

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Stanovení kreatininu v moči s využitím vysokoúčinné
kapalinové chromatografie**

Bakalářská práce

Anežka Vančurová

Školitelka: Ing. Pavla Fojtíková, Ph.D.

České Budějovice 2021

Vančurová, A., Stanovení kreatininu v moči s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie [Determination of creatinine in urine using high performance liquid chromatography. Bc. Thesis, in Czech.] – 35 p, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace

The bachelor thesis deals with an analytical method development for the determination of creatinine in urine using the high-performance liquid chromatography with UV detection. The theoretical part contains information about properties of creatinine, general principles of liquid chromatography, summarizes existing and validated methods used for the determination of creatinine in a biological sample. The experimental part describes the process of the optimization of chromatography for the creatinine separation when different types of columns are used. The aim of the bachelor thesis was to development and validate a rapid method for the quantification of creatinine in a urine sample.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích 6.12.2021

Anežka Vančurová

Klíčová slova

Kreatinin, kapalinová chromatografie, stacionární fáze, optimalizace, validace

Key words

Creatinine, liquid chromatography, stationary phase, optimization, validation

Poděkování

Ráda bych poděkovala mé školitelce Ing. Pavle Fojtíkové, Ph.D. za odborné vedení, rady a zkušenosti, jenž jsem během vypracování bakalářské práce získala. Vážím si jejího přátelského přístupu, velké trpělivosti a všestranné pomoci.

V neposlední řadě děkuji svým přátelům a své rodině za podporu.

Obsah

1.	Cíle práce.....	1
2.	Teoretická část.....	2
2.1	Kreatinin	2
2.1.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti	2
2.1.2	Význam stanovení kreatininu	3
2.1.3	Stabilita kreatininu ve vzorku.....	4
2.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	4
2.2.1	Kolony	5
2.2.2	Stacionární fáze	5
2.2.3	Silikagel.....	6
2.3	Analytické metody pro stanovení kreatininu	7
2.3.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	7
2.3.2	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS)	11
2.3.3	Kapilární elektroforéza	11
2.3.4	Jaffého metoda stanovení kreatininu	11
2.3.5	Enzymatické metody	12
3.	Experimentální část	13
3.1	Instrumentální vybavení pro chromatografii	13
3.1.1	Použité chromatografické kolony.....	13
3.2	Další instrumentální vybavení a spotřební materiál	14
3.3	Chemikálie.....	14
3.4	Příprava roztoků standardu	14
3.5	Příprava mobilních fází.....	15
3.6	Příprava kalibračních roztoků.....	16
3.7	Úprava reálných vzorků.....	16
3.8	Příprava obohacených roztoků	17

4.	Diskuse a výsledky	18
4.1	Vývoj a optimalizace metody	18
4.2	Validace metody	24
5.	Závěr.....	27
6.	Bibliografie.....	28
7.	Seznam zkratk a symbolů	33
8.	Přílohy	35

1. Cíle práce

- Rešerše na dané téma
- Vývoj metody na stanovení kreatininu v moči pomocí HPLC s UV detekcí, zhodnocení vhodnosti různých stacionárních a mobilních fází
- Validace metody na stanovení kreatininu v moči pro vybranou stacionární a mobilní fázi při optimalizovaných podmínkách analýzy

2. Teoretická část

2.1 Kreatinin

2.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

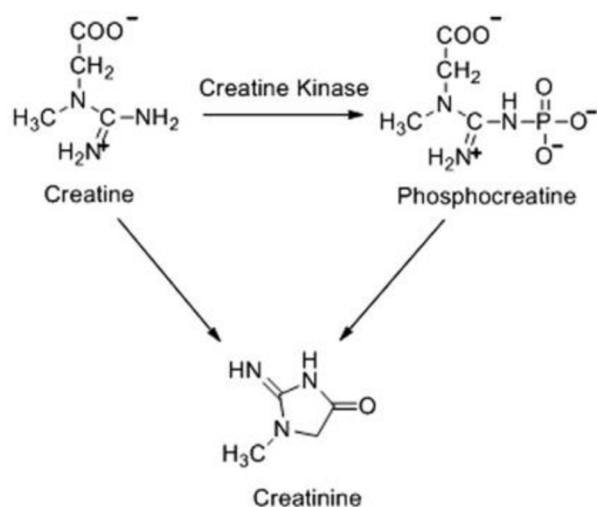
Kreatinin je látka, jejíž systematický název je 2-amino-3-methyl-4H-imidazol-5-on dle organizace IUPAC (Obrázek 1). Sumární vzorec je $C_4H_7N_3O$. Kreatinin bývá řazen do dvou skupin, mezi laktamy a imidazolidinony. Vyskytuje se jako bílá pevná látka, jejíž molekulová hmotnost je 113,12 g/mol. Rozpustnost kreatininu ve vodě je 80,1 mg/ml při teplotě 16 °C (PubChem 2021). Pro koncentraci roztoku 50 g/l je hodnota pH 7,5 až 8,5 při teplotě 20 °C (Sigma Aldrich 2019).



Obrázek 1: Struktura kreatininu (PubChem 2021)

V lidském organismu se kreatinin vyskytuje v orgánech (např. močový měchýř, ledviny, játra), tkáních (např. tuková tkáň, kosterní svaly), buňkách (neurony, fibroblasty) a tělních tekutinách (např. krev, moč) (PubChem 2021). Z hlediska analytického stanovení za pomoci kapalinové chromatografie je důležité, že se jedná o polární látku (Olejarz et al. 2020). Jde o cyklickou látku s obsahem dusíku, která vzniká v organismu z kreatinu nebo z kreatinfosfátu (Obrázek 2). Kreatinfosfát je produktem přeměny kreatinu, vzniká jeho fosforylací. Nachází se v kosterním svalstvu a slouží jako rychlý zdroj energie na začátku fyzické námahy. Kreatinin vzniká z kreatinu a kreatinfosfátu neenzymatickou dehydratací. Jedná se o nevratnou reakci (Kashani et al. 2020). Rychlost produkce kreatininu u zdravého jedince je považována za poměrně konstantní a hodnota je ovlivněna množstvím svalové hmoty (Zuo et al. 2008). Kreatinin je z lidského těla vylučován ledvinami. Koncentrace kreatininu ve vylučované moči je kromě pohlaví ovlivněna stravou a věkem zkoumaného jedince (Čermáková a Štěpánová 2003; Kashani et al. 2020). Pro organismus

je důležité přijímat v potravě dostatečné množství aminokyselin, arginin a glycin, nebo přímo kreatin prostřednictvím doplňků stravy (Masopust 1998; Kashani et al. 2020).



Obrázek 2: Mechanismus vzniku kreatininu z kreatinu a kreatinfosfátu

(Xiang et al. 2014)

2.1.2 Význam stanovení kreatininu

Stanovení koncentrace kreatininu v tělních tekutinách je využíváno k diagnostice nemocí, ke kontrole správného fungování ledvin (Šajdíková a Nováková 2014). Stanovení koncentrace kreatininu v moči se rovněž využívá pro normalizaci výsledků bioanalytických stanovení. Příkladem jsou různé kohortní studie týkající se výzkumu souvislosti expozice člověka škodlivým látkám s chronickými onemocněními a alergiemi (Remane et al. 2015). Koncentrace kreatininu v séru či v moči může být stanovena pomocí tzv. Jaffého metody, enzymatické metody nebo s využitím kapalinové chromatografie. Pro muže jsou normální hodnoty 13,3 mmol/den, u žen jsou normální hodnoty 10,6 mmol/den. Zvýšená nebo snížená koncentrace kreatininu v tělních tekutinách je indikátorem onemocnění nebo špatného životního stylu (Masopust 1998; Čermáková a Štěpánová 2003). Koncentrace kreatininu oproti standardním hodnotám může být zvýšena při častém přijímání potravy bohaté na bílkoviny nebo při sníženém příjmu potravy. Dále se koncentrace kreatininu zvyšuje při větších zásazích do svalové tkáně, při operacích nebo specifických poraněních. Hodnota koncentrace kreatininu v tělních tekutinách se snižuje např. v důsledku glomerulonefritidy, která zapříčiňuje selhávání ledvin. Jedna z možných léčebných opatření je úprava jídelníčku snížením obsahu bílkovin (Čermáková a Štěpánová 2003; Matoušovic 2005; Kubíčková a Böhm 2010).

2.1.3 Stabilita kreatininu ve vzorku

Stabilita stanovovaných analytů v moči je důležitý faktor, který ovlivňuje kvalitu analýzy. Nedodržení podmínek skladování vzorků před analýzou může vést k rozkladu kreatininu a následně k nespolehlivým výsledkům analýz. Při teplotě 20 až 25 °C je kreatinin v moči stabilní 2 dny. Při teplotě 4 až 8 °C je stabilní 6 dní. Při teplotě -20 °C je stabilní 6 měsíců (Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN Hradec Králové 2009).

2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je separační metoda, při které dělené látky ve směsi jsou rozdílně distribuovány mezi fází mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fází. Mobilní fází je např. voda, methanol, acetonitril nebo roztok soli s upraveným pH (pufr). Složení mobilní fáze může být během celé analýzy konstantní, mít stejnou eluční sílu (tzv. izokratická eluce) nebo se během analýzy může měnit její složení a tím postupně zvyšovat eluční sílu vybrané složky mobilní fáze (tzv. gradientová eluce). Mobilní fáze je nejčastěji do systému čerpána pomocí vysokotlakého čerpadla, jedná se o vysokoučinnou kapalinovou chromatografii (High performance Liquid Chromatography; HPLC) (Nováková et al. 2013a). Stacionární fáze může být kapalná látka ukotvena na tuhém nosiči nebo pevná látka. Stacionární fáze (sorbent) je umístěna v koloně, přes kterou proudí kapalná mobilní fáze se vzorkem (Nováková et al. 2013a). V průběhu analýzy jsou složky vzorku unášeny mobilní fází a interagují s částicemi sorbentu. Dochází k opakovanému vyměňování částic vzorku mezi mobilní a stacionární fází, opakovaně se ustaluje rovnováha složek vzorku. K naprosté rovnováze mezi fázemi však nikdy nedochází, protože separace je dynamický systém (Nováková et al. 2013a; Záruba 2016a). Pro popis rovnováhy složek vzorku mezi mobilní a stacionární fází je zavedena distribuční konstanta (K_D). Pokud má distribuční konstanta dané látky vysokou hodnotu, pak částice této látky se zdržují déle ve stacionární fází a její retence roste. V průběhu analýzy dané směsi je důležité, aby distribuční konstanty separovaných látek byly odlišné. Záznam těchto separovaných zón vzorku při průchodu detektorem se nazývá chromatogram (Nováková et al. 2013a). Chromatogram je časová závislost intenzity sledované veličiny, je tvořen gausovskými křivkami, resp. píky (Nováková et al. 2013a; Záruba 2016a). Ke sledování rozdílu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyt se v kapalinové chromatografii používají různé typy detektorů. Mezi nejčastěji používané patří spektrofotometrický, fluorescenční či hmotnostní detektor. Principem spektrofotometrické detekce je sledování absorpce záření v ultrafialové a viditelné oblasti vlnových délek, 180 až 780 nm. Podstatnou podmínkou je, aby mobilní fáze nebyla tvořena látkou, která

absorbuje záření při shodné vlnové délce jako sledovaný analyt (Záruba 2016a). Spektrofotometrické detektory se dále dělí dle jejich konstrukce na detektor s fixní vlnovou délkou, detektor s měnitelnou vlnovou délkou, detektor s programovatelnou vlnovou délkou a detektor s diodovým polem (DAD, PDA) (Nováková et al. 2013a).

2.2.1 Kolony

Kolony jsou trubice z oceli nebo ze skla ve kterých je umístěna stacionární fáze. Délky kolon obvykle dosahují 3 až 25 cm, průměr kolony bývá v rozmezí 4 až 8 mm a velikosti, resp. průměr částic stacionární fáze 3 až 10 μm (Záruba 2016a). Existují různé modely a variace kolon pro HPLC. Volba parametrů kolony se řídí potřebami dané analýzy. Běžným materiálem vnějšího pláště, jak je uvedeno výše, je ocel, nejčastěji nerezová. Vnitřní povrch kolony může být také z nerezové oceli. V některých případech je vnitřní povrch upravován jiným materiálem, z důvodu reakce železa s organickými rozpouštědly (acetonitril a dichlormethan). Tento jev pak může mít vliv na probíhající analýzu. Použité materiály pro úpravu vnitřního povrchu kolony musí být inertní k mobilní fázi a odolné vůči tlaku až do 100 MPa. Skleněné kolony z tvrzeného skla se používají při tlaku do 20 MPa při současném použití ochranného kovového nebo polymerového pouzdra (Nováková et al. 2013a). K samotné koloně je ještě připojena na jejím začátku předkolona. Stacionární fáze umístěná v předkoloně je shodná se stacionární fází ve vlastní koloně (Záruba 2016a). Předkolona se používá z důvodu ochrany kolony před chemickým či mechanickým poškozením. Existují různé typy délek předkolon. Délka se volí na základě velikosti kolony a potřeb dané analýzy, má vliv na dobu separace a tím i celé analýzy. Pro účinnější eliminaci chemického a mechanického znečištění se dále používají předkolonové filtry (kovové frity) s obvyklou velikostí pórů 0,5 μm nebo 2 μm (Nováková et al. 2013b).

2.2.2 Stacionární fáze

Stacionární fáze je nepohyblivá složka chromatografického systému umístěná v koloně. Podle vlastností, složení a dalších faktorů se používané stacionární fáze rozdělují do mnoha skupin. Stacionární fáze by měla splňovat určité požadavky, aby separace a analýza probíhaly za optimálních podmínek. Důležitá je tepelná a chemická stabilita. Chemické složení stacionární fáze musí být inertní k mobilní fázi i vzorku. Nesmí docházet k vymývání stacionární fáze proudem mobilní fáze z kolony.

Nejčastějším způsobem charakterizace použité stacionární fáze je podle tzv. chromatografického módu. Dělí se na normální, reverzní, ionexy, HILIC, HIC, gely, afinitní a chirální.

Dle jejich chemického složení se mohou dělit na anorganické oxidy, chemicky vázané fáze na bázi silikagelu, polymerní, hybridní a stacionární fáze na bázi grafitového uhlíku (Nováková et al. 2013a).

2.2.3 Silikagel

Nejběžnějším sorbentem je silikagel. Obvykle se používá v porézní amorfní formě. Jedná se o polární anorganický sorbent obecného vzorce $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, kdy voda tvoří silanolové skupiny (Si-OH). Tyto skupiny mohou být různými způsoby napojeny na křemík. Napojení může být geminální, vicinální nebo skupina může tvořit siloxanové, asociované skupiny či může být zcela izolovaná.

Silikagel se v kapalinové chromatografii používá samostatně pro separaci na normálních fázích nebo jako nosič s chemicky navázanými ligandy pro separace na reverzních fázích. Důležitou vlastností je velký specifický povrch (až $500 \text{ m}^2/\text{g}$) s velikostí částic v rozmezí 3,5 až 10 μm a průměrem pórů 8 až 15 nm. Samotný silikagel se používá pro analýzy, kde je pH nižší než 7, neboť při vyšším pH se silikagel rozpouští. Způsobem jeho výroby lze ovlivnit mechanické vlastnosti, polaritu povrchu, odolnost vůči pH a teplotě, aktivitu silanových skupin (Nováková et al. 2013a).

Vývoj v oblasti používaných stacionárních fází je rychlý. Kromě porézních částic silikagelu se používají porézní organosilikátové částice, v poslední době pak zejména technologie pevného jádra s porézním povrchem. Výhodou posledně zmiňované technologie v porovnání s tradičními plně porézními částicemi, je výrazné zvýšení účinnosti separace pro stejný průměr částic (Behr 2020).

Při použití silikagelu jako nosiče je povrch modifikován. Na silikagel může být vázána organická i anorganická fáze. Nejčastěji bývají navázány různě dlouhé alkylové řetězce. Nejobvyklejším chemicky vázaným alkylem je oktadecylsilikagel (C_{18} , ODS), obecně se používají alkyly o délce C_2 až C_{30} . Alkylovaná stacionární fáze má z hlediska vlastností analytů velice široké spektrum použití, zejména pro chromatografickou separaci nepolárních analytů (Nováková et al. 2013a). Pro zvýšení retence a rozlišení polárních analytů se používají alkylované stacionární fáze s další úpravou, například polárně endkapované C_{18} kolony (Pragolab 2020).

Pojmem HILIC je označována technika hydrofilní interakční chromatografie. Mechanismus v průběhu HILIC separace je komplexní a nebyl dosud jednoznačně objasněn. Na povrchu polární stacionární fáze, např. silikagelu, nebo polární skupiny navázané na silikagelový, polymerní či hybridní materiál, se vytváří vrstva vody. Rozdělování tak probíhá mezi hydrofobní částí mobilní fáze a silně hydrofilní vrstvou vody. Obdobně jako

v systému s normálními fázemi je retence analytu zvyšována s polaritou analytu a snižuje se zvýšením polarity mobilní fáze. K ovlivňování retence se často využívá přidavek pufrů do mobilní fáze s různou koncentrací solí (Nováková et al. 2013a).

2.3 Analytické metody pro stanovení kreatininu

Pro stanovení kreatininu v tělních tekutinách byla vyvinuta celá řada metod. Dříve se hojně využívala Jaffého metoda se spektrofotometrickou detekcí a enzymatické metody. Později byla publikována řada separačních metod. Jedná se o metody kapalinové chromatografie, plynové chromatografie a kapilární elektroforézu. Jaffého metoda a enzymatické metody jsou v porovnání se separačními metodami méně citlivé a méně selektivní, stanovení je negativně ovlivněno interferencí jiných látek přítomných v analyzovaných vzorcích.

2.3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Pro stanovení kreatininu spolu s dalšími analyty v biologickém vzorku je využívána vysokotlaká kapalinová chromatografie s UV detekcí, popřípadě MS detekcí. Jednotlivé metody, které jsou pro přehlednost shrnuty v Tabulce 1, se liší použitou stacionární a mobilní fází s izokratickou či gradientovou elucí. Obvykle se jedná o metody vyvinuté pro stanovení kreatininu současně s dalšími fyziologicky významnými látkami (např. tenofovir, niaciamid, kyselina močová, hippurová, 2-methylhippurová, indol-3-octová či homovanilová). Volba chromatografických podmínek přímo ovlivňuje kvalitu separace, z ekonomického a ekologického hlediska je podstatné potřebné množství použitých solí a organických rozpouštědel v mobilních fázích.

V první části Tabulky 1 jsou uvedeny metody vyvíjené za použití C18 stacionární fáze. Rychlá a přesná metoda současné separace a kvantifikace tenofoviru a kreatininu v krevní plasmě a moči byla vyvinuta pro monitoring negativního vlivu tenofoviru na fungování ledvin pacientů (Olejarz et al. 2020). Získané koncentrace tenofoviru lze tedy následně normalizovat na koncentraci kreatininu. Malý objem vzorku plazmy či moči (50 µl) byl ředěn mobilní fází (10x) přímo do skleněné HPLC vialky, jiná předúprava vzorku nebyla prováděna. Jako mobilní fáze byl použit fosfátový pufr o koncentraci 0,015 mol/l a pH 7,4. Vlnová délka pro detekci a stanovení koncentrace kreatininu byla 234 nm. Celkový čas analýzy byl méně než 10 min. Metoda byla vyvinuta s ohledem na minimalizaci laboratorního plastového odpadu. Rovněž byl brán zřetel na minimalizaci rozpuštěných solí v mobilní fázi a použité množství organických rozpouštědel. Z tohoto důvodu nebyla pro analýzu kreatininu a tenofoviru ve vzorcích moči použita původně testovaná kolona HILIC (Olejarz et al. 2020). Stacionární fáze C18 byla použita v řadě dalších publikací (Tabulka 1).

V citovaných publikacích pro stanovení kreatininu v biologických vzorcích separací na C18 stacionární fázi byla použita teplota separace 20 až 40 °C. Téměř ve všech uvedených metodách byl použit pufr (fosfátový nebo octanový) jako mobilní fáze A, jednotlivé metody se lišily koncentrací rozpuštěných solí a hodnotou pH ve výsledné mobilní fáze. Jako mobilní fáze B byl použit acetonitril, methanol nebo se jednalo o separaci s použitím 100% vodné mobilní fáze. Vlnová délka UV detekce byla v rozmezí 205 až 250 nm.

Použití hydrofilní interakční chromatografie předpokládá výrazné zvýšení podílu organického rozpouštědla v mobilní fázi. Byla publikována metoda separace kreatininu a kyseliny močové na polární SB-CN koloně (stable bond cyano column) (Zhou et al. 2013). Jako mobilní fáze A byl použit 0,01 mol/l fosfátový pufr (pH 6,85) a acetonitril jako mobilní fáze B. HILIC separace byla použita při stanovení kreatininu a neopterinu. Mobilní fáze byla tvořena octanem amonným o koncentraci 0,01 mol/l (pH 4) a acetonitrilem v poměru 10 : 90 (Kepka 2021). Metoda stanovení kreatininu s využitím ve forenzní toxikologii byla rovněž optimalizována pro HILIC kolonu. (Luginbühl a Weinmann 2017).

Stacionární fáze s pentafluorfenylem (PFP) byla použita pro separaci látek s naprosto odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, kreatininu a retinolu, biomarkeru poškození ledvin. Jako mobilní fáze byl použit vodný pufr mravenčanu amonného o koncentraci 0,015 mmol/l a pH 3,0 (MFA) a 90% acetonitril ve vodě okyselený kyselinou mravenčí (0,005 mol/l) (MFB). Poměr mobilní fáze A a B byl při izokratické eluci 28 : 72, separace probíhala při 25 °C (Kučerová et al. 2019).

Obvyklou úpravou vzorku moči před analýzou byla v citovaných vědeckých publikacích centrifugace (Yuen et al. 2004; Fountain et al. 2007; Askenazi et al. 2014; Luginbühl a Weinmann 2017; Wijemanne et al. 2018; Kepka 2021), případně také filtrace (Li et al. 1992; George et al. 2006; Zuo et al. 2008; Hou et al. 2012; Zhou et al. 2013; Xiang et al. 2014) nebo pouze filtrace (Jen et al. 2002). Z důvodu minimalizace plastového odpadu byla rovněž prováděna analýza vzorků moči zcela bez centrifugace či filtrace (Remane et al. 2015; Olejarz et al. 2020). V některých vědeckých publikacích byla prováděna extrakce vzorku (Kučerová et al. 2019). Protože kreatinin je v analyzovaných vzorcích tělních tekutin obsažen ve vysokých koncentracích, je možné případný matricový efekt na výsledky analýzy minimalizovat ředěním vzorku a zmenšením jeho nástřiku (Zuo et al. 2008). V některých aplikacích byl použit pro zpracování a analýzu vzorků vnitřní standard hypoxanthin (Zuo et al. 2008; Zhou et al. 2013), tyrosin (Wijemanne et al. 2018) nebo izotopicky značený vnitřní standard kreatininu v případě MS detekce (Hou et al. 2012; Askenazi et al. 2014; Luginbühl a Weinmann 2017).

Tabulka 1: Přehled použitých kolon, mobilních fází a dalších podmínek analýzy z publikací

Kolona	MFA	pH MFA	MFB	Eluce, % MFB	Stanovované látky	Citace
ZORBAX SB C18 (150×4,6 mm; 5 μm)	fosfátový pufr 0,015 mol/l	7,4	ACN	gradientová, 2 – 4 %	tenofovir kreatinin	(Olejarz et al. 2020)
RP 18e (100×4,6 mm)	fosfátový pufr 0,02 mol/l	7,25	-	izokratická	k. močová hypoxanthin kreatinin	(Wijemanne et al. 2018)
ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution (100×4,6 mm)	mravenčan amonný 0,05 mol/l, k. oktansulfonová, 1 obj. % methanol 0,005 mol/l	6,55	mravenčan amonný 0,05 mol/l, k. oktansulfonová, 100% methanol 0,005 mol/l	gradientová, 0 – 100 %	k. močová kreatinin k. homovanilová niacinamid k. hippurová k. indol-3-octová k. 2-methylhippurová	(Remane et al. 2015)
ODS-BP (250×4,6 mm; 5 μm)	fosfátový pufr 0,05 mol/l	5,26	methanol	izokratická, 5 %	kreatinin, k. močová hypoxanthin, xanthin	(Xiang et al. 2014)
ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150×2,1 mm, 3,5 μm)	0,1% roztok k. mravenčí ve vodě	-	0,1% roztok k. mravenčí v ACN	izokratická, 50 %	kreatinin	(Hou et al. 2012)
Symmetry C18 (150×3 mm; 5 μm)	fosfátový pufr	4,75	ACN	gradientová, 0 – 30 %	kreatinin k. močová	(Zuo et al. 2008)

Kolona	MFA	pH MFA	MFB	Eluce, % MFB	Stanovované látky	Citace
LUNA C18 (250×4,6 mm; 5 μm)	fosfátový pufr 0,01 mol/l	4,7	-	izokratická	allantoin k. močová kreatinin	(George et al. 2006)
C18 (250×4,6 mm; 5 μm)	fosfátový pufr 0,05 mol/l	7,4	-	izokratická	k. močová kreatinin	(Jen et al. 2002)
ODS (250×4,6 mm)	fosfátový pufr 0,01 mol/l k. oktansulfonová 2,5 mmol	6,1	-	izokratická	pseudouridin kreatinin	(Li et al. 1992)
KINETEX HILIC (150×3 mm; 2,6 μm)	octan amonný 0,01 mol/l	4,0	ACN	izokratická, 90 %	neopterin kreatinin	(Kepka 2021)
PFP (100×3 mm; 1,7 μm)	mravenčan amonný 0,015 mol/l	3,0	k. mravenčí 0,005 mol/l, 90% ACN ve vodě	izokratická, 72 %	retinol kreatinin	(Kučerová et al. 2019)
HILIC (150×2,1 mm; 3,5 μm)	octan amonný 0,005 mol/l, 0,1 obj. % k. mravenčí	5,72	ACN, 0,1 obj. % k. mravenčí	gradientová, 20 – 95 %	kreatinin	(Luginbühl a Weinmann 2017)
ZORBAX SB – CN (150×4,6 mm; 5 μm)	fosfátový pufr 0,01 mol/l	6,85	ACN	izokratická, 5 %	kreatinin k. močová	(Zhou et al. 2013)
TSKgel Amide80	octan amonný 0,01 mol/l	-	ACN	izokratická, 65 %	kreatinin	(Askenazi et al. 2014)
PRP – X200 (100×4,1 mm; 10 μm)	octan sodný 0,02 mol/l	4,8	-	izokratická	kreatinin	(Fountain et al. 2007)
PRP – X200 (100×4,1 mm)	octan sodný 0,005 mol/l	5,1	-	izokratická	kreatinin	(Yuen et al. 2004)

2.3.2 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS)

Tato metoda je založena kombinací dvou technik – plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Plynová chromatografie má za úkol separovat látky druhá technika, v tomto případě hmotnostní spektrometrie, je detekovat (Záruba 2016b).

Dle práce D. Tsikase (Tsikas et al. 2010) lze touto metodou po derivatizaci stanovit kreatinin v moči, plazmě i v séru. Společně s kreatininem byl derivatizován i použitý vnitřní standard methyl-trideuterokreatinin a pentafluorbenzylbromid. Derivatizace byla prováděna ve vzorku biologického materiálu nebo v ředěném roztoku za použití fosfátového pufru (Tsikas et al. 2010).

2.3.3 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je elektromigrační metoda založena na separaci pomocí migrace iontů v kapalině za působení stejnosměrného elektrického pole (Záruba 2016a). Dle práce D.G. Burkeho (Burke et al. 1999) lze touto metodou stanovit koncentraci kreatinu i kreatininu v moči. Pro stanovení kreatininu a kreatinu při vlnové délce 214 nm byl použit roztok 0,03 mol/l fosfátového pufru a 0,15 mol/l dodecylsírany sodného (pH 6) při vloženém napětí 15 kV s použitím kapiláry o délce 45 cm. K porovnání a kontrole výsledků byla v práci použita kapalinová chromatografie (Burke et al. 1999).

2.3.4 Jaffého metoda stanovení kreatininu

Metoda je založena na reakci kyseliny pikrové s kreatininem v zásaditém prostředí za vzniku červenooranžového komplexu. Koncentrace kreatininu je úměrná rychlosti vzniku červenooranžového zbarvení roztoku (Dastyh et al. 2008).

Průběh reakce je závislý na teplotě a pH. Pro stanovení koncentrace kreatininu je optimální teplota nižší než 25 °C a pH v rozmezí 12,3 až 12,5. Nedodržením těchto podmínek dochází k nepřesnému stanovení koncentrace kreatininu a ke zvýšení interferenčních faktorů známých jako Jaffého chromogeny. Mezi chromogeny je řazena např. kyselina askorbová, glukóza, ketolátky nebo vodíkové ionty.

K dosažení větší specifity Jaffého metody lze způsob stanovení modifikovat. Jsou přidávána různá činidla za účelem co nejmenšího rušení interferenčními faktory. Nejznámější modifikací je přidávek křemičitanu hlinitého tzv. Lloyдова činidla. Modifikace je založena na izolaci kreatininu od interferenčních faktorů (Čermáková a Štěpánová 2003; Dastyh et al. 2008).

2.3.5 Enzymatické metody

Kreatinin je pomocí enzymatických metod stanovován dvěma způsoby, jedná se o stanovení kreatinu pocházející z kreatininu nebo stanovení amoniaku pocházející z kreatininu. Tyto jsou metody používané ve větší míře než v případě Jaffého reakce (Čermáková a Štěpánová 2003; Dastych et al. 2008).

Při stanovení kreatinu pocházejícího z kreatininu jde o sérii reakcí za přítomnosti enzymů kreatininázy, kreatinázy, sarkosinoxidázy a peroxidázy. Stanovení koncentrace probíhá spektrofotometricky pomocí chinonmonoiminového barviva.

Stanovení kreatinu lze provést i za přítomnosti kreatininázy, kreatinkinázy, pyruvatkinázy a laktátdehydrogenázy, tzv. UV metodou. Stanovení koncentrace probíhá spektrofotometricky, je měřen pokles koncentrace NADH.

Druhý způsob stanovení kreatininu je stanovení amoniaku pocházejícího z kreatininu. Jde o spektrofotometrické stanovení úbytku NADPH, které je úměrné koncentraci kreatininu. Reakce přeměny kreatininu na amoniak probíhá za přítomnosti enzymu kreatininiminohydrolázy (Dastych et al. 2008).

3. Experimentální část

3.1 Instrumentální vybavení pro chromatografii

- Kapalinový chromatograf UltiMate 3000 (Thermo)
- Zásobník mobilní fáze SR-3000
- Čerpadlo mobilní fáze LPG-3400SD
- Nástříkový modul s chlazeným zásobníkem vialek WPS-3000 TSL
- Vyhřívaný kolonový prostor TCC-3000SD
- Spektrofotometrický detektor s diodovým polem DAD-3000RS
- Ovládání a zpracování výsledků prováděno programem Chameleon 7.2

3.1.1 Použité chromatografické kolony

V průběhu vývoje a validace metody pro stanovení kreatininu v roztoku byly použity 4 různé kolony od firmy Phenomenex (Tabulka 2). Všechny kolony byly vybaveny odpovídající předkolonou na základě doporučení výrobce.

Tabulka 2: Přehled kolon použitých při analýze kreatininu

Kolona	Rozměry	Modifikace stacionární fáze	Chromatografický mód
KINETEX EVO	150×3 mm; 5 µm	C18	Reverzní
LUNA	250×4,6 mm; 5 µm	C18	Reverzní
LUNA	150×3 mm; 5 µm	SCX	Reverzní
KINETEX	150×3 mm; 2,6 µm	HILIC	HILIC

3.2 Další instrumentální vybavení a spotřební materiál

K odměřování a přípravě roztoků před analýzou bylo použito následující vybavení:

- Analytické váhy: MS105DU (Mettler Toledo TM)
- Kombinovaná pH elektroda: typ pH 2 + L (ED, s.r.o.)
- Výrobník deionizované vody: Smart2Pure 6 UV/UF (Thermo)
- Odměrné sklo: třída přesnosti A (Fischer Brand)
- Skleněné dávkovací stříkačky o objemu: 5 – 500 μ l (Hamilton)
- Automatická dávkovací pipeta: Transferette $\text{\textcircled{R}}$; 1 – 10 ml (Brand)
- Automatická dávkovací pipeta: BioPettePLUS; 100 – 1000 μ l (Labnet)
- Automatická dávkovací pipeta: Eppendorf Research Plus; 2 – 20 μ l (Eppendorf $\text{\textcircled{R}}$)
- Automatická dávkovací pipeta: BioPette PLUS; 10 – 100 μ l (Labnet)
- Plastové špičky, centrifugační zkušavky, krimpovací vialky z čirého skla s hliníkovým uzávěrem a pryžovým septem
- Krimpovací kleště

3.3 Chemikálie

Pro přípravu veškerých roztoků byly použity následující chemikálie:

- Kreatinin ≥ 98 % (Sigma Aldrich);
- Octan amonný pro HPLC ≥ 99 % (Sigma Aldrich)
- Kyselina octová 100 % (Merck)
- Hydrogenfosforečnan disodný p.a. ≥ 99 % (Sigma Aldrich)
- Kyselina fosforečná 85 % (Merck)
- Methanol pro HPLC (Merck)
- Acetonitril pro HPLC ≥ 99 % (Merck)
- Deionizovaná voda generována přístrojem Smart2Pure 6 UV/UF (Thermo)

3.4 Příprava roztoků standardu

Zásobní roztok kreatininu byl připraven přesným navážením 16,46 mg. Navážené množství bylo kvantitativně převedeno do 5 ml odměrné baňky. Jako rozpouštědlo byla použita deionizovaná voda. Následně byly postupným ředěním zásobního roztoku připravovány pracovní roztoky kreatininu o koncentracích 1,0 g/l až 0,000020 g/l. Jako rozpouštědlo byla použita vždy příslušná mobilní fáze. Roztoky kreatininu byly skladovány v hlubokomrazícím boxu při teplotě -85 $^{\circ}\text{C}$.

3.5 Příprava mobilních fází

Mobilní fáze byly připravovány pro 4 různé kolony. Složení mobilních fází o daném rozsahu pH MFA byla následující:

Kolona KINETEX EVO C18 (150×3 mm; 5 μm)

Mobilní fáze 1

MFA: 1% vodní roztok kyseliny mravenčí

MFB: Methanol

Mobilní fáze 2

MFA: Hydrogenfosforečnan disodný o koncentraci 0,010 mol/l

pH: 4,75 nebo 3,35

MFB: ACN

Mobilní fáze 3

MFA: Hydrogenfosforečnan disodný o koncentraci 0,050 mol/l

pH: 8,40 nebo 7,20

Kolona Luna C18 (250×4,6 mm; 5 μm)

Mobilní fáze 4

MFA: Hydrogenfosforečnan disodný o koncentraci 0,015 mol/l

pH: 8,43 – 2,10

MFB: ACN nebo methanol

Kolona Luna SCX (150×3 mm; 5 μm)

Mobilní fáze 5

MFA: Hydrogenfosforečnan disodný o koncentraci 0,015 mol/l

pH: 6,06 – 3,80

MFB: ACN nebo methanol

Mobilní fáze 6

MFA: Octan amonný o koncentraci 0,0050 mol/l

pH: 5,72 – 4,03

MFB: Methanol

Mobilní fáze 7

MFA: Octan amonný o koncentraci 0,010 mol/l

pH: 5,84 – 5,05

MFB: Methanol

Mobilní fáze 8

MFA: Octan amonný o koncentraci 0,015 mol/l

pH: 5,00

MFB: Methanol

Kolona KINETEX HILIC (150×3 mm; 2,6 μm)

Mobilní fáze 9

MFA: Octan amonný o koncentraci 0,010 mol/l

pH: 5,98 – 4,00

MFB: ACN

3.6 Příprava kalibračních roztoků

Kalibrační roztoky v koncentračním rozsahu 1,0 až 500 mg/l byly připraveny z pracovního roztoku kreatininu o koncentraci 1,0 g/l. Vypočtené množství zásobního roztoku standardu bylo pipetováno do vialek a následně ředěno vypočteným množstvím mobilní fáze na objem 1 ml (Tabulka 3). Kalibrační roztoky byly připraveny na 7 různých koncentračních úrovních vždy ve 3 opakováních.

Tabulka 3: Kalibrační rozsah roztoků

Číslo roztoku	1	2	3	4	5	6	7
V (standard) [ul]	1	5	10	25	50	250	500
V(rozpouštědlo) [ul]	999	995	990	975	950	750	500
V(celkový) [ul]	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
c [mg/l]	1,0	5,0	10	25	50	250	500

3.7 Úprava reálných vzorků

Vzorky moči byly upravovány ihned po odběru. Vzorek moči byl odstředován rychlostí 20 000 otáček/min po dobu 10 minut. Po odstředění bylo provedeno dvacetinásobné a padesátinásobné ředění pomocí mobilní fáze.

3.8 Příprava obohacených roztoků

Spike (vzorek obohacený přídavkem standardu) je využíván jako kontrola správnosti měření. Spike byl připraven z 400 μl padesátkrát zředěné moči, 590 μl MF a 10 μl roztoku kreatininu o koncentraci 1,0 g/l. K porovnání by připraven vzorek bez zvýšeného obsahu kreatininu z 400 μl padesátkrát zředěné moči a 600 μl MF. Měření probíhala v osmi nezávislých opakováních.

4. Diskuse a výsledky

V této části práce jsou uvedeny a diskutovány výsledky průběhu vývoje a optimalizace metody pro stanovení kreatininu. Důraz byl kladen na výběr vhodné kolony, složení, koncentraci a pH mobilní fáze. Vlnová délka UV detekce stanovovaného analytu kreatininu byla zvolena na základě měření UV spektra v rozsahu 190 až 800 nm a porovnána s literárními daty (Olejarz et al. 2020). Poté byla kontrolována, příp. upřesňována při změně složení mobilní fáze. Zadržování analytu na koloně bylo hodnoceno pomocí kapacitního poměru, což je poměr redukovaného retenčního času ku mrtvému retenčnímu času. Hodnota kapacitního poměru pro jednoduché separace by měla dosahovat hodnoty větší nebo rovno jedné. Pro hodnocení symetrie píku byl použit faktor asymetrie (A_s). Faktor asymetrie charakterizuje míru symetrie a jeho hodnota by měla být v rozmezí 0,80 až 1,5, kdy je hodnota 1,0 znak dokonalé symetrie (Kahoun 2020). Druhá část této kapitoly je věnována vyhodnocení průběhu validace metody.

4.1 Vývoj a optimalizace metody

Kolona KINETEX EVO C18 (150×3 mm; 5 μm)

Na této koloně byly vyzkoušeny celkem 3 různé mobilní fáze (Kapitola 3.5).

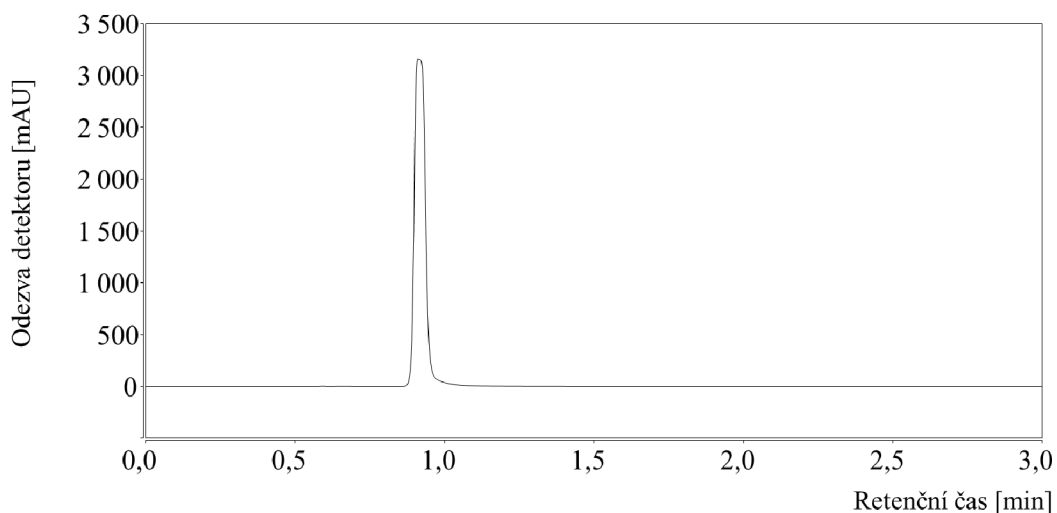
Mobilní fáze 1 byly 1% vodní roztok kyseliny mravenčí (MFA) a methanol (MFB). Byla zvolena teplota kolonového prostoru 35 °C, průtok MF 1 ml/min a UV detekce nastavena na 234 nm. Analyt nebyl zadržován na koloně (retenční čas kreatininu byl roven mrtvému retenčnímu času). Byl vyzkoušen různý poměr MFA a MFB (0 až 100 %), ale žádným z vyzkoušených poměrů se nepodařilo ovlivnit retenční čas.

Mobilní fáze 2 byla použita na základě informací z publikace (Zuo et al. 2008) – hydrogenfosforečnan disodný o koncentraci 0,010 mol/l (MFA) a ACN (0 až 30 %) (MFB). Byla zvolena teplota kolonového prostoru 35 °C, průtok MF 1 ml/min a UV detekce nastavena na 234 nm. Byl sledován vliv pH MFA a procentuálního obsahu MFB na retenční čas a tvar píku. Při analýze s pH MFA 4,75 a obsahem MFB 0 % pík mírně chvostoval ($A_s = 0,67$), retence kreatininu nebyla dostatečně vysoká (kapacitní poměr 0,40). Vyšší obsah organické mobilní fáze vedl ke snížení retenčního času, analyt nebyl na koloně zadržován. Nebyl pozorován výrazný vliv pH MFA.

Mobilní fáze 3 byla použita na základě informací z publikace (Zuo et al. 2008) – hydrogenfosforečnan disodný o koncentraci 0,050 mol/l (MFA). Na základě předchozích analýz (*mobilní fáze 2*) nebyla organická fáze přidávána. Kromě složení MFA byly podmínky analýzy shodné s podmínkami při použití *mobilní fáze 2*. Při

obou použitých pH MFA (7,20, resp. 8,40) byla symetrie píku vyhovující ($A_s = 1,4$, resp. $A_s = 1,5$) (Obrázek 3). Došlo k mírnému zlepšení retence kreatininu na koloně, ale kapacitní poměr (0,50) byl výrazně menší než 1,0.

Pro všechna použitá složení mobilní fáze byla retence kreatininu na koloně nedostatečná.

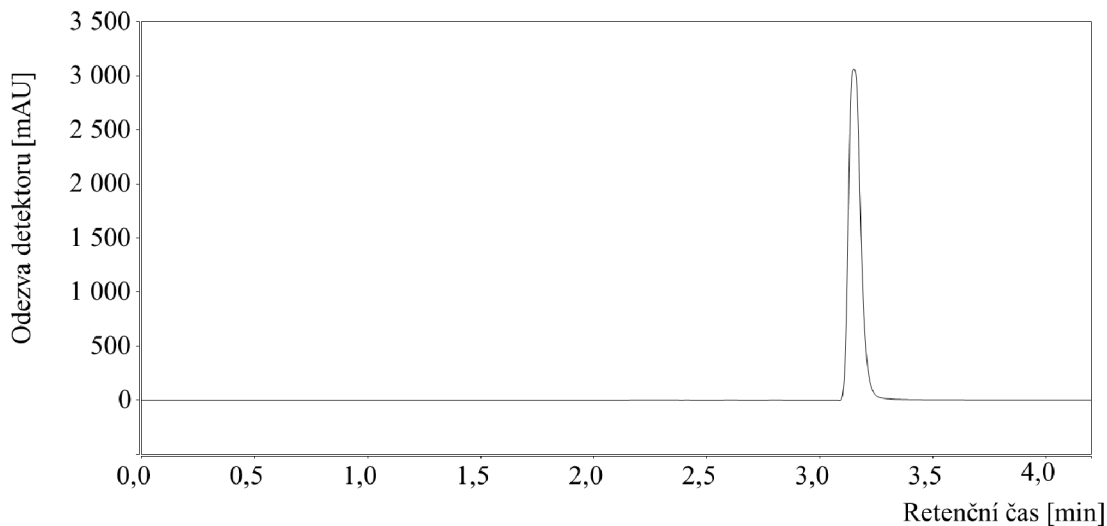


Obrázek 3: Chromatogram analýzy standardu kreatininu při použití MF 3 (pH 8,40, $C_{\text{kreatininu}} = 1,0$ g/l, nástrík 5 μ l)

Kolona Luna C18 (250×4,6 mm; 5 μ m)

Na této koloně byla použita *mobilní fáze 4* na základě literárních dat z publikace (Olejarz et al. 2020) – hydrogenfosforečnan disodný o koncentraci 0,015 mol/l (MFA) a ACN (5 %) nebo methanol (5 % nebo 15 %) (MFB). Teplota kolonového prostoru byla zvolena 25 °C, průtok MF 1 ml/min a UV detekce nastavena na 234 nm. Nejprve byl použit ACN jako MFB. Při nízkém pH MFA (2,10, resp. 3,07) byl nízký kapacitní poměr (0,13, resp. 0,17) a píky chvostovaly ($A_s = 1,5$, resp. $A_s = 1,5$). Při pH MFA 7,69 byl pík kreatininu v chromatogramu velice úzký a vysoký, docházelo k mírnému chvostování ($A_s = 1,3$). Hodnota kapacitního poměru pro toto složení mobilní fáze byla stále nízká (0,25). Při pH 8,43, 6,06, resp. 5,68 došlo k mírnému zlepšení kapacitního poměru (0,33, 0,29, resp. 0,29). Pro MFA pH 6,06 byl jako MFB použit kromě ACN rovněž methanol (5 % nebo 15 %). Použití methanolu vedlo ke zvýšení kapacitního poměru. Při použití ACN (5 %) byl kapacitní poměr analytu 0,29, pro methanol (5 %) došlo ke zvýšení na hodnotu 0,67. Zvýšením obsahu MFB methanolu (15 %) bylo dosaženo lepší hodnoty faktoru asymetrie píku ($A_s = 1,3$) než při obsahu methanolu 5 % ($A_s = 1,4$) (Obrázek 4). Zvýšením obsahu organické mobilní fáze na 15 % vedlo k nežádoucímu snížení retenčního času, kapacitní poměr analytu

byl 0,33. Za podmínek analýz na koloně Luna C18 symetrie píku kreatininu splňovala požadovaná kritéria. Nepodařilo se nalézt optimální složení MF pro dostatečnou retenci analytu. Záměna organického rozpouštědla ACN za methanol vedla ke zvýšení retence.



Obrázek 4: Chromatogram analýzy standardu kreatininu při použití MF 4 (pH 6,06, $c_{\text{kreatininu}} = 1,0 \text{ g/l}$, nástřik $5 \mu\text{l}$)

Kolona Luna SCX (150×3 mm; 5 μm)

Na této koloně byly vyzkoušeny celkem čtyři různé mobilní fáze (Kapitola 3.5).

Mobilní fáze 5 byla použita na základě publikace (Olejarz et al. 2020) – hydrogenfosforečnan disodný o koncentraci 0,015 M (MFA) a methanol nebo ACN (MFB), obsah MFB 0 až 45 %. Teplota kolonového prostoru byla zvolena 25°, resp. 30 °C. Hodnota pH MFA byla upravena na 6,06, resp. 3,80. Při hodnotě pH 6,06 a obsahu MFB (methanol) 0 %, resp. 5 % byl kapacitní poměr nízký (1,1, resp. 0,70), analyt se dostatečně dlouho nezadržoval na koloně. Faktor asymetrie byl 0,76, resp. 0,67. Při snížení pH MFA na hodnotu 3,80 se kapacitní poměr výrazně zvýšil na hodnotu 5,9. Faktor asymetrie píku kreatininu byl $A_s = 1,6$. Dále došlo k výraznému snížení intenzity signálu z 2020 mAU na 226 mAU. Z důvodu optimalizace retenčního času a symetrie píku analytu byl dále optimalizován obsah organické mobilní fáze. Zvýšením obsahu MFB (methanol) na 15 % došlo ke snížení kapacitního poměru (5,6) a zlepšení symetrie píku ($A_s = 1,1$). Další zvýšení obsahu methanolu (30 %) v mobilní fázi vedlo k dalšímu snížení retenčního času (kapacitní poměr 5,1) a zvýšení intenzity signálu na 420 mAU, faktor asymetrie byl ($A_s = 0,70$). Další zvyšování obsahu methanolu v mobilní fázi vedlo k výraznému frontování píku ($A_s = 0,58$). Zvýšením teploty kolonového prostoru na 30 °C při 30 % MFB docházelo k frontování píku

($A_s = 0,56$). Při použití ACN jako MFB byl pík kreatininu v chromatogramu nesymetrický ($A_s = 0,57$, resp. $A_s = 0,65$ pro 30 %, resp. 15 % MFB)

Mobilní fáze 6, na základě odborného textu (Namrata 2018), byla tvořena octanem amonným o koncentraci 0,0050 mol/l (MFA). Jako MFB byl zvolen methanol, obsah MFB 0 až 60 %. Změna složení MFA v porovnání se složením *mobilní fáze 5* byla vedena snahou změnit oblast pH pufrovací kapacity zvoleného pufru, pro octan amonný jde o oblast (5,76 až 3,76) (Namrata 2018). Teplota kolonového prostoru byla 25 °C, průtok MF 1 ml/min a UV detekce nastavena na 234 nm. V testovaném rozsahu pH (5,72 až 4,03) nebylo dosaženo takových podmínek, které by byly optimální pro analýzu roztoku kreatininu. Píky kreatininu v získaných chromatogramech byly nesymetrické a široké, nesplňovaly požadovaná kritéria symetrie. Zvýšení teploty kolonového prostoru na 30 °C nevedlo ke zlepšení výsledků separace. Při porovnání chromatogramů pro analýzy při různých hodnotách pH MFA se jako optimální jevílo pH 5,02. V dalším kroku byla připravena MFA s vyšší koncentrací soli (0,010 mol/l) a pH bylo opět upraveno přibližně na hodnotu 5 (5,05).

Mobilní fáze 7 byla tvořena octanem amonným o koncentraci 0,010 mol/l (MFA) a methanolem (MFB), obsah MFB 5 až 45 %. Teplota kolonového prostoru byla 25 °C, průtok MF 1 ml/min a UV detekce nastavena na 237 nm. Hodnota pH MFA byla upravena na 5,05. Se zvyšujícím se obsahem methanolu (5 až 45 %) docházelo ke snižování retenčního času, kapacitní poměr se měnil z hodnoty 6,7 na 2,2. Píky v chromatogramu byly široké, šířka píku v polovině výšky (0,34 až 0,38 min). Proto byla pro další testovací analýzu snížena koncentrace standardu kreatininu z 1,0 g/l na 0,010 g/l při velikosti nástřiku 5 μ l. Při obsahu MFB 45 %, nástřiku 5 μ l a koncentraci standardu kreatininu 0,010 g/l bylo dosaženo optimálního retenčního času, kapacitního poměr byl 2,3 a rovněž faktor asymetrie (0,80) splňoval požadované kritérium.

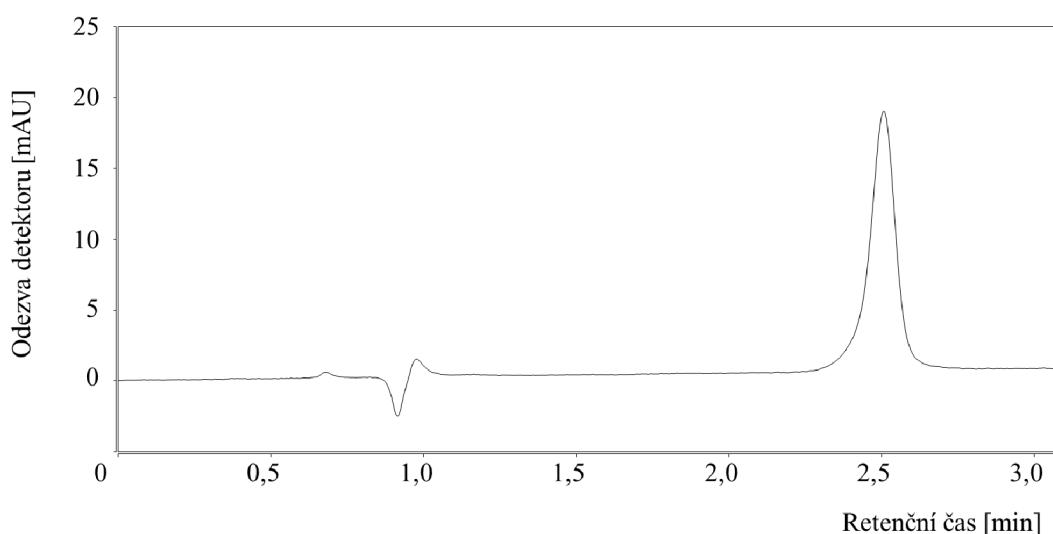
Za těchto podmínek byla provedena analýza reálného vzorku moči. Cílem bylo nalézt optimální ředění reálného vzorku a zjistit, zda za použitých analytických podmínek pík stanovovaného analytu kreatininu nekoeluje s jinými látkami obsaženými ve vzorku. Vzorek moči byl nejdříve analyzován bez ředění, následně při dvacetinásobném a padesátinásobném ředění, jako rozpouštědlo byla použita MF. Na základě těchto předběžných analýz bylo vybráno vhodné ředění (padesátinásobné) pro vlastní validaci metody.

Vzhledem k výsledkům analýz při použití různé koncentrace soli v MFA a pozorovaném vlivu na šířku a asymetrii píku byla v následujícím kroku připravena MFA opět s vyšší koncentrací octanu amonného v porovnání s předchozími analýzami.

Mobilní fáze 8 byla tvořena octanem amonným o koncentraci 0,015 mol/l (MFA) a methanolem (MFB) (45 %). Průtok MF byl 1 ml/min, teplota kolonového prostoru byla 25 °C, vlnová délka UV detekce 237 nm. Hodnota pH MFA byla upravena na 5,00 (Obrázek 5). Podmínky analýzy, až na koncentraci octanu amonného, byly shodné s podmínkami, které byly použity pro *mobilní fázi 7*. Pík analytu byl vyšší a užší než v případě analýzy při koncentraci octanu amonného v MFA 0,010 mol/l, vykazoval optimální hodnotu asymetrie ($A_s = 0,83$). Kapacitní poměr byl za těchto podmínek 1,5. Dále byla optimalizována velikost nástřiku. Analýzy byly provedeny vždy ve třech opakováních pro nastavený nástřik 1 μ l, 3 μ l, 5 μ l, 10 μ l, 20 μ l a 40 μ l při koncentraci kreatininu v nastříkovaném roztoku 0,010 g/l. Byla zjišťována hodnota faktoru asymetrie (Tabulka 4). Hodnota A_s u všech velikostí nástřiků byla v požadovaném rozsahu (0,80 až 1,5), kromě velikosti nástřiku 40 μ l.

Tabulka 4: Sledování vlivu velikosti nástřiku na hodnotu faktoru asymetrie

Nástřik [μ l]	1	3	5	10	20	40
A_s (1. opakování)	0,85	0,87	0,86	0,87	0,83	0,77
A_s (2. opakování)	0,85	0,84	0,83	0,84	0,82	0,77
A_s (3. opakování)	0,82	0,86	0,86	0,84	0,82	0,78
A_s (průměr)	0,84	0,86	0,85	0,85	0,82	0,77

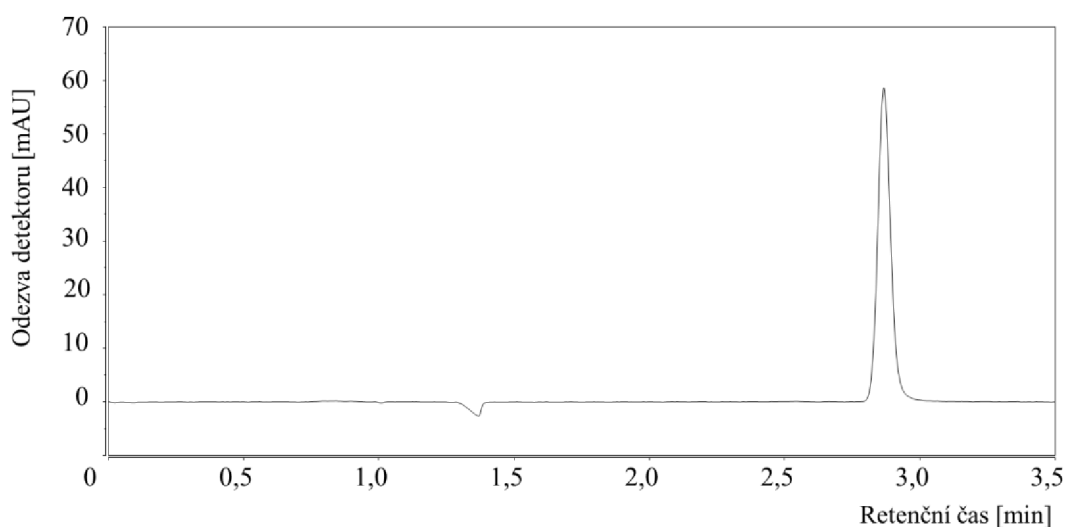


Obrázek 5: Chromatogram analýzy standardu kreatininu při použití MF 8 (pH 5,00, $c_{\text{kreatininu}} = 0,010$ g/l, nástřik 5 μ l)

Pro kolonu Luna SCX byly nalezeny optimální podmínky separace kreatininu ve vzorku moči. Za těchto analytických podmínek byla následně metoda validována (Kapitola 4.2).

Kolona KINETEX HILIC (150×3 mm; 2,6 μm)

Mobilní fáze 9, dle publikace (Kepka 2021), byla tvořena octanem amonným o koncentraci 0,010 mol/l (MFA) a ACN (MFB), obsah MFB 80 až 90 %. Teplota kolonového prostoru byla 25°, 30 °C, resp. 35 °C. Hodnota pH MFA byla upravena na 5,98. Při této hodnotě pH nebyla separace uspokojivá, pík byl nesymetrický ($A_s = 0,70$). Úprava pH pufru na 4,00 vedla k optimálnímu retenčnímu času (kapacitní poměr 2,7) a tvaru píku ($A_s = 1,2$) při průtoku MF 0,8 ml/min, 89 % MFB, vlnové délce UV detekce 237 nm, a teplotě kolonového prostoru 25 °C (Obrázek 6). Roztok standardu kreatininu o koncentraci 0,010 g/l, byl zředěn 90 % ACN. Byl sledován vliv velikosti nástřiku na tvar píku v rozsahu 1 až 80 μl. S rostoucí velikostí nástřiku rostl faktor asymetrie píku z hodnoty $A_s = 1,1$ při nástřiku 1 μl na hodnotu $A_s = 1,4$ při nástřiku 80 μl. Vyvinutá metoda na koloně HILIC odpovídala požadavkům na optimální retenční čas analytu i faktor asymetrie píku stanovené látky. Vzhledem k vysokému obsahu ACN (89 %) v použité mobilní fázi lze konstatovat, že separace pomocí HILIC nejsou ekologické ani ekonomické. Při analýzách za těchto podmínek je třeba analyzovaný vzorek ředit rovněž ACN. Z těchto důvodů nebyla tato metoda zvolena pro validaci.



Obrázek 6: Chromatogram analýzy standardu kreatininu při použití MF 9 (pH MFA 4,00, nástřik 5 μl, $c_{\text{kreatininu}} = 0,010$ g/l)

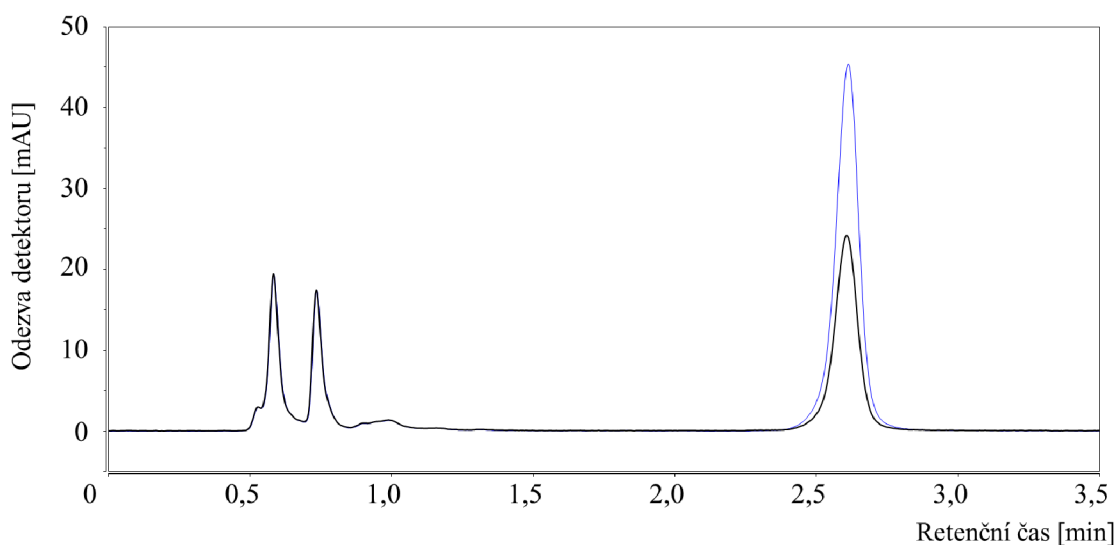
4.2 Validace metody

Pro validaci metody byla vybrána kolona Luna SCX. Podmínky analýzy jsou uvedeny v Tabulce 5.

Parametry použité pro validaci metody byly linearita, správnost, přesnost, rozsah, mez detekce a mez stanovitelnosti. Kritéria přijatelnosti byla zvolena na základě AOAC (Association of Analytical Communities) (Kahoun 2020). Správnost a přesnost byly hodnoceny na základě analýz obohacených a neobohacených reálných vzorků (Kapitola 3.8). Typický chromatogram je uveden na Obrázku 7.

Tabulka 5: Výsledné podmínky analýzy kreatininu

Kolona	Luna SCX (150×3 mm; 5 μm)
MFA, %	octan amonný 0,015 mol/l, 55 %
pH MFA	5,00
MFB, %	methanol, 45 %
Průtok MF	1 ml/min
Teplota kolonového prostoru	25 °C
UV detekce	237 nm
Nástřik standardu/vzorku	5 μl



Obrázek 7: Chromatogram analýzy obohaceného a neobohaceného vzorku moči při použití MF 8 (pH MFA 5,00, nástřik 5 μl)

Linearita

Prvním parametrem hodnocení je linearita, která je definována jako lineární korelace odezvy detektoru a koncentrací analytu (Nováková et al. 2013b). Linearita je vyjádřena vztahem $y = k \cdot c + q$, kde y je odezva detektoru, k je směrnice kalibrační křivky, c je koncentrace analytu a q je intercept (úsek na ose y) (Kahoun 2020). Pro hodnocení stupně korelace je využíván tzv. korelační koeficient (R), kde $R \geq 0,9900$. Linearita je hodnocena

pomocí tzv. QC koeficientu, kde $QC \leq 5 \%$. Byla prováděna tři nezávislá opakování na sedmi koncentračních úrovních v koncentračním rozsahu 1,0 až 500 mg/l. Pro korelační koeficient bylo dosaženo hodnoty 1,000 a pro QC koeficient hodnoty 1,48, byla splněna kritéria přijatelnosti (Tabulka 6).

Tabulka 6: Validacioní parametry

Parametr	Kritérium přijatelnosti	Získaná hodnota
Směrnice [mAU.min.l/mg]	-	0,2116
Intercept [mAU.min]	-	-0,02375
Korelační koeficient [1]	$\geq 0,9900$	1,000
QC koeficient [%]	$\leq 5,00$	1,48
Správnost [%]	80 – 110	101
Přesnost [%]	$\leq 7,3$	0,56 (neobohacený vzorek)
		1,5 (obohacený vzorek)

Správnost

Správnost analytické metody může být označena i jako výtěžnost. Tento parametr je definován jako těsnost shody mezi experimentálně zjištěnou hodnotou koncentrace analytu a skutečnou hodnotou koncentrace analytu. Pro zjištění správnosti metody byly připraveny a analyzovány neobohacené a obohacené vzorky v 8 opakováních (Kapitola 3.8). Získaná hodnota pro správnost 101 % splňovala kritérium přijatelnosti pro použitou koncentrační úroveň (10^{-5}) (Tabulka 6) (Kahoun 2020).

Přesnost

Přesnost analytické metody může být označena jako opakovatelnost. Tento parametr je definován jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky analýz referenčního vzorku. Pro zjištění přesnosti metody byly připraveny a analyzovány neobohacené a obohacené vzorky v 8 opakováních (Kapitola 3.8). Pro neobohacené vzorky dosahovala přesnost hodnoty 0,56 %, pro obohacené vzorky hodnoty 1,5 % a tedy bylo splněno kritérium přijatelnosti pro danou koncentrační úroveň (10^{-5}) (Tabulka 6) (Kahoun 2020).

Rozsah

Na základě hodnocení linearit, správnosti a přesnosti je metoda vhodná k analýzám v koncentračním rozsahu 1,0 až 500 mg/l.

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Posledními parametry hodnocení byly mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ). Mez detekce je definována jako nejnižší koncentrace analytu, která je detekována analytickou metodou, ale nelze ji kvantitativně vyhodnotit. Mez stanovitelnosti je definována jako nejnižší koncentrace analytu, která je detekována analytickou metodou, kterou lze kvantitativně vyhodnotit (Kahoun 2020; Nováková et al. 2013b). Na základě analýz roztoků standardů s klesající koncentrací kreatininu v rozsahu $5,0 \cdot 10^{-4}$ až $2,0 \cdot 10^{-5}$ g/l byl vyhodnocován poměr signálu a šumu (S/N; amplituda zahrnující změny signálu detektoru), a vypočtena mez stanovitelnosti a mez detekce. Jako kritérium pro mez detekce a stanovitelnosti byla na základě literatury zvolena hodnota $S/N = 3$ a pro mez stanovitelnosti $S/N = 10$ (Nováková et al. 2013a). Získané hodnoty poměru S/N pro jednotlivé koncentrace kreatininu v roztoku jsou uvedeny v Tabulce 7. Byly vybrány koncentrace $2,0 \cdot 10^{-5}$ g/l, pro výpočet meze detekce, a $5,0 \cdot 10^{-5}$ g/l, pro výpočet meze stanovitelnosti. Mez detekce byla stanovena na koncentraci $1,3 \cdot 10^{-5}$ g/l a mez stanovitelnosti na koncentraci $6,0 \cdot 10^{-5}$ g/l.

Tabulka 7: Experimentální hodnoty S/N při různých koncentracích standardu

Koncentrace standardu kreatininu [g/l]	S/N
$5,0 \cdot 10^{-4}$	104
$1,0 \cdot 10^{-4}$	23
$5,0 \cdot 10^{-5}$	8,3
$2,0 \cdot 10^{-5}$	4,6

5. Závěr

Stanovení koncentrace kreatininu v tělních tekutinách je využíváno k diagnostice nemocí, rovněž se využívá pro normalizaci výsledků bioanalytických stanovení. Teoretická část předložené bakalářské práce obsahuje informace o vlastnostech, výskytu a vzniku kreatininu. Byly popsány principy metody HPLC/DAD, která byla ke stanovení kreatininu ve vzorku moči využita v této bakalářské práci. Podrobněji zde byly uvedeny obecné informace o kolonách a vlastnostech stacionárních fází. Na základě rešerše publikovaných analytických metod pro stanovení kreatininu, který je stanovován obvykle současně s dalšími analyty, byly vybrány vhodné stacionární a mobilní fáze pro experimentální část. V experimentální části je popsán průběh optimalizace analytické metody pro stanovení kreatininu v biologickém vzorku. Pro testování byly vybrány čtyři stacionární fáze, na kterých bylo optimalizováno složení mobilní fáze. Dle informací z odborných článků se předpokládalo, že optimální mobilní fází bude fosfátový pufr s acetonitrilem. Během optimalizace se ukázalo jako vhodnější použití acetátového pufru a methanolu. Optimálních podmínek pro separaci kreatininu bylo dosaženo na koloně Luna SCX, za použití mobilní fáze octanu amonného o koncentraci 0,015 mol/l, pH 5 a methanolu v poměru 55 : 45. Průtok mobilní fáze po celou dobu separace byl 1 ml/min, teplota kolonového prostoru 25 °C a UV detekce nastavena na 237 nm. Nástřik analyzovaného vzorku byl 5 µl. Metoda byla následně použita pro analýzu reálného vzorku moči, který byl zředěn v poměru 1 : 125. Byla provedena validace optimalizované metody. Metoda je lineární v koncentračním rozsahu 1,0 až 500 mg/l. Dalšími hodnocenými parametry validace byla správnost, přesnost, mez detekce a mez stanovitelnosti. Validace analytické metody prokázala vhodnost jejího užití při analýze reálných vzorků.

6. Bibliografie

ASKENAZI, David J., John F. MOORE, Naomi FINEBERG, Rajesh KORALKAR, Stephanie CLEVINGER a Jon Daniel SHARER, 2014. Comparison of Methods, Storage Conditions, and Time to Analysis of Serum and Urine Creatinine Measured from Microsamples by Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC/MS) vs. Jaffe. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **28**(5), 405.

Dostupné z: doi:10.1002/JCLA.21701

BEHR, Heiko, 2020. Moderní trendy ve vývoji metod HPLC/UHPLC. *Phenomenex*.

BURKE, Darren G., Paul G. MACLEAN, Richard A. WALKER, Patricia J. DEWAR a Truis SMITH-PALMER, 1999. Analysis of creatine and creatinine in urine by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **732**(2), 479–485. ISSN 13872273.

Dostupné z: doi:10.1016/S0378-4347(99)00318-7

ČERMÁKOVÁ, Marta a Irena ŠTĚPÁNOVÁ, 2003. *Klinická biochemie 1.díl*. první. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně - Vinařská 6, 656 02 Brno. ISBN 80-7013-372-4.

DASTYCH, Milan, Petr BREINEK, Miroslava BEŇOVSKÁ, Zdenka ČERMÁKOVÁ, Vladimír SOŠKA, Jana TŮMOVÁ, Jaroslava VÁVROVÁ, Miroslav VERNER a Hana VINOHRADSKÁ, 2008. *Klinická biochemie bakalářský obor Zdravotní laborant*. první. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4572-9.

FOUNTAIN, Kenneth J., Alla KLOSS, Ilya GARIBYAN, Bella BLITSHTEYN, Alexander BREZZANI, Sirkka KYOSTIO-MOORE, Anna ZUK, Robert SACCHIERO a Aharon S. COHEN, 2007. Analysis of creatinine in mouse and rat serum by ion exchange high performance liquid chromatography for in vivo studies of renal function. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **846**(1–2), 245–251. ISSN 15700232.

Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2006.09.003

GEORGE, S. K., M. T. DIPU, U. R. MEHRA, P. SINGH, A. K. VERMA a J. S. RAMGAOKAR, 2006. Improved HPLC method for the simultaneous determination of allantoin, uric acid and creatinine in cattle urine. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **832**(1), 134–137. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2005.10.051

HOU, Hongwei, Wei XIONG, Xiaotao ZHANG, Dongkui SONG, Gangling TANG a Qingyuan HU, 2012. LC-MS-MS measurements of urinary creatinine and the application of creatinine normalization technique on cotinine in smokers' 24 hour urine. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* **1**(1). ISSN 20908865. Dostupné z: doi:10.1155/2012/245415

JEN, Jen Fon, Shih Liang HSIAO a Kang Hsiung LIU, 2002. Simultaneous determination of uric acid and creatinine in urine by an eco-friendly solvent-free high performance liquid chromatographic method. *Talanta* **58**(4), 711–717. ISSN 00399140.

Dostupné z: doi:10.1016/S0039-9140(02)00377-6

KAHOUN, David, 2020. *Úloha č.5: Stanovení fenolu a α - naftolu ve vodě metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na obrácených fázích se spektrofotometrickou detekcí v ultrafialové oblasti (RP-HPLC-UV).*

KASHANI, Kianoush, Mitchell H. ROSNER a Marlies OSTERMANN, 2020. Creatinine: From physiology to clinical application. *European Journal of Internal Medicine* **72**, 9–14. ISSN 0953-6205.

Dostupné z: doi:10.1016/J.EJIM.2019.10.025

KEPKA, Zdeněk, 2021. *Univerzita Karlova Farmaceutická Fakulta v Hradci Králové Katedra Analytické Chemie Problematika stanovení neopterinu a kreatininu v moči s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie se zaměřením na klinickou praxi Diplomová práce.* B.m.: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.

KUBÍČKOVÁ, Rndr Mária a Jitka BÖHM, 2010. Masarykova univerzita v Brně Lékařská fakulta Vliv hladin sérového kreatininu stanovovaného metodou Jaffé a enzymatickou metodou na výpočet GF pomocí korigované kreatininové clearance a rovnice MDRD u nefrologických pacientů dospělého věku Bakalářská práce.

KUČEROVÁ, Kateřina, Lenka Kujovská KRČMOVÁ, Zuzana MIKANOVÁ, Ludmila MATYSOVÁ, Bohuslav MELICHAR a Frantisek ŠVEC, 2019. Determination of urinary retinol and creatinine as an early sensitive marker of renal dysfunction. *Journal of Chromatography A* **1607**. ISSN 18733778.

Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2019.460390

LI, Yongtian, Shaoshen WANG a Ning ZHONG, 1992. Simultaneous determination of pseudouridine and creatinine in urine of normal children and patients with leukaemia by high performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography* **6**(4), 191–193. ISSN 10990801.

Dostupné z: doi:10.1002/bmc.1130060407

LUGINBÜHL, Marc a Wolfgang WEINMANN, 2017. Creatinine in urine – a method comparison. *Drug Testing and Analysis* **9**(10), 1537–1541. ISSN 19427611. Dostupné z: doi:10.1002/dta.2166

MASOPUST, Jaroslav, 1998. *KLINICKÁ BIOCHEMIE požadování a hodnocení biochemických vyšetření.* první. Praha: Karolinum. ISBN 80-7184-648-1.

MATOUŠOVIC, Karel, 2005. Nejčastější formy glomerulonefritidy, jejich diagnóza, prognóza a léčba. *Interní medicína pro praxi.* **3**(7), 294–298. ISSN 1212-7299.

NAMRATA, Saxena, 2018. *Buffers in Mobile Phase - Their Significance of Choosing the Correct Ones* [online] [vid. 2021-06-05]. Dostupné z: <https://phenomenex.blog/2020/04/08/buffers-mobile-phase/>

NOVÁKOVÁ, Lucie, Michal DOUŠA, Pavel BLATNÝ, Pavel JANDERA, Vítězslav MAIER a Joanna ZNALEZIONA, 2013a. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.* první. Praha: Lucie Nováková a Michal Douša. ISBN 978-80-260-4243-3.

NOVÁKOVÁ, Lucie, Michal DOUŠA, Pavel BLATNÝ, Pavel JANDERA, Vítězslav MAIER a Joanna ZNALEZIONA, 2013b. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.* Praha: Nováková Lucie a Douša Michal. ISBN 978-80-260-4244-0.

OLEJARZ, Patrycja, Grażyna CHWATKO, Paweł KUBALCZYK, Krystian PURGAT, Rafał GŁOWACKI a Kamila BOROWCZYK, 2020. Application of high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of tenofovir and creatinine in human urine and plasma samples. *Pharmaceuticals* **13**(11), 1–12. ISSN 14248247. Dostupné z: doi:10.3390/ph13110367

PRAGOLAB, 2020. *LC kolona Accucore aQ | Pragolab* [online] [vid. 2021-10-25]. Dostupné z: <https://www.pragolab.cz/chromatografie-a-ms/spotrebni-material/lc-kolony/accucore-aq->

PUBCHEM, 2021. *Kreatinin | C4H7N3O - PubChem* [online] [vid. 2021-09-06]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Creatinine>

REMANE, Daniela, Soeren GRUNWALD, Henrike HOEKE, Andrea MUELLER, Stefan ROEDER, Martin VON BERGEN a Dirk K. WISENBACH, 2015. Validation of a multi-analyte HPLC-DAD method for determination of uric acid, creatinine, homovanillic acid, niacinamide, hippuric acid, indole-3-acetic acid and 2-methylhippuric acid in human urine. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **998–999**, 40–44. ISSN 1873376X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2015.06.021

ŠAJDÍKOVÁ, Martina a Lucie NOVÁKOVÁ, 2014. *1. Funkční morfologie ledvin • Funkce buněk a lidského těla* [online] [vid. 2021-09-14]. Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/vii-vylucovaci-soustava-a-acidobazicka-rovnovaha/1-funkcni-morfologie-ledvin/>

SIGMA ALDRICH, 2019. *Sigma-Aldrich-C4255.*

TSIKAS, Dimitrios, Alexander WOLF, Anja MITSCHKE, Frank Mathias GUTZKI, Wolfgang WILL a Michael BADER, 2010. GC-MS determination of creatinine in human biological fluids as pentafluorobenzyl derivative in clinical studies and biomonitoring: Inter-laboratory comparison in urine with Jaffé, HPLC and enzymatic assays. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **878**(27), 2582–2592. ISSN 15700232.

Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2010.04.025

ÚSTAV KLINICKÉ BIOCHEMIE A DIAGNOSTIKY LF UK A FN HRADEC KRÁLOVÉ, 2009. *detail - Ústav klinické biochemie a diagnostiky* [online] [vid. 2021-09-07].

Dostupné z: <http://ukbd.fnhk.cz/metoda-kreatinin.html>

WIJEMANNE, Nimanthi, Preethi SOYSA, Sulochana WIJESUNDARA a Hemamali PERERA, 2018. Development and Validation of a Simple High Performance Liquid Chromatography/UV Method for Simultaneous Determination of Urinary Uric Acid, Hypoxanthine, and Creatinine in Human Urine. *International Journal of Analytical Chemistry* **2018**. ISSN 16878779.

Dostupné z: doi:10.1155/2018/1647923

XIANG, Lei Wen, Jing LI, Jin Ming LIN a Hai Fang LI, 2014. Determination of gouty arthritis' biomarkers in human urine using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **4**(2), 153–158. ISSN 20951779.

Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2013.11.003

YUEN, Peter S.T., Stephen R. DUNN, Takehiko MIYAJI, Hideo YASUDA, Kumar SHARMA a Robert A. STAR, 2004. A simplified method for HPLC determination of creatinine in mouse serum. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **286**(6 55-6). ISSN 03636127.

Dostupné z: doi:10.1152/ajprenal.00366.2003

ZÁRUBA, Kamil, 2016a. *Analytická chemie 1.díl*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7080-950-1.

ZÁRUBA, Kamil, 2016b. *Analytická chemie 2.díl*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7080-951-8.

ZHOU, Si, Ruixiao ZUO, Zhuo ZHU, Di WU, Kruti VASA, Yiwei DENG a Yuegang ZUO, 2013. An eco-friendly hydrophilic interaction HPLC method for the determination of renal function biomarkers, creatinine and uric acid, in human fluids. *Analytical Methods* **5**(5), 1307–1311. ISSN 17599660.

Dostupné z: doi:10.1039/c2ay26362a

ZUO, Yuegang, Chengjun WANG, Jiping ZHOU, Amita SACHDEVA a Vanessa C. RUELOS, 2008.
Simultaneous Determination of Creatinine and Uric Acid in Human Urine by High-Performance
Liquid Chromatography. *Analytical Sciences* **24**(12), 1589–1592. ISSN 13482246.
Dostupné z: [doi:10.2116/analsci.24.1589](https://doi.org/10.2116/analsci.24.1589)

7. Seznam zkratek a symbolů

ACN	acetonitril
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
A_s	faktor asymetrie
C18	oktadecylsilikagel
c	koncentrace
$C_{\text{kreatinin}}$	koncentrace kreatininu
DAD	detektor s diodovým polem
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HIC	hydrofobní interakční chromatografie
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC/DAD	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s diodovým polem
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K_D	distribuční konstanta
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MF	mobilní fáze
MFA	mobilní fáze A
MFB	mobilní fáze B
MS	hmotnostní spektrometrie
NADH	nikotinamidadeninukleotid
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
ODS	oktadecylsilikagel
PDA	detektor s fotodiodovým polem

PFP	pentafluorfenyl
QC koeficient	koeficient kvality lineární regrese
R	korelační koeficient
RSD	relativní směrodatná odchylka
SB-CN	stable bond cyano column
SD	výběrová směrodatná odchylka
S/N	poměr signálu a šumu
V	objem látky

8. Přílohy

Primární data pro hodnocení linearity

Koncentrační úroveň	Opakování 1		Opakování 2		Opakování 3	
	c [mg/l]	Odezva [mAU.min]	c [mg/l]	Odezva [mAU.min]	c [mg/l]	Odezva [mAU.min]
1	1,0	0,2171	1,0	0,2174	1,0	0,2069
2	5,0	1,028	5,0	1,065	5,0	1,052
3	10	2,036	10	2,079	10	2,107
4	25	5,370	25	5,399	25	5,503
5	50	10,65	50	10,61	50	10,64
6	250	52,50	250	52,20	250	52,47
7	500	106,9	500	106,1	500	105,0

Primární data pro hodnocení správnosti a přesnosti

Koncentrace [mg/l]	Průměr koncentrací neobohacených vzorků [mg/l]	SD [mg/l]	RSD [%]
11,91	11,86	0,0660	0,56
11,87			
11,88			
11,80			
11,74			
11,81			
11,90			
11,93			

Koncentrace [mg/l]	Průměr koncentrací obohacených vzorků [mg/l]	SD [mg/l]	RSD [%]
21,78	21,91	0,317	1,5
21,44			
21,98			
22,41			
22,09			
21,71			
21,66			
22,18			