

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**SEPARACE PARACETAMOLU A JEHO METABOLITŮ POMOCÍ
CHROMATOGRAFIE HYDROFILNÍCH INTERAKCÍ**

Lucie Parezová

Diplomová práce

2020

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY

**SEPARATION ACETAMINOPHEN AND ITS METABOLITES WITH
HYDROPHILIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY**

Lucie Parezová

Thesis
2020

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Parezová**
Osobní číslo: **C18556**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Téma práce: **Separace paracetamolu a jeho metabolitů pomocí chromatografie hydrofilních interakcí**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. V teoretické části práce popište principy kapalinové chromatografie včetně běžně používaných fázových systémů, detailně se zaměřte na chromatografii hydrofilních interakcí. Zpracujte rešerši prací zabývajících se analýzou metabolitů paracetamolu pomocí kapalinové chromatografie.
2. Experimentálně ověřte vlivy vybraných stacionárních fází a složení mobilní fáze včetně použití iontových aditiv na separaci vybraných metabolitů paracetamolu. Pro dostupné metabolity optimalizujte podmínky separace chromatografií hydrofilních interakcí s cílem dosáhnout co nejlepší separace směsi v co nejkratším čase analýzy.
3. Získaná experimentální data kriticky zhodnoťte a diskutujte.

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

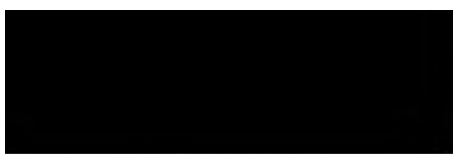
Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultanti diplomové práce: **Ing. Pavla Doležánová**
Katedra analytické chemie
Ing. Petra Warzechová
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**



L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2020

Lucie Parezová

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost, trpělivost a cenné připomínky v průběhu celé práce. Dále bych chtěla poděkovat konzultantce Ing. Petře Warzechové za neustálý zájem o zadané téma, velkou pomoc při plnění laboratorní práce a také cenné připomínky při zpracování této práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu a trpělivost po dobu mého vysokoškolského studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá separací paracetamolu a jeho metabolitů pomocí chromatografie hydrofilních interakcí. Teoretická část je zaměřena na paracetamol z hlediska jeho mechanismu účinku, metabolismu a toxicity v těle. Dále pak pojednává o kapalinové chromatografii a detailně o chromatografii hydrofilních interakcí, jejím mechanismu separace, využívaných mobilních a stacionárních fází a jeho použití v praxi. V závěru této části je zpracována rešerše prací, zabývajících se analýzou paracetamolu a jeho metabolitů v kapalinové chromatografii. V experimentální části práce jsou popsány měření vedoucí k výběru nejvhodnějších mobilní a stacionární fázi pro separaci paracetamolu a jeho metabolitů za podmínek pro chromatografii hydrofilních interakcí.

KLÍČOVÁ SLOVA

Paracetamol; metabolity paracetamolu; chromatografie hydrofilních interakcí

TITLE

Separation acetaminophen and its metabolites with hydrophilic interaction chromatography

ANNOTATION

The main aim of this diploma thesis is separation of acetaminophen and its metabolites with hydrophilic interaction chromatography. The theoretical part is focused on acetaminophen and its metabolism in terms of their mechanism of action, metabolism pathway and toxicity in the body. The thesis further discusses liquid chromatography, in a detail about hydrophilic interaction chromatography, its separation mechanism, applied mobile and stationary phases and practical use of acetaminophen. At the end of this part there is a search of works dealing with analysis acetaminophen and its metabolites in liquid chromatography. The experimental part describes measurements leading to the selection of the most suitable mobile and stationary phases for separation acetaminophen and its metabolites under conditions for hydrophilic interaction chromatography.

KEYWORDS

Acetaminophen, acetaminophen metabolites; hydrophilic interaction chromatography

OBSAH

ÚVOD.....	12
1 TEORETICKÁ ČÁST	13
1.1 Analgetika	13
1.1.1 Opioidní analgetika	13
1.1.2 Neopioidní analgetika.....	14
1.2 Paracetamol	16
1.2.1 Fyzikální a fyzikálně-chemické vlastnosti	16
1.2.2 Základní údaje	16
1.2.3 Mechanismus účinku paracetamolu	17
1.2.4 Syntéza paracetamolu	18
1.2.5 Dávkování.....	18
1.2.6 Metabolismus paracetamolu	20
1.2.7 Toxicita paracetamolu	24
1.3 Kapalinová chromatografie.....	27
1.3.1 Detektory v kapalinové chromatografii	27
1.4 Chromatografie hydrofilních interakcí.....	31
1.4.1 Mechanismus separace HILIC	33
1.4.2 Stacionární fáze pro HILIC	34
1.4.3 Mobilní fáze pro HILIC.....	37
1.4.4 Výhody a nevýhody HILIC	38
1.4.5 Některé aplikace HILIC	38
1.5 Stanovení paracetamolu a jeho metabolitů	41
1.5.1 Kapalinová chromatografie s UV detekcí	41
1.5.2 Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií	44
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	47
2.1 Použité přístroje a chemikálie	47
2.2 Podmínky HILIC separace s UV-VIS detektorem pro analýzu paracetamolu a jeho metabolitů	48
2.3 Optimalizace metody pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů	48
2.4 Podmínky HILIC separace s hmotnostním spektrometrem pro analýzu paracetamolu a jeho metabolitů.....	49
3 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	50

3.1	UV-VIS spektra.....	50
3.2	Vývoj podmínek pro HILIC separaci s UV-VIS detekcí	52
3.2.1	Izokratická eluce paracetamolu a jeho metabolitů	52
3.2.2	Gradientová eluce paracetamolu a jeho metabolitů.....	60
4	ZÁVĚR	69
5	POUŽITÁ LITERATURA	70
6	PŘÍLOHY	83

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

3-OH-APAP	3-hydroxy-APAP
ACN	acetonitril
AKI	akutní poškození ledvin
AMAP	<i>N</i> -acetyl- <i>m</i> -aminofenol
APAP	acetaminofen
APAP-CYS	konjugát acetaminofenu s cysteinem
APAP-NAC	konjugát acetaminofenu s <i>N</i> -acetylcysteinem
APAPR	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -aminofenoxylový radikál
APAP-SG	konjugát acetaminofenu s glutathionem
ASA	kyselina acetylsalicylová
CKD	chronické onemocnění ledvin
CNS	centrální nervová soustava
COX	enzym cyklooxygenáza
CYP450	cytochrom P450
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem
ESRD	konečné stádium onemocnění ledvin
GC	plynová chromatografie
GIT	gastrointestinální trakt
GSH	glutathion
GST	enzym glutathion- <i>S</i> -transferáza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC/MS	nadkritická kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LC	kapalinová chromatografie
MF	mobilní fáze
MRM	multiple reaction monitoring
MS	hmotnostní spektrometrie
NAC	<i>N</i> -acetylcystein
NAPQI	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -benzochinonimin
NP-LC	kapalinová chromatografie v systému s normálními fázemi
NSA	nesteroidní antiflogistika
PAC	polymerní aniontová fáze
PAPR	<i>p</i> -aminofenoxylové radikály

PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PBQI	<i>p</i> -benzochinonimin
PEG	prostaglandin
RP-LC	kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi
SF	stacionární fáze
SULT	sulfotransferázový enzym
UGT	UDP-glukuronosyltransferáza
UV-VIS	ultrafialové viditelné záření
WHO	Světová zdravotnická organizace
ZIC	zwitteriontová fáze
γ GT	γ -glutamyl-transferáza

ÚVOD

Paracetamol neboli acetaminofen (APAP) je pravděpodobně jedním z nejrozšířenějších a nejběžněji užívaných léčiv ke snižování horečky a tlumení bolesti na světě. Jedná se o volně prodejný a zároveň levný lék, který je v terapeutických dávkách velmi dobře tolerován. Při předávkování ovšem hrozí vážné poškození jater či ledvin, které může být i smrtelné. Příčinou těchto komplikací je metabolizace paracetamolu v těle na vysoce reaktivní a toxické meziprodukty.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je v dnešní době jednou z nejpoužívanějších analytických technik pro separaci složek ve směsi. Své popularity docílila díky její citlivosti, rychlosti analýzy, univerzálnosti a minimální spotřebě analytu. I díky těmto vlastnostem se HPLC stala velmi využívanou metodou pro hodnocení bezpečnosti a účinnosti léčiv. V případě separace polárních a hydrofilních látek se v posledních letech osvědčila chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC).

Vzhledem ke stále nepřilíš prostudovanému mechanismu účinku a toxicitě paracetamolu v těle, je vývoj nových metod pro jeho analýzu velmi aktuálním tématem. I přestože paracetamol i jeho metabolity jsou polární látky, v literatuře se vyskytuje pouze omezené množství prací, zabývající se separací těchto látek za podmínek chromatografie hydrofilních interakcí.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Analgetika

Analgetika jsou základní přípravky pro léčbu bolesti a představují v současné době nejvíce užívaná léčiva na světě. Skupina farmak s analgetickými účinky se dělí na neopioidní a opioidní analgetika.

Neopioidní analgetika, tedy analgetika nemorfinového typu, se neváží na opioidní receptory. Tlumí bolest tím, že snižují tvorbu látek (prostaglandinů), které zvyšují vnímání bolesti. Konkrétně tlumí enzym cyklooxygenázu (COX), který je důležitý pro tvorbu prostaglandinů. Některá mají při vhodném dávkování i antipyretický a antiflogistický účinek. Většina neopioidních analgetik má středně silný analgetický účinek. Na rozdíl od analgetik opioidního typu nejsou návyková, neovlivňují dechové centrum a nepůsobí zácpu. Neopioidní analgetika se dále dělí na analgetika-antipyretika a nesteroidní antiflogistika (NSA) [1, 2, 3].

1.1.1 Opioidní analgetika

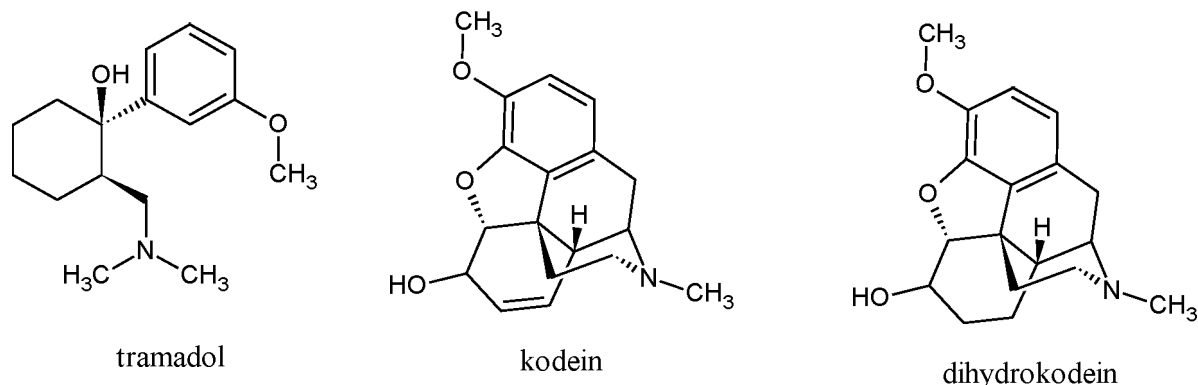
Opioidní analgetika působí především vazbou na opioidní receptory v mozku a míše. Tlumí vedení a zpracování bolestivých vzruchů na různých úrovních centrální nervové soustavy (CNS) včetně mozkové kůry a aktivace descendentního tlumivého systému. Současně tlumí dušnost a úzkost. Až na výjimky téměř všechna opioidní analgetika způsobují zácpu, často celkový útlum, nauzeu, občas i zvracení nebo kožní projevy. K dalším nežádoucím účinkům patří alterace psychiky (útlum vědomí, v některých případech dysforie, zmatenost, halucinace). Dělí se na slabé a silné opioidy [3, 4].

Slabé opioidy

Typickým zástupcem této skupiny je kodein (viz obrázek 1). Je to přirozený alkaloid opia s analgetickým (na opioidní receptory) a antitusickým účinkem. Samotný je analgeticky poměrně slabý, proto se u bolestí používá prakticky jen v kombinacích, nejlépe s paracetamolem. K nežádoucím účinkům patří zácpa.

Nejčastěji předepisovaným léčivem je u nás tramadol (viz obrázek 1), který je syntetický analog kodeinu. Působí analgeticky především aktivací descendentního spinálního systému, méně přímo přes opioidní receptory v mozku. Jeho analgetické účinky se dají podstatně zvýšit současným podáváním paracetamolu. Výhodou tohoto léčiva je, že ve většině případů nepůsobí zácpu a je velmi nízké riziko návyku, ovšem někteří pacienti po něm mívají závratě nebo nauzeu.

U chronických bolestí se někdy používá dihydrokodein (viz Obrázek 1) s prodlouženým účinkem. Je to polosyntetický derivát kodeinu, jehož analgetický účinek je asi šestkrát slabší než účinek morfinu [3, 4].



Obrázek 1 Struktura tramadolu, kodeinu a dihydrokodeinu [5, 6]

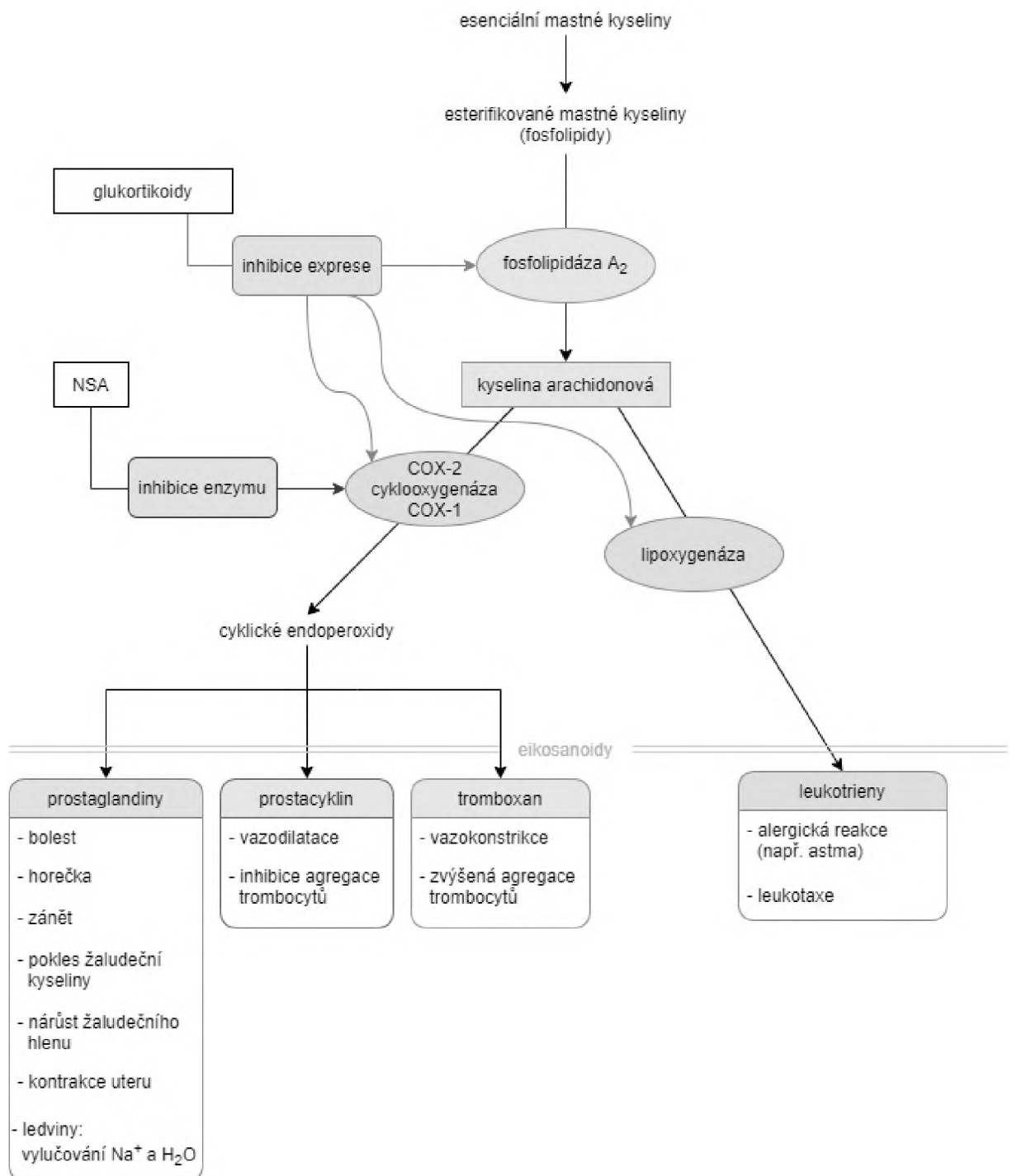
1.1.2 Neopioidní analgetika

Neopioidní analgetika dělíme na analgetika-antipyretika a nesteroidní antiflogistika (NSA). Veškerá farmaka v této skupině mají jednu společnou vlastnost – inhibují vznik eikosanoidů. Rozdíly v projevech účinků jednotlivých látek zřetelně svědčí o přítomnosti dalších mechanismů účinku, které nejsou příliš známé.

U analgetik-antipyretik často není příliš jasný mechanismus účinku. Analgetika-antipyretika se dále dělí dle jejich chemické struktury na deriváty p-aminofenolu (paracetamol) a na deriváty salicylové kyseliny (acetylsalicylová kyselina). NSA jsou inhibitory COX [7].

Inhibice cyklooxygenázy

Mechanismus protizánětlivého, analgetického a antipyretického účinku kyseliny acetylsalicylové spočívající v tlumení COX byl rozpoznán začátkem 70. let sirem Johnem Vanem. Ten za tento objev obdržel roku 1982 Nobelovu cenu. Později byl mechanismus inhibice COX a tím i tvorby prostaglandinů přijat pro všechna NSA. COX je důležitým krokem v syntéze prostaglandinů (viz obrázek 2), které mají v organismu úlohy jak ve fyziologickém, tak patofyziologickém stavu. Prostaglandiny vznikají z kyseliny arachidonové za účasti COX vlivem různých podnětů. Nejznámější jsou jejich úlohy v bolesti: zvyšují citlivost receptorů na bolest (nociceptorů); zánětu – způsobují vazodilataci a zvyšují permeabilitu kapilár; horečku – nastaví termoregulační centrum na vyšší teplotu a v ochraně žaludeční sliznice.



Obrázek 2 Regulace metabolismu kyseliny arachidonové a účinky eikosanoidů [7]

V roce 1991 došlo k objevu odlišné izoformy COX – cyklooxygenáza-2 (COX-2), která se od cyklooxygenázy-1 (COX-1) liší v primární sekvenci aminokyselin, terciální strukturou, lokalizací a úlohou ve fyziologických a patofyziologických procesech. Bylo zjištěno, že COX-1 je produkována běžně ve většině tkání a má organoprotektivní vlastnosti. Na druhou stranu COX-2 je indukovaným enzymem, jehož produkce vzrůstá při poškození organismu (zánět,

bolest). Na základě selektivity k jednotlivým izoenzymům byla NSA klasifikována do tří kategorií:

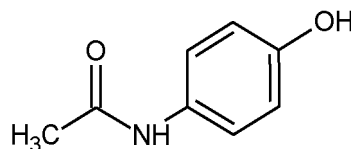
1. COX-neselektivní – ovlivňují obě izoformy COX. Patří sem většina používaných nesteroidních protizánětlivých látek (piroxicam, ibuprofen, naproxen). V této skupině lze najít i látky, které v terapeutických dávkách inhibují více COX1 než COX-2, např. kyselina acetylsalicylová v antiagregačních dávkách do 100 mg inhibuje selektivně COX-1 v trombocytech;
2. COX-2 preferenční (meloxicam, nimesulid případně etodolac) – inhibují COX-2 až 100× více než COX-1;
3. Selektivní inhibitory COX-2 – v doporučeném dávkovaném rozmezí neovlivňují COX-1. Patří sem tzv. koxiby (celecoxib, rofecoxib, piroxicam, valdecoxib, etorikoxib aj.) [8, 9].

1.2 Paracetamol

Paracetamol neboli acetaminofen (APAP) je pravděpodobně nejrozšířenějším a nejběžněji užívaným léčivem na světě. Ve skutečnosti je zařazen do 21. seznamu základních léčivých přípravků Světové zdravotnické organizace, který byl aktualizován v červnu 2019. Navzdory zavedení APAP jako terapeutického činidla před 60 lety, zůstává stále středem zájmu, díky svým terapeutickým vlastnostem, ale také pro svou schopnost působit při předávkování hepatotoxicky [1].

1.2.1 Fyzikální a fyzikálně-chemické vlastnosti

APAP, systematicky *N*-(4-hydroxyfenyl)acetamid, sumární vzorec $C_8H_9NO_2$ (viz obrázek 3), s CAS číslem 103-90-2 je bílý krystalický prášek bez zápachu, který je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v ethanolu a velmi těžce rozpustný v dichlormethanu. Molární hmotnost paracetamolu je 151,16 g/mol a bod tání se pohybuje v rozmezí 168 °C až 172 °C. Roztok v methanolu má absorpční maximum při 249 nm [11].

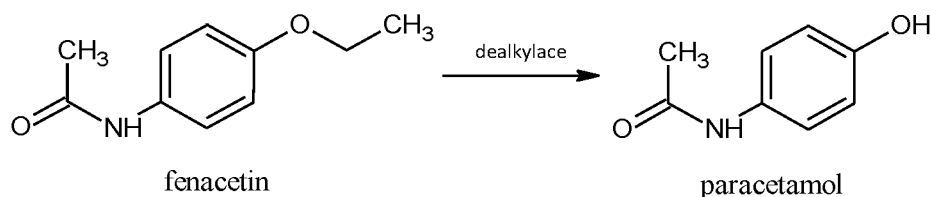


Obrázek 3 Paracetamol

1.2.2 Základní údaje

APAP patří mezi neopioidní analgetika ze skupiny analgetik-antipyretik a je aktivním metabolitem dříve používaného nefrotoxického fenacetinu (viz obrázek 4). Účinkem se velmi

podobá kyselině acetylsalicylové (ASA), ovšem oproti ní nevykazuje prakticky žádný protizánětlivý účinek. Má ovšem ve srovnání s ASA méně nežádoucích účinků, a to především vůči gastrointestinálnímu traktu (GIT), neboť je méně kyselý a nehromadí se tak v žaludeční sliznici. Při terapeutickém dávkování je paracetamol poměrně bezpečný lék. Využívá se především k tlumení běžných bolestí i horečnatých onemocnění. Injekční forma paracetamolu je určena ke krátkodobé léčbě středně silných bolestí především po rozsáhlejších chirurgických výkonech [1, 4, 12, 13, 14].



Obrázek 4 Dealkylace fenacetinu na paracetamol [15]

1.2.3 Mechanismus účinku paracetamolu

Přestože je paracetamol jedním z nejpoužívanějších analgetik na světě, mechanismus jeho analgetického účinku je do značné míry neznámý. Hodně výzkumů se soustředilo na možnost, že paracetamol působí inhibicí cyklooxygenázy, podobně jako nesteroidní antiflogistika (viz obrázek 2), neboť jeho analgetické a antipyretické účinky jsou podobné účinkům aspirinu. V určitém okamžiku byla každá ze tří izoforem COX navržena jako cíl analgetického účinku paracetamolu. Paracetamol však nemá významnou protizánětlivou aktivitu ani neinhibuje produkci tromboxanů A. Ačkoli tedy může existovat určitý účinek paracetamolu na enzymy COX, tento účinek je odlišný od toho, který je pozorován u NSA. Hypotéza vysvětlující tento rozdíl je, že paracetamol působí na COX jako centrální inhibitor, zatímco ostatní inhibitory COX působí centrálně i periferně. Podpora této hypotézy zahrnuje důkaz, že paracetamol inhibuje přeměnu kyseliny arachidonové na prostaglandin E₂ (PEG₂), prostaglandin F_{2α} a tromboxan A₂ v mikroglíích [16, 17].

Analgetický účinek paracetamolu je pravděpodobně zprostředkován jak periferními, tak centrálními mechanismy. Periferní redukce syntézy prostaglandinů vede ke snížení přenosu nociceptivních impulsů. Centrálně paracetamol inhibuje nárůst prostaglandinů v centrální nervové soustavě, které jsou vyvolány periferními nociceptivními přenosy. Zdá se, že paracetamol vykazuje určitou selektivitu vůči COX-2, o čemž svědčí i jeho příznivá gastrointestinální tolerance a minimální účinek na krevní destičky. Tyto účinky jsou typicky zprostředkované inhibicí COX-1. Byly navrženy i další centrální analgetické mechanismy, které se týkají stimulace opioidních receptorů. Opioidní antagonisté u zvířecích modelů zvrátí

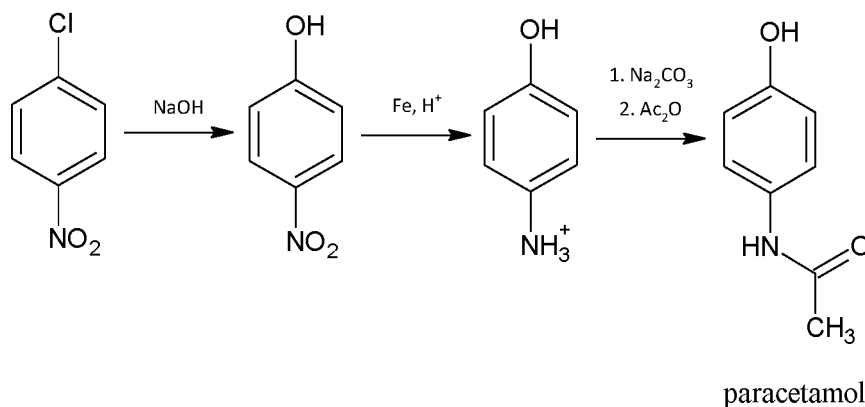
analgetickou aktivitu paracetamolu. Tento účinek může být zprostředkován agonismem opioidních receptorů v mozku, ale také je možné zprostředkování tohoto účinku stimulací sestupných inhibičních cest v míše. Paracetamol byl také spojen s aktivací endogenního kanabinoidního systému [18, 19].

Vzhledem k tomu, že účinky paracetamolu na organismus dosud nejsou zcela známy, může budoucí výzkum odhalit zajímavé mechanismy působení. Zároveň prokázané riziko hepatotoxicity a nefrotoxicity při vyšších dávkách je důvodem, proč se objevují pochybnosti o ponechání paracetamolu jako volně prodejného léku [14, 18]

1.2.4 Syntéza paracetamolu

Paracetamol patří mezi deriváty anilinu, jejichž prvním zástupcem byl acetanilid (*N*-fenylacetamid, fenacetin). Ten byl objeven v 80. letech 19. století a později byl tento preparát vyřazen pro řadu vedlejších účinků, jako jsou methemoglobinémie (oxidace v hemoglobinu Fe^{2+} na Fe^{3+}) a poškozování ledvin. Později bylo prokázáno, že metabolit acetanilidu, *N*-(4-hydroxyfenyl)acetamid, má lepší antipyretické účinky a výrazně nižší toxicitu. Nyní je paracetamol jedním z nejpoužívanějších analgetik a antipyretik.

Jedna z mnoha syntéz paracetamolu (viz obrázek 5) vychází z nukleofilní substituce 4-chlornitrobenzenu hydroxidovým iontem na 4-nitrofenol. V dalším kroku je nitro skupina *p*-nitrolofenolu redukována na aminoskupinu, která je v posledním kroku acetylována a poskytuje paracetamol [5].



Obrázek 5 Syntéza paracetamolu [5]

1.2.5 Dávkování

Jednorázová dávka je 500, maximálně 1000 mg po 4 hodinách, maximálně 4 g denně u dospělých a u dětí nejvíce 60 mg/kg. Pro rychlý nástup účinku jsou vhodné rozpustné formy. Paracetamol ovšem účinkuje velice krátce (3-6 hodin). Za velmi účinnou kombinaci je možné

považovat 1000 mg paracetamolu s 60 mg kodeinu či kombinace paracetamolu s tramadolem. Kombinací s guaifenesinem se dosahuje myorelaxačních a anxiolytických účinků [1, 20, 21].

Opatrnosti v podávání je třeba u poruch jaterních a ledvinných funkcí. Ve vzácných případech může paracetamol vyvolat alergické kožní vyrážky. Poškození jater po užití paracetamolu jsou pozorovány především při současné konzumaci alkoholu nebo užívání hypnotik a sedativ, které obsahují látky jako např. fenobarbital [22].

V mnoha zemích je paracetamol nejčastější jediná sloučenina užívaná při předávkování, náhodném nebo úmyslném. U dávek převyšujících 7 g na den u dospělých a 3 g na den u dětí do 14 let může dojít k velmi těžkému poškození jater, které může končit smrtelně. Menší dávky ovšem mohou také způsobit poškození jater, zejména u lidí s alkoholismem nebo anorexií. Toxicita paracetamolu je hlavní příčinou akutního selhání jater v mnoha vyspělých zemích. Jedna observační kohortová studie 31 jaterních a transplantačních center v USA, která zahrnovala 2070 účastníků s akutním selháním jater v letech 1998 až 2013 zjistila, že otrava paracetamolem byla příčinou poloviny účastníků [23, 24].

Příznaky otravy se vyvíjejí ve třech fázích. V první fázi (1. den) převládá nauzea, zvracení, pocení a bledost. V druhé fázi (2.-4. den) se pacient cítí lépe, avšak hodnoty aminotransferázy narůstají náhle na vysoké úrovni. Ve třetí fázi (3.-5. den) se klinický stav opět zhoršuje (nevolnost, bolesti břicha) a stupňují se projevy selhání jater a ledvin, přičemž se někdy objeví i žloutenka, hypoglykémie a krvácení v zažívacím traktu. Do 8-10 hodin po předávkování je nutno podat specifické antidotum [15, 25].

Teprve v 70. letech 20. století bylo vyvinuto několik protilátek, které doplňují glutathion a detoxikují *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin (NAPQI). Mezi ně patřil například methionin, cystein, cysteamin a dimerkaprol. V jedné observační studii v Edinburghu bylo uvedeno, že intravenózní acetylcystein je stejně účinný jako cysteamin a methionin a nemá nepříznivé účinky. Od té doby se při předávkování paracetamolem jako antidotum používá injekční či perorální acetylcystein (*N*-acetylcystein), který podporuje tvorbu intercelulárního glutathionu, a tím pomáhá rychleji odbourávat toxické metabolity paracetamolu [15, 23].

Předtím, než byla k dispozici léčba acetylcysteinem, byla významná morbidita po předávkování paracetamolem. U neléčených osob s počáteční koncentrací paracetamolu nad pravděpodobnou rizikovou linií nomogramu (cca 200 mg/l ve čtyřech hodinách) byla hlášena úmrtnost 5 %. Po zavedení acetylcysteinu tato míra klesla o 0,4 %. Další observační studie uvádí akutní poškození jater u 58 % lidí. Toto číslo se snížilo na 7 % při podání acetylcysteinu do 10 hodin po požití a 27 % pokud byl podán po více než 10 hodinách [23].

Ačkoli methionin přestal být používán v západních zemích, zůstává stále na seznamu základních léků dle Světové zdravotnické organizace (WHO). V rámci přezkumu v roce 2011 nebyly nalezeny žádné důkazy o rozdílné účinnosti a bezpečnosti acetylcysteinu a methioninu. Proto se levnější methionin stále široce používá v zemích s nízkými až středními příjmy.

K léčbě předávkování paracetamolem se používá mnoho různých typů intervencí zahrnující:

- ty, které snižují absorpci paracetamolu z GIT, včetně výplachu žaludku, aktivního uhlí a ipecacuanha (ipecacuanový sirup, emetikum);
- antidota, která brání přeměně paracetamolu na hepatotoxický metabolit NAPQI (cimetidin)
- antidota k detoxikaci NAPQI (methionin, cystein, cysteamin, dimerkaptol nebo acetylcystein)
- ty, které odstraňují paracetamol z krve poté, co vstoupil do krevního řečiště (intermitentní hemodialýzu, intermitentní hemoperfuzi nebo hemoperfuzi dřevěného uhlí) [23].

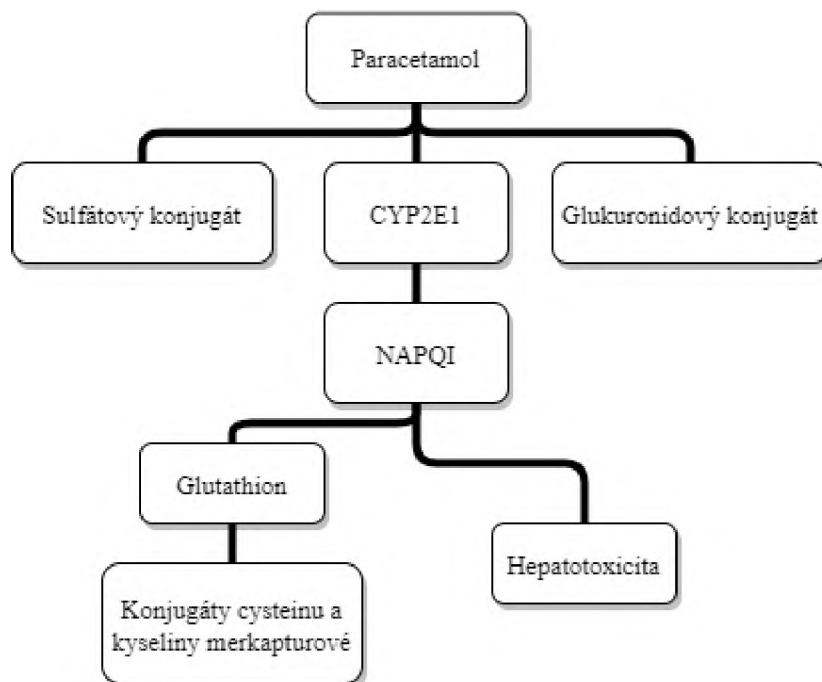
1.2.6 Metabolismus paracetamolu

Pokud je paracetamol používán v doporučených dávkách (4 g/den u dospělého člověka), pak je velmi dobře tolerován. Absorpce paracetamolu je rychlá. Vstřebává se v žaludku a tenkém střevě. Vrchol plazmatické hladiny je za 1-2 hodiny po požití. Po požití vysokých toxických dávek je dosaženo maximální koncentrace za 4 hodiny [14, 26].

Biotransformace probíhá převážně v játrech, ale část může být metabolizována ve střevě a ledvinách. Paracetamol je v jaterních buňkách metabolizován třemi hlavními cestami: glukuronidací, sulfonací a oxidací. Největší část terapeutické dávky je konjugována s kyselinou glukuronovou a kyselinou sírovou (glukuronidace a sulfatace). Asi 5 % paracetamolu je oxidováno cytochromem P450 (CYP450, viz obrázek 7) na toxický intermediát NAPQI. Ten se dále metabolizuje na konjugát acetaminofen-glutathion (APAP-SG, viz obrázek 6) o kterém se nedávno ukázalo, že může také hrát možnou patologickou roli. Tato cesta nabývá významu při předávkování paracetamolem, neboť cesty glukuronidací a sulfatací jsou v tomto případě zcela nasycené. Dochází tedy k vyčerpání zásob jaterního glutathionu a intermediát se začne kovalentně vázat na bílkoviny jater za vzniku jaterní nekrózy [15, 27, 28, 29].

Paracetamol je vylučován ledvinami, z toho 2-5 % v nezměněné formě močí, 50-70 % jako glukuronid, 25-35 % jako sulfát a jen v malé míře po přeměně na cystein. Žlučí je

vyučována jen malá část metabolitů. V případě poškození jater paracetamolem však podíl žlučové extrakce konjugátů s glutathionem stoupá [29, 30].



Obrázek 6 Metabolismus paracetamolu [32]

Absorpce

APAP je slabá kyselina ($pK_a \approx 9,5$) a při fyziologickém pH je tedy téměř zcela neutrální. Snadno se tedy absorbuje z dvanáctníku. Perorální přípravky mají vysokou biologickou dostupnost, absorbuje se přibližně 80 % dávky, a to převážně pasivní difúzí. Tablety a tobolky se musí rozpadnout a poté rozpustit, což vede k prodlevě před absorpcí. Šumivé tablety a kapaliny (kapky, sirupy) se vstřebávají výrazně rychleji. Rektální přípravky mají ve srovnání s jinými cestami nejvíce nevyzpytatelnou a nepředvídatelnou hodnotu biologické dostupnosti (od 24 % do 98 %). Obecně se ale považuje biologická dostupnost rektálních přípravků za nižší, a proto vyžadují vyšší dávky. Absorpce žaludeční sliznicí je zanedbatelná, proto jakýkoli proces (či nemoc) zpomalující vyprazdňování žaludku, zpomaluje i absorpci orálně podávané dávky. Přítomnost potravy tedy prodlužuje dobu pro dosažení maximální koncentrace v krevním řečišti, ale celkový rozsah absorpce se nezmění bez ohledu na to, zda je jídlo přítomno či nikoli [31, 32, 33].

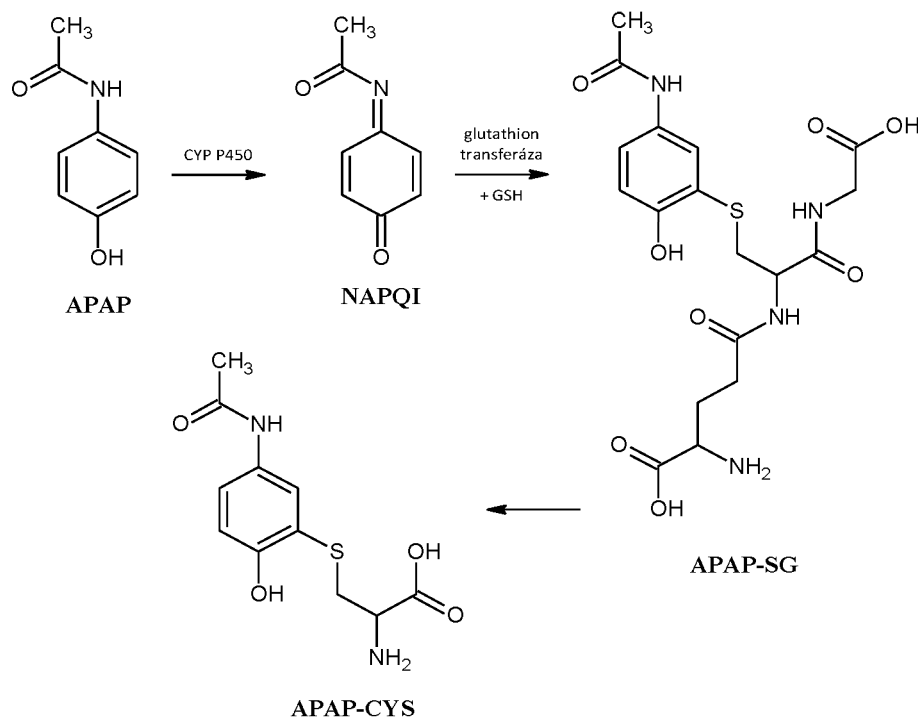
Věk také ovlivňuje absorpci paracetamolu. Pravděpodobně pomalejší doba vyprazdňování žaludku u novorozenců zpožďuje orální absorpci paracetamolu. Normálních absorpčních dob je dosaženo až ve věku 6-8 měsíců [32, 33].

I. fáze biotransformace

Malá část dávky, asi 5-10 %, je oxidována cestou CYP450 v játrech primárně enzymem CYP2E1 na toxický meziprodukt NAPQI (viz obrázek 6) a enzymem CYP2A6 na netoxický metabolit katecholu 3-hydroxy-APAP (3-OH-APAP). Zdá se, že enzym CYP2E1 je přítomen v nižších hladinách u novorozenců než u dospělých, což vede k tvorbě menšího množství toxického intermediárního metabolitu [32, 34].

V procesu aktivace APAP mohou být relevantní i jiné enzymy než CYP450. Jedná se o peroxidázovou skupinu enzymů. Například myperoxidáza, která je obsažená v bílých krvinkách, bioaktivuje širokou škálu léčiv. V jiných tkáních s nízkou aktivitou CYP450 může být za bioaktivaci odpovědná COX (prostaglandin H syntáza). Například toxicita APAP v ledvinách je pravděpodobně umožněna pomocí tohoto enzymu [35].

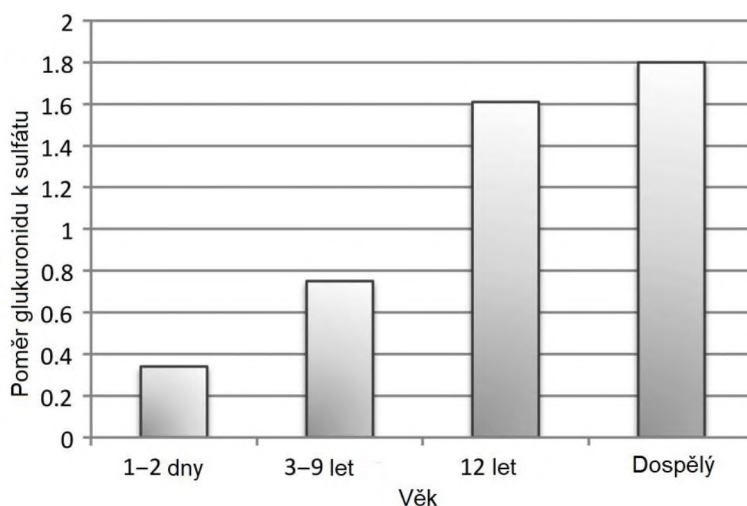
Ačkoli glutathionylace je reakcí II. fáze biotransformace, u APAP nastává po metabolismu I. fáze. NAPQI je slabý elektrofil a snadno tedy reaguje s nukleofilními thiolovými skupinami. NAPQI je detoxikován reakcí s redukováným glutathionem (GSH) za vzniku konjugátu APAP-SG (viz obrázek 7). Bylo prokázáno, že reakce NAPQI s GSH probíhá spontánně i enzymaticky. Enzymatická konjugace je katalyzována glutathion-*S*-transferázovými enzymy (GST). Konjugát APAP-SG lze měřit v játrech či v krvi a je přímým důkazem tvorby reaktivního metabolitu. Díky tomuto možnému detekování látek dříve, než nastane buněčná nekróza je možné určit dávku, které byl organismus vystaven [31, 36].



Obrázek 7 Oxidační metabolická cesta paracetamolu [28]

II. fáze biotransformace

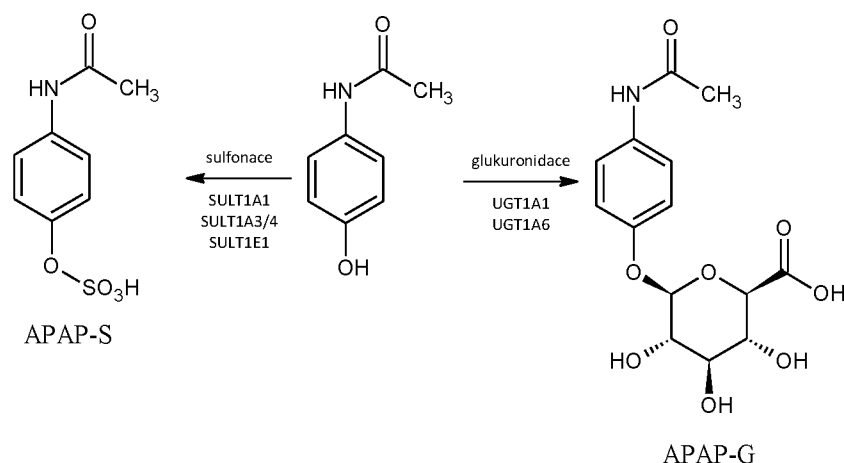
V játrech je paracetamol metabolizován na glukuronidové a sulfátové konjugáty (viz obrázek 9), které jsou poté vylučovány ledvinami. U novorozenců převládá cesta sulfatace. Glukuronidační cesta vyžaduje určitý čas a začne převládat až kolem 2 let. Studie analyzující vylučování těchto dvou konjugátů močí zjistila, že poměr paracetamol-glukuronid k paracetamol-sulfátu je u novorozenců (věk 1-2 dny), dětí (věk 3-9 let) a starších dětí (ve věku 12 let) 0,34, 0,75 a 1,61. Poměr dospělých byl 1,80 (viz obrázek 8) [32].



Obrázek 8 Poměr glukuronidu k sulfátu paracetamolu v různém věku [32]

Asi 50-70 % APAP je metabolizováno na APAP-glukuronid (APAP-G, viz obrázek 9). Glukuronidace je katalyzována UDP-glukuronosyltransferázou (UGT), která přenáší glukuronosylovou skupinu kyseliny uridin-5'-difosfoglukuronové na cílové molekuly a činí je tak více rozpustnými ve vodě. U lidí a hlodavců bylo popsáno mnoho UGT patřících do čtyř rodin (UGT1, UGT2, UGT3 a UGT8). Studie prováděná v 80. letech na potkanech kmene Gunn, kteří jsou špatnými bilirubinovými glukuronidátory, odhalila větší náchylnost k hepatotoxicitě APAP než u jiných kmenů. Toto zjištění bylo rozšířeno na klinickou studii u lidí srovnávající glukuronidaci a bioaktivaci APAP u UGT deficientních pacientů s Gilbertovým syndromem (porucha metabolismu bilirubinu v krvi), bylo zjištěno, že primární defekt v Gilbertově syndromu je v promotoru pro UGT1A1 [31].

Přibližně 25-35 % terapeutické dávky APAP je izolováno jako APAP-sulfát (APAP-S, viz obrázek 9). Sulfonace je katalyzována sulfotransferázovými enzymy (SULT), které přenášejí sulfoskupinu z 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS) na akceptor, v tomto případě APAP. U lidí je známo nejméně 13 izoforem SULT a jsou uspořádány do čtyř rodin. Pro sulfonaci xenobiotik je obvykle katalyzována zejména cytosolickými sulfotransferázami a u APAP konkrétně SULT1A1 a 1A3 nebo 1A4 [31].



Obrázek 9 Sulfonace a glukuronidace APAP [31]

Extrakce paracetamolu

Eliminace konjugátů APAP, které jsou výsledkem biotransformace, probíhá v ledvinách a střevech. Tyto dva hlavní orgány obsahují γ -glutamyl-transferázu (γ GT) a dipeptázu, které umožňují rozdělení APAP-SG na paracetamol-cystein-glycin a cysteinový konjugát (APAP-CYS, viz obrázek 7). Ledviny jsou nejdůležitějším orgánem pro metabolizaci APAP obsahující síru. Vylučován je buď přímo – glomerulární filtrací APAP-CYS a aktivním transportem APAP-NAC, nebo další biotransformací s následným vylučováním ledvinami. Degradční produkty jsou nakonec vylučovány močí [31, 35].

Eliminační poločas paracetamolu se liší u novorozenců, kojenců, dětí a dospívajících. U novorozenců je mezi 2,5 až 4 hodinami, což je asi o 1 hodinu delší než u starších dětí. U předčasně narozených je průměrný poločas ještě vyšší [32].

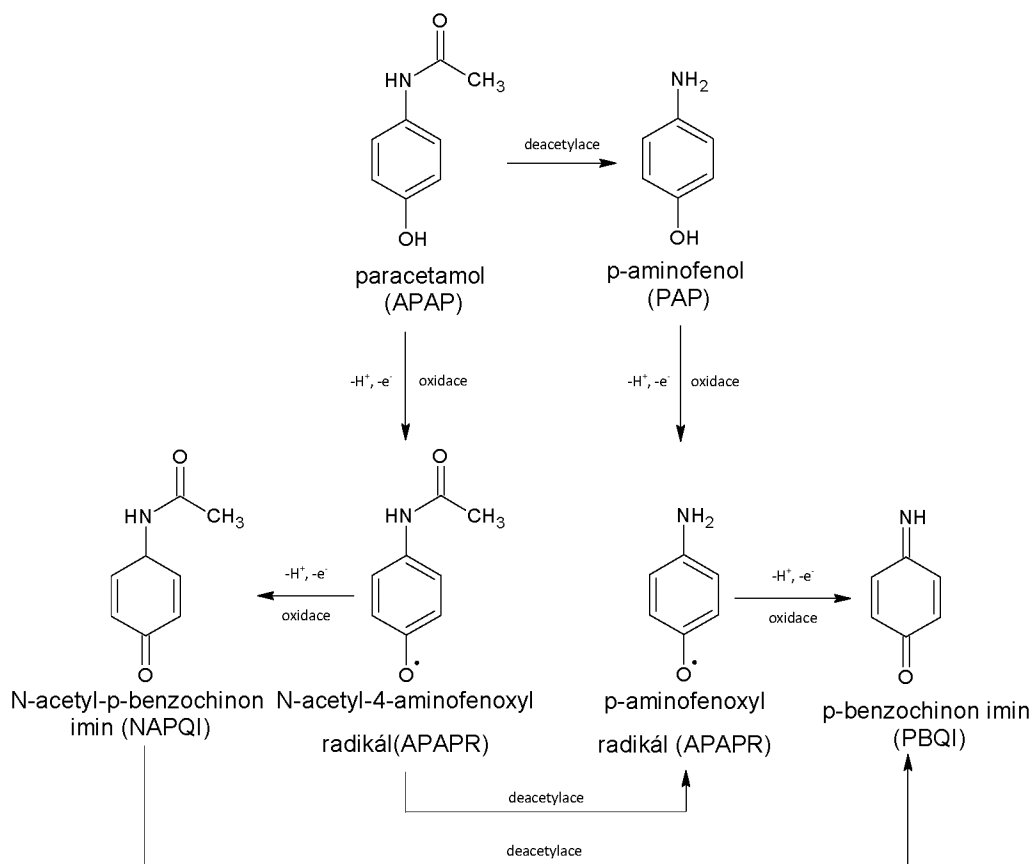
1.2.7 Toxicita paracetamolu

Hepatotoxicita

Počáteční studie prokázaly, že hepatotoxicitu nezpůsobuje samotný paracetamol, ale spíše reaktivní metabolit NAPQI. Mechanismus poškození jater vyvolaného APAP byl studován na hlodavcích, zejména na myších, déle než 40 let. Mitchell *et al.* prokázali, že zatímco hlavní cesty biotransformace pro APAP jsou opravdu detoxikační reakce, které tvoří konjugáty fenolického sulfátu a glukuronidu, vedlejší cestou je oxidační metabolismus léčiva prostřednictvím systému CYP450 na elektrofilní meziproduct NAPQI, který rychle vyčerpá jaterní glutathion (GSH). Když intercelulární koncentrace GSH dosáhnou nízké úrovně, následuje toxicita [1, 36, 37].

Mezi hlavní mechanismy, o nichž se předpokládá, že jimi NAPQI způsobuje poškození jater, patří tvorba proteinových aduktů reakcí s thiolovými skupinami. To vede k mitochondriální dysfunkci a buněčné smrti. Mitochondriální dysfunkce pozorovaná u hepatotoxicity APAP je způsobena narušením mitochondriální membrány a zastavením produkce ATP. Tvorba aduktu mitochondriálního proteinu s NAPQI způsobuje oxidační stres a tvorbu reaktivních kyslíkových látek v mitochondriích. To vede k poškození mitochondriální DNA, poškození mitochondriální permeability a zastavení produkce ATP. Nedávné studie na myších naznačují, že NAPQI způsobuje selektivní inhibici mitochondriálního komplexu II a že podávání methylenové modři může chránit před mitochondriálním poškozením [37].

Kromě NAPQI existují v metabolismu APAP i další látky, které mohou být potenciálně škodlivé. Oxidace APAP pomocí CYP450 a dalších enzymů probíhá ve dvou krocích (viz obrázek 10). Každý odpovídá procesu oxidace jedním elektronem, přičemž první krok poskytuje *N*-acetyl-*p*-aminofenoxylový radikál (APAPR). Navíc pokud se uváží i deacetylace (její možnost v živých organismech byla již prokázána), pak vznikají *p*-aminofenoxylátové radikály (PAPR) a *p*-benzochinonimin (PBQI) jako potenciální kandidáti pro toxicitu APAP [38].



Obrázek 10 Vícekroková oxidace paracetamolu [38]

Nefrotoxicita

Předávkování paracetamolem způsobuje poškození jater, ale v některých případech je také spojeno s poškozením ledvin. Nefrotoxicita indukovaná paracetamolem je ovšem méně častá než hepatotoxicita. Renální onemocnění ledvin se vyskytuje přibližně u 1-2 % pacientů. V některých případech po předávkování může dojít k akutnímu selhání ledvin jako komplikace hepatotoxicity. Několik případů ovšem popisuje nefrotoxicitu APAP i bez selhání jater. Pokud však jde o funkci ledvin, použití APAP ve vhodných terapeutických dávkách by mělo být bezpečnější než NSA či opiáty [39, 40, 41].

Požítí toxického množství APAP může způsobit akutní poškození ledvin (AKI). Časté užívání APAP může vést k chronickému onemocnění ledvin (CKD) a konečnému stádiu onemocnění ledvin (ESRD). Nadměrné množství APAP a NAPQI je vylučováno ledvinami a může přispívat k AKI. Kromě toho může související oxidační stres vést k přímé nefrotoxicitě. Uvádí se ale, že jednorázové užití APAP může být bezpečné i pro pacienty s pokročilým CKD ve stádiu 4 až 5 bez nepříznivého účinku na progresi CKD [41].

Glutathion hraje důležitou roli při detoxikaci toxických sloučenin při předávkování APAP. Zvířecí modely však dokázaly, že glutathionové konjugáty mohou zprostředkovat nefrotoxicitu. Nezávislost nefrotoxicity a hepatotoxicity indukované APAP naznačuje možnost příspěvku různých mechanismů [42].

Dřívější výzkumy prokázaly možnou roli metabolitů APAP odvozených od glutathionu. Bylo zjištěno, že ledviny jsou schopné metabolizovat APAP na NAPQI prostřednictvím mikrosomálních CYP450, i když v menší míře než hepatocyty. Nejvyšší aktivita CYP450 se vyskytuje v renální kůře a zejména v proximálních tubulech ledvin. Proto se renální toxicita APAP pravděpodobně omezuje na tuto část ledvin. Studie také dokázaly schopnost APAP-CYS potencovat poškození ledvin. Dalšími možnými mechanismy, které se podílejí na renální toxicitě, je působení prostaglandinové syntetázy a *N*-deacetylázy [39, 43].

1.3 Kapalinová chromatografie

Tradiční forma kapalinové chromatografie používá polární stacionární fázi (SF) jako je oxid křemičitý nebo oxid hlinitý a nepolární organickou mobilní fázi (MF), například chloroform. Dnes se tato forma nazývá chromatografie s normálními fázemi (NP-LC) a je založena na interakci polárních funkčních skupin analytů s polárními skupinami navázanými na stacionární fázi – například aminoskupiny, diolové nebo kyanoskupiny. Nejméně polární složky směsi budou eluovány první, následovány složkami se střední polaritou, a nakonec nejpolárnějšími sloučeninami. Chromatografie s normálními fázemi již nemá takový význam a převážně se využívá chromatografie s obrácenými fázemi.

V chromatografii s obrácenými fázemi (RP-LC) se používá nepolární stacionární fáze ve spojení s polárními, převážně vodnými mobilními fázemi. Tuto techniku využívá 75-90 % všech HPLC aplikací, která pokrývá širokou škálu molekulárních hmotností, polarit a ionizace. Je to tedy velmi univerzální metoda.

Zadržení analytu do značné míry závisí na hydrofobních interakcích. S velikostí sloučeniny roste retence, a zároveň klesá s polaritou sloučenin. Velké nepolární molekuly jsou tedy vysoce zadržované. V RP-LC se většinou používá dvousložkové (binární), či vícesložkové mobilní fáze. Voda je v tomto případě slabší rozpouštědlo pro úpravu zadržování látek a jako silné rozpouštědlo je použito jedno či více s vodou mísitelných organických rozpouštědel, například methanol, acetonitril či tetrahydrofuran. Většina stacionárních fází jsou vázané skupiny na bázi silikagelu (oxidu křemičitého), ale využívají se i polymerní fáze a fáze založené na anorganických substrátech jiných než oxid křemičitý [44, 45, 46, 47].

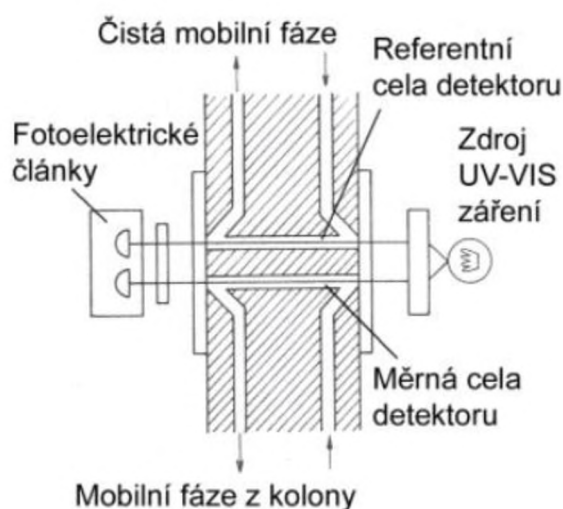
1.3.1 Detektory v kapalinové chromatografii

Mezi běžně používané detektory patří: spektrofotometrický UV-VIS, fluorimetrický, refraktometrický, elektrochemický (amperometrický, coulometrický), vodivostní a hmotnostní spektrometr (HPLC/MS) [48].

UV-VIS spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrické detektory jsou dnes nejčastěji využívané detektory s jejichž pomocí měříme absorpci ultrafialového a viditelného záření. Analyzované molekuly mají charakteristické absorpční spektrum, které může být využito pro určení vzorku, jeho koncentraci a k detekci nečistot. Zároveň však mohou být rozdíly mezi absorpčními spektry molekul s podobnou chemickou strukturou poměrně malé. UV-VIS detektory jsou nedestruktivní a často se využívají v kombinaci s dalším detektorem (fluorimetrický nebo hmotnostní spektrometr).

Ve spektrofotometrickém detektoru prochází mobilní fáze průtokovou kyvetou, kterou prochází paprsek záření z UV-VIS spektrofotometru. Když vzorek absorbující v UV-VIS oblasti prochází přes tuto průtokovou komoru, generuje signál, který je úměrný koncentraci látky (viz obrázek 11). Aby se minimalizovalo mimokolonové rozmývání vzorku, měl by být objem této kyvety co nejmenší. Nejběžnější kyvety mají objem 1 až 10 μl a délku 2 až 10 mm [45, 49, 50].



Obrázek 11 Dvoupaprskový UV-VIS spektrofotometrický detektor [51]

Jsou detekovány pouze sloučeniny absorbující UV-VIS záření, jako například alkeny, aromatické látky či sloučeniny s násobnou vazbou mezi C a O, N nebo S. Mobilní fáze by měla být zvolena taková, jenž absorbuje malé či žádné záření. Absorpce záření je funkcí koncentrace c , podle Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (1)$$

kde A – absorbance, ε – molární absorpční koeficient [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] a l – délka kyvety [cm].

V současné době je možné měřit v UV-VIS oblasti pomocí tří typů detektorů: s proměnnou vlnovou délkou, se stálou vlnovou délkou a s diodovým polem (diode array) [45, 49]

Detektory se stálou vlnovou délkou jsou dnes jen velmi málo používané, avšak stále nacházejí své uplatnění jako standard pro měření při vlnové délce 254 nm k nastavitelným spektrofotometrickým detektorům. Jako zdroj světla při 254 nm se využívají rtuťové výbojky, pro 214 nm zinkové výbojky, které jsou izolované pomocí filtru. Výhodou těchto detektorů je jednoduchost jejich optické cesty a není potřeba žádného monochromátoru [45, 49].

Detektory s proměnnou vlnovou délkou jsou nejvhodnější pro zavedené separační metody a kontrolu kvality, kde jsou známé vlnové délky analytů. Využívá se difrakční mřížky pro výběr určité vlnové délky, před vstupem do kyvety. Tuto mřížku lze otočit pro volbu libovolné vlnové délky. Záznam poměru absorbance na dvou vlnových délkách napříč píkem ukazuje na čistotu látky. Pro UV oblast se jako zdroj záření standardně používá deuteriová oblouková lampa a pro viditelné a blízké infračervené záření žárovka s wolframovým vláknem. Spektrální rozlišení se určuje disperzí monochromátoru a šířkou vstupních a výstupních štěrbin.

Detektory s fotodiodovým polem měří všechny vlnové délky v rozsahu přístroje najednou. Širokopásmové světlo nejprve projde přes průtokovou kyvetu se vzorkem a poté na monochromátor, pevnou mřížku, který rozptyluje paprsek na pole fotodiod, obvykle obsahujících 512 nebo 1024 křemíkových fotodiod. Pole fotodiod využívaných v HPLC detektorech mají maximální délku asi 25 mm. Musí se proto na tuto délku přizpůsobit celý rozsah vlnových délek, pro které je určen. Detektor může poskytovat měření celkové spektrální absorbance eluentu na čas. Výsledný chromatogram pak může být trojrozměrný graf závislosti absorbance – čas – rozsah vlnových délek nebo zobrazení jednoho či více grafů absorbance na čas nebo vlnové délce (2D data). Protože detektor zaznamenává celé spektrum, může poskytnout mnohem více informací o složení vzorku, než je možné u monochromatické detekce. Toto umožnilo aplikaci UV-VIS detektorů při vývoji metod, neboť můžeme identifikovat složky ve směsi či nečistoty ve vzorku [45, 48, 49].

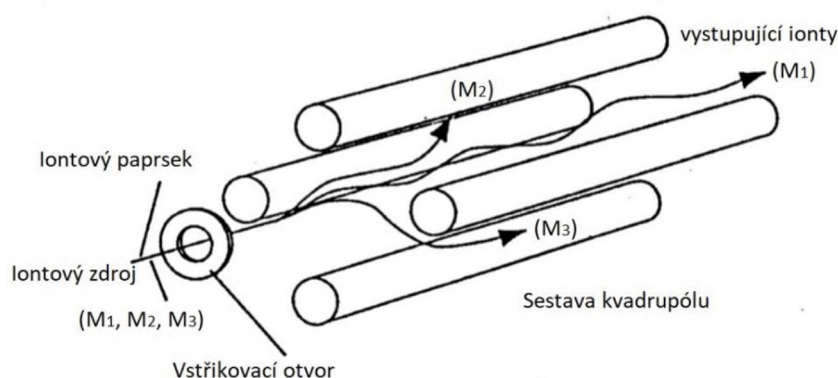
Hmotnostní spektrometr

Díky své schopnosti generovat informace o struktuře a molekulové hmotnosti složek se stala hmotnostní spektrometrie (MS) velmi důležitou metodou detekce v HPLC. HPLC-MS umožňuje separaci i identifikaci ve stejném kroku. Hmotnostní spektrometr se využívá hlavně na kvantitativní a kvalitativní analýzy složitých vzorků (např. tělních tekutin, přírodních produktů, vzorků životního prostředí), ale i jako náhrada složité přípravy vzorku a předseparace hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením s iontovým zdrojem za atmosférického tlaku. Výsledným záznamem HPLC-MS analýzy je intenzita m/z v čase. Veličina m/z je bezrozměrná a získaná vydělením hmotnosti iontu jeho nábojem. Jednou z hlavních nevýhod je, že MS je destruktivní technika a vylučuje tedy možnost sběru frakcí.

V současnosti se pro HPLC-MS využívají ionizátory za atmosférického tlaku, kde se ionizačního procesu přímo účastní mobilní fáze. Tyto ionizátory se dělí na: ionizaci elektrosprejem (ESI), chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizaci za

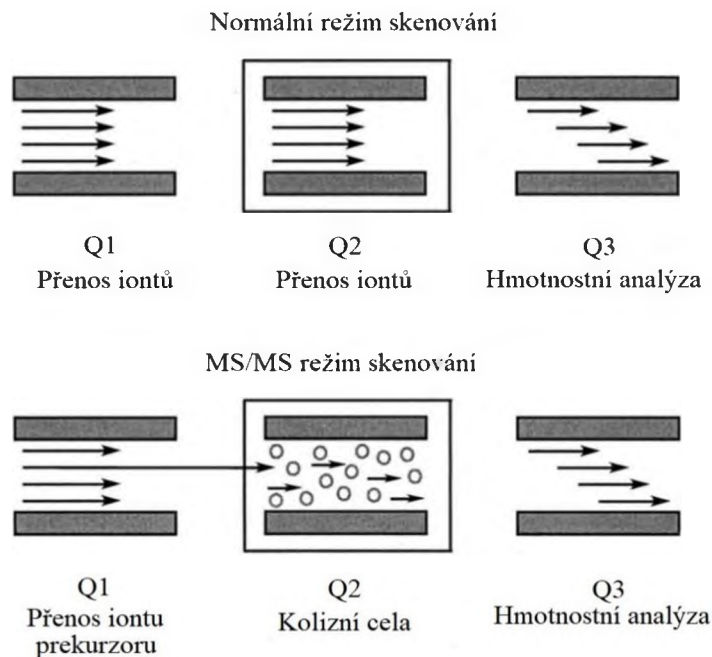
atmosférického tlaku (APPI). Nejčastěji využívané jsou ESI a APCI, APPI je využívána hlavně pro nepolární či velmi labilní látky [47, 52, 53].

Kvadrupólový analyzátor (Q) sestává ze čtyř stejných kovových tyčí kruhového průřezu délky 20-30 cm. Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí U a na zbývající dvě záporné stejnosměrné napětí U . Na všechny čtyři je dále superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí V . Ion je přiveden do středu osy kvadrupólu a začne oscilovat. V daný časový okamžik je vložen určitý poměr U/V . Oscilace pro tento poměr jsou stabilní pouze pro ion s určitou hodnotou m/z , který projde kvadrupólem a dostane se na detektor. Všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu (viz obrázek 12).



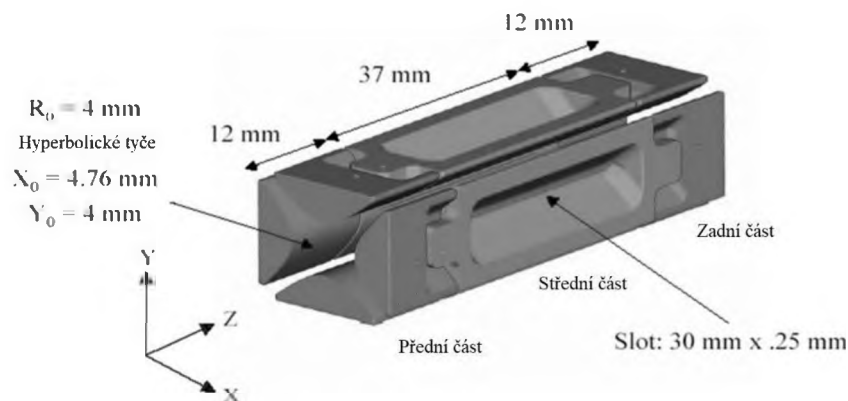
Obrázek 12 Schéma kvadrupólového analyzátoru [53]

Trojité kvadrupólový (QqQ) analyzátor je pravděpodobně nejčastěji užívaný MS/MS instrument. Jedná se o tři kvadrupóly seřazené za sebou, přičemž prostřední z nich (q) slouží jako kolizní cela se zavedeným kolizním plynem (viz obrázek 13). V prvním kvadrupólu dochází k ionizaci, ve druhém k disociaci a třetí slouží k analýze vzniklých fragmentů. Zavedením kolizního plynu je způsobena kolizní extrakce iontů vybraných kvadrupólovým analyzátozem Q1 [53, 54].



Obrázek 13 Porovnání normálního a MS/MS režimu skenování [53]

Lineární iontová past se skládá ze čtyř parabolických tyčí, které jsou rozděleny na tři části – přední, středovou a zadní (viz obrázek 14). Při skenování jsou opět nestabilní ionty vypuzovány z pasti štěrbinami ve středové části [53, 54].

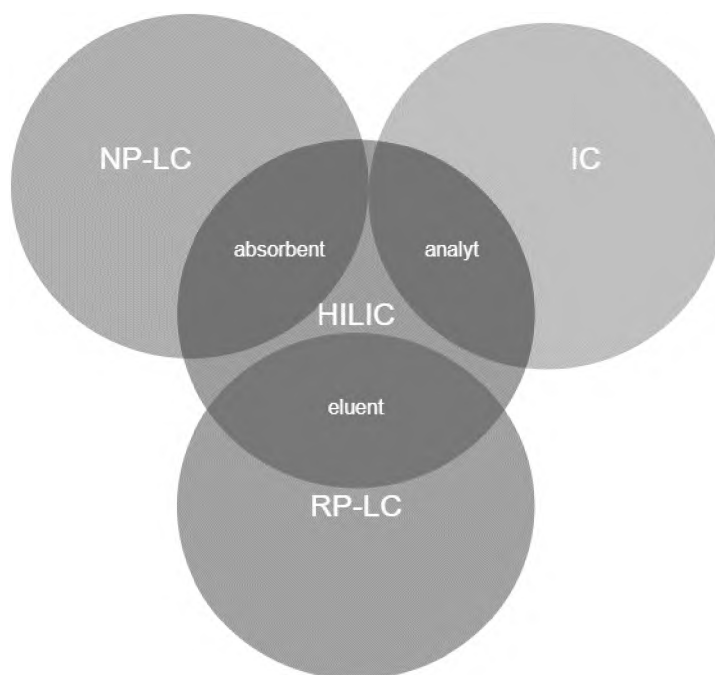


Obrázek 14 Schéma lineární iontové pasti [53]

1.4 Chromatografie hydrofilních interakcí

U klasických reverzních fází je často velice komplikované separovat polární analyty, neboť dochází k jejich eluci v mrtvém retenčním čase. Proto byla v roce 1990 objevena A. J. Alperem metoda kapalinové chromatografie založené na hydrofilních interakcích mezi stacionární fází a separovanými látkami (HILIC). Tato technika byla původně zařazena jako varianta kapalinové chromatografie s normální fází s vodnými mobilními fázemi (ANP LC), ale mechanismus separace v HILIC je komplikovanější než v NP-LC [55, 56].

HILIC je kombinací chromatografie s normálními fázemi, s obrácenými fázemi a iontové chromatografie (viz obrázek 15). Používá stejně jako NP-LC tradiční polární stacionární fáze jako je silikagel, amino nebo kyano skupiny, ale mobilní fáze jsou podobné fázím používaným v režimu RP-LC. Zároveň umožňuje analýzu nabitých látek jako v iontové chromatografii. Rozdíl mezi HILIC a NP-LC je z definice, která byla navržena Alpertem. Pojmu HILIC by se mělo užit, pokud silně eluujícím rozpouštědlem je voda a retenční mechanismus je založen na rozdělení mezi elučním činidlem a vrstvou bohatou na vodu, která je částečně zachycena ve stacionární fázi. Retence v NP-LC je řízena převážně povrchovou adsorpcí [57, 58, 59].

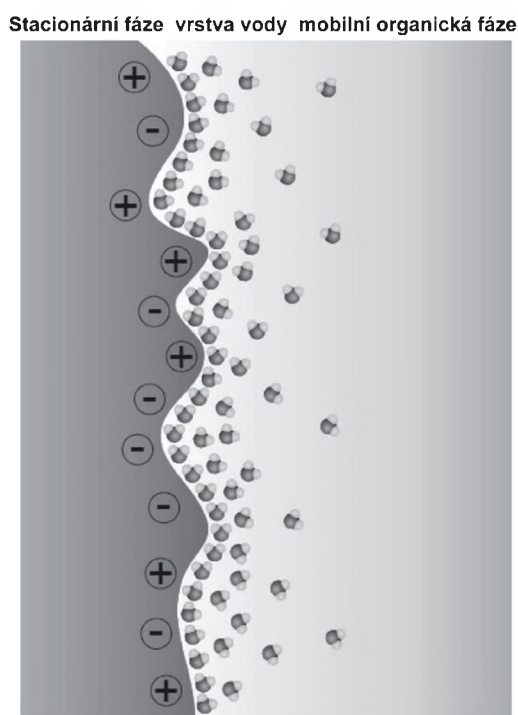


Obrázek 15 Kombinace vlastností běžně užívaných metod v kapalinové chromatografii pomocí HILIC [57]

Existuje mnoho výhod HILIC oproti chromatografii s obrácenými fázemi. Pro některé polární neutrální látky je HILIC prakticky jedinou technikou dosahující dostatečné retence pro separaci. Například uracil může vykazovat dobrou retenci v HILIC, zatímco v RP-LC je užíván jako marker mrtvého objemu. HILIC ovšem není vhodný pro tak široký rozsah sloučenin jako RP-LC. Neutrální nepolární látky mají obecně v HILIC velmi malou retenci, ale je cennou doplňkovou technikou k RP-LC. HILIC lze aplikovat na separaci malých molekul, ale také na peptidy či dokonce na velké proteiny. Další výhodou je snadné propojení s detektory využívající odpařování rozpouštědla [56, 57, 60].

1.4.1 Mechanismus separace HILIC

Stacionární fáze je polárnější než vodná mobilní fáze a díky tomuto uspořádání je možné dělit polární analyty. Nepochopitelné látky nevykazují afinitu ke stacionární fázi a nejsou tedy zadržovány. Separace HILIC je řízena primárně hydrofilními proton donor-akceptorovými a dipól-dipólovými interakcemi se solutem. Interakce probíhají jak s povrchem stacionární fáze, tak i s kapalinou okludovanou na jeho povrchu v difúzní vrstvě. U slabých kyselin a bází se uplatňují i druhotné interakce (např. elektrostatické interakce). Aby mohlo dojít k hydrofilní interakci, je třeba aby se na povrchu sorbentu SF vytvořila hydrofilní vrstva (z angl. „water-rich layer“, viz obrázek 16) [55, 61].



Obrázek 16 Difúzní vrstva vody na povrchu polárního sorbentu [61]

Mobilní fáze je obvykle acetonitril (50-99 %, v/v) ve vodě. Elektrostatické odpuzování (druhotné interakce) lze omezit přidáním pufru – amonných solí organických kyselin, např. mravenčan nebo octan amonný. Toto platí především pro negativně nabitou stacionární fázi na bázi silikagelu. Amonné soli se využívají v milimolárních koncentracích a jsou schopné kompenzovat negativní náboj stacionární fáze. Volba vhodné amonné soli závisí na rozpustnosti v mobilní fázi s vysokým obsahem organického rozpouštědla. Typ stacionární a složení mobilní fáze ovlivňují výsledný mechanismus separace podobné systému s normálními fázemi – retence látek se zvyšuje s jejich polaritou a klesá s rostoucí koncentrací vodné složky (polárnějšího rozpouštědla) v mobilních fázích s vysokým obsahem acetonitrilu.

Při nižších koncentracích acetonitrilu se mění mechanismus retence a odpovídá separacím v RP-LC – retence roste s rostoucím obsahem vody v mobilní fázi [55, 61].

Optimalizovat můžeme i další parametry, v závislosti na požadovaných vlastnostech separačního média, např. pro zvýšení ionizace při MS detekci je možné mobilní fázi obohatit přidavkem organické kyseliny (např. kyselina mravenčí). Retenci lze ovlivnit teplotou – vyšší teplota kolony snižuje šířku difúzní vrstvy vody, zejména v mobilních fázích obsahujících nižší koncentrace acetonitrilu; aciditou mobilní fáze – změna pH mění ionizaci silanolu, ale také relativní ionizaci vzorků, tedy i její retenci, koncentrací použité soli v MF – vysoký obsah acetonitrilu snižuje šířku difúzní vrstvy vody, zároveň vysoká koncentrace octanu amonného má opačný účinek [55, 62, 63].

Mechanismus separace se stále jeví jako složitý a málo probádaný, což může představovat překážku pro širší přijetí této techniky. Nicméně větší porozumění účinku některých jednoduchých parametrů by mohlo vést k přímějšimu vývoji metod [60].

1.4.2 Stacionární fáze pro HILIC

Stacionární fáze v HILIC musí být, stejně jako u chromatografie s normálními fázemi, polárnější než fáze mobilní. Ve skutečnosti většina separací HILIC byla dříve prováděna na kolonách typických pro systém normálních fází (např. s amino- nebo kyanoskupinami a silikagelem), protože bylo dostupných pouze pár HILIC kolon (viz tabulka 1). V posledních letech ale již bylo pro HILIC vyvinuto mnoho speciálních fází s různými funkcemi [55, 64].

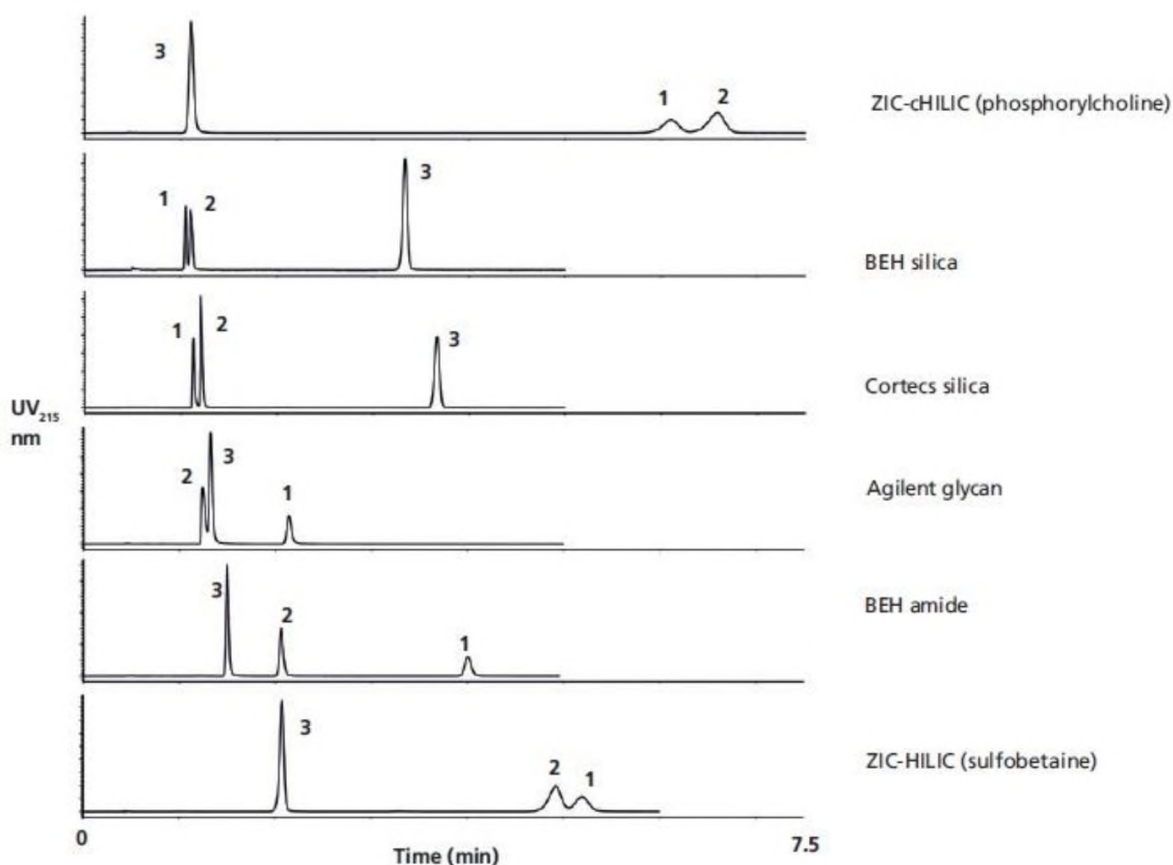
Tabulka 1 Stacionární fáze používané při HILIC [55]

Stacionární fáze	Chemická struktura
a. silikagel	-OH
kyanopropyl	-(CH ₂) ₃ -CN
aminopropyl	-(CH ₂) ₃ -NH ₂
diol	-H ₂ C-CH(OH)-CH ₂ -OH
b. PAC	$\left(\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{CH} \\ \\ \text{C}=\text{O}^n \\ \\ \text{HO} \end{array} \right)_n$
c. ZIC	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{H}_2\text{C}-\text{N}^+(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3^- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$

Běžně se využívají polární chemicky vázané fáze na partikulárním nebo monolitickém nosiči. Nejčastěji se jedná o klasickou silikagelovou stacionární fázi modifikovanou různými funkčními skupinami. Stacionární fáze lze široce rozdělit na fáze, které mají v podstatě neutrální povrch (např. amid nebo diol), kyselý povrch (např. poly(2-sulfoethyl) – má skupiny sulfonových kyselin) a ty, které mají bazický povrch (např. s alkylamino skupinami). Existují i další kategorie, jako zwitterionické kolony, které se mohou chovat podobně jako neutrální kolony díky blízkosti negativně a pozitivně nabitých ligandů. Další skupinou je samotný silikagel, který díky přítomnosti negativně nabitých silanolových skupin vykazuje kyselé vlastnosti, zejména při vyšším pH [55, 60].

Obecně se síla polárních interakcí s analyty zvyšuje v pořadí: kyanopropyl < diol < aminopropyl << silikagel stacionární fáze. Relativně často používané jsou v HILIC aminopropyl-silikagelové kolony [65].

Změna stacionární fáze je pravděpodobně nejúčinnějším způsobem, jak změnit selektivitu separace. To je znázorněno na obrázku 17 pro neutrální uridin (1), kyselinu 4-hydroxybenzoovou (2) a bazický nortriptylin (3) s použitím 5 mmol/l mravenčanu amonného v 95 % acetonitrilu. Oba čisté silikagely (BEH silica a Cortecs silica) vykazují preferenční retenci nortriptylinu díky interakcím s negativně nabitými silanoly. Nízká porozita silikagelů (7-9 % v 89 % acetonitrilu) a jejich špatná hydrofilní selektivita vysvětluje nízkou retenci uridinu. Vázané fáze mají méně silanolů, které navíc mohou být částečně stíněny. To vede k nízké retenci nortriptylinu na zwitteriontové a amidové fázi. Snížená interakce silanolů a dobrá hydrofilní selektivita těchto fází umožňuje lepší retenci neutrálních a kyselých látek. Výrazná změna v selektivitě mezi různými kolonami v HILIC je výhodou oproti metodám s obrácenými fázemi, ve kterých má tato výměna menší vliv na selektivitu [60].

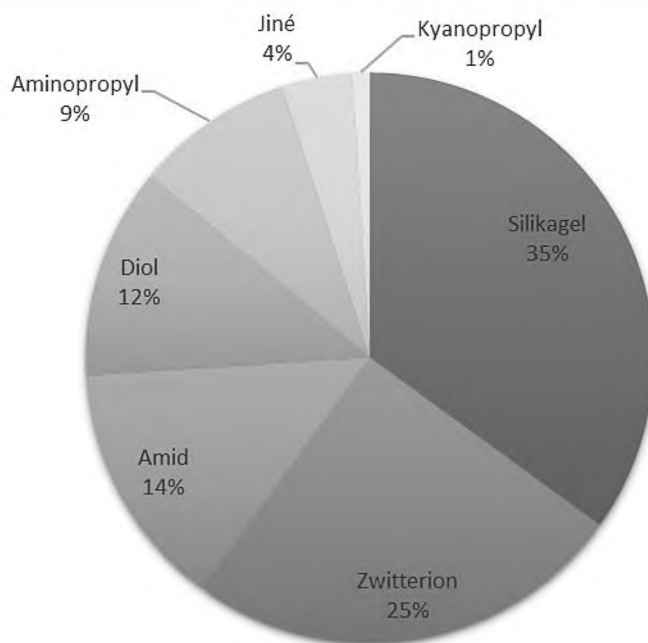


Obrázek 17 Selektivita různých stacionárních fází v HILIC [60]

Silikagel

Nemodifikovaný silikagel má určité výhody pro využití v HILIC ve srovnání s chemicky vázanými stacionárními fázemi, neboť nepodléhá „krvácení“ vázané fáze z kolony, a proto je také stále nejvíce využívanou stacionární fází (viz obrázek 18). Silikagel se dělí na tři typy, které se liší v čistotě v závislosti na technologii přípravy: typ A, B a C.

Typ A je připravován vysrážením z roztoků křemičitanů a je výrazně kontaminován kovy, což způsobuje silné zadržování či asymetrické píky. Typ B jsou vysoce čisté sférické částice silikagelu, které poskytují lepší separace. Tento typ je v HILIC nejčastěji používaným materiálem kolon a je stabilní při středním až vyšším pH. Silikagel s hydrosilovaným povrchem (typ C), který má na povrchu nepolární skupiny Si-H namísto Si-OH, je méně polární než jiné typy silikagelů a může být použit pro separaci kyselin nebo zásad v režimu NP-LC [65, 66].



Obrázek 18 Využití stacionárních fází v HILIC [67]

1.4.3 Mobilní fáze pro HILIC

Složení mobilní fáze pro HILIC chromatografii je v podstatě stejné jako v RP-LC. Dopad složení mobilní fáze na retenci HILIC se však výrazně liší od RP-LC. Mobilní fáze v RP-LC je více hydrofilní než stacionární fáze, ale méně než stacionární fáze v HILIC. Hydrofilní interakce včetně iontové výměny a vodíkových vazeb mezi analyty a stacionární fází jsou mnohem výraznější než v RP-LC [68].

Typická mobilní fáze v HILIC obsahuje polární organická rozpouštědla mísitelná s vodou, jako je acetonitril s malým množstvím vody. Lze však použít libovolné aprotické rozpouštědlo, které je mísitelné s vodou (např. tetrahydrofuran nebo dioxan). Řada autorů zkoumala účinek použití alkoholů, jako například methanol, ethanol a isopropanol, jako plnou či částečnou náhradu za acetonitril či vodu. Bylo ovšem prokázáno, že směsi methanolu a vody v HILIC selhávají, protože podobná afinita povrchu silikagelu k vodě a methanolu brání preferenční adsorpci a tvorbě vodné vrstvy. Acetonitril má také výhodu pro UV detekci, neboť v této oblasti neabsorbuje, a to i při nižších vlnových délkách. Výběr organického rozpouštědla významně ovlivňuje selektivitu separace analytů. Nejsilnějším parametrem ovlivňujícím selektivitu je hodnota pH [56, 57, 69].

V MF pro HILIC se využívá bohatého organického prostředí, obvykle 5-40 % vody nebo pufru. Obvykle jde o těkavý mravenčan amonný nebo octan amonný, pokud se využívá HILIC ve spojení s MS nebo aerosolový detektor nabitých částic (CAD). Tloušťka a složení

vodné vrstvy adsorbované na stacionární fázi má velký vliv na retenci. Obecně je vyžadováno minimálně 2 % pufované vody, aby se tato vodná vrstva vytvořila. [67, 70].

Pro volbu vhodného organického modifikátoru pro mobilní fázi se využívá eluotropická řada. Ta řadí rozpouštědla podle zvyšující se eluce. Síly rozpouštědel v HILIC lze přibližně seřadit takto: aceton < isopropanol ~ propanol < acetonitril < ethanol < dioxan < dimethylformamid ~ methanol < voda [57, 69]

Separace HILIC se provádí buď v izokratickém režimu s vysokým procentem acetonitrilu nebo s gradienty počínaje vysokou koncentrací acetonitrilu (s prahem 95 %), následování zvýšením koncentrace vody až o 50 % a nakonec návratem do výchozího stavu [70]

1.4.4 Výhody a nevýhody HILIC

Jednou z hlavních výhod je separace polárních a ionizovaných sloučenin. V běžné RP-LC jsou tyto látky velmi špatně zadržovány a jsou většinou eluovány v blízkosti mrtvého objemu. Pro měření těchto látek je tak nutná modifikace klasické RP-LC.

Mnoho výhod HILIC separace pramení z využití vysokých koncentrací acetonitrilu (obvykle 60-95 %) v mobilní fázi. Nízká viskozita mobilní fáze umožňuje použití dlouhých kolon nebo rychlý průtok s normální kolonou. Lze tedy dosáhnout zvýšení rychlosti analýz [60, 71,72].

Nízká viskozita, vysoká těkavost a nízké povrchové napětí vysokých koncentrací acetonitrilu vedou také k vyšší citlivosti v hmotnostní spektrometrii s ionizací elektrosprejem (ESI-MS). V průměru bylo dosaženo přibližně trojnásobného zvýšení citlivosti pro podmínky HILIC ve srovnání s podmínkami pro reverzní fázi [60].

HILIC má ovšem i řadu omezení. Kupříkladu nerozpustnost některých sloučenin ve vysokých koncentracích acetonitrilu. Vzorek tedy může být rozpuštěn v rozpouštědle s vyšší eluotropní silou, než má mobilní fáze (tzn. zvýšení koncentrace vody), ale tím se zhoršuje tvar píku. Tento účinek lze zmírnit dávkováním malých objemů, či rozpuštěním sloučenin s nízkou molekulovou hmotností v isopropylalkoholu (IPA) nebo směsi acetonu a IPA v poměru 50:50 (v/v). Použití slabšího rozpouštědla, pro zabránění zkreslení píku, u biofarmak nelze, kvůli možné denaturaci nebo srážení proteinů v mobilní fázi [60, 67, 71].

1.4.5 Některé aplikace HILIC

Ačkoliv chromatografie s normálními fázemi s vodnými eluenty je známa poměrně dlouhou dobu, pro aplikace HILIC trvalo překvapivě dlouhou dobu, než se uplatnila i mimo oblast analýzy sacharidů. Dnes je ovšem HILIC nepostradatelnou technikou pro analýzu

polárních a ionizovaných solutů a ve skutečnosti je upřednostňován i u vzorků přístupných pro analýzu RP-LC z důvodů příznivého spojení s MS a jinými detektory, jako je detektor UV, fluorescence, indexu lomu či aerosolový detektor nabitých částic [57, 58, 60].

Přednostně se tato metoda užívá v separaci aminokyselin a peptidů, ale své uplatnění nalézá i v separaci oligonukleotidů, složek nukleových kyselin a cukrů (oligo- či polysacharidů). Zároveň se ale využívá i pro měření nízkomolekulárních organických látek [55].

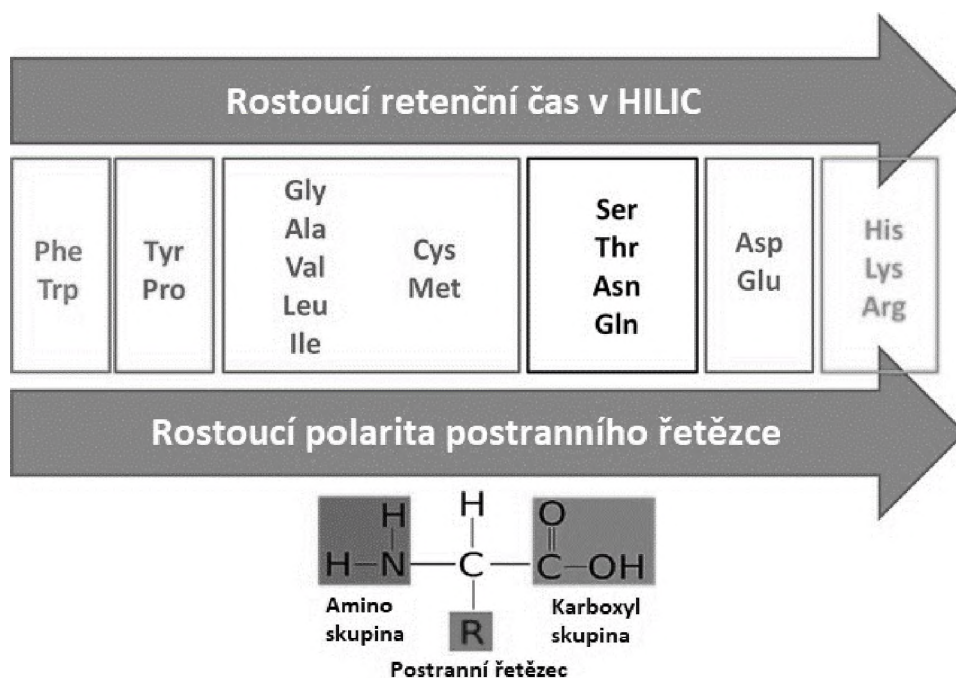
Bioanalýza a farmakokinetika

HILIC se užívá v moderním farmaceutickém vývoji, kde jsou účinné látky analyzovány ve velmi nízkých koncentracích. Mnoho moderních léčiv jsou vysoce polární sloučeniny a analýza pomocí RP-LC je pro ně nevhodná [58].

HILIC se etabloval jako základní technika pro monitorování glykanů v léčivech, monoklonálních protilátek (mAb), určených pro zacílení na specifické antigeny. Při charakterizaci mAb nebo jejich biologických podobností je nutné využít analytických metod. Asi 10 cukrů je běžně obsaženo v glykanech. *N*-glykany mohou být štěpeny z mAb a ty poté mohou reagovat například s 2-aminobenzaminem (2-AB) za vzniku fluorescenčních derivátů. Deriváty 2-AB jsou ovšem kvůli své špatné ionizační schopnosti obtížně detekovatelné v ESI-MS, proto byl nedávno navržen alternativní derivát, který má dobrou fluorescenční citlivost, ale i citlivost na ESI-MS. Tyto deriváty pak mohou být analyzovány s HILIC-MS [60]

Aminokyseliny a peptidy

Aminokyseliny jsou obecně látky kombinující hydrofilní, hydrofobní a iontové ligandy či strukturní znaky. Aminokyseliny jsou, stejně jako peptidy a proteiny, amfoterní látky. Mohou existovat v neutrální formě či jako slabá kyselina nebo báze, v závislosti na pH. Každá aminokyselina je ale odlišná od ostatních, což umožňuje jejich rozdělení výběrem vhodné stacionární a mobilní fáze, pH a gradientních podmínek. Očekávaná retence aminokyselin za podmínek HILIC je uvedena na obrázku 19 [73].



Obrázek 19 Očekávané pořadí eluce aminokyselin za podmínek HILIC, založené na fyzikálně-chemických vlastnostech postranního řetězce aminokyselin [73]

Antibiotika

Přítomnost reziduí antibiotik v environmentální vodě je velkým problémem jak pro vodní ekosystémy, tak pro veřejné zdraví, zejména z důvodu jejich potenciálu přispět k rozvoji mikroorganismů rezistentních na antimikrobiální látky. K monitorování polárních antibiotik v životním prostředí je HILIC užitečnou metodou [74].

Aminoglykosidová antibiotika jsou extrémně polární látky a nejsou účinně odděleny běžnými kolonami C18 v RP-LC. K oddělení hydrofilních sloučenin pomocí LC se obvykle využívá chromatografie iontových párů (IPC) či HILIC. Pro měření aminoglykosidů pomocí HILIC, musí být každý analyt ve formě jednoho iontu, aby se snížila asymetrie a chvostování píků. Toho lze dosáhnout úpravou pH [74].

Potraviny

Během posledních dvou desetiletí si HILIC získala popularitu pro separaci a analýzu mnoha sloučenin v oblasti potravin, včetně kontaminantů, toxických sloučenin a organických živin – nukleosidy, nukleotidy, kyseliny močové a kreatininu, aminokyselin, cholinů a jejich příbuzných sloučenin, sloučeniny s fosfolipidy, sacharidy, umělá sladidla a polyfenolické sloučeniny [75].

Příkladem novějších studií z oblasti potravin je rozdělení populárně konzumovaných lososů a pstruhů podle fosfolipidového profilu. Byl odhalen rozptyl těchto molekul mezi lososy

a pstruhy. Toto určení může být užitečné v budoucím identifikování druhu lososů a zabránit tak problému s nesprávným označením [76].

1.5 Stanovení paracetamolu a jeho metabolitů

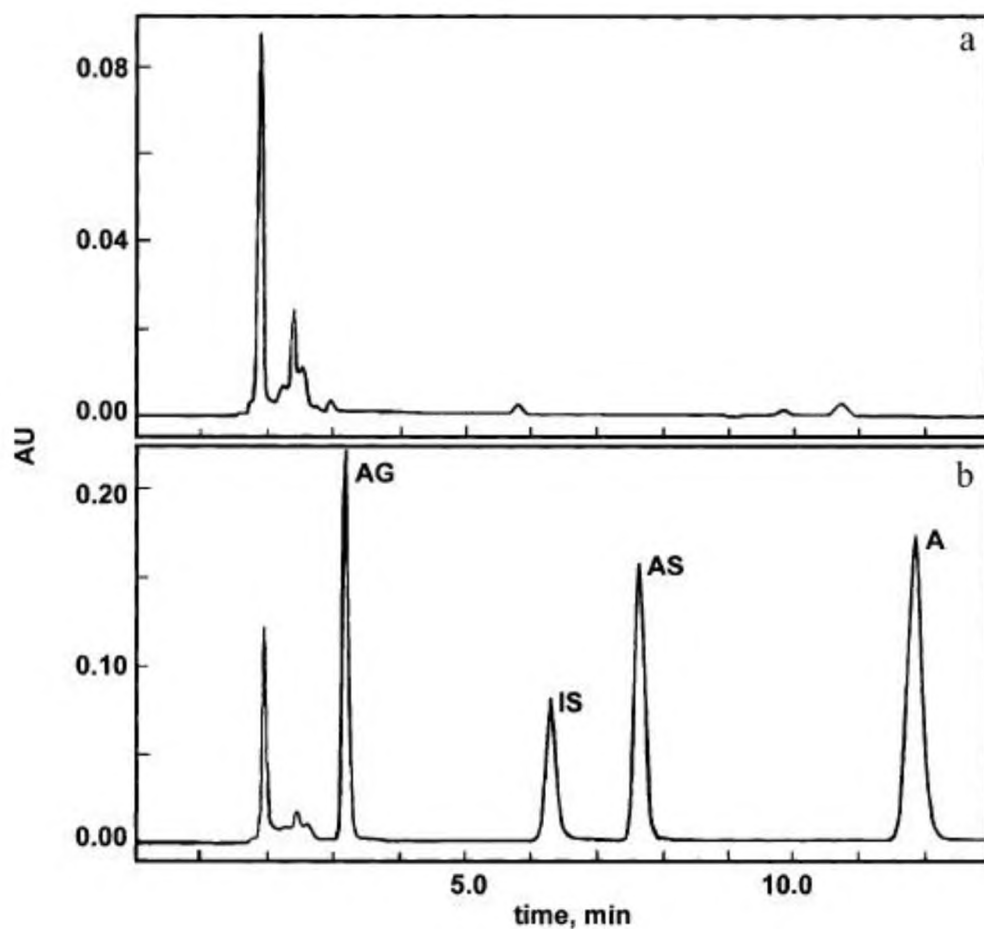
Potřeba klinické toxikologie vyžaduje rychlý, spolehlivý a vysoce specifický odhad APAP ve vzorcích plazmy, pro určení potřeby antidotové terapie. I proto je důležité vyvinout jednoduchou, levnou, citlivou a přesnou analytickou metodu pro stanovení paracetamolu. Pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů samostatně či ve směsích byla popsána řada metod včetně fluorescenční spektrometrie, voltametrie, kapilární elektroforézy, chromatografie na tenké vrstvě, kalorimetrie, micelární elektrokinetické chromatografie a imunologických testů. [77, 78].

1.5.1 Kapalinová chromatografie s UV detekcí

Pro kvantitativní analýzu APAP a jeho metabolitů bylo již popsáno velké množství metod, ale nejčastěji se využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí UV zářením (HPLC-UV). Není však snadné analyzovat pomocí UV detektoru několik metabolitů APAP současně vzhledem k jejich podobným strukturám a fyzikálně-chemickým vlastnostem. Proto se v tomto případě využívá také MS detekce, která je schopná selektivně analyzovat jednotlivé sloučeniny [79].

II. fáze biotransformace paracetamolu byla studována na vzorcích moči pacientů HIV +/-AIDS. Autoři Di Girolamo *et al.* vyvinuli metodu pro současné stanovení paracetamolu a jeho sulfátových a glukuronidových metabolitů s využitím HPLC/UV s možností přepínání vlnových délek. Separace byla provedena na C18 koloně s velikostí částic 5 μm . Jako mobilní fáze byl použit octanový pufr (pH 3,5) s acetonitrem modifikovaným 0,35 % kyselinou trifluoroctovou. Glukuronid a sulfát byly detekovány při 260 nm s retenčními časy 4,8 a 8,5 min a paracetamol byl detekován při 240 nm v retenčním čase 19 min [80].

V roce 2003 Vertzoni *et al.* optimalizovali a validovali metodu HPLC-UV s detekcí při 242 nm pro stanovení konjugátů APAP (A) a jeho hlavních metabolitů glukuronidu (AG) a sulfátu (AS) v králičí plazmě a moči po podání toxické dávky. Separace byla provedena na C18 koloně s velikostí částic 5 μm . Jako mobilní fáze byl použit 0,05 mol/l vodný pufovaný roztok KH_2PO_4 obsahující 1 % CH_3COOH a methanolu (pH 6,5). Jako interní standard byl použit m-aminofenol (IS). Na obrázku 20 lze vidět reprezentativní chromatogram plazmatického roztoku s obsahem paracetamolu (A), jeho metabolitů (AG, AS) a vnitřního standardu (IS) eluované při 11,9, 3,2, 7,8 a 6,3 minutách. Koncentrace standardů byly 50, 50, 50 a 20 mg/ml [81].



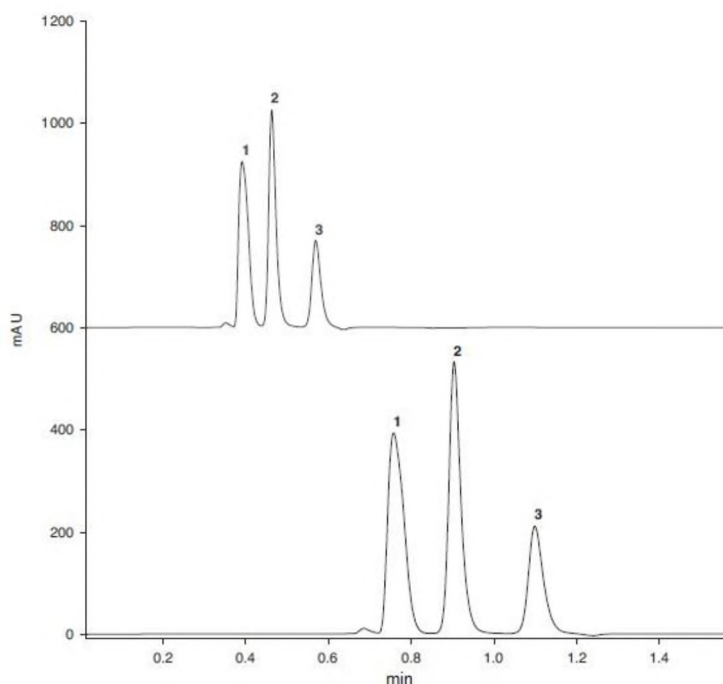
Obrázek 20 Chromatogramy plazmatického roztoku neobsahujícího (a) a obsahujícího (b) paracetamol a jeho metabolity [81]

V rešerši od Hanyšové, Kastnera a Klimeše z roku 2005 je uvedeno několik metod pro detekci oxidačních produktů 4-aminofenolu za pomoci HPLC-UV. Byly použity kolony Merckogel PGM a C1. Jako mobilní fáze sloužil fosfátový pufr (pH 6-7) a UV detekce probíhala při 280 nm [82].

Vzhledem k toxicitě NAPQI vyvinuli roku 2010 Flores-Pérez *et al.* jednoduchou, selektivní a spolehlivou metodu kvantifikace APAP a NAPQI s použitím 100 ml vzorku plazmy na RP-HPLC s UV detekcí. Byla použita C18 kolona a izokratická eluce směsí voda, methanol a kyselina mravenčí. Linearita metody byla v rozmezí 1-30 mg/ml pro APAP a 10-200 mg/ml pro NAPQI. Detekční limity byly stanoveny pro oba analyty na 0,1 mg/ml. Tato metoda může být využita pro stanovení hladiny APAP ve farmakokinetice či při monitorování léčiv v plazmě u dětí. Zároveň je tento test velmi vhodný pro detekci NAPQI při monitorování léčiv u pacientů s diagnózou intoxikace paracetamolem [83].

V roce 2012 vypracovala firma Thermo Fisher Scientific informační list na jejich urea-HILIC kolonu s velikostí částic 2,6 μm . Kolona byla využita na současné měření paracetamolu,

aspirinu a kyseliny salicylové. Jako mobilní fáze sloužili acetonitril, voda s přidavkem 100 mmol/l octanu amonného (pH = 4,9) a UV detekce probíhala při vlnové délce 230 nm. Na obrázku 21 je uveden chromatogram separace paracetamolu (1), kyseliny salicylové (2) a aspirinu (3) při dvou průtocích. Spodní chromatogram byl měřen při průtoku 300 μ l/min a vrchní chromatogram při průtoku 600 μ l/min. Tato analýza je velmi vhodná pro rychlou identifikaci při určení typu otravy těmito léčivými [84].



Obrázek 21 Chromatogram separace paracetamolu, kyseliny salicylové a aspirinu [84]

V roce 2013 publikovali Ali *et al.* článek popisující stanovení paracetamolu současně s hyoscin-*N*-butylbromidem pomocí RP-HPLC. Pro separaci byla použita C18 kolona (velikost částic 5 μ m) a jako mobilní fáze směs voda-methanol (50:50, v/v). Její pH bylo upraveno pomocí kyseliny trifluoroctové na 3,9. Pro detekci paracetamolu byla použita UV spektrofotometrie při 210 nm. Metoda byla úspěšně použita na stanovení APAP v rozmezí koncentrací 2,0-50,0 μ g/ml [85].

V publikaci z roku 2016 Babu *et al.* uvádí metodu RP-HPLC pro současné stanovení paracetamolu a cefiximu v králičí plazmě. Separace byla provedena na C18 koloně s velikostí částic 5 μ m a jako mobilní fáze byla použita směs fosfátového pufru (pH 6,4) a acetonitrilu v poměru 80:20 (v/v). Byla využita UV detekce při 245 nm [86].

Tabletová forma chlorfenamin maleátu, paracetamolu a kofeinu je volně prodejný lék běžně používaný k léčbě nachlazení a kašle. Proto roku 2016 Acheampong *et al.* vyvinuli metodu pro simultánní stanovení těchto látek pomocí RP-HPLC. Byla použita kolona C18

s velikostí částic 5 μm s izokratickou směsí methanolu a 0,05 mol/l pufru dibazického fosfátu (pH 4,0) v poměru 30:70 (v/v). Detekce byla provedena pomocí UV detektoru při vlnové délce 215 nm [87].

1.5.2 Kapalinná chromatografie s hmotnostní spektrometrií

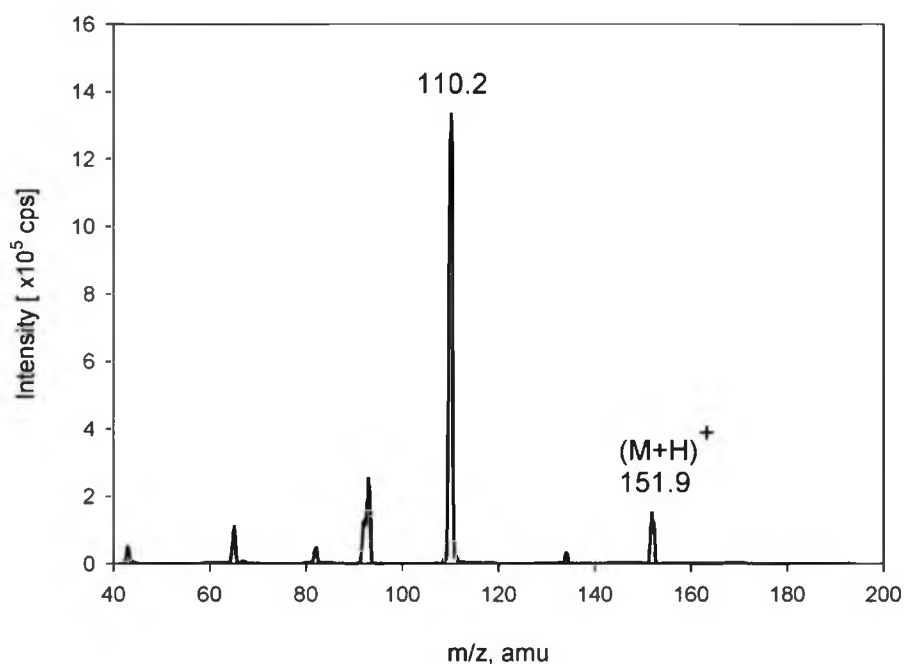
Kombinace dvou analgetik s komplementárními mechanismy účinku může zvýšit analgezií a současně snížit riziko nežádoucích účinků. V roce 2007 představili Zhu *et al.* metodu HPLC-ESI-MS pro současné stanovení paracetamolu a tramadolu v lidské plazmě. Separace proběhla na kyano-silikagelové koloně s velikostí částic 5 μm s mobilní fází 10 mmol/l octanového pufru a 0,5 % kyseliny mravenčí a methanolu (40:60, v/v). Analyty byly stanoveny pomocí ionizace elektrosprejem s kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem v pozitivním režimu SIM (selected ion monitoring). Experimentální výsledky prokázaly, že přidavkem kyseliny mravenčí byla zvýšena citlivost MS vůči analytům a jejich retenční časy se zkrátily. Tato metoda byla využita ke studiu farmakokinetiky nového složení tablety tramadolu s paracetamolem [88].

Další častou kombinací v tabletové formě je paracetamol s aceklofenakem. Používá se u dospělých na akutní bolestivé stavy pro úlevu od onemocnění souvisejících s bolestí a zánětem jako je osteoporóza, revmatoidní artritida, bolest dolních zad, bolest zubů či angína. Široce rozšířené použití tohoto kombinovaného farmaceutického produktu vedlo Khan *et al.* k vývoji analytické metody pro současné stanovení obou složek. Byla vyvinuta metoda UHPLC (ultra-high performance liquid chromatography) s hmotnostní spektrometrií pro separaci a stanovení aceklofenaku, paracetamolu a jejich hlavních produktů rozkladu (diklofenak a *p*-aminofenol). Pro separaci byla využita C18 UHPLC kolona s velikostí částic 1,7 μm za použití izokratické mobilní fáze sestávající z acetonitrilu a 2 mmol/l octanu amonného (40:60, v/v). Jako hmotnostní analyzátor byl využit kvadrupól s analyzátozem doby letu (Q-TOF) v pozitivním režimu. Metoda může být použita pro analýzy kontroly kvality pro sledování hladiny degradačních produktů ve volně uložených léčivech či ve farmaceutických formulacích [89].

Vzhledem k omezenému množství informací o farmakokinetice paracetamolu a dalších léčiv u předčasně narozených dětí, byl roku 2008 vyvinut Zhangem *et al.* test LC-MS/MS pro současné stanovení paracetamolu, kofeinu, felytoinu, rantidinu a theofylinu v malém objemu lidské plazmy. Ve vzorku plazmy byly nejprve sraženy methanolem proteiny a byl přidán vnitřní standard. Poté byl vzorek separován na koloně C18 s velikostí částic 3 μm s gradientovou elucí za použití směsi vody a methanolu jako mobilní fáze s přidavkem kyseliny

mravenčí. Detekce byla prováděna pomocí MS s ionizací elektrosprejem a trojitým kvadrupólem. Všechny analýzy byly provedeny v režimu MRM (multiple reaction monitoring). Na obrázek 22 lze vidět MS/MS produktové spektrum paracetamolu [90].

Ve studii z roku 2012 byla představena metoda tandemové MS pro zvýšení přesnosti analýzy z důvodu přítomnosti iontů analytu i jeho specifických fragmentů. Pomocí metody LC-MS/MS byl kvantifikován APAP a jeho šest hlavních metabolitů v plazmě potkanů. Tato metoda poskytovala výsledky s vysokou citlivostí v řádech ng/ml. Analyty byly separovány na C18 koloně s velikostí částic 5 μm a měřeny pomocí MS s trojitým kvadrupólem. Mobilní fáze byla složena z 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě a acetonitrilu [79].



Obrázek 22 MS/MS spektrum paracetamolu [90]

Několik studií prokázalo korelaci koncentrace APAP-CYS v plazmatické a jaterní toxicitě APAP. Koncentrace proteinu APAP-CYS v plazmě může být tedy měřena při diagnostice předávkování jako specifický biomarker pro stanovení expozice a toxicity APAP. Proto byla v roce 2013 Hairinem *et al.* vyvinuta a validována metoda LC-MS/MS pro stanovení APAP-CYS v lidské plazmě, která byla prokázána jako rychlá, citlivá a reprodukovatelná. Na chromatografickou separaci byla použita C18 kolona (velikost částic 3 μm). Mobilní fáze sestávala z mravenčanu amonného ve vodě a v acetonitrilu. Jako analyzátor byl použit trojitý kvadrupól s ionizací elektrosprejem v režimu MRM. Tato metoda byla úspěšně využita v předběžné klinické studii ke stanovení koncentrace APAP-CYS u 46 pacientů předávkovaných paracetamolem [91].

V roce 2013 vyvinuli Česla *et al.* metodu LC-MS/MS pro stanovení dvou metabolitů paracetamolu – acetaminofen-glutathion a acetaminofen-cystein. Byla použita C18 kolona (velikost částic 2,6 μm) s gradientovou elucí methanol-voda. Pro identifikaci a kvantifikaci metabolitů byla využita tandemová QTRAP MS s ionizací elektrosprejem v režimu MRM. Podmínky detekce byly optimalizovány přímým vstříkáním standardů do hmotnostního spektrometru (viz tabulka 2) [28].

Tabulka 2 Optimalizované podmínky pro MS/MS detekci APAP a jeho dvou metabolitů [28]

	APAP	APAP-SG	APAP-CYS
MRM přechod	152,0/109,9	454,9/271,9	271,0/140,0
Režim polaritý	pozitivní	negativní	pozitivní
Deklasterační potenciál, DP [V]	71	-65	62
Kolizní energie, CE [V]	21	-22	33
Výstupní potenciál kolizní cely, CXP [V]	8	-9	10
Dwell time [ms]	100	100	100

Paracetamol je častým kontaminantem povrchové vody a z nich se odstraňuje pomocí mykoremediace. Cílem studie Esterhuizen-Londta *et al.* bylo vyvinout metodu pro stanovení paracetamolu pomocí LC-MS/MS ve vodní houbě *Mucor hiemalis* a tuto metodu poté použít k vyhodnocení schopnosti vychytávání paracetamolu. Analýza byla prováděna na C18 koloně (velikost částic 2,6 μm) a na hmotnostním spektrometru s ionizací elektrosprejem a trojitým kvadrupólem. Jako mobilní fáze byla použita voda a methanol, oba obsahující přídavek kyseliny mravenčí. Výsledkem byla robustní, citlivá a reprodukovatelná metoda s dolní mezí kvantifikace 5 pg paracetamolu v koloně. Navíc bylo zjištěno, že *M. hiemalis* absorbuje paracetamol a je tedy považován za vhodného kandidáta pro další studie [92].

I přestože paracetamol i jeho metabolity jsou polární látky, v literatuře se vyskytuje pouze omezené množství prací, které se zabývají jejich měření pomocí HILIC. Proto bylo cílem této diplomové práce ověření možnosti této separace.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité přístroje a chemikálie

Přístroje:

- kapalinový chromatograf Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA),
- binární čerpadlo (Agilent 1200, G1312B),
- autosampler (Agilent 1200, G1367C),
- termostat kolon (Agilent 1200, G1316B),
- UV detektor s proměnou vlnovou délkou (Agilent 1200, DAD, G1315C)
- hmotnostní spektrometr SCIEX QRAP 4500 (AB Sciex, Framingham USA)
- UV-VIS spektrofotometr Shimadzu UV-2600 (Kyoto, Japonsko)
- analytické váhy Sartorius (Sartorex, spol. s.r.o., Ústí nad Labem ČR),
- ultrazvuková lázeň.

Chromatografické kolony:

- kolona Luna 3 μm HILIC 200 Å, 150 mm \times 3 mm (Phenomenex, California, USA),
- kolona Luna 3 μm NH2 100 Å, 150 mm \times 2 mm (Phenomenex, California, USA),
- kolona Ascentis Express OH5 HPLC, 10 cm \times 2,1 mm \times 2,7 μm (Supleco analytical products, Bellefonte, USA),
- kolona Ascentis Express ES-CN HPLC, 10 cm \times 2,1 mm \times 2,7 μm (Supleco analytical products, Bellefonte, USA).

Chemikálie:

- acenaften (čistota 99 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA),
- acetonitril (gradient grade for liquid chromatography, LiChrosolv, Darmstadt, Germany),
- APAP (Merck, USA),
- APAP-CYS (Ratiochem, ČR),
- APAP-NAC (Ratiochem, ČR),
- APAP-SG (Ratiochem, ČR),
- kyselina mravenčí (čistota > 98,0 %, Honeywell International, North Carolina, US),
- kyselina octová (čistota \geq 99 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA),
- mravenčan amonný (čistota \geq 99 %, Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA),
- octan amonný (čistota \geq 98 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

2.2 Podmínky HILIC separace s UV-VIS detektorem pro analýzu paracetamolu a jeho metabolitů

Příprava vzorků:

Malé množství pevného vzorku bylo rozpuštěno v 1,5 ml acetonitrilu. Takto byl připraven vzorek APAP, APAP-SG, APAP-CYS, APAP-NAC a acenaften. Vzorek APAP byl rozpuštěn také v 1,5 ml vody pro možnost porovnání separace. Takto připravené vzorky se využívaly k měření za podmínek HILIC.

Podmínky pro analýzu paracetamolu a jeho metabolitů:

Veškeré analýzy probíhaly při průtokové rychlosti 0,2 ml/min. Termostat byl nastaven na 30 °C a pro UV detekci byly zvoleny vlnové délky 200, 220 a 243 nm. Objem vstříkovaného vzorku byl 2 µl.

2.3 Optimalizace metody pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů

Postup:

Pro stanovení paracetamolu a jeho metabolitů bylo využito vysokoúčinného kapalinového chromatografu Agilent 1200 v podmínkách pro HILIC separaci s UV detektorem s proměnnou vlnovou délkou. Stanovení bylo provedeno na čtyřech různých kolonách uvedených výše. Součástí HPLC systému byly dvě pumpy, kolonový termostat a autosampler. Byla provedena izokratická i gradientová eluce.

Volba mobilní fáze:

Jako mobilní fáze byly použity acetonitril a voda s přidavkem aditiv. Zvolená aditiva byla 0,1 % kyseliny mravenčí, 0,1 % kyseliny octové, 10 mmol/l mravenčanu amonného, 10 mmol/l octanu amonného a 20 mmol/l octanu amonného.

Tyto mobilní fáze byly na základě retenčních charakteristik separovaných látek porovnávány a nejvhodnější směsí byl určen 20 mmol/l octan amonný.

Příprava mobilní fáze:

Na izokratickou analýzu byly jako mobilní fáze připraveny roztoky 20 mmol/l octanu amonného v acetonitrilu a vodě. Procenta acetonitrilu činila 90, 95, 96, 97, 98 a 99 %. Na gradientovou eluci byly připraveny roztoky 20 mmol/l octanu amonného v acetonitrilu a vodě 80:20 (v/v, mobilní fáze B) a 20 mmol/l octanu amonného v acetonitrilu a vodě 98:2 (v/v, mobilní fáze A). Podmínky gradientové eluce jsou uvedeny v tabulce 3.

Volba vhodné chromatografické kolony:

Na základě retenčních charakteristik byla zvolena vhodná stacionární fáze pro izokratické rozdělení vzorků. Byly použity čtyři kolony s rozdílnou stacionární fází: silikagelová kolona Luna HILIC 200 Å (150 mm × 3 mm × 3 µm), aminopropylsilikagelová kolona Luna NH2 100 Å, (150 mm × 2 mm × 3µm), diolová kolona Ascentis Express OH5 HPLC (10 cm × 2,1 mm × 2,7 µm) a nitrilová kolona Ascentis Express ES-CN HPLC (10 cm × 2,1 mm × 2,7 µm). U všech kolon byla provedena izokratická eluce jednotlivých vzorků. Nejlepší retenční charakteristiky vykazovala diolová kolona. U této kolony byla poté změřena gradientová eluce směsi paracetamolu a jeho metabolitů podle tabulky 3.

2.4 Podmínky HILIC separace s hmotnostním spektrometrem pro analýzu paracetamolu a jeho metabolitů

Podmínky pro analýzu paracetamolu a jeho metabolitů:

Pro paracetamol a jeho metabolity byla dále změřena lineární gradientová eluce na HPLC/UV/MS, která probíhala na diolové koloně Ascentis Express OH5. Dávkovaný objem vzorku byl 2,0 µl. Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a vody (80:20, v/v) s přídavkem 20 mmol/l octanu amonného (mobilní fáze B) a acetonitril a voda (98:2, v/v) s přídavkem 20 mmol/l octanu amonného (mobilní fáze A). Průtok mobilní fáze byl 0,2 ml/min a teplota kolony byla 30 °C. Detekce na UV-VIS spektrometru probíhala při 243 nm. Pro gradientovou eluci byla zvolena časová rozpětí: 5, 10, 15 a 20 min. V tabulce 3 jsou uvedeny parametry gradientové eluce:

Tabulka 3 Podmínky lineární gradientové eluce pro separaci paracetamolu a jeho metabolitů

	% B	čas [min]
Gradient 1	0 % B	0
	100 % B	20
Gradient 2	0 % B	0
	100 % B	15
Gradient 3	0 % B	0
	100 % B	10
Gradient 4	0 % B	0
	100 % B	5

Hmotnostní spektrometrie probíhala v režimu lineární iontové pasti (Enhanced MS) s ionizací elektrosprejem při napětí 4500/-4500 V (pozitiv/negativ) pro kladné i záporné ionty. Vstupní potenciál (EP) 10/-10 V, deklasterační potenciál (DP) 50/-50 V a kolizní energie (CE) 10/-10 V. Detekované rozmezí spektra bylo 100 – 500 m/z. Průtoky plynů byly curtain gas 20 p.s.i., GS1 40 a GS2 50 (teplota 200 °C).

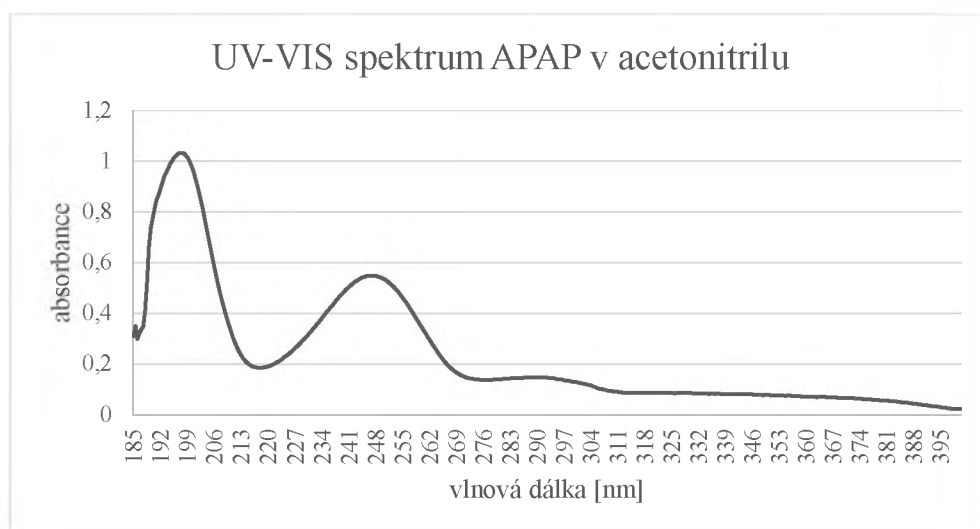
3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Byly ověřeny možnosti analýzy paracetamolu a jeho metabolitů pomocí HILIC chromatografie na základě jejich retenčního chování v pěti různých mobilních fázích na čtyřech různých kolonách uvedených výše. Před separacemi metabolitů byly ověřeny možnosti jejich detekce.

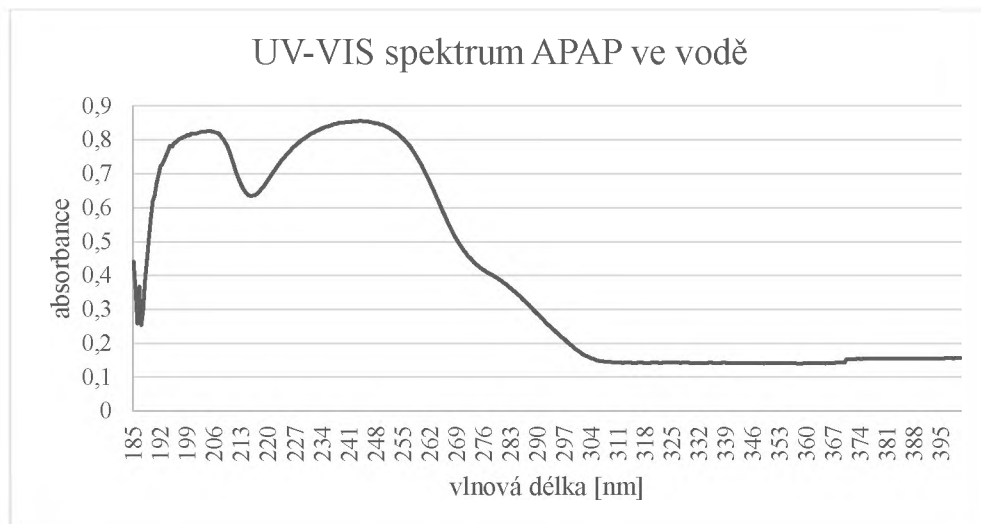
3.1 UV-VIS spektra

Paracetamol a jeho metabolity byly nejprve změřeny na UV-VIS spektrofotometru (Shimadzu UV-2600), abychom zjistili, při jakých vlnových délkách je nejvhodnější jejich detekce. Vzorky byly připraveny v acetonitrilu a zároveň byl acetonitril použit ve srovnávací kvetě. Vzorek APAP byl pro srovnání proměřen také ve vodě.

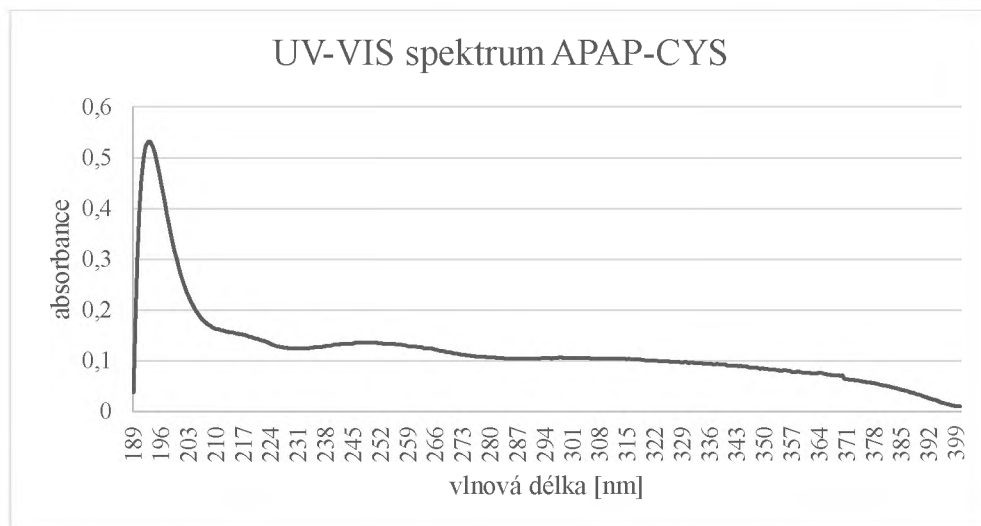
Z grafů na obrázek 23 až 27 byly zvoleny tři vlnové délky pro detekci 200, 220 a 243 nm.



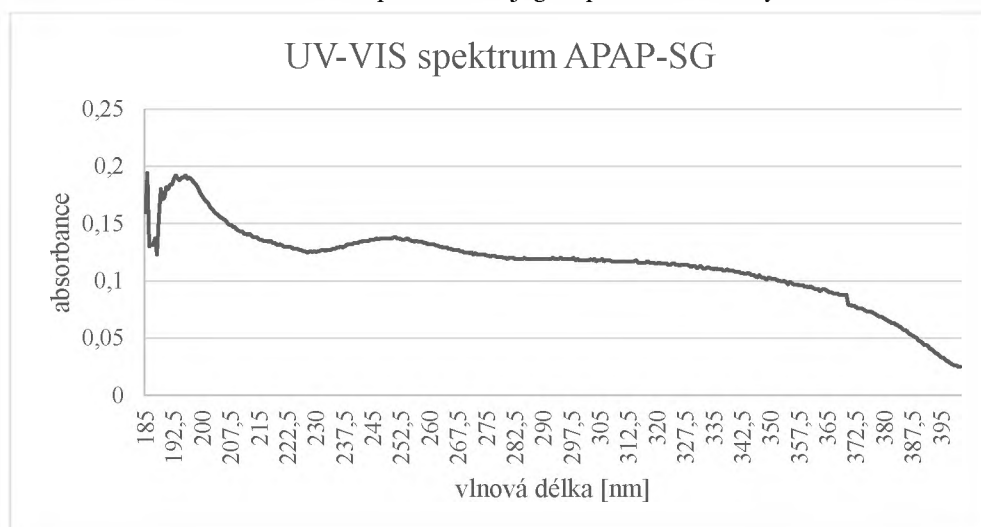
Obrázek 23 UV-vis spektrum paracetamolu v acetonitrilu



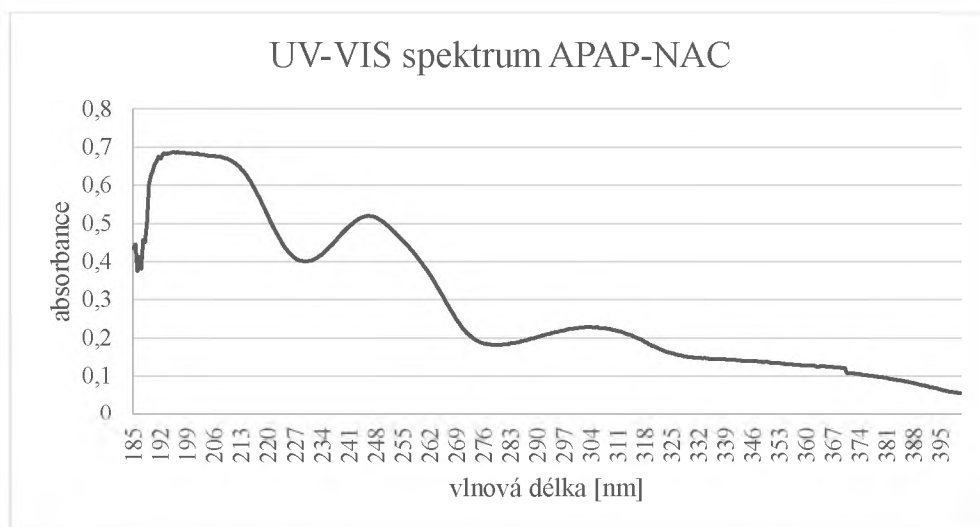
Obrázek 24 UV-VIS spektrum paracetamolu ve vodě



Obrázek 25 UV-VIS spektrum konjugátu paracetamolu s cysteinem



Obrázek 26 UV-VIS spektrum konjugátu paracetamolu s glutathionem



Obrázek 27 UV-VIS spektrum konjugátu paracetamolu s N-acetylcysteinem

Z obrázku 23 a 24 je patrná výrazná změna absorbance paracetamolu v různých rozpouštědlech. U APAP-CYS (obrázek 25) a APAP-SG (obrázek 26) je nejvyšší absorbance převážně u 200 nm. Ve vyšších vlnových délkách již absorbuje jen nepatrně. APAP-NAC (obrázek 27) se svými absorpčními maximy velmi podobá samotnému APAP v acetonitrilu, absorpce je ovšem vyšší, než byla u APAP. Absorpční maxima u všech měřených látek byla kolem 200 nm, druhá výrazná absorbance se u některých látek nacházela u 243 nm. Tyto vlnové délky byly zvoleny jako detekční vlnové délky u separace paracetamolu a jeho metabolitů.

3.2 Vývoj podmínek pro HILIC separaci s UV-VIS detekcí

3.2.1 Izokratická eluce paracetamolu a jeho metabolitů

Byly vyzkoušeny čtyři kolony pro HILIC separaci s různými stacionárními fázemi uvedeny výše. Veškeré studie byly provedeny tak, že se nejprve proměřilo izokratické retenční chování paracetamolu a jeho metabolitů v sérii mobilních fází a byly zjištěny retenční časy. Pro změření mrtvého objemu byl použit acenaften, který je nepolární a v HILIC se nezadržuje.

Z retenčních časů paracetamolu a jeho metabolitů a času acenaftenu jako markeru mrtvého objemu byly přepočítány na retenční faktory k :

$$k = \frac{t_R}{t_0} - 1 \quad (2)$$

Takto upravená data byla zlogaritmována a vložena do grafu v závislosti $\ln k$ na $\ln \varphi_{H_2O}$ (viz příloha 1 až 88). Z těchto grafů byly spočítány směrnice, úseky, jejich směrodatné odchylky a koeficient determinace (viz příloha 12, 24, 36, 47, 59, 69, 80 a 89). Podle rovnice 3:

$$\ln k = a - m \cdot \ln \varphi_{H_2O} \quad (3)$$

kde φ_{H_2O} – koncentrace vody v systému, m – poměr plochy na stacionární fázi zabírané molekulou analytu ku molekulám vody, a – retenční faktor analytu ve slabším rozpouštědle (acetonitril).

U nitrilové kolony je patrné, že měla velmi nízkou retenci látek a v některých případech se látky z kolony eluovaly dříve než mrtvý objem (viz příloha 81 až 86). Při určitém složení mobilní fáze se také u dalších kolon projevila velmi nízká retence a model lineární regrese měl velmi malý koeficient determinace, proto u některých měřených SF nejsou uvedeny všechny analyzované látky.

Eluce některých látek před mrtvým objemem kolny může souviset s elektrostatickým odpuzováním mezi záporně nabitou stacionární fází a ionizovanými analyty. Tuto hypotézu potvrzují analýzy v mobilních fázích s kyselými aditivami (kyselina octová a kyselina mravenčí), kdy k eluci před mrtvým objemem nedocházelo (pravděpodobně díky potlačení ionizace).

Na první zvolené koloně (silikagelové), byly nejprve přeměřeny mobilní fáze acetonitril a voda s přidavkem 0,1 % (v/v) kyseliny mravenčí a poté s přidavkem 0,1 % (v/v) kyseliny octové (viz příloha 1 až 6; příloha 25 až 30). Bohužel se při nízkých koncentracích vody mobilní fáze velmi špatně míchaly a muselo se proto měření zopakovat s předmíchanými MF. I přes toto zlepšení nevykazovala ani jedna ze zvolených MF dobrou retenci látek, a proto se v dalších měřených kolonách tato mobilní fáze již nepřipravovala.

Dalšími aditivami k acetonitrilu a vodě byly zvoleny 10 mmol/l mravenčan amonný a octan amonný. Mravenčan amonný se ovšem rozpouštěl pouze v 10% roztoku vody s acetonitrilem. Při nižších koncentracích vody se již nerozpouštěl a nemohl se proto využít na další měření.

Pro mobilní fáze s octanem amonným byla zjištěna poměrně dobrá retence pro samotný APAP, ale u některých metabolitů APAP retence nebyla příliš vysoká. Proto bylo zvýšeno množství aditiva z 10 mmol/l na 20 mmol/l octanu amonného. Takto zvolená MF vykazovala lepší výsledky měření, obzvláště pro APAP-NAC, který se v OH5 koloně ve většině různých koncentrací vody zadržoval velmi dobře (viz obrázek 30).

Nejllepší separace bylo dosaženo za pomoci kolony Ascentis Express OH5 HPLC s mobilní fází acetonitrilu a vody s 20 mmol/l octanu amonného (viz tabulka 4 až 10; obrázek 28 až 32).

Tabulka 4 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (90:10, v/v) s 20 mmol/l octanu amonného

kolona OH5	90 % AcN + 10 % H ₂ O + 20 mM CH ₃ COONH ₄					
	t(R)1	t(R)2	t(R)3	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	<i>ln k</i>
Acenaften (t(M))	1,04	1,04	1,04	1,04		
APAP (AcN)	1,32	1,33	1,33	1,32	0,272	-1,300
APAP (H ₂ O)	1,30	1,30	1,31	1,30	0,253	-1,376
APAP-NAC	10,00	10,83	10,02	10,28	8,877	2,184
APAP-CYS	1,33	1,32	1,32	1,32	0,272	-1,304
APAP-SG	1,32	1,32	1,32	1,32	0,270	-1,308

Tabulka 5 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (95:5, v/v) s 20 mmol/l octanu amonného

kolona OH5	95 % AcN + 5 % H ₂ O + 20 mM CH ₃ COONH ₄					
	t(R)1	t(R)2	t(R)3	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	<i>ln k</i>
Acenaften (t(M))	1,10	1,08	1,08	1,09		
APAP (AcN)	1,54	1,54	1,54	1,54	0,415	-0,879
APAP (H ₂ O)	1,52	1,52	1,52	1,52	0,398	-0,921
APAP-NAC	55,87	56,12	56,10	56,03	50,577	3,924
APAP-CYS	1,53	1,54	1,54	1,54	0,415	-0,878
APAP-SG	1,54	1,54	1,54	1,54	0,415	-0,879

Tabulka 6 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (96:4 v/v) s 20 mmol/l octanu amonného

kolona OH5	96 % AcN + 4 % H ₂ O + 20 mM CH ₃ COONH ₄					
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)		retenční faktor <i>k</i>	<i>ln k</i>
Acenaften (t(M))	1,08	1,08	1,08			
APAP (AcN)	1,60	1,61	1,60		0,488	-0,717
APAP (H ₂ O)	1,59	1,59	1,59		0,475	-0,744
APAP-NAC	83,60	85,41	84,51		77,427	4,349
APAP-CYS	1,61	1,62	1,62		0,499	-0,695
APAP-SG	1,61	1,61	1,61		0,497	-0,699

Tabulka 7 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (97:3 v/v) s 20 mmol/l octanu amonného

kolona OH5	97 % AcN + 3 % H ₂ O + 20 mM CH ₃ COONH ₄					
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)		retenční faktor <i>k</i>	<i>ln k</i>
Acenaften (t(M))	1,12	1,11	1,11			
APAP (AcN)	1,77	1,77	1,77		0,587	-0,532
APAP (H ₂ O)	1,74	1,73	1,73		0,558	-0,584
APAP-NAC	41,39	41,40	41,40		36,177	3,588
APAP-CYS	1,79	1,79	1,79		0,603	-0,506
APAP-SG	1,77	1,77	1,77		0,590	-0,528

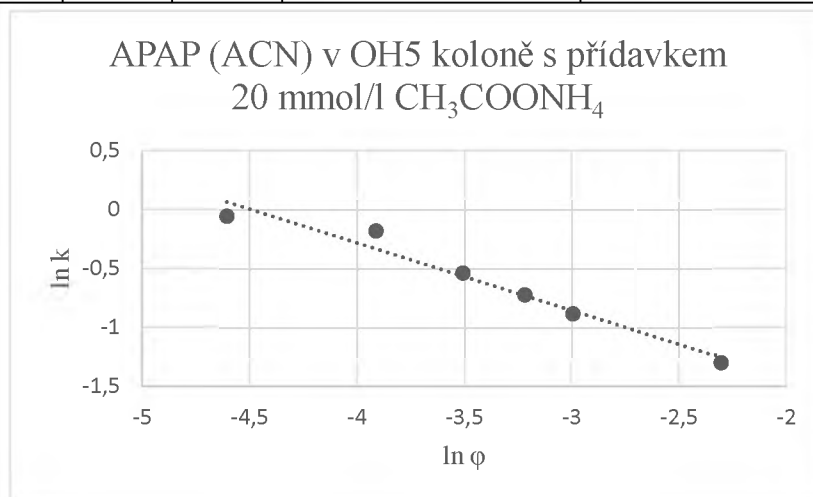
Tabulka 8 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (98:2 v/v) s 20 mmol/l octanu amonného

kolona OH5	98 % AcN + 2 % H ₂ O + 20 mM CH ₃ COONH ₄					
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)		retenční faktor <i>k</i>	<i>ln k</i>
Acenaften (t(M))	1,12	1,12	1,12			
APAP (AcN)	2,05	2,05	2,05		0,84	-0,18

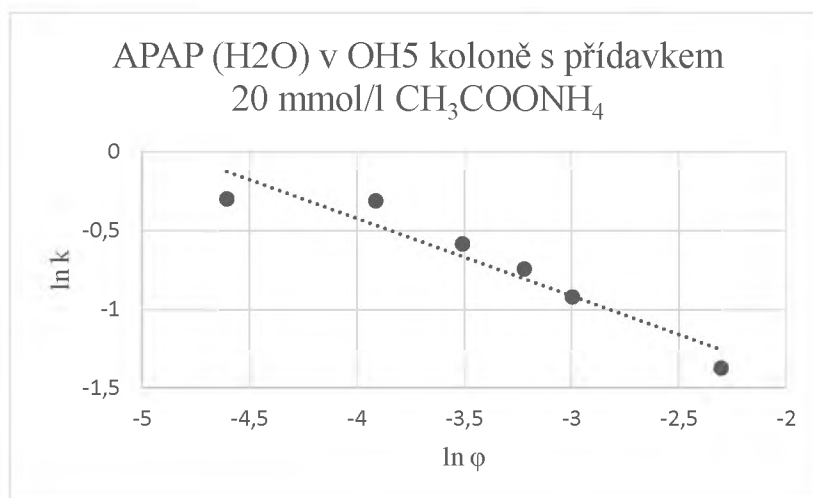
kolona OH5	98 % AcN + 2 % H ₂ O + 20 mM CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
APAP (H ₂ O)	1,94	1,93	1,93	0,73	-0,31
APAP-NAC	2,86	2,86	2,86	1,56	0,44
APAP-CYS	2,03	2,03	2,03	0,82	-0,20
APAP-SG	1,99	1,99	1,99	0,78	-0,25

Tabulka 9 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (99:1 v/v) s 20 mmol/l octanu amonného

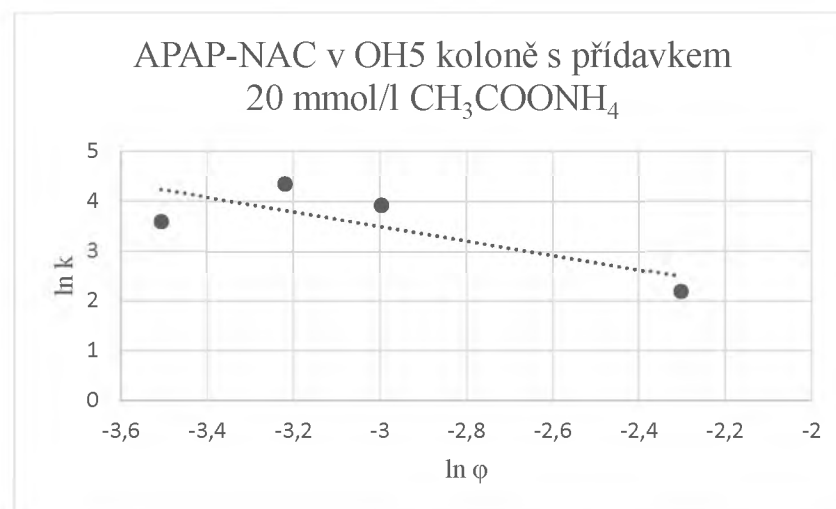
kolona OH5	99 % AcN + 1 % H ₂ O + 20 mM CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,14	1,13	1,14		
APAP (AcN)	2,20	2,22	2,21	0,95	-0,05
APAP (H ₂ O)	1,98	1,97	1,98	0,74	-0,30
APAP-NAC	1,93	1,95	1,94	0,71	-0,34
APAP-CYS	2,24	2,24	2,24	0,97	-0,03
APAP-SG	2,22	2,22	2,22	0,96	-0,05



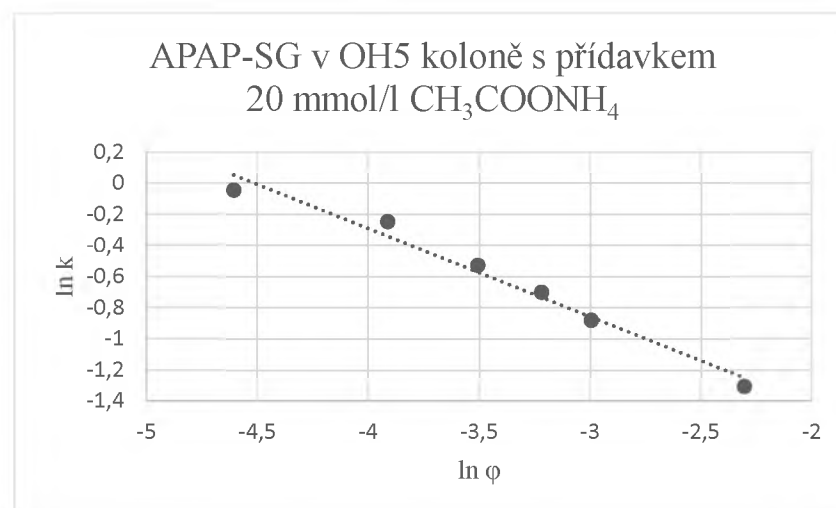
Obrázek 28 Graf závislosti APAP v acetonitrilu ln *k* na ln φ na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 20 mmol/l octanu amonného



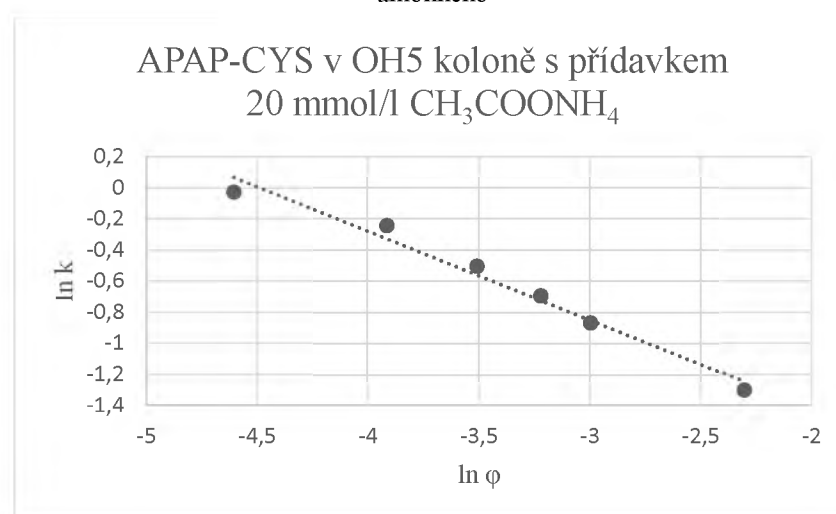
Obrázek 29 Graf závislosti APAP ve vodě ln *k* na ln φ na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 20 mmol/l octanu amonného



Obrázek 30 Graf závislosti APAP-NAC $\ln k$ na $\ln \phi$ na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 20 mmol/l octanu amonného



Obrázek 31 Graf závislosti APAP-CYS $\ln k$ na $\ln \phi$ na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 20 mmol/l octanu amonného

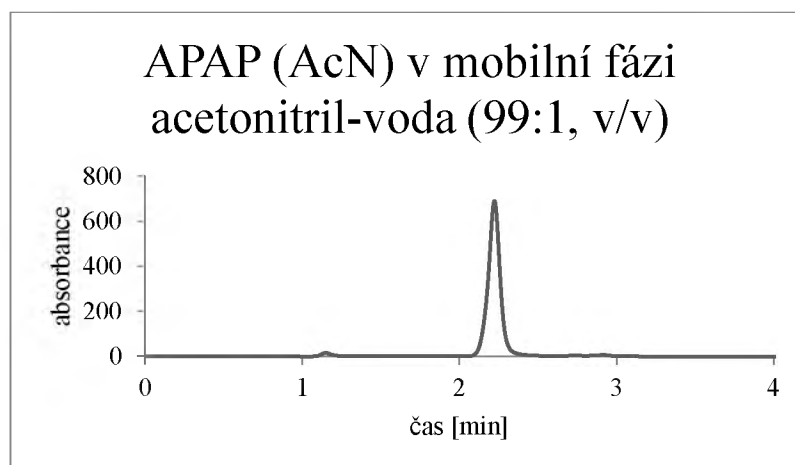


Obrázek 32 Graf závislosti APAP-SG $\ln k$ na $\ln \phi$ na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 20 mmol/l octanu amonného

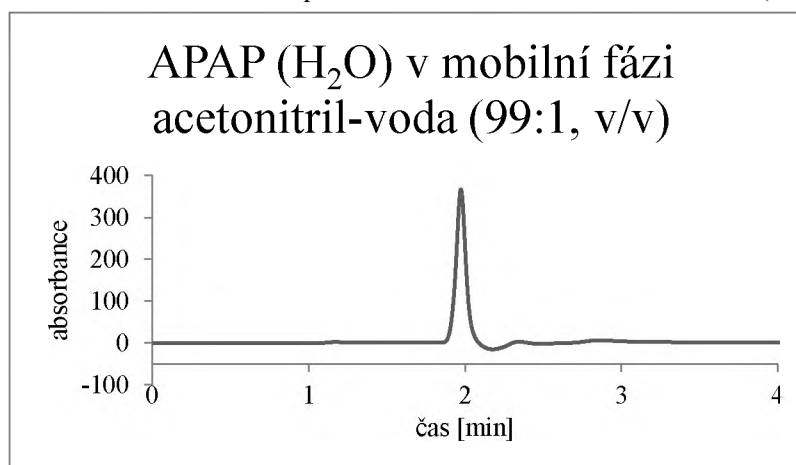
Tabulka 10 Hodnoty lineární regrese pro retenci paracetamolu a jeho metabolitů v mobilní fázi acetonitril a voda s 20 mmol/l octanu amonného u diolové kolony

	Úsek	Směrodatná odchylka úseku	Směrnice	Směrodatná odchylka směrnice	Koeficient determinace
APAP (AcN)	-1,680	0,168	-4,448	0,124	0,962
APAP (H₂O)	-1,844	0,299	-4,725	0,239	0,905
APAP-NAC	-0,434	0,235	-1,482	0,849	0,630
APAP-CYS	-1,717	0,130	-4,468	0,096	0,978
APAP-SG	-1,724	0,136	-4,488	0,101	0,976

Pro porovnání jsou na obrázku 33 a 34 zobrazeny chromatogramy APAP v acetonitrilu a ve vodě při 243 nm při izokratické separaci v mobilní fázi acetonitril-voda (99:1, v/v) s přidavkem 20 mmol/l octanu amonného. Retenční čas APAP v acetonitrilu byl 2,23 min a retenční čas APAP ve vodě byl pouze 1,074 min. Je tedy patrné, že APAP (AcN) se na koloně zdržoval déle, než APAP (H₂O). Zároveň je na chromatogramu APAP (H₂O) patrný následný propad v absorbanci v zakončení píku. Tento problém by mohl být patrnější u reálných vzorků, které budou s největší pravděpodobností měřeny ve vodném prostředí.



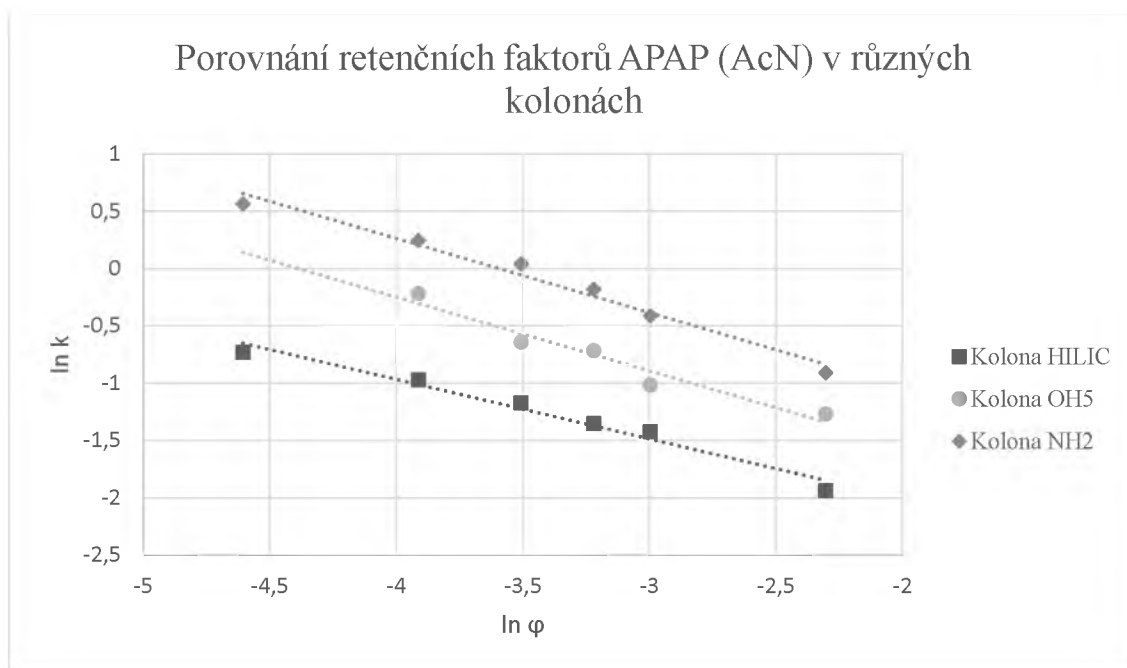
Obrázek 33 APAP v acetonitrilu při 243 nm v mobilní fázi acetonitril-voda (99:1, v/v)



Obrázek 34 APAP ve vodě při 243 nm v mobilní fázi acetonitril-voda (99:1, v/v)

Na obrázku 35 je graf porovnávající retenci paracetamolu v acetonitrilu v mobilní fázi acetonitril a voda s 10 mmol/l octanem amonným na vybraných kolonách. Z grafu je patrné, že je retence APAP na kolonách velmi podobná. Nejlepší retenci zároveň vykazuje aminopropylsilikagelová kolona, ta měla ovšem velmi slabou retenci u metabolitů paracetamolu, proto byla pro měření zvolena kolona diolová. V Tabulka 11 jsou také uvedeny úseky, směrnice, jejich směrodatné odchylky a koeficient determinace u těchto kolon. Z tabulky je patrné, že nejvyšší linearitu retenčního modelu měla opět aminopropylsilikagelová kolona a silikagelová kolona. U silikagelové kolony byla ovšem retence APAP výrazně menší než u diolové kolony. Pravděpodobným vysvětlením nižší retence APAP v této koloně může být mírná kyselost APAP. Je možné, že se ve vodném prostředí silikagelová kolona více disociuje a dochází k výraznějšímu odpuzování APAP, a tudíž nižší retenci.

Nitrilová kolona zde není uvedena, neboť na této koloně byla změřena retence APAP pouze v mobilní fázi acetonitril a voda s přídavkem 20 mmol/l octanu amonného a ani v tomto složení nevykazovala dobrou retenci.



Obrázek 35 Porovnání retence APAP v acetonitrilu na silikagelové, diolové, aminopropylsilikagelové a nitrilové koloně

Tabulka 11 Hodnoty lineární regrese pro retenci APAP v acetonitrilu v mobilní fázi acetonitril a voda s 10 mmol/l octanu amonného u vybraných kolon

Kolona	Úsek	Směrodatná odchylka úseku	Směrnice	Směrodatná odchylka směrnice	Koeficient determinace
HILIC	-0,5194	0,0426	-3,0454	0,1489	0,9738
OH5	-0,6433	0,0890	-2,8238	0,2877	0,9457
NH2	-0,6475	0,0479	-2,3279	0,1677	0,9786

I přes měření různých stacionárních a mobilních fází žádná z nich nevykazovala výraznou retenci měřených látek. Možné zlepšení této retence mohlo být v použití silnějších mobilních fází s přidavkem netěkavých iontových aditiv, které by ovšem nebyly kompatibilní s hmotnostní spektrometrií.

Po proložení naměřených bodů lineárním regresním modelem byl u některých látek koeficient determinace poměrně nízký, proto se pro ověření hypotézy proložily data u diolové kolony s mobilní fází acetonitril-voda s přidavkem 20 mmol/l octanu amonného nelineárním regresním modelem dle rovnice 4:

$$\ln k = a + b \cdot \ln \varphi_{H_2O} + c \cdot \varphi_{H_2O} \quad (4)$$

kde a – parametr pro interakční energii mezi rozpuštěnými látkami a stacionární a mobilní fází, b – koeficient pro přímou interakci mezi analytem a stacionární fází a c – koeficient interakční energie mezi rozpuštěnými látkami a rozpouštědlem [94].

Data byla vyhodnocena v programu TIBCO Statistica (viz příloha 90 až 94). U všech látek se koeficient determinace zvýšil (viz tabulka 12) a statistický program vyhodnotil všechny proměnné v rovnici jako statisticky významné. Je tedy pravděpodobné, že během separace látek v podmínkách pro HILIC se uplatňují další interakce mezi separovanými látkami, stacionární a mobilní fází mimo rozdělování mezi vodnou vrstvou adsorbovanou na povrch stacionární fáze a mobilní fází.

Tabulka 12 Hodnoty nelineární regrese pro retenci paracetamolu a jeho metabolitů v mobilní fází acetonitril a voda s 20 mmol/l octanu amonného u diolové kolony

	a	Směrodatná odchylka a	b	Směrodatná odchylka b	c	Směrodatná odchylka c	Koeficient determinace
APAP (AcN)	-1,898	0,336	-0,424	0,077	-3,957	1,825	0,989
APAP (H ₂ O)	-0,965	0,331	-0,406	-0,176	-0,077	1,800	0,986
APAP-NAC	21,952	0,220	4,341	1,058	-97,838	1,197	0,981
APAP-CYS	-1,845	0,272	-0,415	0,062	-4,311	1,476	0,993
APAP-SG	-1,862	0,220	-0,413	0,051	-4,102	1,197	0,995

Z porovnání regresních parametrů obou retenčních modelů (rovnice 3 a 4; tabulky 10 a 12) je patrná podobnost úseků vyjadřujících retenci v čistém acetonitrilu. Parametr b pro nelineární model je vyšší než směrnice lineární závislosti a spolu s parametrem c kompenzují nelineární retenční chování. Regresní parametry u APAP-NAC jsou pro nelineární model výrazně odlišné od ostatních metabolitů, což může být způsobeno vlivem nejnižšího bodu

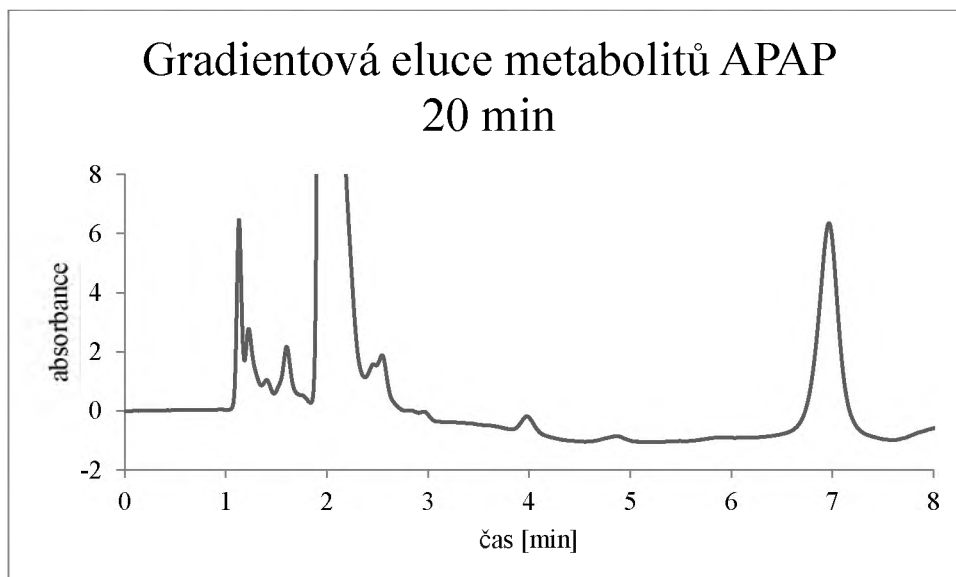
v retenčním modelu při nejnižší koncentraci vody. Tento bod u APAP-NAC způsobuje jako u jediného metabolitu konkávní tvar závislosti.

3.2.2 Gradientová eluce paracetamolu a jeho metabolitů

Na gradientovou eluci bylo použito mobilních fází acetonitril-voda (98:2, v/v) s přídavkem 20 mmol/l octanu amonného (mobilní fáze A) a acetonitril-voda (80:20, v/v) s přídavkem 20 mmol/l octanu amonného (mobilní fáze B). Byly zvoleny čtyři časy gradientů: 20, 15, 10 a 5 min. Počáteční koncentrace mobilní fáze B byla 0 % a konečná koncentrace mobilní fáze B byla 100 % (viz tabulka 3).

Směs látek obsahovala pouze metabolity APAP: APAP-NAC, APAP-CYS a APAP-SG. Samotný APAP byl ze směsi vyřazen, neboť absorboval pouze ve 2,3 min, zvyšoval absorbanci tohoto píku a tím snižoval detekci ostatních látek. Zároveň byly pro každý gradient změřeny standardy pro každou látku (viz příloha 95 až 97) a tyto standardy mohly být následně porovnány s chromatogramem směsi a identifikovány jednotlivé látky.

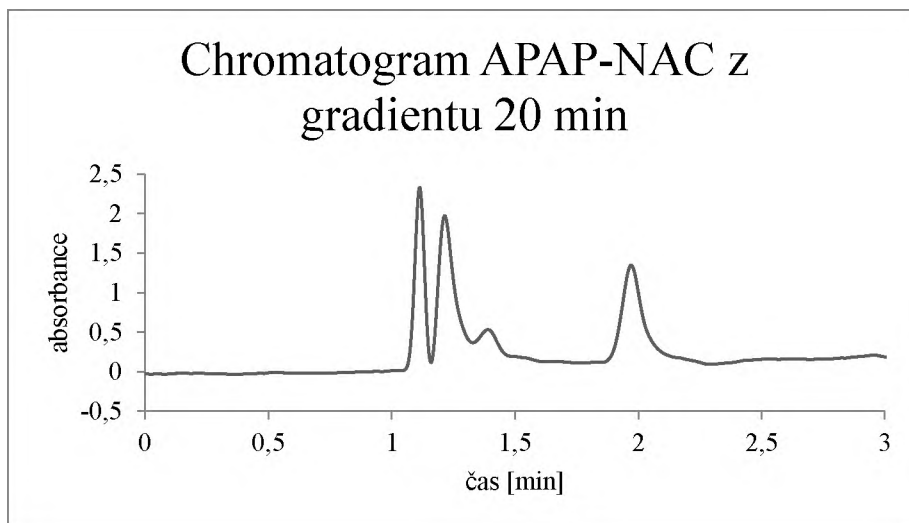
V příloze 96 až 98 lze vidět gradienty 15, 10 a 5 min. Nejvíce píků bylo ovšem nalezeno ve 20 min gradientu (viz obrázek 36). Měřítka tohoto chromatogramu bylo zvoleno tak, aby byly viditelné i ostatní píky, intenzita píku v čase 2,01 min byla vyšší než u ostatních píků a byl identifikován jako APAP-NAC. V tabulce 13 jsou uvedeny retenční časy píků a látky identifikované v tomto čase. Pro porovnání byly z gradientu vytaženy spektra a na základě těchto spekter a retenčních časů byly identifikovány látky ve směsi.



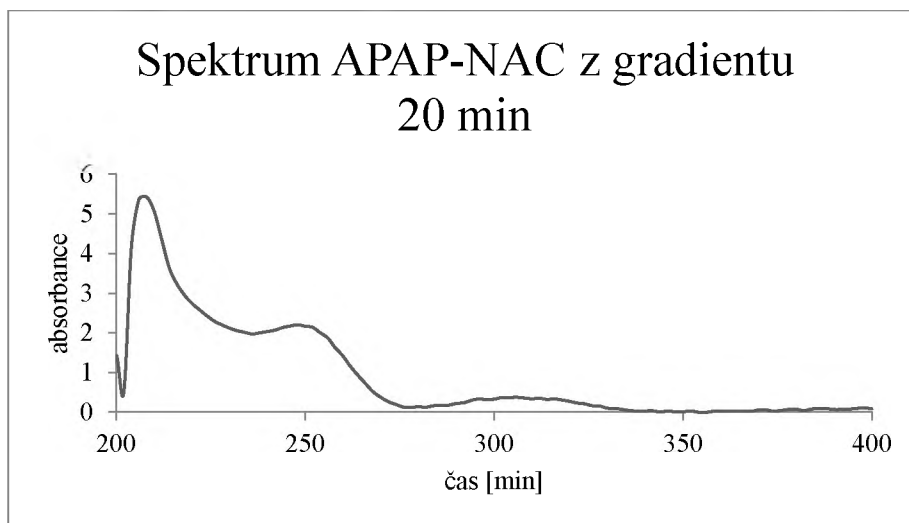
Obrázek 36 Gradientová eluce metabolitů paracetamolu (gradient 1)

Tabulka 13 Retenční časy identifikovaných látek ve směsi

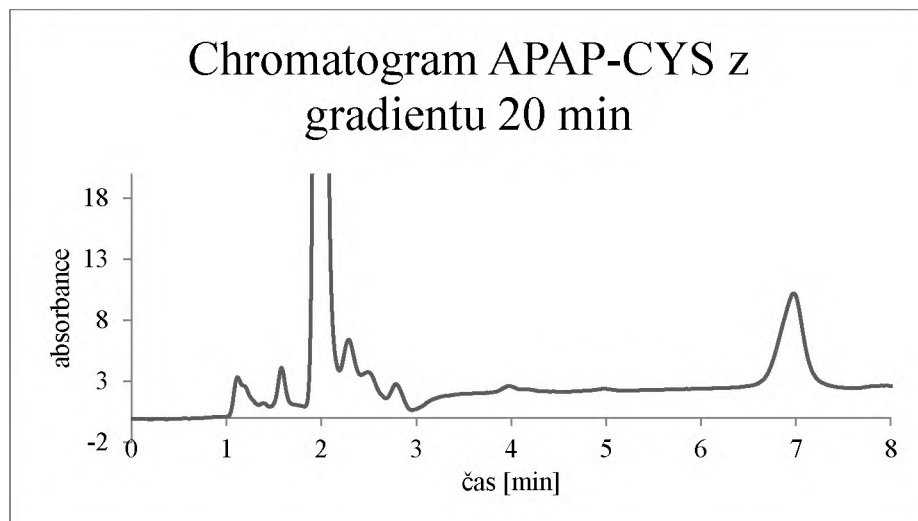
retenční čas (t(R)) [min]	identifikovaná látka
1,23	APAP-SG
1,60	APAP-CYS
2,01	APAP-NAC
2,55	APAP-CYS
6,97	APAP-SG



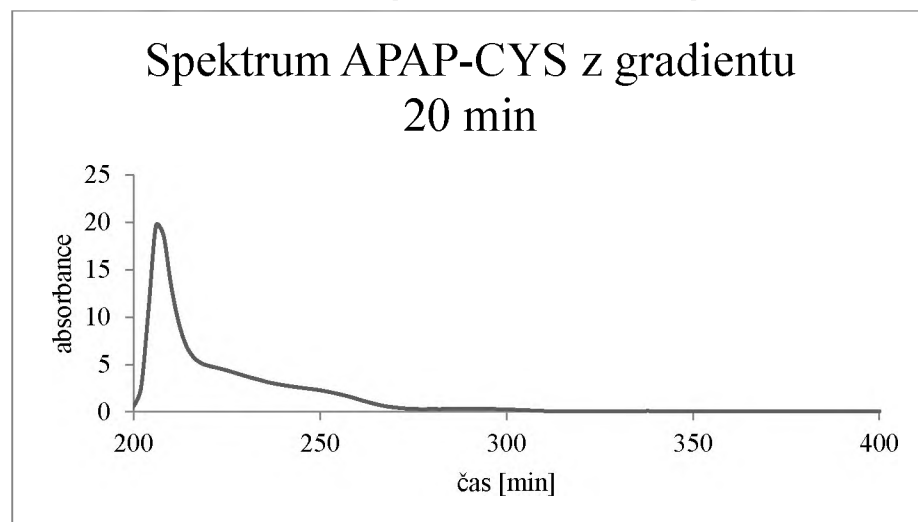
Obrázek 37 Chromatogram APAP-NAC u 20 min gradientu



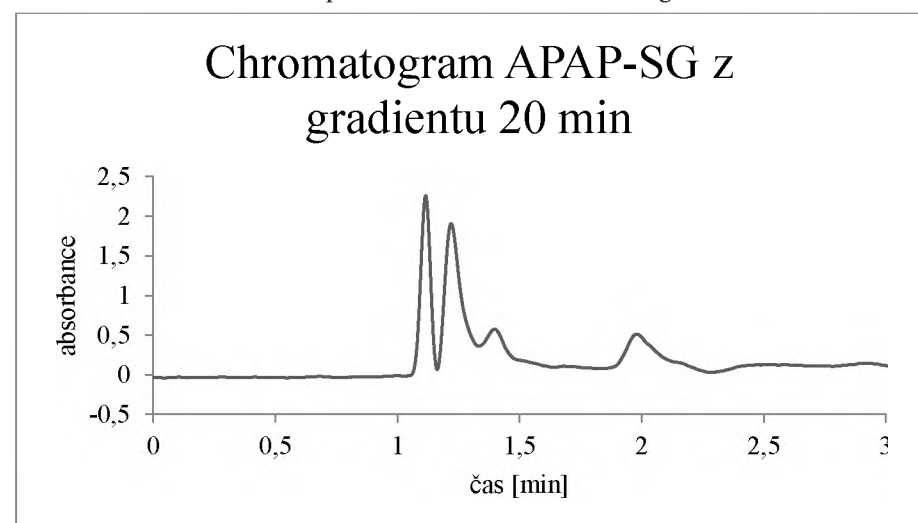
Obrázek 38 Spektrum APAP-NAC u 20 min gradientu



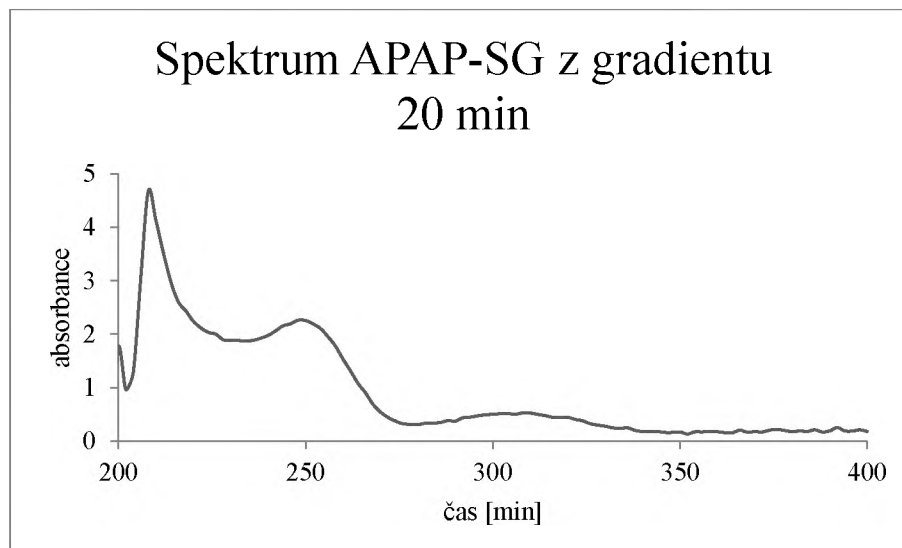
Obrázek 39 Chromatogram APAP-CYS u 20 min gradientu



Obrázek 40 Spektrum APAP-CYS u 20 min gradientu



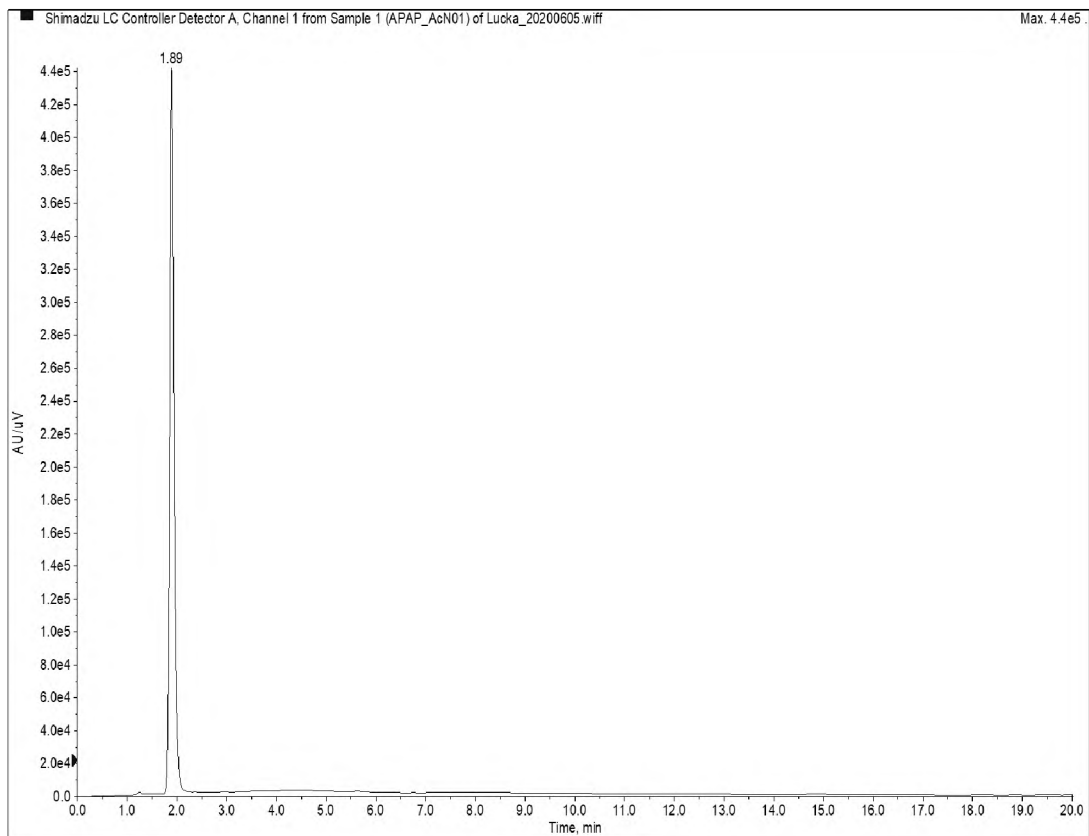
Obrázek 41 Chromatogram APAP-SG u 20 min gradientu



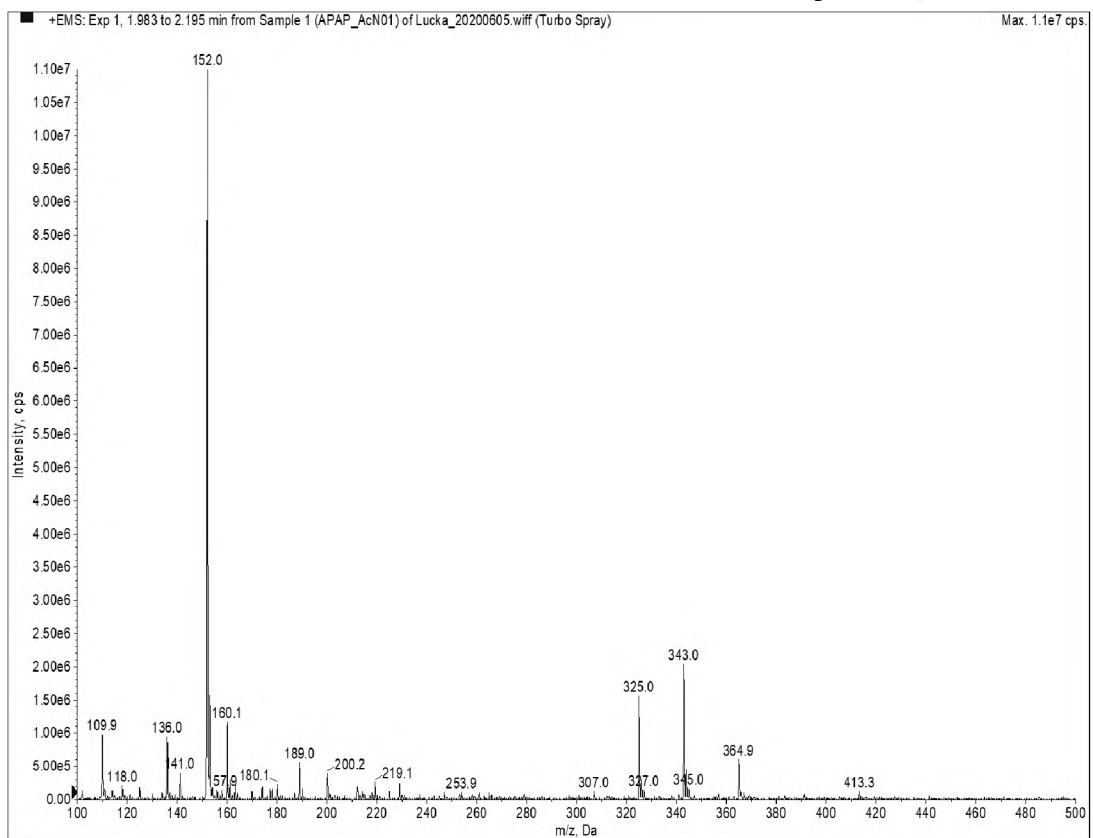
Obrázek 42 Spektrum APAP-SG u 20 min gradientu

Během měření gradientové eluce byl zjištěn problém s vysokým zpožděním gradientu u používaného chromatografu (0,57 ml) [93]. I přes využití snížení objemu smyčky dávkovacího ventilu, bylo toto zpoždění příliš velké a některé látky se i přesto eluovaly v izokratické části měření. Tento problém by se dal vyřešit zvýšením retence látek, dle možností navržených výše, či úpravou celého chromatografického systému tak, aby poskytoval nižší zpoždění gradientu. Úprava systému by však byla spojena s nutností použít spojovací kapiláry s menším vnitřním průměrem, které by přispívaly k vyššímu pracovnímu tlaku.

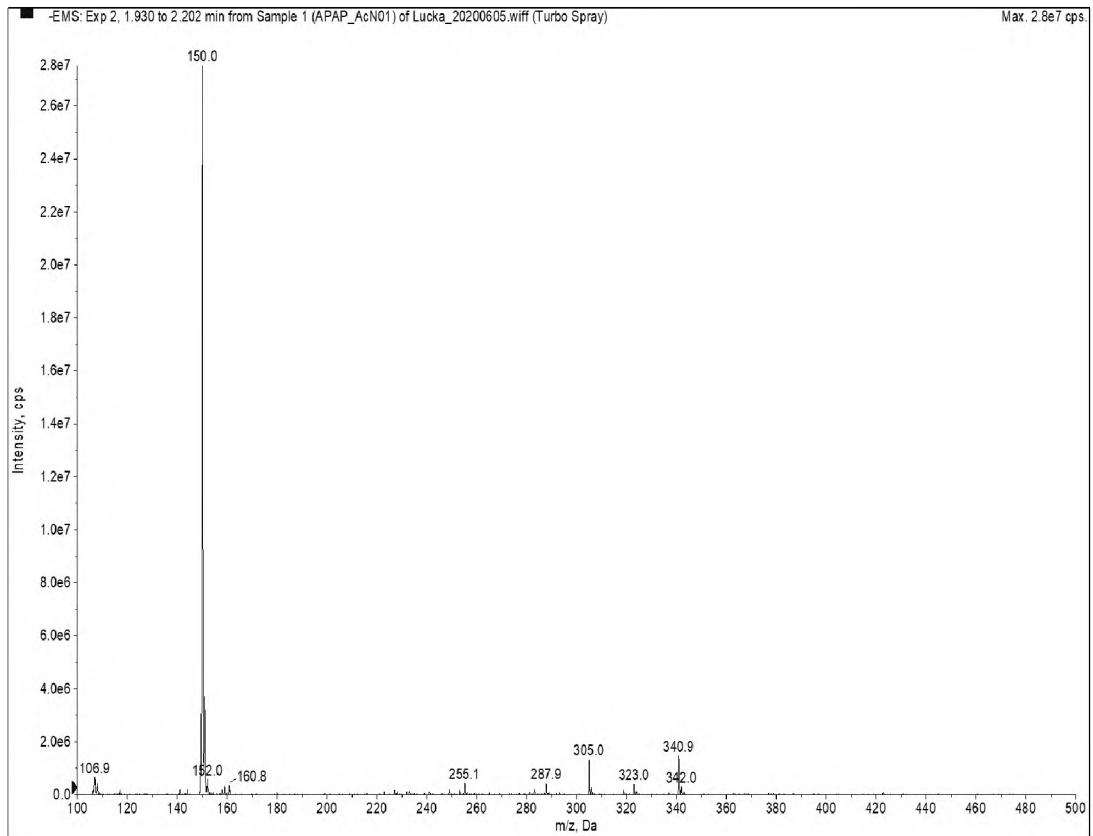
Pro ověření identity látek byly vybrané směsi dále přeměřeny pomocí HPLC/UV/MS v režimu gradientové eluce, dle podmínek uvedených výše. Každá látka byla proměřena v UV spektrometru při 243 nm a poté byl proměřen pozitiv a negativ v hmotnostním spektrometru (viz obrázek 43 až 50).



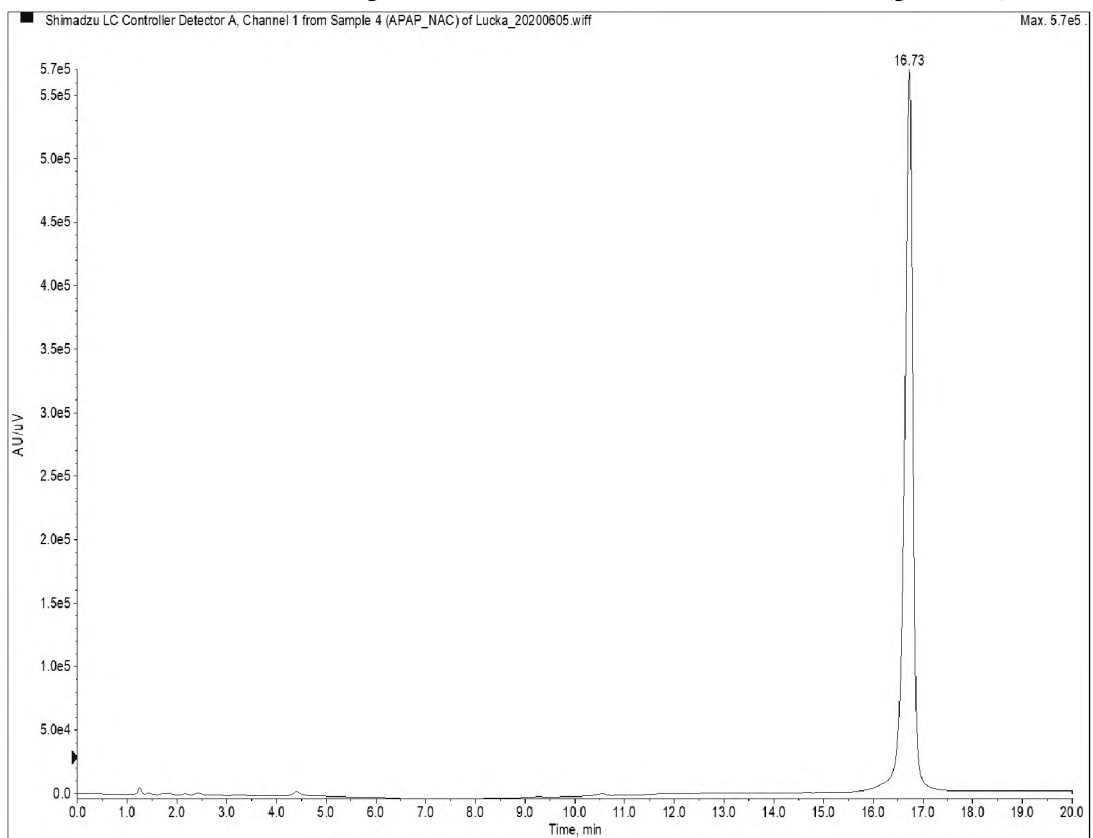
Obrázek 43 UV záznam APAP z HPLC/UV/MS měření (gradient 1)



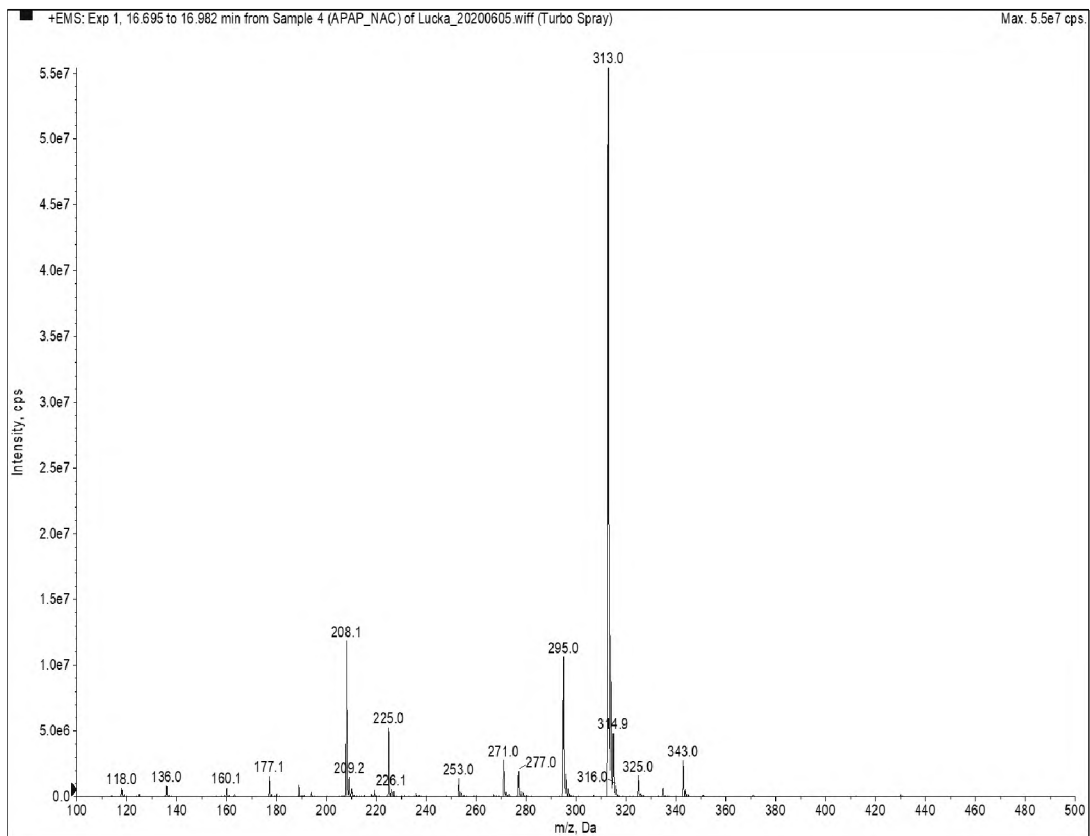
Obrázek 44 Záznam pozitivní ionizace APAP z HPLC/UV/MS měření (gradient 1)



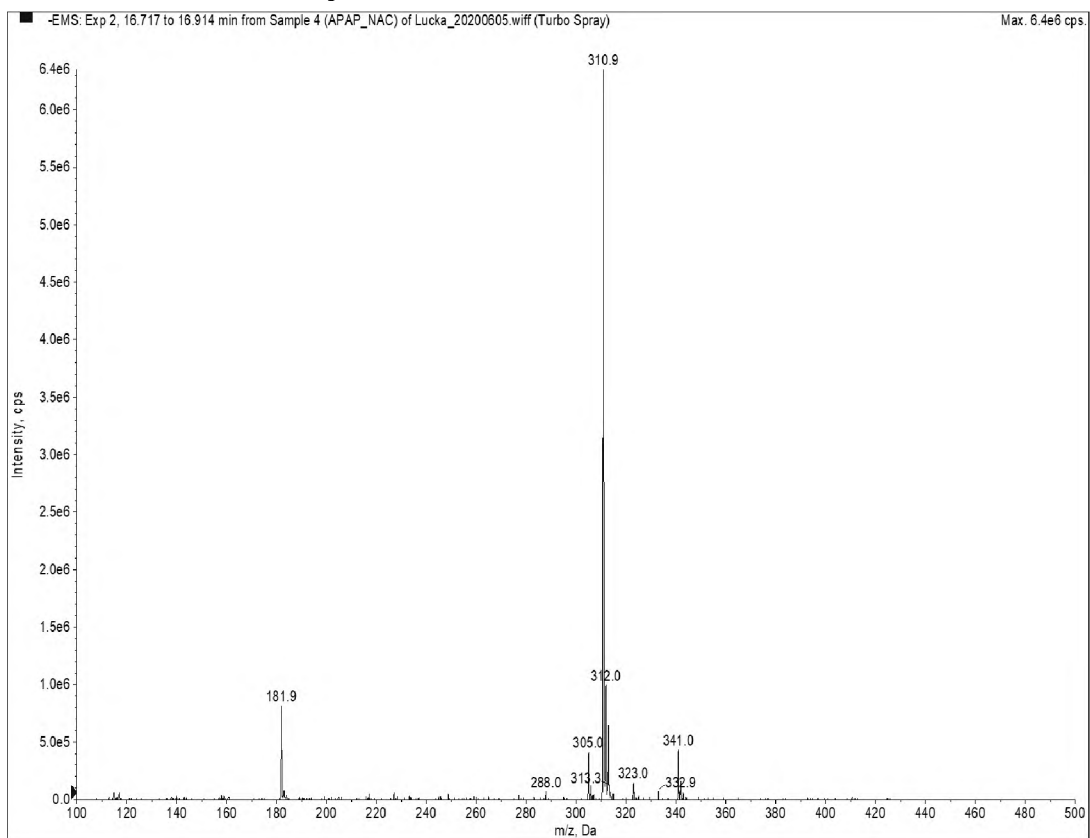
Obrázek 45 Záznam negativní ionizace APAP z HPLC/UV/MS měření (gradient 1)



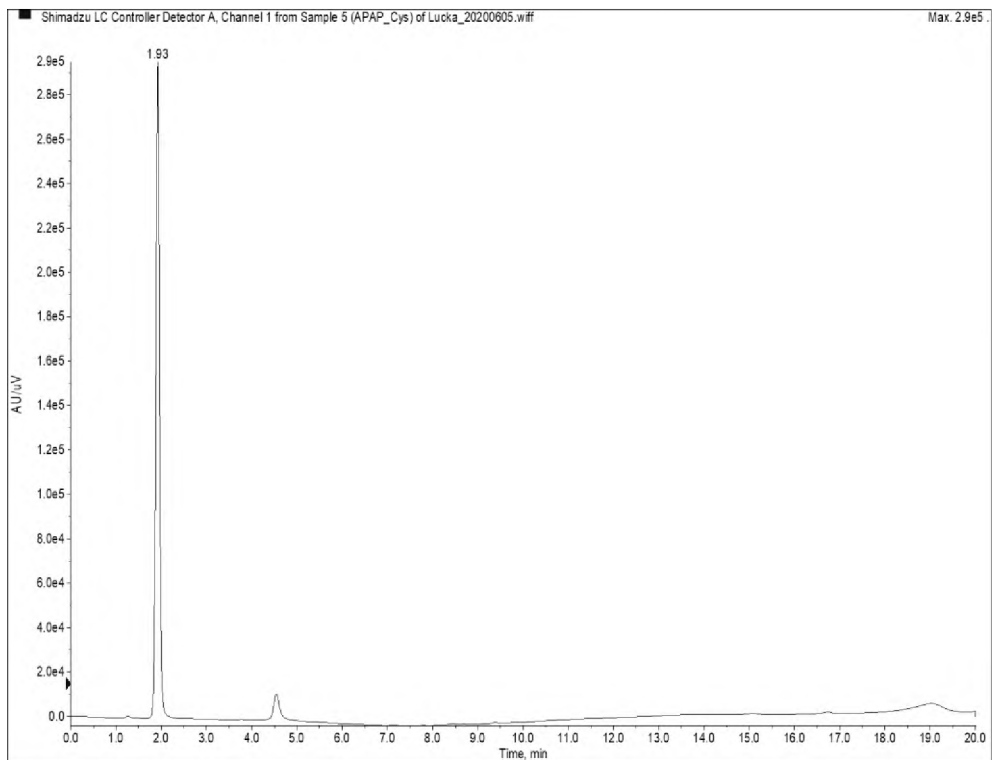
Obrázek 46 UV záznam APAP-NAC z HPLC/UV/MS měření



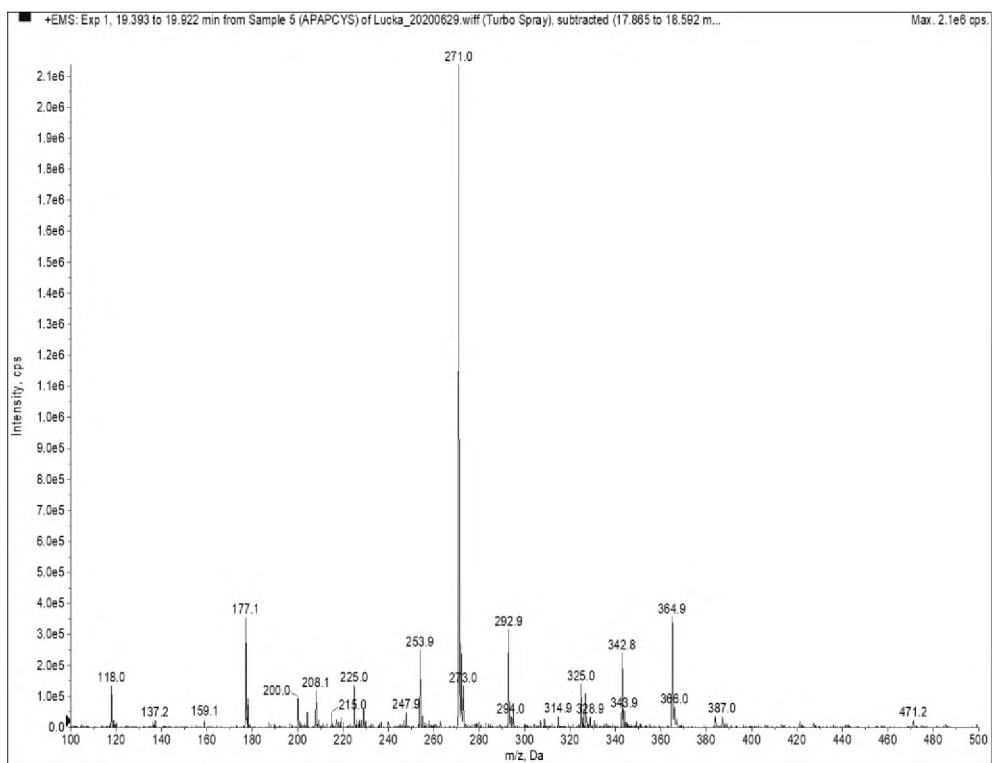
Obrázek 47 Záznam pozitivní ionizace APAP-NAC z HPLC/UV/MS měření



Obrázek 48 Záznam negativní ionizace APAP-NAC z HPLC/UV/MS měření



Obrázek 49 UV záznam APAP-CYS z HPLC/UV/MS měření



Obrázek 50 Záznam pozitivní ionizace APAP-CYS z HPLC/UV/MS měření

Na Obrázek 43 až Obrázek 50 lze vidět záznamy UV a MS detekce APAP v acetonitrilu, APAP-NAC a APAP-CYS. Tyto záznamy jsou z 20 min gradientové eluce. V Tabulka 14 jsou

uvedeny retenční časy z UV spekter, molekulová hmotnost daných látek a záznamy MS z pozitivního a negativního režimu.

Tabulka 14 Retenční časy z UV spekter a m/z z MS spekter pro APAP (AcN), APAP-NAC a APAP-CYS

	t(R) [min]	M _R	MS pozitiv	MS negativ
APAP (AcN)	1,89	151,2	152,0	150,0
APAP-NAC	16,73	312,3	313,0	310,9
APAP-CYS	1,93	270,3	271,0	

APAP-NAC se na hmotnostním spektrometru nepodařilo změřit. Pravděpodobně kvůli nižší účinnosti ionizace v kombinaci s nižší rozpustností APAP-NAC v acetonitrilu.

4 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla optimalizace podmínek separace paracetamolu a jeho metabolitů v chromatografii hydrofilních interakcí a dosáhnout tak co nejlepší separace v co nejkratším čase analýzy.

Na začátku práce bylo nezbytné určit vhodné podmínky UV detekce těchto látek. Toto měření bylo provedeno na UV-VIS spektrofotometru Shimadzu UV-2600 a byl změřen paracetamol v acetonitrilu, konjugát paracetamolu s *N*-acetylcysteinem v acetonitrilu, konjugát paracetamolu s cysteinem v acetonitrilu, konjugát paracetamolu s glutathionem v acetonitrilu a pro porovnání také paracetamol ve vodě. Z těchto měření byly zvoleny vlnové délky 200, 220 a 243 nm pro další detekci v UV detektoru s proměnou vlnovou délkou (Agilent 1200).

Dalším krokem byl výběr vhodné mobilní a stacionární fáze pro separace těchto analytů za podmínek HILIC na vysokoučinném kapalinovém chromatografu Agilent 1200 s UV detekcí. Pro porovnání retenčních faktorů byly zvoleny čtyři kolony: silikagelová kolona Luna HILIC, aminopropylsilikagelová kolona Luna NH₂, diolová kolona Ascentis Express OH5 HPLC a nitrilová kolona Ascentis Express ES-CN HPLC. Jako mobilní fáze byly použity acetonitril a voda s procenty vody 10, 5, 4, 3, 2 a 1 %. Zvolená iontová aditiva pro tyto mobilní fáze byly 0,1 % kyseliny mravenčí, 0,1 % kyseliny octové, 10 mmol/l mravenčanu amonného, 10 mmol/l octanu amonného a 20 mmol/l octanu amonného. Nejoptimálnější separaci vykazovala diolová kolona s 20 mmol/l octanem amonným. Retenční faktory z těchto měření byly vloženy do grafů a byla zhodnocena retenční látek v těchto podmínkách.

U diolové kolony byla následně změřena gradientová eluce s mobilní fází acetonitril-voda (80:20, v/v) s přidavkem 20 mmol/l octanu amonného a acetonitril-voda (98:2, v/v) s přidavkem 20 mmol/l octanu amonného. Tento gradient byl využit pro změření standardů samotného paracetamolu, jeho metabolitů a směsi těchto metabolitů. Chromatogram této směsi mohl být poté za pomoci UV spekter a změřených standardů vyhodnocen. Tento gradient se využil i pro analýzu na HPLC/MS pro ověření identity látek ve směsi. Závěrem byla navržena hypotéza nelinearity měření a možného využití nelineární regrese retenční látek pro charakterizaci separace pomocí HILIC. Možná hypotéza dalších interakcí na koloně byla potvrzena proložení dat nelineární regrese a zlepšení jejich koeficientů determinace.

I přes využití různých stacionárních a mobilních fází, žádná nevykazovala výraznou retenci těchto látek, i přesto, že paracetamol i jeho metabolity jsou polární látky a HILIC separace by pro ně měla být vhodná. Zlepšení by vyžadovalo využití silnějších aditiv, které by ovšem nebyly kompatibilní s hmotnostní spektrometrií.

5 POUŽITÁ LITERATURA

1. ŠČIGEL, Vladimír. *Repetitorium klinické farmakologie pro praxi zubního lékaře* [online]. Vyd. 2., dopl. a rozš. Praha: Havlíček Brain Team, 2010 [cit. 2020-03-31]. Edice zubního lékařství (Havlíček Brain Team). ISBN 978-80-87109-20-5. Dostupné z: <https://kramerius-vs.mzk.cz/uuid/uuid:2ec7ff40-cac0-11e7-a351-005056825209>
2. ADAM, Zdeněk. *Kostní nádorová choroba* [online]. Praha: Grada, 2005 [cit. 2020-04-03]. ISBN 80-247-1357-8. Dostupné z: <https://kramerius-vs.mzk.cz/uuid/uuid:16941180-a135-11e6-bfc2-001018b5eb5c>
3. ROKYTA, Richard. *Bolest a jak s ní zacházet: učebnice pro nelékařské zdravotnické obory* [online]. Praha: Grada, 2009 [cit. 2020-04-03]. ISBN 978-80-247-3012-7. Dostupné z: <https://kramerius-vs.mzk.cz/uuid/uuid:40dd2830-241b-11e4-90aa-005056825209>
4. MAREK, Josef. *Farmakoterapie vnitřních nemocí* [online]. 4., zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2010 [cit. 2020-03-31]. ISBN 978-80-247-2639-7. Dostupné z: <https://kramerius-vs.mzk.cz/uuid/uuid:10923f50-01e4-11e6-a372-001018b5eb5c>
5. HAMPL, František, Stanislav RÁDL a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie* [online]. 3., upravené a rozšířené vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015 [cit. 2020-04-02]. ISBN 978-80-7080-875-7. Dostupné z: <https://kramerius-vs.mzk.cz/uuid/uuid:2138fe40-9a29-11e8-93fd-5ef3fc9bb22f>
6. MELICHAR, Bohuslav. *Chemická léčiva* [online]. Praha: Avicenum, 1972 [cit. 2020-04-15]. Dostupné z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:75fa5510-8a10-11e8-ad64-005056825209>
7. LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Farmakologie a toxikologie* [online]. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004 [cit. 2020-04-06]. ISBN 80-247-0836-1. Dostupné z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:945ce400-84b9-11e5-9cbd-5ef3fc9ae867>
8. ROKYTA, Richard, Miloslav KRŠIAK a Jiří KOZÁK, ed. *Bolest: monografie algeziologie* [online]. 2. vyd. Praha: Tigris, 2012 [cit. 2020-04-03]. ISBN 978-80-87323-02-1. Dostupné z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:66440f50-17d8-11e6-a0ee-5ef3fc9ae867>
9. LINCOVÁ, Dagmar a Hassan FARGHALI. *Základní a aplikovaná farmakologie* [online]. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2007 [cit. 2020-04-06]. ISBN 978-80-7262-373-0. Dostupné z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:e7613140-d8a8-11e5-9f76-5ef3fc9bb22f>

10. ATHERSUCH, Toby J., Daniel J. ANTOINE, Alan R. BOOBIS, Muireann COEN, Ann K. DALY, Lucia POSSAMAI, Jeremy K. NICHOLSON a Ian D. WILSON. Paracetamol metabolism, hepatotoxicity, biomarkers and therapeutic interventions: a perspective. *Toxicology Research* [online]. 2018, 7(3), 347-357 [cit. 2020-04-16]. DOI: 10.1039/C7TX00340D. ISSN 2045-452X. Dostupné z: <https://academic.oup.com/toxres/article/7/3/347-357/5545052>
11. *Český lékopis: Pharmacopoea Bohemica* [online]. Praha: Grada Publishing, 2009, 2009(3) [cit. 2020-03-30]. ISBN 978-80-247-2994-7. Dostupné z: <https://kramerius-vs.mzk.cz/uuid/uuid:f1780660-691a-11e6-abea-5ef3fc9ae867>
12. VLČEK, Jiří, Daniela FIALOVÁ a Magda VYTRÍSALOVÁ. *Klinická farmacie* [online]. Praha: Grada, 2014 [cit. 2020-03-30]. ISBN 978-80-247-4532-9. Dostupné z: <https://kramerius-vs.mzk.cz/uuid/uuid:c61e95b0-6b5a-11e5-9e57-005056827e52>
13. FENDRICH, Zdeněk. *Farmakologie pro farmaceuty III.* [online]. Praha: Karolinum, 2007 [cit. 2020-03-31]. ISBN 978-80-246-1419-9. Dostupné z: <https://kramerius-vs.mzk.cz/uuid/uuid:51eeae90-758f-11e8-bb44-5ef3fc9ae867>
14. LINHART, Igor. *Toxikologie: interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky* [online]. 2., upr. a rozš. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2014 [cit. 2020-03-31]. ISBN 978-80-7080-877-1. Dostupné z: <https://kramerius-vs.mzk.cz/uuid/uuid:9cbd46bd-1196-4a52-88b4-7cb563f78ae9>
15. HARTL, Jiří a Karel PALÁT. *Farmaceutická chemie I.* [online]. 2. vyd.(4. dotisk). Praha: Karolinum, 2004 [cit. 2020-03-30]. ISBN 978-80-7184-619-2. Dostupné z: <https://kramerius-vs.mzk.cz/uuid/uuid:2b66dbd0-3b16-11e7-97e2-005056825209>
16. TOUSSAINT, K., X. C. YANG, M. A. ZIELINSKI, K. L. REIGLE, S. D. SACAVAGE, S. NAGAR a R. B. RAFFA. What do we (not) know about how paracetamol (acetaminophen) works? *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* [online]. 2010, 35(6), 617-638 [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.1111/j.1365-2710.2009.01143.x. ISSN 02694727. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2710.2009.01143.x>
17. ANDERSON, BRIAN J. Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. *Pediatric Anesthesia* [online]. 2008, 18(10), 915-921 [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.1111/j.1460-9592.2008.02764.x. ISSN 11555645. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9592.2008.02764.x>
18. VAN RENSBURG, R a H REUTER. An overview of analgesics: NSAIDs, paracetamol, and topical analgesics Part 1. *South African Family Practice* [online]. 2019, 61(1), S4-S10

- [cit. 2020-04-08]. DOI: 10.1080/20786190.2019.1610228. ISSN 2078-6190. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20786190.2019.1610228>
19. SETH, Bharti. Non-opioid analgesics. *Pharmacology* [online]. 2019, **20**(8), 456-459 [cit. 2020-04-08]. DOI: 10.1016/j.mpaic.2019.06.001. ISSN 14720299. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1472029919301432>
 20. ADAM, Zdeněk a Jiří VORLÍČEK. *Obecná onkologie* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2004 [cit. 2020-04-02]. ISBN 80-210-3574-9. Dostupné z: <https://kramerius-vs.mzk.cz/uuid/uuid:f1226fb0-81ad-11e6-8aeb-5ef3fc9ae867>
 21. SEIFERT, Bohumil, Václav BENEŠ a Svatopluk BÝMA. *Všeobecné praktické lékařství* [online]. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2013 [cit. 2020-04-02]. ISBN 978-80-7262-934-3. Dostupné z: <https://kramerius-vs.mzk.cz/uuid/uuid:22842310-8b5b-11e8-be68-5ef3fc9bb22f>
 22. LANGBEIN, Kurt, Hans-Peter MARTIN a Hans WEISS. *Hořké pilulky* [online]. Praha: Victoria Publishing, 1993 [cit. 2020-04-02]. ISBN 80-856-0506-6. Dostupné z: <https://kramerius-vs.mzk.cz/uuid/uuid:af717a60-a348-11e4-9a7e-5ef3fc9bb22f>
 23. CHIEW, Angela L, Christian GLUUD, Jesper BROK a Nick A BUCKLEY. Interventions for paracetamol (acetaminophen) overdose. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [online]. 2018, **2018**(2), 1-90 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1002/14651858.CD003328.pub3. ISSN 14651858. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD003328.pub3>
 24. *Volně prodejné léky registrované v České republice: schválené příbalové informace pro pacienta : autorské texty* [online]. Praha: Strategie, 1998 [cit. 2020-04-02]. ISBN 80-902-1198-4. Dostupné z: <https://kramerius-vs.mzk.cz/uuid/uuid:2ed311e0-5bcf-11e4-a6f0-5ef3fc9ae867>
 25. LEE, William M. Acetaminophen (APAP) hepatotoxicity—Isn't it time for APAP to go away? *Journal of Hepatology* [online]. 2017, **67**(6), 1324-1331 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.07.005. ISSN 01688278. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827817321487>
 26. ŠVELLA, Kamil a Pavel ŠEVČÍK. *Akutní intoxikace a léková poškození v intenzivní medicíně* [online]. 2., dopl. a aktualiz. vyd. Praha: Grada, 2011 [cit. 2020-03-31]. ISBN 978-80-247-3146-9. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=7ru-AgAAQBAJ&lpg=PA9&ots=tTgAq4F5jb&dq=akutn%C3%AD%20intoxikace&lr&hl=c&pg=PA238#v=onepage&q=paracetamol&f=false>
 27. NÝDLOVÁ, Erika, Martina VRBOVÁ, Petr ČESLA, Barbora JANKOVIČOVÁ, Karel VENTURA a Tomáš ROUŠAR. Comparison of inhibitory effects between acetaminophen-

- glutathione conjugate and reduced glutathione in human glutathione reductase. *Journal of Applied Toxicology* [online]. 2014, **34**(9), 968-973 [cit. 2020-04-09]. DOI: 10.1002/jat.2914. ISSN 0260437X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jat.2914>
28. 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. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3394/3350>
29. PRESCOTT, L. F. Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. *British Journal of Clinical Pharmacology* [online]. 1980, **10**(S2), 291S-298S [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1111/j.1365-2125.1980.tb01812.x. ISSN 03065251. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2125.1980.tb01812.x>
30. TEPLAN, Vladimír. *Akutní poškození a selhání ledvin v klinické medicíně* [online]. Praha: Grada, 2010 [cit. 2020-03-31]. ISBN 978-80-247-1121-8. Dostupné z: <https://kramerius-vs.mzk.cz/uuid/uuid:915cb740-8454-11e5-bf6c-005056825209>
31. MCGILL, Mitchell R. a Hartmut JAESCHKE. Metabolism and Disposition of Acetaminophen: Recent Advances in Relation to Hepatotoxicity and Diagnosis. *Pharmaceutical Research* [online]. 2013, **30**(9), 2174-2187 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1007/s11095-013-1007-6. ISSN 0724-8741. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-013-1007-6>
32. MORIARTY, Camilla a Will CARROLL. Paracetamol: pharmacology, prescribing and controversies. *Research in practice* [online]. 2016, **101**(6), 331-334 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1136/archdischild-2014-307287. ISSN 1743-0585. Dostupné z: <http://ep.bmj.com/lookup/doi/10.1136/archdischild-2014-307287>
33. MARZUILLO, Pierluigi, Stefano GUARINO a Egidio BARBI. Paracetamol: a focus for the general pediatrician. *European Journal of Pediatrics* [online]. 2014, **173**(4), 415-425 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1007/s00431-013-2239-5. ISSN 0340-6199. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00431-013-2239-5>
34. CHEN, Weiqiao, Luke L. KOENIGS, Stella J. THOMPSON, Raimund M. PETER, Allan E. RETTIE, William F. TRAGER a Sidney D. NELSON. Oxidation of Acetaminophen to Its Toxic Quinone Imine and Nontoxic Catechol Metabolites by Baculovirus-Expressed and Purified Human Cytochromes P450 2E1 and 2A6. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 1998, **11**(4), 295-301 [cit. 2020-04-16]. DOI: 10.1021/tx9701687. ISSN 0893-228X. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/tx9701687>

35. BESSEMS, Jos G. M. a Nico P. E. VERMEULEN. Paracetamol (Acetaminophen)-Induced Toxicity: Molecular and Biochemical Mechanisms, Analogues and Protective Approaches. *Critical Reviews in Toxicology* [online]. 2008, **31**(1), 55-138 [cit. 2020-04-16]. DOI: 10.1080/20014091111677. ISSN 1040-8444. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20014091111677>
36. MCGILL, Mitchell R a Hartmut JAESCHKE. Mechanistic biomarkers in acetaminophen-induced hepatotoxicity and acute liver failure: from preclinical models to patients. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* [online]. 2014, **10**(7), 1005-1017 [cit. 2020-04-16]. DOI: 10.1517/17425255.2014.920823. ISSN 1742-5255. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425255.2014.920823>
37. LANCASTER, Elizabeth M., Jonathan R. HIATT a Ali ZARRINPAR. Acetaminophen hepatotoxicity: an updated review. *Archives of Toxicology* [online]. 2015, **89**(2), 193-199 [cit. 2020-04-16]. DOI: 10.1007/s00204-014-1432-2. ISSN 0340-5761. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-014-1432-2>
38. CASTAÑEDA-ARRIAGA, Romina a Annia GALANO. Exploring Chemical Routes Relevant to the Toxicity of Paracetamol and Its meta-Analogue at a Molecular Level. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 2017, **30**(6), 1286-1301 [cit. 2020-04-16]. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.7b00024. ISSN 0893-228X. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrestox.7b00024>
39. VRBOVÁ, M., E. ROUŠAROVÁ, L. BRŮČKOVÁ, P. ČESLA a T. ROUŠAR. Characterization of Acetaminophen Toxicity in Human Kidney HK-2 Cells. *Physiological Research* [online]. 2016, **65**(4), 627-635 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.33549/physiolres.933158. ISSN 1802-9973. Dostupné z: http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/65/65_627.pdf
40. MAZER, Maryann a Jeanmarie PERRONE. Acetaminophen-induced nephrotoxicity: Pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Journal of Medical Toxicology* [online]. 2008, **4**(1), 2-6 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1007/BF03160941. ISSN 1556-9039. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF03160941>
41. PARK, Woo Yeong. Controversies in acetaminophen nephrotoxicity. *Kidney Research and Clinical Practice* [online]. 2020, **39**(1), 4-6 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.23876/j.krcp.20.027. ISSN 2211-9140. Dostupné z: <http://www.krcp-knsn.org/journal/view.html?doi=10.23876/j.krcp.20.027>
42. AYCAN, İlker Öngüç, Orhan TOKGÖZ, Adnan TÜFEK, Ulaş ALABALIK, Osman EVLIYAOĞLU, Hüseyin TURGUT, Feyzi ÇELİK a Abdulmenap GÜZEL. The use of

- thymoquinone in nephrotoxicity related to acetaminophen. *International Journal of Surgery* [online]. 2015, **13**, 33-37 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1016/j.ijssu.2014.11.020. ISSN 17439191. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1743919114009807>
43. STERN, Stephan T., Mary K. BRUNO, Robert A. HORTON, Dennis W. HILL, Jeanette C. ROBERTS a Steven D. COHEN. Contribution of acetaminophen-cysteine to acetaminophen nephrotoxicity II. Possible involvement of the γ -glutamyl cycle. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2005, **202**(2), 160-171 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1016/j.taap.2004.06.029. ISSN 0041008X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X0400300X>
44. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Třetí vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.
45. SMITH, Roger M. *Gas and liquid chromatography in analytical chemistry*. New York: Wiley, 1988. ISBN 04-719-0980-7.
46. NEUE, Uwe D. *HPLC columns: theory, technology, and practice*. New York: Wiley-VCH, 1997. ISBN 04-711-9037-3.
47. FANALI, Salvatore, Paul R. HADDAD, Colin F. POOLE a Marja-Liisa RIEKKOLA. *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*, Volume 1 [online]. 2. vydání. Amsterdam, Netherland: Elsevier, 2017 [cit. 2020-03-01]. ISBN 978-0-12-805393-5. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpLCFIVE01/liquid-chromatography/liquid-chromatography>
48. DEYL, Zdeněk. *Separation methods*. 2. vydání. New York, NY, USA: Sole distributors for the U.S.A. and Canada, Elsevier Science Pub. Co., 1984. ISBN 04-448-0527-3.
49. WILSON, Ian D. a Colin F. POOLE. *Handbook of methods and instrumentation in separation science: Volume 1*. Burlington, MA: Elsevier/Academic Press, 2009. ISBN 01-237-5094-6.
50. SKOOG, Douglas A., F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. *Principles of instrumental analysis*. 6th ed. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, 2007. ISBN 978-049-5012-016.
51. CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické* [online]. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-030-0569-8.
52. SCHMITZ, O. *The HPLC-MS Handbook for Practitioners: State of the Art in the LC/MS* [online]. Kromidas, Stavros: John Wiley, 2017 [cit. 2020-03-01]. ISBN 978-3-527-80919-9

6. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpHPLCMSH4/hplc-ms-handbook-practitioners/hplc-ms-handbook-practitioners>
53. HOLČAPEK, Michal. Hmotnostní spektrometrie [přednáška]. Pardubice: Fakulta chemicko-technologická, UPCE. In: holcapek.upce.cz [online]. [cit. 2020-03-01]. Dostupnost z: http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf
54. BRUSOVÁ, Hana, DOHNAL, Jiří, ed. *Moderní přístupy k farmaceutické analýze*. Praha: Farmaceutická fakulta Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, 2010. ISBN 978-80-7305-085-6.
55. VACEK, Jan, Lucia ONOFREJOVÁ, Bořivoj KLEJDUS a Vlastimil KUBÁŇ. Využití kapalinové chromatografie založené na hydrofilních interakcích pro separace polárních látek. *Chemické listy*. 2009, **103**(5), 381–385. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1534/1534>
56. JANDERA, Pavel. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2011, **692**(1-2), 1-25 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1016/j.aca.2011.02.047. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267011002728>
57. BUSZEWSKI, Bogusław a Sylwia NOGA. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2012, **402**(1), 231-247 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1007/s00216-011-5308-5. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-011-5308-5>
58. HEMSTRÖM, Petrus a Knut IRGUM. Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2006, **29**(12), 1784-1821 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1002/jssc.200600199. ISSN 1615-9306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200600199>
59. IKEGAMI, Tohru, Kouki TOMOMATSU, Hiroataka TAKUBO, Kanta HORIE a Nobuo TANAKA. Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2008, **1184**(1-2), 474-503 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.01.075. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967308002112>
60. MCCALLEY, David V. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography: An Update. *LC-GC Europe* [online]. 2019, **32**(3), 114-124 [cit. 2020-03-08]. ISSN 14716577. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&an=135494379&scope=site>

61. JANDERA, Pavel. HILIC chromatografie: perspektivní technika separace polárních látek na polárních stacionárních fázích ve vodně-organických mobilních fázích. *Chemmagazin*. 2011, **11**(2), 8–9. ISSN 1210-7409. Dostupné z: http://www.chemmagazin.cz/userdata/chemmagazin_2010/file/CHEMAGAZIN_XXI_2_cl1.pdf
62. GUO, Yong, Nidhi BHALODIA, Bassel FATTAL a Ioannis SERRIS. Evaluating the Adsorbed Water Layer on Polar Stationary Phases for Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC). *Separations* [online]. 2019, **6**(2), 19 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.3390/separations6020019. ISSN 2297-8739. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2297-8739/6/2/19>
63. MCCALLEY, David V. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, **1171**(1-2), 46-55 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.09.047. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307015610>
64. GUO, Yong a Sheetal GAIKI. Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2011, **1218**(35), 5920-5938 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.06.052. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311008673>
65. JANDERA, Pavel. Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts. *Journal of Separation Science* [online]. 2008, **31**(9), 1421-1437 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1002/jssc.200800051. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200800051>
66. JANDERA, Pavel a Petr 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. 2020-03-15]. DOI: 10.1016/j.aca.2017.01.060. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267017301514>
67. KARTSOVA, L. A., E. A. BESSONOVA a V. D. SOMOVA. Hydrophilic Interaction Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2019, **74**(5), 415-424 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1134/S1061934819050058. ISSN 1061-9348. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S1061934819050058>

68. HAO, Zhigang, Baiming XIAO a Naidong WENG. Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Journal of Separation Science* [online]. 2008, **31**(9), 1449-1464 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1002/jssc.200700624. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200700624>
69. MCCALLEY, David V. Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2017, **1523**, 49-71 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.06.026. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967317308762>
70. TARAJI, Maryam, Paul R. HADDAD, Ruth I.J. AMOS, Mohammad TALEBI, Roman SZUCS, John W. DOLAN a Christopher A. POHL. Chemometric-assisted method development in hydrophilic interaction liquid chromatography: A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2018, **1000**, 20-40 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1016/j.aca.2017.09.041. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267017311406>
71. DEJAEGHER, Bieke a Yvan VANDER HEYDEN. HILIC methods in pharmaceutical analysis. *Journal of Separation Science* [online]. 2010, **33**(6-7), 698-715 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1002/jssc.200900742. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200900742>
72. MCCALLEY, David V. The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: Some possible approaches for improved separations. *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, **1217**(6), 858-880 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.11.068. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309017555>
73. PERIAT, Aurélie, Ira S. KRULL a Davy GUILLARME. Applications of hydrophilic interaction chromatography to amino acids, peptides, and proteins. *Journal of Separation Science* [online]. 2015, **38**(3), 357-367 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1002/jssc.201400969. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201400969>
74. KIM, Chansik, Hong-Duck RYU, Eu Gene CHUNG, Yongseok KIM a Jae-kwan LEE. A review of analytical procedures for the simultaneous determination of medically important veterinary antibiotics in environmental water: Sample preparation, liquid chromatography, and mass spectrometry. *Journal of Environmental Management* [online]. 2018, **217**, 629-645 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/j.jenvman.2018.04.006. ISSN 03014797. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301479718303864>

75. MARRUBINI, Giorgio, Patrik APPELBLAD, Mariarosa MAIETTA a Adele PAPETTI. Hydrophilic interaction chromatography in food matrices analysis: An updated review. *Food Chemistry* [online]. 2018, **257**, 53-66 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.03.008. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618304163>
76. YU, Xina, Linqiu LI, Honghai WANG, Gongshuai SONG, Jie WANG, Shiyan LI, Yang WANG a Qing SHEN. Lipidomics study of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and salmon (*Oncorhynchus tshawytscha* and *Salmo salar*) using hydrophilic interaction chromatography and mass spectrometry. *LWT* [online]. 2020, **121**, 1-10 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108988. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643819313301>
77. GOYAL, Rajendra N., Vinod K. GUPTA a Sanghamitra CHATTERJEE. Voltammetric biosensors for the determination of paracetamol at carbon nanotube modified pyrolytic graphite electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2010, **149**(1), 252-258 [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.1016/j.snb.2010.05.019. ISSN 09254005. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400510004272>
78. LAU, Grace S.N. a J.A.J.H. CRITCHLEY. The estimation of paracetamol and its major metabolites in both plasma and urine by a single high-performance liquid chromatography assay. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 1994, **12**(12), 1563-1572 [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.1016/0731-7085(94)00859-0. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0731708594008590>
79. AN, Ji Hye, Hwa Jeong LEE a Byung Hwa JUNG. Quantitative analysis of acetaminophen and its six metabolites in rat plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* [online]. 2012, **26**(12), 1596-1604 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1002/bmc.2737. ISSN 02693879. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bmc.2737>
80. DI GIROLAMO, A., W.M. O'NEILL a I.W. WAINER. A validated method for the determination of paracetamol and its glucuronide and sulphate metabolites in the urine of HIV /AIDS patients using wavelength-switching UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 1998, **17**(6-7), 1191-1197 [cit. 2020-04-24]. DOI: 10.1016/S0731-7085(98)00084-3. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708598000843>
81. VERTZONI, M.V, H.A ARCHONTAKI a P GALANOPOULOU. Development and optimization of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the

- determination of acetaminophen and its major metabolites in rabbit plasma and urine after a toxic dose. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2003, **32**(3), 487-493 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1016/S0731-7085(03)00246-2. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708503002462>
82. HANYŠOVÁ, Lenka, Petr KASTNER a Jiří KLIMEŠ. Degradací produkty a nečistoty paracetamolu z hlediska jejich detekce. *Chemické listy*. 2005, **99**(9), 647–652. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2018/2018>
83. FLORES-PÉREZ, Carmen, Juan Luis CHÁVEZ-PACHECO, Blanca RAMÍREZ-MENDIOLA, Radamés ALEMÓN-MEDINA, Raquel GARCÍA-ÁLVAREZ, Hugo JUÁREZ-OLGUÍN a Janett FLORES-PÉREZ. A reliable method of liquid chromatography for the quantification of acetaminophen and identification of its toxic metabolite N-acetyl-p-benzoquinoneimine for application in pediatric studies. *Biomedical Chromatography* [online]. 2010, **25**(7), 760-766 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1002/bmc.1511. ISSN 02693879. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bmc.1511>
84. HILLBECK, Derek. Thermo Fisher Scientific [online]. *Rapid Separation of Analgesic Compounds Using a Solid Core HPLC Column*. 2012 [cit. 2020-06-03]. Dostupné z: https://www.separatedbyexperience.com/documents/AN-Accucore-urea-HILIC-analgesic-AN20589_E.pdf
85. ALI, Nouruddin W., Mohammed GAMAL a Mohammed ABDELKAWY. Simultaneous determination of hyoscine N-butyl bromide and paracetamol in their binary mixture by RP-HPLC method. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2017, **10**, S1868-S1874 [cit. 2020-05-06]. DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.07.015. ISSN 18785352. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878535213002153>
86. BABU, Raveendra, A RAO a J. Venkateswara RAO. Bioanalytical Method Development and Validation for Simultaneous Estimation of Paracetamol and Cefixime by using RP-HPLC in Rabbit Plasma. *Oriental Journal of Chemistry* [online]. 2016, **32**(1), 701-707 [cit. 2020-05-06]. DOI: 10.13005/ojc/320178. ISSN 0970020X. Dostupné z: <http://www.orientjchem.org/vol32no1/bioanalytical-method-development-and-validation-for-simultaneous-estimation-of-paracetamol-and-cefixime-by-using-rp-hplc-in/>
87. ACHEAMPONG, Akwasi, Wilfred Owusu GYASI, Godfred DARKO, Joseph APAU a Sylvester ADDAI-ARHIN. Validated RP-HPLC method for simultaneous determination and quantification of chlorpheniramine maleate, paracetamol and caffeine in tablet

- formulation. *SpringerPlus* [online]. 2016, **5**(1), 1-8 [cit. 2020-05-06]. DOI: 10.1186/s40064-016-2241-2. ISSN 2193-1801. Dostupné z: <http://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/s40064-016-2241-2>
88. ZHU, Tian, Li DING, Xiaofeng GUO, Lin YANG a Aidong WEN. Simultaneous Determination of Tramadol and Acetaminophen in Human Plasma by LC–ESI–MS. *Chromatographia* [online]. 2007, **66**(3-4), 171-178 [cit. 2020-05-06]. DOI: 10.1365/s10337-007-0268-9. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1365/s10337-007-0268-9>
89. KHAN, Hamid, Mushir ALI, Sayeed AHMAD, Niyaz AHMAD, Alka AHUJA, Sanjula BABOOTA a Javed ALI. Validated UPLC/Q-TOF-MS method for simultaneous determination of aceclofenac, paracetamol, and their degradation products in tablets. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* [online]. 2012, **35**(1), 109-128 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1080/10826076.2011.597063. ISSN 1082-6076. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10826076.2011.597063>
90. ZHANG, Yi, Nitin MEHROTRA, Nageshwar R. BUDHA, Michael L. CHRISTENSEN a Bernd MEIBOHM. A tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of acetaminophen, caffeine, phenytoin, ranitidine, and theophylline in small volume pediatric plasma specimens. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2008, **398**(1-2), 105-112 [cit. 2020-04-24]. DOI: 10.1016/j.cca.2008.08.023. ISSN 00098981. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898108004348>
91. HAIRIN, T., A. R. MARZILAWATI, E. M. H. DIDI, S. MAHADEVA, Y. K. LEE, N. ABD. RAHMAN, A. M. MUSTAFA a Z. CHIK. Quantitative LC/MS/MS analysis of acetaminophen–cysteine adducts (APAP–CYS) and its application in acetaminophen overdose patients. *Analytical Methods* [online]. 2013, **5**(8), 1955-1964 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.1039/c3ay26614a. ISSN 1759-9660. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3ay26614a>
92. ESTERHUIZEN-LONDT, Maranda, Katrin SCHWARTZ, Evelyn BALSANO, Sandra KÜHN a Stephan PFLUGMACHER. LC–MS/MS method development for quantitative analysis of acetaminophen uptake by the aquatic fungus *Mucor hiemalis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2016, **128**, 230-235 [cit. 2020-04-25]. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.02.029. ISSN 01476513. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651316300598>
93. ČESLA, Petr, Tomáš HÁJEK a Pavel JANDERA. Optimization of two-dimensional gradient liquid chromatography separations. *Journal of Chromatography A* [online]. 2009,

- 1216(16), 3443-3457 [cit. 2020-06-25]. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.08.111. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967308014556>
94. ČESLA, Petr, Nikola VAŇKOVÁ, Jana KŘENKOVÁ a Jan FISCHER. Comparison of isocratic retention models for hydrophilic interaction liquid chromatographic separation of native and fluorescently labeled oligosaccharides. *Journal of Chromatography A* [online]. 2016, 1438, 179-188 [cit. 2020-06-25]. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.02.032. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967316301315>

6 PŘÍLOHY

Příloha 1 Retenční faktory na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě (90:10, v/v) s 0,1 % HCOOH

kolona HILIC	90 % AcN + 10 % H ₂ O + 0,1 % HCOOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	<i>ln k</i>
Acenaften (t(M))	1,16	1,16	1,16		
APAP (AcN)	1,29	1,29	1,29	0,112	-2,186
APAP (H ₂ O)	1,31	1,31	1,31	0,134	-2,007
APAP-NAC	1,37	1,40	1,39	0,198	-1,619
APAP-CYS	1,27	1,29	1,28	0,108	-2,225
APAP-SG	1,28	1,29	1,28	0,110	-2,209

Příloha 2 Retenční faktory na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě (95:5, v/v) s 0,1 % HCOOH

kolona HILIC	95 % AcN + 5 % H ₂ O + 0,1 % HCOOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	<i>ln k</i>
Acenaften (t(M))	1,16	1,16	1,16		
APAP (AcN)	1,35	1,35	1,35	0,166	-1,799
APAP (H ₂ O)	1,27	1,27	1,27	0,092	-2,383
APAP-NAC	1,62	1,63	1,63	0,403	-0,910
APAP-CYS	1,28	1,38	1,33	0,147	-1,917
APAP-SG	1,33	1,34	1,34	0,153	-1,880

Příloha 3 Retenční faktory na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě (96:4, v/v) s 0,1 % HCOOH

kolona HILIC	96 % AcN + 4 % H ₂ O + 0,1 % HCOOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	<i>ln k</i>
Acenaften (t(M))	1,16	1,16	1,16		
APAP (AcN)	1,35	1,35	1,35	0,170	-1,775
APAP (H ₂ O)	1,28	1,27	1,28	0,104	-2,265
APAP-NAC	1,84	1,85	1,85	0,598	-0,514
APAP-CYS	1,34	1,34	1,34	0,157	-1,854
APAP-SG	1,33	1,34	1,33	0,154	-1,871

Příloha 4 Retenční faktory na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě (97:3, v/v) s 0,1 % HCOOH

kolona HILIC	97 % AcN + 3 % H ₂ O + 0,1 % HCOOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	<i>ln k</i>
Acenaften (t(M))	1,16	1,16	1,16		
APAP (AcN)	1,38	1,38	1,38	0,193	-1,644
APAP (H ₂ O)	1,29	1,28	1,29	0,111	-2,197
APAP-NAC	2,01	2,06	2,04	0,760	-0,274
APAP-CYS	1,31	1,32	1,32	0,137	-1,984
APAP-SG	1,36	1,36	1,36	0,174	-1,747

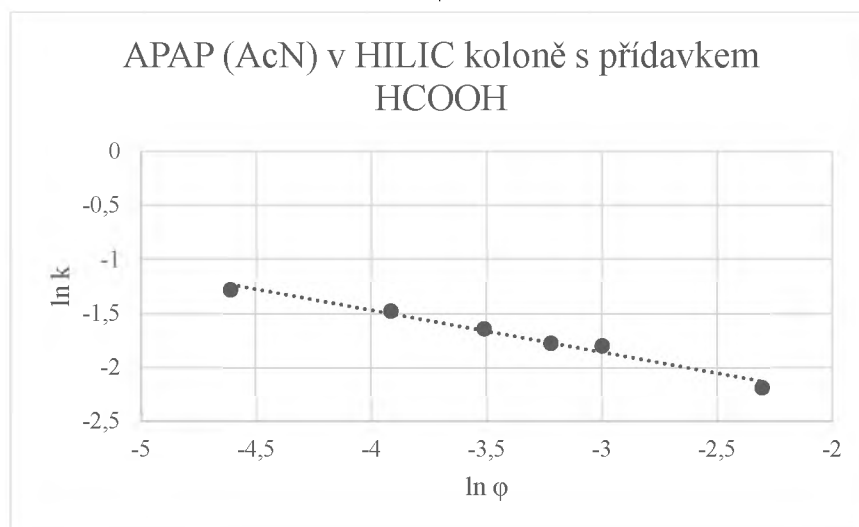
Příloha 5 Retenční faktory na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě (98:2, v/v) s 0,1 % HCOOH

kolona HILIC	98 % AcN + 2 % H ₂ O + 0,1 % HCOOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,16	1,16	1,16		
APAP (AcN)	1,42	1,42	1,42	0,223	-1,500
APAP (H ₂ O)	1,31	1,30	1,30	0,123	-2,098
APAP-NAC	1,96	1,96	1,96	0,688	-0,374
APAP-CYS	1,39	1,39	1,39	0,198	-1,619
APAP-SG	1,39	1,39	1,39	0,199	-1,615

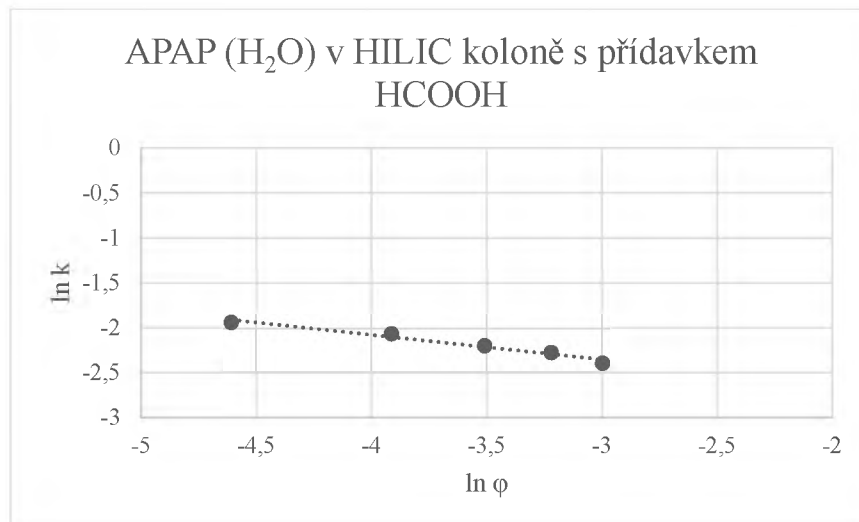
Příloha 6 Retenční faktory na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě (99:1, v/v) s 0,1 % HCOOH

kolona HILIC	99 % AcN + 1 % H ₂ O + 0,1 % HCOOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,16	1,17	1,16		
APAP (AcN)	1,47	1,48	1,48	0,270	-1,309
APAP (H ₂ O)	1,33	1,32	1,32	0,138	-1,980
APAP-NAC	2,30	2,30	2,30	0,980	-0,020
APAP-CYS	1,49	1,48	1,48	0,276	-1,289
APAP-SG	1,47	1,48	1,48	0,270	-1,309

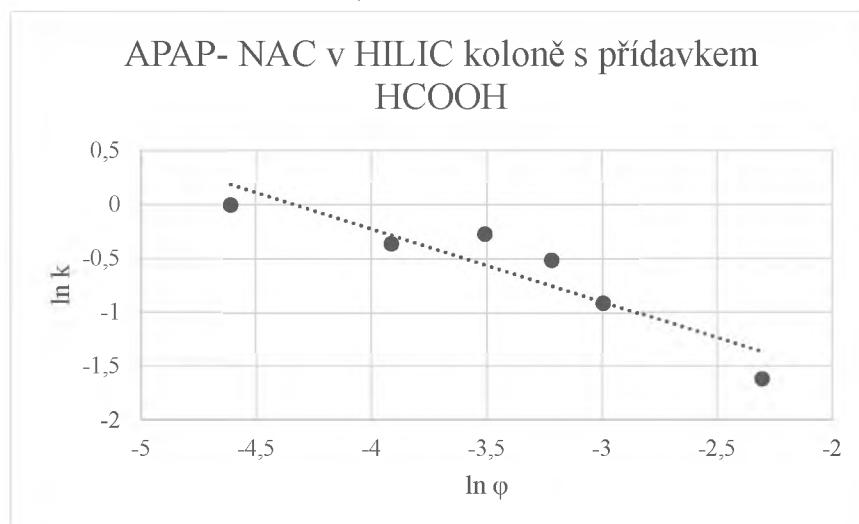
Příloha 7 Graf závislosti APAP v acetonitrilu ln *k* na ln φ na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě s 0,1 % HCOOH



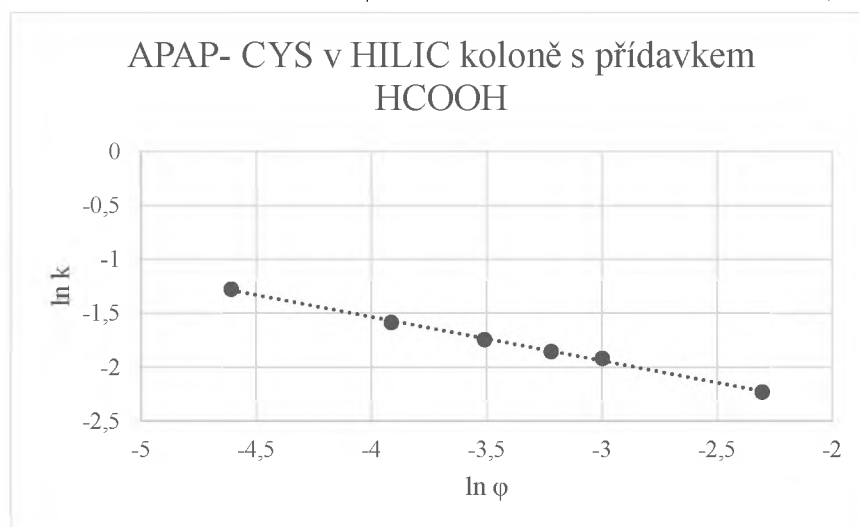
Příloha 8 Graf závislosti APAP ve vodě $\ln k$ na $\ln \phi$ na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě s 0,1 % HCOOH



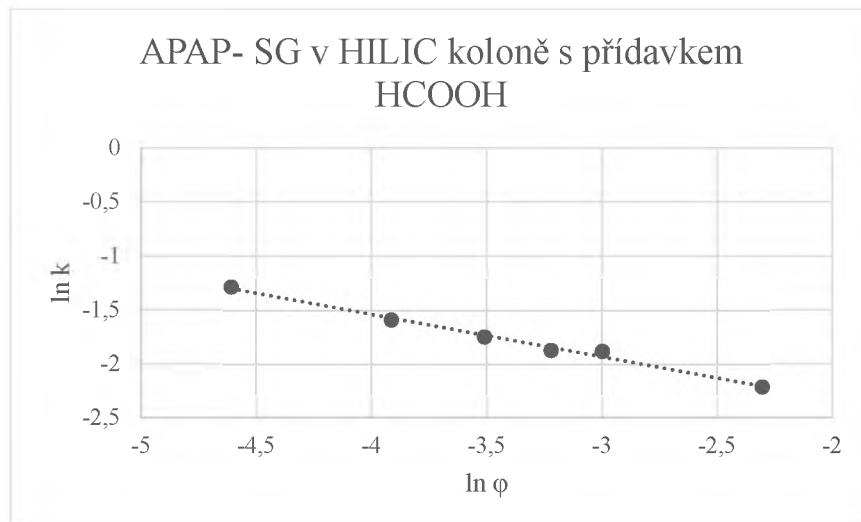
Příloha 9 Graf závislosti APAP-NAC $\ln k$ na $\ln \phi$ na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě s 0,1 % HCOOH



Příloha 10 Graf závislosti APAP-CYS $\ln k$ na $\ln \phi$ na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě s 0,1 % HCOOH



Příloha 11 Graf závislosti APAP-SG $\ln k$ na $\ln \phi$ na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě s 0,1 % HCOOH



Příloha 12 Hodnoty lineární regrese pro retenci paracetamolu a jeho metabolitů v mobilní fázi acetonitril a voda s 0,1 % kyseliny mravenčí v HILIC koloně

	Úsek	Směrodatná odchylka úseku	Směrnice	Směrodatná odchylka směrnice	Koeficient determinace
APAP (AcN)	-0,388	0,029	-3,020	0,100	0,979
APAP (H ₂ O)	-0,083	0,099	-2,425	0,348	0,149
APAP-NAC	-0,672	0,139	-2,917	0,488	0,853
APAP-CYS	-0,403	0,009	-3,148	0,033	0,998
APAP-SG	-0,393	0,018	-3,108	0,064	0,991

Příloha 13 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (90:10, v/v) s 0,1 % HCOOH

kolona OH5	90 % AcN + 10 % H ₂ O + 0,1 % HCOOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor k	$\ln k$
Acenaften (t(M))	1,07	1,07	1,07		
APAP (AcN)	1,33	1,33	1,33	0,236	-1,444
APAP (H ₂ O)	1,27	1,27	1,27	0,184	-1,691
APAP-NAC	4,86	4,86	4,86	3,524	1,260
APAP-CYS	1,47	1,47	1,47	0,367	-1,002
APAP-SG	1,47	1,47	1,47	0,368	-1,000

Příloha 14 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (95:5, v/v) s 0,1 % HCOOH

kolona OH5	95 % AcN + 5 % H ₂ O + 0,1 % HCOOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor k	$\ln k$
Acenaften (t(M))	1,12	1,12	1,12		
APAP (AcN)	1,36	1,51	1,44	0,278	-1,281
APAP (H ₂ O)	1,38	1,38	1,38	0,225	-1,492
APAP-NAC	1,50	1,49	1,50	0,332	-1,104
APAP-CYS	2,10	2,10	2,10	0,869	-0,140
APAP-SG	1,52	1,52	1,52	0,353	-1,042

Příloha 15 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (96:4, v/v) s 0,1 % HCOOH

kolona OH5	96 % AcN + 4 % H ₂ O + 0,1 % HCOOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	<i>ln k</i>
Acenaften (t(M))	1,12	1,12	1,12		
APAP (AcN)	1,54	1,54	1,54	0,379	-0,971
APAP (H ₂ O)	1,38	1,38	1,38	0,232	-1,461
APAP-NAC	1,49	1,49	1,49	0,337	-1,087
APAP-CYS	2,20	2,20	2,20	0,974	-0,027
APAP-SG	1,51	1,51	1,51	0,351	-1,046

Příloha 16 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (97:3, v/v) s 0,1 % HCOOH

kolona OH5	97 % AcN + 3 % H ₂ O + 0,1 % HCOOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	<i>ln k</i>
Acenaften (t(M))	1,13	1,13	1,13		
APAP (AcN)	1,60	1,60	1,60	0,416	-0,878
APAP (H ₂ O)	1,40	1,40	1,40	0,234	-1,454
APAP-CYS	2,74	2,75	2,75	1,428	0,356
APAP-SG	1,53	1,53	1,53	0,349	-1,053

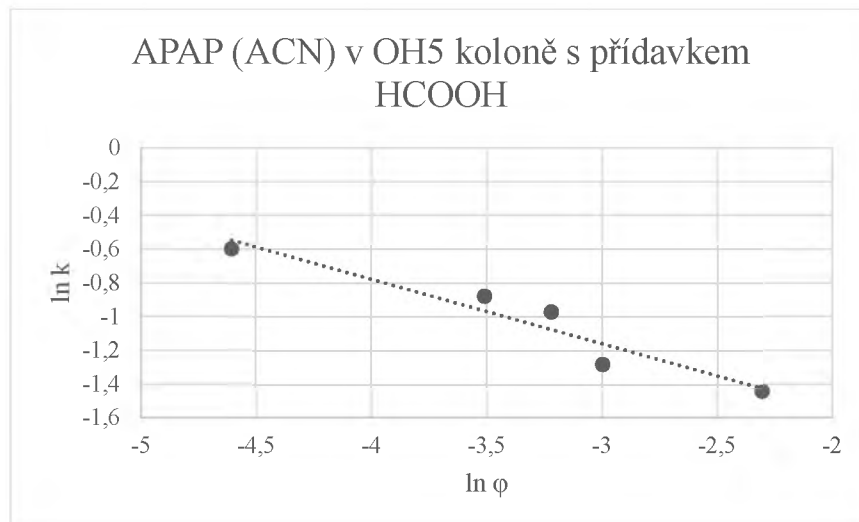
Příloha 17 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (98:2, v/v) s 0,1 % HCOOH

kolona OH5	98 % AcN + 2 % H ₂ O + 0,1 % HCOOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	<i>ln k</i>
Acenaften (t(M))	1,11	1,11	1,11		
APAP (AcN)	1,43	1,43	1,43	0,286	-1,253
APAP (H ₂ O)	1,36	1,36	1,36	0,223	-1,503
APAP-NAC	8,10	8,27	8,19	6,374	1,852
APAP-CYS	1,88	1,89	1,88	0,695	-0,363
APAP-SG	1,50	1,49	1,50	0,347	-1,059

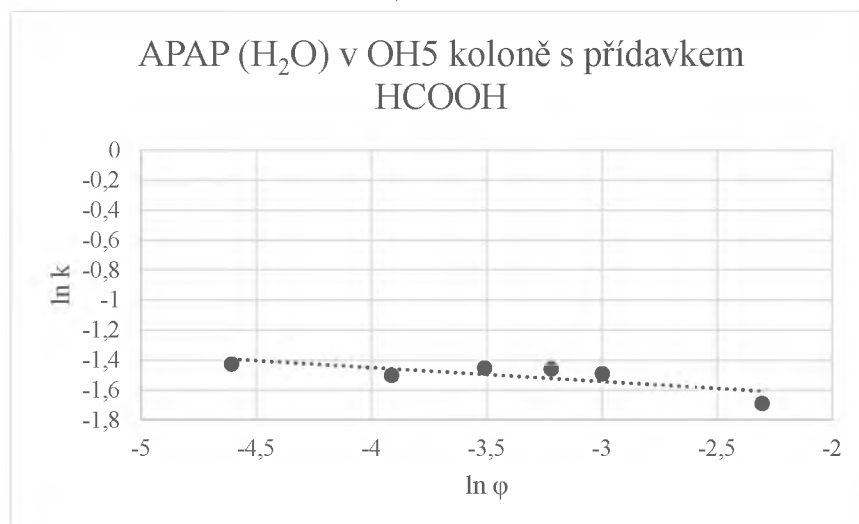
Příloha 18 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (99:1, v/v) s 0,1 % HCOOH

kolona OH5	99 % AcN + 1 % H ₂ O + 0,1 % HCOOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	<i>ln k</i>
Acenaften (t(M))	1,14	1,15	1,14		
APAP (AcN)	1,77	1,78	1,77	0,550	-0,598
APAP (H ₂ O)	1,42	1,42	1,42	0,240	-1,429
APAP-NAC	1,49	1,49	1,49	0,305	-1,188
APAP-CYS	4,40	4,51	4,46	2,896	1,063
APAP-SG	1,60	1,61	1,61	0,404	-0,905

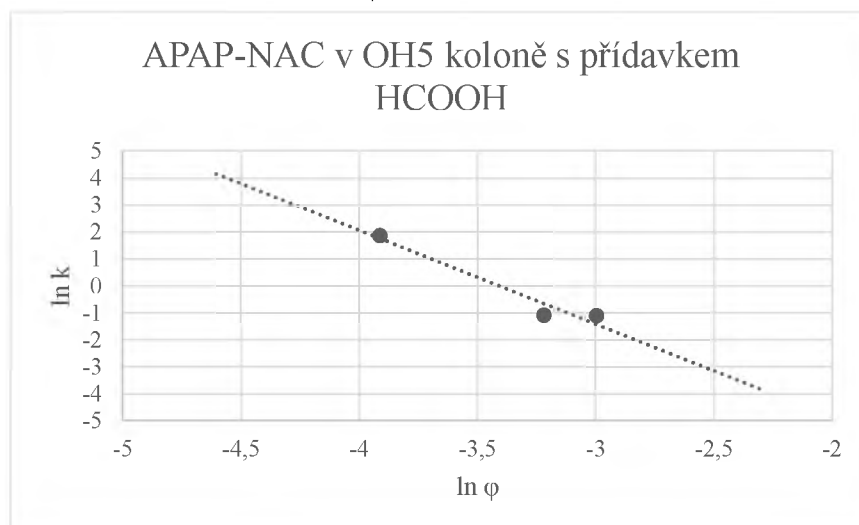
Příloha 19 Graf závislosti APAP ve acetonitrilu $\ln k$ na $\ln \phi$ na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 0,1 % HCOOH



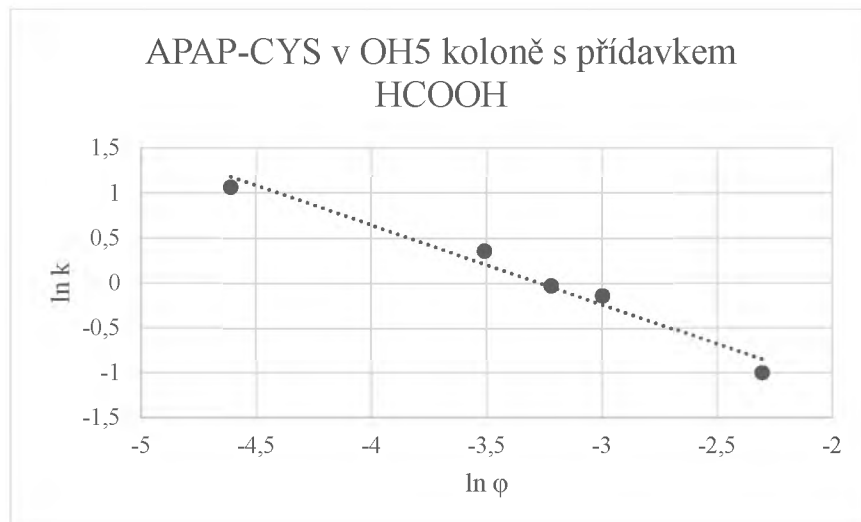
Příloha 20 Graf závislosti APAP ve vodě $\ln k$ na $\ln \phi$ na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 0,1 % HCOOH



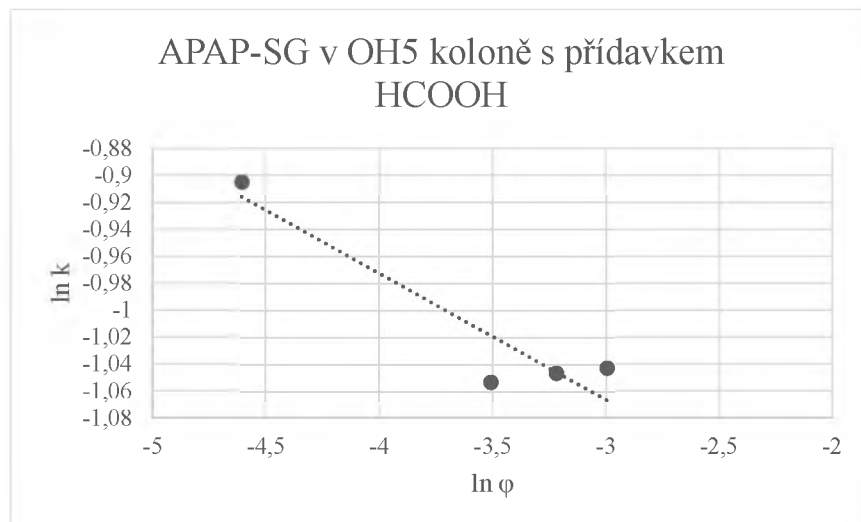
Příloha 21 Graf závislosti APAP-NAC $\ln k$ na $\ln \phi$ na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 0,1 % HCOOH



Příloha 22 Graf závislosti APAP-CYS $\ln k$ na $\ln \phi$ na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 0,1 % HCOOH



Příloha 23 Graf závislosti APAP-SG $\ln k$ na $\ln \phi$ na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 0,1 % HCOOH



Příloha 24 Hodnoty lineární regrese pro retenci paracetamolu a jeho metabolitů v mobilní fázi acetonitril a voda s 0,1 % kyseliny mravenčí v HILIC koloně

	Úsek	Směrodatná odchylka úseku	Směrnice	Směrodatná odchylka směrnice	Koeficient determinace
APAP (AcN)	-0,381	0,065	-2,301	0,222	0,920
APAP (H₂O)	-0,093	0,038	-1,822	0,134	0,594
APAP-NAC	-3,467	0,814	-11,815	2,767	0,948
APAP-CYS	-0,881	0,089	-2,879	0,303	0,970
APAP-SG	-0,093	0,025	-1,346	0,090	0,877

Příloha 25 Retenční faktory na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě (90:10, v/v) s 0,1 % CH₃COOH

kolona HILIC	90 % AcN + 10 % H ₂ O + 0,1 % CH ₃ COOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor k	$\ln k$
Acenaften (t(M))	1,15	1,15	1,15		
APAP (AcN)	1,27	1,27	1,27	0,107	-2,230

kolona HILIC	90 % AcN + 10 % H ₂ O + 0,1 % CH ₃ COOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	<i>ln k</i>
APAP (H ₂ O)	1,24	1,25	1,24	0,080	-2,525
APAP-NAC	1,45	1,45	1,45	0,261	-1,345
APAP-CYS	1,16	1,16	1,16	0,010	-4,649
APAP-SG	1,27	1,27	1,27	0,101	-2,289

Příloha 26 Retenční faktory na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě (95:5, v/v) s 0,1 % CH₃COOH

kolona HILIC	95 % AcN + 5 % H ₂ O + 0,1 % CH ₃ COOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	<i>ln k</i>
Acenaften (t(M))	1,14	1,15	1,15		
APAP (AcN)	1,33	1,33	1,33	0,159	-1,839
APAP (H ₂ O)	1,27	1,27	1,27	0,107	-2,233
APAP-NAC	1,80	1,79	1,80	0,566	-0,568
APAP-CYS	1,31	1,31	1,31	0,140	-1,967
APAP-SG	1,31	1,32	1,32	0,146	-1,924

Příloha 27 Retenční faktory na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě (96:4, v/v) s 0,1 % CH₃COOH

kolona HILIC	96 % AcN + 4 % H ₂ O + 0,1 % CH ₃ COOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	<i>ln k</i>
Acenaften (t(M))	1,15	1,16	1,15		
APAP (AcN)	1,35	1,35	1,35	0,173	-1,757
APAP (H ₂ O)	1,28	1,28	1,28	0,107	-2,234
APAP-NAC	1,68	1,69	1,69	0,464	-0,767
APAP-CYS	1,28	1,28	1,28	0,107	-2,230
APAP-SG	1,33	1,33	1,33	0,154	-1,872

Příloha 28 Retenční faktory na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě (97:3, v/v) s 0,1 % CH₃COOH

kolona HILIC	97 % AcN + 3 % H ₂ O + 0,1 % CH ₃ COOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	<i>ln k</i>
Acenaften (t(M))	1,16	1,16	1,16		
APAP (AcN)	1,38	1,38	1,38	0,194	-1,640
APAP (H ₂ O)	1,29	1,29	1,29	0,115	-2,164
APAP-NAC	1,73	1,74	1,74	0,499	-0,695
APAP-CYS	1,32	1,32	1,32	0,140	-1,970
APAP-SG	1,36	1,36	1,36	0,172	-1,758

Příloha 29 Retenční faktory na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě (98:2, v/v) s 0,1 % CH₃COOH

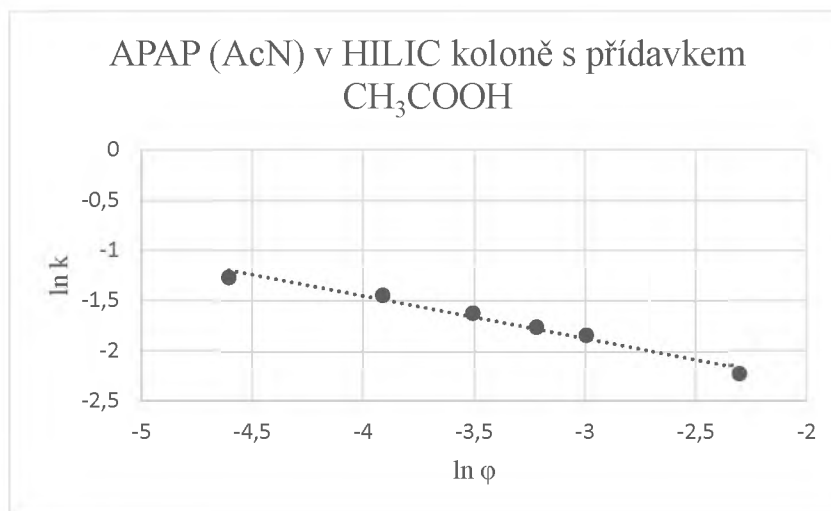
kolona HILIC	98 % AcN + 2 % H ₂ O + 0,1 % CH ₃ COOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	<i>ln k</i>
Acenaften (t(M))	1,16	1,16	1,16		
APAP (AcN)	1,43	1,43	1,43	0,227	-1,484
APAP (H ₂ O)	1,30	1,31	1,30	0,123	-2,099
APAP-NAC	1,80	1,82	1,81	0,556	-0,588

kolona HILIC	98 % AcN + 2 % H ₂ O + 0,1 % CH ₃ COOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
APAP-CYS	1,40	1,40	1,40	0,202	-1,600
APAP-SG	1,39	1,39	1,39	0,200	-1,611

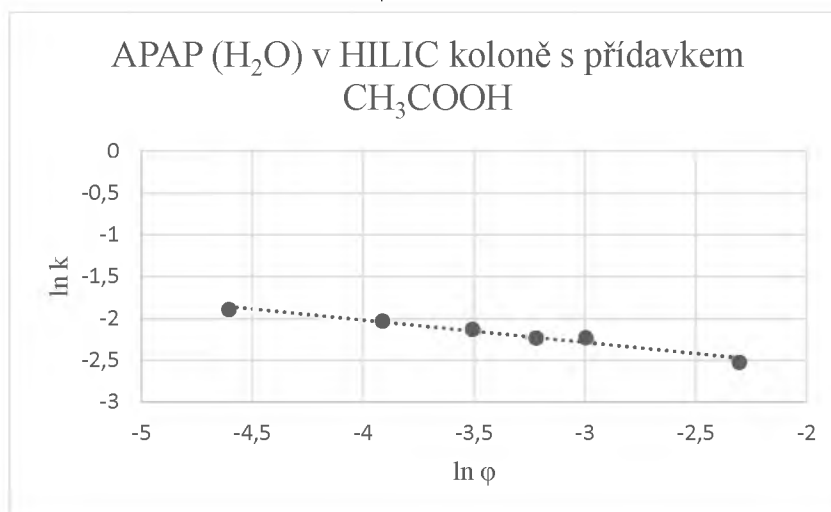
Příloha 30 Retenční faktory na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě (99:1, v/v) s 0,1 % CH₃COOH

kolona HILIC	99 % AcN + 1 % H ₂ O + 0,1 % CH ₃ COOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,16	1,17	1,17		
APAP (AcN)	1,48	1,48	1,48	0,268	-1,318
APAP (H ₂ O)	1,33	1,33	1,33	0,138	-1,980
APAP-NAC	1,85	1,85	1,85	0,587	-0,533
APAP-CYS	1,54	1,53	1,53	0,312	-1,164
APAP-SG	1,35	1,37	1,36	0,167	-1,791

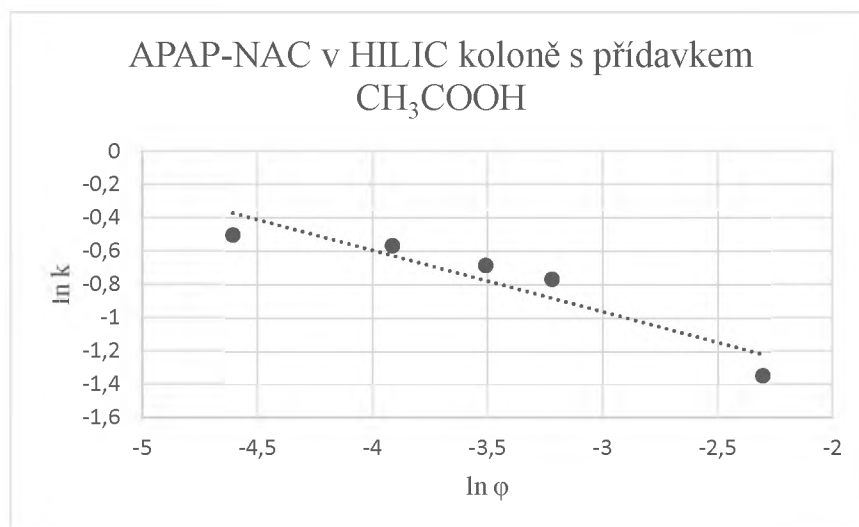
Příloha 31 Graf závislosti APAP v acetonitrilu ln *k* na ln φ na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě s 0,1 % CH₃COOH



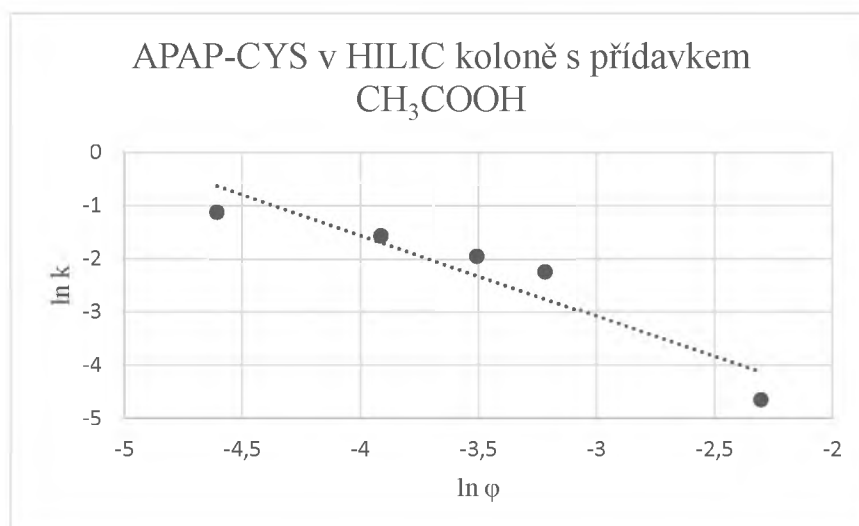
Příloha 32 Graf závislosti APAP ve vodě ln *k* na ln φ na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě s 0,1 % CH₃COOH



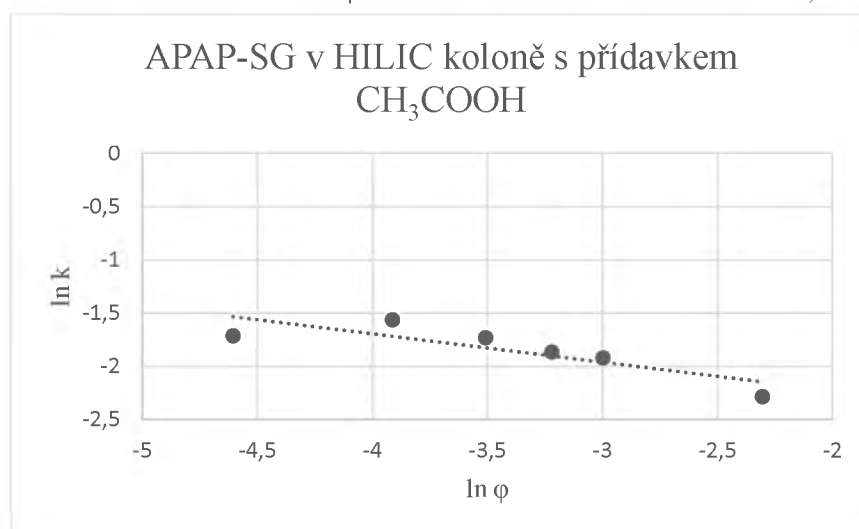
Příloha 33 Graf závislosti APAP-NAC $\ln k$ na $\ln \phi$ na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě s 0,1 % CH_3COOH



Příloha 34 Graf závislosti APAP-CYS $\ln k$ na $\ln \phi$ na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě s 0,1 % CH_3COOH



Příloha 35 Graf závislosti APAP-SG $\ln k$ na $\ln \phi$ na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě s 0,1 % CH_3COOH



Příloha 36 Hodnoty lineární regrese pro retenci paracetamolu a jeho metabolitů v mobilní fázi acetonitril a voda s 0,1 % kyseliny octové v HILIC koloně

	Úsek	Směrodatná odchylka úseku	Směrnice	Směrodatná odchylka směrnice	Koeficient determinace
APAP (AcN)	-0,418	0,034	-3,126	0,119	0,974
APAP-NAC	-0,367	0,082	-2,061	0,293	0,871
APAP-CYS	-1,517	0,323	-7,624	1,161	0,880
APAP-SG	-0,266	0,084	-2,762	0,293	0,717

Příloha 37 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (90:10, v/v) s 0,1 % CH₃COOH

kolona OH5	90 % AcN + 10 % H ₂ O + 0,1 % CH ₃ COOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,07		1,07		
APAP (AcN)	1,33	1,33	1,33	0,248	-1,396
APAP-NAC	4,77	4,63	4,70	3,407	1,226
APAP-CYS	1,50	1,48	1,49	0,399	-0,918
APAP-SG	1,48	1,48	1,48	0,390	-0,942

Příloha 38 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (95:5, v/v) s 0,1 % CH₃COOH

kolona OH5	95 % AcN + 5 % H ₂ O + 0,1 % CH ₃ COOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,13	1,13	1,13		
APAP (AcN)	1,52	1,50	1,51	0,337	-1,088
APAP-NAC	2,13	2,13	2,13	0,887	-0,120
APAP-CYS	1,53	1,53	1,53	0,355	-1,036
APAP-SG	1,57	1,57	1,57	0,389	-0,944

Příloha 39 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (96:4, v/v) s 0,1 % CH₃COOH

kolona OH5	96 % AcN + 4 % H ₂ O + 0,1 % CH ₃ COOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,12	1,12	1,12		
APAP (AcN)	1,53	1,53	1,53	0,364	-1,011
APAP-NAC	2,33	2,33	2,33	1,081	0,078
APAP-CYS	2,34	2,34	2,34	1,085	0,082
APAP-SG	1,54	1,54	1,54	0,376	-0,978

Příloha 40 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (97:3, v/v) s 0,1 % CH₃COOH

kolona OH5	97 % AcN + 3 % H ₂ O + 0,1 % CH ₃ COOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,13	1,13	1,13		
APAP (AcN)	1,61	1,61	1,61	0,424	-0,858
APAP-NAC	2,86	2,86	2,86	1,525	0,422
APAP-CYS	2,86	2,86	2,86	1,525	0,422
APAP-SG	1,61	1,62	1,61	0,425	-0,856

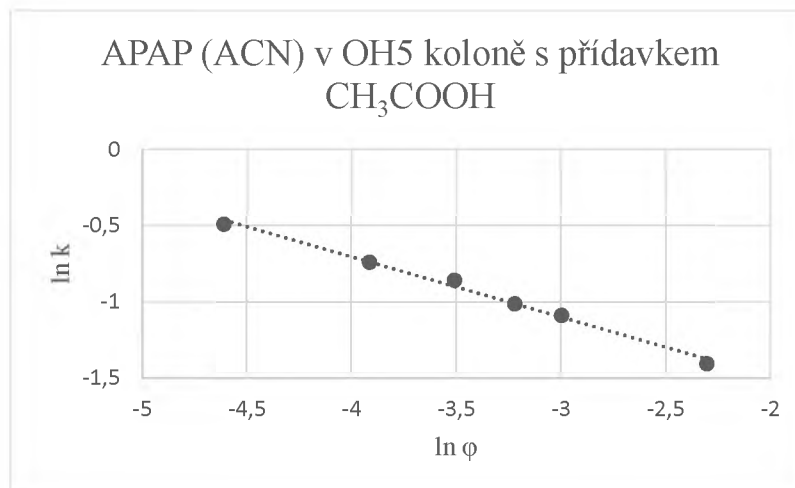
Příloha 41 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (98:2, v/v) s 0,1 % CH₃COOH

kolona OH5	98 % AcN + 2 % H ₂ O + 0,1 % CH ₃ COOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,14	1,15	1,14		
APAP (AcN)	1,69	1,69	1,69	0,478	-0,739
APAP-NAC	3,46	3,46	3,46	2,024	0,705
APAP-CYS	3,47	3,47	3,47	2,033	0,710
APAP-SG	1,70	1,69	1,70	0,481	-0,732

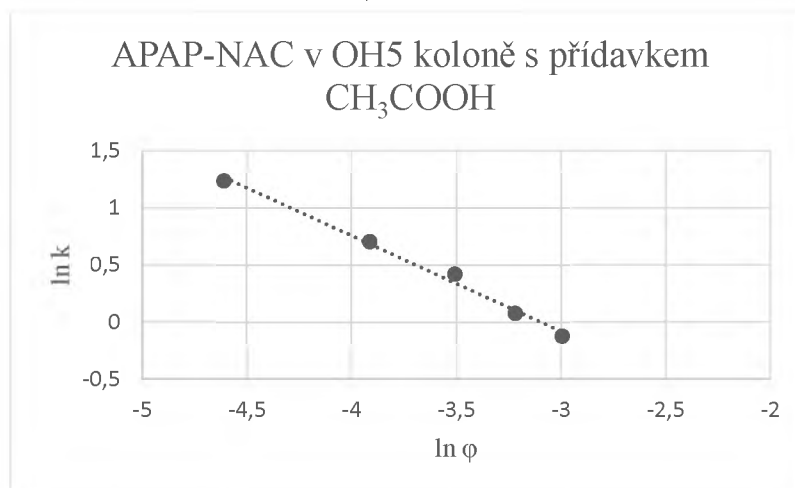
Příloha 42 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (99:1, v/v) s 0,1 % CH₃COOH

kolona OH5	99 % AcN + 1 % H ₂ O + 0,1 % CH ₃ COOH				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,16	1,16	1,16		
APAP (AcN)	1,87	1,87	1,87	0,611	-0,492
APAP-NAC	5,16	5,15	5,16	3,437	1,235
APAP-CYS	5,16	5,16	5,16	3,439	1,235
APAP-SG	1,87	1,87	1,87	0,608	-0,498

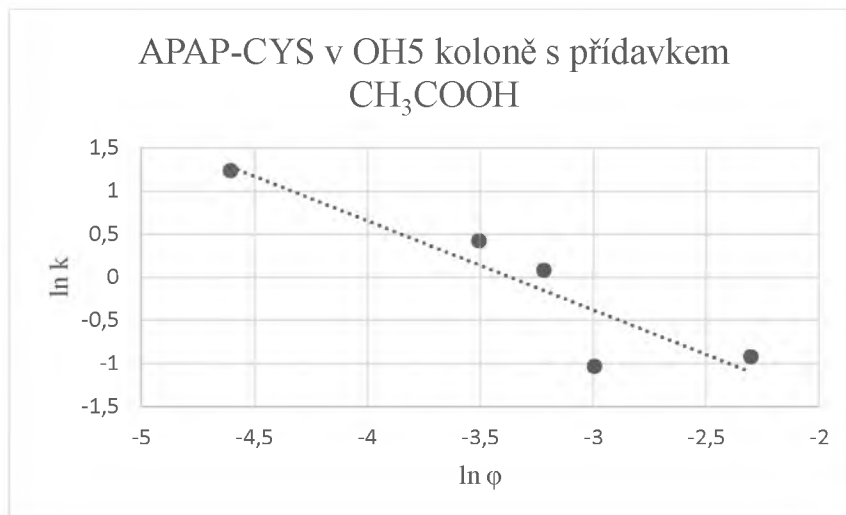
Příloha 43 Graf závislosti APAP v acetonitrilu ln *k* na ln φ na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 0,1 % CH₃COOH



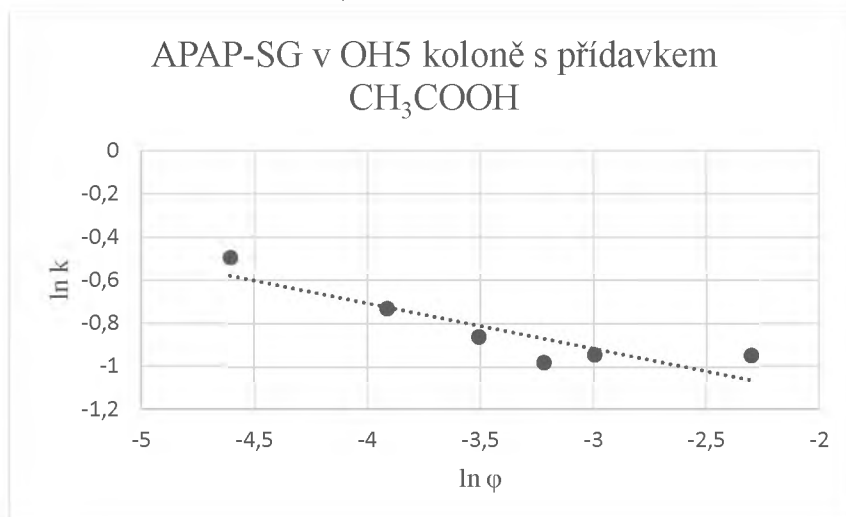
Příloha 44 Graf závislosti APAP-NAC ln *k* na ln φ na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 0,1 % CH₃COOH



Příloha 45 Graf závislosti APAP-CYS $\ln k$ na $\ln \phi$ na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 0,1 % CH₃COOH



Příloha 46 Graf závislosti APAP-SG $\ln k$ na $\ln \phi$ na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 0,1 % CH₃COOH



Příloha 47 Hodnoty lineární regrese pro retenci paracetamolu a jeho metabolitů v mobilní fázi acetonitril a voda s 0,1 % kyseliny octové v OH5 koloně

	Úsek	Směrodatná odchylka úseku	Směrnice	Směrodatná odchylka směrnice	Koeficient determinace
APAP (AcN)	-2,519	0,105	-5,771	0,102	0,993
APAP-NAC	-1,183	0,062	-3,099	0,041	0,992
APAP-CYS	-0,809	0,206	-3,361	0,176	0,837
APAP-SG	-3,820	0,976	-6,581	0,824	0,793

Příloha 48 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (90:10, v/v) s 10 mmol/l mravenčanem amonným

kolona OH5	90 % AcN + 10 % H ₂ O + 0,1 % HCOONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor k	$\ln k$
Acnaften (t(M))	1,16	1,30	1,23		
APAP (AcN)	1,46	1,51	1,49	0,206	-1,579
APAP (H₂O)	2,00	1,90	1,95	0,582	-0,541
APAP-SG	1,83	1,98	1,90	0,545	-0,607

Příloha 49 Retenční faktory na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě (90:10, v/v) s 10 mmol/l octanem amonným

kolona HILIC	90 % AcN + 10 % H ₂ O + 10 mmol/l CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,12	1,12	1,12		
APAP (AcN)	1,28	1,29	1,28	0,144	-1,939
APAP (H ₂ O)	1,45	1,45	1,45	0,292	-1,232
APAP-CYS	1,32	1,32	1,32	0,179	-1,720
APAP-SG	1,45	1,45	1,45	0,292	-1,232

Příloha 50 Retenční faktory na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě (95:5, v/v) s 10 mmol/l octanem amonným

kolona HILIC	95 % AcN + 5 % H ₂ O + 10 mmol/l CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,11	1,13	1,12		
APAP (AcN)	1,39	1,39	1,39	0,240	-1,427
APAP (H ₂ O)	1,57	1,57	1,57	0,398	-0,922
APAP-CYS	1,19	1,19	1,19	0,062	-2,782
APAP-SG	1,39	1,39	1,39	0,237	-1,442

Příloha 51 Retenční faktory na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě (94:6, v/v) s 10 mmol/l octanem amonným

kolona HILIC	96 % AcN + 4 % H ₂ O + 10 mmol/l CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,13	1,13	1,13		
APAP (AcN)	1,42	1,42	1,42	0,258	-1,355
APAP (H ₂ O)	1,53	1,53	1,53	0,357	-1,029
APAP-CYS	1,17	1,17	1,17	0,037	-3,291
APAP-SG	1,42	1,42	1,42	0,258	-1,353

Příloha 52 Retenční faktory na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě (97:3, v/v) s 10 mmol/l octanem amonným

kolona HILIC	97 % AcN + 3 % H ₂ O + 10 mmol/l CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,13	1,13	1,13		
APAP (AcN)	1,48	1,47	1,47	0,304	-1,192
APAP (H ₂ O)	1,60	1,59	1,60	0,411	-0,890
APAP-CYS	1,21	1,22	1,21	0,073	-2,624
APAP-SG	2,89	2,88	2,89	1,553	0,440

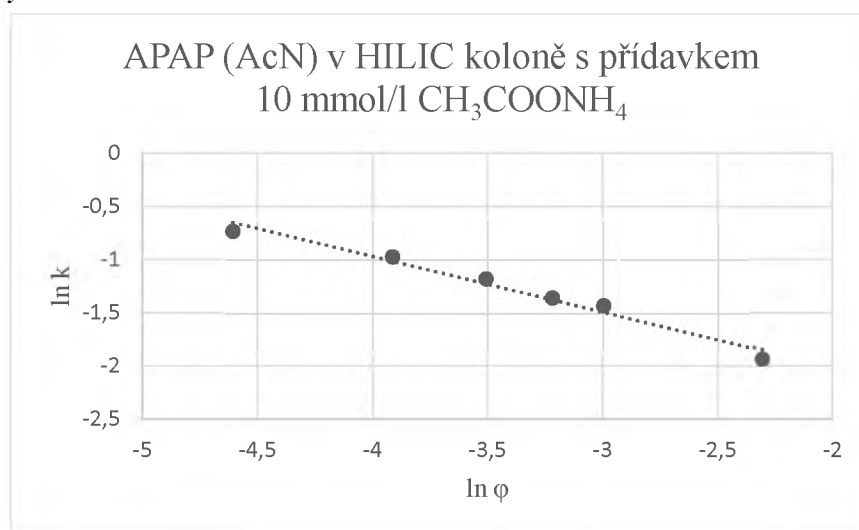
Příloha 53 Retenční faktory na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě (98:2, v/v) s 10 mmol/l octanem amonným

kolona HILIC	98 % AcN + 2 % H ₂ O + 10 mmol/l CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,13	1,14	1,14		
APAP (AcN)	1,56	1,55	1,55	0,367	-1,004
APAP (H ₂ O)	1,53	1,53	1,53	0,343	-1,070
APAP-CYS	1,27	1,27	1,27	0,114	-2,173
APAP-SG	1,10	1,10	1,10	-0,031	

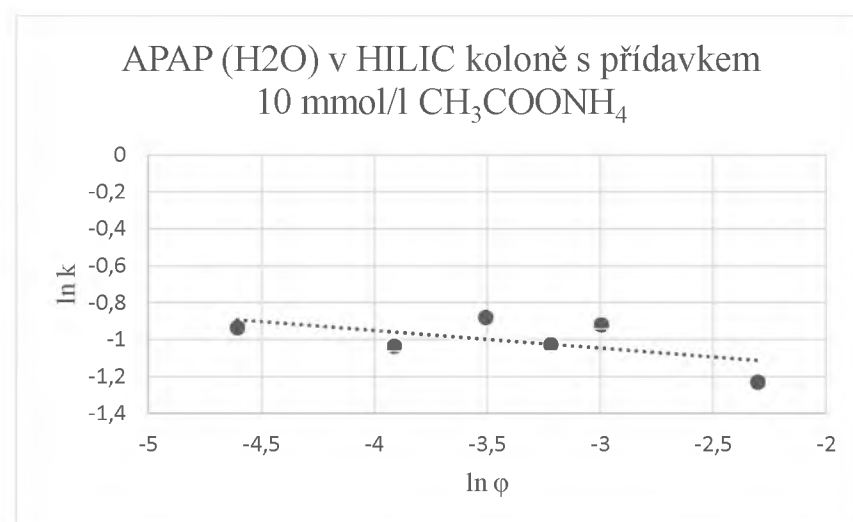
Příloha 54 Retenční faktory na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě (99:1, v/v) s 10 mmol/l octanem amonným

kolona HILIC	99 % AcN + 1 % H ₂ O + 10 mmol/l CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,14	1,15	1,14		
APAP (AcN)	1,67	1,67	1,67	0,464	-0,769
APAP (H ₂ O)	1,57	1,57	1,57	0,376	-0,978
APAP-CYS	1,34	1,35	1,34	0,178	-1,726
APAP-SG	1,10	1,10	1,10	-0,034	

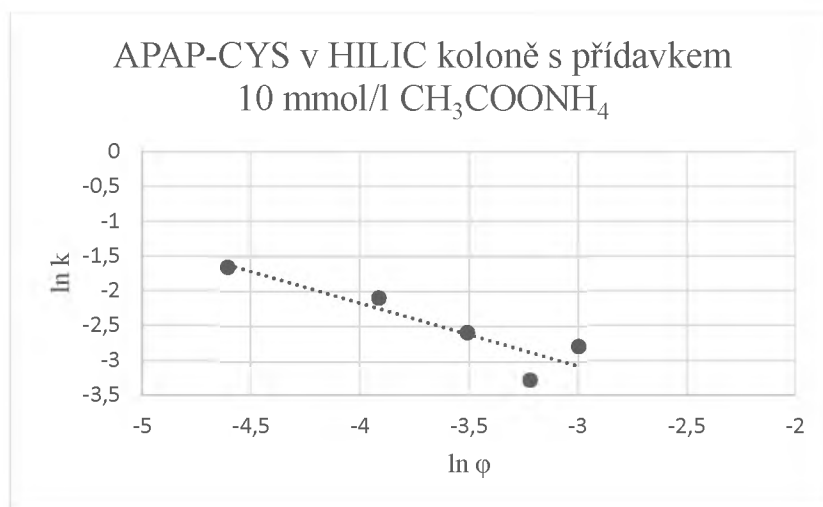
Příloha 55 Graf závislosti APAP v acetonitrilu ln *k* na ln φ na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě s 10 mmol/l octanem amonným



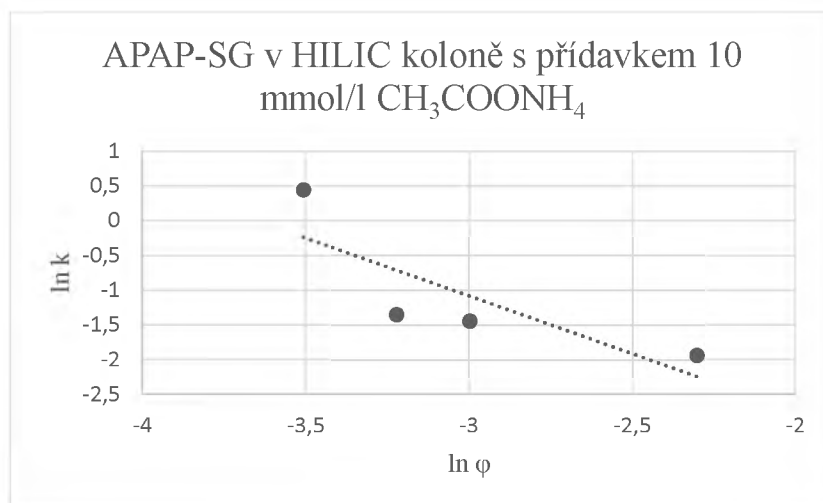
Příloha 56 Graf závislosti APAP ve vodě ln *k* na ln φ na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě s 10 mmol/l octanem amonným



Příloha 57 Graf závislosti APAP-CYS $\ln k$ na $\ln \phi$ na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě s 10 mmol/l octanem amonným



Příloha 58 Graf závislosti APAP-SG $\ln k$ na $\ln \phi$ na HILIC koloně v acetonitrilu a vodě s 10 mmol/l octanem amonným



Příloha 59 Hodnoty lineární regrese pro retenci paracetamolu a jeho metabolitů v mobilní fázi acetonitril a voda s 10 mmol/l kyseliny octové v HILIC koloně

	Úsek	Směrodatná odchylka úseku	Směrnice	Směrodatná odchylka směrnice	Koeficient determinace
APAP (AcN)	-0,519	0,043	-3,045	0,149	0,974
APAP (H ₂ O)	-0,096	0,064	-1,334	0,225	0,356
APAP-CYS	-0,900	0,243	-5,763	0,895	0,821
APAP-SG	-1,654	0,829	-6,039	2,518	0,666

Příloha 60 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (90:10, v/v) s 10 mmol/l octanem amonným

kolona OH5	90 % AcN + 10 % H ₂ O + 10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor k	$\ln k$
Acenaften (t(M))	1,04	1,02	1,03		
APAP (AcN)	1,29	1,35	1,32	0,279	-1,277
APAP (H ₂ O)	1,28	1,33	1,30	0,263	-1,334
APAP-CYS	1,36	1,36	1,36	0,313	-1,162

Příloha 61 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (95:5, v/v) s 10 mmol/l octanem amonným

kolona OH5	95 % AcN + 5 % H ₂ O + 10 mM CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,15		1,15		
APAP (AcN)	1,57	1,57	1,57	0,362	-1,017
APAP (H ₂ O)	1,53	1,53	1,53	0,325	-1,123
APAP-CYS	2,62	2,62	2,62	1,273	0,241

Příloha 62 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (96:4, v/v) s 10 mmol/l octanem amonným

kolona OH5	96 % AcN + 4 % H ₂ O + 10 mM CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,12	1,13	1,12		
APAP (AcN)	1,63	1,72	1,67	0,490	-0,714
APAP (H ₂ O)	1,58	1,59	1,59	0,414	-0,882
APAP-CYS	3,11	7,42	5,27	3,692	1,306

Příloha 63 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (97:3, v/v) s 10 mmol/l octanem amonným

kolona OH5	97 % AcN + 3 % H ₂ O + 10 mM CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,12	1,13	1,12		
APAP (AcN)	1,70	1,72	1,71	0,525	-0,645
APAP (H ₂ O)	1,62	1,60	1,61	0,435	-0,833
APAP-CYS	1,71	1,71	1,71	0,521	-0,653

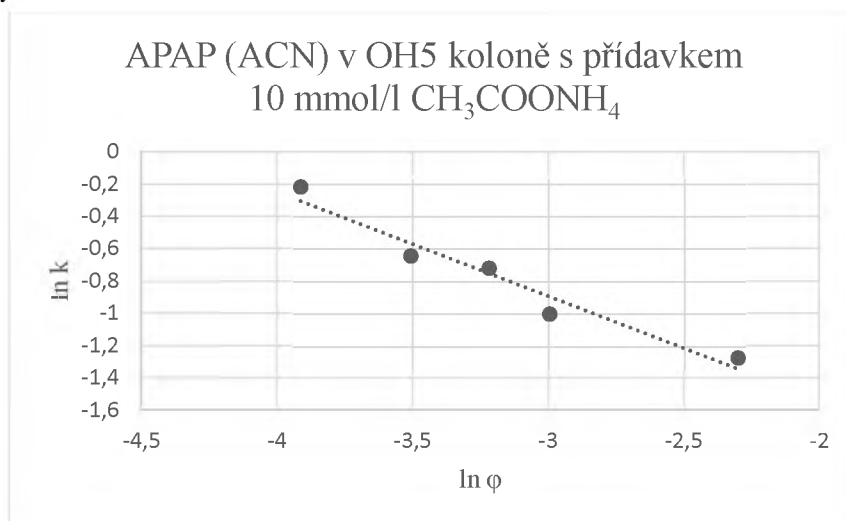
Příloha 64 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (98:2, v/v) s 10 mmol/l octanem amonným

kolona OH5	98 % AcN + 2 % H ₂ O + 10 mM CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,17	1,22	1,19		
APAP (AcN)	2,03	2,27	2,15	0,803	-0,219
APAP (H ₂ O)	2,83	3,20	3,02	1,529	0,425
APAP-NAC	4,46	5,46	4,96	3,155	1,149
APAP-CYS	1,89	1,91	1,90	0,592	-0,524
APAP-SG	2,87	3,52	3,20	1,679	0,518

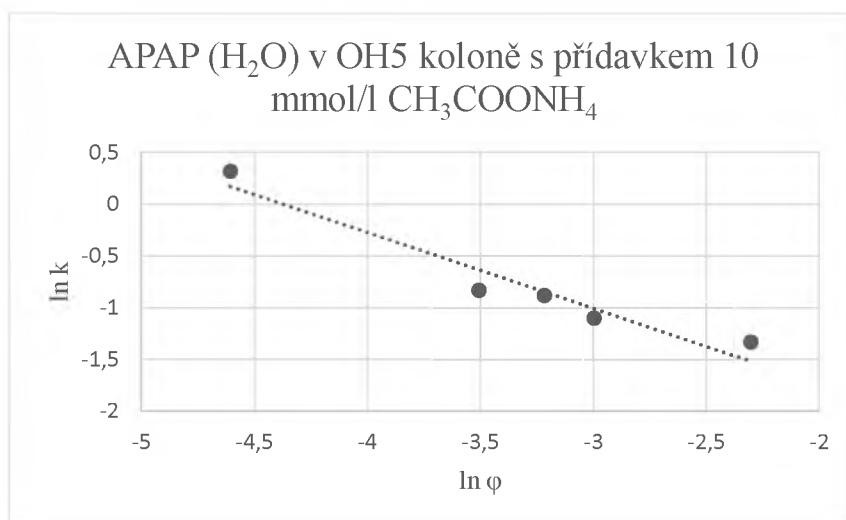
Příloha 65 Retenční faktory na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě (99:1, v/v) s 10 mmol/l octanem amonným

kolona OH5	99 % AcN + 1 % H ₂ O + 10 mM CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	2,08	2,07	2,08		
APAP (AcN)	3,22	3,23	3,22	0,551	-0,595
APAP (H ₂ O)	4,93	4,93	4,93	1,373	0,317
APAP-CYS	1,91	1,92	1,92	-0,077	
APAP-SG	3,15	2,95	3,05	0,468	-0,760

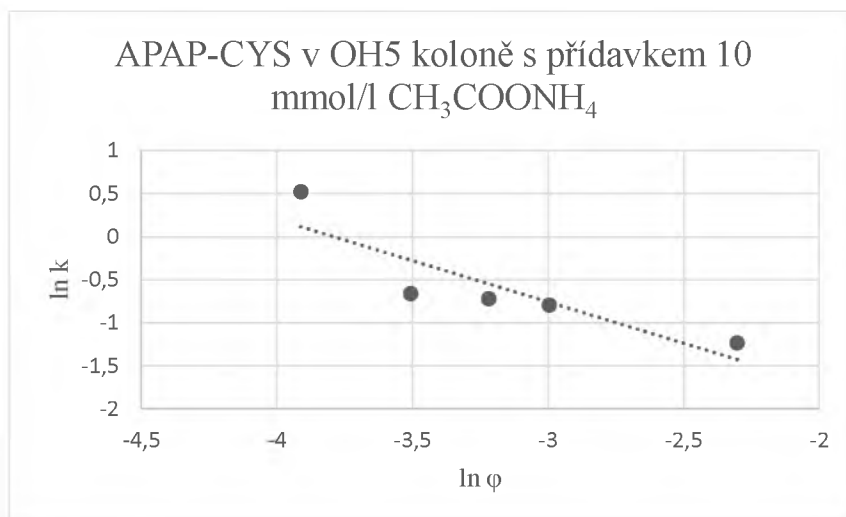
Příloha 66 Graf závislosti APAP v acetonitrilu $\ln k$ na $\ln \phi$ na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 10 mmol/l octanem amonným



Příloha 67 Graf závislosti APAP ve vodě $\ln k$ na $\ln \phi$ na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 10 mmol/l octanem amonným



Příloha 68 Graf závislosti APAP-CYS $\ln k$ na $\ln \phi$ na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 10 mmol/l octanem amonným



Příloha 69 Hodnoty lineární regrese pro retenci paracetamolu a jeho metabolitů v mobilní fázi acetonitril a voda s 10 mmol/l kyseliny octové v OH5 koloně

	Úsek	Směrodatná odchylka úseku	Směrnice	Směrodatná odchylka směrnice	Koeficient determinace
APAP (AcN)	-1,485	0,193	-4,330	0,163	0,952
APAP (H ₂ O)	-1,304	0,189	-4,299	0,176	0,941
APAP-CYS	-0,313	0,307	-3,171	0,268	0,257

Příloha 70 Retenční faktory na NH₂ koloně v acetonitrilu a vodě (90:10, v/v) s 10 mmol/l octanem amonným

kolona NH ₂	90 % AcN + 10 % H ₂ O + 10 mM CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	2,04	2,04	2,04		
APAP (AcN)	2,85	2,87	2,86	0,402	-0,911
APAP (H ₂ O)	2,90	2,90	2,90	0,422	-0,864
kolona NH ₂	90 % AcN + 10 % H ₂ O + 10 mM CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
APAP-NAC	5,49	5,43	5,46	1,677	0,517

Příloha 71 Retenční faktory na NH₂ koloně v acetonitrilu a vodě (95:5, v/v) s 10 mmol/l octanem amonným

kolona NH ₂	95 % AcN + 5 % H ₂ O + 10 mM CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	2,15	2,15	2,15		
APAP (AcN)	3,56	3,59	3,57	0,659	-0,416
APAP (H ₂ O)	3,59	3,57	3,58	0,662	-0,412

Příloha 72 Retenční faktory na NH₂ koloně v acetonitrilu a vodě (96:4, v/v) s 10 mmol/l octanem amonným

kolona NH ₂	96 % AcN + 4 % H ₂ O + 10 mM CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	2,24	2,24	2,24		
APAP (AcN)	4,11	4,11	4,11	0,833	-0,183
APAP (H ₂ O)	3,70	3,69	3,70	0,649	-0,432
APAP-SG	4,11	4,17	4,14	0,847	-0,166

Příloha 73 Retenční faktory na NH₂ koloně v acetonitrilu a vodě (97:3, v/v) s 10 mmol/l octanem amonným

kolona NH ₂	97 % AcN + 3 % H ₂ O + 10 mM CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	2,29	2,29	2,29		
APAP (AcN)	4,66	4,66	4,66	1,038	0,037
APAP (H ₂ O)	4,62	4,61	4,61	1,017	0,017
APAP-SG	4,62	4,61	4,61	1,017	0,017

Příloha 74 Retenční faktory na NH₂ koloně v acetonitrilu a vodě (98:2, v/v) s 10 mmol/l octanem amonným

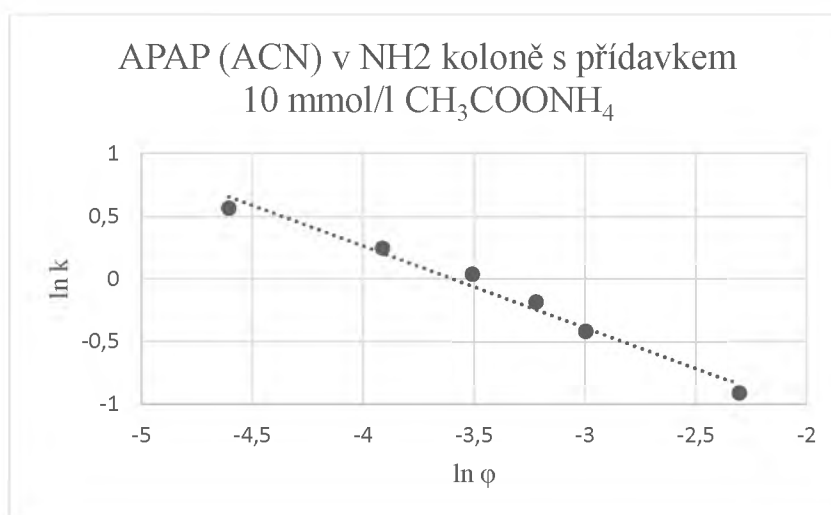
kolona NH ₂	98 % AcN + 2 % H ₂ O + 10 mM CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	2,56	2,78	2,67		

APAP (AcN)	6,17	5,99	6,08	1,277	0,245
APAP (H₂O)	4,70	4,69	4,70	0,759	-0,276
APAP-NAC	8,91	8,59	8,75	2,278	0,823
APAP-SG	5,49	5,49	5,49	1,056	0,055

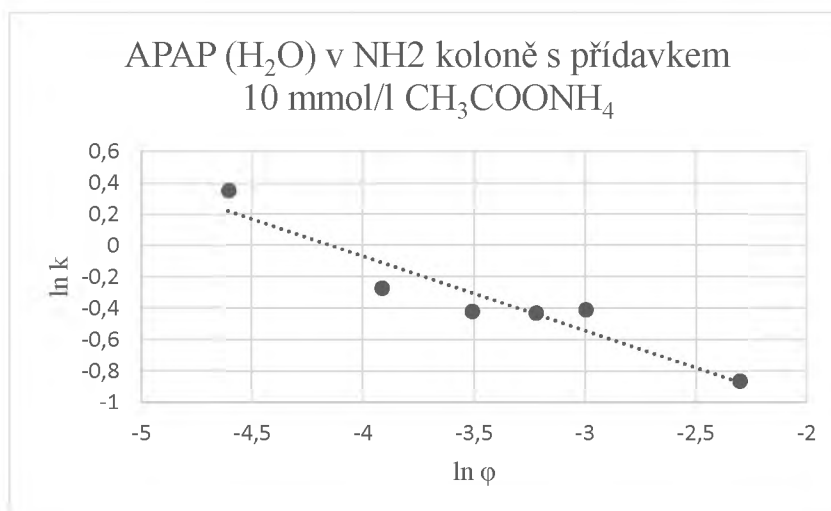
Příloha 75 Retenční faktory na NH₂ koloně v acetonitrilu a vodě (99:1, v/v) s 10 mmol/l octanem amonným

kolona NH ₂	99 % AcN + 1 % H ₂ O + 10 mM CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	2,40	2,39	2,40		
APAP (AcN)	6,60	6,60	6,60	1,754	0,562
APAP (H₂O)	5,78	5,80	5,79	1,416	0,348
APAP-NAC	7,71	7,72	7,71	2,218	0,797
APAP-SG	6,57	6,57	6,57	1,741	0,554

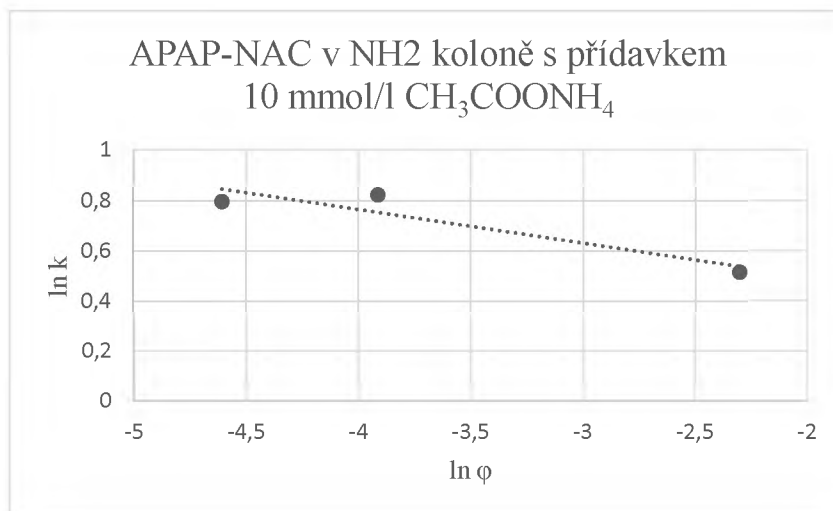
Příloha 76 Graf závislosti APAP v acetonitrilu ln *k* na ln φ na NH₂ koloně v acetonitrilu a vodě s 10 mmol/l octanem amonným



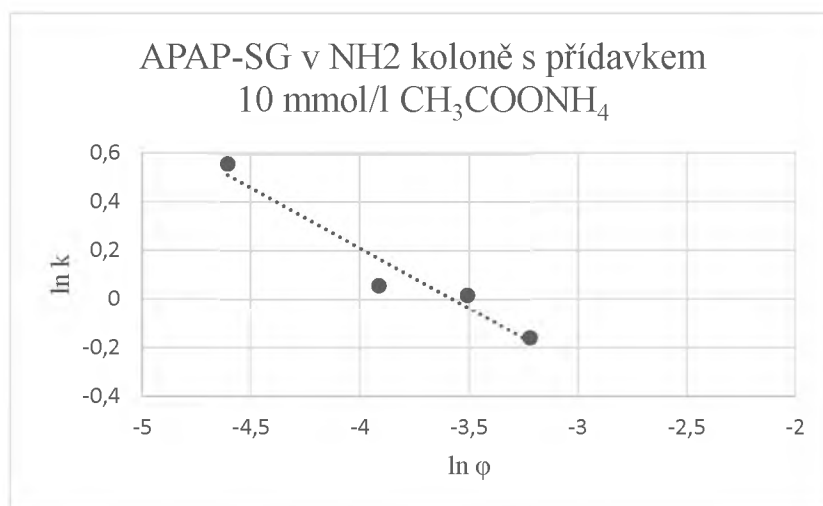
Příloha 77 Graf závislosti APAP ve vodě ln *k* na ln φ na NH₂ koloně v acetonitrilu a vodě s 10 mmol/l octanem amonným



Příloha 78 Graf závislosti APAP-NAC $\ln k$ na $\ln \phi$ na NH2 koloně v acetonitrilu a vodě s 10 mmol/l octanem amonným



Příloha 79 Graf závislosti APAP-SG $\ln k$ na $\ln \phi$ na NH2 koloně v acetonitrilu a vodě s 10 mmol/l octanem amonným



Příloha 80 Hodnoty lineární regrese pro retenci paracetamolu a jeho metabolitů v mobilní fázi acetonitril a voda s 0,1 % kyseliny octové v NH2 koloně

	Úsek	Směrodatná odchylka úseku	Směrnice	Směrodatná odchylka směrnice	Koeficient determinace
APAP (AcN)	-0,648	0,048	-2,328	0,168	0,979
APAP (H₂O)	-0,472	0,078	-1,958	0,273	0,901
APAP-NAC	-0,133	0,053	0,231	0,198	0,864
APAP-SG	-0,495	0,089	-1,770	0,341	0,940

Příloha 81 Retenční faktory na ES-CN koloně v acetonitrilu a vodě (90:10, v/v) s 20 mmol/l octanem amonným

kolona ES-CN	90 % AcN + 10 % H ₂ O + 20 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$					
	t(R)1	t(R)2	t(R)3	průměrný t(R)	retenční faktor k	$\ln k$
Acenaften (t(M))	1,12	1,12	1,12	1,12		
APAP (H₂O)	1,20	1,16	1,16	1,17	0,049	-3,024
APAP-NAC	1,16	1,45	1,45	1,35	0,212	-1,552

Příloha 82 Retenční faktory na ES-CN koloně v acetonitrilu a vodě (95:5, v/v) s 20 mmol/l octanem amonným

kolona ES-CN	95 % AcN + 5 % H ₂ O + 20 mM CH ₃ COONH ₄					
	t(R)1	t(R)2	t(R)3	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,28	1,28	1,28	1,28		
APAP (H ₂ O)	1,23	1,22	1,24	1,23	-0,04	
APAP-NAC	1,47	1,47	1,48	1,47	0,16	-1,86

Příloha 83 Retenční faktory na ES-CN koloně v acetonitrilu a vodě (96:4, v/v) s 20 mmol/l octanem amonným

kolona ES-CN	96 % AcN + 4 % H ₂ O + 20 mM CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,27	1,27	1,27		
APAP (H ₂ O)	1,32	1,27	1,30	0,02	-3,97
APAP-NAC	1,79	1,80	1,79	0,41	-0,90

Příloha 84 Retenční faktory na ES-CN koloně v acetonitrilu a vodě (97:3, v/v) s 20 mmol/l octanem amonným

kolona ES-CN	97 % AcN + 3 % H ₂ O + 20 mM CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,27	1,26	1,26		
APAP (H ₂ O)	1,26	1,26	1,26	0,00	
APAP-NAC	2,39	2,45	2,42	0,92	-0,09

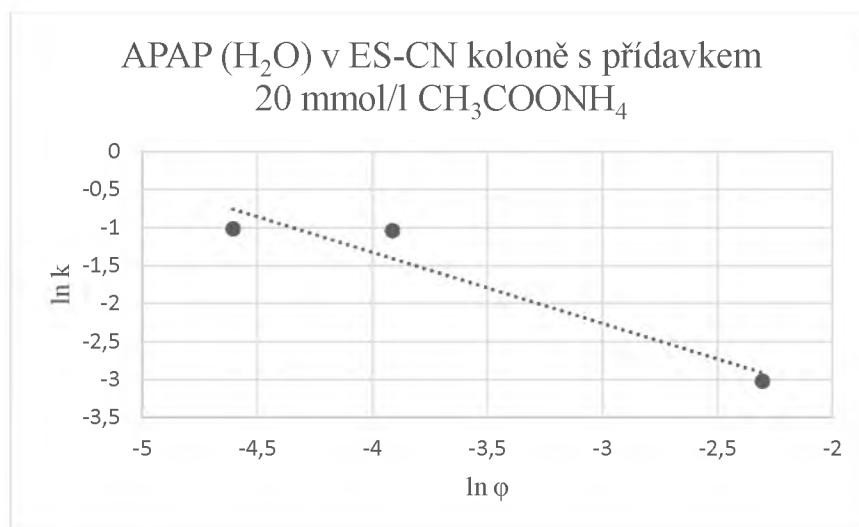
Příloha 85 Retenční faktory na ES-CN koloně v acetonitrilu a vodě (98:2, v/v) s 20 mmol/l octanem amonným

kolona ES-CN	98 % AcN + 2 % H ₂ O + 20 mM CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,26	1,26	1,26		
APAP (H ₂ O)	1,71	1,71	1,71	0,35	-1,04
APAP-NAC	3,81	3,82	3,81	2,02	0,70

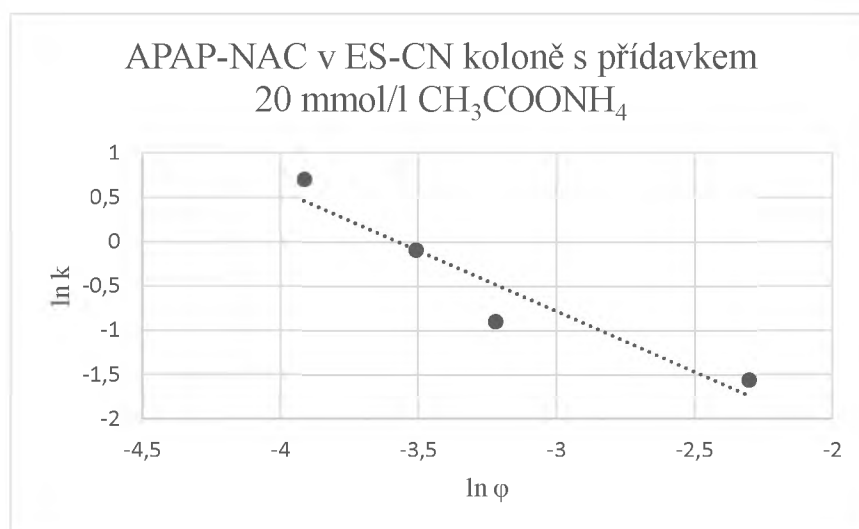
Příloha 86 Retenční faktory na ES-CN koloně v acetonitrilu a vodě (99:1, v/v) s 20 mmol/l octanem amonným

kolona ES-CN	99 % AcN + 1 % H ₂ O + 20 mM CH ₃ COONH ₄				
	t(R)1	t(R)2	průměrný t(R)	retenční faktor <i>k</i>	ln <i>k</i>
Acenaften (t(M))	1,26	1,26	1,26		
APAP (H ₂ O)	1,71	1,72	1,72	0,36	-1,02

Příloha 87 Graf závislosti APAP ve vodě $\ln k$ na $\ln \phi$ na ES-CN koloně v acetonitrilu a vodě s 20 mmol/l octanem amonným



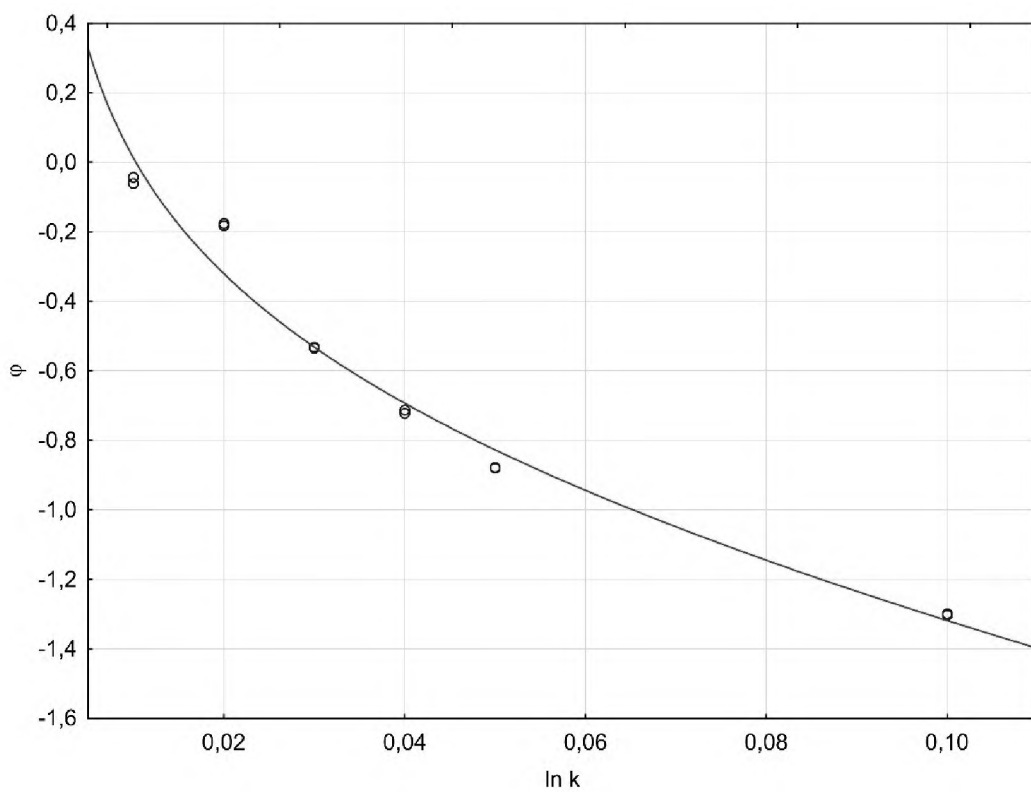
Příloha 88 Graf závislosti APAP-NAC $\ln k$ na $\ln \phi$ na ES-CN koloně v acetonitrilu a vodě s 20 mmol/l octanem amonným



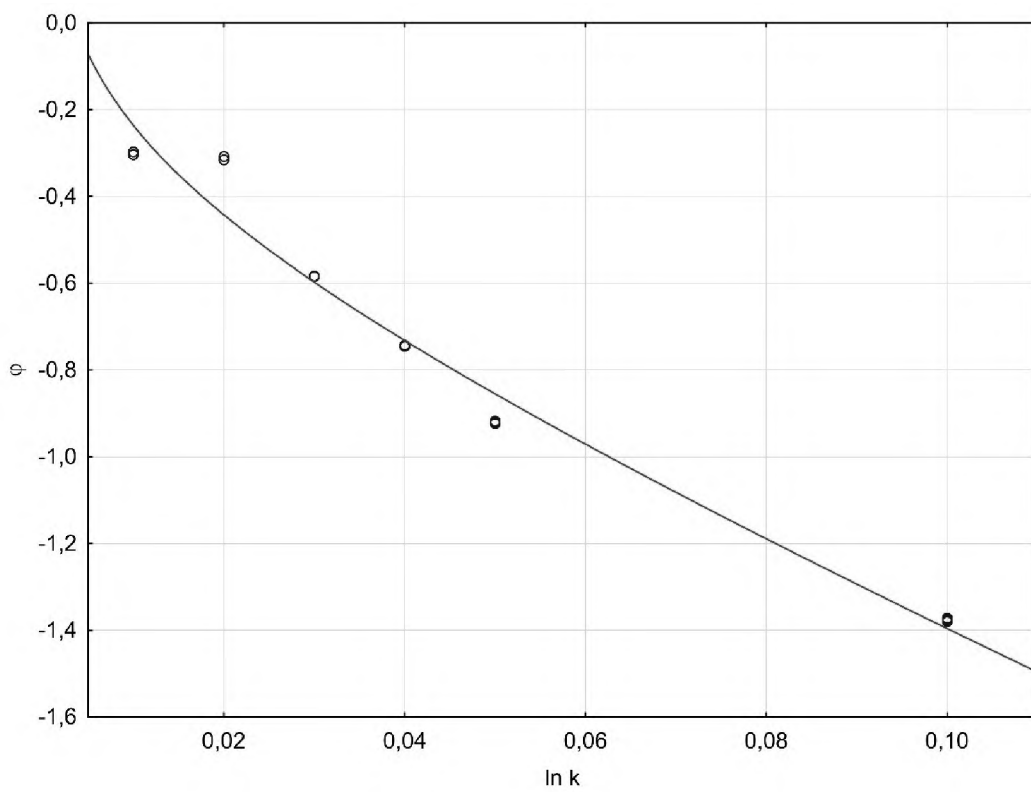
Příloha 89 Hodnoty lineární regrese pro retenci paracetamolu a jeho metabolitů v mobilní fázi acetonitril a voda s 20 mmol/l kyseliny octové v ES-CN koloně

	Úsek	Směrodatná odchylka úseku	Směrnice	Směrodatná odchylka směrnice	Koeficient determinace
APAP (H₂O)	-0,935	0,276	-5,068	1,029	0,920
APAP-NAC	-1,365	0,305	-4,874	1,003	0,909

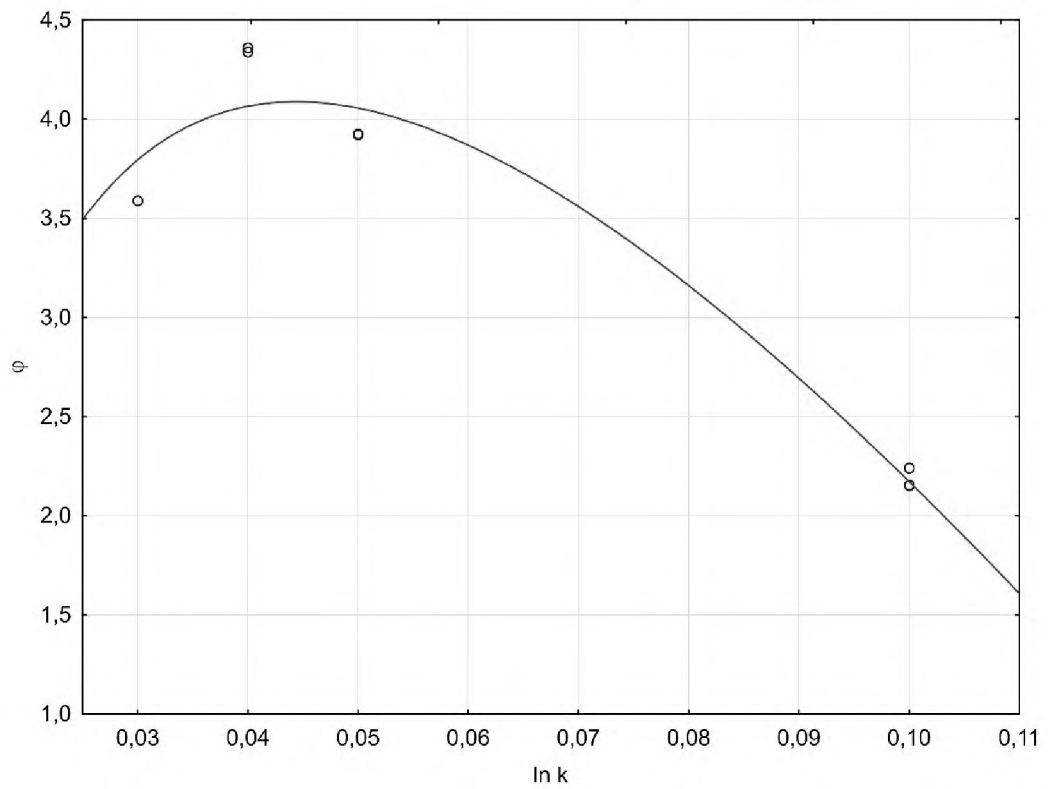
Příloha 90 Graf nelineární regrese APAP v acetonitrilu na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 20 mmol/l octanem amonným



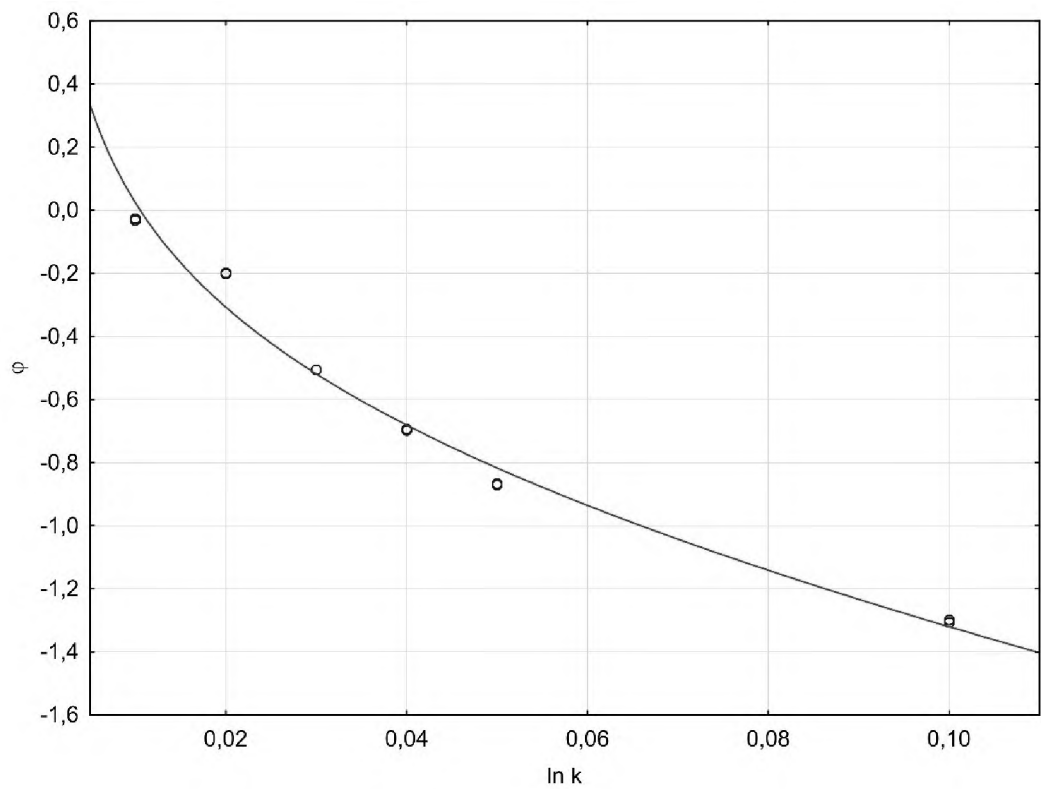
Příloha 91 Graf nelineární regrese APAP ve vodě na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 20 mmol/l octanem amonným



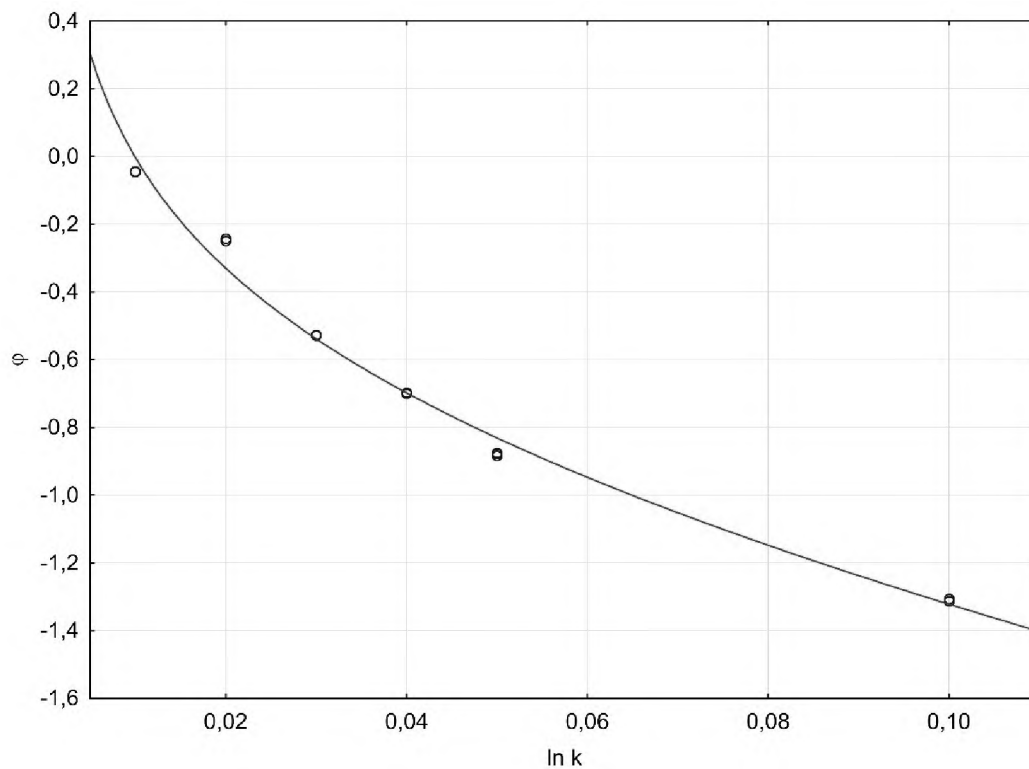
Příloha 92 Graf nelineární regrese APAP-NAC na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 20 mmol/l octanem amonným



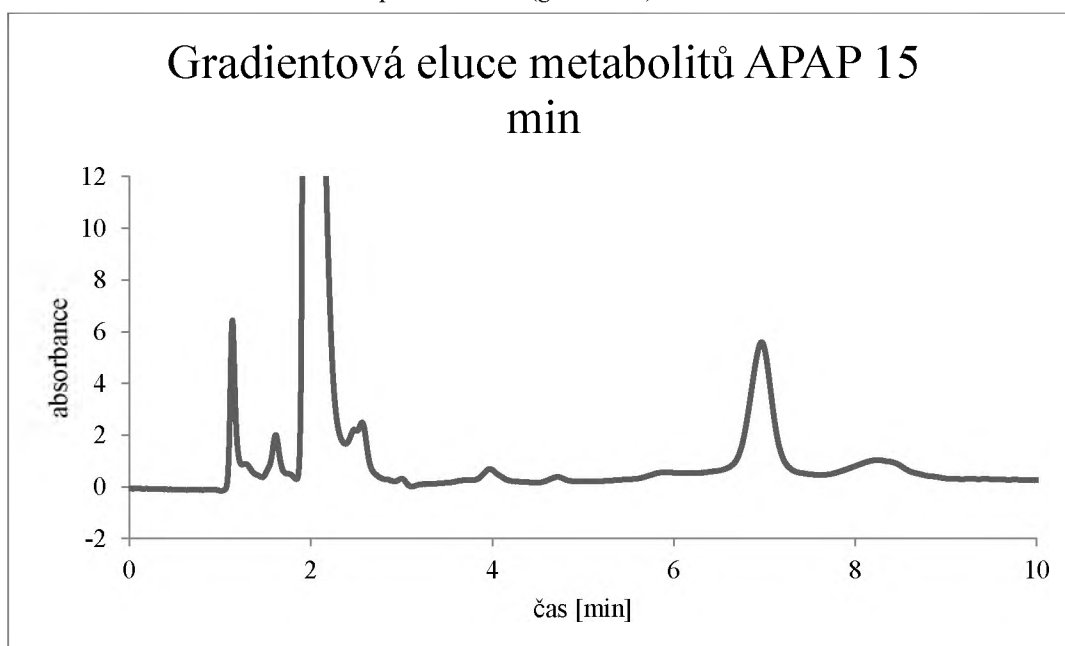
Příloha 93 Graf nelineární regrese APAP-CYS na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 20 mmol/l octanem amonným



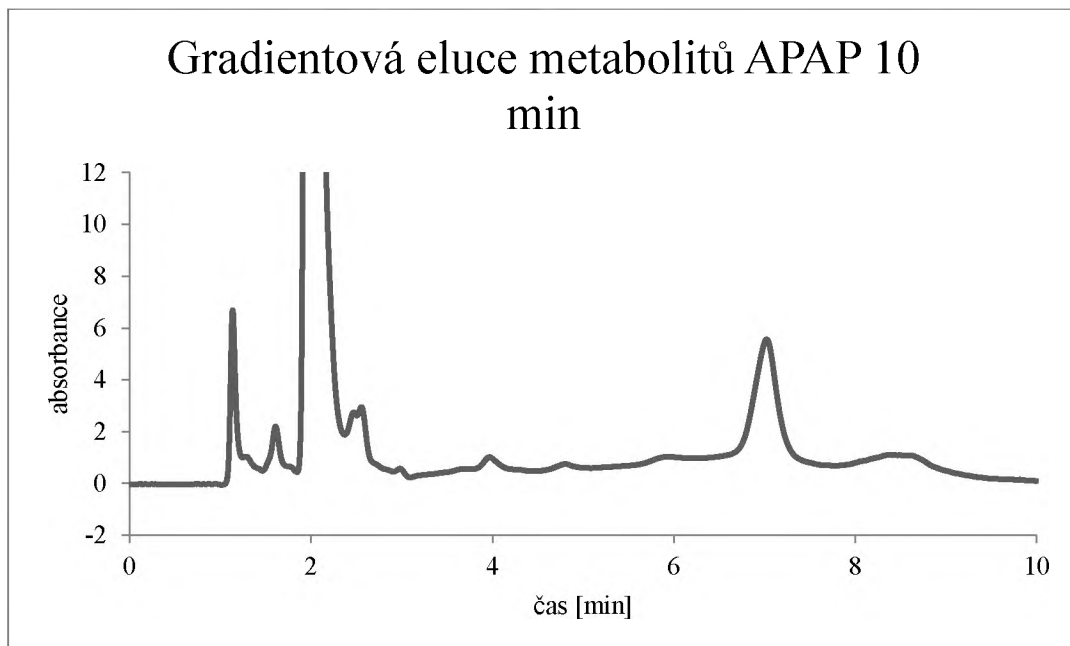
Příloha 94 Graf nelineární regrese APAP-SG na OH5 koloně v acetonitrilu a vodě s 20 mmol/l octanem amonným



Příloha 95 Gradientová eluce metabolitů paracetamolu (gradient 2)



Příloha 96 Gradientová eluce metabolitů paracetamolu (gradient 3)



Příloha 97 Gradientová eluce metabolitů paracetamolu (gradient 4)

