

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Analýza metabolitů paracetamolu pomocí kapalinové chromatografie

Radka Chudomská

Bakalářská práce

2018

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Analysis of metabolites of paracetamol using liquid chromatography

Radka Chudomská

Bachelor thesis

2018

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

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Radka Chudomská**  
Osobní číslo: **C15216**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Název tématu: **Analýza metabolitů paracetamolu pomocí kapalinové chromatografie**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

1. V dostupné literatuře vyhledejte a popište práce zabývající se analýzou paracetamolu kapalinovou chromatografií. Stručně popište principy kapalinové chromatografie, používanou instrumentaci a fázové systémy vhodné pro analýzu paracetamolu.
2. Experimentálně ověřte možnosti separace nejvýznamnějších metabolitů paracetamolu v chromatografii hydrofilních interakcí.
3. Získané výsledky shrňte a diskutujte.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.**

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

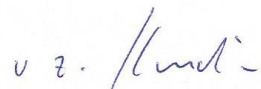
Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSC.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSC.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

**Prohlašuji:**

Prohlašuji, že jsem tuto práci 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 30.6. 2018

.....

Radka Chudomská

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za rady, pomoc, vstřícný přístup a trpělivost při vypracování bakalářské práce. Poděkování také patří doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. za poskytnutí vzorků použitých pro analýzu v experimentální části této práce.

## **ANOTACE**

Teoretická část této bakalářské práce se zabývá obecnými vlastnostmi paracetamolu a jeho prospěšnými i škodlivými účinky na lidský organismus. Dále jsou zde shrnuty základní chromatografické metody, podrobněji je popsána vysokoúčinná kapalinová chromatografie včetně její instrumentace a použití módu pro chromatografii hydrofilních interakcí. Experimentální část této práce se soustředí na různé analýzy metabolitů paracetamolu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

acetaminofen, chromatografie hydrofilních interakcí, paracetamol, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

## **TITLE**

Analysis of metabolites of paracetamol using liquid chromatography

## **ANNOTATION**

Theoretical part of this bachelor thesis deals with general characteristic of paracetamol and its beneficial and harmful effects on human body. Then there are discussed basic chromatographic methods, high-performance liquid chromatography and its instrumentation and use of mode for hydrophilic interaction chromatography are explained closely. Experimental part of this thesis focuses on various analyses of paracetamol metabolites using high-performance liquid chromatography.

## **KEYWORDS**

acetaminophen, high-performance liquid chromatography, hydrophilic interaction chromatography, paracetamol

# Obsah

ÚVOD.....	12
1. CÍL PRÁCE.....	13
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	14
2.1. Paracetamol .....	14
2.1.1. Fyzikálně-chemické vlastnosti paracetamolu.....	14
2.1.2. Účinek paracetamolu .....	15
2.1.3. Metabolismus paracetamolu .....	15
2.1.4. Akutní otrava paracetamolem .....	17
2.1.4.1. Otrava paracetamolem .....	17
2.1.4.2. Rizikové skupiny .....	18
2.1.4.3. Léčba otravy paracetamolem.....	18
2.2. Definice chromatografie a rozdělení chromatografických metod .....	18
2.2.1. Definice chromatografie .....	19
2.3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	23
2.3.1. Základní části kapalinového chromatografu – instrumentace v HPLC .....	24
2.3.2. Chromatografický proces.....	27
2.4. Hydrofilní interakční chromatografie.....	29
2.5. Přehled prací zabývajících se analýzou paracetamolu (a jeho metabolitů).....	32
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	35
3.1. Použité přístroje, chemikálie a materiál .....	35
3.2. Chromatografické podmínky pro HPLC analýzu paracetamolu a jeho metabolitů .....	36
4. VÝSLEDKY A DISKUZE .....	38
4.1. Vývoj podmínek pro HPLC analýzu paracetamolu a jeho metabolitů.....	38
5. ZÁVĚR .....	43
6. POUŽITÁ LITERATURA A ZDROJE .....	44



## SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1: Chemická struktura paracetamolu .....	14
Obrázek 2: Molekula NAPQI .....	16
Obrázek 3: Schéma metabolismu paracetamolu .....	16
Obrázek 4: Metabolismus APAP .....	17
Obrázek 5: Jednoduché schéma HPLC .....	24
Obrázek 6: Chromatogram (příklad).....	28
Obrázek 7: Schéma retenčního mechanismu v HILIC .....	30
Obrázek 8: Izokratická analýza (APAP-směs) .....	39
Obrázek 9: Gradient 1 .....	39
Obrázek 10: Gradient 2.....	40
Obrázek 11: Gradient 3.....	40
Obrázek 12: Gradient 4.....	41
Obrázek 13: Vzorek č.1 (deproteinát myších jater 1 h po podání APAP).....	41
Obrázek 14: Vzorek č.17 (kontrola vzorku deproteinátu myších jater) .....	42
Tabulka 1: Podmínky pro jednotlivé gradienty .....	37

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ALT	alaninaminotransferáza
APAP	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -aminofenol, paracetamol
APAP-CYS	konjugát paracetamolu s cysteinem
APAP-SG	konjugát paracetamolu s glutathionem
AST	aspartátaminotransferáza
ASTM	Americká společnost pro zkoušení a materiály
BSI	Britský normalizační úřad
CK-MB	myokardiální izoenzym kreatinkinázy
COX-2	cyklooxygenáza-2
CYP450	cytochrom P450
GC	plynová chromatografie
GPC	gelová permeační chromatografie
GSH	glutathion
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí
I.D.	vnitřní průměr
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
LC	kapalinová chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MZ ČR	Ministerstvo zdravotnictví České republiky
NAPQI	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -benzochinonimin
PC	papírová chromatografie

TLC	tenkovrstvá chromatografie
UHPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie
UV-VIS	ultrafialovo-viditelná oblast spektra

# ÚVOD

Paracetamol je celosvětově oblíbené analgetikum používané k léčbě střední bolesti. V malém množství je neškodný, pokud ale dojde k předávkování, hrozí velké riziko akutního jaterního selhání a dalších zdravotních komplikací.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jedna z nejpoužívanějších a nejmodernějších analytických technik zabývajících se separací složek směsí v dnešní době. Je natolik oblíbená především pro svou citlivost, univerzálnost, rychlost analýzy a minimální spotřebu analytů.

HPLC má široké uplatnění v analytické chemii, v lékařství i farmakologii. Pro stanovování množství léčiv a jejich metabolitů v lidském organismu je ideální, a často právě výsledek HPLC analýzy má rozhodující vliv pro další diagnostický a léčebný postup.

HILIC je speciální druh kapalinové chromatografie, pomocí níž lze separovat středně až silně hydrofilní polární sloučeniny, jež jsou pro klasickou HPLC analýzu nevhodné.

# 1. CÍL PRÁCE

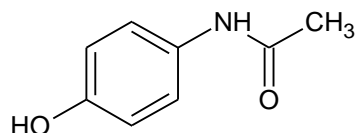
Cílem práce je analýza paracetamolu a jeho metabolitů pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie jak teoreticky, tak i prakticky.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Paracetamol

#### 2.1.1. Fyzikálně-chemické vlastnosti paracetamolu

- **Chemický název dle IUPAC:** *N*-(4-hydroxyfenyl)acetamid
- **Lékopisný název:** Paracetamol
- **Synonyma:** *N*-acetyl-*p*-aminofenol, APAP
- **Strukturní vzorec:**



Obrázek 1: Chemická struktura paracetamolu

- **Sumární vzorec:** C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>
- **M<sub>r</sub>** 151,16
- **CAS** 103-90-2

Paracetamol je bílý krystalický prášek, který je mírně rozpustný ve vodě a velmi špatně rozpustný v dichlormethanu. Je ale velmi snadno rozpustný v 96% ethanolu [1].

**Paracetamol** (neboli **acetaminofen**) je lék oblíbený pro své antipyretické a analgetické účinky a je v humánní medicíně velice hojně používán již od roku 1893. Celosvětově je dostupný ve formě tablet i roztoků ve více než 200 formách a vyrábí ho nespočet farmaceutických firem [2].

Paracetamol je metabolický derivát fenacetinu, chemicky se tedy jedná o 4-hydroxyacetanilid. Dalším možným názvem je *N*-acetyl-*p*-aminofenol, a z tohoto názvu se tedy obecně začala používat zkratka APAP [2].

### 2.1.2. Účinek paracetamolu

Přesný účinek paracetamolu není znám, ale předpokládá se, že je zprostředkován přes centrální nervový systém, kde dochází k inhibici syntézy prostaglandinů a je vysoce selektivní pro cyklooxygenázové enzymy (COX-2) přímo v hypotalamu [3].

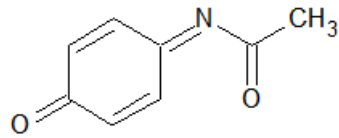
Paracetamol má slabé protizánětlivé účinky, a proto je používán jako běžný bezpředpisový lék proti mírné až střední bolesti a horečce. Je obvykle doporučován k léčbě menších bolestí způsobených chřipkou, virových a bakteriálních infekcí, bolesti hlavy a zubů či menstruačních bolestí. V malém množství je neškodný, vysoká dávka však může způsobit akutní selhání jater, ledvin nebo krevních buněk. V USA, Velké Británii a dalších evropských zemích je úmyslné i neúmyslné předávkování paracetamolem považováno za jednu z hlavních příčin akutního jaterního selhání jak u dospělých, tak i u dětí [4; 5; 6].

### 2.1.3. Metabolismus paracetamolu

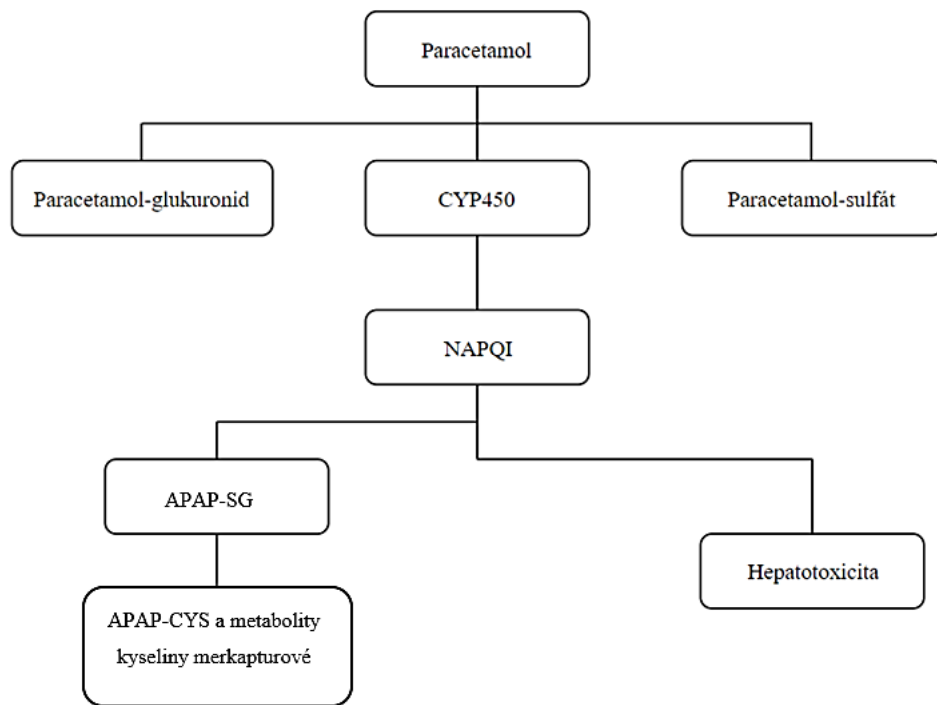
APAP je metabolizován v játrech konjugací na paracetamol-glukuronid (50-60 %) nebo paracetamol-sulfát (25-35 %). Z toho je asi 2-10 % metabolizováno oxidací na velmi reaktivní a toxický meziprodukt NAPQI (viz. Obrázek 2), jež je inaktivován glukuronidizací s glutathionem na cystein (viz. Obrázek 4), na metabolity kyseliny merkapturové a 3-hydroxyparacetamol. Paracetamol-glukuronid, paracetamol-sulfát, 3-hydroxyparacetamol, cystein a všechny metabolity kyseliny merkapturové jsou společně s nezměněným APAP (2-5 %) vyloučeny močí [2; 7].

Při požití terapeutického množství je tedy 90 % APAP metabolizováno v játrech pomocí sulfurylace a glukuronidace. Vznikají z něj netoxické metabolity, které jsou vyloučeny močovým systémem. Malá část nezmetabolizovaného APAP je oxidativně přeměněna jaterními enzymy ze skupiny cytochromů P450 na silně reaktivní a toxický meziprodukt *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin (NAPQI). To znamená, že čím více paracetamolu je přijato, tím více NAPQI vzniká. V normálním případě je tento toxický metabolit ihned detoxifikován pomocí konjugace s glutathionem (na APAP-SG). Tento konjugát je dále metabolizován na APAP-cystein a metabolity kyseliny merkapturové, jež jsou vyloučeny močí. Nicméně při nadměrném požití acetaminofenu postupně dochází k vyčerpání zásob glutathionu potřebného pro konjugaci, což způsobí kovalentní navázání NAPQI

s bílkovinami hepatocytů (viz. Obrázek 3). To může případně vést až k centrilobulární nekróze jater [2; 4; 7; 5].

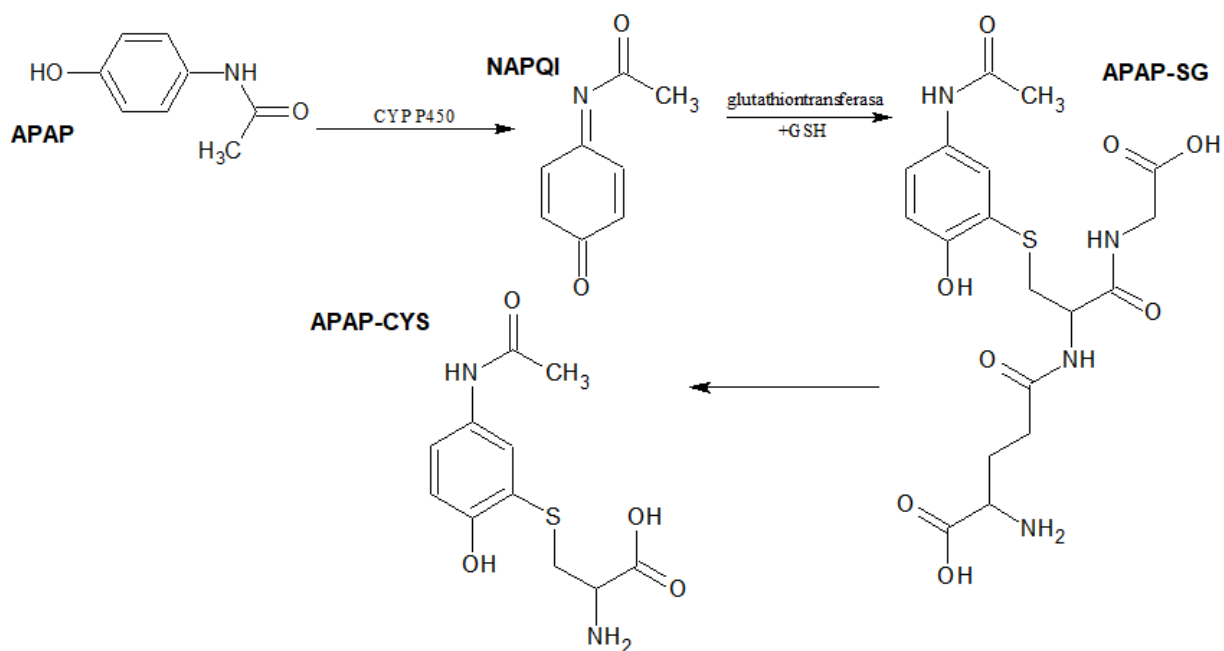


Obrázek 2: Molekula NAPQI



Obrázek 3: Schéma metabolismu paracetamolu [3]





Obrázek 4: Metabolismus APAP [26]

## 2.1.4. Akutní otrava paracetamolem

### 2.1.4.1. Otrava paracetamolem

Nejznámější formou toxicity acetaminofenu je akutní, závažné hepatocelulární selhání důsledkem úmyslného či neúmyslného předávkování. Selhání je přímým důsledkem požití nadměrného množství APAP. Je proto velmi důležité dodržet terapeutickou dávku, která se uvádí 10-15 mg/kg s maximální dávkou 2,5 g/24 hodin. Nedodržení tohoto množství může skončit až fatálně. Toxická dávka se uvádí 150 mg/kg u dětí a více než 7,5 g/kg u dospělých. K jaternímu poškození dochází většinou u dávek větších než 15 g [2; 7; 5].

Jaterní selhání nastává 24 až 72 hodin po požití, dochází k výraznému zvýšení hodnot ALT a AST v séru (hodnoty často vyšší než 2000 U/l = 30  $\mu$ kat/l; tedy až 30x vyšší než fyziologická hodnota), po 48 až 96 hodinách je následováno typickými klinickými příznaky jako žloutenka a zmatenost. 3-5 dní po intoxikaci většinou dochází k selhání jater a ledvin a k postižení myokardu spojeným se zvýšenými hodnotami CK-MB. Pokud je otrava včas rozpoznána a vhodně léčena, hodnoty ALT i AST se rychle vracejí na původní hladinu a uzdravení je rychlé. Pokud ale otrava včas podchycena není a pacient není léčen až do doby, kdy u něj dojde k jaternímu selhání, je úmrtnost 20-40 % [2; 8; 5].

### **2.1.4.2. Rizikové skupiny**

Velké riziko akutního jaterního selhání po požití většího množství paracetamolu hrozí u kriticky nemocných pacientů, u nichž současně probíhá další nemoc, u osob trpících malnutricí, u alkoholiků, nebo u pacientů s již probíhajícím jaterním onemocněním [5].

Dalším z důvodů, kdy může dojít k neúmyslnému předávkování, je to, když pacient souběžně s paracetamolem užívá další kontrolované látky (jako oxykodon či kodein), nebo jiné přípravky obsahující paracetamol (jako rozpustný Coldrex<sup>TM</sup>, jež se skládá z více léčebných složek). Takový pacient často nečte příbalové informace u jednotlivých léků, proto si ani není vědom rizika, kterému se vystavuje při snaze zbavit se bolesti [5].

Příkladem neúmyslného předávkování paracetamolem u dětí je nejčastěji nesprávný výpočet optimální dávky nebo užívání tablet pro dospělé místo těch určených pro dětskou věkovou skupinu [5].

### **2.1.4.3. Léčba otravy paracetamolem**

V roce 1974 byl poprvé použit jako antidotum acetylcystein. Ten zabraňuje jaternímu poškození především díky tomu, že obnovuje zásobu glutathionu v játrech. Kromě toho také zlepšuje hemodynamiku a využití kyslíku a zmenšuje otok mozku. Přesný mechanismus těchto efektů není znám, ale je možné, že se může týkat odstraňování volných radikálů nebo změny průtoku krve játry [8].

## **2.2. Definice chromatografie a rozdělení chromatografických metod**

Metody založené na principu chromatografie jsou používány již od pradávna. Přirozeně se vyskytující fenomény jako pohyb plynů skrz zemskou kůru a půdu, prosakování vody přes skály, jíl a půdu mají za následek dělení a pohyb jednotlivých částic vyskytujících se v půdě, rostlinách a vodě. V průběhu let člověk dokázal tento fenomén aplikovat v praxi například k odseparování barviv z kořenů a listů rostlin, ke zpracování potravy či k extrakci kovů. Vědecká hodnota těchto metod ale nebyla poznána až do průmyslové revoluce v 19. století. Pojem *chromatografie* (psaní barvou, odvezeno z řeckých slov chroma-barva, a graphein-psaní) poprvé použil v roce 1906 ruský botanik Michail Semjonovič Cvět k popisu své práce týkající se separace rostlinných barevných pigmentů na koloně. Pracoval tak, že

filtoval petroletherový extrakt přes skleněnou kolonu plněnou uhličitanem vápenatým [9; 10].

### **2.2.1. Definice chromatografie**

„Chromatografie je metoda, při které jsou komponenty směsi rozděleny na adsorpční koloně v průtokovém systému“ (Cvět, 1906) [9]

Od doby Cvěta se chromatografie významně vyvinula a dnes zahrnuje mnoho možností, jak základní separační proces provést. Chromatografie proto obsahuje veliký rozsah technik, z nichž spousta má již vlastní terminologii. Organizace pro normalizaci v některých zemích, jako například Britský normalizační úřad (BSI) nebo Americká společnost pro zkoušení a materiály (ASTM), měly dokonce vlastní definice. Proto v roce 1993 Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (IUPAC) publikovala aktualizovanou nomenklaturu a definici pro chromatografii, nazvanou „Unifikovaná nomenklatura pro chromatografii“ [9].

#### **IUPAC definice chromatografie**

"Chromatografie je fyzikální separační metoda, při níž jsou separované složky distribuovány mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je stacionární a druhá se pohybuje v daném směru" [11; 12].

#### **Dělení chromatografických metod**

Chromatografie, proces, kterým mohou být rozděleny jednotlivé komponenty směsi, se stala jednou ze základních analytických metod pro identifikaci a kvantifikaci sloučenin v plynném nebo kapalném skupenství. Základní princip je založen na rovnováze zkoumaných komponent mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Jedna fáze je stacionární (tedy nepohyblivá), druhá fáze se nazývá mobilní (tedy pohyblivá). Fáze jsou voleny tak, aby v každé z nich měly složky vzorku odlišnou rozpustnost. Právě rozdílná rozpustnost jednotlivých složek vede k jejich oddělení. Ze všech instrumentálních analytických technik má chromatografie nejširší možnosti využití. Chromatografie zaujímá dominantní pozici ve všech laboratořích zabývajících se molekulární analýzou [13].

V dnešní době je chromatografie všeobecně nejvíce využívanou a nejúčinnější dostupnou separační technikou v analytické chemii nabízející obrovské možnosti separace a kvantifikace jak anorganických, tak organických látek. Chromatografická separace zahrnuje

interakci vzorku s kapalnou nebo pevnou stacionární fází, za současného proudění kapalné nebo plynné mobilní fáze právě přes stacionární fázi. To je proces nazývaný eluce [10; 14].

Vzhledem k tomu, že je chromatografických metod spousta, je možné je rozdělit do následujících skupin [15]:

#### **a) Rozdělení podle skupenství mobilní fáze [15]**

Pokud je mobilní fází kapalina, jedná se o kapalinovou chromatografii (LC) a pokud se mobilní fáze vyskytuje ve skupenství plynném, jedná se o chromatografii plynovou (GC).

#### **Plynová chromatografie**

Od Cvětovy definice chromatografie uběhlo téměř 50 let do vzniku chromatografie plynové (GC–gas chromatography). Od té doby se GC velmi rychle vyvinula především v průběhu 60. let, a to způsobilo rapidní změny v analytické chemii a spouště oblastní výzkumu a vývoje [9].

Plynová chromatografie je jednou z nejdůležitějších analytických technik, a protože byla dostupná téměř o deset let dříve než HPLC, dá se považovat za předchůdce moderní instrumentální analýzy a rutinní analýzy [9].

Princip GC je založen na separaci těkavých složek směsí pomocí migrace skrz kolonu obsahující tekutou nebo pevnou stacionární fází rovnoměrně rozloženou po celém povrchu chromatografické kolony. Vzorek je unášen pomocí mobilní fáze kolonou a každá složka směsi interaguje se stacionární fází, proto jsou v koloně zadržovány. Na konec kolony se nejdříve dostanou složky málo zadržované. Každý analyt je po odchodu z kolony detekován pomocí specifického elektrického signálu. Takový signál je zaznamenán do chromatogramu, jež je tvořen závislostí tohoto specifického signálu na čase [9].

#### **Kapalinová chromatografie**

Pojem kapalinová chromatografie zahrnuje různé separační techniky jako kapalina-kapalina, kapalina-pevná fáze, iontově-výměnnou a velikostně-výměnnou chromatografii, u nichž všech je mobilní fází kapalina. Klasická kolonová kapalinová chromatografie je charakterizována použitím poměrně širokých skleněných kolon rovnoměrně pokrytých stacionární fází a prouděním mobilní fáze pouze díky gravitační síle. I když se touto technikou podařilo provést spousty významných separací, je obecně velmi pomalá a

zkoumání získaných frakcí (např. pomocí chemických nebo spektroskopických technik) může být velmi zdlouhavé [16].

Zhruba od 70. let se ale začala zdokonalovat moderní vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC z anglického High Performance Liquid Chromatography) a ta umožnila kapalinové chromatografii se vyrovnat plynové chromatografii díky tomu, že poskytla vlastnosti jako vysokou eluční sílu mobilní fáze, rychlejší separaci, nepřetržitou detekci eluátu, opakovatelnou a reprodukovatelnou analýzu s použitím stejné kolony a automatizaci celého analytického procesu včetně vyhodnocení výsledků [16].

HPLC je v některých ohledech univerzálnější než chromatografie plynová vzhledem k tomu, že není limitovaná těkavými a teplotně-nestabilními vzorky a možnost volby mobilní a stacionární fáze je mnohem širší [16].

#### **b) Rozdělení podle uspořádání stacionární fáze [15]**

Další jednoduché členění je podle toho, zda je stacionární fáze umístěna v koloně (kolonová chromatografie), nebo na plochém podkladu jako papír či fólie (plošná chromatografie).

#### **Plošná chromatografie**

##### **Papírová chromatografie**

Papírová chromatografie (PC) byla jednou z prvních vynalezených forem chromatografie. Její princip spočívá v použití celulóзовého papíru jako rovinnou „kolonu“. Archer J.P. Martin a Richard L.M. Synge začali tuto dvojrozměrnou metodu používat k rozdělování více než 20 aminokyselin s použitím ninhydrinu pro označení oddělených složek. Nyní je PC téměř ve všech případech nahrazena tenkovrstvou chromatografií pro její vyšší separační účinnost [9].

##### **Tenkovrstvá chromatografie**

Tenkovrstvá chromatografie (TLC-Thin Layer Chromatography) je technika, při které se komponenty směsi rozdělují podle rozdílné pohyblivosti. Jako stacionární fáze slouží tenká vrstva sorbentu (silikagel, celulóza, alumina) nanosená na vhodné podložce (sklo, kovová či plastová fólie). Vzorek společně se standardy je nanosen na začátek této vrstvy a ta je po zaschnutí vložena do vyvíjecí komory s mobilní fází (nejčastěji organické

rozpouštědlo). Složky směsi postupně vzlínají a po vyjmutí z vyvíjecí komory je použito vhodné detekční činidlo pro odečet [9].

TLC je pro svou rychlost a jednoduchost používána zejména jako kvalitativní technika pro identifikaci organických i anorganických látek pomocí porovnávání se standardy, které jsou nanášeny společně se vzorkem. Kvantitativní analýza je možná, ale její přesnost je velmi malá [9].

### **c) Rozdělení podle povahy děje, který při separaci probíhá**

Při každé separaci obvykle probíhá více fyzikálně-chemických dějů současně, z nichž jeden převládá. Proto můžeme použít následující rozdělení [15]:

#### **Iontově-výměnná chromatografie**

Iontová výměna je proces, ve kterém roztok elektrolytu prochází skrz ionex (iontoměnič), jehož aktivní ionty jsou nahrazeny ionty podobného náboje příslušící zkoumanému analytu. O separaci tedy rozhodují elektrostatické přitažlivé síly mezi ionty ionexu (stacionární fáze) a ionty vzorku [15].

#### **Gelová permeační chromatografie**

U gelové permeační chromatografie (GPC) je stacionární fází pórovitá polymerní hmota, jejíž póry jsou kompletně zaplněné mobilní fází. Velikost pórů je rozhodující vzhledem k tomu, že metoda je založená na tom, že dojde k oddělení látek podle jejich velikosti. Proudění mobilní fáze způsobí, že větší molekuly kolonou projdou bez porušení gelu, tím pádem nejrychleji. Zato malé molekuly projdou kolonou mnohem pomaleji, protože se budou zdržovat v pórech [9]. I když je velká možnost využití GPC v analýze organických a anorganických materiálů, je tato technika používána především ve studiu komplexních biochemických nebo vysoce polymerizovaných molekul [16].

#### **Afinitní chromatografie**

U afinitní chromatografie se využívá schopnosti stacionární fáze vázat určité složky zkoumaného vzorku, ke kterým má selektivní vztah. Metoda je založena na navázání afinitního ligandu na stacionární fází, s nímž následně reaguje biologicky aktivní látka, jež je stanovována. Tato metoda je často využívána ke stanovování peptidů, aminokyselin, enzymů, antigenů a protilátek [15; 17].

## **Rozdělovací chromatografie**

U rozdělovací chromatografie rozhoduje o separaci rozdílná rozpustnost složek vzorku ve stacionární a mobilní fázi. Nejčastěji jsou vzorky rozdělovány mezi dvě kapaliny, z nichž jedna je zakotvena na nosiči a tím tvoří stacionární fázi. Retenční čas zkoumaných analytů závisí na jejich rozpustnostech v každé z obou fází [15].

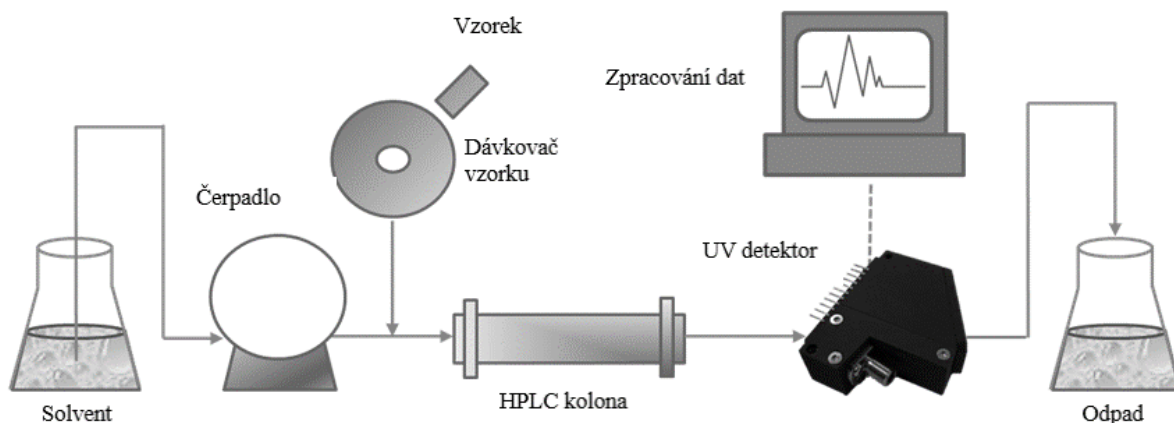
## **Adsorpční chromatografie**

U adsorpční chromatografie záleží na tom, jak silně jsou zkoumané složky schopny poutat se na povrch pevné stacionární fáze. Využívá se tedy mezimolekulových přitažlivých sil mezi analytem a stacionární fází [15].

## **2.3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie**

HPLC je technika určená pro separaci složek směsí díky odlišné migraci skrz kolonu obsahující mikročasticovou pevnou stacionární fázi s částicemi o průměru 2-5  $\mu\text{m}$ , nebo porézní monolitický materiál, který způsobí významný pokles tlaku na koloně. Analyzované látky jsou transportovány skrz kolonu díky tlakovému proudu kapalné mobilní fáze a jsou detekovány, jakmile opustí kolonu. Aby došlo k plynulému proudění, musí být na mobilní fázi vyvinut velký tlak [13; 10].

### 2.3.1. Základní části kapalinového chromatografu – instrumentace v HPLC



Obrázek 5: Jednoduché schéma HPLC [18]

#### Zásobníky mobilní fáze

S ohledem na fyzikálně-chemické vlastnosti mobilní fáze (eluentu) jsou používány různé nádoby. Nejčastěji jsou to tmavé hnědé laboratorní lahve, jejichž zbarvení chrání eluenty citlivé na světlo. Pokud jsou analyzovány anorganické ionty, měly by se používat polyethylenové (plastové) nádoby, jelikož ze skleněné lahve by mohly nějaké ionty projít do analyzovaného vzorku a tím způsobit falešný výsledek. Někdy jsou také používány nádoby z nerezové oceli [14].

#### Čerpadla mobilní fáze

Čerpadlo je jednou z nejdůležitějších součástí HPLC systému, jelikož jeho výkon přímo ovlivňuje retenční čas, reprodukovatelnost analýzy a citlivost detektoru. Je odpovědné za plynulý tok mobilní fáze, jež je nutný pro kvantifikaci analýz. Čerpadlo by mělo být schopné unášet mobilní fázi s konstantním průtokem 1-5 ml/min a při tlaku až 35 MPa. Většina analýz v HPLC je ale prováděna při tlacích od 3 MPa do 30 MPa [14; 16].

#### Dávkovače vzorků

Správný výsledek měření koreluje přímo se správným a co nejrychlejším zavedením vzorku do kolony pomocí dávkovacího ventilu. Do kolony musí být přesně zaveden předem definovaný objem vzorku a během dávkování nesmí docházet k výrazným změnám průtoku



mobilní fáze. Vzorek může být do systému zaveden dvěma způsoby: přímo do kolony pomocí stříkačky nebo pomocí dávkovacího ventilu. Dnes se v praxi nejčastěji používá šesticečný ventil obsahující dávkovací smyčku s definovaným objemem [14; 13; 19].

## **Detektory**

Další důležitou částí analyzátoru je citlivý detektor zajišťující průběžný monitoring vystupujícího analyzovaného vzorku z kolony. Problém kapalinové chromatografie je v tom, že fyzikální vlastnosti vzorku a mobilní fáze jsou často velmi podobné, proto v podstatě neexistuje žádný univerzální detektor. Nicméně detektory dostupné v dnešní době jsou velmi citlivé, obecně selektivní a mají poměrně široký rozsah aplikací [14].

Detektor pro HPLC by měl splňovat následující požadavky:

- 1) Vysokou citlivost a nízký detekční limit (koncentrace  $\mu\text{g}$  až  $\text{ng/ml}$ )
- 2) Velkou selektivitu
- 3) Rychlou a lineární odezvu
- 4) Reprodukovatelnost odezvy
- 5) Univerzálnost (nejlépe detekce všech složek analyzovaného vzorku)
- 6) Spolehlivost

### ***Spektrofotometrické detektory (UV – VIS)***

Tyto detektory jsou používány k analýze léčiv nejčastěji. Detekce je založena na Lambert-Beerovu zákonu ( $A = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot C$ ): Absorbance ( $A$ ) mobilní fáze je měřena na výstupu kolony při zvolené vlnové délce  $\lambda$  v UV nebo viditelném spektru a je přímo úměrná molárnímu absorpčnímu koeficientu  $\varepsilon_{\lambda}$  stanovované látky, koncentraci této látky v roztoku a také délce kyvety, skrz kterou záření prochází. Je důležité, aby byla mobilní fáze průhledná či aby měla velmi malou absorpci [13].

UV – VIS detektor je nejpoužívanějším detektorem v HPLC. Je jednoduchý, citlivý na koncentraci, selektivní a nedestruktivní. Monitorované analyty musí obsahovat chromofor (seskupení atomů v molekule, které způsobuje absorpci v UV-VIS oblasti), jinak není detekce možná. Většina detektorů tohoto typu má detekční rozmezí od 190 do zhruba 600 nm. To umožňuje individuální nastavení potřebné vlnové délky podle specifických vlastností analytů [14].

### ***Fluorescenční detektory***

Fluorescenční detektor poskytuje vysokou selektivitu a citlivost, což je důvodem pro jeho využití ve stopové analýze. Vysoká selektivita je výsledkem toho, že pouze málo analytů je schopno fluoreskovat.

Typicky se z fluoreskujících molekul získávají dva typy spekter: excitační a emisní. Takové molekuly nejprve absorbují primární elektromagnetické (excitační) záření a následně tuto absorbovanou energii mohou opět vyzářit v podobě fluorescence. Obě spektra jsou charakteristická pro každou analyzovanou látku, a proto je velkým pomocníkem v kvalitativní analýze při identifikaci molekul.

I nefluoreskující látky mohou být pomocí derivatizace s vhodnými činidly převedeny na deriváty fluoreskující s velmi vysokou selektivitou a nízkými detekčními limity [14].

### ***Elektrochemické detektory***

Tyto detektory zaznamenávají různé veličiny jako proud (ampérometrický detektor), elektrodový potenciál (potenciometrický detektor) nebo elektrolytickou vodivost (vodivostní detektor). Ve všech těchto případech je výsledný signál přímo úměrný látkovému množství měřeného analytu [14; 19].

### ***Hmotnostní spektrometr***

Hmotnostní spektrometr (MS) nabízí možnost přímé identifikace jednotlivých odseparovaných látek na základě jejich hmotnostních spekter. Princip této detekce spočívá v tom, že po vstupu vzorku do MS dojde k jeho ionizaci, tedy ke vzniku nabitých částic. Ty jsou následně odděleny podle poměru hmotnosti a náboje fragmentu, a zaznamenány ve formě spekter charakteristických pro jednotlivé molekuly. Tato metoda poskytuje informace pro kvalitativní i kvantitativní analýzu [10].

### **Zařízení pro zpracování dat**

V dnešní době je už téměř samozřejmostí, že je součástí chromatografu počítač vybavený speciálním softwarem, jenž automaticky zpracovává signály z detektoru a zaznamenává je ve formě píků.

## **Kolony a jejich náplně**

Kolona je místem, kde celý separační proces probíhá, a je tedy hlavním a nepostradatelným prvkem kapalinového chromatografu.

HPLC kolony jsou ve většině případů vyrobené z nerezové oceli či skla. Standardně používané kolony mají vnitřní průměr 3 až 5 mm a jsou dlouhé 60 až 250 mm [10; 9]. Běžná rychlost průtoku eluentu je zhruba 1-2 ml/min. Pokud je ale třeba docílit rychlejší separace (ale s nižší účinností), lze použít kolony i 30 mm krátké s rychlostí průtoku 4 ml/min [15].

U HPLC jsou používány pouze náplňové kolony. Každá kolona musí být naplněna vhodným sorbentem, na němž se separace odehrává (je to tedy stacionární fáze). V dnešní době jsou téměř všechny komerčně důležité HPLC kolony naplněny polárními částicemi silikagelu s průměrem <math><10\ \mu\text{m}</math>, jež poskytují vyšší účinnost kolony a také vyšší rychlost separace [16]. Nejpopulárnější fází je oktadecyl silikagel (C18) a většina separací v ní probíhá na principu obrácených fází s mobilní fází v podobě metanolu či acetonitrilu s vodou, nebo vodného pufru. Oktadecyl silikagel je vhodný pro separaci středně až vysoce polárních látek [10].

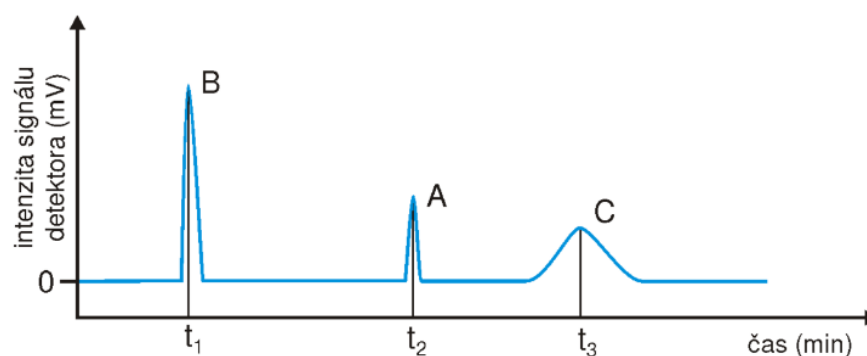
### **2.3.2. Chromatografický proces**

Základní chromatografický proces se dá popsat následovně:

1. Svislá dutá skleněná trubička (kolona) je naplněna vhodným jemným práškem, stacionární fází.
2. Na začátek této kolony je umístěno malé množství vzorku směsi, které má být rozděleno na jednotlivé složky.
3. Vzorek je následně unášen postupným přidáváním mobilní fáze, která je kolonou tlačena (v případě jednoduché kolonové chromatografie fáze prochází kolonou jen díky gravitaci; v případě vysokoúčinné kapalinové chromatografie je součástí chromatografu vysokotlaké čerpadlo, které zajistí rychlejší průtok mobilní fáze). Mobilní fáze tedy unáší jednotlivé složky směsi, které se postupně na stacionární fázi zachycují. Tento proces se nazývá eluce.
4. Každá složka směsi interaguje se stacionární fází rozdílně, tedy se na ní zachycuje různou dobu. Když látka přestane se stacionární fází interagovat, vystoupí z kolony a projde skrz detektor, který zpracuje signál a zaznamená ho do počítače, či tiskárny.

5. Zpracovaný signál je zaznamenán ve formě grafu a nazývá se **chromatogram** [13].

Chromatogram (viz. Obrázek 6) je základním grafem každé chromatografické analýzy, který zaznamenává průchod komponent chromatografickou kolonou v závislosti na čase. Je to signál zachycený specifickým detektorem po odchodu z kolony a je zaznamenán ve formě specifických píků. Pokud je separace úspěšná, chromatogram ukáže přesně tolik píků, kolik je komponent v analyzované směsi [13].



Obrázek 6: Chromatogram (příklad) [37]

Uvedený chromatogram zobrazuje průběh analýzy směsi obsahující tři složky. Každá látka obsažená ve směsi má svůj specifický retenční čas, proto má každá vlastní pík. Díky tomuto specifickému retenčnímu času lze s jistotou určit, o jakou látku se jedná. Velikost píku zase umožňuje zjistit množství zkoumané látky ve vzorku. To je důkaz toho, že lze chromatografii použít jak jako kvalitativní metodu, tak i metodu kvantitativní.

## 2.4. Hydrofilní interakční chromatografie

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) je druh kapalinové chromatografie, který poskytuje retenci a separaci středně až vysoce hydrofilních a polárních sloučenin. HILIC je založena na užití hydrofilních stacionárních fází, tradičně používaných v kapalinové chromatografii s normálními fázemi, zkombinované s mobilními fázemi (vodnými/polárními organickými směsmi, typicky užívaných v kapalinové chromatografii s obrácenými fázemi). Kromě toho HILIC umožňuje retenci a separaci iontových a ionizovatelných sloučenin, jež si obvykle vyžadují separaci například pomocí iontově-výměnné chromatografie [20].

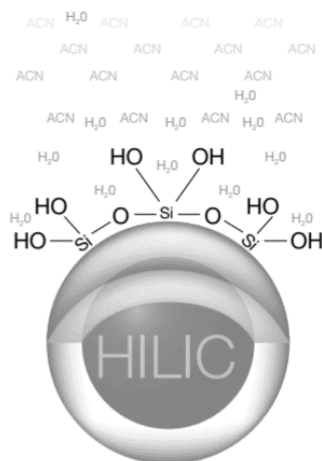
Mechanismus retence není dodnes plně objasněn, ale podle všeho vyplývá z kombinace rozdělení analytu mezi vodnou vrstvu sdruženou s hydrofilním povrchem stacionární fáze a organickou složku mobilní fáze, s jiným typem interakcí (jako vodíkové vazby, interakce dipól-dipól, elektrostatické nebo dokonce hydrofobní interakce) [20; 21].

### Podstata HILIC

Chromatografie s obrácenými fázemi je zaběhlý mechanismus pro většinu separací. Nicméně s ohledem na analýzu malých vysoce polárních analytů se tato technika stává obtížně uplatnitelnou. Proto byla hledána nová metoda, jež by byla vhodná právě pro rozdělení takovýchto analytů. Takovou metodou se osvědčila právě HILIC a během posledního desetiletí se jí dostává stále větší obliby v chromatografické analýze [22; 20].

### Retenční mechanismus HILIC

Separace v HILIC je založena na použití hydrofilní stacionární fáze v kombinaci s hydro-organickou mobilní fází s vysokým podílem organického rozpouštědla. Hydrofilní skupiny na povrchu stacionární fáze silně přitahují molekuly vody z mobilní fáze a vytvářejí tak vodnou vrstvu (viz. Obrázek 7). Proto tedy polární analyt rozpuštěný v mobilní fázi podstoupí rozdělovací mechanismus mezi dvěma kapalnými fázemi: nehybnou vodnou vrstvou na povrchu stacionární fáze a mobilní fází bohatou na organické látky. Další mechanismy jako adsorpce a elektrostatické interakce mají také na retenci vliv [20; 23].



Obrázek 7: Schéma retenčního mechanismu v HILIC [36]

### Stacionární fáze v HILIC

Materiály používané jako stacionární fáze v HILIC jsou charakterizovány svou hydrofilní povahou umožňující povrchově zadržovat vrstvu vody, ve které se rozdělování zkoumaných analytů odehrává. Stacionární fáze se nechová nejen jako inertní opora pro adsorbovanou hydrofilní vrstvu, ale může také specificky působit na analyt a tím přispívat k jeho retenci [20; 23; 24].

Stacionární fáze na bázi silikagelu jsou široce využívány v HILIC separaci. Nemodifikovaný silikagel nebo chemicky vázaný aminopropyl na silikagelu jsou nejpoužívanějšími stacionárními fázemi [20].

### Mobilní fáze

Mobilní fáze v HILIC musí obsahovat vysoké procento organické složky, nejčastěji se jedná o acetonitril s obsahem >50 %. Vodnou složku mobilní fáze tvoří voda nebo těkavý pufr. Každopádně, aby došlo k zachování podmínek pro vodnou chromatografii hydrofilních interakcí, musí být obsah vody alespoň 2,5 % z celkového objemu. Nejčastějším rozpouštědlem, tedy organickou složkou, je acetonitril. Eluce polárních analytů je umožněna zvyšováním obsahu vodné složky. To tedy znamená, že voda je velmi silným eluentem v módu HILIC. I malé zvýšení její koncentrace v mobilní fázi okamžitě vede k velkému snížení retence. Z toho plyne, že čím menší podíl vody mobilní fáze obsahuje, tím vyšší je konečná retence zkoumaných analytů [21; 24; 25].

Někdy lze vodu nahradit jiným polárním rozpouštědlem, jako je například alkohol (metanol, etanol, či propan-2-ol). Pokud je voda nahrazena zcela, nelze už mluvit o HILIC, ale o NA-HILIC (čili non-aqueous HILIC) [21].

Vzhledem k tomu, že podíl vodné fáze má zásadní vliv na celkový průběh separace, musí být tedy vzorek rozpuštěn v rozpouštědle stejném jako je mobilní fáze. Jinak by došlo ke ztrátě účinnosti separace, jako by tomu bylo při použití rozpouštědla s vysokým obsahem vody [21].

Velký vliv na průběh chromatografické křivky má také objem vzorku, jež je do systému přiváděn. Velké objemy mohou způsobit rozmývání píků, a tím tedy výrazně snížit účinnost systému [21].

### **Výhody HILIC**

Mezi výhody HILIC metody patří, že může snadno nahradit chromatografii s normálními fázemi, jež využívá toxická rozpouštědla a je špatně reprodukovatelná. Díky použití HILIC lze vyřešit časté problémy s nedostatečnou selektivitou metody, či analyzovat současně polární a nepolární látky. Také poskytuje velmi dobrou retenci pro polární látky, dokáže i u bazických látek získat vhodné tvary píků, a umožňuje použít vyšší průtoky mobilní fáze díky jejímu vysokému obsahu organické složky [21; 22].

### **Užití HILIC metody**

Jak již bylo zmíněno, hlavní výhodou HILIC je použití v zadržování polárních rozpuštěných látek, zvláště v analýze sloučenin léčiv a jejich metabolitů, tedy především ve farmacii a bioanalýze. Metabolity léčiv jsou často mnohem více hydrofilní než výchozí sloučeniny; především pokud jejich metabolismus souvisí s konjugací na glukuronid. (viz. kapitola 2.1.3.). Tím pádem je tato metoda vhodná právě pro analýzu paracetamolu a jeho metabolitů [22; 20].

HILIC je tedy nejčastěji používána pro analýzu sacharidů, peptidů, aminokyselin, nukleotidů, nukleosidů, antibiotik, léčiv, pesticidů atd [20].

## 2.5. Přehled prací zabývajících se analýzou paracetamolu (a jeho metabolitů)

Česla a kolektiv vyvinuli metodu pro stanovení metabolitů paracetamolu pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Separace byla provedena na koloně Kinetex C18 naplněnou porézními částicemi (100 mm x 3,0 mm, 2,6 μm; Phenomenex) při konstantní teplotě 40 °C. Mobilní fáze se skládala z vody s přidavkem 0,1 % (v/v) kyseliny octové (A) a metanolu (B) a její průtok byl 0,4 ml/min. Byl použit gradientový profil: 0 min – 10 % B, 5 min – 70 % B, 7 min – 70 % B, 8 min – 10 % B [26].

Kvantitativní analýzou acetaminofenu a jeho 6 dalších metabolitů pomocí LC-MS/MS se zabývali také An a kolektiv. K separaci byla použita kolona Capcell Pak MG II C18 (150 mm x 2,0 mm I.D., 5 μm). Mobilní fáze byla voda (A) a acetonitril (B). Průtok mobilní fáze byl nastaven na konstantních 0,3 ml/min a separace probíhala na základě gradientové eluce [27].

Ve studii zabývající se problematikou působení oxidativního stresu na metabolismus paracetamolu a následnou analýzou jeho metabolitů pomocí LC-MS/MS a GC-MS/MS použili Trettin a kolektiv lidské a myší vzorky moči, plazmy a lyzovaných erytrocytů. Jako stacionární fáze pro všechna měření byla použita kolona Acquity UPLC BEH C18 (100 mm x 2,1 mm I.D., 1,7 μm). Byla použita gradientová eluce: 0,0 - 0,5 min – 20 % B, 0,5 - 5,5 min – lineární vzestup do 95 % B, 5,5 min - 6,0 min – 95 % B. Jako mobilní fáze A byl použit 2 mmol/l octan amonný a 0,1 % kyselina mravenčí (pH 3). Mobilní fáze B byl acetonitril. Průtok kolonou byl konstantní (0,3 ml/min) [28].

Metodu pro selektivní stanovení metabolitů paracetamolu v myší moči pomocí LC-MS/MS vyvíjeli Hewavitharana a kol. Pro analýzu použili kolonu Cogent phenyl 100-A (50 mm x 2,1 mm I.D., 5 μm). Mobilní fáze byla voda s 0,1 % (v/v) kyselinou mravenčí (A) a acetonitril taktéž s kyselinou mravenčí (B). Analyty byly separovány pomocí izokratické eluce [29].

More a kolektiv souběžně stanovovali Paracetamol, Chlorzoxazon a Nimesulid v lécích s použitím HPLC s obrácenými fázemi. Separace byla provedena na koloně Thermo Hypersil GOLD C18 (250 mm x 4,6 mm I.D., 5 μm). Jako mobilní fáze byla použita voda a



acetonitril v poměru 55:45 (v/v). UV detekce probíhala při 275 nm a průtoková rychlost mobilní fáze byla 1,2 ml/min [30].

Problematiku analýzy acetaminofenu a kofeinu přítomného v plodové vodě po extrakci na pevnou fázi (SPE) a pomocí LC-MS/MS studovali Burrai a kolektiv. Byla použita kolona Phenomenex Synergi C18 (50 mm x 2,0 mm I.D., 4  $\mu$ m) a 3  $\mu$ m předkolona Phenomenex C18 security guard cartridge (4 mm x 2,1 mm I.D.). Do systému bylo dávkováno 5  $\mu$ l. Byla použita gradientová eluce se 2 solventy: (A) 0,1% kyselina mravenčí ve vodě a (B) 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu. Gradient byl nastaven následovně: 0 min – 10 % B; 4 min – 90 % B; 5,5 min – 90 % B; 5,6 min – 10 % B; 9 min – 10 % B. Průtok byl nastaven na 0,3 ml/min [31].

O rozvinutí a validaci mikroanalytické techniky pro stanovení paracetamolu a jeho glukuronidových a sulfátových metabolitů z pouhé kapky krve u novorozenců s detekčním limitem metody 600 pg se zasloužili Oliviera a kolektiv. Metoda je založena na HPLC s obrácenými fázemi spolu s UV detekcí při 254 nm. Separace byla prováděna na Hypersil C18 koloně (75 mm x 4,6 mm I.D., 3  $\mu$ m). Mobilní fáze se skládala z 20 mmol/l mravenčanu amonného (A) a metanolu (B). Pro analýzu byla zvolena gradientová eluce [32].

Souběžným stanovováním paracetamolu a ceterizinu v lidské plazmě a farmaceutických přípravcích se zabývali Nagaralli a kol. Pro analýzu byla použita kolona CLC C18 (25 cm x 4,6 mm I.D., 5  $\mu$ m) a CLC ODS předkolona pro ochranu analytické kolony (4 cm x 4,6 mm I.D.) a byla zvolena UV detekce při vlnové délce 230 nm. Jako vnitřní standard byl použit Nimesulid. Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a vody v poměru 55:45 (v/v), byla filtrována přes 0,45  $\mu$ m membránový filtr. Separace probíhala za pokojové teploty a průtok mobilní fáze měl konstantní rychlost 0,8 ml/min [33].

Lidskou plazmu pro kvantitativní stanovení APAP-CYS s použitím LC-MS/MS použili také Hairin a kolektiv. Tato metoda se osvědčila jako vhodná u pacientů, u nichž došlo k předávkování acetaminofenem. K analýze byla použita kolona Protecol P C18 (100 mm x 2,1 mm I.D., 3  $\mu$ m). Jako mobilní fáze byl použit 2 mmol/l mravenčan amonný ve vodě (A) a mravenčan amonný v acetonitrilu (B). Průtok mobilní fáze byl 0,25 ml/min a bylo využito gradientové eluce [4].

Pomocí HPLC s elektrosprejovou ionizací a tandemovou hmotnostní spektrometrií Cook a kol. souběžně analyzovali APAP a jeho pět dalších metabolitů v lidské moči a plazmě. Studie byla soustředěná na farmakokinetiku paracetamolu u novorozenců. Pro analýzu byl použit Agilent 1260 Infinity HPLC systém spolu s Agilent 6460 hmotnostním spektrometrem. Chromatografická separace byla provedena na Agilent Poroshell 120 EC-C18 koloně (100 mm x 2,1 mm I.D., 2,7  $\mu\text{m}$ ) s použitím gradientu u mobilní fáze: 10 mmol/l octan amonný, pH 3,5 (A) a metanol (B). Průtoková rychlost mobilní fáze byla 0,25 ml/min [34].

Taylor a kolektiv porovnávali kvantifikaci APAP v plazmě, mozkomíšním moku a kapkách zaschlé krve s pomocí HPLC-MS/MS. Mobilní fáze použitá pro analýzu byla 0,1% kyselina mravenčí ve vodě (A) a 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu (B). Byla použita UHPLC kolona Phenomenex Kinetix (100 mm x 4,6 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ ). Jako vnitřní standard byl použit acetaminofen-D4 [35].

## **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1. Použité přístroje, chemikálie a materiál**

#### **Přístroje**

- kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)
- binární čerpadlo pro Agilent 1290 Infinity II
- autosampler pro Agilent 1290 Infinity II
- termostat kolon pro Agilent 1290 Infinity II
- UV detektor s proměnnou vlnovou délkou

#### **Chromatografický materiál**

- Kolona Kinetex HILIC, délka 100 mm, vnitřní průměr 2,1 mm, velikost částic 1,7  $\mu\text{m}$

#### **Pomůcky**

- laboratorní sklo
- mikropipety
- mikrozkuhavky Eppendorf
- přístroj pro přípravu destilované vody MiliQ Reference system (MERCK Millipore, Darmstadt, Germany)
- vialky určené pro chromatograf
- analytické váhy
- ultrazvuková lázeň
- odstředivka

#### **Chemikálie**

- octan amonný 50 mmol/l (mobilní fáze A)
- acetonitril čistoty pro HPLC (mobilní fáze B)
- APAP (1mg látky rozpuštěný v 1 ml H<sub>2</sub>O, následně ředěno 1:10 vodou)
- APAP-SG (1mg látky rozpuštěný v 1 ml H<sub>2</sub>O, následně ředěno 1:10 vodou)
- APAP-CYS (1mg látky rozpuštěný v 1 ml H<sub>2</sub>O, následně ředěno 1:10 vodou)

- vzorek deproteinátu myších jater odebraný 1 h po podání APAP v dávce 400 mg/kg (vzorek použitý z projektu Ministerstva zdravotnictví ČR prostřednictvím Interní grantové agentury MZ ČR, číslo projektu NT14320-3/2013)
- kontrola z experimentu na myších, slepý pokus (projekt NT14320-3/2013)

### **3.2. Chromatografické podmínky pro HPLC analýzu paracetamolu a jeho metabolitů**

Pro každou analýzu je důležité zvolit optimální podmínky zahrnující výběr vhodné stacionární a mobilní fáze, vlnové délky pro UV detekci a volbu ideální rychlosti průtoku skrz chromatografický systém.

#### **Zvolené podmínky pro analýzu paracetamolu**

Termostat byl nastaven na 25 °C, všechny analýzy probíhaly při průtokové rychlosti 0,3 ml/min a pro detekci byl použit UV-VIS detektor s nastavitelnou vlnovou délkou, kdy se jako ideální ukázala  $\lambda = 254$  nm. Vzorky byly do systému vstříkovány v objemu 1  $\mu$ l.

#### **Příprava mobilní fáze, zásobních roztoků a vzorků**

- **Příprava mobilní fáze (izokratická analýza)**

Jako mobilní fáze byl použit vodný roztok 50 mmol/l octanu amonného a acetonitril v poměru 10:90 (v/v).

- **Příprava zásobního roztoku octanu amonného**

50 mmol/l vodný roztok octanu amonného byl připraven navážením 3,854 g  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  a doplněním destilovanou vodou na 1 l.

- **Příprava zásobních roztoků vzorků**

#### **Zásobní roztoky vzorků APAP, APAP-SG, APAP-CYS**

Bylo naváženo po 1 mg APAP, APAP-SG i APAP-CYS a ty byly následně zvlášť rozpuštěny v 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Poté byl každý roztok naředěn tak, že z něj bylo odpipetováno 100  $\mu$ l a bylo k němu přidáno 900  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}$ . Takto naředěné roztoky byly připraveny k analýze.

### **Zásobní roztok APAP-směs**

Tento zásobní roztok byl připraven tak, že bylo napipetováno 100 µl APAP, 100 µl APAP-SG a 100 µl APAP-CYS a k těmto roztokům bylo přidáno 700 µl H<sub>2</sub>O. Takto připravený roztok ve vialce byl připraven k analýze.

### **Volba vhodného gradientu pro analýzu**

Pro analýzu byla použita kolona Kinetex HILIC (100 mm x 2,1 mm I.D., 1,7 µm). Nejprve byla analýza provedena izokraticky, což se ukázalo jako nevhodné, jelikož nedošlo k oddělení všech složek směsi. Proto bylo třeba najít vhodný gradient, při kterém se separace povedla. Měření bylo provedeno pomocí čtyř různých gradientů:

*Tabulka 1: Podmínky pro jednotlivé gradienty*

	<b>0 min</b>	<b>8 min</b>	<b>9 min</b>	<b>10 min</b>
<b>Gradient 1 (viz. Obrázek 9)</b>	99 % B	20 % B	20 % B	99 % B
<b>Gradient 2 (viz. Obrázek 10)</b>	90 % B	70 % B	70 % B	90 % B
<b>Gradient 3 (viz. Obrázek 11)</b>	80 % B	60 % B	60 % B	80 % B
<b>Gradient 4 (viz. Obrázek 12)</b>	99 % B	40 % B	40 % B	99 % B

## **4. VÝSLEDKY A DISKUZE**

### **4.1. Vývoj podmínek pro HPLC analýzu paracetamolu a jeho metabolitů**

V rámci bakalářské práce byly ověřeny možnosti analýzy metabolitů paracetamolu v HILIC systému. Pro experimenty byly zvoleny následující podmínky:

#### **Stacionární fáze**

Jako stacionární fáze byla zvolena kolona Kinetex HILIC (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.7  $\mu$ m).

#### **Mobilní fáze**

Byla hledána vhodná mobilní fáze, při které by došlo z rozdělení všech složek směsi. Nejprve byla použita směs roztoku octanu amonného (50 mmol/l) a acetonitrilu v poměru 10:90 (v/v) pro izokratickou analýzu (viz. Obrázek 8). Tato analýza se neprojevila jako vhodná, jelikož k rozdělení směsi nedošlo. Proto bylo dále provedeno měření s použitím gradientové eluce se čtyřmi různými gradienty.

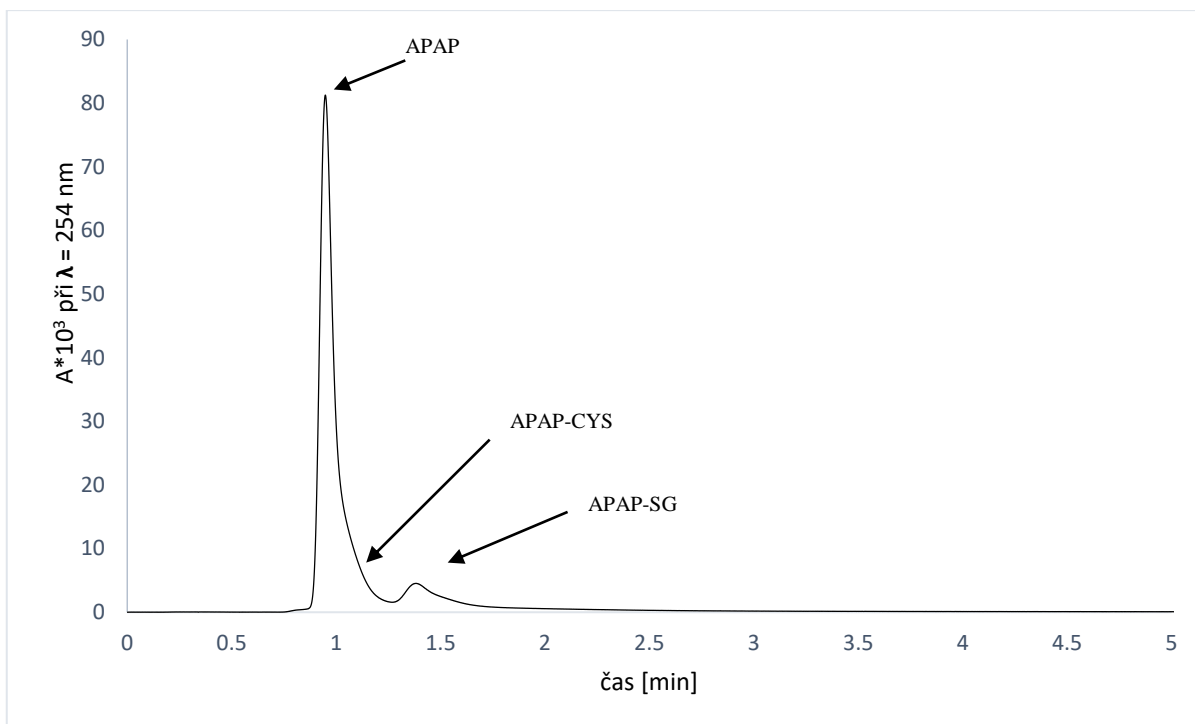
#### **Gradientová eluce**

Pro gradientovou eluci byla zvolena mobilní fáze ve složení: 50 mmol/l octan amonný (A) a acetonitril (B). Záznamy separací z jednotlivých typů gradientů jsou uvedeny na obrázcích 9 až 12.

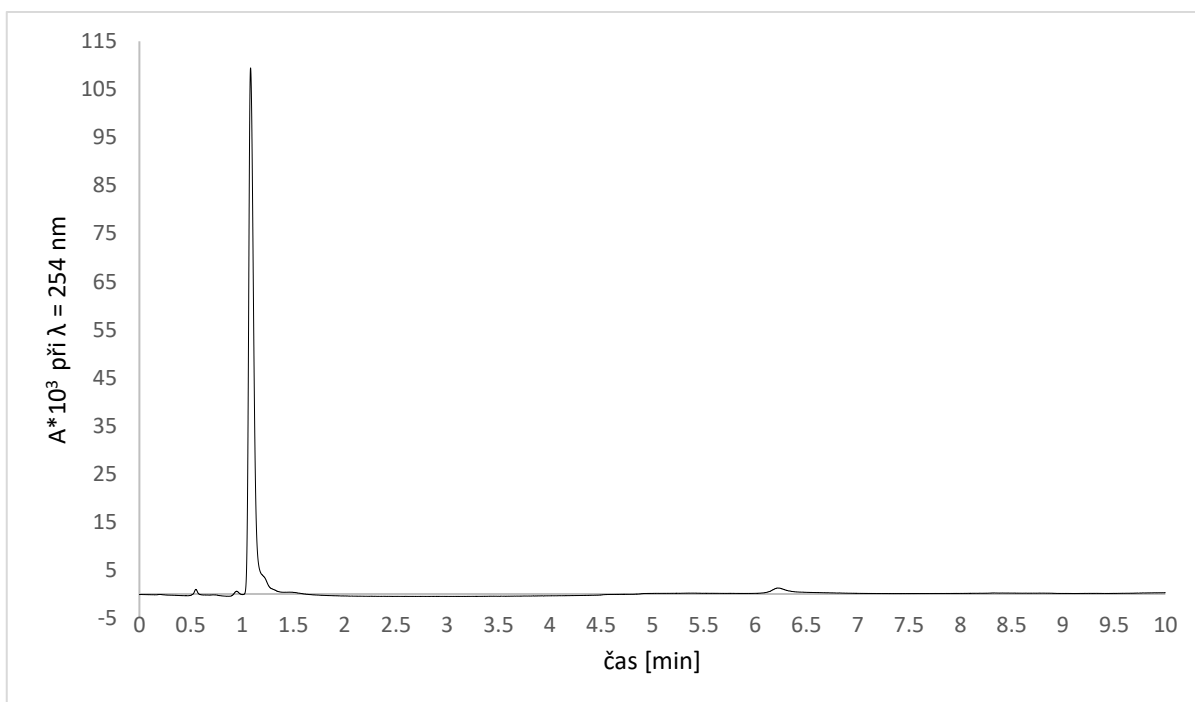
Gradient 4 (0 min – 99 % B, 8 min – 40 % B, 9 min – 40 % B, 10 min – 99 % B) se projevil jako nevhodnější, jelikož pouze u něj došlo alespoň k částečnému oddělení složek analyzované směsi (viz. Obrázek 12).

#### **Analýza vzorku získaného z projektu MZ ČR – NT14320-3/2013**

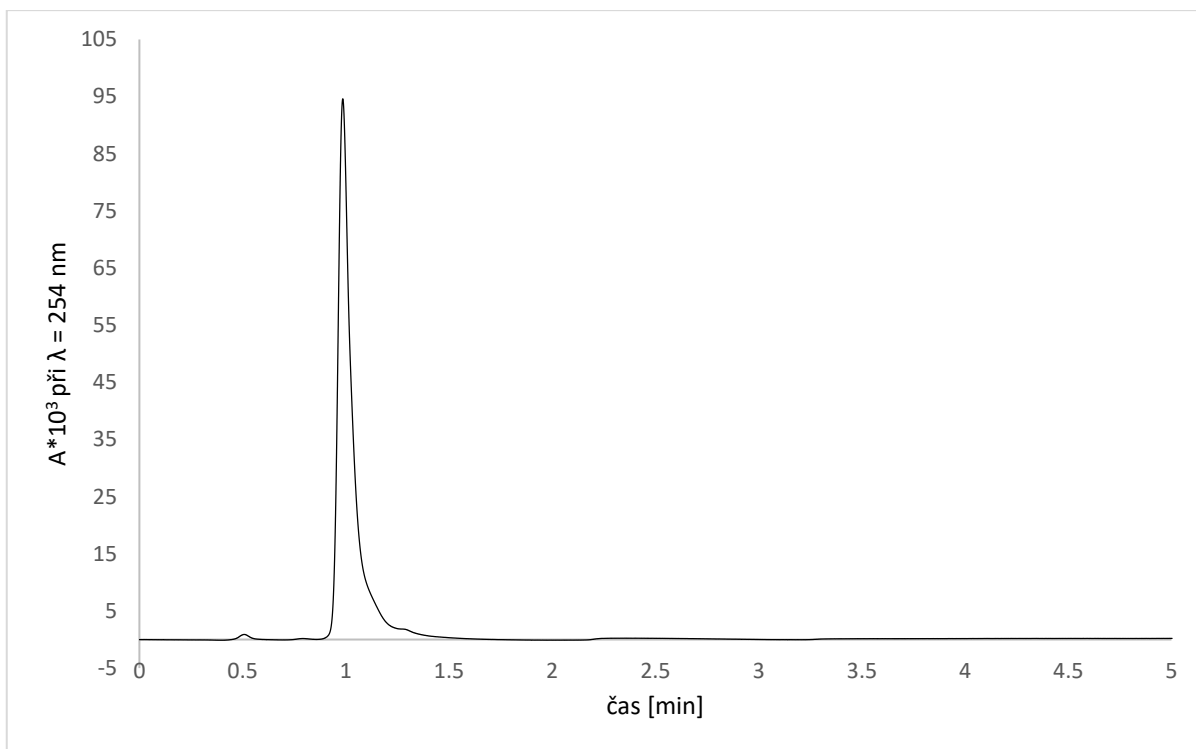
Pro analýzu pomocí gradientu 4 byl obdržen vzorek deproteinátu myších jater odebraný 1 h po podání APAP v dávce 400 mg/kg. Obdržенý vzorek byl již v kapalném stavu a nebylo jej třeba ředit. Proto z něj bylo pouze odpipetováno 1 ml do vialky a takto byl připraven k analýze. Záznamy ze separací vzorku a kontroly jsou uvedeny na obrázcích 13 a 14.



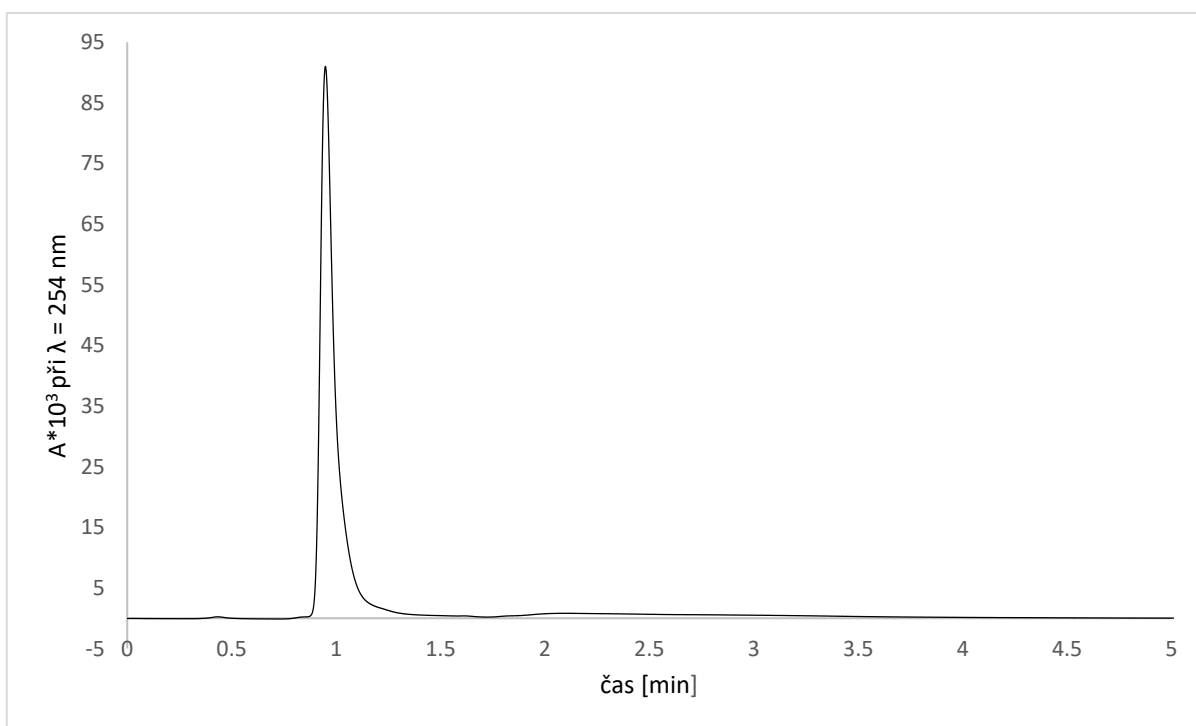
Obrázek 8: Izokratická analýza (APAP-směs)



Obrázek 9: Gradient 1

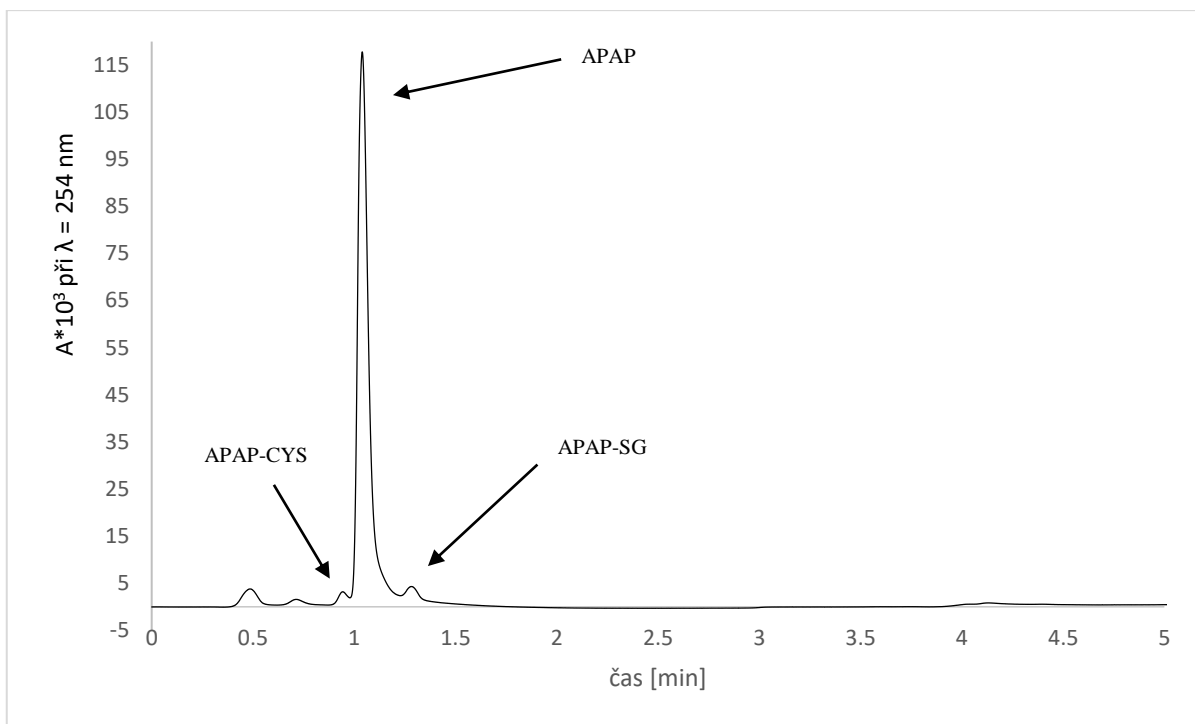


Obrázek 10: Gradient 2

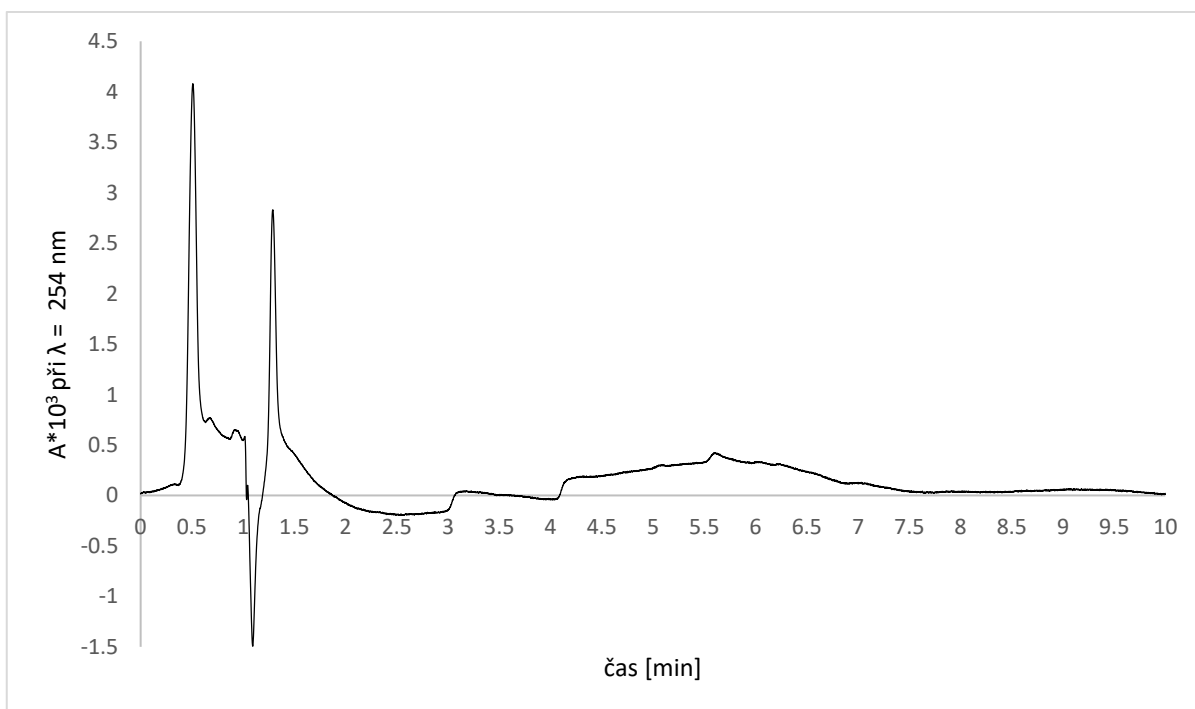


Obrázek 11: Gradient 3

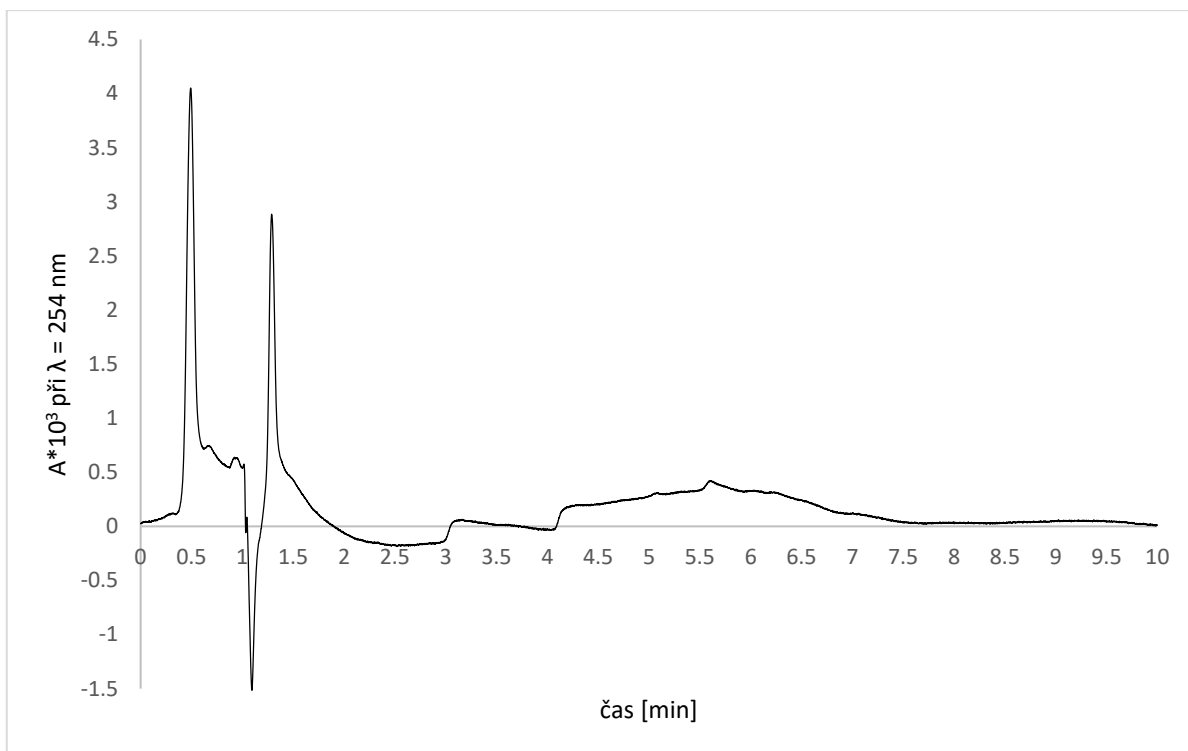




Obrázek 12: Gradient 4



Obrázek 13: Vzorek č.1 (deproteinát myších jater 1 h po podání APAP)



Obrázek 14: Vzorek č.17 (kontrola vzorku deproteinátu myších jater)

Ze záznamu uvedeného na obrázku 12 je vidět úspěšné oddělení paracetamolu a jeho metabolitů. Výhoda použití HILIC metody je v tomto případě rychlejší analýza. Tyto podmínky byly aplikovány na vzorky, které by potenciálně mohly obsahovat APAP a jeho metabolity. Ze srovnání chromatogramů na obrázcích 13 a 14 jsou vidět minimální rozdíly v profilu píků, které mohou naznačovat přítomnost pouze velmi nízké koncentrace metabolitů. Pro další identifikaci a kvantifikaci by bylo vhodné použít jinou detekční techniku, například spojení HILIC s hmotnostní spektrometrií, při které by byla těkavá mobilní fáze s vysokým obsahem acetonitrilu výhodná.

## 5. ZÁVĚR

V této bakalářské práci byly vypracovány vhodné chromatografické podmínky pro analýzu paracetamolu a jeho metabolitů.

Pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii v HILIC módu byla použita kolona Kinetex HILIC (100 mm x 2,1 mm I.D., 1,7  $\mu$ m) jako stacionární fáze. Mobilní fáze byla složena ze směsi 50 mmol/l octanu amonného (A) a acetonitrilu (B). Pro separaci zkoumaného vzorku deproteinátu myších jater byla použita gradientová eluce s kontinuálním gradientem s nenulovou hodnotou (0 min – 99 % B, 8 min – 40 % B, 9 min – 40 % B, 10 min – 99 % B). Průtoková rychlost mobilní fáze byla zvolena 0,3 ml/min, vzorky byly do systému vstříkovány v objemu 1  $\mu$ l. Detekce odseparovaných látek probíhala pomocí UV detektoru při vlnové délce  $\lambda = 254$  nm.

Cílem této práce nebylo stanovit přesné množství v obdrženém vzorku, kdežto pokusit se zjistit, která z vyzkoušených metod by byla nejvhodnější k další analýze vzorků podobného typu. Finální podmínky separace byly otestovány při analýze vzorku deproteinátu myších jater. Na chromatografu je patrné, že se ve vzorku nachází několik dalších složek, které ale nebyly již dále identifikovány. Lze tedy pouze usuzovat, že se ve vzorku vyskytovala všechna stádia metabolismu paracetamolu. Z dosažených výsledků je patrné, že metabolity paracetamolu lze úspěšně analyzovat v HILIC systému, ovšem pro identifikaci a kvantitativní analýzu je potřeba další optimalizace, přesahující rámec této bakalářské práce.

## 6. POUŽITÁ LITERATURA A ZDROJE

- [1] *Český lékopis 2009*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2994-7.
- [2] ŠEVELA, K., R. KRAUS a P. ŠEVČÍK. *Akutní intoxikace v intenzivní medicíně*. 1. vyd. Praha: Grada, 2002. ISBN 80-716-9843-1.
- [3] MORIARTY, C. a W. CARROLL. Paracetamol: pharmacology, prescribing and controversies. *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice*. 2016, **101**(6), 331-334. DOI: 10.1136/archdischild-2014-307287. ISSN 1743-0585. Dostupné také z: <http://ep.bmj.com/lookup/doi/10.1136/archdischild-2014-307287>
- [4] HAIRIN, T. Quantitative LC/MS/MS analysis of acetaminophen–cysteine adducts (APAP–CYS) and its application in acetaminophen overdose patients. *Anal. Methods*. 2013, **8**(5), 1955-1964. DOI: 10.1039/c3ay26614a. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3ay26614a>
- [5] Acetaminophen. *LiverTox: Clinical and research information on drug-induced liver injury* [online]. Bethesda (Maryland): U.S. National Library of Medicine, 2018 [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <https://livertox.nlm.nih.gov//Acetaminophen.htm>
- [6] NAVID, A. Quantitative In Silico analysis of transient metabolism of acetaminophen and associated causes of hepatotoxicity in humans. *In Silico Pharmacology*. 2013, **1**(1), 1-14. DOI: 10.1186/2193-9616-1-14. ISSN 2193-9616. Dostupné také z: <http://in-silico-pharmacology.springeropen.com/articles/10.1186/2193-9616-1-14>
- [7] VAN DER MAREL, C., B. ANDERSON, R. VAN LINGEN, N. HOLFORD, M. PLUIM, F. JANSMAN, J. VAN DEN ANKER a D. TIBBOEL. Paracetamol and metabolite pharmacokinetics in infants. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2003, **59**(3), 243-251. DOI: 10.1007/s00228-003-0608-0. ISSN 0031-6970. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00228-003-0608-0>
- [8] HEARD, K. Acetylcysteine for Acetaminophen Poisoning. *New England Journal of Medicine*. 2008, **359**(3), 285-292. DOI: 10.1056/NEJMct0708278. ISSN 0028-4793. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMct0708278>

- [9] BRAITHWAITE, A. a F.J. SMITH. *Chromatographic methods*. 5th ed. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic, 1999. ISBN 07-514-0158-7.
- [10] KEALEY, D. a P. HAINES. *Analytical chemistry*. 1st ed. Oxford: BIOS, 2002. Instant notes series. ISBN 18-599-6189-4.
- [11] ETTRE, L. Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993). *Pure and Applied Chemistry* [online]. 1993, **65**(4), 819-872 [cit. 2018-04-14]. DOI: 10.1351/pac199365040819. ISSN 1365-3075. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.1993.65.issue-4/pac199365040819/pac199365040819.xml>
- [12] ŠVEC, F. Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií?. *Chem. listy*. 2009, **103**(4), 266270.
- [13] ROUESSAC, F. a A. ROUESSAC. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. 2nd ed. Chichester: Wiley, 2007. ISBN 978-0-470-85903-2.
- [14] GÜNZLER, H. a A. WILLIAMS. *Handbook of analytical techniques*. 1st ed. New York: Wiley-VCH, 2001. ISBN 35-273-0165-8.
- [15] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [16] JEFFERY, G.H. *Vogel's textbook of quantitative chemical analysis*. 5th ed. Harlow: Wiley, 1989. ISBN 05-824-4693-7.
- [17] Afinitní chromatografie. In: *Datový standard MZ ČR* [online]. 2018 [cit. 2018-05-20]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/AJAYH.htm>
- [18] HPLC Illustration. In: *Ibsen photonics* [online]. b.r. [cit. 2018-05-18]. Dostupné z: [https://ibsen.com/wp-content/uploads/HPLC-illustration\\_T.png](https://ibsen.com/wp-content/uploads/HPLC-illustration_T.png)
- [19] OPEKAR, F. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0553-8.
- [20] RODRÍGUEZ-GONZALO, E. a D. GARCÍA-GÓMEZ. Hydrophilic Interaction Chromatography: Current Trends and Applications. *Reference Module in Chemistry*,

- Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, 2018, , 1-7. DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.12681-2. ISBN 9780124095472. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124095472126812>
- [21] NOVÁKOVÁ, L. a M. DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [22] HEATON, J. a N. SMITH. Advantages and Disadvantages of HILIC; a Brief Overview. *Chromatography Today*. 2012, (5), 44-47.
- [23] JANDERA, P. a P. JANÁS. Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2017, **967**, 12-32 [cit. 2018-05-25]. DOI: 10.1016/j.aca.2017.01.060. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267017301514>
- [24] JANDERA, P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2011, **692**(1-2), 1-25 [cit. 2018-05-25]. DOI: 10.1016/j.aca.2011.02.047. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267011002728>
- [25] JANDERA, P. a T. HÁJEK. Mobile phase effects on the retention on polar columns with special attention to the dual hydrophilic interaction-reversed-phase liquid chromatography mechanism, a review. *Journal of Separation Science* [online]. 2018, **41**(1), 145-162 [cit. 2018-05-25]. DOI: 10.1002/jssc.201701010. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201701010>
- [26] ČESLA, P., T. ROUŠAR, E. NÝDLOVÁ, M. VRBOVÁ, L. ČESLOVÁ a J. FISCHER. Development of LC/MS/MS method for determination of acetaminophen metabolites. *Chem. Listy*. 2013, **107**(3), 348-350.
- [27] AN, J., H. LEE a B. JUNG. Quantitative analysis of acetaminophen and its six metabolites in rat plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 2012, **26**(12), 1596-1604. DOI: 10.1002/bmc.2737. ISSN 02693879. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bmc.2737>
- [28] TRETTIN, A., D. MODUN, S. MADUNIC et al. LC–MS/MS and GC–MS/MS measurement of plasma and urine di-paracetamol and 3-nitro-paracetamol: Proof-of-

- concept studies on a novel human model of oxidative stress based on oral paracetamol administration. *Journal of Chromatography B*. 2014, **959**, 71-81. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.03.031. ISSN 15700232. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023214002219>
- [29] HEWAVITHARANA, A.K., S. LEE, P.A. DAWSON, D. MARKOVICH a P.N. SHAW. Development of an HPLC–MS/MS method for the selective determination of paracetamol metabolites in mouse urine. *Analytical Biochemistry*. 2008, **374**(1), 106-111. DOI: 10.1016/j.ab.2007.11.011. ISSN 00032697. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269707007440>
- [30] MORE, S. Application of HPLC for the Simultaneous Determination of Paracetamol, Chlorzoxazone, and Nimesulide in Pharmaceutical Dosage Form. *ISRN Chromatography* [online]. 2012, **2012**, 1-8 [cit. 2018-05-28]. DOI: 10.5402/2012/252895. ISSN 2090-8636. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/archive/2012/252895/>
- [31] BURRAI, L., M. NIEDDU, C. TRIGNANO, A. CARTA a G. BOATTO. LC-MS/MS analysis of acetaminophen and caffeine in amniotic fluid. *Analytical Methods*. 2015, **7**(2), 405-410. DOI: 10.1039/C4AY02577F. ISSN 1759-9660. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4AY02577F>
- [32] OLIVEIRA, E.J, D.G WATSON a N.S MORTON. A simple microanalytical technique for the determination of paracetamol and its main metabolites in blood spots. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002, **29**(5), 803-809. DOI: 10.1016/S0731-7085(02)00174-7. ISSN 07317085. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708502001747>
- [33] NAGARALLI, B., J. SEETHARAMAPPA, B. GOWDA a M. MELWANKI. Liquid chromatographic determination of ceterizine hydrochloride and paracetamol in human plasma and pharmaceutical formulations. *Journal of Chromatography B*. 2003, **798**(1), 49-54. DOI: 10.1016/j.jchromb.2003.08.048. ISSN 15700232. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023203007128>
- [34] COOK, S., A. KING, J. VAN DEN ANKER a D. WILKINS. Simultaneous quantification of acetaminophen and five acetaminophen metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem

- mass spectrometry: Method validation and application to a neonatal pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B* [online]. 2015, **1007**, 30-42 [cit. 2018-05-28]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.10.013. ISSN 15700232. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023215302300>
- [35] TAYLOR, R. Comparison of the quantification of acetaminophen in plasma, cerebrospinal fluid and dried blood spots using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013, **83**, 1-9. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.04.007. ISSN 07317085. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708513001520>
- [36] [Unbonded silica phase]. In: *Phenomenex* [online]. b.r. [cit. 2018-05-23]. Dostupné z: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/ef8950ec-aa2c-4c78-919b-18e3c432b638.pdf>
- [37] [Chromatogram]. In: *Wikimedia Commons* [online]. b.r. [cit. 2018-05-23]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chromatogram.png>