

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

VÝVOJ METODY ON-LINE EXTRAKCE NA TUHÉ FÁZI

POMOCÍ PRŮTOKOVÝCH METOD

Diplomová práce



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

Hradec Králové

Bc. Jan Vinklárek

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

V Hradci Králové 1. 9. 2021

Bc. Jan Vinklárek

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych rád poděkoval svému školiteli doc. PharmDr. Petru Chocholoušovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, vstřícnost, trpělivost, cenné rady a připomínky k mé diplomové práci a také za jeho ochotu a výbornou spolupráci, díky čemuž jsem mohl mojí diplomovou práci sepsat.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Jan Vinklárek

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

Název diplomové práce: Vývoj metody on-line extrakce na tuhé fázi pomocí průtokových metod

Cílem předložené diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu využívající spojení extrakce na tuhé fázi a průtokových metod.

Extrahovaným analytem byl zvolen kreatinin a biologickým materiálem moč.

V prvním kroku se metoda nejprve optimalizovala (koncentrace a průtok promývacího činidla, průtok vzorku a standardu). Poté se testovala robustnost metody, a nakonec její správnost a opakovatelnost, dále se testovala i stabilita nařaděných vzorků.

Všechny tyto testy dopadly dobře a podařilo se metodu optimalizovat.

Finální parametry metody jsou následující:

- Sorbent – SPH Iontosorb 100
- Promývací činidlo – 50% acetonitril, nasáváno 0,5 ml
- Eluční činidlo – 1% vodný roztok hydroxidu amonného, nasáváno 0,5 ml
- Vzorek ředěný kyselinou octovou o pH 2,4, nasáváno 20 μ l, nebo 10 μ l podle koncentrace vzorku (rozhodnutí o změně nasávaného objemu metoda provede sama, v programu je rozhodovací algoritmus)
- Pro zjištění koncentrace vzorku je používaná metoda standardního přídatku. Používá se standard o koncentraci 2mg/l v nástricích 0, 10, 20 μ l. Vzorky se měří v dubletu
- Měří se absorbance při 235 a 270 nm, do výpočtů se používá rozdíl absorbance 235 – 270 nm.
- Délka jednotlivého měření: 130 s

Při použití optimalizovaných parametrů má metoda při opakovaném měření chybovost do 5 %. Stanovení kreatininu ve vzorcích moči pomocí vyvinuté metody vykázalo dobrou shodu s výsledky stanovení v klinické laboratoři. Díky postupným výsledkům experimentů bylo dosaženo stanoveného cíle práce a vyvinutá metoda je připravena pro další rozšíření.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical chemistry

Candidate: Bc. Jan Vinklárek

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

Title of the diploma thesis: Development of on-line solid phase extraction using flow methods

The goal of this diploma thesis was to create and validate method using combination of SPE extraction and flow methods (in this case method SIA).

Creatinine was chosen as extracted analyte and urine was chosen as biological material.

At first, the method was optimized (concentration and flow rate of wash reagent and flow rate of sample and standards). Then the limits of the created method were tested. Finally, the trueness and repeatability of results was tested and also stability of diluted samples.

All of these tests (in thesis named experiments) had good results. Final parameters of method are:

- Sorbent – SPH Iontosorb 100
- Wash reagent – 50% acetonitrile, aspirated 0,5 ml
- Elute reagent – 1% water solution of ammonia hydroxide, aspirated 0,5 ml
- Sample diluted by acetic acid with pH 2,4, aspirated 20 μ l, or 10 μ l according to sample concentration (method alone makes decision about changing aspirated volume, decision algorithm is in the program)
- Method of standard adding is used for measuring creatinine concentration in samples. Used standard have concentration 2mg/l, this standard is aspirated at volumes 0, 10, 20 μ l. Samples are measured in doublets.

- For detection, absorbance at 235 and 270 nm is measured, for calculations, difference of absorbance at 235 – 270 nm is used.
- Time of one measuring: 130 s

Method using optimized parameters have error rate around 5 %.

Results gained by measuring creatinine in urine samples with created method have good comparison with results gained by using method used at clinical laboratories. Goal of thesis was reached in thanks to follow-up experiments and created method is ready for next enhancing.

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	6
OBSAH	8
POUŽITÉ ZKRATKY.....	10
1. ÚVOD	11
2. CÍL PRÁCE.....	13
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	14
3.1. SPE (Solid Phase Extraction)	14
3.1.1. Princip SPE	14
3.1.2. Tuhé fáze – Sorbent.....	14
3.1.3. Praktický postup SPE	17
3.2. Průtokové metody SIA a FIA.....	21
3.3. Kreatinin	23
3.3.1. Klinický význam kreatininu	23
3.3.2. Stanovení kreatininu v klinické laboratoři.....	24
3.3.3. Význam, provedení a alternativy clearance kreatininu.....	25
3.4. Moč.....	26
3.5. Charakteristika statistických metod	26
3.5.1. Diferenciální analýza dle Bland – Altmana	26
3.5.2. Regresní analýza dle Passing – Babloka	26
4. PRAKTICKÁ ČÁST.....	30
4.1. Laboratorní vybavení.....	30
4.1.1. Použité přístroje	30
4.1.2. Chemikálie	32
4.1.3. Vzorky:.....	33
4.1.4. Technické zázemí.....	33
4.2. Metoda stanovení kreatininu v moči pomocí SIA finální optimalizovaná metoda	33
4.3. Vývoj metody.....	35
5. VÝSLEDKY	37
5.1. Test funkčnosti sorbentu pro extrakci kreatininu	37
5.2. Test rychlosti průtoku vzorku a eluentu.....	39
5.3. Test vhodného nástřiku vzorku	43
5.4. Zjištění vhodné koncentrace a průtoku acetonitrilu	45
5.5. Test nového postupu analýzy	47
5.6. Test provedení metody standardního přídatku.....	49

5.7. Výběr vhodného ředění moči.....	51
5.8. Test změny pořadí zón na koloně	53
5.9. Test nového způsobu provedení metody standardního přídávku	55
5.10. Kalibrační rozsah a opakovatelnost nástřiku	59
5.11. Opakovatelnost v sérii.....	61
5.12. Mezdenní opakovatelnost měření	62
6. DISKUZE.....	73
7. ZÁVĚR	74
8. POUŽITÁ LITERATURA	75

POUŽITÉ ZKRATKY

FIA – průtoková injekční analýza

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie, High Performance Liquid Chromatography

MDRD – jedna z rovnic pro výpočet clearance kreatininu

MIPs – molekulárně vtištěné polymery

SIA – sekvenční injekční analýza

SPE – extrakce na tuhé fázi

1. ÚVOD

V současné době se široké spektrum analytů stanovuje fotometrickými metodami založenými na tvorbě produktu, který absorbuje v určitém světelném spektru. Tyto metody se rutinně provádějí v kyvetách automatických analyzátorů.

Průtokové metody používají místo kyvet systém hadiček, ve kterých probíhá stejná reakce, jejímž výsledkem je barevný produkt. Na rozdíl od reakcí v kyvetách, kde reakce probíhá na místě, tak u průtokových metod reakce probíhá kontinuálně při průtoku reakční směsi hadičkou. Toto řešení má svá specifika v tom, že při reakci v kyvetách je roztok zabarven stejně v celém objemu (homogenně), ale u průtokových metod reakce probíhá dynamicky. Takto je tomu v případě provedení metodou FIA (využívá konstantní nosný proud). U metody SIA se zóny reakční směsi nasají do mísící cívky a reakce probíhá zde. Některé vzorky je potřeba před analýzou upravit. Jednou z možností úprav je extrakce často využívající různé chování analytů v různých prostředích (polární, nepolární). Jednou z nich je SPE (extrakce na tuhé fázi). Využívá tuhý sorbent o různém složení a vlastnostech interagující s extrahovanými látkami. Vlastní provedení spočívá v protlačování různých roztoků SPE kolonkou. Toto je možné provést manuálně (ruční protlačení roztoků přes kolonku) nebo automatizovaně např. za použití metody SIA.

Toto automatizované provedení spočívá v nasátí požadovaných roztoků do mísící cívky a jejich následné protlačení přes SPE kolonu (ta je upravená pro integraci do SIA systému).

Cílem práce bylo stanovení kreatininu v moči využívající SPE jako jeden ze selektivních kroků analýzy.

Kreatinin je odpadní produkt metabolismu kreatinu ve svalech. Jeho tvorba je téměř stálá a měření hodnot kreatininu v moči se používá pro stanovení funkce ledvin. Počítá se clearance kreatininu. Clearance vyjadřuje objem plazmy očištěný od zvolené látky (v tomto případě kreatininu) za jednotku času (standardně se používá 24 h). Ke správnému výpočtu je zapotřebí sbírat moč po dobu 24 hodin. Nevýhodou je nespolehlivost pacientů při sběru moči, proto se v dnešní době používají pro výpočet clearance i jiné rovnice, kterým stačí pouze hodnoty určitých látek z jednorázového odběru krevního séra.

Moč byla zvolena z důvodu snadné dostupnosti a neinvazivnosti při odběru. Moč se vyšetřuje relativně často a vyšetření je poměrně rychlé. V klinické praxi se nejčastěji stanovuje kreatinin metodou dle Jaffé nebo enzymatické stanovení s využitím kreatininásou.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu extrakce kreatininu z moči vhodným sorbentem.

Za tímto účelem byl vybrán sorbent se siným katexem (Iontosorb SPH 100, detaily v experimentální části), který fungoval a poskytoval nejlepší výtěžnost. Pro tento sorbent byly následně optimalizovány podmínky (rychlost průtoku jednotlivých kapalin, koncentrace promývacího činidla, vhodné ředění a nasávaný objem vzorku, úprava metody standardního přídávku a nová sekvence průtoku kapalin) s cílem, aby bylo dosaženo správného výsledku stanovení koncentrace kreatininu v moči.

Po optimalizaci metody byla testována opakovatelnost výsledků v sérii a čase. Následně bylo provedeno i porovnání námi naměřených hodnot s hodnotami z klinické laboratoře a jejich statistické vyhodnocení.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. SPE (Solid Phase Extraction)

Extrakce na tuhé fázi je druhem extrakční metody, která využívá adsorbce analytu na sorbent. Používá se na extrakci analytu ze vzorku a k odstranění matrice. Matrice může mít nežádoucí efekty na následnou analýzu či jí úplně znemožnit. Z tohoto důvodu je matici potřeba odstranit. Další použití SPE je při potřebě analyt zakoncentrovat. V některých vzorcích je analyt přítomen ve stopových množstvích a v této koncentraci není možné provést analýzu vzorku s dostatečnou výpovědní hodnotou (signál analytu může být ukrytý v šumu). Další důvod použití SPE je změna rozpouštědla. Některá rozpouštědla jsou nekompatibilní s některými analytickými technikami a je potřeba analyt převést do rozpouštědla kompatibilního s danou analytickou technikou [1].

Tuto techniku lze označovat různými termíny. Nejčastější je použití zkratky SPE (v doslovném překladu extrakce na tuhé fázi), mezi další používané názvy patří extrakce kapalina – tuhá látka, nebo kolonová extrakce [1].

3.1.1. Princip SPE

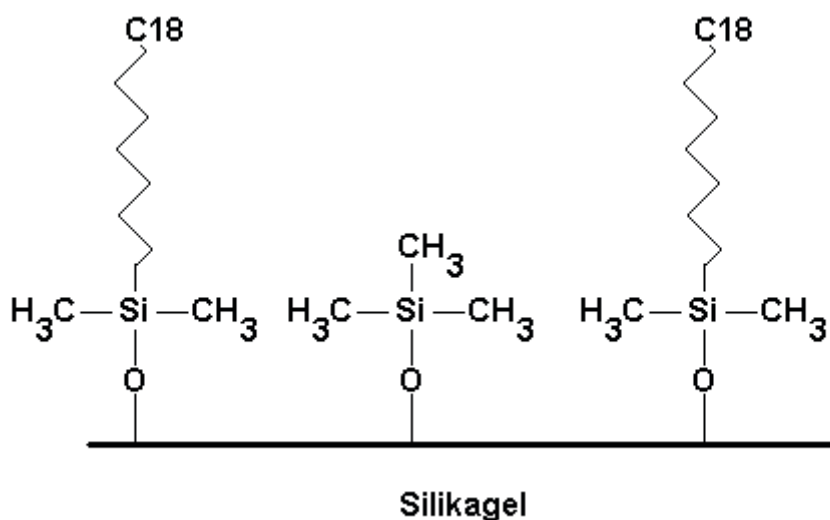
Při SPE se přivádí vzorek (může být kapalný nebo plynný) na sorbent v tuhé formě, kde dochází k interakci složek vzorku se sorbentem. Na základě těchto interakcí je při vhodných podmínkách analyt zadržen a zbytek vzorku odchází pryč (existuje ale i opačný postup, kdy se zadržuje matrice a analyt prochází přímo) [1].

3.1.2. Tuhé fáze – Sorbent

Jako tuhá fáze se mohou používat různé sloučeniny podle typu (vlastností) extrahovaného analytu. Tyto fáze si jsou podobné se stacionárními fázemi v kapalinové chromatografii (v další části textu uváděna jako HPLC). Liší se však velikostí částic a často i tvarem.

Jedním z nejčastěji používaných materiálů je silikagel. Ten se ovšem velmi liší velikostí částic. U SPE se jedná o rozměry 30 – 60 μm v průměru, ale u kapalinové chromatografie se běžně jedná o velikosti 1,5 – 5 μm .

Základem silikagelu jsou polymerně vázané skupiny SiO_2 , na které se vážou různé další skupiny podle potřeby při extrakci. V průběhu těchto reakcí ale zůstávají některé tyto silanolové skupiny volné a mohou způsobovat nežádoucí reakce (jiná vazebná síla, vazba nežádoucích látek, nemožnost vazby jako takové a jiné). Z tohoto důvodu je potřeba tyto volné silanoly blokovat. Této blokaci se říká endcapping a provádí se nejčastěji reakcí s trialkylchlorosilanem. Po této reakci je ještě stále přítomno kolem 30 % nezablokovaných skupin [1]. Takto se postupuje hlavně u sorbentů pro HPLC.



Obrázek 1 – Příklad provedení endcappingu na silikagelovém sorbentu (modifikace s označením C18)

Podle dalších látek, které se na silanolový základ navážou se rozlišuje několik typů sorbentu:

Nepolární sorbent

Polární sorbent

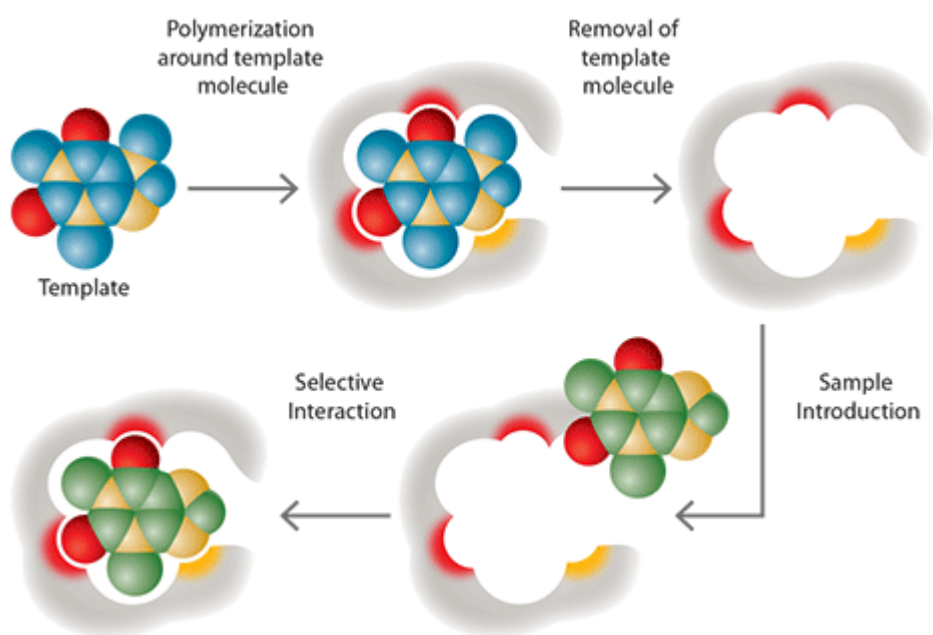
Iontově výměnný sorbent

Podobně jako je tomu u HPLC tak i u SPE existují dvě možnosti provedení.

Při použití reverzních fází se analyt navazuje na nepolární sorbent z polární mobilní fáze. Kdežto při normálních fázích se na polární sorbent navazují látky z nepolárního rozpouštědla.

Mezi další možné sorbenty patří aktivní uhlí, křemičitan hořečnatý, oxid hlinitý, celulóza (tvarem částic a formou vázání modifikujících látek ovlivňující finální vlastnosti se podobá silikagelu, jen má jiný základ) nebo makrozesítené polymery a iontově-výměnné pryskyřice, MIPs a jiné.

Molekulárně vtištěné polymery jsou speciálním druhem vysoce selektivního sorbentu. Jsou určeny pro extrakci pouze jedné látky, nebo skupiny látek s velmi podobnou strukturou. Jejich selektivita spočívá v speciálně vytvořených dutinkách, do kterých zapadnou pouze předem zvolené analyty. Jsou poměrně chemicky stabilní, ale jsou také náročné na výrobu. Kvůli faktu vysoké selektivity se musí pro každý stanovovaný analyt vyrobit nová verze MIP, která je schopna tento analyt vázat [2, 3].



Obrázek 2 – Schéma výroby a funkce MIPs princip popsán nad obrázkem

3.1.3. Praktický postup SPE

3.1.3.1. Kolonky

Původní forma SPE bylo smíchání sorbentu se vzorkem v nádobce a následné oddělení obou fází filtrací nebo centrifugací v dnešní době se používá způsob protlačení těchto roztoků přes sorbent v plastové kolonce, které mohou mít různé tvary i velikosti, nejčastější tvar připomíná injekční stříkačku bez pístu. Kolonky se vyrábějí nejčastěji jednorázové, u kterých může být problém reprodukovatelností podmínek, nebo ve formě vyměnitelných náplní [1].

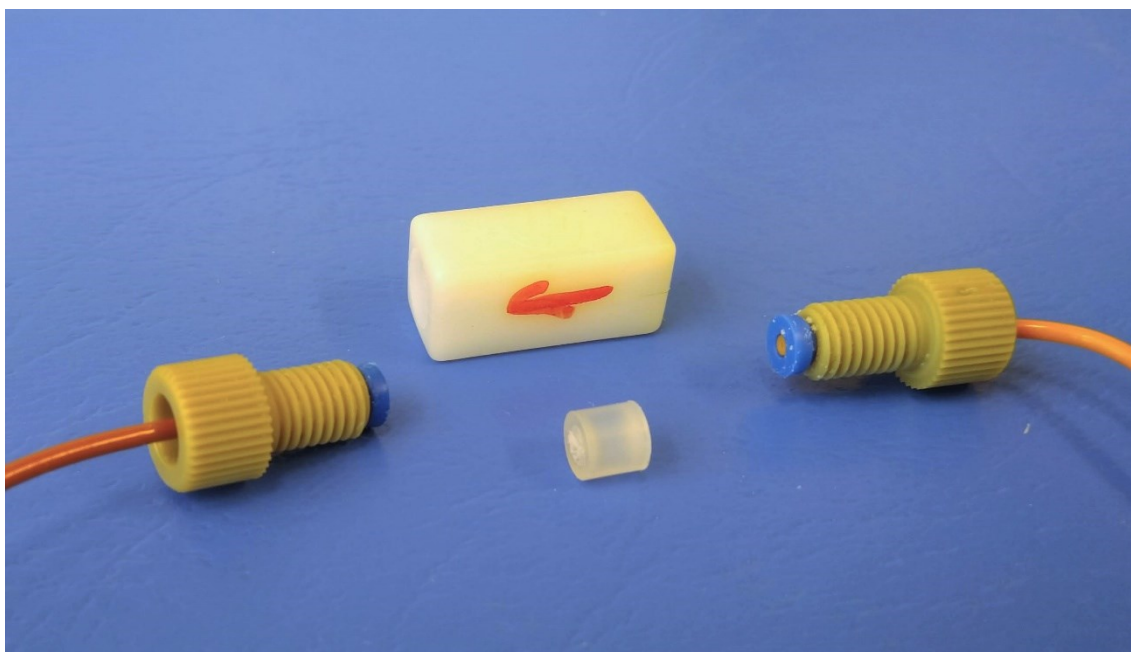
Sorbent se může do kolonek dopravit manuálně v suchém stavu nebo ve formě suspenze. Buď se do kolonky vlije nebo se může dávkovat injekční stříkačkou. Sorbent je v kolonce držen fritami, nejčastěji dvěma, ale kvůli snížení odporu vůči průtoku to může být i jen jedna na výstupu z kolony [1].



Obrázek 3 – Různé velikosti kolon se SPE sorbentem (jednorázová varianta používaná v offline systémech)

Pro potřeby zapojení do průtokových systémů se vyrábějí kolony menších velikostí (objemů). Tyto kolony jsou pomocí spojek nebo šroubů zapojeny do průtokového systému, tak aby nedocházelo k úniku kapalin při promývání kolonou za vyššího tlaku [1].

Další možností je vytvoření SPE kolony přímo v analytickém systému. U této varianty dochází k nasátí samotného sorbentu do průtokového systému a jeho následném zadržení v předem určené části, pak se postupuje stejně jako u klasického provedení v průtokovém systému. Na závěr je tento sorbent odstraněn z průtokového systému. Nevýhodou tohoto provedení je skutečnost, že takto vytvořená kolona se pro každé měření vytváří znovu a může mít trochu jiné vlastnosti [1].



Obrázek 4 – Kolona uzpůsobená pro zapojení do průtokového systému a online SPE

Poznámka: obrázek je přímo kolona použitá pro měření v této diplomové práci (druhá velikost více v experimentální části)

3.1.3.2. Popis obecného postupu praktického provedení SPE

Každá extrakce na tuhé fázi probíhá v několika krocích, které by měly být dodrženy zejména u kolonek se silikagelovým sorbentem.

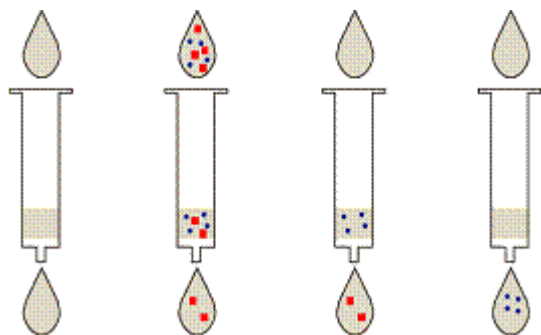
Prvním krokem je aktivace sorbentu. V tomto kroku se dosud suchá kolona promyje vhodným činidlem. Funkční skupiny na povrchu částic sorbentu jsou zkroucené a v tomto stavu nemohou plnit svoji funkci. Když se tyto molekuly dostanou do kontaktu s vhodnou smáčecí kapalinou, tak se napřímí do prostoru, zvětší se jejich vazebná plocha a již mohou plnit svou funkci. Dále je důležité po tomto kroku udržet takto aktivovaný sorbent stále vlhký. Přeskočení tohoto kroku vede k neúspěchu při extrakci a malým extrakčním výtěžkům. Obecně používaným aktivačním činidlem u nepolárních sorbentů je směs voda a methanol. U polárních sorbentů se doporučuje použít organickou látku, ve které je analyt dobře rozpustný.

Dalším krokem je kondicionace. V tomto kroku se již aktivovaný sorbent promyje činidlem podobným vzorku. Při nepolárním sorbentu může být tímto činidlem voda, nebo pufovací roztok se stejným pH jako vzorek. Opomenutí tohoto kroku má za následek nižší extrakční účinnost. Při opomenutí se někdy stává, že první část vzorku působí sama jako kondicionační činidlo a analyt není zadržován, až později po kondicionaci je analyt zadržován s vyšší účinností.

Dalším krokem je nanášení vzorku. V tomto kroku se extrahovaný vzorek nanáší na aktivovanou a kondiciovanou kolonu a dochází k adsorbci analytu na sorbent. Síla vazby analytu se sorbentem se dá ovlivnit změnou např. pH vzorku, typem sorbentu a typem mobilní fáze.

Dalším krokem je promývání kolonky. V tomto kroku se se kolonkou protlačuje vhodné promývací činidlo, které vyplavuje zbytky matrice, ale nezpůsobí vyplavování analytu.

Posledním krokem je eluce analytu. V tomto kroku se navázaný analyt desorbuje ze sorbentu a opouští kolonu, která se z pravidla vyhazuje jako jednorázová. Takto se s kolonou zachází při manuálním provedení. V případě zapojení do průtokového systému se kolona používá opakovaně a pokud je třeba tak se mezi extrakcemi kolona reaktivuje – tak aby měla stejnou účinnost [4].



Obrázek 5 – Princip SPE extrakce zleva aktivace/kondicionace, poté dávkování primárního roztoku, 3. schéma odstranění matrice, 4. schéma eluce analytu

V základním provedení se nechají kapaliny kolonkou protéci za atmosférického tlaku. Tento postup ale trvá dlouho. Proto se dnes nejčastěji používá varianta s podtlakovým odsáváním, kdy tekutiny protečou kolonkou rychleji.

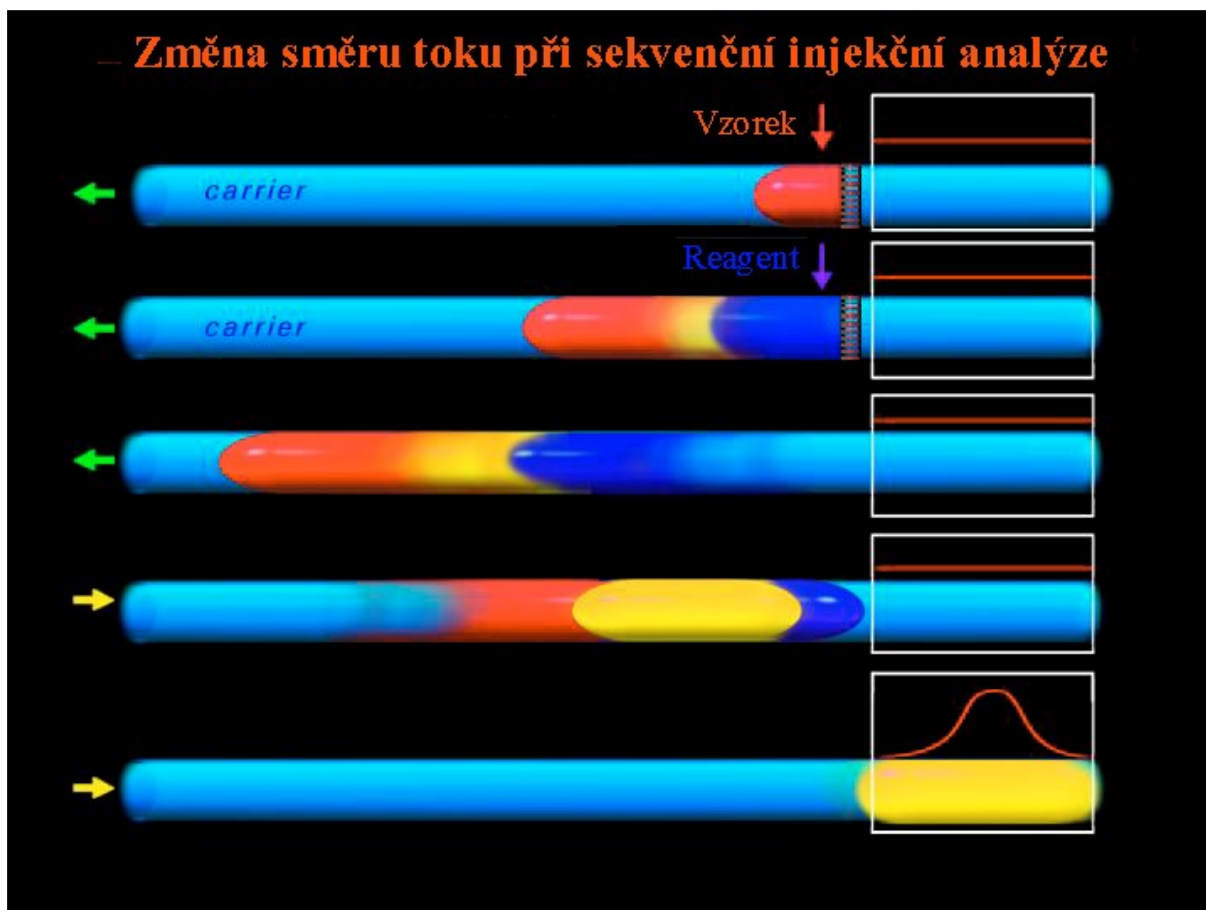


Obrázek 6 – Manuální provedení SPE extrakce s urychlením průtoku kapalin pod tlakem standardní provedení SPE mimo analytický systém

Zapojením kolony do průtokového systému je možné tento postup automatizovat. Při automatizaci je možné řídit průtoky kapalin kolonou počítačem a není potřeba ruční výměna kapalin, dále se přesně řídí průtoková rychlost kapalin (aby nedošlo vysokým tlakem ke zničení kolony). Další výhodou automatizace je přítomnost kolony v analytickém systému a odpadá potřeba přesunu extraktu do analytického systému (výhoda nižší ztráty analytu a možnost rychlejší analýzy, ovšem je potřeba si ověřit kompatibilitu elučního činidla s analytickým systémem) [5, 6, 7, 8].

3.2. Průtokové metody SIA a FIA

Existují dva typy provedení průtokových systémů, systém FIA, který využívá konstantního proudu nosné kapaliny, do které se přimíchávají další roztoky, nevýhodou tohoto způsobu provedení je skutečnost, že reakce probíhá postupně a před příchodem do detektoru nemusí být kompletně hotová, tento nedostatek je možné odstranit prodloužením hadiček ve kterých reakce probíhá, ale za cenu zvýšení mrtvého objemu (objem různých spojů, který se neúčastní reakcí, ale o tento objem je zvýšená spotřeba všech kapalin) [9, 10, 11, 12], a systém SIA, který na rozdíl od systému FIA používá obousměrnou pumpu a před příchodem reakční směsi do detektoru je zajištěno, že již reakce proběhla až do konce, k tomuto účelu se používá mísící cívka, do které jsou jednotlivé části reakční směsi nataženy a pak se nechá tato směs reagovat, následně je směs obsahující produkt natažena do detektoru a vyhodnocen získaný signál, z důvodu přítomnosti reakčního místa v průtokovém systému je metoda SIA úspornější (vyžaduje méně roztoků) než metoda FIA. SIA má dále výhodu flexibility, neboť změny parametrů lze dosáhnout za použití programování, bez nutnosti změny vlastního zapojení systému. Mezi nejčastěji optimalizované parametry patří objem kapaliny (vzorku, činidla), průtoková rychlost této kapaliny a v některých případech i jejich pořadí (u určitých analýz se nasává nejprve vzorek a až poté činidlo a u jiných naopak) [9, 10, 13, 14].



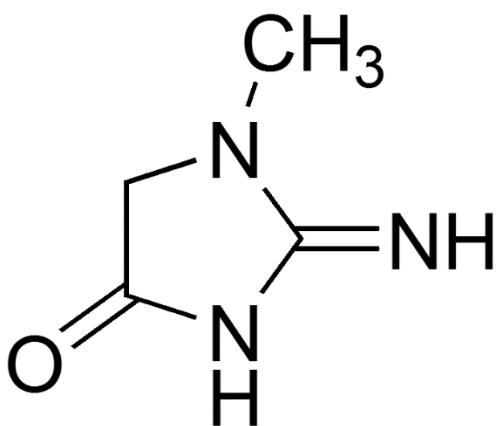
Obrázek 7 – Princip průtokové metody SIA



Obrázek 8 – Příklad průtokového systému SIA

3.3. Kreatinin

Vzniká ve svalech ireverzibilně neenzymatickým procesem (dehydratace a cyklizace) z kreatinu. Kreatin slouží ve svalech jako zásobárna energie ve formě kreatinfosfátu. Kreatinin již dále není schopen vázat další fosfát a přechází do krve. V krvi je jako pro tělo ve vodě rozpustná odpadní látka vylučován do moče především glomerulární filtrací. Z tohoto důvodu se kreatinin využívá při určování funkce ledvin. V organismu během svalového klidu vzniká relativně stálou rychlostí [15].



Obrázek 9 – Vzorec kreatininu

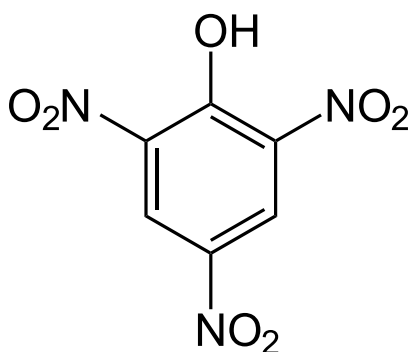
3.3.1. Klinický význam kreatininu

Zvýšené hodnoty v plazmě mohou ukazovat na poškození a nefunkčnost ledvin, ale také na zvýšenou fyzickou námahu, kdy dochází k vyšší tvorbě kreatininu. Další důvod zvýšené koncentrace v plazmě je příjem kreatinu a posléze vytvořeného kreatininu z masité potravy [15, 16].

3.3.2. Stanovení kreatininu v klinické laboratoři

Kreatinin se stanovuje v krevní plazmě a v moči. V krevní plazmě se stanovuje koncentrace kreatininu přímo aktuální hodnota, kdežto v moči se stanovuje hodnota kreatininu za 24 h. Z tohoto důvodu je potřeba moč sbírat.

Stanovení kreatinu se nejčastěji provádí Jaffého metodou. Principem stanovení je reakce kreatininu s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí. Výsledkem reakce je červené zbarvení, které je možno hodnotit spektrofotometricky. Jaffého reakce ale není specifická pouze pro kreatinin. Reagují i jiné látky např. pyruvát, acetát, oxalacetát, glukóza, kyselina askorbová, aceton. Souhrnně se tyto látky označují jako tzv. Jaffého pozitivní chromogeny. Z důvodu nespecifičnosti této reakce jsou skutečné hodnoty kreatininu nižší asi o 9 – 18 $\mu\text{mol/l}$ [15,16].



Obrázek 10 – Vzorec kyseliny pikrové

Jaffého metoda ale není jediným způsobem, jak stanovit koncentraci kreatininu. Mezi další metody patří enzymatické stanovení založené na reakci Fossatiho, Prencipeho a Bertiho. Reakce je vícefázová. V první fázi je kreatinin přeměněn na kreatin za účasti enzymu kreatininázy. Vznikající kreatin je hydrolyzován enzymem kreatináza na sarkosin a močovinu. Vzniklý sarkosin je rozkládán enzymem sarkosinoxidáza na glycin, formaldehyd a peroxid vodíku. Vznikající peroxid vodíku reaguje s chromogenem za vzniku modrého zbarvení, které se hodnotí spektrofotometricky. Tato reakce již je specifická pouze pro kreatinin. Díky tomu jsou hodnoty kreatinu změřené touto metodou přesnější než hodnoty získané Jaffého reakcí. Tato reakce se používá pro stanovení

kreatininu jak v séru, tak i v moči a byla použita jako referenční metoda pro výsledky v této diplomové práci [17].

3.3.3. Význam, provedení a alternativy clearance kreatininu

Při hodnocení funkce ledvin nestačí jen hodnota kreatininu v plazmě. Pro posouzení funkce ledvin se počítá renální clearance kreatininu. Renální clearance dané látky udává objem plazmy, který je za určitý časový úsek (zpravidla 24 h) zcela zbaven dané látky. Clearance může být jak glomerulární, tak i tubulární (určité látky jsou odstraňovány z plazmy glomeruly, jiné pak tubuly a existují i látky, které jsou odstraňovány obojím způsobem).

V případě kreatininu se jedná o clearance glomerulární. K vypočtení clearance je zapotřebí sbírat moč 24 h. Z této sebrané moči se poté stanoví hodnota kreatininu, pro používaný vzorec je ještě zapotřebí hodnota sérového kreatininu a množství sebrané moči.

Kreatinin ale nesplňuje přesně podmínky pro vypočtení přesné glomerulární clearance. Tyto podmínky dokonale splňuje inulin, u kterého je ale problém. Tato látka se totiž v organismu přirozeně nevyskytuje a pro účely určení clearance se musí uměle dodávat.

Se samotným sběrem moči je také problém. Nikoliv v jejím laboratorním zpracování, ale při jeho získávání. Na pacienty totiž není vždy spolehnutí, že opravdu všechnu moč sebrali.

Z tohoto důvodu se dnes raději než výpočet skutečné clearance, raději počítá její odhad, kterému stačí pouze hodnota sérového kreatininu. Způsobů výpočtu odhadu clearance je několik. Historicky starší metodou je odhad podle Cockrofta a Gaulta. Tento vzorec ale v dnešní době přestává používat. Jeho náhrada (rovnice MDRD) je spolehlivější, ale pro výpočet potřebuje více hodnot (kromě kreatininu i ureu a hodnotu albuminu) všechny jsou naštěstí pouze ze séra. Tato rovnice vychází z rozsáhlé multicentrické studie, která se zabývala vlivem diety na ledvinná onemocnění (Modification of Diet in Renal Disease – MDRD) [16, 18, 19].

3.4. Moč

Jedná se o většinou čirou tekutinu obvykle žluté barvy (při dehydrataci až do hněda), produkovanou ledvinami jako kapalný odpad metabolismu. Moč je ve své podstatě zahuštěný ultrafiltrát plazmy. Fyziologicky je moč sterilní. Její složení je z velké části voda. Mezi další významné látky, patří již zmíněný kreatinin, dále močovina, malé bílkoviny (do moče pronikají bílkoviny menší než albumin). Dále se organismus pomocí moči zbavuje různých pro tělo nepotřebných a někdy až škodlivých ve vodě rozpustných látek [15].

3.5. Charakteristika statistických metod

Zde je přiblížení a princip statistických metod použitých v závěru experimentální části k porovnání vyvinuté metody s metodou používanou v klinických laboratořích

3.5.1. Diferenciální analýza dle Bland – Altmana

Analýza dle Blanda – Altmana se používá k určení shody mezi dvěma kvantitativními měřeními téhož vzorku různými metodami za pomoci určení průměrného rozdílu a určování limitů shody mezi sledovanými měřeními.

Tímto způsobem je možné určit, zda je rozdíl mezi výsledky dvou metod výrazný či nikoliv. Při tvorbě výsledků se určí bias mezi průměry rozdílů a stanovení intervalu shody, pod kterou spadá 95 % rozdílů druhé metody ve srovnání první metody. Zmíněná analýza určí pouze interval shody. Získaným výsledkem je grafické vykreslení rozptylu, kde je na ose Y rozdíl mezi dvěma porovnávanými měřeními a na ose X je průměr těchto hodnot. Jinak řečeno, rozdíl dvou porovnávaných měření je vyneseno v grafu proti průměru těchto měření. B&A doporučují, aby 95% hodnot leželo v rozmezí +/- dvě směrodatné odchylky od průměrného rozdílu [20].

3.5.2. Regresní analýza dle Passing – Babloka

Regresní analýza dle Passing-Babloka se používá ke zjištění závislosti dvojice metod. Dává představu o shodě mezi metodami a umožňuje odhalit případný bias. Tato analýza je robustní, neparametrová metoda, necitlivá k odlehlým

(outlier) hodnotám. Díky intervalu spolehlivosti lze určit, zda hodnoty procházejí nulou nebo hodnotou jedna, což ukazuje na shodu metod nebo nutnost případné korekce.

Pokud interval spolehlivosti (CI, confidential interval) první metody neobsahuje 0, je zde přítomen systematický rozdíl mezi metodami. Pokud CI druhé metody neobsahuje 1, je zde proporciónální rozdíl mezi metodami [21, 22].

3.6. Rešerše speciálních metod stanovení kreatininu

Kreatinin lze stanovit různými způsoby, základem jsou fotometrické metody, které využívají tvorbu produktu absorbujícího ve viditelné oblasti spektra. Jsou dvě základní, starší Jaffého metoda (není úplně specifická) a enzymatické stanovení založené na reakci Fossatiho, Prencipeho a Bertioho, princip obou metod je popsán výše.

V jednom experimentu pro stanovení kreatininu za použití Jaffého metody byl vyvinut speciální párový vyzařovací diodový detektor (PEDD). Tento detektor byl vytvořen v kompaktní formě jako průtoková celda (30 μ l celkový objem a 7 mm optická cesta, část kudy prochází optický paprsek). Takto vytvořený detektor poté zastupoval fotometrický detektor v průtokovém systému multikomunotované průtokové analýzy (MCFA). Tento systém byl tvořený z několika mikroprocesorem ovládaných mikrosolenoidových čerpadlech a ventilech. Tento systém umožňoval měřit až 40 vzorků za hodinu. Měření se provádělo pro několik koncentrací kreatininu za přítomnosti kyseliny pikrové a NaOH. Pro měření reálných vzorků moči musely být tyto vzorky 100x naředěny a detektor vykázal dobrou lineární odezvu, při měření vzorků séra byl problém s vyšší viskozitou. Ze získaných výsledků experimentu se detektor osvědčil a může být použit pro testy reálných vzorků moči u séra se ještě musí vyřešit vhodné ředění kvůli vyšší viskozitě. Referenční metoda byla stanovení vzorků Jaffého metodou na klasických kvetových analyzátoch [23].

V dalším experimentu se zkoušelo současné stanovení kreatininu a močoviny ve vzorcích moči kombinací FIA systému s bezkontaktním vodivostním detektor C4D pro močovinu a PEDD detektor pro kreatinin. Zvolené ředění vzorku bylo

100x. Vzorek moči je přímo vstříkovan do proudu pufru glycin-NaOH o pH 8,8. Dále je vzorek unášen ureázovou minikolonu pro on-line enzymatickou hydrolyzu močoviny. Vznikající amoniak přechází z nosného proudu přes porézní polytetrafluorethylenovou (PTFE) membránu do proudu destilované vody, tento přechod vede ke zvýšení signálu na C4D v důsledku amonných iontů rozpouštěných ve vodě. Pro stanovení kreatininu je použita Jaffova reakce, změna barvy je detekována pomocí PEDD vybaveného dvěma zelenými LED diodami, Lineární rozsah močoviny je 30-240 mg/l a kreatininu je 10-500 mg/l. Navržený systém poskytuje dobrou přesnost (RSD <3%). Rychlost měření vzorku je 31 vzorků/h pro dva analyty. Postup byl úspěšně aplikován a validován pomocí vybraných referenčních metod [24].

V dalším experimentu se zkoumal a optimalizoval neenzymatické fluorometrické stanovení kreatininu. Metodu původně popsal Blass v 90. letech, ale autoři článku zjistili, že kromě činidel uvedených v postupu práce je zapotřebí přidat peroxid vodík k získání fluorescenční sloučeniny. Excitační maximum fluoroforu je 405 nm, emisní je 475 nm. Optimální podmínky pro kvantifikaci kreatininu jsou následující: 3,5–dinitrobenzoová kyselina o koncentraci 25 mmol/l rozpuštěná v 1,4-butandiolu s roztokem peroxidu vodíku o koncentraci 58 mmol/ a vodný roztok NaOH o koncentraci 2 mol/l smíchané v poměru 1: 1. Bylo zjištěno, že metoda je selektivní vůči analytu v přítomnosti sloučenin, jako je močovina, kyselina močová, bilirubin, albumin a glukóza. Metoda má dobrou schodu mezi získanými výsledky a referenční enzymatickou metodou [25].

Stanovení koncentrace reakcemi ale není jediný způsob stanovení. Mezi další způsoby se řadí použití separačních metod, konkrétně nejčastěji používanou technikou je metoda HPLC.

V dalším experimentu se testovalo stanovení poměru retinolu kreatininu. Stanovení retinolu v moči je v současné době obtížné dosáhnou Retinol je nový slibný časný biomarker poškození ledvin. Typicky se klinickém prostředí vyjadřuje v jako poměr retinol/kreatinin. Autoři článku vyvinuli jsme a ověřili novou

metodu využívající spojení HPLC s UV a MS detekcí pro separaci a kvantifikaci retinolu a kreatininu ve vzorku moči. Separace těchto dvou látek se zcela odlišnými fyzikálně – chemickými vlastnostmi bylo dosaženo použitím kolony naplněné fluorovanou stacionární fází. Jako mobilní fáze byl použit pufrovaný acetonitril a vodný roztok mravenčanu amonného. Separace byla dokončena během 4 minut. Vyvinutá nová metoda zahrnuje velmi rychlou a jednoduchou přípravu vzorku, která vyžaduje malé množství vzorků a rozpouštědel. Pro přesnější kvantifikaci byl použit interní standard označený deuteriem. Metoda byla testována na skutečných vzorcích moči získaných od pacientů trpících rakovinou prsu, hlavy, krku a kolorektálním karcinomem [26].

V dalším experimentu se vyvíjela a testovala nízkonákladová a jednorázová mikrocella pro neenzymatické elektrochemické stanovení kreatininu. Pracovní elektroda byla upravena sazemi a udržovala kontakt s trojmocnými ionty železa adsorbovanými na papír. Pro analýzu stačil malý objem vzorku (konkrétně 3 μL). V přítomnosti kreatininu byly ionty železa vytvářely komplex. Poté byly nekomplexové železné ionty elektrochemickou redukcí odstraněny. Při hodnocení výsledků měření byly použity metody cyklické voltametrie a diferenciálního pulsu. Významné zvýšení analytického signálu způsobila modifikace pracovní elektrody pomocí sazí. Senzor vykazoval lineární odezvu na rozmezí koncentrací kreatininu od 0,10 do 6,5 mmol/l, s mezí detekce kreatininu 0,043 mmol/l. Experimenty pro stanovení kreatininu ve skutečných vzorcích bylo úspěšně provedeno prostřednictvím standardního stanovení v moči [27].

4. PRAKTICKÁ ČÁST

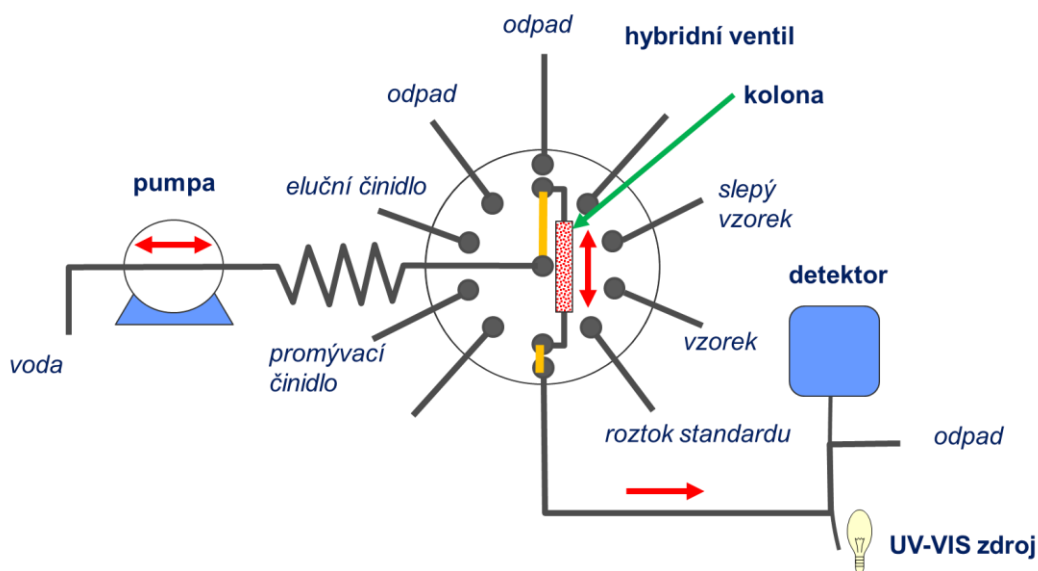
Praktická část diplomové práce se věnuje vývoji, optimalizaci a validaci spojení SPE s průtokovými metodami.

4.1. Laboratorní vybavení

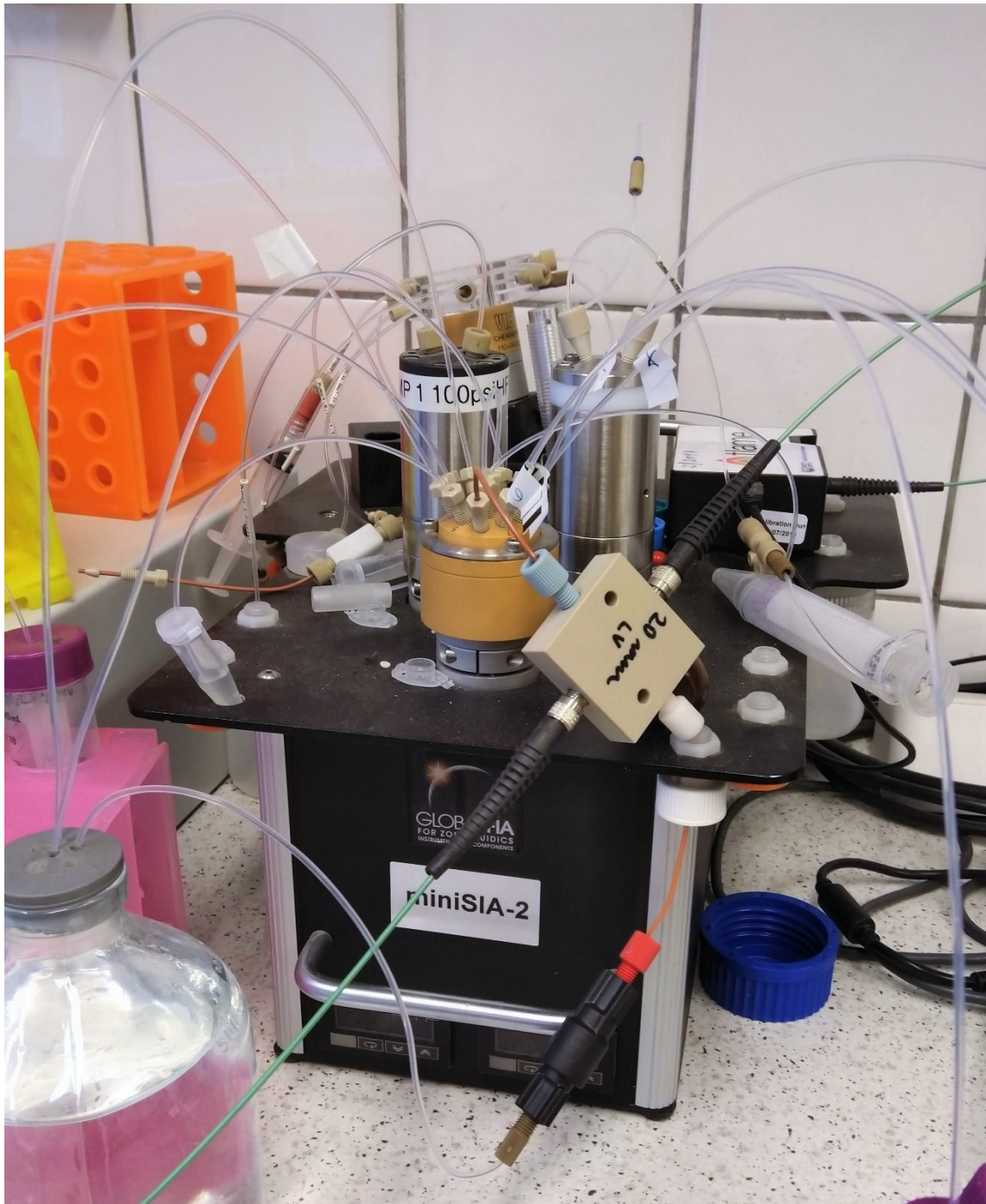
4.1.1. Použité přístroje

Přístroj miniSIA-2 (GlobalFIA, USA) – kontinuální pumpa MilliGAT HiFlow s mísící cívkou o objemu 1,5 ml, hybridní selekční ventil pro použití v SIA a FIA módu (VICI, USA), průtoková Z cela detektoru, optická cela detektoru délka 20 mm (FIALab, USA), spektrofotometrický detektor USB4000 (Ocean Optics, USA), zdroj záření 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 Iontosorb SHP 100 o rozměrech 3 x 2,5 mm, uzpůsobená pro zapojení do průtokového systému (IDEX, USA).



Obrázek 11 – Schéma přístroje používaného při analýze



Obrázek 12 – Systém SIA používaný v této diplomové práci

4.1.2. Chemikálie

Superčistá voda Millipore

Acetonitril – ředěný ze zásobní lahve, přesná koncentrace byla zvolena při vývoji metody

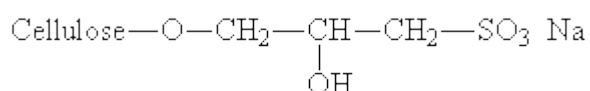
Koncentrovaný hydroxid amonný – pro analýzu naředěn vodou na koncentraci 1 %

Ledová kyselina octová – používána na ředění vzorků a standardů jako roztok o pH 2,4

Kreatinin standard – připraven jako zásobní roztok o koncentraci 2 mg/ml, z tohoto roztoku byly dále připravovány standardy dle potřeby, při přípravě standardů byly ředěny roztokem kyseliny octové o pH 2,4

4.1.2.1. Použitý sorbent

SPH Iontosorb 100 (IONTOSORB, ČR)



Obrázek 13 – Chemický vzorec použitého sorbentu

Parametry sorbentu:

- Typ: silně kyselý kationtově výměný sorbent na bázi částic celulózy se 3-sulfo-2-hydroxypropylskupinami
- Velikost částic: 50 – 80 μm
- Porozita 100 A

4.1.3. Vzorky:

Pro potřeby ověření fungování metody na reálných vzorcích byly získány vzorky reálné moči.

Tyto vzorky byly získány sběrem moči ve dnech:

9. 3. 2021, 10. 3. 2021, 11. 3. 2021, 29. 3. 2021 a dva starší ze dne 10. 6. 2020 a 11. 6. 2020.

Tyto odebrané vzorky byly skladovány v lednici v primárních odběrových zkumavkách.

Pro následnou analýzu byly ředěny vodným roztokem kyseliny octové o pH 2,4. Vhodné ředění bylo určeno až v průběhu vývoje metody.

4.1.4. Technické zázemí

Software pro vyhodnocování dat: Flow SIA, šablony v MS Excel používané při hodnocení výsledků měření (statistické funkce, porovnávání lepších parametrů, zpracování dat po měření, šablony pro určování koncentrace).

4.2. Metoda stanovení kreatininu v moči pomocí SIA finální optimalizovaná metoda

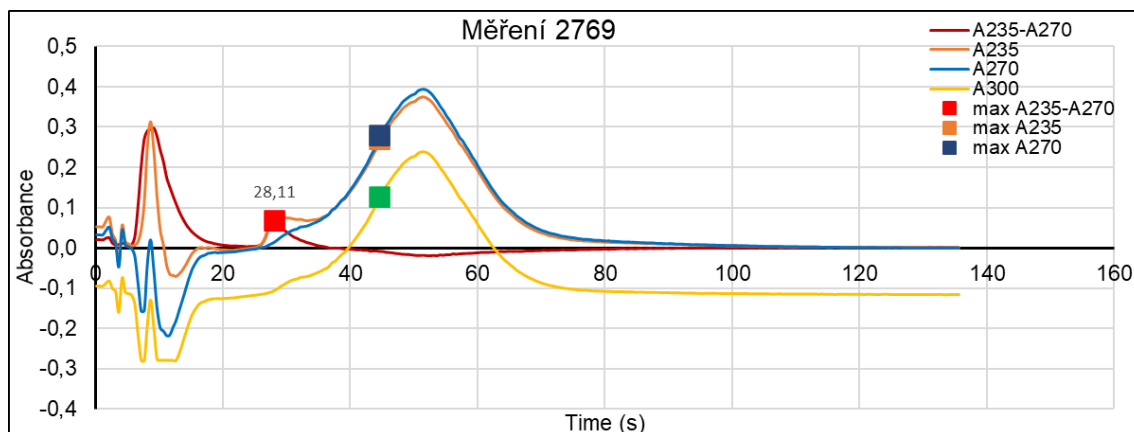
Tabulka 1 – Podmínky experimentu

Sorbent	SPH Iontosorb
Rozměr kolony	3 x 2,5 mm
Rozpouštědlo vzorku	Kys. octová pH 2,4
Nástřík vzorku	20 µl (10 µl) (VX)
Roztok standardu	Kreatinin 2 µg/ml v kys. octové pH 2,4
Nástřík standardu	0, 10, 20 (VS)
Promývací činidlo	Acetonitril 50%
Eluční činidlo	Hydroxid amonný 1%
Vlnové délky detekce	235 nm korekce 270 nm

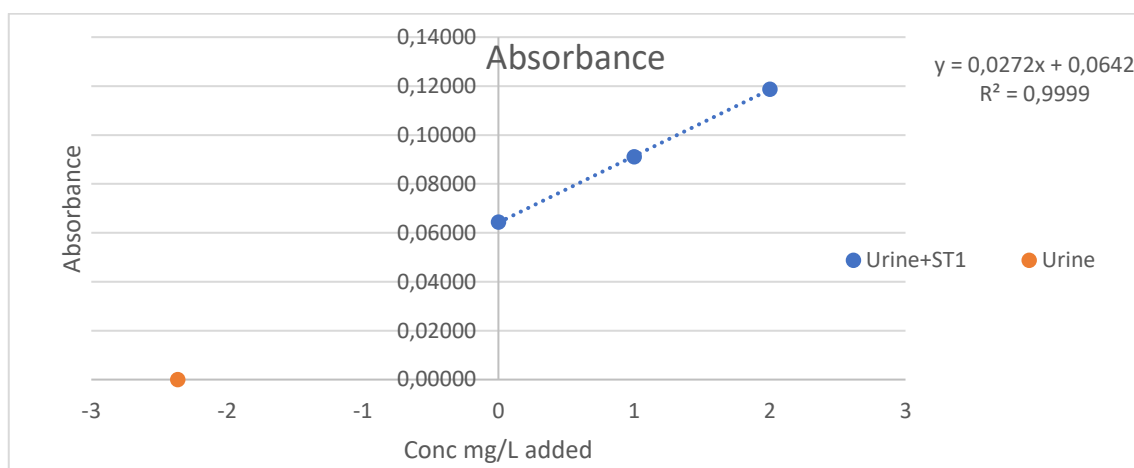
Tabulka 2 – Sekvence kroků SIA metody pro stanovení kreatininu v moči, pro zjištění koncentrace nutno opakovat 3x pro jednotlivé přídávky

Krok	Jednotka	Parametry
Nasátí elučního roztoku	Ventil	Port 2
	Pumpa	500 μ l; 30 μ l/s
Nasátí promývacího činidla	Ventil	Port 3
	Pumpa	500 μ l; 30 μ l/s
Nasátí vzorku	Ventil	Port 7
	Pumpa	VX μ l; 20 μ l/s
Nasátí roztoku standardu	Ventil	Port 8
	Pumpa	VS μ l; 20 μ l/s
Zahájení detekce	Spektrofotometr	Záznam 235-270 nm
Dávkování sekvence zón na kolonu – analýza	Ventil	Port 10
	Pumpa	2000 μ l; 15 μ l/s
Ukončení detekce a uložení dat	Spektrofotometr	Stop
	FloZF	Zapsat do Excelu

Ke kvantifikaci kreatininu ve vzorku byla použita metoda standardního přídávku. Použity byly 2 standardní přídávky (použit pracovní standard o koncentraci 2 μ g/ml). Bylo tak potřeba změřit vzorek samotný a poté s dvěma přídávky (bez, 10 μ l a 20 μ l), měření každého vzorku bylo provedeno 2x a pro výpočet byl použit průměr získaných hodnot výšky píku a plochy pod píkem. Po změření samotného vzorku bez přídávky si program vyhodnotí hodnotu absorbance, a když přesáhne 0,350 tak sám sníží nástřik vzorku z 20 μ l na 10 μ l a k prováděnému měření udělá ještě jedno navíc jako kompenzaci za první testovací, když je hodnota absorbance vzorku pod hodnotou 0,350 tak se objem nástřiku nemění. Po ukončení všech měření vzorku s přídávky standardu byla data absorbancí přenesena ze souboru vytvořeného programem FloZF (a ve kterém program provádí kontrolu hodnoty absorbance) do připravené šablony programu MS Excel. V této šabloně se následně upravila hodnota základní linie a hodnoty času začátku a konce zjišťování píku (prováděno ručně tak aby byla hodnocena plocha nad nulovou linií), následně šablona vypočítá výšku píku a plochu pod píkem. Tyto hodnoty byly poté přeneseny do další šablony, která z měření i se standardními přídávky (opět přenášená hodnota výšky píku a plochy pod píkem po úpravě hodnot časů) spočítá hodnotu kreatininu ve vzorku moči, šablona vyžadovala zadání ředění vzorku.



Obrázek 14 – Ukázka záznamu z vyhodnocovací šablony pro výšku píku



Obrázek 15 – Ukázka záznamu z vyhodnocovací šablony pro určení koncentrace kreatininu ve zředěném vzorku moči

4.3. Vývoj metody

Při vývoji metody se nejprve testovala funkčnost sorbentu. Testovaný sorbent byl: Částicový sorbent SPH Iontosorb

Po ověření fungování sorbentu SHP Iontosorb byla optimalizována metoda.

Optimalizované parametry byly následující:

- Rychlost průtoku a složení eluentu. Použit MS Excel pro vyhodnocení nejlepší výšky píku a plochy pod píkem, nakonec zvolen 50% acetonitril s průtokem 20 μ l.
- Rychlost nasátí vzorku (v této fázi byl jako vzorek používán standard kreatininu), po sériích experimentů zvolena rychlost 20 μ l/s.

- Dávkovaný objem vzorku (stále ještě používán pouze standard), nakonec byl zvolený nastříkávaný objem 20 μ l
- Test reálných vzorků, zjištění funkčnosti metody i s reálnými vzorky
- Vhodné ředění vzorku (k ředění byl použit roztok kyseliny octové o pH 2,4), nakonec zvoleno ředění 100x
- Optimalizace programu pro automatickou změnu nástřiku u koncentrovanějších vzorků.

5. VÝSLEDKY

Tato kapitola popisuje konkrétní měření a výsledky u prováděných 12 experimentů. Na konci každého experimentu je uveden závěr experimentu.

Během těchto experimentů byly zachovány tyto podmínky, z tohoto důvodu nebudou uváděny v podmínkách jednotlivých experimentů:

- Rozpouštědlo vzorku kyselina octová pH 2,4
- Eluční činidlo 1% hydroxid amonný
- Vlnová délka detekce 235 nm korekce 270 nm

5.1. Test funkčnosti sorbentu pro extrakci kreatininu

V tomto experimentu se testovala funkčnost sorbentu.

Tabulka 3 – Podmínky experimentu

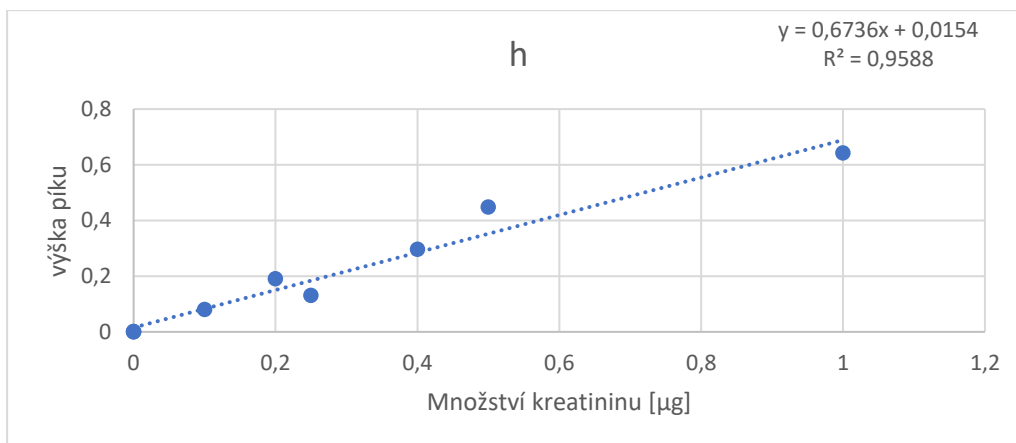
Rozměr kolony	10 x1 ,5 mm
Nástřik vzorku	10, 20, 40 μ l
Promývací činidlo	voda

Tabulka 4 – Měřené roztoky

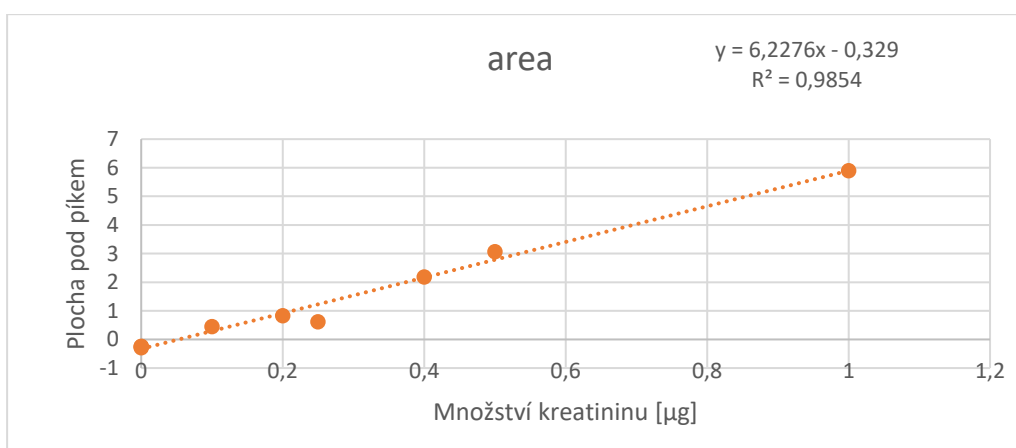
Číslo vzorku	Složení vzorku
1	Slepý vzorek (kys. octová pH 2,4)
2	Kreatinin 10 μ g/ml
3	Kreatinin 25 μ g/ml

Tabulka 5 – Získaná data

Koncentrace [μ g/ml]	Objem [μ l]	Množství kreatininu [μ g]	výška píku	plocha pod píkem
0	20	0	0,0004	-0,2410
10	20	0,20	0,1902	0,8341
25	20	0,50	0,4482	3,0656
0	10	0	0,0005	-0,243
10	10	0,10	0,0806	0,4571
25	10	0,25	0,1302	0,6254
0	40	0	0,0007	-0,2846
10	40	0,40	0,2958	2,1831
25	40	1,00	0,6420	5,9004



Obrázek 16 – Vyhodnocení výšky píku



Obrázek 17 – Vyhodnocení plochy pod píkem,

Závěr experimentu

Z výsledků je patrné, že sorbent funguje a při zvyšování nastříknuté koncentrace detektor poskytuje relativně lineární odezvu.

5.2. Test rychlosti průtoku vzorku a eluentu

Cílem tohoto experimentu je vyzkoušet různé rychlosti průtoku vzorku a eluentu přes kolonu.

Tabulka 6 – Podmínky experimentu

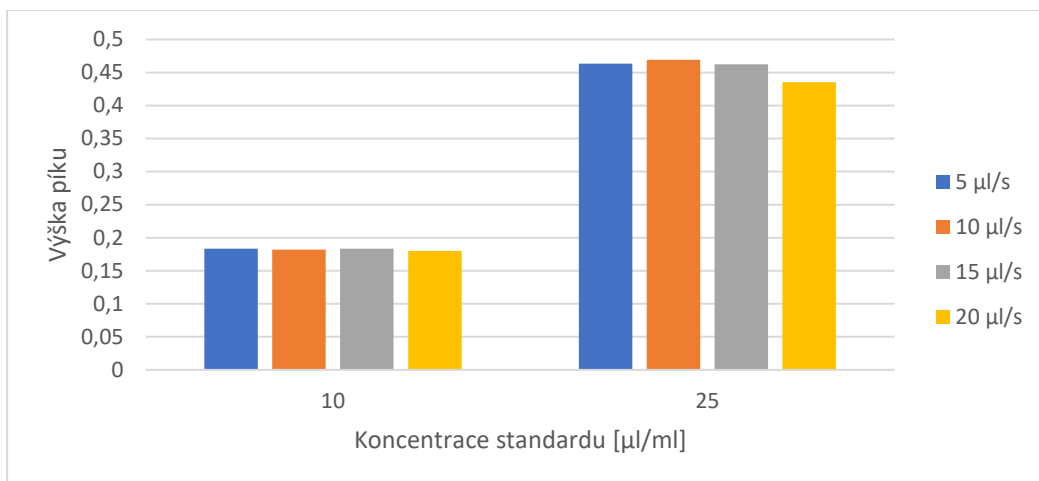
Rozměr kolony	10 x 1,5 mm
Nástřik vzorku	20 μ l
Promývací činidlo	voda

Tabulka 7 – Měřené roztoky:

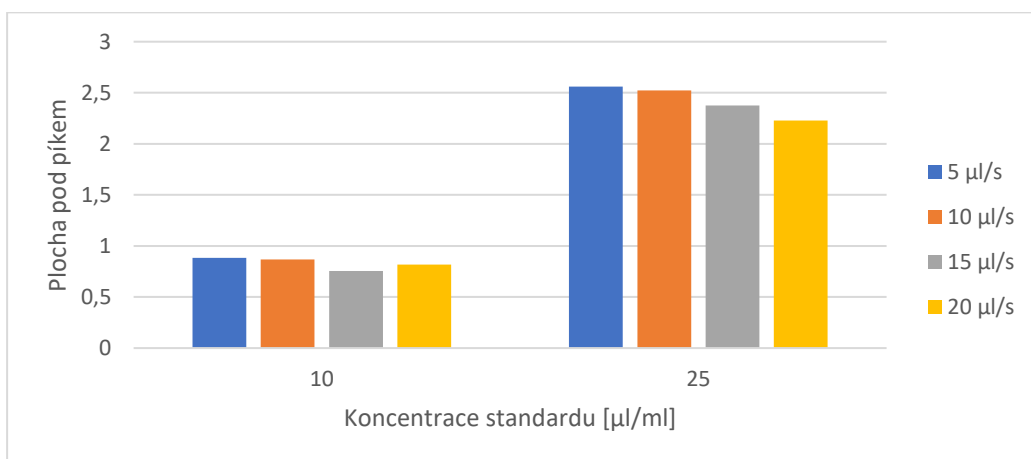
Číslo vzorku	Složení vzorku
1	Slepý vzorek (kys. octová pH 2,4)
2	Kreatinin 10 μ g/ml
3	Kreatinin 25 μ g/ml

Tabulka 8 – Získaná data při testování rychlosti průtoku vzorku

koncentrace [μ g/ml]	rychlost průtoku vzorku [μ l/s]	výška píku	plocha pod píkem
10	15	0,1832	0,7537
25	15	0,4623	2,3760
10	5	0,1833	0,8821
25	5	0,4634	2,5602
10	10	0,1821	0,8667
25	10	0,4691	2,5235
10	20	0,1802	0,8176
25	20	0,4354	2,2296



Obrázek 18 – Odezva detektoru při rychlosti průtoku vzorku hodnocena výška píku

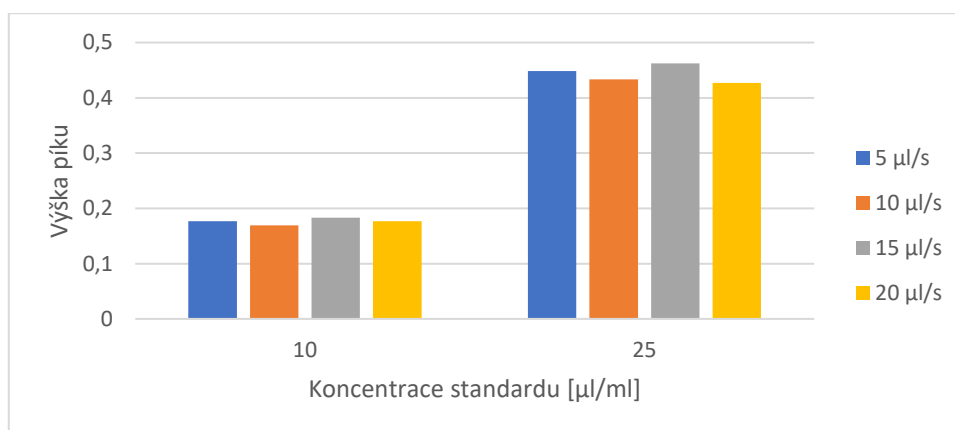


Obrázek 19 – Odezva detektoru při rychlosti průtoku vzorku, hodnocena plocha pod píkem

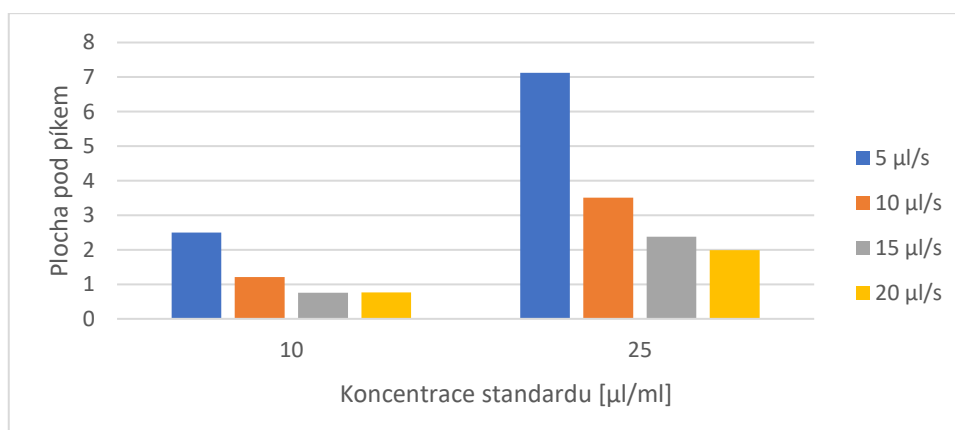
Z grafů je jasné (výška sloupečků se příliš neliší), že rychlost průtoku vzorku odezvu příliš neovlivňuje, tedy pro další měření byla zvolena rychlost 20 $\mu\text{l/s}$.

Tabulka 9 – Získaná data při testování rychlosti průtoku eluentu

koncentrace [µg/ml]	rychlost průtoku eluentu [µl/s]	výška píku	plocha pod píkem
10	15	0,1832	0,7537
25	15	0,4623	2,3760
10	5	0,1768	2,4998
25	5	0,4484	7,1227
10	10	0,1693	1,213
25	10	0,4330	3,5069
10	20	0,1767	0,7691
25	20	0,4269	1,9901



Obrázek 20 – vyhodnocená data v tabulce 4 dle výšky píku



Obrázek 21 – vyhodnocená data v tabulce 4 dle plochy pod píkem

Z grafů vyplývá, že rychlost průtoku eluentu výrazně neovlivňuje hodnocení výšky píku, ale způsobuje zužování píků a tím změny plochy.

Závěr

Změna rychlosti průtoku vzorku nezpůsobuje výrazné změny v odpovědi detektoru. Změna rychlosti průtoku eluentu způsobuje změny u vyhodnocování pomocí plochy pod píkem, ale nezpůsobuje výrazné změny u hodnocení pomocí výšky píku. Do dalších experimentů byla zvolena rychlost průtoku obou kapalin 20 $\mu\text{l/s}$.

5.3. Test vhodného nástřiku vzorku

V tomto experimentu se testovalo množství nastříknutého vzorku na kolonu a linearita jednotlivých množství.

Tabulka 10 – Podmínky experimentu

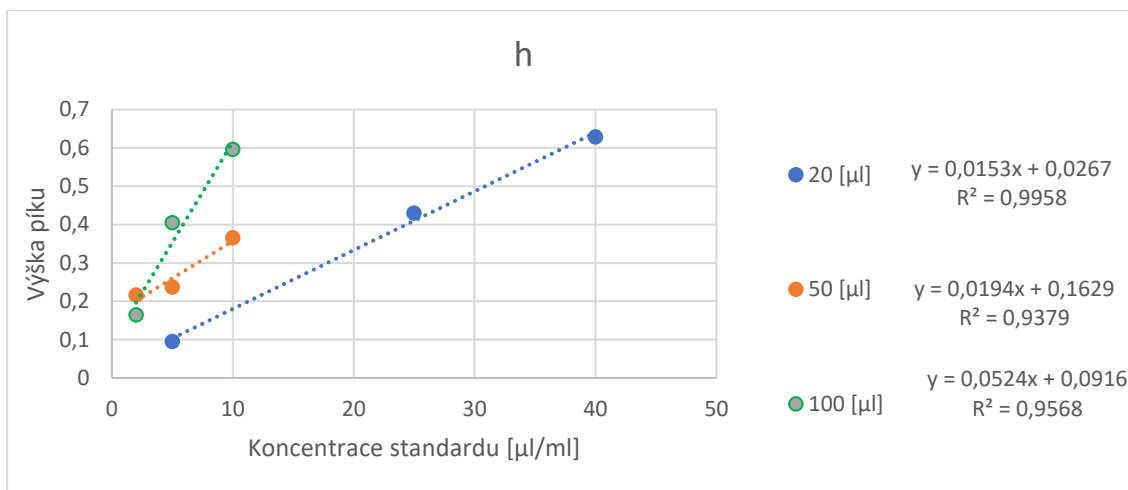
Rozměr kolony	10 x 1,5 mm
Nástřik vzorku	20, 50, 100 μ l
Promývací činidlo	voda

Tabulka 11 – Měřené roztoky

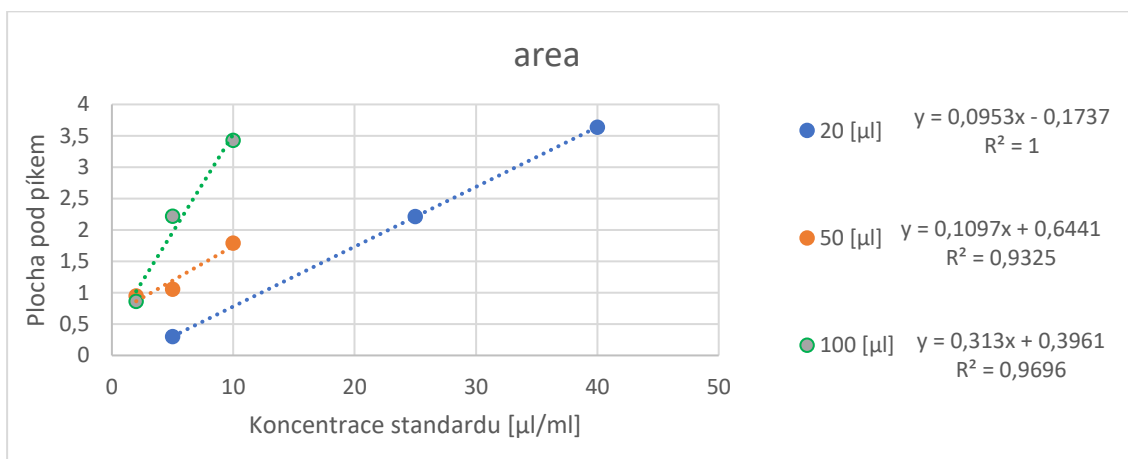
Číslo vzorku	Složení vzorku
1	Slepý vzorek (kys. octová pH 2,4)
2	Kreatinin 2 μ g/ml
3	Kreatinin 5 μ g/ml
4	Kreatinin 10 μ g/ml
5	Kreatinin 25 μ g/ml
6	Kreatinin 40 μ g/ml

Tabulka 12 – Získaná data

Koncentrace standardu [μ g/ml]	Nastřikávaný objem [μ l]	Výška píku	Plocha pod píkem
5	20	0,0947	0,3008
25	20	0,4303	2,2143
40	20	0,6287	3,6367
2	50	0,2161	0,9485
5	50	0,2368	1,0560
10	50	0,3656	1,7917
2	100	0,1642	0,8619
5	100	0,4051	2,2170
10	100	0,5965	3,4297



Obrázek 22 – Vyhodnocená data pro výšku píku



Obrázek 23 – Vyhodnocená data pro plochu pod píkem

Po vyhodnocení získaných dat bylo zjištěno, že nástřik 20 μl vykazuje nejvyšší hodnotu spolehlivosti a z tohoto důvodu byl zvolen jako standardní pro další měření.

5.4. Zjištění vhodné koncentrace a průtoku acetonitrilu

V tomto experimentu se testovala koncentrace promývacího činidla (acetonitrilu).

Tabulka 13 – Podmínky experimentu

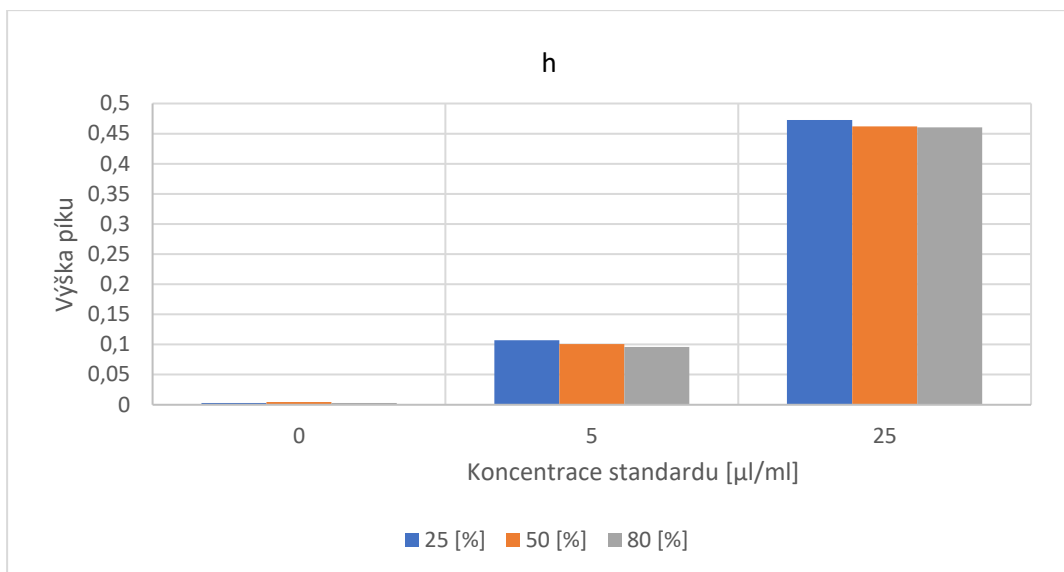
Rozměr kolony	10 x 1,5 mm
Nástřík vzorku	20 μ l
Promývací činidlo	Acetonitril 25%, 50%, 80%

Tabulka 14 – Měřené roztoky

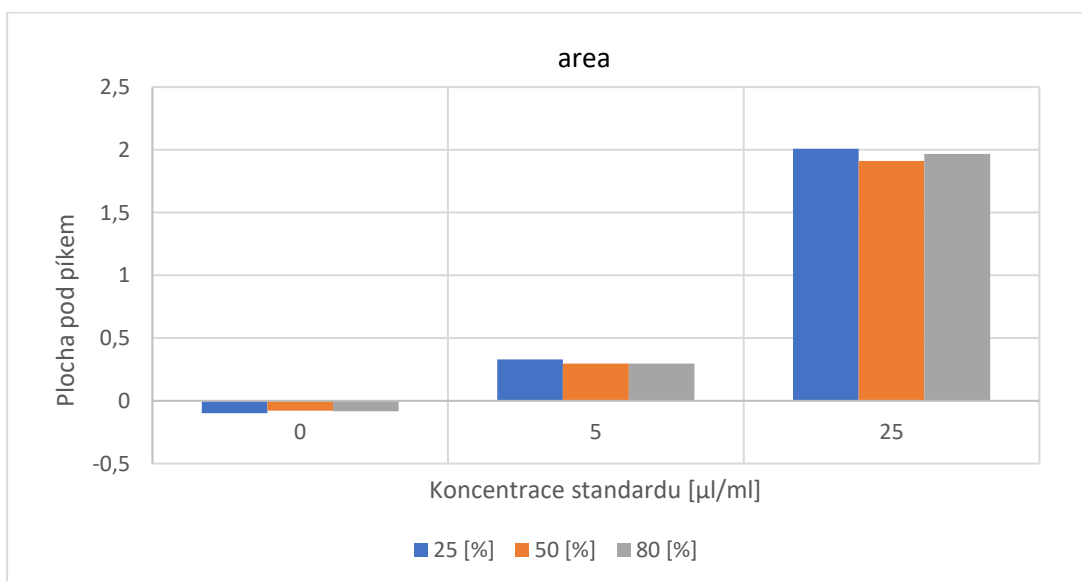
Číslo vzorku	Složení vzorku
1	Slepý vzorek (kys. octová pH 2,4)
2	Kreatinin 5 μ g/ml
3	Kreatinin 25 μ g/ml

Tabulka 15 – Získaná data

koncentrace [μ g/ml]	koncentrace eluentu [%]	výška píku	plocha pod píkem
0	25	0,0028	-0,0998
5	25	0,1068	0,3296
25	25	0,4726	2,0074
0	50	0,0044	-0,0769
5	50	0,1007	0,2956
25	50	0,4618	1,9105
0	80	0,0031	-0,082
5	80	0,0961	0,2967
25	80	0,4606	1,9675



Obrázek 24 – vyhodnocená data podle výšky píku



Obrázek 25 – vyhodnocená data podle plochy pod píkem

Z grafů je patrné, že zvolené koncentrace acetonitrilu podávají téměř stejné výsledky.

Závěr

Z důvodu jednoduchosti přípravy a z obavy před poškození sorbentu koncentrovaným acetonitrem, byl pro další experimenty zvolen 50% acetonitril.

5.5. Test nového postupu analýzy

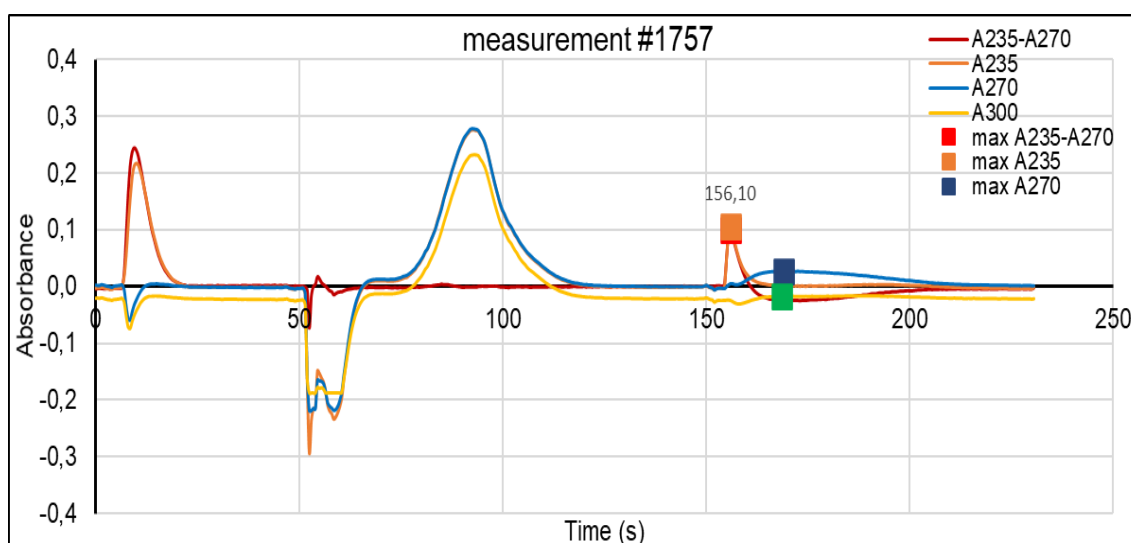
V tomto experimentu se testoval nový postup analýzy – nová sekvence zón dávkovaných na kolonu.

Do tohoto experimentu byl postup následující: vždy došlo k nasátí pouze jednoho roztoku do mísící cívky a poté jeho protlačení přes kolonu. V tomto experimentu se zkoušela nasát do mísící cívky celá sekvence roztoků (v obráceném pořadí, než je poté dávkována na kolonu, hydroxid amonný je nasáván první, poté následuje zóna acetonitrilu, a nakonec vzorek a později přídavky standardů) a poté jejich jednotné protlačení kolonou (na koloně byl stálý průtok, ne po částech jako dosud) následované zónou destilované vody na promytí kolony.

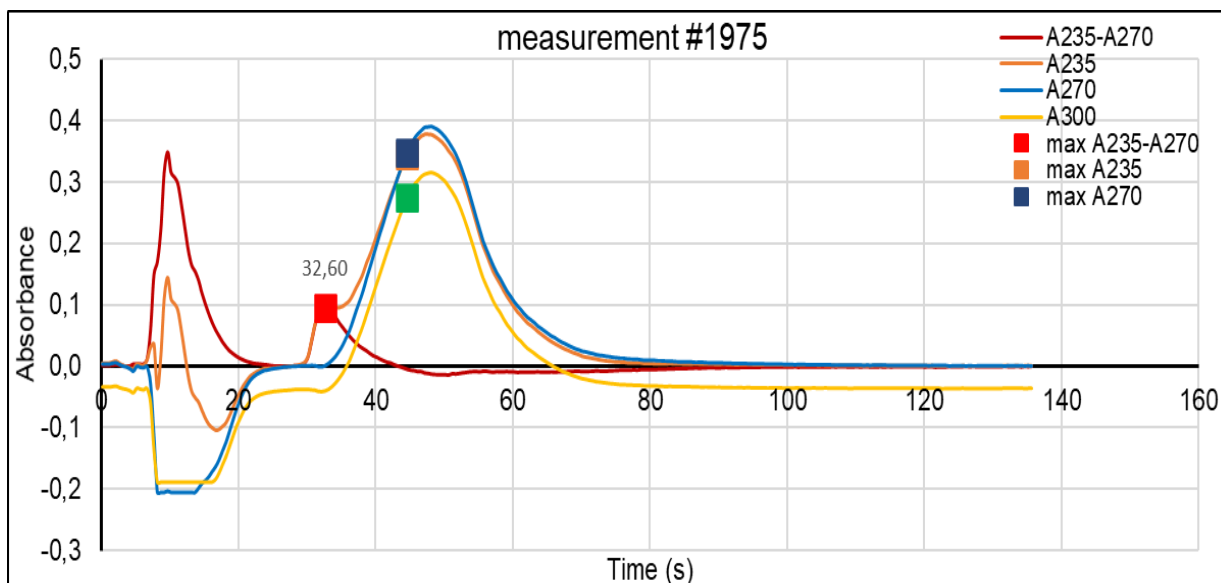
Tabulka 16 – Podmínky experimentu

Rozměr kolony	3 x 2,5 mm
Nástřik vzorku	20 μ l
Promývací činidlo	Acetonitril 50%

Od dalších experimentů je koncentrace promývacího činidla stálá, tak jeho koncentrace již nebude uváděna. Dále od tohoto experimentu došlo ke změně rozměrů kolony (původní 10 x 1,5 mm, nová 3 x 2,5 mm), změna byla z důvodu častého ucpávání kolony a tím pádem nutnosti její výměny. Kolona nových rozměrů (3 x 2,5 mm) již tímto problémem netrpí a je používána i v dalších experimentech.



Obrázek 26 – Záznam vzorku původním způsobem



Obrázek 27 – Záznam vzorku novým způsobem

V porovnání je zobrazen záznam měření samotného standardu o koncentraci 5 $\mu\text{l/ml}$.

Tabulka 17– Srovnání obou způsobů provedení

Původní způsob	Nový způsob
Čas analýzy 230s	Čas analýzy 130s
Nasátí vzorku	Nasátí elučního roztoku
Zahájení detekce	Nasátí promývacího činidla
Dávkování vzorku na kolonu	Nasátí vzorku
Nasátí promývacího roztoku	Nasátí roztoku standard
Promytí kolony promývacím roztokem	Zahájení detekce
Nasátí elučního roztoku	Dávkování sekvence zón na kolonu – analýza
Eluce kreatininu	Ukončení detekce a uložení dat
Ukončení detekce a uložení dat	

Závěr

Z těchto dvou záznamů je zřejmé, že nový postup je rychlejší, ke koloně šetrnější (stálý průtok roztoků, dostatečné promytí kolony, kolona používaná kontinuálně). Zvláštností nového postupu je fakt, že zóna acetonitrilu (v původním způsobu pík uprostřed záznamu) je vidět až za píkem vzorku.

5.6. Test provedení metody standardního přídávku

V tomto experimentu se testovala metoda standardního přídávku pro kvantifikaci kreatininu ve vzorku. Standard o koncentraci 5 µg/ml byl zvolen jako vzorek a k tomuto standardu byly přidávány jednotlivé přídávky. Tyto přídávky ale nebyly přidávány přímo do zkumavky se standardem, nýbrž byly nastříkávány přímo na kolonu hned za zónou vzorku.

Tabulka 18 – Podmínky experimentu

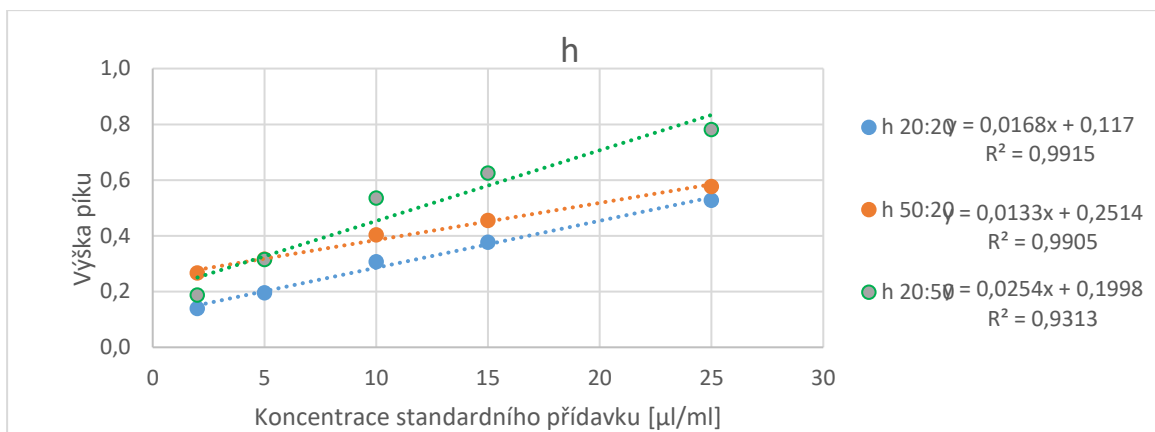
Rozměr kolony	3 x 2,5 mm
Nástřík vzorku	20, 50 µl

Tabulka 19 – Měřené roztoky

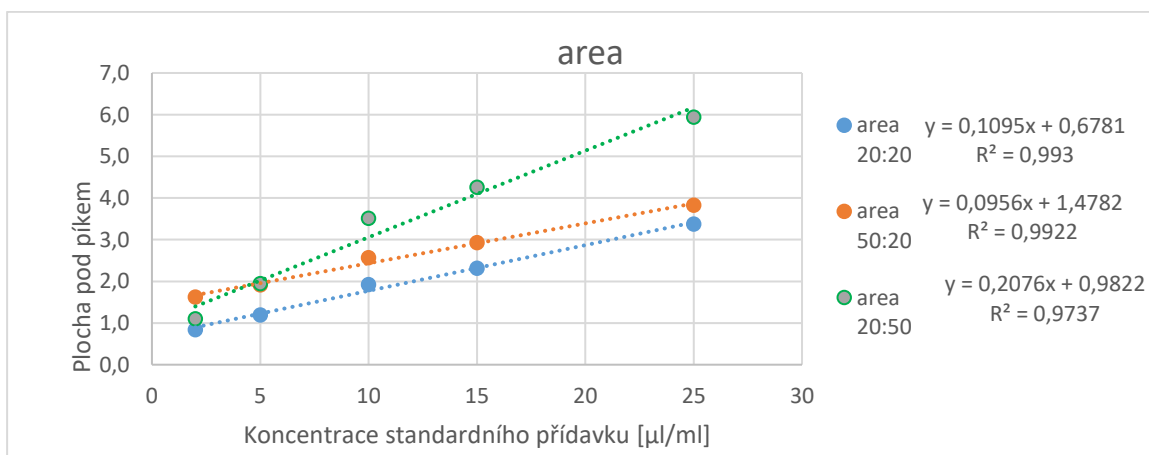
Číslo vzorku	Složení vzorku
1	Slepý vzorek (kys. octová pH 2,4)
2	Kreatinin 2 µg/ml
3	Kreatinin 5 µg/ml
4	Kreatinin 10 µg/ml
5	Kreatinin 15 µg/ml
6	Kreatinin 25 µg/ml

Tabulka 20– Získaná data kalibrační křivka

koncentrace vzorku [µg/ml]	Nastříkávaný objem vzorku [µl]	koncentrace standardu [µg/ml]	Nastříkávaný objem standardu [µl]	výška píku	plocha pod píkem
5	20	2	20	0,1388	0,8374
5	20	5	20	0,1952	1,1880
5	20	10	20	0,3070	1,9187
5	20	15	20	0,3764	2,3150
5	20	25	20	0,5276	3,3733
5	50	2	20	0,2665	1,6191
5	50	5	20	0,3157	1,9111
5	50	10	20	0,4030	2,5651
5	50	15	20	0,4554	2,9231
5	50	25	20	0,5764	3,8235
5	20	2	50	0,1877	1,1012
5	20	5	50	0,3147	1,9405
5	20	10	50	0,5354	3,5137
5	20	15	50	0,6252	4,2554
5	20	25	50	0,7811	5,9356



Obrázek 28 – Vyhodnocená data pro výšku píku



Obrázek 29 – Vyhodnocená data pro plochu pod píkem

Z grafů je patrné, že při vyšších násťkách a vyšší koncentraci standardů již není odpověď detektoru lineární (hodnota spolehlivosti se snižuje).

Závěr

Kombinace 20 μl vzorku a 20 μl standardu má nejvyšší hodnoty spolehlivosti a z tohoto důvodu byla takto kombinace zvolena jako základní pro další experimenty.

5.7. Výběr vhodného ředění moči

V tomto experimentu se testovalo vhodné ředění vzorku moči (ředilo se roztokem kyseliny octové o pH 2,4).

Tabulka 21 – Podmínky experimentu

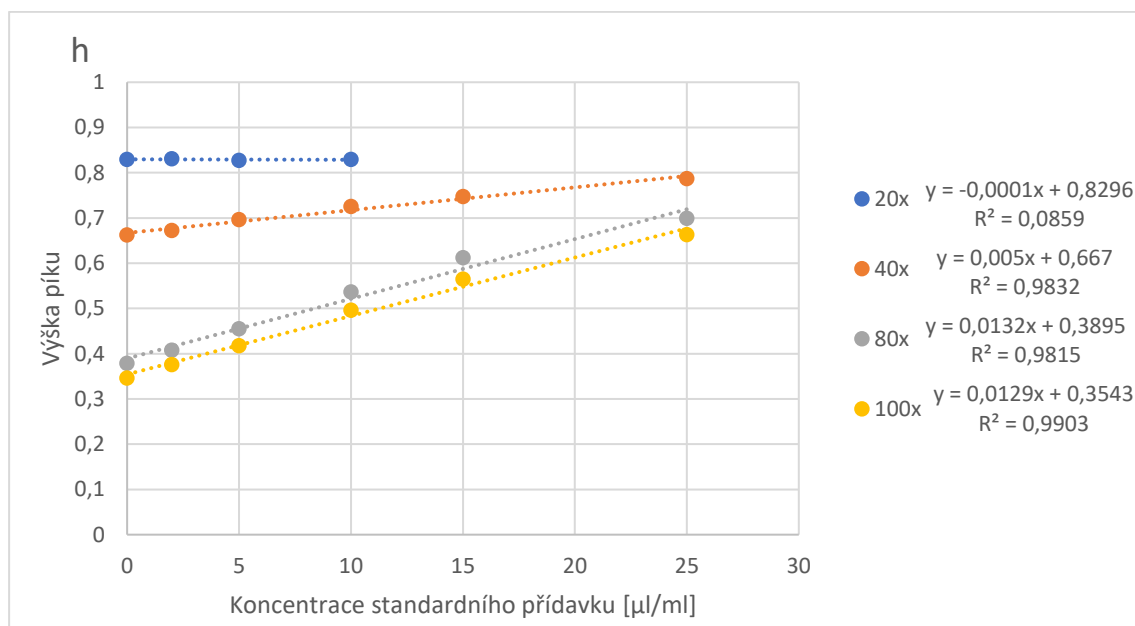
Rozměr kolony	3 x 2,5 mm
Nástřík vzorku	20 μ l

Tabulka 22 – Měřené roztoky

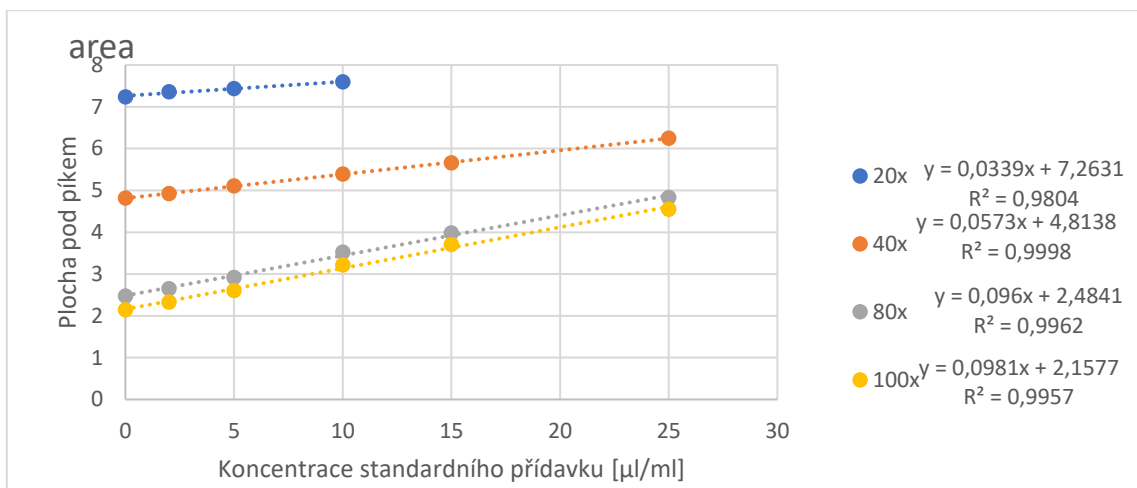
Číslo vzorku	Složení vzorku
1	Slepý vzorek (kys. octová pH 2,4)
2	Kreatinin 2 μ g/ml
3	Kreatinin 5 μ g/ml
4	Kreatinin 10 μ g/ml
5	Kreatinin 15 μ g/ml
6	Kreatinin 25 μ g/ml
7	Moč 9.3.21 naředěná 20x
8	Moč 9.3.21 naředěná 40x
9	Moč 9.3.21 naředěná 80x
10	Moč 9.3.21 naředěná 100x

Tabulka 23 – Získaná data při měření různě ředěného vzorku moči.:

ředění moči	koncentrace standardního přídavku [μg/ml]	výška píku	plocha pod píkem
20x	0	0,8294	7,2399
20x	2	0,8308	7,3572
20x	5	0,8272	7,4372
20x	10	0,8293	7,5948
40x	0	0,6620	4,8130
40x	2	0,6719	4,9249
40x	5	0,6964	5,1101
40x	10	0,7250	5,3890
40x	15	0,7469	5,6585
40x	25	0,7866	6,2507
80x	0	0,3784	2,4722
80x	2	0,4078	2,6515
80x	5	0,4549	2,9197
80x	10	0,5362	3,5228
80x	15	0,6123	3,9821
80x	25	0,6990	4,8297
100x	0	0,3459	2,1445
100x	2	0,3756	2,3286
100x	5	0,4171	2,6014
100x	10	0,4958	3,2124
100x	15	0,5644	3,7060
100x	25	0,6630	4,5479



Obrázek 30 – vyhodnocená data podle výšky píku



Obrázek 31 – vyhodnocená data podle plochy pod píkem

Závěr

Ředění vzorku 100x (vzorek ředěný roztokem kyseliny octové o pH 2,4) má nejvyšší hodnotu spolehlivosti. Z tohoto důvodu bylo ředění vzorku 100x zvoleno jako standardní.

5.8. Test změny pořadí zón na koloně

V tomto experimentu se zkoušela změna pořadí nasávání standardního přídávku a vzorku (normálně se nasával nejprve vzorek, standardní přídavek až poté).

Tabulka 24 – Podmínky experimentu

Rozměr kolony	3 x 2,5 mm
Nástřík vzorku	20 μl

Tabulka 25 – Měřené roztoky

Číslo vzorku	Složení vzorku
1	Slepý vzorek (kys. octová pH 2,4)
2	Kreatinin 2 $\mu\text{g/ml}$
3	Kreatinin 5 $\mu\text{g/ml}$
4	Kreatinin 10 $\mu\text{g/ml}$
5	Moč 9.3. naředěná 100x

Tabulka 26 – výsledek pro vzorek 10.3.21 ředěný 100x změřený normálním způsobem (pořadí nasávání nejprve vzorek, poté standardní přídavek)

Výsledky	Výška píku	Plocha pod píkem
Směrnice	0,0162	0,1095
Abs. člen	0,3297	2,0797
R	0,9979	0,9974
Koncentrace kreatininu v nástřiku [mg/l]	20,3161	18,9893
Koncentrace kreatininu ve vzorku [mg/l]	2031,61	1898,93
Koncentrace kreatininu ve vzorku [mmol/l]	17,9598	16,7869

Tabulka 27 – výsledek pro vzorek 10.3.21 ředěný 100x změřený reverzním způsobem (pořadí nasávání nejprve standardní přídavek, poté vzorek)

Výsledky	Výška píku	Plocha pod píkem
Směrnice	0,0166	0,1161
Abs. člen	0,3185	1,9872
R	0,9978	0,9978
Koncentrace kreatininu v nástřiku [mg/l]	19,238	17,113
Koncentrace kreatininu ve vzorku [mg/l]	1923,82	1711,32
Koncentrace kreatininu ve vzorku [mmol/l]	17,0069	15,1283

Závěr

Z výsledků je parné, že změna pořadí nasávání nemá výrazný vliv na výslednou hodnotu. Pro další měření byl tedy ponechán původní postup (nasávání v pořadí vzorek, až poté standardní přídavek).

5.9. Test nového způsobu provedení metody standardního přídávku

V tomto experimentu se zkoušel nový postup metody standardního přídávku. Metoda spočívala v pouze jednom roztoku standardu (konkrétně 2 µg/ml), který se ale dávkoval během analýzy v různých objemech (konkrétně 10, 20, 40 µl). Tímto způsobem bylo dosaženo různých koncentracích standardních přídávků ke vzorku.

Tabulka 28 – Podmínky experimentu

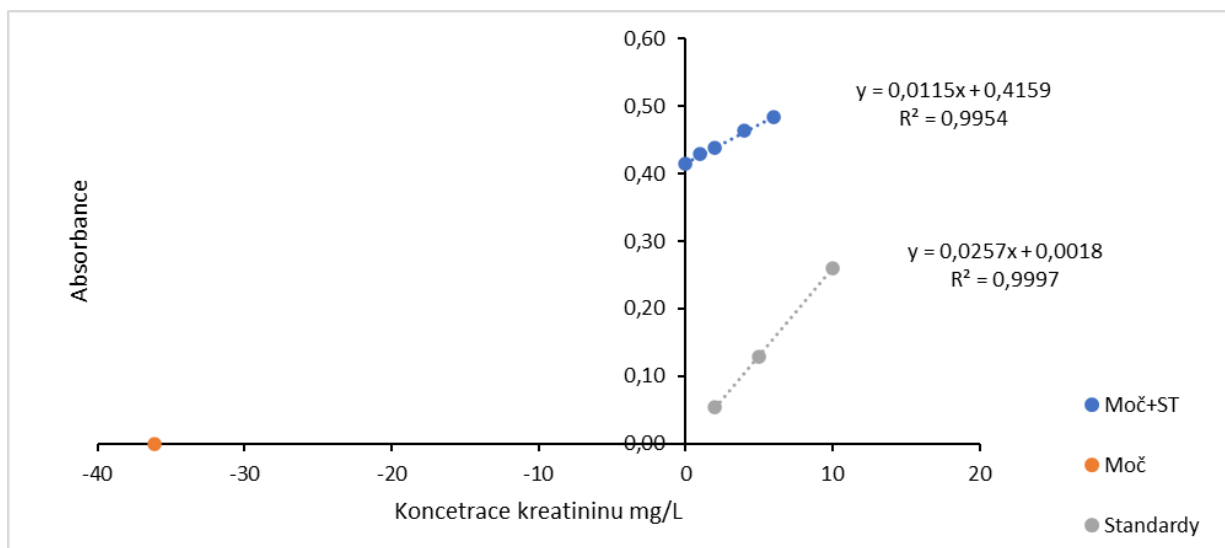
Rozměr kolony	3 x 2,5 mm
Nástřík vzorku	10, 20 µl

Tabulka 29 – Měřené roztoky

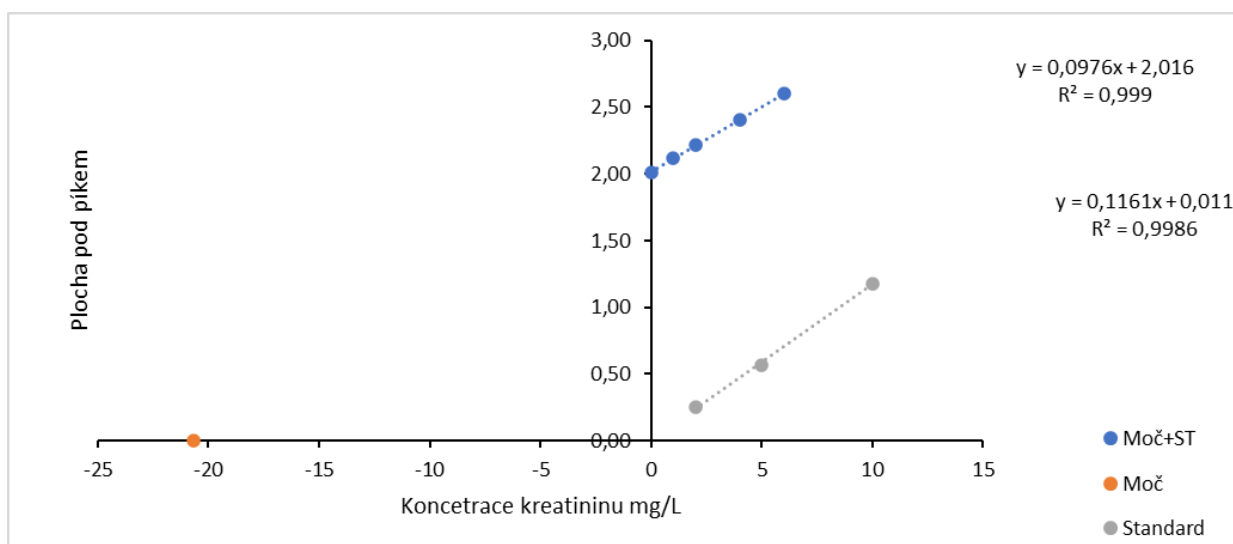
Číslo vzorku	Složení vzorku
1	Slepý vzorek (kys. octová pH 2,4)
2	Kreatinin 2 µg/ml
3	Moč 9.3.21 naředěná 100x
4	Moč 10.3.21 naředěná 100x
5	Moč 11.3.21 naředěná 100x

Tabulka 30– výsledek pro vzorek 9.3.21 ředěný 100x s nástříkem 20 µl

Výsledky	Výška píku	Plocha pod píkem
Směrnice	0,0115	0,0976
Abs. člen	0,4159	2,0141
R	0,9977	0,9995
Nastříknutá koncentrace [mg/L]	36,079	20,663
Koncentrace kreatininu ve vzorku [mg/L]	3607,91	2066,34
Koncentrace kreatininu ve vzorku [mmol/L]	31,8946	18,2668



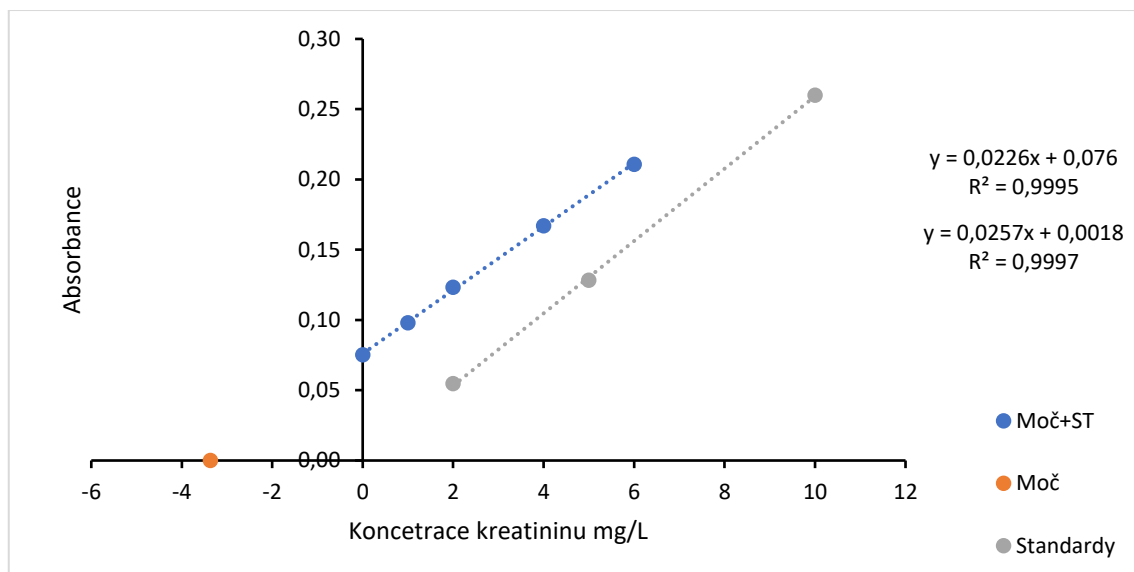
Obrázek 32 – Grafické zpracování pro výšku píku



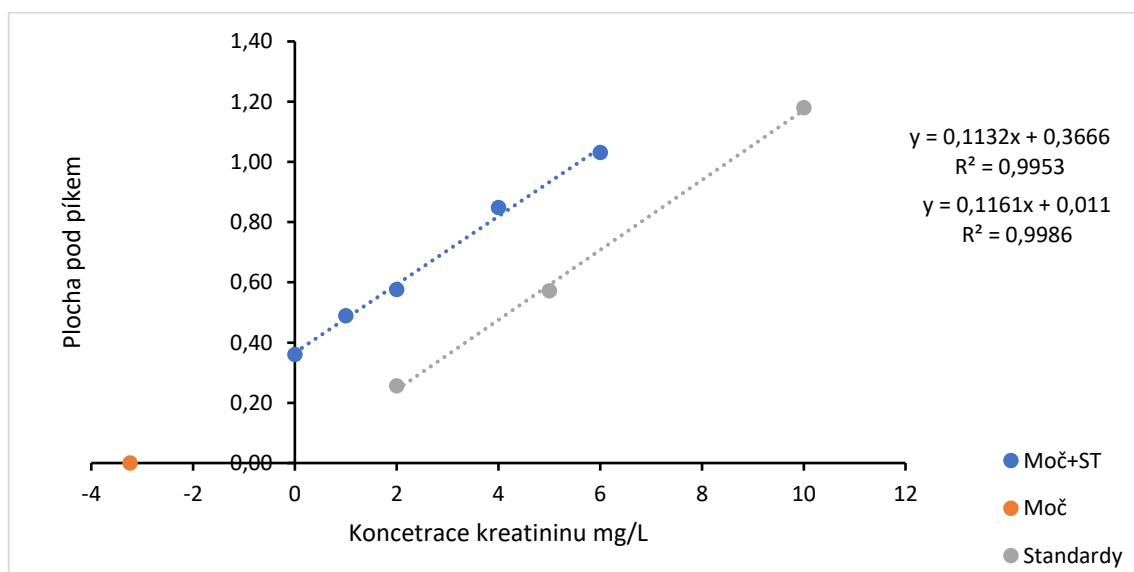
Obrázek 33 – Grafické zpracování pro plochu pod píkem

Tabulka 31 – výsledek pro vzorek 10.3.21 ředěný 100x s nástřikem 20 µl

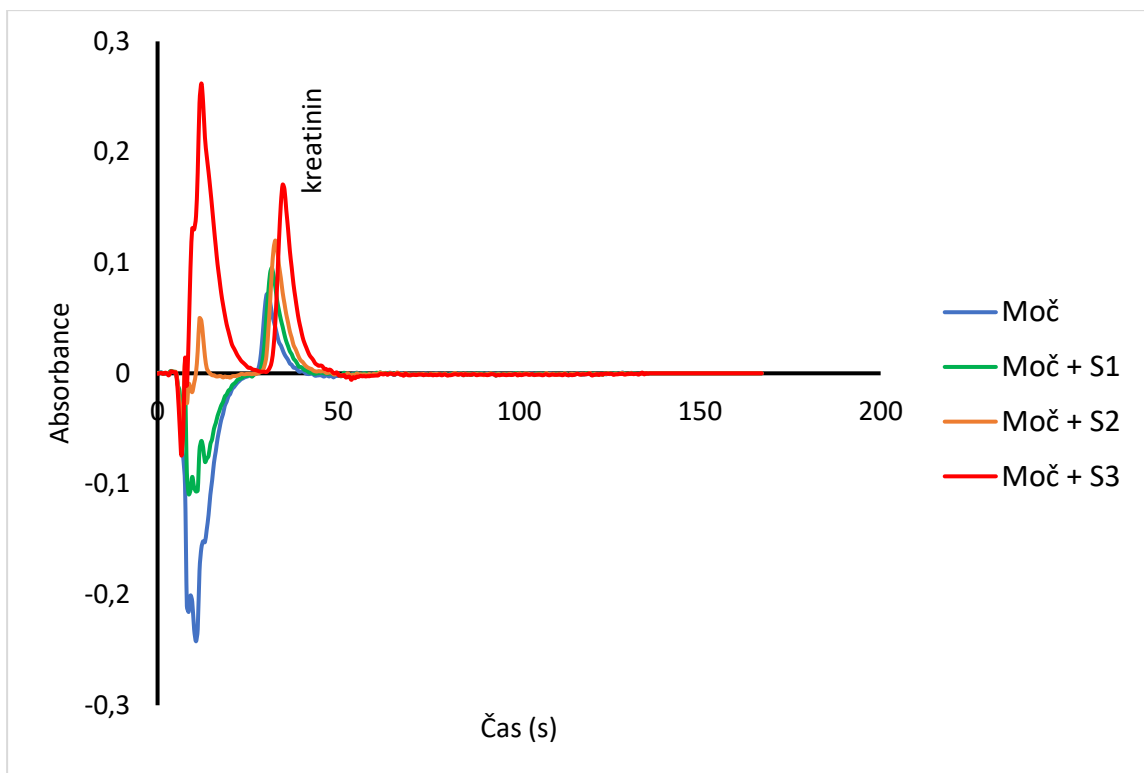
Výsledky	Výška píku	Plocha pod píkem
Směrnice	0,0226	0,1132
Abs. člen	0,0760	0,3577
R	0,9997	0,9976
Nastříknutá koncentrace [mg/L]	3,364	3,237
Koncentrace kreatininu ve vzorku [mg/L]	336,4	323,7
Koncentrace kreatininu ve vzorku [mmol/L]	2,974	2,862



Obrázek 34 – Grafické zpracování pro výšku píku



Obrázek 35 – Grafické zpracování pro plochu pod píkem



Obrázek 36 – Grafické zobrazení záznamu vzorku s přidavky

Tabulka 32 – výsledek pro vzorek 11.3.21 ředěný 100x s nástřikem 20 μ l

Výsledky	Výška píku	Plocha pod píkem
Směrnice	0,0257	0,1234
Abs. člen	0,0669	0,3111
R	0,9997	0,9994
Nastříknutá koncentrace [mg/L]	2,598	2,508
Koncentrace kreatininu ve vzorku [mg/L]	259,89	250,80
Koncentrace kreatininu ve vzorku [mmol/L]	2,297	2,217

Tabulka 33 – výsledek pro vzorek 9.3.21 ředěný 100x s nástřikem 10 μ l

Výsledky	Výška píku	Plocha pod píkem
Směrnice	0,0203	0,1063
Abs. člen	0,2341	1,0815
R	0,9973	0,9968
Nastříknutá koncentrace [mg/L]	11,539	10,150
Koncentrace kreatininu ve vzorku [mg/L]	2307,89	2030,04
Koncentrace kreatininu ve vzorku [mmol/L]	20,402	17,945

Závěr

Z grafů vyplývá, že nový postup za použití jen jednoho standardu funguje. Ale pro vzorek s vyšším obsahem kreatininu musí být snížen nástřik.

5.10. Kalibrační rozsah a opakovatelnost nástřiku

V tomto experimentu byla změřena kalibrační křivka. Každý kalibrační roztok byl změřen 6x a data byla použita i pro vyhodnocení opakovatelnosti nástřiku.

Tabulka 34 – Podmínky experimentu

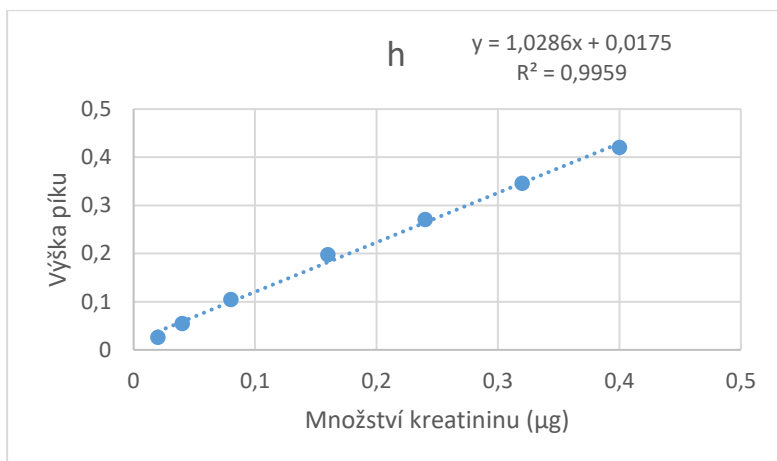
Rozeř kolony	3x2,5 mm
Rozpouštědlo vzorku	Kys. octová pH 2,4
Nástřik vzorku	10, 20 μ l
Promývací činidlo	Acetonitril 50%

Tabulka 35 – Měřené roztoky:

Číslo vzorku	Složení vzorku
1	Slepý vzorek (kys. octová pH 2,4)
2	Kreatinin 2 μ g/ml

Tabulka 36 – Získaná data pro výšku píku

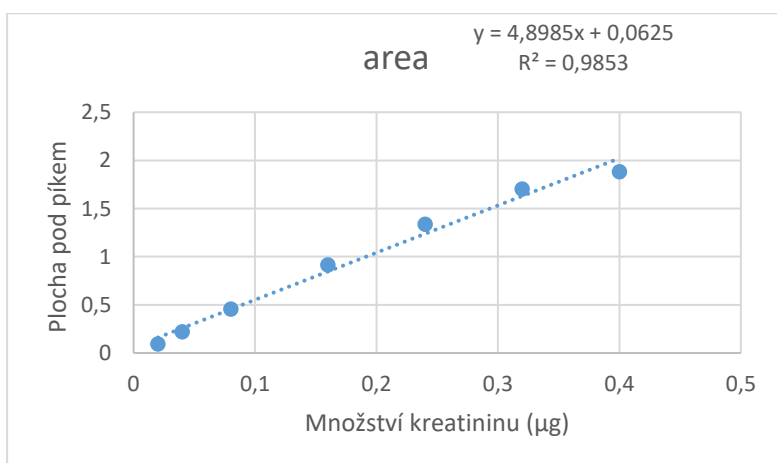
objem standardu [μ l]	Množství kreatininu [μ g]	výška píku nástřik 1	výška píku nástřik 2	výška píku nástřik 3	výška píku nástřik 4	výška píku nástřik 5	výška píku nástřik 6	výška píku průměr	výška píku SD	výška píku RSD
10	0,02	0,0244	0,0259	0,0257	0,0268	0,0255	0,0257	0,0257	0,0007	2,67 %
20	0,04	0,0533	0,0544	0,0544	0,0546	0,0558	0,0554	0,0546	0,0008	1,46 %
40	0,08	0,1049	0,1039	0,1036	0,1035	0,1062	0,1052	0,1045	0,0010	0,94 %
80	0,16	0,1973	0,1974	0,1979	0,1961	0,2000	0,1961	0,1975	0,0013	0,67 %
120	0,24	0,2733	0,2753	0,2694	0,2667	0,2688	0,2718	0,2709	0,0029	1,06 %
160	0,32	0,3419	0,3368	0,3369	0,3525	0,3520	0,3529	0,3455	0,0072	2,08 %
200	0,40	0,4219	0,4215	0,4317	0,4228	0,4144	0,4073	0,4199	0,0076	1,81 %



Obrázek 37 – Grafické zpracování pro výšku píku

Tabulka 37 – Získaná data pro plochu pod píkem

objem standardu [μl]	plocha pod píkem nástřík 1	plocha pod píkem nástřík 2	plocha pod píkem nástřík 3	plocha pod píkem nástřík 4	plocha pod píkem nástřík 5	plocha pod píkem nástřík 6	plocha pod píkem průměr	plocha pod píkem SD	plocha pod píkem RSD
10	0,0915	0,0970	0,0918	0,0979	0,0950	0,0922	0,0942	0,0025	2,69 %
20	0,2174	0,2218	0,2150	0,2214	0,2226	0,2248	0,2205	0,0033	1,49 %
40	0,4551	0,4525	0,4523	0,4527	0,4604	0,4603	0,4555	0,0035	0,77 %
80	0,9183	0,9175	0,9172	0,9070	0,9185	0,9131	0,9153	0,0041	0,45 %
120	1,3441	1,3438	1,3384	1,3352	1,3364	1,3340	1,3387	0,0040	0,30 %
160	1,7110	1,7083	1,7056	1,7283	1,6870	1,6793	1,7032	0,0161	0,95 %
200	1,8757	1,8778	1,8916	1,8831	1,8802	1,8860	1,8824	0,0053	0,28 %



Obrázek 38 – Grafické zpracování pro plochu pod píkem

Závěr

Z grafů a tabulek je zřejmé, že ve zvoleném rozsahu kalibrace je odpověď detektoru lineární (další výsledky vzorků jsou tedy správné).

Kalibrační rozsah byl stanoven 0,02 – 0,40 µg. Na základě poměru signálu a šumu (s/n) základní linie by stanoven limit detekce 0,003 µg (3 × s/n) a limit kvantifikace 0,01 µg (10 × s/n) kreatininu.

5.11. Opakovatelnost v sérii

V tomto experimentu byl připraven a změřen 6x stejný vzorek moči. Testovala se opakovatelnost měření. Současně se automatizovalo měření jednotlivých vzorků tak, že již nebylo potřeba spouštět měření jednotlivých přídavek ručně, ale každý vzorek byl i s jeho přídávky změřen na jedno spuštění analyzátoru (obslužný program si přídávky nástříků řídí sám, nejprve změří samotný vzorek pak při dalším měření si sám nasaje 10 µl standardu, při dalším 20 µl a při posledním 30 µl, každý přídavek měří 2x a do výsledkové šablony se bere jejich průměr).

Tabulka 38 – Podmínky experimentu

Rozměr kolony	3 x 2,5 mm
Nástřík vzorku	20 µl
Standardní přídávky	10, 20, 30 µL / 1, 2, 3 µg/ml

Tabulka 39 – Měřené roztoky

Číslo vzorku	Složení vzorku
1	Slepý vzorek (kys. octová pH 2,4)
2	Kreatinin 2 µg/ml
3	Moč 10.3.21 ředěná 100x

Tabulka 40 – Získaná data

Ředění vzorku	nasávaný objem [μ l]	naměřená koncentrace [mmol/L]
100x 1	20	2,391
100x 2	20	2,576
100x 3	20	2,454
100x 4	20	2,531
100x 5	20	2,215
100x 6	20	2,554
průměr	2,454	
SD	0,123	
RSD	5,05 %	

Z tabulky je zřejmé, že metoda má poměrně dobrou opakovatelnost v sérii (Chyba kolem 5 % je této metody dobrý výsledek).

5.12. Mezigenní opakovatelnost měření

V tomto experimentu se testovala mezigenní opakovatelnost měření.

Měřeno bylo již optimalizovanou metodou, ke kvantifikaci kreatininu ve vzorku byla použita upravená metoda standardního přídávku (úprava spočívala v použití jen jednoho standardu v různých nástřících test a princip této metody v kapitole 5.9. a 5.11.).

Tabulka 41 – Podmínky experimentu

Rozměr kolony	3 x 2,5 mm
Nástřík vzorku	10, 20 μ l
Standardní přídávky	10, 20, 30 μ L / 1, 2, 3 μ g/ml

Tabulka 42 – Měřené roztoky

Číslo vzorku	Složení vzorku
1	Slepý vzorek (kys. octová pH 2,4)
2	Kreatinin 2 µg/ml
3	Moč 9.3.21 ředěná 100x
4	Moč 10.3.21 ředěná 100x
5	Moč 11.3.21 ředěná 100x
6	Moč 29.3.21 ředěná 100x
7	Moč 10.6.20 ředěná 100x
8	Moč 11.6.20 ředěná 100x

Tabulka 43 – Výsledky ze 31. 3. 2021 – Prvotní ředění vzorku vše ředěno 100x roztokem kyseliny octové o pH 2,4 a každý vzorek byl připraven v dubletu, proto se opakuji datумы

Datum odběru vzorku	Nástřik vzorku [µl]	Ředění vzorku	Koncentrace vzorku podle výšky píku [mmol/L]	Koncentrace vzorku podle plochy pod píkem [mmol/L]
9.3.21	20	100x 1	39,416	16,526
9.3.21	10	100x 1	16,588	15,678
10.3.21	20	100x 1	2,491	2,153
11.3.21	20	100x 1	2,0544	2,0958
29.3.21	20	100x 1	10,5696	9,6939
10.6.20	20	100x 1	5,3324	5,1928
11.6.20	20	100x 1	4,2489	4,2272
9.3.21	20	100x 2	20,8299	17,4234
9.3.21	10	100x 2	12,3995	14,8899
10.3.21	20	100x 2	2,6684	2,3967
11.3.21	20	100x 2	1,8743	1,8089
29.3.21	20	100x 2	10,2292	9,4587
10.6.20	20	100x 2	5,8088	5,7263
11.6.20	20	100x 2	3,7857	4,0378

Poznámka: U vzorků s vyššími koncentracemi (konkrétně vzorek odebraný 9.3.) byl u dalších měření zvolen poloviční nástřik a do statistického zpracování byl použit výsledek získán tímto nižším nástřikem, z tohoto důvodu se v následujících tabulkách liší nástřiky u jednotlivých vzorků

Tabulka 44 – Výsledky ze 1. 4. 2021 – Změřeny vzorky připravené dne 31. 3. 2021 - koncentrace vzorku podle výšky píku

Datum odběru vzorku	Nástřik vzorku [μl]	Ředění vzorku	Koncentrace vzorku [mmol/L]	Koncentrace vzorku [mmol/L]
9.3.21	10	100x 1	19,3687	15,2066
10.3.21	20	100x 1	2,5156	2,5280
11.3.21	20	100x 1	2,0272	1,8140
29.3.21	20	100x 1	12,3834	10,9994
10.6.20	20	100x 1	5,5616	5,9384
11.6.20	20	100x 1	3,6350	3,8922
9.3.21	10	100x 2	16,5510	13,7896
10.3.21	20	100x 2	2,2395	2,2683
11.3.21	20	100x 2	1,7692	1,6973
29.3.21	20	100x 2	8,2549	9,5166
10.6.20	20	100x 2	5,7234	5,9200
11.6.20	20	100x 2	4,2054	3,9877

Tabulka 45 – Výsledky ze 6. 4. 2021 – Změřeny vzorky připravené dne 31. 3. 2021- koncentrace vzorku podle výšky píku

Datum odběru vzorku	Nástřik vzorku [μl]	Ředění vzorku	Koncentrace vzorku [mmol/L]	Koncentrace vzorku [mmol/L]
9.3.21	10	100x 1	20,0494	15,2664
10.3.21	20	100x 1	2,1492	1,7931
11.3.21	20	100x 1	2,3466	1,9108
29.3.21	20	100x 1	12,5635	10,5082
10.6.20	20	100x 1	7,1185	5,9076
11.6.20	20	100x 1	4,7021	3,8299
9.3.21	10	100x 2	18,6649	14,3216
10.3.21	20	100x 2	2,6534	2,0067
11.3.21	20	100x 2	1,9241	1,7651
29.3.21	20	100x 2	11,3349	10,1036
10.6.20	20	100x 2	6,8090	6,1087
11.6.20	20	100x 2	5,0095	3,9727

Tabulka 46 – Výsledky ze 7. 4. 2021 – Připraveno nové ředění vzorku opět každý vzorek připraven v dubletu

Datum odběru vzorku	Nástřik vzorku [μl]	Ředění vzorku	Koncentrace vzorku [mmol/L]	Koncentrace vzorku [mmol/L]
9.3.21	10	100x 1	14,7961	12,8558
10.3.21	20	100x 1	2,0882	1,8951
11.3.21	20	100x 1	1,9690	1,6545
29.3.21	20	100x 1	12,2456	8,6683
10.6.20	20	100x 1	7,2358	5,2509
11.6.20	20	100x 1	3,9562	3,7643
9.3.21	20	100x 2	18,5752	13,3827
10.3.21	10	100x 2	2,0923	1,7916
11.3.21	20	100x 2	1,8393	1,5936
29.3.21	20	100x 2	12,9005	9,5860
10.6.20	20	100x 2	6,3588	5,2992
11.6.20	20	100x 2	3,8307	3,8569

Tabulka 47– Výsledky ze 8. 4. 2021 – Změřeny vzorky připravené dne 7. 4. 2021

Datum odběru vzorku	Nástřik vzorku [μl]	Ředění vzorku	Koncentrace vzorku [mmol/L]	Koncentrace vzorku [mmol/L]
9.3.21	10	100x 1	15,2780	13,7842
29.3.21	10	100x 1	10,2400	8,1378
9.3.21	10	100x 2	11,5058	12,7811
29.3.21	10	100x 2	10,3571	8,1043

Tabulka 48– Statistické zpracování pro výšku píku

výška	31.3. [mmol/L]	1.4. [mmol/L]	6.4. [mmol/L]	Průměr	SD	RSD
9.3.21	16,5885	19,3687	20,0494	18,66887	1,49706	8,02 %
10.3.21	2,4913	2,5156	2,1492	2,385367	0,167289	7,01 %
11.3.21	2,0544	2,0272	2,3466	2,142733	0,144583	6,75 %
29.3.21	10,5696	12,3834	12,5635	11,83883	0,90049	7,61 %
10.6.20	5,3324	5,5616	7,1185	6,004167	0,793489	13,22 %
11.6.20	4,2489	3,635	4,7021	4,195333	0,437285	10,42 %
9.3.21	12,3995	16,551	18,6649	15,8718	2,602536	16,40 %
10.3.21	2,6684	2,2395	2,6534	2,520433	0,198744	7,89 %
11.3.21	1,8743	1,7692	1,9241	1,855867	0,064567	3,48 %
29.3.21	10,2292	8,2549	11,3349	9,939667	1,273963	12,82 %
10.6.20	5,8088	5,7234	6,809	6,113733	0,492862	8,06 %
11.6.20	3,7857	4,2054	5,0095	4,333533	0,507763	11,72 %

Tabulka 49 -Statistické zpracování pro plochu pod píkem

plocha	31.3. [mmol/L]	1.4. [mmol/L]	6.4. [mmol/L]	Průměr	SD	RSD
9.3.21	15,6785	15,2066	15,2664	15,38383	0,209786	1,36 %
10.3.21	2,1534	2,528	1,7931	2,158167	0,300041	13,90 %
11.3.21	2,0958	1,814	1,9108	1,9402	0,116908	6,03 %
29.3.21	9,6939	10,9994	10,5082	10,4005	0,538382	5,18 %
10.6.20	5,1928	5,9384	5,9076	5,6796	0,344449	6,06 %
11.6.20	4,2272	3,8922	3,8299	3,9831	0,174469	4,38 %
9.3.21	14,8899	13,7896	14,3216	14,3337	0,449277	3,13 %
10.3.21	2,3967	2,2683	2,0067	2,2239	0,162283	7,30 %
11.3.21	1,8089	1,6973	1,7651	1,7571	0,04591	2,61 %
29.3.21	9,4587	9,5166	10,1036	9,692967	0,291322	3,01 %
10.6.20	5,7263	5,92	6,1087	5,918333	0,156119	2,64 %
11.6.20	4,0378	3,9877	3,9727	3,9994	0,027835	0,70 %

Tabulka 50 – Výsledky z měření v klinické laboratoři, každý vzorek měřen 2x

Datum odběru vzorku	Koncentrace vzorku při měření v klinické laboratoři [mmol/L]	Koncentrace vzorku při měření v klinické laboratoři [mmol/L]
9.3.21	13,312	13,364
10.3.21	1,948	1,913
11.3.21	1,734	1,751
29.3.21	8,305	8,265
10.6.20	4,619	4,632
11.6.20	3,409	3,480

Statistické zpracování výsledků

Teoretický základ je v kapitole (3.5.)

Statistické zpracování pro výšku píku

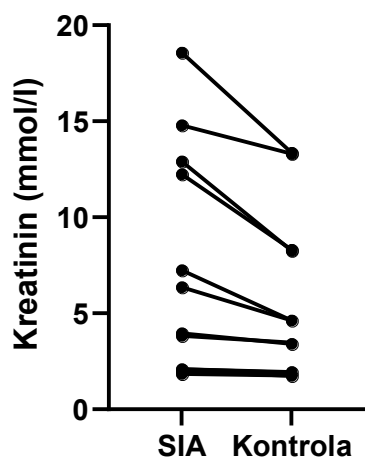
Tabulka 51 – Porovnávaná data vlevo hodnoty naměřené vyvinutou metodou, vpravo hodnoty získané změřením vzorku v klinické laboratoři

SIA	Kontrola
14,7961	13,312
2,0882	1,948
1,969	1,734
12,2456	8,305
7,2358	4,619
3,9562	3,409
18,5752	13,364
2,0923	1,913
1,8393	1,751
12,9005	8,265
6,3588	4,632
3,8307	3,48

Tabulka 52 – Wilcoxon test

Table Analyzed	Výška píku 7,4,2021
Column B	Kontrola
vs.	vs,
Column A	SIA
Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0,0005
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	***
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	0,000 , -78,00
Sum of signed ranks (W)	-78
Number of pairs	12
Number of ties (ignored)	0
Median of differences	
Median	-1,016
How effective was the pairing?	
rs (Spearman)	0,965
P value (one tailed)	<0,0001
P value summary	****
Was the pairing significantly effective?	Yes

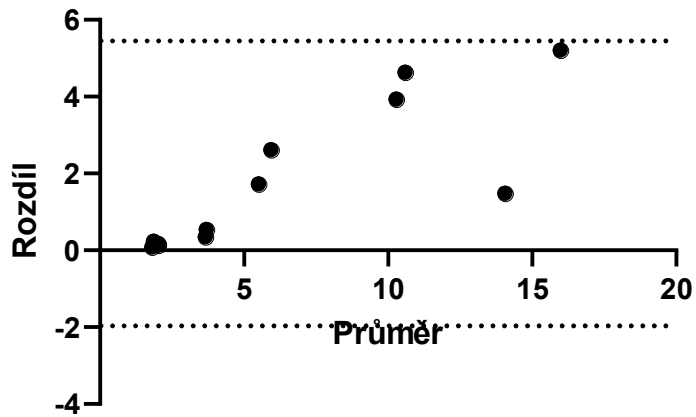
Výška píku 7.4.2021



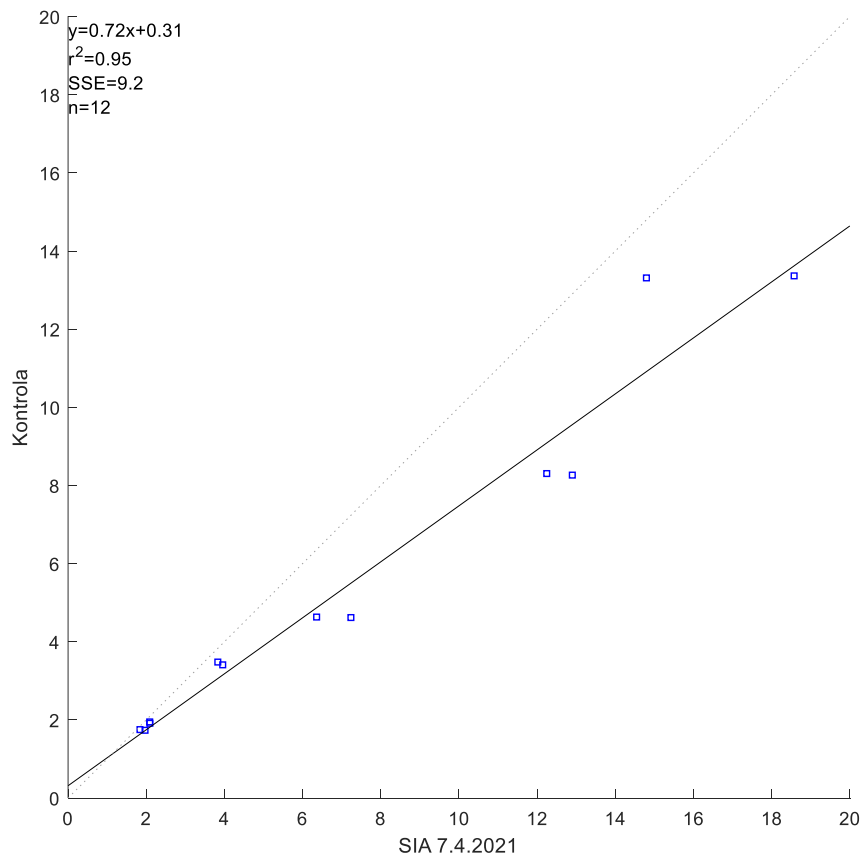
Tabulka 53 – Bland-Altman test

	1,763
SD of bias	1,894
95% Limits of Agreement	
From	-1,949
To	5,475

Rozdíl vs. průměr: Bland-Altman SIA 7.4.2021 a kontrola



Passing Bablok regrese



Statistické zpracování pro plochu pod píkem

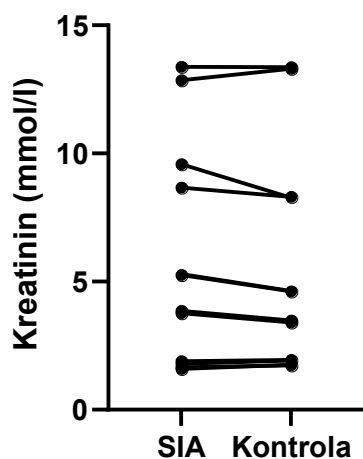
Tabulka 54 – Porovnávaná data vlevo hodnoty naměřené vyvinutou metodou, vpravo hodnoty získané změřením vzorku v klinické laboratoři

SIA	Kontrola
12,8558	13,312
1,8951	1,948
1,6545	1,734
8,6683	8,305
5,2509	4,619
3,7643	3,409
13,3827	13,364
1,7916	1,913
1,5936	1,751
9,586	8,265
5,2992	4,632
3,8569	3,48

Tabulka 55 – Wilcoxon test

Table Analyzed	Plocha pod píkem 7,4,2021
Column B	Kontrola
vs.	vs,
Column A	SIA
Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0,2334
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	23,00 , -55,00
Sum of signed ranks (W)	-32
Number of pairs	12
Number of ties (ignored)	0
Median of differences	
Median	-0,187
How effective was the pairing?	
rs (Spearman)	0,986
P value (one tailed)	<0,0001
P value summary	****
Was the pairing significantly effective?	Yes

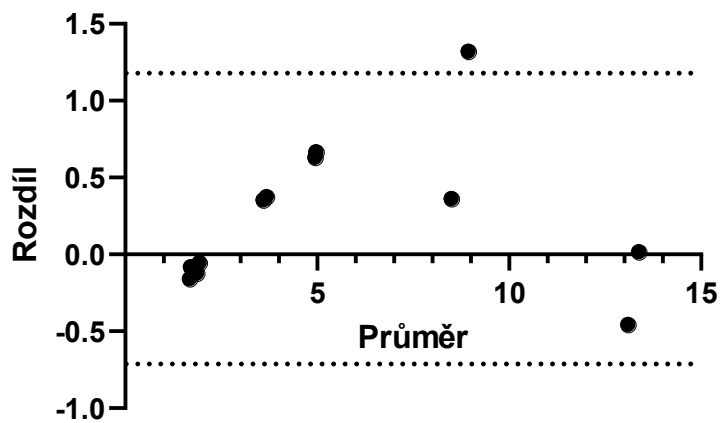
Výška píku 7.4.2021



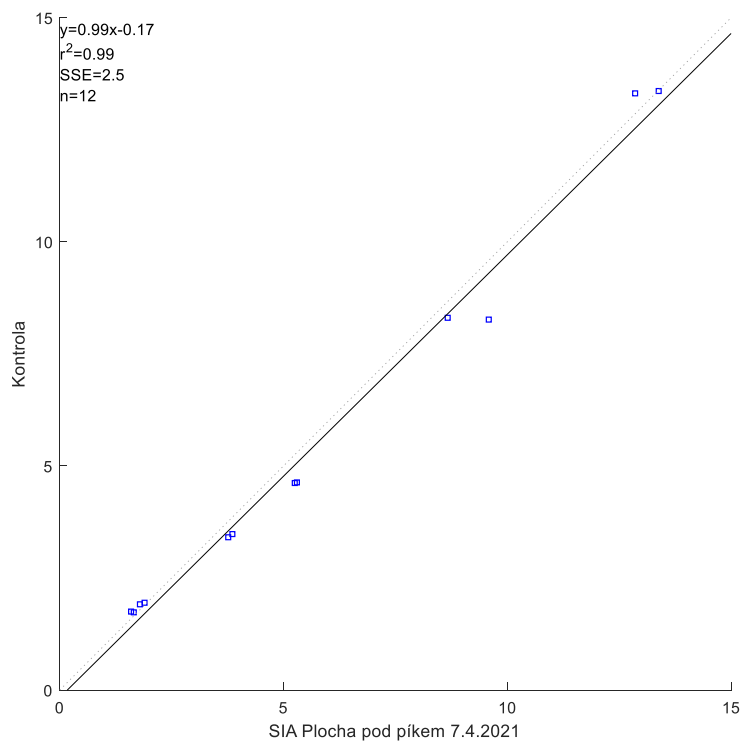
Tabulka 56 – Bland-Altman test

	0,2389
SD of bias	0,4826
95% Limits of Agreement	
From	-0,707
To	1,185

Rozdíl vs. průměr: Bland-Altman SIA 7.4.2021 a kontrola



Passing Bablok regrese



6. DISKUZE

Metodu se povedlo optimalizovat a výsledné parametry jsou:

- Sorbent - SPH Iontosorb 100
- Promývací činidlo – 50% acetonitril, nasáváno 0,5 ml
- Eluční činidlo – 1% vodný roztok hydroxidu amonného, nasáváno 0,5 ml
- Vzorek ředěný kyselinou octovou o pH 2,4, nasáváno 20 μ l, nebo 10 μ l podle koncentrace vzorku (rozhodnutí o změně nasávaného objemu metoda provede sama, v programu je rozhodovací algoritmus)
- Pro zjištění koncentrace vzorku je používána metoda standardního přídávku. Používá se standard o koncentraci 2mg/l v nástricích 0, 10, 20 μ l.
- Měří se absorbance při 235 a 270 nm, do výpočtů se používá jejich rozdíl.

Vyvinutá metoda ve srovnání s metodou používanou v klinické praxi (v tomto případě byla jako srovnávací metoda použita enzymatická reakce založená na reakci Fossatiho, Prencipeho a Bertiho, princip popsán v teoretické části) podává velmi podobné výsledky a na rozdíl od ní používá méně nebezpečná činidla. Vyvinutá metoda příjemně překvapila méně častou potřebou měnit kolonu (při několikadenním měření ji bylo potřeba vyměnit až čtvrtý až pátý den, platí až pro druhý rozměr). Do klinického provozu se vyvinutá metoda zatím nehodí z důvodu přístrojové náročnosti (v klinických laboratořích většinou není průtokový systém přítomen, většinou se používá kyvetový analyzátor).

7. ZÁVĚR

Cíle diplomové práce se podařilo naplnit. Byla vyvinuta metoda, která využívá spojení SPE extrakce a průtokové metody SIA. Tato metoda má chybovost při opakovaném měření do 5 %. Při porovnání s metodou používanou v klinické laboratoři podává vyvinutá metoda statisticky podobné výsledky. Vyvinutá metoda je připravena pro další rozšíření.

8. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Guide to Solid Phase Extraction. Supelco Bulletin 910 [online]. Sigma Aldrich, 1998 [cit. 2021-08-17]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/572/614/4538.pdf>
- [2] Novosvětská, L., Chocholouš, P., Švec F. et al. Fully automated method based on on-line molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for determination of lovastatin in dietary supplements containing red yeast rice. *Anal Bioanal Chem* 411, 1219–1228 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1554-0>
- [3] Pichon, V. Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. *J Chromatogr A*. 2007;1152(1–2):41–53
- [4] Nováková, L. Moderní trendy v přípravě vzorku pro analýzu separačními technikami [přednáška]. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 14. 11. 2017.
- [5] Buszewski, B., Szultka, M. (2012) Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42:3, 198-213, DOI: 10.1080/07373937.2011.645413
- [6] Poole, C. F. New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2003, 22(6), 362-373. DOI: 10.1016/S0165-9936(03)00605-8. ISSN 01659936.
- [7] Żwir-Ferenc, A., Biziuk, M. Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. *Polish J. of Environ. Stud.* 2006, 15(5), 677-690. ISSN 1230-1485.
- [8] Calderilla, C., Maya, F., O. Leal, L., Cerdà, V. Recent advances in flow-based automated solid-phase extraction, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 108, 2018, Pages 370-380, ISSN 0165-9936, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.011>.
- [9] Růžička, J., Chocholouš, P., Flow injection analysis, *Tutorial & News on FLOW Based micro Analytical Techniques*, (2019) Edition, [online], [citováno dne: 3.8.2021] Dostupné z: www.flowinjectiontutorial.com
- [10] Růžička, J, Marshall, G. D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays, *Analytica Chimica Acta*, Volume 237, 1990, Pages 329-343, ISSN 0003-2670, [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)83937-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)83937-9).
- [11] Růžička, J., Hansen, E. H. Flow injection analysis. Second edition. New York: John Wiley, 1988, 498 stran : černobílé ilustrace ; 24 cm. ISBN 0471813559.
- [12] Hansen, E. H. Flow injection analysis. Lyngby: Technical University of Denmark, 1986, x, 139 s. : il., tab. ISBN 87-502-0636-2.

- [13] Economou, A. (2005). Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 24. 416-425. 10.1016/j.trac.2004.12.004.
- [14] Paseková, H., Polášek, M. A, Solich, P. Sekvenční injekční analýza. *Chemické listy*. 1999, 93(6), 354-359. ISSN 1213-7103.
- [15] Racek, J. *Klinická biochemie / Jaroslav Racek et al.* 2006. ISBN 8072623249.
- [16] Sitter, T. [Serum creatinine and estimated glomerular filtration rate]. *MMW Fortschritte der Medizin* [online]. 2021, 163(10), 50-51 [cit. 2021-8-30]. ISSN 16133560. Dostupné z: doi:10.1007/s15006-021-9853-3
- [17] Fossati, P, Prencipe, L, Berti, G. Enzymic creatinine assay: A new colorimetric method based on hydrogen peroxide measurement. *Clin Chem*. 1983;29(8):1494–1496
- [18] Volbeda, M, Hessels, L, Posma, RA, Bakker, SJ, Nijsten, MW. Time courses of urinary creatinine excretion, measured creatinine clearance and estimated glomerular filtration rate over 30 days of ICU admission. *J Crit Care*. 2021 Jun;63:161-166. doi: 10.1016/j.jcrc.2020.09.017. Epub 2020 Sep 24. PMID: 32994085.
- [19] Uçucu, S. , Ayan, D. Comparison of the diagnostic accuracy of CKD-EPI cystatin-C, CKD-EPI creatinine and 24-hour creatinine clearance for estimating GFR: a preliminary study *Cukurova Medical Journal* 46 (2021): 1-10 <<https://dergipark.org.tr/tr/pub/cumj/issue/59504/783433>>.
- [20] Giavarina, D., Understanding Bland Altman analysis, *Biochemia Medica* (2015), 25(2), 141–151.
- [21] Bilić-Zulle, L., Comparison of methods: Passing and Bablok regression, *Biochemia Medica* (2011), 21(1), 49-52.
- [22] Passing, H., Bablok, A., A New Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (1983), 21, 709-720.]
- [23] Tymecki, Ł., Korszun, J., Strzelak, K., Koncki, R. Multicommutated flow analysis system for determination of creatinine in physiological fluids by Jaffe method, *Analytica Chimica Acta*, Volume 787, 2013, Pages 118-125, ISSN 0003-2670, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.05.052>.
- [24] Sumonmarn Chaneam, Kamparnart Kaewyai, Thitirat Mantim, Rasamee Chaisuksant, Prapin Wilairat, Duangjai Nacapricha, 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*, Volume 1073, 2019, Pages 54-61, ISSN 0003-2670, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.003>.

[25] 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*, Volume 1135, 2020, Pages 116-122, ISSN 0003-2670, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.08.017>.

[26] Kučerová, K., Kujovská Krčmová, L., Mikanová, Z., Matysová, L., Melichar, B., Švec, F. Determination of urinary retinol and creatinine as an early sensitive marker of renal dysfunction, *Journal of Chromatography A*, Volume 1607, 2019, 460390, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460390>.

[27] Fava, E. L., Prado, T. M. do, Garcia-Filho, A., Silva, T. A., Cincotto, F. H., Moraes, F. C. de, Faria, R. C., Fatibello-Filho, O., Non-enzymatic electrochemical determination of creatinine using a novel screen-printed microcell, *Talanta*, Volume 207, 2020, 120277, ISSN 0039-9140, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120277>.