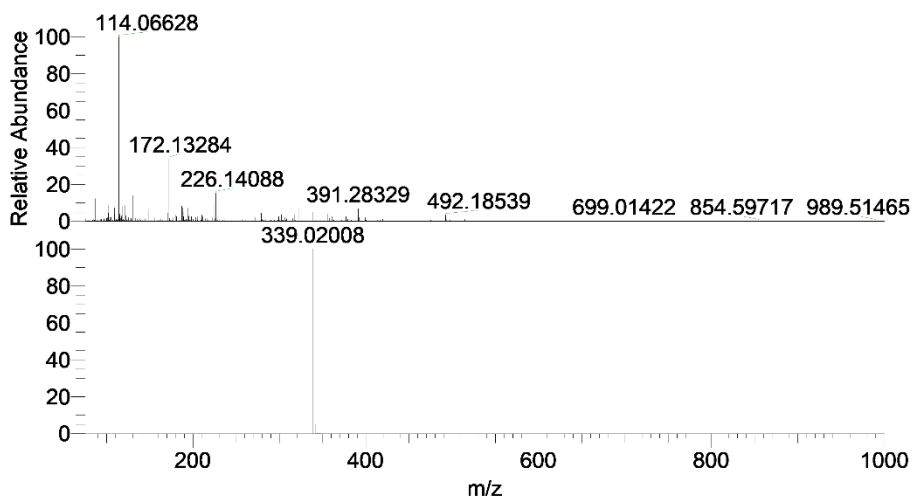
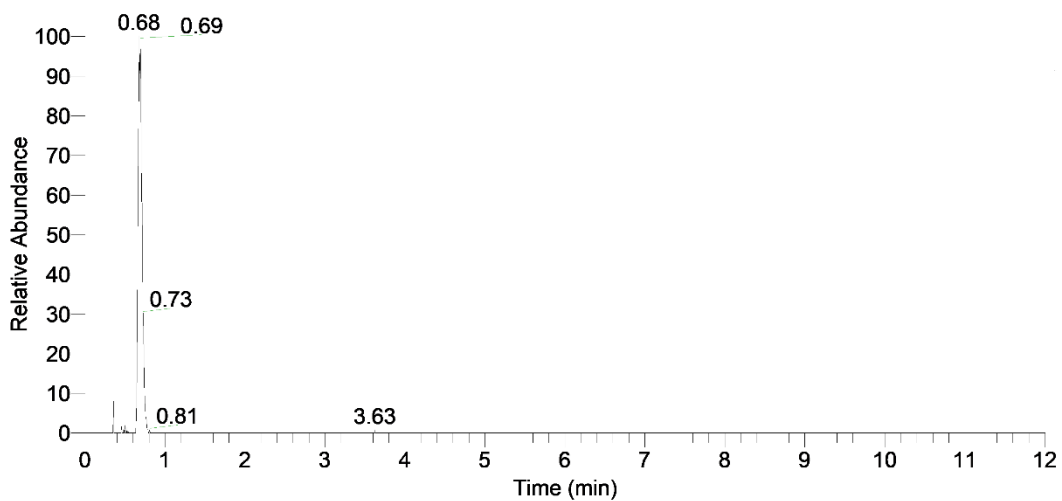
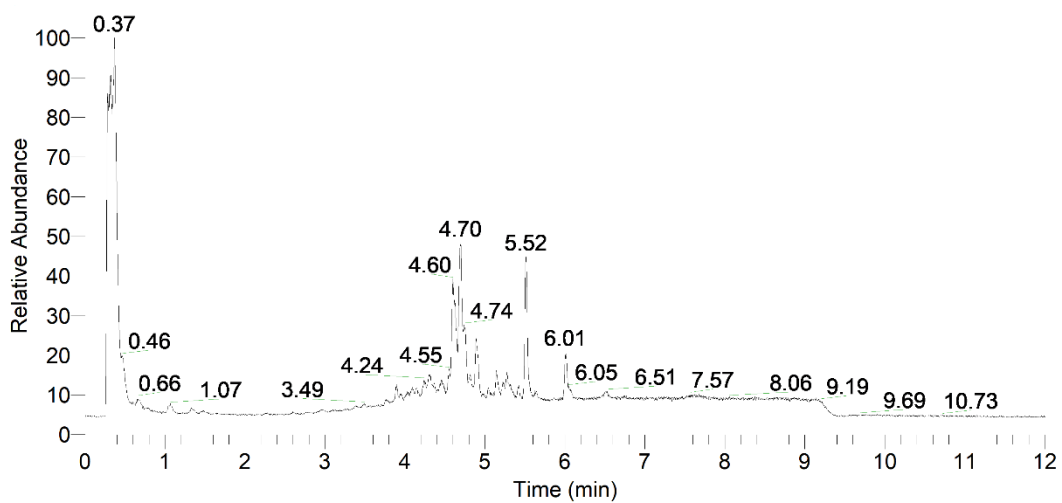
Na obrázku 23 je hmotnostní spektrum po analýze full  $ms^2$ , tedy jedná se o fragmentaci vybraného iontu 295,96 Da vyskytujícího se ve vzorku 23. Tento iont byl izolován a následně podroben fragmentaci při kolizních energiích 10, 30 a 50 V. Spektrum bylo pořízeno při průměrné součtové kolizní energii 30 V. Monitorování proběhlo v rozmezí hmot 50,00-320,00 Da.

Vidíme, že mateřský iont má slabou intenzitu, tedy došlo k rozsáhlé fragmentaci. Nejintenzivnější iont, který pozorujeme, má hmotu 77,96 Da a odpovídá fragmentu s hmotou  $C_2NO_2S$ . Ostatní fragmenty se nepodařilo identifikovat.

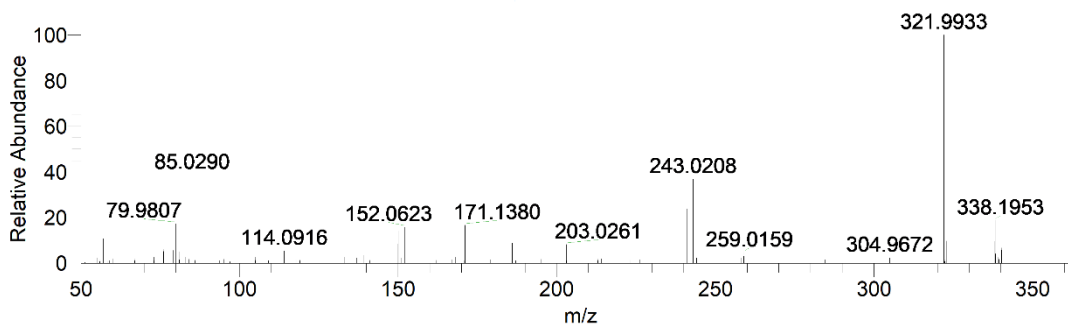
### **CHLORTALIDON**

Na obrázku 24A je chromatogram celého iontového toku vzorku 51. Vybraný iont odpovídá hmotě 339,02 Da. Lze ho sledovat v retenčním čase 0,69 minut, jak vidíme na obrázku 22B. Ovšem signál vybraného iontu je v porovnání se svým okolím slabý.

Na obrázku 24C vidíme porovnání spektra, kde je ve spodní stopě teoreticky zadaná hmotu vypočítána dle vzorce chlortalidonu  $C_{14}H_{11}ClN_2O_4S + H^+$  se spektrem, které bylo získáno proměřením vzorku. Spektrum získané proměřením vzorku ukazuje ionty o jiných hmotách, ovšem hledaný iont 339,02 Da je skryt mezi signály koelujících látek, takže na obrázku nevyčníká.



**Obrázek 24: A) SCAN mód, B) SIM mód, C) MS signál chlortalidonu**



**Obrázek 25: Fragmentace iontu 339,02 Da (chlortalidon)**

Na obrázku 25 vidíme hmotnostní spektrum chlortalidonu vzorku 51. Jedná se o fragmentaci vybraného iontu s hmotností 339,02 Da v retenčním čase 0,69 minut. Fragmentace probíhala při kolizních energiích 10, 30 a 50 V, spektrum je pořízeno při průměrné součtové kolizní energii 30 V. Monitorovalo se rozmezí m/z 50,00-365,00 Da.

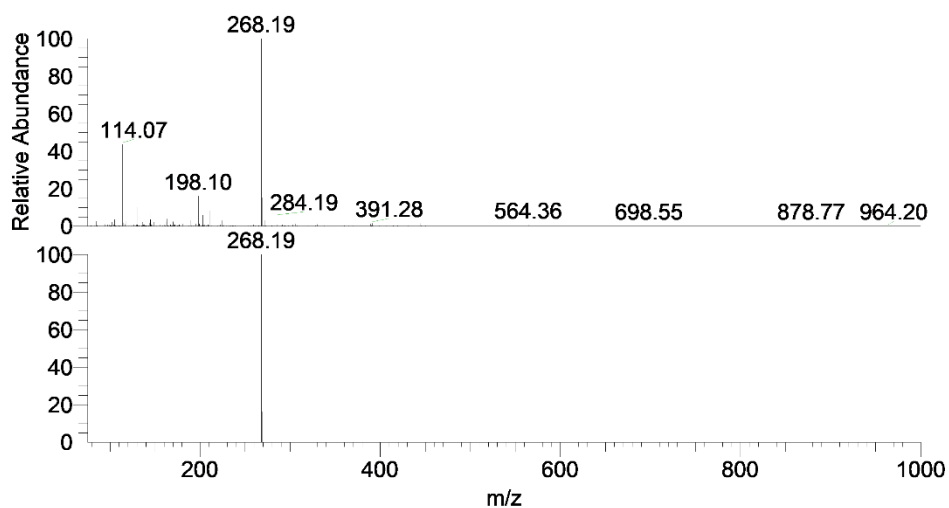
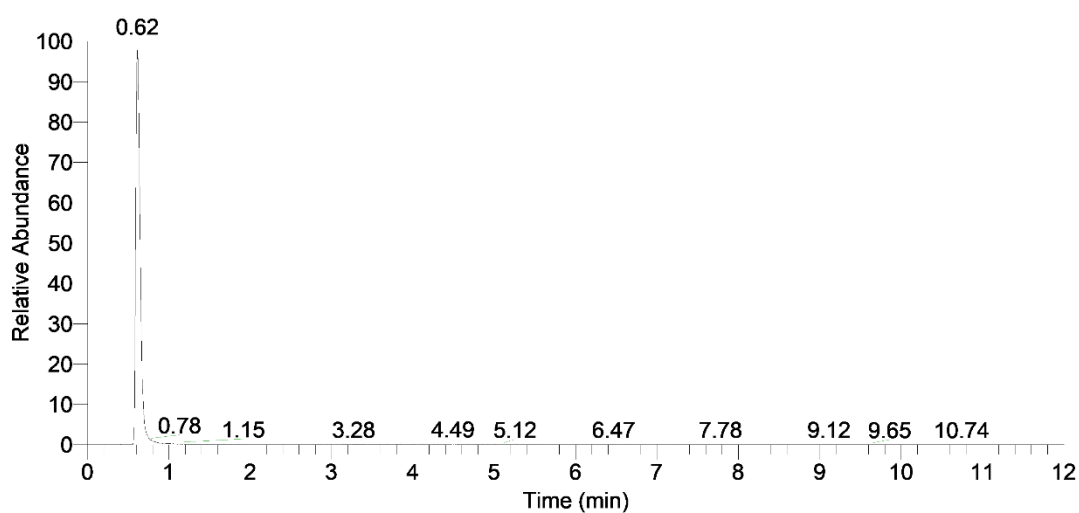
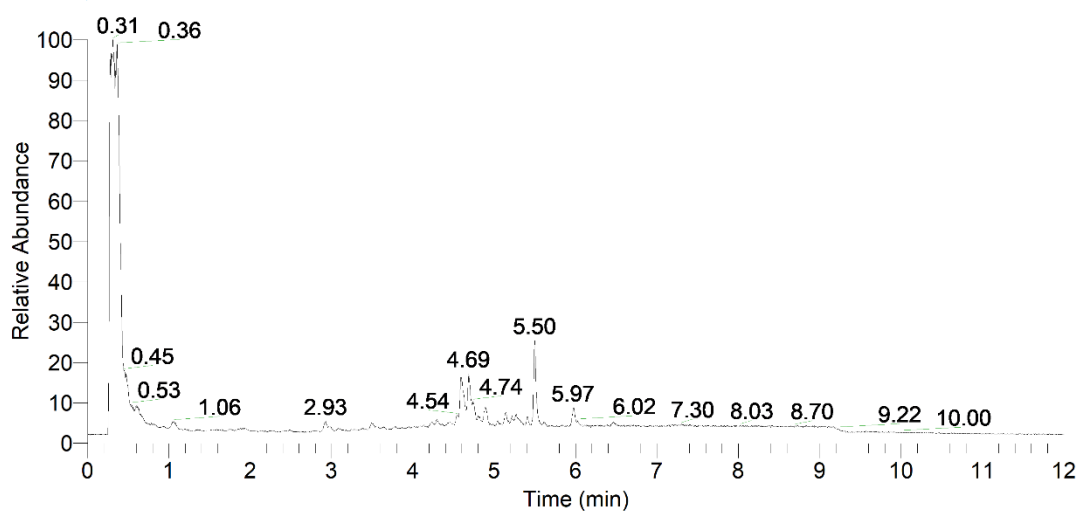
Fragment s m/z 321,99 Da, který má poměrně silný signál, odpovídá fragmentu, který mohl vzniknout po odštěpení NH<sub>3</sub>, tedy fragment by měl sumární vzorec C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>ClNO<sub>4</sub>S. Fragment s hmotou 79,98 Da odpovídá odštěpenému fragmentu H<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>S. Fragment C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>ClNO by mohl odpovídat hmotě 243,02 Da. Některé fragmenty, ač se vyskytovaly s relativně vysokou intenzitou, se nepodařilo identifikovat.

## **METOPROLOL**

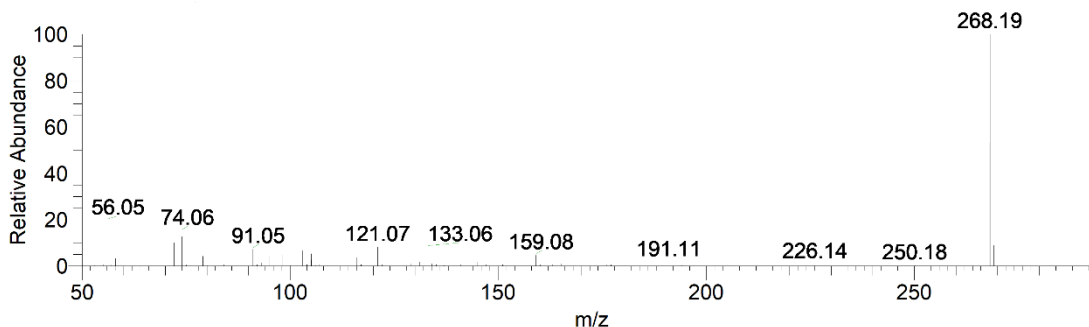
Na obrázku 26A vidíme chromatogram celého iontového toku vzorku moči 31.

Na obrázku 26B je záznam SIM modu, který po zadání hmoty vybraného iontu s m/z 268,19 Da ukazuje, že tuto látku je možné pozorovat v retenčním čase 0,63 minut. Při analýzách vzorků obsahujících metoprolol bylo potvrzeno, že se opravdu vyskytuje v tomto retenčním čase.

Signál, který odpovídá tomuto iontu, je v tomto vzorku poměrně silný, jak vidíme na obrázku 26C a odpovídá spodní stopě, tedy teoreticky zadané hodnotě, která je vypočítána ze sumárního vzorce C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>3</sub> + H<sup>+</sup>.



**Obrázek 26: A) SCAN mód, B) SIM mód, C) MS signál metoprololu**



**Obrázek 27: Fragmentace iontu 268,19 Da (metoprolol)**

Na obrázku 27 vidíme hmotnostní spektrum vzorku 31. Jedná se o spektrum izolovaného iontu 268,19 Da, který byl podroben fragmentaci při kolizních energiích 10, 30 a 50 V, přičemž na obrázku je fragmentace při průměrné součtové kolizní energii 30 V. Monitorovalo se v rozmezí m/z 50,00-295,00 Da.

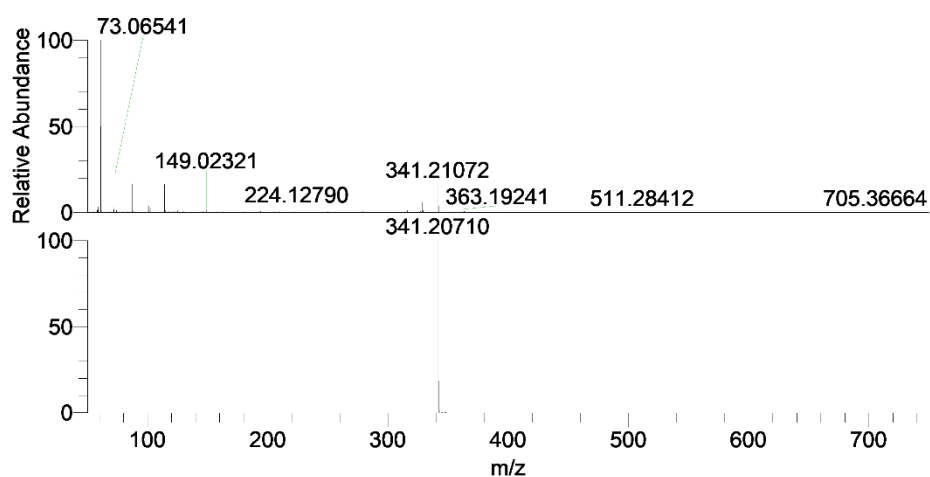
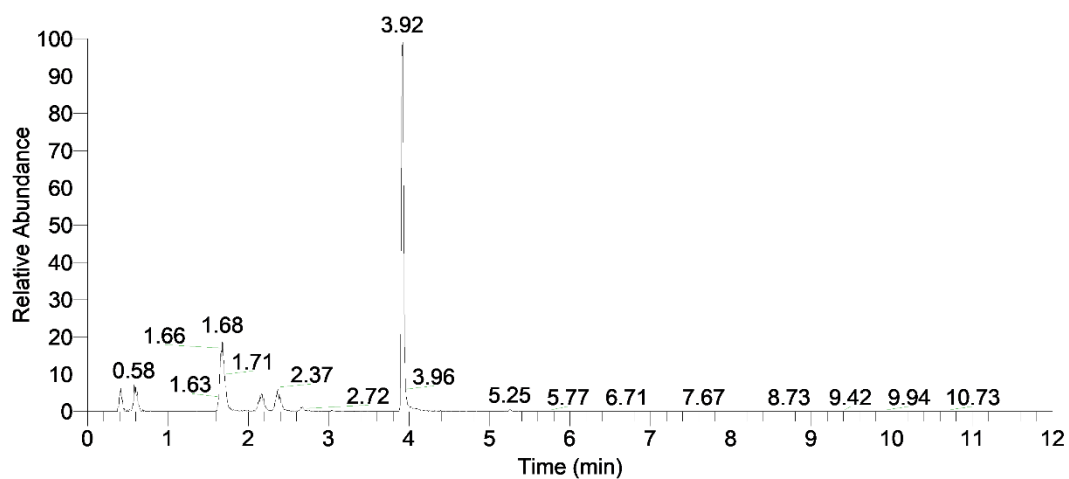
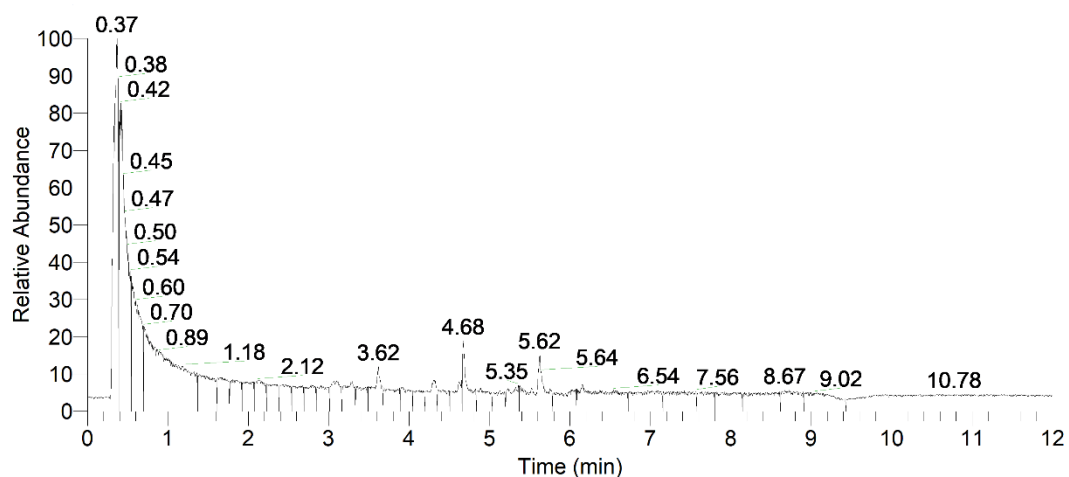
Z obrázku je patrné, že iont s hmotou 268,19 Da je stabilním iontem, který obtížně fragmentuje. Signál pro m/z 133,06 Da by mohl odpovídat fragmentu  $C_6H_{14}NO_2$ , který vznikl při přerušení vazby mezi atomem kyslíku a benzenovým jádrem. Při odštěpení molekuly vody dojde ke vzniku fragmentu  $C_{15}H_{24}NO_2$  s m/z 250,18 Da. Některé fragmenty nebyly identifikovány.

## **PERINDOPRILÁT**

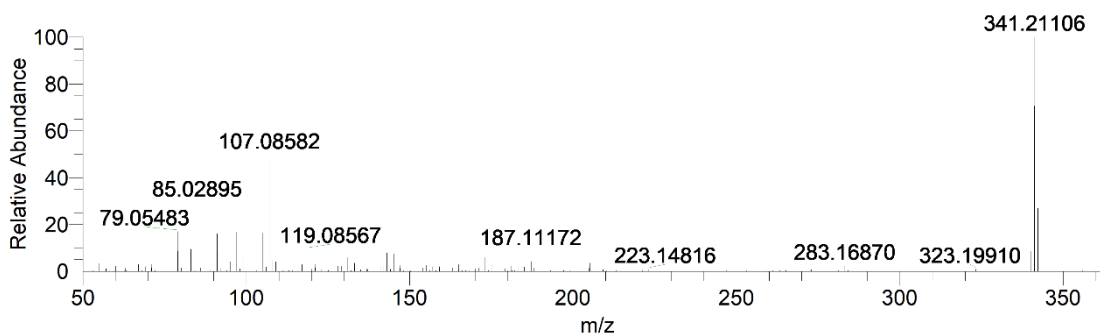
Na obrázku 28A je chromatogram celého iontového toku vzorku 32.

Na obrázku 28B vidíme iont, který lze sledovat v retenčním čase 3,90 minut. Tento iont odpovídá hmotě 341,21 Da. Jedná se o aktivní metabolit perindoprilu, tzv. perindoprilát. Samotný perindopril nebyl detekován.

Intenzita sledovaného iontu je poměrně slabá a jak vidíme na obrázku 28C při porovnání hmoty iontu ve vzorku, tak teoreticky zadaná hmota vypočítána podle vzorce perindoprilátu  $C_{17}H_{28}N_2O_5 + H^+$  se liší v druhém desetinném místě od hmoty iontu ve vzorku moči.



**Obrázek 28:** A) SCAN mód, B) SIM mód, C) MS signál perindoprilátu



**Obrázek 29: Fragmentace iontu 341,21 Da (perindoprilát)**

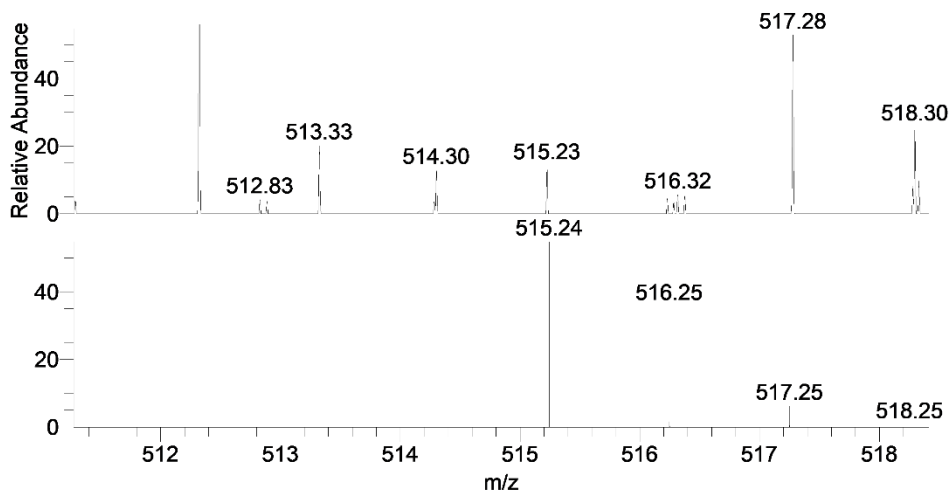
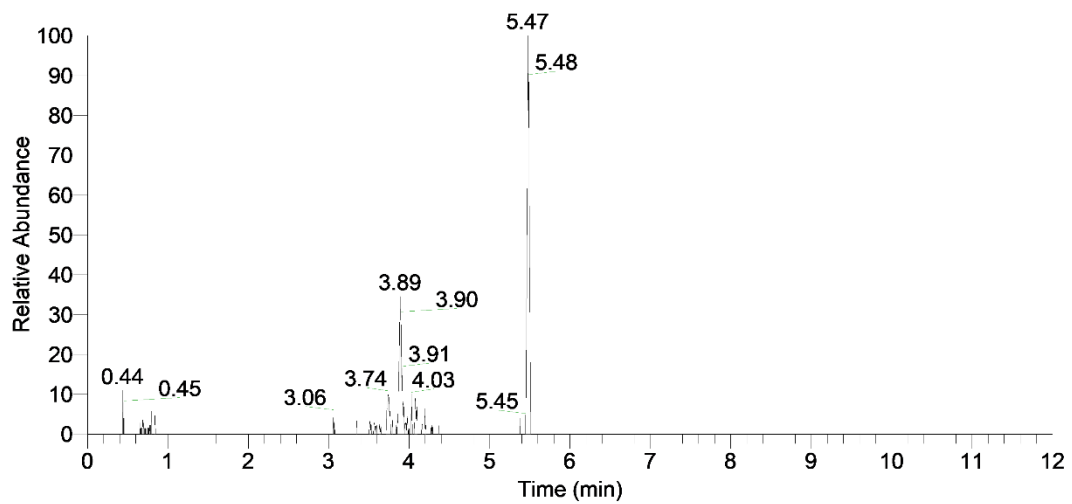
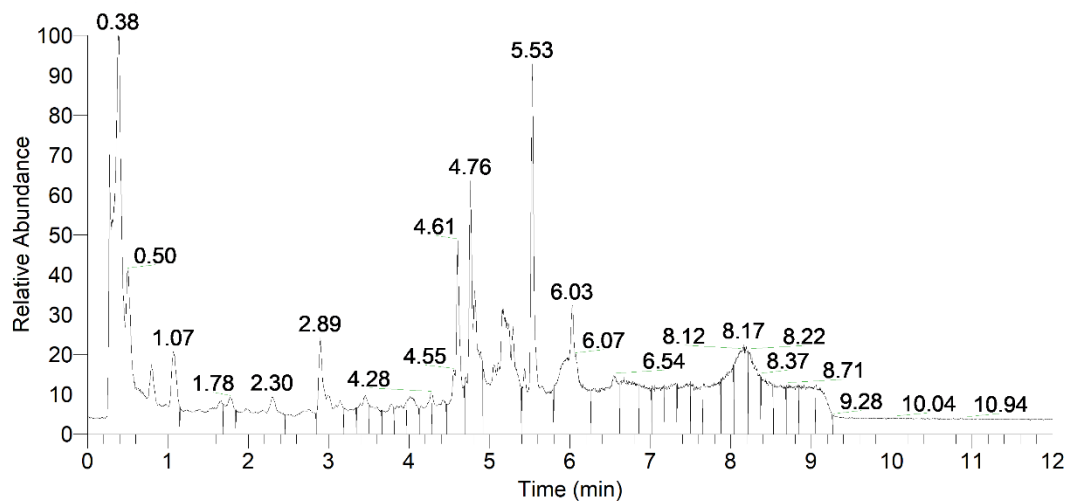
Na obrázku 29 je hmotnostní spektrum vzorku 32. Jedná se full  $ms^2$  spektrum, tedy o fragmentaci iontu, který byl vybrán. Pozorovaný iont má hmotu 341,21 Da. Spektrum bylo pořízeno v retenčním čase 3,89 minut. Monitorovalo se v rozmezí  $m/z$  50,00-365,00 Da. Spektrum bylo pořízeno při průměrné součtové kolizní energii 30 V.

Vybraný iont je stabilní, jelikož ho pozorujeme ve spektru i po fragmentaci. Znamená to, že se iont neochotně fragmentuje, ale jelikož šlo pouze o zjištění, jaké fragmenty vznikají, pak je tento postup dostačující a nebylo zapotřebí použití vyšších kolizních energií, aby došlo k naprosté fragmentaci iontu. Po odštěpení molekuly vody z molekuly perindoprilátu dojde ke vzniku fragmentu, jehož hmotu je 323,19 Da. Jedná se o fragment se sumárním vzorcem  $C_{17}H_{27}N_2O_4$ . Zbylé fragmenty se nepodařilo identifikovat.

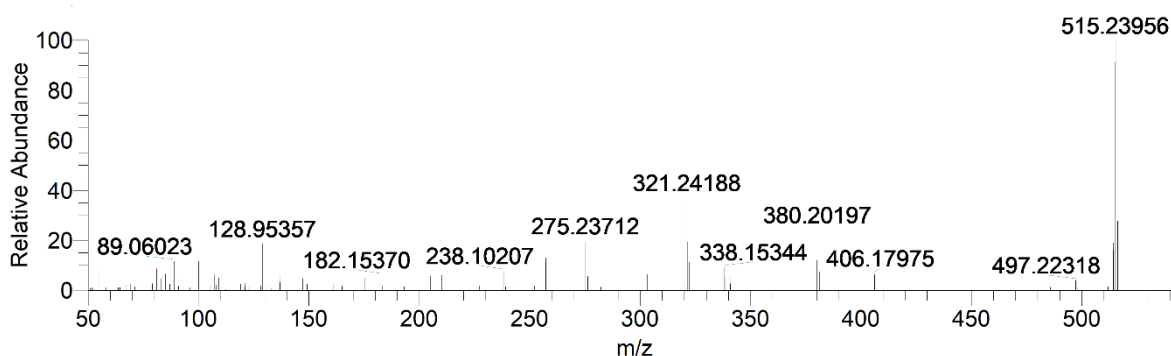
### **TELMISARTAN**

Na obrázku 30A je chromatogram celého iontového toku vzorku 51. Na obrázku 30B je již vybraný iont s  $m/z$  515,23 Da, ale v daném chromatogramu je více píků s danou hmotou příslušejícím dalším izobarickým sloučeninám. Z dalších analýz s touto látkou je možné usuzovat, že telmisartan je možno sledovat v retenčním čase 3,92 minut.

Celkové spektrum je s nízkou intenzitou a pro identifikaci obtížně hodnotitelné, jelikož je ovlivňováno koelujícími látkami. Jak vidíme na obrázku 30C, tak ve vzorku moči se nachází telmisartan s hmotou 515,23, ale teoreticky vypočítaná hmotnost dle vzorce  $C_{33}H_{30}N_4O_2 + H^+$  ve spodní stopě se liší v druhém desetinném místě, tedy 515,24 Da.



Obrázek 30: A) SCAN mód, B) SIM mód, C) MS signál telmisartanu



**Obrázek 31: Fragmentace iontu 515,23 Da (telmisartan)**

Na obrázku 31 vidíme fragmentaci izolovaného iontu 515,24 Da ze vzorku moči 51. Fragmentace byla provedena v retenčním čase 3,92 minut a obrázek byl pořízen při průměrné součtové kolizní energii 30 V. Monitorovalo se v rozmezí m/z 50,00-545,00 Da.

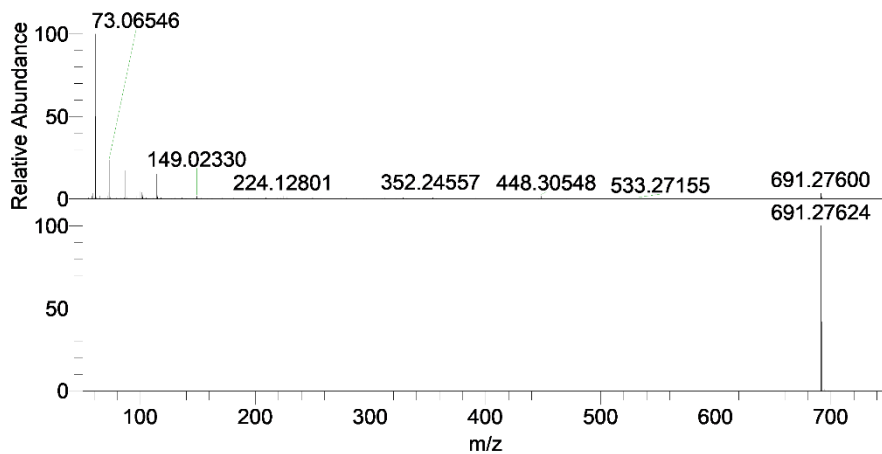
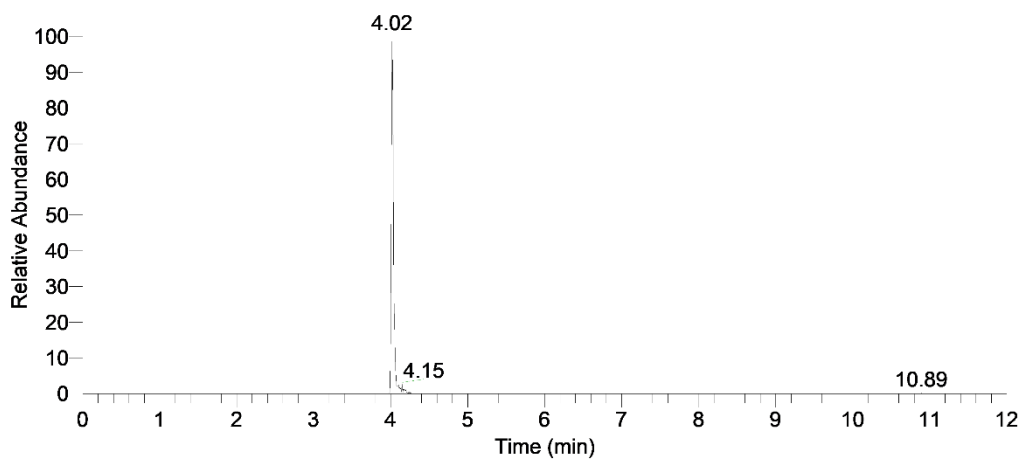
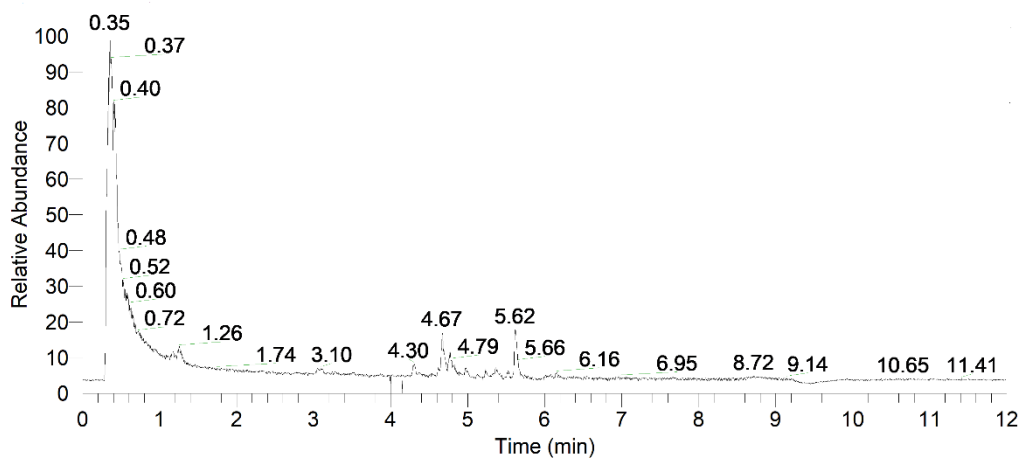
Opět se jedná o stabilní iont, který se obtížně fragmentuje, a proto je možno ho vidět ve spektru i po fragmentaci. Po odštěpení molekuly vody z vybraného iontu dojde ke vzniku fragmentu se vzorcem  $C_{33}H_{29}N_4O$  a s hmotou 497,22 Da. Fragment s hmotou 338,15 Da odpovídá  $C_{24}H_{22}N_2$ . Zbývající fragmenty nebyly identifikovány.

### **TELMISARTANGLUKURONID**

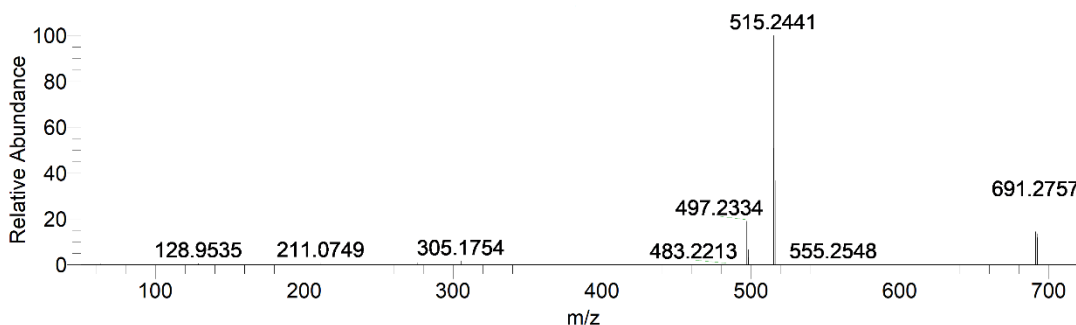
Na obrázku 32A je chromatogram celého iontového toku vzorku 43. Vybraným iontem je iont s m/z 691,27 Da, který odpovídá glukuronidu sloučeniny telmisartanu.

Glukuronid telmisartanu je možno sledovat v retenčním čase 4,01 minut, což se potvrdilo při analýzách více vzorků obsahujících telmisartanglukuronid. V tomto retenčním čase není vidět množství jiných píků se stejnou hmotou, které by odpovídaly sloučeninám s velmi blízkou hmotou, jako tomu bylo u samotného telmisartanu.

Iont má relativně slabý signál, ale je lépe identifikován než samotný telmisartan. Na obrázku 32C při porovnání hmoty iontu ve vzorku moči a teoreticky zadanou hmotou ve spodní stopě se ionty liší až na čtvrtém desetinném místě.



**Obrázek 32: A) SCAN mód, B) SIM mód, C) MS signál telmisartanglukuronidu**



**Obrázek 33: Fragmentace vybraného iontu 691,27 Da (telmisartanglukuronid)**

Na obrázku 33 vidíme Full  $ms^2$  spektrum vybraného iontu s hmotou 691,27 Da. Jedná se tedy o fragmentaci tohoto iontu ve 4. minutě analýzy. Spektrum bylo pořízeno při průměrné součtové kolizní energii 30 V. Monitorovalo se v rozmezí  $m/z$  50,00-725,00 Da.

Nejintenzivnějším fragmentem je fragment s hmotou 515,24 Da, který odpovídá telmisartanu po odštěpení glukuronidu, tedy molekule se vzorcem  $C_{33}H_{31}N_2O_4$ . Další fragment s hmotou 497,23 Da odpovídá fragmentu se vzorcem  $C_{33}H_{29}N_4O$ . Ostatní fragmenty se vyskytovaly jen s velmi nízkou intenzitou a jejich identifikace se nezdařila. Ve spektru je možno vidět i iont, který byl podroben fragmentaci. Je to tím, že se jedná o stabilní iont.

#### **4.1 Vyhodnocení kvalitativní analýzy sledovaných látek a jejich fragmentů**

Po vytvoření vlastní knihovny spekter a vyhodnocení přítomnosti a nepřítomnosti látek byla vypočítána senzitivita a specifická metoda jak pro dané látky, tak pro jejich fragmenty. Tedy do programu Chromeleon byly kromě hmot sledovaných látek, které jsou uvedeny v tabulce 1, zadány také hmoty fragmentů a byly nastaveny podmínky uvedené v podkapitole 3.2.2. Tímto způsobem se dalo sledovat, ve kterých vzorcích se vyskytují jaké přechody, tedy kde došlo k fragmentaci a jaké fragmenty vznikaly. Hmoty sledovaných fragmentů jsou uvedeny v tabulce 1. Jedná se o vyhodnocení kvalitativní, které bylo pro představu doplněno i kvantitativním vyhodnocením v podobě grafů, kde jsou udávány plochy píků sledovaných fragmentů. Následně byly získány číselné údaje ploch píků, které se v jednotlivých vzorcích vyskytovaly. Hodnoty ploch byly zaznamenány do tabulek, které byly vyhodnoceny formou krabicových grafů (Excel). Tyto grafy jsou uvedeny níže a zobrazují přítomnost či nepřítomnost sledovaných fragmentů ve vzorcích v závislosti na velikosti plochy píků. Rozřazovacím kritériem tedy bylo, zda se látka má ve vzorku vyskytovat, nebo ne. Zároveň ukazují, v jakém rozmezí se pohybovaly plochy píků. Aby mohly být tyto grafy vytvořeny,

bylo nutno také znát, zda se látka měla ve vzorku vyskytovat či nikoliv. K tomuto kroku bylo využito logistické regrese.

Tato statistická metoda se zabývá odhadem pravděpodobnosti nějakého jevu, na základě námi známé skutečnosti, která může ovlivnit výskyt tohoto jevu. Případ, kdy jev nastal modeluje náhodná veličina, která nabývá hodnoty 0 pokud jev nenastal a hodnoty 1, pokud jev nastal. [75]

Tedy pokud se látka měla vyskytovat ve vzorku, bylo do tabulky zadáno 1, v případě, že se látka ve vzorku vyskytovat neměla, pak bylo zadáno do tabulky 0.

Pro látky, kterými se tato práce zabývá, byly vytvořeny tabulky, ve kterých je vždy uvedeno číslo vzorku, velikost plochy píku a údaj, zda jev nastal či nenastal, tedy 1 nebo 0. Jelikož měly látky více fragmentů, a tedy více přechodů, byl vybrán vždy jen jeden a to ten, který měl nejlepší výsledky (intenzitu, selektivitu, citlivost).

**Tabulka 1: Přehled retenčních časů, hmot látek a jejich fragmentů**

Látka	Očekávaný retenční čas (min)	Hmota	Fragmenty
<b>Acebutolol</b>	0,56	337,21	<b>72,08</b> ; 86,10; 116,11; 319,20
<b>Amlodipin</b>	3,48	409,15	74,06; 334,08; <b>392,12</b>
<b>Doxazosin</b>	3,47	452,19	<b>247,11</b> ; 435,29
<b>Chlortalidon</b>	0,69	339,02	79,98; 243,02; <b>321,99</b>
<b>Hydrochlorthiazid</b>	0,38	297,97	<b>77,96</b>
<b>Metoprolol</b>	0,63	689,19	<b>133,06</b> ; 250,18
<b>Perindoprilát</b>	3,90	341,21	<b>323,19</b>
<b>Telmisartan</b>	3,92	515,24	<b>338,15</b> ; 497,22
<b>Telmisartan-glukuronid</b>	4,01	691,27	497,23; <b>515,14</b>

## ACEBUTOLOL

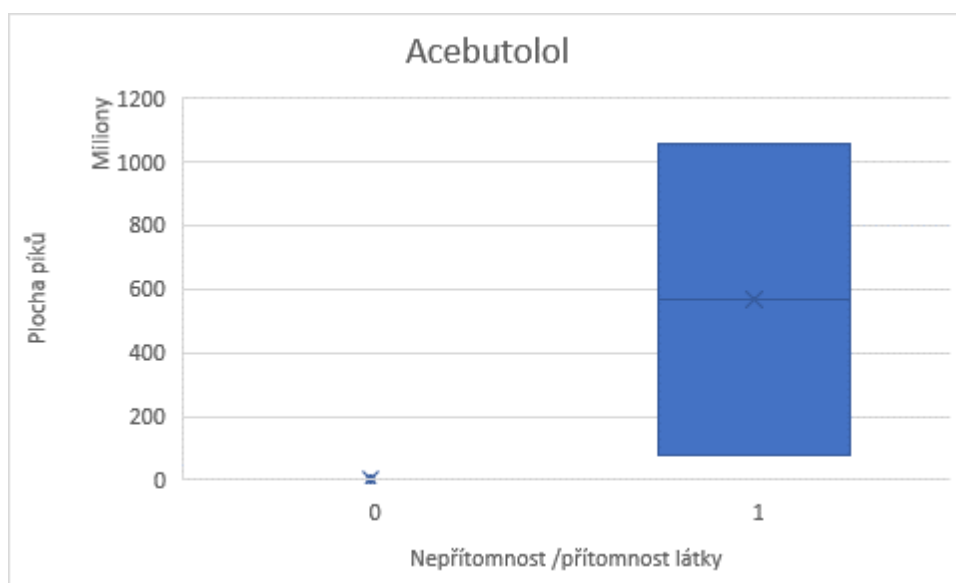
**Tabulka 2: Senzitivita a specificita metody pro acebutolol**

Test	Látka očekávána	Látka neočekávána	Celkem
<b>Pozitivní</b>	2	5	7
<b>Negativní</b>	0	51	51
<b>Celkem</b>	2	56	<b>58</b>

**Tabulka 3: Senzitivita a specificita metody pro fragmenty acebutololu**

Test	Látka očekávána	Látka neočekávána	Celkem
<b>Pozitivní</b>	2	56	58
<b>Negativní</b>	0	0	0
<b>Celkem</b>	2	56	<b>58</b>

V tabulkách 2 a 3 jsou uvedeny hodnoty, podle kterých můžeme vyhodnotit specifickost a senzitivitu metody pro acebutolol. Je zřejmé, že se měl acebutolol vyskytovat ve 2 vzorcích. V obou těchto vzorcích byl opravdu naměřen, jak ve SCAN módu, tak i při vyhodnocení přítomnosti fragmentů. V obou případech by se tedy senzitivita rovnala 100 %. Ovšem v 56 vzorcích se acebutolol vyskytovat neměl. V případě SCAN módu se nevyskytoval v 51 vzorcích z těchto 56, ale v 5 vzorcích se ho podařilo identifikovat i přes skutečnost, že se tam vyskytovat neměl. Je důležité ovšem zmínit, že se zde acebutolol vyskytoval s o několik řádů nižší intenzitou, což by mohlo být způsobeno kontaminací při přípravě vzorku nebo kontaminací z nástřiku předešlého vzorku. Tudíž těchto 5 vzorků by se dalo označit jako falešně pozitivní. Při analýze fragmentů se za falešně pozitivní vzorky označilo celkem 56 vzorků. Specifickost metody je v případě SCAN módu 91 % a v případě analýzy fragmentů 0 %. Tyto parametry byly ovšem stanoveny na základě přítomnosti acebutololu pouze ve 2 vzorcích, což je ze statistického pohledu nedostačující.



**Graf 1: Graf znázorňující přítomnost/nepřítomnost fragmentů acebutololu v závislosti na ploše píků**

Graf 1 ukazuje grafické zpracování dat naměřených 58 vzorků moče pacientů. Hodnoty na ose  $x$ , tedy 0 a 1 ukazují, zda by ve vzorcích acebutolol být přítomen neměl, či měl. Jak vidíme, tak v případě, že by acebutolol ve vzorcích měl být přítomen, tak se plochy píků odpovídající acebutololu pohybují od 70 milionů výše. V případě, že by vzorky acebutolol obsahovat neměly, byly naměřeny plochy píků, které nedosahují ani jednoho milionu. Tedy,

i když vzorky byly falešně pozitivní, hodnoty odpovídající plochám píků, které byly detekovány, byly řádově menší.

## AMLODIPIN

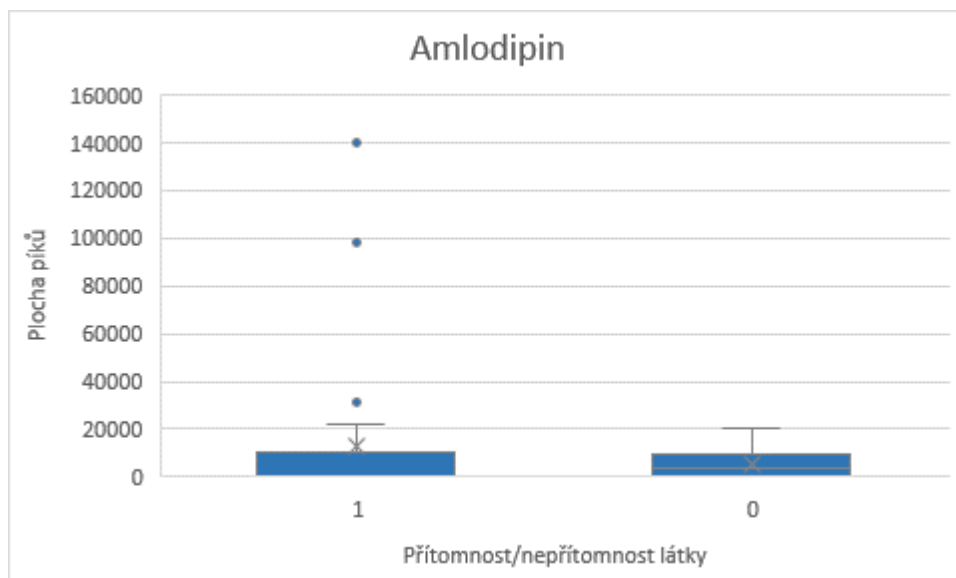
*Tabulka 4: Senzitivita a specificita testu pro amlodipin*

Test	Látka očekávána	Látka neočekávána	Celkem
<b>Pozitivní</b>	28	2	30
<b>Negativní</b>	6	22	28
<b>Celkem</b>	34	24	<b>58</b>

*Tabulka 5: Senzitivita a specificita metody pro fragmenty amlodipinu*

Test	Látka očekávána	Látka neočekávána	Celkem
<b>Pozitivní</b>	16	12	28
<b>Negativní</b>	18	12	30
<b>Celkem</b>	34	24	<b>58</b>

V tabulkách 4 a 5 jsou uvedeny hodnoty, podle kterých můžeme vyhodnotit specificitu a senzitivitu metody pro amlodipin. V tabulkách můžeme vidět, že se měl amlodipin vyskytovat ve 34 vzorcích. Výsledky ze SCAN módu byly u amlodipinu lepší než při vyhodnocení fragmentů amlodipinu. Z tabulky je jasné, že v případě SCAN módu bylo skutečně pozitivních 28 vzorků a 6 vzorků bylo označeno za falešně negativní. U analýzy fragmentů bylo skutečně pozitivních 16 a falešně negativních 18 vzorků. Senzitivita metody pro amlodipin je u SCAN módu 82 % a u analýzy fragmentů 47 %. Specificita metody je 92 % v případě SCAN módu, protože skutečně negativních vzorků je 22 a falešně pozitivní jsou 2 vzorky. U analýzy fragmentů je specificita 47 %, jelikož z 24 vzorků, kde se neměl amlodipin, a tedy ani jeho fragmenty vyskytovat, byl naměřen ve 12 vzorcích. Těchto 12 vzorků bylo označeno jako falešně pozitivní.



**Graf 2: Graf znázorňující přítomnost/nepřítomnost fragmentů amlodipinu v závislosti na ploše píků**

V grafu můžeme vidět, že vzorky, které měly obsahovat amlodipin mají plochu píku v rozmezí, 0-140 128, zatímco vzorky, kde amlodipin neměl být mají plochu píku v rozmezí 0-20 295. Na rozdíl od acebutololu u amlodipinu nemají hodnoty ploch pozitivních a negativních výsledků mezi sebou tak markantní rozdíly. Amlodipin byl prokazatelně odhalen u 3vzorků.

## DOXAZOSIN

**Tabulka 6: Senzitivita a specifita testu pro doxazosin**

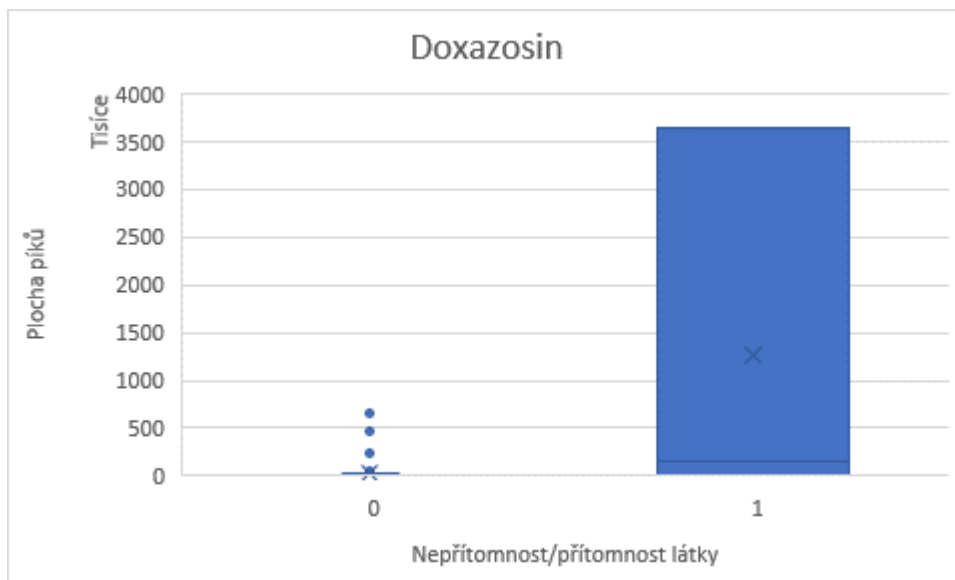
Test	Látka očekávána	Látka neočekávána	Celkem
Pozitivní	2	6	8
Negativní	1	49	50
<b>Celkem</b>	<b>3</b>	<b>55</b>	<b>58</b>

**Tabulka 7: Senzitivita a specifita testu pro fragmenty doxazosinu**

Test	Látka očekávána	Látka neočekávána	Celkem
Pozitivní	2	26	28
Negativní	1	29	30
<b>Celkem</b>	<b>3</b>	<b>55</b>	<b>58</b>

V tabulkách 6 a 7 můžeme vidět, že doxazosin se měl vyskytovat ve 3 vzorcích z 58. V případě SCAN módu i analýzy fragmentů byl doxazosin naměřen ve 2 vzorcích z těchto třech. Senzitivita metody je pro doxazosin i jeho fragmenty 67 %. V 55 vzorcích se doxazosin vyskytovat neměl, přesto v případě SCAN módu došlo k identifikaci doxazosinu v 6 vzorcích

z těchto 55. Při analýze fragmentů bylo za falešně pozitivní označeno 26 vzorků. Stejných 6 vzorků jako v případě SCAN módu a dalších 20. Proto je specificita metody pro fragmenty doxazosinu 53 % a pro doxazosin ve SCAN módu 89 %.



**Graf 3: Graf znázorňující přítomnost/nepřítomnost fragmentů doxazosinu v závislosti na ploše píků**

V graf 3 je vidět, že vzorky, které neměly obsahovat doxazosin, tedy v grafu jsou to hodnoty nad číslem 0 na ose  $x$ , měly hodnoty plochy píku v rozmezí 0-657 928. Hodnoty ploch vzorků, kde se doxazosin měl vyskytovat, se pohybují v rozmezí od 0-3 640 973. Jak tedy vidíme, rozdíl mezi pozitivními a negativními výsledky je poměrně vysoký.

## HYDROCHLORThIAZID

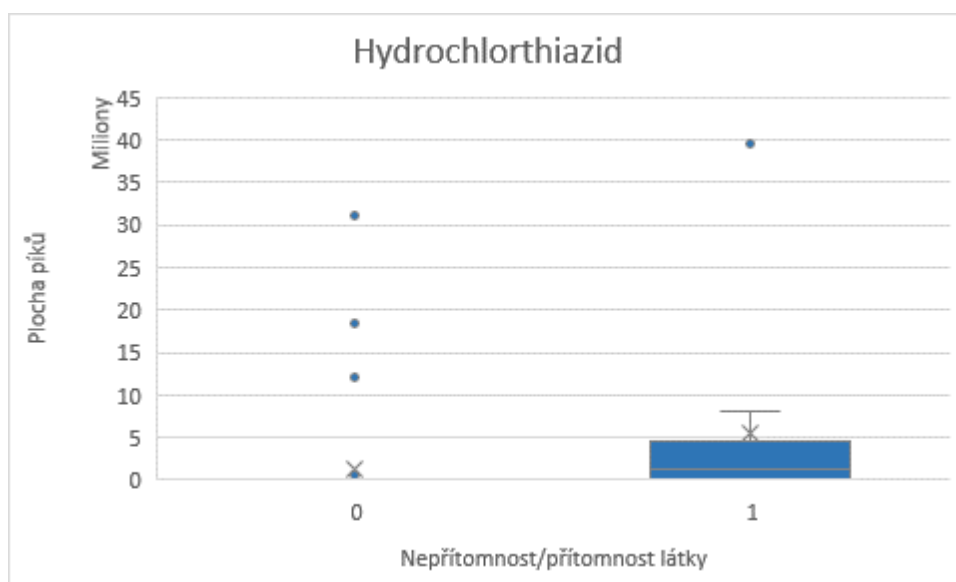
**Tabulka 8: Senzitivita a specificita testu pro hydrochlorthiazid**

Test	Látka očekávána	Látka neočekávána	Celkem
Pozitivní	7	24	31
Negativní	4	23	27
<b>Celkem</b>	<b>11</b>	<b>47</b>	<b>58</b>

**Tabulka 9: Senzitivita a specificita testu pro fragmenty hydrochlorthiazidu**

Test	Látka očekávána	Látka neočekávána	Celkem
Pozitivní	11	45	56
Negativní	0	2	2
<b>Celkem</b>	<b>11</b>	<b>47</b>	<b>58</b>

V tabulkách 8 a 9 můžeme vidět, že se měl hydrochlorthiazid vyskytovat v 11 vzorcích. Při analýze fragmentů byl v 11 vzorcích opravdu prokázán, ale při SCAN módu byl identifikován pouze v 7 vzorcích z těchto 11. Senzitivita metody pro hydrochlorthiazid je 63 % a pro fragmenty hydrochlorthiazidu je 100 %. Specificita je lepší v případě SCAN módu. Jako falešně pozitivní bylo označeno 24 vzorků ze 47. U analýzy fragmentů bylo za falešně pozitivní označeno 45 vzorků, přičemž 22 vzorků stejných jako u SCAN módu. Z těchto 45 vzorků byla u 43 vzorků intenzita píků o několik řádů nižší než u skutečně pozitivních výsledků. Plochy píků u těchto 42 vzorků jsou tedy mnohem menší než plochy píků odpovídajících skutečně pozitivním výsledkům. Specificita metody pro fragmenty hydrochlorthiazidu je 4 % a pro hydrochlorthiazid ve SCAN módu je 49 %.



**Graf 4: Graf znázorňující přítomnost/nepřítomnost fragmentů hydrochlorthiazidu v závislosti na ploše píků**

Jak je patrné z grafu 4, tak plochy píků odpovídajících hydrochlorthiazidu se pohybovaly v milíonech. Hodnoty ploch píků u vzorků, které neměly obsahovat hydrochlorthiazid se pohybovaly v rozmezí 0-31 009 282. Hodnoty ploch u vzorků, kde měl hydrochlorthiazid být, se pohybovaly v rozmezí 0-39 546 703. Jak vidíme, hodnoty plochy píků se příliš neliší.

## CHLORTALIDON

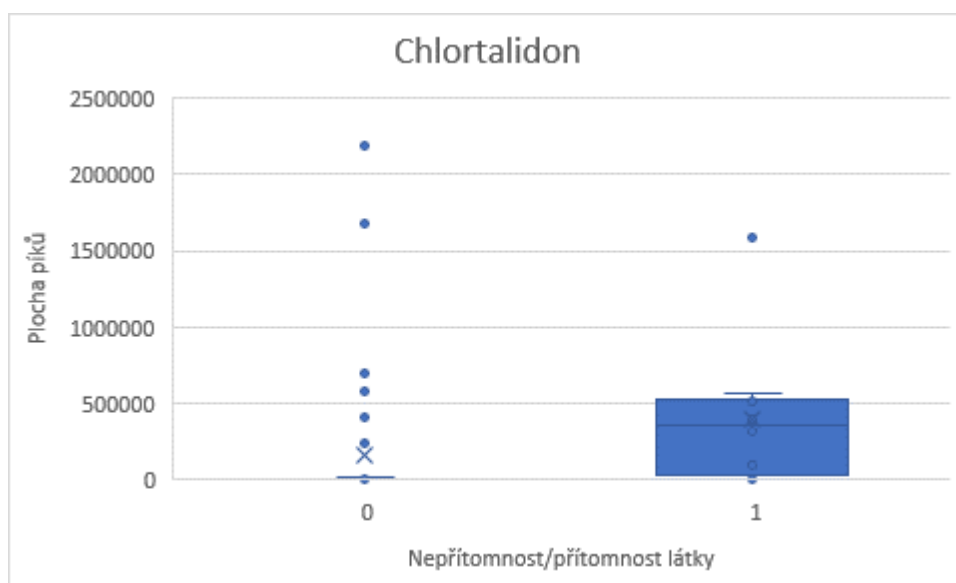
*Tabulka 10: Senzitivita a specifická testu pro chlortalidon*

Test	Látka očekávána	Látka neočekávána	Celkem
Pozitivní	8	7	15
Negativní	2	41	43
<b>Celkem</b>	<b>10</b>	<b>48</b>	<b>58</b>

*Tabulka 11: Senzitivita a specifická testu pro fragmenty chlortalidonu*

Test	Látka očekávána	Látka neočekávána	Celkem
Pozitivní	9	25	34
Negativní	1	23	24
<b>Celkem</b>	<b>10</b>	<b>48</b>	<b>58</b>

V tabulkách 10 a 11 jsou uvedeny hodnoty, podle kterých můžeme vyhodnotit specificku a senzitivitu metody pro chlortalidon. Z tabulek je zřejmé, že se chlortalidon měl vyskytovat v 10 vzorcích. V případě SCAN módu byl identifikován v 8 vzorcích a 2 vzorky byly označeny jako falešně negativní. Při analýze fragmentů byl chlortalidon identifikován v 9 vzorcích. U 2 vzorků z těchto 9 byla ovšem plocha píků odpovídající fragmentům chlortalidonu o dva řády nižší než u zbylých 7. Senzitivita metody pro chlortalidon je 80 % a pro jeho fragmenty 90 %. Specifickita je lepší pro vyhodnocení chlortalidonu ze SCAN módu, protože je 85 % a pro fragmenty chlortalidonu je 48 %. Vzorky, které byly označeny jako falešně pozitivní v případě SCAN módu byly falešně pozitivní i v případě analýzy fragmentů.



*Graf 5: Graf znázorňující přítomnost/nepřítomnost fragmentů chlortalidonu v závislosti na ploše píků*

Graf 5 nám ukazuje hodnoty ploch píků, které odpovídají chlortalidonu. Plochy píků odpovídající chlortalidonu se pohybovaly v rozmezí 0-2 184 006, přičemž jak můžeme vidět v grafu, tak hodnoty falešně pozitivních vzorků dosahovaly vyšších hodnot než hodnoty skutečně pozitivních vzorků. Nejvyšší hodnotou, která byla naměřena u skutečně pozitivního vzorku, je hodnota 1 583 957.

## METOPROLOL

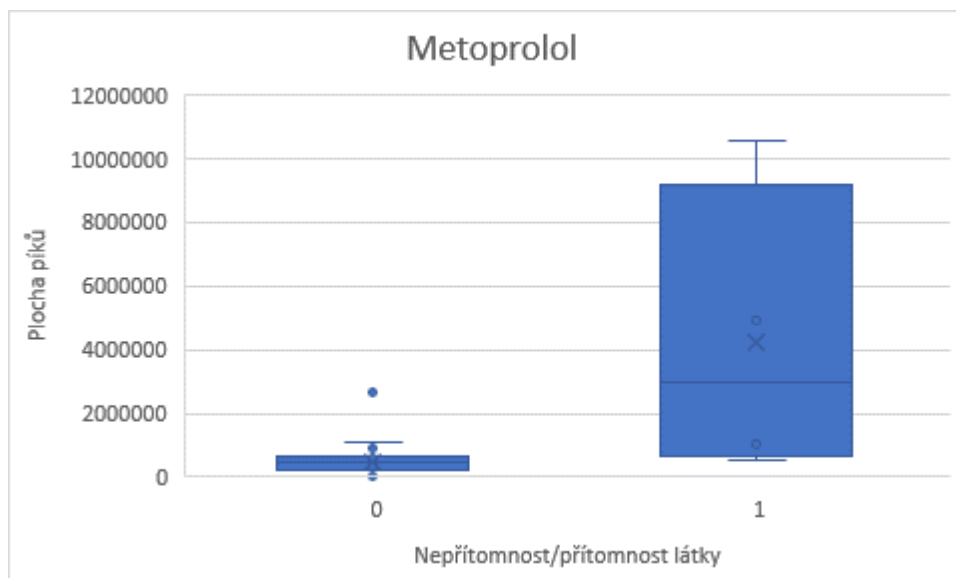
*Tabulka 12: Senzitivita a specifická testu pro metoprolol*

Test	Látka očekávána	Látka neočekávána	Celkem
<b>Pozitivní</b>	4	3	7
<b>Negativní</b>	0	51	51
<b>Celkem</b>	4	54	<b>58</b>

*Tabulka 13: Senzitivita a specifická testu pro fragmenty metoprololu*

Test	Látka očekávána	Látka neočekávána	Celkem
<b>Pozitivní</b>	4	54	58
<b>Negativní</b>	0	0	0
<b>Celkem</b>	4	54	<b>58</b>

V tabulkách 12 a 13 jsou uvedeny hodnoty, podle kterých můžeme vyhodnotit specificku a senzitivitu metody pro metoprolol a jeho fragmenty. Jelikož se měl metoprolol vyskytovat ve 4 vzorcích a opravdu zde byl identifikován, jak při vyhodnocení ze SCAN módu, tak při vyhodnocení fragmentů, je senzitivita metody pro metoprolol a jeho fragmenty 100 %. Stejně jako u acebutololu i v tomto případě je závěr, že je senzitivita testu pro metoprolol 100 %, ukvapený, jelikož by bylo třeba proměřit více takovýchto vzorků. V 54 vzorcích se vyskytovat neměl a identifikován nebyl u SCAN módu v 51 vzorcích, ale v případě vyhodnocení podle přítomnosti fragmentů bylo 54 vzorků označeno jako falešně pozitivní. Ovšem intenzita těchto 54 vzorků byla o řád nižší než u vzorků, které byly vyhodnoceny jako skutečně pozitivní. Specifická testu pro metoprolol je 94 %, ale pro fragmenty metoprololu 0 %.



**Graf 6: Graf znázorňující přítomnost/nepřítomnost fragmentů metoprololu v závislosti na ploše píkù**

Jak v grafu 6 můžeme vidět, tak hodnoty ploch píku se pohybovaly od 500 026-10 555 97. se pohybovaly od 500 026 až po 10 555 970. Vzorky, kde metoprolol neměl být přítomen, mají hodnoty ploch píků v rozmezí 2 941-2 679 224. Můžeme tedy vidět, že rozdíl je jeden řád.

## PERINDOPRILÁT

**Tabulka 14: Senzitivita a specifická testu pro perindoprilát**

Test	Látka očekávána	Látka neočekávána	Celkem
<b>Pozitivní</b>	11	8	19
<b>Negativní</b>	2	37	39
<b>Celkem</b>	13	45	<b>58</b>

**Tabulka 15: Senzitivita a specifická testu pro fragmenty perindoprilátu**

Test	Látka očekávána	Látka neočekávána	Celkem
<b>Pozitivní</b>	0	0	0
<b>Negativní</b>	13	45	58
<b>Celkem</b>	13	45	<b>58</b>

Z tabulek 14 a 15 je patrné, že se perindoprilát měl vyskytovat ve 13 vzorcích. Při vyhodnocení perindoprilátu ze SCAN módu bylo 11 vzorků skutečně pozitivních a 2 vzorky byly označeny jako falešně negativní. V případě analýzy fragmentů perindoprilátu bylo 13 vzorků označeno jako falešně negativní. Senzitivita je tedy v tomto případě 0 %, zato u vyhodnocení ze SCAN módu je 84 %. Ve 45 vzorcích se perindoprilát vyskytovat neměl a při

analýze fragmentů nebyl ani v jednom z těchto vzorků naměřen. Při identifikaci perindoprilátu ze SCAN módu bylo 8 vzorků označeno za falešně pozitivní. U těchto 8 vzorků byla intenzita nižší než u vzorků skutečně pozitivních. Specificita metody pro perindoprilát je 82 % a pro fragmenty perindoprilátu je 100 %.

Výsledky uvedené v tabulce 15 jsou značně podezřelé. V žádném ze vzorků nebyla naměřena intenzita fragmentů perindoprilátu, proč tomu tak bylo se nám zatím nepodařilo objasnit.

## TELMISARTAN

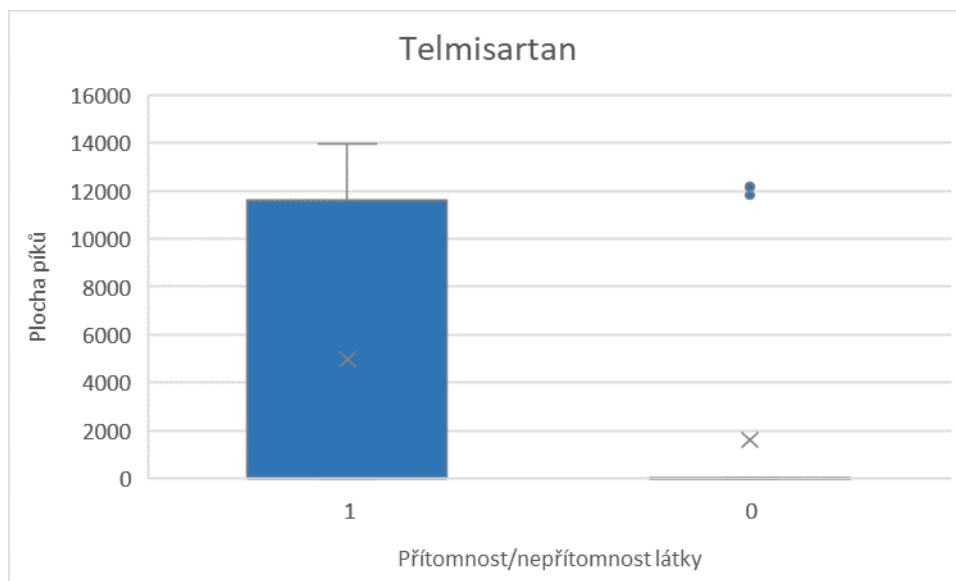
*Tabulka 16: Senzitivita a specificita testu pro telmisartan*

Test	Látka očekávána	Látka neočekávána	Celkem
<b>Pozitivní</b>	24	9	33
<b>Negativní</b>	3	22	25
<b>Celkem</b>	27	31	<b>58</b>

*Tabulka 17: Senzitivita a specificita testu pro fragmenty telmisartanu*

Test	Látka očekávána	Látka neočekávána	Celkem
<b>Pozitivní</b>	11	4	15
<b>Negativní</b>	16	27	44
<b>Celkem</b>	27	31	<b>58</b>

V tabulkách 16 a 17 jsou hodnoty týkající se telmisartanu a jeho fragmentů. Senzitivita metody pro telmisartan je 89 % a pro fragmenty telmisartanu 41 %. Z tabulek je jasné, že se měl telmisartan vyskytovat ve 27 vzorcích. V případě SCAN módu bylo skutečně pozitivních 24 vzorků a 3 vzorky byly označeny za falešně negativní. U analýzy fragmentů bylo skutečně pozitivních 11 a falešně negativních 16 vzorků. Senzitivita metody pro telmisartan je u SCAN módu 89 % a u analýzy fragmentů 41 %. Specificita metody je 71 % v případě SCAN módu, protože skutečně negativních vzorků je 22 a falešně pozitivních je 9 vzorků. U analýzy fragmentů je specificita 87 %, jelikož z 31 vzorků, kde se neměl telmisartan a tedy ani jeho fragmenty vyskytovat, byl naměřen ve 4 vzorcích. Plocha píků odpovídající těmto 4 vzorkům byla řádově stejná jako plocha píků pro skutečně pozitivní vzorky. Tyto 4 vzorky byly označeny jako falešně pozitivní.



**Graf 7: Graf znázorňující přítomnost/nepřítomnost fragmentů telmisartanu v závislosti na ploše píkù**

Jak je znázorněno v grafu 7, u vzorkù, kde se měl telmisartan vyskytovat, se hodnoty ploch píkù pohybují v rozmezí 0-13 974. U vzorkù, kde telmisartan být neměl, se hodnoty ploch píkù pohybují od 0 do 12 311.

## TELMISARTANGLUKURONID

**Tabulka 18: Senzitivita a specifická testu pro telmisartanglukuronid**

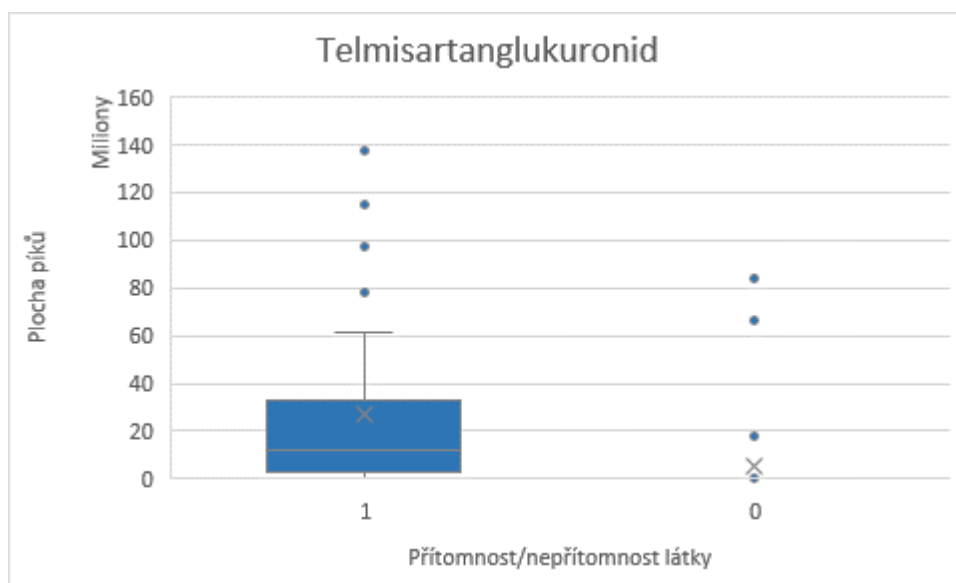
Test	Látka očekávána	Látka neočekávána	Celkem
<b>Pozitivní</b>	25	14	39
<b>Negativní</b>	2	17	19
<b>Celkem</b>	27	31	<b>58</b>

**Tabulka 19: Senzitivita a specifická testu pro fragmenty telmisartanglukuronidu**

Test	Látka očekávána	Látka neočekávána	Celkem
<b>Pozitivní</b>	24	7	31
<b>Negativní</b>	3	24	27
<b>Celkem</b>	27	31	<b>58</b>

V tabulkách 18 a 19 jsou uvedeny hodnoty, podle kterých můžeme vyhodnotit specificku a senzitivitu metody pro telmisartan-glukuronid a jeho fragmenty. Je zřejmé, že se měl telmisartan-glukuronid vyskytovat v 27 vzorcích. V případě SCAN módu byl v 25 vzorcích opravdu naměřen a při analýze fragmentù byl naměřen ve 24 vzorcích. Senzitivita metody pro telmisartan-glukuronid je 93 % a pro jeho fragmenty 89 %. V 31 vzorcích se telmisartan-

glukuronid vyskytovat neměl. V případě SCAN módu se nevyskytoval v 17 vzorcích z těchto 31, ale ve 14 vzorcích se ho podařilo identifikovat i přes skutečnost, že se tam vyskytovat neměl. Tudíž tyto vzorky by se označily jako falešně pozitivní. Při analýze fragmentů se za falešně pozitivní vzorky označilo 7 vzorků, přičemž 6 vzorků bylo označeno za falešně pozitivní jak v případě SCAN módu, tak v případě analýzy fragmentů. Specificita metody je v případě SCAN módu 55 % a v případě analýzy fragmentů 77 %.



**Graf 8: Graf znázorňující přítomnost/nepřítomnost fragmentů telmisartanglukuronidu v závislosti na ploše píků**

Z grafu 8 je vidět, že hodnoty ploch píků u vzorků, kde se měl telmisartanglukuronid vyskytovat, se pohybují v rozmezí 0-137 176 047 a u vzorků, kde neměl být přítomen, v rozmezí 0-84 244 792, rozdíl je jeden řád.

Při vyhodnocení dat, je nutné si uvědomit, že ani pro jednu látku nejsou výsledky ideální. Samozřejmě z vyhodnocení senzitivity a specificity nemůžeme se spolehlivostí tvrdit, že u některých látek jsou výsledky 100%, protože pro toto tvrzení by muselo být změřeno více vzorků. Při monitorování fragmentů by měly být výsledky mnohem lepší než ve SCAN módu. V našem případě jsme u látek, jako je amlodipin, získali lepší výsledky ze SCAN módu. Poměrně velká část vzorků byla falešně negativní, tedy očekávané látky jsme neidentifikovali. Jev falešné negativy by se dal vysvětlit tak, že pacient lék, který obsahuje danou látku, neužívá, zapomněl užít, popřípadě moč byla odebrána v době, kdy je exkrece látky ledvinami minimální, tedy koncentrace látky v moči je malá, a tudíž špatně detekovatelná. Zajímavějším

jevem ovšem je, že se vzorky pro určité látky jeví jako falešně pozitivní. V tomto případě by mohlo jít o zadržování látky v koloně. Některé výsledky by mohly být zkresleny proto, že poslední měření probíhala zhruba po roce od odebrání vzorků, tedy některé látky nemusí být tak stabilní, aby dávaly i po tak dlouhé době stále stejné a kvalitní výsledky. V případě rutinního měření těchto látek, kdy je zapotřebí změřit velké množství vzorků najednou, by se muselo použít pozitivních vzorků ke kontrole spektra a retenčních časů. Také by se měla zohlednit velikost plochy pro skutečně pozitivní vzorky a falešně pozitivní vzorky, tedy určit pomyslnou hranici, od které se budou vzorky hodnotit jako skutečně pozitivní, resp. falešně pozitivní.

Pro utvrzení kvality výsledků by bylo nutno změřit více vzorků a v kratším časovém úseku. Také by bylo možné změnit kolonu nebo složení mobilní fáze.

## **4.2 Metodika na sledování léčiv v moči**

V případě potřeby zařadit novou látku do této analytické metody by bylo třeba zjistit:

- jakou hmotu má daná látka
- v jakém retenčním čase daná látka eluuje (v případě nemožnosti srovnání se standardem, zjistit retenční čas jako v této práci změřením více vzorků)
- jaké fragmenty z dané látky vznikají
- jaká je hranice, od které lze považovat výsledek za pozitivní/negativní, aby nedocházelo ke špatnému vyhodnocování falešně pozitivních/negativních výsledků

## ZÁVĚR

V této diplomové práci byla vyvinuta metoda na sledování antihypertenziv v moči pacientů. Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí byla následně verifikována proměřením patientských vzorků.

Metoda byla vytvořena tak, aby se do ní daly zařadit další látky, které by bylo třeba sledovat. Mobilní fáze A byla směsí mravenčanu amonného a vody v poměru 1:200, ve stejném poměru byla namíchána i mobilní fáze B, místo vody byl použit methanol. Rychlost průtoku byla nastavena na 0,400 ml/min. Separace vybraných antihypertenziv probíhala na vázané reverzní fázi (kolona Supelco C18, 50 mm x 2,1 mm x 2,7 μm) při teplotě 30 °C.

Byla vytvořena knihovna spekter pro vybrané látky a antihypertenziva ve vzorcích moče pacientů byla identifikována na základě porovnání s těmito spektry. V rámci statistického vyhodnocení byly vytvořeny krabicové grafy, které ukazují, kolik vzorků bylo pozitivních a kolik negativních na sledované látky a na jaké úrovni odezvy. Také byla spočítána senzitivita a specifická metoda pro jednotlivé látky a také pro jejich fragmenty. Výsledky naznačily, že ne vždy je hodnocení fragmentů daných látek lepší než hodnocení v SCAN módu.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] OPEKAR, František. 2002. Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem. 1. vyd. Praha: Karolinum, 201 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0553-8
- [2] PRICHARD, Elizabeth a kol. *Practical laboratory skills training guides: High Performance Liquid Chromatography* [online]. UK: RSC, 2003 [cit. 2020-03-24]. ISBN 0-85404-483-3. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=abUKSwEkkE0C&oi=fnd&pg=PA1&dq=Practical+Laboratory+Skills+Training+Guides:+High+Performance+Liquid+Chromatography&ots=7rm6sd2VPV&sig=Z-KNXPU6ac-SUbx5Symwmaw8-Ow&redir\\_esc=y#v=onepage&q=Practical%20Laboratory%20Skills%20Training%20Guides%3A%20High%20Performance%20Liquid%20Chromatograph&f=false](https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=abUKSwEkkE0C&oi=fnd&pg=PA1&dq=Practical+Laboratory+Skills+Training+Guides:+High+Performance+Liquid+Chromatography&ots=7rm6sd2VPV&sig=Z-KNXPU6ac-SUbx5Symwmaw8-Ow&redir_esc=y#v=onepage&q=Practical%20Laboratory%20Skills%20Training%20Guides%3A%20High%20Performance%20Liquid%20Chromatograph&f=false)
- [3] OLŠOVSKÁ, Jana a Marie JURKOVÁ. Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin. Část 1. Teoretický úvod. *Kvasný průmysl*. 2012, **58**(2), 30-35.
- [4] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [5] SÝKORA, D. a J. FAHRNICH. *KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE A ABSORPČNÍ UV SPEKTROFOTOMETRIE* [online]. In: s. 1-19 [cit. 2020-02-22]. Dostupné z: [http://uanlch.vscht.cz/files/uzel/0012437/6\\_LC.pdf?redirected](http://uanlch.vscht.cz/files/uzel/0012437/6_LC.pdf?redirected)
- [6] NOVÁKOVÁ, Lucie, Michal DOUŠA a kol. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha: Europrint, 2013. ISBN 978-80-2604243-3.
- [7] THAMANNA, Mukthi. A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016, **5**(2), 22-28.
- [8] BUDZIKIEWICZ, Herbert a kol. Mass spectrometry and isotopes: A century of research and discussion. *Mass Spectrometry Reviews*. 2005, **25**(1), 146-157.
- [9] AWAD, Hanan a kol. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2014, **50**(2), 158-175. DOI: 10.1080/05704928.2014.954046.
- [10] DOWNARD, Kevin. *Mass spectrometry: A foundation course* [online]. Great Britain: Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2004 [cit. 2020-02-21]. ISBN 1847551300 9781847551306.
- [11] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.

- [12] FRIEDECKÝ, D. a K. LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2012, **20**(41), 152-157 [cit. 2019-01-22]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>
- [13] HOFFMANN, Edmond de a Vincent STROOBANT. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Třetí. England: John Wiley, 2007. ISBN 978-0-470-03310-4.
- [14] HAYEN, Heiko a kol. Strategies for the liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of non-polar compounds. *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 2003, **1000**(1-2), 549-565. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00505-3.
- [15] HORNING, E.C. New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure. *Analytical Chemistry*. 1973, **45**(6), 936-943. DOI: 10.1021/ac60328a035.
- [16] CARROL, D.I. a kol. Atmospheric pressure ionization mass spectrometry. Corona discharge ion source for use in a liquid chromatograph-mass spectrometer-computer analytical system. *Analytical Chemistry*. 1975, **47**(14), 2369-2373. DOI: 10.1021/ac60364a031.
- [17] HOLČAPEK, Michal a Pavel JANDERA. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické Listy* [online]. 1998, **92**, 278-286 [cit. 2019-10-22]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/9109771-Spojeni-kapalinove-chromatografie-a-hmotnostni-spektrometrie-hplc-ms.html>
- [18] DAWSON, Peter H. *Quadrupole mass spectrometry and its applications*. Amsterdam: Elsevier, 1976. ISBN 0-444-41345-6.
- [19] EKMAN, Rolf, Jerzy SILBERRING, Ann WESTAMN-BRINKMALM a Agnieszka KRAJ. *Mass spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications*. Canada: John Wiley, 2009. ISBN 978-0-471-71395-1.
- [20] BOHÁČ, Michal, Arnd INGENDO, Jens FUCHSER a Matthias WITT. Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR MS) a její využití jako nejflexibilnější hmotnostně spektrometrické metody v proteomice. *Chemické listy* [online]. 2005, 943-951 [cit. 2019-01-29]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005\\_12\\_943-951.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_12_943-951.pdf)
- [21] PERRY, Richard H., R. Graham COOKS a Robert J. NOLL. Orbitrap mass spectrometry: Instrumentation, ion motion and applications. *Wiley InterScience* [online]. 2008, (27), 661-699 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.1002/mas.20186 Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mas.20186>

- [22] SADÍLEK, Petr. *Moderní trendy v úpravě vzorků biologického materiálu k analýze vybraných biologicky aktivních látek*. Hradec Králové, 2012. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Petr Solichov.
- [23] BENÁKOVÁ, H. *Preanalytická příručka Klinických laboratoří ÚLBLD* [online]. Praha, 2019 [cit. 2020-01-27]. Dostupné z: <https://ulblld.lf1.cuni.cz/file/3513/preanalyticka-prirucka-vyd13-zm0.pdf>.
- [24] Odběr biologického materiálu. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2019-10-22]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Odběry\\_biologického\\_materiálu](https://www.wikiskripta.eu/w/Odběry_biologického_materiálu)
- [25] MUSIL, František. *Laboratorní příručka pro lékaře* [online]. Klatovy, 2019 [cit. 2020-01-27]. Dostupné z: [https://www.biolab-kt.cz/laboratorni-prirucka/\\_start.htm](https://www.biolab-kt.cz/laboratorni-prirucka/_start.htm)
- [26] KLAPKOVÁ, E., R. UŘINOVSKÁ a R. PRŮŠA. Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2011, **19**(40), 5-8 [cit. 2019-10-23]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2011/2011-1/Klapkova.pdf>
- [27] BORKOVCOVÁ, Ivana a Romana KOSTRHOUNOVÁ. *Extrakční metody* [online]. Brno, 2013 [cit. 2019-10-23]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/15463881-Extrakcni-metody-studijni-material-1-obecna-charakteristika-extrakce-2-extrakce-kapalina-kapalina-lle-3-alkalicka-hydrolyza.html>
- [28] NOVÁKOVÁ, Lucie, Moderní trendy v přípravě vzorku pro analýzu separačními technikami [přednáška]. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta UK.25.10.2019. In: [Pragolab.cz](http://Pragolab.cz) [online] [cit. 2019-10-23]. Záznam dostupný z: [https://www.pragolab.cz/files/udalosti/201910/01\\_2019%2010%20Pragolab%20sample%20prep.pdf](https://www.pragolab.cz/files/udalosti/201910/01_2019%2010%20Pragolab%20sample%20prep.pdf)
- [29] RIJKE, E. de a kol. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, **1112**(1-2), 31-63 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.01.019. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16480997>
- [30] BIMAKR, M a kol. Optimization of ultrasound-assisted extraction of crude oil from winter melon (*Benincasa hispida*) seed using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activity, total phenolic content and fatty acid composition. *Molecules*. 2012, **17**(10), 48-62. DOI: 10.3390/molecules171011748.

- [31] Vysolování. In: *Laboratorní technika* [online]. [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: <http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech/pages/vysolovani.html>
- [32] Antihypertenziva. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2019-11-06]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Antihypertenziva>
- [33] NOVINKY VE FARMAKOTERAPII ARTERIÁLNÍ HYPERTENZE. *FARMAKOTERAPEUTICKÉ INFORMACE Měsíčník pro lékaře a farmaceuty*. Praha, 2017, (6), 1-4. ISSN 1211-0647.
- [34] Inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2019-11-06]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Inhibitory\\_angiotenzin\\_konvertujícího\\_enzymu](https://www.wikiskripta.eu/w/Inhibitory_angiotenzin_konvertujícího_enzymu)
- [35] Blokátory receptorů pro angiotenzin II. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2019-11-06]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Blokátory\\_receptorů\\_pro\\_angiotenzin\\_II](https://www.wikiskripta.eu/w/Blokátory_receptorů_pro_angiotenzin_II)
- [36] Beta-blokátory. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2019-11-06]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Beta-blokátory>
- [37] Diuretika. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2019-11-06]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Diuretika>
- [38] Přímá vazodilatancia. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2019-11-06]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Přímá\\_vazodilatancia](https://www.wikiskripta.eu/w/Přímá_vazodilatancia)
- [39] Acebutolol. *DrugBank* [online]. 2005 [cit. 2020-01-10]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01193>
- [40] Acebutolol. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2020-01-10]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Acebutolol>
- [41] Státní ústav pro kontrolu léčiv: Acebutolol. *SÚKL* [online]. [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: [http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch\\_for%5D=Acebutolol&data%5Bcode%5D=&data%5Batc\\_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Brc%5D=&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-yes&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-](http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch_for%5D=Acebutolol&data%5Bcode%5D=&data%5Batc_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Brc%5D=&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-yes&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-)

- [no&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-  
def&data%5Bwith\\_adv%5D=0&search=Vyhledat&data%5Blisting%5D=20](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amlodipine)
- [42] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Amlodipine, CID=2162, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amlodipine> (accessed on Jan. 10, 2020)
- [43] Amlodipine. *Drugs.com* [online]. 1.12.2019 [cit. 2020-01-10]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/amlodipine.html>
- [44] MORGAN, Jamie L. a kol. Pharmacokinetics of amlodipine besylate at delivery and during lactation. *Pregnancy Hypertenzion*. Elsevier, 2017, **11**(2018), 77-80. DOI: 10.1016/j.preghy.2018.01.002.
- [45] REUTER-RICE, Karin E. a kol. Conventional and Unconventional Lifesaving Therapies in an Adolescent With Amlodipine Ingestion. *Critical Care Nurse*. 2016, **36**(4), 64-69. DOI: 10.4037/ccn2016524.
- [46] Státní ústav pro kontrolu léčiv: Amlodipine. *SÚKL* [online]. [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: [http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch\\_for%5D=Amlodipine&data%5Bcode%5D=&data%5Batc\\_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Brc%5D=&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-yes&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-no&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-def&data%5Bwith\\_adv%5D=0&search=Vyhledat&data%5Blisting%5D=20](http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch_for%5D=Amlodipine&data%5Bcode%5D=&data%5Batc_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Brc%5D=&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-yes&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-no&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-def&data%5Bwith_adv%5D=0&search=Vyhledat&data%5Blisting%5D=20)
- [47] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Doxazosin, CID=3157, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxazosin> (accessed on Jan. 10, 2020)
- [48] Doxazosin. *DrugBank* [online]. 2005 [cit. 2020-01-10]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00590>
- [49] Státní ústav pro kontrolu léčiv: Doxazosin. *SÚKL* [online]. [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: [http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch\\_for%5D=DOxazosin&data%5Bcode%5D=&data%5Batc\\_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Brc%5D=&data%5Bcheckbox%5D%5B0%5D=brail-yes&data%5Bcheckbox%5D%5B1%5D=brail-no&data%5Bcheckbox%5D%5B2%5D=brail-def&data%5Bwith\\_adv%5D=0&data%5Blisting%5D=20&search=Vyhledat&page=2](http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch_for%5D=DOxazosin&data%5Bcode%5D=&data%5Batc_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Brc%5D=&data%5Bcheckbox%5D%5B0%5D=brail-yes&data%5Bcheckbox%5D%5B1%5D=brail-no&data%5Bcheckbox%5D%5B2%5D=brail-def&data%5Bwith_adv%5D=0&data%5Blisting%5D=20&search=Vyhledat&page=2)

- [50] Chlorthalidone. *DrugBank* [online]. 2005 [cit. 2020-01-14]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00310>
- [51] Chlortalidon. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2019 [cit. 2020-01-14]. Dostupné z: <https://de.wikipedia.org/wiki/Chlortalidon>
- [52] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Chlorthalidone, CID=2732, Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorthalidone> (accessed on Jan. 14, 2020)
- [53] Státní ústav pro kontrolu léčiv: Tenoretic. *SÚKL* [online]. [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: [http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch\\_for%5D=Tenoretic&data%5Bcode%5D=&data%5Bac\\_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Brc%5D=&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-yes&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-no&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-def&data%5Bwith\\_adv%5D=0&search=Vyhledat&data%5Blisting%5D=20](http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch_for%5D=Tenoretic&data%5Bcode%5D=&data%5Bac_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Brc%5D=&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-yes&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-no&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-def&data%5Bwith_adv%5D=0&search=Vyhledat&data%5Blisting%5D=20)
- [54] Hydrochlorthiazide. *DrugBank* [online]. 2005 [cit. 2020-01-10]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00999>
- [55] Hydrochlorthiazide. *INCHEM* [online]. [cit. 2020-01-10]. Dostupné z: <http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/hydrochl.htm#PartTitle:1.NAME>
- [56] Hydrochlorthiazide. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2020-01-10]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Hydrochlorothiazide>
- [57] Hydrochlorthiazid. *WebMD* [online]. [cit. 2020-01-10]. Dostupné z: <https://www.webmd.com/drugs/2/drug-5310/hydrochlorothiazide-oral/details>
- [58] Telmisartan/hydrochlorthiazide. *Emc* [online]. 3.3.2016 [cit. 2020-01-10]. Dostupné z: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/8603/smpc>
- [59] PEDERSEN, Sidsel Arnspang a kol. Hydrochlorothiazide use and risk of nonmelanoma skin cancer: A nationwide case-control study from Denmark. *Journal of American Academy of Dermatology*. 2018, **78**(4), 673-681. DOI: 10.1016/j.jaad.2017.11.042.
- [60] Hydrochlorthiazide. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2020 [cit. 2020-03-25]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Hydrochlorothiazide>

- [61] Metoprolol. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2020-01-10]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Metoprolol>
- [62] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Metoprolol, CID=4171, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metoprolol> (accessed on Jan. 10, 2020)
- [63] Metoprolol. *Drugs.com* [online]. 1.8.2019 [cit. 2020-01-10]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/pro/metoprolol.html>
- [64] What is Metoprolol. *EVERYDAYHEALTH* [online]. [cit. 2020-01-10]. Dostupné z: <https://www.everydayhealth.com/drugs/metoprolol>
- [65] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Perindopril, CID=107807, Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Perindopril> (accessed on Jan. 10, 2020)
- [66] Perindopril. *DrugBank* [online]. 2005 [cit. 2020-01-10]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00790>
- [67] ŠPINAR, Prof. MUDr. Jindřich a CSc., FESC, Prof. MUDr. Jiří VÍTOVEC. Perindoprilum. *Remedia* [online]. 2005, **15**(2), 121-135 [cit. 2020-01-14]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-profilu/Perindoprilum/6-I-bA.magarticle.aspx>
- [68] SIMPSON, Dene a kol. Perindopril: In Congestive Heart Failure. *Drugs*. 2002, **62**(9), 1367-1377.
- [69] Telmisartan. *DrugBank* [online]. 2005 [cit. 2020-01-14]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00966>
- [70] HU, Miao a kol. Telmisartan increases systemic exposure to rosuvastatin after single and multiple doses, and in vitro studies show telmisartan inhibits ABCG2-mediated transport of rosuvastatin. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2016, (72), 1471-1478. DOI: 10.1007/s00228-016-2130-1.
- [71] DOLEŽAL, MUDr. Tomáš. Telmisartanum. *Remedia* [online]. 2002, **12**(2), 85-91 [cit. 2020-01-14]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-profilu/Telmisartanum/6-I-fm.magarticle.aspx>
- [72] Telmisartan/Hydrochlorothiazide 40 mg/12.5 mg Tablets. *Emc* [online]. 2018 [cit. 2020-01-14]. Dostupné z: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/8603/smpc>
- [73] RAVI, Vasu Babu a et al. Simultaneous determination of telmisartan and amlodipine in human plasma by LC-MS/MS and its application in a human pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. Elsevier, 2012, **2**(5), 319-326 [cit.

2020-01-14]. DOI: 10.1016/j.jpha.2012.03.008. Dostupné z:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5760765/>

[74] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Telmisartan, CID=65999, Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Telmisartan> (accessed on Jan. 14, 2020)

[75] Logistická regrese. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2020-03-23]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Logistick%C3%A1\\_regrese](https://cs.wikipedia.org/wiki/Logistick%C3%A1_regrese)

## **SEZNAM PŘÍLOH**

*Příloha 1: Popis vzorků moče, které byly analyzovány*

## **PŘÍLOHY**

**Příloha 1: Popis vzorků moče, které byly analyzovány**

<b>Vzorek</b>	<b>Název léku</b>	<b>Účinná látka</b>
<b>1</b>	Telmisartan 40 mg, Agen 5 mg	telmisartanum, amlodipinum
<b>2</b>	Telmisartan 80 mg, Agen 5 mg, Presid 5 mg a 2.5 mg	telmisartanum, amlodipinum, felodipinum
<b>3</b>	Telmisartan 80 mg, Agen 5 mg, Presid 5 mg a 2.5 mg	telmisartanum, amlodipinum, felodipinum
<b>4</b>	Olmetec 10 mg	olmesartan
<b>5</b>	Agen 5 mg	amlodipinum
<b>6</b>	Telmisartan 80 mg, Moduretic	telmisartanum, amilorodi hydrochlor.dihydric. s hydrochlorothiazidem
<b>7</b>	Acecor 400 mg, Amlodipin Mylan 5 mg	acebutolol, amlodipinum
<b>8</b>	Telmisartan 40 mg, Agen 5 mg	telmisartanum, amlodipinum
<b>9</b>	Gopten 4 mg, Amicloton, Verospiron, Zoxon 4 mg, Lusopress , Rivocor 10 mg	trandolaprilum, chlortalidonum- amiloridi hydrochloridum dihydricum, spironolactonum, doxazosinum, nitrendipinum, bisoprololi fumaras
<b>10</b>	Triplixam 5/1.25/10	indapamidum amlodipini besilas perindoprilum argininum
<b>11</b>	Rivocor (Concor) 10 mg, Telmisartan/hydrochlorothiazid, Nitresan	bisoprololi fumaras, telmisartanum/hydrochlorothiazidum, nitrendipinum
<b>12</b>	Rivocor 10 mg, Twynsta 80/5 mg, Amicloton, Verospiron 25 mg, Dopegyt	bisoprololi fumaras, telmisartanum/amlodipinum, chlortalidonum-amiloridi hydrochloridum dihydricum, spironolactonum, methyl dopum
<b>13</b>	Tritace 2.5 mg	ramiprilum
<b>14</b>	Hydrochlorothiazid 25 mg, Verospiron 100 mg, Verospiron 50 mg	hydrochlorothiazidum, spironolactonum
<b>15</b>	Verospiron 100 mg, Hydrochlorothiazid 25 mg, Cardilopin 10 mg (Apo-amlo)	spironolactonum, hydrochlorothiazidum, amlodipini besilas
<b>16</b>	Telmisartan/Hydrochlorothiazid, Agen 5 mg, Verospiron 25 mg	telmisartanum/hydrochlorothiazidum, amlodipinum, spironolactonum

<b>17</b>	Rivocor 10 mg, Doxazosin Mylan 4 mg, Dopegyt 250 mg, Telmisartan 80 mg,	bisoprololi fumaras, doxazosinum, methyldopum, telmisartanum
<b>18</b>	Triplixam 10/2.5/5	indapamidum amlodipini besilas perindoprilum argininum
<b>19</b>	Nebilet 5 mg	nebivololi hydrochloridum
<b>20</b>	Tritace 5 mg, Betaloc 100 mg	ramiprilum, metoprololi succinas
<b>21</b>	Twynsta 80/5	telmisartanum/amlodipinum
<b>22</b>	Rivocor (Concor) 5 mg, Tezeo (Telmisartan) 80 mg, Kapidin 20 mg	bisoprololi fumaras, telmisartanum, lercanidipini hydrochloridum
<b>23</b>	Concor cor 5 mg, Prestarium Neo, Loradur 5/50	bisoprololi fumaras, perindoprilum argininum, amiloridi hydrochloridum anhydricum-hydrochlorothiazidum
<b>24</b>	Agen 5 mg, Sectral 400, Loradur Mite	amlodipinum, acebutololi hydrochloridum, hydrochlorothiazidum-amiloridi hydrochloridum dihydricum
<b>25</b>	Prestarium Neo, Lusopress 20	perindoprilum argininum, nitrendipinum
<b>26</b>	Tezefort 80/10, Indap 2.5 mg	amlodipini besilas/telmisartanum, indapamindum
<b>27</b>	Moduretic 5/50, Concor 5 mg	amiloridum-hydrochlorothiazidum, bisoprololi fumaras
<b>28</b>	Micardis plus, Rivocor 5 mg	telmisartanum-hydrochlorothiazidum, bisoprololi fumaras
<b>29</b>	Telmisartan 80 mg, Apo-amlo 10 mg, Concor 10 mg	telmisartanum, amlodipinum, bisoprololi fumaras
<b>30</b>	Betaloc 200 mg, Inhibace 2.5 mg	metoprololi succinas, cilazaprilum
<b>31</b>	Betaloc 200 mg ZOK, Dopegyt, Valsacor 320 mg	metoprololi succinas, methyldopum, valsartanum
<b>32</b>	Triplixam 10/2.5/10, Doxazosin 4 mg XL	indapamidum amlodipini besilas perindoprilum argininum, doxazosinum
<b>33</b>	Twynsta 80/5, Rivocor 5 mg, Amicloton	telmisartanum/amlodipinum, bisoprololi fumaras, chlortalidonum-amiloridi hydrochloridum dihydricum

34	Triplixam 10/2.5/10, Bisoprolol 2.5 mg	indapamidum amlodipini besilas perindoprilum argininum, bisoprololi fumaras
35	Betaloc ZOC 25 mg, Gopten 2 mg	metoprololi succinas, trandolaprilum
36	Concor combi 5/5, Tezeo 80 mg, Indapamid 2.5 mg	bisoprololi fumaras/amlodipini besilas, telmisartanum/hydrochlorothiazidum, indapamidum
37	Triplixam 5/1.25/5	indapamidum amlodipini besilas perindoprilum argininum
38	Triplixam 10/2.5/10	indapamidum amlodipini besilas perindoprilum argininum
39	Prestance 10/10	perindoprilum argininum/amlodipinum
40	Amicloton	chlortalidonum-amiloridi hydrochloridum dihydricum
41	Nitresan 20 mg, Rivocor (Concor) 10 mg, Prestarium Neo Combi	nitrendipinum, bisoprololi fumaras, perindoprilum argininum/indapamidum
42	Telmisartan 80 mg, Amicloton, Rivocor 10 mg	telmisartanum, chlortalidonum-amiloridi hydrochloridum dihydricum, bisoprololi fumaras
43	Twynsta 80/5, Concor 5 mg, Amicloton	telmisartanum/amlodipinum, bisoprololi fumaras, chlortalidonum-amiloridi hydrochloridum
44	Rivocor 5 mg, Agen 10 mg	bisoprololi fumaras, amlodipinum
45	Twynsta 80/10, Rivocor 5 mg	telmisartanum/amlodipinum, bisoprololi fumaras
46	Twynsta 80/5, Concor 5 mg	telmisartanum/amlodipidum, bisoprololi fumaras
47	Twynsta 80/10, Rhefluin (Moduretic), Rivocor (Concor) 5 mg	telmisartanum/amlodipinum, amiloridi hydrochloridum dihydricum, bisoprololi fumaras
48	Concor (Rivocor) 5 mg, Agen 10 mg, Telmisartan/hydrochlorothiazid 80/12.5	bisoprololi fumaras, amlodipinum, telmisartanum-hydrochlorothiazidum
49	Concor combi 5/5 mg	bisoprololi fumaras/amlodipini besilas

<b>50</b>	Amicloton, Twynsta 80/5	chlortalidonum-amiloridi hydrochloridum dihydricum, telmisartanum/amlodipinum
<b>51</b>	Concor 5 mg, Amicloton, Twynsta 80/5	bisoprololi fumaras, chlortalidonum-amiloridi hydrochloridum dihydricum, telmisartanum/amlodipinum
<b>52</b>	Bisoprolol 2.5 mg, Agen 10 mg, Telmisartan 80 mg	bisoprololi fumaras, amlodipinum, telmisartanum
<b>53</b>	Telmisartan 80 mg, Rivocor 5 mg, Amicloton, Nitresan 20 mg	terlmisartanum, bisoprololi fumaras, chlortalidonum-amiloridi hydrochloridum dihydricum, nitrendipinum
<b>54</b>	Triplixam 10/2.5/5, Dopegyt	indapamidum amlodipini besilas perindoprilum argininum, methyldopum
<b>55</b>	Prestarium 5 mg, Kapidin 20 mg	perindoprilum argininum, lercanidipini hydrochloridum
<b>56</b>	Agen 5 mg, Prestarium Neo 5 mg	amlodipinum, perindoprilum argininum
<b>57</b>	Concor 5 mg, Telmisartan 80 mg, Amicloton	bisoprololi fumaras, telmisartanum, chlortalidonum-amiloridi hydrochloridum dihydricum
<b>58</b>	Tonarssa 8/10 mg, Concor cor 2.5 mg	amlodipini besilas-perindoprilum erbuminum, bisoprololi fumaras