

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

STANOVENÍ KREATININU V MOČI POMOCÍ ON-LINE

SPE V SIA

Bc. Eva Semerádová

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2021

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu své práce doc. PharmDr. Petru Chocholoušovi, Ph.D. za odborné vedení práce, věcné připomínky, dobré rady a vstřícnost při konzultacích a vypracovávání diplomové práce.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 4. 1. 2021

OBSAH

ABSTRAKT	6
ABSTRACT	7
1. ÚVOD	8
2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1. Tvorba a složení moči	10
3.2. Glomerulární filtrace a clearance	12
3.2.1. Clearance	13
3.2.2. Metody vyšetření glomerulární filtrace	14
3.3. Kreatinin a jeho stanovení	16
3.3.1. Kreatinin	16
3.3.2. Význam stanovení kreatininu	19
3.3.3. Stanovení	21
3.4. Extrakce na tuhou fázi (SPE)	29
3.4.1. Vývoj a princip SPE	29
3.4.2. Postup SPE	30
3.4.3. Sorbenty	31
3.4.4. Výhody a využití v praxi	33
3.5. Průtokové metody	34
3.5.1. Průtoková injekční analýza (FIA)	34
3.5.2. Sekvenční injekční analýza (SIA)	35
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4.1. Použité přístroje a pomůcky	39
4.2. Použité chemikálie	39
4.3. Použité roztoky	40
Roztok zředěné kyseliny octové	40
Roztok amoniaku	40
Roztok acetonitrilu	40
Zásobní roztok kreatininu	40

Pracovní roztoky kreatininu	40
4.4. Použité (měřené vzorky)	42
4.5. Použitý sorbent	42
4.6. Parametry měření	43
4.6.1. Popis a nastavení přístroje	44
4.6.2. Podmínky měření	45
4.7. Výsledky a diskuze.....	45
4.7.1. Vývoj metody, optimalizované parametry.....	46
4.7.2. Validace vyvinuté metody za finálních podmínek.....	47
4.7.3. Stanovení vzorků moči	57
4.7.4. Diskuze	61
5. ZÁVĚR	64
6. POUŽITÉ ZKRATKY.....	65
7. SEZNAM TABULEK	67
8. SEZNAM OBRÁZKŮ	69
9. POUŽITÁ LITERATURA.....	71

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Eva Semerádová

Školitel: doc. PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Název diplomové práce: Stanovení kreatininu v moči pomocí on-line SPE v SIA

Cílem diplomové práce bylo stanovit kreatinin v moči metodou, jejíž výsledky by byly srovnatelné s rutinně používanou metodou na bázi Jaffého reakce. Byly použity tři vzorky moči, výsledné hodnoty byly statisticky porovnány s hodnotami naměřenými na klinickém analyzátoru dle Jaffého protokolu.

Kreatinin v moči byl stanoven pomocí online extrakce na tuhé fázi (SPE) v sekvenční injekční analýze (SIA). Kolona v systému SIA byla naplněna sorbentem pro extrakci, byl použit sorbent do materiálu Plexa PCX. Pro stanovení kreatininu byla použita metoda standartního přídávku, každý vzorek byl změřen dvakrát a pro hodnocení byl využit průměr daných hodnot. Podmínky experimentu byly nejprve optimalizovány na roztocích standardu ve zředěné kyselině octové, poté byly aplikovány i na reálné vzorky moči.

V metodě byla hodnocena linearita, výtěžnost, opakovatelnost a robustnost. Dle hodnoty korelačního koeficientu bylo dosaženo dobré linearity, výtěžnosti kolem 100 %. Opakovatelnost byla zhodnocena dle RSD, která se pohybovala vždy kolem 2-3 %, což je považováno za velmi dobrý výsledek.

Výsledné koncentrace kreatininu byly vypočteny z výšky píků (absorbance) i z plochy pod píkem. Hodnoty naměřené v našem experimentu byly srovnatelné s hodnotami naměřenými v klinické laboratoři dle Jaffého protokolu, cíl práce byl tedy splněn.

Klíčová slova: extrakce na tuhé fázi, sekvenční injekční analýza, kreatinin v moči

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical chemistry

Candidate: Bc. Eva Semerádová

Supervisor: Assoc. Prof. PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Title of the diploma thesis: Determination of creatinine in urine using on-line SPE in SIA

The aim of the diploma thesis was to determine creatinine in urine by a method whose results would be comparable to the routinely used method based on the Jaffé reaction. Three urine samples were used, the resulting values were statistically compared with the values measured on a clinical analyzer according to the Jaffé protocol.

Urine creatinine was determined by online solid phase extraction (SPE) in sequence injection analysis (SIA). The column in the SIA system was filled with sorbent for extraction, a sorbent was used in the Plexa PCX material. The standard addition method was used to determine creatinine, each sample was measured twice and the average of the given values was used for evaluation. The experimental conditions were first optimized on standard solutions in dilute acetic acid, then applied to real urine samples.

The method was evaluated for linearity, yield, repeatability and robustness. According to the value of the correlation coefficient, good linearity was achieved, yield around 100%. Repeatability was evaluated according to RSD, which was always around 2-3%, which is considered a very good result.

The resulting creatinine concentrations were calculated from the peak height (absorbance) and from the area under the peak. The values measured in our experiment were comparable with the values measured in the clinical laboratory according to the Jaffé protocol, so the aim of the work was met.

Key words: solid phase extraction, sequential injection analysis, creatinine in urine.

1. ÚVOD

Kreatinin je cyklická dusíkatá organická látka, která vzniká ve svalech z kreatinfosfátu. Jeho hodnota slouží především jako ukazatel glomerulární filtrace a může být nápomocná také k predikci stavu pacientů po operaci srdce nebo ke sledování účinnosti hemodialýzy. Je běžnou součástí moči a spolu s kreatinem se nachází ve svalové tkáni, v mozku a v krvi. Nižší hodnoty nacházíme u těhotných žen, při úbytku svalové hmoty nebo při zvýšení rychlosti glomerulární filtrace vlivem léků (glukokortikoidy). Zvýšené hodnoty v krvi naměříme při sníženém vylučování kreatininu ledvinami (poškození ledvin, poruchy prokrvení, účinkem některých léků) nebo při jeho zvýšené produkci (gigantismus, polytraumata). Fyziologický rozsah hodnot koncentrace kreatininu v krvi je také ovlivněn faktory jako je věk, pohlaví, svalová hmota nebo etnická příslušnost. Hodnota clearance kreatininu může poskytnout přesnější informace již v časném stadiu poruchy ledvin.

Kreatinin lze měřit pomocí mnoha laboratorních metod jako je například Jaffého reakce, enzymatické stanovení, kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza nebo pomocí průtokových metod. V této práci jsme měřili kreatinin v několika vzorcích moči pomocí sekvenční injekční analýzy a naměřené hodnoty jsme porovnávali s hodnotami naměřenými Jaffého reakcí.

2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce je stanovení kreatininu pomocí online SPE v SIA. Pomocí této metody byly optimalizovány podmínky pro stanovení kreatininu v moči a následně změřeny koncentrace kreatininu v několika vzorcích. Výsledky byly poté porovnány s koncentrací naměřenou pomocí Jaffého metody na klinickém analyzátoru.

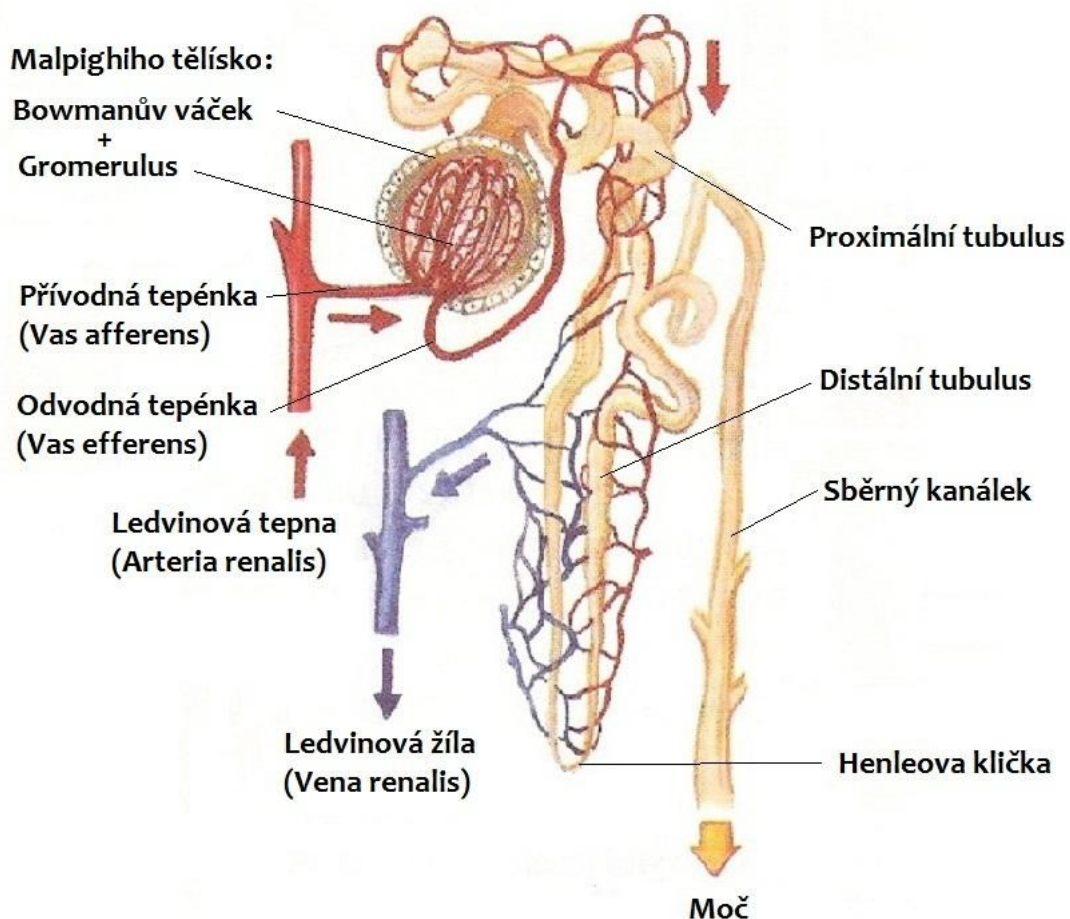
3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Tvorba a složení moči

Hlavní funkcí ledvin je vyloučení nepotřebných látek (močovina, kreatinin, kyselina močová), řady léků a toxických látek z těla. Ledvina obsahuje asi milion funkčních jednotek – nefronů [1]. Nefrony jsou dále tvořeny glomerulem (klubko kapilár vchlípené do Bowmanova váčku), stočeným kanálkem 1. řádu (proximální tubulus), Henleovou kličkou, stočeným kanálkem 2. řádu (distální tubulus) a sběrným kanálkem [2].

Ke vzniku moči dochází nejprve v glomerulech. Zde probíhá nepřetržitá filtrace krevní plazmy přes bazální membránu do Bowmanova váčku. Tímto způsobem vzniká primární moč, která je definována jako ultrafiltrát krevní plazmy (má tedy stejné složení jako plazma jen bez bílkovin). Následně probíhá v tubulárním systému úprava primární moči a resorpce důležitých látek a vody [2].

V proximálním tubulu probíhá resorpce elektrolytů, glukózy, aminokyselin a dalších důležitých látek. V této fázi dochází k izosmotické resorpci vody, 80 % původního filtrátu je resorbováno. Z proximálního tubulu přitéká tekutina do Henleovy kličky, kde se vstřebává další část elektrolytů a tekutina se stává hypotonickou vůči ledvinové dřeni. Hypotonická tekutina přitéká do distálního tubulu a zde se zahustí (zpět do krve se resorbuje voda), do krve se vstřebává další část elektrolytů a močovina. Činností sběrných kanálků dochází ke konečné úpravě moči. Propustnost stěn sběrných kanálků je řízena antidiuretickým hormonem (ADH) z hypotalamu a současně vlivem aldosteronu (hormon nadledvinové kůry) dochází k výměně Na^+ za ionty H^+ a amoniak [1]. Průměrně se produkce definitivní moči pohybuje okolo 1,5 až 2 litrů za 24 hodin [2].



Obrázek č. 1 – Tvorba moči [3]

Představu o složení normální moči uvádí následující tabulky:

Tabulka č. 1 – Nejdůležitější anorganické součásti moči [2]

Nejdůležitější anorganické součásti	
Sodík	120-240 mmol/24hodin
Draslík	45-90 mmol/24 hodin
Hořčík	0,6-5,0 mmol/24 hodin
Vápník	0,6-5,0 mmol/24 hodin
Amonný iont	30-75 mmol/24 hodin
Vodíkový iont	1-10 μ mol/24 hodin (pouze v kyselé moči)
Chloridy	120-240 mmol/24 hodin
Fosfáty	25-35 mmol/24 hodin
Hydrogenuhlíčitan	0-50 mmol/24 hodin

Tabulka č. 2 – Významné organické složky moči [2]

Významné organické složky	
Močovina	333-583 mmol/24 hodin
Kreatinin	9-16 mmol/24 hodin
Kyselina močová	1,5-5 mmol/24 hodin
Jiné dusíkaté látky	0,5 g N/24 hodin

Tabulka č. 3 – Hodnoty moči [2]

Objem	0,6-2,5 l/24 hodin	Relativní hustota	1003-1035
pH	4,7-8,0 (průměr 6,0)	Osmolalita	50-1400 mmol/kg

Množství, složení i vlastnosti moči se mění dle přijaté vody, druhu potravy a metabolických okolností [2].

3.2. Glomerulární filtrace a clearance

V předchozí kapitole byla stručně shrnuta tvorba moči. Glomerulus zajišťuje selektivní filtrování krve – glomerulární filtraci [2]. Glomerulární filtrace je proces, který závisí hlavně na dvou faktorech – filtračním tlaku a vlastnostech glomerulární membrány. Hydrostatický tlak ve vas afferens působí proti koloidně osmotickému tlaku plazmy a tlaku glomerulárního filtrátu. Dle velikosti (molekuly menší než 70 kDa se filtrují) a dle náboje (záporně nabitý povrch membrány – např. albumin je zadrženo) glomerulární membrána selektuje molekuly. Normální hodnota glomerulární filtrace je cca 180 l/den. Nefrony, které přebírají funkci po zaniklých nefronech (zánik chorobně, involucí) nazýváme reziduální. Pokud zaniknou nefrony, sníží se glomerulární filtrace a produkce primární moči. V případě že by se v tubulech vstřebalo stejné procento vody jako při normální GF (1-2%) a příjem tekutin by byl stejný, došlo by k retenci vody. Reziduální nefrony proto musí vždy zvýšit vylučování vody. Kompenzace tubulárními funkcemi a GF určují závislost solutů na poklesu GF – zjednodušeně je lze rozdělit na 3 skupiny:

- Skupina A. – kreatinin a urea – v plazmě jsou zvýšené pokud GF <50 %
- Skupina B. – K+, fosfáty, uráty, H+ – v plazmě jsou zvýšené, pokud GF <25 %
- Skupina C. – NaCl – v plazmě jsou zvýšené, pokud GF <2 % [1]

Normální rychlost GF je 1,5 – 2ml/s. Hodnota pod 1 ml/s znamená již mírné postižení ledvin. Všechny výsledky se vždy interpretují s ohledem na klinický stav a příznaky.

Tabulka č. 4 – Stupně chronického poškození ledvin dle doporučení National Kidney Foundation [4]

Stupeň postižení ledvin	Klinický popis	GF (ml/s/1,73 m ²)	Další
1	Normální GF	> 1,5	Bílkovina nebo albumin v moči, buňky nebo válce v moč. sedimentu
2	Mírný pokles GF	1-1,49	
3	Střední pokles GF	0,50-0,99	
4	Těžký pokles GF	0,25-0,49	
5	Selhání funkce ledvin	< 0,25	

3.2.1. Clearance

Různé látky jsou eliminovány z krve do moči různou rychlostí. Rychlost, kterou látka přechází z krve do moči, je označována jako clearance. Jinak řečeno clearance je takový objem plazmy v mililitrech, který je očištěn od určité látky při jednom průtoku ledvinami.

V oblasti funkčních zkoušek ledvin je nejpoužívanější vyšetření clearance kreatininu. Clearance vyžaduje sběr moče (obvykle za 24 hodin), ve které se měří kreatinin. Měření clearance před měřením GF se upřednostňuje v případech jako:

- pacient se známým onemocněním ledvin (např. pokud má v moči albumin nebo bílkovinu)
- starší pacienti nebo děti

- pacienti s extrémní hmotností (podvyživení nebo obézní)
- pacienti s neobvyklými dietními zvyky (vegetariáni)
- pacienti se změněnými renálními funkcemi (např. akutní renální onemocnění)
- v případě nutnosti upravit dávky léčiva (osoby užívající nefrotoxické léky) [4]

3.2.2. Metody vyšetření glomerulární filtrace

3.2.2.1. Metody měření GF se sběrem moči

Renální clearance endogenního kreatininu (včetně korigované hodnoty)

U zdravého dospělého člověka clearance kreatininu (C_{kr}) může přesahovat GF jen velmi lehce (o 10 až 20 %). Je to důsledek nevelké tubulární sekrece kreatininu v proximálním tubulu. Avšak u jedinců s chronickým renálním selháním dochází ke zvýšení tubulární sekrece kreatininu a v konečných stádiích chronického selhání ledvin můžou hodnoty přesahovat GF o 100 a více procent. Renální clearance kreatininu je určena na podkladě měření močového vylučování kreatininu ($U_{kr} \cdot V$) ve sledovaném období a sérové koncentrace kreatininu (S_{kr}). Výpočet se provádí dle vzorce:

$C_{kr} = U_{kr} \cdot V / S_{kr}$ (U_{kr} – koncentrace kreatininu v moči v $\mu\text{mol/l}$, V – objem moči vytvořený za sledovanou časovou jednotku v ml/s , S_{kr} – koncentrace kreatininu v krevním séru v $\mu\text{mol/l}$)

Hodnota C_{kr} není ovlivněna extrarenálními faktory, proto poskytuje lepší odhad než hodnota S_{kr} . Extrarenálními faktory se rozumí vylučování kreatininu střevem u jedinců v pokročilejším stadiu CKD (chronic kidney disease), změny distribučního prostoru kreatininu (jedinci s velkými otoky) a rozdíly v objemu svalové hmoty (eventuálně i v příjmu masa). Kreatinin je závislý i na funkci jater. V játrech je kreatin vytvořen a uvolňován do cirkulace, vychytáván ve svalech a zde neenzymaticky přeměněn na kreatinin. Hodnota C_{kr} se přepočítává na ideální tělesný povrch ($1,73 \text{ m}^2$).

Chyby v neúplném sběru moči jsou jedním z hlavních důvodů, proč řada kliniků raději volí odhad GF na podkladě hodnocení S_{kr} nebo užije výpočtové metody [5].

Clearance inulinu

Inulin se v glomerulech filtruje volně a při průchodu tubuly se nemění jeho množství. Pokud je tedy provedení správné, poskytuje inulin nejpravdivější hodnoty GF. Jeho měření však vyžaduje přesné a metodicky náročné laboratorní vyšetření za standardních podmínek hydratace. Je nutný přesný sběr moči. Princip měření renální clearance je založen na přesném měření vyloučeného množství inulinu do moči za časovou jednotku při stabilizované plazmatické koncentraci [5].

3.2.2.2. Metody měření GF bez sběru moči

Koncentrace kreatininu v séru

Tato hodnota je samostatně nepřesná pro predikci, ale významně se uplatňuje ve výpočtových vzorcích pro stanovení GF či C_{kr} . Na hodnotu má vliv množství svalové hmoty, věk, staří a příjem proteinů a aminokyselin. Pro stanovení kreatininu v séru se uvádí tři metody: Jaffého reakce, enzymatické stanovení a jako referenční metoda plynová chromatografie s izotopovou dilucí a hmotnostní spektrometrií.

Hodnota S_{kr} může sloužit k základnímu nefrologickému vyšetření a její vysoké hodnoty mohou pomoci při rozhodování o zahájení dialyzační léčby. Pro lepší odhad GF je nutné využít výpočtové metody [5].

Výpočtové metody odhadu GF na podkladě stanovení sérového kreatininu (eGF)

Největším zdrojem chyb u stanovení clearance kreatininu je přesný sběr moči. Cíl všech výpočtových vzorců je odhad hodnoty GF bez sběru moči. Uvádí se dva vzorce:

Odhad clearance kreatininu dle Cockcrofta a Gaulta

C_{kr} (ml/s) = (140 – věk) · hmotnost / 44,5 · S_{kr} (Hodnotu věku udáváme v rocích a hmotnost v kg, S_{kr} v $\mu\text{mol/l}$.)

Tato rovnice je nespolehlivá u pacientů s retencí tekutin nebo vysokým procentem tělesného tuku. Tento vzorec už se považuje za zastaralý a v praxi se nepoužívá.

Odhad GF pomocí vzorců MDRD (Modification of Diet in Renal Disease)

$$C_{kr} = 2,83 \cdot (0,0113 \cdot S_{kr})^{-0,999} \cdot věk^{-0,176} \cdot (2,8 \cdot \text{sérová urea})^{-0,17} \cdot (0,1 \cdot \text{sérový albumin})^{0,318}$$

U žen se tato hodnota ještě musí vynásobit faktorem 0,762 [6].

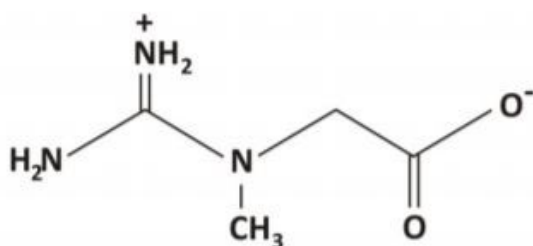
3.3. Kreatinin a jeho stanovení

3.3.1. Kreatinin

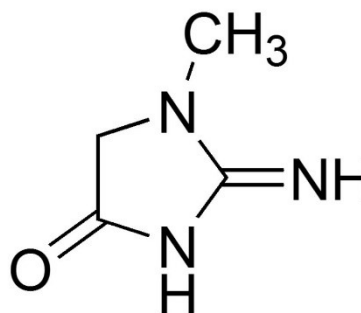
Látka kreatinin byla poprvé pojmenována Liebigem v roce 1847 a syntetizována Horbaczewskim v roce 1885 [7]. Kreatinin je cyklická dusíkatá organická látka. Je to anhydrid kreatinu, vzniká ve svalích z kreatinfosfátu neenzymatickou dehydratací a odpojením fosfátu [8]. Je to konečný produkt degradace kreatinfosfátu, který je energetickou rezervou pro svalový stah. Spolu s kreatinem se nachází ve svalové tkáni, v mozku a v krvi. Je také běžnou součástí moči [9]. Hned po glukóze je uváděn jako nejžádanější analyt v klinické analýze [7].

3.3.1.1. Chemická a fyzikální charakteristika

Sumární vzorec kreatininu je $C_4H_7N_3O$ a jeho relativní molekulová hmotnost je 113,12 g/mol. Kreatinin má podobu bílých krystalů a rozkládá se kolem teploty 300 °C [10]. Hodnota pK_b je 1,688. Rozpouští se ve 12 dílech vody a slabě rozpustný je také v ethanolu. Je nerozpustný v acetonu, etheru nebo chloroformu. Jeho izolace z moči je velmi obtížná, proto se většinou připravuje z komerčního kreatinu za použití HCl. Stabilita kreatininu se uvádí jako: 2 dny při 20-25 °C, 6 dnů při 4-8 °C, 24 týdnů při 20 °C [8].



Obrázek č. 2 – Kreatin [11]



Obrázek č. 3 – Kreatinin [11]

3.3.1.2. Metabolismus

Kreatinin je konečný produkt katabolismu kreatinu a kreatinfosfátu. Kreatin slouží primárně jako zásobárna vysokoenergetického fosfátu, zvláště v kosterním a v srdečním svalu. Množství kreatinu v krvi ovlivňuje tvorbu a vylučování kreatininu [12].

Pokud má organismus dostatek energie, je na kreatin z ATP přenesen fosfát. Vzniklá makroergní sloučenina (kreatinfosfát) poté slouží v případě potřeby k opětovnému přenesení fosfátu na ADP, a tedy i k doplnění ATP pro svalový stah. Reakce se uplatňuje zvláště v prvních minutách intenzivní svalové práce. Přeměna kreatin + ATP « kreatinfosfát + ADP je katalyzována enzymem kreatinkinázou (CK) a je reverzibilní [13]. Kromě endogenní syntézy se kreatinin do organismu dostává také potravou [14].

Z celkového množství kreatinu v těle nacházíme asi 95 % v kosterním svalstvu. Zbýlých 5 % je uloženo v buňkách mozku, ledvin, jater a varlat. Ve svalu se vyskytuje převážně jako kreatinfosfát (20-30 % je volný kreatin, zbytek se nachází ve fosforylované formě) [13].

Produkce kreatininu je za předpokladu fyzického klidu a bezmasé diety stabilní a úměrná tělesné hmotnosti. Denně se v organismu na kreatinin přemění 1-2 % kreatinu [9].

3.3.1.3. Příjem, zdroj a syntéza kreatinu

Kreatin tělo získává dvěma způsoby. Endogenní kreatin získáváme biosyntézou – ta probíhá v ledvinách, játrech a pankreatu. Kreatinfosfát i kreatin vzniklý z biosyntézy je poté neenzymově přeměněn na kreatinin a eliminace z těla probíhá pomocí glomerulární filtrace. Exogenní kreatin je kreatin získaný potravou (tedy ze střeva) [13].

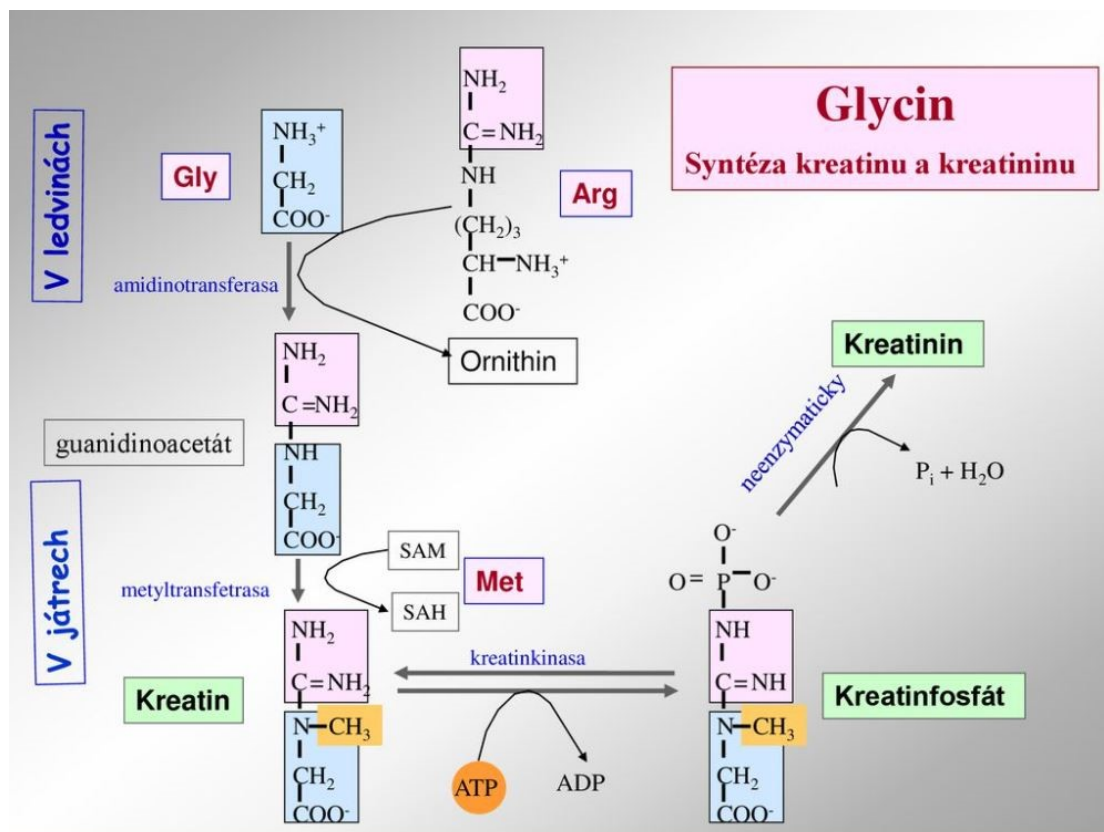
Kreatinin se vyskytuje ve všech půdách, v obilných zrnech nebo v některých rybách. Kreatinfosfát, který se nachází ve svalové tkáni živočichů je po smrti hydrolyzován na kreatin, který se poté během tepelného zpracování masa dehydratuje na kreatinin. Jako zdroj kreatinu můžeme tedy uvést i maso a masné výrobky [15].

Obecně probíhá přeměna kreatinu na kreatinin ve vodných roztocích, kdy poté obě látky tvoří rovnovážnou směs. Pokud probíhá přeměna v kyselém roztoku, veškerý kreatin je přeměněn na kreatinin [8].

Hlavní místo tvorby kreatinu u člověka jsou ledviny ale syntéza kreatinu probíhá i v játrech, a částečně i v pankreatu a jiných tkáních. Kreatin se syntetizuje z tří prekurzorových aminokyselin – z glycinu, argininu a methioninu. V první kroku za účasti enzymu L-arginin:glycin-amidinotransferázy (AGAT) se nejprve amidinová skupina z argininu přenese na glycin a vzniká guanidinoacetát a L-ornitin. Vzniklý guanidinoacetát je z ledvin transportován do jater a zde probíhá druhý krok – methylace. Pomocí S-adenosylmethioninu (SAM) a enzymu N-guanidinoacetátmethyltransferázy (GAMT) probíhá methylace guanidinoacetátu. Vzniká kreatin, který je poté transportován krví do svalu [16].

Regulace tvorby kreatinu probíhá pomocí enzymu AGAT – tedy tvorby guanidinoacetátu. Enzym AGAT je schopen kreatin zpětnovazebně inhibovat. Jako regulační faktory fungují také thyroïdní hormony, somatotropin, pohlavní hormony a ornitin [16].

Regulace tvorby kreatinu je také potravou. Pokud má organismus nedostatek proteinů ve stravě, je snížený i obsah kreatininu. Příčinou je nedostatečný přísun esenciálních aminokyselin, z kterých se kreatin syntetizuje [14].



Obrázek č. 4 – Syntéza kreatinu a kreatininu [17]

3.3.1.4. Vylučování kreatininu

Kreatinin se přenáší krevním oběhem a při správné funkci ledvin je odfiltrován a odstraněn z lidského těla jako složka moči [18]. Kreatinin se vylučuje převážně glomeruly (nevstřebává se zpět do krve), jeho hladina slouží jako ukazatel glomerulární filtrace. Jeho exkrece závisí na množství svalové hmoty, dietě a funkci ledvin [9].

Poměr produkce a exkrece kreatininu je za normálních podmínek konstantní. Z 90 % je do moči filtrován glomeruly, ze zbylých 10 % se do moči dostává tubulární sekrecí. V případě, že vzroste koncentrace v séru, vzroste i množství secernované tubuly [14].

Při chronické nedostatečnosti ledvin dochází k výraznému zvýšení koncentrace kreatininu v plazmě a je možná i exkrece kreatininu střevní sliznicí (až 60 %). Ve střevech je kreatinin hydrolyzován bakteriální kreatinkinázou [9].

3.3.2. Význam stanovení kreatininu

Pokud je poškozeno více jak 50 % nefronů, koncentrace kreatininu v krevním séru se zvyšuje, v moči naopak snižuje. Tato hodnota se stanovuje pravidelně například u pacientů s diagnostikovanou poruchou ledvin, cukrovkou nebo u pacientů užívajících větší množství léků [19]. Hodnota clearance kreatininu může poskytnout přesnější informace již v časném stadiu poruchy ledvin [9]. I přes analytická a fyziologická omezení kreatinin zůstává základem metod pro odhad GF.

Kreatinin je také uváděn jako marker svalové hmoty a jeho tvorba odráží pomalý obrat svalového proteinu. Jeho hladina je uváděna jako index zásoby aminokyselin uložených ve svalové hmotě a snížení tohoto indexu znamená ztrátu rezervy dusíku [7].

Při stanovení funkce ledvin jsou důležité tři hodnoty kreatininu – jeho koncentrace v moči, v séru i jeho clearance (viz kapitola glomerulární filtrace). V oblasti funkčních zkoušek ledvin je nejčastěji používané vyšetření clearance kreatininu. Výhodou je, že toto stanovení nevyžaduje podání cizorodé látky vyšetřované osobě, neboť při vyloučení kreatinu z potravy (omezený příjem masa) a vyloučení svalové práce (klid na lůžku) je hladina endogenního kreatininu v krvi relativně stálá [1]. Pokud ledviny fungují správně, clearance kreatininu odpovídá glomerulární filtraci. Snížená filtrace pod 50 % zvyšuje

kreatininémii a současně dochází ke zvýšenému vylučování kreatininu tubulární sekrecí [12].

Vlastní zkouška trvá 12 nebo 24 hodin. Veškerá moč se sbírá do jedné (clearance jednorázová) nebo více nádob (clearance frakciovaná – 8 hodnot/24 hodin). Vždy se změří objem moči a stanoví se koncentrace kreatininu pomocí Jaffého reakce. Na začátku a na konci se stanoví hladina kreatininu a poté se stanoví průměrná hodnota. Výpočtem zjistíme hodnotu clearance a z této hodnoty můžeme vypočítat také hodnotu tubulární resorpce [1].

Stanovení koncentrace kreatininu lze také využít k odhadu úplnosti sběru moče (pokud překročí množství kreatininu v 24 hodin sbírané moči o více než 30 % očekávané hodnoty jde pravděpodobně o neúplný sběr). Další možnou indikací k měření koncentrace kreatininu je standardizace odpadu látek v moči. Obvykle se tato hodnota měří v jednorázovém nasbíraném vzorku a výsledek se vyjadřuje jako množství dané látky na mmol kreatininu ve vzorku [1].

Koncentrace kreatininu podléhá diurnálnímu rytmu (maximální je večer, minimální je ráno). V moči hodnota kreatininu klesá při svalové atrofii nebo myotonické dystrofii a lze jej tedy také považovat za kvantitativní indikátor anorexie [7]. Může sloužit k predikci stavu pacientů po operaci srdce nebo ke sledování účinnosti hemodialýzy. Poměr močoviny v moči ke kreatininu se používá ke stanovení příjmu bílkovin ve stravě [18].

Díky menšímu procentu svalové hmoty je u žen koncentrace asi o 15 % nižší než u mužů, v dětském věku jsou hodnoty nižší asi o 80 %. Nižší hodnoty jsou také u těhotných žen vzhledem k zvýšené glomerulární filtraci. Zvýšené hodnoty kreatininu v krvi nalezneme při sníženém vylučování kreatininu ledvinami (poškození ledvin, poruchy prokrvení, účinek některých léků) nebo při jeho zvýšené produkci (gigantismus, polytraumata). Snížené hodnoty nalezneme naopak při úbytku svalové hmoty nebo při zvýšení rychlosti glomerulární filtrace (glukokortikoidy) [12].

Fyziologický rozsah hodnot koncentrace kreatininu v krvi závisí na více faktorech jako je věk, pohlaví, svalová hmota, etnická příslušnost. U zdravého člověka se hodnoty kreatininu v séru pohybují okolo 0,05-0,11mM. Pokud je koncentrace vyšší než 0,14mM,

jsou vyžadována další klinická vyšetření. Hodnota nad 0,50 mM značí závažnou renální dysfunkci. V extrémních stavech dysfunkce můžou hodnoty překročit i 1 mM. Naopak ve vzorku moči u zdravých lidí jsou významně vyšší hodnoty kreatininu (několik milimolů na litr) [7].

Tabulka č. 5 – Vylučování kreatininu močí [20]

Zvýšené vylučování močí	Snížené vylučování močí
Zvýšený příjem proteinů	Glomerulonefritida – akutní, chronická
Hladovění	Pyelonefritida
	Obstrukce močových cest
	Leukemie
	Vegetariánská dieta

Tabulka č. 6 – Odpad kreatininu a koncentrace v závislosti na věku [20]

Věk	Odpad moči za 24 hod (mmol/d)	Koncentrace (mmol/l)
0-1 měsíc	4,4-8,8	
1 měsíc – 1 rok	5,5-11,5	
1-15 roků	6,0-16,0	
15-99 roků	8,0-18,0	
0-99 roků		2,5-18,0

3.3.3. Stanovení

Bylo popsáno mnoho metod pro analýzu kreatininu, od klasické Jaffého metody, přes enzymatické testy, kapilární elektroforézu, HPLC nebo průtokové metody. Některé z nich jsou shrnuty v této kapitole.

3.3.3.1. Jaffého reakce

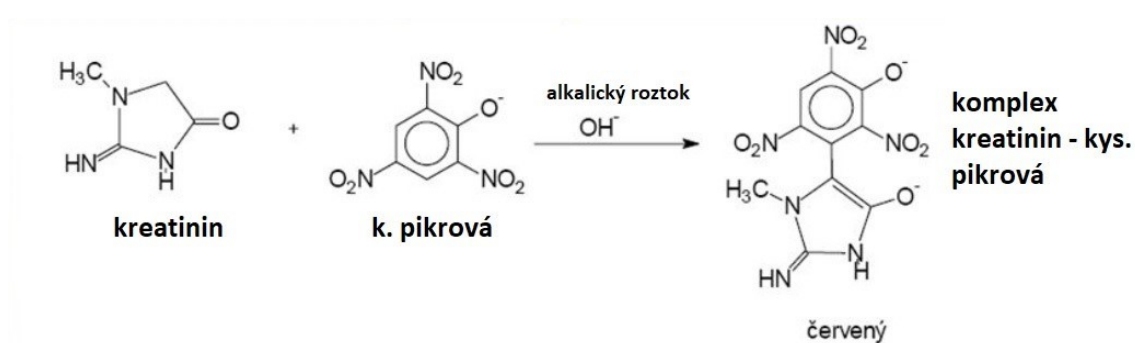
První, kdo popsal reakci s alkalickým pikrátem, byl Max Jaffé v roce 1886. Pro klinické aplikace v séru a v moči reakci upravil Otto Folin v roce 1919. Metoda se používá hlavně pro vzorky moči, které obecně obsahují méně interferujících látek než sérum. Při této

metodě je rozhodující dbát na dodržení stejných inkubačních časů, doba se pohybuje kolem jedné hodiny, v závislosti na počtu vzorků k měření [21]. Díky své jednoduchosti a nízké ceně je Jaffého reakce stále populární [22].

Jaffého reakcí s alkalickým pikrátem je kreatinin stanovován nejčastěji. Využívá se zde reakce látek s aktivní methylenovou nebo methinovou skupinou s aromatickými nitrolátkami. V alkalickém prostředí reaguje bezbarvý kreatinin s kyselinou pikrovou. Vzniká podvojný červenooranžový pikrát, který se kvantitativně určuje fotometrií a jeho množství je přímo úměrné množství výchozího kreatininu [19].

Klasickou Jaffého reakci lze také automatizovat. V tomto případě je vzorek moči nebo séra nakombinován v reakční cele s roztokem pufru kyseliny pikrové. Roztok pufru musí být upraven tak, aby snížil vliv jiných sloučenin ve vzorku. Čas analýzy této metody závisí na typu stroje, uvádí se okolo 15 minut pro kalibraci přístroje a přibližně 5 minut pro měření vzorku [21].

Metoda je známa svou nespecifičností, kromě kreatinu reagují pozitivně i jiné látky tzv. Jaffého pozitivní chromogeny (ketolátky, glukóza, kyselina pyrohroznová) a výsledek bývá často nadhodnocen. Vliv mnoha z nich lze snížit, pokud je reakce kyseliny pikrové provedena při neutrální i alkalickém pH ve stejných vzorcích. Metodu je nutné kompenzovat, jako nejjednodušší způsob se volí odečtení hodnoty pseudokreatinu od výsledků měření. Pokud se jedná o měření na klinickém analyzátoru, odečítá se hodnota stejná pro všechny vzorky, obvykle udávaná výrobcem příslušného stroje [23]. Tyto interference jsou ale méně časté než při stanovení Jaffého reakcí v séru [12]. V případě významné hyperbilirubinémie může být výsledek naopak falešně snížený [24].



Obrázek č. 5 – Jaffého reakce [25]

3.3.3.2. Enzymatické stanovení

Pro stanovení lze použít i enzymatickou metodu, která interferencemi netrpí, odborná literatura ale udává, že přínos pro klinickou praxi není zcela jasný [1].

Metody využívají stanovení účinku enzymu kreatininázy na kreatinin, ze kterého vzniká kreatin. Stanovuje se dvěma způsoby.

První způsob (kreatinináza – kreatináza – sarkosinoxidáza – peroxidáza) stanovení spočívá v přeměně kreatininu pomocí kreatininázy na močovinu a sarkosin. Dále následuje reakce katalyzovaná sarkosinoxidázou, kde se přemění sarkosin na glycin, formaldehyd a peroxid vodíku. Nakonec se trinderovou reakcí stanoví peroxid, který reaguje s 4-aminoantipyrinem a fenolem za přítomnosti peroxidázy a vznikne chinonmonoiminové barvivo, které lze stanovit spektrofotometricky. Tato naměřená hodnota je úměrná koncentraci kreatininu ve vzorku.

V druhém případě (kreatinináza – kreatinkináza – pyruvátkináza – laktátdehydrogenáza) je začátek reakce stejný, opět se přemění kreatinin pomocí kreatininázy na kreatin. Pokud je přítomno ATP, kreatin se dále mění na kreatinfosfát a ADP. ADP se poté pomocí pyruvátkinázy a fosfoenolpyruvátu mění na ATP a pyruvát. Nakonec se oxiduje NADH na NAD za přítomnosti laktátdehydrogenázy a současně se redukuje pyruvát na laktát. Úbytkem NADH dochází k poklesu schopnosti absorpce záření a ten je úměrný koncentraci kreatininu ve vzorku [26].

3.3.3.3. HPLC S UV detekcí

Tato technika využívá HPLC na reverzní fázi pro separaci kreatininu od interferujících látek [27]. Pomocí UV detektoru a měření absorbance při 236 nm lze monitorovat pík kreatininu. Metodu lze uplatnit pro vzorky séra i moči. Technika je rychlá, jednoduchá a výsledky jsou obecně srovnatelné s Jaffého metodou. HPLC může být užitečná pro problematické vzorky (zejména sérum/plazmu), protože odstraňuje sloučeniny, které mohou interferovat při stanovení. Doba přípravy vzorku se udává okolo 20 minut a doba dokončení analýzy každého vzorku 10 minut [21].

3.3.3.4. LC-MS/MS

Metoda je vhodná pro vzorky séra i moči. Skládá se z jednoduchého postupu ředění/deproteinace izotopů a poté následuje krátká HPLC separace s detekcí pomocí tandemové hmotností spektrometrie (MS). Do vzorku se vždy přidá izotopem značený interní standard kreatinu (ISTD). Poté se monitorují vrcholy endogenního a ISTD kreatininu. Hladiny kreatininu se počítají porovnáváním výsledků se syntetickou kalibrační křivkou.

Technika je vysoce reprodukovatelná a přesná, čas přípravy vzorku se uvádí přibližně 30 minut, kalibrační křivka je dokončena asi za 60 minut. Kontrola vzorku trvá asi 8 minut a analýza vzorku pak dalších 10 minut. Celkový čas na proměření 5 vzorků je přibližně 2,5 hodiny [21].

3.3.3.5. Metody založené na stanovení amoniaku

Působením kreatininminohydrolázy se z kreatininu stává amoniak a 1-ethyl-dantoin. Amonné ionty reagují s 2-oxoglutarátem a NAD(P)H a katalyticky se stanoví pomocí glutamátdehydrogenázy. Pokles absorbance NAD(P)H je úměrný koncentraci kreatininu v původním vzorku [26]. Může se použít i indikátor, kde využíváme změny barvy a koncentrace kreatininu se stanovuje fotometricky [12].

3.3.3.5.1 Porovnání metod

Zatímco Jaffého reakce je používána hlavně pro svou jednoduchost, enzymatické metody se využívají hlavně pro vysokou specifitu. Separační techniky vykazují vysokou přesnost a velká výhoda průtokových metod je jejich rychlost [28].

Metoda LC-MS/MS se preferuje kvůli její rychlosti, specifitě, stabilitě i citlivosti. Lze použít také menší objemy vzorků a je odolnější vůči interferujícím sloučeninám. Tento fakt poskytuje velkou výhodu například při měření vzorků odebraných nemocným novorozencům nebo kojencům, kde je odběr vzorku obtížnější a objem odebraného vzorku menší.

Metody jako HPLC s UV detekcí nebo LC-MS/MS poskytují i přes svou finanční náročnost řadu výhod. Některé články uvádí, že je pravděpodobné, že v budoucnu nahradí základní Jaffého metodu.

Kvůli četnosti metod pro měření kreatininu je velmi obtížné porovnávat výsledky v různých laboratořích. Většina odborníků tedy doporučuje, aby byly všechny metody standardizovány pomocí metody stabilního izotopového ředění a tandemové hmotnostní spektrometrie. Při odběru časovaných vzorků moči a stanovení referenčních rozsahů pro kreatinin je vždy nutné vzít v úvahu věk, pohlaví i rasu pacienta [21].

3.3.3.6. Další možnosti pro stanovení kreatininu

V posledních letech se objevuje snaha o zavedení jiné finančně nenáročné alternativy pro stanovení kreatininu ve fyziologických tekutinách. Pro srovnání s naším experimentem jsou uvedeny v této kapitole některé studie, které se zabývaly stanovením kreatininu pomocí levnějších alternativních metod.

Jeden z příkladů této snahy je stanovení pomocí PEDD detektoru (detektor párových emitorových diod), které uvádí kolektiv autorů z Varšavské univerzity. Pro potřeby fotometrického stanovení kreatininu v séru a v moči byl zkonstruován levný a kompaktní PEDD detektor použitý v systému multikomunotované průtokové analýzy (MCFA). Systém byl založený na mikroprocesorech řízených mikrosolenoidovými čerpadly a ventily. Měření bylo provedeno pro několik koncentrací kreatininu v přítomnosti kyseliny pikrové a NaOH. Detektor vykazoval dobrou lineární odezvu a kreatinin byl úspěšně stanoven v submilimolárním rozmezí koncentrací s detekčním limitem na úrovni ppm ve vzorcích moči. Metoda umožňovala stanovit 15-40 vzorků za hodinu v závislosti na režimu měření. Vzorky moči musely být stokrát zředěny, bohužel v případě analýzy séra tento systém selhal, kvůli jeho vyšší viskozitě. Referenční analýza byla provedena dle Jaffého protokolu na klinickém analyzátoru. [7].

Další experiment týkající se stanovení kreatininu měl za cíl vyvinout analytickou metodu pro analýzu močovininy a kreatininu pro předběžné screeningové testy. Stanovení probíhalo pomocí systému FIA s dvěma detektory. Pro stanovení močovininy se využil bezkontaktní vodivostní detektor C4D, který detekoval změnu vodivosti. Pro stanovení

kreatininu byl použit PEDD detektor, který detekoval červeno-oranžovou zónu produktu (Jaffého reakce). Zvolené zředění moči bylo přibližně 100krát. Lineární rozsah metody pro stanovení kreatininu byl určen jako 10-500 mg/l s detekčním limitem 0,9 mg/l. Metoda prokázala dobrou opakovatelnost systému (RSD <3 %), propustnost vzorků byla stanovena na 31 vzorků/h. Rychlost průtoku byla optimalizována na 1ml/min a injekční objem na 100 ml. Výťažnost metody se pohybovala od 91,3 % do 118,2 %. Tato technika prokazovala úspěšnost i ve srovnání s výsledky referenčních metod (zde byla použita bromthymolová modř pro močovinu jako pH indikátor a dávková Jaffého metoda pro kreatinin). Systém vykazoval dobrou linearitu a velkou výhodou byla skutečnost, že se tato analytická metoda obešla bez speciální přípravy vzorku [29].

Další experiment, který se zabýval stanovením kreatininu v séru, využíval pro detekci neenzymatický fluorometrický test. Byla zvolena kombinace činidel DNBA (kyselina 3,5-dinitrobenzoová), H₂O₂ a vodný roztok NaOH. Metoda vykazovala dobrou přesnost, RSD byla 1,5 %. Detekce probíhala při vlnové délce 405 nm. Doba inkubace se zvyšovala dle počtu ředění (200-300 s). Metoda byla levná a oproti spektrofotometrii vykazovala vyšší citlivost stanovení. Jako referenční metoda byla zvolena enzymatická metoda pomocí klinického analyzátoru, při srovnání obou technik se výsledky statisticky nelišily [30].

Dalším příkladem může být studie, která si dala za cíl stanovit kreatinin a retinol v moči současně. Retinol se uvádí jako slibný časný biomarker poškození ledvin. Cílem bylo stanovit látky s odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, toho bylo nakonec dosaženo metodou UHPLC. Kolona systému byla naplněná stacionární fluorovanou fází (pentafluorofenyl) a jako mobilní fáze byl použit acetonitril s vodným amoniumformiátovým pufrém. Separace obou látek trvala 4 minuty a příprava vzorku zahrnovala dva procesy – srážení bílkovin a filtraci. Technika byla tedy rychlá a jednoduchá s minimálním množstvím rozpouštědel i matrice. Vzorky použité při analýze pocházely od nemocných pacientů (rakovina prsu, kolorektální karcinom), koncentrace látek tedy byla vysoká a detekce probíhala na principu UV [31].

V dalším experimentu autoři uvádí jednobodovou metodu pro kolorimetrické stanovení kreatininu v moči. Opět byla použita kombinace činidel DNBA a NaOH, vývoj signálu byl

pozorován 2 minuty po zahájení reakce. Výsledný signál byl změřen pomocí spektrofotometru a pomocí jednoduchého PEDD detektoru. Lineární rozsahy byly určeny jako 40-4000 $\mu\text{mol/l}$ pro spektrofotometrii a 10-300 $\mu\text{mol/l}$ pro detektor PEDD. Jako referenční metoda byla použita Jaffého reakce na klinickém analyzátoru (spolehlivost mezi těmito metoda byla stanovena na 95 %). Metodu nebylo možné aplikovat na měření kreatininu v séru díky vysokým interferencím bilirubinu a proteinů [22].

Další studie pro stanovení kreatininu v moči využívala neenzymatické elektrochemické stanovení pomocí jednorázové mikrobuňky. Stanovení kreatininu bylo založeno na principu komplexního formování s ionty železa a kreatinin byl monitorován pomocí redukce volného přebytku Fe^{3+} . Kvantitativní stanovení kreatininu bylo prováděno pomocí diferenciální pulzní voltametrie s použitím NaCl jako podpůrného elektrolytu. Mezi hlavní výhody stanovení byly uvedeny: snadná tvorba komplexu mezi Fe^{3+} a kreatininem, malý objem vzorku (3 μL), minimální produkce odpadu, zmíněna byla i větší robustnost metody ve srovnání s biosenzory. Náklady na výrobu buňky byly nízké, výroba byla rychlá a jednoduchá. Ve srovnání s kvantifikačními limity spektrofotometrického stanovení byla metoda citlivější. Metoda vykazovala dobrou selektivitu a lineární odezvu na koncentrace kreatininu v rozmezí od 0,10 do 6,5 mmol/l , detekční limit byl stanoven na 0,043 mmol/l . Pro hodnocení reprodukovatelnosti byla vypočtena RSD na 7,76 % [21].

Pro stanovení kreatininu v moči bylo využito také mikrofluidní analytické zařízení se vzorováním hydrofobní bariéry na bázi papíru (MPAD). Zařízení MPAD se skládalo z centrální zóny, ze které vzorek proudil do 8 okolních kanálů, do kterých byly přidány standardní roztoky. Kanály byly připojené ke kruhové ploše naplněné reagentem. Metoda využívala opět Jaffého reakce, pro kvantifikaci byla využita kolorimetrická reakce. Optimální objem byl stanoven na 0,6 μL činidla a 55 μL vzorku. Reakční doba byla 5 minut. Velkou výhodou byla skutečnost, že nebyla nutná žádná předúprava vzorku. Bylo dosaženo dobré linearity v širokém rozmezí koncentrací kreatininu (50-1000 mg/l). Hodnocena byla také reprodukovatelnost metody, RSD byla vypočtena jako 2,1 %, mez kvantifikace (LOQ) byla 16,9 mg/l . Jako referenční metoda byla použita HPLC analýza na reverzní fázi, srovnání výsledků těchto metod nevykazovalo významné rozdíly [32].

Kolektiv vědců z Číny se pokusil stanovit kreatinin a puriny v moči současně. Opět bylo obtížné stanovit látky s rozdílnými fyzikálními vlastnostmi a odlišnými koncentracemi, nakonec byla použita metoda HPLC s ultrafialovou spektroskopií a kvadrupólovou hmotnostní spektrometrií doby letu. Ke kvantifikaci kreatininu byl použit jak UV, tak MS detektor. Bylo dosaženo dobré linearity a hodnoty LOQ se pohybovaly od 0,002 do 9,756 µg/ml. Metoda byla přesná a dobře reprodukovatelná, výtěžnost se pohybovala kolem 100 % a RSD byla vždy menší než 8,0 %. [33].

Monosegmentovaný systém SIA lab at valve (SI-LAV) byl také použit pro stanovení albuminu, glukózy a kreatininu současně. Jako detekční reakce byla zvolena opět Jaffého reakce. Technika se využila pro in-line ředění vzorků kreatininu (rozmezí 2-100 násobků), v in-line single-standard kalibraci nebo v in-line standartním přidání. V článku nebyly uvedeny přesné hodnoty výtěžnosti nebo opakovatelnosti, ale metoda byla hodnocena dobře obzvlášť díky automatickému, rychlému, jednoduchému a nákladově efektivnímu stanovení všech tří analytů současně. Cíl práce – vyvinout metodu pro screeningové účely využitelnou v menších nemocnicích a na klinikách – byl splněn [34].

Poslední experiment, který uvádíme v souvislosti se stanovením kreatininu, je opět použití SIA ve spojení s PEDD a C4D detektorem (bezkontaktní detektor vodivosti). V této studii byla metoda využita pro současnou detekci absorbance oranžového barviva a vodivosti rozpuštěného prášku orální rehydratační soli. Detektor byl použit pro měření kreatininu a vodivosti vzorků lidské moči. Uváděná průchodnost systému je až 60 vzorků za hodinu a výhodou je, že s výše uvedenými technikami lze spojit všechny druhy detekce (UV – Vis absorbance, fluorescence, chemiluminiscence, elektrochemických detekcí, amperometrie, vodivost a bezkontaktní vodivost). Metoda vykazovala dobrou linearitu a citlivost pro stanovení byla zhodnocena jako dostatečná. Absorbance byla měřena při 525 nm. Stanovení kreatininu touto metodou bylo srovnáno s klasickou (dávkovou) Jaffého reakcí (detekce spektrofotometrem), která vykazovala dobrou shodu. Limit kvantifikace pro kreatinin byl 2,38 mg/l. Opakovatelnost metody vyjádřená RSD byla 1,4 % a ve vzorcích moči 0,68-2,6 %. [35].

3.4. Extrakce na tuhou fázi (SPE)

Abychom mohli měřit nízké koncentrace analytů v plazmě a v moči, je nutné je extrahovat a koncentrovat. Extrakcí na tuhou fázi lze dosáhnout rozdělení analytů mezi tuhou fázi a kapalinu [36]. Tato technika patří mezi dnes nejrozšířenější metody přípravy vzorku. Velmi často se používá pro čištění vzorků a izolaci vybraných látek [37]. Její podstata spočívá v zachycení molekul látky na tuhém sorbentu, přes který protéká vzorek.

Přípravě vzorku je nutné věnovat odpovídající pozornost, neboť právě v této fázi dochází k největšímu množství chyb. Spolu se zpracováním dat je tato fáze i časově nejnáročnější díky obtížnější automatizaci.

Cíle extrakce jsou především:

- separace analytu od interferujících balastů/matrice
- zakoncentrování analytu pro zvýšení citlivosti následně použité metody
- izolace stopových látek
- změna rozpouštědla vzorku

3.4.1. Vývoj a princip SPE

Poprvé byla metoda popsána koncem 70. let. Použitý sorbent byl z polymerní pryskyřice [36]. Ve srovnání s tehdy rozšířenou LLE byl její vývoj z počátku pomalý. V souvislosti se snahou chemiků omezit organická rozpouštědla ale můžeme sledovat koncem devadesátých let její masivní rozšíření [38]. Jedním z důvodů rozšíření metody byla také širší nabídka sorbentů.

Princip sorpce je obdobný jako u kapalinové chromatografie [39]. Při této technice se analyt sorbuje na tuhé fázi z fáze kapalně. Interakce analytu s tuhou fází je silnější než s fází kapalnou, ve které je analyt rozpuštěn [40]. Žádaná skupina látek se selektivně sorbuje a nesorbované látky (matrice) prochází volně kolonou [41]. Metoda se nejčastěji používá pro zpracování kapalných vzorků, pro extrakci středně těkavých a netěkavých látek, jejich zakoncentrování a odstranění nežádoucích látek, rušících následná analytická stanovení [42].

Tato technika je rychlá, přesná a snadno reprodukovatelná. SPE umožňuje současné zpracování až 96 vzorků a lze ji také automatizovat [36].

3.4.2. Postup SPE

Obecně existují dva postupy pro izolaci a vyčištění sledovaných složek vzorku:

- Interference matrice se adsorbují, sledované složky procházejí kolonou nezadržené.
- Sledované složky se adsorbují, interference matrice procházejí kolonou nezadržené.

Pokud je požadovaná složka vzorku přítomna ve vysoké koncentraci, volíme první postup. Pokud jsou naše zájmové složky přítomny v nižších koncentracích nebo je nutné izolovat více složek s velmi rozdílnou polaritou, volíme druhý postup [40].

3.4.2.1. Postup extrakce

SPE se skládá z 5 kroků. Odborná literatura uvádí i 4 kroky (v tom případě je sušení a eluce brána jako jeden krok). V některých aplikacích lze některé kroky vynechat a postup zjednodušit.

1. Kondicionace sorbentu

Tento krok minimalizuje povrchové napětí sorbentu a umožní tak interakci s požadovanou formou sorbentů.

2. Aplikace vzorku

Vzorek se nanese na sorbent, který poté zachytí analyty po průchodu kolonou. Vzorek je nutné nechat protékat dostatečný čas, při rychlém provedení hrozí, že se analyt nezadrží úplně.

3. Promytí sorbentu

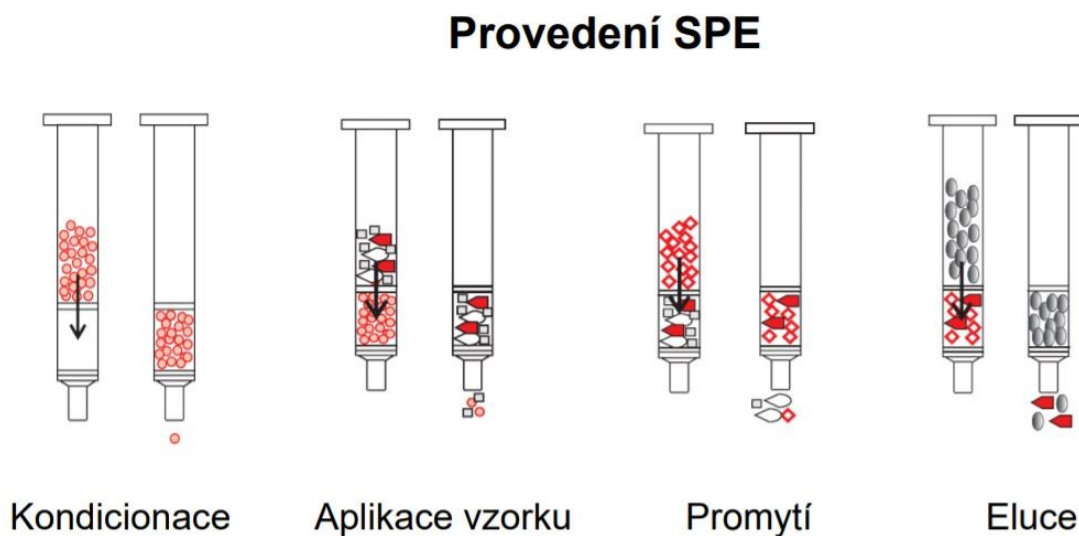
Tímto krokem dochází k eliminaci nežádoucích látek. Pro promytí se volí rozpouštědlo, v kterém jsou analyty nerozpustné. Odstraní se slabě vázané matricové složky a posílí se interakce analyt-sorbent.

4. Sušení sorbentu

Pro sušení se využívá vzduch či inertní plyn. Nejčastější volbou je dusík.

5. Eluce analytů

Eluce se provádí organickým rozpouštědlem optimalizovaným tak, aby se přerušila interakce analyt-sorbent. Opět je nutné kontrolovat rychlost průtoku (všechn analyt se nemusí vymýt). Dochází k uvolnění adsorbovaného analytu [43].



Obrázek č. 6 – Provedení SPE

3.4.3. Sorbenty

Velmi důležitým krokem je volba správného sorbentu [44]. Sorbent určuje selektivitu extrakce [46], může být uložen v trubičkách z polypropylenu, ze skla nebo slisován se skleněnými vlákny do disků. Retenční mechanismus je téměř stejný jako v kapalinové chromatografii, sorbenty jsou z hlediska chemismu velice podobné. Mohou se používat reverzní fáze na bázi silikagelu, normální fáze, iontově výměnné fáze a mnoho dalších.

Nejčastěji se používají sorbenty na bázi chemicky modifikovaných částic silikagelu [38]. V tomto případě se na povrchové silanolové skupiny chemicky vážou skupiny různých vlastností, což rozhoduje o vlastnosti sorbentu. Mechanismy, které využíváme při separaci jsou různé, rozlišují se na základě rozdílnosti interakcí mezi analytem a sorbentem [36].

Jeden z moderních trendů v SPE rozvíjený na KACH FaF je využití nanovláknenných materiálů jako sorbentu pro SPE [46].

3.4.3.1. Sorbenty s reverzní fází

V případě, že je analyt našeho zájmu středně polární až nepolární sloučenina, použijeme reverzní fází. Tato separace zahrnuje polární (obvykle vodnou) nebo mírně polární matrici vzorku (mobilní fáze) a nepolární fází stacionární. Analyt je na sorbentu zadržen nepolárními silami, a to disperzními či Waalsovými silami [40]. Jako stacionární fáze nepolární se nejčastěji uvádí silikagel s navázanými funkčními skupinami, jako polární mobilní fáze směs acetonitrilu nebo methanolu s vodou nebo jiným puftrem [36].

Díky velkému množství vodných vzorků (od nápojů, ovoce a zeleniny až po biologické tekutiny), typ s reverzní fází v četnosti použití převládá.

3.4.3.2. Sorbenty s normální fází

Pro separaci neutrálních až mírně polárních látek využíváme sorbenty s normální fází. V tomto případě je na sorbentu analyt zadržován pomocí vodíkových vazeb, π - π interakcí, vazbou dipól-dipól nebo interakcí dipól-indukovaný dipól. Mobilní fází tvoří středně polární až nepolární látky (nejčastěji aceton nebo chlorovaná rozpouštědla), stacionární fáze je naopak polární [36].

3.4.3.3. Sorbenty s iontoměničovou fází

Do této skupiny patří sorbenty, které jsou iontové nebo ionizovatelné [40]. Pomocí elektrostatických sil jsou schopny iontové výměny s analytem. Aby došlo k eluci hledaného analytu, volíme pH použitého roztoku tak, aby došlo k neutralizaci funkční skupiny analytu nebo sorbentu [36]. Skupinu lze rozdělit na kationtové a aniontové

měníče (katexy a anexy), které lze dále rozdělit na slabé a silné (v závislosti na typu iontové skupiny na jejich povrchu).

Látky patřící do skupiny silných katexů obsahují kyselý povrchový podíl (např. kyselina sulfonová), který je vždy ionizovaný (záporně nabitý) v celém rozsahu pH. Slabé katexy mají kyselý povrchový podíl, jako například karboxylovou kyselinu, který je při vyšším pH také záporně nabitý, ale při nižším pH neutrální. Stejně tomu je u anexů. Silné anexy nesou například kvartérní amoniové soli a vždy jsou kladně nabité. Naopak slabé anexy obsahují látky jako primární, sekundární, terciální aminové skupiny, při nízkém pH jsou kladně nabité a neutrální při vysokém pH [40]. Pokud používáme silné iontoměníče pro silné anionty/kationty, jejich eluce není možná a volíme použití slabých iontoměníčů [36].

3.4.3.4. Chelatační sorbenty

Tento typ sorbentů tvoří dvě složky, dle jejich vlastností se určuje použití sorbentu. Jedná se o polymerní nosič a na něm vázaný chelátový ligand. Jako nejpoužívanější polymerní nosič se uvádí agarosa, jako nejpoužívanější ligand iminodioctová kyselina (IDA). Chelátový ligand je schopen tvořit stabilní komplexy s dvojmocnými nebo trojmocnými kationty kovů [36].

3.4.4. Výhody a využití v praxi

SPE chrání analytické chromatografické kolony před kontaminanty, zlepšuje citlivost a kvantifikaci metody [36]. Ve srovnání s LLE umožňuje práci s menšími objemy vzorků, je tedy rychlejší, levnější a bezpečnější (díky menší spotřebě organických rozpouštědel) [37]. Další výhodou je praktická jednoduchost a možnost automatizace ve spojení s jinými metodami [45]. Oproti jiným technikám lze uvést také minimální ztráty při izolaci analytů v průběhu evaporace [47]. Jako nevýhodu můžeme označit fakt, že pro některé izolace nejsou na trhu vhodné SPE kolony [41].

Metoda SPE se velmi často využívá pro čištění látek, příkladem může být získání přečištěné pitné vody nebo metalurgie pro získání čistých kovů. Při analýze stopových prvků lze techniku využít také pro zakoncentrování analytu [47]. Dále lze techniku aplikovat pro analýzu různých farmaceutických sloučenin a jejich metabolitů v tělních

tekutinách, drog v tělních tekutinách, pesticidů a antibiotik v potravinách, pro frakcionaci lipidů nebo analýzu vitaminů rozpustných v tucích [36].

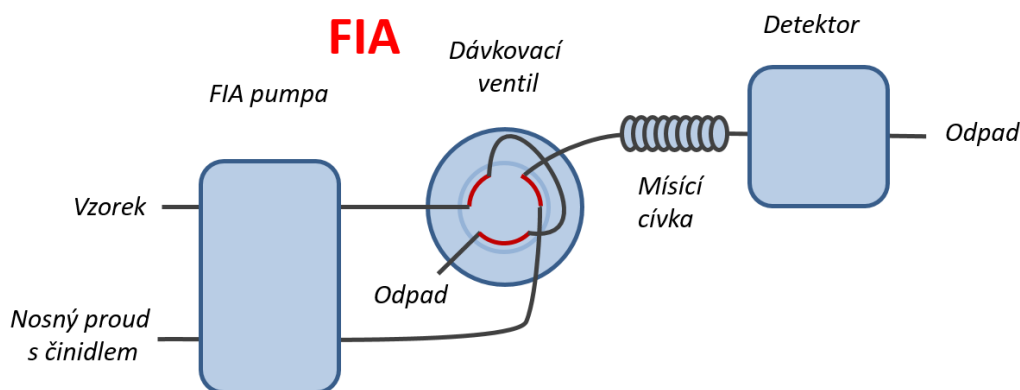
3.5. Průtokové metody

Jak už vyplývá z názvu, průtokové metody jsou založené na průtoku kapaliny systémem. Do této skupiny řadíme metody jako je průtoková injekční analýza (FIA) nebo sekvenční injekční analýza (SIA). Obě metody mohou být i plně automatické a jsou založeny na vstřikování kapalného vzorku do proudu nosiče vhodné kapaliny [48].

3.5.1. Průtoková injekční analýza (FIA)

Systém FIA byl poprvé popsán Růžičkou a Hansenem v roce 1975 a patří do první generace průtokových metod [49]. Nejprve je vzorek dávkován do přímého konstantního proudu činidla pomocí dávkovacího ventilu s vyměnitelnou smyčkou. Vstřikovaný vzorek je poté unášen a rozptýlen do nosného proudu, čímž vzniká zóna produktu [50]. Díky průchodu derivatizovaného produktu přes průtokovou celu detektor zaznamená změnu barvy nebo jiného parametru (Dle parametru se zvolí vhodný detektor.) [51]. Současně probíhají dva procesy – disperze vzorku a chemická reakce – detektor zaznamenává výsledek obou dějů nejčastěji ve formě píků [49].

Nejjednodušší uspořádání systému FIA obsahuje peristaltickou pumpu, přepínací ventil, mísící cívku a detektor. Funkcí pumpy je čerpání a pohánění nosného proudu jedním směrem. Objem vzorku je určen vstřikovacím ventilem a mísící cívka je část ve které probíhá disperze vzorku do nosného proudu [49], [50].



Obrázek č. 7 – Průtoková injekční analýza – schéma

Pro jednotlivá stanovení se objem vzorků pohybuje v rozmezích desítek až stovek μl . Systém umožňuje stanovit až 120 vzorků za minutu [52].

FIA je robustní metoda, která umožňuje stanovit vysoký počet vzorků za krátký čas. Pokud chceme změnit parametry měření, je nutný manuální zásah do součástí (hardware) systému (na rozdíl od SIA systému). Další nevýhodou je nižší mechanická odolnost hadiček peristaltické pumpy, vysoká spotřeba reagentů a tvorba odpadu [52].

FIA se podobně jako SIA uplatňuje v monitorování životního prostředí, v analýze potravin, vody a půdy. Využití je možné také v klinické, farmaceutické analýze a pro monitorování dlouhodobých procesů v laboratořích a výrobě [53].

3.5.2. Sekvenční injekční analýza (SIA)

Při odstraňování nevýhod systému FIA byla vyvinuta průtoková analytická metoda SIA. Základní rozdíl metod je v geometrii nosného toku. SIA na rozdíl od FIA využívá změnu přímého a zpětného toku [48]. Díky tomu je dosaženo vyššího stupně mísení zón a konverze analytu na výsledný produkt a také spotřeba činidel a vzorků je nižší. Velká výhoda SIA systému je jeho flexibilita – na rozdíl od FIA lze objem vzorku a činidel měnit pomocí počítačové techniky (tedy bez manuálního zásahu do součástí systému). Oproti FIA systému analýza technikou SIA probíhá v jednobanálním uspořádání s jedním ventilem a čerpadlem. Nevýhoda SIA systému je naopak nutnost použití počítačové techniky a nižší frekvence dávkování vzorků [50].

Průtoková rychlost metody se pohybuje okolo $1\text{ml}/\text{min}$ a celková doba měřicího cyklu většinou nepřesáhne 30 s [50]. V jednotlivých cyklech lze dávkovaný objem vzorku měnit (v rozsahu jednotek až stovek mikrolitrů), čímž lze optimalizovat citlivost stanovení [54]. Pokud je jeden z kanálů selektivního ventilu propojen s roztokem standardu, můžeme provést i kalibraci. Další předností je modularita – do SIA systému lze zapojit další součásti, které umožňují náročnější úpravy vzorků před vlastním stanovením [55].

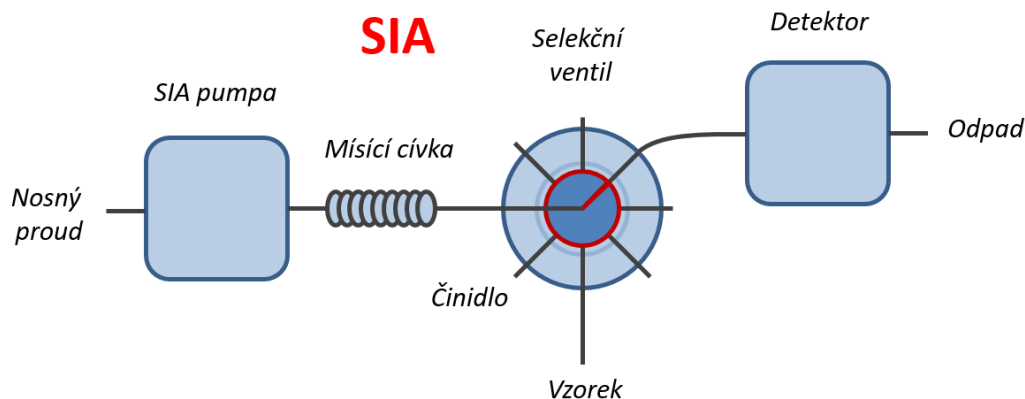
3.5.2.1. Princip SIA

Technika SIA je univerzální, zakládá se na programovatelném průtoku [56]. Metoda využívá oddělené měřicí cykly. Nejdříve jsou zóny nosného média, vzorku a činidla dávkovány do jednonálového systému s využitím selekčního vícecestného ventilu a pístového čerpadla, poté dochází k promísení zóny vzorku a činidla pomocí obráceného pohybu pístu [55]. Produkt, který vznikl, je dopraven k detektoru a je získán výsledný analytický signál ve formě píku. Výška píku je přímo úměrná koncentraci analytu [56]. Díky selekčnímu ventilu je možné používat různé roztoky reaktantů bez nutnosti měnit konfiguraci průtokového systému [57]. Systém je programován pomocí softwaru a řízen přes počítač, různým naprogramováním lze dosáhnout zvýšení citlivosti. U metody lze využít zastavení toku a sledovat průběh reakcí a zvýšit tím jejich výtěžnost [55].

3.5.2.2. Součásti systému

Mezi součásti SIA patří:

- jednonálové pístové čerpadlo – umožňuje čerpat roztoky v obou směrech, ovládá se pomocí mikroprocesoru (počítače),
- vícecestný selekční ventil – funkce spočívá v seřazení jednotlivých zón v mísící cínce, připojení všech požadovaných roztoků k systému, jejich aspiraci a po obrácení toku i transport zón do detektoru (obvykle umožňuje přepínat mezi 6 až 10 pozicemi),
- spojovací hadičky – nejčastěji z teflonu, vnitřní průměr 0,5-0,8 mm,
- mísící cívka – podporuje radiální mísení zón,
- světelný zdroj – LED, deuteriová nebo halogenová lampa,
- vhodný detektor – volí se dle typu analytické reakce (Nejčastěji se využívají spektrofotometrické, fluorescenční a elektrochemické s příslušnými průtokovými celami.),
- PC s příslušným programovým vybavením; zajišťuje její přesnou opakovatelnost a synchronizaci (Řídí kroky cyklu, sbírá, uchovává a vyhodnocuje vstupní data.).



Obrázek č. 8 – Sekvenční injekční analýza – schéma

3.5.2.3. Použití v praxi

SIA se velmi často uplatňuje při analýze složek životního prostředí. Lze ji využít při stanovení některých anorganických iontů ve vodě (kontrola kvality vody). Pro toto stanovení se vzorek nemusí separovat nebo opakovaně měřit s různými činidly. Několik druhů iontů lze stanovit současně (vápenaté ionty, hořečnaté ionty, železité ionty). Dále lze touto metodou stanovit současně také chloridy a fluoridy. V tomto případě se pro detekci využívají iontově selektivní elektrody. Pomocí SIA se spektrofotometrickou detekcí lze stanovit obsah dusitanů a dusičnanů. SIA se uplatňuje také při stanovení obsahu herbicidů, lze ji využít pro stanovení stopového množství některých těžkých kovů (vanad, molybden, chróm) v různých mocnostvích nebo pro stanovení kadmia, mědi, rtuti, india, olova, cínu nebo thalia, kdy se využívá elektrochemické detekce (rozpuštěcí voltametrie) [50].

V SIA se často uplatňují také imunoanalytické reakce [58]. Používají se speciální typy detekčních cel, které umožňují imobilizaci protilátek nebo antigenů v SIA systému [50].

Pomocí amperometrické detekce s využitím enzymových elektrod lze stanovit také ethanol nebo glukózu [54]. Reakcí s monoklonálními protilátkami lze metodou určit také koncentraci sérového albuminu nebo různých typů inzulinů. V tomto případě se pro detekci využíval fluorescenční mikroskop.

SIA je vhodná i pro enzymové stanovení, vzhledem k tomu, že pořízení enzymů je často finančně náročné a SIA technika je známá malou spotřebou vzorků [59]. Jedna z aplikací

je například stanovení obsahu celkového a oxidovaného glutationu v lidské krvi nebo obsahu dusitanu a dusičnanu v krevním séru.

Pomocí SIC techniky, která kombinuje výhody sekvenční injekční analýzy (programovatelný tok) a monolitických kolon (separační schopnost) lze analyzovat jednoduché směsi [60]. Při automatizované úpravě a derivatizaci vzorků lze uplatnit SIA ve spojení s extrakčními technikami [61]. Úpravu vzorků pomocí SIA metody lze také propojit s instrumentálními metodami jako např. s HPLC, elektroforetickými technikami [54].

3.5.2.4. Trendy metody

SIA se řadí do robustních metod a lze ji přizpůsobit potřebám konkrétního úkolu [60]. Vlastnosti jako rychlost, jednoduchost, flexibilita a plná automatizace předurčují SIA metodu v analýzách velké série vzorků (rutinní analýzy vod, potravin, krve, moči). Metoda nám umožňuje sledovat změny koncentrace analytů v průběhu různých procesů (monitorování hladiny léčiv) nebo studovat odpověď buněk na různé vnější podněty (farmaceutický výzkum). Využitím komerčních imunosorbentů lze podstatně zrychlit a zlevnit imunoanalytické metody. SIA může zjistit také stejnoměrnost obsahu účinné látky v různých farmaceutických přípravcích a rychlost jejího uvolňování z lékové formy (disoluční testy). Jako významné uplatnění se uvádí také možnost využití studia vazby léčiv a toxických látek na krevní bílkoviny [50].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité přístroje a pomůcky

Přístroj miniSIA-2 (GlobalFIA, USA) – dvě kontinuální pumpy MilliGAT HiFlow s mísícími cívkami – v práci využita jedna, hybridní selekční ventil pro použití v SIA a FIA módu (VICI, USA), průtoková Z cela detektoru, optická délka 20 mm (FIALab, USA), detektor USB4000 (Ocean Optics, USA), zdroj UV-VIS DH-2000 (Ocean Optics, USA), optická vlákna pro UV-VIS s průměrem 600 μm (FIALab, USA), hadičky o vnitřním průměru 0,5 a 0,75 mm, materiál teflon a PEEK, počítač vybavený software FloZF (GlobalFIA, USA)

Kolona SPE se sorbentem PCX o rozměrech 10x1,5 mm, uzpůsobená pro zapojení do průtokového systému (IDEX, USA)

SPE sorbent Bond Elut Plexa PCX (Agilent, USA)

SPE sorbent DSC-SCX (Supelco, USA)

SPE sorbent Oasis MCX (Waters, USA)

Analytické váhy ANALYTIC A200S (SARTORIUS, Německo)

Digitální pH metr Hanna instruments pH 212

Automatické pipety Biohit M

Laboratorní sklo – odměrné

Laboratorní pomůcky plastové – zkumavky eppendorf 1,5 ml, zkumavky 5 ml, centrifugační zkumavky s uzávěrem 15 ml a 50 ml

4.2. Použité chemikálie

Kyselina octová $\geq 99,7\%$

Acetonitril Chromasolv gradient grade $> 99,9\%$

Amoniak 28–30%

Voda ultra – čistá, Millipore

Kreatinin $\geq 98\%$

4.3. Použité roztoky

Roztok zředěné kyseliny octové

Kyselina octová $\geq 99,7\%$ byla naředěna ultračistou vodou na pH 2,6 – měřeno pomocí digitálního pH metru. Tento roztok byl použit k ředění vzorků moči, pro přípravu pracovních roztoků kreatininu a jako slepý vzorek.

Roztok amoniaku

Amoniak 28-30% byl naředěn ultračistou vodou na 1%, pH 11,40. Tento roztok byl použit jako eluent kreatininu z SPE kolony.

Roztok acetonitrilu

Acetonitril byl podle potřeby naředěn ultračistou vodou na 50%, 75% a 90%. Byl použit 99,9% acetonitril a roztok byl vždy ředěn do 15 ml zkumavky. Bylo tedy naředěno vždy 13,5 ml; 11,25 ml nebo 7,5 ml acetonitrilu a doplněno ultračistou vodou do 15 ml. Tento roztok byl použit jako promývací roztok k odstranění matrice vzorku.

Zásobní roztok kreatininu

Zásobní roztok kreatininu byl připraven rozpuštěním standardu v ultračisté vodě o koncentraci 2000 mg/l.

Pracovní roztoky kreatininu

Pro měření bylo nutno připravit pracovní roztoky kreatininu v různých koncentracích. Vybrané koncentrace roztoků pro kalibraci byly 2 mg/l, 4 mg/l, 6 mg/l, 8 mg/l, 15 mg/l, 20 mg/l a 25 mg/l. Tyto koncentrace byly naředěny kyselinou octovou o pH 2,6 do 5 ml. Ředění je uvedeno v tabulce (Tabulka č. 7).

Zvolené koncentrace tří standartních roztoků byly 4, 6 a 8 mg/l. Vzorky byly naředěny kyselinou octovou o pH 2,6 do 25 ml. Seznam roztoků je v tabulce (Tabulka č. 8). Standartní roztoky byly následně ještě naředěny 1:1 (standart/blank, standart/zředěná moč) do 1,5 ml eppendorf zkumavek. Výsledné koncentrace měřených roztoků tedy byly 2, 3 a 4 mg/l.

Tabulka č. 7: Příprava roztoků kreatininu pro kalibraci. Množství odebraného zásobního roztoku kreatininu, které bylo doplněno kyselinou octovou o pH 2,6 do 5 ml

C (mg/l)	2	4	6	8	15	20	25
Roztok kreatininu 2000 mg/l	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl	375 µl	500 µl	625 µl

Tabulka č. 8: Příprava standartních roztoků kreatininu. Množství odebraného zásobního roztoku kreatininu, které bylo doplněno kyselinou octovou o pH 2,6 do 25 ml

Označení roztoku	S1	S2	S3
C (mg/l)	4	6	8
Roztok kreatininu 2000 mg/l	50 µl	75 µl	100 µl

Tabulka č. 9: Příprava měřených roztoků kreatininu, ředěno 1:1 – standart/blank, standart/zředěná moč (ředěno do eppendorf zkumavek 1,5 ml)

Výsledná c (mg/l)	----- (měřený vzorek)	2	3	4
Kyselina octová (blank)	750 µl	-----	-----	-----
S1	-----	750 µl	-----	-----
S2	-----	-----	750 µl	-----
S3	-----	-----	-----	750 µl
Zředěná moč	750 µl	750 µl	750 µl	750 µl

4.4. Použité (měřené vzorky)

Pro měření byly použity tři vzorky moči. Každý vzorek moči byl naředěný. Zvolené naředění vzorku bylo 80x. Každý vzorek moči byl naředěn do jiné zkumavky o objemu 15 ml. Do jednotlivých zkumavek bylo pipetováno 375 μ l vzorku moči a doplněno zředěnou kyselinou octovou do 15 ml. Poté byl vzorek ještě naředěn do eppendorf zkumavek o objemu 1,5 ml v poměru 1:1 zředěnou kyselinou octovou nebo roztokem standardu (Jak je uvedeno v tabulce č. 9.).

Tabulka č. 10 – Vzorky měřené během experimentu

Číslo vzorku	Složení vzorku
1	Slepý vzorek (kys. octová pH 2,6)
2	Kreatinin 2 mg/l
3	Kreatinin 3 mg/l
4	Kreatinin 4 mg/l
5	Moč č. 1
6	Moč č. 1 + standardní přídavek 2 mg/l
7	Moč č. 1 + standardní přídavek 3 mg/l
8	Moč č. 1 + standardní přídavek 4 mg/l
9	Moč č. 2
10	Moč č. 2 + standardní přídavek 2 mg/l
11	Moč č. 2 + standardní přídavek 3 mg/l
12	Moč č. 2 + standardní přídavek 4 mg/l
13	Moč č. 3
14	Moč č. 3 + standardní přídavek 2 mg/l
15	Moč č. 3 + standardní přídavek 3 mg/l
16	Moč č. 3 + standardní přídavek 4 mg/l

4.5. Použitý sorbent

Pro tento experiment byl zvolen sorbent Plexa PCX. Tento sorbent používá polymerní katexovou pryskyřici. Sorbent kombinuje silný kation výměnný a nepolární retenční mechanismus, odstraňuje kyselá a neutrální interference z matrice, koncentruje bazické

sloučeniny. Lze jej použít také pro selektivní frakcionaci bazických, kyselých a neutrálních analytů. Používá se zejména pro bazické a neutrální látky.

4.6. Parametry měření

Pro hodnocení obsahu kreatininu v moči byla použita metoda standardního přídávku, kdy byly využity tři koncentrace přídávku k původnímu vzorku. Hodnocena byla také výtěžnost a linearita odezvy. Každý vzorek byl změřen dvakrát, k hodnocení byl použit průměr naměřených hodnot.

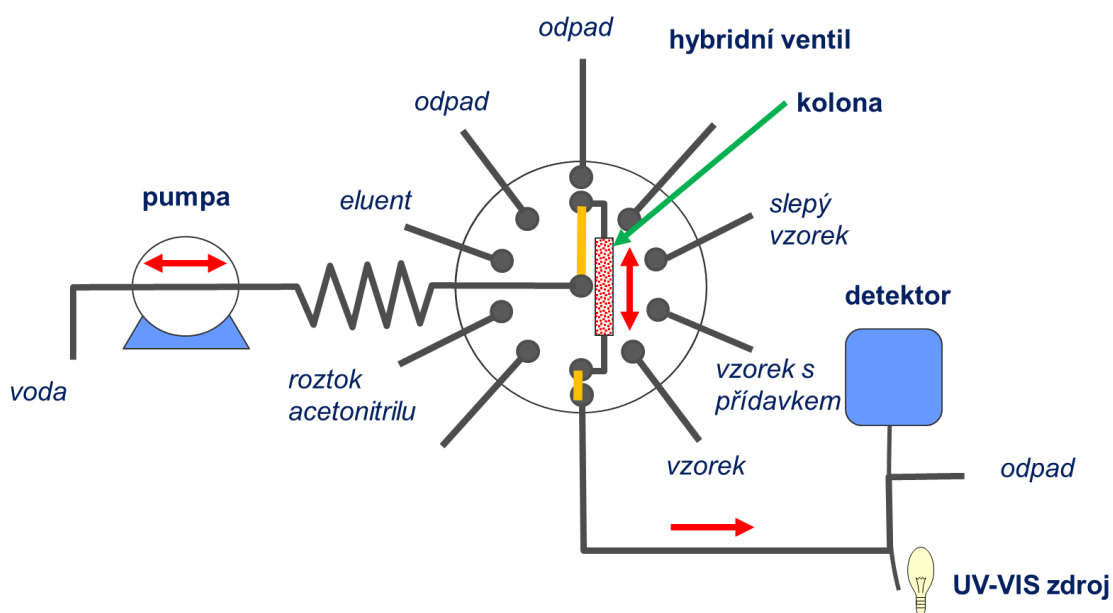
SIA metoda se skládala ze sekvence kroků vykonávaných pumpou, ventilem a detektorem. Obecně vždy došlo k nasátí roztoku/vzorku z příslušného portu ventilu do mísící cívky pumpy a následně nadávkování této zóny na kolonu. Zvýšený objem při dávkování na kolonu znamenal následné promytí kolony vodou tak, aby na koloně nezbyl žádný z dávkovaných roztoků. Dostatečný přebytek pro promytí byl zvolen na základě poklesu signálu detektoru na základní linii.

Tabulka č. 11 – Sekvence kroků SIA metody pro stanovení kreatininu v moči

Krok	Jednotka	Parametry
Nasátí vzorku	Ventil	Port 7
	Pumpa	20 µl; 20 µl/s
Dávkování vzorku na kolonu	Ventil	Port 10
	Pumpa	320 µl; 15 µl/s
Zahájení detekce	Spektrofotometr	235/270 nm
Nasátí promývacího roztoku acetonitrilu	Ventil	Port 3
	Pumpa	200 µl; 30 µl/s
Promytí kolony roztokem acetonitrilu (odstranění matrice vzorku)	Ventil	Port 10
	Pumpa	600 µl; 15 µl/s
Nasátí elučního roztoku	Ventil	Port 2
	Pumpa	400 µl; 30 µl/s
Eluce kreatininu	Ventil	Port 10
	Pumpa	1000 µl; 15 µl/s
Ukončení detekce a uložení dat	Spektrofotometr	Stop
	FloZF	Zapsat do Excelu

4.6.1. Popis a nastavení přístroje

Systém miniSIA-2 se skládá z několika částí. Mezi součásti patří dvě pumpy (v práci byla využita jedna) a mísící cívka vedoucí k hybridnímu přepínacímu/selekčnímu ventilu. Další částí je kolona, která byla naplněna sorbentem Plexa PCX. Rozměry kolony byly 10 x 1,5 mm. Další části systému jsou deuteriová lampa, spektrofotometrický detektor a průtoková cela detektoru. SIA systém využívá teflonových a PEEK hadiček. Před použitím přístroje byl vždy spuštěn promývací program, kdy byl celý systém propláchnut roztoky, které byly užívány k analýze. Vždy když se měnil použitý vzorek, byla promyta daná pozice vzorku – systém si nejprve odebral určitý objem vzorku, kterým promyl danou pozici, a až poté bylo spuštěno měření příslušného vzorku. Vzorky byly dávkovány hybridním ventilem, slepému vzorku byla přidělena pozice č. 8, vzorkům moči a vzorkům moči se standardním přídavkem byly přiděleny vždy pozice č. 6 a č. 7. Nástřik vzorku byl nastaven na 20 μ l. Aby došlo k vymytí balastu, jako promývací činidlo byl zvolen 50% acetonitril (pozice č. 3) a pro eluci analytu bylo zvoleno eluční činidlo – 1% amoniak (pozice č. 2). Schéma zapojení SIA přístroje je uvedeno na obrázku č. 9. Proces byl detekován UV spektrofotometrem, zvolené vlnové délky detekce byly 235 nm (korekce při 270 nm). Ovládání systému bylo přes příslušný software s počítačem, který zpracovával data z UV detektoru.



Obrázek č. 9 – Schéma zapojení SIA přístroje

4.6.2. Podmínky měření

K hodnocení každého měření byly použity výšky píku a plocha pod píkem počítaná metodou nejmenších čtverců, kdy hodnota základní linie a pík byly manuálně definovány. Záznamy byly vždy korigovány signálem slepého vzorku. Vzorky byly kvantifikovány s pomocí tří standardních přídavek. Vhodnost tohoto postupu byla hodnocena také rovnicí přímky, korelačním koeficientem a výtěžností. Pro hodnocení záznamů a pro kvantifikaci vzorků byly použity šablony vytvořené v MS Excel, statistické hodnocení bylo provedeno s využitím GraphPad Prism 9.

Tabulka č. 12 – Podmínky experimentu

Sorbent	Plexa PCX
Rozměr kolony	10x1,5 mm
Zředění vzorku	80
Rozpouštědlo vzorku	Kys. octová pH 2,6
Nástřik vzorku	20 µl
Promývací činidlo	50% acetonitril
Eluční činidlo	1% amoniak
Vlnové délky detekce	235 nm korekce 270 nm

4.7. Výsledky a diskuze

Pomocí online SPE v SIA byly měřeny různé koncentrace kreatininu ve vzorcích moči. Po optimalizaci metody byly stanoveny podmínky, při kterých byly měřeny nejprve standartní roztoky kreatininu, poté tři vzorky moči (kvantifikovány třemi přídávky kreatininu). Naředění vzorků moči bylo 80x, jako rozpouštědlo vzorků a slepý vzorek byla použita kyselina octová s pH 2,6. Jako promývací činidlo byl zvolen 50% acetonitril a jako eluční činidlo 1% amoniak. Pro extrakci byl použit sorbent Plexa PCX a kolona o rozměrech 10 mm x 1,5 mm. Nástřik vzorků byl 20 µl a vlnové délky detekce byly 235 nm (korekce při 270 nm).

Před měřením vzorku moči byla provedena kalibrace z třech pracovních roztoků, která ověřila záchyt kreatininu na koloně. Všechny hodnoty byly zaneseny do tabulek,

z naměřených hodnot byla vypočtena výtěžnost. Pro přesnost metody byla měřena také opakovatelnost a byla stanovena mez detekce a mez kvantifikace.

Každý vzorek byl změřen dvakrát, k hodnocení byl vždy použit průměr naměřených hodnot. Z grafu kalibrační přímky byl zjištěn také korelační koeficient, který prokázal linearitu uvedené metody. Hodnoty koncentrace kreatininu byly vypočteny z výšky píku i z plochy pod píkem a nakonec byly porovnány s hodnotami naměřenými v klinické laboratoři metodou Jaffého reakce.

4.7.1. Vývoj metody, optimalizované parametry

Na začátku experimentu bylo nutné optimalizovat podmínky měření. Nejprve byly zkoušeny různé eluenty, při použití SPE kolony se sorbentem do materiálu DSC SCX. Tento sorbent je tvořen polymerně vázanou kyselinou benzensulfonovou na silikagelovém nosiči, který funguje jako iontoměnič pro kationty. Bylo srovnáno použití 1% amoniaku a 2% amoniaku. Při měření s tímto sorbentem byl dle srovnání schémat absorbance z přístroje nejprve vybrán 2% amoniak. Při použití samotného roztoku amoniaku, ale nedocházelo k dostatečnému vymytí balastu, proto byl k 2% amoniaku přidán jako promývací roztok (eluent č. 3) čistý acetonitril. Pro tyto dva eluenty byl také vyzkoušen mód back-flush, kdy byl vzorek dávkován na kolonu v jednom směru průtoku a eluován opačným směrem průtoku. Tento mód ale na průběh analýzy neměl výrazný vliv. Z hodnot naměřených při použití acetonitrilu společně s 2% amoniakem byla provedena kalibrace, výsledná kalibrační závislost ale nevykazovala dobrou linearitu. Po použití acetonitrilu došlo k lepšímu vymytí balastu, ale asi po 130 měřeních musel být sorbent vyměněn, kolona byla ucpaná a tlaková pojistka systému protékala.

Další SPE sorbent, který byl vyzkoušen do materiálu, byl Oasis MCX. Jde o polymerní sorbent se smíšeným režimem, určený pro extrakci bazických sloučenin s kationtově výměnnými skupinami. Dle popisu výrobce by se měl vyznačovat vysokou selektivitou a stabilitou v organických rozpouštědlech. Pro tento sorbent byly zkoušeny kombinace 1% amoniaku s čistým acetonitrem v různých poměrech, nejprve 1:1, poté 2:1, 4:1 a 1:2. Opět byl srovnáván rozdíl při použití 1% a 2% amoniaku a nakonec byly zkoušeny i rozdílné koncentrace acetonitrilu – 50%, 75%, 80% a 90%. Porovnáním jednotlivých schémat píků se jako nejlepší jevíly píky při použití 1% amoniaku spolu s 50%

acetonitrilem. Použitý sorbent vykazoval dobré výsledky pro asi 200 měření, poté byla kolona opět částečně ucpaná. Nakonec byl tedy zvolen sorbent Plexa PCX, který byl stabilní pro více počtů měření.

Dále byly měřeny pracovní roztoky s různými koncentracemi kreatininu. Měřené vzorky byly 0,01 mg/l; 0,025 mg/l; 0,05 mg/l; 0,0625 mg/l; 0,125 mg/l; 0,250 mg/l; 0,5 mg/l; 0,75 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l; 2 mg/l; 5 mg/l. Nejnižší koncentrace, která byla při více měřeních jasně rozlišitelná od blanku byla 0,05 mg/l, tato hodnota se tedy blížila limitu detekce. Mez detekce metody byla poté přesně určena z poměru 3x signál/šum. Finální koncentrace roztoků zvolené pro kalibraci byly 2mg/l, 4mg/l, 6mg/l, 8mg/l, 15mg/l, 20mg/l a 25mg/l.

Nástřík systému byl několikrát upraven, prvotní nastavení bylo na 100 μ l, v souvislosti s různými koncentracemi kreatininu ve vzorku byl nástřík postupně snižován (při vyšším nástříku se neobjevil rozdíl v koncentracích) na 20 μ l až 10 μ l. Při výsledném objemu 20 μ l nástříku byly poté měřeny i vzorky moči s a bez standardních přídavek kreatininu.

Dále byla naředěna a měřena různá ředění moči. Moč byla ředěna kyselinou octovou 500x, 400x, 300x, 200x, 100x, 80x, 50x a 40x. Vše bylo opět proměřeno proti slepému vzorku, odezvy detektoru byly zřetelně odlišitelné od slepého vzorku, ale ve zředění 300-500x nebyla na první pohled vidět větší odlišnost výšky píků. Nakonec bylo zvoleno zředění moči 80x, které bylo velmi dobře odlišitelné od blanku a vykazovalo dobré výsledky. Koncentrace standardních roztoků kreatininu byly 1,5 mg/l; 2,5 mg/l a 3,5 mg/l, nakonec byly ale pro lepší kvantifikaci zvoleny finální koncentrace 2 mg/l, 3 mg/l a 4 mg/l.

Tyto podmínky a zředění byly použity pro finální měření, z kterých byla vytvořena kalibrace a zhodnocena také linearita a výtěžnost. Pro přesnost metody byla rovněž stanovena opakovatelnost, nejprve z obou nástříků v páru současně, poté z každého nástříku zvlášť. Nakonec byla hodnocena také robustnost metody.

4.7.2. Validace vyvinuté metody za finálních podmínek

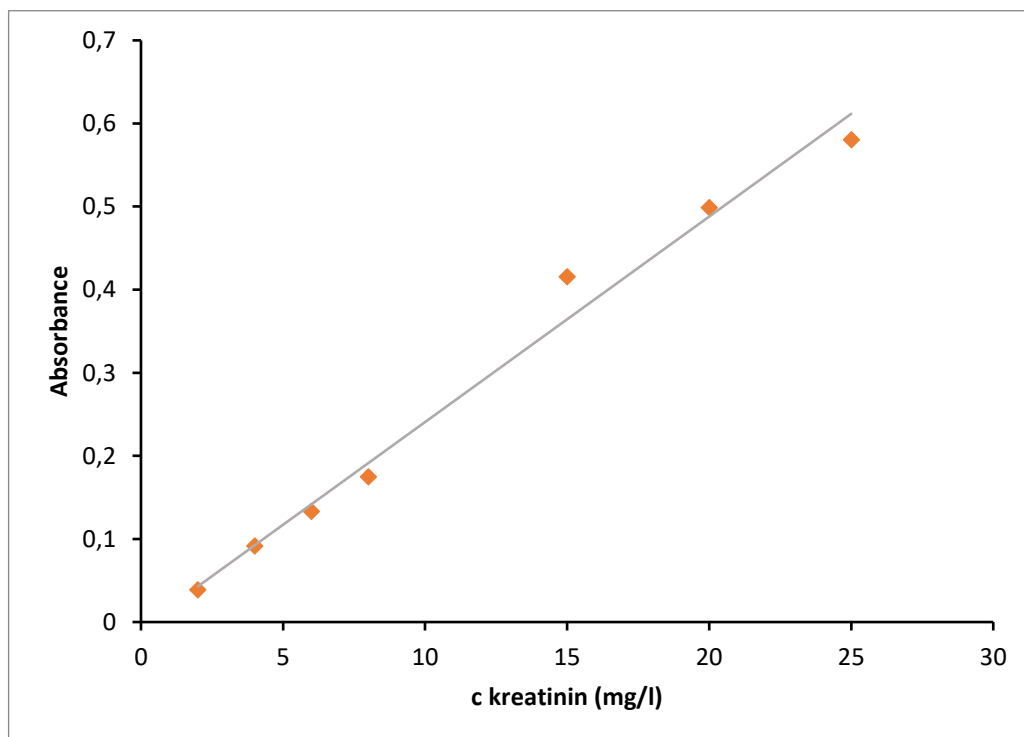
Pro validaci metody za finálních podmínek bylo zvoleno několik pracovních roztoků kreatininu, každá koncentrace byla změřena čtyřikrát. Pro sestavení kalibrační přímky

byly použity průměry naměřených hodnot. Hodnoty, ze kterých byla sestrojena kalibrační přímka, jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tabulka č. 13 a č. 14). Byly stanoveny také hodnoty SD a RSD. Kalibrace byla vytvořena z naměřených hodnot absorbance a z ploch pod píkem.

Tabulka č. 13 – Hodnoty pro kalibraci z absorbance

Koncentrace kreatininu (mg/l)	Nástřik				Průměr	SD	RSD
	1.	2.	3.	4.			
2,00	0,047	0,031	0,044	0,032	0,039	0,007	18,45 %
4,00	0,099	0,081	0,103	0,082	0,091	0,010	10,91 %
6,00	0,147	0,119	0,148	0,118	0,133	0,014	10,86 %
8,00	0,191	0,156	0,193	0,159	0,175	0,018	10,03 %
15,00	0,444	0,385	0,451	0,381	0,415	0,032	7,81 %
20,00	0,536	0,460	0,536	0,462	0,499	0,037	7,46 %
25,00	0,624	0,544	0,615	0,538	0,580	0,039	6,74 %

$$y = 0,02472 x - 0,00659 ; R = 0,9928$$

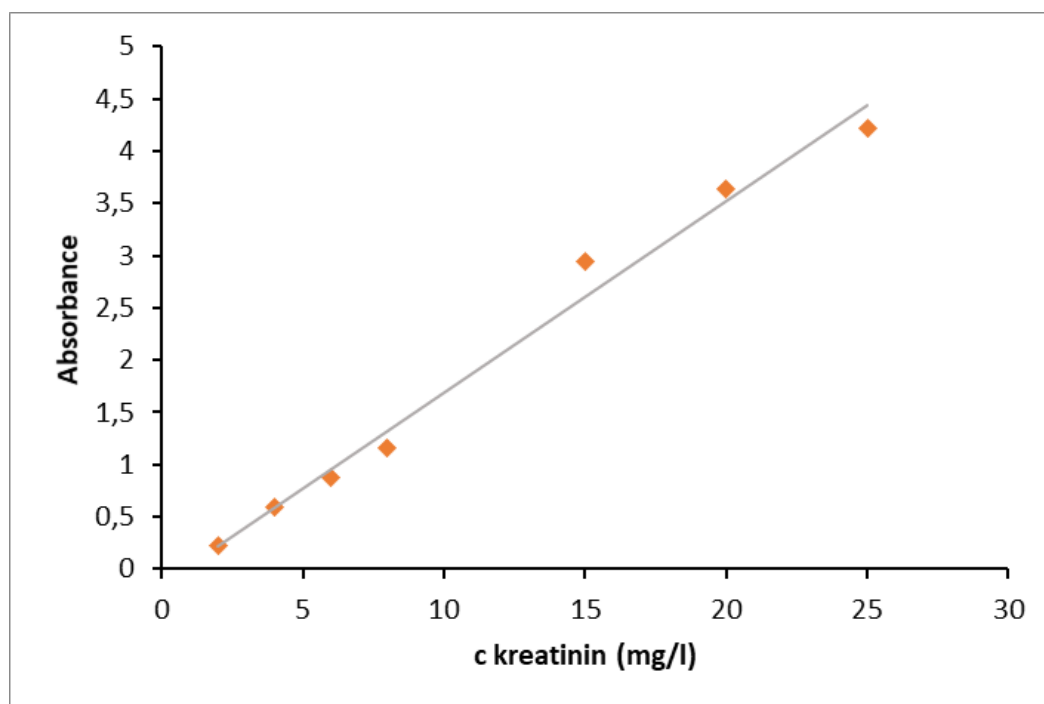


Obrázek č. 10 – Kalibrace vytvořená z hodnot absorbance

Tabulka č. 14 – Hodnoty pro kalibraci z plochy pod píkem

Koncentrace kreatininu (mg/l)	Nástřik				Průměr	SD	RSD
	1.	2.	3.	4.			
2,00	0,282	0,181	0,265	0,186	0,229	0,045	19,77 %
4,00	0,655	0,525	0,686	0,523	0,597	0,074	12,42 %
6,00	0,990	0,783	0,978	0,759	0,877	0,107	12,21 %
8,00	1,291	1,024	1,293	1,033	1,160	0,132	11,35 %
15,00	3,178	2,696	3,213	2,668	2,939	0,257	8,75 %
20,00	3,491	2,857	3,572	2,979	3,225	0,311	9,64 %
25,00	0,624	0,544	0,615	0,538	0,580	0,039	6,74 %

$$y = 0,18336 x - 0,14491 ; R = 0,9934$$



Obrázek č. 11 – Kalibrace vytvořená z hodnot plochy pod píkem

Z obrázků sestrojených kalibračních křivek je patrný záchyt kreatininu při vyšších (25mg/l) i nižších koncentracích (2mg/l).

Mez detekce a mez kvantifikace

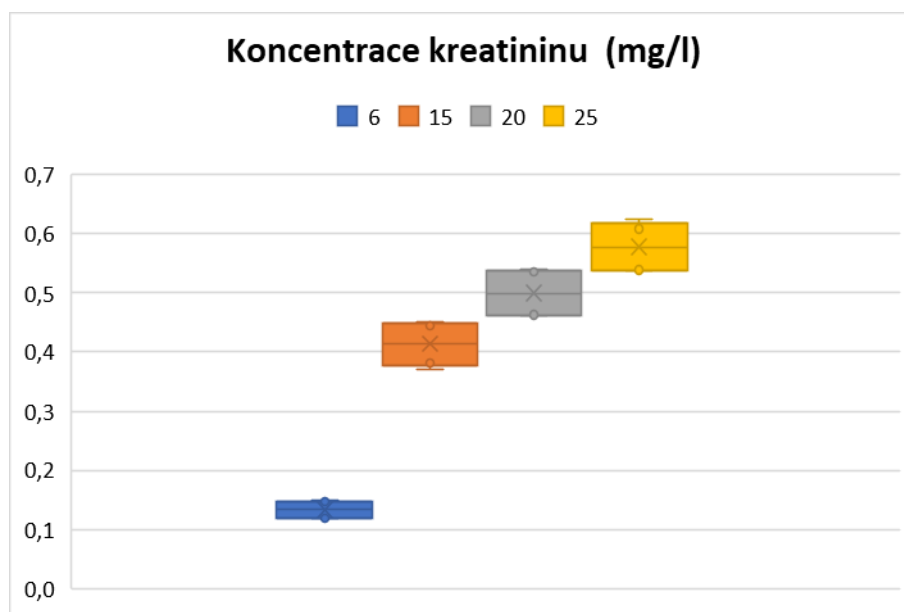
Pro správnou validaci metody byla určena také mez detekce a mez kvantifikace. Mez detekce metody byla určena z poměru 3x signál/šum na 0,45 mg/l a mez kvantifikace jako 1,35 mg/l.

Opakovatelnost

Pro zjištění přesnosti měření byla také měřena opakovatelnost. Byly proměřeny čtyři koncentrace, opakovatelnost byla opět hodnocena z absorbance i z ploch pod píkem a vynesena do grafu. Do grafu byly také zvlášť zaneseny hodnoty z prvního a z druhého nástřiku v páru. Z hodnot v tabulkách i z grafů je patrné, že pokud se hodnotily jednotlivé nástřiky zvlášť, RSD byla mnohem nižší.

Tabulka č. 15 – Hodnoty pro opakovatelnost z absorbance

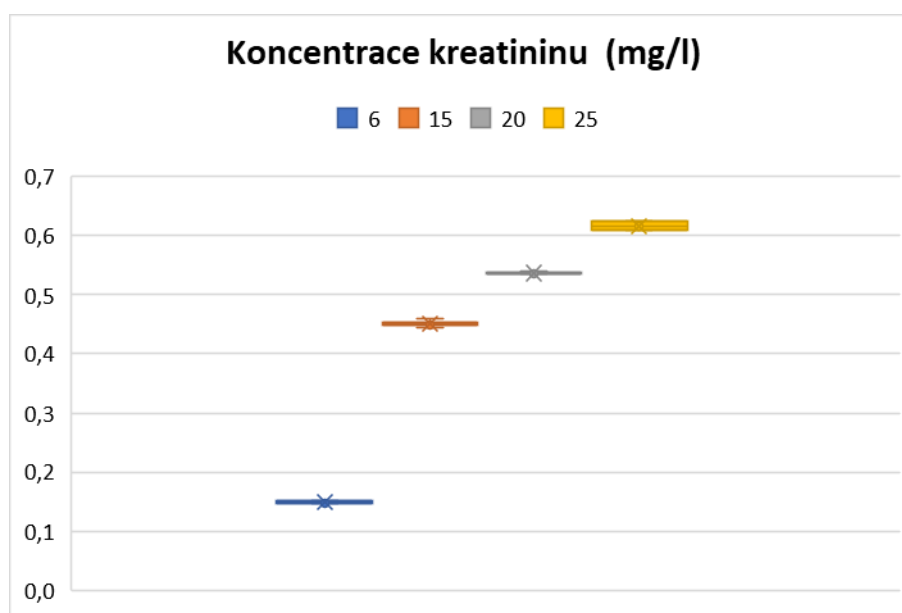
	Nástřik								
Koncentrace kreatininu (mg/l)	1.	2.	3.	4.	5.	6.	Průměr	SD	RSD
6,00	0,147	0,119	0,148	0,118	0,150	0,122	0,134	0,014	10,76%
15,00	0,444	0,385	0,451	0,381	0,449	0,369	0,413	0,035	8,50 %
20,00	0,536	0,460	0,536	0,462	0,538	0,463	0,499	0,037	7,49 %
25,00	0,624	0,544	0,615	0,538	0,608	0,537	0,578	0,038	6,60%



Obrázek č. 12 – Opakovatelnost stanovená z naměřených hodnot absorbance

Tabulka č. 16 – Hodnoty pro opakovatelnost z absorbance – hodnoty prvního nástřiku v páru

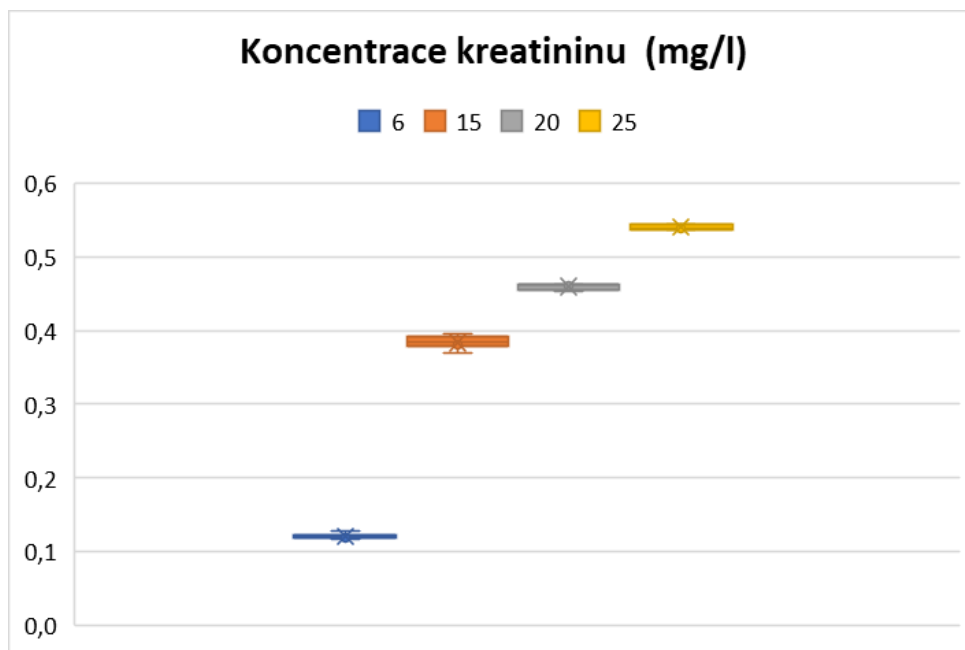
Koncentrace kreatininu (mg/l)	Nástřik						Průměr	SD	RSD
	1.	2.	3.	4.	5.	6.			
6,00	0,147	0,148	0,150	0,172	0,151	0,152	0,150	0,002	1,29 %
15,00	0,444	0,451	0,449	0,458	0,452	0,452	0,451	0,004	0,95 %
20,00	0,536	0,536	0,538	0,535			0,536	0,001	0,22 %
25,00	0,624	0,615	0,608				0,615	0,006	1,05 %



Obrázek č. 13 – Opakovatelnost stanovená z naměřených hodnot prvního nástřiku absorbance

Tabulka č. 17 – Hodnoty pro opakovatelnost z absorbance – hodnoty druhého nástřiku v páru

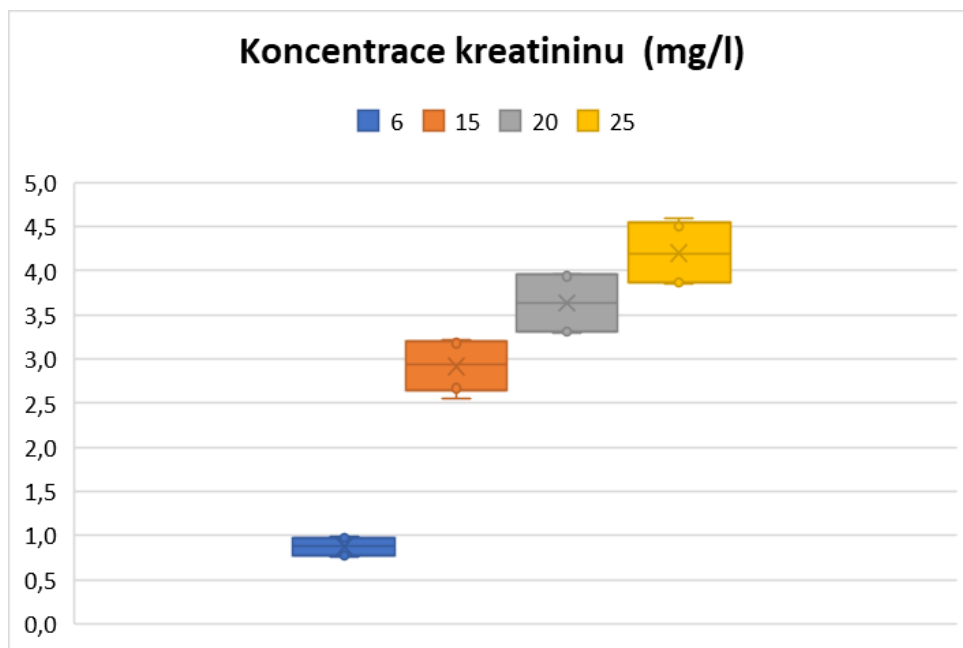
Koncentrace kreatininu (mg/l)	Nástřik						Průměr	SD	RSD
	1.	2.	3.	4.	5.	6.			
6,00	0,119	0,118	0,122	0,128	0,117	0,122	0,121	0,003	2,83 %
15,00	0,385	0,381	0,369	0,395	0,390	0,382	0,384	0,008	2,11 %
20,00	0,460	0,462	0,463	0,453			0,460	0,004	0,82 %
25,00	0,544	0,538	0,537				0,540	0,003	0,59 %



Obrázek č. 14 – Opakovatelnost stanovená z naměřených hodnot druhého nástřiku absorbance

Tabulka č. 18 – Hodnoty pro opakovatelnost z plochy pod píkem

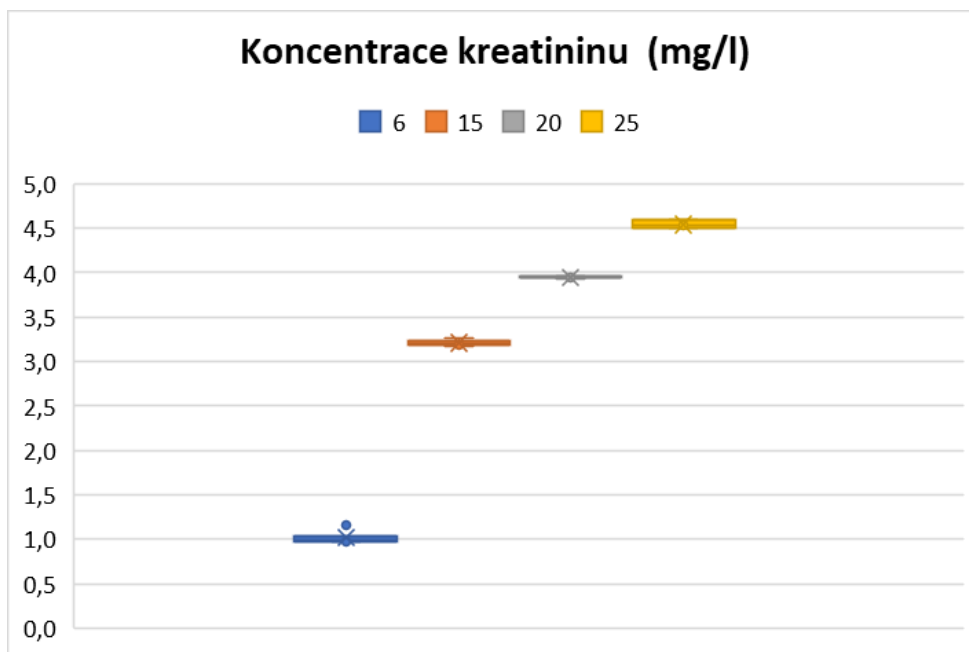
Koncentrace kreatininu (mg/l)	Nástřik						Průměr	SD	RSD
	1.	2.	3.	4.	5.	6.			
6,00	0,990	0,783	0,978	0,759	0,976	0,779	0,877	0,104	11,88%
15,00	3,178	2,696	3,213	2,668	3,197	2,554	2,918	0,282	9,66 %
20,00	3,949	3,303	3,965	3,316	3,936	3,326	3,632	0,318	8,75 %
25,00	4,594	3,880	4,533	3,870	4,496	3,845	4,203	0,340	8,08 %



Obrázek č. 15 – Opakovatelnost stanovená z naměřených hodnot plochy pod píkem

Tabulka č. 19 – Hodnoty pro opakovatelnost z plochy pod píkem – hodnoty prvního nástřiku v páru

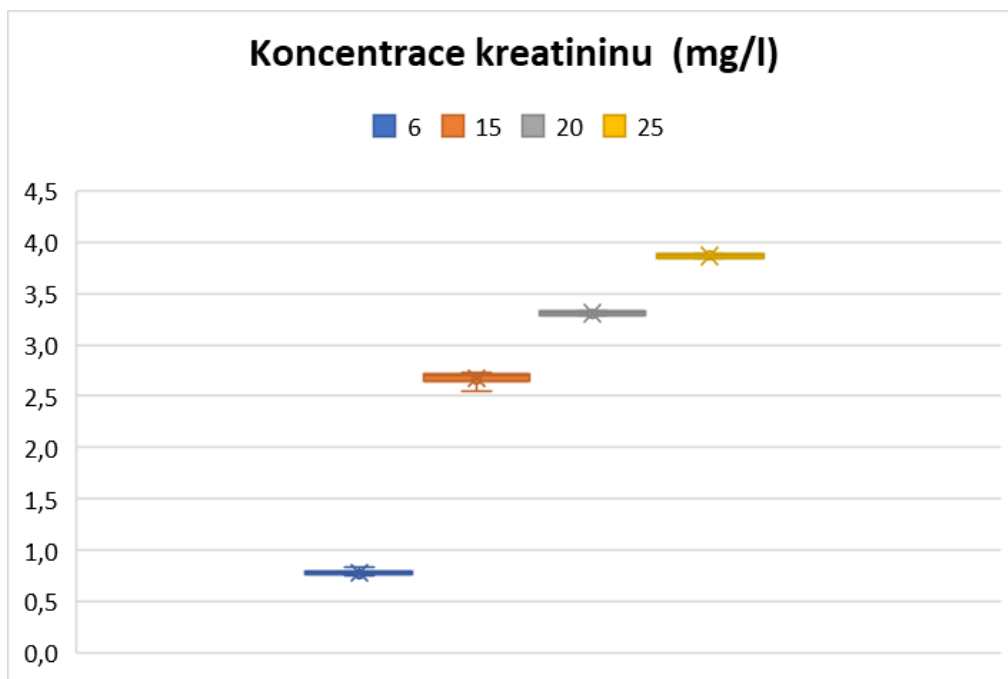
Koncentrace kreatininu (mg/l)	Nástřik						Průměr	SD	RSD
	1.	2.	3.	4.	5.	6.			
6,00	0,990	0,978	0,976	1,160	1,007	1,002	0,991	0,012	1,26 %
15,00	3,178	3,213	3,197	3,220	3,192	3,264	3,211	0,027	0,85 %
20,00	3,949	3,965	3,936	3,945			3,949	0,011	0,27 %
25,00	4,594	4,533	4,496				4,541	0,040	0,89 %



Obrázek č. 16 - Opakovatelnost stanovená z naměřených hodnot prvního nástřiku plochy pod píkem

Tabulka č. 20 – Hodnoty pro opakovatelnost z plochy pod píkem – hodnoty druhého nástřiku v páru

Koncentrace kreatininu (mg/l)	Nástřik						Průměr	SD	RSD
	1.	2.	3.	4.	5.	6.			
6,00	0,783	0,759	0,779	0,834	0,763	0,782	0,783	0,024	3,13 %
15,00	2,696	2,668	2,554	2,725	2,714	2,702	2,677	0,057	2,15 %
20,00	3,303	3,316	3,326	3,289			3,308	0,014	0,42 %
25,00	3,880	3,870	3,845				3,865	0,015	0,38 %



Obrázek č. 17 - Opakovatelnost stanovená z naměřených hodnot druhého nástřiku plochy pod píkem

Na základě výsledků byly provedeny úpravy v metodě s cílem zjistit vliv jednotlivých parametrů na robustnost metody. Došlo k úpravě v nastřikovaném objemu, zředění vzorku, koncentrace acetonitrilu v promývacím roztoku a koncentrace jednotlivých standardních přísadků. Při testování vlivu podmínek analýzy vzorků moči na výsledné koncentrace kreatininu byly vyzkoušeny různá ředění vzorků moči, různé koncentrace acetonitrilu i různý objem nástřiku vzorků. Naměřené koncentrace kreatininu při různých podmínkách experimentu jsou uvedeny v následující tabulce (tabulka č.21).

Tabulka č. 21 – Testování vlivu podmínek analýzy vzorků moči na výsledky

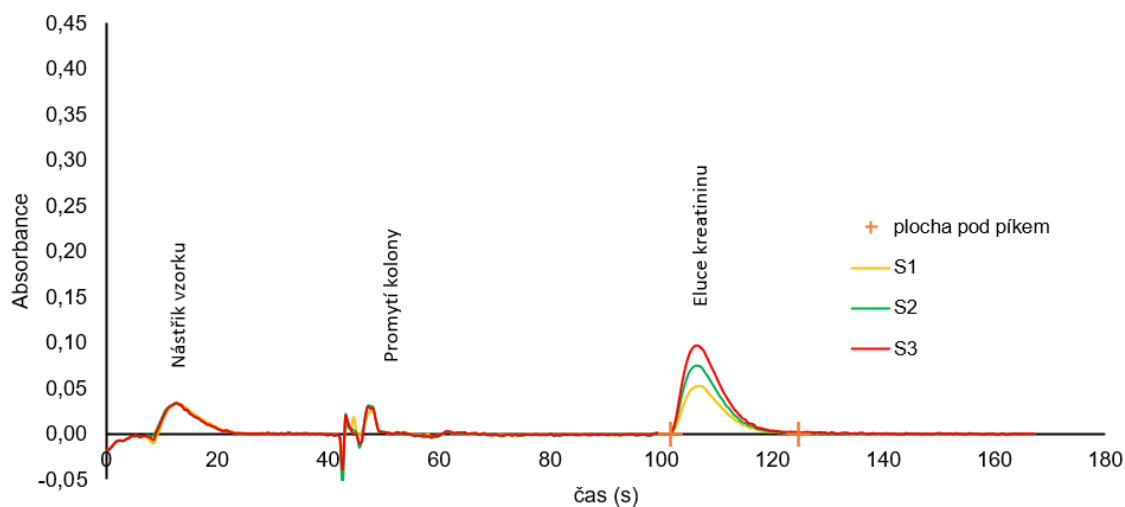
Den měření	Zředění vzorku	Nástřik vzorku (μl)	Promytí kolony	Standardní přídavky (mg/l)	Koncentrace kreatininu z A (mmol/l)	Koncentrace kreatininu z plochy (mmol/l)
28. 7. 2020	40x	100	Acetonitril 50%	2,00; 3,00; 4,00	6,395; 6,770; 6,742; 6,347; 6,805; 6,474	6,405; 6,120; 6,653; 6,128; 6,174; 6,080
30. 9. 2020	40x	20	Acetonitril 50%	2,00; 3,00; 4,00	6,596; 7,706	7,152; 7,130
2. 10. 2020	40x	20	Acetonitril 50%	2,00; 3,00; 4,00	6,945	7,274
9. 10. 2020	80x	20	Acetonitril 50%	2,00; 3,00; 4,00	5,811; 6,104	5,646; 6,001
9. 10. 2020	20x	10	Acetonitril 50%	2,00; 3,00; 4,00	6,030; 6,597	6,089; 6,445
11. 11. 2020	20x	10	Acetonitril 80%	4,00	15,601; 11,811	8,421; 9,414
12. 11. 2020	40x	20	Acetonitril 80%	2,00; 3,00; 4,00	9,258; 8,175	7,148; 7,056
12. 11. 2020	40x	20	Acetonitril 50%	2,00; 3,00; 4,00	6,661; 9,932	6,505; 7,126

Opakovatelnost metody byla měřena také ve vzorcích moči. Hodnoty nástřiků a z nich vypočtené SD a RSD jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka č. 22 – Hodnoty pro opakovatelnost při analýze vzorku moči

28. 7. 2020	Příprava vzorku / koncentrace kreatininu (mmol/l)						Průměr	SD	RSD
	1.	2.	3.	4.	5.	6.			
Z výšky píku	6,396	6,770	6,742	6,347	6,805	6,474	6,589	0,187	2,85 %
Z plochy pod píkem	6,405	6,120	6,653	6,128	6,174	6,080	6,260	0,205	3,28 %

Pro přehlednost a správnou validaci je uveden i graf tří standardních přídávků (obr. 18).



Obrázek č. 18 – nástřik standardů kreatininu

4.7.3. Stanovení vzorků moči

V následujících tabulkách a grafech jsou naměřené hodnoty při finálních podmínkách našeho experimentu.

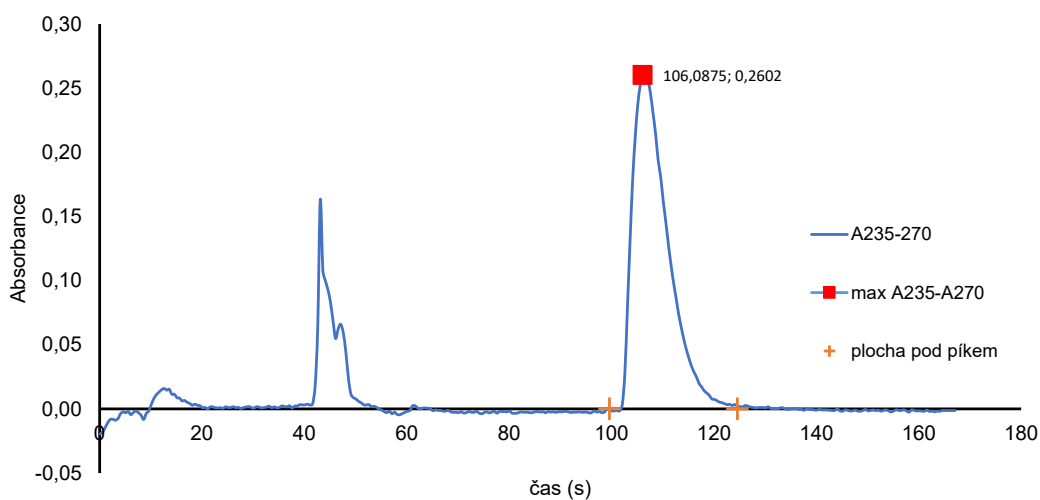
4.7.3.1. Vzorek moči č. 1

Výsledky, záznamy a vytvořené kalibrace z naměřených hodnot pro vzorek č. 1 jsou uvedeny v této kapitole. Analyzovány byly i další dva vzorky moči, průběh analýzy těchto vzorků moči byl shodný, parametry metody kvantifikace byly téměř totožné jako u vzorku č. 1. Detaily ani záznamy proto nejsou uvedeny. Stanovené koncentrace kreatininu ze všech vzorků a jejich porovnání jsou uvedeny v tabulce č. 24.

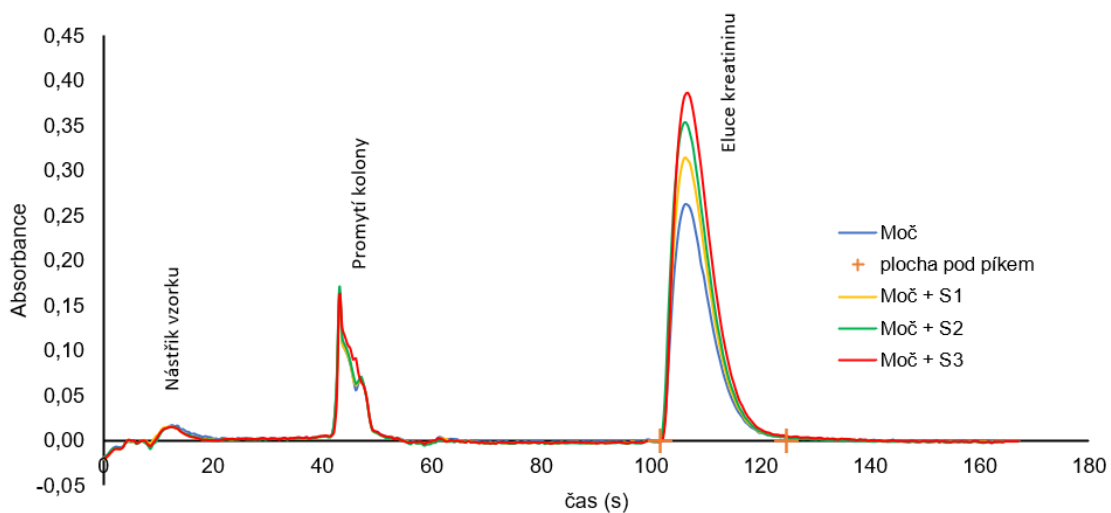
Tabulka č. 23 – Výsledky pro vzorek moči č. 1, měřeno 9. 10. 2021. Zředění vzorku 80x, nástřik 20 µl, promytí kolon 50% acetonitril

	Absorbance	Plocha pod píkem
Výtěžnost Moč č. 1 + standardní přídavek 2 mg/l	99,90 %	100,31 %
Výtěžnost Moč č. 1 + standardní přídavek 3 mg/l	123,36 %	125,47 %
Výtěžnost Moč č. 1 + standardní přídavek 4 mg/l	127,41 %	130,33 %
Směrnice	0,0292	0,2388
Abs. Člen	0,2399	1,9068
R	0,9962	0,9950
Stanovená koncentrace kreatininu (mg/l)	8,216	7,984
Koncentrace kreatininu ve vzorku (mg/l)	657,29	638,72
Koncentrace kreatininu ve vzorku (mmol/l)	5,811	5,646
Koncentrace kreatininu dle Jaffé (mmol/l)		4,863

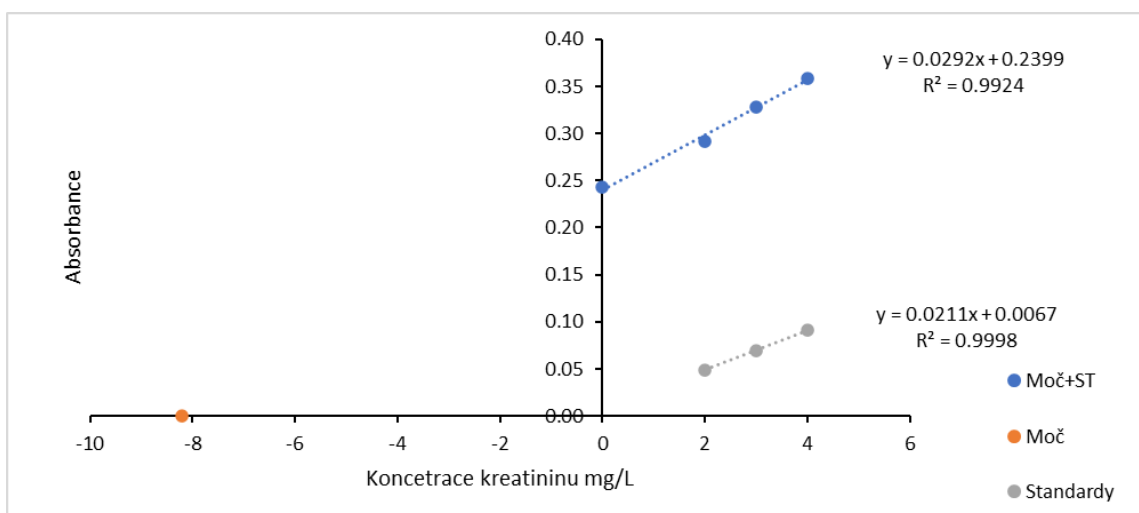
Z hodnot průměrů jednotlivých vzorků a standardů byla vypočtena výtěžnost, která se pohybovala mezi 99-130 %. Jako ukazatel dobré lineární závislosti slouží korelační koeficient, který byl vypočten jak z hodnot absorbance, tak z ploch pod píkem. Hodnoty koncentrace kreatininu ve vzorku č.1 vyhodnocené jak z výšky píku, tak z plochy pod píkem byly velmi blízké hodnotě stanovené v klinické laboratoři metodou dle Jaffé.



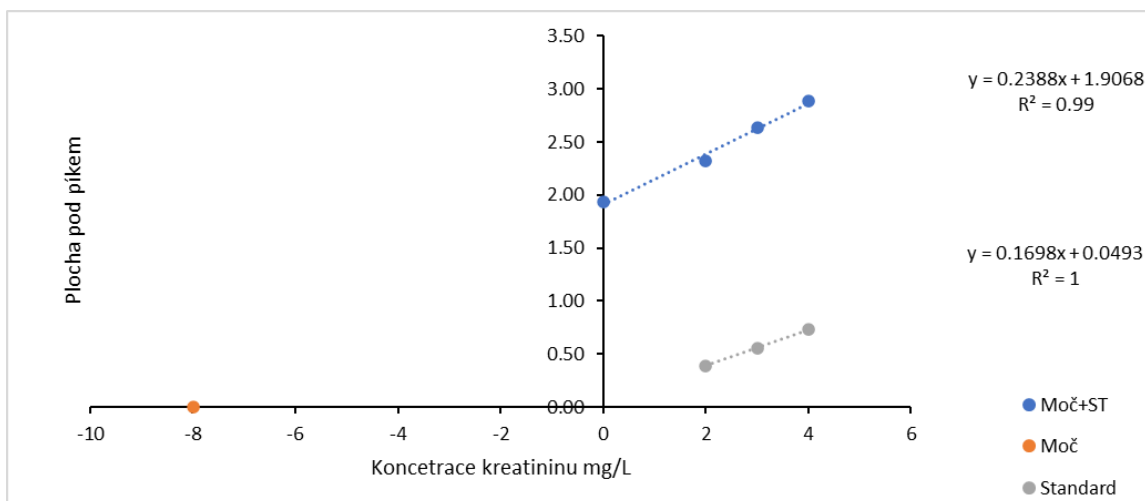
Obrázek č. 19 – Záznam analýzy kreatininu ve vzorku moči č.1, korigovaný záznamem slepého vzorku



Obrázek č. 20 – Záznamy analýzy moči č. 1. - překrytý, záznamy se moči se standardními přísadky.



Obrázek č. 21 – Kvantifikace kreatininu ve vzorku moči č. 1, hodnocení dle výšky píku



Obrázek č. 22 – Kvantifikace kreatininu ve vzorku moči č. 1, hodnocení dle plochy pod píkem

Pro proměření standardních přídavek byly vždy použity průměry dvou naměřených hodnot standardů, výšky píku a plochy pod píkem. Od všech hodnot byla odečtena hodnota příslušného slepého vzorku. Dle hodnoty koeficientu determinace lze říct, že odezva standardních přídavek vykazuje dobrou linearitu. Hodnoty byly využity pro určení výtěžnosti standardních přídavek.

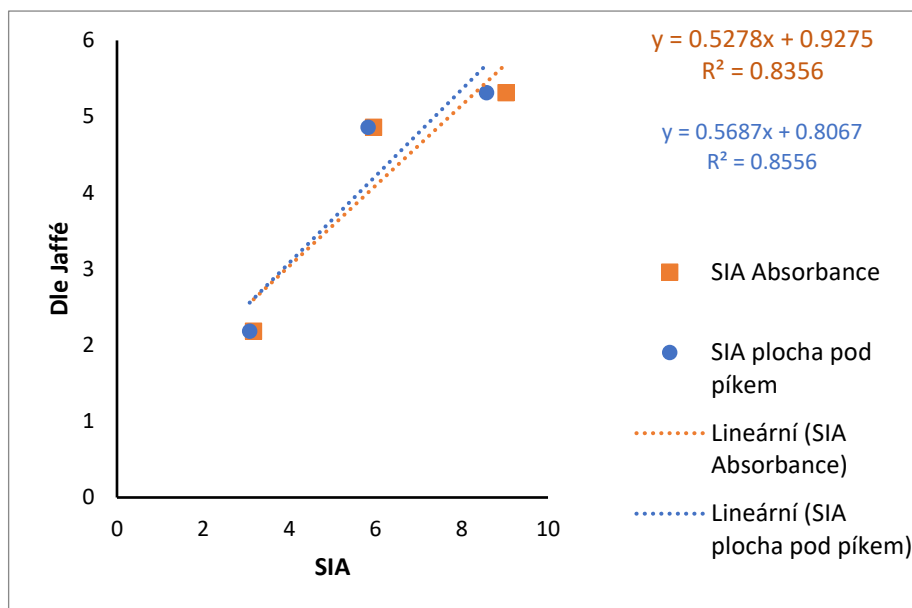
Všechny tři vzorky moči byly připraveny k analýze 2x a výsledky porovnány se stanovením dle Jaffé, provedeným v komerční klinické laboratoři.

Tabulka č. 24 – Porovnání naměřených hodnot s hodnotami naměřenými Jaffého metodou

Absorbance	Koncentrace kreatininu ve vzorku (mmol/l)					Dle Jaffé
Vzorek	1. příprava	2. příprava	Průměr	SD	RSD	
1	5,811	6,104	5,9575	0,1465	2,46 %	4,863
2	8,880	9,171	9,0255	0,1455	1,61 %	5,314
3	3,492	2,849	3,1705	0,3215	10,14 %	2,186
Plocha pod píkem						
1	5,646	6,009	5,8275	0,1815	3,11 %	4,863
2	8,651	8,504	8,5775	0,0735	0,86 %	5,314
3	3,469	2,686	3,0775	0,3915	12,72 %	2,186

Statisticky byla zhodnocena shoda hodnot naměřených metodou SIA a standardní metodou dle Jaffé. Použit byl Wilcoxonův párový test (neparametrický). Při porovnání výsledků vypočtených z absorbance i z plochy pod píkem vyšla hodnota $p = 0,2500$ (na hladině významnosti 0,05; dvoustranný test; $n = 3$), tedy hodnoty naměřené oběma

metodami nejsou statisticky rozdílné. Pro přehlednost byla provedena i regresní analýza výsledků (obrázek č. 23).



Obrázek č. 23 – Regresivní analýza výsledků

4.7.4. Diskuze

Pro stanovení koncentrace kreatininu ve vzorcích moči pomocí SPE v SIA bylo nutné použitou metodou optimalizovat. Výběr vhodného sorbentu měl značný vliv na správný průběh analýzy. Byly zkoušeny tři typy sorbentů – sorbent do materiálu DSC SCX, Oasis MCX a Plexa PCX. I přesto, že první dva typy sorbentů byly schopny extrahovat stanovený analyt, hlavní problém byla jejich stabilita při měření. Během opakovaného měření došlo k ucpání kolony a překročení tlakového maxima SIA přístroje 250 psi. Sorbent DSC SCX byl funkční asi na 130 měření/extrakcí, sorbent Oasis MCX asi na 200 měření. Aby bylo měření provedeno správně za stejných podmínek bylo nutné najít sorbent, který bude stabilní po celou dobu měření, sorbent Plexa PCX tuto podmínku splnil, když s ním bez ztráty funkčnosti bylo provedeno více než 600 měření včetně analýzy vzorků moči.

Dalším faktorem, který měl vliv na analýzu, byl výběr správného promývacího a elučního činidla. Vhodný promývací roztok byl zvolen tak, aby odstranil interferující matrici vzorku. Nalezení vhodného elučního činidla je nutné za účelem úplné a dostatečně rychlé desorpce analytu. Po vyzkoušení různých kombinací činidel v různých poměrech

byla zvolena kombinace 50% acetonitrilu a 1% amoniaku jako finální pro náš experiment. Po vyzkoušení 25% i 75% acetonitrilu nebyly výsledky při odstranění matrice lepší než při použití 50% acetonitrilu. Pro eluci byl 1% amoniak opět nejvhodnější – při nižší koncentraci docházelo k výrazně pomalejší eluci – tedy nižší i širší pík, naopak vyšší koncentrace znamenala sice velmi rychlou eluci a úzké a vysoké píky, ale na úkor opakovatelnosti a pracovního rozsahu detektoru.

V průběhu optimalizace byl také testován objem nástřiku vzorků, aby byly v rámci kalibračního rozsahu zaznamenány i vzorky s rozdílnou koncentrací kreatininu. Objem nástřiku bylo nutno postupně snižovat až na výsledný objem 20 μ l. Stejně tak byla sledována opakovatelnost nástřiku při snižujícím se objemu, zde v rozsahu 20-100 μ l nedošlo k výrazným změnám. Při objemu 10 μ l byla relativní chyba opakovatelnosti mezi prvním a druhým nástřikem již dvojnásobná, ale stále porovnatelná při opakovatelném měření.

Rozhodující faktor pro měření bylo také zředění vzorku. Vzorky byly proměřeny proti slepému vzorku. Zředění bylo nutno zvolit tak, aby odezva detektoru byla zřetelně odlišitelná od slepého vzorku. Pro koncentrace kreatininu bylo nutné určit také mez detekce a mez kvantifikace, aby byla odezva detektoru správná. Dle určené meze detekce a kvantifikace byly poté určeny také koncentrace roztoků zvolených pro kalibraci.

Po nastavení finálních podmínek experimentu byly naměřeny hodnoty kreatininu u třech vzorků moči, které byly srovnatelné s hodnotami naměřenými v klinické laboratoři dle Jaffého metody. Metoda vykazovala dobrou linearitu i výtěžnost. Pro zjištění přesnosti dané techniky bylo nutné zhodnotit také opakovatelnost. Ta byla měřena na čtyřech koncentračních úrovních v jedné sérii za stejných podmínek. Nejprve byla vypočtena RSD vždy z obou nástřiků téhož vzorku. Dle této hodnoty se zdálo, že metoda není příliš opakovatelná. Důvodem byl hlavně velký rozdíl hodnot z prvního a druhého nástřiku (tento jev charakteristický pro metodu SIA se nepodařilo během vývoje eliminovat). Po hodnocení opakovatelnosti z prvních a druhých nástřiků zvlášť, byla relativní směrodatná odchylka téměř vždy do 2 %, což lze považovat za velmi dobrý výsledek. U nižších koncentrací kreatininu a vzorků moči se RSD pohybovala kolem 3 %.

Z hodnocení dat bylo zřejmé, že tato vlastnost neměla na výsledky vliv – hodnoty kreatininu byly prakticky shodné při hodnocení prvních, druhých nástřiků i obou průměrů nástřiků.

Při srovnání s jinými metodami tato technika poskytuje řadu výhod. Mezi hlavní výhody je nutné zmínit hlavně minimální spotřebu vzorku (mikrolitry) i tvorbu odpadu (jednotky mililitrů/měření) a jednoduchou úpravu vzorku před analýzou. Velkou výhodou také byla krátká doba měření, doba měření jednoho vzorku dvakrát (dva nástřiky) se pohybovala do 6 minut.

Jako referenční metoda byla zvolena Jaffého reakce na klinickém analyzátoru. Hodnoty experimentu ve srovnání s hodnotami naměřenými rutinně používanou Jaffého reakcí vykazovaly dobrou shodu.

5. ZÁVĚR

Cílem práce bylo stanovit kreatinin metodou SPE v SIA, jejíž výsledky by byly srovnatelné s hodnotami naměřenými na klinickém analyzátoru dle Jaffého protokolu. Pro stanovení kreatininu byla použita metoda standartního přídávku, každý vzorek byl změřen dvakrát a pro hodnocení byl využit průměr daných hodnot.

Nejprve byly optimalizovány podmínky pro měření kreatininu v kyselině octové. Bylo zvoleno eluční a promývací činidlo a určena mez detekce a kvantifikace. Dle určených mezí byly zvoleny koncentrace pro sestrojení kalibrační přímky. Po sestrojení kalibrační přímky byla zhodnocena linearita metody. Dle korelační koeficientu vypočteného z absorbance i z plochy píků bylo dosaženo dobré linearity metody.

Poté byly stejné podmínky aplikovány také na měření reálných vzorků moči. Aby byla odezva detektoru správná, byla zkoušena různá měření moči a vybráno finální ředění.

Pro reálné vzorky moči byla opět sestrojena kalibrační křivka a zhodnocena linearita. Dle korelačního koeficientu měření všech vzorků moči vykazovalo dobrou linearitu. Zhodnocená výtěžnost byla dostačující, pro přesnost metody byla vypočtena také opakovatelnost. Při hodnocení RSD bylo zjištěno, že je technika dobře reprodukovatelná.

Výsledné koncentrace kreatininu byly vypočteny z výšky píků (absorbance) i z plochy pod píkem. Hodnoty naměřené v našem experimentu byly srovnatelné s hodnotami naměřenými v klinické laboratoři dle Jaffého protokolu, cíl práce byl tedy splněn.

6. POUŽITÉ ZKRATKY

ADP – adenosine diphosphate – adenosindifosfát

ATP – adenosine triphosphate – adenosintrifosfát

C4D – capacitively coupled contactless conductivity detector – kapacitně vázaný bezkontaktní vodivostní detektor

C_{kr} – clearance kreatininu

CNN – creatinine – kreatinin

DNBA – 3,5-dinitrobenzoic acid – kyselina 3,5-dinitrobenzoová

FIA – flow injection analysis – průtoková injekční analýza

GF – glomerular filtration – glomerulární filtrace

HPLC – high-performance liquid chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IDA – imidoacetic acid – kyselina imidoctová

ISTD – interní standard kreatinu

LC – liquid chromatography – kapalinová chromatografie

LLE – liquid liquid extraction – extrakce kapalina/kapalina

LOD – limit of detection – mez detekce

LOQ – limit of quantification – mez kvantifikace

MCFA – multicommutated flow analysis – multikomutovaná průtoková analýza

MDRD – modification of diet in renal disease – úprava stravy u onemocnění ledvin

MPAD – microfluidic paper-based analytical device – mikrofluidní papírové analytické zařízení

MS – mass spectrometry – hmotnostní spektrometrie

NAD – nicotinamide adenine dinucleotide – nikotinamidadenindinukleotid

NADH – nicotinamide adenine dinucleotide hydride –
nikotinamidadenindinukleotidhydrid

NADPH – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate – nikotinamidadenin
dinukleotid fosfát

PEDD – paired emitter detector diode – detektor párových emitorových diod

PEEK – polyetheretherketone – polyetereterketon

RSD – relative standard deviation – relativní směrodatná odchylka

SD – standard deviation – směrodatná odchylka

SIA – sequential injection analysis – sekvenční injekční analýza

S_{kr} – serum creatinine concentration – koncentrace kreatininu v séru

SPE – solid phase extraction – extrakce na tuhou fázi

UHPLC – ultra-high-performance liquid chromatography – ultra-
vysokoučinnákapalinová chromatografie

U_{kr} – urine creatinine concentration – koncentrace kreatininu v moči

7. SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1 – Nejdůležitější anorganické součásti moči	11
Tabulka č. 2 – Významné organické složky moči	12
Tabulka č. 3 – Hodnoty moči	12
Tabulka č. 4 – Stupně chronického poškození ledvin dle doporučení National Kidney Foundation	13
Tabulka č. 5 – Vylučování kreatininu močí	21
Tabulka č. 6 – Odpad kreatininu a koncentrace v závislosti na věku	21
Tabulka č. 7: Příprava roztoků kreatininu pro kalibraci	41
Tabulka č. 8: Příprava standartních roztoků kreatininu	41
Tabulka č. 9: Příprava měřených roztoků kreatininu	41
Tabulka č. 10 – Vzorokly měřené během experimentu	42
Tabulka č. 11 – Sekvence kroků SIA metody pro stanovení kreatininu v moči	43
Tabulka č. 12 – Podmínky experimentu	45
Tabulka č. 13 – Hodnoty pro kalibraci z absorpance	48
Tabulka č. 14 – Hodnoty pro kalibraci z plochy pod píkem	49
Tabulka č. 15 – Hodnoty pro opakovatelnost z absorpance	50
Tabulka č. 16 – Hodnoty pro opakovatelnost z absorpance – hodnoty prvního nástřiku v páru	51
Tabulka č. 17 – Hodnoty pro opakovatelnost z absorpance – hodnoty druhého nástřiku v páru	51
Tabulka č. 18 – Hodnoty pro opakovatelnost z plochy pod píkem	52

Tabulka č. 19 – Hodnoty pro opakovatelnost z plochy pod píkem – hodnoty prvního nástřiku v páru	53
Tabulka č. 20 – Hodnoty pro opakovatelnost z plochy pod píkem – hodnoty druhého nástřiku v páru	54
Tabulka č. 21 – Testování vlivu podmínek analýzy vzorků moči na výsledky	56
Tabulka č. 22 – Hodnoty pro opakovatelnost při analýze vzorku moči	56
Tabulka č. 23 – Výsledky pro vzorek moči č. 1	58
Tabulka č. 24 – Porovnání naměřených hodnot s hodnotami naměřenými Jaffého metodou	60

8. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 – Tvorba moči	11
Obrázek č. 2 – Kreatin	16
Obrázek č. 3 – Kreatinin	16
Obrázek č. 4 – Syntéza kreatinu a kreatininu	18
Obrázek č. 5 – Jaffého reakce	22
Obrázek č. 6 – Provedení SPE	31
Obrázek č. 7 – Průtoková injekční analýza – schéma	34
Obrázek č. 8 – Sekvenční injekční analýza – schéma	37
Obrázek č. 9 – schéma zapojení SIA přístroje	44
Obrázek č. 10 – Kalibrace vytvořená z hodnot absorbance	48
Obrázek č. 11 – Kalibrace vytvořená z hodnot plochy pod píkem	49
Obrázek č. 12 – Opakovatelnost stanovená z naměřených hodnot absorbance	50
Obrázek č. 13 – Opakovatelnost stanovená z naměřených hodnot prvního nástřiku absorbance	51
Obrázek č. 14 – Opakovatelnost stanovená z naměřených hodnot druhého nástřiku absorbance	52
Obrázek č. 15 – Opakovatelnost stanovená z naměřených hodnot plochy pod píkem	53
Obrázek č. 16 – Opakovatelnost stanovená z naměřených hodnot prvního nástřiku plochy pod píkem	54
Obrázek č. 17 – Opakovatelnost stanovená z naměřených hodnot druhého nástřiku plochy pod píkem	55
Obrázek č. 18 – Nástřik standardů kreatininu	57

Obrázek č. 19 – Záznam analýzy kreatininu ve vzorku moči č.1, korigovaný záznamem slepého vzorku	58
Obrázek č. 20 – Záznamy analýzy moči č. 1. Záznam vzorku moči překrytý, záznamy se moči se standardními přídávky	59
Obrázek č. 21 – Kvantifikace kreatininu ve vzorku moči č. 1, hodnocení dle výšky píku	59
Obrázek č. 22 – Kvantifikace kreatininu ve vzorku moči č. 1, hodnocení dle plochy pod píkem	60
Obrázek č. 23 – Regresivní analýza výsledků	61

9. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Rajdl D., E-klinická biochemie – Základy tvorby moče + Základní vyšetření, (2003), [citováno dne: 2.3.2021], s. 49-69, dostupné z:
<http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/texty/eBiochemie-gastro>
- [2] Kotyza J., Balvín M., Černý R., *et al.*, Úvod do klinické biochemie a enzymologie pro studující lékařství – teorie a praktikum, 1. vydání, Praha Karolinum (2007), ISBN 978-80-246-1350-5, s. 41-67
- [3] Žaloudková D., Výpočet extrakce MAG3 v ledvinách při dynamické scintigrafii ledvin, České Budějovice, 2011, [online], [cit. 10.1.2021], Dostupné z:
<https://docplayer.cz/40678498-Vypocet-extrakce-mag3-v-ledvinach-pri-dynamicke-scintigrafii-ledvin.html>, Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, MUDr. Ladislav Šabata
- [4] Prevedig – laboratorně diagnostické centrum, odborné texty – odhad glomerulární filtrace, [online] dostupné z:
https://www.prevedig.cz/pict/fotogalerie/Odborne_texty/Glomerul%C3%A1rn%C3%AD%20filtrace%20-%20odhad.pdf
- [5] Zima T., Racek J., Tesař V., *et al.*, Česká nefrologická společnost, Doporučení k diagnostice chronického onemocnění ledvin (odhad glomerulární filtrace a vyšetřování proteinurie), (2014) [online], [citováno: 10.3.2021], dostupné z:
http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/2014/2014_Dop_nefrol.pdf
- [6] Teplan V. *et al.*, Praktická nefrologie, 2. zcela přepracované a doplněné vydání, (2006), ISBN 80-247-1122-2, 496 s.
- [7] Tymecki L., Korszun J., Strzelak K., *et al.*, Multicommutated flow analysis systém for determination of creatinine in physiological fluids by Jaffe method, *Analytica Chimica Acta* (2013), s. 118-125
- [8] Devlin M. T., Textbook of Biochemistry with clinical correlation, 7th edition, (2010), ISBN: 978-0-470-28173-4, 1240 s.

- [9] Masopust J., *Klinická biochemie, Požadování a hodnocení biochemických vyšetření*, (1998), ISBN: 80-7184-649-3, 832 s.
- [10] Budavari S., *The Merck Index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, (1996), ISBN: 0911910123 9780911910124
- [11] Wikiskripta, *Kreatin*, 2019 [online], [cit. 15.1.2021], dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Kreatin>
- [12] Racek J. *et al.*, *Klinická biochemie, 2. přepracované vydání*, (2006), ISBN: 8072623249, 329 s.
- [13] Wyss M, Kaddurah-Daouk R., *Creatine and Creatinine Metabolism. Physiological Reviews.* (2000), 80(3); s. 1107-1213. Dostupné z: <http://physrev.physiology.org/content/80/3/1107.full>
- [14] Thomas L., *Clinical laboratory diagnostics: use and assesment of clinical laboratory results*, 1th edition, (1998), ISBN: 3980521540, 1527s.
- [15] Velíšek J., *Chemie potravin, 2. upravené vydání*, (2002), ISBN: 80-86659-01-12, 303 s.
- [16] Da Silva R. P., Nissim I., Brosnan M. E., et al., *Creatine synthesis: hepatic metabolism of guanidinoacetate and creatine in the rat in vitro and in vivo*, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, (2009), 296(2) s. E256-E261, [online], [citováno dne 10.2.2021], Dostupné z: <http://ajpendo.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpendo.90547.2008>
- [17] Nováková J., *Přeměna AMK na odvozené produkty*, [online], [cit. 15.1.2021], dostupné z: <https://slideplayer.cz/slide/17424160/>
- [18] Sumonmarn Ch. *et al.*, *Simultaneous and direct determination of urea and creatinine in human urine using a cost-effective flow injection system equipped with in-house contactless conductivity detector and LED colorimeter*, *Analytica Chimica Acta* (2019), 1073; s.54-61

- [19] Čermáková M., Štěpánová I., *Klinická biochemie 1. vydání*, (2010), ISBN: 978-80-7013-515-0, 130 s.
- [20] Kvasnicová V., Jabor A., Wilhelm Z., *Kreatinin v moči a odpad v moči*, 2006 [online], [cit. 15.1.2021], dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJEKC.htm
- [21] Moore F. J., Sharer D. J., *Methods for Quantitative Creatinine Determination*, *Current Protocols in Human Genetics*, (2017) 6;93:A.30.1-A.30.7.
- [22] Lewińska I., Tymecki Ł., Michalec M., *An alternative, single-point method for creatinine determination in urine samples with optoelectronic detector, Critical comparison to Jaffé method*, *Talanta* (2019), 195; s. 865–869
- [23] Friedecký B., Holečková M., *Kompenzace Jaffého metody stanovení kreatininu, Kvalita v laboratorní medicíně*, (2012), s. 14-17, [online], [citováno dne 10.2.2021], dostupné z: <http://web3.stapro.cz/bullfons/22012/kvalita1.pdf>
- [24] Simpson G. W., *Plasma creatinine and the effect of delay in separation of samples*, (1992), s.307-309
- [25] Breinek P., *Dusíkaté látky nebílkovinné povahy*, (2011), [online], převzato a upraveno, [citováno dne 15.1.2021], dostupné z: <https://slideplayer.cz/amp/4017950/>
- [26] Dastych M., Breinek P. a kolektiv, *Klinická biochemie bakalářský obor Zdravotní laborant*, 3. vydání, (2015), ISBN-13: 978-80-210-7788-1, 254 s.
- [27] Chromý V., Fischer J., *Analytické metody v klinické chemii*, (2000), ISBN: 80-210-2363-5, 211 s.
- [28] Fava L. E., do Prado M. T., Garcia-Filho A., *et al.*, *Non-enzymatic electrochemical determination of creatinine using a novel screen-printed microcell*, *Talanta* (2020), 207;120277
- [29] Chanaem S., Kaewyai K., Mantim T., *et al.*, *Simultaneous and direct determination of urea and creatinine in human urine using a cost-effective flow injection system*

equipped with in-house contactless conductivity detector and LED colorimeter, *Analytica Chimica Acta* (2019), 1073; s.54-61

[30] Lewińska I., Michalec M., Tymecki Ł., From the bottom of an old jar: A fluorometric method for the determination of creatinine in human serum, *Analytica Chimica Acta* (2019), 1135; s.116-122

[31] Kučerová K., Krčmová L. K., Mikanová Z., *et al.*, Determination of urinary retinol and creatinine as an early sensitive marker of renal dysfunction, *Journal of Chromatography A* (2019), 1607;460390

[32] Mathaweesansurn A., Thongrod S., Khongkaew P., *et al.*, Simple and fast fabrication of microfluidic paper-based analytical device by contact stamping for multiple-point standard addition assay: Application to direct analysis of urinary creatinine, *Talanta* (2020), 210;120675

[33] Yuan Y., Jiang M., Zhang H., *et al.*, Simultaneous quantification of urinary purines and creatinine by ultra high performance liquid chromatography with ultraviolet spectroscopy and quadrupole time-of-flight mass spectrometry: Method development, validation, and application to gout study, *Journal of Separation Science* (2019), 42(15); s.2467–2586

[34] Kiwfo K., Wongwilai W., Sakai T., *et al.*, Determination of Albumin, Glucose, and Creatinine Employing a Single Sequential Injection Lab-at-Valve with Mono-Segmented Flow System Enabling In-Line Dilution, In-Line Single-Standard Calibration, and In-Line Standard Addition, *Molecules* (2020), 25;1666; s. 1-11

[35] Mantim T., Chaisiwamongkhol K., Uraisin K., *et al.*, Dual-Purpose Photometric-Conductivity Detector for Simultaneous and Sequential Measurements in Flow Analysis, *Molecules* (2020), 25, 2284, s. 1-14

[36] Walker V., Mills G. A., Solid-phase extraction in clinical biochemistry, *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*, (2002);39(Pt 5): s. 464-77

- [37] Dziurkowska E., Wesolowski M., Solid Phase Extraction Purification of Saliva Samples for Antipsychotic Drug Quantitation, *Molecules* (2018), 12;23(11):2946
- [38] Venn R. F., Merson J., Cole S., *et al.*, 96-Well solid phase extraction: a brief history of its development, *Journal of Chromatography B*, (2005), 5;817(1): s. 77-80
- [39] Sigma Aldrich, Solid Phase Extraction (SPE) Overview, [online], [citováno dne: 10.2.2021], Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/learning-center/spe-overview.html>
- [40] Waters, SPE Method Development Summary, [online], [citováno dne: 10.2.2021], Dostupné z: https://www.waters.com/waters/en_CZ/SPE-Method-Development-Summary/nav.htm?cid=10083883&locale=126
- [41] Coufal P., Extrakce, (1996), [online], [citováno dne 15.1.2021], Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>
- [42] Borkovcová I., Kostrhounová R., Extrakční metody, (2013), [online], [citováno dne 10.2.2021], Dostupné z: <https://docplayer.cz/15463881-Extrakcni-metody-studijni-material-1-obecna-charakteristika-extrakce-2-extrakce-kapalina-kapalina-lle-3-alkalicka-hydrolyza.html>
- [43] Klouda P., Moderní analytické metody. 2. aktualizované vyd. Ostrava: Pavel Klouda, (2003), ISBN 80-86369-07-2, 132 s.
- [44] Marć M., Namieśnik J., Płotka-Wasyłka J., *et al.*, New Polymeric Materials for Solid Phase Extraction, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* (2017) 3;47(5): s. 373-383
- [45] Krašavec I., Prosen H., Solid-Phase Extraction of Polar Benzotriazoles as Environmental Pollutants: A Review, *Molecules*, (2018) 29;23(10):2501
- [46] Háková M., Havlíková Ch. L., Švec F., *et al.*, Nanofibers as advanced sorbents for on-line solid phase extraction in liquid chromatography: A tutorial, *Analytica Chimica Acta* (2020), 1121, s. 83-96
- [47] Türker, A. R., Separation, Preconcentration and Speciation of Metal Ions by Solid Phase Extraction, *Separation & Purification Reviews* (2012), 41:3; s.169-206

- [48] Sakai T., a Teshima N., Advancement of Flow-based Analysis with Alternative Chemical Reaction and New Devices for Enviromental and Biological Samples. *Analytical Sciences* (2008), 24; s. 855-864
- [49] Růžička J., Hansen E. H., Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis, *Analytica Chimica Acta* (1975), 78; s.145-157
- [50] Paseková H., Polášek M., Solich P., Sekvenční injekční analýza, *Chem. Listy* (1999), 93, s. 354-359
- [51] Růžička J., Flow injection-renewable surface techniques, *Analytica Chimica Acta* (1995), 308; s. 14-19
- [52] Miró M., Cerdá V., Estela J. M., Multisyringe flow injection analysis: characterization and application, *Trends in Analytical Chemistry* (2002), s. 199-210
- [53] Hansen E. H., The impact of flow injection on modern chemical analysis: Has it fulfilled our expectations ? And where are we going ?, *Talanta* (2004), 64(5): s.1076-83
- [54] Wu C.H., Scampavia L., Ruzicka J., *et al.*, Micro sequential injection: fermantation monitoring of ammonia glycerol, glucose, and free iron using the novel lan-on-valve systém, *Analyst* (2001); 126(3): s.291-7
- [55] Lapa R.A.S., Lima J. F. C., Reis B. F., *et al.*, Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities, *Analytica Chimica Acta* (2002), 466; s.125–132
- [56] Růžička J., Chocholouš P., Flow injection analysis, Tutorial & News on FLOW Based micro Analytical Techniques, (2019) Edition, [online], [citováno dne: 10.2.2021]
Dostupné z: www.flowinjectiontutorial.com
- [57] Růžička J., The second coming of flow-injection analysis, *Analytica Chimica Acta*, (1992), s. 3-10
- [58] Zhang R., Nakajima H., Soh N., *et al.*, Sequential injection chemiluminescence immunoassay for nonionic surfactants by using magnetic microbeads, *Analytica Chimica Acta* (2007), 600(1-2): s.105-113

[59] Chen Y., Růžička J., Accelerated micro-sequential injection in lab-on-valve format, applied to enzymatic assays, *Analyst* (2004), 7

[60] Šatínský D., Solich P., Chocholouš P., *et al.*, Monolithic columns – A new concept of separation in the sequential injection technique, *Analytica Chimica Acta* (2003), 499(1): s. 205-214

[61] Chen X.W., Wang J.H., The miniaturization of bioanalytical assays and sample pretreatments by exploiting meso-fluidic lab-on-valve configurations: a review, *Analytica Chimica Acta*, (2007), 602(2): s.173-180