



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

**Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**

**Možnosti záchytu vybraných léčiv pomocí chromatografie na tenkých
vrstvách v soudní a klinické toxikologii**

**Potential methods of detection of chosen drugs in forensic and clinical
toxicology**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Daniela Obitková

Hana Straková



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Straková** Jméno: **Hana** Osobní číslo: **469743**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Možnosti záchytu vybraných léčiv pomocí chromatografie na tenkých vrstvách v soudní a klinické toxikologii

Název bakalářské práce anglicky:

Potential Methods of Detection of Chosen Drugs in Forensic and Clinical Toxicology

Pokyny pro vypracování:

Bakalářská práce se bude zaměřovat na záchyt vybraných léčiv, především paracetamolu v biologických materiálech na poli klinické a forenzní toxikologie. V teoretické části bude popsán paracetamol a některé další léčivé látky, především struktura, biotransformace a toxicita. Bude popsána chromatografie na tenkých vrstvách, princip a použití k detekci a vyhledávání vzorků pozitivních na přítomnost paracetamolu. Praktická část se bude zabývat možnostmi extrakce paracetamolu z biologického materiálu, porovnáním vybraných metod, provedením chromatografie na tenké vrstvě a jejím vyhodnocením. Dále budou měřeny vzorky s pozitivním záchytem paracetamolu pomocí technik plynové chromatografie s hmotnostní detekcí s kvantifikací obsahu paracetamolu ve zkoumaném biologickém materiálu. Cílem bakalářské práce bude zvládnutí technik chromatografie na tenkých vrstvách a plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Seznam doporučené literatury:

- [1] BALÍKOVÁ, Marie, Forenzní a klinická toxikologie: laboratorní toxikologická vyšetření, ed. 2., Praha: Galén, 2017, ISBN 978-80-7492-304-3
- [2] LINHART, Igor, Toxikologie: interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky, ed. 2., Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2014, ISBN 978-80-7080-877-1
- [3] HODIS Jiří, Nová fakta o paracetamolu, rizika předávkování, intoxikace a jejich zvládnutí. Praktické lékařství: časopis postgraduálního vzdělávání pro farmaceuty, číslo 11(3), 2015, 90-92 s., ISSN 1801-2434

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

MUDr. Daniela Obitková

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Mgr. Jitka Macháčková

Datum zadání bakalářské práce: **28.09.2018**

Platnost zadání bakalářské práce: **18.09.2020**

prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA, dr.h.c.
podpis vedoucí(ho) katedry

prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.
podpis děkana(ky)

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem **Možnosti záchytu vybraných léčiv pomocí chromatografie na tenkých vrstvách v soudní a klinické toxikologii** vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně dne 09.05.2019

.....
podpis

Poděkování

Touto cestou bych ráda velice poděkovala MUDr. Daniele Obitkové za velkou trpělivost, pomoc při hledání materiálů a cenné rady při vedení mé bakalářské práce.

Velké poděkování patří také primářce Oddělení soudní a klinické toxikologie Krajské nemocnice Liberec Mgr. Jitce Macháčkové a také všem laborantkám na zdejším oddělení za vstřícné přijetí a trpělivost při vysvětlování všech postupů.

Abstrakt

Bakalářská práce se v teoretické části zabývá léčivy patřící do skupiny analgetik – antipyretik, jejich metabolismem a toxicitou pro lidský organismus. Práce je zaměřena na metody stanovení těchto léčiv v organismu, hlavně paracetamolu, jemuž je věnována největší část práce.

Detailně je popsán postup extrakce paracetamolu a následné stanovení pomocí chromatografie na tenké vrstvě. Extrakce paracetamolu byla provedena dvěma postupy, extrakcí kapalina – pevná fáze a kapalina – kapalina. Při extrakcích byly zohledněny změny teploty a posouzena opakovatelnost pokusu.

Dále byly porovnávány záchyty paracetamolu získané pomocí plynové chromatografie z toxikologické laboratoře v Krajské nemocnici Liberec. Především pozitivní a negativní záchyt, a zda se jednalo o živého pacienta, či o nekroptický materiál.

Klíčová slova

Chromatografie; chromatografie na tenké vrstvě; paracetamol; acetaminophen; toxikologie

Abstract

This bachelor's thesis deals with drugs which belong to a group of analgesics – antipyretics, their metabolism and toxicity for human organism. The thesis is focused on methods determining the presence of the selected drugs, mainly paracetamol, in organism. Paracetamol extraction procedures are described in detail. The solid phase extraction (SPE) and liquid-liquid extraction were used to obtain samples suitable for thin layer chromatography detection. The thin layer chromatography result compares the extraction methods.

Also changes of temperature were taken into consideration during extractions and repeatability of the experiment was surveyed.

Then the gas chromatography measurements, which were gained from Toxicology Laboratory of the Liberec Regional Hospital, were compared. It was mainly detected if the sample was positive or negative and if the person was alive or if it was necroptic material.

Keywords

Chromatography; thin layer chromatography; paracetamol; acetaminophen; toxicology

Obsah

1	Úvod	9
2	Současný stav	11
2.1	Vybraná léčiva.....	11
2.1.1	Metamizol.....	11
2.1.2	Propyfenazon.....	14
2.1.3	Diklofenak	15
2.1.4	Salicyláty.....	17
2.2	Paracetamol	20
2.2.1	Složení.....	20
2.2.2	Kinetika.....	20
2.2.3	Toxicita.....	21
2.3	Metody průkazu a stanovení	24
2.3.1	Chromatografie.....	24
2.3.2	Papírová chromatografie.....	26
2.3.3	Chromatografie na tenké vrstvě.....	27
2.3.4	Plynová chromatografie	28
2.3.5	Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	31
2.3.6	Detektory	33
3	Cíl práce.....	36
4	Metodika	37
4.1	Extrakce.....	37
4.1.1	Extrakce kapalina - kapalina (l – l).....	37
4.1.2	Extrakce kapalina – pevná látka (l – s).....	38

4.2	Princip experimentu.....	39
4.3	Postup práce	39
5	Výsledky.....	45
5.1	Výtěžnost extrakcí, opakovatelnost a vliv teploty	45
5.1.1	Zpracování získaných dat.....	47
5.2	Výsledky plynové chromatografie.....	50
6	Diskuze	52
7	Závěr	55
8	Seznam použitých zkratk.....	56
9	Seznam použité literatury.....	57
10	Seznam použitých obrázků	60
11	Seznam použitých tabulek.....	61
12	Seznam Příloh.....	62

1 ÚVOD

Chromatografie na tenké vrstvě patří k metodám využívaných v klinické i soudní toxikologii, ať už se jedná o akutní intoxikaci či o průkaz toxické látky v biologickém materiálu.

Teoretická část pojednává o analgetikách a antipyretikách, neboli o lécích na bolest a ke snížení teploty. Je zde popsáno složení, metabolismus i toxicita nejčastěji využívaných, volně prodejných léciv. Tato část bakalářské práce poukazuje na narůstající počet intoxikací způsobených právě těmito lécivy, a to především paracetamolem, což pramení zejména ze špatné informovanosti veřejnosti. Zároveň popisuje méně známá léciva, která nejsou tak toxická pro lidský organismus a mají i lepší analgetický účinek.

Praktickou částí této práce bylo zvládnutí techniky tenkovrstvé chromatografie, které je věnována kapitola Metodika. Zvláště byl kladen důraz na možnosti extrakce z biologického materiálu tak, aby bylo z materiálu přeneseno co nejvíce hledaného analytu. Příprava materiálu pro extrakci, extrakci a samotnou chromatografii na tenké vrstvě má na starost zdravotní laborant. Následné vyhodnocení provádí spolu s laborantem vysokoškolsky vzdělaný odborný pracovník v laboratorních metodách nebo klinický bioanalytik se specializací v toxikologii. Po konzultaci může bioanalytik rozhodnout o specifikaci záchytu na plynovém chromatografu. Tato metoda spolehlivě určí daný analyt.

Práci na toxikologické téma jsem si vybrala proto, že se o toto odvětví zajímám a protože se jedná v současnosti o perspektivní obor vzhledem k tomu, že žijeme v době neustálého vývoje nových léciv, syntézy nových chemikálií, kdy je potřeba monitorovat, jaký mají vliv na lidský organismus, ale i na životní prostředí.

V oboru toxikologie lze najít široké uplatnění, a to nejenom v nemocničních laboratořích, ale i v kriminalistických expertizních laboratořích či u Armády České republiky.

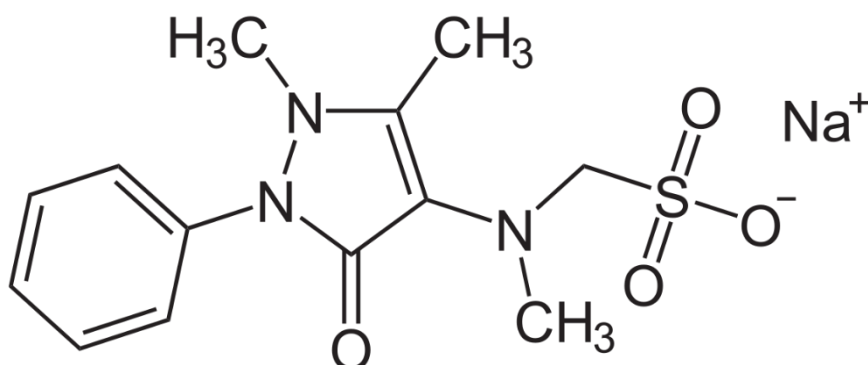
2 SOUČASNÝ STAV

2.1 Vybraná léčiva

Níže vybraná léčiva řadíme do skupiny analgetika – antipyretika, která patří do vyšší skupiny nesteroidních antirevmatik (NSA). Podle selektivity je možné rozdělit NSA do tří skupin: neselektivní blokuji cyklooxygenázu 1 i cyklooxygenázu 2 (COX), preferenční (blokují COX 2) a specifické (blokují COX 2).

2.1.1 Metamizol

Metamizol, dříve známý jako dipyrón, je analgetikum patřící do skupiny neopioidních analgetik. Dnes ho známe pod obchodním názvem Novalgin. Složením a strukturou se řadí do skupiny pyrazolových derivátů [1].



Obrázek 1 Struktura metamizolu [24]

Metamizol se vyznačuje účinky analgetickými, antipyretickými a antiflogistickými, avšak antiflogistická aktivita je oproti jiným antirevmatikům nižší. Vykazuje také mírné spazmolytické účinky. Při testování se prokázalo, že metamizol má vyšší spazmolytický účinek než tramadol či indometacin [1].

Analgetický účinek byl testován na myších. Při těchto testech byla prokázána vyšší účinnost než u Codeinu, Paracetamolu, Acetylsalicylové kyseliny či Ibuprofenu. Podobné výsledky se následně objevily i u lidí. V podávané dávce Metamizolu, který byl 1 g, byl pozorován silnější účinek než u Paracetamolu, Diklofenaku nebo Ibuprofenu, které byly podávány v dávkách 50 mg, 100 mg a 800 mg [1].

Antipyretické účinky byly prokázány na zdravých dobrovolnících. Byl porovnáván nástup účinku a velikost účinku Paracetamolu a Metamizolu. Dobrovolníkům byla podávána dávka 1 gram. Výsledky ukázaly, že Metamizol má rychlejší nástup účinku oproti Paracetamolu, a to o hodinu. Předpokládalo se, že Metamizol bude mít i antiflogistický účinek, podobně jako jiné léky z této skupiny. Tento účinek byl prokázán pouze u zvířat, u člověka se ani při vyšších dávkách neprojevil. Protizánětlivá reakce se vztahuje k inhibici tvorby prostaglandinů v periférii a centrálním nervovém systému. Prostaglandiny se tvoří z kyseliny arachidinové za pomoci enzymu COX. Metamizol blokuje obě dvě varianty tohoto enzymu COX 1 a COX 2. U působení Metamizolu se předpokládá specifický zásah do hlavních drah bolesti. Podle jedné studie byla objevena schopnost uvolňování β -endorfinů či možnost zasahovat do uvolňování glutamátu na míšní úrovni, kde je primárním nocireceptorním mediátorem [1] [2].

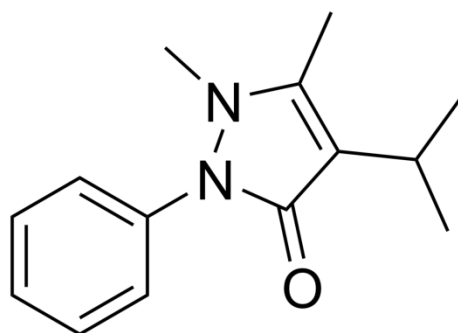
Metabolismus Metamizolu při perorálním podání začíná v žaludku, kde je rychle hydrolyzován na čtyři metabolity, pouze dva z nich jsou farmakologicky účinné. Hlavní aktivní metabolit je 4 – metylaminoantipyrin (4 – MAA), ten se rychle absorbuje v tenkém střevě. Původní látku nelze detekovat ani v plazmě, ani v moči při podání per os. Stanovit lze jen v plazmě při intravenózním podání. Pro prokázání Metamizolu se stanovují jeho metabolity. Metabolity zůstávají v těle pouze 15 minut. 4 – MAA je v játrech metylován na 4 – aminoantipyrin (4 - AA), který je také aktivní. Menší část 4 – MAA se oxiduje na 4 – formylaminoantipyrin (FAA). 4 – AA je následně acetylován a vzniká neaktivní konjugovaný metabolit 4 – acetylaminoantipyrin (4 – AcAA). Původní látka je proléčivo, samo o sobě nemá žádný účinek, účinek mají až jeho metabolity. Nakonec se Metamizol vyloučí močí [1] [2].

Analgetická účinnost se využívá hlavně v oblasti akutní bolesti. Je vhodný pro tlumení kolikových bolestí při renální kolice, je zde uplatňován i splazmolytický účinek. Dále je používán při tlumení bolesti hlavy migronézního nebo tenzního typu. Podle síly bolesti se určuje nejvhodnější podání. Je možné podání perorální či intravenózní. V neposlední řadě se používá při tlumení bolesti zubů, používá se ve velké míře rovněž při drobných stomatochirurgických výkonech.

Metamizol je organismem velmi dobře snášen. Na rozdíl od ostatních NSA nemá nefrotoxický ani hepatotoxický účinek. Po dlouhodobém léčení Paracetamolem byly hodnoty AST a ALT zvýšeny, Metamizol nezvyšoval hodnoty ani jedné z transamináz. Jediné riziko, které se u Metamizolu vyskytuje, je vznik agranulocytózy a možnost vzniku alergické reakce [1] [2].

2.1.2 Propyfenazon

Propyfenazon je analgetikum patřící do skupiny neopioidních antirevmatik. Svou strukturou, stejně jako Metamizol, patří ke skupině pyrazolových derivátů. Dnes se používá v některých kombinovaných preparátech. Propyfenazon můžeme nalézt pod obchodním názvem Valetol či Saridon a nejčastěji bývá v těchto léčích v kombinaci s Paracetamolem [3].



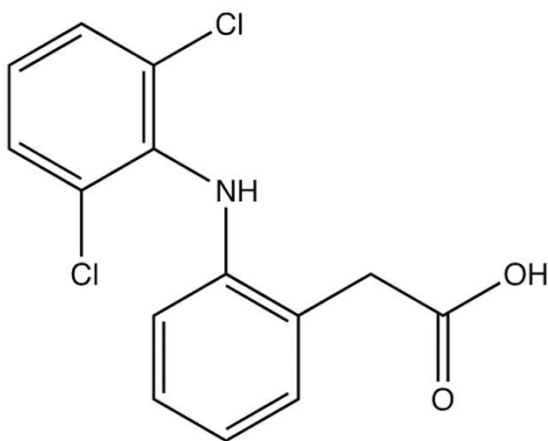
Obrázek 2 Struktura propyfenazonu [25]

Propyfenazon má analgetické a antipyretické účinky. Je velmi špatně rozpustný ve vodě. Jeho působení je v některých ohledech stejné jako u Metamizolu, jen riziko vzniku agranulocytózy je menší. Je tomu tak proto, že nevytváří metabolit 4 – aminofenazon. Metabolity se vylučují močí [3] [4].

V ložiskách zánětu mají metabolity nižší vliv na blokaci COX, avšak mnohem lépe se vstřebávají do centrálního nervového systému. Zde poté slabě inhibuje COX v mozkové tkáni. Pravděpodobně hlavním místem účinku jsou zadní rohy míšň a mozek, zde blokuje COX 2 [4].

2.1.3 Diklofenak

Diklofenak patří do skupiny NSA. Jedná se o derivát kyseliny fenyloctové s antipyretickým, antiflogickickým a analgetickým účinkem [4] [5].



Obrázek 3 Struktura diklofenaku [26]

Nejdůležitějším účinkem je inhibice COX neboli blokace syntézy prostaglandinů. Hlavními tvůrci zánětu jsou prostaglandiny ze třídy PGE₂. Tyto prostaglandiny zvyšují senzitivitu nocireceptorů na periférii u histaminu a bradykininu, čímž způsobují zánět doprovázený bolestí. Diklofenak se řadí k neselektivním NSA, inhibuje jak COX 1, tak COX2 [5].

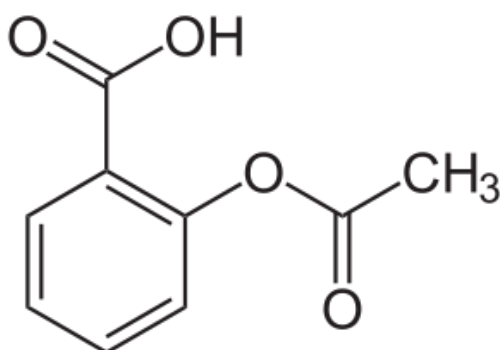
Diklofenak se kompletně vstřebává v tenkém střevě. Metabolismus začíná hydroxylací a methoxylací na cytochromu P450 (CYP), především verze CYP 2C9, z menší části CYP 3A4 a CYP 2C8. Dále probíhá konjugace s kyselinou glukuronovou uridin-5-difosfoglukuronosyl transferázou 2B7 na diklofenak glukuronid. Metabolity mohou být zcela inaktivní či méně aktivní než původní látka. Glukuronid vytváří vazby s jaterními buňkami, a proto se většina Diklofenaku metabolizuje v játrech [5] [6].

Druhá polovina se váže na plazmatické bílkoviny, zejména na albumin. Nadpoloviční většina se vyloučí ledvinami, zbytek se vyloučí stolicí. Převážně se vylučují inaktivní metabolity. Při nadměrném užívání se Diklofenak kumuluje v organismu, a dochází tak k renálním či jaterním poruchám funkčnosti [5].

Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří účinky na gastrointestinální trakt, nefrotoxické a kardiotoxické účinky a časté bolesti hlavy. K poškození gastrointestinálního traktu dochází kvůli inhibici COX 1 a následné blokaci produkce prostaglandinů, které mají protektivní vliv na sliznice GIT. Tím se snižuje tvorba mucinu a produkce bikarbonátů a dochází ke zvýšení množství kyseliny chlorovodíkové. Z tohoto důvodu může dojít ke krvácení a perforacím žaludeční stěny. Dále může docházet ke zvyšování aminotransferáz. Může dojít až k selhání jater. U Diklofenaku bylo zjištěno, že při nadměrném užívání se vyskytuje riziko vzniku arteriálních trombotických stavů. Ty vedou k infarktu myokardu či cévní mozkové příhodě. Pacienti s kardiovaskulárním onemocněním mohou být léčeni Diklofenakem až po důkladné diagnóze [5].

2.1.4 Salicyláty

Jedná se o nejznámější a nejrozšířenější skupinu léčiv s analgetickými, antipyretickými a antiflogistickými účinky. Nejvyužívanější léky z této skupiny jsou Aspirin a Acylpirin, jejichž účinnou látkou je kyselina acetylsalicylová [10] [12] [13].



Obrázek 4 Struktura kyseliny salicylové ^[27]

Salicyláty jsou jedny z nejdéle užívaných léků. Už ve starověku se využívaly odvary, čaje z vrbové kůry. Název salicin je odvozen od rodového jména vrby – salix. V 19. století byl připraven ester kyseliny acetylsalicylové a kyseliny octové Charlesem Fredericem Gerhardtem a následně jej převzal chemik Felix Hoffmann. Kyselina acetylsalicylová se ukázala jako účinnější analgetikum, než salicylan sodný [13].

Salicyláty se nejlépe vstřebávají nalačno při perorálním podání. Vstřebávají se zejména v žaludku a ve sliznici duodena. Při podání nalačno dosahují největšího účinku během 30 minut. Resorpce pak nastává v rozmezí 15 – 30 minut. Salicyláty se podávají i ve formě čípků, tedy rektálně. Při tomto podání probíhá vstřebávání déle, okolo tří hodin, je nerovnoměrné a nedochází k úplnému vstřebání. Na rozdíl od perorálního podání nezvyšuje průchodnost přes střevní či žaludeční stěnu a nemusí navodit alergickou reakci [13].

Podávání Salicylátů během těhotenství se nedoporučuje v první a třetím trimestru. Je to z toho důvodu, že vede ke vzniku krvácení gastrointestinálního traktu (GIT) a ke zvyšování koncentrace železa v erythrocytech. Dále také procházejí přes placentu, kde se vstřebává 20 – 30 % salicylátů, které matka přijme. Podají-li se před porodem, či během porodu, zvyšuje se tím riziko krvácení. Salicyláty přecházejí i do mateřského mléka. Do mléka se dostává 0,5 % salicylátu užitého matkou [13].

Po vstřebání jsou salicyláty rychle přemísťovány, a to hlavně pasivními procesy. Převážně se vyskytují v extracelulárním prostoru, ale mohou být přítomny i v intracelulárním. Jejich pohyb skrz buněčnou membránu závisí na pH a pravděpodobně i na tom, zda je přítomen inzulin. Nejčastěji se kumulují v orgánech, kde je spíše kyselé pH, to je možná příčina poškození žaludku. Při acidóze mohou pronikat i do likvoru a neuronů, to může vést až k edému mozku. Při terapeutických dávkách je nadpoloviční většina salicylátů vázaná na albumin. Účinná forma je pouze volná a nenavázaná [13].

Vylučují se převážně ledvinami ve formě kyselin salicylové, pyrokatecholové, gentisové a salicylurové. Salicyláty je možné nalézt i ve slinách, slzách a stolici [13].

Analgetický účinek působí v centru hypotalamu a tlumí tvorbu prostaglandinů. Nástup účinku nastává za 15 minut, nejvyšší účinnosti dosahuje za dvě hodiny a trvá maximálně čtyři hodiny. Jako analgetikum se nejčastěji využívá při středních silných bolestech. Výhodou salicylátů je, že nevzniká léková závislost [13].

Antipyretické účinky působí v hypotalamu. Ten uvolňuje pyrogeny a při podání salicylátu je navyšuje. Pyrogeny ovlivňují teplotu organismu. Při podání léčiva tvorba tepla neklesá, ale zvyšuje se jeho výdej, takže dochází k pocení, ohřátí kůže a k překrvení periferních částí. K navýšení teploty organismu došlo i u zcela zdravých pacientů [13].

Antiflogistický účinek se projeví útlumem syntézy prostaglandinů. Prostaglandiny působící ve svalu nebo v kloubu vedou k bolesti, hyperémii a otoku. To jsou typické příznaky pro zánět. Podáním salicylátů dojde k jejich útlumu [13].

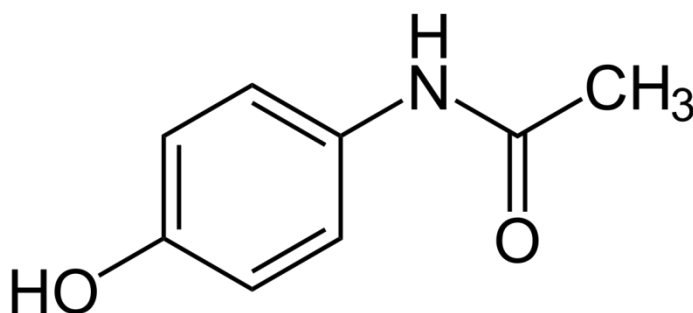
Letální dávka při jednorázovém požití je 20 – 30 g, pokud jde o opakované požití, je to 6 – 8 g. Při dosažení toxické dávky začne být drážděno dýchací centrum, to může vést až k alkalóze. Kyselina acetylsalicylová odstraňuje slizniční stěnu žaludku a dochází k naleptání kyselinou chlorovodíkovou. Tím může vzniknout hemoragie. Při vysokých dávkách dochází k poškození tubulárního systému, tím pádem se snižuje resorpce vody a minerálů. Při dlouhodobém užívání salicylátů a dalších analgetik může dojít až k analgetické nefropatii [11][12] [13].

2.2 Paracetamol

Jedná se o účinnou látku obsaženou v mnoha volně prodejných léčivech, jako jsou Paralen, Modafen, Coldrex a další. Jde o hojně používané antipyretikum a analgetikum při nachlazení. Při správném dávkování se jedná o velmi bezpečný lék, který se ve srovnání s kyselinou acetylsalicylovou nekumuluje v žaludeční sliznici [7] [10].

2.2.1 Složení

Z chemického pohledu se jedná o slabou kyselinu s $pK_A = 9,38$. Proto není ve fyziologickém prostředí nedisociovaná. Díky těmto vlastnostem se do buněk a tkání dostává difúzí [7] [14].



Obrázek 5 Struktura paracetamolu^[28]

2.2.2 Kinetika

Paracetamol se vstřebává nejvíce v žaludku a v tenkém střevě, největšího účinku dosahuje za 30 – 60 minut a může se podávat i rektálně. Při tomto podávání se doporučuje dávkování 3 – 4krát vyšší v přepočtu na kilogram než u perorálního dávkování [7].

V ledvinách se Paracetamol oxiduje za katalýzy prostaglandin H-synthasou (PHS). Metabolismus Paracetamolu probíhá především v játrech. Zde je paracetamol konjugován na glukuronid nebo na sulfát. Metabolismus probíhá

oxidací prostřednictvím cytochromu P450, ve formách CYP 2E1, CYP 1A2 a CYP 3A4, na farmakologicky aktivní N-acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI), ten je konjugován v játrech s donorem –SH skupin, glutathionem. Tento metabolit je následně vyloučen močí [7] [10].

Paracetamol inhibuje syntézu prostaglandinů a tím i funkci COX. Mechanismus působení funguje tak, že když se paracetamol váže na část COX, dochází k tvorbě radikálu, tzv. paracetu. Tímto zkrátí cyklus přeměny radikálu kationtu feryl-protoporfyrinu na feryl-protoporfyrin, a to bez příjmu elektronu z COX a výslednému úbytku radikálu tyrosinu. Radikál tyrosinu je potřebný k aktivaci arachnoidonové kyseliny na její radikál. Tím paracetamol blokuje funkci COX [10].

Paracetamol inhibuje COX 1 i COX 2. Mívá však větší selektivitu pro COX 2. Při inhibici COX 2 se předpokládá, že je vytvořen žádoucí analgetický účinek. Jelikož je spojena se snížením produkce prostaglandinů PGI₂ a PGE₂, které působí jako mediátory bolesti [7] [10].

2.2.3 Toxicita

Maximální dávka, která je vhodná pro dospělého jsou 4 g/den, to činí 1 000 mg v jedné dávce. Dávkuje se po 4 – 6 hodinách 500 mg [7] [11].

Mezi nejčastější účinky NSA patří inhibice COX a PHS. Často vedou k překyselení žaludku, hlavním důvodem je inhibice prostaglandinů, které tlumí produkci žaludeční kyseliny. Nadměrné užívání vede k dráždění žaludeční stěny, to může způsobit krvácení a tvorbu žaludečních vředů. U paracetamolu k těmto stavům v žaludku obvykle nedochází, neboť paracetamol má nízkou gastrointesticiální toxicitu. Při jeho vysokých dávkách dochází k vyčerpání glutathionu v buňkách jater a ledvin. Z tohoto důvodu je nefrotoxický a hepatotoxický. Toxicita může být umocněna jinými látkami elektrofilního

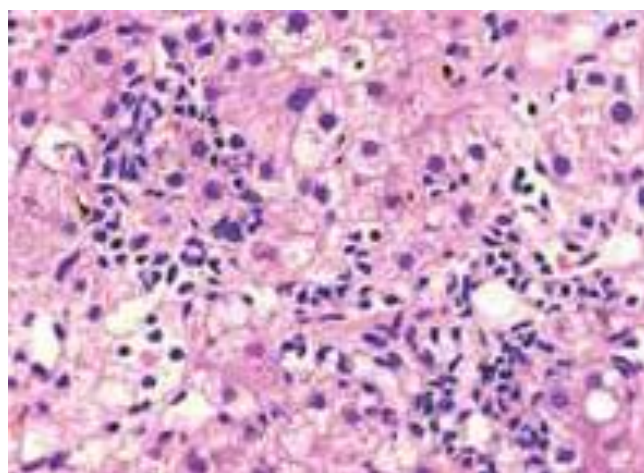
charakteru, které také vyčerpávají glutathion. To může být oxidativní stres, indukce cytochromu P450, hlavně jeho forma, která je indukovaná ethanolem. Při kombinaci paracetamolu s alkoholem může docházet k vážnému poškození jater, případně ledvin [7] [10].

Při předávkování se konjugace přesytí a paracetamol se metabolizuje jiným způsobem. Dochází tak ke zvýšené produkci aktivního, toxického metabolitu NAPQI, který je za normálních okolností inaktivován glutathionem. Při vysokých hladinách NAPQI dochází k navázání $-SH$ skupin na zhruba 23 proteinů, přibližně 6 z nich je mitochondriálních. Nejdůležitějším enzymem při této reakci je glutathion peroxidáza, její hladina však při předávkování klesá. Tím dochází k nerovnováze iontů, poté k zániku mitochondrie až k zániku celé buňky [7] [8].

Při nadměrném požití se při prvních 24 hodinách mohou objevit nespecifické žaludeční potíže, např. nauzea či zvracení. Nekróza v játrech se začíná objevovat a dále rozvíjet po 24 hodinách. Projevuje se zvýšením transamináz, bolestí v pravém podžebří, je možná i žloutenka. Dále se může objevit acidóza nebo hypoglykémie. Po 72 – 96 hodin po požití nastává silná nekróza jater, selhání ledvin až smrt. Průběh otravy mohou ovlivnit faktory jako je abúzus alkoholu, malnutrice, požití paracetamolu nalačno i přítomnost virózy. Zvýšené riziko otravy může být u lidí, kteří trpí nealkoholickou steatózou jater, riziko je zde 4 – 7krát vyšší [7] [8].

Toxicita je velice svázána s jeho metabolismem. Až 10 % léku je oxidováno na toxický NAPQI, ten je dále detoxikován glutathionem a vyloučen močí či žlučí. Nedetoxikovaný NAPQI je vázán na hepatocyty, tvoří kovalentní vazby na mitochondriální bílkoviny, dochází k peroxidaci lipidů, dále k oxidaci thiolových skupin jaterních enzymů. Tímto dojde k poškození buněčného metabolismu, a tak vyvolává nekrózu. Některé studie uvádí možný vznik hepatopatie při jednorázové dávce. U některých případů jsou prokázány vrozené rozdíly v enzymové aktivitě

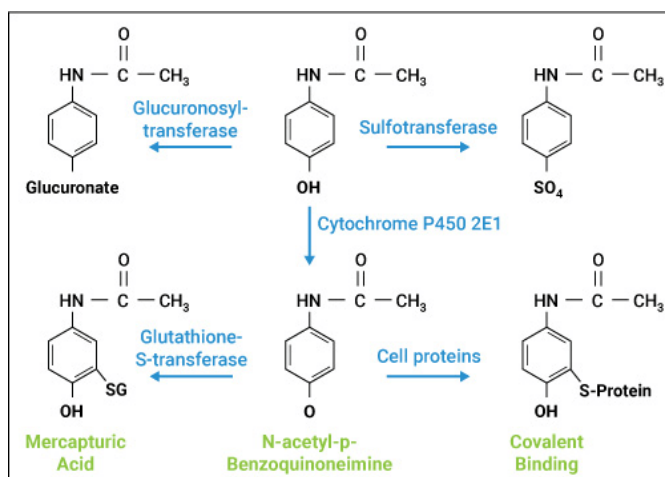
jaterních enzymů. Intoxikace probíhá ve 4 fázích. K první fázi patří nechutenství, nevolnost, zvracení i malátnost. Druhá fáze zahrnuje ústup příznaků fáze první, může se objevit bolest či tlak v pravém podžebří, zvětšení jater. Objevuje se zvýšený bilirubin a jaterní enzymy, je prodloužený protrombinový čas. Třetí fáze nastává po 48 – 120 hodinách po požití, opět se objevují příznaky z první fáze, navíc se známkami selhání jater, se žloutenkou, hypoglykémii, koagulopatií a encefalopatií. V některých případech dochází i k renálnímu selhání. Čtvrtá fáze nastává 2. až 14. den, v této fázi bývá nutná transplantace jater, nebo dochází k úmrtí [7] [8] [9].



Obrázek 6 Játra s inklusemi, barveno hematoxylin – eosin ^[9]

Intoxikaci je možné léčit pomocí antidota N-acetylcysteinu, největší efekt má při podání do 8 hodin po požití. Obvykle se dává perorálně 140 mg/kg, poté se podává jen udržovací dávka, která je 70 mg/kg hmotnosti pacienta. Takto se podává po dobu 72 hodin, a to každé čtyři hodiny. Lze podávat i intravenózně do 10 hodin po požití paracetamolu. První dávka je 150 mg/kg na 15 minut, která je podána s 200 ml 5 % glukózy. Dále se podává po 4 hodinách 50 mg/kg v 500 ml 5 % glukózy a poté 100 mg/kg v 1 000 ml 5 % glukózy. Pokud dochází k léčbě až po deseti hodinách a déle se podává, jako první dávka, 140 mg/ml na jednu hodinu v 500 ml 5 % glukózy, déle jen 70 mg/kg ve 250 ml 5 % glukózy, a to každé čtyři

hodiny. Je nutné podat dvanáct dávek. V nejhorších případech se používá dialyzační léčba [7] [8].



Obrázek 7 Metabolismus paracetamolu [29]

2.3 Metody průkazu a stanovení

V následující části se zaměříme na metody, kterými se v toxikologii prokazují a stanovují léčiva či jiné toxické látky. V toxikologických laboratořích se nejčastěji využívají metody chromatografie.

2.3.1 Chromatografie

Jedná se o skupinu technik, které využívají separaci směsí na základě různých fyzikálně - chemických interakcí mezi dvěma vzájemně nemísitelnými složkami. Chromatografie je založena na separaci složek vzorku mezi dvě fáze, stacionární a mobilní. Stacionární fáze je pevná látka či kapalina, mobilní fáze tvoří kapalina či plyn. Mobilní fáze se pohybuje skrze fázi stacionární. Společně s mobilní fází prochází i vzorek. Rozdělené části vzorku (analyty) v různé míře interagují se stacionární nebo mobilní fází. Analyty, které lépe reagují se stacionární fází, se pohybují pomaleji. Ty, které se stacionární fází reagují hůře, jsou unášeny rychleji [14].

Chromatografické metody jsou flexibilní a přizpůsobivé široké škále sloučenin. Ve většině případů mohou být metody pro nové sloučeniny navrženy poměrně rychle ve srovnání s imunoanalýzou [15].

Chromatografické techniky umožňují kvantifikaci řady příbuzných sloučenin v jediném cyklu. To je výhoda především, když je stanovováno víc látek najednou nebo u požadované osobité aktivity metabolitu. Kombinace flexibility, senzitivity a specifity činí z chromatografie jednu z nejpoužívanějších technik používaných v toxikologii. Vyskytují se však i nevýhody, např. v porovnání s imunoanalýzou jsou pomalejší [15].

Plynová chromatografie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie se využívá ve většině klinických oborů, nejčastěji jsou využívány pro terapeutické monitorování hladin léků (TDM). Tyto metody a metody v kombinaci s hmotnostním spektrometrem se využívají pro jejich rychlost, flexibilitu, senzitivitu, spolehlivost a nízkou spotřebu vzorku [15].

Chromatografické metody lze rozdělit podle skupenství mobilní fáze na kapalinovou a plynovou chromatografii, nebo podle uspořádání stacionární fáze na kolonovou chromatografii a plošné techniky. Ty se dále dělí na papírovou a tenkovrstvou chromatografii [22].

2.3.2 Papírová chromatografie

Papírová chromatografie byla jedna z prvních uvedených metod chromatografie. Nalezla široké uplatnění v toxikologickém stanovení drog a léčiv. Byla nejvýznamnější metodou plošné chromatografie, a to hlavně z důvodu ekonomicky nenáročného chromatografického média [17].

Jedná se o techniku kapalinové chromatografie v plošném uspořádání. Principem separace při papírové chromatografii je unášení analytu ze vzorku pomocí mobilní fáze. Unášené analyty více nebo méně reagují se stacionární fází, a tím dochází k rozdělení na jednotlivé složky. Stacionární fáze je kapalina zakotvena v papíře, mobilní fáze protéká papírem vlivem kapilárních sil [18][19].

Mechanismem separace je rozdělování mezi dvě fáze. Papír je nosič stacionární fáze, většinou komplex celulóza – voda. Mohou být i jiná rozpouštědla např. dimethylformamid. K dané stacionární fázi je nutné najít vhodnou mobilní fázi, to zajistí, že dojde k rozdělení hledaných složek od sebe [18] [19].

Chromatogram se vyvíjí v chromatografické komoře. Vyvíjení je ukončeno vyndáním chromatogramu z vyvíjecí komory, když čelo mobilní fáze dosáhne opačného konce chromatografického papíru [21].

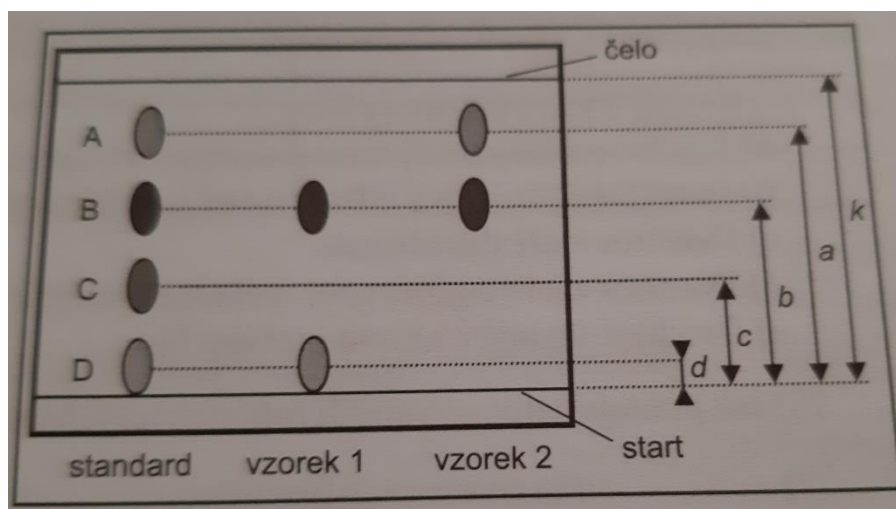
2.3.3 Chromatografie na tenké vrstvě

V toxikologických laboratořích se především využívají metody chromatografie, a to chromatografie na tenké vrstvě (TLC, thin layer chromatography). Je to účinný systém záchytu i identifikace neznámých nox. Využívaná je zejména pro relativní finanční nenáročnost. Jde o rychlou a z technického hlediska jednoduchou metodu, která je poměrně specifická a citlivá. Při jedné analýze je možné rozlišit jednotlivé složky v analyzovaném vzorku. Pro stacionární fázi se nejčastěji využívá silikagel, oxid hlinitý, celulóza, polyamid a silikagel s $-C18$, $-NH_2$ nebo $-CN$ skupinami. Fáze je natažena na skleněné podložní desce nebo na hliníkové fólii. Mobilní fáze je tvořena směsí rozpouštědel o různých polaritách [15][16][20].

Poté, co jsou analyty separovány ze vzorku, jsou naneseny na start chromatografické desky. Deska s nanesenými vzorky je umístěna do uzavřené chromatografické komory s mobilní fází. Mobilní fáze migruje přes tenkou vrstvu, rozpouští a nese molekuly vzorku. Jakmile mobilní fáze dosáhne určité výšky (čela), deska (chromatogram) se vyndá z komory a vysuší [15][16][20].

Na oddělené skvrny, které vznikly na chromatogramu, jsou nanesena postříkem různá syntetická činidla, která danou skvrnu zabarví. Dojde k vizualizaci a následně jsou barevné odstíny porovnávány. Do každé TLC jsou přidávány referenční standardy, podle nichž se kompenzují mírné výkyvy (kolísání teploty, změny v mobilní fázi) a variace v pohyblivosti [14][15][19].

Jednotlivě separované analyty se určují retenčním faktorem (R_f). Tato hodnota udává, jak daleko je látka od čela desky. R_f je charakteristický pro určitou látku v daném systému. Retenční faktor vypočítáme tak, že vzdálenost středu skvrny analytu od linie startu vydělíme vzdáleností mezi čelem mobilní fáze a linií startu [21].



Obrázek 8 Chromatogram známé směsi složek a dvou vzorků [22]

Retenční faktor pro jednotlivé složky je vypočítán podle vzorce:

$$R_f(A) = \frac{a}{k}$$

Do čitatele je dosazována vzdálenost dané složky od startu. V obrázku 8. je dosazována hodnota a, b, c a d, a následně hodnoty vzdáleností vzorku [22].

2.3.4 Plynová chromatografie

V toxikologické analýze je ke kvalitativní a kvantitativní detekci využívána technika plynové chromatografie (GC, gas chromatography). Jedná se o metodu s velkou separační účinností, a proto se používá k přesnému určení analytu. Využívá se při monitorování léčby, kontrole podávaných léčiv či k dopingové kontrole. Je vhodná pro stanovování těkavých látek a zároveň termostabilních látek [15][17].

GC může být v systému plyn – pevná látka nebo plyn – kapalina. Stacionární fáze v systému plyn – pevná látka může být absorbent, hlavně pro speciální aplikace plynů a těkavých látek. Zde se využívají molekulární síta, silikagel a aktivní uhlí. V systému plyn – kapalina je kapalná fáze navázaná na vnitřní stěnu kapilární kolony. Využívají se především křemenné kapiláry. Pro navázání kapalné fáze v koloně se používají tuhé zrnité materiály s velkou

pórovitostí. Nejčastější kapalná fáze jsou poly(dimethylsilikony) nebo siloxany. Pro určení vhodné kapalné fáze neexistuje žádná metoda. Kapalná fáze by měla dobře, ale nestejněměrně rozpouštět komponenty vzorku a být tepelně stálá [15][17][20].

Mobilní fází při GC je nosný inertní plyn, většinou dusík, hélium, argon nebo ve speciálních stanoveních se používá i vodík. Výběr nosného plynu je určen detektorem v daném přístroji. Přístroj může pracovat při konstantní teplotě, nebo je programován tak, aby běžel při různých teplotách, pokud má vzorek komponenty s různou vitalitou [15][17][20].

Vzorek, který je vstříkován, musí být vstříkován jako plyn, nebo musí být teplota injekčního portu nad bodem varu složek tak, aby se po importu z injekce vypařovaly. Vzorek par částečně prochází kolonou jako plyn a částečně se rozpouští v kapalně fázi. Těkavé sloučeniny, které jsou přítomné převážně v plynné fázi, budou mít nízký rozdělovací koeficient. Sloučeniny s vyššími teplotami varu se pomalu pohybují přes kolonu. Eluát prochází detektorem, který zpracovává elektrický signál úměrný koncentraci těkavých složek [15].

Separace analytů ve směsi je při GC řízena polaritou stacionární fáze, vlastností analytů, průtokovou rychlostí nosného plynu a pracovní teplotou. Analyt prochází kolonou nebo kapilárou podle tenze par, která je určena zčásti molekulární hmotností a zčásti polaritou látky. Z toho plyne, že malé molekuly eluují z kolony rychleji než velké molekuly. Látky nepolárního charakteru na nepolární stacionární fázi eluují podle bodu varu [20].

V systému plyn – kapalina jsou kolony většinou vyráběny ze skla nebo nerezové oceli. Balené sloupce se naplní inertními částicemi např. křemelinou, porézním polymerem či skleněnými kuličkami potažené netěkavou tekutinou (stacionární) fází. Trubkové kolony s otevřenými kapilárními stěnami s vnitřním povrchem mají vnitřní průměr od 0,25 mm do 0,50 mm a mají délku 60 m. Tekutá

vrstva je nanese na vnitřní stranu kolony. Pevná podložka potažená kapalnou fází může být také nanese na stěnách kolony. Kapalná stacionární fáze musí být při použitých teplotách netěkavá, musí být tepelně stabilní a nesmí chemicky reagovat s rozpuštěnými látkami, které mají být odděleny. Selektivní kapalná fáze se používá k oddělení polárních sloučenin na základě relativní polarit [15][17][20].

K vyhodnocení chromatogramů se používá převážně retenčního času (t_R), což je doba od nástřiku k maximální odezvě. Dále lze použít korigovaný retenční čas, u kterého je od t_R odečten mrtvý prostor kolony. Je to doba, za kterou projdou kolonou dané látky. Je možné využít relativní retenční čas (R_{tR}), což je poměr retenčního času k retenčnímu času referenční látky, např. vnitřnímu standardu. Při kvalitativním stanovení hodnotíme některý z parametrů eluční křivky, výšku nebo plochu. Měření plochy je provedeno vážením, elektromechanickým nebo analogovým integrátorem [17] [20].



Obrázek 9 Plynový chromatograf [30]

2.3.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je analogie TLC, která je v kolonovém uspořádání. Využívá se stacionární fáze o jednotné a velmi malé velikosti částic, které tvoří dělicí kolony. Mobilní fáze proudí pod tlakem, její průtoková rychlost může být regulována. Za stacionární fázi jsou vybírány absorbenty, chemicky vázané fáze či iontoměniče. Nejčastější stacionární fázi jsou absorbenty na bázi silikagelu, které mohou být modifikovány jinými funkčními fázemi. Mobilní fázi tvoří voda a směs organických rozpouštědel. Její složení je během analýzy konstantní (izokratická eluce), nebo je možné ji programově změnit (gradientová eluce) [15][20].

Stacionární fáze je zabalena do dlouhých nerezových sloupců. HPLC se obvykle provádí při laboratorní teplotě, ale je možné vložit sloupce se stacionární fází do pece a zahřívat je, aby došlo k rychlejšímu dělení. Nejběžnějším materiálem pro plnění kolon je silikagel, který je stabilní a je možné ho využít mnoha způsoby. Může být využit jako pevná náplň v chromatografii kapalina – pevná látka, nebo silikagel potažený rozpouštědlem, který slouží jako stacionární fáze v chromatografii kapalina – kapalina. Pro tento typ kolonového plnění je nejčastější mobilní fází acetonitril, methanol, voda či kombinace rozpouštědel. Pro oddělení iontových, neiontových a ionizovaných částic se používá sloupec s vyhrazenou fází [14][15].

Moderní analyzátory HPLC monitorují eluát, který opouští kolonu a v ideálním případě produkuje elektrický signál. Ten je úměrný koncentraci jednotlivých oddělených složek. Nejčastěji se pro detekci využívají spektrofotometry detekující absorbcí viditelného nebo UV záření. Díky fluorescenci některých biologických materiálů se využívají i fluorescenční detektory. Dalším běžným detektorem v HPLC je ampérometrický nebo elektrochemický detektor. Tyto detektory měří proud, který je vytvořen, když je sledovaný analyt oxidován, či redukován při nastaveném potenciálu mezi dvěma elektrodami. MS je také možné použít jako detektor [15][16][20].

Rekordér zaznamenává detekční signál proti době, kdy mobilní fáze prošla přístrojem, počínaje okamžikem vstříknutí vzorku. Retenční čas se využívá k identifikaci sloučenin, ve srovnání se standardními retenčními časy, které probíhají za stejných podmínek. Počáteční eluční kompozice mohou mít retenční časy blízké nule, což způsobuje špatnou separaci (rozlišení). Základní sloučeniny mají často nízké retenční časy, protože některé sloupce nemohou mít mobilní fáze s vysokým pH. Závislost kationtových párovacích činidel na mobilní fázi může vést k lepšímu zadržení negativně nabitých sloučenin na tomto sloupci. Sloučeniny s pozdní elucí mohou mít dlouhé retenční časy, což produkuje široká pásma, a to vede ke snížené citlivosti. Gradientová eluce je technikou HPLC, která může být použita k překonání tohoto problému. Složení mobilní fáze se mění, aby se zajistilo neustálé zvyšování pevnosti rozpouštědla v mobilní fázi, která vstupuje do kolony. Stejně gradientové eluce se provádí rychlejší změnou koncentrace mobilní fáze [15][16].

2.3.6 Detektory

V GC se používají především detektory tepelně vodivostní (TC), také zvané katarometry. Fungují na principu detekce změny tepelné vodivosti vlákna (wolframového) při eluci analytu. Vlákna tvoří protilehlá ramena, které jsou elektricky vyhřívány, aby navyšovaly teplotu. Helium má vysokou tepelnou vodivost, proto je nejčastějším nosným plynem v TC detektoru. Nosný plyn z referenční kolony proudí rovnoměrně přes jedno vlákno a lehce jej ochlazuje. Nosný plyn a oddělené sloučeniny ze vzorku kolony proudí přes druhé vlákno. Součásti vzorku mají obvykle nižší tepelnou vodivost. Elektrická změna je úměrná koncentraci analytu [15][20].

Velice rozšířený je plamenový ionizační detektor (FID). Je citlivější než detektory TC. Detekce probíhá tak, že dochází ke spalování organických látek, které jsou eluovány z kolony. Ke spalování dochází v kyslíko–vodíkovém plamínku za vzniku plazmy nabitých částic, které vytvářejí elektrický proud mezi dvěma elektrodami. Elektrický proud je úměrný koncentraci iontů [15][16][17][20].

Dále se využívá dusíkový detektor (NPD), ten selektivně detekuje látky, které ve své molekule mají dusík nebo fosfor. Keramické nebo skleněné tělísko se zdrojem alkalického kovu (rubidiem nebo chloridem cesným) je zahříváno elektrickým žhavením či kyslíko–vodíkovým plamínkem. Tím dochází k vytvoření plazmy iontů alkalických kovů. Proud plazmy reaguje citlivě k elektrodám detektoru pro přísun dusíkatých analytů, které vycházejí z kolony do prostoru detektoru. Zvýšená citlivost pro dusíkaté látky dělá tento detektor ideální pro screening léčiv a drog [15][16][20].

Pro detekci analytů s obsahem halogenů se využívá detektor elektronového záchytu (ECD), který je vysoce citlivý. Detektor obsahuje fólii s radioaktivním niklem, ten emituje beta záření, elektrony. Nosný plyn je v tomto detektoru ionizovaný, vytvoří anionty a následně proud mezi dvěma elektrodami

v detektoru. Analyty, které obsahují halogeny, vycházející z kolony do detektoru, vybírají elektrony, a tak dojde k poklesu proudu mezi elektrodami. Detektor je vnímavý vůči látkám, které dokáží zachytit elektrony. Využívá se ke stanovené např. benzodiazepinů [15][16][17].

Hmotnostní spektrometrie (MS, mass spectrometry) je fyzikálně – chemická metoda pro určení hmotnosti atomů, molekul a jejich fragmentů. Jde o konečnou identifikaci vzorků eluovaných z kolon GC nebo HPLC. Využívá se spojená technika GC/MS a LC/MS. Vzorek v MS je nejprve vypařen a poté ionizován za vzniku nabitých molekulových iontů a fragmentů, které jsou odděleny podle poměru hmotnosti k náboji. Vzorek se následně zkontroluje detektorem, který udává intenzitu iontového proudu pro každý druh. Tento základní postup zahrnuje 5 kroků: přívod vzorku a jeho zplynění, ionizace molekul, separace vzniklých iontů, měření jejich počtu a registrace vzniklých spekter. MS pracuje ve vysokém vakuu proto, aby se zabránilo rekombinaci vzniklých iontů. Pokud se ztratí vakuum, ztratí se i citlivost detekce [15][16][20].

V novějších přístrojích jsou používány jako detektory, k dělení iontů na základě různých fyzikálních principů, kvadrupól nebo iontová past. Kvadrupólový analyzátor má čtyři rovnoběžné tyčové elektrody. Na každou tyč je přiváděno stejnosměrné napětí a rovněž složka radiofrekvenčního pole. Nastavené hodnoty (amplituda, frekvence) předurčují trajektorii cest, po kterých se budou ionty s určitou hodnotou pohybovat mezi elektrodami. Iontová past funguje na podobném principu jako kvadrupól, akorát má tři elektrody, jednu kruhovou a dvě vyklenuté do prostoru kruhu. V tomto místě je shromažďován oblak iontů. Je použit základní plyn, většinou helium o nízkém tlaku. Helium zpomaluje pohyb iontů a napomáhá jejich shlukování do oblaku. Změnou nastavení veličin jsou ionty odváděny k detektoru. Dále jsou také využívány hmotnostní analyzátor FT – ICR (Fourier – Transform Ion Cyclotron Resonance) a hmotnostní spektrometr TOF – MS (Time Of Flight) [15][16][20][22].

V toxikologických laboratořích se pro detekci iontů využívá elektronový násobič, fotonásobič nebo faradayova klec. V elektronovém násobiči ionty dopadají na povrch dynody, ze které vyrazí elektron, dále jsou zesíleny systémem dynod či opakovanými kolizemi na zakřivené dynodě. Ve fotonásobiči ionty dopadají na konverzní dynodu a uvolní elektrony, ty dopadem na fosforovou desku uvolní fotony, které se zesílí ve fotonásobiči. Ve faradayově kleci dopadají ionty na povrch dynody, která následně emituje elektrony a indukuje se proud, který je zesílen a zaznamenán [15][16][20][22].

3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této bakalářské práce je zvládnutí technik chromatografie na tenkých vrstvách a plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

V teoretické části je cílem poukázat na volně prodejné léky zpopularizované reklamou a prezentované jako léčiva neškodlivá pro náš organizmus. Takováto léčiva mohou závažně poškodit zdraví, užívají-li se špatně nebo v nadměrném množství.

V kapitolách metodika a výsledky je cílem zvládnutí techniky TLC a následné vyhodnocení výsledků i výsledků z plynové chromatografie.

4 METODIKA

4.1 Extrakce

Prvním krokem vedoucím ke stanovení látky je extrakce, separační metoda, při které hledaný analyt přechází ze směsi vzorku v kapalné nebo tuhé fázi do jiné kapalné fáze. Tato metoda je velice výhodná pro separování tepelně nestabilních látek, protože se může provádět za laboratorní teploty i za chladu [16].

Extrakce lze rozdělit podle skupenství fází, mezi kterými přechází složka z pevné fáze do kapaliny, z kapaliny do kapaliny, a z kapaliny nebo plynu do pevné fáze [22].

Derivatizace je nejčastěji používána u GC a HPLC. Provádí se z praktických důvodů, zejména kvůli zvýšení citlivosti a umožnění samotné detekce, ke zvýšení rozlišení a umožnění separace, k zamezení navázání látek na koloně. Derivatizační techniky lze rozlišit do tří kategorií, podle toho, kde se deprivatizace uskutečňuje. Jsou děleny na prekolonovou, kolonovou a postkolonovou derivatizaci. Každý způsob deprivatizace má vliv na eluční charakteristiku separovaných látek [23].

Častými způsoby derivatizace jsou trimethylsililace a acetylace. Při provedení trimethylsililace je použito trimethylsililační činidlo, které je přidáno ke vzorku a vše je inkubováno 30 minut při 60 °C. Takto upravený vzorek je dán přímo do GC k analýze. Při acetylaci je přidáno ke vzorku acetylační činidlo, 24 minut necháno na ultrazvuku a následně odpařeno. Odpařený vzorek je dán k analýze [23].

4.1.1 Extrakce kapalina - kapalina (l –l)

Extrakce kapalina – kapalina je nejčastější metoda pro izolaci rozpuštěných látek pro metody chromatografie. Hodnota pH vzorku se upraví tak, aby se zajistilo, že sloučeniny, které mají být extrahovány, budou izolovány [16].

Tato extrakce se provádí z kyselého a alkalického prostředí. Kyselá a neutrální léčiva přecházejí do kyselého prostředí a bazická či slabě bazická přecházejí do bazického prostředí. Po bazické extrakci se extrakt okyseluje kyselinou chlorovodíkovou. Tímto způsobem se těkavá léčiva převádí na netěkavou formu hydrochloridů. Nejčastěji využívané extrakční činidlo je diethylether, lze použít i chloroform [23].

4.1.2 Extrakce kapalina – pevná látka (l – s)

Při extrakci kapalina – pevná látka se používá polypropylenová kolonka s malým množstvím vysokokapacitní náplní (sorbent) na bázi oxidu křemičitého. Analyt je navázán na sorbent. Nečistoty jsou z kolony vypláchnuty a konečná eluce uvolní analyt. Odpařením a následným rozpuštěním ve vhodném rozpouštědle poskytuje čistý koncentrovaný vzorek připravený pro analýzu. Polární stacionární fáze uchovávají polární analyty, ty jsou eluovány organickými rozpouštědly, zatímco nepolární stacionární fáze si uchovávají nepolární analyty a eluují se do vodního rozpouštědla [16].

Podstatou je zachycení molekul látky na pevném sorbentu, přes který protéká vzorek. Při extrakci se využívá chemických vlastností molekul, které v důsledku mezimolekulových interakcí ulpívají na sorbentu. Metodu lze nazvat též chemickou filtrací [22].

Příprava kolony

Tato extrakce je prováděna na kolonách. Kolony jsou kondicionalizovány nebo kondiciovány pro danou metodu. Pro paracetamol jsou připravovány pomocí injekční stříkačky, tou jsou nanесeny na kolonu 2 ml směsi rozpouštědla (pro alkalickou extrakci dichlormethan–isopropanol v poměru 85:15 nebo diethylether pro kyselou extrakci) a kolona je provzdušněna injekční stříkačkou tak, aby bylo odstraněno všechno přebytečné rozpouštědlo. Injekční stříkačkou jsou nanесeny na kolonu 3 ml destilované vody, tentokrát už není kolona provzdušněna [23].

Provádí se extrakce z kyselého a alkalického prostředí jako u extrakce kapalina – kapalina. Po alkalické extrakci je možné připravit hydrolyzát. Principem je, že při biotransformaci se vytváří konjugáty, které se vylučují močí, ve formě glukosiduronátu, vazbu je možné rozštěpit silnou minerální kyselinou [23].

4.2 Princip experimentu

Principem experimentu bylo porovnání metod extrakce paracetamolu. Byly porovnávány extrakce kapalina – kapalina a extrakce kapalina – pevná látka. V obou případech byla provedena kyselá extrakce. Stanovení paracetamolu bylo provedeno pomocí chromatografie na tenké vrstvě.

4.3 Postup práce

Experiment byl proveden v Krajské nemocnici Liberec a.s. na oddělení klinické a soudní toxikologie.

Chemikálie

Kyselina chlorovodíková, p.a. (Kulich, ČR), diethylether, p.a. (Penta, ČR), bezvodý síran sodný, p.a. (Penta, ČR), ethanol, p.a. (Penta, ČR), methanol, p.a. (Penta, ČR), ethylacetát, p.a. (Penta, ČR), amoniak, p.a. (Kulich, ČR), chlorid železitý, p.a. (Kulich, ČR), ferrikyanid draselný, p.a. (Kulich, ČR), paralen pro děti 125 mg (Zentiva Group, ČR)

Aparatura

Extrakce kapalina – kapalina byla provedena v dělicí nálevce.



Obrázek 10 Aparatura pro extrakci kapalina – kapalina ^[31]

Extrakce kapalina – pevná látka byla provedena na koloně, vzorek byl aplikován pomocí injekční stříkačky a lisu. Kolony Tessek SGX s náplní C 18,60 μm byly dodány od firmy Merck.



Obrázek 11 Aparatura pro extrakci kapalina - pevná látka ^[31]

Příprava vzorku

Nejprve byl připraven roztok paracetamolu z 19 tablet paralenu pro děti. Tablety měly koncentraci 125 mg/l, ty byly rozpuštěny v 0,5 l destilované vody.

Příprava vzorku v GC

Pro vyšetření GC je používána krev či moč. Krev je nejprve nutné stabilizovat pomocí pufru. Další úpravou může být derivatizace, to záleží na povaze vyšetření, každá skupina léčiv je jinak citlivá a má jiné nároky. Poté je vzorek extrahován buď metodou kapalina – kapalina nebo kapalina – pevná látka. V případě stanovení moči není potřeba stabilizace, jediné pokud je hustá moč, tak je nutné ji naředit. Dále se postupuje stejně jako u stanovení z krve.

Extrakce kapalina – kapalina

Z připraveného roztoku paracetamolu bylo odebráno 20 ml a bylo přidáno 50 ml diethyletheru. Připravený roztok byl okyselen kyselinou chlorovodíkovou na pH 3 – 4. Roztok byl nalit do dělicí nálevky a po dobu dvou minut protřepáván. Po ustálení fázové rovnováhy diethylether – voda byla odpuštěna destilovaná voda a odpadní látky, separovaný Paracetamol, který extrakcí přešel do diethyletheru. Diethylether s paracetamolem byl přefiltrován přes bezvodý síran sodný, aby se vychytaly zbývající nečistoty. Přefiltrovaný roztok byl odpařen do sucha na vodní lázni.

Tímto způsobem byla provedena extrakce u 18 vzorků.

Extrakce kapalina – pevná látka

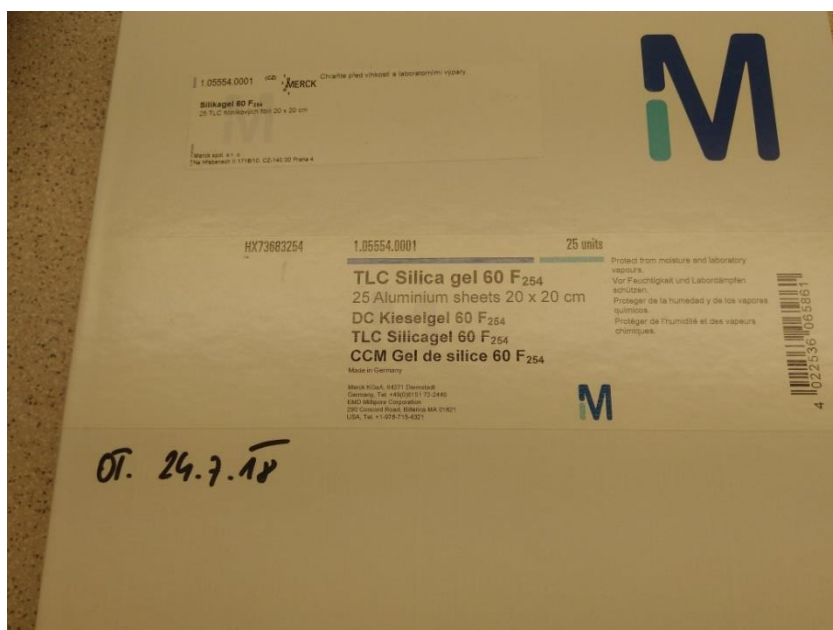
K extrakci bylo připraveno 20 ml roztoku paracetamolu, který byl okyselen na pH 3 – 4 kyselinou chlorovodíkovou. Připravený roztok byl nabrán do injekční stříkačky. Na stříkačku byla nasazena kolona a přes ni byl eluován roztok. Následně byla kolona provzdušněna. Dále bylo odlito 10 ml diethyletheru, ten byl nabrán do stříkačky a eluován přes kolonku, aby se uvolnil paracetamol navázaný na sorbentu v koloně. Vzniklý roztok byl odpařen na vodní lázni.

Touto extrakcí bylo připraveno 18 vzorků.

Tenkvrstvá chromatografie

Obsah v odpařených kádinkách byl rozpuštěn v 1 ml koncentrovaného ethanolu. Mezitím byla připravena silikagelová deska, na tu byl načrtnut start a čelo. Poté bylo na desku nanášeno 10 μ l roztoku ve dvoucentimetrových rozestupech.

Silikagelová deska, je hliníková deska potažena silikagelem.

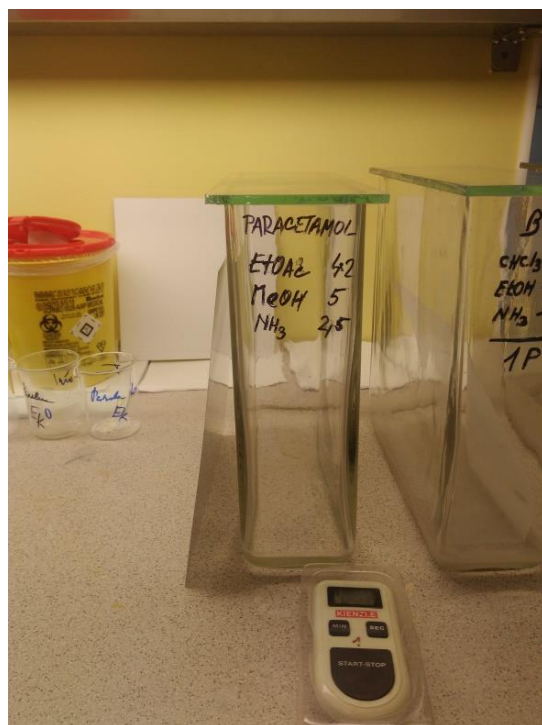


Obrázek 12 Silikagelová deska [31]

Silikagel je granulovitá, pórovitá forma oxidu křemičitého, vyráběna z křemičitanu sodného.

Pro vyvíjení silufolové desky byla použita vyvíjecí komora, která byla naplněna mobilní fází.

Příprava vyvíjecí komory byla provedena tak, že do skleněné vyvíjecí komory byla nalita směs rozpouštědel ethylacetát – methanol – amoniak v poměru 42:5:2,5. Zakrytá soustava byla sycena mobilní fází 15 minut.



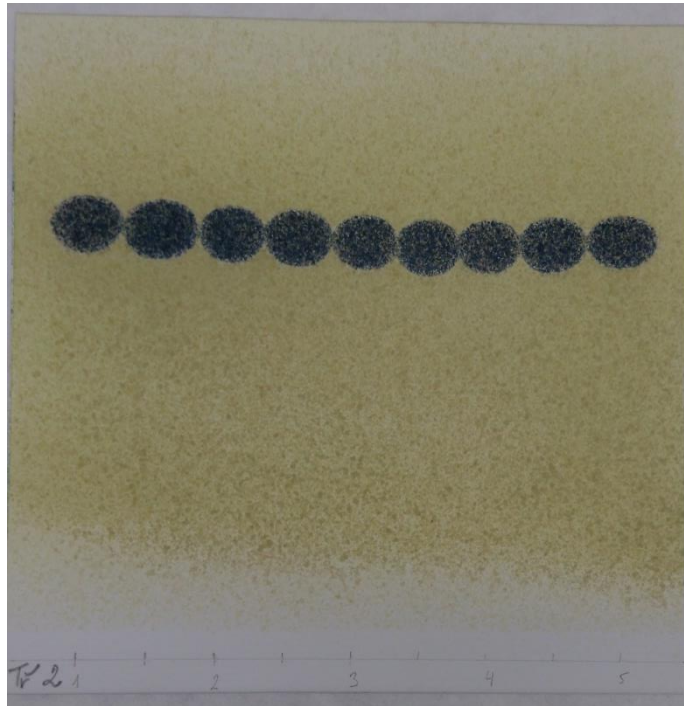
Obrázek 13 Vytěžovací komora ^[31]

Deska byla ponořena do vytěžovací komory a byla vytěžována cca 60 minut. Po vytěžení byla deska vyjmuta a obarvena detekčními činidly. Nejprve byl na desku nanesen aerosol chloridu železitého, který měl oranžovou barvu, a následně byla deska přestříkána aerosolem ferrikyanidu draselného, který měl zelenou barvu.

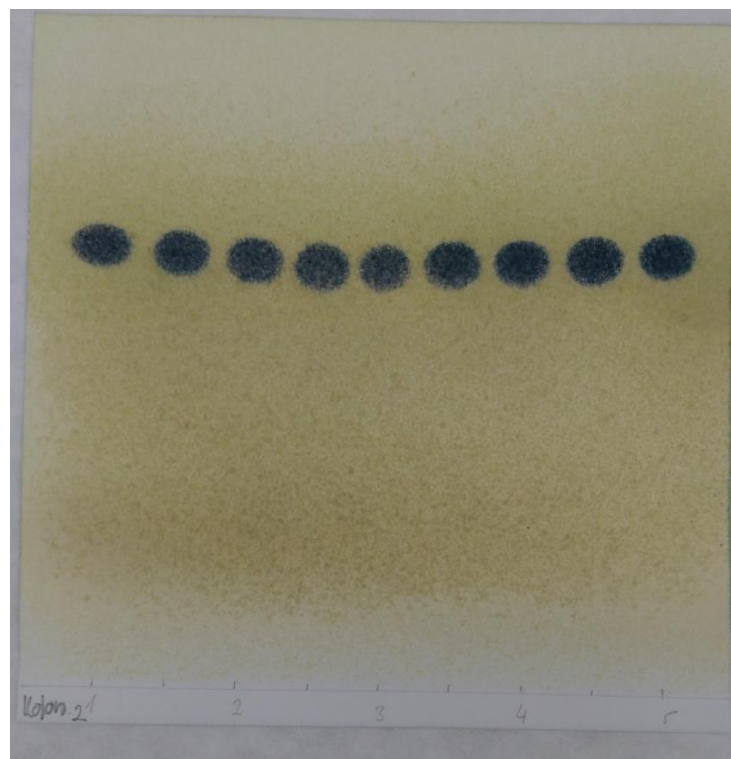
Bylo prováděno měření na výtěžnost extrakcí, na opakovatelnost metody a vliv teploty. Na výtěžnost bylo provedeno 18 měření na extrakci kapalina – kapalina, 18 měření na extrakci kapalina – pevná látka, 9 měření na opakovatelnost metody a 9 měření na vliv teploty.

5 VÝSLEDKY

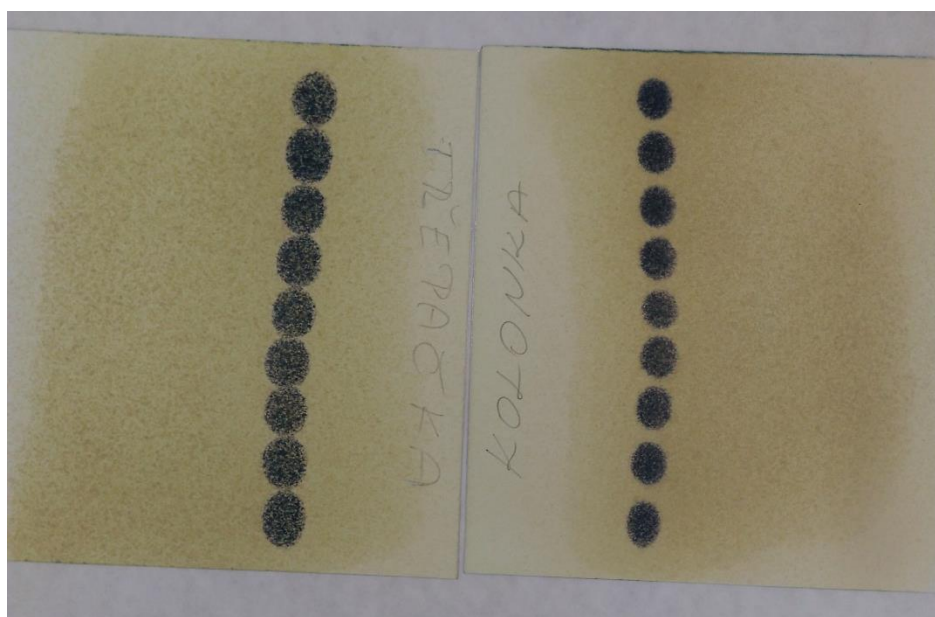
5.1 Výtěžnost extrakcí, opakovatelnost a vliv teploty



Obrázek 14 Druhá výsledná deska extrakce I – I ^[31]



Obrázek 15 Druhá výsledná deska extrakce l – s ^[31]



Obrázek 16 Porovnání desek z extrakce l - s a l - l ^[31]

Výsledky stanovení jsou zobrazeny v příloze 1 až 6. Statistické zpracování dat bylo vypočítáno pomocí programu Microsoft Excel 2010. Vyhodnocení bylo provedeno statistikou popisnou metodou a Mann – Whitneyovým testem.

5.1.1 Zpracování získaných dat

Pro získání hodnoty výtěžnosti byla změřena výška a šířka skvrny a také spočítána plocha skvrny pomocí milimetrového papíru. Tabulky se všemi hodnotami v příloze 7 až 10.

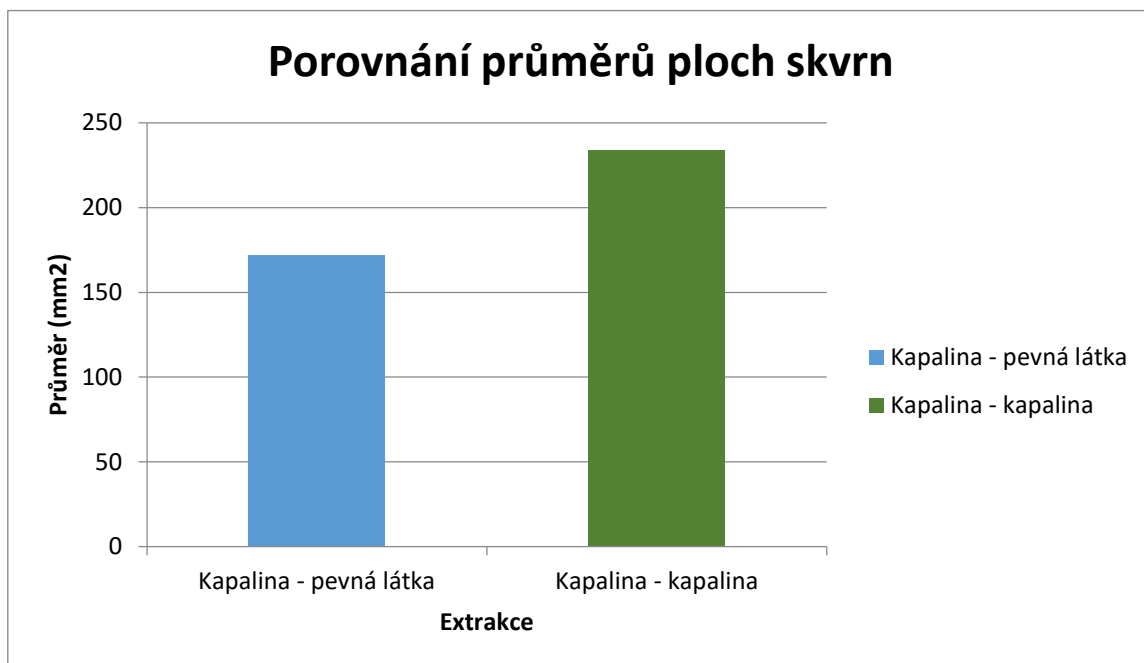
Tabulka 1 Statistické hodnoty plochy skvrn na milimetrovém papíru

Měření ploch na milimetrovém papíru						
$[mm^2]$	Kapalina – pevná látka	Kapalina - kapalina	Kapalina – pevná látka opakovat elnost	Kapalina – kapalina opakovat elnost	Kapalina – pevná látka teplota	Kapalina - kapalina teplota
Průměr	171,9444	234,1667	184,4444	264,7778	193,7778	276,6667
Sm. Odchylka	15,5830	19,9451	10,7508	18,8961	12,0626	56,6392
Rozptyl	242,8302	397,8056	115,5802	357,0617	145,5062	3208

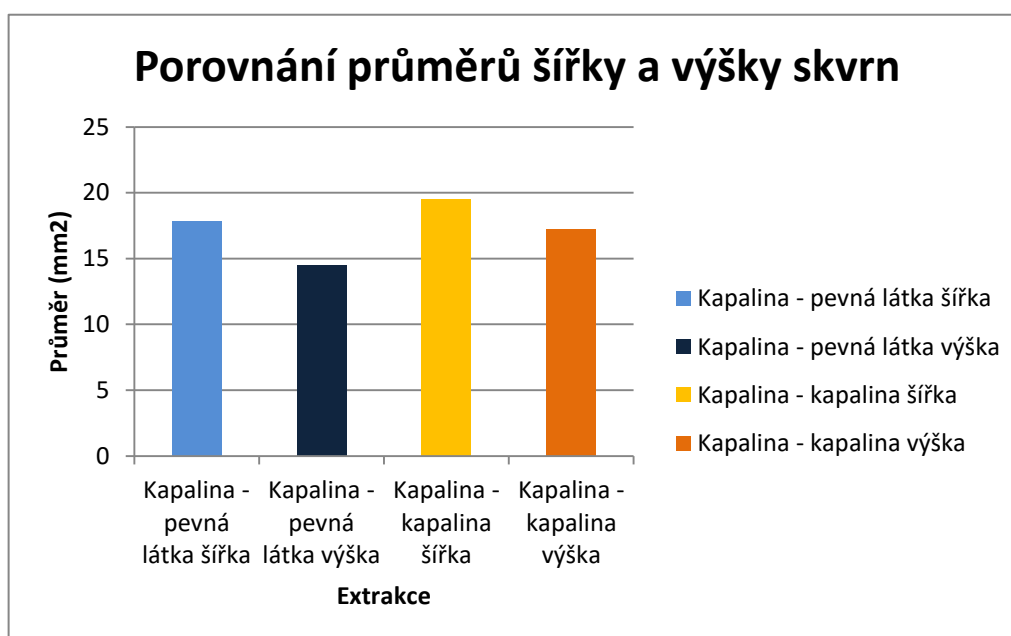
Výsledek Mann – Whitney U testu vyšel tak, že hodnota U je 1,5. Kritická hodnota U při $p < 0,05$ je 99. To činí výsledek statisticky významný. Protože se výsledky extrakce statisticky liší, znamená to, že efektivnější metoda pro extrakci je kapalina – kapalina.

Tabulka 2 Statistické hodnoty šířky a výšky skvrn

Měření šířky a výšky skvrn			
Extrakce [mm]	Průměr	Směrodatná odchylka	Rozptyl
Kapalina – pevná látka	17,8333	1,5366	2,3611
	14,5	1,2583	1,5833
Kapalina - kapalina	19,5	1,9791	3,9167
	17,2222	1,0304	1,0617
Kapalina – pevná látka opakovatelnost	17,5556	2,11403	4,4691
	16,6667	1,8856	3,5556
Kapalina - kapalina opakovatelnost	20,2222	1,9309	3,7284
	18,5556	0,9558	0,9135
Kapalina – pevná látka teplota	19,5556	1,0657	1,1358
	14,7778	0,7857	0,6172
Kapalina - kapalina teplota	20,4444	2,2167	4,9136
	19	1,1547	1,3333



Obrázek 17 Graf porovnání průměrů ploch skvrn ^[32]



Obrázek 18 Graf porovnání průměrů šířky a výšky skvrn ^[32]

Z vyhodnocení Mann – Whitneyho U testu vyplývá, že efektivnější metodou extrakce je kapalina – kapalina.

Ze získaných hodnot i vyvíjecích desek je zřetelné, že extrakce kapalina – kapalina má větší výtěžnost než extrakce kapalina – pevná látka. Měřením bylo zjištěno, že vliv teploty neovlivní stanovení paracetamolu. Metodu bylo možné několikrát opakovat, aniž by byl znatelný rozdíl ve výtěžnosti.

5.2 Výsledky plynové chromatografie

Z Oddělení klinické a soudní toxikologie v Liberci byly poskytnuty chromatogramy z plynového chromatografu, které byly pozitivní na nález paracetamolu. Chromatogramy jsou zařazeny v příloze 11 až 14.

Byl poskytnut i seznam vyšetření a záchytu Paracetamolu za rok 2017. Celkem bylo zaznamenáno 287 vyšetření s požadavkem na záchyt Paracetamolu, z toho bylo 146 vzorků negativních a 141 pozitivních nálezů.



Obrázek 19 Graf statistiky záchytu paracetamolu za rok 2017 ^[32]

Všechny vzorky byly nejprve vyšetřeny tenkovrstvou chromatografií. Pokud zde byl pozitivní nález, byl vzorek kvantifikován na plynovém chromatografu.

Za rok 2018 bylo vyšetřeno 502 vzorků na intoxikaci paracetamolem. Z celkového počtu stanovení bylo 77 pozitivních a 425 negativních záchytů. Pozitivní nález byl u 390 živých pacientů, z toho byly 4 děti. Dále bylo stanoveno 112 nálezů z nekroptického materiálu, z toho bylo 1 dítě. V převážné většině se vyšetření provádělo u dospělých, v 7 případech bylo provedeno u dětí.



Obrázek 20 Statistika záchytu paracetamolu za rok 2018 ^[32]

6 DISKUZE

Byly provedeny dvě metody extrakce, kapalina – kapalina a kapalina pevná látka. Z naměřených hodnot byla statisticky vyhodnocena výtěžnost techniky. V našem měření byla stanovena průměrná výtěžnost, u extrakce kapalina – kapalina byla hodnota plochy skvrn 234,1667 mm², průměr výšky 17,2222 mm a průměr šířky 19,5 mm. U extrakce kapalina – pevná látka byla stanovena hodnota plochy skvrn 171,94444 mm², průměr výšky 14,5 mm a průměr šířky 17,8333 mm. Pomocí Mann – Whitney U testu bylo statisticky vyhodnoceno, že metoda kapalina – kapalina je efektivnější. Z těchto údajů vyplývá, že výtěžnost extrakce kapalina – kapalina je větší než u extrakce kapalina – pevná látka.

Metoda extrakce kapalina – pevná látka byla méně výtěžná, pravděpodobně proto, že kolony určené pro separaci mají omezený počet vazebných míst pro hledaný analyt. Jakmile došlo k maximálnímu navázání analytu, analyt, který byl v nadbytku, byl spolu s maticí odplaven. To je možný důvod, proč v našem pokusu byla extrakce kapalina - pevná látka méně výtěžná.

Extrakce kapalina – kapalina je jedna z prvních metod extrakce, která se v oblasti toxikologie a stanovené TLC začala používat a přetrvala dodnes. Jedná se o manuální a časově náročnější metodu extrakce analytů. Výhodou je její výtěžnost, i z malého množství vzorku lze získat dostatečné množství analytu, avšak pro dnešní dobu má mnoho nevýhod. Jedna z hlavních nevýhod je časová náročnost metody a spotřeba organických rozpouštědel a ostatních chemikálií. Spotřeba rozpouštědel se pohybuje okolo 50 ml pro extrakci, oproti extrakci kapalina – pevná látka, kde je spotřeba okolo 20 ml [15][17][33].

Extrakce kapalina – pevná látka, prováděna na kolonách, je prvním krokem k automatizaci chromatografických postupů, čímž postupně tak vytlačuje metodu kapalina – kapalina. Ve srovnání s extrakcí kapalina – kapalina má tato metoda

výhodu v bezpečnosti práce, ve spotřebě vzorku, stačí minimum. Jde o levnější a rychlejší metodu, vzorky na kolonách je možné lépe skladovat a transportovat s trvanlivostí až 8 měsíců při – 20 °C. Zároveň je tato metoda jednoduchá na provedení. Jedinou nevýhodou jsou neexistující kolony pro novější léky a drogy. K dnešnímu dni existuje mnoho specifických kolon pro stanovení nejrůznějších léčiv, například kolony pro stanovení amfetaminu, kanabinoidů a jiných látek [34][35].

O tom, která metoda je levnější lze diskutovat, záleží na dané laboratoři. Některé laboratoře si potřebné směsi chemikálií namíchají sami a jen speciální chemikálie kupují, jiné nakupují chemikálie všechny [30].

Toxikologická vyšetření se pohybují v cenovém rozmezí od 500 Kč až po 5 000 Kč. Takováto vyšetření se provádí pro samoplátce, pro oddělení nemocnice, pro Policii ČR v případě přestupků, nehod a jiných situací, pro Vězeňskou službu a také pro firmy, které provádí namátkové kontroly na drogy a alkohol. Základní vyšetření, imunometoda, stojí podle ceníku nemocnice Liberec 547 Kč, metoda TLC se pohybuje okolo 2 000 Kč. Nejdražší metodou používanou v nemocničních laboratořích je GC - MS. Tato metoda, jako screening, stojí 4 751 Kč, jedná-li se o určení dané nox, je cena nižší.

Cena těchto vyšetření je vysoká zejména kvůli specifickým materiálům pro stanovení daných látek, ale i kvůli práci laborantek a laborantů, kteří tyto vyšetření provádí.

Byla provedena statistika záchytu paracetamolu v Krajské nemocnici Liberec a.s. Bylo pozorováno, zda je vzorek pozitivní nebo negativní, dále bylo pozorováno, jedná-li se o dítě či dospělého a jestli je vzorek ze živého pacienta nebo z nekroptického materiálu. Celkem bylo zachyceno 502 případů intoxikace či na její podezření.

Ze statistiky vyplývá, že ve většině případů se jednalo o dospělé, bylo zachyceno pouze sedm dětí, které byly vyšetřovány na intoxikaci paracetamolem. Z těchto sedmi pacientů byly dva pozitivní. Možným důvodem intoxikace u dětí je nepozornost rodičů při dávkování nebo při čtení příbalového letáku. Někteří rodiče tak nevědomě intoxikují své děti. Dalším důvodem intoxikace dětí je pokus o sebevraždu, to bývá pozorováno především u dětí v období puberty, jelikož se jedná o volně prodejný lék a je možné ho najít v každé domácnosti, což činí z Paralenu jejich první volbu [36].

U dospělých je intoxikace nebo podezření na ni častější. Důvodem intoxikace v těchto případech je nepozornost při čtení příbalové informace používaných léčiv. Většina lidí si při nachlazení koupí Paralen tablety a rozpustné horké nápoje, které podle reklam okamžitě uleví od rýmy a nachlazení. Tyto horké nápoje, ale obsahují dávku paracetamolu, a proto není vhodné po jejich vypití si ihned brát tabletu Paralenu. Tímto způsobem dochází k intoxikaci. Dalším možností intoxikace je klasické předávkování. Lidé si na bolest vezmou dvě až tři tablety Paralenu a v některých případech je zapijí alkoholem se záměrem urychlit nástup účinku. Hlavně u starších pacientů dochází k předávkování a následné smrti, jejich organismus, především játra a ledviny, už nezvládnou takový příval toxické látky. V posledních 5 letech se na pultech lékáren objevil lék Tramadol/paracetamol Teva, který obsahuje malé množství paracetamolu na zvýšení účinku tramadolu. Tento lék je předepisován na bolest po těžkých operacích a chirurgických zákrocích [36].

I přesto, že je pro průkaz léčiv či drog častěji využívána metoda GC – MS, má i TLC své nezastupitelné místo v klinické toxikologii. Ať už se jedná o screeningové vyšetření či o cenově výhodnější techniku.

7 ZÁVĚR

Byla provedena extrakce paracetamolu oběma metodami a následný průkaz technikou TLC. Měřením byly porovnány dvě metody extrakce, a to extrakce kapalina – kapalina a kapalina – pevná látka.

Porovnávána byla výtěžnost dvou extrakčních metod. Extrakce byly provedeny podle standardních operačních postupů, z obou metod se povedlo extrahovat paracetamol.

Ze statistického vyhodnocení vyplývá, že metoda extrakce kapalina – kapalina byla výtěžnější, než metoda kapalina – pevná látka, a to jak ve vyhodnocení šířky a výšky skvrny, tak ve vyhodnocení její plochy. Byl také proveden pokus na opakovatelnost metody a pokus na vliv teploty na průkaz. V obou pokusech byl prokázán zanedbatelný vliv na průkaz.

Do budoucna by metoda kapalina – kapalina neměla být vytlačena, jelikož i přes svou časovou náročnost má dobré výsledky a skvěle se doplňuje s metodou kapalina – pevná látka.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

COX	cyklooxygenáza
ECD	detektor elektronového záchytu
FID	plamenový ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
GIT	gastrointestinální trakt
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
NAPQI	N – acetyl – p - benzochinonimin
NPD	dusíkový detektor
NSA	nesteroidní antirevmatika
PHS	prostaglandin H – synthasa
TC	tepelně vodivostní
TLC	chromatografie na tenké vrstvě

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] FENDRICH, Zdeněk. Metamizol - nové účinné analgetikum s dlouhou historií. Přehled farmakologie a praktického využití. *Časopis lékařů českých*. 2000, **139**(14), 440 - 444.
- [2] DOLEŽAL, Tomáš. Současné postavení metamizolu v terapii bolesti. *Farmakoterapie*. 2006, **2**(4), 458 - 460.
- [3] VOTAVA, Martin. Analgetika. *Farmakologie*. 1. Praha: Grada Publishing, 2018, 303 - 311. ISBN 9788024755588.
- [4] ADAM, Zdeněk a Zdeněk FOJTÍK. Neopioidná analgetika - farmakologie a klinické využití. *Zdravotnictví a medicína* [online]. Praha: Divize Medical Services, 2006 [cit. 2018-12-08]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/neopioidni-analgetika-farmakologie-a-lecebne-vyuziti-173267>
- [5] ZEGZULKOVÁ, Kateřina. Diklofenak - léčba bolesti v ordinaci praktického lékaře. *Acta medicae*. 2015, **4**(10), 83 - 85.
- [6] VYMAZAL, Tomáš a Karel URBÁNEK. Léčba bolesti fixní kombinací orfenadrinu a diklofenaku. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2018, **32**(3), 26 - 33. ISSN 1803-5353.
- [7] HODIS, Jiří. Nová fakta o paracetamolu, rizika předávkování, intoxikace a jejich zvládání. *Praktické lékárenství: časopis postgraduálního vzdělávání pro farmaceuty*. 2015, **11**(3), 90 - 92. ISSN 1801-2434.
- [8] HLUŠIČKA, Jiří. Intoxikace paracetamolem. *Praktický lékař*. 2017, **97**(1), 38 - 40.
- [9] HLADÍK, Michal, Andrea OLOSOVÁ, Iveta JOUROVÁ, Tomáš ZAORAL, Asad BAKHTARY, Romuald ČUŘÍK a Štěpán RUCKI. Akutní poškození jater paracetamolem. *Pediatric pro praxi*. 2005, **2005**(4), 212 - 214. ISSN 1803-5264.
- [10] LINHART, Igor. *Toxikologie: interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. 2., upr. a rozš. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2014. ISBN 978-807-0808-771.
- [11] PELCLOVÁ, Daniela. *Nejčastější otravy a jejich terapie*. 2., dopl. a rozš. vyd. Praha: Galén, c2009. ISBN 978-807-2626-038.

- [12] VIŠŇOVSKÝ, Peter. Salicylany a analgetická nefropatia. *Časopis lékařů českých*. 1983, 122 (13), 404.
- [13] PEKÁREK, Jan. Kyselina acetylsalicylová. *Liečivár*. 1995, 19 (1), 3.
- [14] Acetaminofen. *Pubchem* [online]. Bethesda: US National Library of medicine, 2019 [cit. 2019-02-19]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acetaminophen#section=pH>
- [15] BISHOP, Michael L., Edward P. FODY a Larry E. SCHOEFF. *Clinical chemistry: techniques, principles, correlations*. 6. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2010. ISBN 9780781790451.
- [16] MOFFAT, Anthony C., M. David OSSELTON a Brian WIDDOP. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 4. London: Pharmaceutical Press, 2011. ISBN 9780853697114.
- [17] CHUNDELA, Bedřich. *Vybrané kapitoly z toxikologie*. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání středních zdravotnických pracovníků, 1986. Učební texty (Institut pro další vzdělávání středních zdravotnických pracovníků).
- [18] *Chromatografie* [online]. Praha: Datový standard MZ ČR, 2005 [cit. 2019-03-03]. Dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJAME.htm
- [19] *Cvičení z vybraných fyzikálně-chemických metod* [online]. Univerzita Palackého v Olomouci: Katedra fyzikální chemie, 2004 [cit. 2019-03-03]. Dostupné z: http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/chrom/chrom_teorie.htm
- [20] BALÍKOVÁ, Marie. *Forenzní a klinická toxikologie: laboratorní toxikologická vyšetření*. Druhé, doplněné vydání. Praha: Galén, [2017]. ISBN 978-807-4923-043.
- [21] Thin Layer Chromatography, TLC Paper Chromatography, PC. *Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova* [online]. Univerzita Karlova: Katedra analytické chemie, 1996 [cit. 2019-03-24]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/tlpc.html>
- [22] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-808-6369-228.
- [23] SOP. Standartní operační postupy toxikologické laboratoře nemocnice Liberec a.s.

- [24] Metamizol. *Wikipedia* [online]. [cit. 2019-01-09]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Metamizol#/media/File:Metamizol.svg>
- [25] Propyphenazone. *Wikipedia* [online]. [cit. 2019-01-09]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Propyphenazone#/media/File:Propyphenazone-2d-skeletal.png>
- [26] Diklofenak. *Wikipedia* [online]. [cit. 2019-01-09]. Dostupné z: <https://sv.wikipedia.org/wiki/Diklofenak#/media/File:Diclofenac.png>
- [27] Kyselina acetylsalicylová. *Wikiskripta* [online]. [cit. 2019-04-09]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Kyselina_acetylsalicylov%C3%A1#/media/File:Acetylsalicyls%C3%A4ure2.svg
- [28] Paracetamol. *Wikipedia* [online]. [cit. 2019-01-09]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Paracetamol#/media/File:N-Acetyl-p-aminophenol.svg>
- [29] Metabolism. *Dentalcare* [online]. [cit. 2019-04-09]. Dostupné z: <https://www.dentalcare.com/en-us/professional-education/ce-courses/ce486/metabolism>
- [30] Mgr. Aneta Šimonová, 22.11.2018
- [31] Hana Straková, 1.8.2018
- [32] Hana Straková, 3.4.2019
- [33] VEČERKOVÁ, Jarmila. *Postupy při záchytu a identifikaci léčiv a jejich metabolitů v biologickém materiálu pomocí chromatografie na tenkých vrstvách*. 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1983.
- [34] Extrakce. *Přírodovědecká fakulta* [online]. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 1996 [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>
- [35] SPE - Aplikace. *Labicom* [online]. Olomouc: Matosoft, 2019 [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: <https://www.labicom.cz/produkty/instrumentace/priprava-vzorku/spe/spe-aplikace>
- [36] Mgr. Jitka Macháčková, 17.4.2019

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Struktura metamizolu	11
Obrázek 2	Struktura propyfenazonu	14
Obrázek 3	Struktura diklofenaku	15
Obrázek 4	Struktura kyseliny salicylové	17
Obrázek 5	Struktura paracetamolu	20
Obrázek 6	Játra s inklusemi, barveno hematoxylin – eosin	23
Obrázek 7	Metabolismus paracetamolu	24
Obrázek 8	Chromatogram známé směsi složek a dvou vzorků	28
Obrázek 9	Plynový chromatograf	30
Obrázek 10	Aparatura pro extrakci kapalina – kapalina	40
Obrázek 11	Aparatura pro extrakci kapalina - pevná látka	41
Obrázek 12	Silikagelová deska	43
Obrázek 13	Vyvíjecí komora	44
Obrázek 14	Druhá výsledná deska extrakce l – l	45
Obrázek 15	Druhá výsledná deska extrakce l – s	46
Obrázek 16	Porovnání desek z extrakce l - s a l – l	46
Obrázek 17	Graf porovnání průměrů ploch skvrn	49
Obrázek 18	Graf porovnání průměrů šířky a výšky skvrn	49
Obrázek 19	Graf statistiky záchytu paracetamolu za rok 2017	50
Obrázek 20	Statistika záchytu paracetamolu za rok 2018	51

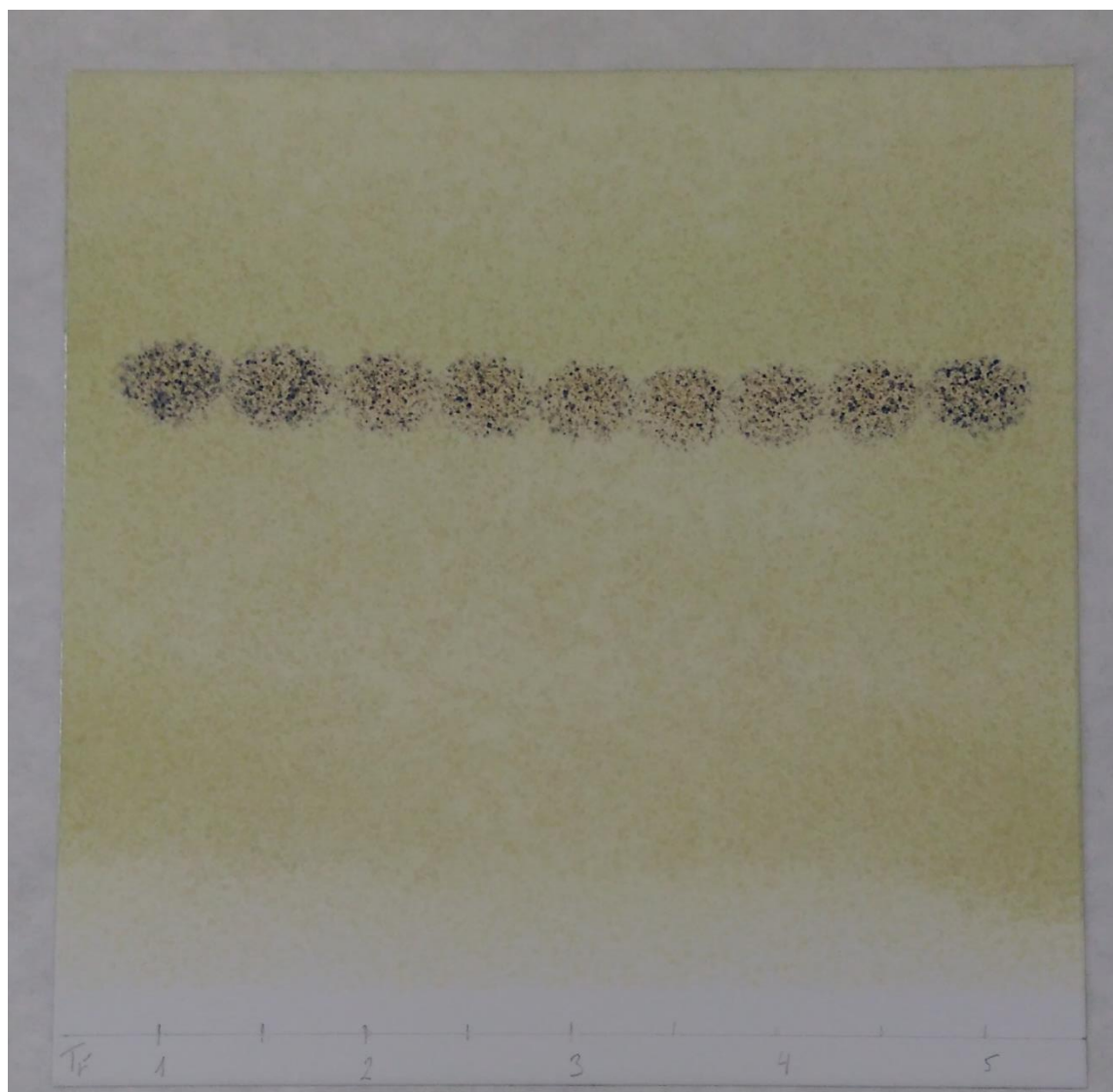
11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 Statistické hodnoty plochy skvrn na milimetrovém papíru	47
Tabulka 2 Statistické hodnoty šířky a výšky skvrn.....	48

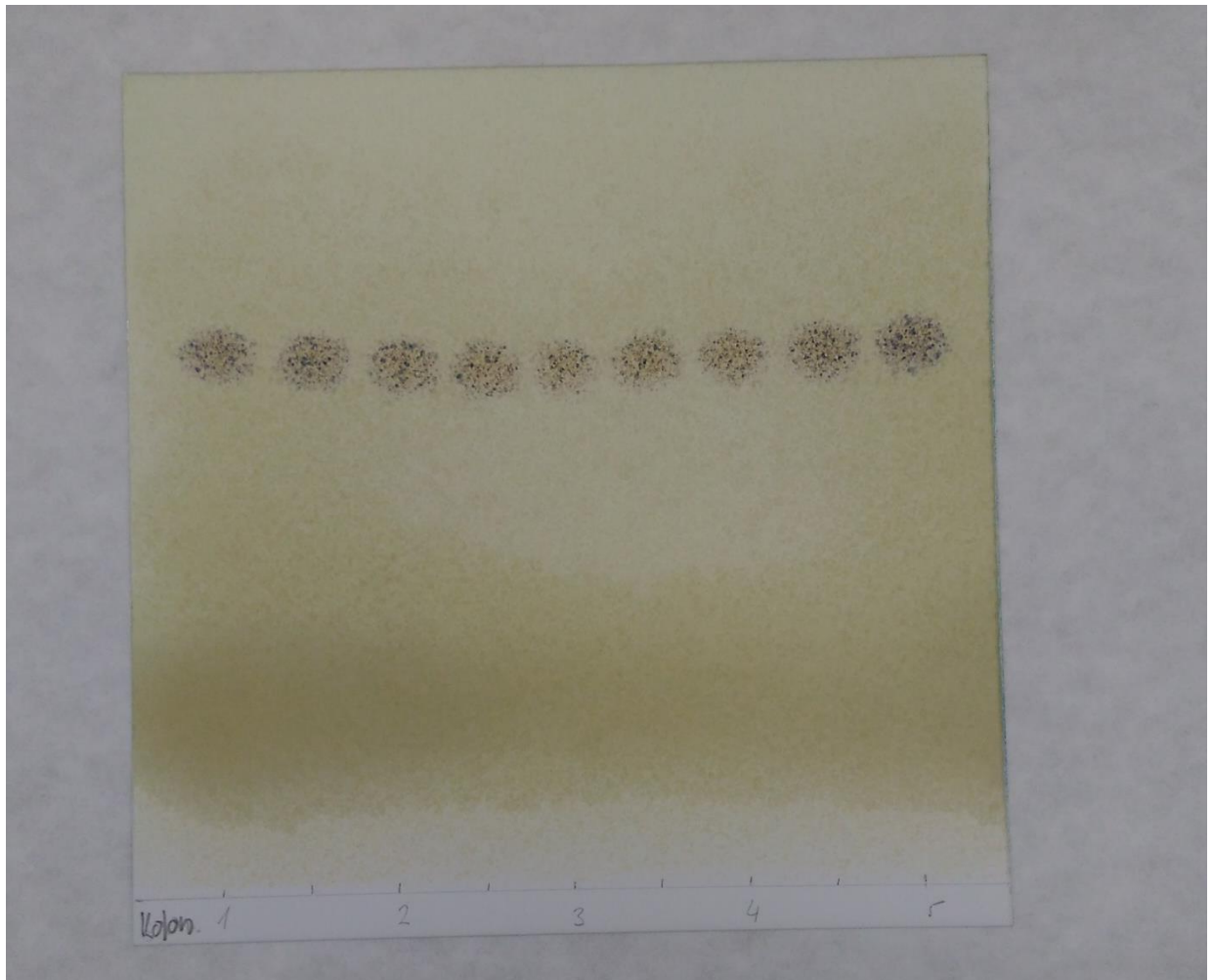
12 SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1 Výsledná deska extrakce l – l
- Příloha 2 Výsledná deska extrakce l – s
- Příloha 3 Výsledná deska extrakce l – l vliv teploty
- Příloha 4 Výsledná deska extrakce l – l opakovatelnost
- Příloha 5 Výsledná deska extrakce l – s vliv teploty
- Příloha 6 Výsledná deska extrakce l – s opakovatelnost
- Příloha 7 Tabulka výsledky měření ploch skvrn (kolona a výtřep)
- Příloha 8 Tabulka výsledky měření ploch skvrn (teplota a opakovatelnost)
- Příloha 9 Tabulka výsledky měření šířky a výšky skvrn (kolona a výtřep)
- Příloha 10 Tabulka výsledky měření šířky a výšky skvrn (teplota a opakovatelnost)
- Příloha 11 Chromatogram 1
- Příloha 12 Chromatogram 2
- Příloha 13 Chromatogram 3
- Příloha 14 Chromatogram 4

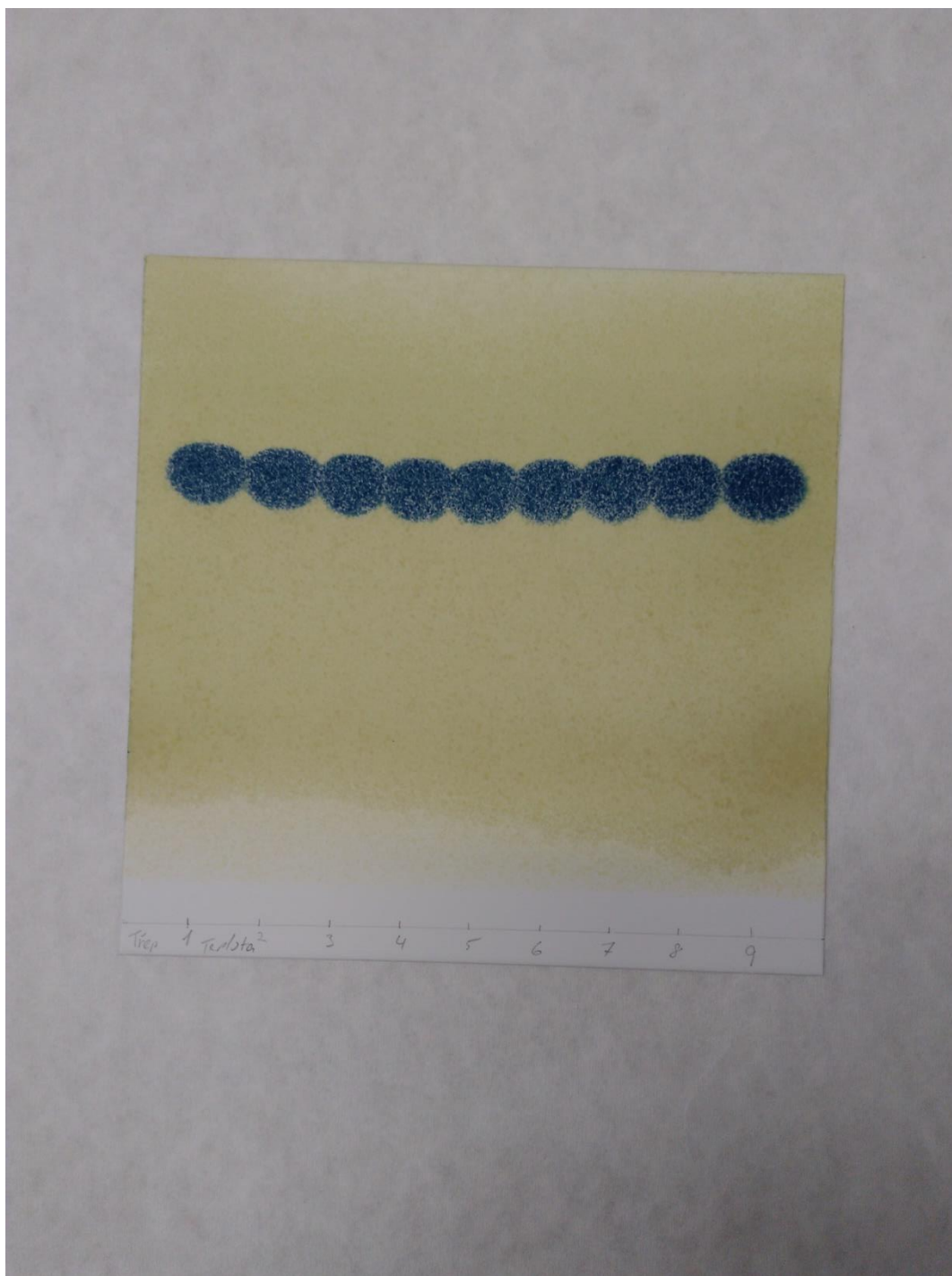
Příloha 1 Výsledná deska extrakce 1-1



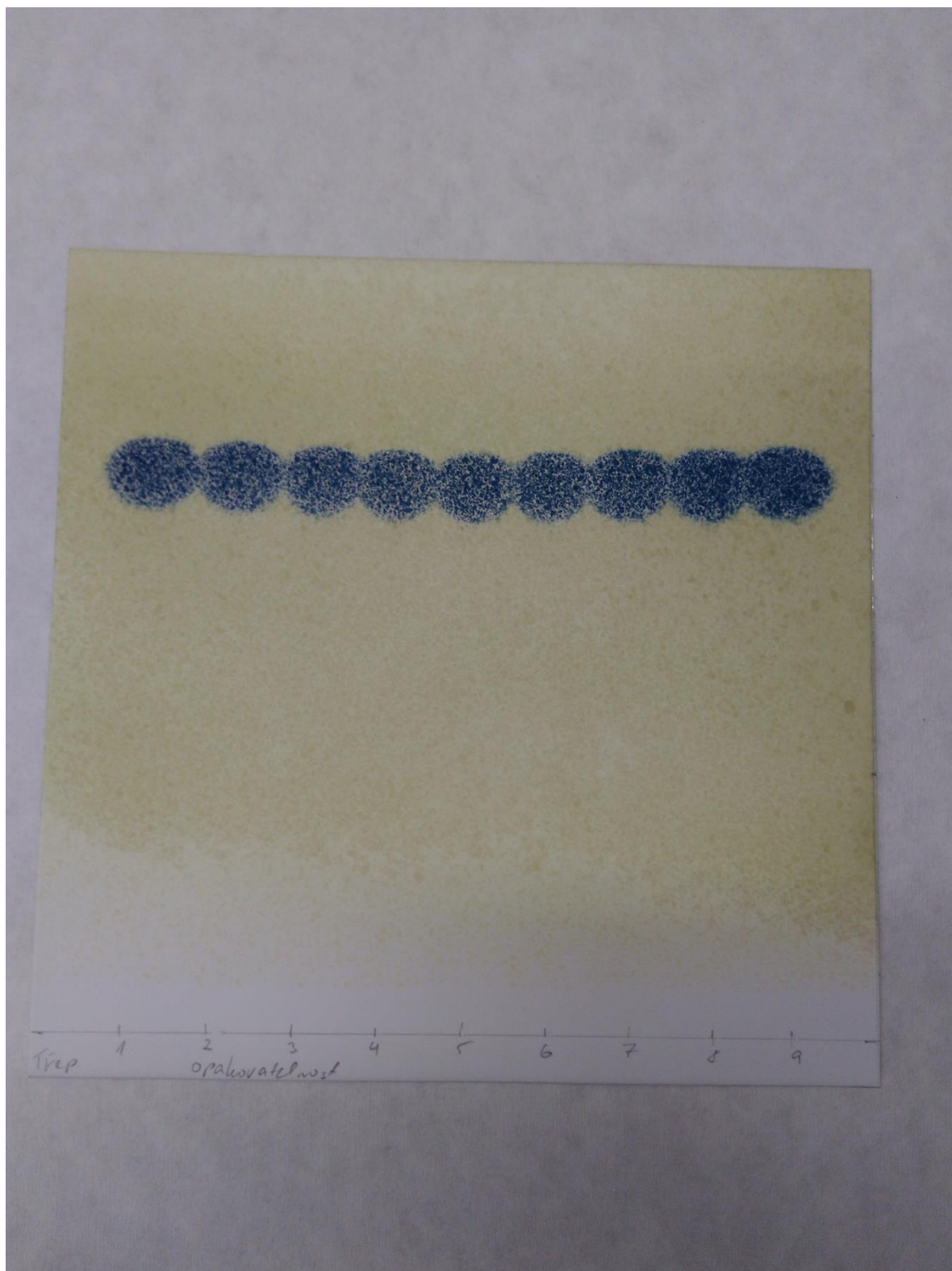
Příloha 2 Výsledná deska extrakce l – s



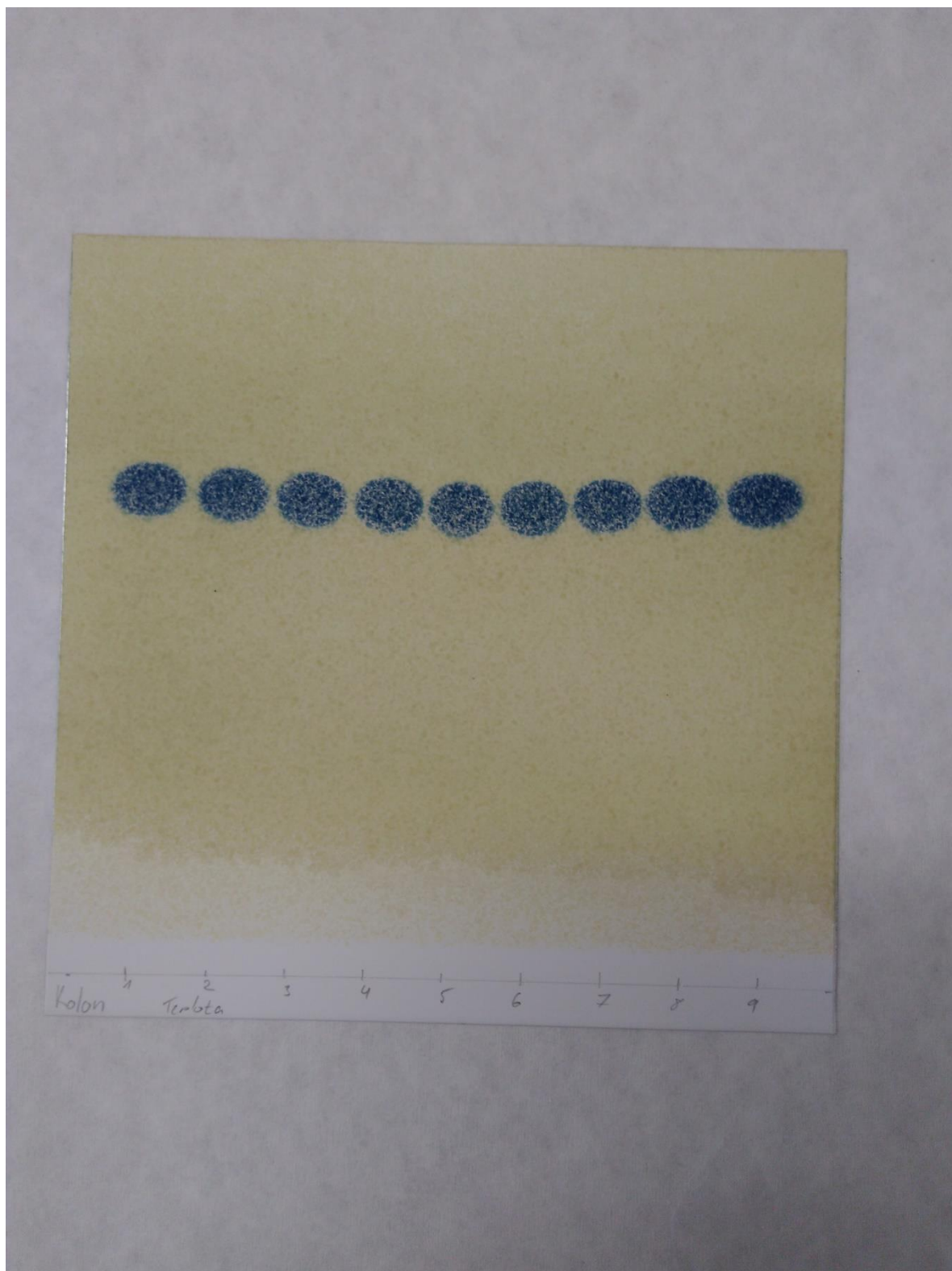
Příloha 3 Výsledná deska extrakce 1 – 1 vliv teploty



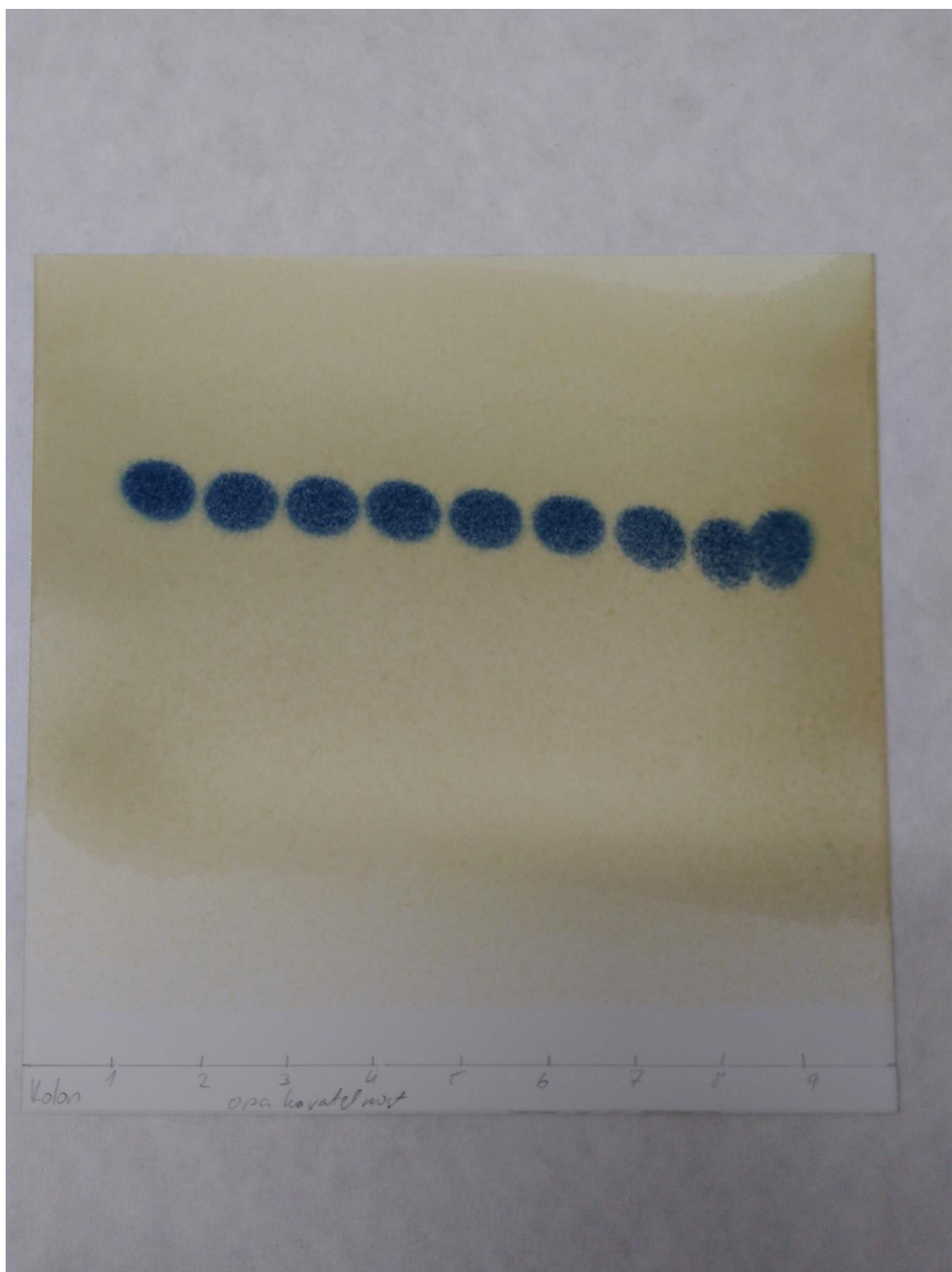
Příloha 4 Výsledná deska extrakce 1 – 1 opakovatelnost



Příloha 5 Výsledná deska extrakce I – s vliv teploty



Příloha 6 Výsledná deska extrakce I – s opakovatelnost



Příloha 7 Tabulka výsledky měření ploch skvrn (kolona a výtřep)

Vzorek	Kolona [mm ²]	Výtřep [mm ²]
1	163	260
2	190	279
3	185	232
4	166	241
5	149	216
6	197	249
7	169	213
8	172	228
9	175	232
10	173	244
11	164	271
12	178	220
13	169	240
14	143	207
15	209	222
16	159	209
17	162	221
18	172	231
Průměr	171,9444	234,1667
Směrodatná odchylka	15,58301	19,94506
Rozptyl	242,8302	397,8056

Příloha 8 Tabulka výsledky měření ploch skvrn (teplota a opakovatelnost)

Vzorek	Kolona teplota [mm ²]	Kolona opakovatelnost [mm ²]	Výtřep teplota [mm ²]	Výtřep opakovatelnost [mm ²]
1	209	205	372	294
2	212	164	205	262
3	175	181	377	272
4	185	186	264	246
5	183	179	231	258
6	188	188	234	249
7	198	183	256	240
8	189	195	269	297
9	205	179	282	265
Průměr	193,7777778	184,4444444	276,6666667	264,7777778
Směrodatná odchylna	12,06259395	10,75082541	56,63920903	18,89607706
Rozptyl	145,5061728	115,5802469	3208	357,0617284

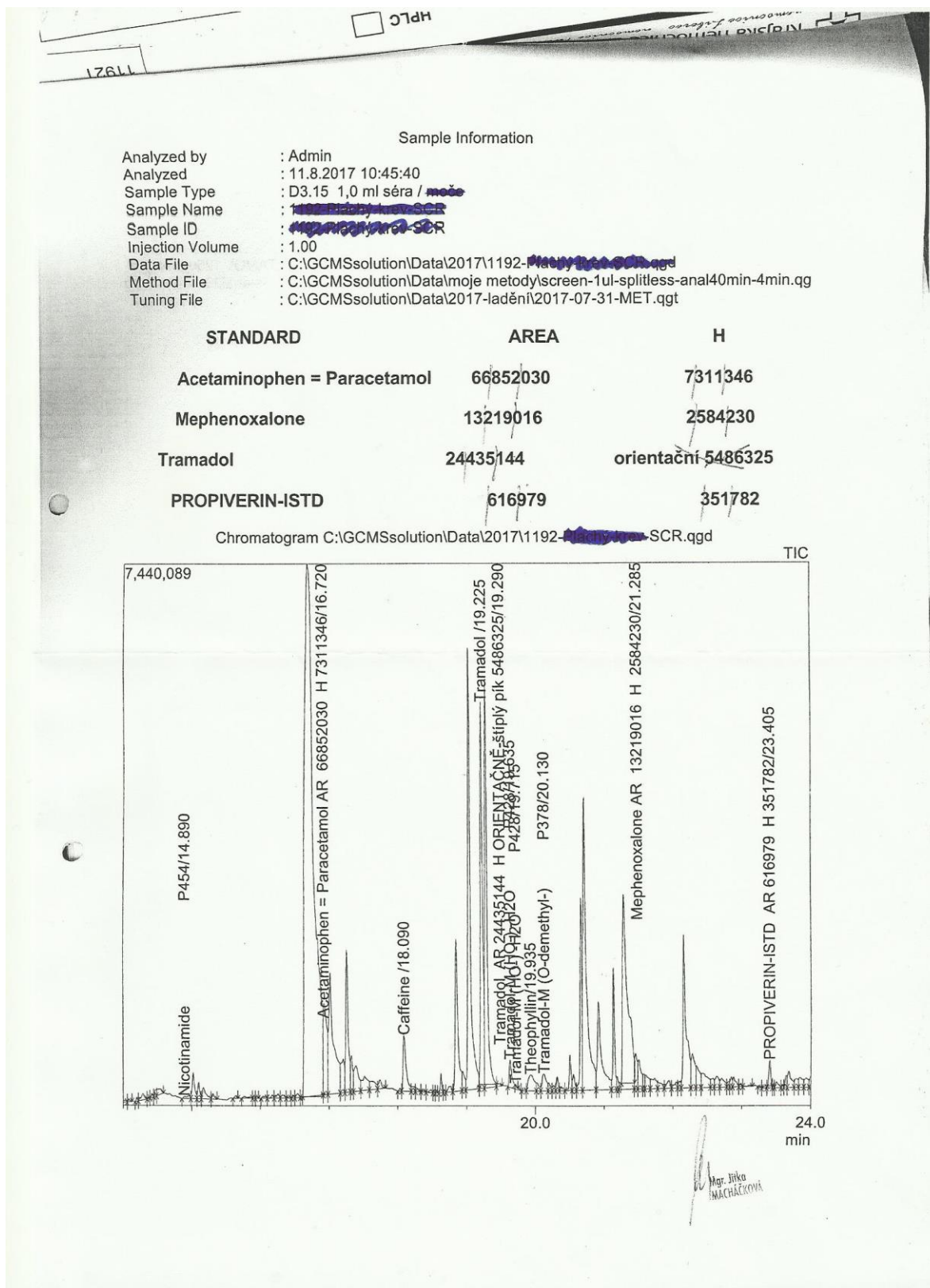
Příloha 9 Tabulka výsledky měření šířky a výšky skvrn (kolona a výtřep)

[mm]	Kolona		Výtřep	
	Šířka	Výška	Šířka	Výška
1	20	15	22	17
2	19	17	20	19
3	18	14	18	19
4	19	15	19	18
5	16	16	17	16
6	18	15	20	17
7	16	15	18	17
8	17	15	23	19
9	19	14	21	18
10	17	14	17	16
11	20	15	18	16
12	18	15	18	17
13	18	14	18	17
14	14	13	19	16
15	18	16	20	18
16	17	12	18	17
17	17	14	24	17
18	20	12	21	16
Průměr	17,8333	14,5	19,5	17,2222
Sm. odchylka	1,5366	1,2583	1,9791	1,0304
Rozptyl	2,3611	1,5833	3,9167	1,0617

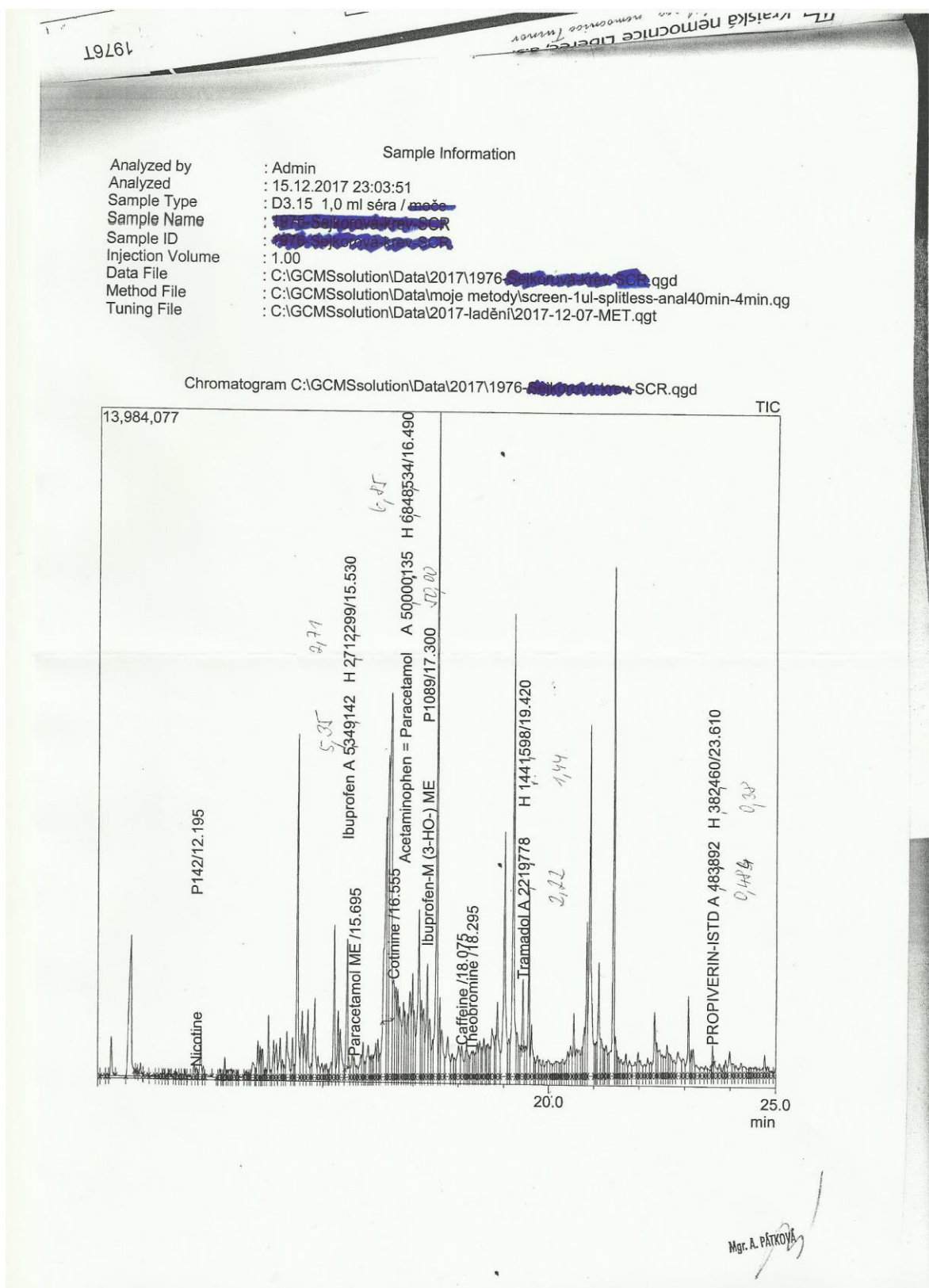
Příloha 10 Tabulka výsledky měření šířky a výšky skvrn (teplota a opakovatelnost)

[mm]	Kolona teplota		Výtřep teplota		Kolona opakov.		Výtřep opakov.	
	Šířka	Výška	Šířka	Výška	Šířka	Výška	Šířka	Výška
1	20	14	25	20	15	20	23	20
2	21	15	20	19	13	17	19	20
3	18	14	21	20	17	20	20	18
4	18	15	19	20	19	16	19	18
5	19	16	18	20	19	15	19	18
6	19	15	18	19	19	16	20	17
7	20	16	19	17	18	15	17	19
8	20	14	21	19	18	16	22	19
9	21	14	23	17	20	15	23	18
Průměr	19,5556	14,7778	20,4444	19	17,5556	16,6667	20,2222	18,5556
Sm.odch.	1,0657	0,7857	2,2167	1,1547	2,11403	1,8856	1,9309	0,9558
Rozptyl	1,1358	0,6172	4,9136	1,3333	4,4691	3,5556	3,7284	0,9135

Příloha 11 Chromatogram 1



Příloha 12 Chromatogram 2



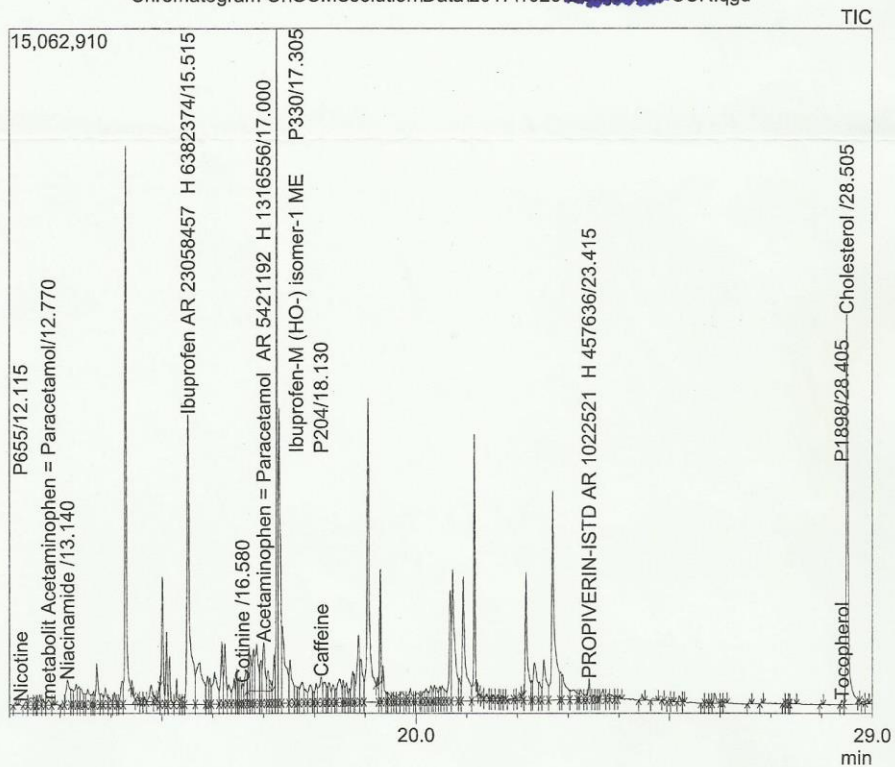
Příloha 13 Chromatogram 3

Sample Information

Analyzed by : Admin
 Analyzed : 11.7.2017 11:00:07
 Sample Type : D3.15 1,0 ml séra / moč
 Sample Name : 1026-
 Sample ID : 1026-
 Injection Volume : 1.00
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\2017\1026-
 Method File : C:\GCMSsolution\Data\moje metody\Screen 10 Splitless-anal40min-4min.qg
 Tuning File : C:\GCMSsolution\Data\2017-ladění\2017-06-14-MET.qgt

STANDARD	AREA	H
Acetaminophen = Paracetamol	5421192	1316556
Ibuprofen	23058457	6382374
PROPIVERIN-ISTD	1022521	457636

Chromatogram C:\GCMSsolution\Data\2017\1026- SCR.qgd



Příloha 14 Chromatogram 4

Sample Information

Analyzed by : Admin
 Analyzed : 15.5.2017 14:11:35
 Sample Type : D3.15 1.0 ml séra / moče
 Sample Name : 632-
 Sample ID : 632-
 Injection Volume : 1.00
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\2017-05-05-14:11:35-632-
 Method File : C:\GCMSsolution\Data\moje metody\screen-1ul-spiress-anal40min-4min.qg
 Tuning File : C:\GCMSsolution\Data\2017-ladění\2017-05-05-MET.qgt

