



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

NOVÉ POSTUPY PRO AUTONOMNÍ ANALÝZY SUCHÝCH KREVNÍCH SKVRN POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

NEW PROCEDURES FOR AUTONOMOUS ANALYSES OF DRIED BLOOD SPOTS BY CAPILLARY
ELECTROPHORESIS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Sylvie Profousová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Miloš Dvořák, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1965/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Sylvie Profousová**
Studijní program: Chemie přírodních látek
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Miloš Dvořák, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Nové postupy pro autonomní analýzy suchých krevních skvrn pomocí kapilární elektroforézy

Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární rešerši popisující využití suchých krevních skvrn v klinické analýze, současné techniky pro automatizovanou analýzu DBS a využití kapilární elektroforézy pro standardní a automatizované analýzy DBS.
2. Otestujte nové postupy pro odběry DBS, které eliminují využití porézních odběrových substrátů.
3. Nově navržené postupy pro bez-substrátové odběry krevních vzorků aplikujte na další vybrané klinicky významné analyty.
4. Výsledky dosažené pro nově navržené bez-substrátové odběry DBS a pro standardní odběry DBS porovnejte a výsledky diskutujte s ohledem na míru kontaminace, přesnosti odběrů a uživatelskou přívětivost.

Termín odevzdání diplomové práce: 29.4.2024:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Sylvie Profousová
studentka

Ing. Miloš Dvořák, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Již nějakou dobu jsou v klinické analýze populární odběry kapilární krve, které se získávají v podobě suchých krevních skvrn (DBS) na DBS odběrové karty. Při diagnostice a monitorování metabolických poruch a onemocnění jsou ale cílové analyty (např. anorganické a organické ionty) vyšetřovány z krevní plazmy nebo séra. Stanovení z kapilární krve nebo ze vzorků DBS není pro tyto analyty standardem a nejsou pro ně k dispozici referenční hodnoty z důvodu odlišné kompozice plazmy/séra a kapilární krve. Bylo zjištěno, že odběrové DBS sorbenty uvolňují do výsledného eluátu mnohé ionty, které mohou eluát kontaminovat, a spolu s vlivem hematokritu krve a zadržováním cílových analytů mohou negativně ovlivňovat kvantitativní analýzu DBS vzorků. Z těchto důvodů se diplomová práce zabývá návrhem alternativního konceptu odběru DBS, který by eliminoval využití odběrových sorbentů a zajistil přesné odběry definovaného objemu krve. Experimentální část se zaměřuje na stanovení vybraných anorganických a organických iontů (NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , mravenčanů, laktátů a octanů) metodou kapilární elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí (CE-C⁴D). Všechny tyto ionty jsou obsaženy v krvi a současně se mohou uvolňovat jako kontaminanty z odběrových DBS sorbentů. Pro bezsorbentové odběry DBS byla použita neporézní polypropylenová vialka. Do této vialky byla přenesena malá kapka krve o přesném objemu (např. 5 μl), která byla následně přímo ve vialce usušena. Zvolená vialka je vhodná pro přímou eluci DBS i analýzu DBS eluátu a je plně kompatibilní s dávkovacími systémy komerčních CE přístrojů. Navržený koncept bezsorbentových odběrů krve eliminoval nežádoucí kontaminaci a ukázal se vhodný pro stanovení testovaných kationtů a aniontů. Stabilita aniontů byla obecně nižší než stabilita kationtů, ale v porovnání se standardně používanými odběrovými sorbenty byla stále výrazně lepší. Stanovení některých aniontů se ukázalo jako přijatelné pouze v době 0–48 hodin po zaschnutí bezsorbentového DBS vzorku (skladovaného při laboratorní teplotě), jelikož docházelo k průběžnému zvyšování jejich obsahu. To bylo pravděpodobně způsobeno mikrobiálním rozkladem krevní matrice. Bylo ověřeno, že tento nárůst může být zpomalen uchováváním bezsorbentových vzorků DBS při nízkých teplotách. Pro bezsorbentové DBS vzorky byly navrženy různé postupy odběrů krve, které jsou jednoduché, ekonomické, pohodlné a opakovatelné a jsou tedy vhodné jak pro domácí samoodběry, tak i pro odběry ve zdravotnických centrech. Jedná se o základní pilotní studii aplikovanou pouze na vybrané analyty, které sloužily jako modelový příklad. Pro rozvoj tohoto směru budou v návaznosti na tuto diplomovou práci pokračovat další obsáhlejší vědecké studie tohoto nově navrženého konceptu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Suché krevní skvrny, kapilární elektroforéza, kontaminace, bezsorbentové odběry vzorků, anorganické kationty, anorganické a organické anionty

ABSTRACT

Collection of capillary blood in the form of dry blood spot (DBS) samples on cellulose sampling cards has been popular in clinical analysis for some time. However, in the diagnosis and monitoring of metabolic disorders and diseases, target analytes (e.g. inorganic and organic ions) are examined from blood plasma or serum. Determination of the target analytes from capillary blood or DBS samples is not the standard and reference values are not available due to the different composition of plasma/serum vs. capillary blood. Moreover, DBS sorbents have been found to release several ions into DBS eluates resulting in their contamination and, together with the effect of blood hematocrit and retention of target analytes, can adversely affect the quantitative analysis of DBS samples. For these reasons, this thesis addresses the design of an alternative concept for DBS collection that would eliminate the use of sampling sorbents and ensure the collection of a defined and precise volume of blood. The experimental part focuses on the determination of selected inorganic and organic ions (NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , formate, lactate, and acetate) by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection (CE-C⁴D) in various DBS samples. All these ions are present in blood at different concentrations and can be simultaneously released as contaminants from the DBS sorbents. A non-porous polypropylene vial was used for the novel sorbentless DBS collection. A small drop of blood of defined volume (e.g. 5 μl) was transferred into this vial and then dried directly therein. The selected vial is suitable for both direct DBS elution and DBS eluate analysis and is fully compatible with autosamplers of commercial CE instruments. The proposed concept of the sorbentless blood collection eliminated unwanted contamination and proved suitable for the determination of the tested cations and anions. The stability of anions was generally lower than that of cations but was still significantly better compared to standard DBS sampling sorbents. Determination of some anions appeared to be acceptable only within 0–48 hours after drying of the sorbentless DBS samples (stored at laboratory temperature), as there was a continuous increase in their content. This was probably due to microbial degradation of the blood matrix. It was confirmed that this increase could be slowed down by storing sorbentless DBS samples at low temperatures. Different blood sampling procedures have been proposed for sorbentless DBS collection that are simple, economical, convenient, and repeatable and are therefore suitable for patient-centric blood sampling as well as for sampling in medical centers. This is a basic pilot study applied only to selected analytes that served as model examples, nevertheless, based on this thesis, more extensive scientific studies will follow up to further develop the new concept of sorbentless DBS collection.

KEYWORDS

Dried blood spots, capillary electrophoresis, contaminations, sorbentless sampling, inorganic cations, inorganic and organic anions

PROFOUSOVÁ, Sylvie. *Nové postupy pro autonomní analýzy suchých krevních skvrn pomocí kapilární elektroforézy*. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156539>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Miloš Dvořák.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem svou závěrečnou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího závěrečné práce a všechny použité literární zdroje správně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat Ing. Miloši Dvořákovi, Ph.D. za vstřícný přístup, jeho odborné rady, trpělivost a věnovaný čas během vedení mé diplomové práce. Rovněž bych ráda poděkovala RNDr. Pavlu Kubáňovi, Ph.D., DSc. za poskytnutou příležitost podílet se na vědecké činnosti na oddělení elektromigračních metod na Ústavu analytické chemie Akademie věd ČR, v. v. i.. A v neposlední řadě patří velké díky i mé rodině a blízkým za podporu v průběhu celé doby studia.

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1	Metoda suchých krevních skvrn.....	11
2.1.1	Výhody DBS.....	11
2.1.2	Nevýhody DBS.....	12
2.1.3	Odběrové karty.....	13
2.1.3.1	Výběr typu sorbentu pro přípravu DBS.....	13
2.1.3.2	Interference pocházející z odběrového sorbentu.....	14
2.1.3.3	Objem vzorku.....	14
2.1.4	Odběr krve.....	14
2.1.4.1	Proces sušení a skladování.....	15
2.1.5	Příprava vzorku.....	15
2.2	Nevolumetrická odběrová zařízení.....	15
2.2.1	Whatman.....	16
2.2.2	Ahlstrom.....	16
2.2.2.1	Výhody neolumetrických odběrových zařízení.....	16
2.2.2.2	Nevýhody neolumetrických odběrových zařízení.....	17
2.3	Volumetrická odběrová zařízení.....	17
2.3.1	VAMS – Mitra.....	17
2.3.1.1	Výhody VAMS – Mitra.....	18
2.3.1.2	Nevýhody VAMS – Mitra.....	18
2.3.2	Capitainer-B.....	18
2.3.2.1	Výhody Capitainer-B.....	19
2.3.2.2	Nevýhody Capitainer-B.....	19
2.3.3	HemaPEN.....	19
2.3.3.1	Výhody HemaPEN.....	20
2.3.3.2	Nevýhody HemaPEN.....	20
2.3.4	HemaXis DB 10.....	20
2.3.4.1	Výhody HemaXis DB 10.....	20
2.3.4.2	Nevýhody HemaXis DB 10.....	21
2.4	Techniky zpracování DBS.....	21
2.5	Analýza DBS vzorků.....	22
2.6	Instrumentace kapilární elektroforézy.....	23
2.6.1	Kapilární elektroforéza s bezkontaktní vodivostní detekcí CE-C ⁴ D.....	24
2.7	Využití DBS.....	25

2.7.1 Stanovení základních biochemických parametrů.....	25
2.7.1.1 Sodík Na	26
2.7.1.2 Draslík K.....	27
2.7.1.3 Vápník Ca	27
2.7.1.4 Hořčík Mg.....	28
2.7.1.5 Amoniak NH ₃	28
2.7.1.6 Chloridy Cl ⁻	28
2.7.1.7 Laktát Lac	29
2.7.1.8 Dusitany NO ₂ ⁻ , Dusičnany NO ₃ ⁻	29
2.7.1.9 Sírany SO ₄ ²⁻	30
2.7.1.10 Mravenčany HFO	30
2.7.1.11 Octany HAc	30
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
3.1 Použité chemikálie.....	32
3.1.1 Chemikálie pro elektroforetické stanovení	32
3.1.2 Standardy iontů	32
3.2 Příprava roztoků	32
3.2.1 Základní elektrolyt (BGE) pro analýzu kationtů.....	32
3.2.2 Základní elektrolyt (BGE) pro analýzu aniontů.....	32
3.2.3 Kalibrační roztoky.....	33
3.2.3.1 Kalibrační roztoky pro analýzu kationtů.....	33
3.2.3.2 Kalibrační roztoky pro analýzu aniontů.....	33
3.2.4 Reálné vzorky DBS.....	33
3.2.4.1 Příprava DBS na odběrových kartách.....	33
3.2.4.2 Příprava DBS v polypropylenových vialkách.....	33
3.2.4.3 Příprava rozpuštěné kapilární krve	34
3.2.5 Ostatní roztoky	34
3.3 Použité laboratorní pomůcky.....	34
3.4 Použité přístroje.....	34
3.4.1 Laboratorní sestava kapilární elektroforézy s vodivostní detekcí (CE-C ⁴ D).....	34
3.4.2 Komerční CE-C ⁴ D sestava.....	35
4 VÝSLEDKY A DISKUSE.....	36
4.1 Analýza anorganických kationtů ve vzorcích krve	36
4.1.1 Výběr analytů.....	36
4.1.2 Výběr BGE.....	36
4.1.3 Nová koncepce způsobů odběrů DBS.....	36
4.1.4 Analýzy různých velikostí průměrů výřezů odběrové karty.....	37

4.1.5	Analýzy DBS a rozpuštěné kapilární krve	39
4.1.6	Analýzy různých odběrových sorbentů.....	41
4.1.7	Analýza stability DBS.....	43
4.1.8	Experimentální stanovení reálných koncentrací v kapilární krvi a v sorbentu ...	46
4.2	Analýzy organických a anorganických aniontů ve vzorcích krve	47
4.2.1	Výběr analytů.....	47
4.2.2	Výběr BGE.....	47
4.2.3	Analýzy různých velikostí průměrů výřezů odběrové karty	47
4.2.4	Analýzy stability DBS během procesu schnutí a skladování.....	50
4.2.5	Analýzy DBS a rozpuštěné kapilární krve	53
4.2.6	Analýzy porézních odběrových sorbentů.....	54
4.2.7	Experimentální stanovení reálných koncentrací	56
4.3	Návrh postupů bezsorbentových odběrů DBS	58
5	ZÁVĚR.....	62
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64

1 ÚVOD

Během posledních let došlo k rozvoji techniky suchých krevních skvrn (DBS) a vzrostl zájem o její používání pro kvantitativní bioanalýzy, zejména ve farmaceutickém průmyslu či výzkumných centrech [1]. V roce 1963 Guthrie a Susi představili techniku DBS pro screening fenylketonurie u novorozenců a časem si získávala popularitu. Dodnes je základem novorozeneckého screeningu po celém světě a v nedávné době se rozšířila do mnoha vědeckých oblastí (epidemiologické, farmakologické a toxikologické studie, terapeutické monitorování léčiv, testování dopingových látek atd.) [2, 3]. Vzorky DBS se nejčastěji připravují z kapilární krve, která se odebírá z prstu nebo paty po vpichu lancetou a je obvykle nanášena na odběrovou kartu, kde zaschne [4].

Bylo prokázáno, že technika odběru DBS má ve srovnání s konvenčním žilním odběrem mnohostranné výhody. Mezi nejvýznamnější výhody patří: (a) menší objem odebrané krve (μl); (b) minimální rizika bakteriální kontaminace a/nebo hemolýzy; (c) neinvazivní, méně bolestivý a ekonomický odběr krve; (d) vyšší stabilita analytů i po delší dobu skladování (v řádu dnů až měsíců); (e) možnost provádět samoodběry v domácím prostředí [4].

Ačkoli je DBS zajímavou technikou odběru vzorků, tak se kromě uvedených výhod potýká také s několika problémy [5]. Jednou z nevýhod pro použití DBS jsou chybějící referenční hodnoty pro cílové analyty, které jsou obvykle definované pouze pro vzorky plazmy nebo séra. Významným problémem DBS je nestejná velikost a nerovnoměrné rozprostření krve ve skvrnách, ke kterým dochází v důsledku různých hladin hematokritu, a které mohou mít vliv na kvantitativní analýzu [6]. Tomuto efektu se lze jednoduše vyhnout analýzou celých skvrn namísto použití jejich částí. Analýza celé DBS poskytne správné údaje pouze tehdy, pokud je na odběrovou kartu nanášen přesný a známý objem krve, což může být náročný úkol, pokud není proveden pomocí volumetrických odběrových zařízení (např. pipet) ve vybavené laboratoři s vyškoleným personálem [5, 7].

V současné době se většina vzorků DBS odebírá na odběrové karty na bázi celulózy [1]. Některé z nevýhod (např. vliv hematokritu krve, snížená výtěžnost analytů při eluci či nekontrolovaný odběr objemu vzorku) tak vedly k vývoji nových odběrových materiálů a zařízení, které představují atraktivní a uživatelsky přívětivé alternativy pro odběr krve. Jedná se například o zařízení HemaPEN, Capitainer-B či Mitra [8].

Velkou nevýhodou porézních sorbentů pro odběr DBS vzorků může být přítomnost látek z procesů jejich přípravy a výroby, které se mohou uvolnit během zpracování krevního vzorku, kontaminovat výsledný eluát a potenciálně ovlivnit kvantitativní analýzu [4]. Jedná se například o klinicky významné anorganické a organické ionty (např. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , mravenčany, octany), které se využívají při diagnostice a monitorování metabolických poruch a onemocnění [9].

Stanovení těchto anorganických a organických iontů umožňuje například technika kapilární elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí (CE- C^4D), která je užitečným nástrojem při analýzách široké škály organických a biochemických sloučenin v řadě biologických vzorků. Kromě rozmanitého rozsahu použití dosahuje CE- C^4D vynikajících analytických parametrů jako je vysoká separační účinnost, krátké separační časy, minimální požadavky na objem vzorku a jednoduché přístrojové vybavení.

Možnými nevýhodami ve srovnání s chromatografickými technikami je její nižší robustnost, nižší citlivost detekce a nižší opakovatelnost při práci se složitými vzorky [10, 11].

Cílem této diplomové práce je navrhnout a otestovat nové postupy odběrů DBS, které nebudou využívat odběrové sorbenty a mohou eliminovat tři hlavní nevýhody současných odběrů DBS: vliv hematokritu krve, kontaminaci eluátu DBS a zadržování cílových analytů sorbenty pro odběr vzorků. Pro tento, tzv. bezsorbentový odběr budou otestovány různé neporézní odběrové vialky a bude studováno několik souvisejících parametrů (opakovatelnost odběrů DBS, stabilita analytů DBS a míra kontaminace eluátu DBS). Dále budou navrženy jednoduché, ekonomické a opakovatelné postupy odběrů malých objemů krve a jejich následného přenesení do vialky vhodné pro domácí samoodběry a i pro odběry ve zdravotnických centrech.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Metoda suchých krevních skvrn

Lidská krev se odebírá převážně v "mokrém" formátu a jako žilní krev (sérum nebo plazma) je nejpreferovanější a právními předpisy uznávanou biologickou maticí [1, 5].

Buňky ve zkumavkách pro odběr vzorků při skladování po dobu několika hodin nebo dnů rychle degradují. Tento hlavní problém vedl k vývoji mnoha metod, které umožňují uchování krve a krevních buněk po dobu několika dnů nebo dokonce až mnoha let [2].

Ivar Christian Bang, otec moderní klinické mikrochemie, se v roce 1913 stal průkopníkem metody odběru vzorků suché krve (DBS) pro stanovení glykémie. Později Guthrie a Susi v roce 1963 představili techniku suché krevní skvrny pro screening fenylketonurie u novorozenců a poté si metoda DBS získala popularitu v bioanalýze [2, 3, 12]. Ačkoli konkrétní test již není používán, termín "Guthrieho karta" zůstává pro hovorové označení techniky odběru suché krevní skvrny, která je dodnes základem dnešních programů novorozeneckého screeningu po celém světě [12, 13]. Jedná se o filtrační papír, který je navržen tak, aby usnadnil odběr správného množství krve a zároveň zajistil sběr správných údajů o pacientovi [3].

2.1.1 Výhody DBS

Analýza krve hraje ústřední roli v biomedicínském výzkumu a zdravotní péči [2]. V posledních několika letech došlo k rychlému rozvoji odběru vzorků suchých krevních skvrn (DBS) a vzrostl zájem jejich používání pro kvantitativní bioanalýzy, který byl odvozený od snadného postupu odběru vzorku, kdy se kapka krve nanese na odběrovou kartu [3, 14].

Kromě toho je prokázáno, že technika odběru DBS má ve srovnání s konvenčním žilním odběrem řadu výhod [7, 15, 16]. Výhody jsou mnohostranné a týkají se etických, ekonomických, praktických a vědeckých hledisek [17, 18]. V porovnání s konvenčními postupy odběru žilní krve, které jsou invazivní a bolestivé, je odběr DBS pohodlnější a jednodušší metodou odběru vzorků, která je pro pacienta komfortnější [1, 15]. Odběr vzorků pomocí DBS obvykle vyžaduje méně krve (obvykle několik desítek mikrolitrů) a představuje méně invazivní způsob (např. vpichem do prstu) získání požadovaných vzorků u pacientů a dobrovolníků, zejména se jedná o užitečnou metodu u dětí nebo novorozenců [1, 13, 15]. Kombinace méně invazivního odběru vzorků a odstranění nutnosti odebírat plazmu nebo sérum navíc znamená, že klinické studie lze snadněji provádět v oblastech bez přístupu k plně vybaveným klinickým laboratořím a pacienti mohou s jasnými instrukcemi a po odpovídajícím zaškolením provést odběr z prstu sami doma, aniž by byl nutný vyškolený lékař, zdravotní sestra či flebotomik [1, 15–17].

Další výhodou metody DBS oproti konvenčnímu odběru vzorků je možnost pohodlné přepravy a skladování vzorků při okolní teplotě a jejich klasifikace jako biologicky nezávadných, což umožňuje realizovat přepravu běžnými poštovními a zásilkovými společnostmi [5, 13–15]. Adsorpce a sušení krve na pevné fázi zajišťují, že analyty jsou obvykle méně reaktivní než v (tekuté) krvi a jsou tak považovány za méně nebezpečné a vykazující zvýšenou stabilitu v okolních podmínkách, a to nejméně po dobu několika dnů (v některých případech až několika měsíců) pouze s několika bezpečnostními opatřeními (vzorky zabalené v uzavřených sáčcích s vysoušedlem) [1, 13, 15].

DBS vzorky lze přepravovat nebo převážet bez důvodného očekávání, že se manipulující osoby dostanou do kontaktu s krví nebo jiným biologicky nebezpečným materiálem, díky tomu, že všechny proteiny, patogeny a enzymy jsou na kartě inaktivovány a je zabráněno růstu bakterií [15]. Tyto faktory činí z odběru vzorků pomocí DBS ideální postup pro odběr vzorků v terénu, protože odpadá nutnost skladovat a přepravovat vzorky bez nutnosti chlazení a nákladného skladování vzorků [6, 14, 17].

Jak lze očekávat, všechny výše uvedené výhody pozitivně ovlivňují celkové náklady, avšak musí být k dispozici vhodná analytické metody, které jsou schopny identifikovat a kvantifikovat cílové analyty v hladinách předpokládaných v několika mikrolitrech suché krve [5, 11].

2.1.2 Nevýhody DBS

Ačkoli je DBS zajímavou technikou odběru vzorků, tak se kromě uvedených výhod potýká také s několika problémy, které je třeba pochopit, aby bylo možné získat vysoce kvalitní kvantitativní výsledky stejně jako u každé jiné techniky [5, 7, 14].

Malý objem krve, který je jednou z výhod DBS, omezuje možnost provádění opakovaných analýz a současně vyžaduje vysoce citlivé a specifické testy pro detekci a kvantifikaci [5, 12]. Zpracování DBS bývá i obvykle časově a pracovně náročné [5].

Nevýhodou pro použití DBS je, že referenční hodnoty pro cílové analyty mohou být k dispozici pouze pro vzorky plazmy nebo séra [6]. Koncentrace analytů v kapilární a žilní krvi se může odlišovat, protože kompozice DBS se skládá z krevních buněk, plazmy a intersticiální tekutiny [15]. Proto může být nezbytné provést srovnávací studii mezi DBS z plné krve a vzorky séra nebo plazmy [6].

Nejvýznamnějším problémem DBS je nerovnoměrné rozprostření krve v důsledku různých hladin hematokritu (HCT) (objemové zastoupení erytrocytů v celkovém objemu krve), což může mít vliv na platnost výsledků, neboť ovlivňuje tvorbu skvrn, jejich velikost, dobu sušení, homogenitu a v konečném důsledku i robustnost a reprodukovatelnost testů [5, 6, 17]. HCT je přímo úměrný viskozitě krve. Krev s nižší hodnotou HCT má nižší viskozitu ve srovnání s krví s vyšším HCT, a proto se nižším HCT při daném objemu krve vytvoří větší skvrna [14, 19]. Může mít tak přímý vliv na kvantitativní přesnost analýzy ve vybrané frakci [6]. HCT se liší podle věku, pohlaví, zdravotního stavu a mírně i podle etnické příslušnosti. Referenční rozmezí se liší podle zdrojů, ale obvykle se pohybuje v rozmezí 40–50 % u dospělých mužů a 35–45 % u dospělých žen [13]. Kapilární krev má obvykle vyšší hematokrit než krev venózní [19].

Bylo navrženo několik různých přístupů ke eliminaci nebo korekci výše uvedených nepříznivých účinků HCT na kvantitativní analýzu DBS [5, 7].

HCT efektu se lze jednoduše vyhnout analýzou celých skvrn namísto použití jejich částí, případně bylo navrženo používání perforovaných nebo předřezaných DBS karet. Celá DBS poskytne přesné údaje pouze tehdy, pokud je na odběrovou kartu nanesen kontrolovaný objem krve. Nanesení přesného objemu na kartu může být náročný úkol pokud není proveden pomocí pipety ve vybavené laboratoři s vyškoleným personálem [2, 8, 9].

Nejčastěji používanou metodou korekce HCT je standardizace HCT v kalibračních standardech blízkých očekávanému HCT vzorků. Jedná se o nejpraktičtější a nejjednodušší metodu korekce; kalibrační standardy jsou připraveny na zakázku, a proto je snadné kontrolovat HCT. Někdy je však zkreslení příliš velké a je třeba použít jinou metodu korekce [15].

Byla navržena korekce objemu krve stanovením obsahu draslíku nebo sodíku v DBS, nicméně tento přístup vyžaduje další přístrojové vybavení/analýzy. Rozdíly v objemech odebraných vzorků krve by mohly být také eliminovány zařízeními pro volumetrické absorpční mikrovzorkování (VAMS), která absorbují fixní objem krve, nebo korigovány měřením vodivosti konečného eluátu DBS před analýzou [5].

2.1.3 Odběrové karty

V minulosti se k odběru vzorků DBS používala řada různých materiálů. Základním požadavkem pro reprodukovatelnou kvalitativní a kvantitativní analýzu je, aby došlo k nejrovnoměrnějšímu rozprostření a absorpci vzorku krve v různých bodech odběrové karty, což ovlivňuje výběr materiálu karty, který bude použit, včetně jeho tloušťky a hustoty [1, 2, 16]. Vhodný výběr karty by měl vycházet z vlastností analytu a požadavků na jeho stabilizaci, účinnost eluce a metody analýzy [20]. V souladu s tím mohou rozdíly v těchto pevných nosičích ovlivnit výskyt interferencí, rozprostření krve, homogenitu vzorku a také stabilitu a výtěžnost analytu [1, 16].

2.1.3.1 Výběr typu sorbentu pro přípravu DBS

DBS karty se skládají z necelulózové nebo celulózové matrice o specifické tloušťce a velikosti pórů [1]. V současné době jsou k dispozici různé DBS karty podle typu analytických požadavků [1]. Komerčně dostupné odběrové karty mohou být buď neupravené (např. Whatman 903, Ahlström 226, Whatman FTA DMPK-C), nebo předupravené například denaturačními činidly nebo inhibitory enzymů (např. Whatman FTA DMPK-A, FTA DMPK-B a FTA Elute) [1, 4, 15].

Karty Whatman 903 se v zásadě používají při screeningu novorozenců, karty Whatman FTA DMPK typu A, B, C se používají pro odběr mikroobjemových vzorků (10–20 μ l) při farmakokinetických a toxikokinetických studiích a karty FTA Elute jsou určeny především pro sběr a purifikaci DNA pro následnou analýzu [1, 15].

Karty bez impregnace chemickými látkami, které by mohly potenciálně narušovat bioanalýzu, mohou být lepší volbou pro analýzu biomolekul na bázi proteinů, protože nedochází k jejich denaturaci [1, 8].

Odběrové karty Whatman 903 a Ahlstrom 226 jsou registrovány americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA) jako zdravotnické prostředky třídy II [15]. Tyto karty jsou navíc doporučeny používat Institutem pro klinické a laboratorní standardy (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) a jsou schváleny Programem zajištění kvality novorozeneckého screeningu (Newborn Screening Quality Assurance Program, NSQAP) a také Centrem pro kontrolu a prevenci nemocí (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) [1, 12].

Dále se u některých metod založených na DBS používají předupravené odběrové karty pro zvýšení stability nebo výtěžnosti analytu [4]. Kromě toho byly jako sběrné sorbenty navrženy chitosanové a alginátové pěny, které pomáhají zvýšit výtěžnost analytu, protože se během eluce vzorku rozpouštějí [4, 18].

Ačkoli většina bioanalytických metod založených na DBS používá běžný, neupravený filtrační papír na bázi celulózy, pro určité aplikace může být cenné vyhodnotit použití předem upravených nebo necelulózových alternativ [4]. Příkladem necelulózového materiálu je karta Agilent Bond Elut DMS [15]. Uvádí se, že jsou lepší v podobě lepšího signálu hmotnostní spektrometrie (MS), menší námahy při vyrážení a homogenity skvrn nezávislé na hematokritu, protože neobsahují celulózu [1, 15].

2.1.3.2 Interference pocházející z odběrového sorbentu

Během počátečního vývoje metody se doporučuje analyzovat několik prázdných odběrových sorbentů, aby bylo možné posoudit, zda je samotný materiál sorbentu čistý a zda jsou přítomny nějaké interference, které je třeba oddělit od cílových sloučenin. Pokud nelze tyto interference eliminovat, pak lze zvážit použití jiných typů odběrových sorbentů [4].

2.1.3.3 Objem vzorku

Množství vzorku potřebné pro určitou analýzu závisí především na dolní mezi stanovitelnosti a je neodmyslitelně spojeno s dostupným přístrojovým vybavením [4]. Objem krve nanesený na odběrovou kartu ovlivňuje velikost vytvořeného DBS a také analytické výsledky [21]. Způsob odběru vzorku by se měl přizpůsoben pro minimální požadovaný objem krve [4].

2.1.4 Odběr krve

Dokument CLSI NBS01-A6 poskytuje návod na odběr krve na odběrovou kartu pro programy screeningu novorozenců z paty. Tyto postupy však lze aplikovat i na odběr vzorků z vpichů do prstů používaných pro klinické monitorování pacientů například s dědičnými metabolickými poruchami [21].

V současné době je nejčastěji používanou metodou nevolumentrický odběr vzorku kapky krve. Krevní skvrna je vytvořena volným nakápnutím krve nebo kontaktem prstu/paty v místě vpichu s odběrovou kartou [4]. Alternativně lze vzorek krve odebrat volumetricky pomocí kapiláry nebo pipety [4, 22]. Kromě toho existuje několik strategií odběru krve, při nichž lze volumetrický vzorek sušené krve vytvořit přímo z volné kapky krve bez použití pipety nebo ruční kapiláry. Mezi zařízení využívající tyto strategie patří například HemaXis, hemaPEN, Capitainer-B a VAMS [4].

Rovněž mohou při výběru metody odběru vzorků hrát důležitou roli i další parametry, jako je požadovaný objem vzorku, možnosti automatizace, komerční dostupnost, cena daného zařízení pro odběr mikrovzorků a také celkové náklady [4].

Komerční odběrová zařízení mají obvykle vytištěné kruhy s přerušovanými čarami o předem definovaném průměru (obvykle 10–12 mm), aby byl získán vzorek odpovídající velikosti [18, 21].

Proces odběru je jednoduchý a zahrnuje pouze několik kroků [18]. Po dezinfekci se pacient píchne do prstu lancetou, nejlépe automatickým zařízením pro propíchnutí kůže – autolancetou. První kapka krve je nevhodná pro analýzu z důvodu obsahu mezibuněčných materiálů (tkáňového moku), proto je otřena sterilní buničinou. Další kapka se odebere tak, aby vyplnila předem vyznačený kruh na odběrové kartě; jedna kapka do jednoho kruhu [15].

2.1.4.1 Proces sušení a skladování

Parametrem, který je u metod založených na DBS často opomíjen, je vliv doby sušení. Pokud není vzorek před uložením do uzavíratelného sáčku pro skladování zcela vysušen, může dojít k mikrobiologickému růstu a zhoršení kvality vzorku. Mimoto může nesprávné sušení také ovlivnit stabilitu a výtěžnost analytu [4].

Krev zachycená na odběrovou kartu musí být před transportem do laboratoře plně vysušena [21]. Proto se obecně doporučuje sušit vzorky vodorovně alespoň 2–4 hodiny za okolních podmínek (neměly by být vystaveny přímému slunečnímu záření) [1, 4, 21]. V určitých podmínkách však může být požadovaná doba sušení delší, protože závisí na okolní teplotě a vlhkosti, objemu vzorku a typu použité karty. V jiných podmínkách může stačit kratší doba sušení [1, 4].

Pro ochranu před vlhkostí se doporučuje DBS karty pečlivě zabalit a skladovat je v uzavíratelných plastových sáčcích s odpovídajícím vysoušedlem, které ze sušených vzorků odstraní dalších 5 % vody, a indikátorem vlhkosti, abychom zjistili, kdy je třeba vysoušedlo vyměnit [1, 4, 23].

2.1.5 Příprava vzorku

Příprava vzorků DBS pro analýzu vyžaduje odebrání a přenos části nebo celé skvrny z odběrové karty, aby se umožnila eluce analytu pro kvantifikaci [21]. U volumetricky nanesených objemů krve musí být velikost děrovače dostatečně velká, aby se vyrazila celá skvrna, nezávisle na HCT vzorku. Pro nevolumentrické skvrny se používají děrovače, které vylučují vnější okraj vzorku [4].

Vysušené karty lze vyrážet pomocí jednoduchých levných ručních vyrážecích nástrojů, poloautomatických a plně automatizovaných robotických vyrážecích systémů. Děrovače jsou komerčně dostupné a mají různé průměry vyrážecích hlav [1, 21].

Vyražené kruhové části lze eluovat vhodným elučním rozpouštědlem po přenesení do zkumavek nebo v mikrotitračních destičkách [1, 18, 24]. Byly popsány různé eluční metody pro analýzu DBS a většina analytů se běžně eluuje pomocí směsí vody a organických rozpouštědel (většinou metanolu nebo acetonitrilu). Optimální požadavky na eluci závisí na fyzikálních a chemických vlastnostech analytu [21]. Vzniklý eluát může být vysušen a rekonstituován vhodným rozpouštědlem, které je kompatibilní s požadavky na následnou analýzu [25].

2.2 Nevolumentrická odběrová zařízení

Odběrové karty jsou nyní k dispozici od několika výrobců. Většina karet je vyrobena z čisté celulózy a může obsahovat látky, které při kontaktu s buňkami lyzují a denaturují proteiny. Na komerčních kartách jsou vyznačeny kruhy pro odběry krve. Manipulace a analýza je jednoduchá a zahrnuje pouze několik kroků [18].

Komerčně jsou dostupné různé formy zachycení DBS, přičemž některé z nich uvádějí lepší účinnost eluce nebo stabilitu pro určité třídy analytů. Vhodný výběr karty by měl vycházet z vlastností analytu a jeho požadavků na stabilizaci, účinnosti eluce a metody analýzy. Mezi základní odběrové karty patří Whatman 903 a Ahlstrom 226 [20].

Karty Ahlstrom 226 jsou plně srovnatelné s kartami Whatman 903 Protein Saver card. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) nezjistila žádný rozdíl mezi vlastnostmi odběrových karet 903 vs. 226, které také poskytly srovnatelné výsledky napříč analyty a testovacími metodami [26].

2.2.1 Whatman

Karty Whatman 903 jsou nejběžněji používané pro sběr a uchovávání DBS v klinické péči a výzkumu [27]. Na každé kartě jsou v oblasti pro odběr vzorků předtištěny kruhy. Do každého kruhu se běžně vejde 75 až 80 μl vzorku. Obal má místa pro jméno a datum odběru, je potištěn univerzálním symbolem biologického materiálu a je vhodný pro skladování v uzavíratelných sáčcích [28].

Různé typy odběrových karet se liší svými fyzikálními vlastnostmi, jako je tloušťka, velikost pórů a retence částic. Nejpoužívanějšími typy karet jsou Whatman FTA, Whatman 903 a Whatman 31 ET CHR. Whatman FTA karty jsou navrženy pro analýzu nukleových kyselin. Existují různé typy karet Whatman FTA: FTA Elute, FTA DMPK-A, FTA DMPK-B a FTA DMPK-C. Whatman FTA Elute, DMPK-A a DMPK-B jsou ošetřeny chemikáliemi, které mohou lyzovat buňky a denaturovat proteiny, zatímco DMPK-C jsou neupravené [29].

Na druhou stranu karty 903 Protein Saver mají neošetřenou matici a jsou osvědčené pro odběr krve, moči a dalších biologických vzorků ve výzkumu, v laboratořích i terénu. Jsou vhodné zejména pro analýzu malých molekul a proteinů [30, 31].

2.2.2 Ahlstrom

Karty Ahlstrom poskytují spolehlivý a reprodukovatelný odběr vzorků, díky oblastem vytištěných na papíře, pro jejich vyplnění je třeba objem vzorku 50–75 μl [26, 32]. Kapka plné krve by měla být nanášena do středu oblasti odběru, aby byla umožněna radiální disperze k určenému okraji skvrny [12].

Společnost Ahlstrom vyvinula celé portfolio karet pro odběr vzorků. Mezi komerčně dostupné karty patří Ahlstrom BioSample a 5 circle, Ahlstrom GenSaver™ 2.0, GenSaver™ 2.0, GenSwab™, Ahlstrom GenReleaz™ a GenReleaz™ Color, Ahlstrom AutoCollect™, Ahlstrom HemaSep™ [33]. V předešlých letech byla dále dostupná karta Ahlstrom GenCollect™ 2.0.

Odběrové karty Ahlstrom BioSample a 5 circle jsou vyrobeny z bílých a čistých absorpčních papírů pro reprodukovatelný sběr a neobsahují žádné přísady nebo chemikálie pro odolnost vůči vlhkosti, čímž se minimalizují možné interference pro spolehlivé analytické výsledky [32, 33].

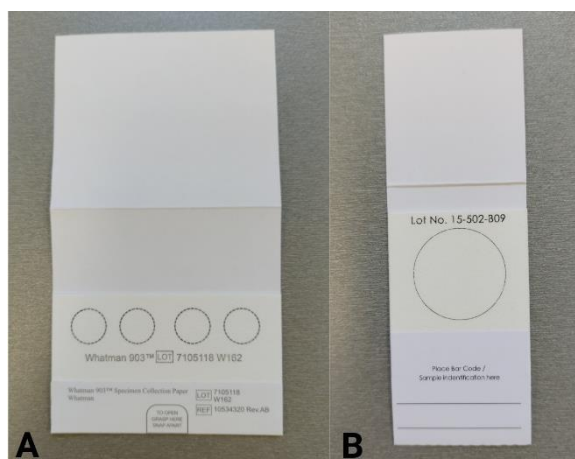
2.2.2.1 Výhody neolumetrických odběrových zařízení

Nevolumetrická odběrová zařízení jsou jednoduše navržena a cenově dostupná a jedná se o levnější variantu oproti volumetrickým odběrovým zařízením [34, 35]. Odběrové karty jsou ideální pro použití v jakémkoliv prostředí, jsou relativně robustní, umožňují odběr minimálních objemů krve pro analýzu a vyžadují méně potřebného vybavení oproti běžnému odběru žilní krve [33]. Na jedné odběrové kartě lze shromáždit více skvrn, což usnadňuje opakování a/nebo další analýzy. Dalšími výhodami je snadná manipulace s kartami a kompatibilita s automatizovaným laboratorním zpracováním.

Kromě toho i DBS vyrážecí zařízení jsou široce dostupná. Odběrové karty navíc obsahují dostatek prostoru pro záznam demografických údajů pacienta a nevytváří žádný plastový odpad [34, 35].

2.2.2.2 Nevýhody nevolumentrických odběrových zařízení

Hlavními nedostatky nevolumentrických odběrových zařízení jsou riziko kontaminace vzorku díky jejich otevřenému formátu a rozdílné objemy krve v jednotlivých vyražených discích o pevném průměru [35]. Další nevýhodou je nekontrolovaný odběr vzorku, tj. objem aplikované krve a kvalita vzorku [34].



Obrázek 1: Nevolumetrická odběrová zařízení (A...Whatman 903 Protein Saver Card, B...Ahlstrom GenCollect 2.0)

2.3 Volumetrická odběrová zařízení

2.3.1 VAMS – Mitra

V roce 2014 společnost Neoteryx dnes Trajan Scientific and Medical (Melbourne, Austrálie) představila zařízení Mitra založené na technologii volumetrického absorpčního mikrovzorkování (VAMS) jako alternativní řešení k tradiční technice DBS pro odběr různých biologických tekutin, jako je krev, sérum, plazma, moč a ústní tekutiny [8, 35–37]. Mitra je zařízením s výjimkou třídy 1 zařazeným na seznam FDA a samostatným certifikátem CE-IVD ve Spojeném království a EU [37].

Tato unikátní zařízení se skládají ze specifické absorpční polymerní špičky připevněné k plastové rukojeti, která umožňuje snadný přímý odběr konzistentního objemu krve (10, 20 nebo 30 μ l) v širokém rozsahu hodnot HCT (0,20 až 0,70) [8, 36–38]. Objem odebrané krve je dán množstvím a vlastnostmi polymerního sorbentu [35]. Zařízení Mitra jsou kompatibilní s automatizovanými systémy pro manipulaci s kapalinami, které zvyšují účinnost testování [34, 35].

Odběr vzorků se provádí přímým ponořením okraje špičky zařízení do kapky krve pod úhlem 45° [36, 38]. Špička absorbuje krev během několika sekund kapilárními silami [36]. Špička je připevněna k rukojeti a dále je zařízení uloženo do ochranné plastové kazety nebo pouzdra, aby nedošlo ke změně obsažného objemu nebo ke kontaminaci [38–40].

Po odběru krve by podle pokynů výrobce měla být špička vysušena za okolních podmínek, při pokojové teplotě minimálně po dobu 24 hodin [41]. Vysušené vzorky se poté skladují nebo přepravují k další laboratorní analýze [35, 36]. Zařízení Mitra jsou k dispozici v uzavíratelných sáčcích na vzorky s vysoušedlem a lze zařízení zabalit do praktických sběrných sad s pokyny, spotřebním materiálem pro odběr vzorků [40].

V současné době jsou vyvíjeny nové strategie volumetrického odběru vzorků využívající absorpční papírové disky (VAPD) a minidisky (VAPDmini), které kombinují principy odběrových karet a VAMS [8, 39].

2.3.1.1 Výhody VAMS – Mitra

Zařízení Mitra překonala téměř všechny nevýhody konvenčního vzorkování s několika dalšími výhodami. Odběrové sady obsahující více zařízení (2 nebo 4) jsou dostupné v různých velikostech pro různé objemy odebírané krve (10, 20 a 30 μL) [34]. Vzorky lze přepravovat nebo skladovat při pokojové teplotě [38].

Homogenita skvrny a vliv hladiny HCT jsou hlavními problémy spojenými s odběrem vzorků DBS, které VAMS snadno překonává, protože odebírá přesné množství biologické tekutiny a při eluci se používá celá špička [8, 36].

Toto zařízení umožňuje snadnou přípravu vzorku, protože odpadá krok centrifugace kapalně matrice a nutnost výřezu skvrny krve. Kromě toho je vzorkovač navržen tak, aby se vešel do manuálních nebo automatizovaných extrakčních zařízení [38].

2.3.1.2 Nevýhody VAMS – Mitra

Zařízení vyžaduje ruční odstranění špičky vzorku, což lze překonat použitím systémů pro manipulaci se vzorky a/nebo eluci vzorků. S těmito zařízeními je nutné pečlivě manipulovat jak při odběru krve, tak při odstraňování špičky, aby se snížila rizika chyby (např. ztráta a záměna vzorků pacientů; kontaminace) [34, 42]. Na jedno zařízení lze odebrat pouze jeden vzorek a nesprávným použitím špiček může dojít k odchylkám v množství absorbované krve, mezi než patří například přeplnění vzorku způsobené ponořením celé špičky do krevní kapky nebo nanesení nedostatečného množství krve, což může být obtížně vizuálně posouditelné [8, 34, 43].

Ze samotných polymerních špiček byly také pozorovány různé interference [42]. Nedostatkem je také chybějící prostor pro záznam demografických údajů pacienta kromě plastového pouzdra. A další významnou nevýhodou je velké množství plastového odpadu na jedno zařízení [34]. V neposlední řadě je jednotková cena jednoho odběrového zařízení Mitra vyšší než cena odběrových karet nebo soupravy pro venepunkci [43].

2.3.2 Capitainer-B

Dalším zařízením je Capitainer-B, které bylo představeno Královským technologickým institutem (KTH, Stockholm, Švédsko) k překonání nevýhod nevolumentrických odběrových karet v přesném a objemovém odběru vzorků [8, 36]. Skládá se ze vstupní šterbiny, do které se nanese kapka krve, která vyplní kapilární mikrokánek o pevném objemu 10 μL , se standardní odchylkou $< 0,5 \mu\text{L}$ [8, 36, 44, 45]. Po naplnění kapilárního kanálku, vedoucího k celulózovému disku, se sorbent přítomný na vstupu rozpustí, čímž dojde k oddělení přebytečné krve, která je absorbována matricí nacházející se pod sorbentem [8, 36, 44].

Úplným rozpuštěním tenké vrstvy sorbentu na výstupu se kapilární kanálek vyprázdní kapilárními silami, což vede k absorpci 10 µl krve diskem (filtrační papír Ahlstrom 222) [8, 44, 45]. Pomocí pinzety lze disk po úplném usušení snadno vyjmout pro další zpracování vzorku [8, 36]. Odebrané vzorky DBS lze skladovat při pokojové teplotě [45]. Tato zařízení jsou schopna přesně dávkovat průměrný objem krve 10 µl v širokém rozsahu HCT (18–55,0 %) [8, 36, 44].

2.3.2.1 Výhody Capitainer-B

Výhodou Capitainer-B je, že je vysoce kompatibilní se stávajícími pracovními postupy v rutinním screeningu novorozenců/metabolické laboratoři. K dispozici je nástroj pro vyjímání disku, který umožňuje rychlé a snadné vyjmutí DBS. Nástroj pro vyjmutí disku umožňuje naskenovat čárové kódy identifikátoru pacienta a automaticky generuje seznam vzorků pacientů [34].

Capitainer-B může shromáždit až dvě skvrny v rámci jednoho zařízení, což je výhodné v případě chyby [34]. Vzorky na odběrových kartách jsou chráněny před kontaminací [45]. Princip odběru krve eliminuje riziko přeplnění nebo nedostatečného naplnění, kdy se zabrání nasáknutí kapalného vzorku krve na odběrovou kartu a nedojde tak k vytvoření DBS [34, 45]. Kromě toho má zařízení dostatečný prostor pro záznam demografických údajů pacientů [34].

2.3.2.2 Nevýhody Capitainer-B

Odběrové zařízení Capitainer-B obsahuje vyšší procento odpadových částí (kombinace plastu a papírové karty, která tvoří více než 80 %) [34, 45]. Další nevýhodou je mrtvý objem kapiláry, kdy na vytvoření 10 µl skvrny musí být použito přibližně 17 µl krve [34].

2.3.3 HemaPEN

Zařízení hemaPEN (Trajan Scientific and Medical, Austrálie) je současnou uživatelsky přívětivější aplikací přesného odběru vzorků kapilární krve [8, 36]. Jedná se o robustní ruční zařízení pro jednorázové použití a odběr vzorků v malém objemu ($4 \times 2,74 \mu\text{l} = 10,96 \mu\text{l}$) [42, 46]. Konstrukce zařízení obsahuje čtyři integrované mikrokapiláry, které dávkují definovaný objem $2,74 \mu\text{l} \pm 0,14 \mu\text{l}$ kapilární krve na čtyři odběrové disky (průměr 3,5 mm) [36, 46, 47]. Funkce hemaPEN zůstává konzistentní nezávisle na sorbentu. Každý hemaPEN je identifikován pomocí specifického čísla modelu, které odkazuje na materiál sorbentu, objem kapilár a typ modelu hemaPEN. Sorbent D = 226 (modelové číslo D300S) je dodáván společností PerkinElmer Pty Ltd a sorbent W = 903 (modelové číslo W300S) dodává společnost Eastern Business Forms, Inc., která zároveň výrobcem karty Whatman [46].

HemaPEN zachycuje přesný objem krve přímým kontaktem hrotu zařízení s kapkou krve [36, 47]. Kapilární kanálky se naplní a stlačením základny zařízení se kapiláry automaticky vyprázdní na odběrové disky umístěné uvnitř [36, 46, 47]. Odebraný objem krve zaplní celou plochu odběrových disků, které jsou použity pro následné zpracování a analýzy, čímž se účinně eliminuje volumetrický aspekt zkreslení hematokritem, který je vlastní běžným kartám DBS [46]. Vzhledem k přesnému a samovolnému odběru vzorku ve srovnání s konvenčními kapilárními zařízeními založenými na DBS lze pomocí tohoto zařízení snadno provádět samoodběr vzorků pacienty [36].

Po dokončení odběru jsou vzorky uloženy v pouzdře hemaPEN odolném proti manipulaci, integrovaný vysoušeč v zadní části umožňuje konzistentní profil sušení vzorku a formát vysušeného vzorku umožňuje zjednodušené skladování a logistiku [46, 47].

2.3.3.1 Výhody HemaPEN

Koncoví uživatelé si oblíbili intuitivní design hemaPEN připomínající pero a skutečnost, že k rychlému a snadnému odběru čtyř vzorků stačí jeden vpich a jedno odběrové zařízení [46].

Výhodou systému hemaPEN oproti tradičním kartám DBS je, že odpadají kroky alikvotace a vyražení. Je to proto, že 4 vzorky DBS v zařízení hemaPEN jsou vytvořeny na 4 samostatných odběrových discích uvnitř. Zároveň je téměř nemožné odebrat nedostatečný nebo nadměrný vzorek [46].

HemaPEN zajišťuje bezpečnost vzorků díky ochrannému pouzdru odolnému proti neoprávněné manipulaci, takže je vhodný pro antidopingové programy ve sportu nebo jiné programy, kde hrozí riziko manipulace se vzorky [35, 46].

2.3.3.2 Nevýhody HemaPEN

Nevýhodou hemaPEN je nutnost manuálního otevření zařízení pro získání odběrových disků s krví za pomoci specializovaného nástroje. Navíc toto zařízení vytváří velké množství plastového a skleněného odpadu [35].

2.3.4 HemaXis DB 10

Zařízení HemaXis DB 10 (DBS System SA, Gland, Švýcarsko) je na jedno použití a je speciálně navržen tak, aby generoval $4 \times 10,0 \mu\text{l} \pm 0,5 \mu\text{l}$ vzorků lidské suché krve s normální hladinou hematokritu [36, 48]. Jedná se o plastové skládací zařízení založené na mikrofluidním principu, které se skládá z celulózové odběrové karty Whatman 903 a mikrofluidního čipu obsahujícího čtyři kapilární mikrokanálky [8, 36]. Postup odběru vzorků je jednoduchý a měl by být snadno použitelný pro vlastní odběr vzorků pacientem [8]. Po kontaktu kapilárního vstupu s kapkou krve vytékající z prstu se mikrokanálky naplní pevně stanoveným objemem krve působením kapilární síly. K naplnění všech čtyř kanálek je tedy třeba tento postup odběru krve čtyřikrát opakovat. Následně lze plastový kryt podobný knize zavřít a je třeba jej stisknout po dobu 10 s, aby se umožnil kvantitativní přenos fixního množství krve z výstupu kapilárních mikrokanálek na protilehlou kartu DBS [8, 36]. Po odběru plastový kryt chrání kartu se vzorky před poškozením, které mohou být přepraveny do analytické laboratoře k analýze. Karty jsou navrženy pro skladování při teplotě od $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ do $40 \text{ }^\circ\text{C}$ [48].

Bylo prokázáno, že vzorky DBS připravené pomocí volumetrického pipetování a vzorky připravené zařízením HemaXis DB 10 jsou srovnatelné a prokázaly přijatelnou a dobrou shodu výsledků nezávisle na různých hladinách HCT v odebrané krvi [8, 36].

2.3.4.1 Výhody HemaXis DB 10

Na rozdíl od výše uvedených zařízení HemaPEN, Capitainer-B a Mitra si tato technika odběru vzorků stále zachovává formát klasické DBS karty, což umožňuje kompatibilitu s automatizovanými systémy dostupnými pro DBS analýzu [8].

Volumetrická odběrová zařízení jsou navržena pro vlastní odběr vzorků pacientem a zařízení HemaXis DB 10 má dostatečný prostor pro připevnění identifikačního štítku pacienta. Je umožněn odběr více vzorků kapilární krve v rámci jednoho zařízení, což usnadňuje opakování a/nebo další analýzy. Skvrna se vytvoří pouze tehdy, když je na zařízení nanese dostatečné množství krve. Pokud je do aplikováno nedostatečné množství krve, je navržen tak, aby se zabránilo nasáknutí kapalného vzorku krve na odběrovou kartu a aby se nevytvořila DBS, a tak odstraňuje riziko nedostatečně naplněných vzorků [34].

2.3.4.2 Nevýhody HemaXis DB 10

Ze zařízení HemaXis musí být DBS manuálně vyraženy pomocí děrovače stejně jako u nevolumentických odběrových zařízení, což může být méně neefektivní pro rutinní analýzy v laboratoři. Mezi další nevýhody patří mrtvý objem kapiláry, kdy k vytvoření 10 μ l skvrny je třeba do zařízení odebrat 12 μ l krve, a množství plastového odpadu na jedno zařízení [34].



Obrázek 2: Volumetrická odběrová zařízení (A...Mitra, B...Capitainer-B, C...HemaPEN, D...HemaXis DB10)

2.4 Techniky zpracování DBS

Přestože odběr vzorků DBS má pro pacienty řadu výhod, pro laboratoře je manipulace se vzorky značně náročná [15]. Proto narůstá potřeba automatizace zpracování a analýz DBS [16]. Pro rutinní laboratorní aplikace jsou k dispozici i komerční systémy, které umožňují částečnou automatizaci, jako jsou automatické děrovače a systémy pro manipulaci s kapalinami [16, 43]. Pro plně automatizované přístupy k analýze DBS je na trhu jen několik výrobců [16]. Na rozdíl od částečné automatizace zajišťuje použití plně automatizovaných systémů bezproblémový pracovní postup; jako jediná manuální činnost se vyžaduje ruční vkládání DBS karet do analytického systému na začátku procesu [16, 49]. Poté následuje automatická eluce, separace a analýza – bez nutnosti další lidské interakce. V současné době jsou k dispozici dvě hlavní sestavy, které lze spojit s LC-MS/MS: DBS-MS 500 (CAMAG) a DBS Autosampler (DBSA, Spark Holland). Tyto systémy se liší kapacitou vzorků (500 karet vs. násobky jednotlivých stojanů na 24 karet), elučním procesem (horizontální eluce vs. průtoková desorpce), strategií zpracování eluátu (smyčka, online SPE nebo SPE) a aplikací vnitřního standardu (aplikace rozprašováním vs. míchání do elučního rozpouštědla). Jednotlivé systémy proto nejsou vzájemně přímo srovnatelné [16].

Jako dalším komerčně dostupným automatickým systémem je DSX-1 (Thermo Fisher Scientific), který je kompatibilní se systémy založenými na hmotnostní spektrometrii [50].

Tyto systémy jsou konstruovány pro manipulace s běžnými odběrovými kartami (Whatman, Ahlstrom) a s dalšími odběrovými sorbenty nejsou kompatibilní. Systémy umožňují pozoruhodně snadnou analýzu DBS a mají velké výhody ve srovnání s manuálními a poloautomatickými technikami vyrážení [51]. Automatizace může zkrátit dobu přípravy vzorku a analýzy, umožnit použití organických rozpouštědel, zvýšit efektivitu a opakovatelnost [15, 43]. Výsledkem je celkově vyšší rychlost zpracování vzorků, minimální nutnost zásahu obsluhy a výrazné snížení spotřeby spotřebního materiálu, jako jsou vzorkovnice, pipetovací špičky a skleněné lahvičky [16, 43].

Avšak náklady na robotické přístroje pro zpracování vzorků mohou být poměrně vysoké [15]. Přechod z manuální metody DBS na plně automatizovaný systém DBS může vyžadovat odborné znalosti v oblasti LC a automatizace a může trvat několik týdnů [16]. Náročnější může být nalezení vhodné kombinace rozpouštědel pro eluce a analýzy. Mezi další nevýhody patří nízká účinnost eluce, která je ovlivněna úrovní hematokritu krve. Kromě toho tyto systémy poskytují pouze jeden eluát na DBS a není možné analýzu zopakovat. V neposlední řadě jsou zapotřebí dva sofistikované přístroje (jeden pro eluce DBS a druhý pro analýzy DBS), což činí tyto systémy rozměrnými a drahými [52].

Proto byla nedávno demonstrována alternativní koncepce plně automatizovaných analýz DBS za využití kapilární elektroforézy (CE) k elucím celých DBS, což eliminovalo účinky hematokritu krve a nehomogenity skvrn. Vše je provedeno pomocí jednoho komerčního CE přístroje s minimálními provozními náklady [22, 52, 53]. Možnými omezeními této koncepce jsou nižší detekce či omezení škálou analytů [52].

2.5 Analýza DBS vzorků

Analýza komplexních, zejména biologických vzorků není triviálním úkolem z několika důvodů. Objemy vzorků jsou obvykle omezené, koncentrace většiny analytů nízké a matrice vzorků komplikované [54].

Pro identifikaci a kvantifikaci analytu v DBS se používá široká škála různých analytických technik, včetně metod imunoanalýzy, GC-MS, HPLC, LC-MS, tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS), kapilární elektroforézy (CE) a analýz DNA amplifikované polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) [3, 15].

LC-MS/MS je volena jako analytická metoda pro kvantifikaci analytu z biologických matric, jako je krev, plazma, sérum, mozkomíšní mok a moč. LC-MS/MS je populárnější technikou než GC-MS, ačkoli GC-MS poskytuje také dostatečnou selektivitu, citlivost, robustnost pro mnoho analytů v DBS. Výběr LC nebo GC technik závisí na požadované citlivosti a charakteristikách cílového analytu. Pokrok v technologiích, jako je ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC), zlepšil účinnost separace analytů (účinnější než GC). Dvourozměrná chromatografie (2D-C) dále zlepšila separační účinnost, analytickou citlivost, přesnost a kvantifikaci [12, 38].

Některé přímé metody, jako je desorpční elektrosprejová ionizace (DESI), přímé analýzy v reálném čase (DART) a hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací (ESI-MS), byly využity za účelem generování iontů z povrchu vzorku, čímž se vyhýbají procesům předanalytického čištění a derivatizace [12, 38].

Kapilární elektroforéza (CE) je vhodnou analytickou metodou pro rychlé analýzy nepatrných objemů vzorků, a proto se dokonale hodí pro analýzu DBS [5, 55]. CE navíc umožňuje současné stanovení více složek vzorku s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, pokud je kombinována s univerzálním detektorem, například s kapacitně vázaným bezkontaktním vodivostním detektorem (C^4D) [5].

Ve srovnání s HPLC a MS nabízí CE levnější, jednodušší a efektivnější přístrojové uspořádání, přičemž se ukázala jako vhodná pro automatizované zpracování a analýzu vzorků [22]. CE navíc překonává ostatní separační techniky, pokud jde o rychlost analýzy (separace jsou dosahovány v rozsahu min) a separační účinnosti (obvykle je dosahováno účinnosti až milionů teoretických pater/m kapiláry) [54, 56].

Všechny tyto vlastnosti jsou výhodné pro klinické/bioanalytické testy a jsou považovány za užitečné pro kvantitativní analýzy konkrétních analytů ve vzorcích DBS [5, 22].

2.6 Instrumentace kapilární elektroforézy

Kapilární elektroforéza se vyznačuje jednoduchým přístrojovým vybavením a v zásadě se systém skládá z vysokonapěťového zdroje (obvykle pracujícího v rozmezí 0 až 30 kV stejnosměrného proudu), dvou platinových elektrod, separační kapiláry, dvou vialek s roztokem elektrolytu (BGE), detektoru a ze sběrnice dat propojené s PC [10, 54]. Použité kapiláry z taveného oxidu křemičitého mají typické rozměry od 25–100 μm vnitřního průměru (ID) a 30–70 cm na délku a jsou obvykle naplněny pouze BGE [54, 55, 57].

Princip separace CE je rovněž velmi jednoduchý; nabité analyty jsou v kapalných roztocích separovány na základě jejich různé elektroforetické pohyblivosti a na základě velikosti a směru elektroosmotického toku [54, 55].

Existuje několik důvodů rychlého vývoje CE [54]. Mezi ně patří instrumentální jednoduchost, minimální spotřeby činidel a vzorků, nízké náklady na spotřební materiál (kapiláry atd.), vícenásobný separační režim a vynikající biokompatibilita [54, 58]. Jelikož je dávkovaný objem v CE omezen malými vnitřními objemy separačních kapilár, typické dávkovací objemy vzorku se pohybují v rozmezí od pl do nl a spotřebovaný roztok elektrolytu je menší než 1 μl pro každou analýzu vzorku, obvykle postačí několik ml roztoku základního elektrolytu na celý pracovní den, díky čemuž se CE považuje za ekologicky šetrnou a ekonomickou analytickou techniku [54–56, 58]. Skutečné požadavky na objemy vzorku v CE, které jsou potřebné pro spolehlivé dávkování, jsou podstatně větší. Minimální objem vzorku, se kterým lze spolehlivě manipulovat a který lze použít pro dávkování objemů nl, je ve většině sestav CE přibližně 10 μl [56].

Jednou z největších výhod CE je její rozmanitý rozsah použití [57]. CE si získala oblibu v analýze biochemických makromolekul a v genomovém výzkumu a je preferovanou analytickou technikou pro separaci krevních bílkovin a DNA [10].

Kromě toho se CE ukázala jako užitečný nástroj při analýzách různých organických analytů v biologických vzorcích a také se často používá jako alternativní technika k iontové chromatografii při biologických analýzách malých anorganických iontů a molekul [10].

CE má rovněž velký potenciál miniaturizace a přenosnosti. Tyto vlastnosti jsou zvláště zajímavé v biomedicínských aplikacích, které vyžadují rychlou analytickou odezvu, množství vzorků je často omezené a analýza by měla být, pokud možno prováděna přímo na místě [10].

Navzdory zjevným výhodám CE je její robustnost nižší ve srovnání s chromatografickými technikami. Jako nevýhody CE jsou často uváděny nižší citlivost detekce a nižší opakovatelnost při práci se složitými vzorky. Nižší stabilita systémů CE a nižší opakovatelnost je způsobena malými změnami velikosti elektroosmotického toku, které jsou vyvolány postupnými změnami vnitřního povrchu separačních kapilár a vedou tak ke změnám migračních časů a separačních účinností [10, 54].

Za účelem stabilizace elektroosmotického toku a zlepšení elektroforetické separace mohou být aplikovány vysokomolekulární látky (například deriváty celulózy) jako aditiva do roztoků BGE a použity jako pokrytí vnitřní stěny kapiláry a omezení interakcí rozpuštěné látky se stěnou [54, 57]. Separační účinnost a opakovatelnost elektroforetických metod se však zlepšila díky používání moderních komerčních přístrojů CE [10].

Nižší citlivost detekce je obvykle spojena s aplikacemi nejčastěji používaného UV-VIS detektoru [10, 54]. Krátká optická délka spolu s malými dávkovanými objemy vedou k relativně nízké koncentrační citlivosti, což lze zlepšit použitím citlivějších a/nebo selektivnějších detektorů [54]. To bylo prokázáno použitím laserem indukované fluorescence (LIF), chemiluminiscence, konduktometrie, hmotnostní spektrometrie (MS) a elektrochemických detektorů [10]. Alternativně lze citlivost CE zvýšit vhodným postupem úpravy vzorků, kdy se analyty před nadávkováním do CE selektivně zakoncentrují nebo dojde k přečištění vzorků před analýzou [10, 54, 58].

2.6.1 Kapilární elektroforéza s bezkontaktní vodivostní detekcí CE-C⁴D

Měření vodivosti je nejuniverzálnější metodou detekce CE, protože všechny nabitě částice migrující v elektrickém poli mají určitou vodivost a jsou tedy detekovatelné pomocí C⁴D [59].

Jedná se nedestruktivní techniku detekce a o typ detektoru založeného na měření vodivosti, který je tvořen ze dvou válcových elektrod umístěných axiálně kolem polyimidem potažené kapiláry bez přímého kontaktu s elektrolytickým a měřeným roztokem [57–59]. Tyto elektrody jsou od sebe odděleny malou detekční mezerou o vzdálenosti 1,5 mm [61, 62]. Na jednu z galvanicky oddělených elektrod se přivádí střídavé napětí a na druhé elektrodě se měří výsledný střídavý proud [63]. Tento proud je funkcí vodivosti v oblasti mezi elektrodami, proto lze detekovat jakoukoli změnu vodivosti BGE v důsledku přítomnosti procházejících analytů [62].

Princip C⁴D detekce přímo ovlivňuje výběr BGE vhodných pro CE-C⁴D. Často se používají elektrolyty s kyselým pH připravené ze zředěných slabých organických kyselin (octová, mléčná, mravenčí atd.) nebo směs slabých organických kyselin s aminokyselinami [59].

Při použití C^4D není nutné odstraňovat polyimidový povlak, protože emitované střídavé napětí a přijímaný střídavý proud mohou procházet standardními kapilárními materiály (tavený oxid křemičitý a polyimid) a také polymerními kapilárami (PFA, Teflon, PEEK, PTFE atd.) [57, 59].

C^4D je většinou spojena s CE a tímto spojením bylo dosaženo vynikajících analytických parametrů (vysoká separační účinnost, krátké separační časy, minimální požadavky na objem vzorku a jednoduché přístrojové vybavení) [10, 11]. CE- C^4D je analytická technika, která umožňuje stanovení aniontů a/nebo kationtů s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, použití kombinace více detektorů (UV-VIS, MS, LIF), které dále zvyšují selektivitu/citlivost analýzy a rozšířit tak rozsah detekovatelných analytů a lze ji použít pro simultánní stanovení malých anorganických iontů a široké škály organických a biochemických sloučenin například v řadě biologických vzorků či ve vzorcích pitné vody a potravin [5, 59, 63].

Použití komerčního přístroje CE- C^4D umožňuje například stanovit přesný objem krve v neznámých vzorcích DBS kvantifikací hlavních anorganických iontů v eluátu DBS nebo měřením vodivosti eluátu. V eluátu DBS lze současně stanovit K^+ , Na^+ a kationtové analyty (aminokyseliny). Koncentrace K^+ a Na^+ se použijí k výpočtu přesného objemu krve v neznámém vzorku DBS a tento objem se použije pro stanovení koncentrací aminokyselin [5].

Dalšími aplikacemi CE- C^4D jsou například skupiny biochemických analytů, mezi nejdůležitější patří aminokyseliny, peptidy a proteiny. Dále lze snadno stanovit značné množství farmaceutických sloučenin [11, 63].

C^4D se snadno hodí k různým separačním technikám, přenosným přístrojům a připojení ke komplexním procesům úpravy/zakoncentrování vzorků i k průmyslovým aplikacím [59].

2.7 Využití DBS

Technika DBS je díky svým mnoha výhodám široce využívána v různých oborech zejména ve farmaceutickém průmyslu, nemocnicích a výzkumných centrech, tam, kde jsou objemy vzorků krve nebo plazmy nízké, obtížně se shromažďují, skladují, zpracovávají nebo přepravují [1, 64]. Spektrum aplikací DBS se neustále rozšiřuje, kromě tradičních metod, jako je např. nejrozšířenější novorozenecký screening vrozených metabolických vad a mikrobiologický a epidemiologický dohled nad nemocemi, i hrají ústřední roli ve farmakokinetických a toxikokinetických studiích, terapeutickém monitorování léčiv (TDM), screeningu nemocí, testování dopingových látek, genetiky/epigenetiky a metabolických studiích [1, 2, 65, 66].

Analýza biomateriálu ve vzorcích DBS umožňuje identifikaci a kvantifikaci široké škály analytů [64]. Suché krevní skvrny jsou vhodným zdrojem biomateriálu pro analýzu přítomnosti biomarkerů, sledování kontaminantů životního prostředí, sekvenování DNA pro genomické/epigenetické účely a hodnocení adherence k farmaceutickým léčivům [65, 66].

2.7.1 Stanovení základních biochemických parametrů

Výsledky laboratorních vyšetření jsou zdrojem cenných informací popisujících změnu metabolismu organismu, které lze využít k posuzování zdravotního stavu pacienta. Největší a nejdůležitější součástí laboratorních vyšetření je rozbor krve, krevního séra nebo plazmy. Krev je poměrně snadno dostupný materiál a její složení odráží řadu biochemických procesů probíhajících v různých tkáních [67].

Kapilární krev získaná pro laboratorní vyšetření se výrazně liší od běžně testované žilní krve. Je to směs žilní, arteriální a kapilární krve a také intersticiálních a buněčných tekutin. Vzhledem k této směsi se kapilární krev více podobá krvi arteriální než žilní [68]. Díky této biologické variabilitě dochází ke vzniku potenciálních nesrovnalostí v kvantifikaci a odlišností v referenčních hodnotách, zejména kvůli matricovým efektům. V současné době existují jen omezené znalosti o vlivu složení matrice (kapilární vs. žilní krev) na stanovení analytu [13, 68].

Pro většinu analýz se využívá žilní krev. Kapilární krve má v současnosti jen omezená použití a nejčastěji se z ní vyšetřuje: glykémie, screeningové vyšetření fenylketonurie a hypotyreózy u novorozenců, acidobazické rovnováhy a bilirubin [67]. Proto pro většinu uvedených kationtů a aniontů jsou referenční hodnoty a onemocnění uvedeny zejména pro plazmu či krevní sérum.

Jedním z hlavních možných vyšetření je stanovení nabitých iontů solí nazývaných krevní elektrolyty, které se nalézají v krvi a jiných tkáních. Napomáhají transportu živin do buňky a odpadních látek ven z buňky, udržují rovnováhu vody v těle a optimální pH organismu. Obvykle se stanovují hlavní elektrolyty: sodný a draselný kationt, chloridový anion a celkový oxid uhličitý [9].

Vyšetření krevních elektrolytů je součástí rutinního screeningu v případech podezření na nadbytek nebo nedostatek některé složky z elektrolytů (nejčastěji sodíku nebo draslíku) a při podezření na poruchy acidobazické rovnováhy. Slouží jako rychlý diagnostický nástroj pro následující příznaky: otoky, zvracení, slabost, srdeční arytmie. Vyšetření elektrolytů je velkou pomocí při diagnostice různých akutních a chronických onemocnění a při užívání léků, které mohou narušit jejich rovnováhu. Elektrolyty se také často testují za účelem sledování léčby vysokého krevního tlaku, srdečního selhání a onemocnění jater a ledvin [9].

Pro vyšetření dále zmíněných elektrolytů neexistují „standardní“ referenční rozmezí, většina laboratoří je uvádí velice podobné, avšak ne úplně stejné. Výsledky testů jsou lékařem vyhodnoceny podle referenční tabulky pro daný test, protože stanovování normy ovlivňuje spousta faktorů. Referenční tabulka je specifická pro každou laboratoř, proto je nezbytné, aby laboratoř dodala výsledky společně s odpovídajícími referenčními mezemi [69, 70].

2.7.1.1 Sodík Na

Referenční mez pro plazmu a sérum: 137–146 mmol/l [71]

Kritická hodnota: <120 mmol/l, >155 mmol/l [72]

Umožňuje zhodnotit rovnováhu elektrolytů a funkci ledvin, monitorovat některé chronické stavy (vysoký a nízký krevní tlak) a chronické či akutní hypernatremie (příznaky: pocity žízně, snížená produkce moči, svalové křeče, třes) nebo hyponatremie (příznaky: slabost, zmatenost, únava, letargie) [67, 69].

Hyponatremie je často způsobena ztrátou sodíku z těla (Adisonova choroba, průjem, nadměrné pocení, zvracení, užívání diuretik, ledvinové onemocnění), poukazuje na renální ztráty (nadměrné močení), intoxikaci vodou či respirační alkalózu [67, 69, 73].

Hypernatremie doprovází Cushingovův syndrom anebo diabetes insipidus (nedostatek antidiuretického hormonu (ADH)) [69, 73].

2.7.1.2 Draslík K

Referenční mez pro plazmu: 3,8–5,2 mmol/l [74]

Kritická hodnota: <2,5 mmol/l, >6,5 mmol/l [72]

Testování koncentrace draslíku slouží k vyhodnocení elektrolytické rovnováhy a monitorování chronických nebo akutních hyperkalemií nebo hypokalemií [70].

Nejčastější příčinou hyperkalemie je snížené vylučování ledvinami (Addisonova choroba, selhání ledvin, terapie diuretiky šetřící K). Zvýšené hodnoty mohou také znamenat: hypoaldosteronismus, maligní hypertermie, poškození tkáně, přesun K z buněk (zhmoždění tkání, hemolýza, křeče, diabetická acidóza), infekci, cukrovku, dehydrataci [70, 75, 76].

Hypokalemie se může objevit u průjmových onemocnění, u zvracení, dehydratace a u nadbytečného pocení. Snížené hodnoty také ukazují na hepatopatie, komplikace při předávkování paracetamolem, snížený přívod draslíku (po operacích, infuze bez K, dlouhodobé hladovění), ztráty moči (terapie diuretiky, tubulární poškození, primární hyperaldosteronismus, větší ztráty edému, Cushingova choroba), přesun do buněk (infuze glukózy s inzulinem, terapie testosteronem, metabolická alkalóza) a terapie kortisonem [70, 75, 76].

2.7.1.3 Vápník Ca

Referenční mez pro plazmu a sérum: 2,0–2,75 mmol/l [71]

Kritická hodnota: <1,50 mmol/l, >3,10 mmol/l [72]

Přibližně polovina vápníku v krvi je „volná“ a metabolicky aktivní. Druhou polovinu tvoří „vázaný“ vápník, který je navázaný na albumin a ostatní látky a není metabolicky aktivní [77].

Vyšetřením celkového vápníku se stanovují obě formy, volná a vázaná. Stanovení volné formy probíhá vyšetřením ionizovaného vápníku. Ve většině případů se stanovuje celkový vápník, protože jeho testování je jednodušší a nevyžaduje speciální manipulace se vzorkem krve. Vysoká nebo nízká koncentrace plazmatických bílkovin ovlivňuje hodnotu celkového vápníku. V těchto případech je výhodnější použít stanovení ionizovaného vápníku [77].

Celkový vápník je často součástí celkového vyšetření i v rámci testů určených k diagnostice a sledování různých stavů souvisejících s kostmi, srdcem, nervy, ledvinami a zuby. Stavby a choroby, které narušují regulaci vápníku, mohou způsobit nepřiměřené akutní nebo chronické zvýšení vápníku – hyperkalcémie (příznaky: únava, ztráta chuti, bolest břicha, ...), nebo snížení vápníku – hypokalcémie (příznaky: křeče v břiše, svalové křeče a brnění prstů) [77].

Dvě z nejčastějších příčin hyperkalcémie jsou: hyperparatyreóza (zvýšená funkce příštítných tělísek) a rakovina (při postihnutí kostí, které uvolňují vápník do krve). Dalšími příčinami jsou: zvýšená funkce štítné žlázy, tuberkulóza, nadbytečný příjem vitamínu A a D, transplantace ledvin a užívání thiazidových diuretik [75, 77, 78].

Nejčastější příčinou nízkého celkového vápníku je nízká hodnota plazmatických bílkovin, zvláště albuminu. Dále například: hypoparathyreóza (snížená funkce příštítných tělísek), dědičná rezistence k účinku parathormonu, extrémní nedostatek vápníku ve výživě, snížená hodnota vitamínu D, nedostatek hořčiku, zvýšená hodnota fosforu, akutní zánět slinivky břišní (pankreatitida), selhání ledvin, alkoholismus a cirhóza jater [75, 77, 78].

2.7.1.4 Hořčík Mg

Referenční mez pro sérum: 0,66–1,07 mmol/l [75]

Kritická hodnota: <0,60 mmol/l [72]

Krev zdravého člověka obsahuje jen velmi malé množství celkového tělesného hořčíku (asi 1%). Množství hořčíku v krvi se měří při symptomech jako jsou např. slabost, srdeční arytmie, podrážděnost, nevolnost a/nebo průjem, které mohou být způsobeny příliš nízkou nebo naopak příliš vysokou hladinou hořčíku, popřípadě abnormálními hodnotami vápníku a draslíku. Hladiny hořčíku mohou být použity při sledování a hodnocení závažnosti problémů s ledvinami a/nebo neléčeného diabetu a mohou pomoci diagnostikovat poruchy trávení [79].

Nízká hladina hořčíku (hypomagnesemie) v krvi je nejčastěji spojená s nadměrným vylučováním hořčíku ledvinami, nedostatečnou absorpcí hořčíku tenkým střevem nebo nedostatkem hořčíku v potravě. Test na hladinu hořčíku může být součástí vyhodnocení malabsorpce, podvýživy, průjmu nebo alkoholismu [79, 80].

Ke zvýšené hladině hořčíku (hypermagnesemie) dochází při selhání ledvin, hyperparatyreóze, hypotyreóze, dehydrataci, diabetické acidóze, Addisonově nemoci a při požívání antacidu a laxativ obsahujících hořčík [79, 81].

2.7.1.5 Amoniak NH₃

Referenční mez pro plazmu: <60 μmol/l [71]

Kritická hodnota: >100 μmol/l [72]

Vyšetření amoniaku může pomoci k objasnění poruch chování a vědomí. Vyšetřuje se spolu s glukózou, elektrolyty a testy ledvinných a jaterních funkcí, aby se určila příčina nejasného upadání do bezvědomí nebo aby pomohl diagnostikovat Reyeův syndrom nebo jaterní encefalopatii. Tento stav způsobuje duševní a neurologické změny, které se projevují jako neklid, dezorientace, spavost, až kómatem či smrtí [82, 83].

Vyšetření amoniaku je často nutné k odhalení a určení závažnosti jaterních onemocnění a vzácných vrozených poruch močovinového cyklu. Další příčinou zvýšení amoniaku je snížení průtoku krve játry a selhání ledvin (nedokáže účinně vylučovat amoniak z těla, a tak se hromadí v krvi). Zvýšenou koncentraci amoniaku může též zapříčinit svalová námaha, delší použití škrtidla při odběru krve, některé léky a kouření [82, 83].

Snížená koncentrace amoniaku bývá občas u pacientů s hypertenzí a při požívání některých antibiotik (např. neomycin) [82].

2.7.1.6 Chloridy Cl⁻

Referenční mez pro plazmu a sérum: 97–108 mmol/l [72]

Kritická hodnota: <70 mmol/l, >125 mmol/l [84]

Chloridové anionty se v největším zastoupení vyskytují v krvi a v extracelulárních tekutinách, kde doprovází především sodík, a v samotných buňkách se nachází v nižší koncentraci. Velký podíl mají chloridy na osmotický tlak extracelulární tekutiny, na udržování acidobazické rovnováhy a na regulaci množství tekutin v těle. Do organismu se chloridy dostávají v potravě ve formě NaCl a jeho příjem bývá běžně dostatečný [72, 85]. Normální hladina chloridů v krvi je stabilní, kromě mírného poklesu po jídle. Většina přijatých chloridů se vstřebává v gastrointestinálním traktu a je vylučován spolu s dalšími ionty ledvinami [86].

Vyšetření by mělo být indikováno v kombinaci se stanovením dalších iontů a je prováděno rutinně jako součást celkového vyšetření elektrolytů v těle [75, 85]. Hodnoty překračující stanovenou hranici značí hyperchloridemii a velmi často jsou spojeny s hypernatremií, nejčastěji v důsledku dehydratace organismu či některé vrozené nemoci ledvin [67, 85, 87]. Zvýšení nastává také například při nadměrném přívodu fyziologického roztoku, při léčbě vybranou medikací, respirační alkalóze, při renální tubulární acidóze, nepoměru mezi přívodem NaCl a ztrátou Na⁺ (při průjmech a renálním diabetes insipidus), a také při primárním aldosteronismu a primární hyperparatyreóze [72, 75, 87].

Naopak hypochloridémie nastává při stravě chudé na NaCl, při nadměrném pocení, těžkých průjmech či silném zvracení [72, 75]. Dále např. při diabetické ketoacidóze, respirační acidóze, při ztrátách chloridů močí (při léčbě diuretiky), při depleci kalia s metabolickou alkalózou, při Addisonově chorobě a také při kombinacích poruch [72, 75, 87].

2.7.1.7 Laktát Lac

Referenční mez pro plazmu: 0,5–2,2 mmol/l [88]

Kritická hodnota: 3,40 mmol/l [72]

Laktát cirkulující v krvi je produkován při anaerobním metabolismu glukózy [88]. Zvýšené hodnoty laktátu se objevují u mnoha systémových a metabolických onemocnění, infekcí, vrozených chorob či po podání některých léčiv [89]. Hromadění laktátu vede nejdříve k hyperlaktátemii a později i k rozvoji laktátové acidózy, která může provázet renální selhání a leukemii. Laktátová acidóza má dvě možné příčiny. Obvykle se jedná o zvýšení laktátu v krvi v důsledku anoxie, jež je způsobena z různých důvodů, jakými jsou infarkt, srdeční selhání, plicní problémy, šok či úrazy. V druhém případě mohou být příčinou poruchy jater či ledvin nebo také cukrovka, poruchy ukládání glykogenu a další případy, při kterých nedochází k odstraňování laktátu z organismu [88, 89]. Zvýšené hodnoty laktátu jsou také spojeny s nadměrnou fyzickou zátěží [88].

Nejčastěji se stanovením laktátu posuzují stavy hypoxie, laktátová acidóza či poruchy acidobazické rovnováhy. Toto vyšetření se provádí současně s dalšími vyšetřeními acidobazické rovnováhy a vyšetřením krevních plynů [88, 89].

2.7.1.8 Dusitany NO₂⁻, Dusičnany NO₃⁻

Koncentrace dusitanů a dusičnanů v krevní plazmě jsou důležité v klinických situacích, protože je známo, že jsou spontánními chemickými produkty oxidu dusnatého (NO) v krvi [90]. Koncentrace dusitanů *in vivo* se pohybují od 300–500 nM v krvi a do 1–10 μM ve tkáních [91]. NO je vysoce reaktivní volný radikál a buněčná signální molekula regulující fyziologické procesy v lidském těle. Nadprodukce NO je jedním z patogenních faktorů způsobujících šok a orgánovou dysfunkci [90, 92]. Protože NO se v krvi rychle oxiduje na dusitany a dusičnany, používají se jako markery aktivity syntázy NO a produkce radikálů NO [90, 93].

Dusitan, endogenní vazodilatátor, je považován za stabilní zásobu NO a dalších reaktivních dusíkatých látek během hypoxie. Když dusitan reaguje s Fe²⁺ hemu v oxyhemoglobinu nebo deoxyhemoglobinu červených krvinek, oxiduje Fe²⁺ na Fe³⁺, což vede k methemoglobinu. Kromě toho se dusitany přeměňují na dusičnany (reakce s oxyhemoglobinem) nebo NO (reakce s deoxyhemoglobinem) [94].

Při nadměrném příjmu dusitanů dochází k hromadění methemoglobinu v krvi. Tento stav vede k methemoglobinémii, která může způsobit cyanózu, dýchací potíže, únavu, ztrátu vědomí, a dokonce smrt [94]. Methemoglobinémie, zvaná také jako syndrom modrého dítěte, může ohrozit na životě zejména kojence [95].

2.7.1.9 Sírany SO_4^{2-}

Sírany jsou ukazatelem účinnosti jater při odstraňování mnoha léků, steroidních hormonů a toxických látek. Vysoký obsah síranů může naznačovat, že sulfatace je velmi aktivní. Nízká hladina síranů vede ke snížení schopnosti jater odstraňovat toxické sloučeniny [96]. Toto narušení může dále vést ke zvýšené propustnosti střeva, snížené záloze látek z ledvin a alergickým potížím [97].

Dobrá sulfatace je také důležitá pro funkci a integritu střevních a ledvinových membrán a pro funkci různých enzymů, včetně inzulínu, gastrinu a cholecystokininu [97]. Sirné aminokyseliny cystein, methionin a taurin i síranové soli se používají k doplnění sirných drah a k obnově a udržení zásob síranu v játrech [96, 97]. Jelikož se jedná o esenciální aminokyseliny, dieta s nedostatkem bílkovin i na krátkou dobu může vést ke snížení hladiny síranů. Dále bylo prokázáno, že sérové hladiny síranů u normálních lidí dramaticky stoupají od 3 do 8 hodin po požití jediného velkého množství bílkovin [98]. Normální koncentrace síranu nalačno u dospělých lidí se obecně pohybují v průměru mezi 0,25 a 0,4 mmol/l [98].

2.7.1.10 Mravenčany HFO

Stanovení mravenčanu ve vzorcích krve je nezbytné pro včasnou diagnostiku otravy metanolem, jelikož je metanol metabolizován alkoholdehydrogenázou přes formaldehyd na kyselinu mravenčí, která se může v lidském těle hromadit a je zodpovědná především za toxicitu při otravách metanolem [99, 100].

Mravenčanové anionty jako produkty metabolismu metanolu mají silný cytotoxický účinek a inhibují mitochondriální dýchání [101]. Mezi specifické příznaky zvýšené hladiny mravenčanu patří nevolnost, bolesti hlavy, závratě, rozmazané vidění nebo úplná ztráta zraku a hluboká metabolická acidóza vedoucí k hyperventilaci [101, 102]. Pokud se neléčí, může vysoká koncentrace mravenčanu způsobit vážné poškození optického nervu, respirační selhání, selhání ledvin, kóma, křeče a případnou smrt v důsledku kardiopulmonální zástavy [102].

Mravenčan v krvi se obvykle pohybuje mezi 20 a 450 μM a pro analýzu mravenčanu u zdravých jedinců se uvádí referenční rozmezí 0–400 μM [99]. Koncentrace v krvi se v případech spojených s akutní otravou metanolem obvykle pohybuje mezi 0,2–30 mM. S tím, že koncentrace vyšší než 10 mM jsou spojeny s těžkou toxicitou, trvalým poškozením tkání nebo úmrtím [99, 102].

2.7.1.11 Octany HAC

Octan je produkován a uvolňován metabolismem etanolu v játrech. Octan snadno prochází hematoencefalickou bariérou a je aktivně metabolizován v mozku. Octan může být důležitý v intoxikačních účincích etanolu. Octan také zvyšuje koronární průtok krve, kontraktilitu myokardu a srdeční výdej. A dále inhibuje lipolýzu v tukové tkáni a podporuje steatózu v játrech [103, 104].

Octan v séru u člověka je obvykle pod 0,2 mM. Sérový octan může být po požití etanolu zvýšen více než 20krát. Mezi další běžné příčiny zvýšeného sérového octanu patří dlouhodobé hladovění a nedostatek inzulínu (tj. diabetes 1. typu) [103].

Bylo prokázáno, že octan je inkorporován do fosfolipidů, neutrálních lipidů, sterolů a nasycených a nenasycených mastných kyselin v různých preparátech lidských a zvířecích tkání. Při katabolismu nebo anabolické syntéze je octan normálně se vyskytujícím metabolitem, například při tvorbě glykogenu, syntéze cholesterolu, degradaci mastných kyselin a acetylaci aminů. Odhaduje se, že plazmatická hladina octanového iontu u lidí je asi 50–60 $\mu\text{mol/l}$ [105].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

3.1.1 Chemikálie pro elektroforetické stanovení

- Deionizovaná voda
- Kyselina octová, Lach-Ner, Česká republika
- Metanol, Lach-Ner, Česká republika
- 18-Crown-6, Sigma Chemical Company, USA
- Hydroxid sodný, Lach-Ner, Česká republika
- L-Glutamová kyselina, Merck, Německo
- L-Histidin, Sigma Aldrich, USA
- Cetyltrimethylamoniumbromid, Sigma Aldrich, USA

3.1.2 Standardy iontů

- Chlorid sodný, Lachema, Česká republika
- Chlorid draselný, Lachema, Česká republika
- Chlorid vápenatý, Lachema, Česká republika
- Hexahydrát chloridu hořečnatého, Lachema, Česká republika
- Octan amonný, Sigma-Aldrich, USA
- Dusičnan lithný, Lachema, Česká republika
- Dusitan draselný, Sigma-Aldrich, USA
- Síran hořečnatý, Lachema, Česká republika
- Kyselina fosforečná, Lach-Ner, Česká republika
- Mravenčan draselný, Lachema, Česká republika
- Laktát lithný, Sigma Aldrich, USA
- Kyselina octová, Lach-Ner, Česká republika

3.2 Příprava roztoků

3.2.1 Základní elektrolyt (BGE) pro analýzu kationtů

Jako BGE pro analýzu vybraných anorganických kationtů byla zvolena směs 1M kyseliny octové, 20 % metanolu a 1mM 18-crown-6. Výsledné pH roztoku činilo 2,50. 1M kyselina octová se denně ředila z 10M zásobního roztoku kyseliny octové připraveného z 99,8% kyseliny octové ředěním deionizovanou vodou a 1mM 18-crown-6 ze 100mM zásobního roztoku 18-crown-6, který byl jako pevná substance navážen a rozpuštěn v deionizované vodě. Připravené zásobní roztoky byly skladovány v lednici při teplotě 4 °C.

3.2.2 Základní elektrolyt (BGE) pro analýzu aniontů

BGE použitý pro analýzu aniontů se skládal z 40mM kyseliny glutamové, 20mM histidinu a 75μM Cetyltrimethylamoniumbromidu (CTAB). Jeho pH činilo 4,13. Tento BGE byl každý den připravován ze zásobních roztoků 50mM glutamové kyseliny, 100mM histidinu, které byly jako pevné substance naváženy a rozpuštěny v deionizované vodě. A 50mM CTAB, který byl připraven navážením a rozpuštěním pevné substance v metanolu a následně v deionizované vodě. Tyto zásobní roztoky byly skladovány v lednici při teplotě 4 °C.

3.2.3 Kalibrační roztoky

3.2.3.1 Kalibrační roztoky pro analýzu kationtů

Pro sestavení kalibrační křivky byl připraven směsný roztok o koncentraci Ca^{2+} a NH_4^+ 0,5 mM, Na^+ a K^+ 5 mM, Mg^{2+} 0,25 mM, který byl naředěn ze zásobních roztoků jednotlivých iontů o koncentraci 100 mM, které byly jako pevná substance naváženy a rozpuštěny v deionizované vodě. Roztok byl postupně ředěn 2krát, 4krát, 8krát, 16krát, 32krát a 64krát deionizovanou vodou.

3.2.3.2 Kalibrační roztoky pro analýzu aniontů

Pro sestavení kalibrační křivky byl připraven směsný roztok o koncentraci Cl^- 5 mM, NO_3^- 0,15 mM, NO_2^- 0,080 mM, SO_4^{2-} 0,2 mM a HFO, Lac, HAc 0,4 mM, který byl naředěn ze zásobních roztoků jednotlivých aniontů o koncentraci 1000krát větší, které byly připraveny buď naředěním, nebo navážením a rozpuštěním pevné substance. Roztok byl postupně ředěn 2krát, 4krát, 8krát, 16krát, 32krát a 64krát deionizovanou vodou.

3.2.4 Reálné vzorky DBS

Vzorky DBS byly získány od dobrovolníků z Ústavu analytické chemie AV ČR, v. v. i., po podepsání informovaného souhlasu. Pro každou sadu experimentů byly analyzované vzorky odebrány z jednoho vpichu od stejného jedince. Před odběrem krve byla špička prstu dezinfikována tamponem s etanolem (Lach-Ner, Česká republika). Alkohol na prstu se nechal odpařit, aby nedocházelo ke srážení krve a břicho prstu bylo propíchnuto pomocí automatického zařízení pro propíchnutí kůže – autolancetou ACCU-CHEK FastClix (Roche Diabetes Care, Německo). První kapka krve byla setřena sterilním vatovým tamponem a následně byl odebírán přesný objem krve, který byl použit na přípravu vzorků DBS.

3.2.4.1 Příprava DBS na odběrových kartách

Vzorky DBS byly připravovány nanesením 5 μl kapilární krve z prstu pomocí mikropipety (Eppendorf Research plus, Německo) na karty Whatman 903 Protein Saver Card (GE Healthcare Ltd., UK), které byly sušeny na vzduchu při laboratorní teplotě po dobu 3 hodin. Po uschnutí (a skladování) byla celá skvrna vyražena z karty pomocí děrovače o průměru 5,5 mm. Vyražená část byla přenesena do čisté polypropylenové vialky (1ml; P/N 5182-0567, Agilent, Německo), pro eluci bylo přidáno 100 μl deionizované vody při analýzách kationtů a 150 μl při analýzách aniontů, vialka byla uzavřena a míchána při 700 ot/min po dobu 20 minut na třepače (VORTEX IKA MS 3 Basic).

Z odběrových karet byly také připravovány vzorky výřezů bez krve. Po vyražení z karty byly tyto výřezy přeneseny do polypropylenových vialek a byly eluovány ve 100 μl deionizované vody při analýzách kationtů a 150 μl při analýzách aniontů 20 minut na třepače při 700 ot/min.

3.2.4.2 Příprava DBS v polypropylenových vialkách

Kapilární krve o objemu 5 μl byla napipetována na dno polypropylenové vialky (1ml; P/N 5182-0567, Agilent, Německo) a byla na vzduchu ponechána 3 hodiny k vysušení. Pro eluci těchto skvrn bylo do vialek napipetováno 100 μl deionizované vody při analýzách kationtů a 150 μl při analýzách aniontů, vialka byla uzavřena polyethylen olefinovým vrškem (P/N 5181-1507, Agilent, Německo) a míchána při 700 ot/min po dobu 20 minut na třepače.

3.2.4.3 Příprava rozpuštěné kapilární krve

Vzorky rozpuštěné kapilární krve byly získávány napipetováním 5 μ l kapilární krve do polypropylenové vialky s 95 μ l deionizované vody při analýzách kationtů a 145 μ l při analýzách aniontů a byly analyzovány ihned po promíchání při 700 ot/min na třepačce.

3.2.5 Ostatní roztoky

Pro proplachy kapiláry byl používán 20mM NaOH při analýzách kationtů a 50mM NaOH při analýzách aniontů, které byly každý den naředěny ze zásobního roztoku 1M NaOH, který byl připraven navážením a rozpuštěním pevné substance v deionizované vodě.

Při analýzách aniontů byla navíc kapilára proplachována 150 μ M CTAB, který byl každý den připravován ze zásobního roztoku 50mM CTAB.

3.3 Použité laboratorní pomůcky

- Běžné laboratorní sklo a vybavení
- PCR mikrozkušavky (250 μ l, Fisher scientific, USA)
- Polypropylenové vialky (1ml; P/N 5182-0567, Agilent, Německo)
- Polyethylen olefinové vršky (P/N 5181-1507, Agilent, Německo)
- Skleněné vialky (2ml; P/N 5182-9697, Agilent, Německo)
- Polypropylenové vialky (2ml; 4100P-1232, J.G. Finneran Associates, USA)
- Automatické pipety (Eppendorf Research plus, Německo)
- Špičky One Touch (Sorenson Bioscience Inc., USA)
- Plastové stříkačky (Injekt-F Solo 1 ml, Braun, Německo)
- Lodičky, laboratorní lžice
- Další použité pomůcky zmíněny v rámci jednotlivých experimentů

3.4 Použité přístroje

- Analytické váhy SI-114, Denver Instrument, USA
- Ultrazvuk BANDELIN Sonorex RK 52 H, Německo
- Třepačka VORTEX IKA MS 3 Basic, USA
- Počítač
- Lednice s mrazákem

3.4.1 Laboratorní sestava kapilární elektroforézy s vodivostní detekcí (CE-C⁴D)

Analýzy vybraných anorganických kationtů byly provedeny za pomoci laboratorní sestavy kapilární elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí CE-C⁴D. Její separační část byla tvořena křemennou kapilárou s polyimidovou vrstvou (Polymicro Technologies, USA) o vnějším průměru 375 μ m s vnitřním průměrem 50 μ m a celkovou délkou kapiláry 50 cm, jejíž efektivní délka činila 36 cm. Konce kapiláry zbavené polyimidové vrstvy byly spolu s platinovými elektrodami ponořeny do vialek naplněných BGE. Každý den před prvním analýzou byla samotná kapilára promývána manuálně injekční stříkačkou po dobu 2 minut 20mM roztokem NaOH, 1 minutu deionizovanou vodou, a nakonec roztokem BGE 2 minuty. Mezi dvěma po sobě jdoucími analýzami byla kapilára propláchnuta po dobu 20 sekund 20mM NaOH a 30 sekund roztokem BGE. Následně byl dávkovací konec separační kapiláry ponořen do kádinky s deionizovanou vodou před nadávkováním analytu, aby se zabránilo kontaminaci vzorku roztokem BGE.

Po skončení analýz na konci dne byla kapilára propláchnuta 20 mM NaOH (1 minuta), deionizovanou vodou (1 minuta) a vysušena vzduchem. Vzorky byly do systému dávkovány výškovým rozdílem hladin, který činil 10 cm a toto dávkování probíhalo 10 sekund. Analýzy probíhaly při konstantní laboratorní teplotě (25 ± 1 °C). Laboratorní sestava využívala zdroj vysokého napětí CZE 1000R (Spellman High Voltage, USA). Elektrické napětí o velikosti -15 kV bylo aplikováno na výstupní konec kapiláry. Detekce probíhala za použití C^4D detektoru, jehož analytický signál byl převeden digitálním převodníkem ORCA 28000 (ECOM spol. s.r.o., ČR) a zpracován softwarem ECOMAC (ECOM spol. s.r.o., ČR). Získaná data byla následovně vyhodnocena pomocí programu Clarity (DataApex, ČR).

3.4.2 Komerční CE- C^4D sestava

Analýzy vybraných organických a anorganických aniontů byly provedeny na komerčním přístroji 7100 CE (Agilent Technologies, Německo) vybaveným C^4D (Admet, ČR). Anionty byly separovány při potenciálu -25 kV aplikovaném na dávkovací straně křemenné separační kapiláry o vnějším průměru 375 μm s vnitřním průměrem 50 μm (Polymicro Technologies, USA) o efektivní délce 36 cm z celkové délky 50 cm. Před každou první analýzou dne byla kapilára propláchnuta 2 minuty 50mM NaOH, 1 minutu roztokem $150\mu\text{M}$ CTAB a 1 minutu roztokem BGE. Mezi analýzami byla kapilára promývána 5 sekund 50mM NaOH, 15 sekund roztokem $150\mu\text{M}$ CTAB a 40 sekund roztokem BGE. Po poslední analýze byla kapilára propláchnuta 1 minutu 50mM NaOH, 5 minut deionizovanou vodou a konce kapiláry byly ponořeny do vialek s deionizovanou vodou až do druhého dne. Všechny proplachovací kroky byly vykonány při tlaku 950 mbar. Hydrodynamické dávkování probíhalo po dobu 3 sekund při tlaku 50 mbar a teplota kapiláry během separace analytů byla udržována na 25 °C. Ke zpracování analytického signálu sloužil software ChemStation CE (Agilent Technologies, Německo).

Zpracování výsledků:

Všechny výsledky, grafy i tabulky byly založeny na měření tří individuálních vzorků, a každý z nich byl po eluci třikrát změřen na CE- C^4D sestavě. Z těchto výsledků byly vypočítány směrodatné odchylky a těm odpovídají i směrodatné úsečky zobrazené v grafech.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Analýza anorganických kationtů ve vzorcích krve

Pro analýzy anorganických kationtů byla zvolena laboratorní sestava CE-C⁴D. Výhodou této sestavy je plná kontrola při dávkování vzorků a zamezení působení vnějších vlivů (kontakt kapiláry s vnitřními částmi přístroje např. naváděcím konusem). Naopak nevýhodou je nutnost manuální obsluhy a delší doba trvání dávkování a promývání.

4.1.1 Výběr analytů

Jako analyty byly zvoleny anorganické kationty, které jsou běžně přítomné jak v krvi, tak v porézních odběrových sorbentech. Jako nejhojněji zastoupené kationty byly vybrány NH₄⁺, K⁺, Ca²⁺, Na⁺ a Mg²⁺, které jsou zároveň dobře stanovitelné [5, 18, 106]. NH₄⁺ byl zvolen jako jeden z analytů z důvodu jeho možné komigrace s K⁺ (viz kapitola 4.1.2). Tyto kationty byly také vybrány na základě jejich používání při diagnostice a monitorování metabolických poruch a onemocnění viz kapitola 2.7.1.

4.1.2 Výběr BGE

S ohledem na vybrané analyty byl použit vhodný roztok BGE, který je schopný je odseparovat. Složení elektrolytu bylo zvoleno na základě předešlých experimentů [107] a jednalo se o směs 1M kyseliny octové, 20 % metanolu a 1mM 18-crown-6. Roztoky metanolu a 18-crown-6 byly přidány z důvodu lepší separace analytů. NH₄⁺ a K⁺, které mají téměř identickou elektroforetickou mobilitu a proto komigrovaly, byly odseparovány pomocí 18-crown-6 tvořícího komplex s draselnými ionty. Dále metanol poskytl rozlišení Na⁺ a Mg²⁺, které také komigrovaly.

4.1.3 Nová koncepce způsobů odběrů DBS

Dnes nejčastěji používané odběrové materiály na bázi celulózy vykazují řadu nevýhod jako je snížená výtěžnost analytů, z důvodu zadržování krevní matrice a cílových analytů v pórech sorbentů, které tak nemohou být kvantitativně eluovány. Odběrové materiály mohou navíc uvolňovat kontaminující látky do eluátu DBS, jako například anorganické a organické ionty.

Jako řešení těchto nevýhod byl zvolen bezsorbentový odběr vzorků krve pro přípravu DBS, který by měl umožnit nanesení přesných objemů krve nezávisle na hladině hematokritu a zajistit dostupnost celé DBS pro eluci, eluci cílových analytů, eluáty bez sorbentových kontaminantů, flexibilitu, snadnou manipulaci a kompatibilitu s dávkovacími systémy různých instrumentací.

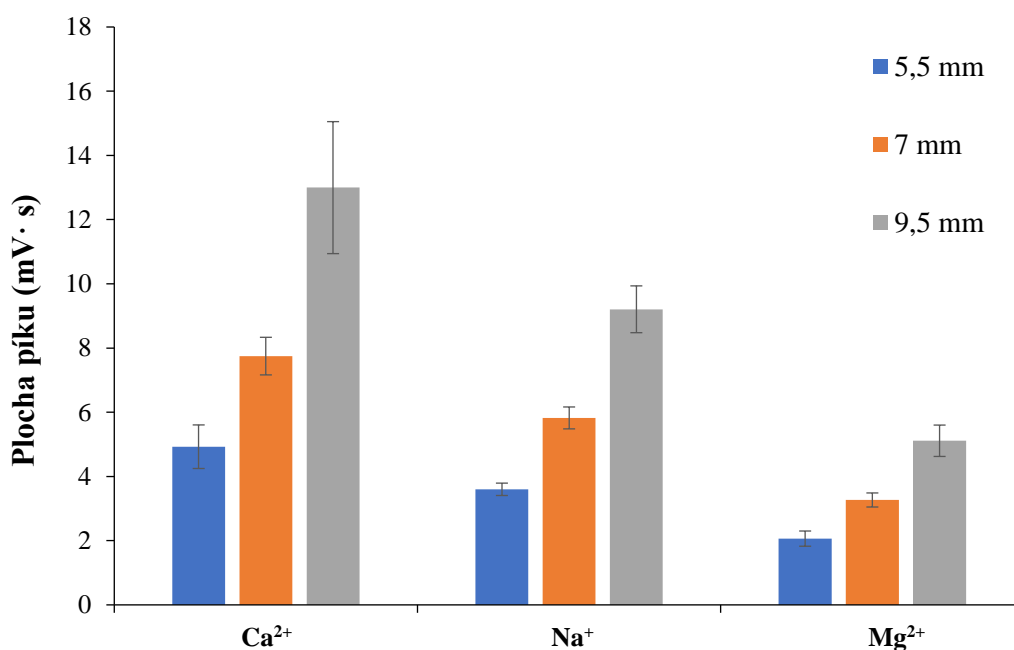
Mezi testovanými odběrovými nádobkami byly 2ml skleněné vialky Agilent, které se projeví jako nevhodné z důvodu kontaminace Na⁺ ionty a nutnosti použití většího objemu eluátu pro dávkování. Pro odběry byly testované také PCR mikrozkušavky, které se ukázaly jako nevhodné z důvodu jejich nízkého objemu a nekompatibility s dávkovacími systémy komerčních CE přístrojů. Jako konečná varianta byly vybrány 1ml polypropylenové vialky Agilent, které jsou kompatibilní s CE dávkovacími systémy, čímž byla minimalizována manipulace se vzorkem. Před odběrem krve byly nové vialky dodatečně předčištěny deionizovanou vodou pro vyloučení či snížení kontaminujících iontů pocházejících z výroby, které by se mohly uvolnit do výsledných eluátů. Poté byly do vialek odebírány vzorky krve o přesném objemu (5 µl). Vzniklé DBS vzorky byly eluovány v těchto vialkách a analyzovány po nadávkování přímo z volného roztoku. Detailní popis odběru vzorků viz kapitola 3.2.4.

4.1.4 Analýzy různých velikostí průměrů výřezů odběrové karty

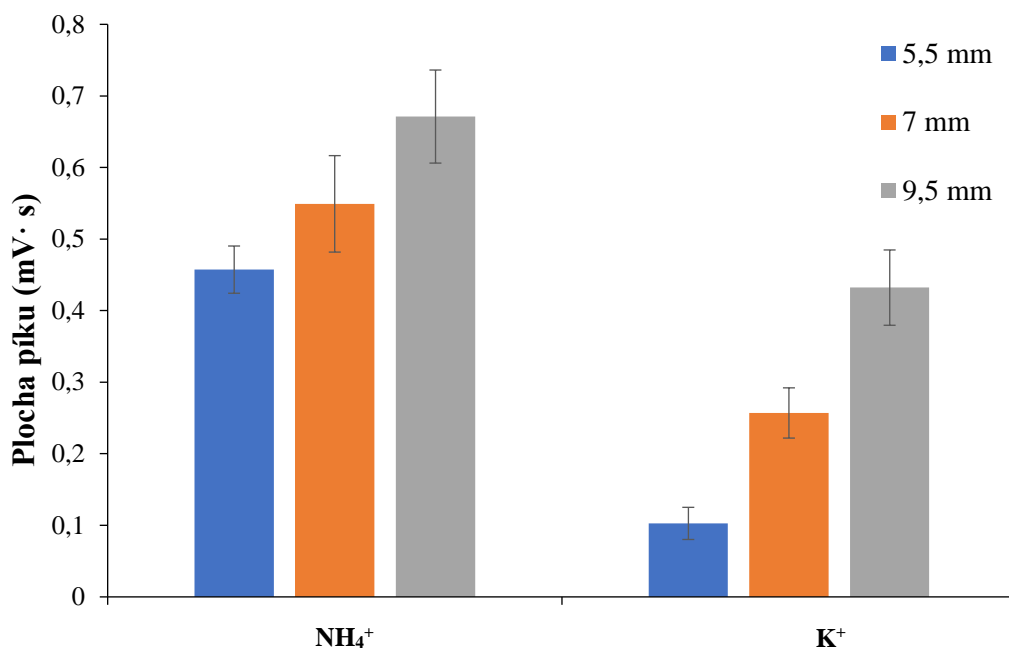
Pro posouzení míry kontaminace, v nejčastěji používaných odběrových kartách na bázi celulózy Whatman 903 Protein Saver Card (dále jen Whatman 903), byly pro analýzu připraveny výřezy o velikosti 5,5; 7 a 9,5 mm. Tyto velikosti byly zvoleny na základě dostupných děrovačů za účelem sledování nárůstu kontaminace s plochou odběrové karty.

Výřezy o velikosti 7 a 9,5 mm musely být vloženy do polypropylenových vialek s větším průměrem dna (2ml; 4100P-1232, J.G. Finneran Associates, USA) a po eluci byl eluát přepipetován do PCR mikrozkušavky s odříznutým vrškem vložené do 1ml polypropylenové vialky (Agilent). Tato PCR mikrozkušavka sloužila jako insert pro vytvoření vyšší hladiny roztoku pro nadávkování, což bylo nutné z důvodu nižšího objemu eluátu díky absorpci části elučního roztoku výřezem (cca 30 μ l).

Z obrázků 3 a 4 je patrná zvyšující se koncentrace anorganických kationtů s narůstající velikostí výřezu odběrové karty. Výsledky byly rozděleny do dvou grafů s vhodným měřítkem z důvodu velkých rozdílů v plochách píků jednotlivých kontaminujících kationtů. Nejvyšší kontaminace uvolněné z výřezů odběrové karty byly zaznamenány u Ca^{2+} , Mg^{2+} a Na^+ iontů. Tyto kontaminace pravděpodobně pochází z procesů přípravy a výroby celulózových odběrových karet. Nejnižší kontaminace byly zaznamenány pro NH_4^+ a K^+ ionty, které se v odběrových kartách téměř nevyskytují.



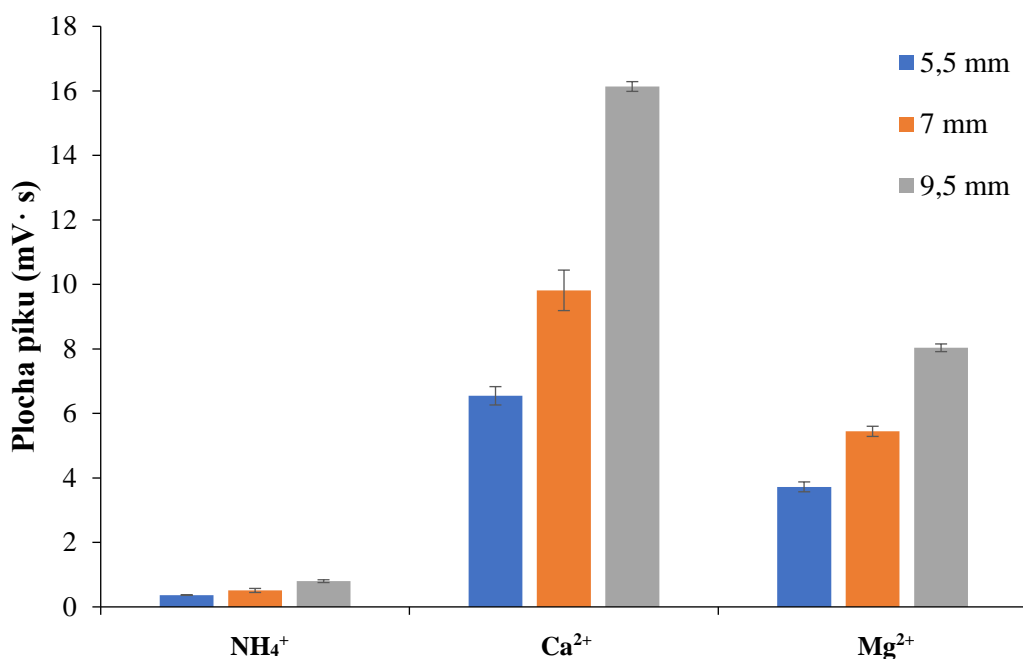
Obrázek 3: Graf závislosti nárůstu jednotlivých kationtů na různých průměrech výřezů odběrových karet Whatman 903 (Podmínky měření viz kapitola 3.4.1)



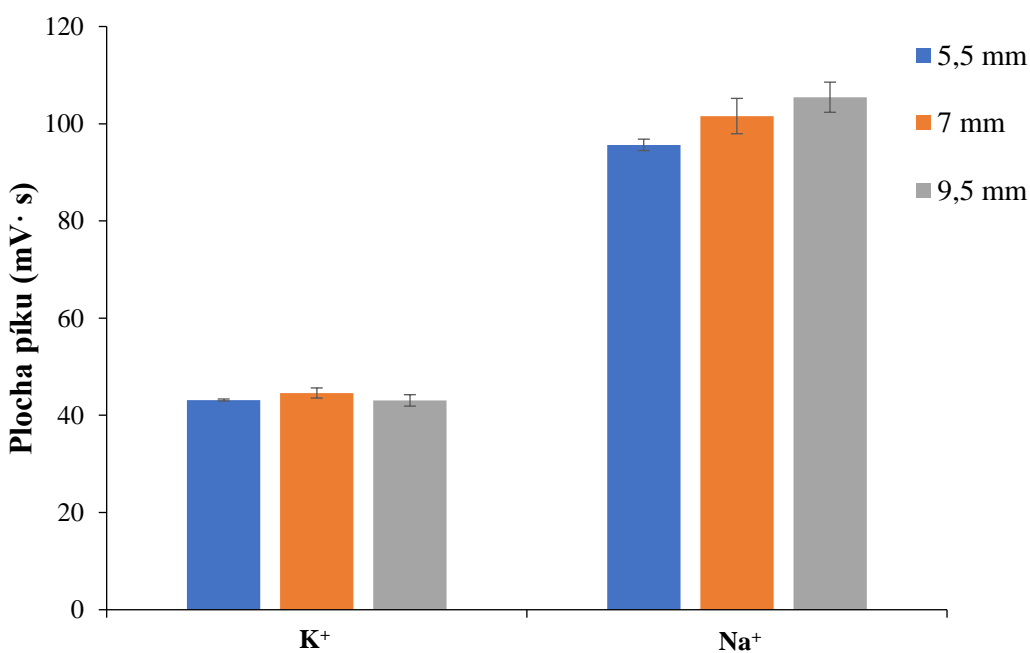
Obrázek 4: Graf závislosti nárustu jednotlivých kationtů na různých průměrech výřezů odběrových karet Whatman 903 (Podmínky měření viz kapitola 3.4.1)

Následně byl proces zopakován se stejně velkými výřezy odběrových karet (5,5–9 mm), na které byl nanesen jednotný objem kapilární krve (5 μl) pro vytvoření DBS. Tento experiment byl proveden pro přiblížení reálné situace, jaké množství těchto anorganických kationtů se ve vzorcích krve nachází v porovnání s přidavkem kationtů ze sorbentu. Vzorek kapilární krve o množství 5 μl vytvořil na odběrové kartě skvrnu o průměru 4,5 mm, proto menší průměr než 5,5 mm nebyl testován z důvodu, že by nebyla kvantitativně odebrána celá skvrna a vlivem hematokritu by nebyla zajištěna homogenní distribuce analytů. Příprava vzorků probíhala podle postupu v kapitole 3.2.4.1 Výsledky analýz znázorněné na obrázcích 5 a 6 potvrdily výsledky předešlého experimentu, samozřejmě s patřičným nárustem přirozeného obsahu kationtů v kapilární krvi. Nejvýrazněji lze opět pozorovat nárůst kontaminace s plochou výřezu u Ca^{2+} , Mg^{2+} a Na^+ . V krvi vysoce zastoupený K^+ byl ve vzorcích DBS s různými plochami výřezů konstantní.

Srovnáním ploch jednotlivých kationtů na obrázcích 3,4 a 5,6 lze získat představu o obsahu kationtů, které v rámci vzorků DBS zaujímá materiál odběrové karty a které se zároveň zvyšují s velikostí vyražené části karty. Tyto kontaminující kationty uvolněné z materiálu karty tak narušují správné stanovení sledovaných analytů v krevním vzorku.



Obrázek 5: Graf závislosti nárustu jednotlivých kationtů na různých průměrech výřezů odběrových karet Whatman 903 s DBS (Podmínky měření viz kapitola 3.4.1)



Obrázek 6: Graf závislosti nárustu jednotlivých kationtů na různých průměrech výřezů odběrových karet Whatman 903 s DBS (Podmínky měření viz kapitola 3.4.1)

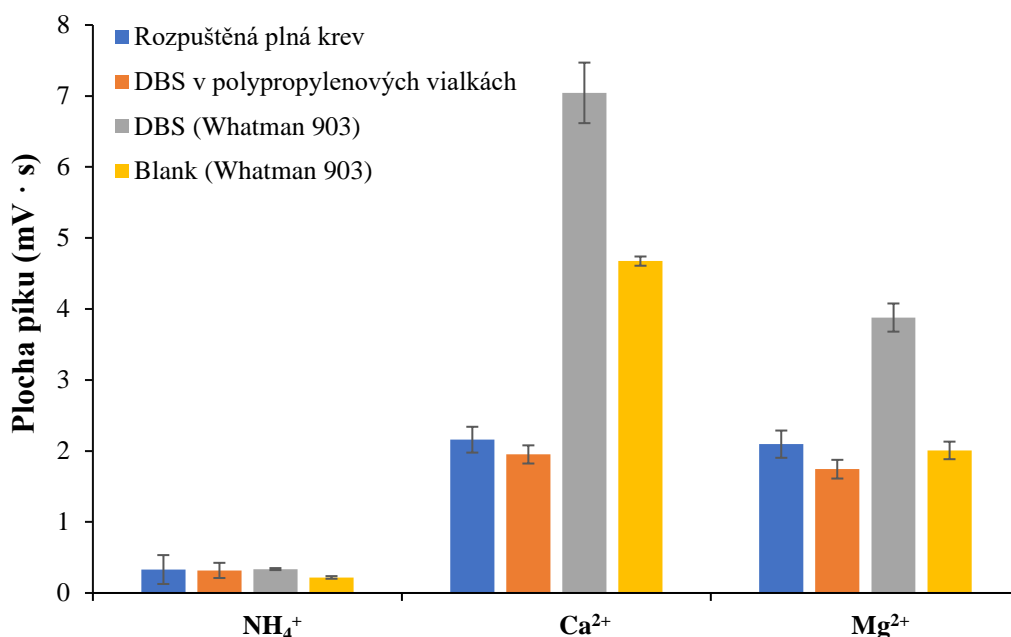
4.1.5 Analýzy DBS a rozpuštěné kapilární krve

Pro další experimenty bylo pracováno s výřezem odběrové karty Whatman 903 o velikosti 5,5 mm. Velikost byla zvolená tak, aby výřez s DBS obsahoval co nejméně odběrového materiálu, ale byl schopen pojmout zvolené množství odebírané krve (5 μ l) a přesně zapadl do polypropylenových vialek. Výřezem celé skvrny bylo zajištěno potlačení vlivu hematokritu, který ovlivňuje nehomogenitu analytu ve skvrně zvláště patrnou ve středu a na okrajích, kdy mezi analytem a sorbentem dochází k interakci chromatografického typu.

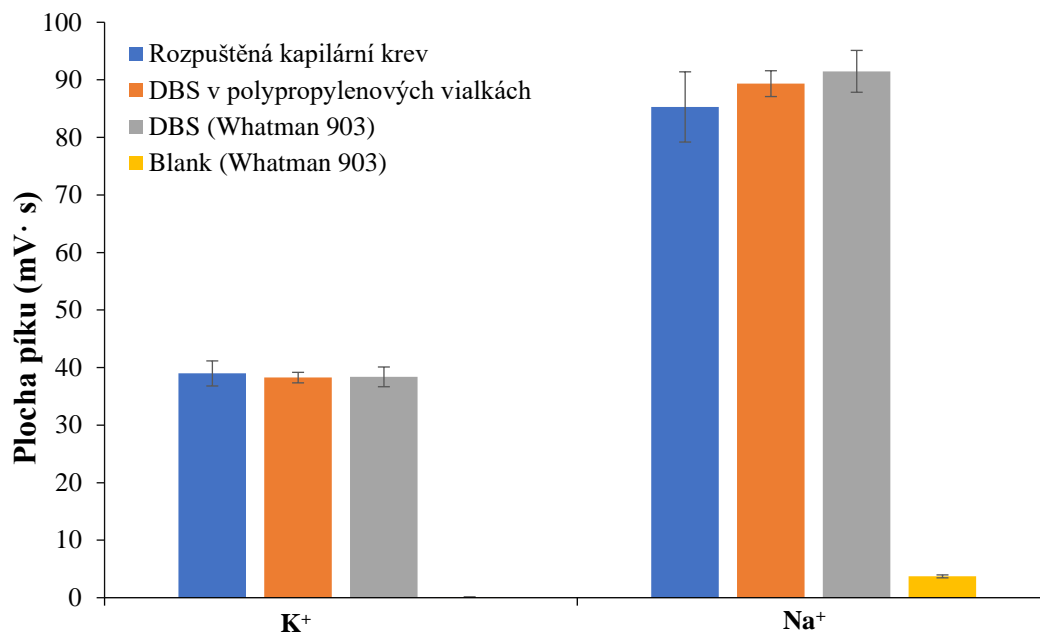
Obrázky 7 a 8 zobrazují analýzu eluátu výřezu odběrové karty bez DBS o velikosti 5,5 mm (blank), DBS na odběrové kartě Whatman 903 o průměru 5,5 mm, DBS v polypropylenové vialce (1ml; P/N 5182-0567, Agilent, Německo) bez odběrové karty a rozpuštěné kapilární krve v polypropylenové vialce. Postupy přípravy viz kapitola 3.2.4.

Z výsledků analýz je opět patrný značný nárůst kontaminace u vzorku DBS z odběrové karty oproti rozpuštěné kapilární krvi. Tento rozdíl se přibližně rovná kontaminaci uvolněné z výřezu odběrové karty bez DBS, což je zejména viditelné u Ca^{2+} a Mg^{2+} . Jelikož odběrová karta obsahuje zanedbatelné množství K^+ , plocha tohoto kationtu ve vzorku DBS na odběrové kartě je téměř stejná jako ve vzorcích rozpuštěné kapilární krve a DBS v polypropylenové vialce.

U DBS vytvořených v polypropylenových vialkách v porovnání s DBS na odběrových kartách nebylo prokázáno zvýšení obsahu vlivem kontaminujících kationtů. DBS v polypropylenových vialkách zároveň vykazují podobné plochy jako rozpuštěná kapilární krev, tudíž materiál vialek nekontaminuje výsledné eluáty ani není patrné zadržování iontů tímto materiálem. Zároveň při použití sorbentů na zachycení vzorků krve je patrná nutnost používat co nejmenší nutné množství těchto sorbentů, pro co nejmenší ovlivnění analýz obsaženými ionty.



Obrázek 7: Graf porovnání různých přístupů přípravy DBS, rozpuštěné kapilární krve a blanku odběrové karty (Podmínky měření viz kapitola 3.4.1)



Obrázek 8: Graf porovnání různých přístupů přípravy DBS, rozpuštěné kapilární krve a blanku odběrové karty (Podmínky měření viz kapitola 3.4.1)

4.1.6 Analýzy různých odběrových sorbentů

Pro tento experiment bylo vybráno sedm porézních odběrových sorbentů, které jsou komerčně dostupné. Jedná se o odběrové karty Whatman 903, Ahlstrom – GenCollect 2.0, odběrová zařízení Mitra, HemaPEN D300S, HemaPEN W300S, Capitainer-B a HemaXis DB 10 a dále byly použity polypropylenové vialky (1ml; P/N 5182-0567, Agilent, Německo) pro bersorbentovou variantu DBS odběrů. Všechny odběrové sorbenty až na zařízení Mitra, která má polymerní špičku (pro sorpci 10 μ l krve), jsou odběrové karty nebo již vyražené disky odběrových karet vyrobené z celulózy. Z důvodu rozdílných rozměrů a hmotností porézních sorbentů bylo dle navážky sorbentu vyjmutého ze zařízení přepočítáno množství deionizované vody pro eluci viz tabulka 1. Jako základ pro tento výpočet byly vybrány odběrové karty Whatman 903, které byly eluovány ve 100 μ l deionizované vody, a eluční objemy pro ostatní odběrové sorbenty byly vztaženy poměrově k tomuto objemu. U HemaPEN D300S a W300S byly k jedné eluci použity tři disky odběrových karet kvůli jejich nízké hmotnosti. Ačkoliv špička zařízení Mitra je nejtěžší z uvedených odběrových sorbentů, pro tuto analýzu bylo zvoleno množství 100 μ l stejně jako pro karty Whatman 903 z důvodu jiného výrobního materiálu s jinou schopností absorpce.

K odběrovým sorbentům přenesených do polypropylenových vialek bylo přidáno vypočítané množství deionizované vody a poté byly po dobu 20 minut míchány na třepačce při 700 ot/min. Do samotné polypropylenové vialky (1ml; P/N 5182-0567, Agilent, Německo) bez odběrového sorbentu bylo také přidáno 100 μ l deionizované vody a vialka byla ponechána 20 minut na třepačce při 700 ot/min. Pro srovnání byl připraven i reálný vzorek DBS na kartě Whatman 903 viz kapitola 3.2.4.1.

Všechny testované porézní odběrové sorbenty vykazují kontaminace kationty viz obrázek 7. V porovnání se vzorkem DBS na kartě Whatman 903 jsou tyto kontaminace významné. Nejnížší kontaminace kationty vykazují odběrová zařízení Mitra a HemaPEN D300S.

Velmi vysoké kontaminace ionty jsou logicky znatelné u odběrových karet Ahlstrom – GenCollect 2.0, které jsou předupravené napuštěním činidly, která mohou lyzovat buňky a denaturovat proteiny. Tyto odběrové karty byly pravděpodobně předupraveny pomocí dodecylsulfátu sodného, jelikož byla naměřena vysoká koncentrace Na⁺, jak je vidět na elektroforeogramu viz obrázek 9. U odběrových zařízení HemaPEN W300S a HemaXis DB 10 byl potvrzen předpoklad, že sorbent bude obsahovat podobné množství kationtů jako odběrová karta Whatman 903, jelikož sorbenty do těchto zařízení jsou dodávány s podobnými specifikacemi a stejnou společností jako pro odběrové karty Whatman 903. Kontaminace všech celulózových odběrových sorbentů pravděpodobně pocházejí z procesů jejich přípravy a výroby.

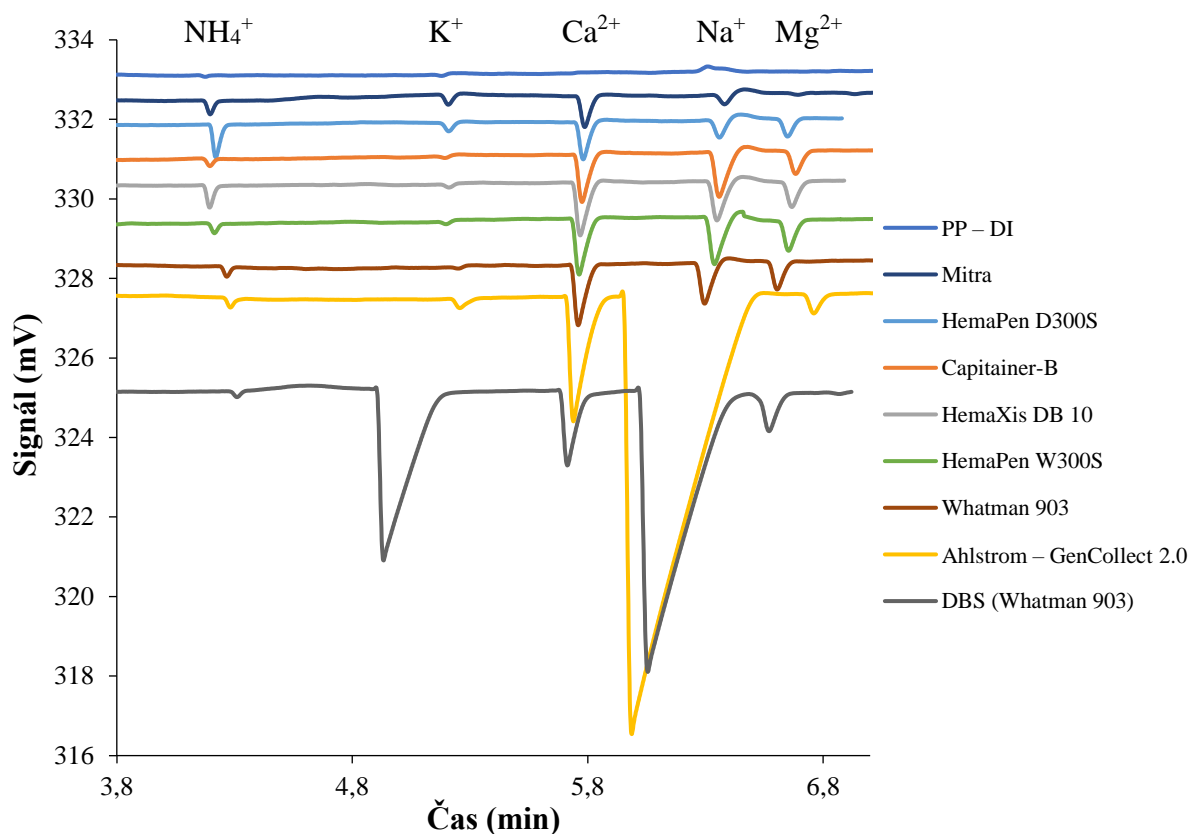
Obrázek 9 ukazuje i elektroforeogram analýzy polypropylenové vialky s deionizovanou vodou, která byla navržena pro bezsorbentové odběry DBS a ve které nebyla zaznamenána kontaminace sledovanými kationty. Z tohoto důvodu se bezsorbentové odběry jeví jako vhodná alternativa pro odběry vzorků DBS.

Tabulka 1: Průměrné hmotnosti sorbentů se směrodatnou odchylkou (SD) a příslušné přidané množství deionizované vody (DI)

Odběrový sorbent	Průměrná hmotnost ± SD (mg)	Množství DI (μl)
Polypropylenová vialka s DI	–	100
Mitra	15,43 ± 0,30	100
HemaPEN D300S*	4,50 ± 0,08	100
Capitainer-B	8,60 ± 0,37	190
HemaXis DB 10	4,68 ± 0,29	104
HemaPEN W300S*	5,10 ± 0,08	113
Whatman 903	4,50 ± 0,16	100
Ahlstrom – GenCollect 2.0	4,40 ± 0,23	98

*Celková hmotnost D300S je dána hmotností 1 disku (1,50 mg)

*Celková hmotnost W300S je dána hmotností 1 disku (1,70 mg)



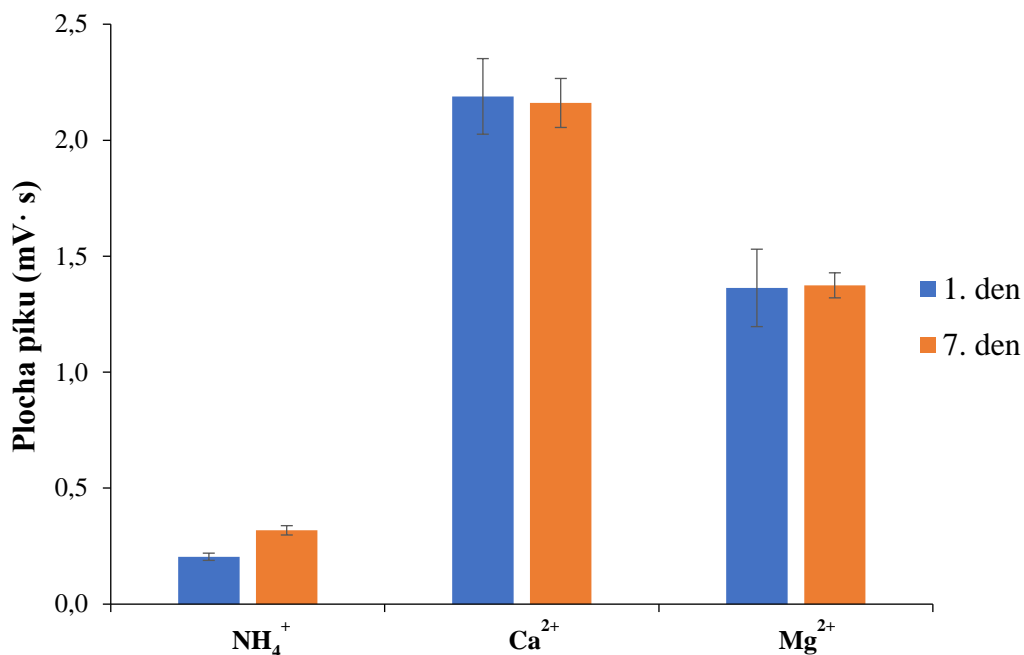
Obrázek 9: Elektroforeogramy eluátů porézních odběrových sorbentů, polypropylenové vialky s deionizovanou vodou (PP – DI) a DBS na kartě Whatman 903 (Podmínky měření viz kapitola 3.4.1 a tabulka 1)

4.1.7 Analýza stability DBS

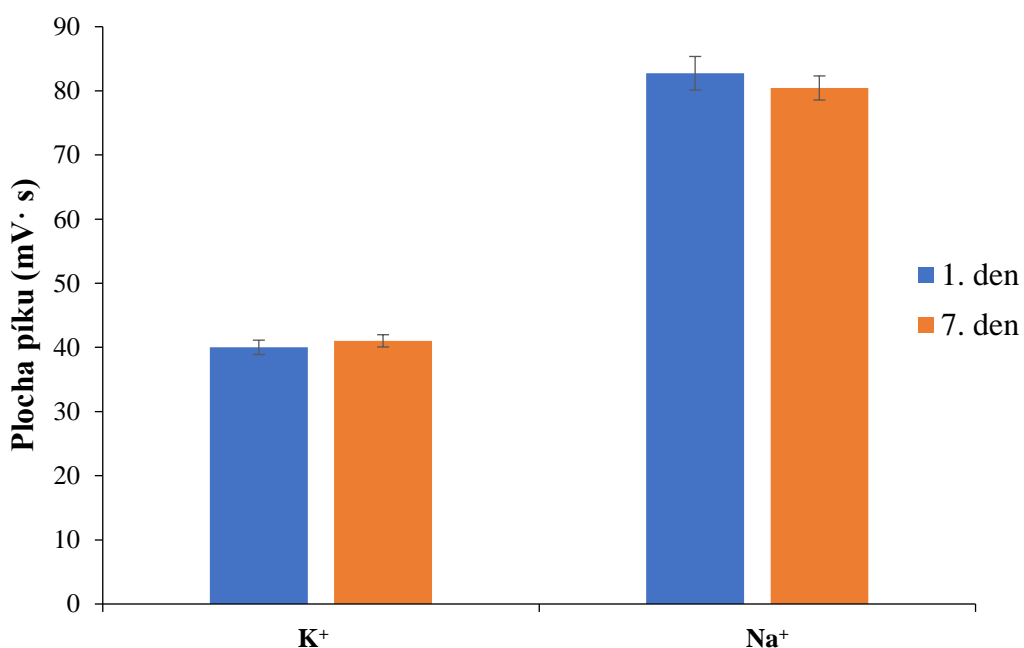
U vzorků DBS na odběrové kartě Whatman 903 a v polypropylenových vialkách byla otestována týdenní stabilita v rámci prvního a sedmého dne pro základní ověření předpokladu stability těchto kationtů. Skladování (po odběru a 3hodinovém schnutí – viz kapitola 3.2.4) probíhalo za laboratorní teploty v uzavíratelném sáčku s vysoušedlem. Při tomto způsobu skladování nebyly patrné změny ve složení těchto kationtů. Pro tyto anorganické kationty se předpokládá, že vykazují stabilitu i v rámci týdnů, což nebylo předmětem této práce, ale jedná se o závislost, která se dá potvrdit v rámci jiných časově náročnějších studiích a tento fakt byl i publikován např. v [5, 106].

V rámci týdne vzorky DBS jak na odběrové kartě, tak v polypropylenové vialce vykazovaly stabilní množství anorganických kationtů (kromě NH_4^+), jejichž procentuální změny mezi 1. a 7. dnem se pohybovaly od 0,74 % do 4,37 %. Co se týče NH_4^+ iontů, tak na obrázcích 10 a 12 lze pozorovat výrazné rozdíly v jeho stanovených množstvích, navíc s velkými chybovými úsečkami. Jeho stanovená množství byla velmi proměnlivá i v rámci různých vzorků, a zároveň měl tento kationt největší procentuální nárůst mezi 1. a 7. dnem, tento nárůst činil 60 % pro DBS v polypropylenových vialkách a 164 % pro DBS na odběrové kartě. Tento nárůst může být způsoben dekompozicí dusíkatých sloučenin v DBS (např. aminokyselin – viz [52]) za vzniku jednodušších sloučenin jako je NH_4^+ . Jedná se o hypotézu, u které by byla potřeba další studie pro její ověření.

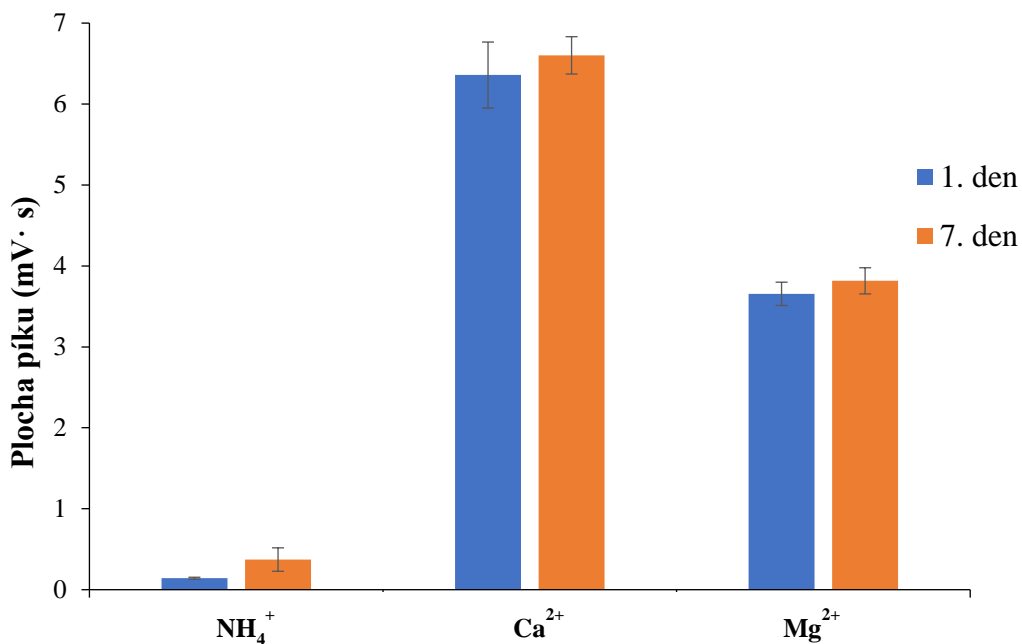
Ostatní vybrané anorganické kationty jsou v obou případech přípravy DBS (na odběrové kartě a v polypropylenové vialce) v čase stabilní a mezi 1. a 7. dnem nevykazují významné rozdíly v množství. U DBS na odběrové kartě je opět patrné navýšení množství kationtů o kontaminace ze sorbentu. V rámci stability se dá ale říci, že pro tyto kationty se jedná o rovnocenné varianty přípravy DBS, nicméně z pohledu ovlivnění správnosti analýz kationtů z kapilární krve se až na draselné ionty jedná v případě použití sorbentů o variantu nevhodnou.



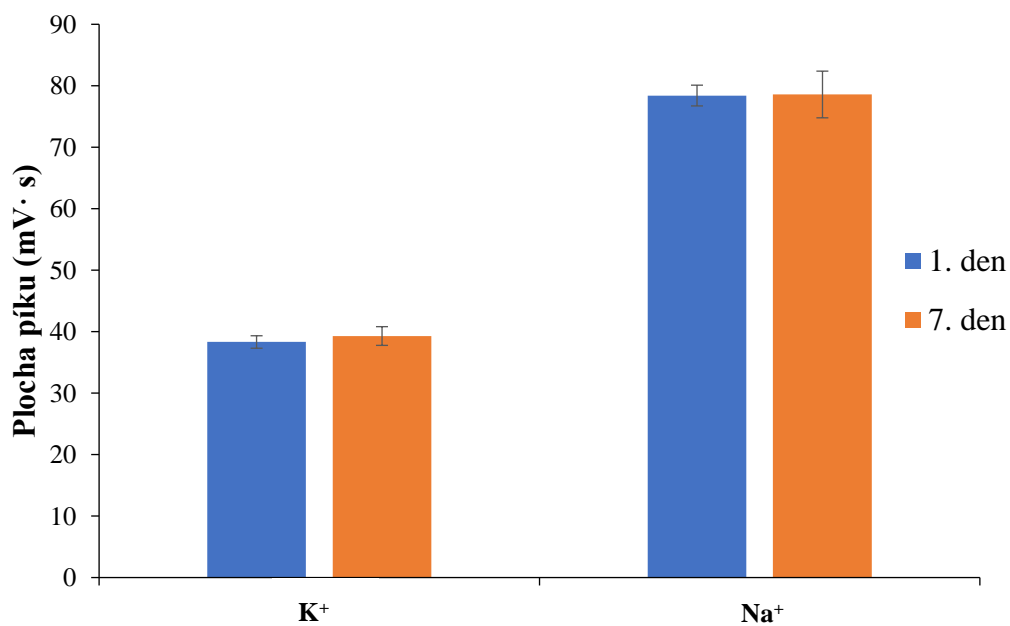
Obrázek 10: Graf závislosti stability vybraných kationtů v DBS v polypropylenových vialkách pro 1. a 7.den skladování (Podmínky měření viz kapitola 3.4.2)



Obrázek 11: Graf závislosti stability vybraných kationtů v DBS v polypropylenových vialkách pro 1. a 7.den skladování (Podmínky měření viz kapitola 3.4.2)



Obrázek 12: Graf závislosti stability vybraných kationtů v DBS na odběrové kartě pro 1. a 7.den skladování (Podmínky měření viz kapitola 3.4.2)



Obrázek 13: Graf závislosti stability vybraných kationtů v DBS na odběrové kartě pro 1. a 7.den skladování (Podmínky měření viz kapitola 3.4.2)

4.1.8 Experimentální stanovení reálných koncentrací v kapilární krvi a v sorbentu

Pro zjištění koncentrace kationtů v kapilární krvi byly připraveny a proměřeny kalibrační roztoky v rozsahu 0,004–5 mmol/l dle stanovovaných iontů, které byly připraveny dle postupu v kapitole 3.2.3.1. Kalibrační rozsah byl zvolen na základě předpokládaného rozsahu koncentrací daných kationtů ve 20krát zředěné kapilární krvi a pokrývá tak nízké koncentrační hladiny pro sorbenty bez DBS, tak i přirozené obsahy iontů v krvi, i jejich případná zvýšená množství. Podle směrnic kalibračních křivek byly vypočteny výsledné průměrné koncentrace kationtů obsažených ve vzorcích DBS připravených různé dny. Výsledné koncentrace v neředěné kapilární krvi a blanku (zohledňující zředovací faktor 20) jsou spolu s koeficienty determinace (R^2) pro zvolený kalibrační rozsah uvedeny v tabulce 2. Průměrná koncentrace kationtů byla stanovena pro výřezy odběrových karet Whatman 903 bez DBS (blank), DBS na odběrových kartách (DBS – Wh903) a eluáty DBS v polypropylenových vialkách (DBS – PP). Postupy přípravy viz 3.2.4.

Tabulka 2: Souhrn stanovených reálných koncentrací kationtů se směrodatnou odchylkou (SD)

Vzorek	Průměrná koncentrace kationtů ± SD (mmol/l)				
	NH ₄ ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	Mg ²⁺
Blank	*	0,363 ±	7,970 ±	4,385 ±	1,597 ±
		0,008	0,028	0,456	0,030
DBS – Wh903	0,408 ±	54,729 ±	10,321 ±	88,974 ±	2,412 ±
	0,056	4,827	2,531	4,326	0,342
DBS – PP	0,273 ±	50,752 ±	1,950 ±	85,600 ±	0,711 ±
	0,062	0,552	0,110	0,599	0,156
R ²	0,9926	0,9966	0,9970	0,9927	0,9993

* Koncentrace NH₄⁺ nebyly reprodukovatelné v rámci různých DBS karet i jedné jediné DBS karty.

Kationty jsou v odběrových kartách Whatman 903 obsaženy přibližně v koncentracích desetin mmol/l u K⁺ iontů. Pro Ca²⁺, Na⁺ a Mg²⁺ to jsou již jednotky mmol/l. Přítomná kontaminace tedy může významně ovlivnit kvantitativní stanovení těchto iontů (obzvláště Ca²⁺, Na⁺ a Mg²⁺ – viz výsledky pro DBS – Wh903).

Ve vzorcích DBS v polypropylenových vialkách byly stanoveny koncentrace kationtů. Tyto kationty se většinou stanovují v plazmě nebo séru, proto nelze tyto stanovené hodnoty pro kapilární krev porovnávat s uváděnými referenčními rozmezími pro tyto matrice, neboť složení kapilární krve se může lišit [6]. Kapilární krev je tvořena krví procházející tepnami, žilami a kapilárami a současně obsahuje také intersticiální a buněčné tekutiny a jednotlivé analyty jsou mezi těmito dvěma složkami distribuovány v různých poměrech a pro každý analyt jinak, např. viz [108]. Navíc složení kapilární krve ovlivňuje podíl hematokritu, který může být značně rozdílný a může významně ovlivňovat koncentrace některých iontů (např. K⁺).

Průměrné stanovené koncentrace byly $85,600 \pm 0,599$ mmol/l pro Na^+ , $0,711 \pm 0,156$ mmol/l pro Mg^{2+} , $1,950 \pm 0,110$ mmol/l pro Ca^{2+} a $50,752 \pm 0,552$ mmol/l pro K^+ . Koncentrace Na^+ a K^+ iontů se liší výrazně od referenčních hodnot pro plazmu a sérum, zatímco koncentrace Ca^{2+} a Mg^{2+} (ve formě volných iontů) do referenčních hodnot spadají (viz. kapitola 2.7.1.3 a 2.7.1.4). Koncentrace stanovené v DBS mohly být ovlivněny hemolýzou, kdy došlo k porušení buněčné membrány a vyplavení obsahu erytrocytů, které obsahují výrazně odlišné koncentrace K^+ a Na^+ (v porovnání s plazmou). Hemolýza mohla probíhat při odběru, sušení a zpracování krve [109]. Naměřená koncentrace pro NH_4^+ je několika násobně vyšší než udávaná mez <60 $\mu\text{mol/l}$ pro plazmu, což mohl být způsobeno jeho proměnlivostí během analýz z důvodu rozkladu dusíkatých látek z DBS matrice.

Srovnatelné hodnoty byly pro některé kationty naměřeny metodou Neutron Activation Analysis, kdy byly zjištěny koncentrace pro kapilární krev odebrané na filtrační papír Whatman pro Na^+ ($78,30 \pm 12,61$ mmol/l), K^+ ($41,95 \pm 6,65$ mmol/l) a Ca^{2+} ($3,06 \pm 1,21$ mmol/l) [110].

4.2 Analýzy organických a anorganických aniontů ve vzorcích krve

Analýzy organických a anorganických aniontů byly provedeny na komerční CE-C⁴D sestavě (Agilent Technologies, Německo). Oproti laboratorní sestavě odpadá manuální manipulace se vzorky a kapilárou a poskytuje tak lepší opakovatelnost. Díky komerčnímu CE systému je jak promývací, tak dávkovací proces rychlejší.

4.2.1 Výběr analytů

Na základě analýz odběrových karet Whatman 903 a rozpuštěné kapilární krve bylo identifikováno osm aniontových analytů vyskytující se v těchto maticích. Jedná se o chloridy, dusičnany, dusitany, sírany, fosfáty, mravenčany (HFO), laktáty (Lac) a octany (HAc). Fosfát nebyl dále ve vzorcích stanovován z důvodu jeho nízké koncentrace, která bývala často pod mezí kvantifikace i detekce. Většina těchto analytů byla také vybrána na základě jejich používání při diagnostice a monitorování metabolických poruch a onemocnění viz kapitola 2.7.1.

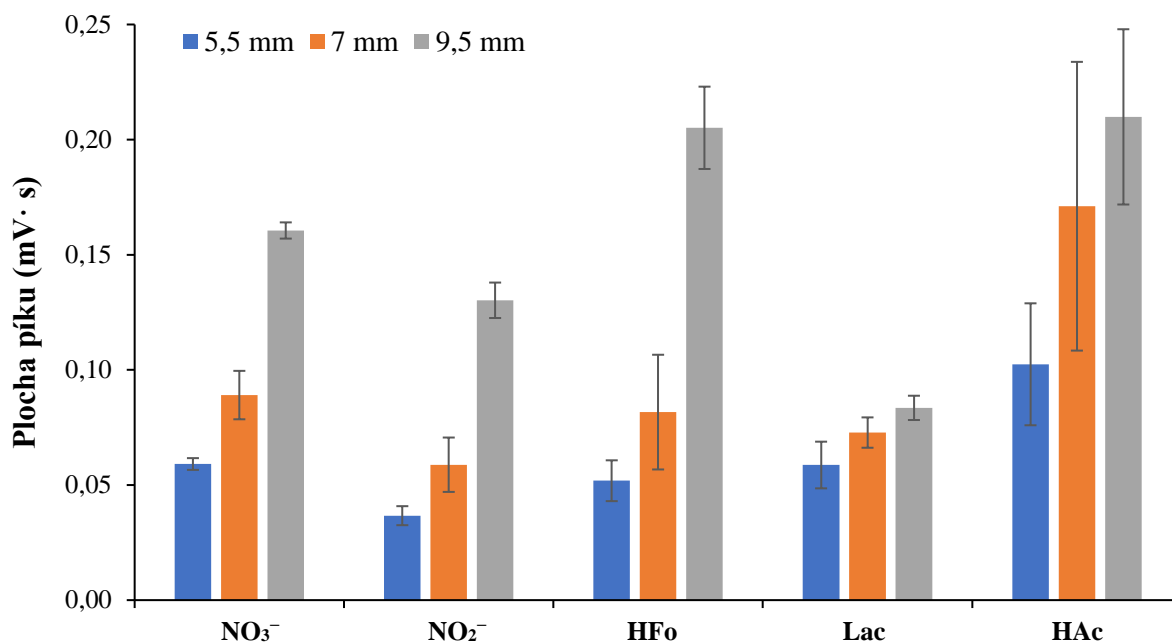
4.2.2 Výběr BGE

Pro odseparování všech vybraných analytů byl použit BGE o složení: 40mM kyselina glutamová, 20mM histidin a 75 μM CTAB. Tato směs byla zvolena na základě práce [102] a koncentrace jednotlivých komponent byla upravena pro lepší separaci všech stanovovaných analytů. CTAB byl do roztoku přidáván jako modifikátor elektroosmotického toku, který pokrývá kapiláru, aby došlo ke snížení a obratu elektroosmotického toku a umožnila se doba migrace aniontů pod 4 minuty.

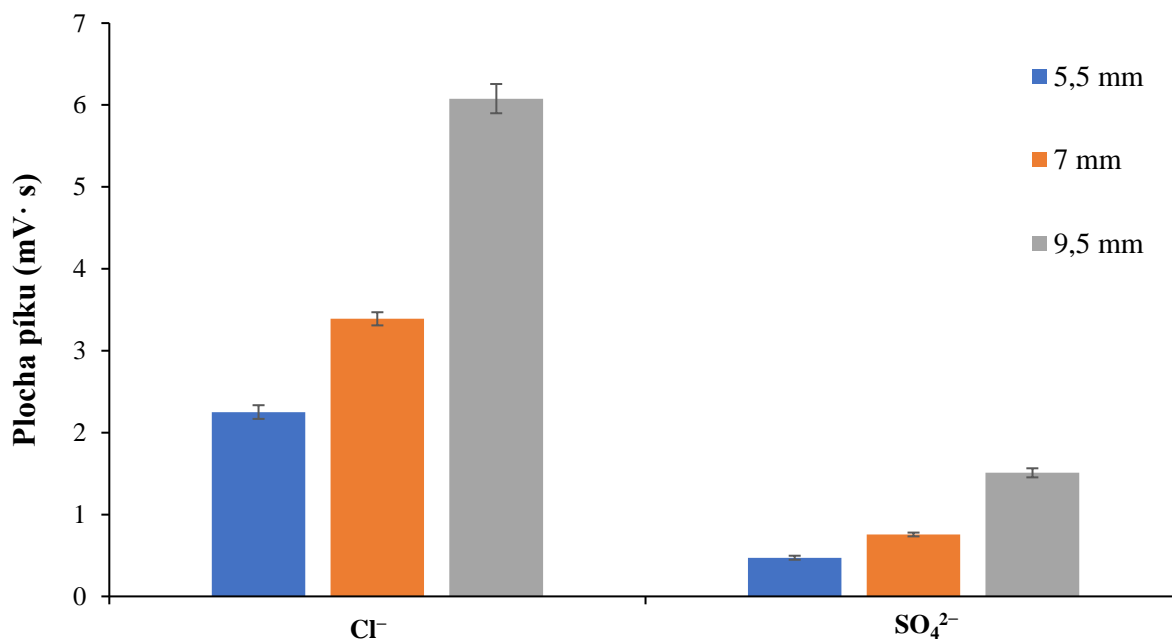
4.2.3 Analýzy různých velikostí průměrů výřezů odběrové karty

Stejně jako u anorganických kationtů byla posouzena míra kontaminace z odběrových karet Whatman 903 i pro vybrané anorganické a organické anionty. Pro tyto analýzy byly znovu zvoleny výřezy o velikosti 5,5; 7 a 9,5 mm z důvodu pozorování zvýšení kontaminace s plochou odběrové karty. Postup přípravy byl shodný s přípravou z kapitoly 4.1.4.

Z obrázků 14 a 15 je zřejmé, že s narůstajícím průměrem výřezu se eluuje vyšší množství anorganických a organických aniontů z materiálu karty. Výsledky analýz aniontů byly také rozděleny do dvou grafů s vhodným měřítkem z důvodu velkých rozdílů koncentrací zejména mezi chloridy a ostatními anionty. V eluátu blanku sorbentu byl naměřen nejvyšší obsah chloridů a síranů. Znatelná množství byla zaznamenána i u HAc, u kterých se zároveň vyskytují největší odchylky v naměřených hodnotách, z důvodu velké variability stanovených koncentrací mezi různými vzorky. Tyto kontaminace opět pravděpodobně pochází z procesů přípravy a výroby celulózových odběrových karet.



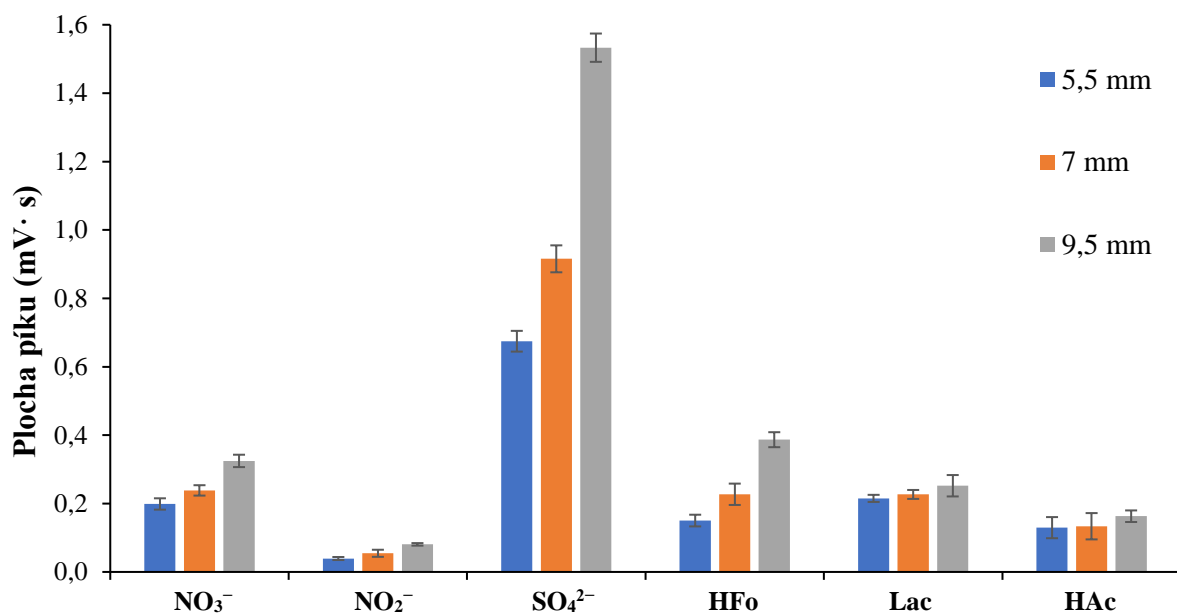
Obrázek 14: Graf závislosti nárůstu jednotlivých aniontů na různých průměrech výřezů odběrových karet Whatman 903 (Podmínky měření viz kapitola 3.4.2)



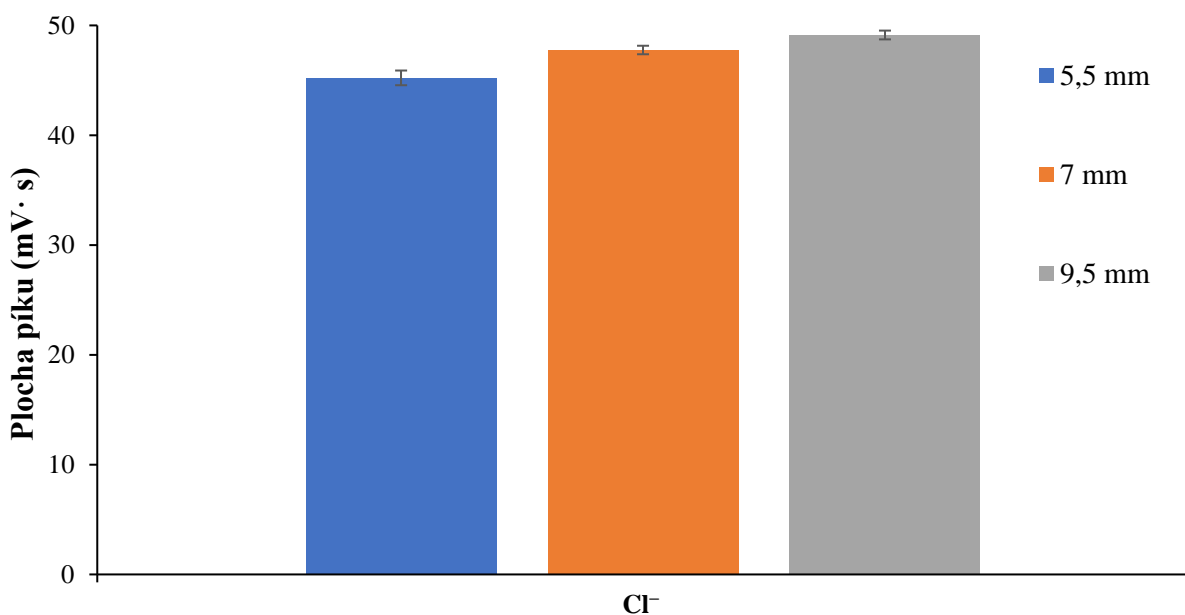
Obrázek 15: Graf závislosti nárůstu jednotlivých aniontů na různých průměrech výřezů odběrových karet Whatman 903 (Podmínky měření viz kapitola 3.4.2)

Tento experiment byl poté rozšířen o analýzy stejných velikostí různých výřezů (5,5–9 mm) odběrové karty Whatman 903, na které byly napipetovány vzorky krve o stejném množství (5 μ l) pro tvorbu DBS. Výsledky na obrázcích 16 a 17 znovu potvrzují nárůst kontaminace s plochou výřezů odběrové karty. Při porovnání s obrázkem 14 a 15 lze pozorovat plochy navýšené o množství aniontů pocházející z přidané krve. Nejvyšší nárůst vykazují dusitany a octany, které se přirozeně v krvi vyskytují ve velmi nízkém množství, viz kapitola 4.2.7.

Bylo prokázáno, že i v případě anorganických a organických aniontů dochází k jejich uvolňování z materiálu odběrových karet a kontaminování výsledného eluátu, které pak následně zkresluje analytické výsledky stanovovaných analytů v DBS.



Obrázek 16: Graf závislosti nárůstu jednotlivých aniontů na různých průměrech výřezů odběrových karet Whatman 903 s DBS (Podmínky měření viz kapitola 3.4.2)

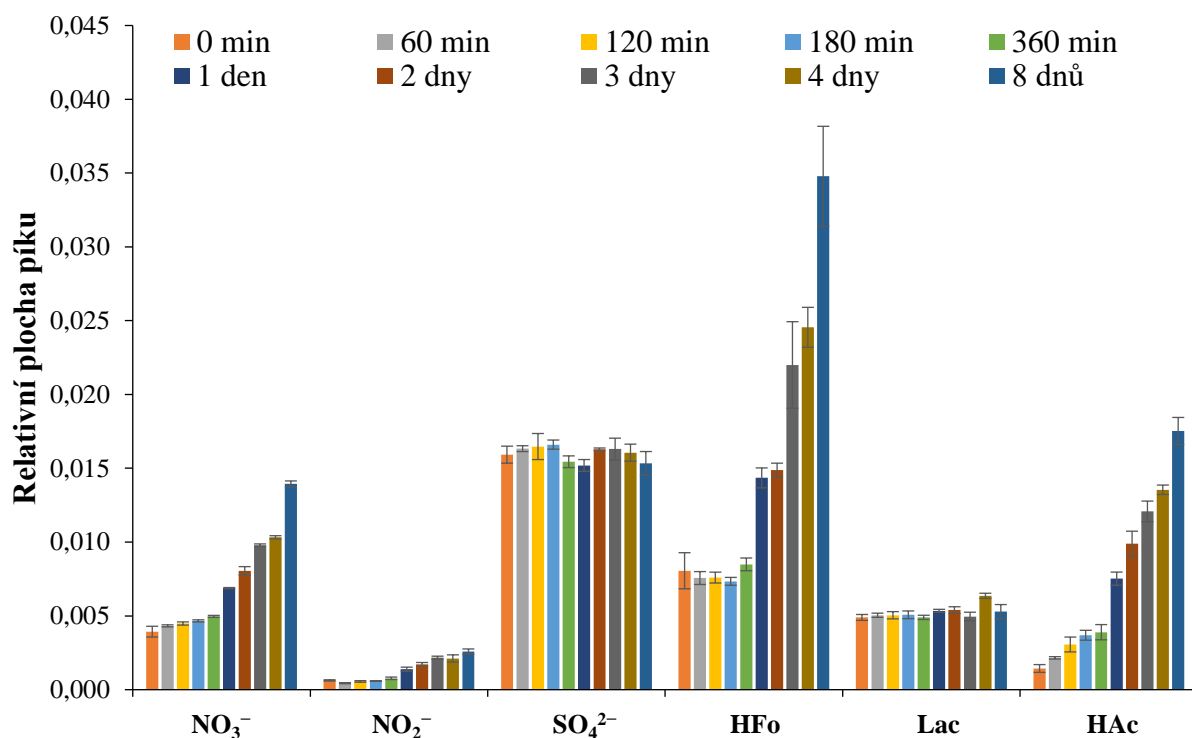


Obrázek 17: Graf závislosti nárůstu chloridů na různých průměrech výřezů odběrových karet Whatman 903 s DBS (Podmínky měření viz kapitola 3.4.2)

4.2.4 Analýzy stability DBS během procesu schnutí a skladování

Na vzorcích DBS na odběrových kartách Whatman 903 i v polypropylenových vialkách byla otestována stabilita vybraných anorganických a organických aniontů během procesů schnutí a skladování. Vyšší frekvence analýz byla zvolena z důvodu zjištění značných změn v množství stanovovaných aniontů během procesů schnutí, jelikož v předběžném experimentu analýz vzorků skladovaných v rámci jednoho týdne bylo zaznamenáno velké navýšení množství některých aniontů. Z tohoto důvodu, při detailněji provedeném experimentu, byly vzorky krve nejprve měřeny ihned po nanesení 5 μ l kapilární krve na odběrovou kartu či do polypropylenové vialky a přidání deionizované vody (0 min). Poté následovaly analýzy v průběhu schnutí v časech 60 min, 120 min, 180 min, 360 min, kdy byly vzorky nechány při laboratorních podmínkách otevřené. Zbývající vzorky byly měřeny po skladování 1 den, 2 dny, 3 dny, 4 dny a 8 dnů při laboratorní teplotě v uzavíratelném sáčku s vysoušedlem. Další sada vzorků DBS v polypropylenových vialkách byla po vysušení volně na vzduchu (6 hodin) při laboratorní teplotě následně skladována v uzavíratelných sáčcích s vysoušedlem v mrazáku při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a takto skladované vzorky byly analyzovány po skladování 1 den, 2 dny, 3 dny, 4 dny a 8 dnů. Postup přípravy vzorků viz kapitola 3.2.4.

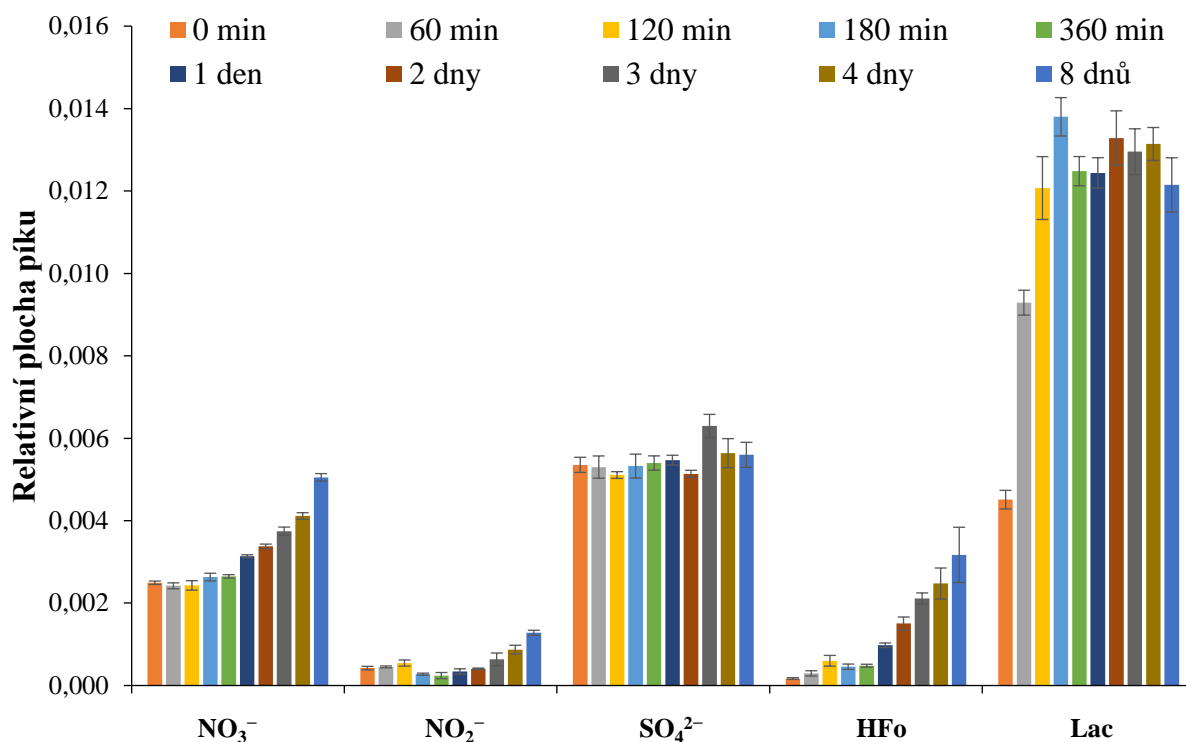
V rámci těchto experimentů nebylo testováno více různých prostředí pro skladování vzorků DBS na odběrových kartách, protože odběrové karty vykazují oproti DBS v polypropylenových vialkách významnou kontaminaci všemi anionty. Navíc, mnohé analyty (až na chloridy, sírany a laktáty) v čase neustále rostou, jak je znázorněné na obrázku 18. Výsledky v grafech (obrázky 18, 19 a 20) pro tyto experimenty byly vztaženy na plochu píku chloridů, jelikož jejich množství ve vzorcích je konstantní. U vzorků DBS na odběrových kartách Whatman 903 je obsah aniontů zvýšen o kontaminace ze samotných výřezů a následně jejich obsah výrazně roste pravděpodobně díky biochemickým pochodům (mikrobiálním rozkladům). Nárůst množství dusičnanů, dusitanů, a octanů byl během schnutí velmi pozvolný až při skladování v horizontu dnů došlo k jejich navyšování. Velký přírůstek od 1 dne skladování je viditelný i u mravenčanů, které do té doby byly téměř konstantní.



Obrázek 18: Porovnání stability anorganických a organických aniontů ve vzorcích DBS na odběrových kartách během procesů schnutí a skladování (Podmínky měření viz kapitola 3.4.2)

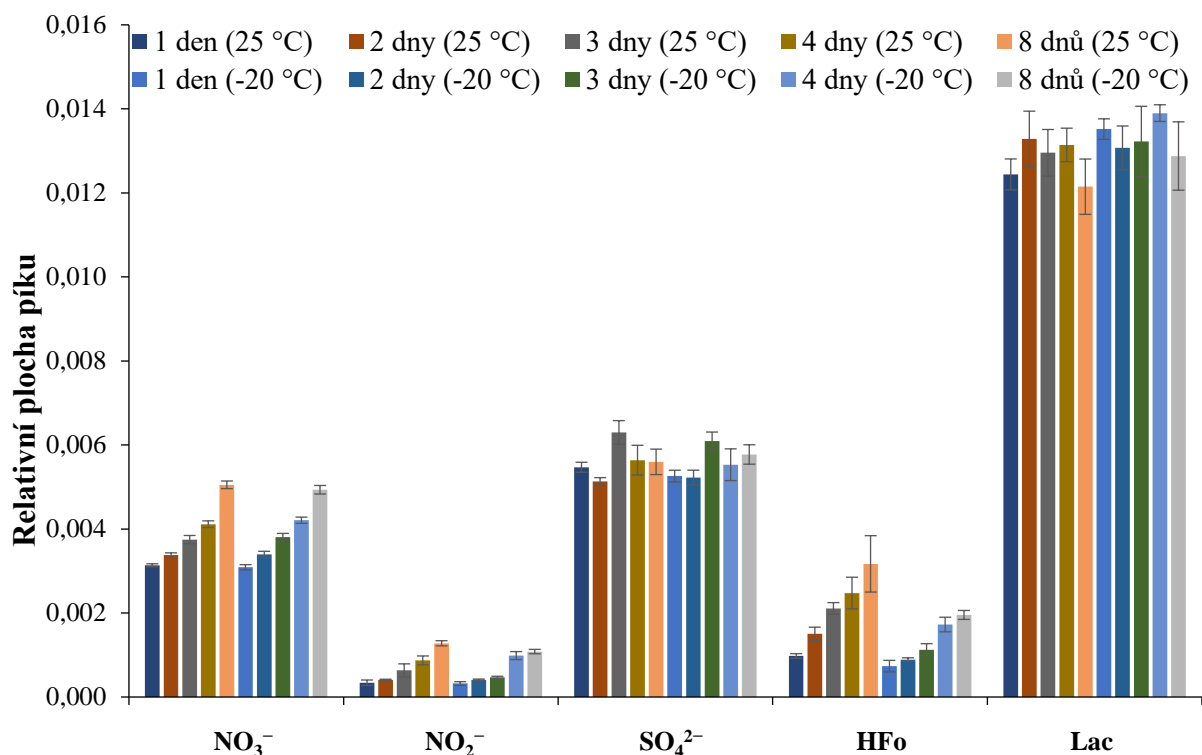
Obrázek 19 zobrazuje výsledky analýz schnutí a skladování při laboratorní teplotě pro DBS v polypropylenových vialkách. Obsah všech vybraných aniontů je až na laktáty velmi nízký a u octanů se vyskytoval pod mezí detekce až do 2. dne skladování, kdy se jeho obsah nepatrně zvýšil (a proto není v obrázku 19 uveden). Dusitany a mravenčany jsou obsaženy také v množství blízkém mezi detekce zejména v prvních hodinách schnutí, proto byly velmi špatně integrovatelné a hodnoty mohou být zkresleny.

V obrázku 19 můžeme pozorovat stabilní koncentrace síranů. Stabilní koncentrace vykazují v prvních hodinách i dusičnany, dusitany a mravenčany, následně během skladování v rámci dnů mírně narůstají, což může být zapříčiněno mikrobiálním rozkladem. Množství laktátů v prvních hodinách během schnutí narůstá, což může být způsobeno vlivem glykolýzy v krevních elementech [72]. Dále během skladování je zhruba stabilní s odpovídajícími odchylkami, jelikož jsou laktáty závislé na formě schnutí, které ovlivňuje rozprostření krve na dně vialky.



Obrázek 19: Porovnání stability anorganických a organických aniontů ve vzorcích DBS v polypropylenové vialce během procesů schnutí a skladování (Podmínky měření viz kapitola 3.4.2)

Obrázek 20 porovnává dvě prostředí skladování DBS v polypropylenových vialkách – při laboratorní teplotě (25 °C) a v mrazáku (-20 °C) pro otestování možnosti potlačení následné tvorby některých iontů. Poměrně stabilní a srovnatelné koncentrace vykazují sírany a laktáty v obou prostředích. Obsah dusičnanů teplotou skladování nebyl ovlivněn, a tak obě prostředí vykazují stejné množství tohoto aniontu se stejným nárůstem v čase. Ale u dusitanů a mravenčanů tento vliv teploty již lze pozorovat. Nízká teplota v mrazáku zpomalila nárůst obsahu těchto aniontů, zejména mravenčanů, pravděpodobně zpomalením mikrobiálních rozkladů.



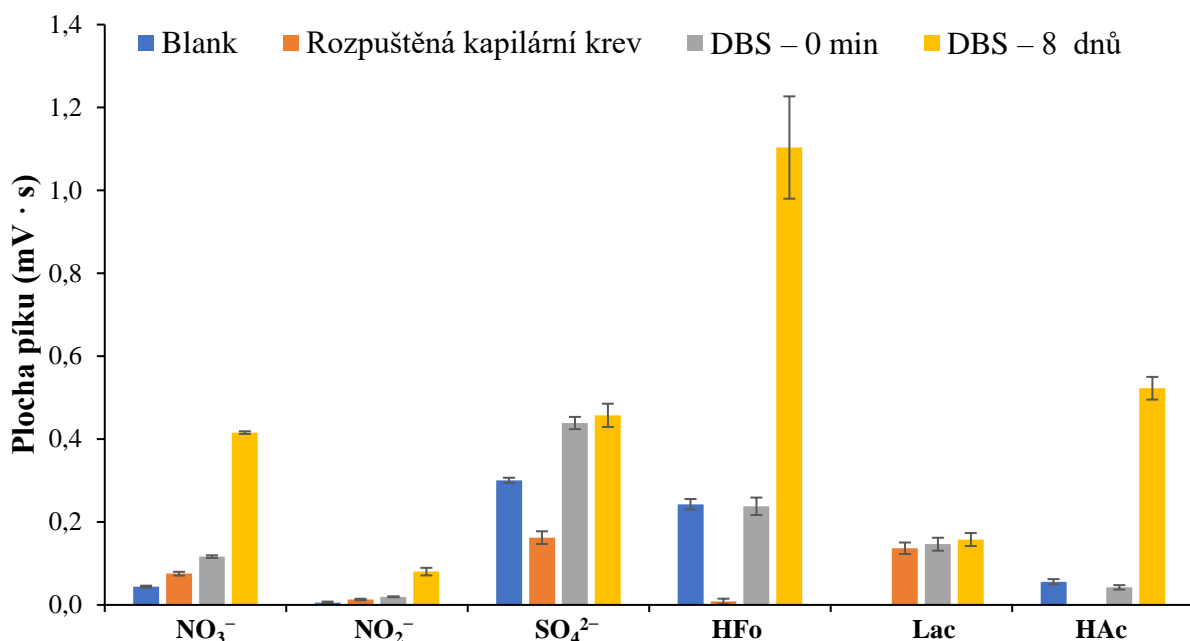
Obrázek 20: Porovnání stability anorganických a organických aniontů ve vzorcích DBS v polypropylenové vialce během skladování ve dvou různých prostředí (Podmínky měření viz kapitola 3.4.2)

4.2.5 Analýzy DBS a rozpuštěné kapilární krve

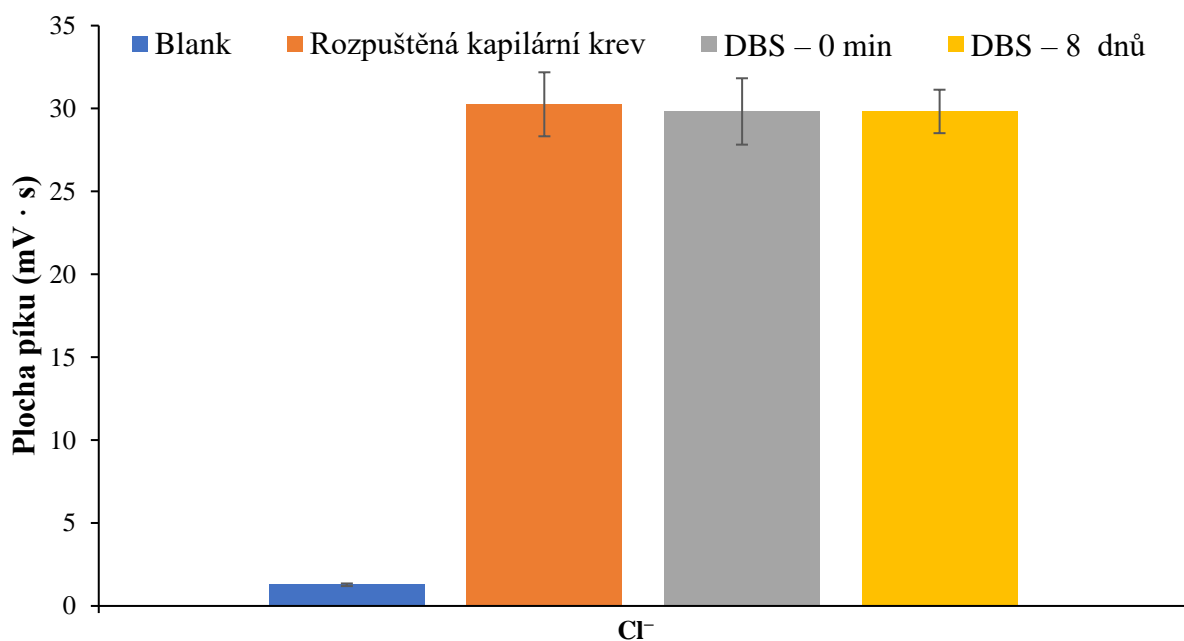
Obrázky 21 a 22 zobrazují porovnání výsledků analýz pro výřezy odběrové karty Whatman 903 bez DBS o velikosti 5,5 mm (blank), rozpuštěné kapilární krve, krve nanesené na odběrové karty měřené bez schnutí (DBS – 0 min) a DBS na odběrové kartě po 8 dnech skladování při laboratorní teplotě. Postupy přípravy viz kapitola 3.2.4.

U většiny aniontů je viditelný předpokládaný rozdíl mezi krví nanesenou na odběrovou kartu (DBS – 0 min) a rozpuštěnou kapilární krví – rozdíl se rovná množství aniontů v blanku. V grafu jsou patrné chybějící hodnoty pro laktáty v blanku a pro octany v rozpuštěné kapilární krvi, z důvodu jejich obsahu po limitem detekce. Pro porovnání byl uveden 8. den skladování, který ukazuje velký nárůst obsahu aniontů, až na stabilní sírany a laktáty.

Z tohoto experimentu a experimentu stability DBS během procesů schnutí a skladování lze vyvodit, že odběrové karty jsou nevhodné pro stanovení námi sledovaných aniontů ve vzorcích DBS jak z hlediska kontaminací, tak z hlediska stability, kdy kromě chloridů, síranů a laktátů dochází k vysokému nárůstu obsahu těchto sledovaných aniontů. V DBS v polypropylenových vialkách uchovávaných při laboratorní teplotě docházelo k nižším nárůstům než v DBS na odběrových kartách. Tento princip přípravy pro stanovení aniontů kromě laktátů by byl přijatelný do 1 dne skladování, maximálně do 2 dnů. Jako nejvhodnější se ukazuje skladování v nízkých teplotách, při kterých byl zpomalen nárůst obsahu dusitanů a mravenčanů.



Obrázek 21: Graf porovnání rozpuštěné kapilární krve, blanku odběrové karty Whatman 903, krve nanesené na odběrovou kartu bez schnutí a DBS na odběrové kartě po 8 dnech skladování (Podmínky měření viz kapitola 3.4.2)



Obrázek 22: Graf porovnání rozpuštěné kapilární krve, blanku odběrové karty Whatman 903, krve nanesené na odběrovou kartu bez schnutí a DBS na odběrové kartě po 8 dnech skladování (Podmínky měření viz kapitola 3.4.2)

4.2.6 Analýzy porézních odběrových sorbentů

Na základě kapitoly 4.1.6 byl experiment zopakován i pro anorganické a organické anionty. Výběr porézních odběrových sorbentů i jejich příprava k analýze probíhala stejně s rozdílem, že výřezy odběrové karty Whatman 903 bylo eluovány ve 150 μ l deionizované vody a eluční objemy pro ostatní odběrové sorbenty byly vztaženy poměrově k tomuto objemu. Tato množství deionizované vody jsou uvedena v tabulce 3.

Hmotnosti sorbentu Capitainer-B se mezi jednotlivými kusy mírně lišily, jelikož při vyjímání disku nedocházelo k vyjmutí celého sorbentu a část zůstávala přichycena na zařízení díky způsobu ukotvení k podkladu.

Podmínky měření z kapitoly 3.4.2 byly upraveny. Kvůli nižším koncentracím některých aniontů v odběrových sorbentech, které se pohybovaly na hodnotách meze detekce, bylo hydrodynamické dávkování zvýšeno na dobu 10 sekund při tlaku 50 mbar. K tomu bylo přistoupeno jednak z důvodu vizualizace diskutovaných iontů, a zároveň je třeba vzít v úvahu, že pokud by analýzy cílily specificky na tyto ionty a jejich kontaminace, tak by metoda taktéž vyžadovala zvýšené dávkování. Z důvodu tohoto zvýšeného dávkování již ale nebyla pro porovnání měřena DBS na odběrových kartách jako v předešlém experimentu, jelikož by majoritní chloridový anion při vyšším dávkovaném objemu překryl signály minoritních analytů. Nicméně porovnání skutečných množství aniontů v reálné kapilární krvi a množství kontaminujících iontů v blanku sorbentu Whatman 903 je možné vyčíst např. z grafu na obrázku 21 a 22. Ostatní odběrové sorbenty lze poměrově srovnat s tímto sorbentem.

Obrázek 23 ukazuje elektroforeogramy vybraných porézních odběrových sorbentů, na kterých jsou znatelné kontaminace anorganickými a organickými anionty. Díky zvýšení doby dávkování byl u některých sorbentů detekován i pík fosfátů. Nejnižší kontaminaci vykazují odběrová zařízení Mitra a HemaPEN D300S. Na elektroforeogramu odběrové karty Ahlstrom GenCollect 2.0 lze pozorovat více větších píků neznámého původu, které mohou pocházet z činidel, jimiž byly karty předupraveny. Tento elektroforeogram se celkově svým záznamem velmi liší od ostatních elektroforeogramů znázorněných v obrázku. Odběrové sorbenty HemaPen W300S, HemaXis DB 10 a Whatman 903, které jsou dodávány s podobnými specifikacemi a stejnou společností, obsahují stejné množství aniontů až na mravenčany, které mohly vzniknout v důsledku špatného skladování nebo rozkladu organické hmoty.

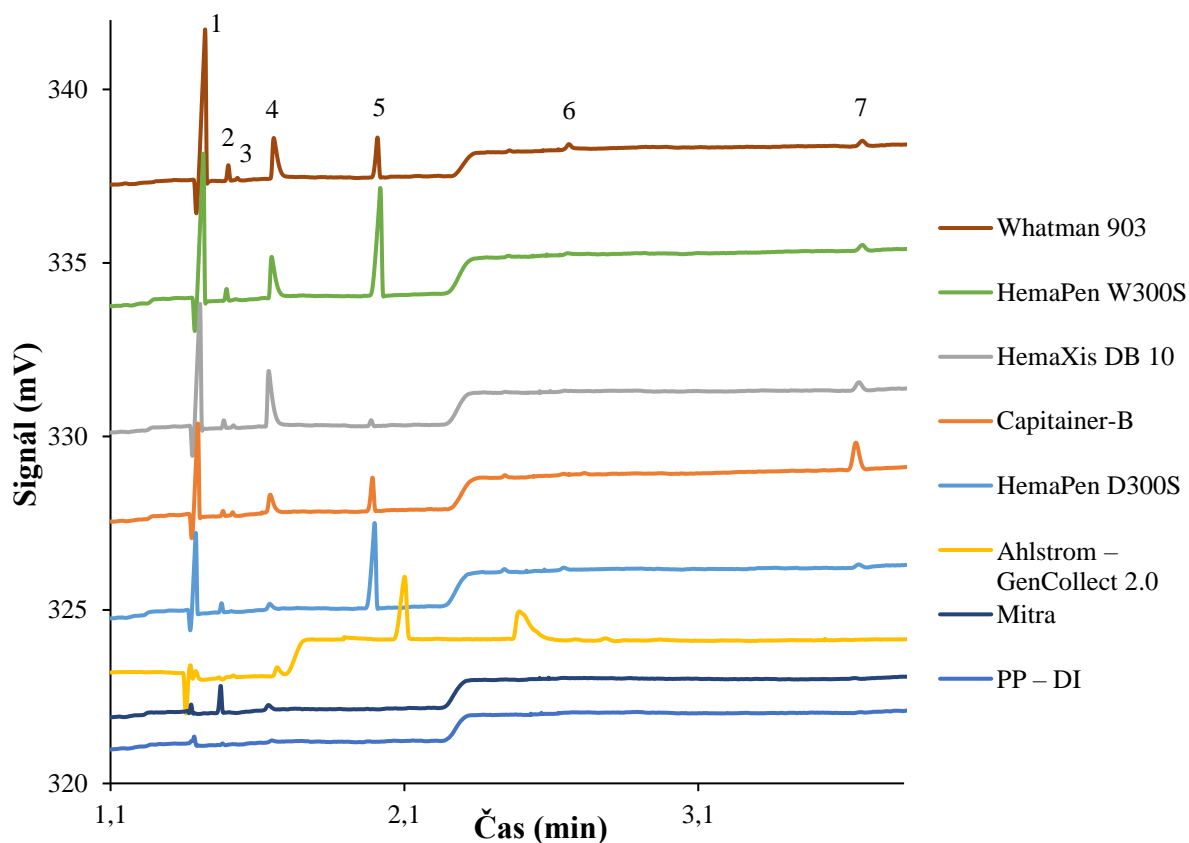
Obrázek 23 znázorňuje i elektroforeogram analýzy polypropylenové vialky s deionizovanou vodou, která byla navržena pro bezsorbentové odběry DBS a ve které nebyla zaznamenána kontaminace sledovanými anionty. Z tohoto důvodu se bezsorbentové odběry jeví jako vhodná alternativa pro odběry vzorků DBS.

Tabulka 3: Průměrná hmotnost sorbentů \pm SD a příslušné množství deionizované vody (DI)

Sorbent	Průměrná hmotnost \pm SD (mg)	Množství DI (μ l)
Whatman 903	4,78 \pm 0,18	150
HemaPEN W300S*	4,80 \pm 0,08	150
HemaXis DB 10	4,20 \pm 0,08	135
Capitainer-B	7,70 \pm 0,25	240
HemaPEN D300S*	4,70 \pm 0,13	150
Ahlstrom – Gencollect 2.0	4,47 \pm 0,05	140
Mitra	14,97 \pm 0,29	150
Polypropylenová vialka s DI	–	150

* Celková hmotnost D300S je dána hmotností 1 disku (1,57 mg)

* Celková hmotnost D300S je dána hmotností 1 disku (1,60 mg)



Obrázek 23: Elektroforeogramy porézních odběrových sorbentů a polypropylenové vialky s deionizovanou vodou (PP – DI), pořadí piků: (1) Cl^- , (2) NO_3^- , (3) NO_2^- , (4) SO_4^{2-} , (5) HFo, (6) Lac, (7) HAc (Podmínky měření viz kapitola 3.4.2 s výjimkou hydrodynamického dávkování)

4.2.7 Experimentální stanovení reálných koncentrací

Pro experimentální stanovení reálné koncentrace anorganických a organických aniontů v kapilární krvi byly připraveny kalibrační roztoky v rozsahu 0,00125–5 mmol/l dle jednotlivých iontů viz kapitola 3.2.3.2. Podle směrnice kalibračních křivek byly vypočteny výsledné průměrné koncentrace aniontů obsažených ve vzorcích DBS. Výsledné koncentrace v neředěné kapilární krvi a blanku (zohledňující zředovací faktor 30) jsou spolu s koeficienty determinace (R^2) uvedeny v tabulce 4. Průměrná koncentrace aniontů byla stanovena pro výřezy odběrových karet Whatman 903 (blank), DBS na odběrových kartách (DBS – Wh903), v polypropylenových vialkách (DBS – PP) a pro rozpuštěnou kapilární krev. Postup přípravy viz 3.2.4. Vzorky DBS byly analyzovány po 3 hodinách schnutí při laboratorní teplotě.

Tabulka 4: Souhrn stanovených reálných koncentrací aniontů s příslušnými směrodatnými odchylkami (SD)

Vzorek	Průměrná koncentrace aniontů ± SD (mmol/l)						
	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	SO ₄ ²⁻	HFo	Lac	HAc
Blank	3,456 ±	0,187 ±	0,053 ±	0,478 ±	1,080 ±		0,702 ±
	0,247	0,007	0,007	0,038	0,048	–	0,073
DBS – Wh903	93,983 ±	0,482 ±	0,088 ±	0,701 ±	0,991 ±	1,358 ±	1,231 ±
	0,837	0,006	0,002	0,014	0,028	0,060	0,180
DBS – PP	91,502 ±	0,300 ±	0,061 ±	0,257 ±	0,215 ±	3,584 ±	
	0,389	0,010	0,003	0,011	0,010	0,139	–
Rozpuštěná kapilární krev	92,670 ±	0,300 ±	0,078 ±	0,270 ±	0,179 ±	1,312 ±	
	1,428	0,003	0,004	0,006	0,002	0,045	–
R²	0,9989	0,9963	0,9964	0,9993	0,9966	0,9998	0,9980

Anionty se v odběrových kartách Whatman 903 vyskytují přibližně v koncentracích 0,053–3,456 mmol/l, laktáty v případě těchto blanků nebyly stanoveny z důvodu jejich nízké koncentrace. Přítomná kontaminace tedy může významně ovlivnit kvantitativní stanovení minoritních aniontů (obzvláště NO₃⁻, NO₂⁻, SO₄²⁻, mravenčanů a octanů – viz výsledky pro DBS – Wh903).

Ve vzorcích DBS v polypropylenových vialkách byly stanoveny koncentrace aniontů. Naměřené koncentrace činily 91,502 ± 0,389 mmol/l pro chloridy, 0,257 ± 0,011 mmol/l pro sírany, 0,215 ± 0,010 mmol/l pro mravenčany, 0,061 ± 0,003 mmol/l pro dusitanů, 0,300 ± 0,010 mmol/l pro dusičnanů a 3,584 ± 0,139 mmol/l pro laktáty. Hodnoty pro octany v kapilární krvi nebyly naměřeny z důvodu jejich nízké koncentrace pod limitem detekce. Stanovené koncentrace (s výjimkou dusitanů a laktátů) odpovídají hodnotám referenčních rozmezí či uváděným průměrům jednotlivých aniontů v kapitolech 2.7.1.6, 2.7.1.7, 2.7.1.9 a 2.7.1.10 nebo koncentracím stanoveným jinými analytickými metodami v krevní plazmě a séru. Pomocí atomové absorpční spektroskopie byla určena koncentrace síranů v lidském krevním séru (0,366–0,433 mmol/l) [111]; koncentrace dusitanů a dusičnanů ve vzorcích plazmy stanovené pomocí Griessova testu byly průměrně 0,0042 mmol/l a 0,453 mmol/l [93]; metodou plynové chromatografie byla naměřeno množství octanu v plazmě, které činilo 0,051 ± 0,005 mmol/l [112]. Předpokládáme, že k navýšení koncentrace dusitanů mohlo dojít hemolýzou krevního vzorku, jelikož srovnatelné koncentrace byly stanoveny také v kapilární krvi zředěné vodou a analyzované ihned po odběru. Nadhodnocené koncentrace laktátů v DBS byly důsledkem pomalejšího zasychání kapalné krve ve vialce; ke zvýšení koncentrací laktátů dochází v průběhu schnutí krevní kapky (viz. kapitola 4.2.4 a obrázek 19) vlivem glykolýzy v krevních elementech [72]. Pro ostatní sledované analyty byly stanovené koncentrace aniontů v DBS a v kapilární krvi srovnatelné a splňovaly požadavky pro klinické analýzy biologických vzorků [114].

Některé vybrané anionty byly stanoveny z kapilární krve v jiných studiích a jsou zde uvedeny pro srovnání. Pomocí techniky Neutron Activation Analysis byly ve vzorcích krve na filtračním papíru Whatman naměřeny koncentrace chloridů ($86,029 \pm 13,82$ mmol/l) [110]. Metodou epic Point of Care bylo stanoveno množství laktátu $1,1 \pm 0,4$ mmol/l [113]. In-line spojením mikrodialýzy s CE byla naměřená koncentrace mravenčanu $0,122 \pm 0,011$ mmol/l [99].

4.3 Návrh postupů bezsorbentových odběrů DBS

Pro nově navržený koncept bezsorbentových odběrů DBS, bylo otestováno několik možností pro přesné mikrovzorkování malého objemu krve (5 a 10 μ l), jenž je klíčovým parametrem při kvantitativních analýzách. Pro otestování tohoto konceptu byly použity tři komerčně dostupné typy pipet, tj. laboratorní pipeta (0,5–10 μ l, Eppendorf Research plus, Německo), laboratorní pipeta (0,5–10 μ l, JOANLAB, Čína) a pipeta určená pro domácí použití (10 μ l, SD Biosensor, Korea). Další z navrhovaných postupů je použití skleněných odběrových end-to-end kapilár o objemech 5 a 10 μ l (Drummond Scientific Company, USA).

Jak pipety, tak kapiláry byly nejprve otestovány pomocí deionizované vody, kdy byl 10krát odebrán požadovaný objem (5 a 10 μ l), který byl zvážen a použit na výpočet přesnosti ($\leq 0,4$ %) a opakovatelnosti ($\leq 1,2$ % RSD). Tyto zjištěné hodnoty odpovídají deklarovaným přesnostem a opakovatelnostem, které uvádí výrobce.

Poté byly pro otestování jednotlivých přístupů odebrány vzorky kapilární krve (5 μ l) do polypropylenových vialek (1ml; P/N 5182-0567, Agilent, Německo) podle postupu přípravy v kapitole 3.2.4.2. K těmto vzorkům byly navíc stejným způsobem připraveny vzorky krve o objemu 10 μ l, které byly eluovány s upraveným objemem deionizované vody (300 μ l) pro zachování stejného ředícího faktoru.

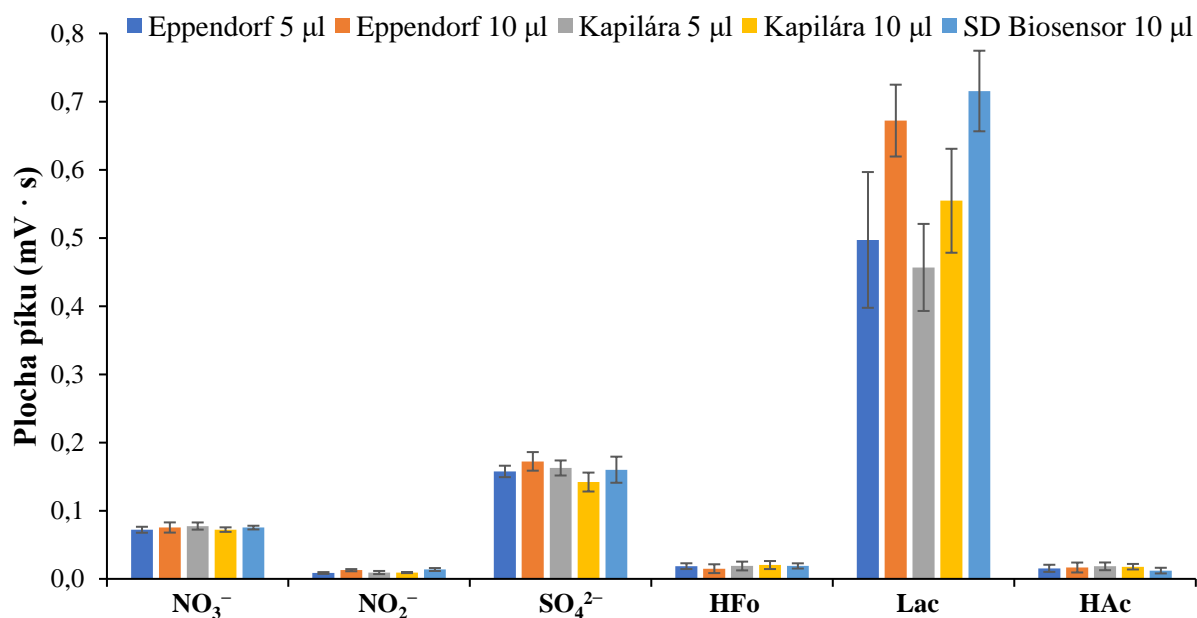
Obrázek 24 a 25 zobrazuje porovnání ploch aniontů obsažených ve vzorcích DBS v polypropylenových vialkách, které byly připraveny pomocí pipet Eppendorf, SD Biosensor a odběrových kapilár. Další obrázky 26 a 27 ukazují porovnání vzorků připravených pipetami Eppendorf a JOANLAB. Výsledky ukázaly, že všechna testovaná zařízení dokážou přesně nadávkovat malý objem krve, což potvrzují srovnatelná množství aniontů v těchto obrázcích. Obrázky 24 a 26 ukazují velké odchylky laktátů, jejichž obsah je závislý rozprostření skvrny a doby jejího schnutí. V obrázcích lze pozorovat výrazně větší plochy piků laktátů ve vzorcích o objemu 10 μ l pro všechny testované postupy, jelikož se vytvoří větší skvrna, která schne pomaleji a tím obsah laktátů více narůstá. Různé postupy odběrů byly porovnatelné mezi zařízeními s vysokou mírou opakovatelnosti. Plochy piků pro CE- $C^{4}D$ majoritních stabilních iontů (chloridy a sírany) vykazovaly opakovatelnost $\leq 6,5$ % (RSD), což splňuje nároky na metody klinických analýzy (< 15 %) [114].

Všechny pipety umožnily rychlou a snadnou manipulaci, kterou by po zaškolení či s manuálem dokázal i laik. Na dno polypropylenové vialky lze jednoduše nanést kapku krve. Pipeta Eppendorf je z tohoto výběru nejdražší variantou, její cena se pohybuje okolo 7 000 Kč. Funkčně velmi podobná je laboratorní pipeta JOANLAB, která je ale levnější a dá se komerčně koupit za cenu okolo 600 Kč. Obě tyto pipety mají nastavitelný objem (0,5–10 μ l). Třetí pipetou je SD Biosensor, jejíž cena je okolo 300 Kč, která se liší velikostí a jako jediná má fixní objem (10 μ l). Ačkoliv se tyto tři pipety liší cenově, přesnost odběrů a manipulace s nimi jsou téměř srovnatelné.

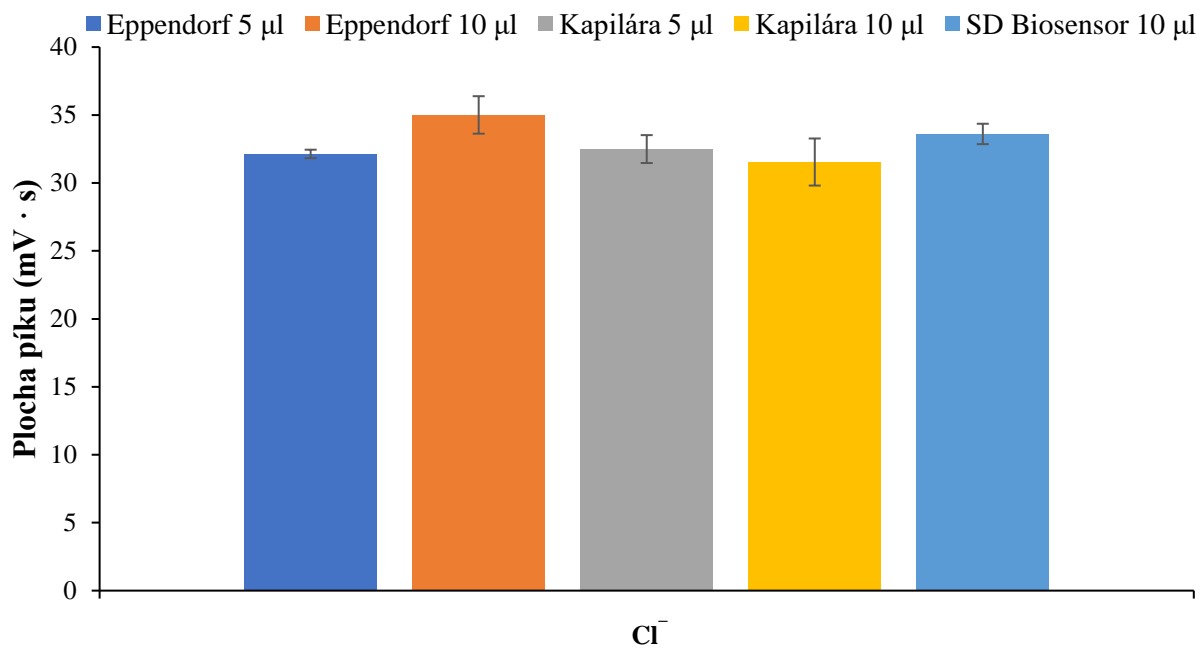
Poslední z navrhovaných technik je použití skleněných kapilár sloužících pro odběr kapilární krve. Skleněné kapiláry byly pro co nejpřesnější vyprázdnění vloženy do očního kapátka (Alfa Vita, Česká republika) s latexovým balonkem, do kterého byly udělány dva malé otvory (cca 1 mm) proti sobě. K utěsnění kapiláry v kapátku posloužila silikonová hadička (rozměry: vnější průměr 3,2 mm, vnitřní průměr 1,0 mm a o délce 10 mm).

Pro odběr krve byla kapilára přiložena ke kapce krve, kterou nasála kapilárními silami. Pro vyprázdnění krevního vzorku do polypropylenové vialky byl balonek zmáčknut zároveň se zakrytím otvorů. K dispozici je široký výběr kapilár s různými rozměry a objemy (cena za 1 kus kapiláry je cca 5–10 Kč). Cena kapátka se přibližně pohybuje kolem 20 Kč. Jedná se o jednu z možností odběrů přesných objemů krve, u které je třeba větší míra zručnosti a praxe při správném vyprázdňování kapiláry a nanášení krve na dno vialky. Jedním z možných nedostatků je rozptýlení krve do větší plochy ve vialce při chybném použití (přidání přebytečného vzduchu do kapky krve), což může zapříčinit již zmíněné odchylky v naměřených koncentracích, zejména laktátů.

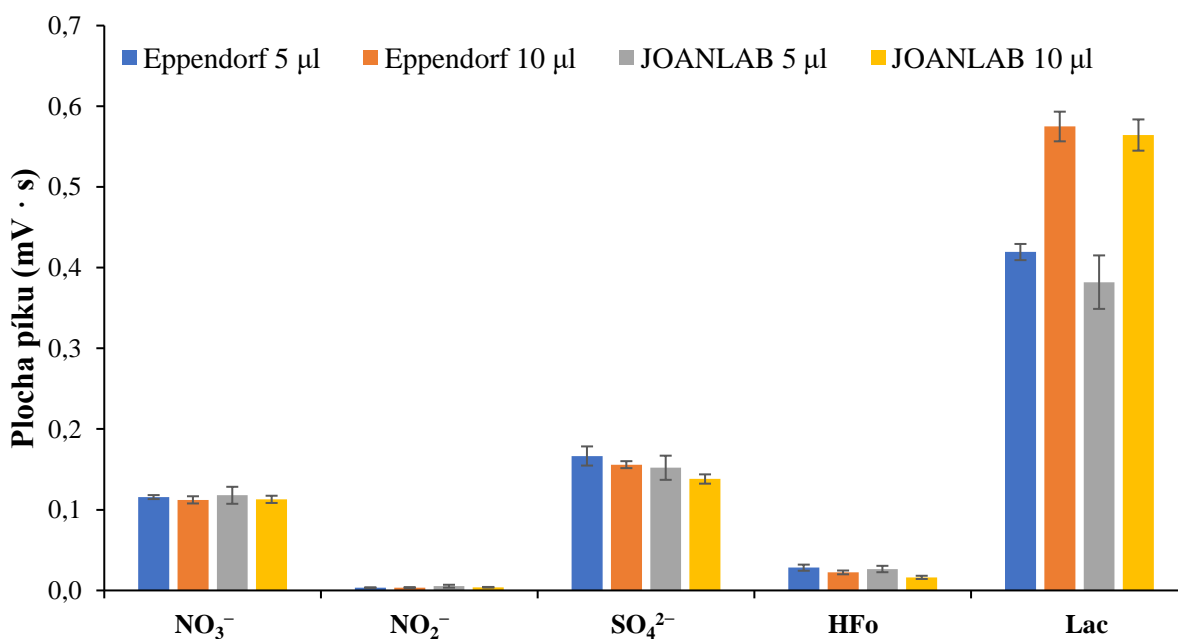
V tomto experimentu byly testovány 3 specifické pipety, lze ale předpokládat, že pro mikrovzorkování by měly fungovat i další komerčně dostupné pipety. Pořizovací cena pipet je vyšší, ale při dlouhodobém pravidelném používání budou výhodnější než jednorázové kapiláry. Jsou i uživatelsky přívětivé z důvodu jejich jednoduchého použití, a rovněž cena příslušných pipetovacích špiček je zanedbatelná. Při méně častých odběrech je ekonomičtější variantou použití kapátka s kapilárou, se kterým je ale třeba se naučit správně manipulovat. Všechny tyto postupy tak umožňují i kvantitativní stanovení, jelikož nanáší známý a přesný objem kapilární krve a vytvořená DBS je následně eluována celá.



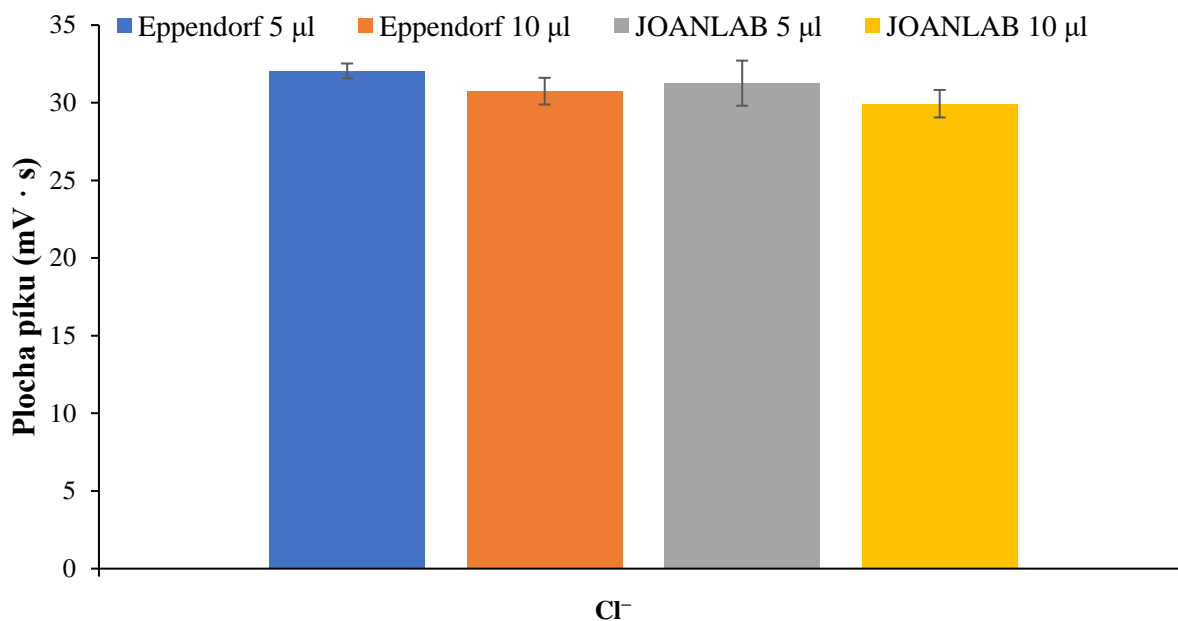
Obrázek 24: Porovnání různých přístupů mikrovzorkování – pipety Eppendorf, pipety SD Biosensor a odběrové kapiláry (Podmínky měření viz kapitola 3.4.2)



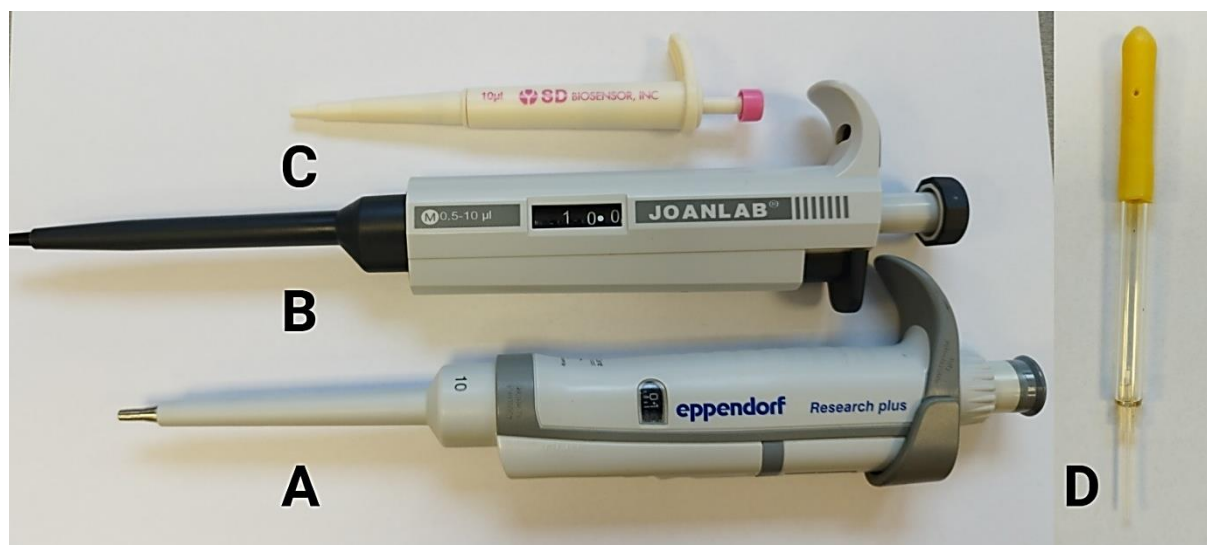
Obrázek 25: Porovnání různých přístupů mikrovzorkování – pipety Eppendorf, pipety SD Biosensor a odběrové kapiláry (Podmínky měření viz kapitola 3.4.2)



Obrázek 26: Porovnání různých přístupů mikrovzorkování – pipety Eppendorf a pipety JOANLAB (Podmínky měření viz kapitola 3.4.2)



Obrázek 27: Porovnání různých přístupů mikrovzorkování – pipety Eppendorf a pipety JOANLAB (Podmínky měření viz kapitola 3.4.2)



Obrázek 28: Testované zařízení pro mikrovzorkování (A...pipeta Eppendorf, B...pipeta JOANLAB, C...pipeta SD Biosensor, D...kapátko s odběrovou kapilárou)

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem diplomové práce bylo otestovat a navrhnout postupy pro odběry suchých krevních skvrn (DBS), které eliminují využití odběrových sorbentů. A tyto nově navržené postupy pro bezsorbentové odběry krevních vzorků aplikovat na modelové analyty, konkrétně na anorganické a organické ionty. Cílem této práce nebylo stanovit přesné koncentrace kationtů a aniontů v kapilární krvi, pro které v současnosti nejsou k dispozici referenční hodnoty, protože jsou obvykle stanovovány z krevní plazmy či séra. Z důvodu odlišné kompozice matric kapilární krve a plazmy/séra se mohou naše naměřené koncentrace lišit od publikovaných hodnot z jiných studií.

V současné době se většina vzorků DBS odebírá na porézní sorbenty na bázi celulózy ve formě odběrových karet. Bylo zjištěno, že při eluci DBS dochází uvolňování nativních složek sorbentů a kontaminování výsledného eluátu. Kontaminace byla prokázána pro běžné anorganické kationty (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} a NH_4^+) a obdobně pro anorganické a organické anionty (Cl^- , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , HFo, Lac a HAc). Tato kontaminace pravděpodobně pochází z procesů přípravy a výroby celulózových odběrových sorbentů a může významně ovlivnit následující kvantitativní analýzy. Některé ionty (NH_4^+ a HAc) vykazovaly výrazné rozdíly ve stanovovaných množstvích s velkými odchylkami, a to jak mezi jednotlivými odběrovými kartami, tak i v rámci jediné odběrové karty.

Přítomnost významného množství kontaminujících iontů byla potvrzena analýzami eluátů vyražených disků odběrových karet Whatman 903. Majoritně zastoupenými ionty byly zejména Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , HFo a HAc. Ionty Na^+ a Cl^- přítomné v sorbentech ovlivnily kvantitativní analýzy méně významně, jelikož v porovnání s jejich koncentracemi v DBS vzorcích byly jejich příspěvky zanedbatelné ($\leq 5\%$). Naproti tomu, Ca^{2+} a Mg^{2+} ionty velmi významně ovlivnily kvantitativní analýzu, jelikož skutečné koncentrace v DBS zvýšily o 200–400 %. Kvantitativní analýzu významně ovlivnily i SO_4^{2-} , HFo a HAc, protože skutečné koncentrace v DBS zvýšily o 200–500 %. Některé z těchto iontů jsou markery pro řadu onemocnění a klinických stavů (např. maligní onemocnění, hyperparatyreóza a nadužívání alkoholu) a jejich nesprávná kvantifikace může mít fatální důsledky.

Z hlediska sledované stability vykazují kationty ve vzorcích DBS stabilitu v rámci týdne při skladování při laboratorní teplotě. V případě potřeby by bylo vhodné tyto studie rozšířit na delší časový horizont a další analyty. Tato stabilita již neplatí pro anionty, jejichž obsah během procesu schnutí a skladování po dobu 8 dnů prudce rostl již v prvních hodinách s výjimkou chloridů, síranů a laktátů vlivem mikrobiálních rozkladů (rozklad dusíkatých a uhlíkatých organických molekul). Lze proto vyvodit závěr, že odběrové karty Whatman 903 pro stanovení těchto vybraných kationtů a aniontů ve vzorcích DBS jsou nevhodné z důvodu kontaminace ionty ze sorbentů a nestability některých analytů. Zjištění přesné příčiny nárustu nebylo předmětem této práce, probíhající procesy jsou specifické pro každý analyt a je nutné je určit pro každý analyt zvlášť.

V rámci diplomové práce byly otestovány i další alternativní komerčně dostupné porézní odběrové sorbenty, které jsou nejčastěji na bázi celulózy nebo polymeru. Ačkoli tyto sorbenty nabízí různé výhody oproti standardní odběrové kartě Whatman 903, tak u všech testovaných sorbentů bylo pozorováno uvolňování kontaminantů. Nejvhodnější z těchto odběrových

zařízení sejevily polymerní sorbenty Mitra, které vykazovaly nejmenší obsah kontaminantů. U vybraných odběrových zařízení (např. HemaPEN) může dojít k další kontaminaci v průběhu odběru vzorku, kdy krev prochází přes skleněnou odběrovou kapiláru, která je pokryta protisrážlivým činidlem (například draselnou solí kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA)). Kontaminace eluátů vlivem celého odběrového procesu, tzn. i průchodem přes odběrové kanálky, vyžaduje otestování různých dostupných odběrových zařízení, což nebylo předmětem této práce.

Proto byl navržen koncept odběrů DBS bez sorbentů, který zajišťuje odběry krve bez kontaminace běžnými kationty a anionty a neovlivňuje tak stanovení sledovaných analytů v krevních vzorcích. Vzorky krve byly odebírány do polypropylenových vialek (kompatibilními s komerčními CE přístroji), ve kterých byl uskutečněn celý proces zpracování i analýz DBS. Obsah kationtů naměřený ve vzorcích DBS v polypropylenových vialkách byl srovnatelný se vzorky rozpuštěné kapilární krve, a tyto koncentrace byly v DBS stabilní po dobu alespoň jednoho týdne. Při procesu schnutí a skladování při laboratorní teplotě docházelo k nárustu obsahu některých aniontů, ale v menší míře než v odběrových kartách. Bylo ověřeno, že tento nárůst mohl být dále zpomalen uchováváním při nízkých teplotách (zejména u dusitanů a mravenčanů). Doba, po kterou mohou být tyto méně stabilní anionty stanoveny v DBS vzorcích je přibližně 1–2 dny, kdy je nárůst minimální. Bezsorbentové odběry krve do polypropylenových vialek se ukázaly jako nevhodné pro stanovení laktátů, u kterých se množství mění v závislosti na době schnutí. Z těchto důvodů jsou a budou zkoumány nové postupy pro další zlepšení bezsorbentových odběrů DBS. Prvotní experimenty potvrdily např. srovnatelné koncentrace laktátů v kapilární krvi a v bezsorbentových DBS, u kterých byla výrazně zkrácena doba schnutí.

Pro zajištění co nejpřesnějších a uživatelsky přívětivých odběrů krve do polypropylenových vialek byly otestovány tři typy komerčně dostupných pipet a odběrové end-to-end kapiláry pro přesné mikrovzorkování malých objemů krve (5 a 10 μ l). Všechny tyto přístupy při správné manipulaci vykazují přesné a opakovatelné odběry a kvantitativní přenos krevních vzorků do polypropylenových vialek, proto mohou být vhodné pro samoodběry v domácím prostředí i pro odběry ve zdravotnických centrech.

Navržený koncept v této práci umožnil překonat některá z úskalí spojená s odběrovými kartami. Jedná se o základní pilotní studii aplikovanou pouze na vybrané analyty, které sloužily jako modelový příklad. Tato studie nezahrnuje experimenty s dalšími analyty, které mohou generovat odlišné výsledky, a proto je nutné další a širší testování tohoto konceptu. V návaznosti na tuto diplomovou práci budou dále testovány vlastnosti bezsorbentových odběrů DBS pro stanovení vybraných léčiv, která jsou výrazně zadržována sorbenty standardních odběrových karet, a také budou pokračovat studie zkoumající vliv teploty skladování na vybrané nestabilní analyty.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SHARMA, Abhisheak, Swati JAISWAL, Mahendra SHUKLA a Jawahar LAL. Dried blood spots: Concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis. *Drug Testing and Analysis* [online]. 2014, **6**(5), 399–414 [vid. 2023-11-14]. ISSN 1942-7603, 1942-7611. Dostupné z: doi:10.1002/dta.1646
- [2] AIT BELKACEM, Ines, Noushine MOSSADEGH-KELLER, Penelope BOURGOIN, Isabelle ARNOUX, Marie LOOSVELD, Pierre-emmanuel MORANGE, Thibaut MARKARIAN, Pierre MICHELET, Jean Marc BUSNEL, Sandrine ROULLAND, Franck GALLAND a Fabrice MALERGUE. Cell Analysis from Dried Blood Spots: New Opportunities in Immunology, Hematology, and Infectious Diseases. *Advanced Science* [online]. 2021, **8**(18), 2100323 [vid. 2023-11-14]. ISSN 2198-3844, 2198-3844. Dostupné z: doi:10.1002/advs.202100323
- [3] TANNA, Sangeeta a Graham LAWSON. Analytical methods used in conjunction with dried blood spots. *Analytical Methods* [online]. 2011, **3**(8), 1709 [vid. 2023-11-14]. ISSN 1759-9660, 1759-9679. Dostupné z: doi:10.1039/c1ay05160a
- [4] CAPIAU, Sara, Herman VEENHOF, Remco A. KOSTER, Yngve BERGQVIST, Michael BOETTCHER, Otto HALMINGH, Brian G. KEEVIL, Birgit C.P. KOCH, Rafael LINDEN, Constantinos PISTOS, Leo M. STOLK, Daan J. TOUW, Christophe P. STOVE a Jan-Willem C. ALFFENAAR. Official International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Guideline: Development and Validation of Dried Blood Spot–Based Methods for Therapeutic Drug Monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring* [online]. 2019, **41**(4), 409–430 [vid. 2023-11-14]. ISSN 0163-4356. Dostupné z: doi:10.1097/FTD.0000000000000643
- [5] DVOŘÁK, Miloš, Lenka RYŠAVÁ a Pavel KUBÁŇ. Capillary Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection for Quantitative Analysis of Dried Blood Spots with Unknown Blood Volume. *Analytical Chemistry* [online]. 2020, **92**(1), 1557–1564 [vid. 2023-11-14]. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.9b04845
- [6] NETO, Ricardo, Andrew GOOLEY, Michael C. BREADMORE, Emily F. HILDER a Florian LAPIERRE. Precise, accurate and user-independent blood collection system for dried blood spot sample preparation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2018, **410**(14), 3315–3323 [vid. 2023-11-14]. ISSN 1618-2642, 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-018-0993-y
- [7] LEUTHOLD, Luc Alexis, Olivier HEUDI, Julien DÉGLON, Marc RACCUGLIA, Marc AUGSBURGER, Franck PICARD, Olivier KRETZ a Aurélien THOMAS. New Microfluidic-Based Sampling Procedure for Overcoming the Hematocrit Problem Associated with Dried Blood Spot Analysis. *Analytical Chemistry* [online]. 2015, **87**(4), 2068–2071 [vid. 2023-11-14]. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac503931g
- [8] VELGHE, Sofie, Lisa DELAHAYE a Christophe P. STOVE. Is the hematocrit still an issue in quantitative dried blood spot analysis? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2019, **163**, 188–196 [vid. 2023-11-20]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2018.10.010

- [9] Elektrolyty. *LAB TESTS ONLINE* [online]. 2010. Dostupné z: <https://www.labtestsonline.cz/elektrolyty.html>
- [10] KUBÁŇ, Pavel a Petr BOČEK. Capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection: A universal tool for the determination of supported liquid membrane selectivity in electromembrane extraction of complex samples. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, **1267**, 96–101 [vid. 2023-12-03]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2012.07.010
- [11] KUBÁŇ, Pavel a Peter C. HAUSER. Fundamental aspects of contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. Part I: Frequency behavior and cell geometry. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2004, **25**(20), 3387–3397 [vid. 2024-03-25]. ISSN 0173-0835, 1522-2683. Dostupné z: doi:10.1002/elps.200406059
- [12] ZAKARIA, Rosita, Katrina J. ALLEN, Jennifer J. KOPLIN, Peter ROCHE a Ronda F. GREAVES. Advantages and Challenges of Dried Blood Spot Analysis by Mass Spectrometry Across the Total Testing Process. *EJIFCC*. 2016, **27**(4), 288–317. ISSN 1650-3414.
- [13] WAGNER, Michel, David TONOLI, Emmanuel VAREGIO a Gérard HOPFGARTNER. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 2016, **35**(3), 361–438 [vid. 2023-11-14]. ISSN 0277-7037, 1098-2787. Dostupné z: doi:10.1002/mas.21441
- [14] DENNIFF, Philip a Neil SPOONER. Volumetric Absorptive Microsampling: A Dried Sample Collection Technique for Quantitative Bioanalysis. *Analytical Chemistry* [online]. 2014, **86**(16), 8489–8495 [vid. 2023-11-14]. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac5022562
- [15] WILHELM, Abraham J., Jeroen C. G. DEN BURGER a Eleonora L. SWART. Therapeutic Drug Monitoring by Dried Blood Spot: Progress to Date and Future Directions. *Clinical Pharmacokinetics* [online]. 2014, **53**(11), 961–973 [vid. 2023-11-14]. ISSN 0312-5963, 1179-1926. Dostupné z: doi:10.1007/s40262-014-0177-7
- [16] LUGINBÜHL, Marc a Stefan GAUGLER. The application of fully automated dried blood spot analysis for liquid chromatography-tandem mass spectrometry using the CAMAG DBS-MS 500 autosampler. *Clinical Biochemistry* [online]. 2020, **82**, 33–39 [vid. 2023-11-14]. ISSN 00099120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2020.02.007
- [17] TIMMERMAN, Philip, Steve WHITE, Susanne GLOBIG, Silke LÜDTKE, Leonarda BRUNET, John SMERAGLIA, a CONTRIBUTORS, OTHER EBF MEMBER COMPANIES LISTED AT END OF ARTICLE. EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots. *Bioanalysis* [online]. 2011, **3**(14), 1567–1575 [vid. 2023-11-14]. ISSN 1757-6180, 1757-6199. Dostupné z: doi:10.4155/bio.11.132
- [18] EIBAK, Lars Erik Eng, Anne Bee HEGGE, Knut Einar RASMUSSEN, Stig PEDERSEN-BJERGAARD a Astrid GJELSTAD. Alginate and Chitosan Foam Combined with Electromembrane Extraction for Dried Blood Spot Analysis. *Analytical Chemistry* [online]. 2012, **84**(20), 8783–8789 [vid. 2023-11-14]. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac301996n

- [19] LI, Wenkui a Francis L. S. TSE. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomedical Chromatography* [online]. 2010, **24**(1), 49–65 [vid. 2023-11-14]. ISSN 0269-3879, 1099-0801. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.1367
- [20] LIM, Mark D. Dried Blood Spots for Global Health Diagnostics and Surveillance: Opportunities and Challenges. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [online]. 2018, **99**(2), 256–265 [vid. 2023-11-18]. ISSN 0002-9637, 1476-1645. Dostupné z: doi:10.4269/ajtmh.17-0889
- [21] MOAT, Stuart J., Roanna S. GEORGE a Rachel S. CARLING. Use of Dried Blood Spot Specimens to Monitor Patients with Inherited Metabolic Disorders. *International Journal of Neonatal Screening* [online]. 2020, **6**(2), 26 [vid. 2023-11-18]. ISSN 2409-515X. Dostupné z: doi:10.3390/ijns6020026
- [22] RYŠAVÁ, Lenka, Miloš DVOŘÁK a Pavel KUBÁŇ. Dried Blood Spot Self-Sampling with Automated Capillary Electrophoresis Processing for Clinical Analysis. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2021, **60**(11), 6068–6075 [vid. 2023-11-14]. ISSN 1433-7851, 1521-3773. Dostupné z: doi:10.1002/anie.202012997
- [23] GRÜNER, Nico, Oumaima STAMBOULI a R. Stefan ROSS. Dried Blood Spots - Preparing and Processing for Use in Immunoassays and in Molecular Techniques. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2015, (97), 52619 [vid. 2023-11-18]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/52619
- [24] MEI, Joanne V., J. Richard ALEXANDER, Barbara W. ADAM a W. Harry HANNON. Use of Filter Paper for the Collection and Analysis of Human Whole Blood Specimens. *The Journal of Nutrition* [online]. 2001, **131**(5), 1631S-1636S [vid. 2023-11-18]. ISSN 00223166. Dostupné z: doi:10.1093/jn/131.5.1631S
- [25] SKOGVOLD, Hanne Bendiksen, Helge ROOTWELT, Léon REUBSAET, Katja Benedikte Prestø ELGSTØEN a Steven Ray WILSON. Dried blood spot analysis with liquid chromatography and mass spectrometry: Trends in clinical chemistry. *Journal of Separation Science* [online]. 2023, **46**(15), 2300210 [vid. 2024-03-02]. ISSN 1615-9306, 1615-9314. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.202300210
- [26] BÖRSCH-SUPAN, Axel, Luzia M. WEISS, Martina BÖRSCH-SUPAN, Alan J. POTTER, Jake COFFEREN a Elizabeth KERSCHNER. Dried blood spot collection, sample quality, and fieldwork conditions: Structural validations for conversion into standard values. *American Journal of Human Biology* [online]. 2021, **33**(4), e23517 [vid. 2023-11-28]. ISSN 1042-0533, 1520-6300. Dostupné z: doi:10.1002/ajhb.23517
- [27] DOWNS, Jennifer A., Paul L.A.M. CORSTJENS, Julius MNGARA, Peter LUTONJA, Raphael ISINGO, Mark URASSA, Dieuwke KORNELIS a Govert J. VAN DAM. Correlation of serum and dried blood spot results for quantitation of Schistosoma circulating anodic antigen: A proof of principle. *Acta Tropica* [online]. 2015, **150**, 59–63 [vid. 2023-11-27]. ISSN 0001706X. Dostupné z: doi:10.1016/j.actatropica.2015.06.026

- [28] Cytiva Whatman™ 903 Protein Saver Card, USA. *Fisher scientific* [online]. 2023. Dostupné z: <https://www.fishersci.com/shop/products/whatman-903-protein-saver-card-us/05715121>
- [29] ZAILANI, Nur Nabihah Binte a Paul Chi-Lui HO. Dried Blood Spots—A Platform for Therapeutic Drug Monitoring (TDM) and Drug/Disease Response Monitoring (DRM). *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* [online]. 2023, **48**(5), 467–494 [vid. 2023-11-27]. ISSN 0378-7966, 2107-0180. Dostupné z: [doi:10.1007/s13318-023-00846-4](https://doi.org/10.1007/s13318-023-00846-4)
- [30] ARCA-LAFUENTE, Sonia, Cristina CASANUEVA-BENÍTEZ, Celia CRESPO-BERMEJO, Violeta LARA-AGUILAR, Luz MARTÍN-CARBONERO, Ignacio DE LOS SANTOS, Ricardo MADRID a Verónica BRIZ. 903 Protein Saver cards: the best alternative for dried blood spot storage at room temperature for HCV RNA. *Scientific Reports* [online]. 2022, **12**(1), 10124 [vid. 2023-11-27]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: [doi:10.1038/s41598-022-14375-8](https://doi.org/10.1038/s41598-022-14375-8)
- [31] Whatman 903 Protein Saver Card. *Taylor Scientific* [online]. 2024. Dostupné z: <https://www.taylorscientific.com/whatman-903-proteinsaver-card>
- [32] Biosamples collection cards. *AHLSTROM* [online]. 2023. Dostupné z: <https://www.ahlstrom.com/products/medical-life-sciences-and-laboratory/specimen-collection-cards/Biosamples-collection-cards/>
- [33] *BIOSAMPLES COLLECTION AND PRESERVATION* [online]. B.m.: AHLSTROM MUNKSJO. 2019. Dostupné z: <https://www.ahlstrom.com/globalassets/x-old/files/medical-care-and-life-science-files/medical-ba-literature/ahlstrom-munksjo-specimen-collection-cards-portfolio.pdf>
- [34] CARLING, Rachel S., Erin C. EMMETT a Stuart J. MOAT. Evaluation of volumetric blood collection devices for the measurement of phenylalanine and tyrosine to monitor patients with phenylketonuria. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2022, **535**, 157–166 [vid. 2023-11-20]. ISSN 00098981. Dostupné z: [doi:10.1016/j.cca.2022.08.005](https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.08.005)
- [35] THANGAVELU, Manchu Umarani, Bert WOUTERS, Alida KINDT, Irwin K. M. REISS a Thomas HANKEMEIER. Blood microsampling technologies: Innovations and applications in 2022. *Analytical Science Advances* [online]. 2023, **4**(5–6), 154–180 [vid. 2023-11-25]. ISSN 2628-5452, 2628-5452. Dostupné z: [doi:10.1002/ansa.202300011](https://doi.org/10.1002/ansa.202300011)
- [36] SHITOLE, Vaibhav, Komal BHAMARE, Prasoon KUMAR a Pinaki SENGUPTA. Technological advancement in dry blood matrix microsampling and its clinical relevance in quantitative drug analysis. *Bioanalysis* [online]. 2020, **12**(20), 1483–1501 [vid. 2023-11-20]. ISSN 1757-6180, 1757-6199. Dostupné z: [doi:10.4155/bio-2020-0211](https://doi.org/10.4155/bio-2020-0211)
- [37] MINGAS, Panagiotis-Dimitrios, Jurij ZDOVC, Iztok GRABNAR a Tomaž VOVK. The Evolving Role of Microsampling in Therapeutic Drug Monitoring of Monoclonal Antibodies in Inflammatory Diseases. *Molecules* [online]. 2021, **26**(6), 1787 [vid. 2023-11-27]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: [doi:10.3390/molecules26061787](https://doi.org/10.3390/molecules26061787)

- [38] LONDHE, Vaishali a Madhura RAJADHYAKSHA. Opportunities and obstacles for microsampling techniques in bioanalysis: Special focus on DBS and VAMS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2020, **182**, 113102 [vid. 2023-11-27]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2020.113102
- [39] BAILLARGEON, Keith R. a Charles R. MACE. Microsampling tools for collecting, processing, and storing blood at the point-of-care. *Bioengineering & Translational Medicine* [online]. 2023, **8**(2), e10476 [vid. 2023-11-27]. ISSN 2380-6761, 2380-6761. Dostupné z: doi:10.1002/btm2.10476
- [40] Mitra Devices. *neoteryx by TRAJAN* [online]. 2023. Dostupné z: <https://www.neoteryx.com/volumetrically-accurate-micro-sampling-vams-collection-devices>
- [41] *The Mitra Microsampling User Guide* [online]. B.m.: Neoteryx. Dostupné z: <https://www.neoteryx.com/extraction-microsampling-user-guide-2021>
- [42] PROTTI, Michele, Camilla MARASCA, Marco CIRRINCIONE, Andrea CAVALLI, Roberto MANDRIOLI a Laura MERCOLINI. Assessment of capillary volumetric blood microsampling for the analysis of central nervous system drugs and metabolites. *The Analyst* [online]. 2020, **145**(17), 5744–5753 [vid. 2023-11-25]. ISSN 0003-2654, 1364-5528. Dostupné z: doi:10.1039/D0AN01039A
- [43] KOCUR, Arkadiusz a Tomasz PAWIŃSKI. Volumetric Absorptive Microsampling in Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs—From Sampling and Analytical Issues to Clinical Application. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **24**(1), 681 [vid. 2023-11-27]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms24010681
- [44] VELGHE, Sofie a Christophe P. STOVE. Evaluation of the Capitainer-B Microfluidic Device as a New Hematocrit-Independent Alternative for Dried Blood Spot Collection. *Analytical Chemistry* [online]. 2018, **90**(21), 12893–12899 [vid. 2023-11-24]. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.8b03512
- [45] Capitainer®B - Easy, Reliable, Accurate Dried Blood Spot Sampling. *Capitainer* [online]. 2023. Dostupné z: <https://capitainer.com/capitainerb/>
- [46] hemaPEN. *neoteryx by TRAJAN* [online]. 2023. Dostupné z: <https://www.neoteryx.com/hemapen-dried-blood-spot-collection>
- [47] DEPREZ, Sigrid, Lucía PANIAGUA-GONZÁLEZ, Sofie VELGHE a Christophe P. STOVE. Evaluation of the Performance and Hematocrit Independence of the HemaPEN as a Volumetric Dried Blood Spot Collection Device. *Analytical Chemistry* [online]. 2019, **91**(22), 14467–14475 [vid. 2023-11-25]. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.9b03179
- [48] HEMAXIS DB10 WHOLE BLOOD COLLECTION DEVICE. *HemaXis* [online]. 2018. Dostupné z: <https://hemaxis.com/products/hemaxis-db10/>

- [49] VELGHE, Sofie, Sigrid DEPRez a Christophe P. STOVE. Fully automated therapeutic drug monitoring of anti-epileptic drugs making use of dried blood spots. *Journal of Chromatography A* [online]. 2019, **1601**, 95–103 [vid. 2023-12-17]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2019.06.022
- [50] GARZA, Kyana Y. a Clarke WILLIAM. Dried Blood Spots and Beyond. *Association for Diagnostics & Laboratory Medicine* [online]. 1. září 2022. Dostupné z: <https://www.myadlm.org/cln/articles/2022/september/dried-blood-spots-and-beyond>
- [51] CAMAG® DBS-MS 500 HCT. *CAMAG®* [online]. Dostupné z: <https://dbs.camag.com/product/camag-dbs-ms-500-hct>
- [52] DVOŘÁK, Miloš, Ondrej MORAVČÍK a Pavel KUBÁŇ. Capillary Electrophoresis with Interchangeable Cartridges for Versatile and Automated Analyses of Dried Blood Spot Samples. *Analytical Chemistry* [online]. 2023, **95**(31), 11823–11830 [vid. 2024-03-31]. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.3c02474
- [53] MORAVČÍK, Ondrej, Miloš DVOŘÁK a Pavel KUBÁŇ. Autonomous capillary electrophoresis processing and analysis of dried blood spots for high-throughput determination of uric acid. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2023, **1267**, 341390 [vid. 2024-04-09]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2023.341390
- [54] KUBÁŇ, Pavel a Petr BOČEK. Direct coupling of supported liquid membranes to capillary electrophoresis for analysis of complex samples: A tutorial. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2013, **787**, 10–23 [vid. 2023-12-03]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2013.04.065
- [55] GRUNDMANN, Marco a Frank-Michael MATYSIK. Analyzing small samples with high efficiency: capillary batch injection–capillary electrophoresis–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2012, **404**(6–7), 1713–1721 [vid. 2023-12-03]. ISSN 1618-2642, 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-012-6282-2
- [56] ŠLAMPOVÁ, Andrea a Pavel KUBÁŇ. Injections from sub- μ L sample volumes in commercial capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* [online]. 2017, **1497**, 164–171 [vid. 2023-12-03]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2017.03.064
- [57] LAUER, Henk H. a Gerard P. ROZING. *High Performance Capillary Electrophoresis: A primer*. [online]. Second completely revised edition. Germany: Agilent Technologies, Inc. 2009–2018, 2018. 5990–3777EN. Dostupné z: www.agilent.com/chem/CE
- [58] XIE, Hai-Yang a You-Zhao HE. Green analytical methodologies combining liquid-phase microextraction with capillary electrophoresis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2010, **29**(7), 629–635 [vid. 2023-12-03]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2010.02.017
- [59] KUBÁŇ, Pavel a Peter C. HAUSER. 20th anniversary of axial capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary electrophoresis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2018, **102**, 311–321 [vid. 2023-12-03]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2018.03.007

- [60] BRITO-NETO, José Geraldo Alves, José Alberto FRACASSI DA SILVA, Lucas BLANES a Claudimir Lucio DO LAGO. Understanding Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection in Capillary and Microchip Electrophoresis. Part 1. Fundamentals. *Electroanalysis* [online]. 2005, **17**(13), 1198–1206 [vid. 2023-12-03]. ISSN 1040-0397, 1521-4109. Dostupné z: doi:10.1002/elan.200503237
- [61] LOPEZ, C., R. NEHME, B. CLAUDE, Ph. MORIN, J. P. MAX, R. PENA, M. PELISSOU a J. P. RIBET. A Convenient Approach to Simultaneous Analysis of a Pharmaceutical Drug and Its Counter-Ion by CE Using Dual-Opposite End Injection and Contactless Conductivity Detection. *Chromatographia* [online]. 2012, **75**(1–2), 25–32 [vid. 2023-12-03]. ISSN 0009-5893, 1612-1112. Dostupné z: doi:10.1007/s10337-011-2154-8
- [62] NEHMÉ, Reine, Adrien LASCAUX, Raphaël DELÉPÉE, Bérengère CLAUDE a Philippe MORIN. Capillary electrophoresis procedure for the simultaneous analysis and stoichiometry determination of a drug and its counter-ion by using dual-opposite end injection and contactless conductivity detection: Application to labetalol hydrochloride. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2010, **663**(2), 190–197 [vid. 2023-12-03]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2010.01.032
- [63] KUBÁŇ, Pavel a Peter C. HAUSER. A review of the recent achievements in capacitively coupled contactless conductivity detection. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2008, **607**(1), 15–29 [vid. 2023-12-03]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2007.11.045
- [64] MALSAGOVA, Kristina, Artur KOPYLOV, Alexander STEPANOV, Tatyana BUTKOVA, Alexander IZOTOV a Anna KAYSHEVA. Dried Blood Spot in Laboratory: Directions and Prospects. *Diagnostics* [online]. 2020, **10**(4), 248 [vid. 2023-12-19]. ISSN 2075-4418. Dostupné z: doi:10.3390/diagnostics10040248
- [65] MCCLENDON-WEARY, Bryttany, Diane L. PUTNICK, Sonia ROBINSON a Edwina YEUNG. Little to Give, Much to Gain—What Can You Do With a Dried Blood Spot? *Current Environmental Health Reports* [online]. 2020, **7**(3), 211–221 [vid. 2023-12-19]. ISSN 2196-5412. Dostupné z: doi:10.1007/s40572-020-00289-y
- [66] DEMIREV, Plamen A. Dried Blood Spots: Analysis and Applications. *Analytical Chemistry* [online]. 2013, **85**(2), 779–789 [vid. 2023-12-19]. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac303205m
- [67] ZÍMOVÁ, Lucie. Co ukáže krev? Krevní skupiny [online]. 2017, **XVII**(1–2). Dostupné z: <https://www.pharmanews.cz/vydani/pharma-news-01-2017/>
- [68] Composition of Capillary Blood. *LabCE* [online]. Dostupné z: https://www.labce.com/spg860122_composition_of_capillary_blood.aspx
- [69] Sodík. *LAB TESTS ONLINE* [online]. 1. květen 2010. Dostupné z: <https://www.labtestsonline.cz/sodik.html>
- [70] Draslík. *LAB TESTS ONLINE* [online]. 1. květen 2010. Dostupné z: <https://www.labtestsonline.cz/draslik.html>

- [71] ZIMA, Tomáš a Kateřina MRÁZOVÁ. Normální laboratorní hodnoty dospělých. *VELKÝ LÉKAŘSKÝ SLOVNÍK* [online]. Dostupné z: <https://lekarske.slovniky.cz/normalni-hodnoty>
- [72] Laboratorní příručka. *Fakultní nemocnice Ostrava* [online]. 11. leden 2023. Dostupné z: https://www.mnof.cz/docs/okb_laboratorni_prirucka/_start.htm
- [73] ŠUBRTOVÁ, Marie a Halina MATĚJOVÁ. Sodík a jeho vliv na zdraví. *Hygiena*. 2015, **60**(4), 149–154. ISSN 1802-6281.
- [74] Draslík (P/S). *Fakultní nemocnice Plzeň* [online]. Dostupné z: <https://old.fnplzen.cz/pracoviste/ukbh/detail.asp?id=94>
- [75] Laboratorní metody. *SYNLAB* [online]. Dostupné z: https://www.synlab.cz/fileadmin/user_upload/Podklady_PDF/Laboratorn%C3%AD_metody___Synlab.html
- [76] Draslík (K+, Kalium). *Vaše laboratoře* [online]. 2019. Dostupné z: <https://www.vaselaboratore.cz/seznam-vysetreni/biochemie/item/draslik-k-kalium>
- [77] Vápník. *LAB TESTS ONLINE* [online]. 2. květen 2010. Dostupné z: <https://www.labtestsonline.cz/vapnik.html>
- [78] Vápník. *Národní zdravotnický informační portál* [online]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/1146-vapnik>
- [79] Magnézium. *LAB TESTS ONLINE* [online]. 8. září 2008. Dostupné z: <https://www.labtestsonline.cz/magnezium.html>
- [80] Hořčík. *Národní zdravotnický informační portál* [online]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/1148-horcik>
- [81] Hořčík (Mg, Magnesium). *Vaše laboratoře* [online]. 2019. Dostupné z: <https://www.vaselaboratore.cz/seznam-vysetreni/biochemie/item/horcik-mg-magnesium>
- [82] Amoniak. *LAB TESTS ONLINE* [online]. 21. říjen 2008. Dostupné z: <https://www.labtestsonline.cz/amoniak.html>
- [83] THOMAS, Lothar, ed. *Clinical laboratory diagnostics: use and assessment of clinical laboratory results*. 1. ed. Frankfurt/Main: TH-Books-Verl.-Ges, 1998. ISBN 978-3-9805215-4-3.
- [84] Hlášení výsledků v kritických intervalech. *PREVEDIG Laboratorně diagnostické centrum* [online]. Dostupné z: <https://www.prevedig.cz/2-uncategorised/333-vysledky-v-kriticky-intervalech.html>
- [85] Chloridy. *Vitalion* [online]. Dostupné z: <https://laborator.vitalion.cz/chloridy/>
- [86] Chloridy. *LAB TESTS ONLINE* [online]. 16. září 2008. Dostupné z: <https://www.labtestsonline.cz/chloridy.html>

- [87] Chloridy Cl-. *Vaše laboratoře* [online]. Dostupné z: <https://www.vaselaboratore.cz/seznam-vysetreni/biochemie/item/chloridy-cl>
- [88] Laktát. *Vaše laboratoře* [online]. Dostupné z: <https://www.vaselaboratore.cz/seznam-vysetreni/biochemie/item/laktat>
- [89] Laktát. *Vitalion* [online]. Dostupné z: <https://laborator.vitalion.cz/laktat/>
- [90] UEDA, Toshiko, Tsuyoshi MAEKAWA a Kazuyuki NAKAMURA. Plasma Nitrite and Nitrate Determination. In: Stephen M. PALFREY *Clinical Applications of Capillary Electrophoresis* [online]. New Jersey: Humana Press, 1999 [vid. 2024-04-17], s. 203–208. ISBN 978-1-59259-689-8. Dostupné z: doi:10.1385/1-59259-689-4:203
- [91] SHIVA, Sruti, Sheila FRIZZELL a Mark T. GLADWIN. Nitrite and Heme Globins. In: *Nitric Oxide* [online]. B.m.: Elsevier, 2010 [vid. 2024-04-17], s. 605–626. ISBN 978-0-12-373866-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-373866-0.00019-8
- [92] ZHAO, Jiao, Jun WANG, Yaling YANG a Yunhui LU. The Determination of Nitrate and Nitrite in Human Urine and Blood by High-Performance Liquid Chromatography and Cloud-Point Extraction. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2015, **53**(7), 1169–1177 [vid. 2024-04-17]. ISSN 0021-9665, 1945-239X. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/bmu212
- [93] MOSHAGE, H, B KOK, J R HUIZENGA a P L JANSEN. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clinical Chemistry* [online]. 1995, **41**(6), 892–896 [vid. 2024-04-17]. ISSN 0009-9147, 1530-8561. Dostupné z: doi:10.1093/clinchem/41.6.892
- [94] KIM, Minyoul, Suncheun KIM, Wonkyung YANG a Juhyun SIM. Determination of nitrite and nitrate in postmortem whole blood samples of 10 sodium nitrite poisoning cases: The importance of nitrate in determining nitrite poisoning. *Forensic Science International* [online]. 2022, **335**, 111279 [vid. 2024-04-17]. ISSN 03790738. Dostupné z: doi:10.1016/j.forsciint.2022.111279
- [95] YAN, Hui, Xiangyi ZHUO, Baohua SHEN, Ping XIANG a Min SHEN. Determination of Nitrite in Whole Blood by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection and a Case of Nitrite Poisoning. *Journal of Forensic Sciences* [online]. 2016, **61**(1), 254–258 [vid. 2024-04-17]. ISSN 0022-1198, 1556-4029. Dostupné z: doi:10.1111/1556-4029.12918
- [96] Sulfate. *health matters* [online]. Dostupné z: <https://healthmatters.io/understand-blood-test-results/sulfate>
- [97] WARING, R. H. a L. V. KLOVRZA. Sulphur Metabolism in Autism. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine* [online]. 2000, **10**(1), 25–32 [vid. 2024-04-16]. ISSN 1359-0847, 1364-6907. Dostupné z: doi:10.1080/13590840050000861
- [98] BLINN, C M, B A BIGGEE, T E MCALINDON, M NUIE a J E SILBERT. Sulphate and osteoarthritis: decrease of serum sulphate levels by an additional 3-h fast and a 3-h glucose tolerance test after an overnight fast. *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. 2006, **65**(9), 1223–1225 [vid. 2024-04-16]. ISSN 0003-4967. Dostupné z: doi:10.1136/ard.2006.052571

- [99] KUBÁŇ, Pavel a Petr BOČEK. Direct analysis of formate in human plasma, serum and whole blood by in-line coupling of microdialysis to capillary electrophoresis for rapid diagnosis of methanol poisoning. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2013, **768**, 82–89 [vid. 2024-04-16]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2013.01.021
- [100] HOVDA, Knut Erik, Yvonne Elisabeth LAO, Gaut GADEHOLT a Dag JACOBSEN. Formate test for bedside diagnosis of methanol poisoning. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* [online]. 2021, **129**(1), 86–88 [vid. 2024-04-16]. ISSN 1742-7835, 1742-7843. Dostupné z: doi:10.1111/bcpt.13597
- [101] ZAKHAROV, Sergey, Ivana KURCOVA, Tomas NAVRATIL, Tomas SALEK, Martin KOMARC a Daniela PELCLOVA. Is the Measurement of Serum Formate Concentration Useful in the Diagnostics of Acute Methanol Poisoning? A Prospective Study of 38 Patients. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* [online]. 2015, **116**(5), 445–451 [vid. 2024-04-16]. ISSN 1742-7835, 1742-7843. Dostupné z: doi:10.1111/bcpt.12338
- [102] KUBÁŇ, Petr, František FORET a Robert BOCEK. Capillary electrophoresis with contactless conductometric detection for rapid screening of formate in blood serum after methanol intoxication. *Journal of Chromatography A* [online]. 2013, **1281**, 142–147 [vid. 2024-04-15]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2013.01.035
- [103] RAJENDRAM, Roshanna, Rajkumar RAJENDRAM a Victor R. PREEDY. Ethanol Metabolism and Implications for Disease. In: *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse* [online]. B.m.: Elsevier, 2016 [vid. 2024-04-17], s. 377–388. ISBN 978-0-12-800213-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800213-1.00035-3
- [104] RAJENDRAM, R., R. HUNTER a V. PREEDY. Alcohol: Absorption, Metabolism, and Physiological Effects. In: *Encyclopedia of Human Nutrition* [online]. B.m.: Elsevier, 2013 [vid. 2024-04-17], s. 40–49. ISBN 978-0-12-384885-7. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-375083-9.00005-2
- [105] PRAVASI, S.D. Acetic Acid. In: *Encyclopedia of Toxicology* [online]. B.m.: Elsevier, 2014 [vid. 2024-04-17], s. 33–35. ISBN 978-0-12-386455-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00216-5
- [106] DVOŘÁK, Miloš, Manuel MIRÓ a Pavel KUBÁŇ. Automated Sequential Injection-Capillary Electrophoresis for Dried Blood Spot Analysis: A Proof-of-Concept Study. *Analytical Chemistry* [online]. 2022, **94**(13), 5301–5309 [vid. 2024-03-19]. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.1c05130
- [107] DVOŘÁK, Miloš, Richard MARŠALA a Pavel KUBÁŇ. In-vial dried urine spot collection and processing for quantitative analyses. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2023, **1254**, 341071 [vid. 2024-02-28]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2023.341071
- [108] BAILY, Kim. Healthcare Facts for Simulation Technology Specialists: The Fun „Fizzyology" of IV Fluids. *SIMGHOSTS* [online]. 12 2016. Dostupné z: <https://simghosts.org/news/509080/Healthcare-Facts-for-Simulation-Technology-Specialists-The-Fun-Fizzyology-of-IV-Fluids.htm///>

- [109] ŠINÁGLOVÁ, Dana. Hemolýza. Jak ovlivňuje výsledek? *Klinické Laboratoře Tábor* [online]. léto 2019. Dostupné z: <https://www.klt.cz/aktuality/odborne-akce/hemolyza-jak-ovlivnuje-vysledek>
- [110] KOVACS, L., C. B. ZAMBONI, L. A. S. NUNES, T. F. LOURENÇO a D. V. MACEDO. Concentrations of ions and metals in blood of amateur and elite runners using NAA. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* [online]. 2013, **297**(3), 393–398 [vid. 2024-04-20]. ISSN 0236-5731, 1588-2780. Dostupné z: doi:10.1007/s10967-012-2382-x
- [111] CHATTARAJ, Sarnath a Arabinda K. DAS. Indirect atomic absorption spectrometric determination of sulfate in human blood serum. *The Analyst* [online]. 1992, **117**(3), 413 [vid. 2024-04-24]. ISSN 0003-2654, 1364-5528. Dostupné z: doi:10.1039/an9921700413
- [112] TOLLINGER, C. D., H. J. VREMAN a M. W. WEINER. Measurement of acetate in human blood by gas chromatography: effects of sample preparation, feeding, and various diseases. *Clinical Chemistry*. 1979, **25**(10), 1787–1790. ISSN 0009-9147.
- [113] CAO, Jing, Rachel EDWARDS, Janette CHAIREZ a Sridevi DEVARAJ. Validation of capillary blood analysis and capillary testing mode on the epoc Point of Care system. *Practical Laboratory Medicine* [online]. 2017, **9**, 24–27 [vid. 2024-04-20]. ISSN 23525517. Dostupné z: doi:10.1016/j.plabm.2017.07.003
- [114] Bioanalytical method validation - Scientific guideline. *European Medicine Agency* [online]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>