

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**Identifikace a rozbor zdrojů nejistoty stanovení iontů
v klinickobiochemické laboratoři na automatickém analyzátoru**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Ctirad Musil

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

Ing. David Milde, Ph.D.

Olomouc 2010

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Děkuji panu Ing. Davidu Mildemu, Ph.D. za cenné rady a připomínky v rámci vedení této diplomové práce.

Děkuji paní RNDr. Janě Skopalové, Ph.D. za konzultace při řešení problematiky elektrochemie.

Dále bych chtěl poděkovat vedoucímu oddělení klinické biochemie a hematologie zdravotnického zařízení SPEA Olomouc s.r.o. panu RNDr. Miloši Davidovi za technickou a informační podporu a vedení zdravotnického zařízení SPEA Olomouc s.r.o. za umožnění vypracování diplomové práce na tomto pracovišti.

SOUHRN

Nejistota stanovení iontů na automatických biochemických analyzátoch je větší, než cílová nejistota měření, vypočtená z biologických variabilit. Zdroje a složky nejistoty automatizovaného stanovení iontů nejsou běžně diskutovány. V této práci byla provedena testovací stanovení iontů na automatickém analyzátoch. Bylo použito uměle připravených roztoků i reálných sér od pacientů. Naměřená data byla použita k výpočtu a rozboru nejistoty stanovení. Statistické zhodnocení výsledků specificky nastavených pokusů pomohlo identifikovat a kvantifikovat jednotlivé vlivy na nejistotu měření. Pomocí Paretovy analýzy byla určena významnost složek nejistoty. Byla vypracována doporučení pro rutinní provoz ke snížení nejistoty stanovení iontů.

SUMMARY

The uncertainty of ions determination on automatic biochemical analyzers is larger than target measurement uncertainty, calculated from biological variabilities. Sources and components of automated ions determination uncertainty are not discussed frequently. The experimental ions determinations by automatic analyzer were carried out in this study. The synthetic solutions and real human serum samples were used. The measured data were used to calculate and analyse uncertainty of determination. The statistical interpretation of results of specifically configured tests helped to identify and quantify individual factors of measurement uncertainty. The significances of measurement uncertainty components were determined by Pareto analysis and recommendations for routine usage were made to restrict uncertainty of ions determination.

OBSAH

| | | |
|-----------|--|----------|
| 1. | ÚVOD | 1 |
| 2. | TEORETICKÁ ČÁST | 3 |
| 2.1 | Postavení iontů v medicíně | 3 |
| 2.1.1 | Vnitřní prostředí | 3 |
| 2.1.2 | Biologický význam iontů | 4 |
| 2.1.3 | Vyšetření iontů v medicíně | 4 |
| 2.1.4 | Fyziologické koncentrace iontů | 4 |
| 2.1.5 | Regulace vnitřního prostředí a bilance iontů | 5 |
| 2.1.6 | Biologická variabilita | 8 |
| 2.2 | Specifika stanovení mineralogramu v medicíně | 9 |
| 2.2.1 | Preanalytická fáze | 11 |
| 2.2.2 | Metody stanovení mineralogramu v medicíně | 13 |
| 2.3 | Kvalita stanovení iontů v klinické praxi | 18 |
| 2.3.1 | Metrologická terminologie | 19 |
| 2.3.2 | Základní znaky analytické metody | 20 |
| 2.3.3 | Metrologie v laboratorní medicíně | 22 |
| 2.3.4 | Činitelé ovlivňující nejistotu výsledku při měření iontů | 29 |
| 2.4 | Projevy nejistoty stanovení iontů v praxi | 32 |
| 2.4.1 | Porušení návaznosti | 32 |
| 2.4.2 | Vysoká nejistota | 32 |
| 2.4.3 | Systematické chyby | 33 |
| 2.4.4 | Praktický dopad na pacienta | 33 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3. | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 35 |
| 3.1 | Chemikálie, přístroje a pomůcky | 35 |
| 3.1.1 | Použité chemikálie | 35 |
| 3.1.2 | Další pomůcky | 36 |
| 3.1.3 | Přístroje | 37 |
| 3.2 | Pracovní postup | 37 |
| 3.2.1 | Příprava roztoků a vzorků | 38 |
| 3.2.2 | Nejistota vážení a volumetrických operací | 39 |
| 3.2.3 | Čištění chemického nádobí | 40 |
| 3.3 | Statistické zpracování naměřených dat | 41 |
| 3.3.1 | Použité statistické metody | 41 |
| 4. | VÝSLEDKY A DISKUSE | 43 |
| 4.1 | Celková nejistota měření | 43 |
| 4.1.1 | Nejistota v podmínkách reprodukovatelnosti | 43 |
| 4.1.2 | Nejistota v podmínkách opakovatelnosti | 46 |
| 4.2 | Podchytitelné složky nejistoty | 48 |
| 4.2.1 | Kalibrace | 48 |
| 4.2.2 | Odpar vzorku | 50 |
| 4.2.3 | Rušení elektromagnetickým zářením | 52 |
| 4.2.4 | Teplota | 55 |
| 4.2.5 | Kondice ISE v senzoru | 57 |
| 4.2.6 | Stáří ISE | 59 |
| 4.2.7 | Interference | 60 |
| 4.2.8 | Iontová síla | 64 |
| 4.2.9 | Acidobazické poměry | 77 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.2.10 | Paměťový efekt | 81 |
| 4.2.11 | Nelinearita závislosti odezvy na koncentraci | 83 |
| 4.2.12 | Chyba pipetování, výkyv napětí v síti a další celkové vlivy | 86 |
| 4.3 | Kombinovaná nejistota stanovení | 87 |
| 4.4 | Paretova analýza | 89 |
| 4.5 | Rozbor výsledků Paretovy analýzy a celkové kombinované nejistoty | 91 |
| 4.5.1 | Chloridová iontově selektivní elektroda | 92 |
| 4.5.2 | Sodíková iontově selektivní elektroda | 93 |
| 4.5.3 | Draslíková iontově selektivní elektroda | 93 |
| 4.5.4 | Celková zhodnocení a doporučení | 94 |
| 5. | ZÁVĚR | 95 |
| 6. | LITERATURA | 96 |
| 7. | PŘÍLOHY | 98 |

1 ÚVOD

Stanovení koncentrace iontů v krevním séru patří mezi nejčastější požadavky lékařů na klinicko-biochemickou laboratoř. Majoritně zastoupené anorganické ionty krevního séra, kterými jsou sodné, draselné, vápenaté a hořečnaté kationty a chloridové, fosfátové a hydrogenuhličitanové anionty hrají velkou roli v udržování podmínek vnitřního prostředí živého organismu. Tyto ionty jsou základními složkami všech tekutin v organismu a vychýlení jejich koncentrace z fyziologických rozmezí znamená ohrožení života. Multifaktoriální vztahy mezi koncentracemi jednotlivých iontů a metabolickými vztahy celého organismu nedovolují zpravidla jednoduché diagnostické rozhodnutí lékaře a vyžadují řadu doplňujících vyšetření. Na druhou stranu je vyšetření iontů velmi levnou a rychlou metodou k nahlédnutí na celkový stav organismu. Při léčbě chorob spojených s iontovou dysbalancí jsou zároveň dobrým markerem úspěšnosti léčebného zásahu. Z chorobných stavů patří k nejvýznamnějším příčinám vychýlení koncentrace iontů z fyziologického rozmezí různá onemocnění ledvin (akutní i chronické selhání ledvin), poruchy aciodazické rovnováhy (těžké infekce, dušení, katabolismus), poruchy výživy a funkce trávicího traktu (průjmy, zvracení, otravy) a mnoho dalších. Důležité je i sledování koncentrace iontů krevního séra v případech jejich léčebného podávání.

Mineralogramem či iontogramem se v medicíně v užším slova smyslu nazývá stanovení tří iontů: draselného, sodného a chloridového. Na rozdíl od dalších iontů, které se zpravidla stanovují spektrofotometricky, se tato triáda většinou stanovuje potenciometricky. Jiné metody jsou okrajové, nebo na ústupu. Současná dominace potenciometrie je dána zejména snadností technického provedení a nízkou cenou. Nevýhodou je pak poměrně vysoká nejistota potenciometrického stanovení iontů, která je na hranici uspokojivosti pro medicínské použití.

Provoz klinicko-biochemické laboratoře musí neustále řešit problematiku zvyšujícího se počtu požadovaných vyšetření. Mnoho analytických postupů muselo opustit zdravotnictví nikoliv kvůli zastaralosti, nebo nejistotě stanovení, ale kvůli pomalosti provedení. Je snaha obsáhnout stanovování co nejvíce analytů pokud možno činností jednoho univerzálního analyzátoru. Takový přístroj je zpravidla uzavřený systém, do kterého obsluha zasahuje s postupem vědy a techniky stále méně. Mnoho charakteristik spojených s kvalitou měření je

tedy pouze v kompetenci výrobce a nikoliv uživatele (obsluhy) analyzátoru. Jedná se například o preciznost pipetování, výkyvy napětí v elektrické síti, nejistota koncentrace reagensů a podobně. Stále však zůstává ve hře řada rušivých vlivů, které obsluha analyzátoru ovlivňuje a může je omezit. To jsou například záležitosti okolo manipulace se vzorkem, odpar vody ze vzorku, doba měření, teplota okolí, rušivé elektromagnetické pole atd. Řada rušivých vlivů spojených zejména s individualitou každého vzorku a jeho matričním vlivem je obecně těžko řešitelných a je předmětem neustálého výzkumu.

Identifikace a rozbor zdrojů nejistoty stanovení iontů na automatickém analyzátoru v klinické praxi je základním předpokladem k vytvoření optimalizace tohoto provozu a snížení nejistoty měření. Na rozdíl od bazálního výzkumu, kde se můžeme zabývat fyzikálně-chemickými vlastnostmi měřicí soustavy, či dokonce jen jejich částí, je automatický analyzátor nerozebratelný. Je nutno jej studovat statisticky jako celek se zaměřením nikoliv na součástky přístroje, ale na jednotlivé rušivé vnější vlivy. Vzhledem k tomu, že se jedná o hodnocení funkce výrobku, tak nastává první problém již se získáním literárních dat. Většina informací z oblasti kvality měření automatických analyzátorů je buď zobecněna a konstatována bez hlubšího studia, nebo je výrobním tajemstvím poskytovatele. Nedostupnost informací o původu nejistoty stanovení analytů na automatických analyzátorech bývá často zbytečnou příčinou poklesu kvality analýz.

Statistické názvosloví použité v práci bylo ujednoceno podle normy¹ TNI 01 0115:2009.

Cílem této práce bylo vytvořit přehledný a statisticky podložený seznam rušivých vlivů, zhoršujících přesnost měření iontů v klinicko-biochemické laboratoři. Dále byla vypracována doporučení směřující k zmírnění těchto vlivů a tím zpřesnění stanovení. Na počátku vlastní práce bylo vytyčeno několik hlavních úkolů:

- 1) Vypracování literární rešerše týkající se zadaného tématu
- 2) Provedení experimentů potřebných k identifikaci a rozboru jednotlivých složek nejistoty
- 3) Statistické vyhodnocení naměřených dat a kvantifikace složek nejistoty
- 4) Vypracování praktických doporučení pro obsluhující personál

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Postavení iontů v medicíně

2.1.1 Vnitřní prostředí²

Živé organismy se skládají z látek, které můžeme velmi široce rozdělit na stavební, zásobní a funkční. Pomiňme nyní z didaktického důvodu látky stavební a zásobní, které jsou vlastní fyzickou strukturou organismu. Funkční látky účastníci se metabolických dějů jsou různorodé, počítané v milionových řádech, vyskytují se ve velice širokém rozmezí koncentrací a vzájemným ovlivňováním v rámci metabolických drah vytváří nesmírně složitý mechanismus metabolismu. K tomu aby tento systém mohl dobře fungovat potřebuje nastavení vnitřního prostředí, které lze s určitými výhradami nazvat chemickou terminologií jako reakční podmínky. Systém udržování konstantního vnitřního prostředí navzdory kolísání podmínek vnějších nazýváme jedním slovem HOMEOSTASA.

Podstatou vnitřního prostředí organismu je voda. Ta však sama o sobě nestačí k udržení stavu života. Jsou v ní rozpuštěny, nebo dispergovány látky účastníci se metabolických procesů. Metabolismus je systém velmi dynamický a proto musí existovat mechanismy, které jej řídí a udržují ve stabilním chodu. K tomu, aby bylo možno provádět přísun substrátů, veškeré jejich proměny a nakonec i vylučování katabolitů (produktů), musí být udržováno konstantní složení vlastního roztoku, ve kterém se všechno odehrává. Největší vliv na vlastnosti tohoto základního roztoku má pH a iontové složení. Protože je pH specifickým (logaritmickým) vyjádřením koncentrace jednoho z iontů, tedy vodíkového iontu, tak můžeme problematiku shrnout do jedné věty:

Zásadní význam pro správné fungování organismu má iontové složení jeho vnitřního prostředí².

2.1.2 Biologický význam iontů

Ionty se v organismu účastní nastavení reakčních podmínek ve smyslu iontové síly, pH, solvatačních charakteristik, interakce s organickými sloučeninami například komplexním mechanismem atd. Mimo to se účastní membránových procesů. Jejich různá koncentrace uvnitř a vně buňky, vytváří na cytoplasmatické membráně elektrický potenciál³. Tento potenciál je podstatou dráždivosti biologických struktur a je tak zodpovědný za nejzákladnější podstatu živého chování systému. Dále se ionty účastní reakcí katalyzovaných enzymy v podobě kofaktorů, mají signální význam a mnoho dalších funkcí, které jsou však již poměrně specifické a úzce vázané na konkrétní metabolické a reakční situace.

2.1.3 Vyšetření iontů v medicíně^{2,4-6}

V celé této práci bude dále pojednáváno již jen o třech iontech: draselném, sodném a chloridovém. Jedná se o hlavní ionty séra. Jejich stanovení patří mezi nejčastěji požadovaná vyšetření a většinou se stanovují shodným způsobem, tedy potenciometricky v průtoku senzorem a to najednou. Tyto důvody z nich dělají jakousi nerozlučnou trojici. Jejich potenciometrické stanovení je předmětem této práce.

Další významné anorganické ionty jako vápenatý, hořečnatý, hydrogen a dihydrogenfosforečnanový, hydrogenuhličitanový a síranový mají svá specifika, odlišné funkce i jiné způsoby stanovení než zmíněná hlavní triáda. Jejich stanovení je lékaři požadováno méně a patří již k cílenějším vyšetřením, než jen k obecnému zhodnocení celkového stavu pacienta. Tato práce se těmito dalšími ionty již hlouběji nezabývá.

2.1.4 Fyziologické koncentrace iontů

Dvě nejvýznamnější funkce iontů v organismu, tedy nastavení reakčního prostředí roztoku a dráždivost biologických membrán jsou pro život zásadně důležité a vyžadují silné regulační mechanismy udržující koncentrace iontů ve vhodných rozmezech. Rozmezí, která

jsou pro život nejvhodnější, nazýváme fyziologickým rozmezím. Lékařsky ne zcela správné je používání výrazu normální hodnoty. Fyziologické hodnoty jsou odlišné pro různé tělesné tekutiny. V literatuře a klinické praxi se rutinně setkáváme s údaji pro krevní sérum (Tab. I), vnitrobuněčný obsah (Tab. II), eventuelně mozkomíšní mok. Velmi široká rozmezí koncentrací iontů jsou v moči. Ta totiž netvoří vnitřní prostředí a je odpadním produktem. Zde tedy nemá organismus důvod úzkostlivě nastavovat přesné složení. Stanovení iontů v moči je však důležité z důvodu hodnocení bilančního hospodaření organismu s ionty. Stanovit ionty můžeme i v mnoha jiných tekutinách jako jsou pot, slzy, žaludečních šťávy, výpotek, eventuelně další. Význam těchto stanovení je však v běžné klinické praxi omezený. Lékařsky požadováno je rutinně jen vyšetření iontů v krevním séru a moči. Jiná stanovení ačkoliv jsou proveditelná, požadovány nebývají.

Tab. I: koncentrace iontů v krevním séru člověka²

| | Dolní fyziologická mez mmol/l | Horní fyziologická mez mmol/l |
|-----------------------|--|--|
| Na⁺ | 137 | 145 |
| K⁺ | 3,6 | 4,6 |
| Cl⁻ | 98 | 106 |

Tab.II: koncentrace iontů uvnitř buněk²

| | Fyziologické intracelulární koncentrace iontů mmol/l |
|-----------------------|---|
| Na⁺ | 10 - 14 |
| K⁺ | 160 |
| Cl⁻ | 4 |

2.1.5 Regulace vnitřního prostředí a bilance iontů

K udržování stabilního vnitřního prostředí existuje řada účinných mechanismů. Hlavními přesuny iontů v organismu jsou:

- 1) Příjem potravou
- 2) Vyloučení močí
- 3) Přesun mezi vnitrobuněčným a mimobuněčným prostorem

Vedle těchto hlavních přesunů iontů jsou i další⁵, které hrají větší roli spíše ve zvláštních případech zátěže organismu. U zdravých osob se projevují minimálně nebo vůbec. Jedná se o pocení, ztráty stolicí, průjem, ztráty zvracením, Parenterální příjem (podávání iontů do žíly přímo do oběhu), přesun iontů do specifického kompartmentu (absces, výpotek), léčebná dialýza, tonutí a mnohé další. Vzhledem k šíři tématu, které však nemá přímou vazbu k analýze iontů, může zájemce najít podrobnější informace v literatuře²⁻⁶.

2.1.5.1 Příjem iontů potravou

V běžné stravě se nachází chlorid sodný, kuchyňská sůl. Dále i soli draselné, zastoupené zejména v potravinách rostlinného původu. V běžných potravinách je sodných iontů dostatek, nebo až nadbytek vzhledem k potřebám lidského organismu. Draselných iontů naopak může někdy pochybět, zejména je-li nižší spotřeba rostlinné stravy. Sníženou koncentraci draselných iontů v séru z důvodu nižšího příjmu vidíváme často u starších osob. Chloridové ionty jsou natolik samozřejmou součástí jakékoliv stravy, že je jejich nedostatek z důvodu sníženého příjmu vyjímecný. Smrtelné případy akutního nedostatku, nebo nadměrného příjmu iontů potravou se vyskytují vzácně, ačkoliv principiálně možné jsou. Velmi časté jsou však choroby spojené s chronickým nedostatkem nebo nadměrným přísunem (hypertenze u nadměrného solení). Tyto choroby mohou mít časem za následek i smrt. Snížený příjem iontů nemusí být způsoben jen jejich chyběním ve stravě, ale i poškozením vstřebávací funkce trávicího traktu. Nejčastější příčiny hypochloridémie a současně i hypokalémie způsobené poruchou funkce trávicího traktu bývá zvracení a průjem. Chronická zánětlivá onemocnění střev (například Chronova choroba) bývají rovněž někdy doprovázena hypokalémií.

2.1.5.2 Vylučování iontů močí

Problematika regulace vylučování je natolik široká, že se o ní píše samostatné monografie²⁻⁶. Její výzkum patří mezi nejintenzivněji rozvíjející se medicínské oblasti.

V ledvinách se moč tvoří v nefronech, kde je krev nejprve v glomerulu mechanicky filtrována. Takzvaná primární moč, jak se filtrátu říká, pak prochází tubulárním systémem z kůry ledvin do dřeně a po otočce v Henleho kliče zpět do dřeně. Po celé této trase je filtrát obohacován nebo ochuzován o své složky činností tubulárních buněk. Ty mohou na základě hormonální regulace z mozku, srdce i samotných ledvin zvyšovat či snižovat vstřebávání a vylučování vody, minerálů a dalších látek tak, aby složení obíhající krve bylo pokud možno co nejvíce konstantní. Kromě aktivního transportu látek do lumen tubulů (do moči) nebo naopak zpět do buněk a krevního oběhu využívá ledvina i protiproudového systému s osmolárním gradientem. Jeho podstatou je průchod tubulu s protékající močí z kůry do dřeně ledvin, přičemž kůra má nižší osmolaritu než dřeň. Gradient je vytvářen aktivní činností iontových kanálů a umožňuje pasivní návrat vody do organismu. Tento gradient umožňuje redukci objemu glomerulárního filtrátu (primární moči) zhruba o dva řády. Porušení osmolárního gradientu patří k jedněm z příčin selhávání ledvin.

2.1.5.3 Přesun iontů mezi vnitrobuněčným a mimobuněčným prostorem²⁻⁶

Rozdílná, ale stabilně udržovaná koncentrace iontů na stranách biologických membrán (například cytoplasmatická membrána obklopující buňku) je podstatou existence elektrického potenciálu na těchto strukturách. Malé výkyvy koncentrace iontů způsobují změnu potenciálu a dávají tak vznik vzruchu, či signálu, kterému biologicky říkáme podráždění. Vzhledem k tomu, že základním předpokladem živého chování organické soustavy je její dráždivost, pak je podstata této dráždivosti i podstatou života. Zánikem rovnováhy koncentrací iontů na stranách membrány končí život daného systému. Enzymy, přenašeče a iontové kanály, které zabezpečují udržení koncentrace iontů na stranách membrány v mezích slučitelných se životem patří k nejdůležitějším v organismu. Jejich poškozením nastává zánik potenciálu na biologické membráně a smrt. Přesun iontů z intersticia (mezibuněčného prostoru) do buňky nebo naopak je medicínsky velmi významný. V intenzivní medicíně patří tento pochod k základním sledovaným dějům a spolu s acidobasickou rovnováhou se zde iontogram vyšetřuje u jednoho pacienta i několikrát za den.

Přesun iontů mezi vnitrobuněčným a mimobuněčným prostorem je řízen hlavně hormonálně, koncentrací iontů, pH, metabolickou zátěží a kotransportem s některými metabolity. Mnohocestnost přesunu iontů má nevýhodu v tom, že je mnoho příležitostí k poškození některého z mechanismů. Na druhou stranu je bohatost tohoto systému i pojistkou a jeden poškozený mechanismus je vykrýván mnoha náhradními. Na rozdíl od ledvin, které regulují množství iontů v organismu rychlostí v horizontu hodin až dnů, může přestup iontů z buněk do intersticia a naopak měnit koncentrace iontů již za desítky minut.

2.1.6 Biologická variabilita^{4,6,7}

Přestože se organismus snaží všemi svými prostředky udržovat stabilní homeostázu, není vnitřní prostředí absolutně přesně nastaveno na neměnné složení. Nejen vnější vlivy, ale i vnitřní děje neustále rovnovážný stav narušují a ten musí být opět navrácen do optimálních hodnot. Typickými běžnými příčinami kolísání a změn složení vnitřního prostředí jsou biologické rytmy se střídáním spánku a denní aktivity, střídání vlivů spojených se změnou ročních období eventuálně počasí, změna stavu lačnosti a sytosti. Kromě toho se projevuje ještě nepravidelná intraindividuální variabilita, která nasedá na změny vyvolané životními cykly. Ta je dána interakcí našeho organismu s nepravidelnými vnějšími vlivy, jako jsou změna polohy těla, změna teploty, změna fyzické aktivity, variabilita stravy a vypitých tekutin atd. Některé látky je schopen organismus i navzdory výše zmíněným vlivům udržovat ve velmi úzkém rozmezí. Jiné mohou kolísat velmi široce. Hormony zodpovědné za řízení homeostatických mechanismů mohou i za zcela fyziologických podmínek kolísat ve svých koncentracích během dne až o několik řádů. Příkladem mohou být hormony kortizol, melatonin či adrenalin. Lékař si při hodnocení výsledku stanovení analytů v krevním séru musí být vědom těchto fyziologických denních změn. Například hormon kortizol se proto musí odebírat vždy ve stejnou dobu a to ráno před probuzením pacienta, jinak se jeho hodnoty nedají vzájemným porovnáním koncentrací vyhodnotit pro diagnostické účely. Proměnlivost koncentrace iontů krevního séra je u zdravého člověka, nevystaveného extrémním vlivům, poměrně malá ve srovnání s jinými analyty. Důvodem je již zmíněný fakt, že určují základní vlastnosti vnitřního prostředí a organismus jejich homeostázu udržuje velmi intenzivně.

Intraindividuální variabilita iontů^{4,6,7}

K⁺: 4,8%

Na⁺: 0,7%

Cl⁻: 1,2%

Kromě průběžných změn hodnot koncentrací analytů v séru jednotlivce se v medicíně musí ještě počítat s rozdíly mezi jednotlivci. I když dva lidé budou shledáni zdravými, budou se tak cítit a i v dlouhé době po vyšetření, stále budou v dobré kondici a bez prokazatelného chorobného stavu, tak přesto nemusí mít stejné hodnoty koncentrací látek obsažených v jejich těle. Na rozrůznění složení vnitřního složení v populaci, čili na interindividuální variabilitu, mají největší vliv věk, pohlaví, rasa, životní návyky, atd.

Interindividuální variabilita iontů^{4,6,7}

K⁺: 5,6%

Na⁺: 1,0%

Cl⁻: 1,5%

Intraindividuální i interindividuální variabilita mají velký význam při hodnocení zdravotního stavu pacienta a dále mají význam pro analytické hodnocení nejistoty měření, která by neměla být větší než cílová nejistota vypočtená z biologických variabilit (viz kap. 2.3.3.2).

2.2 Specifika stanovení mineralogramu v medicíně

Současná věda a technika v analytické chemii nabízí velmi širokou paletu metod stanovení draselného, sodného a chloridového iontu. Jejich využitelnost však není univerzální a každý praktický obor si z nich vybírá ty, které jsou slučitelné s jeho provozem, nároky na kvalitu, finančními možnostmi a dalšími konkrétními požadavky. Vyšetření iontů v krevním séru, eventuálně moči, mozkomíšním moku či jiné tělesné tekutině v klinické praxi má tyto požadavky:

I. Statistické a analytické

- 1) Preciznost a přesnost
- 2) Nejistota měření do limitu spočítaného z biologických variabilit (tzv. cílová nejistota měření)
- 3) Robustnost při práci s biologickou maticí, odolnost proti interferencím
- 4) Reprodukovatelnost a srovnatelnost mezi pracovišti

II. Technické

- 5) Rychlost
- 6) Malý objem vyšetřovaného materiálu
- 7) Proveditelnost stanovení v místě se stanovením mnoha dalších analytů

III. Finanční

- 8) Cena

Statistickými a analytickými charakteristikami stanovení iontů se bude zabývat zbytek této práce v dalších kapitolách.

Technické požadavky musí čelit faktu, že klinicko-biochemická laboratoř přijímá denně stovky až tisíce vzorků, z nich přibližně dvě třetiny přichází s žádostí o stanovení základních iontů - mineralogramu. V laboratořích malých poliklinik se tak denně stanoví mineralogram v přibližně 100-300 vzorcích, ve velkých okresních nemocnicích to bývá kolem 500-1000 požadavků. Fakultní nemocnice se pohybují v řádu tisíců těchto stanovení denně. V případě urgentního požadavku na vyšetření (statimové vyšetření) je laboratoř povinna vydat výsledek do jedné hodiny od příjmu vyšetřovaného materiálu. Tento statimový vzorek je však vyšetřován současně s dalšími desítkami, či stovkami jiných statimových vyšetření, které musí být rovněž do hodiny vydány.

Běžný vzorek z odběru krve standardně obsahuje po centrifugaci a usazení buněčných součástí krve 3-4 ml odděleného krevního séra. Z tohoto množství se často požaduje 10-30 různých stanovení zcela nepříbuzných analytů. Odebraná množství krve od novorozenců a kojenců se pohybují ještě o řád níže a lékař již musí pečlivě vážit indikaci každého stanovení, aby nedošlo k vyplývání nedostupného vzorku na méně důležité analyty. Většina analyzátorů

je schopna vyšetřit běžné medicínské analyty v objemu desítek mikrolitrů séra. Málomterý analyt vyžaduje nad 200 mikrolitrů vzorku. Podle druhu analyzátoru je požadavek na množství séra k vyšetření všech tří hlavních iontů dohromady v rozmezí 20-80 μ l.

Jedním z limitů stanovení iontů v klinicko-biochemické laboratoři je automatizovatelnost a propojitelnost se stanovením jiných analytů. Mezi největší časové zdržení provozu patří ruční přepipetování a tvorba alikvotů. V některých případech to dokonce ohrožuje kvalitu měření. Ideálním analyzátozem by v tomto případě byl přístroj, který by dokázal z jedné zkumavky vyšetřit všechny požadované analyty. Tato vymoženost je stále v klinické praxi vzácností. V běžném provozu se však daří omezit množství přístrojů v laboratoři na tři: Koagulometr (vyšetření různých parametrů krevní srážlivosti), hematologický analyzátor (vyšetření krevního obrazu, stanovení počtu buněk - krvinek v krvi) a biochemický analyzátor. Posledně jmenovaný přístroj vyšetřuje z odděleného krevního séra nízkomolekulární látky jednoduchými barevnými či precipitačními reakcemi fotometricky, eventuálně turbidimetricky, dále některé druhy proteinů (albumin, celková bílkovina, CRP, protilátky a antigeny, onkomarkery, enzymy atd.). Jedná se v podstatě o automatický spektrofotometr s pipetorem. Součástí tohoto biochemického analyzátoru je i vyšetření iontů.

Finanční požadavky na stanovování analytů nejsou předmětem této práce a je to téma široké, všeobecně diskutované napříč všemi obory. Téma uzavřeme jen údajem, že běžné stanovení draselného, sodného a chloridového iontu v klinicko-biochemické laboratoři z krevního séra, se účtuje žadateli v řádu desítek korun (15-25,- Kč, stav z února 2010).

2.2.1 Preanalytická fáze^{4,8}

V době mezi požádáním lékaře o vyšetření iontů a vlastní interakcí měřícího systému se vzorkem se nachází několik kroků, které významně zasahují do kvality očekávaného výsledku.

2.2.1.1 Interference na úrovni preanalytiky

Odběr vzorku krve je uskutečněn ze žíly pacienta. Výsledek tedy podá informaci o hodnotách koncentrací analytů v době odběru. Byl-li například bezprostředně před odběrem podán nitrožilně přípravek obsahující vyšetřované ionty, pak odeslaný vzorek bude ve výsledku uvádět koncentraci iontů navýšenou o tento přípravek. Jakékoliv vychýlení iontogramu z nastavené rovnováhy se organismus snaží vyrovnávat, takže v době za několik hodin již vydaný výsledek vyšetření neudává skutečnou aktuální informaci o stavu pacienta.

Dalším zkreslením je hemolýza. Vlivem mechanického poškození erytrocytů, například třepáním s odběrovou zkumavkou, dojde k jejich popraskání a vnitrobuněčný obsah se smísí s krevním sérem. Obohatí jej tak zejména o draselné ionty.

Krev, která není ihned analyticky zpracována podléhá změnám. Krevní buňky i po odběru zachovávají životní funkce a spotřebovávají kyslík a glukosu, které však již nemohou být doplňovány. Postupně rovněž slábnou vitální funkce buněk a selhává iontová pumpa udržující rozdílné složení vnitrobuněčného a mimobuněčného prostředí. Již po několika hodinách po odběru měřitelně vzrůstá ve vyšetřovaném vzorku koncentrace draselných iontů prostupujících z buněk do séra. Tento jev se urychlí v chladném prostředí, protože za chladu enzymy iontových pump pracují pomaleji. Paradoxně tak chlazení, které používáme k prodloužení trvanlivosti většiny analytů, v tomto případě dobu použitelnosti vzorku zkracuje.

Pro odběr krve existuje řada odběrových systémů. Zkumavky jsou opatřeny různým obsahem, podle svého dalšího určení a jejich záměna může zasáhnout do správnosti výsledku. Pro některá měření se používá nesrážlivá krev. Činidla použitá k zabránění srážení krve mohou obsahovat měřené ionty a tím falešně zvýšit jejich koncentraci ve vzorku.

2.2.1.2 Správný preanalytický postup

Krev je od pacienta odebírána ze žíly. V době odběru jsou zastaveny veškeré nitrožilní vstupy léčiv. Krev je odebírána nejlépe do zkumavky bez chemických činidel. Vhodný je

přídavek mechanického srážedla, například krastenu (povrchově upravené kuličky z polystyrenu). Krev se nechá krátce několik minut stát, aby získala čas ke sražení. Se zkumavkou se netřepe. Po celou dobu se s ní manipuluje při pokojové teplotě. Po té se zkumavka se vzorkem centrifuguje 10 minut při 3600 otáčkách za minutu. Výsledkem je oddělený krevní koláč, jak se říká vespod usazené sraženině s krevními buňkami, a vrchní část odděleného krevního séra.

Správný preanalytický postup se vyznačuje rychlým provedením, mechanickou a teplotní šetrností ke vzorku, volbou správného odběrového systému a ohledem na medikaci, která předcházela odběru.

Centrifugací oddělené krevní sérum je již plně způsobilé k vyšetření v běžném klinicko-biochemickém analyzátoru. Do analyzátoru je zpravidla možno vkládat zkumavku celou i s vespod odděleným krevním koláčem. Moderní analyzátory umí odsávat sérum od hladiny a nedochází tak často k ucpání jehel sraženinami. Pokud chceme krev používat delší dobu, nebo ji odesíláme na jiné pracoviště, pak je nutné pipetou oddělit sérum do jiné čisté zkumavky. V takto odděleném séru je koncentrace iontů stabilní dlouhodobě a trvanlivost vzorku je omezena na několik dnů pouze jeho biologickou zkázou (bakteriální kontaminace, hnití organické hmoty). Zmražené vzorky odděleného séra lze používat měsíce až roky podle teploty uložení.

Centrifugací se ošetřuje i vzorek moče. Po ochladnutí totiž v moči krystalizují některé látky a v patologických případech obsahuje moč i hlen, krev a další příměsi, které mechanicky vadí při zpracování analyzátozem.

2.2.2 Metody stanovení mineralogramu v medicíně

Metod² vlastního stanovení iontů v krevním séru je mnoho, ale v průběhu 20.století dominovaly dvě metody. První z nich je plamenová fotometrie, která je dnes již zcela na ústupu a v podstatě se považuje za historickou. Druhou metodou, která je však dnes universálně rozšířena, je potenciometrie. S jinými metodami se setkáváme raritně.

2.2.2.1 Plamenová fotometrie

I přes jednoznačný ústupu této metody z klinických laboratoří, se můžeme s touto metodou ještě okrajově setkat a navíc se s ní statisticky a analyticky srovnávají další metody, zejména potenciometrie.

Zpravidla se dnes s plamenovou fotometrií můžeme v klinicko-biochemických laboratořích setkat ještě okrajově jako se záložním přístrojem nebo při měření lithných iontů v krevním séru, není-li k dispozici jiná metoda. Toto stanovení využívají psychiatři k monitoraci koncentrace lithných iontů v krevním séru u pacientů, kterým byla lithná sůl podána například při léčbě maniodepresivních stavů, některých sexuálních úchylek, či ke stabilizaci nálady.

Navzdory dobrým statistickým parametrům i uspokojivé ceně plamenové fotometrie, je jejím velkým nedostatkem technická neprovázatelnost s uspořádáním běžného biochemického analyzátoru. Potřeba zdroje plynu, permanentní plamen, nároky na zvláštní technická povolení, nutnost tvorby alikvotů a další obtížnosti vytěsnilo tuto metodu z klinických laboratoří.

2.2.2.2 Potenciometrie

Potenciometrie je dnes suverénně dominující metoda stanovení draselného, sodného a chloridového iontu v krevním séru. Jejimi přednostmi jsou velmi dobrá technická zakomponovatelnost do jiných analytických systémů, nízká cena, rychlost analýzy, jednoduchost obsluhy. Nevýhodou je nestabilita elektrod, někdy i neselektivita – zejména u chloridové elektrody. Výrobci i literární zdroje deklarují linearitu v dostatečném rozsahu koncentrací pokrývajícím hodnoty vyskytující se v medicínských vzorcích.

2.2.2.3 Fyzikálněchemický princip potenciometrie a iontově selektivní elektrody

Měření koncentrace pomocí potenciometrie je založeno na elektrochemickém jevu, kdy si analyt v roztoku vyměňuje s jinou nemísitelnou fází (další roztok, nebo pevný povrch) náboj (elektron) a vytváří tím na fázovém rozhraní potenciál. Výška potenciálu závisí na koncentraci a druhu analytu a na druhu interagující druhé fáze. Výsledný potenciál se zaznamenává v bezproudovém stavu na voltmetru. V praxi se analyt stanovuje ze změřeného napětí elektrochemického článku, tvořeného indikační elektrodou ponořenou do analyzovaného roztoku a elektrodou referenční spojenou s analyzovaným roztokem solným můstkem. V biologické matrici existuje mnoho iontů a protože potenciál na elektrodě je dán součtem všech jejích interakcí s veškerými analyty ochotnými k výměně náboje, tak je třeba použít selekčního mechanismu zaručujícího měření jen jednoho iontu. K tomu slouží iontově selektivní membrána, která propouští k indikační elektrodě jen požadovaný analyt. Membrána může být skleněná, krystalická, nebo kapalná. S krystalickými elektrodami se v klinicko-biochemických laboratořích setkáváme málo. Vyjimečně se užívá v potenciometrickém stanovení chloridů, kdy je krystalickou membránou tableta chloridu stříbrného. Skleněné membrány je užito například k selekci sodných iontů, nebo vodíkových iontů u pH metru. Kapalná membrána je nejčastěji používaná v iontověselektivních elektrodách pro měření iontů v klinicko-biochemických analyzátoch. V praxi se většinou nejedná o kapalinu ve smyslu tekutiny, ale o polymerní hmotu, nejčastěji modifikovaný PVC. Tento polymer v sobě obsahuje aktivní složku zodpovědnou za selekci analytu. Všeobecně jde většinou o ionex, či neutrální ionofor. Existuje velmi široká paleta ionexů a ionoforů užívaných v membránách iontověselektivních elektrod v klinicko-biochemických analyzátoch. Za všechny uvedme známý valinomycin, schopný selektovat draselné ionty, crownethery využívané jak pro draselné, tak i sodné ionty a kvarterní amonné soli využívané jako selektory chloridů. Širší přehled aktivních iontově selektivních složek je v literatuře².

2.2.2.4 Technické uspořádání potenciometrie pro medicínské použití

Praktické provedení potenciometrického stanovení iontů v krevním séru potenciometricky musí respektovat základní požadavky zahrnující nároky na rychlost a robustnost k individuálnímu složení matrice vzorků. Měření probíhá v průtokovém systému, kdy je elektroda omývána po sobě jdoucími vzorky, nebo referenčním roztokem. Měření jednoho vzorku tak trvá přibližně jednu minutu. Vzorek může být měřen přímo stykem krevního séra s povrchem elektrody, nebo po naředění roztokem o velké iontové síle čímž se sníží matriční rozdíly mezi jednotlivými vzorky. Rozlišujeme podle toho potenciometrii na přímou bez ředění a nepřímou s ředěním. Vzorky moče bývají natolik rozdílného složení a širokého spektra iontové síly, že se využívá ředění vždy.

Vyšetřovaný vzorek je nasát jehlou ze zkumavky v množství asi 20-80 μl a naředěn ředícím roztokem k ujednocení svých matričních vlastností. Poté protéká kolem iontověselektivní indikační elektrody. Většinou jsou všechny tři, tedy draslíková, sodíková a chloridová elektroda seřazeny těsně za sebe do jednoho modulu a všechny tři základní ionty se tak měří najednou v čase i prostoru. Potenciál se měří proti referenční elektrodě, která je oddělena solným můstkem. Ten může být buď jako stabilní, nebo průtokový s odchodem roztoku solného můstku po smísení s vzorkem v prostoru za elektrodami do společného odpadu. Naměřený potenciál je jednak porovnáván s referenčním roztokem, který kolem elektrod protéká mezi vzorky a dále je využíváno kalibračního srovnání pomocí periodicky prováděné kalibrace.

Zvláštním případem je potenciometrie v plné krvi bez separace séra. Toto měření má sice různá technická omezení, která jsou však vyvážena rychlostí s jakou dostáváme výsledek. Tento postup je využíván v POCT (Point-of-care testing - vyšetření u lůžka nemocného) a dává výsledek do dvou minut od odběru vzorku.

2.2.2.5 Specifika výsledku a srovnání potenciometrie s plamenovou fotometrií

Abychom mohli výsledek měření správně interpretovat, je třeba ještě popsat postanalytickou fázi softwarového vyhodnocení, která se liší podle použitého postupu měření.

Krev obsahuje z fyzikálněchemického hlediska tři složky:

- 1) buněčné elementy
- 2) makromolekulární a micelární složky, koloidně rozpuštěné v krevním séru
- 3) vlastní vodné prostředí s vlastnostmi pravého roztoku

Ionty jsou rozpuštěny ve vodné složce krve. Měříme-li koncentraci iontů stejného vzorku na plamenovém fotometru a srovnáváme s potenciometrickou odezvou, pak potenciometrie produkuje vyšší naměřené hodnoty^{2,4}. Plamenová fotometrie totiž ten stejný počet jednotlivých částic iontů měří v celém objemu vzorku, zatímco potenciometrie jen v jeho vodné části. Asi 7% krevního séra jsou koloidně dispergované složky neobsahující roztok solutů. Ty vyplňují sice prostor v séru, ale netvoří s ním pravou homogenní fázi. Druhou odlišností obou metod je vliv iontové síly na aktivitu iontů. V tak koncentrovaném prostředí, jakým je krevní sérum, je aktivita iontů výrazně nižší než skutečná koncentrace. Oba zmíněné faktory musí analyzátor využívající potenciometrickou metodiku softwarově korigovat.

2.2.2.6 Další možnosti stanovení iontů v medicínském prostředí²

Pro úplnost zmiňme ještě okrajové metody, jako jsou spektrofotometrie produktů štěpených beta-galaktosidasou po aktivaci sodnými kationty nebo tryptofanázou po aktivaci draselnými ionty, dále fluorescence nilské modři na optickém vlákne v závislosti na koncentraci sodných iontů a fluorescence trinitroanilinu po aktivaci draselnými ionty a konečně atomová absorpční spektrometrie. Chloridy se kromě potenciometrie vhodné pro stanovení v krevním séru, někdy stanovují coulometrickou titrací. Ze stříbrné anody uvolňovaný stříbrný kationt sráží chloridy v roztoku a hledaný bod ekvivalence nastává vysrážením veškerých chloridů. Coulometrická metoda stanovení chloridů slouží jako

referenční metoda a v praxi je využívána například ke stanovení chloridů v potu. Vyšetření chloridů v potu využívají lékaři při diagnostice mukoviscidosis (cystické fibrosy). Spetrofotometricky se měří koncentrace kyseliny chloranilové vznikající z chloranilanu rtuťnatého vlivem chloridů. Podobně jako u kationtů i chloridy lze měřit na optickém vlákne s fluorescencí barviva Chromoionophore VI nebo derivátů porfyrinu na jeho povrchu. Argentometrie a merkurimetrie jsou v klinické praxi zcela raritní manuální metody využívané spíše v dobách před vznikem automatizovaných metod.

Použití těchto metod má význam v některých speciálních případech. Například stanovení iontů na optickém vlákne je užito v přístrojích záchranné služby, nebo přístrojích POCT (malé přístroje přímo u pacienta). Jde o přenosné přístroje pro urgentní medicínu a práci mimo dosah nemocničního zařízení.

2.3 Kvalita stanovení iontů v klinické praxi

Stanovení jakéhokoliv analytu libovolnou metodou vyžaduje nejen vlastní praktické provedení od odběru vzorku až po vydání naměřené hodnoty, ale i závěrečné zhodnocení výpovědní hodnoty a vyvození důsledků pro sledovaný subjekt. Výsledkem hodnocení jsou potom praktické kroky k řešení nějakého problému. V klinické praxi je vzorek odebrán od pacienta za účelem zjištění přítomnosti či nepřítomnosti chorobného stavu a posouzení jeho závažnosti. Vyvozeným důsledkem je rozhodnutí o léčbě. Samotná chemická analýza je jen jeden z kroků v tomto procesu. Analýza pro klinické účely musí splňovat určité charakteristiky kvality, aby nedocházelo k vydávání výsledků vedoucích k špatnému terapeutickému rozhodnutí. Kontrolou těchto charakteristik kvality se zabývá systém vnitřní a externí kontroly kvality. K pochopení celkové problematiky je třeba nejprve vysvětlit základní názvoslovné pojmy a statistické principy kontroly.

2.3.1 Metrologická terminologie¹

Jasná terminologie je podmínkou bezchybné a jednoznačné komunikace mezi odbornou veřejností. Názvosloví se časem mění a upravuje podle dobových požadavků souvisejících s daným stavem vědy a techniky. Poslední větší změna statistické názvoslovné terminologie proběhla v roce 2008, kdy bylo vydáno třetí vydání Mezinárodního metrologického slovníku (VIM 3). V souvislosti s mezinárodními úpravami došlo i k posunu v české terminologii. Ta jednak reflektuje změny v Mezinárodním metrologickém slovníku a navíc zavádí nové české ekvivalenty foneticky příbuzné anglickým originálům. Vlastní česká norma je přístupná v dokumentu¹ Úřadu pro technickou normalizaci TNI 01 0115:2009 platném od 1.3.2009. Mezinárodní podklad vydala Mezinárodní organizace pro normalizaci a je přístupný jako ISO/IEC Guide 99:2007 International vocabulary of metrology - Basic and general concepts and associated terms (VIM).

Pro názornost je v následující tabulce uveden výběr nejběžnějších metrologických pojmů s anglickým originálem a v potřebných případech i starším ekvivalentem. Podrobnější údaje jsou rozsáhlé a jsou zájemcům dostupné přímo v normě¹ TNI 01 0115:2009.

Přehled vybraných ekvivalentů preferovaných terminů podle VIM 3 zajímavých pro chemii a laboratorní medicínu:

| Anglický termín | Český ekvivalent | Starší ekvivalent (je-li odlišný) |
|------------------------------------|------------------------------------|--|
| measurement trueness | pravdivost měření | |
| measurement accuracy | přesnost měření | správnost měření |
| measurement precision | preciznost měření | přesnost měření |
| intermediate measurement precision | mezilehlá preciznost měření | |
| measurement repeatability | opakovatelnost měření | |
| measurement reproducibility | reprodukovatelnost měření | |
| measurement uncertainty | nejistota měření | |

| | |
|---|---|
| combined stand. measurement uncertainty | kombinovaná standardní nejistota měření |
| target measurement uncertainty | cílová nejistota měření |
| expanded measurement uncertainty | rozšířená nejistota měření |
| coverage factor | koeficient rozšíření |
| metrological traceability | metrologická návaznost |
| measurement bias | vychýlení měření |

2.3.2 Základní znaky analytické metody^{9,10}

Z velkého množství metrologických pojmů, které uvádí norma TNI 01 0115:2009, je pro hodnocení kvality měření v klinicko-biochemické laboratoři důležitý následující výběr (doporučení České společnosti klinické biochemie - ČSKB):

Pravdivost

- Těsnost shody mezi aritmetickým průměrem nekonečného počtu opakovaných naměřených hodnot veličiny a referenční hodnotou veličiny. Pravdivý výsledek je zatížen zanedbatelnou systematickou chybou. Mírou pravdivosti je obvykle vychýlení (bias).

Výtěžnost

- Podíl z množství analytu, přítomného v analyzovaném vzorku zkoušeného materiálu nebo přidaného k němu, který je extrahován a podrobován měření. Výtěžnost je podíl rozdílu mezi údaji měřicího systému při měření vzorku se známým přidaným množstvím analytu či složky a vzorku bez přídavku a přidaného množství. Udává míru schopnosti měřicí metody (postupu) postihnout měřeným signálem veškerý analyt přítomný ve vzorku. Je mírou účinnosti dané metody.

Preciznost - dříve přesnost (v podmínkách opakovatelnosti nebo reprodukovatelnosti)

- Těsnost shody mezi indikacemi nebo naměřenými hodnotami veličiny získanými opakovanými měřeními na stejném objektu nebo na podobných objektech za specifikovaných podmínek.

Nejistota měření

- Nezáporný parametr charakterizující rozptýlení hodnot veličiny přiřazených k měřené veličině na základě použité informace. Parametr přidružený k výsledku měření, který charakterizuje míru rozptýlení hodnot, které by mohly být důvodně prisuzovány měřené veličině. Parametrem může být např. směrodatná odchylka nazývaná standardní nejistota měření.

Mez detekce, mez stanovitelnosti, pracovní interval, linearita, analytická citlivost (souvisí s kalibrací)

- Mez detekce daného analytického postupu je dána nejmenším množstvím analytu ve vzorku, které může být detekováno, ale které nemusí být stanovitelné jako exaktní hodnota.
- Mez stanovitelnosti metody je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno jako exaktní hodnota s požadovanou hodnotou nejistoty.
- Pracovní interval je uzavřený interval hodnot množství či obsahu měřené veličiny ve vzorku, pro který bylo validací potvrzeno, že metoda (postup) je v něm aplikovatelná (nejistota měření je v této oblasti přijatelná). Ohraničení tvoří nejčastěji zdola mez stanovitelnosti (dolní hranice pracovního rozsahu nesmí být z definice menší než mez stanovitelnosti).
- Linearita kalibračního vztahu je rozsah hodnot obsahu, množství či koncentrací, ve kterém je analytický signál lineární funkcí hodnot obsahu, množství či koncentrace.
- Citlivost je podíl změny indikace měřicího systému a odpovídající změny hodnoty veličiny, která je měřena. Citlivost je dána sklonem (směrnicí) kalibrační závislosti.

Analytická selektivita, interference

- Analytická selektivita je taková vlastnost měřicího systému používajícího specifikovaný postup měření, pomocí něhož poskytuje naměřené hodnoty veličiny pro jednu nebo více měřených veličin, že hodnoty každé měřené veličiny jsou nezávislé na jiných měřených veličinách nebo jiných veličinách v rámci zkoumaného jevu, tělesa nebo látky. Selektivita je taková vlastnost analýzy, stanovení či postupu, kdy je stanovení analytu v určité matici závislé na přítomnosti omezeného množství určitých příměsí za definovaných podmínek reakce. Selektivita se mění s obsahem, (množstvím, koncentrací) analytu a

někdy i v závislosti na nastavení parametru metody (souvislost s robustností). Mírou selektivity je známý, kvantitativním způsobem vyjádřený vliv matrice. Pouze minimum metod chemické analýzy lze označit za specifické. Proto doporučení IUPAC (2001) dává přednost obecnému používání termínu selektivita.

Robustnost

- Schopnost metody poskytovat přijatelné výsledky měření i v případě, že dojde k malým odchylkám od měřicího postupu či složení vzorku. Udává její spolehlivost při běžném používání.

Srovnání s jinými metodami

- Porovnávání dvou či více metod je běžnou úlohou činnosti v zkušebních laboratořích (zkušebních laboratořích dle normy ISO/IEC 17 025).

Kritéria spolehlivosti

- Schopnost výrobku nebo služby plnit požadované funkce za určených podmínek po předepsanou dobu. U analytických metod měření je spolehlivost dána precizností a pravdivostí - bias postupu měření. U přístrojové techniky (analytické instrumentace) jde o její bezporuchovost. V tomto případě jsou výrazy spolehlivost a bezporuchovost synonyma.

2.3.3 Metrologie v laboratorní medicíně

2.3.3.1 Specifická a citlivost

Literární zdroje se v analytické chemii často hlouběji zabývají dvěma analytickými znaky, specifickou či selektivitou a citlivostí (senzitivitou).

Z hlediska klinické praxe je však velmi důležité si uvědomit, že podobné pojmy ve zdravotnické literatuře, ačkoliv definičně mají blízko k analytickým definicím, neznamenají totéž. Z chemického hlediska nás zajímá schopnost metody citlivě a specificky stanovit

analyt. Z klinického hlediska nás zajímá jak citlivě a specificky zvolené stanovení analytu pomáhá stanovit diagnosu pacienta. I velmi citlivá a specifická analytická metoda může mít špatnou klinickou specificitu či senzitivitu, pokud je mezi vyšetřovanými nemocnými a zdravými osobami jen malý rozdíl koncentrací sledovaného analytu, nebo naopak pokud i přirozený rozptyl hodnot převyšuje odchylky dané vlivem nemoci. Analytická a klinická senzitivita a specificita však spolu souvisí. Analytické vlastnosti metody jsou totiž jedním z faktorů určujících vlastnosti diagnostické a jsou tedy podmnožinou faktorů, které určují klinickou senzitivitu a specificitu. Obecně se doporučuje před pojmy specificita a senzitivita stavět i vztahový výraz „analytická“, nebo „klinická“.

V klinických souvislostech se obě charakteristiky někdy spojují do jedné, graficky znázorněné veličiny, kterou tzv. ROC křivka⁴ (receiver operating characteristic). Ta ukazuje míru schopnosti diagnostické metody být citlivá i specifická a tím i odlišit zdravé jedince od nemocných.

2.3.3.2 Klinický význam analytických znaků metody

Aby bylo možno využívat analytickou metodu pro účely vyhodnocení stavu vyšetřované osoby, tedy stanovení diagnosy a po té i navržení léčebného postupu, musí dosahovat analytické znaky určité požadované kvality. Příliš velká nejistota měření by mohla způsobit, že zdravý člověk bude léčen i když není nemocný, nebo naopak že nemocný člověk nebude léčen, protože nebude choroba rozpoznána. Analytická metoda tedy musí mít své znaky nastaveny tak, aby stav nemoci dokázala diferencovat proti stavu zdraví. Naopak pokud analytická metoda poskytuje výsledek s menší nejistotou, než je biologická variabilita analytu ve vyšetřovaném systému, pak již další zpřesňování nepřináší lepší výsledky ve stanovení diagnózy. Zvyšování kvality měření pod hranicí biologické variability je bezúčelné a drahé.

Podobná je i záležitost meze stanovitelnosti. V krevním séru se i v případě život ohrožujících snížení koncentrace některých analytů stále pohybujeme vysoko nad mezí stanovitelnosti. Například koncentrace sodných iontů v krevním séru se nedostává běžně pod 120 mmol/l. Hodnoty pod 100 mmol/l jsou již život ohrožující. Je věcí individuality, kde je hranice slučitelnosti se životem, ale odhadem to bude pravděpodobně koncentrace kolem 80 mmol/l. Mez stanovitelnosti v řádech jednotek mmol/l je tedy plně postačující pro vyšetření

veškerého spektra hodnot získaných od jakýchkoliv pacientů. Snižování meze stanovitelnosti pod řád milimolů na litr séra je opět jen finančně náročná zbytečnost, kterou lékař nevyužije.

2.3.3.3 Cílová nejistota měření a rozšířená cílová nejistota měření¹⁰

K určení dostatečné kvality měření se v metrologické terminologii klinické biochemie zavádí pojem cílová nejistota měření – target measurement uncertainty (TMU). Jde o parametr vypočtený (1) z intraindividuální a interindividuální variability. Analytická metoda by hodnotu nejistoty danou tímto parametrem neměla překračovat.

$$\text{TMU (\%)} = z * (0,5 * \text{CV}_i) + 0,25 * \sqrt{(\text{CV}_i^2 + \text{CV}_g^2)} \quad (1)$$

Kde „z“ je kvantil jednostranného normálního rozdělení – na hladině spolehlivosti 95% je jeho hodnota 1,65. CV_i je intraindividuální variabilita a CV_g je interindividuální variabilita ve formě variačního koeficientu (CV). TMU je mezinárodně zvyklá zkratka pro cílovou nejistotu měření – Target measurement uncertainty. Obě uvedené biologické variability jsou získány empiricky v rozsáhlých studiích a jsou dostupné v literárních zdrojích⁷.

Cílová nejistota měření je vlastně složena z požadavku na mezilehlou preciznost (první člen vztahu pro výpočet TMU, starším názvem mezilehlá přesnost) a vychýlení (druhý člen téhož vztahu). Mezilehlá preciznost, by neměla být větší než polovina intraindividuální variability. Maximální vychýlení (vyjádřené jako bias) by nemělo přesáhnout čtvrtinu celkové biologické variability, tj kombinace intraindividuální a interindividuální variability.

Ne vždy však máme to štěstí, že je analytická metoda jistější, než požadovaná úroveň TMU pro klinické účely. Jsou to mimo jiné právě ionty sodný, draselný a chloridový, jejichž nejistota stanovení pomocí potenciometrie je vyšší než cílová nejistota měření vypočítaná z biologických variabilit. V tomto případě je odbornou společností ČSKB (Česká společnost klinické biochemie) stanovena rozšířená cílová nejistota měření (Tab. III.). Je určena tak, aby zvýšená nejistota vydaného výsledku ještě neovlivňovala diagnostické rozhodování lékaře a současně, aby bylo reálné dosáhnout takové kvality měření v rutinním analytickém provozu.

Tab. III: Porovnání teoretické a rozšířené cílové nejistoty měření

| iont | TMU | Rozšířená TMU |
|-----------------|------------|----------------------|
| Na ⁺ | 1% | 5% |
| K ⁺ | 5,6% | 8% |
| Cl ⁻ | 1,5% | 7% |

Rozšířená cílová nejistota měření iontů je závazná pro všechny klinicko-biochemické laboratoře v České republice a je kontrolována systémem externí kontroly kvality.

2.3.3.4 Systém kontroly kvality

Kvalita měření v klinicko-biochemické laboratoři není dána fixně od výrobce analytického systému, ale je ovlivňována řadou jevů, kterými se budeme dále zabývat. K tomu, abychom však byli schopni kvalitu měření udržet, musíme mít především nástroj k její kontrole a nástroj k indikaci zhoršení charakteristik kvality měření. Těmito nástroji jsou systém vnitřní kontroly kvality a systém externí kontroly kvality.

2.3.3.5 Systém vnitřní kontroly kvality

Vnitřní kontrola kvality se uskutečňuje každodenním měřením kontrolních vzorků se známou koncentrací analytů. Správným postupem je kontrola před započetím denního provozu a pak opět po jeho skončení a to nejméně na dvou koncentračních hladinách. Často se však v běžném provozu provádí jen jedna kontrola denně. Laboratoř si tak denně sama ověřuje stabilitu svého analytického systému.

Vyhodnocení vnitřní kontroly kvality měření vyžaduje nejen samotné opakované stanovování koncentrace analytů v kontrolním materiálu, ale i jejich vyhodnocování a statistické postupy odhalující možné závady. Systém pravidel pro hodnocení vnitřní kontroly kvality vypracoval Dr. James O. Westgard a jsou proto známy pod názvem Westgardova pravidla¹¹.

2.3.3.6 Westgardova pravidla¹¹

Vnitřní kontrola kvality není pouhým změřením koncentrace analytu se známou koncentrací (kontrolního materiálu) a následným konstatováním způsobilosti měření k vydávání výsledků. Je to kontrola s časovým sledováním tendencí v analytickém systému. Odhaluje skryté závady dané například stárnutím chemikálií, dlouhou dobou od kalibrace, poškozením součástí analyzátorů atd.

Základem kontroly je již zmíněné každodenní měření kontrolních vzorků. Jejich výsledky jsou zapisovány a kontrolovány nejen ve vztahu k deklarované koncentraci, ale i ve vzájemném vztahu mezi sebou. Vzniká tak tzv. Levey-Jenningův regulační diagram (diagram kvality, kontrolní graf, Control chart). Ten má vodorovnou časovou osu a svislou osu s vynášenými naměřenými hodnotami kontrolního materiálu. Diagram je opatřen navíc vodorovnou linií znázorňující deklarovanou hodnotu koncentrace analytu v kontrolním materiálu a dvě další linie na každé straně, které znázorňují vychýlení o jednu či dvě směrodatné odchylky. Jejich hodnoty jsou uvedeny výrobcem analytického systému a souvisí s TMU, event rozšířenou nejistotou měření. Někdy bývá graf ve sloupcové podobě postaven svisle.

Pro každý analyt a každou jeho kontrolní hladinu koncentrace je sestrojen svůj diagram. V něm se kvalita měření hodnotí pomocí tzv. Westgardových kontrolních pravidel¹¹ (Westgard Rules). Přehled základních a doplňujících pravidel je v příloze (Tab. IV, Tab. V).

Hodnocení Westgardových pravidel:

Náhodné chyby, detekované zpravidla pravidly $1x3s$, nebo $R4s$, zhoršují reprodukovatelnost výsledku a preciznost analytického systému. Bývají způsobovány výkyvem napětí v elektrické síti, nestabilitou objemu pipetování či dávkování, kontaminací, bublinami v systému atd.

Systematické chyby typu trendu, nebo bias (vychýlení, zhoršení přesnosti) se obvykle odhalují pomocí pravidel $2x2s$, $4x1s$, nebo pravidla $10x$. Bývají způsobovány chybami v kalibraci, nastavení inkubační teploty, chybě v elektronice, u optických metod vnikem

nežádoucího světla například štěrbinou v krytu detektoru, špatně uvedenou reagentií (záměna za jiný lot s jinou koncentrací a podobně). Trendy bývají způsobovány stárnutím reagentie, nebo čidel.

Důležité je myslet i na možnost chyby v kontrolním materiálu. I ten má svou životnost a předepsané limity použití.

2.3.3.7 Systém externí kontroly kvality

Externí kontrola kvality je periodické vyhodnocení laboratoře nezávislou institucí, která zasílá své kontrolní materiály. Koncentrace analytu v kontrolním materiálu není předem koncovému uživateli analytického systému známa. Po vyhotovení analýzy se výsledek odesílá původci kontrolního materiálu. Po doručení údajů od všech účastníků se vyhodnotí chyba kontrolního stanovení a nejistota měření u jednotlivých analytů pro každou laboratoř. Úspěšné stanovení koncentrace analytů v kontrolním materiálu by mělo být podkladem pro důvěryhodnost práce klinicko-biochemické laboratoře. Je snaha o zavedení povinnosti uspět v této kontrole pod hrozbou výpovědi smluvních vztahů s pojišťovnou v případě opakovaného neúspěchu. Kontrolní materiál je vyhodnocován na dvou koncentračních hladinách analytu a je hodnocen zvlášť pro jednotlivé typy analytických systémů. Koncoví uživatelé účastníci se kontrolního mechanismu jsou tedy rozříděni do skupin podle metody kterou ke stanovení iontů používají. Hodnotí se přesnost stanovení kontrolního materiálu a nejistota vypočtená z dlouhodobých vnitřních kontrol. Dále se porovnává vzájemná poloha výsledků od jednotlivých účastníků. Ukázka části výsledkové listiny vydávané firmou SEKK spol. s r.o.¹² je v příloze (Obr. 1). Graficky je zde znázorněna řada hodnot stanovených jednotlivými laboratořemi pro daný analyt. Střední linie představuje deklarovanou koncentraci analytu v kontrolním materiálu a linie nad a pod ní jsou meze dané tolerančním rozpětím odvozeným z rozšířené cílové nejistoty měření (rozšířené TMU). Úsečky vedoucí symetricky od hodnot jednotlivých stanovení představují míru nejistoty měření v dané laboratoři.

Nejčastějším původcem kontrolního materiálu pro klinicko-biochemické laboratoře v České republice je firma SEKK spol. s r.o.¹². Pro méně běžné analyty je nutno hledat jiné, většinou zahraniční poskytovatele kontrolního materiálu.

2.3.3.8 Referenční materiál a návaznost v metrologii^{9,10}

Abychom vůbec mohli provádět kontrolu kvality měření v jednotlivých laboratořích, musí existovat ujednacení v tom, jak je vůbec deklarovaný a definovaný rozměr obsahu analytu u jednotlivých kontrolních prvků. Musí existovat i ujednocená metrologie jako taková. Základním předpokladem je respekt ke stejným měrným jednotkám. Počátek organizace metrologického ujednacení spadá až k roku 1790, kdy byl zahájen postup k vytvoření ujednocené míry délky - metru. V průběhu 19. století se metrologická soustava postupně změnila v komplexní systém jednotek SI, uznávaný v odborné veřejnosti po celém světě. Samotná shoda na tom, co je jednotkou délky, hmotnosti, času atd. nestačí k tomu, abychom v klinických laboratořích mohli vzájemně porovnávat naměřená data. Všechny laboratoře v současnosti již vydávají výsledky stanovení v jednotkách mol na litr, nebo gram na litr. Ovšem vzhledem k chování organické matrice a zvoleným běžným analytickým metodám nebývá signál vydaný analytickým systémem vždy adekvátní a mezilaboratorně se liší. K ujednacení slouží systém referenčních materiálů poskytovaných referenčními laboratořemi. Nejvyšším referenčním materiálem bývá nadnárodní etalon poskytovaný referenční metodou pro národní referenční laboratoře. Ty podle něj vyhotovují kontrolní (referenční) materiál pro laboratoře nižších úrovní eventuelně pro koncové klinicko-biochemické laboratoře. Veškerá problematika návaznosti se týká jak kontrolních materiálů, tak i kalibrátorů.

Pro definiční potřeby se uvádí následující vysvětlení¹³: Návaznost (Traceability) je vlastnost výsledku měření nebo hodnoty etalonu, kterou může být určen vztah k uvedeným referencím, zpravidla národním nebo mezinárodním etalonům, přes neporušený řetězec porovnávání, jejichž nejistoty jsou uvedeny.

Kromě kontroly kvality měření má vztah veškerých kontrolních materiálů k jednomu referenčnímu materiálu – etalonu i druhý neméně významný důvod. Je jím mezilaboratorní porovnatelnost. Pacient vyšetřený jednou laboratoří by měl odcházet s výsledkem, který by se neměl lišit od výsledku, který na stejném vzorku vyhotoví jiná laboratoř. Je to nutné z důvodu vedení léčby. Zvýšení, či snížení koncentrace analytu v séru musí odpovídat skutečnosti a nikoliv výchytkám v jednotlivých laboratořích. V opačném případě by lékař mohl rozdíl mezi výsledky dvou laboratoří zaměnit s trendem ve zdravotním stavu pacienta a zahájit nesprávný

léčebný postup. Mezilaboratorní porovnatelnost výsledků však není dodnes uspokojivě dořešena a lékař je povinen respektovat například rozdílná referenční rozmezí jednotlivých analytů u jednotlivých laboratoří. Zejména v imunochemii jsou rozdíly značné.

2.3.3.9 Validace a verifikace

Při zavádění a provozu jakékoliv laboratorní metody jsou nutné dva procesy související s kontrolou kvality měření. Validace je systém statistického hodnocení kontrolních měření při vytvoření nové metody, nebo po zásahu do původní metody a má za úkol prokázat systematickou platnost (validitu) podávaných výsledků. Validaci zpravidla u uzavřených systémů provádí výrobce analytického systému a dokládá ji v dokumentaci. Verifikace (ověření platnosti), nebo také malá validace, jak se jí někdy říká, je pouhým ověřením, že systém opravdu měří správně. Verifikaci provádí každý koncový uživatel s určitým časovým odstupem, většinou však jednou do roka. Praktické provedení sestává ze statistického zhodnocení každodenních kontrol kvality za uplynulé období a malé série čerstvě naměřených kontrolních výsledků v podmínkách opakovatelnosti. Velmi lidově bychom verifikaci mohli přirovnat ke zkoušení obuvi v obchodě. I když je na botě uvedená číselná velikost, kterou si pravidelně kupujeme, přesto si boty před zaplacením vyzkoušíme (verifikujeme výrobcem deklarovaný údaj).

2.3.4 Činitelé ovlivňující nejistotu výsledku při měření iontů¹⁴⁻²³

Literární zdroje týkající se nejistoty potenciometrického měření koncentrace iontů jsou zpravidla zaměřeny na výzkumnou oblast. Popisují klasické učebnicové vlivy na výsledek potenciometrického stanovení. Naproti tomu údaje pro praktický provoz s měřením na automatickém biochemickém analyzátoru jsou omezeny na nevelký souhrn doporučení výrobce. Rozbor zdrojů nejistoty stanovení iontů na automatickém analyzátoru není v souhrnné formě běžně výrobcem poskytován.

Literatura¹⁴⁻¹⁹ i odborná periodika²⁰⁻²³ zabývající se potenciometrickým stanovováním iontů uvádí zpravidla tyto rušivé vlivy:

Teplota – vliv na aktivitu iontů i rychlost výměny náboje na povrchu elektrody

Výkyvy napětí v elektrické síti – přímý vliv na velikost výsledného signálu

Vnější elektromagnetické pole - např. magnetická míchačka má vliv na potenciál ISE

Hluk – mechanické vibrace ovlivňují děje na povrchu elektrody

Aktivace ISE - přestávka mezi měřeními a vliv předchozího prostředí (vzorku)

Neselektivita ISE a interference s jinými ionty

pH jakožto zvláštní druh interference s H_3O^+ ionty

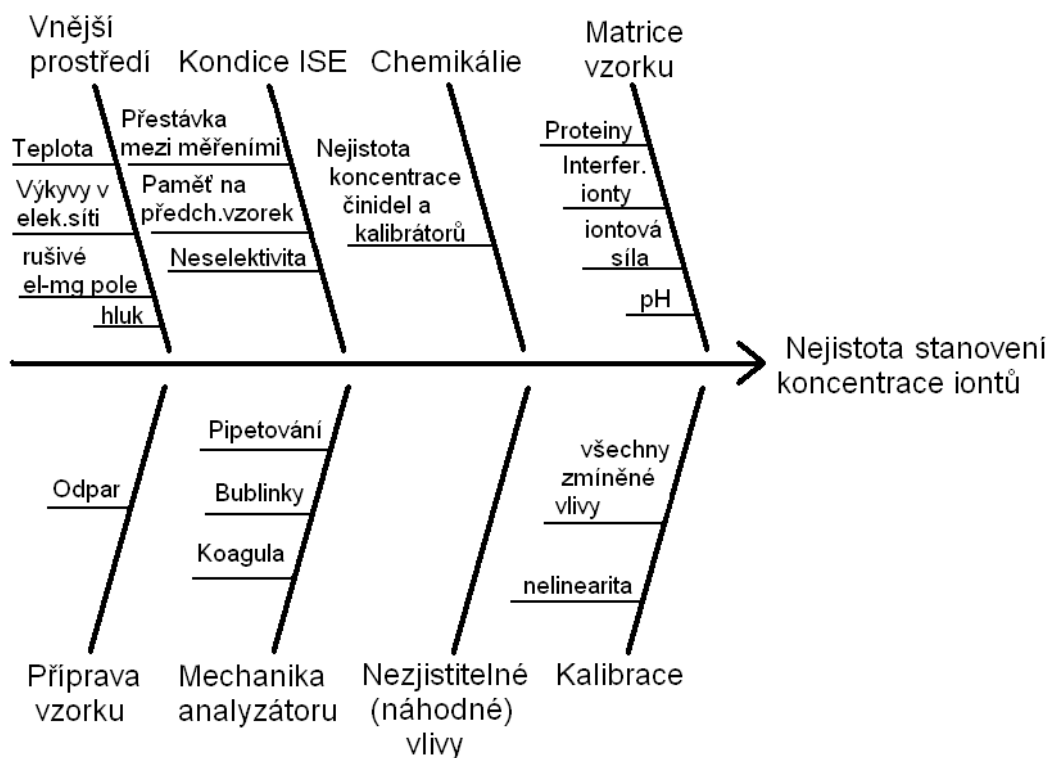
Nejistota koncentrace reagensů

Nejistota kalibrace

Vliv iontové síly – projevuje se změnou aktivity iontů a tím i potenciálu na ISE

Kontaminace povrchu elektrod (makromolekuly, proteiny atd.) – snižuje citlivost ISE

Všechny tyto vlivy musíme respektovat a omezit nebo stabilizovat jejich vliv při klasickém laboratorním potenciometrickém měření. V klinicko-biochemické laboratoři máme však k dispozici analyzátor s uzavřeným systémem a řadu jevů nemůžeme ovlivnit. Dokonce se objevují nové vlivy způsobené mechanikou analyzátoru, například: nepravidelnost pipetování, bublinky v systému, koagula v krevním séru, odpar vzorku při čekání ve frontě vzorků. Souhrnný přehled vlivů na nejistotu stanovení iontů na automatickém analyzátoru znázorňuje Ishikawův diagram²⁴ (Obr. 2).



Obr. 2: Ishikawův diagram zobrazující složky nejistoty stanovení iontů.

Je samozřejmostí, že s každým analytickým systémem dostáváme od výrobce nejen vlastní přístroj, ale i manuál s uvedením postupů a také výstrah a varování před chybami. Najdeme tam taková doporučení jako: nepoužívat mobilní telefony v blízkosti analyzátorů, nepoužívat proexpirované reagentie a senzory, měřit jen předepsané typy materiálů (moč, sérum, likvor), je uváděn pracovní teplotní interval jako prevence přehřívání přístroje, bývá deklarován lineární rozsah kalibrační závislosti. Je ovšem zářející jak často chybí například údaje o nejistotě koncentrace reagentií, nebo jak skromné jsou údaje o interferencích. Rovněž interval kritických hodnot u kontrolních materiálů se nekryje přesně s údaji TMU, případně rozšířené TMU. To je však dáno nesjednocením domácích předpisů se zahraničním dodavatelem.

2.4 Projevy nejistoty stanovení iontů v praxi

Samotná statistika a výpočty s ní spojené bývají pro laika často na první pohled teoretizováním vytrženým z reality. Abychom mohli zdůvodnit používání složitých kontrolních mechanismů, které zatěžují laboratoř časově i finančně, měli bychom mít v rukou vážné důkazy o riziku či dokonce existenci nepřesností v měření.

2.4.1 Porušení návaznosti

Při provádění interních kontrol kvality máme ke každému kontrolnímu materiálu v příbalovém letáku uvedenou deklarovanou koncentraci sledovaných analytů. Pro klinicko-biochemické účely však bývají deklarované hodnoty koncentrací rozdílné pro různé analytické systémy. Například pro přístroje řady Dimension je v certifikátu²⁵ kontrolních roztoků Bio-Rad uvedena hodnota koncentrace draselných iontů 4,05 mmol/l a pro přístroj Architect v témže kontrolním materiálu koncentrace 3,88 mmol/l K⁺. Oba údaje jsou vytištěny ve společném dokumentu pro stejnou šarži kontrolního materiálu. Tady vidíme, že už ani teoreticky se nepředpokládá, že by přístroje měly měřit stejně.

2.4.2 Vysoká nejistota

Westgardovská pravidla vnitřní kontroly kvality umožňují přijmout za platnou sérii měření i když výsledek měření kontrolního materiálu přesáhl odchylku od deklarované hodnoty koncentrace o dvě směrodatné odchylky. Dvě směrodatné odchylky na obě strany u draselných iontů podle informací z příbalového letáku pro kontrolní materiál Bio-Rad-2 činí rozmezí 0,78 mmol/l.

2.4.3 Systematické chyby

Při prohlížení výsledků externí kontroly, kde máme k dispozici náhled na mezilaboratorní porovnání, zjistíme, že u mnoha analytů existuje dost významná celorepubliková systematická chyba. Průměr z měření desítek či stovek laboratoří se často liší o několik procent od deklarované hodnoty kontrolního materiálu. Například výsledek hodnocení chloridových iontů ve vzorku B z data 17.4.2009 od firmy SEKK spol. s r.o. měl celorepublikový medián naměřených koncentrací přibližně o 2% níže, než je deklarováno (referenční hodnota). Vezmeme-li v úvahu, že TMU pro chloridy je 1,5%, tak již jenom systematická chyba na straně analytického systému, nebo kontrolního mechanismu tuto rezervu pro nejistotu nejen že zcela vyčerpalo, ale i přesáhlo. Nebýt rozšíření TMU na 7%, pak by v externí kontrole kvality vyhovovalo měření pouhé jedné třetiny laboratoří. Zarážející je zejména fakt, že střední hodnota (medián) naměřených koncentrací v rámci celé České republiky by byla na základě nerozšířené TMU zamítnutelná. Ukázka grafické části výsledkové listiny externí kontroly kvality je v příloze (Obr. 1).

2.4.4 Praktický dopad na pacienta

Předpokládejme, že do ordinace lékaře přichází pacient s nespecifickými potížemi. Lékař je nucen provést obecná skriningová vyšetření k ozřejmení zdravotní situace pacienta. Předpokládejme, že skutečná koncentrace draselných iontů v séru tohoto pacienta bude 3,5 mmol/l. Tato koncentrace je sice již nižší, než je obvyklé pro fyziologický stav, ale neznamená ještě nijak alarmující hodnotu. Z předchozích tří odstavců vyplývá, že laboratoř měřící na přístroji Dimension, která uspěla v hodnocení externí kontroly kvality a v rámci systému vnitřní kontroly dnes naměřila o dvě směrodatné odchylky ($1s = 0,2$ mmol/l) vyšší hodnotu než deklarovanou, může stanovit koncentraci draselných iontů u předpokládaného pacienta na 3,90 mmol/l ($3,5 + 2 \cdot 0,2 = 3,9$ mmol/l K^+). To je v podstatě fyziologická hodnota a lékař ji u pacienta s nespecifickými potížemi vyhodnotí zpětně jako toho času diagnosticky nepřínosnou. Nebudou-li nalezeny jiné výrazné patologické projevy, bude pacient pravděpodobně propuštěn domů. Jiná laboratoř, měřící na přístroji Architect, která rovněž

uspěla v externím hodnocení kvality měření a dnes stanovila v kontrolním materiálu draselné ionty v koncentraci o dvě směrodatné odchylky nižší, než je deklarováno, může stanovit u téhož pacienta koncentraci draselných iontů na 2,93 mmol/l ($3,5 - 2 \cdot 0,2 - 0,17 = 2,93$ mmol/l K^+ , kde 0,17 je systematický rozdíl mezi stanovením na přístrojích Dimension a Architect (viz kap. 2.4.1.). Tato hodnota lékařem rozhodně nebude přijata jako fyziologická a v žádném případě by ji neměl bez dalšího upřesnění příčiny ambulantně došetřovat v domácích podmínkách. Pacient bude pravděpodobně odeslán k došetření do nemocnice. Zvolený příklad je sice zvolen tak, aby uvedl příklad projevu dvou maximálních, ještě povolených odchylek současně, ale ukazuje, že principiálně je možné, aby lékař pacienta vedl diagnosticky a léčebně zcela rozdílným způsobem jen proto, že jej nechal vyšetřit v jiné laboratoři.

Význam systému kontroly kvality a důležitost dodržování správných laboratorních postupů jsou o to patrnější, když si navzdory výše uvedenému příkladu uvědomíme, že draselné ionty zdaleka nejsou analytem s největší nejistotou měření.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie, přístroje a pomůcky

3.1.1 Použité chemikálie

- Chlorid sodný NaCl p.a., Lachema, Česká republika
- Chlorid draselný KCl p.a., Lachema, Česká republika
- Chlorid vápenatý bezvodý CaCl₂ p.a., Lachema, Česká republika
- Chlorid hořečnatý krystalický MgCl₂ p.a., Lachema, Česká republika
- Síran hořečnatý krystalický MgSO₄.7H₂O čistý, Lachema, Česká republika
- Síran sodný bezvodý Na₂SO₄ p.a., Lachema, Česká republika
- Hydrogenuhličitan sodný NaHCO₃ p.a., Lachema, Česká republika
- Hydrogenfosforečnan sodný krystalický Na₂HPO₄.12H₂O p.a., Lachema, Česká republika
- Dihydrogenfosforečnan sodný krystalický NaH₂PO₄.H₂O p.a., Lachema, Česká republika
- Hydroxid sodný NaOH p.a., Ing. Petr Švec – PENTA, Česká republika
- Kyselina chlorovodíková HCl p.a., Analytika s r.o., Česká republika
- Směsné lidské krevní sérum, separace ze srážlivé krve centrifugací 10 minut při 3600 otáčkách za minutu
- Individuální lidské krevní sérum, separace ze srážlivé krve centrifugací 10 minut při 3600 otáčkách za minutu
- Kontrolní materiál, Liquid Assayed Multiqual 1 a 2, Bio-Rad Laboratories (v textu jen zkráceně Biorad 1 a 2)
- Kontrolní materiál, Dade® TRU-Liquid Moni-Trol 1 a 2, Siemens Medical Solutions Diagnostics (v textu zkráceně jen Monitrol 1 a 2)

Spotřební materiál a příslušenství „QuickLYTE“ pro měření iontů na biochemickém analyzátoru Dimension RxL:

- IMT Standard A

- IMT Standard B
- IMT Flush Solution
- IMT Sample Diluent
- IMT Dilution Check
- Salt Bridge Solution

Koupené roztoky a voda:

- Demineralizovaná voda z přístroje AQUAL 29, AQUAL, Brno, Česká republika pro přípravu jednotlivých roztoků
- Demineralizovaná voda z přístroje AQUA OSMOTIC 05 KOMPAKT
- Demineralizovaná voda z přístroje AQUA OSMOTIC 03
- Ringerův roztok – Ringers injection „fresenius“ 500ml, Fresenius Kabi Italia S.r.l.
- Fyziologický roztok – 0,9% sodium chloride in water for injection u.s.p., Fresenius Kabi Italia S.r.l.

3.1.2 Další pomůcky

- automatické pipety
- plastové špičky na pipety
- skleněné laboratorní nádobí
- plastové zkumavky s víčky
- Láhve s víčkem, kulaté, širokohrdlé, PE, 100 ml
- laboratorní folie PARAFILM „M“ Pechiney, Chicago, USA
- latexové rukavice
- odběrové stříkačky S-Monovette® 7,5 ml Serum, Sarstedt, bez aditiv pro odběr srážlivého séra, obsahují aktivátor srážení nanosený na krastenových kuličkách
- Sample Cups with Lids 1,5 ml, Dimension (dále v textu jen vzorkovnička)

3.1.3 Přístroje

- analytické váhy KERN 770-15, Německo
- analytické laboratorní váhy Chirana 15420 (přesnost +/- 10 mg)
- horkovzdušný sterilizátor HS 62A, Chirana
- centrifuga Rotofix 32A, Hettich, Německo
- pH metr InoLab pH Level 1
- pH elektroda SenTix 41
- biochemický analyzátor Dimension RxL s oddílem pro potenciometrické stanovení iontů QuickLYTE: Integrated Multisensor Cartridge

Dimension RxL je středně velký biochemický analyzátor určený pro klinickobiochemické laboratoře. Integruje fotometrické metody, potenciometrické stanovení iontů a heterogenní imunochemický modul. Jedná se o uzavřený systém používající zásobníky na reagenty Flex. Fotometrické reakce se uskutečňují v kyvetách, které se vytváří z kyvetového filmu přímo v přístroji. Stanovení iontů probíhá v senzoru "QuikLYTE integrated multisensor", ve kterém vzorek protéká kolem plošně uspořádaných iontově selektivních elektrod a nakonec před odtokem do odpadu se smíchává s roztokem solného můstku, který protekl kolem referenční elektrody. Vzorek je nasáván jehlou ze vzorkovničky umístěné v segmentu karuselu.

3.2 Pracovní postup

Podstatou této práce je měření vzorků za takových podmínek, aby se výrazně projevil jen jeden sledovaný rušivý vliv na nejistotu stanovení iontů. Je využito měření za podmínek opakovatelnosti s vystavením série měření, nebo různých sérií měření škále intenzity vnějšího nebo vnitřního činitele, který snižuje preciznost měření, nebo způsobuje vychýlení stanovené koncentrace od deklarované. Výsledky jsou statisticky zpracovány.

3.2.1 Příprava roztoků a vzorků

K jednotlivým experimentům bylo použito jednak uměle připravených vzorků solí a dále individuálního původního i směsného a chemicky upraveného séra pacientů.

Umělé roztoky byly připraveny z demineralizované vody a solí NaCl, KCl, MgSO₄, CaCl₂, MgCl₂, Na₂SO₄ běžným gravimetrickým postupem při laboratorní teplotě v běžném laboratorním skle. Byly určeny k experimentům, které vyžadují porovnávání skutečné koncentrace s odezvou analyzátoru (stanovenou hodnotou) a k experimentům, které vyžadují minimalizaci projevu matričních efektů. Jedná se zejména o experimenty s měřením vlivů iontové síly, linearity, paměťového efektu, a interferencí. Koncentrace solí či iontů v jednotlivých roztocích jsou uvedeny u každého experimentu.

Rignerův roztok a fyziologický roztok byly odebírány z originálního balení a použity pro experimenty bez jakékoliv předchozí úpravy, vyjma ředění demineralizovanou vodou. Byly použity v těch experimentech, kde byla velká a předem spatně odhadnutelná spotřeba měřeného materiálu. Tyto roztoky jsou dostupné ve velkém množství a odběr z jedné uzavřené lahve zaručuje konstantní složení. Nejistota deklarované koncentrace jednotlivých iontů je u zvolených experimentů nevýznamná, protože její hodnota není zahrnuta do výpočtů a nahrazuje ji střední hodnota naměřených dat. Jedná se o experimenty s měřením vlivů kalibrace, elektromagnetického záření, teploty, kondice ISE, stáří ISE, iontové síly, paměťového efektu a k porovnání opakovatelnosti měření.

Sérum získané od reálných pacientů bylo použito k experimentům s odparem vzorku, a sledování vlivu pH. Sérum bylo získáno odběrem od pacientů do zkumavek Sarstedt bez protisrážlivých činidel, opatřených uvnitř kuličkami krastenu, jako urychlovače srážení. Oddělení séra od krevních elementů bylo provedeno centrifugací při 3600 otáčkách za minutu po dobu 10-ti minut za laboratorní teploty. Pro experimenty s větším množstvím séra bylo použito směsné sérum několika desítek pacientů. Zvolená séra nebyla ikterická, hemolytická ani chylosní. Nastavení pH vzorků směsného séra bylo provedeno titrací koncentrovaným roztokem NaOH a HCl za kontroly pH metrem, tak aby byl objemový přídavek činidla zanedbatelný a v matici vzorku měnil jen pH, nikoliv však koncentrace ostatních matričních

komponent. Žádný vzorek nebyl mražen a jejich použití bylo vždy v průběhu 24 hodin od přípravy.

Základní předpoklady o celkové nejistotě měření byly odvozeny ze složek kombinované nejistoty reprodukováných měření na kontrolních materiálech Monitrol a Biorad.

3.2.2 Nejistota vážení a volumetrických operací²⁶

V případě připravovaných roztoků, kde hraje důležitou roli vztažení stanovené koncentrace ke skutečné (deklarované) koncentraci je nutno znát i nejistotu deklarované koncentrace. Ta je dána nejistotou vážení a odměřování objemu.

Nejistota vážení

Nejistota vážení má zdroje v nejistotě spojené s opakovaným vážením (směrodatná odchylka opakovaného vážení), v nejistotě linearitu vážení, kterou deklaruje výrobce vah a nakonec v nejistotě kalibrace, která je dána nejistotou hmotnosti kalibračního závaží. Nejistota vážení je pak vyjádřena vztahem:

$$u_{c(m)} = \sqrt{2 * (u_{(m_1)}^2 + u_{(m_2)}^2 + u_{(m_3)}^2)} \quad (2)$$

Kde $u_{(m_1)}$ je směrodatná odchylka vážení (vstupní data jsou v příloze v tabulce VI), $u_{(m_2)}$ je odchylka vážení od linearitu vyjádřená jako toleranční limit ($\pm tol$) a převedena na směrodatnou odchylku a $u_{(m_3)}$ je nejistota závaží. Při diferenčním vážení se tento příspěvek započítává dvakrát.

$$u_{(m_1)} = 0,00005 \text{ mg}$$

$$u_{(m_2)} = \frac{\pm tol}{\sqrt{3}} = 0,05774 \text{ mg}$$

$$u_{(m_3)} = 0,30000 \text{ mg}$$

$$u_{c(m)} = \sqrt{2 * (0,00005)^2 + (0,05774)^2 + (0,30000)^2} = 0,43205 \text{ mg}$$

Nejistota volumetrických operací

Nejistota volumetrie má zdroje v nejistotě spojené s opakovaným doplňováním po značku, vyjádřená jako směrodatná odchylka opakovaného odměřování pipetou, byretou nebo odměrnou nádobou (vstupní data jsou v příloze v tabulce VI), v nejistotě tolerance jmenovitého objemu ($\pm tol$), kterou deklaruje výrobce skla a nakonec v nejistotě spojené s teplotní roztažností skla. Nejistota vážení je pak vyjádřena vztahem:

$$u_{(V)} = \sqrt{u_{(V_1)}^2 + u_{(V_2)}^2 + u_{(V_3)}^2} \quad (3)$$

Kde $u_{(V_1)}$ je výběrová směrodatná odchylka odměřování (doplňování po značku), $u_{(V_2)}$ je nejistota spojená s tolerancí jmenovitého objemu ($tol=0,1\text{ml}$) převedená na směrodatnou odchylku ($tol/\sqrt{3}$) a $u_{(V_3)}$ je nejistota spojená s teplotní roztažností skla, vypočtená jako součin měřeného objemu, koeficientu teplotní roztažnosti ($0,00021^\circ\text{C}^{-1}$) a předpokladu maximální teplotní výchyly během operace ($100\text{ml} * 0,00021 * \pm 3^\circ\text{C}$) a rovněž převedená na směrodatnou odchylku ($/\sqrt{3}$).

$$u_{(V)} = \sqrt{0,07136^2 + 0,05774^2 + 0,03637^2} = 0,09873 \text{ ml}$$

Význam nejistoty vážení a odměřování objemu pro účely této práce je patrnější z relativních nejistot (cca 0,04% při vážení 1g a 0,10% při odměřování 100ml). Celková nejistota přípravy pracovních roztoků bude v závislosti od vážených hmotností kolem 0,11%.

3.2.3 Čištění chemického nádobí

Veškeré nádobí použité pro manipulaci s krevním sérem bylo použito jednorázově. Rovněž veškeré zásobní nádoby a zkumavky byly použity jednorázově i pro umělé roztoky. Laboratorní sklo používané k přípravě umělých roztoků bylo vymýváno destilovanou vodou a sušeno v horkovzdušném sterilizátoru (sušárně). Každá vzorkovnička použitá k měření byla jen na jedno použití a po měření vyhozena do odpadu.

3.3 Statistické zpracování naměřených dat^{27,28}

Zpracování výsledků bylo prováděno pomocí statistického software²⁸ QC Expert 2.7 (Trilobyte, ČR) na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Pro názorná grafická zobrazení a některé opakované jednoduché výpočty byl použit program Microsoft Office Excel 2007.

3.3.1 Použité statistické metody^{26,29,30}

Z měření sérií vzorků ovlivněných jednotlivými sledovanými parametry byly získány příslušné složky nejistoty měření. Tyto složky nejistoty byly získány buď v podobě variačních koeficientů v případech zvýšeného rozptylu naměřených hodnot, nebo v podobě relativní výchylky (bias jako změna v procentech proti původnímu, nerušenému stavu). Obě složky jsou volně kombinovatelné podle obecného vztahu²⁶:

$$u_c(y(x_1, x_2, \dots)) = \sqrt{\sum_{i=1}^n c_i^2 u(x_i)^2} = \sqrt{\sum_{i=1}^n u(y, x_i)^2} \quad (4)$$

Kde $u_c(y)$ je kombinovaná standardní nejistota hodnoty y a x_1, x_2, \dots, x_n jsou nejistoty navzájem nezávislých parametrů určujících nejistotu y . c_i je citlivostní koeficient vypočtený jako parciální diferenciál y podle x_i .

Pro modely, které zahrnují pouze sčítání nebo rozdíl veličin, je výpočet zjednodušen tím, že je citlivostní koeficient roven jedné. Podobně se výpočet zjednodušuje, když použijeme relativní příspěvky nejistot.

Výpočty kombinace nejistot jsou prováděny jen z dat, která testováním na statistickou významnost ($p=0,05$) prokázala vliv na celkovou nejistotu měření. Pro testování vlivů vychylujících střední hodnotu stanovení jsou využity testy shodnosti výsledků a párové testy využívající porovnání t charakteristik s kritickými hodnotami studentova rozdělení. Pro testování statistické významnosti vlivů, které navyšují rozptyl naměřených dat bylo využito F testu porovnání rozptylů. K těmto výpočtům byl použit statistický software²⁸ QC Expert 2.7.

Pro jednodušší práci s citlivostním koeficientem byly jednotlivé složky nejistoty předem přepočítány na běžně se vyskytující rozsah rušivého vlivu. Většinou se jedná o rozmezí dané fyziologickým rozpětím (biologickou variabilitou) dané sledované charakteristiky, případně jde o rozpětí fyzikálních charakteristik působících na analytický systém (proměnlivost teploty v laboratoři a podobně).

Ze složek nejistoty v Ishikawově diagramu (Obr. 2) byly do výpočtu celkové kombinované standardní nejistoty zahrnuty jen statisticky významné složky nejistoty. Zcela vynecháno bylo měření vlivu hluku. Rovněž byly při výpočtech dílčích kombinovaných nejistot vypouštěny některé komponenty výpočtu, pokud je jejich příspěvek nepatrný. Jedná se v některých případech například o nejistoty průměru. Nepatrnost vlivu nejistoty průměru je demonstrována například v kapitole 4.2.1. U malých sérií měření se závěrečnou kombinací výsledků více sérií byla přesnost průměru zvyšována eliminací odlehlých hodnot. Prostý výpočet nejistoty průměru by totiž v těchto případech naopak vedl k falešnému navýšení rozsahu kombinované nejistoty.

Pojmy výchylka a bias jsou dále v práci brány jako synonyma. Pokud není uvedeno jinak, jsou uváděny vždy jako relativní veličina v rozměrech procent.

Výsledky mezivýpočtů prováděné v tabulkovém editoru MS Excel byly zaokrouhlovány na dvě desetinná místa až po dokončení výpočtů.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Celková nejistota měření

Celková nejistota měření je nejistota s jakou stanovujeme analyty v průběhu dlouhé doby pod vlivem všech běžných rušivých vlivů s časovým odstupem dnů až měsíců. K jejímu zjištění bychom museli po dobu několika týdnů až měsíců měřit sadu aspoň třiceti kontrolních vzorků s deklarovanou koncentrací analytů předem stanovenou referenční metodou. Tuto možnost nyní nemáme. Za aspoň orientační zdroj informací o velikosti celkové nejistoty stanovení iontů budeme pro potřeby této práce považovat kombinovanou nejistotu a její složky, spočítané z výsledků měření na čtyřech kontrolních materiálech v podmínkách reprodukovatelnosti.

4.1.1 Nejistota v podmínkách reprodukovatelnosti

Základní statistický obraz o celkové nejistotě měření iontů na automatickém klinicko-biochemickém analyzátoru nám dává vyhodnocení výsledků měření kontrolního materiálu v podmínkách reprodukovatelnosti. Je zde zahrnuta většina rušivých vlivů, včetně těch, které jsou proměnné s časem a ovlivněné obsluhující osobou. Je to tedy celek nejistoty, který v sobě zahrnuje většinu níže popsaných složek nejistoty. Ve srovnání s nejistotou stanovení analytů v reálných vzorcích chybí u nejistoty vypočtené z reprodukování měření kontrolních materiálů některé vlivy, jako například vliv různorodosti iontové síly mezi vzorky, nebo vliv různorodosti koncentrace interferentů. Obě tyto charakteristiky se totiž s reprodukcí měření na jednom kontrolním materiálu nemění a jsou konstantní. Navíc se při kontrolním měření neuplatňuje ani chyba způsobená odparem vzorku. Kontrola totiž probíhá ještě před začátkem denního provozu a kontrolní vzorek tedy nečeká po napipetování na své stanovení déle než několik minut. Pro porovnání některých systematických vlivů bychom potřebovali mnoho různých kontrolních vzorků. Nyní jsou k dispozici jen čtyři (Monitrol a Biorad, každý na dvou koncentračních úrovních).

Tabulky VIII a IX v příloze zahrnují výsledky měření kontrolních materiálů za několikaměsíční období na dvou koncentračních hladinách.

K výpočtu odhadu kombinované nejistoty měření byl použit vztah³¹ doporučený firmou SEKK s r.o. v rámci externího hodnocení kvality (External Quality Assessment, Mezilaboratorní porovnávání zkoušek):

$$u_{r,tot} = \sqrt{u_{r,repr}^2 + B_r^2 + u_{r,ref}^2 + u_{r,xp}^2} \quad (5)$$

kde

$u_{r,tot}$ je kombinovaná nejistota

$u_{r,repr}$ je variační koeficient, čili relativní směrodatná odchylka měření každodenních vnitřních kontrol uvedená v procentech

$$u_{r,repr} = CV = \frac{SD}{x_{prům}} * 100 \quad (6)$$

Přičemž SD je výběrová směrodatná odchylka

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - x_{prům})^2} \quad (7)$$

B_r je vychýlení střední hodnoty z každodenních kontrol od referenční hodnoty kontrolního materiálu v procentech. Koncentrace analytů v referenčním materiálu deklaruje jeho výrobce.

$$B_r = \frac{x_{prům} - x_{refer}}{x_{refer}} * 100 \quad (8)$$

$u_{r,ref}$ je nejistota deklarované hodnoty koncentrace analytu v kontrolním materiálu (v %). Tu by měl uvádět výrobce kontrolního materiálu. V případě kontrolních materiálů Monitrol a Biorad tento údaj dostupný není. Pro účely této práce se uvede nulová nejistota.

$u_{r,xp}$ je nejistota průměru měření (v %). Ta je při jednom měření shodná s variačním koeficientem každodenního měření (% SD z průměrné hodnoty) a v případě nekonečně mnoha měření se blíží nule.

$$u_{r,xp} = \frac{SD}{x_{prům} * \sqrt{n}} * 100 \quad (9)$$

Výsledek kombinované nejistoty měření iontů na analyzátoru Dimension RxL v podmínkách reprodukovatelnosti pro každý iont na dvou koncentračních úrovních uvádí tabulka VII. Výpočet byl proveden z výsledků vnitřních kontrol za období v délce 5 měsíců. (květen-září 2009). Vlastní jednotlivé výsledky stanovení jsou v příloze v tabulce VIII. K měření byly použity kontrolní roztoky Monitrol 1 a Monitrol 2.

Tab. VII: Vypočtené charakteristiky z měření kontrolního materiálu Monitrol 1 a 2 pro výpočet kombinované nejistoty v podmínkách reprodukovatelnosti

| Iont | Referenční hodnota mmol/l | Střední hodnota mmol/l | Preciznost CV | Bias % | Nejistota Průměru (%) | Kombinovaná Nejistota (%) | Rozšířená TMU (%) |
|-----------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------------------|---------------|------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| Na⁺ | 128 | 127,12 | 1,51 | 0,69 | 0,19 | 1,66 | 5 |
| Na⁺ | 145 | 144,85 | 1,29 | 0,11 | 0,16 | 1,30 | 5 |
| K⁺ | 5,55 | 5,31 | 2,02 | 4,34 | 0,25 | 4,79 | 8 |
| K⁺ | 4,76 | 4,73 | 2,41 | 0,65 | 0,30 | 2,52 | 8 |
| Cl⁻ | 106 | 102,43 | 1,34 | 3,37 | 0,17 | 3,63 | 7 |
| Cl⁻ | 91 | 89,38 | 1,88 | 1,78 | 0,23 | 2,60 | 7 |

Podobné měření bylo provedeno na kontrolních roztocích Biorad 1 a Biorad 2 v období leden až březen 2010. Jednotlivé naměřené hodnoty jsou v tabulce IX. Vypočtené charakteristiky a kombinovaná nejistota jsou v tabulce X.

Tab. X: Vypočtené charakteristiky z měření kontrolního materiálu Biorad 1 a 2 pro výpočet kombinované nejistoty v podmínkách reprodukovatelnosti

| Iont | Referenční hodnota mmol/l | Střední hodnota mmol/l | Preciznost CV | Bias % | Nejistota Průměru (%) | Kombinovaná Nejistota (%) | Rozšířená TMU (%) |
|-----------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------------------|---------------|------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| Na⁺ | 111 | 109,30 | 1,00 | 1,53 | 0,18 | 1,84 | 5 |
| Na⁺ | 138 | 134,33 | 2,15 | 2,66 | 0,39 | 3,44 | 5 |
| K⁺ | 2,08 | 2,11 | 3,88 | 1,60 | 0,71 | 4,25 | 8 |
| K⁺ | 4,05 | 3,89 | 2,33 | 3,87 | 0,43 | 4,54 | 8 |
| Cl⁻ | 73,4 | 72,83 | 2,45 | 0,77 | 0,45 | 2,61 | 7 |
| Cl⁻ | 96,8 | 93,17 | 2,82 | 3,75 | 0,51 | 4,72 | 7 |

Hodnota kombinované nejistoty $u_{r,tot}$ by měla být menší, než rozšířená cílová nejistota měření **TMU** (viz kapitola 2.3.3.3). 95% výsledků měření by se mělo nacházet v rozmezí $\pm 2 \cdot \text{TMU}$.

Hodnota systematické výchylky stanovení je pro každý kontrolní vzorek jiná, protože systematicky působící vlivy, jako jsou iontová síla, interferenty, pH, atd jsou v každém vzorku jiné. Pro jejich statistické zhodnocení jsou čtyři kontrolní materiály nedostačující.

4.1.2 Nejistota v podmínkách opakovatelnosti

Kombinovaná nejistota vypočtená z výsledků měřených v podmínkách opakovatelnosti nám udává minimální nejistotu měření, jaké lze dosáhnout na daném analytickém systému. Její velikost je dána obsluhou neovlivnitelnými faktory, jako je nepřesnost pipetování, výkyvy napětí v síti, nehomogenity v měřeném materiálu (bublinky, mikroskopické částičky) atd. Kombinovanou nejistotu v podmínkách opakovatelnosti vypočítáváme z výsledků měření provedených v sérii ihned za sebou jdoucích vzorků. Tyto vzorky jsou z jedné lahvičky kontrolního materiálu, pipetované v jednom čase, jednou pipetou, jednou osobou, za stejných teplotních podmínek, stejné vzdušné vlhkosti. Jejich měření probíhají s minimálním časovým rozestupem, tj. přibližně jedné minuty a mezi měřeními jednotlivých vzorků neprobíhá žádná úprava analyzátoru, údržba, ani kalibrace.

Do výpočtu nejistoty v podmínkách opakovatelnosti není zahrnuta systematická výchylka průměru stanovených hodnot od deklarované koncentrace, protože vlivy působící na výchylku se s odstupem času mění a při různých měřeních opakovatelnosti bychom došli k různým závěrům. Systematická výchylka je součástí výpočtu nejistoty v podmínkách reprodukovatelnosti. Z toho důvodu také pro měření nejistoty měření v podmínkách opakovatelnosti nemusíme používat vzorek s přesně známou (deklarovanou) koncentrací. Vše vztahujeme k naměřenému průměru ať je již jakýkoliv.

Vlastní jednotlivé výsledky stanovení jsou v příloze v tabulce XI. K měření byl použit Ringerův roztok. Měření bylo třikrát opakováno s odstupem měsíce na jiném senzoru, aby bylo možno porovnat jaký je rozdíl opakovatelnosti mezi senzory (Tab. XII-XIV).

Tab. XII: Charakteristiky první série měření
v podmínkách opakovatelnosti

| | Na⁺ mmol/l | K⁺ mmol/l | Cl⁻ mmol/l |
|----------------|--|---------------------------------------|--|
| SD | 0,62 | 0,03 | 1,04 |
| Průměr | 152,83 | 4,11 | 142,83 |
| CV | 0,40 | 0,79 | 0,73 |
| u.prum. | 0,10 | 0,19 | 0,17 |
| u.komb. | 0,42 | 0,81 | 0,75 |

Tab. XIII: Charakteristiky druhé série měření
v podmínkách opakovatelnosti

| | Na⁺ mmol/l | K⁺ mmol/l | Cl⁻ mmol/l |
|----------------|--|---------------------------------------|--|
| SD | 0,68 | 0,04 | 0,99 |
| Průměr | 151,89 | 4,12 | 143,5 |
| CV | 0,45 | 0,93 | 0,69 |
| u.prum. | 0,10 | 0,22 | 0,16 |
| u.komb. | 0,46 | 0,96 | 0,71 |

Tab. XIV: Charakteristiky třetí série měření
v podmínkách opakovatelnosti

| | Na⁺ mmol/l | K⁺ mmol/l | Cl⁻ mmol/l |
|----------------|--|---------------------------------------|--|
| SD | 0,77 | 0,04 | 1,00 |
| Průměr | 156,33 | 4,18 | 146,22 |
| CV | 0,49 | 0,92 | 0,69 |
| u.prum. | 0,12 | 0,22 | 0,16 |
| u.komb. | 0,50 | 0,94 | 0,70 |

Měření za podmínek opakovatelnosti po vizualizaci do podoby sloupcového grafu (Obr. 3) nám může napovědět o původu nejistoty více. Nad sebou uložené grafy pro jednotlivé ionty ukazují, že část výchylek od střední hodnoty je u všech tří iontů shodná a jen některé jsou individuální. Případy, kdy jsou všechny tři ionty vychýleny k vyšší, či nižší stanovené koncentraci musí být způsobeny vlivem působícím na celkovou vlastnost nasátého vzorku, tedy například nepřesnost pipetování vzorku či ředícího roztoku, nebo výkyv v napětí elektrické sítě. Výchylky neshodující se u jednoho vzorku ve všech třech iontech jsou způsobeny vlivem působícím individuálně na každou elektrodu zvlášť, například mikroskopické částičky ve vzorku. Většina vlivů působících individuálně na každou elektrodu zvlášť je pravděpodobně způsobených mikroskopickými lokálními fyzikálně

chemickými vlivy, jejichž podchycení není v možnostech této práce. Jejich přítomnost nedokážeme předpovídat a považujeme je za náhodné. Grafická vizualizace je v příloze (Obr.3).

Pro jednotlivé ionty je podíl základní nejistoty při opakování měření $u_{\text{opakov.}}$:

| | |
|---------------------------|---------------|
| $u_{\text{Na,opakov.}}$: | 0,46 % |
| $u_{\text{K,opakov.}}$: | 0,90 % |
| $u_{\text{Cl,opakov.}}$: | 0,72 % |

4.2 Podchytitelné složky nejistoty

Rozdíl mezi celkovou nejistotou a nejistotou v podmínkách opakovatelnosti tvoří podíl nejistoty způsobený vlivy, které mají časovou a interindividuální proměnlivost. Tyto vlivy jsou zpravidla již lépe zjištěitelné a řadu z nich můžeme omezit, či dokonce zcela odstranit. Základním předpokladem omezení či odstranění těchto rušivých vlivů je jejich identifikace a kvantifikace. V následujících kapitolách budou individuálně rozebrány.

4.2.1 Kalibrace

Kalibrace slouží k určení závislosti mezi koncentrací analytu a odezvou analytického systému. Zpětně pak u jednotlivých vzorků z odezvy odečítáme na základě kalibrační závislosti koncentraci analytu. Nepřesnost, které se dopustíme při kalibraci má trvalý vliv na celou sérii následně měřených vzorků. Výchyly jednotlivých průměrů koncentrací stanovených po jednotlivých kalibracích jsou podkladem pro výpočet té části nejistoty, která je dána nepřesností kalibrace. Tabulka XV. zobrazuje průměrné hodnoty koncentrací iontů stanovených po jednotlivých kalibracích a z nich vypočtené charakteristiky.

Tab. XV: Průměrné hodnoty stanovované po jednotlivých kalibracích a zhodnocení příspěvku kalibrace k nejistotě měření

| | Na⁺ mmol/l | K⁺ mmol/l | Cl⁻ mmol/l |
|------------------------------|--|---------------------------------------|--|
| Kal-1 | 151,2 | 4,10 | 143,6 |
| Kal-2 | 152,0 | 4,12 | 143,4 |
| Kal-3 | 151,4 | 4,12 | 143,0 |
| Kal-4 | 152,2 | 4,12 | 143,2 |
| Kal-5 | 152,4 | 4,14 | 144,4 |
| Kal-6 | 152,6 | 4,16 | 143,8 |
| <hr/> | | | |
| Průměr | 151,97 | 4,13 | 143,57 |
| SD | 0,56 | 0,02 | 0,50 |
| CV_{kal.} | 0,37 | 0,50 | 0,35 |
| u_{prům.kal.} | 0,07 | 0,09 | 0,06 |
| u_{kal.} | 0,37 | 0,51 | 0,35 |

Kalibrace a měření mezi nimi byly provedeny nejrychlejším možným způsobem. Mezi jednotlivými měřeními nebyl proveden žádný jiný úkon, kromě kalibrace mezi sériemi vzorků. Pokus byl proveden na Ringerově roztoku jako vzorku. Jednotlivé naměřené hodnoty jsou v příloze v tabulce XVI.

Do odhadu celkové nejistoty měření iontů použijeme variační koeficient mezikalibračních průměrů měření $CV_{kal.}$ a nejistotu odhadu průměru $u_{prům.kal.}$. Z nich vypočítanou kombinovanou nejistotu mezikalibračních stanovení považujeme za vyjádření vlivu nejistoty kalibrace na celkovou nejistotu měření.

$$u_{kalib.} = \sqrt{CV_{kal.}^2 + u_{prům.kal.}^2} \quad (10)$$

Jak již bylo řečeno v kapitole 3.3.1., vliv nejistoty průměru na celkový výsledek je nepatrný. V tomto případě jde spíše o demonstraci této skutečnosti.

Pro jednotlivé ionty je kalibrační podíl u_{kalib} na celkové nejistotě měření:

| | |
|------------------------|---------------|
| $u_{\text{Na,kalib.}}$ | 0,37 % |
| $u_{\text{K,kalib.}}$ | 0,51 % |
| $u_{\text{Cl,kalib.}}$ | 0,35 % |

4.2.2 Odpar vzorku

Odpar vzorku je velmi proměnlivý vliv na nejistotu měření. Je ovlivněn

- 1) Teplotou okolí
- 2) Vzdušnou vlhkostí
- 3) Poměrem objemu vzorku k ploše, ze které se odpařuje (k ploše hladiny)
- 4) Teplotou vzorku

Za standardní podmínky vlivu odparu vzorku na nejistotu měření byla zvolena laboratorní teplota 26,5°C, 36% vlhkost vzduchu a 500 μl vzorku ve vzorkovničce (sample cup). Víčko s otvorem bylo po dobu odparu uzavřené, takže odpar byl jen přes malé okénko.

Jako doplňující pokus (Obr. 5 v příloze) byl sledován vliv odparu na 200 μl vzorku při 24°C a při 9°C (lednice) po dobu 6,5 hodiny. Kontrolním vzorkem je uzavřená vzorkovnička, jejíž obsah se odpařoval jen několik minut během měření. Vážení vzorku je kontrola, že změna koncentrace iontů je opravdu způsobena pouze odparem a nikoliv jiným vlivem (adsorpce, znečištění). Doba měření v délce šesti a půl, či devíti hodin byla zvolena proto, že je dostatečně dlouhá k jednoznačnému zaznamenání změněné koncentrace, ale nestačí ještě na úplné odpaření vzorku. Navíc je to doba, po kterou je v laboratoři standardní provoz.

Tab. XVII: Navýšení koncentrace iontů odparem za časový úsek 9 hodin (vzorek 500 μl)

| Čas (hodiny) | Na^+ mmol/l | K^+ mmol/l | Cl^- mmol/l |
|---|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| 0 | 140,00 | 3,46 | 103,33 |
| 9 | 150,83 | 3,85 | 112,50 |
| Vypočtená hmotnost vzorku po odparu (mg) | 464,10 | 450,20 | 459,30 |

Po devíti hodinách vážil vzorek 460 mg +/- 10mg

Průměr z očekávaných hmotností spočítaný ze změn koncentrací iontů byl 457,86 mg. Očekávaná a skutečná hmotnost po odparu se liší o -0,46% (Interval spolehlivosti: -1,71% až 2,64%) a prokazuje, že zkoncentrování vzorku je opravdu výsledkem odparu. Jiné vlivy (adsorpce, znečištění) mají méně než 5% význam (zvážená a vypočtená hmotnost vypařené vody se liší o méně než 5%).

Za 9 hodin odparu v zavíčkované vzorkovničce za laboratorní teploty (26,5°C) došlo nárůstu koncentrace analytů o 8,43%. Adekvátní změna za hodinu ve stejných podmínkách je 0,94%. Graficky je odpar znázorněn v příloze (Obr. 4) na sodném iontu jako příkladu. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce XVII.

Každý vzorek je vystaven odparu po jinou dobu. Doba čekání od opuštění pipety po nasátí jehlou analyzátoru se pohybuje od několika minut do hodiny, někdy i déle. Pokud bychom pouhým kvalifikovaným odhadem stanovili průměrnou dobu odparu na 30 minut, pak je průměrná výchylka stanovení způsobená odparem asi půl procenta: 0,47%. V případě, že je vzorku pouze 200 µl a vzorkovnička čeká s otevřeným víčkem, pak je tato výchylka za půl hodiny dokonce kolem 2,6%.

Testem shodnosti průměrů byly porovnány střední hodnoty série měření v podmínkách opakovatelnosti a stejná série s výsledky povýšenými o koncentrační přírůstek vlivem odparu za půl hodiny. Kritická hodnota 2,00 je menší než vypočtená t-statistika 2,79 a dokazuje tak statisticky významný rozdíl průměrné naměřené hodnoty po půlhodině čekání vzorku na vlastní proces měření.

Výsledek nejistoty pro jednotlivé ionty byl sjednocen do jedné průměrné hodnoty, protože odpar působí na zkoncentrování všech iontů stejně a malé rozdíly mezi výsledky jsou způsobeny pouze rozdílným vlivem zaokrouhlování čísel v různých řádových hodnotách.

Je třeba si uvědomit, že odpar vzorku snižuje kvalitu měření jen jednostranně, tedy směrem k falešnému zvýšení koncentrace iontů.

Vzhledem k tomu, že průměrná doba čekání vzorku na stanovení je odhadnuta, pak je třeba i výpočet průměrné výchylky stanovení vlivem odparu vzorku brát spíše jako

kvalifikovaný odhad, než přesný výpočet. Do výpočtu z tohoto důvodu nemá smysl ani vkomponovávat složku nejistoty průměru.

Pro účely výpočtu celkové kombinované nejistoty budeme dále shodně pro všechny ionty využívat stejnou hodnotu výchylky:

| | | |
|----------------------------|---------------|-----------------------------------|
| u_{odpar.}: | 0,47 % | (všechny tři ionty shodně) |
|----------------------------|---------------|-----------------------------------|

4.2.3 Rušení elektromagnetickým zářením

Elektromagnetické záření je obecně považováno za rušivý prvek s vlivem na elektroniku. V řadě příruček k nejrůznějším přístrojům včetně biochemických analyzátorů je poznámka upozorňující na zákaz používání mobilních telefonů v blízkosti přístroje. Oprávněnost této poznámky a hloubka jejího významu byla sledována na pokusu s měřením koncentrace iontů v Ringerově roztoku nejprve v podmínkách opakovatelnosti bez vlivu elektromagnetického záření a po té pod jeho vlivem. Technicky byl pokus uspořádán tak, že mobilní telefon (Siemens C55) byl položen přímo na senzoru (vzdálenost od ISE asi 1 cm). Opakovaným voláním bylo vyvoláváno a ukončováno každých 20 sekund zvonění příchozího hovoru. Tato činnost mobilního telefonu je největším zdrojem elektromagnetického záření a je to patrné například po přiložení mobilního telefonu navazujícího spojení ke klasickému starému počítačovému monitoru, nebo k reproduktorům. Kompletní tabulka hodnot naměřených výsledků je v příloze (Tab. XVIII) a vypočtené charakteristiky v tabulce XIX. Do hodnoty pro výpočet nejsou zahrnuty první dvě hodnoty, protože jsou zatíženy vlivem odlišné kondice ISE.

Tab. XIX: Srovnání kvality měření v klidu a při rušení elektromagnetickým zářením se zdrojem ve vyzvánějícím mobilním telefonu

| | | Na⁺ mmol/l | K⁺ mmol/l | Cl⁻ mmol/l |
|--------------------------|--------------------------------|--|---------------------------------------|--|
| Klidový stav | Průměrná koncentrace | 152,83 | 4,11 | 142,83 |
| | SD_{klid} | 0,62 | 0,03 | 1,04 |
| | CV_{klid.} | 0,40 | 0,79 | 0,73 |
| | u_{prům,klid.} | 0,15 | 0,01 | 0,25 |
| Rušení vyzváněním | Průměrná koncentrace | 153,4 | 4,12 | 143,26 |
| | SD_{mobil} | 1,10 | 0,04 | 1,21 |
| | CV_{mobil.} | 0,71 | 1,00 | 0,84 |
| | u_{prům,mobil.} | 0,24 | 0,01 | 0,27 |
| | Bias % | 0,37 | 0,22 | 0,30 |

Podíl elektromagnetického záření na nejistotě měření iontů je patrný z navýšení rozptylu a výchyly hodnot po rušení vyzvánějícím mobilním telefonem. Kvantifikace tohoto podílu se dopočte jako rozdíl nejistoty při rušení měření a bez rušení.

Nejprve spočteme kombinované nejistoty stanovení v klidu (11) a při vyzvánění mobilního telefonu (12).

$$u_{\text{klid}} = \sqrt{CV_{\text{klid}}^2 + u_{\text{prům,klid}}^2} \quad (11)$$

$$u_{\text{mobil}} = \sqrt{CV_{\text{mobil}}^2 + u_{\text{prům,mobil}}^2} \quad (12)$$

Dále spočteme (13) podíl vlivu elektromagnetického záření z vyzvánění mobilu $u_{\text{navýšení}}$ na celkovou nejistotu měření v podmínkách opakovatelnosti.

$$u_{\text{navýšení}} = \sqrt{u_{\text{mobil}}^2 - u_{\text{klid}}^2} = \sqrt{CV_{\text{mobil}}^2 + u_{\text{prům,mobil}}^2 - CV_{\text{klid}}^2 - u_{\text{prům,klid}}^2} \quad (13)$$

$$u_{\text{navýšení,Na}} = 0,6205$$

$$u_{\text{navýšení,K}} = 0,6111$$

$$u_{\text{navýšení,Cl}} = 0,4346$$

Kombinovaná nejistota způsobená elektromagnetickým zářením vyzvánějícího mobilního telefonu se vypočte (14) z výchytky středních hodnot přes a po rušení a navýšení rozptylu hodnot.

$$u_{\text{el.mg}} = \sqrt{u_{\text{navýšení}}^2 + B_{\text{el.mg}}^2} \quad (14)$$

Pro jednotlivé ionty je podíl elektromagnetického rušení (mobilní telefon siemens c55) na nejistotě měření $u_{\text{el.mg}}$:

$$u_{\text{Na,el-mg}}: \quad \mathbf{0,72 \%}$$

$$u_{\text{K,el-mg}}: \quad \mathbf{0,65 \%}$$

$$u_{\text{Cl,el-mg}}: \quad \mathbf{0,53 \%}$$

Tyto údaje jsou však výsledkem po rušení rychle periodicky vyzvánějícím mobilním telefonem položeným přímo na senzoru. Taková situace nikdy v praxi nenastává a je tedy údajem o maximální technické možnosti rušení měření elektromagnetickým zářením se zdrojem v mobilním telefonu. Naměřené hodnoty proto v žádném případě nelze započítat do celkové kombinované nejistoty. Tento pokus má za cíl ukázat, že ani tak bezprostřední blízkost mobilního telefonu a volba jeho činnosti na maximální rušivý projev nemá za následek přesažení limitů nejistoty měření nad TMU (Tab. III). Měření iontů na přístroji Dimension RxL je tedy robustní k používání takového mobilního telefonu, jakým je Siemens C55 v blízkosti analyzátoru. Zhodnocením statistické významnosti rozdílnosti průměrů a rozptylů měření v klidu a pod vlivem rušení periodicky vyzvánějícím mobilním telefonem se navíc ani v tomto extrémním případě nepotvrdila statistická významnost rozdílnosti průměrných hodnot stanovení. Test shody rozptylů prokazuje statisticky významný rozdíl jen pro sodné ionty ($F_{\text{Na}}=3,08$, $F_{\text{Na,krit}}=2,32$). Vliv běžného elektromagnetického záření na celkovou kombinovanou nejistotu budeme pro naše účely považovat za nulový.

4.2.4 Teplota

Byla proměřena závislost odezvy senzoru (stanovené koncentrace iontů) na změně jeho teploty. Teplotní rozsah 19,2°C až 30,2°C byl takto široký zvolen proto, aby bylo možno přesněji analyzovat závislosti vychýlení stanovených hodnot na teplotě (Tab. XX). Data, ze kterých vychází výpočet závislosti jsou v příloze v tabulce XXI. Průměrné hodnoty stanovených koncentrací při horní a dolní teplotní hranici měření a z nich spočítané změny měření připadající na změnu teploty o 1°C, jsou v tabulce XXIII. Relativní výchylka (Bias %, Tab. XXIII) vyjadřuje změny ve výsledcích měření připadající na variabilitu teploty zjištěnou v laboratoři.

Tab.XX: Závislost odezvy senzoru (c_{Na^+} , c_{K^+} , c_{Cl^-}) na teplotě (t , °C)

| Iont | Závislost odezvy na teplotě (°C) | Koeficient determinace |
|-----------------------|---|-------------------------------|
| Na⁺ | $c_{\text{Na}^+} = 0,0605t + 154,88$ | $R^2 = 0,0736$ |
| K⁺ | $c_{\text{K}^+} = 0,0080t + 3,9554$ | $R^2 = 0,3250$ |
| Cl⁻ | $c_{\text{Cl}^-} = 0,7908t + 122,41$ | $R^2 = 0,8806$ |

Tab. XXII: Vliv teploty na změnu odezvy senzoru

| | Δc_{Na^+} mmol/l | Δc_{K^+} mmol/l | Δc_{Cl^-} mmol/l |
|---|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Změna stanovené koncentrace v rozmezí 19,2 a 30,2°C | 0,67 | 0,09 | 8,70 |
| Rozpětí stanovených koncentrací při konst. teplotě, tj. rozmezí dané $\pm 2\text{SD}$ na obě strany od průměrné hodnoty | 2,47 | 0,13 | 4,17 |

Již z pouhého prohlédnutí výsledků regrese a hodnot v tabulce XXII, je patrné, že na draselný a sodný iont má teplota v rozsahu 19,2°C až 30,2°C zanedbatelný význam. Můžeme srovnat směrodatnou odchylku získanou z výsledků v podmínkách opakovatelnosti s teplotní změnou průměrné stanovené koncentrace a zjistíme, že 95% hodnot ($\pm 2\text{SD}$) pro konstantní teplotu se nachází ve větší vzdálenosti od střední hodnoty, než průměrné hodnoty stanovené při teplotách 19,2°C a 30,2°C. Tento fakt ještě více vynikne, když si uvědomíme, že senzor mění svou teplotu během dne jen úzce mezi 27,2°C až 29,2°C (minimální a maximální zjištěná hodnota). Pro draselný i sodný iont je navíc korelace regresní závislosti (R^2) malá (Tab.XX).

Chloridový iont vykazuje větší změnu odezvy senzoru v závislosti na teplotě, než odpovídá prostému rozptylu hodnot a spolehlivost závislosti je větší než u sodného a draselného iontu. Tento význam je však sledovatelný jen na velkém teplotním rozsahu (19,2°C až 30,2°C). Pro běžné výkyvy teploty senzoru (27,2°C až 29,2°C) je změna koncentrace pouhých 1,50 mmol/l, tedy méně, než je rozptyl 95% hodnot při konstantní teplotě (rozmezí 4,17 mmol/l). Přesto však na rozdíl od draselného a sodného iontu má smysl započítávat nejistotu stanovení chloridů závislou na výkyvech teploty senzoru, protože je dobře korelovaná.

Abychom mohli vypočítat vliv změny teploty na nejistotu stanovení iontů, museli bychom porovnat rozptyly měření za konstantní teploty a měření za teplotního rozmezí. V tomto teplotním rozmezí by však každý významný teplotní přírůstek musel být zastoupen statisticky významným souborem měření. To by zahrnovalo pro rozmezí 19,2°C až 30,2°C kolem dvou tisíc naměřených hodnot pro každý iont (pro každý přírůstek o 0,2°C 30 měření, aby bylo možno použít Gaussovo rozdělení). To je u netermostatovaného přístroje technicky velmi obtížný úkol. Byla tedy zvolena metoda, kdy se z koncentrací naměřených při teplotě 20,5°C ($\pm 0,1$) a 30,1°C ($\pm 0,1$) vypočetly průměry a z rovnice přímky proložené těmito body vypočítána změna příslušející teplotnímu rozmezí 2°C. Byla tak získána hodnota výchyly (Bias %, Tab. XXIII) stanovení iontů vlivem teploty v běžném rozmezí, ke kterému dochází na senzoru přístroje Dimension RxL.

Tab. XXIII: Odvození výchyly stanovení vlivem běžných teplotních změn v laboratoři

| | Na⁺ mmol/l | K⁺ mmol/l | Cl⁻ mmol/l |
|--|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Průměrná stanovená koncentrace pro 20,5°C | 155,92 | 4,11 | 138,85 |
| Průměrná stanovená koncentrace pro 30,1°C | 156,42 | 4,19 | 146,17 |
| Změna stanovení koncentrace při změně teploty o 1°C | 0,05 | 0,01 | 0,76 |
| Odezva při 28°C (střední teplota senzoru) | 156,31 | 4,17 | 144,57 |
| Bias % odpovídající změnám o 2°C kolem 28°C | 0,07 | 0,42 | 1,05 |

Jako příspěvek k celkové nejistotě měření iontů budeme počítat procentuelně vyjádřenou výchyly měření odpovídající změně o 2°C (% Bias / 2°C) uvedené v posledním

řádku tabulky XXIII. Tuto hodnotu použijeme pro výpočet celkové kombinované nejistoty i přes to, že v teplotním rozmezí $\pm 1^\circ\text{C}$ (o 2°C) se průměry naměřených hodnot statisticky liší jen nevýznamně ($p=0,05$). Důvodem je fakt, že hodnota výchyly (Bias %) není získána statistickým zhodnocením dvou měření při teplotách lišících se o 2°C , ale regresí z širšího a tedy i významnějšího teplotního rozmezí. I při sebemenším rozměru je tedy dílem statisticky prokázáno vlivu teploty na výchylku stanovené iontů. Testování na statistickou významnost v tomto případě postrádá smyslu.

Do celkové nejistoty měření budeme započítávat vliv teplotních výkyvů jen pro chloridové ionty, protože pro zbývající dva ionty je závislost níže korelovaná.

| | |
|--|---------------|
| $u_{\text{Cl,teplota}}$: | 1,05 % |
|--|---------------|

4.2.5 Kondice ISE v senzoru

I velmi základní literatura včetně středoškolských učebnic uvádí, že iontově selektivní elektroda musí být kondiciovaná před každým použitím. Je známá a ve všech příbalových letácích k elektrodám uvedená nutnost namáčet elektrody v roztocích příslušného iontového složení. V dokumentaci k analyzátorům však chybí údaj o kvalitě prvních měření. Předpokládá se pravděpodobně, že když je ISE v senzoru po celý den omývána roztoky (IMT Standard A, IMT Standard B, IMT Flush Solution, IMT Sample Diluent, IMT Dilution Check, Salt Bridge Solution), tak jsou elektrody vlastně trvale v prostředí, které je udržuje v stabilní kondici a schopné měřit nezávisle na tomto vlivu.

Pro pokus ověřující tuto charakteristiku bylo zvoleno vyhodnocení průměrné výchyly prvních až čtvrtých naměřených hodnot po dvouhodinových pauzách ve srovnání s průměrem stanovení v sérii od třetí hodnoty dále ($B(\%)_{\text{prům},j}$).

$$B(\%)_{\text{prům},j} = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^n \frac{\left(x_j - \frac{1}{n-2} \sum_{i=3}^n x_{i,j}\right) * 100}{\frac{1}{n-2} \sum_{i=3}^n x_{i,j}} \quad (15)$$

Kde: x_j je první, druhá nebo další měřená hodnota v každé sérii

$x_{i,j}$ jsou jednotlivé stanovené hodnoty v sériích (třetí až n-tá hodnota)

n je počet měření v sérii

m je počet sérií

Tabulky XXIV-XXVI v příloze ukazují naměřené hodnoty jednotlivých sérií měření. V tabulce XXVII jsou vypočtené relativní odchýlení (Bias %) prvních čtyř stanovení v sérii.

Tab. XXVII: Relativní vychýlení hodnot v pořadích od průměru měření série

| | Na⁺ (%) | K⁺ (%) | Cl⁻ (%) |
|---|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Průměrné % vychýlení 1. měřené hodnoty | -0,89 | -0,93 | -2,27 |
| Průměrné % vychýlení 2. měřené hodnoty | -0,12 | 0,73 | -0,44 |
| Průměrné % vychýlení 3. měřené hodnoty | -0,34 | -0,32 | -0,01 |
| Průměrné % vychýlení 4. měřené hodnoty | -0,32 | -0,32 | -0,48 |

Abychom mohli výsledky hodnotit jako normálně rozdělené, potřebovali bychom aspoň 30 hodnot každého měření a aspoň 30 prvních hodnot ze sérií měření. To by představovalo 900 stanovení. Takový soubor měření není k dispozici. Proto byl učiněn výběr z menších souborů a za statisticky významnou odchylku je nutno považovat větší odchýlení, než jednotka nejmenšího desetinného místa škály, ve které se iont měří. V malém souboru dat totiž zaokrouhlení ta toto desetinné místo tvoří řádově srovnatelnou chybu jako samotný rozptyl hodnot. Takovou výchytkou je 0,1 mmol/l pro K⁺ a 1 mmol/l pro Na⁺ a Cl⁻. Při procentuálním (vzhledem ke středním měřeným hodnotám Na⁺ 151 mmol/l, K⁺ 4,4 mmol/l a Cl⁻ 135 mmol/l) vyjádření je to pro K⁺ 2,27%, pro Na⁺ 0,66% a pro Cl⁻ 0,74%. Z takto nastavených podmínek vyplývá, že statisticky významně se odchylojí od průměru pouze první měření sodného a chloridového iontu (Tab. XXVII).

Z výsledku měření a provedených výpočtů lze konstatovat, že po dvouhodinové pauze je první naměřená hodnota sodného iontu průměrně o 0,89% (1,34 mmol/l) nižší než odpovídá opakováním zjištěnému průměru a hodnota chloridového iontu průměrně o 2,27% (3,06 mmol/l) nižší, než odpovídá opakováním zjištěnému průměru na témže vzorku. Pro

draselný iont nelze z dostupných dat spolehlivě určit, zda je první hodnota v sérii statisticky významně odchylená od průměrných naměřených hodnot celých sérií měření.

Pro jednotlivé ionty je podíl vlivu kondice ISE na celkovou nejistotu měření:

| | |
|-------------------------------------|---|
| $u_{Na,kondice}$: | 0,89 % |
| $u_{K,kondice}$: | bez prokázaného statisticky významného vlivu (aprox. k 0,00 %) |
| $u_{Cl,kondice}$: | 2,27 % |

4.2.6 Stáří ISE

S opotřebením iontově selektivní membrány na povrchu elektrod v senzoru dochází ke snížení schopnosti elektrody interagovat s ionty na svém povrchu. To znamená, že dochází ke snížení citlivosti měření. Každý moderní analyzátor má tuto skutečnost ošetřenou třemi způsoby. Jedná se o časové omezení použití senzoru, omezení použití na předepsaný počet měření a omezení měření jakmile směrnice kalibrační závislosti klesne pod výrobcem určenou hodnotu.

Byly provedeny dvě série dvaceti měření (Tab. XXVIII v příloze). První série jednoho roztoku byla proměřena dvacetkrát rychle za sebou na starém senzoru v době konce jeho životnosti a druhá série téhož roztoku byla proměřena stejným způsobem na novém senzoru. Aby do pokusu nezasahoval zvýšením nejistoty vliv kondicionace elektrod, byly první tři hodnoty obou sérií měření vynechány z výpočtů. Z obou řad sedmnácti výsledků byly spočteny rozptyly a srovnány F-testem (Tab. XXIX).

Tab. XXIX: Test shodnosti rozptylů měření na staré a nové ISE
(porovnání citlivosti)

| | Rozptyl staré ISE | Rozptyl nové ISE | Poměr rozptylů (F) | Kritická hodnota ($F_{krit.}$) | Prorovnání rozptylů |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|--|----------------------------|
| Na⁺ | 0,60 | 0,57 | 1,05 | 2,38 | Shodné |
| K⁺ | $1.54 \cdot 10^{-3}$ | $0.59 \cdot 10^{-3}$ | 2,63 | 2,38 | Rozdílné |
| Cl⁻ | 1,03 | 0,63 | 1,63 | 2,38 | Shodné |

Na základě testu shodnosti rozptylů jeví odlišnost v souvislosti se stářím senzoru pouze citlivost stanovení draselných iontů. Při nahlédnutí na charakter dat (Tab. XXVIII v příloze), kdy se mezi stejnými číselnými výsledky o minimální hodnotu (0,1 mmol/l) u nového senzoru odlišuje jedno stanovení a u starého senzoru tři stanovení ze sedmnácti, pak bude pravděpodobně vhodnější řídit se robustním testem, který statistickou významnost nepotvrzuje. Rozdíl mezi citlivostí stanovení pomocí starého a nového senzoru je při dodržení pravidel nastavených výrobcem zanedbatelný. Do výpočtu celkové kombinované nejistoty tento vliv započítávat nebudeme.

4.2.7 Interference

Vliv interferentů z řad iontů konkurujících měřeným iontům na iontově selektivní membráně o místo na ionoforech je známý. Mezi analytickými systémy se velmi liší. Sledován byl vliv iontů, jejichž interference je fyzikálně možná a zároveň se v lidském séru vyskytují ve významném množství: sodný a draselný kationt mezi sebou, dále vápenatý a hořečnatý kationt. Z aniontů jsou to síranový, hydrogenuhličitanový a hydrogen i dihydrogenfosforečnanový.

Pro sledování interference mezi kationty byl připraven základní roztok směsi chloridů (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}). K jeho alikvotům byla přidána vždy jedna ze sloučenin navíc. Přídavek byl učiněn rozpuštěním krystalické látky v základním roztoku tak, aby nedošlo k významnému navýšení objemu roztoku (změna objemu o promile, změny koncentrací přídavkem o desítky procent).

Tab. XXX: Interference hlavních kationtů séra mezi sebou

| | Na^+ mmol/l | | K^+ mmol/l | |
|---|----------------------|------|---------------------|------|
| | Koncentrace | SD | Koncentrace | SD |
| Základní roztok | 127,8 | 0,42 | 2,98 | 0,04 |
| Přídavek 3,27 mmol/l K^+ | 128 | 0,67 | 6,27 | 0,05 |
| Přídavek 33,02 mmol/l Na^+ | 161,4 | 1,17 | 3,01 | 0,03 |
| Přídavek 2,41 mmol/l Ca^{2+} | 128 | 0,47 | 2,99 | 0,03 |
| Přídavek 2,66 mmol/l Mg^{2+} | 128,3 | 0,67 | 3,00 | 0,00 |

Z tabulky XXX vzájemné interference kationtů je patrné, že se naměřené koncentrace jednotlivých iontů neliší mezi roztokem s nízkou a vysokou koncentrací interferentu. Koncentrace interferentů byly zvoleny tak, aby pokryly možná rozmezí vyskytující se v lidském séru. Sodný, draselný, vápenatý a hořečnatý iont svými změnami koncentrace ve zvolených rozmezích nezměnily statisticky významně odezvy iontově selektivních elektrod vůči sodným či draselným iontům. Byl proveden test shodnosti průměrů (Tab. XXXI) stanovených koncentrací iontů v sériích lišících se mezi sebou koncentrací interferujícího iontu. Z porovnání t charakteristik s kritickými hodnotami studentova rozdělení vyplývá, že sledované ionty neinterferují se stanovením sodných a draselných iontů.

Tab XXXI: Test shodnosti stanovení iontů v přítomnosti interferentů a bez nich

| Interferent | t_{Na} | t_K | t_{Na, krit} | t_{K, krit} | Komentář |
|------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------------|--|
| Na⁺ | nelze | 1,80 | nelze | 2,10 | Na⁺ neinterferuje s K⁺ |
| K⁺ | 0,80 | nelze | 2,10 | nelze | K⁺ neinterferuje s Na⁺ |
| Ca²⁺ | 1,00 | 0,60 | 2,10 | 2,10 | Ca^{+II} neinterferuje s Na⁺ ani K⁺ |
| Mg²⁺ | 1,99 | 0,60 | 2,10 | 2,10 | Mg^{+II} neinterferuje s Na⁺ ani K⁺ |

Pro sledování interferencí na chloridové ISE byly zvoleny roztoky síranu sodného, síranu hořečnatého (oba užity současně i při sledování vlivů iontové síly), hydrogenuhličitanu sodného, hydrogenfosforečnanu sodného a dihydrogenfosforečnanu sodného.

Interference síranů s chloridy byla proměřena na nezávislých roztocích MgSO₄ a Na₂SO₄. Společným vyhodnocením bylo zjištěno, že do 60 mmol/l síranových iontů je možno závislost odezvy chloridové elektrody považovat za lineární a vyjádřit ji rovnicí $y = 1,006x$ o spolehlivosti $R^2 = 0,9785$. Do této koncentrace lze tedy interferenci síranů k chloridům aproximovat na poměr 1:1. Ačkoliv se tato skutečnost zdá významná, je snížena na úroveň bezvýznamnosti, když si uvědomíme, že v lidském séru nepřesahuje koncentrace síranových iontů běžně úroveň nad 1 mmol/l. V případě léčebného intravenózního podání síranu hořečnatého lze podat i 20 ml 10% MgSO₄ s předpokládaným teoretickým zvýšením síranů v séru o asi 3,33 mmol/l. Toto zvýšení na cca 4 mmol/l síranů v litru séra však má trvání jen několika minut. Pouze bezprostřední odběr krve po podání takového množství síranů intravenózně by zvýšil odezvu chloridové elektrody nad meze nejistoty stanovení chloridů. To

je však jev natolik zřídka, že jej nelze započítat mezi pravidelné zdroje nejistoty měření iontů.

Určení míry interference hydrogenuhličitanového aniontu (bikarbonátu) s chloridy na ISE není možné pouhým proměření roztoku této soli. Analyzátor totiž používá pro detekci vzduchových bublin v analytickém systému měření povrchového napětí a vzorek roztoku NaHCO_3 do koncentrací 50 mmol/l vyhodnocuje falešně jako vzduchovou bublinu. Tato technická nepříjemnost byla vyřešena smícháním roztoku NaHCO_3 s krevním sérem v poměru 1:1. Výsledky stanovení iontů v této směsi byly porovnány s výsledky stejného séra naředěného deionizovanou vodou 1:1. Vliv rozdílné iontové síly je minimální a byl zanedbán. Vzorek séra ředěného vodou měl stanoveno 49,33 mmol/l chloridů a vzorek séra ředěného roztokem NaHCO_3 (po smíchání 24,41 mmol/l) 59,5 mmol/l. Navýšení o 10,17 mmol/l tedy připadá na vliv 24,41 mmol/l bikarbonátu. Při fyziologickém rozmezí bikarbonátu v séru zdravé populace (22-26 mmol/l) je vliv biologické variability bikarbonátu v séru ($\text{SD} = 1$ mmol/l) na nejistotu stanovení chloridů (102 mmol/l): $\text{CV}_{\text{Cl,bikarb.}} = 0,4083 \%$.

V případě fosforečnanů byl u roztoku NaH_2PO_4 řešen stejný technický problém jako u NaHCO_3 . Roztok Na_2HPO_4 tyto potíže sice nečinil, ale přesto byl proveden pokus s měřením interferencí hydrogenfosforečnanového aniontu s chloridy na ISE jak přímým měřením čistého roztoku Na_2HPO_4 , tak i jeho směsi se sérem 1:1 pro porovnání obou způsobů. Pokus byl rozdělen na pokus s hydrogenfosforečnanem a dihydrogenfosforečnanem.

Hydrogenfosforečnanový aniont byl v roztoku o koncentraci 24,83 mmol/l smíchán se sérem 1:1 a byly stanoveny koncentrace chloridových iontů: 63,5 mmol/l. Naměřené hodnoty byly porovnány s koncentrací chloridů v séru naředěném 1:1 pouhou vodou: 47,75 mmol/l. Rozdíl 15,75 mmol/l je vliv 12,42 mmol/l hydrogenfosforečnanu (zředěn sérem na polovinu). Chloridová ISE je tedy 1,27-krát citlivější k hydrogenfosforečnanům, než k chloridům. Biologická variabilita fosfátů je 12,67%. I přes tyto vysoká čísla je vliv fosfátů na nejistotu stanovení chloridů nízký, protože koncentrace ionizovaných (nikoliv celkových) fosfátů v séru je pouhých 0,5 mmol/l. Hydrogenfosforečnan tvoří v soustavě fosfátového amfolytu za fyziologických podmínek 80%, tedy asi 0,4 mmol/l. Násobení této koncentrace biologickou variabilitou (12,67%) a vlivem na chloridovou ISE (1,27) a podělení střední koncentrací ionizovaných chloridů udává nejistotu stanovení chloridů vlivem biologické variability hydrogenfosforečnanů. $\text{CV}_{\text{Cl,hydrogenfos.}} = 0,0630 \%$. V případě podobného výpočtu

z měření roztoku hydrogenfosforečnanu sodného přímo bez ředění sérem dostaneme výsledek $CV_{Cl,hydrogenfos.} = 0,0585 \%$. Rozdíl výsledku obou metod se při výpočtu kombinované nejistoty interferentů projeví na třetím desetinném místě a v případě celkové kombinované nejistoty je vliv ještě menší. Rozdílnost obou metod můžeme pro účely této práce zanedbat.

Podobně spočítáme i vliv dihydrogenfosforečnanového aniontu. Ten byl v roztoku o koncentraci 24,35 mmol/l smíchán se sérem 1:1 a byly stanoveny koncentrace chloridových iontů: 53,0 mmol/l. Naměřené hodnoty byly porovnány s koncentrací chloridů v séru naředěném 1:1 pouhou vodou: 47,75 mmol/l. Rozdíl 5,25 mmol/l je vliv 12,17 mmol/l dihydrogenfosforečnanu (zředěn sérem na polovinu). Chloridová ISE má tedy afinitu k dihydrogenfosforečnanům rovnou přibližně 0,43 násobku afinity k chloridům. Biologická variabilita fosfátů je 12,67%. Dihydrogenfosforečnany tvoří v soustavě fosfátového amfolytu za fyziologických podmínek 20%, tedy asi 0,1 mmol/l (20% z ionizovaného fosfátu, tedy z 0,5 mmol/l). Násobení této koncentrace biologickou variabilitou (12,67%) a relativním vlivem na chloridovou ISE (0,43) a podělení střední koncentrací ionizovaných chloridů udává nejistotu stanovení chloridů vlivem biologické variability dihydrogenfosforečnanů. $CV_{Cl,dihydrogenfos.} = 0,0054 \%$

Vliv interferentů a jejich biologické variability na stanovení chloridů se spočítá jako kombinace nejistot způsobených jednotlivými vlivnými ionty, tedy jako odmocnina součtu čtverců příspěvků nejistot HCO_3^- a HPO_4^{2-} , $H_2PO_4^-$.

$$u_{Cl,interf.} = \sqrt{0,4083^2 + 0,0630^2 + 0,0054^2} = 0,4131 \%$$

Pouze pro chloridovou ISE má vliv interferentů význam na celkovou nejistotu měření:

| | |
|------------------------------------|---------------|
| $u_{Cl,interf.}$ | 0,41 % |
|------------------------------------|---------------|

4.2.8 Iontová síla

Iontová síla je jeden ze základních parametrů ovlivňujících odezvu iontově selektivní elektrody k měřeným iontům. Na rozdíl od všech ostatních sledovaných vlivů ji nemůžeme měřit, i když určité možnosti jejího odhadu existují³² (viz dále v této kapitole). Proto byly připraveny roztoky o známém složení a tedy i známé iontové síle. Experiment však vyžadoval vyloučení nepřírodných solutů a také solutů, jejichž chemická podstata nedovoluje jasně spočítat iontovou sílu (proteiny a podobně). Výběr látek byl tedy jen velmi úzký: NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, MgSO₄, Na₂SO₄. Základním principem pokusu je sestavení škály roztoků o různé koncentraci sodných, draselných a chloridových iontů a různé iontové síle. Po té bylo provedeno stanovení těchto iontů v připravených roztocích. Stanovená koncentrace byla porovnána s tou, která byla určena z navážky jednotlivých solí a byla vypočtena výchylka stanovení od gravimetricky a volumetricky určené koncentrace. Výchylka byla v procentuální stupnici vynášena do grafu proti vypočtené iontové síle.

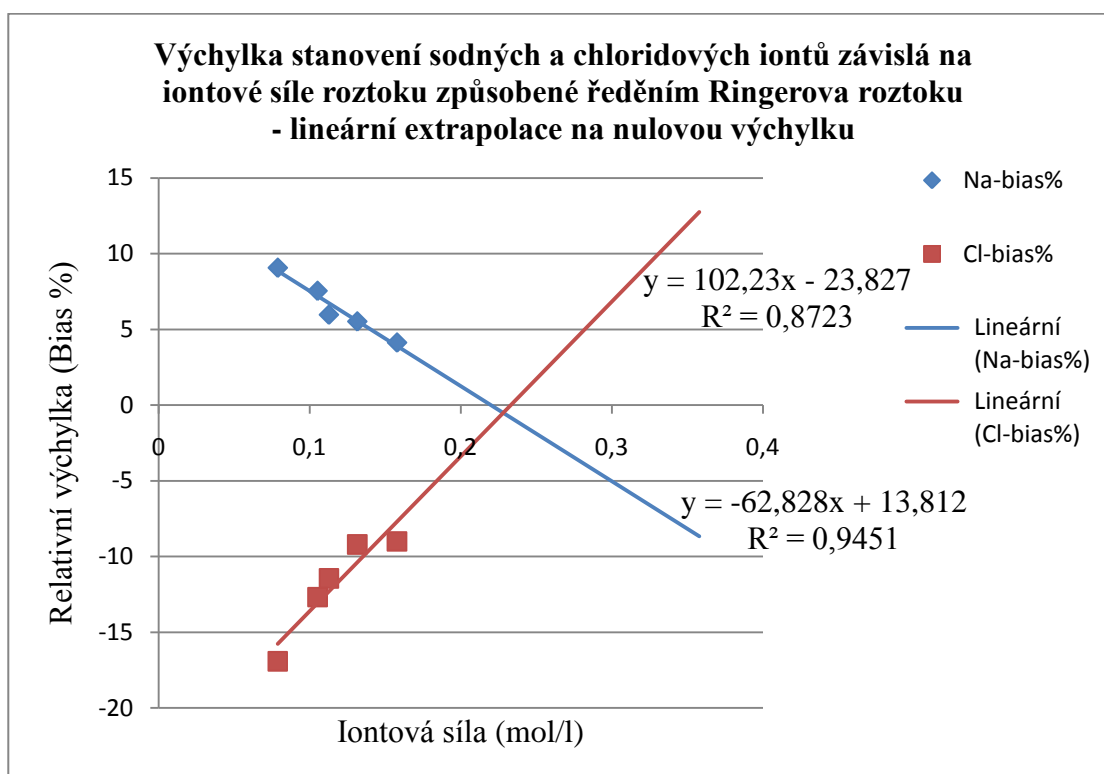
Byla provedena řada pokusů, jejichž použití pro konečný výpočet závislosti výchylky stanovení na iontové síle se ukázalo jako nevhodné. Výše popsané látky byly různě kombinovány a byly z nich připravovány roztoky různých koncentrací. Nakonec byl jako zdroj dat pro výpočet nejistoty zvolen pokus s měřením připraveného roztoku pouze s obsahem různých koncentrací chloridu draselného a sodného.

1) experiment s prostým ředěním Ringerova roztoku.

- Ringerův roztok má iontovou sílu 157,75 mmol/l. Jeho ředěním demineralizovanou vodou byla připravena škála roztoků o snižující se koncentraci. Průměrné naměřené hodnoty jsou v tabulce XXXII v příloze. Tabulka XXXIII ukazuje již vypočtené hodnoty výchylek stanovení sodného a chloridového iontu v závislosti na iontové síle. Data z tabulky XXXIII vizualizuje graf na obrázku 6. Tento pokus je jen orientační, protože není k dispozici deklarace nejistoty koncentrace Ringerova roztoku a navíc je měřeno dosti nízko při dolní části kalibrační závislosti. Posloužil k rychlé orientaci v problematice a nastavení dalších pokusů.

Tab. XXXIII: Relativní výchylky stanovení Na⁺ a Cl⁻ v závislosti na iontové síle ředěného Ringerova roztoku

| Iontová síla (mol/l) | Na ⁺ bias % | Cl ⁻ bias% |
|----------------------|------------------------|-----------------------|
| 0,157750 | 4,13 | -9,00 |
| 0,131458 | 5,53 | -9,20 |
| 0,112679 | 5,97 | -11,44 |
| 0,105167 | 7,55 | -12,68 |
| 0,078875 | 9,07 | -16,92 |



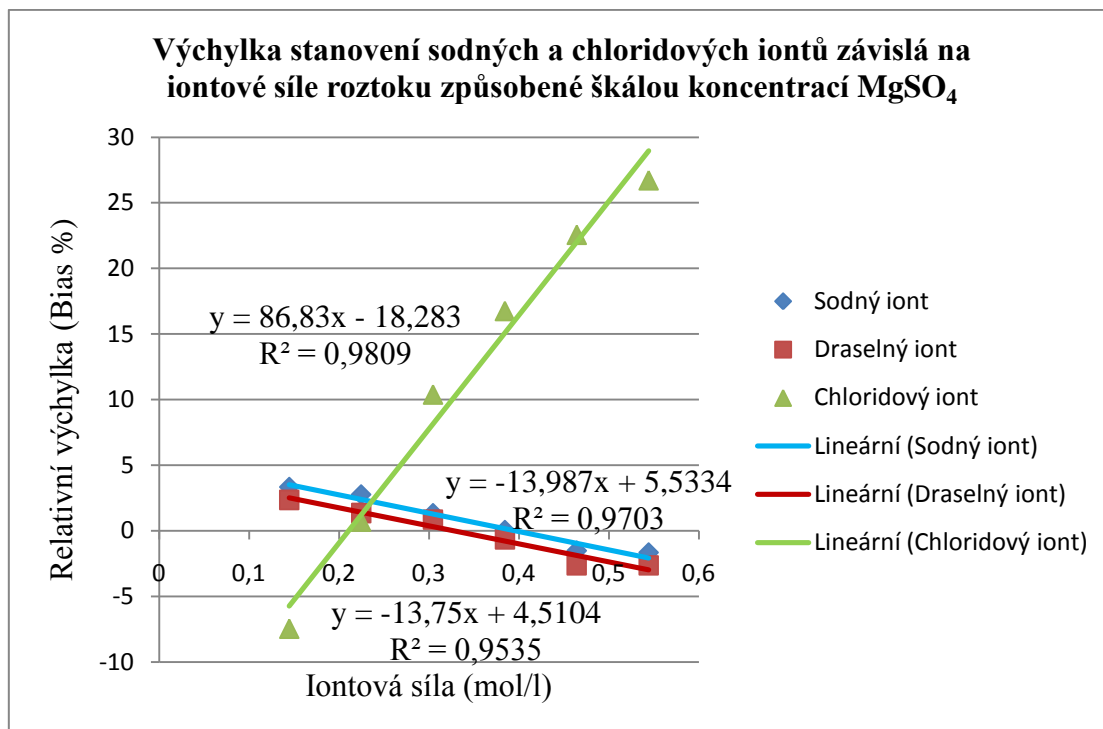
Obr. 6: Relativní výchylka stanovení iontů v závislosti na změně iontové síly způsobené ředěním Ringerova roztoku.

Naměřená data vytváří v grafu soustavu bodů, které však rozsahem spektra iontové síly nedostačují k protnutí osy x, neboli dosažení iontové síly s nulovou výchylkou stanovení. Nulová výchylka je tedy výsledkem velmi orientační extrapolace. Dalším důvodem nepřijatelnosti výsledků tohoto experimentu je nízká koncentrace draselných iontů a tím pádem i špatně sledovatelná výchylka vlivem změny iontové síly. Pokus však posloužil aspoň k orientaci v problematice.

2) Experiment s navyšováním iontové síly síranem hořečnatým

- Širokého spektra iontové síly lze dosáhnout dobře látkou s vícemocnými ionty. Zvolený síran hořečnatý umožňuje snadno při konstantní koncentraci sodných, draselných a chloridových iontů měnit iontovou sílu roztoku o více než řád výše než je iontová síla dříve použitého Ringerova roztoku.

Roztok směsi chloridu sodného a chloridu draselného byl připraven v jedné základní koncentraci a z něj byly připraveny roztoky o stejné koncentraci sodných, draselných a chloridových iontů, ale různé iontové síle navyšované síranem hořečnatým. Celkem bylo připraveno 5 roztoků (kromě základního bez MgSO_4) a to vždy z devíti dílů základního roztoku a jednoho dílu různě koncentrovaného síranu hořečnatého. Naměřené koncentrace sodných, draselných a chloridových iontů by v případě ideálně selektivních elektrod a nulovém vlivu iontové síly měly být mezi pokusy stejné. Ve skutečnosti jsou ve hře interference síranů při stanovení chloridů, vliv iontové síly na citlivost potenciometrického stanovení a dále snížená disociace chloridu hořečnatého (v roztoku jsou chloridy i hořečnaté ionty), čímž se nám snižuje i iontová síla roztoku. Naměřené hodnoty koncentrací jsou v příloze v tabulce XXXIV. Skutečné, gravimetricky stanovené koncentrace iontů v roztocích byly: Na^+ : 140,1275, K^+ : 4,4507, Cl^- : 144,5782 (ve všech roztocích stejně), Mg^{2+} a SO_4^{2-} postupně: 99,8565 - 79,8852 - 59,9139 - 39,9426 - 19,9713 - 0 (vše je v jednotkách mmol/l). V tabulce XXXV jsou uvedeny relativní výchyly stanovených koncentrací iontů od koncentrací vypočtených z gravimetrické přípravy roztoků. Stejně hodnoty jsou vizualizovaný v grafu na obrázku 7.



Obr. 7: Relativní výchylka stanovení iontů v závislosti na změně iontové síly způsobené škálou koncentrací MgSO₄.

Tab. XXXV: Relativní výchylky stanovení iontů v závislosti na iontové síle roztoku nastavené přidavkem MgSO₄

| Iontová síla roztoku mol/l | Na ⁺ bias % | K ⁺ bias % | Cl ⁻ bias % |
|----------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| 0,144578 | 3,33 | 2,36 | -7,45 |
| 0,224463 | 2,76 | 1,36 | 0,71 |
| 0,304349 | 1,34 | 0,86 | 10,39 |
| 0,384234 | 0,05 | -0,64 | 16,75 |
| 0,464119 | -1,52 | -2,64 | 22,56 |
| 0,544004 | -1,66 | -2,64 | 26,71 |

Při srovnání těchto hodnot s hodnotami naměřenými na škále různě řaděných roztoků síranu sodného (viz následující experiment č.3) zjistíme, že se zde podepisuje kromě iontové síly opravdu velmi významně i vliv nízké disociace chloridu hořečnatého a interference síranů s chloridy.

3) Experiment s různými koncentracemi síranu sodného

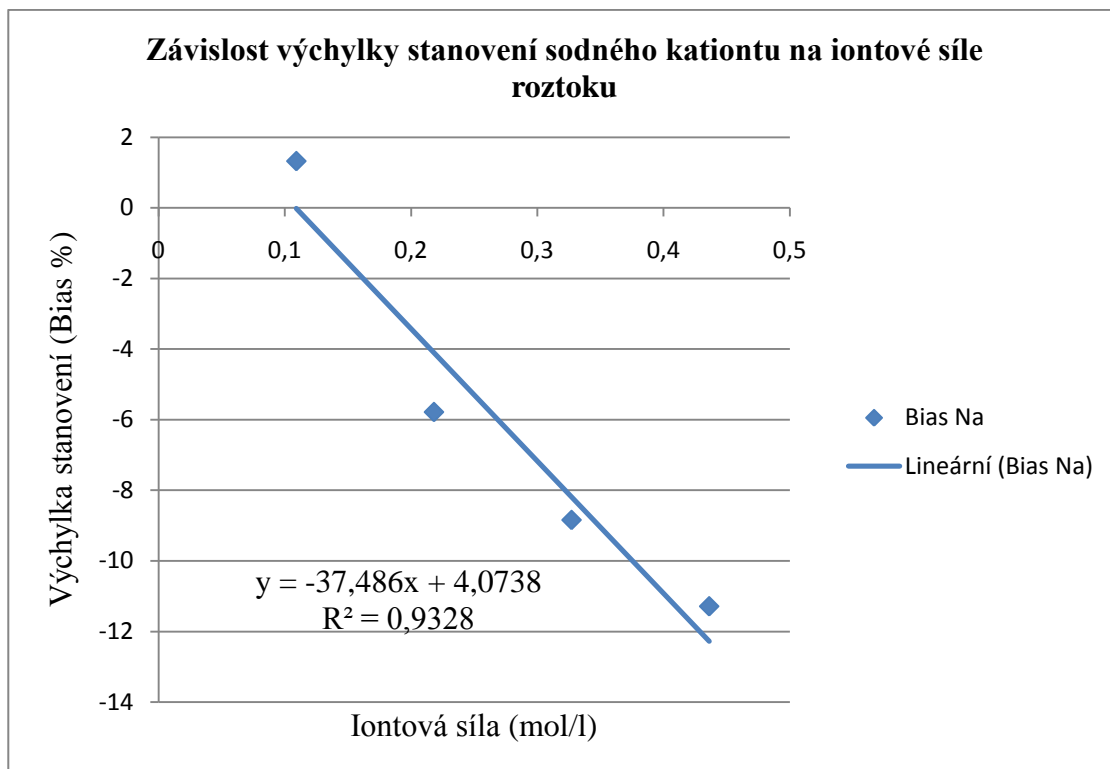
- Tento experiment měl posloužit jednak k posouzení výchylky stanovení sodných iontů na iontové síle a také k posouzení míry interference síranů s chloridovou ISE. Byla připravena koncentrační škála roztoků síranu sodného. V těchto roztocích byly stanoveny chloridové a sodné ionty. V případě síranových iontů (Tab. XXXVI.) byla sledována interference s chloridy (falešně zjištěná přítomnost chloridů) a v případě sodných iontů (Tab. XXXVII) byla spočítána výchylka (Tab. XXXVIII) stanovené koncentrace od gravimetricky zjištěných hodnot v závislosti na iontové síle roztoku.

Tab. XXXVII: Srovnání koncentrace sodných iontů
spočítané z navážky a získané stanovením

| Na₂SO₄ mmol/l gravimetrie | Na⁺ mmol/l vypočtený | Na⁺ mmol/l stanovený |
|--|--|--|
| 145,41 | 290,82 | 258,00 |
| 109,06 | 218,11 | 198,83 |
| 72,70 | 145,41 | 137,00 |
| 36,35 | 72,70 | 73,67 |

Tab. XXXVIII: Relativní výchylky stanovení sodných iontů v
závislosti na iontové síle roztoků s různou koncentrací Na₂SO₄

| Iontová síla | Bias (%) Na⁺ |
|---------------------|--------------------------------|
| 0,109057 | 1,32 |
| 0,218115 | -5,78 |
| 0,327172 | -8,84 |
| 0,436230 | -11,29 |



Obr. 8: Grafické zobrazení dat z tabulky XXXVIII, relativní výchylka stanovení sodných iontů v závislosti na změně iontové síly způsobené škálou koncentrací Na_2SO_4

Křivka znázorňující výchylku stanovení sodného iontu je posunuta v grafu (Obr. 7) z experimentu č.2 s navyšováním iontové síly síranem hořečnatým proti grafu (Obr. 8) z pokusu se síranem sodným doprava, protože v roztoku se síranem hořečnatým je teoreticky vypočtená iontová síla ve skutečnosti snížena úbytkem hořečnatých a chloridových iontů z roztoku jejich nízkou disociací ze soustavy $\text{MgCl}_{2(\text{Aq})}$. Za reálnou tedy můžeme považovat spíše představu o vlivu iontové síly z grafu měření na roztoku síranu sodného (Obr. 8).

K porovnání vlivu iontové síly na vychýlení stanovených iontů a interference síranů s chloridy pomůže srovnání experimentů 2 a 3. Tabulka XXXVI ukazuje stanovené koncentrace chloridů v roztocích, které žádné chloridy neobsahují. Obsahují pouze interferující síran sodný ve čtyřech koncentracích.

Tab. XXXVI: Interference síranů na chloridové ISE

| Koncentrace Na ₂ SO ₄ mmol/l | Detekovaná koncentrace Cl ⁻ mmol/l |
|--|---|
| 145,41 | 102,00 |
| 109,06 | 79,33 |
| 72,70 | 63,50 |
| 36,35 | 35,83 |

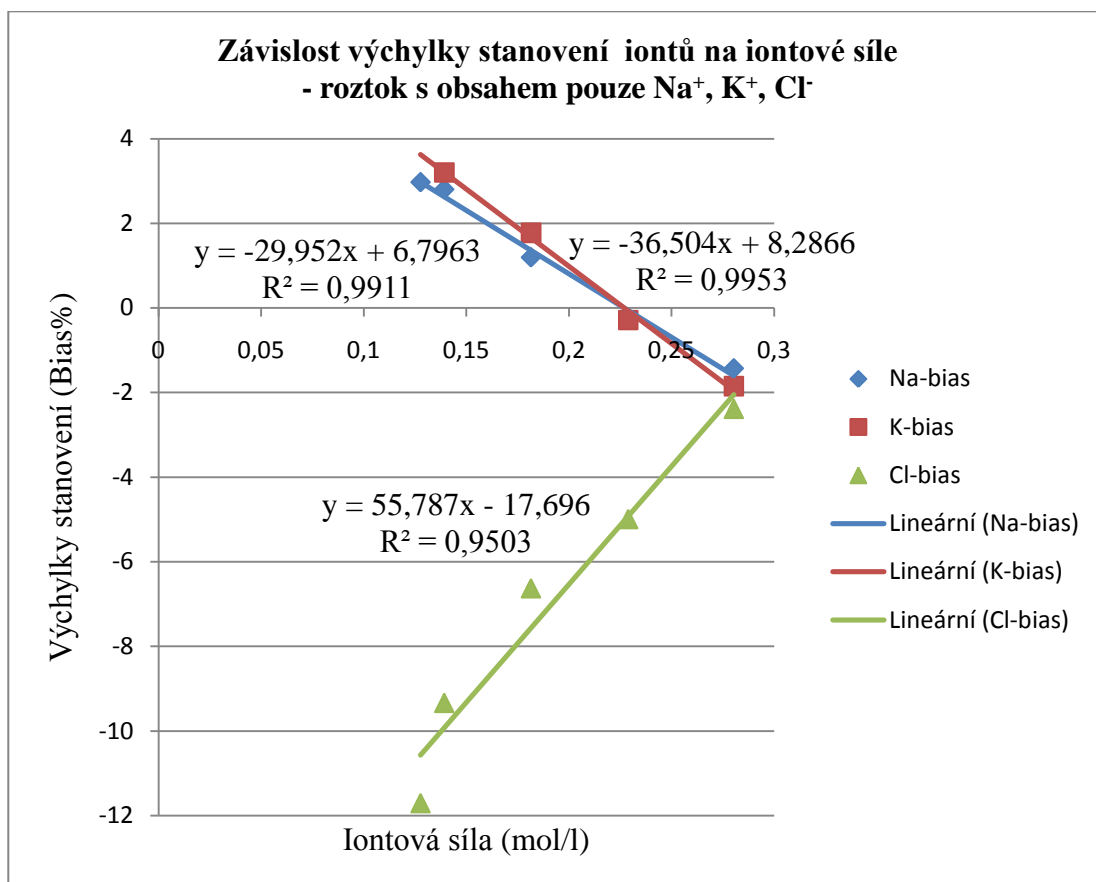
Až do koncentrace síranů kolem 60 mmol/l je interference síranů s chloridy přibližně na úrovni 1:1. To odpovídá údajům naměřeným z testování interference. Velmi vysoký nárůst výchytky stanovení chloridů s rostoucí koncentrací síranu hořečnatého (experiment 2.) je tedy ve větší míře vliv interference se sírany, než vliv iontové síly. Protože je však ve hře ještě navíc úbytek chloridových iontů z roztoku vlivem vazby na hořečnaté ionty, tak nelze vliv interference jen jednoduše odečíst.

4) Experiment se škálou koncentrací chloridu sodného a chloridu draselného

- Vzhledem ke zkušenostem s různými interferencemi byla nakonec závislost výchytky stanovení iontů na iontové síle určena z proměření škály roztoků neobsahujících žádné interferenty. Bylo využito možnosti měřit koncentrace všech iontů až do koncentrace 300 mmol/l, jak je deklarováno v příbalovém letáku³³ k senzoru. Byly připraveny roztoky (Tab. XXXIX v příloze) obsahující pouze chlorid sodný o konstantní koncentraci kolem 130 mmol/l a chlorid draselný o koncentraci od 0 do 150 mmol/l. Bylo tak získáno spektrum roztoků s iontovou silou od 0,13 do 0,28 mol/l (Tab.XL). Relativní výchytky (Tab.XL) stanovení spočtené z naměřených dat (Tab. XXXIX v příloze) vynesené do grafu (Obr. 9), opět přináší diskutabilní výsledky. Původně očekávaný průsečík osy x (nulové výchytky stanovení) s přímkami výchytek všech iontů v oblasti kolem 0,167 (předpokládaná iontová síla séra³² v mol/l – vysvětleno dále v textu) je posunut k vyšším hodnotám a navíc se závislosti jednotlivých iontů protínají pod osou x.

Tab. XL: Relativní výchyly stanovení iontů v závislosti na iontové síle roztoků s různou koncentrací KCl

| I.sila (mol/l) | Na-bias (%) | K-bias (%) | Cl-bias (%) |
|----------------|-------------|------------|-------------|
| 0,13 | 2,98 | - | -11,71 |
| 0,14 | 2,81 | 3,20 | -9,34 |
| 0,18 | 1,20 | 1,77 | -6,63 |
| 0,23 | -0,26 | -0,28 | -4,99 |
| 0,28 | -1,43 | -1,85 | -2,38 |



Obr. 9: Grafické zobrazení dat z tabulky XL, relativní výchyly stanovení sodných iontů v závislosti na změně iontové síly způsobené škálou koncentrací KCl

Tentokrát je odchylka od očekávaných výsledků způsobena pravděpodobně tím, že analyzátor je koncipovaný na reálné sérum projevující se poměrně bohatou škálou matričních jevů (proteiny, malé ale mnohočetné interference atd.). Experiment s roztokem obsahujícím

pouze měřené složky tedy vystavuje senzor prostředí bez těchto vlivů. Analyzátor má však softwarově ošetřenou korekci naměřených výsledků. Nepřítomnost matričních vlivů séra tedy způsobuje snížení hodnot stanovených koncentrací iontů a tím i posunutí všech závislostních přímk směřem k nižším hodnotám. Největší změna je pozorovatelná u chloridové ISE. I tak je však výsledek přínosný. Při posouzení vlivu variability iontové síly mezi séry není totiž důležitá absolutní hodnota výchylky, ale pouze její změna. Tu lze odečíst i ze softwarem posunuté přímky. Z výsledku tohoto experimentu použijeme tedy jen směrnice přímk závislostí výchylek stanovení na iontové síle. Dosazením biologické variability iontové síly do vztahu pak získáme rozsah vlivu variability iontové síly na výchylku stanovení iontů.

Odvození biologické variability iontové síly

Abychom mohli určit míru podílu různé iontové síly na nejistotu stanovení iontů, museli bychom znát distribuci iontové síly v populaci. Museli bychom znát její střední hodnotu a intraindividuální a interindividuální variabilitu. Existuje velké množství prací, kterých se iontová síla krevního séra týká, protože pracují s měřením analytů v krevním séru, jejichž odezva na analytickém systému závisí na iontové síle, nebo se zabývají vzájemnou interakcí imunologicky aktivních molekul, která na iontové síle také závisí. Přesto je velmi obtížné najít práci, která by iontovou sílu krevního séra studovala jako cíl a nikoliv jen jako pozadí či popracovní podmínku své práce. Chybí systematické informace o iontové síle krevního séra. Dostupné jsou jen útržkovité a často velmi staré zprávy. D.D. Van Slyke³² uvádí, že iontová síla lidského séra je přibližně 0,167. Tuto hodnotu stanovil na základě změn disociační konstanty kyseliny uhličitě do prvního stupně, která je v podmínkách roztoku s touto iontovou silou 6,13, stejně jako v krevním séru. Van Slykeho údaj je velmi blízký hodnotě iontové síly, při které byla v této práci naměřena nulová výchylka stanovení sodných iontů v různě koncentrovaných roztocích síranu sodného.

Výpočet iontové síly séra je velmi obtížný, protože řada významných solutů není plně disociována (Ca^{+II} , Mg^{+II} disociují jen asi na 50%) a příspěvek některých majoritních složek séra nelze definovat vůbec (proteiny), protože se jejich ionizovatelné části mohou vyskytovat pod povrchem molekuly, jindy jsou navázány na různé jiné ionty i neionizované molekuly.

Vzhledem k tomu, že z provedených pokusů (Experimenty 1-4 s iontovou silou) vyplývá už graficky (Obr. 6-9) zjevně velká závislost nejistoty stanovení iontů na iontové síle matrice, nemůžeme tuto nejistotu aproximovat k nule a zanedbat ve výpočtu kombinované nejistoty. Variabilitu iontové síly je tedy nutno kvalifikovaně odhadnout a přes přibližnou závislost výchytky stanovení iontů na iontové síle odhadnout průměrnou výchytku stanovení iontů vlivem variability iontové síly.

Variabilitu iontové síly bychom mohli odhadnout výpočtem z variability ionizovaných solutů v matrici krevního séra. To je úkol nelehký, když si uvědomíme, že například množství nábojů na molekule proteinů séra se dá těžko odhadnout. To bychom však ještě nemuseli považovat za závažnou překážku, když si uvědomíme, že množství nábojů na povrchu albuminu je proměnlivé s pH a iontovým složením. Nejistota stanovení iontů vlivem té části iontové síly, za kterou zodpovídají proteiny, je vlastně z větší části obsažena v nejistotě způsobené změnami pH, protože na něm závisí ionizovanost povrchu proteinů a tím i množství iontů na ně navázaných. Přestože proteiny na svém povrchu obsahují mnoho funkčních skupin (karboxyly, hydroxyly, aminy, karbaminy, thioly, terciální a kvarterní dusíky), tak vlivem interakce s okolím je většina těchto skupin obsazených ionty z okolí a neúčastní se tedy příspěvků k iontové síle. Toto na první pohled silné a nepodložené tvrzení lze podložit výpočtem zbytku iontové síly (Tab. XLI), který připadá na proteiny (hlavně albumin), po odečtení části iontové síly připadající na nízkomolekulární ionty, které snadno stanovíme.

Tab. XLI: Koncentrace (vše v mmol/l) ionizovaných solutů², výpočet efektivního náboje albuminu a podílu albuminu na iontové síle séra.

| Na ⁺ | K ⁺ | Ca ²⁺ | Mg ²⁺ | P | Albumin | HCO ₃ ⁻³ | UA ⁻ | Cl ⁻ | Iontová Síla ³² | Bez albuminu | Rozdíl | Ef.náb.alb. |
|-----------------|----------------|------------------|------------------|-----|-------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|----------------------------|--------------|--------|-------------|
| 138 | 4,0 | 1,2 | 0,6 | 0,5 | 0,6 (40g/l) | 24 | 8 | 102 | 167 | 142,6 | 24,39 | 9,04 |

P – fosfáty (dohromady HPO₄²⁻ a H₂PO₄⁻, střední stupeň disociace je 1,8)

Mr albuminu = 67 000 g/mol

UA⁻ – neměřitelné anionty (běžně nestanovované), většinou jednosytné (zjednodušení)

Iont.síla – Van Slykeho³² údaj o iontové síle séra

Bez alb. – teoretická síla séra bez započtení albuminu

Rozdíl – iontová síla připadající na albumin za předpokladu správnosti Van Slykeho údaje o iontové síle séra

Ef.náb.alb. – efektivní náboj albuminu, teoretický náboj na povrchu této molekuly

Náboj na povrchu albuminu (látková koncentrace náboje na jeden mol albuminu) spočtený z rozdílu celkové iontové síly a její části připadající na malé ionty je ve skutečnosti efektivním a v iontové síle se účastnícím nábojem. Na litr séra tedy připadá 15,07 náboje albuminu. Rozdíl od literárního údaje 11,2 mmol/l² tvoří ta část, která připadá na vázané vápenaté, hořečnaté a sodné ionty (dohromady cca 3,87 mmol/l náboje). Fakt, že koncentrace vázaných iontů je doplňkem látkové koncentrace vypočteného efektivního náboje na povrchu albuminu k jeho literárně uváděné látkové koncentraci náboje, potvrzuje správnost předpokladu, že takovým podílem se albumin účastní iontové síly séra.

Z intraindividuální a interindividuální biologické variability iontů tabelované v literatuře⁷ spočítáme celkovou biologickou variabilitu jednotlivých iontů v populaci (Tab. XLII), z čehož můžeme odhadnout celkovou biologickou variabilitu iontové síly v populaci. Z grafu (Obr. 9) měření závislosti výchytky stanovené hodnoty iontů od deklarované hodnoty na iontové síle pak odečteme jaká výchytky připadá na rozmezí iontové síly vyskytující se běžně v populaci. Tato hodnota bude mírou vlivu iontové síly na celkovou nejistotu stanovení iontů.

Začneme výpočtem celkové biologické variability iontů (16) z dostupných literárních údajů⁷ o intraindividuální a interindividuální variabilitě (Tab. XLII).

$$CV_{x,biol.} = \sqrt{CV_{x,intra.}^2 + CV_{x,inter.}^2} \quad (16)$$

Tab. XLII: Biologická variabilita hlavních iontů séra

| Iont | CV_{x,intra.} (%) | CV_{x,inter.} (%) | CV_{x,biol.} (%) |
|-------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Na | 0,7 | 1,0 | 1,22 |
| K | 4,8 | 5,6 | 7,38 |
| Cl | 1,2 | 1,5 | 1,92 |
| Ca | 1,9 | 2,8 | 3,38 |
| Mg | 3,6 | 6,4 | 7,34 |
| P | 8,5 | 9,4 | 12,67 |
| Albumin | 3,1 | 4,2 | 5,22 |
| HCO₃- | Není tabelováno | Není tabelováno | 4,17 (vypočteno z refer.mezi) |
| UA | Není tabelováno | Není tabelováno | 12,5 (vypočteno z refer.mezi) |

CV_{x,biol.} je celková biologická variabilita (16)

CV_{x,intra.} je intraindividuální variabilita

CV_{x,inter.} je interindividuální variabilita každého jednotlivého iontu

Podílem vlivu jednotlivých iontů na celkovou iontovou sílu (úměrný jejich střední koncentraci), se vynásobí příslušné biologické variability (17) a vypočtené podíly variability (Tab. XLIII) se skombinují v celkovou biologickou variabilitu iontové síly v populaci (18).

$$u_{I,x} = \frac{0,5 \cdot c_x \cdot z^2}{I_{\text{celk.}}} * CV_{x,\text{biol.}} \quad (17)$$

Kde $u_{I,x}$ je podíl variability jednotlivého iontu na variabilitu iontové síly v populaci, c_x je koncentrace iontu, z je náboj iontu, $I_{\text{celk.}}$ je celková iontová síla séra (tabelována střední hodnota 0,167 mol/l, resp. 167 mmol/l) a $CV_{x,\text{biol.}}$ biologická variabilita iontu (Tab. XLII, Tab. XLIII).

Tab. XLIII: Podíl variability ionizovaných iontů na variabilitě iontové síly v populaci

| Iont | Biologická variabilita CV_{biol.} | Střední koncentrace mmol/l | Náboj | $u_{I,x}$ |
|------------------------------------|--|---------------------------------------|--------------|-----------------------------|
| Na⁺ | 1,22 | 138 | 1 | 0,50 |
| K⁺ | 7,38 | 4 | 1 | 0,09 |
| Cl⁻ | 1,92 | 102 | 1 | 0,59 |
| Ca²⁺ | 3,38 | 1,2 | 2 | 0,05 |
| Mg²⁺ | 7,34 | 0,6 | 2 | 0,05 |
| P | 12,67 | 0,5 | 1,8 | 0,06 |
| Alb | 5,22 | 0,6 | 9,04 | 0,77 |
| HCO₃⁻ | 4,17 | 24 | 1 | 0,30 |
| UA⁻ | 12,5 | 8 | 1 | 0,30 |

$u_{I,x}$ je příspěvek každého iontu k variabilitě iontové síly

Celková variabilita iontové síly v populaci se pak spočítá jako kombinace příspěvků variabilit jednotlivých iontů (21).

$$u_I = \sqrt{\sum_{x=1}^n u_{I,x}^2} \quad (18)$$

Odhad biologické variability iontové síly v populaci: $u_I = 1,18 \%$

Vzhledem k tomu, že však ne všechny variability iontů v krevním séru jsou nezávislé a například zvýšení či snížení koncentrace sodných iontů částečně koreluje (přímá úměra) se

změnami chloridových iontů, pak bude variabilita iontové síly o něco větší. V případě 100% přímé úměry mezi koncentracemi sodných a chloridových iontů by byla variabilita iontové síly 1,41 %. Vztah sodných a chloridových iontů však není těsný na 100%. Míra korelovanosti není tabelována a nyní nemáme možnosti, jak ji zjistit. Proto budeme dále počítat se střední (průměrnou) hodnotou $u_I = 1,29 \%$. Přepočet tohoto variačního koeficientu na směrodatnou odchylku iontové síly nám dává hodnotu $SD_I = 0,0021543$ pro výpočet v jednotkách mol/l ($1,29\% = 0,0129$ a $0,0129 \cdot 0,167 = 0,0021543$, kde 0,167 je iontová síla séra³²⁾)

Výpočet vlivu variability iontové síly na výchytku stanovení iontů

Ze směrnic závislostí výchytky stanovení iontů na iontové síle matrice (Obr. 9) můžeme dosazením směrodatné odchylky iontové síly za proměnnou x vypočítat střední výchytku stanovení vlivem biologické variability iontové síly.

$$u_{I,K} = 36,504 * SD_I$$

$$u_{I,Na} = 29,952 * SD_I$$

$$u_{I,Cl} = 55,787 * SD_I$$

Kde: $u_{I,K}$ je střední výchytky (Bias %) stanovení draselných iontů vlivem iontové síly, $u_{I,Na}$ je střední výchytky stanovení sodných iontů vlivem iontové síly, $u_{I,Cl}$ je střední výchytky stanovení chloridových iontů vlivem iontové síly, SD_I je směrodatná výchytky iontové síly vypočtená z biologické variability iontové síly. Konstanty jsou absolutní hodnoty směrnic z grafu závislosti výchytky stanovení na iontové síle získaného z dat měření roztoků chloridu sodného a draselného bez dalších příměsí (Experiment 4, Obr. 9).

Do výpočtu celkové kombinované nejistoty stanovení iontů použijeme tedy jako podíl vlivu iontové síly hodnoty:

| | |
|------------------------------------|---------------|
| $u_{i,síla,K}$: | 0,08 % |
| $u_{i,síla,Na}$: | 0,06 % |
| $u_{i,síla,Cl}$: | 0,12 % |

I přes experimentální vyhotovení podkladů pro tyto dílčí výsledky je však nutno dále brát na zřetel, že celý postup obsahuje řadu aproximací a literárně velmi variabilních údajů. Proto je vhodné tyto hodnoty chápat spíše jako kvalifikovaný odhad, než jako přesný závěr.

Nutno ještě podotknout, že podíl albuminu na variabilitě iontové síly bude velmi pravděpodobně záviset více na pH, než na koncentraci tohoto proteinu. Je to dáno tím, že i malá změna pH se projevuje změnou ionizovanosti funkčních skupin na povrchu proteinů. Funkčních skupin mají proteiny mnoho a rozptyl ionizovanosti vlivem pH tedy bude významný. Následkem toho je podíl albuminu na variabilitě iontové síly séra a tím i nejistotě měření z větší části pravděpodobně obsažen v nejistotě měření závislé na pH.

4.2.9 Acidobazické poměry

Pro zjištění závislosti nejistoty stanovení iontů na pH byly připraveny tři vzorky směšného séra o různém pH. Sérum bylo zvoleno proto, že volba jakéhokoliv jiného roztoku neumožňuje dokonalé napodobení fyziologických pufrovacích mechanismů a byly by pouze hypotetickým modelem. První vzorek séra byl okyselen koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Tato kyselina byla zvolena proto, že obsahuje pouze fyziologicky přítomné ionty. Druhý vzorek byl alkalizován koncentrovaným roztokem hydroxidu sodného. Volba činidla byla rovněž z důvodu obsahu pouze fyziologicky přítomných iontů. Vysoká koncentrace titrujících roztoků byla zvolena proto, aby změny pH bylo dosaženo se zanedbatelnou změnou ostatních parametrů, které jsou závislé na změně objemu (naředění) roztoku. Posledním roztokem bylo směšné sérum bez úprav. Všechny tři vzorky byly před úpravami vzaty z jedné dobře promíchané směsi krevních sér.

Ve vzorcích sér bylo úpravami dosaženo pouze změny pH a malého přírůstku sodných, nebo chloridových iontů. Tento přírůstek je však známý a lze jej odečíst. Rozmezí pH bylo zvoleno tak, aby pokrylo veškeré pH snesitelné senzorem: 4,85 - 8,11 - 9,48. Stanovení pH bylo provedeno na pH metru InoLab pH Level 1 s elektrodou SenTix 41. Stanovené koncentrace iontů jsou v tabulce XLIV. Spektrum pH slučitelné se životem je samozřejmě výrazně užší a pokus tak pokrývá veškeré klinické případy. pH moči sice může zabíhat i do těchto extrémů, ale ve srovnání se sérem, nemá moč tak silnou pufrovací kapacitu

a IMT Sample Diluent tak jednotlivé vzorky moči ředěním sjednocuje významněji, než sérum. pH prostředního vzorku séra, které nebylo upraveno není fyziologické, ale je lehce alkaličtější, protože nese následky vyprchání oxidu uhličitého. Podíl na změně pH má i oddělení erytrocytů. To však není na závadu pokusu, protože tento jev je souměřitelný se všemi ostatními vzorky, které laboratoří prochází. Stejněmu jevu jsou totiž vystaveny i ostatní vzorky.

Protože ve výchylce stanovení od skutečné hodnoty koncentrace hrají roli nejen pH, ale i iontová síla, teplota a interferenty, byl jako údaj s nulovou výchylkou vzat výsledek měření na vzorku bez úpravy. To proto, že od něj se oba další roztoky liší jen okyselením či alkalizací (změna iontové síly je malá, možno zanedbat).

Použité standardizované roztoky:

1,0052 mol/l NaOH

1,1967 mol/l HCl

Výpočty složení vzorků vzniklých úpravou 10ml směšného séra (Tab. XLV):

(výpočty provedeny softwarem bez zaokrouhlování, ruční výpočet se proto liší)

Okyselený vzorek:

Spotřeba 0,40 ml HCl

Konečný objem: 10,4ml

Koeficient naředění koncentrace všech solutů: 0,96

Přírůstek koncentrace chloridů titrací kyselinou chlorovodíkovou: (po korekci naředění): 46,02 mmol/l (Výpočet: $0,0004 \text{ ml HCl} * 1196,7 \text{ mmol/l HCl} / 0,01 \text{ l a ředění } 0,96$).

Alkalizovaný vzorek:

Spotřeba 0,15 ml NaOH

Konečný objem: 10,15ml

Koeficient naředění koncentrace všech solutů: 0,99

Přírůstek koncentrace sodných iontů titrací hydroxidem sodným: (po korekci naředění): 14,86 mmol/l (Výpočet: 0,00015 ml NaOH * 1005,2 mmol/l NaOH / 0,01 l a ředění 0,99).

Tab. XLIV: Průměrné naměřené koncentrace iontů (mmol/l)

| pH | Na ⁺ | K ⁺ | Cl ⁻ |
|------|-----------------|----------------|-----------------|
| 4,85 | 140,25 | 5,26 | 130,00 |
| 8,11 | 137,17 | 5,13 | 100,83 |
| 9,48 | 147,17 | 5,05 | 103,67 |

Tab. XLV: Vypočtené koncentrace iontů (mmol/l)

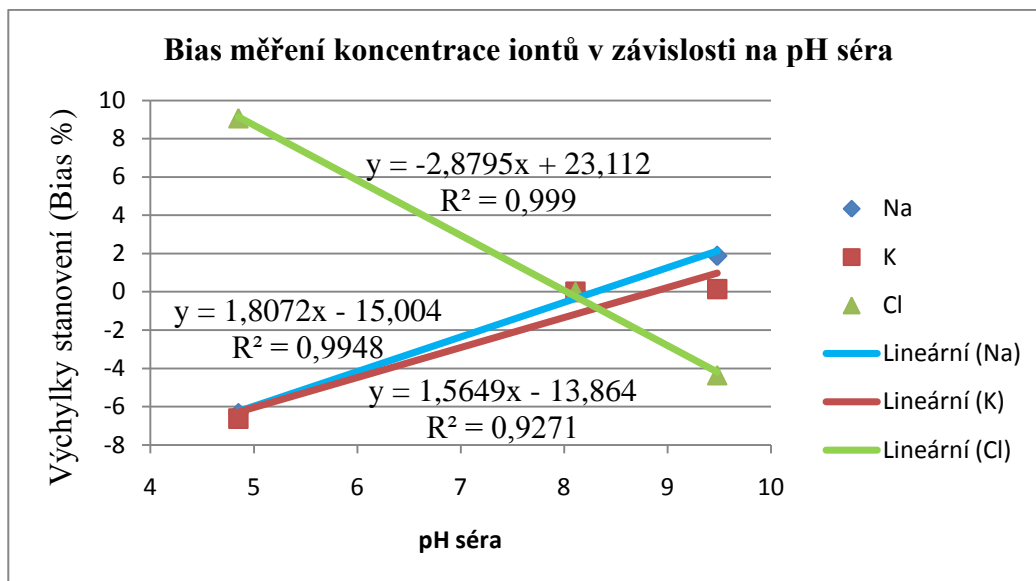
| pH | Na ⁺ | K ⁺ | Cl ⁻ |
|------|-----------------|----------------|-----------------|
| 4,85 | 131,89 | 4,94 | 142,98 |
| 8,11 | 137,17 | 5,13 | 100,83 |
| 9,48 | 149,99 | 5,06 | 99,34 |

Způsob výpočtu hodnoty v tabulce: Původních 10ml směsného séra obsahuje 137,17 mmol/l Na⁺, při titraci NaOH vynásobeno ředícím faktorem 0,99 a připočten přírůstek Na⁺ (z roztoku NaOH) 14,86. Podobně se vypočte přírůstek chloridů v okyseleném vzorku. Ostatní případy změny koncentrace jsou jen naředění přidávkem objemu titračního činidla.

Relativní výchyly (Tab. XLVI) se vynesou do grafu (Obr. 10) a vypočteme směrnice.

Tab. XLVI: Relativní vychýlení naměřených hodnot od předpokládaných (%)
(poměr hodnot z tabulek XLIV a XLV)

| pH | Na ⁺ | K ⁺ | Cl ⁻ |
|------|-----------------|----------------|-----------------|
| 4,85 | -6,34 | -6,62 | 9,08 |
| 8,11 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 9,48 | 1,88 | 0,15 | -4,35 |



Obr. 10: Závislost vychýlení měření na pH

Nejistotu stanovení iontů získáme při zhodnocení fyziologického rozmezí² pH v populaci ($p=0,05$): 7,36 až 7,44 , což je rozsah $\pm 2SD$, tedy $4xSD$. Jedna SD má v pH stupnici tedy rozměr 0,2.

Ze směrnic závislostí vychýlení stanovení iontů na pH (Obr. 10) a směrodatné odchylky pH v populaci (0,2) vypočteme střední výchylky stanovení vlivem pH (Tab. XLVII).

Tab. XLVII: Odvození střední výchylky stanovení vlivem variability pH séra v populaci

| | Funkce vychýlení | Směrnice | SD pH | Bias % pro populaci ($p=0,05$) |
|-----------------------|-------------------------|----------|-------|----------------------------------|
| Cl⁻ | $y = -2,8795x + 23,112$ | 2,8795 | 0,2 | 0,5759 |
| K⁺ | $y = 1,5649x - 13,864$ | 1,5649 | 0,2 | 0,3130 |
| Na⁺ | $y = 1,8072x - 15,004$ | 1,8072 | 0,2 | 0,3614 |

Při hodnocení vlivu pH na vychýlení stanovených koncentrací iontů je však třeba mít na paměti, že pH, neboli koncentrace vodíkových iontů, je vliv zasahující do mnoha fyzikálně chemických vlastností matrice. Mimo jiné výrazně ovlivňuje disociaci molekul na ionty (vliv na vazbu iontů na bílkoviny, vliv na disociaci i nízkomolekulárních látek) a tím i iontovou sílu matrice séra. Nízké pH zvýšením disociace iontů zvyšuje iontovou sílu matrice. Tento fakt by mohl být příčinou zvýšení odezvy ISE vůči chloridovým iontům (Bias při nízkém pH

roste do pozitivních hodnot) a snížení odezvy ISE vůči kationtům (K^+ , Na^+), kdy bias klesá do záporných hodnot. V alkalické oblasti měření tentýž mechanismus působí obráceně.

Pro jednotlivé ionty je podíl biologické variability pH na celkové nejistotě měření:

| | |
|--------------------------------------|---------------|
| $u_{Na,acidobas.}$ | 0,58 % |
| $u_{K,acidobas.}$ | 0,31 % |
| $u_{Cl,acidobas.}$ | 0,36 % |

4.2.10 Paměťový efekt

Vliv koncentrace analytu z předchozího vzorku na naměřený výsledek v následujícím vzorku byl sledován pomocí střídání čtyřikrát opakovaného měření Ringerova roztoku a reálného krevního séra. Vlastní hodnoty v jednotlivých sériích měření jsou v příloze v tabulce XLVIII. Oba vzorky se od sebe významně liší matricí. Pro výpočty je důležitá průměrná naměřená hodnota koncentrací iontů v séru a Ringerově roztoku, protože testujeme významnost vychýlení prvních hodnot jednotlivých serií od těchto průměrů (Tab. XLIX pro Ringerův roztok, Tab. L pro sérum). Nevadí nám tedy, že se například vlivem nízké iontové síly významně systematicky odchyľují stanovené hodnoty v Ringerově roztoku. Podstatné je to, že všechny ostatní vlivy, kromě střídání matrice vzorků jsou konstantní a nepřispívají ke změnám koncentrací prvních hodnot ve srovnání s průměry měření.

Vliv předchozího vzorku na první měření následujícího vzorku bylo testováno testem shodnosti průměrů prvních hodnot naměřených po změně matrice a průměrů všech naměřených hodnot. Bylo použito srovnání dvou hodnot pomocí t-testu pro shodné rozptyly. Shodnost rozptylů byla potvrzena.

Tab. XLIX: zhodnocení vlivu předcházení Ringerova roztoku krevnímu séru.

| Iont | První hodnoty mmol/l | Průměr v sérii mmol/l | t-statistika | Kritická hodnota $t_{krit.}$ | Komentář |
|-----------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------|--|-------------------------|
| Na⁺ | 142,00 | 142,42 | 0,78 | 2,16 | Bez vlivu předch.vzorku |
| K⁺ | 5,53 | 5,54 | 0,25 | 2,16 | Bez vlivu předch.vzorku |
| Cl⁻ | 105,33 | 106,33 | 1,83 | 2,16 | Bez vlivu předch.vzorku |

Tab. L: zhodnocení vlivu předcházení krevního séra Ringerovu roztoku.

| Iont | První hodnoty mmol/l | Průměr v sérii mmol/l | t-statistika | Kritická hodnota $t_{krit.}$ | Komentář |
|-----------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------|--|-------------------------|
| Na⁺ | 153,50 | 152,56 | 1,84 | 2,10 | Bez vlivu předch.vzorku |
| K⁺ | 4,18 | 4,18 | 0,27 | 2,10 | Bez vlivu předch.vzorku |
| Cl⁻ | 143,25 | 144,50 | 2,19 | 2,10 | Patrný vliv předch.vz. |

Ke stejným výsledkům dojdeme i bez pomoci QC Expertu pouhým porovnáním průměrných procentuálních výchylek prvních hodnot sérií s variačním koeficientem všech hodnot měření jednoho vzorku a jednoho iontu (Tab. LI).

Tab. LI: Porovnání průměrného vychýlení prvního měření v sérii s relativní výchylkou celého měření

| | Na⁺ | K⁺ | Cl⁻ |
|---|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| Průměrná výchylka prvních hodnot stanovení v séru (%) | -0,29 | -0,15 | -0,94 |
| CV – variační koeficient | 0,56 | 0,93 | 0,83 |
| Průměrná výchylka prvních hodnot stanovení v Ringerově roztoku (%) | 0,61 | 0,45 | -0,87 |
| CV – variační koeficient | 0,63 | 0,96 | 0,71 |

Z tabulky LI je patrné, že průměrná výchylka první hodnoty stanovení chloridů v Ringerově roztoku po předcházejícím krevním séru je větší než by odpovídalo průměrnému vychýlení. Tato tabulka je však jen velmi orientační, kvůli nízkému počtu naměřených hodnot. Doplnujícím pokusem (Tab. LII) ověřujícím vliv předchozího vzorku na následující měření je měření krevního séra po koncentrovaném roztoku chloridu draselného (296,6 mmol/l). Koncentrace tohoto roztoku o dva řády převyšuje koncentraci draselných iontů v krevním séru.

Tab. LII: Shodnost prvních hodnot měření po koncentrovaném roztoku KCl (296,6 mmol/l) s ostatními hodnotami v sérii

| | Průměr 1.hodnoty mmol/l | Průměr dalších mmol/l | t-statistika | Kritická hodnota t_{krit} | Komentář |
|-----------------------|--|--------------------------------------|---------------------|---|---------------------------------|
| Na⁺ | 138,67 | 138,67 | 0 | 2,228 | 1. hodnota se neliší od dalších |
| K⁺ | 4,63 | 4,29 | 6,932 | 2,228 | 1. hodnota je vyšší než další |
| Cl⁻ | 99,00 | 101,11 | 3,034 | 2,228 | 1. hodnota je nižší než další |

Z doplňujícího pokusu je patrné, že draselná ISE po změření koncentrovaného roztoku draselných iontů nadhodnotí koncentraci draselných iontů v následujícím vzorku. Tento efekt je však pozorovatelný až při koncentračním rozdílu obou roztoků o dva řády. Chloridová ISE po koncentrovaném vzorku paradoxně u dalšího vzorku stanovenou koncentraci podhodnocuje. Vzhledem k tomu, že u pokusu se střídáním séra a Ringerova roztoku je tomu naopak (v koncentrovanějším vzorku je první naměřená hodnota podhodnocena proti dalším), tak je pravděpodobně mechanismus vzniku odchylek stanovení pod vlivem předchozího vzorku složitější a nelze jej jednoduše vysvětlit jen vlivem rezidua iontů z předchozího vzorku v membráně ISE, nebo u kovového povrchu elektrody. Do kombinované celkové nejistoty vliv předchozího vzorku započítávat nebudeme, protože se projevuje až při takových maticích rozdílech vzorků, které se běžně nevyskytují. Tento zdroj nejistoty by mohl začít hrát významnou roli snad jen tehdy, kdyby byly střídavě mezi sebou vyšetřovány vzorky séra a moče.

4.2.11 Nelinearita závislosti odezvy na koncentraci

K ověření deklarované linearity³³ odezvy analytického systému potřebujeme sadu roztoků (Tab. LIII), které budou vzájemně izosmolární, o konstantním pH, se stejnou iontovou silou a stejnou maticí. Jediná odlišnost je koncentrace měřených iontů. Byla proměřena tato soustava roztoků o protichůdně vzrůstajících molárních koncentracích chloridu sodného a draselného (Tab. LIII).

Tab. LIII: Koncentrace roztoků spočítané z navážek a stanovené koncentrace
(skutečné koncentrace Na⁺ a K⁺ odpovídají koncentracím jejich solí)

| | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. |
|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| NaCl mmol/l | 0 | 50,03 | 100,05 | 125,03 | 150,01 | 200,03 | 250,04 |
| KCl mmol/l | 249,89 | 199,76 | 149,63 | 124,76 | 99,88 | 49,94 | 0 |
| Průměry naměřených hodnot | | | | | | | |
| Na⁺ mmol/l | 3,9 | 51 | 99,4 | 124,4 | 149,4 | 201 | 251,2 |
| K⁺ mmol/l | 233,15 | 193,33 | 145,41 | 124,08 | 100,46 | 51,38 | 0,26 |

Výchylka stanovených hodnot od gravimetricky a volumetricky určených koncentrací má jednak původ ve vlivu iontové síly a dále v nelinearitě měření. Iontová síla působí na všechny tyto roztoky stejně (je konstantní). Rozdíl odchylek mezi jednotlivými roztoky je tedy pouze vliv nelinearity měření.

K otestování linearity bylo použito nejprve Mandelova testu, který je obsažen v normě³⁴ ISO 8466-1. Podstatou testu je porovnání reziduálních rozptylů lineárního a kvadratického modelu. Nulová hypotéza o platnosti lineárního modelu se zamítá, jestliže je vypočtený kvantil Fisher-Snedecorova rozdělení větší než tabelovaná kritická hodnota $F_{krit.}$.

Pro sodné ionty: $F = 2,03$ a $F_{krit.} = 5,59$ ($p = 0,05$), lineární model se přijímá

Pro draselné ionty: $F = 93,3$ a $F_{krit.} = 5,59$ ($p = 0,05$), lineární model se zamítá

Provedeme dále test modelu v QC Expertu, kde se využívá určení významnosti kvadratického členu matematického popisu modelu. Tentokrát je linearita zamítnuta u obou iontů.

Pro sodný iont hraničí dolní mez intervalu spolehlivosti kvadratického členu těsně s nulou (0,0001-0,0003). Pokud však odstraníme první naměřenou hodnotu (nulová koncentrace Na⁺), pak i test v QC Expertu doporučuje lineární model jako vhodný (interval spolehlivosti kvadratického členu zahrnuje nulu, kvadratický člen je tedy nevýznamný). Běžně se v klinické praxi setkáváme s koncentracemi Na⁺ v séru od 100 mmol/l výše a vliv nelinearity na nepřesnost měření koncentrací pod 50 mmol/l je z hlediska klinické praxe zcela bezvýznamný.

Pro draselný iont je problém obrácený. Nesetkáváme se s koncentracemi v séru nad 10 mmol/l a proto zkusíme vynechat nejvyšší měřenou koncentraci. Po jejím vynechání je

kvadratický člen nevýznamný. Pro koncentrace do 200 mmol/l K^+ tedy vychází lineární model jako vhodný.

Matematický popis modelů z výsledků všech naměřených dat:

$$Na^+: y = 0,0002x^2 + 0,9409x + 3,6309$$

$$K^+: y = -0,0005x^2 + 1,0485x + 0,1645$$

Tyto výsledky však neberou v úvahu rozsah běžně měřených dat a výrobcem nastavenou kalibrační přímkou pro běžný rozsah měření. Abychom předešli ukvapeným závěrům z bezmyšlenkovitě použitých matematických operací, musíme probrat naměřená data i logickou úvahou.

Již z pouhého prohlédnutí naměřených dat je patrná jen malá odchylka naměřených dat od vypočtených z gravimetrických podkladů pro sodné ionty. Pro koncentrace od 100 mmol/l Na^+ výše, je odchylka naměřených hodnot od vypočtených menší než 1%. Z grafu závislosti výchylky měření na iontové síle (Obr. 9) dokonce vyplývá, že je tato odchylka způsobena pouze vyšší iontovou silou. Samotný vliv nelinearity je u sodných iontů z pohledu reálných potřeb medicíny skutečně zanedbatelný v rozsahu výchylky cca desetiny až setiny procenta měřené koncentrace.

Draselné ionty vykazují podstatně větší míru nelinearity a při vyšších koncentracích je odchylka naměřených hodnot od vypočtených 6,70 % (pro $c=249,89$ mmol/l). Je však nutno dodat, že v krevním séru se nevyskytují hodnoty kalemie nad 10 mmol/l K^+ . Z naměřených dat je evidentní, že přímkou kalibrační závislosti je těsná s křivkou odezvy zejména právě v oblasti jednotek až desítek mmol/l K^+ . Pro oblast klinických hodnot, tedy na úseku 0-10 mmol/l K^+ se nelinearita projevuje vlivem odchýlení v řádu setin procenta měřené hodnoty. Tak nízkou nelinearitu však nemůžeme testovat na přístroji, který již primárně zaokrouhluje výsledek na jednotky desetiny mmol/l, které představují u běžně měřených koncentrací přibližně 2-3% odchylku. Vzhledem k tomu, že nás zajímá vliv nelinearity na měření reálných vzorků séra, pak nás nemusí znepokojovat nelinearita zjištěná Mandelovým testem pro kalibrační rozsah 0-300 mmol/l. Pouze formálně však můžeme prohlásit, že se nepodařilo potvrdit údaj od výrobce³³, deklarující linearitu měření v rozsahu 0-300 mmol/l K^+ .

Chloridové ionty nelze v dostupných podmínkách otestovat na linearitu kalibrační závislosti. Tč. totiž není k dispozici sada roztoků o proměnné koncentraci chloridů a současně konstantní iontové síle a nepřítomnosti interferentů. Pro účely této práce nezbyvá, než důvěřovat údajům v příbalovém letáku (certifikátu³³) a spolehnout se na deklaraci linearit v rozsahu 0-330 mmol/l.

Do celkové kombinované nejistoty stanovení iontů nebudeme započítávat vliv nelinearity kalibrační závislosti, protože je v měřených rozsazích statisticky nevýznamný.

4.2.12 Chyba pipetování, výkyv napětí v síti a další celkové vlivy

Při prohlédnutí sloupcového grafu (Obr. 3 v příloze) stanovených koncentrací iontů v podmínkách opakovatelnosti zjistíme, že některé výchylky od průměru jsou u všech iontů shodným směrem a dokonce podobného relativního rozsahu a jiné nikoliv. Ačkoliv není v silách koncového uživatele analyzátoru kvantifikovat jednotlivé vlivy na úrovni izolovaných fyzikálních příčin, můžeme aspoň vizuálně v grafu upozornit na tento jev.

Vlivem nepravidelností v pipetování vzorku či ředícího roztoku dochází ke zcela shodné procentuální změně koncentrace všech měřených iontů. K témuž dojde při změně napětí v síti. I zde totiž jsou elektrody vystaveny stejnému vlivu. Naopak drobné nehomogenity ve vzorku, jako jsou mikrokoagula, smítka, mikroskopické turbulence v proudění vzorku kolem elektrod a podobně, mají vliv natolik lokální, že nezasáhnou prostorově ani působením svých fyzikálních polí (magnetismus) do oblasti více elektrod. Tam se potom výchylka stanovení projeví jen u jednoho, eventuálně dvou iontů. Vzhledem k tomu, že veškeré tyto jevy se vyskytují najednou a nemůžeme je izolovaně pozorovat, tak nelze provést ani jejich spolehlivé statistické vyhodnocení. Velmi obrazně bychom mohli nejistotu měření v podmínkách opakovatelnosti označit za statistické pozadí nejistoty stanovení iontů, na které nasedají ostatní složky celkové nejistoty.

4.3 Kombinovaná nejistota stanovení

Následky všech sledovatelných vlivů na nejistotu stanovení iontů lze matematicky vyjádřit v podobě variačních koeficientů nebo procentuálně vyjádřené výchylky (Bias %). Důvodem je fakt, že rušivý vliv na ISE může buď snižovat stabilitu měření a tím zvyšovat rozptyl (potažmo variační koeficient), nebo může pouze měnit míru interakce ISE s ionty a tím posouvat naměřenou hodnotu k vyšším či nižším hodnotám. Procentuálně vyjádřená výchylka i směrodatná odchylka jsou spolu s nejistotou průměru již přímo použitelné jako jednotlivé členy výpočtu kombinované nejistoty. Veškeré tyto výchylky musí být převedeny na míru, která odpovídá běžným vlivům, tj.: teplota $\pm 1^\circ\text{C}$, změny složení matrice odpovídajícím biologické variabilitě (interferenty, iontová síla, pH), odpar vzorku za dobu, která je u čekání na stanovení běžná, nebo průměrná, vliv paměťového efektu sledovat po reálných koncentračních změnách mezi vzorky. Takto nastavené pokusy produkují dílčí kombinované nejistoty vhodné k výpočtu celkové kombinované nejistoty podle vztahu:

$$u_{\text{celk,komb.}} = \sqrt{\sum_{x=1}^n u_{x,\text{komb.}}^2} \quad (19)$$

Kde $u_{\text{celk,komb}}$ je celková kombinovaná nejistota a $u_{x,\text{komb.}}$ jsou příspěvky k nejistotě měření jednotlivých rušivých vlivů, tak jak byly popsány a vypočteny v předchozích kapitolách.

Do výpočtu nejsou zahrnuty nejistoty způsobené těmi vlivy, které se neprokázaly na statisticky významné úrovni a to ani v rozsahu působení větším, než je běžný. Jsou to: : Elektromagnetického záření, stáří ISE, paměťový efekt, nelinearita kalibrace a chyba pipetování a výkyvu napětí (poslední dvě jsou totiž už zahrnuty v opakovatelnosti). Ostatní složky celkové kombinované nejistoty (Tab. LIV) se zahrnou do výpočtu:

Obecný výpočet kombinované nejistoty:

$$u_{\text{celk,komb.}} = \sqrt{u_{\text{opakov.}}^2 + u_{\text{kalib.}}^2 + u_{\text{odpar}}^2 + u_{\text{teplota}}^2 + u_{\text{kondice}}^2 + u_{\text{i.síla}}^2 + u_{\text{acidobas.}}^2 + u_{\text{interf.}}^2} \quad (20)$$

Kde:

- $u_{\text{opakov.}}$ je základní nejistota při opakování měření
- $u_{\text{kalib.}}$ je vliv kalibrace
- u_{odpar} je vliv odparu
- u_{teplota} je vliv teploty (jen Cl^-)
- u_{kondice} je vliv kondice ISE (jen Na^+ a Cl^-)
- $u_{\text{i.síla}}$ je vliv iontové síly
- $u_{\text{acidobas.}}$ je vliv acidobazických výkyvů
- $u_{\text{interf.}}$ je vliv biologické variability interferentů (jen Cl^-)

Pro jednotlivé ionty pak vztah vpuštěním statisticky nevýznamných položek nabývá tvarů:

$$u_{\text{Na,celk.komb.}} = \sqrt{u_{\text{Na,opakov.}}^2 + u_{\text{Na,kalib.}}^2 + u_{\text{Na,odpar}}^2 + u_{\text{Na,kondice}}^2 + u_{\text{Na,i.síla}}^2 + u_{\text{Na,acidobas.}}^2} \quad (21)$$

$$u_{\text{K,celk.komb.}} = \sqrt{u_{\text{K,opakov.}}^2 + u_{\text{K,kalib.}}^2 + u_{\text{K,odpar}}^2 + u_{\text{K,i.síla}}^2 + u_{\text{K,acidobas.}}^2} \quad (22)$$

$$u_{\text{Cl,celk.komb.}} = \sqrt{u_{\text{Cl,opakov.}}^2 + u_{\text{Cl,kalib.}}^2 + u_{\text{Cl,odpar}}^2 + u_{\text{Cl,teplota}}^2 + u_{\text{Cl,kondice}}^2 + u_{\text{Cl,i.síla}}^2 + u_{\text{Cl,acidobas.}}^2 + u_{\text{Cl,interf.}}^2} \quad (23)$$

Tab. LIV: Významné složky nejistoty stanovení iontů s uvedením svého příspěvku k nejistotě stanovení (relativní výchylky, nebo relativní sm.odchylky)

| | Na^+ (%) | K^+ (%) | Cl^- (%) |
|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| Opakovatelnost | 0,46 | 0,90 | 0,72 |
| Kalibrace | 0,37 | 0,51 | 0,35 |
| Odpar | 0,47 | 0,47 | 0,47 |
| Teplota | Nevýzn. | Nevýzn. | 1,05 |
| Kondice ISE | 0,89 | Nevýzn. | 2,27 |
| Iontová síla | 0,08 | 0,06 | 0,12 |
| pH | 0,58 | 0,31 | 0,36 |
| Interference | Nevýzn. | Nevýzn. | 0,41 |

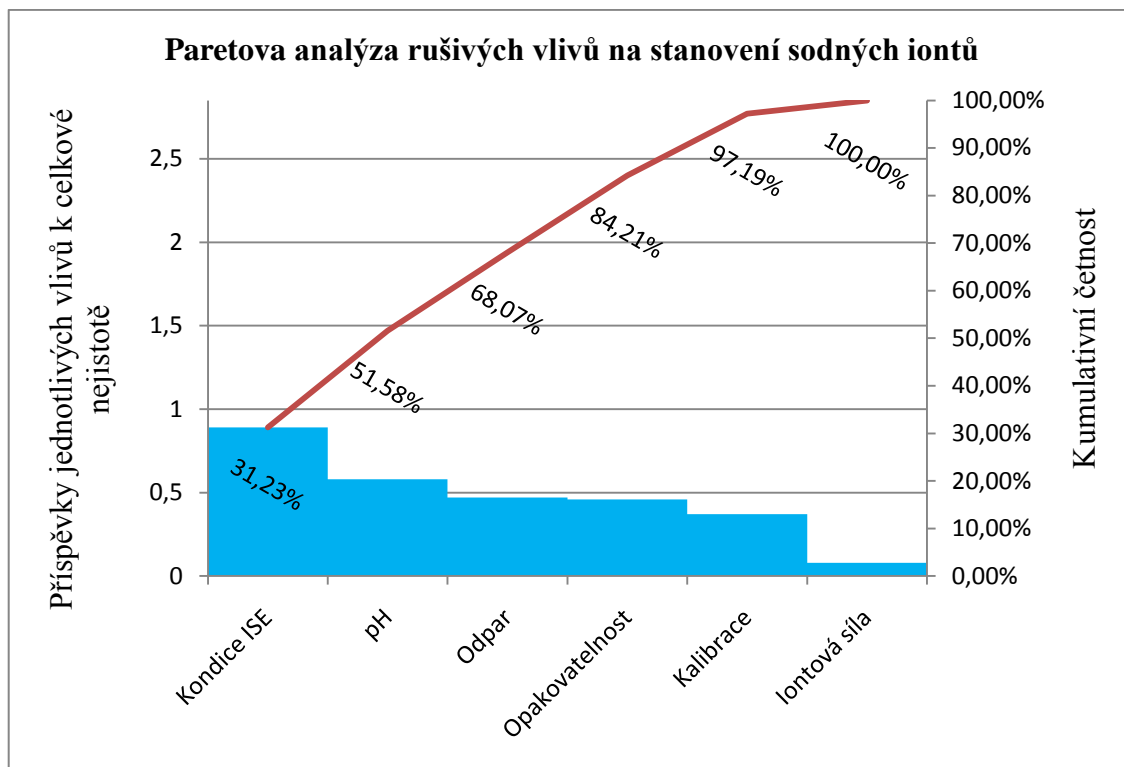
Celková kombinovaná nejistota stanovení iontů:

| | |
|-----------------------------|---------------|
| $u_{\text{celk.komb.Na}}$: | 1,31 % |
| $u_{\text{celk.komb.K}}$: | 1,18 % |
| $u_{\text{celk.komb.Cl}}$: | 2,73 % |

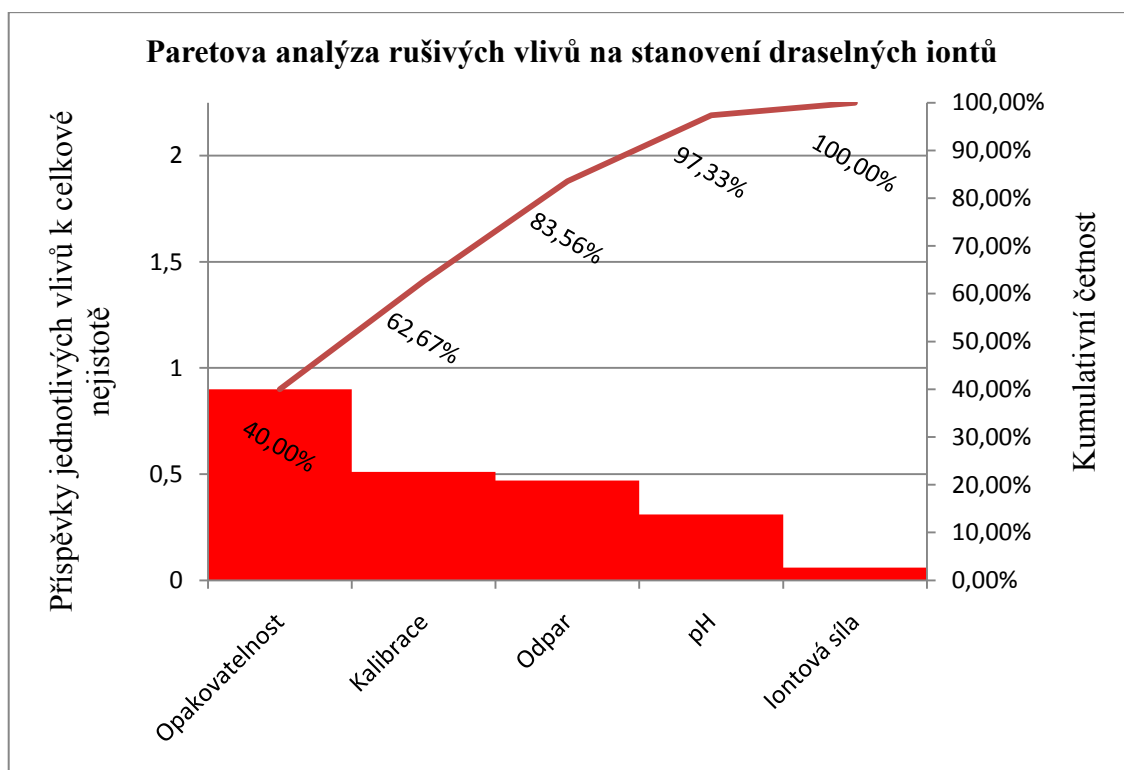
Vypočtené hodnoty celkové kombinované nejistoty bychom v ideálním případě měli srovnat s kombinovanou nejistotou vypočtenou z mnohasouborového reprodukováného měření. Jak již však bylo napsáno výše, tak zejména systematická výchylka je v případě pouhých čtyř kontrolních vzorků zatížená konstantními vlivy. Proto budeme celkovou kombinovanou nejistotu srovnávat jen s hodnotami variačního koeficientu, čili s mírou preciznosti dlouhodobého reprodukováného měření dostupných čtyř kontrolních materiálů (Tab. VII a Tab. X).

4.4 Paretova analýza

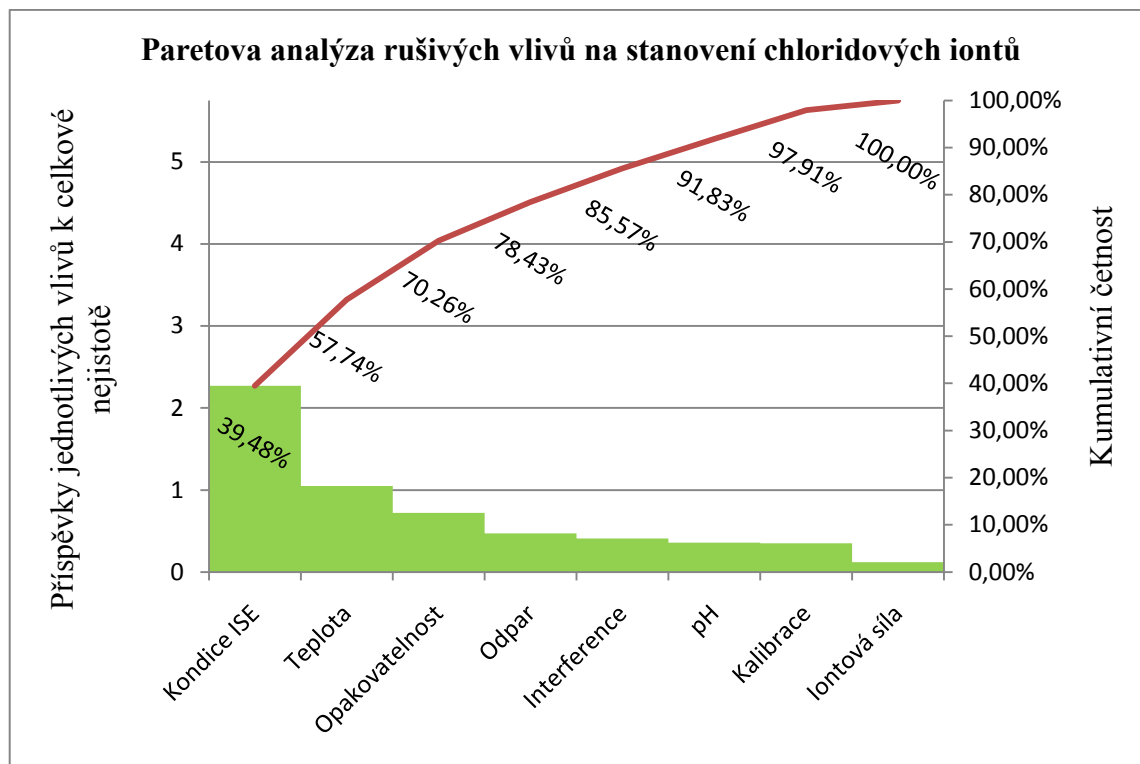
Pro praktické zhodnocení a vyvození závěrů pro praktická opatření potřebujeme zjistit, které vlivy mají největší význam a má smysl se zabývat jejich omezením, či eliminací. Pro každý iont sestavený graf Paretovy analýzy ukazuje podíl rušivých vlivů na jejich stanovení.



Obr. 11: Graf Paretovy analýzy významnosti složek nejistoty stanovení sodných iontů



Obr. 12: Graf Paretovy analýzy významnosti složek nejistoty stanovení draselných iontů



Obr. 13: Graf Paretovy analýzy významnosti složek nejistoty stanovení chloridových iontů

Z grafů Paretovy analýzy (Obr. 11, Obr. 12, Obr. 13) je patrné, že jednotlivé elektrody v senzoru rozhodně nemají stejné vlastnosti.

4.5 Rozbor výsledků Paretovy analýzy a celkové kombinované nejistoty

Na výsledcích výpočtu celkových kombinovaných nejistot je patrné, že pro sodné a chloridové ionty se podařilo poskládáním všech známých složek nejistoty měření získat celkovou kombinovanou nejistotu podobného číselného rozměru, jako je velikost variačního koeficientu preciznosti reprodukováného měření. Viditelné je to zejména při srovnání s měřeními méně početných sérií (30 měření v každé sérii) na kontrolních roztocích Biorad 1 a 2, které jsou rozměry statistických souborů srovnatelné se soubory pro rozbor vlivů na nejistotu stanovení. Pro draselné ionty však dostáváme hodnotu celkové kombinované nejistoty menší, než odpovídá předpokladu odvozenému z preciznosti reprodukováných dat. Vysvětlením je nízká koncentrace draselných iontů ve vyšetřovaných vzorcích a tím i měření ve velmi úzkém rozsahu koncentrací a navíc se zaokrouhlováním na jedno desetinné místo

(nelze změnit, je dáno výrobcem analyzátoru). Nejmenší cifra, na kterou analyzátor zaokrouhluje výsledky, tvoří ve výsledcích stanovení draselných iontů 2,5%, zatímco u chloridů jen 1% a u sodných iontů dokonce jen 0,7%. Nepříjemným důsledkem je ztráta dat, která se pohybují svým významem pod těmito procentuálními významy. Při výpočtech nejistot se tedy pro draselné ionty část dat ztratila již v softwarovém nastavení analyzátoru. Jako dominantní složka nejistoty stanovení draselných iontů nám proto vyplynul základní rozptyl hodnot daný náhodnými vlivy na pozadí veškerých ostatních (známých) vlivů. I přes toto pesimistické zjištění máme k dispozici náhled na ty složky nejistoty, které se projeví výrazně.

4.5.1 Chloridová iontově selektivní elektroda

Oprávněnost postesku nad nestabilitou chloridové ISE v literatuře² je potvrzena i výsledkem rozboru složek nejistoty. Viditelné je to už na rozměru nejistoty stanovení chloridů vlivem kondice ISE a vlivu teplotních výkyvů (první dva sloupce v Paretově grafu). Pokud bychom z grafu Paretovy analýzy odstranili nejistotu při podmínkách opakovatelnosti, kterou nemůžeme v běžném provozu ovlivnit, dostaneme do 80% vlivu i vliv interferentů ve vzorku a vliv pH. Z těchto všech vlivů nemůžeme ovlivnit biologickou variabilitu interferentů a acidobazických poměrů v krevním séru populace. Výsledky jednoznačně ukazují, že pro zvýšení kvality měření chloridů na přístroji Dimension RxL je třeba dodržet následující pokyny:

- 1) Před započítáním vlastní série měření změřit 2-3 nepotřebné vzorky s podobnou maticí, jako mají následující vyšetřované vzorky
- 2) Analyzátor by měl stát v klimatizované místnosti bez výkyvů teplot.
- 3) Omezit přepipetování vzorků, přípravu alikvotů a vyvarovat se měření malých objemů vzorků ve velkých sériích. Přístroj neumožňuje vyšetření séra v uzavřeném odběrovém systému přes membránu, takže je třeba aspoň provádět měření po jednom, maximálně dvou blocích (blok má 10 zkumavek) v původním odebraném množství vzorku.

4.5.2 Sodíková iontově selektivní elektroda

Sodíková ISE vykazuje poněkud větší stabilitu měření, než elektroda chloridová. Každopádně vliv kondice ISE je i zde na prvním místě mezi vlivy na nejistotu měření. Hned za vlivem pH vzorku, které ovlivnit nemůžeme, stojí vliv odparu při tvorbě alikvotů.

Pro zvýšení kvality měření sodných iontů na přístroji Dimension RxL je třeba dodržet následující pokyny:

- 1) Před započítáním vlastní série měření změřit 2-3 nepotřebné vzorky s podobnou maticí, jako mají následující vyšetřované vzorky
- 2) Omezit přepipetování vzorků, přípravu alikvotů a vyvarovat se měření malých objemů vzorků ve velkých sériích.

4.5.3 Draslíková iontově selektivní elektroda

Vlivem zaokrouhlení již vstupních dat vydaných analyzátozem zanikl ve výpočtech význam ovlivnitelných rušivých vlivů na nejistotu stanovení draselných iontů v krevním séru. V grafu Paretovy analýzy stojí na prvních dvou místech základní nejistota při opakování měření a vliv kalibrace, která je ovlivnitelná obsluhou jen částečně. Za významný díl nejistoty stanovení draselných iontů je možno považovat ještě vliv odparu vzorku při tvorbě alikvotů.

Pro zvýšení kvality měření sodných iontů na přístroji Dimension RxL je třeba dodržet následující pokyny:

- 1) Kalibraci provádět pokud možno po změření několika vzorků, aby kalibrace nebyla ovlivněna změnou kondice ISE.
- 2) Omezit přepipetování vzorků, přípravu alikvotů a vyvarovat se měření malých objemů vzorků ve velkých sériích.

4.5.4 Celková zhodnocení a doporučení

Z výsledků statistického zpracování dat vyplývá, že personál by se měl zaměřit zejména na fakt, že první hodnoty měření mají větší chybu stanovení, než měření následující, dále by neměl prodlužovat dobu práce s otevřeným vzorkem a už vůbec ne pokud jde o alikvot s malým objemem pod 500 μl . Vedení laboratoře by mělo zajistit stabilitu teploty prostředí, ve kterém se měří. Laboratoř by tedy měla být klimatizovaná.

Paradoxně se nepotvrdily všeobecně předpokládané představy o rušivém vlivu používání mobilních telefonů v blízkosti analyzátoru. Malý vliv na měření mají i paměťový efekt ISE a stáří ISE. Vliv interferentů je patrný jen u chloridové ISE. Nelinearita kalibrační závislosti je z hlediska požadavků klinické praxe nevýznamná (pro chloridy nebylo ověřeno).

Významnými složkami nejistoty stanovení iontů jsou i vlivy, které obsluha analyzátoru ovlivnit nemůže. Jsou to vlivy technických nepravidelností při manipulaci analyzátoru se vzorkem a biologické variability pH a iontové síly.

Základní nejistota měření v sérii opakovaných vzorků nese známky zátěže nejistotou objemu pipetování a pravděpodobně i vlivu nehomogenit ve vzorku v době, kdy prochází senzorem. Zaměření na zpřesnění mechaniky pipetovacích jehel a pump či stříkaček s případným zdokonalením systému filtrů lze doporučit výrobcí na základě zjištěných statistických charakteristik nejistoty nerušeného opakovaného měření.

Jak již bylo řečeno, vliv pH na iontově selektivní elektrodu je spíše projevem ovlivněné iontové síly při uvolnění či navázání iontů na albumin. Samotná změna kyselých vodíkových iontů a hydroxylových aniontů je koncentračně nepatrná a nemůže se projevit na signálu elektrod. Při sečtení statistické váhy vlivu pH a iontové síly na nejistotu měření zjistíme, že je podíl tohoto spojeného vlivu značný. Je výzvou pro výrobce analytického systému upravit ředění vzorku před analýzou tak, aby byl vliv iontové síly dokonaleji eliminován.

5 ZÁVĚR

Hlavní náplní této práce byla identifikace a rozbor jednotlivých složek nejistoty, jejich kvantifikace a následně vypracování praktických doporučení pro obsluhující personál. Práce byla prováděna na biochemickém analyzátoru Dimension RxL. K měření byly použity uměle připravené roztoky, zakoupené kontrolní materiály a lidské směsné i individuální krevní sérum.

Pokusy byly nastaveny tak, aby se v měřených sériích projevil selektivně vždy jen jeden sledovaný rušivý vliv na nejistotu stanovení iontů. Naměřená data byla po té statisticky zpracována. Konečné výsledky byly graficky znázorněny pomocí Paretovy analýzy.

Výpočet celkové kombinované nejistoty pro každý iont a porovnání velikosti této nejistoty s nejistotami zjištěnými při reprodukováném měření umožňuje kontrolu důvěryhodnosti výsledků práce. Za dostatečně informačně výtěžné se dají považovat výsledky rozboru a kvantifikace složek nejistoty stanovení sodných a chloridových iontů. Naopak statistické zpracování dat pro draselné ionty vykazuje značné rezervy a pro zvýšení výpovědní hodnoty dat by bylo nutno měřit podobně koncipované experimenty na podstatně rozsáhlejších souborech vzorků.

Výsledky statistického zpracování naměřených dat byly použity pro vypracování pracovních doporučení pro personál obsluhující biochemický analyzátor Dimension RxL.

Za nejdůležitější opatření lze považovat nutnost zahájení vlastní série měření až po několika měřeních podobných vzorků, jejichž výsledky nepotřebujeme, vybavení laboratoře klimatizací a minimalizace manipulace se vzorkem, nerozlévání do alikvotů a po otevření zkumavky urychleně provádět měření.

Výzvou pro výrobce analytických systémů je zaměření na robustnost měření ve vztahu k iontové síle matričního roztoku vzorků. Rovněž mechanika analyzátoru s projevy nepravidelností pipetování eventuelně ošetření homogenity vzorku si zaslouží pozornost.

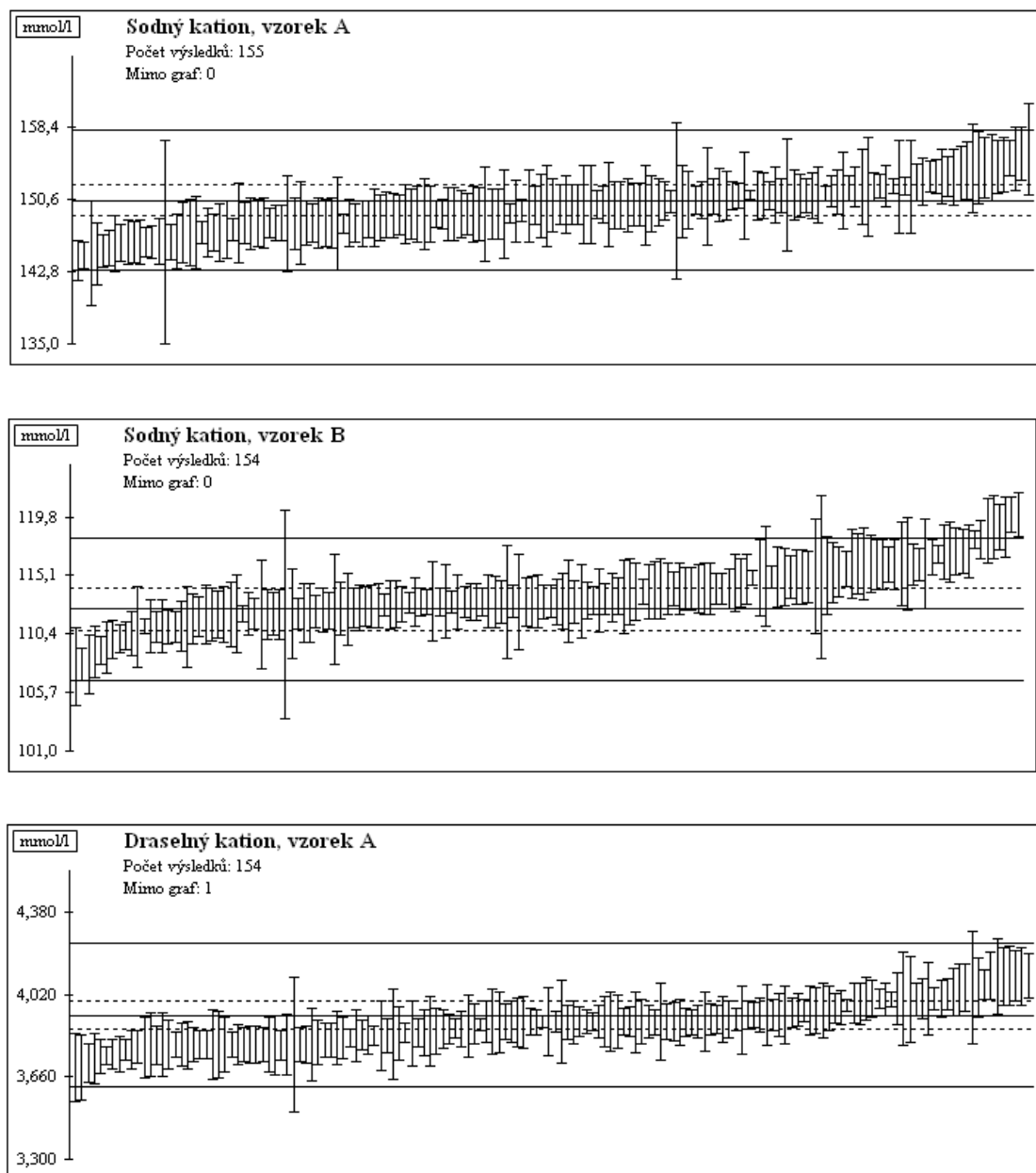
Celkově lze konstatovat, že byly splněny vytýčené cíle této práce. Podařilo se rozebrat a kvantifikovat složky nejistoty a na základě toho vypracovat pracovní opatření v podobě doporučení pro obslužný personál.

6 LITERATURA

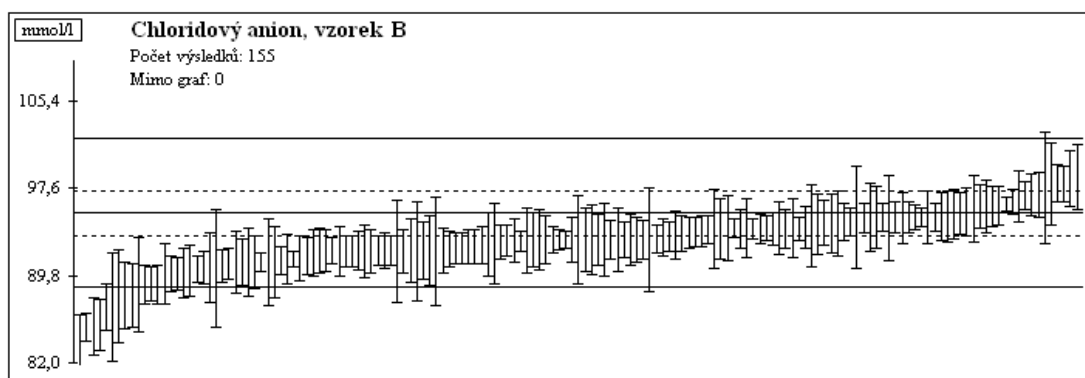
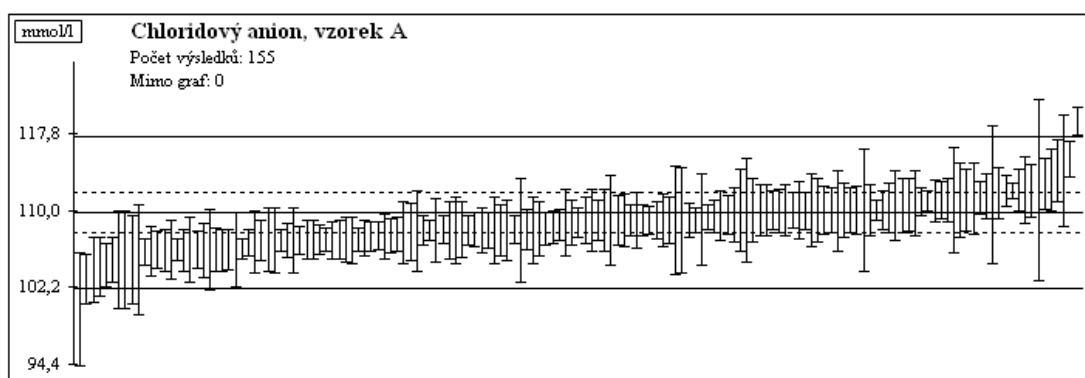
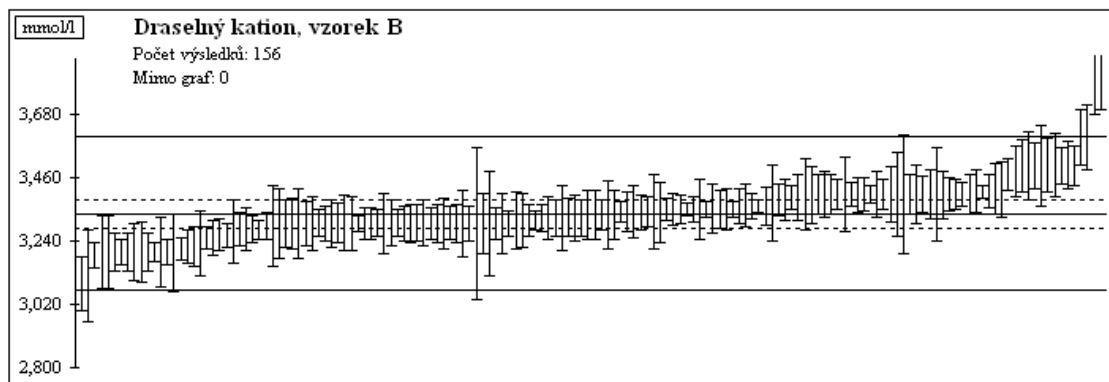
1. TNI 01 0115:2009 *Mezinárodní metrologický slovník - Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM)*.
2. Jabor A. a kolektiv: *Vnitřní prostředí*. Grada, Praha 2008.
3. Ganong W.F.: *Přehled lékařské fyziologie*. H&H, Praha 1995.
4. Racek J. a kolektiv: *Klinická biochemie*. Galén, Praha 2006.
5. Klener P. a kolektiv: *Vnitřní lékařství*. Galén, Praha 2006.
6. Zima T.: *Laboratorní diagnostika*. Galén, Praha 2007.
7. Ricós C., Alvarez V., Cava F, García-Lario J.V., Hernández A., Jiménez C.V., Minchinela J., Perich C., Simón M.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **59**, 491 (1999).
8. Jabor A., Zámečník M.: *Preanalytická fáze*. ČSKB ČLS JEP a SEKK, spol. s r.o., Praha 2005.
9. Kolektiv autorů: *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi – speciál 2008*. SEKK s.r.o., katedra klinické biochemie IPVZ Praha, 2008.
10. Friedecký B., Kratochvíla J., Kubiček Z.: *Metrologie chemických měření v laboratorní medicíně 2006*. SEKK spol.s r.o., Pardubice 2006.
11. www.westgard.com/westgard-rules-and-multirules.htm, "Westgard Rules" and Multirules, 2009.
12. www.sekk.cz/Info_o_nas/CompanyProfile.htm, Profil firmy, 14.4.2010.
13. Barek J. a kol.: *Chem. Listy*. 94, 439 (2000).
14. Koryta J., Štulík K.: *Iontově selektivní elektrody*. Academia, Praha 1984.
15. Havas J.: *Ion- and Molecule-Selective Electrodes in Biological Systems*. Akadémiai Kaidó, Budapest 1985.
16. Pungor E.: *Ion-selective electrodes*. Akadémiai Kaidó, Budapest 1973.
17. Morf W.E.: *The principles of ion-selective electrodes and of membráně transport*. Akadémiai Kaidó, Budapest 1981.
18. *Iontově selektivní elektrody ve vodohospodářských laboratořích*. Dokumentace vydaná MLVH ČSR, Praha 1985.
19. Semler M. a kolektiv: *Iontově selektivní elektrody a jejich využití v potravinářské a zemědělské praxi*. Výzkumný ústav potravinářského průmyslu, Praha 1990.
20. Dybko A.: *Sensors*. **1**, 29 (2001).

21. G. Meinrath G., Kufelnicki A., Swiatek M.: *Accred Qual Assur.* **10**, 494 (2006).
22. Kufelnicki A., Lis S., G. Meinrath G.: *Anal Bioanal Chem.* **382**, 1652 (2005).
23. Sousa A.R., Trancoso M.A.: *Accred Qual Assur* **10**, 430 (2005).
24. Kupka K.: *Statistické řízení jakosti*. TriloByte statistical software, Pardubice 1997.
25. Certifikát, Liquid Assayed Multiqual® 1, 2, 3, LOT 45580, United States, Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA.
26. Suchánek M. (editor): *Kvalimetrie 11. Stanovení nejistoty analytického měření*. EURACHEM-ČR, Praha 2001.
27. Meloun M., Militký J.: *Statistická analýza experimentálních dat*. Academia, Praha 2004.
28. Kupka K.: *QC Expert verze 2.7. Uživatelský manuál*, TriloByte, Pardubice 2004.
29. Suchánek M., Friedecký B., Kratochvíla J., Budina M., Bartoš V.: *Klinická biochemie a metabolismus* **1**, 43 (2006).
30. Magnusson B., Näykki T., Hovind H., Krysell M.: *Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories*. Nordtest, Espoo 2004.
31. www.sekk.cz/EQA/Nejistota_odhad.xls, Pomůcka pro výpočet odhadu kombinované nejistoty ("kalkulačka nejistot"), 14.4.2010.
32. Van Slyke D.D., Hastings A.B., Murray C.D., Sendroy J.: *J. Biol. Chem.* **65**, 701 (1925).
33. Certifikát, QuikLYTE® Integrated Multisenzor Na⁺/K⁺/Cl⁻, Dade Behring.
34. ČSN ISO 8466-1:1994 (75 7031) *Jakost vod - Kalibrace a hodnocení analytických metod a určení jejich charakteristik - Část 1: Statistické hodnocení lineární kalibrační funkce*.

7 PŘÍLOHY



Obr. 1 (první polovina): Výsledky externí kontroly kvality s grafickým mezilaboratorním porovnáním (duben 2009), část grafů je na následující straně
Střední vodorovná linie představuje deklarovanou hodnotu koncentrace refer.materiálu
Vrchní a dolní linie představují toleranční limit
Jednotlivé úsečky jsou odhady šířky nejistoty měření jednotlivých laboratoří
Ve středech úseček jsou vlastní stanovené hodnoty (v papírové verzi zvýrazněny tečkou)



Obr. 1 (druhá polovina): Výsledky externí kontroly kvality s grafickým mezilaboratorním porovnáním (duben 2009), část grafů je na předchozí straně

Střední vodorovná linie představuje deklarovanou hodnotu koncentrace refer.materiálu
Vrchní a dolní linie představují toleranční limit

Jednotlivé úsečky jsou odhady šířky nejistoty měření jednotlivých laboratoří

Ve středech úseček jsou vlastní stanovené hodnoty (v papírové verzi zvýrazněny tečkou)

Tab. IV: Základní Westgardova pravidla

| Symbol pravidla | Popis a funkce pravidla |
|------------------------|--|
| 1x3s | Série měření je zamítnuta, byl-li výsledek kontrolního měření odlišný od deklarované hodnoty o nejméně tři směrodatné odchylky. |
| 1x2s | Je-li odchylka naměřené koncentrace kontrolního materiálu od deklarované hodnoty nad dvě směrodatné odchylky, ale méně než o tři, pak je nutno provést hlubší kontrolu, recalibraci atd. Není však nutno ještě zamítnat naměřenou sérii. |
| 2x2s | Naměřená série měření je odmítnuta, byla-li kontrolní hodnota odchýlena dvakrát po sobě o více než dvě směrodatné odchylky v jednom směru. |
| R4s | Naměřená série je odmítnuta, došlo-li ke změně o více než čtyři směrodatné odchylky proti předchozímu kontrolnímu měření. Například byla-li první kontrolní hodnota o dvě a půl směrodatné odchylky pod deklarovanou hodnotou a druhá kontrolní hodnota jednu a půl směrodatné odchylky nad deklarovanou hodnotou, pak je jejich vzájemná poloha vzdálená o čtyři směrodatné odchylky a série měření musí být odmítnuta. |
| 4x1s | Série měření je odmítnuta, jestliže je čtyřikrát po sobě odchylka od deklarované hodnoty nad jednu směrodatnou odchylku a to vždy na stejnou stranu. |
| 10x | Série měření je odmítnuta, je-li výsledek kontrolního měření desetkrát vychýlen jen na jednu stranu od deklarované hodnoty. |
| 8x | Série měření je odmítnuta, je-li výsledek kontrolního měření osmkrát vychýlen jen na jednu stranu od deklarované hodnoty. |
| 12 | Série měření je odmítnuta, je-li výsledek kontrolního měření dvanáctkrát vychýlen jen na jednu stranu od deklarované hodnoty. |

Tab.V: Další Westgardova pravidla

Kromě výše popsaných pravidel se užívají i další pravidla. Ty využívají spíše obory klinické hematologie, imunologie a dalších oborů, kde je statistické hodnocení výsledků poněkud odlišné než v klasické chemické (byť klinické) analýze.

| Symbol pravidla | Popis a funkce pravidla |
|------------------------|---|
| 2 z 3 2s | série měření je odmítnuta, byly-li dvě ze tří po sobě jdoucích kontrolních měření odchýleny od deklarované hodnoty o více než dvě směrodatné odchylky |
| 4x1s | Série měření je odmítnuta, jestliže je čtyřikrát po sobě odchylka od deklarované hodnoty nad jednu směrodatnou odchylku a to vždy na stejnou stranu. |
| 6x | Série měření je odmítnuta, je-li výsledek kontrolního měření šestkrát vychýlen jen na jednu stranu od deklarované hodnoty. |
| 9x | Série měření je odmítnuta, je-li výsledek kontrolního měření devětkrát vychýlen jen na jednu stranu od deklarované hodnoty. |
| 7T | Série měření je odmítnuta, jestliže je v kontrolních hodnotách setrvalý trend po dobu aspoň sedmi kontrolních měření. |

Tab. VI: Vstupní data pro výpočet nejistoty vážení a volumetrických operací

| Opakované navážky pokusného objektu [g] | Hmotnosti opakovaně doplněné odměrky [g≈ml] |
|--|--|
| 16,2252 | 156,4762 |
| 16,2251 | 156,4965 |
| 16,2251 | 156,3884 |
| 16,2251 | 156,3263 |
| 16,2252 | 156,4675 |
| 16,2251 | 156,3119 |
| 16,2252 | 156,4935 |
| 16,2251 | 156,4240 |
| 16,2252 | 156,4619 |
| 16,2251 | 156,5284 |
| 16,2251 | 156,3771 |
| 16,2251 | 156,4173 |
| 16,2252 | 156,3210 |
| 16,2252 | 156,3295 |
| 16,2252 | 156,4082 |
| Směrodatná odchylka | Směrodatná odchylka |
| 0.0000516 | 0,071357 |

Tab. VIII: Výsledky každodenních vnitřních kontrol za období květen-září 2009 na kontrolních materiálech Monitrol 1 a Monitrol 2 (v hlavičce jsou deklarované koncentrace)

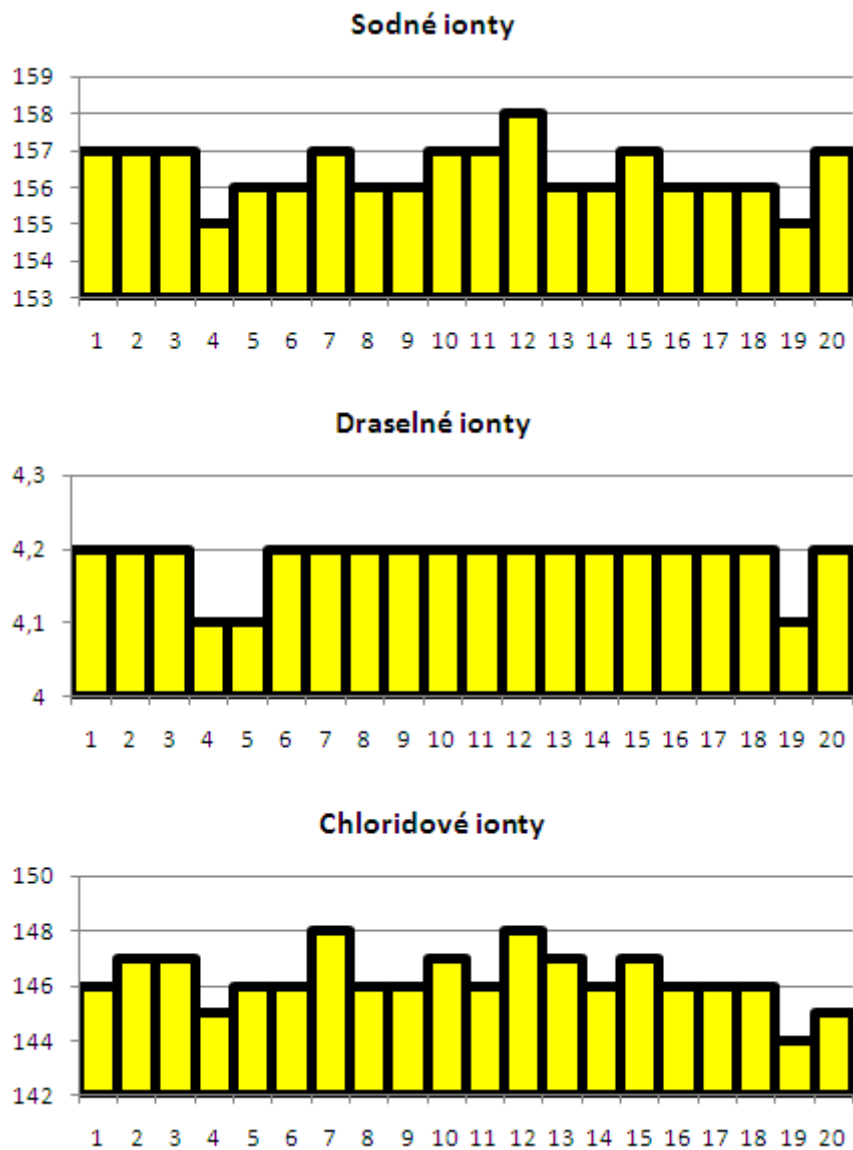
| Na 128 mmol/l | | Na 145 mmol/l | | K 5,55 mmol/l | | K 4,76 mmol/l | | Cl 106 mmol/l | | Cl 91 mmol/l | |
|------------------|-----|------------------|-----|------------------|-----|------------------|-----|------------------|-----|-----------------|----|
| 126 | 130 | 151 | 145 | 5,3 | 5,3 | 4,9 | 4,8 | 103 | 102 | 90 | 89 |
| 130 | 128 | 147 | 145 | 5,4 | 5,1 | 4,7 | 4,8 | 103 | 102 | 89 | 89 |
| 129 | 131 | 147 | 143 | 5,4 | 5,3 | 4,8 | 4,9 | 104 | 103 | 87 | 92 |
| 126 | 129 | 146 | 143 | 5,2 | 5,3 | 4,7 | 4,7 | 100 | 101 | 87 | 91 |
| 126 | 127 | 146 | 144 | 5,3 | 5,3 | 4,8 | 4,7 | 102 | 101 | 90 | 89 |
| 126 | 126 | 144 | 146 | 5,3 | 5,3 | 4,9 | 4,8 | 102 | 103 | 89 | 89 |
| 128 | 126 | 144 | 143 | 5,4 | 5,2 | 4,8 | 5 | 101 | 105 | 92 | 88 |
| 128 | 126 | 143 | 148 | 5,4 | 5,4 | 4,6 | 4,8 | 102 | 104 | 90 | 92 |
| 128 | 127 | 144 | 147 | 5,3 | 5,4 | 4,7 | 4,7 | 103 | 104 | 89 | 88 |
| 127 | 126 | 143 | 147 | 5,3 | 5,3 | 4,6 | 4,8 | 100 | 102 | 89 | 90 |
| 127 | 126 | 145 | 145 | 5,3 | 5,3 | 4,8 | 4,7 | 102 | 104 | 90 | 88 |
| 128 | 125 | 148 | 144 | 5,4 | 5,1 | 4,7 | 4,4 | 104 | 102 | 90 | 89 |
| 128 | 128 | 144 | 148 | 5,1 | 5,3 | 4,8 | 4,7 | 102 | 102 | 89 | 90 |
| 126 | 126 | 142 | 147 | 5,3 | 5,2 | 5,1 | 4,8 | 102 | 102 | 89 | 90 |
| 125 | 126 | 146 | 146 | 5,2 | 5,3 | 4,8 | 4,7 | 102 | 102 | 91 | 89 |
| 127 | 127 | 143 | 145 | 5,2 | 5,7 | 4,7 | 4,7 | 102 | 102 | 88 | 91 |
| 127 | 128 | 145 | 146 | 5,3 | 5,2 | 4,5 | 4,7 | 104 | 102 | 88 | 91 |
| 128 | 127 | 144 | 148 | 5,3 | 5,4 | 4,7 | 4,6 | 104 | 101 | 90 | 89 |
| 127 | 124 | 143 | 146 | 5,2 | 5,4 | 4,8 | 4,6 | 104 | 102 | 89 | 87 |
| 127 | 125 | 142 | 147 | 5,2 | 5,6 | 4,6 | 4,7 | 104 | 103 | 88 | 90 |
| 128 | 132 | 143 | 145 | 5,4 | 5,3 | 4,6 | 4,7 | 104 | 103 | 90 | 92 |
| 127 | 135 | 143 | 144 | 5,4 | 5,4 | 4,8 | 4,7 | 102 | 101 | 89 | 95 |
| 125 | 126 | 142 | 147 | 5,5 | 5,3 | 4,6 | 4,7 | 101 | 102 | 89 | 89 |
| 127 | 129 | 144 | 145 | 5,4 | 5,3 | 4,7 | 4,6 | 101 | 101 | 90 | 91 |
| 125 | 128 | 144 | 144 | 5,3 | 5,3 | 4,9 | 4,6 | 104 | 102 | 88 | 91 |
| 126 | 127 | 143 | 142 | 5,2 | 5,2 | 4,8 | 4,8 | 101 | 102 | 88 | 92 |
| 125 | 125 | 146 | 142 | 5,4 | 5,4 | 4,6 | 4,7 | 108 | 100 | 89 | 89 |
| 124 | 127 | 145 | 146 | 5,2 | 5,3 | 4,7 | 4,7 | 103 | 103 | 90 | 82 |
| 126 | 128 | 145 | 144 | 5,2 | 5,4 | 4,7 | 4,6 | 104 | 102 | 89 | 89 |
| 127 | 128 | 145 | 146 | 5,1 | 5,3 | 4,8 | 4,7 | 103 | 103 | 89 | 89 |
| 125 | 128 | 145 | 145 | 5,3 | 5,3 | 4,9 | 4,6 | 102 | 103 | 88 | 89 |
| 124 | 129 | 144 | 141 | 5,4 | 5,3 | 4,8 | 4,7 | 101 | 100 | 88 | 90 |
| 130 | - | 145 | - | 5,3 | - | 4,8 | - | 103 | - | 90 | - |

Tab. IX: Výsledky každodenních vnitřních kontrol za období leden – březen 2010 na kontrolních materiálech Biorad 1 a Biorad 2 (v hlavičce jsou deklarované koncentrace)

| Na | | K | | Cl | |
|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 111 mmol/l | 138 mmol/l | 2,08 mmol/l | 4,05 mmol/l | 73,4 mmol/l | 96,8 mmol/l |
| 110 | 137 | 2,1 | 4 | 72 | 94 |
| 110 | 137 | 2 | 4 | 71 | 95 |
| 108 | 137 | 1,9 | 3,9 | 70 | 96 |
| 112 | 134 | 2 | 3,8 | 71 | 92 |
| 106 | 136 | 2,1 | 4 | 72 | 94 |
| 110 | 136 | 2,1 | 3,8 | 72 | 94 |
| 109 | 136 | 2 | 4 | 72 | 95 |
| 109 | 134 | 2,1 | 3,9 | 72 | 92 |
| 109 | 134 | 2,1 | 4 | 76 | 92 |
| 109 | 131 | 2,3 | 3,9 | 72 | 91 |
| 109 | 131 | 2,1 | 3,8 | 72 | 91 |
| 109 | 126 | 2,1 | 3,7 | 73 | 87 |
| 109 | 133 | 2,1 | 3,9 | 72 | 89 |
| 110 | 131 | 2,2 | 3,9 | 71 | 92 |
| 109 | 133 | 2,1 | 3,9 | 71 | 90 |
| 109 | 132 | 2,1 | 3,9 | 73 | 90 |
| 110 | 132 | 2,1 | 3,9 | 74 | 96 |
| 112 | 136 | 2,2 | 4 | 72 | 93 |
| 110 | 136 | 2,1 | 4 | 72 | 94 |
| 109 | 137 | 2,1 | 3,9 | 76 | 94 |
| 109 | 136 | 2,2 | 3,9 | 76 | 89 |
| 109 | 133 | 2,2 | 3,8 | 72 | 96 |
| 110 | 137 | 2,1 | 4 | 72 | 98 |
| 109 | 128 | 2,3 | 3,8 | 76 | 94 |
| 109 | 135 | 2,1 | 3,7 | 76 | 94 |
| 109 | 136 | 2,1 | 3,8 | 73 | 98 |
| 109 | 139 | 2,1 | 3,8 | 73 | 96 |
| 108 | 136 | 2,1 | 3,9 | 73 | 94 |
| 110 | 136 | 2,1 | 4 | 72 | 93 |
| 109 | 135 | 2,2 | 3,9 | 76 | 92 |

Tab. XI: Výsledky měření tří nezávislých sérií dvacetkrát opakovaných stanovení iontů v Ringerově roztoku

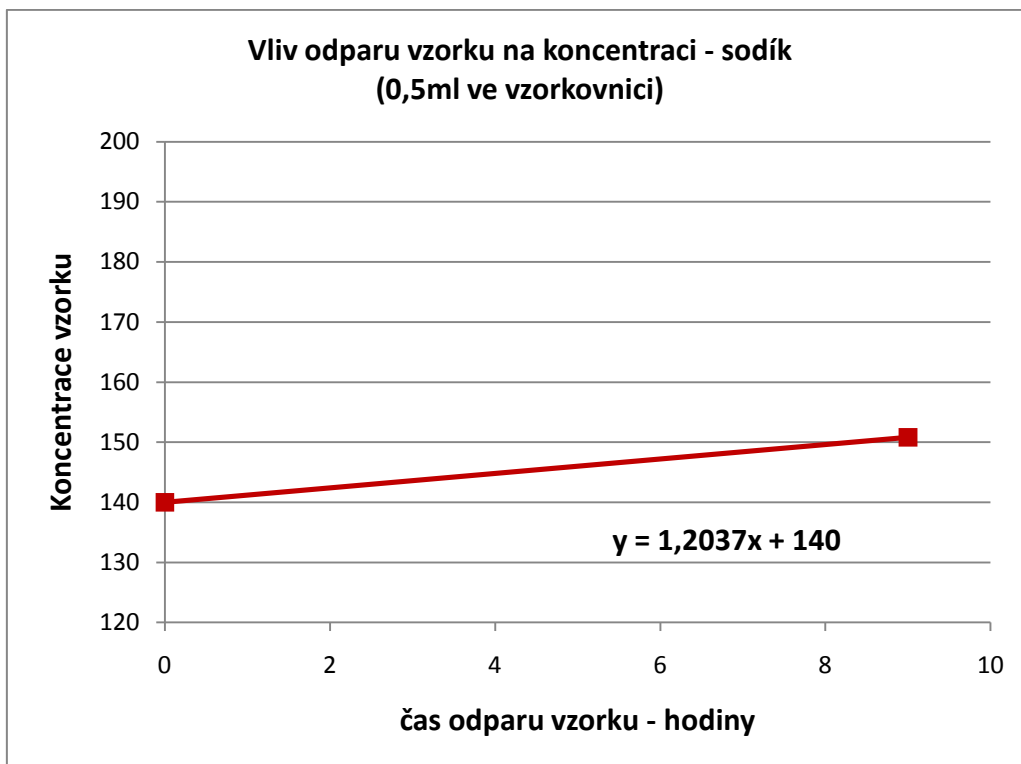
| Na ⁺ mmol/l | K ⁺ mmol/l | Cl ⁻ mmol/l | Na ⁺ mmol/l | K ⁺ mmol/l | Cl ⁻ mmol/l | Na ⁺ mmol/l | K ⁺ mmol/l | Cl ⁻ mmol/l |
|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 152 | 4 | 138 | 153 | 4,2 | 143 | 157 | 4,2 | 146 |
| 154 | 4,1 | 139 | 151 | 4,1 | 143 | 157 | 4,2 | 147 |
| 153 | 4,1 | 144 | 152 | 4,1 | 144 | 157 | 4,2 | 147 |
| 152 | 4,1 | 142 | 152 | 4,1 | 143 | 155 | 4,1 | 145 |
| 153 | 4,1 | 143 | 152 | 4,1 | 143 | 156 | 4,1 | 146 |
| 153 | 4,1 | 143 | 151 | 4,1 | 143 | 156 | 4,2 | 146 |
| 153 | 4,1 | 144 | 151 | 4,1 | 143 | 157 | 4,2 | 148 |
| 153 | 4,1 | 142 | 152 | 4,1 | 143 | 156 | 4,2 | 146 |
| 153 | 4,1 | 143 | 152 | 4,1 | 143 | 156 | 4,2 | 146 |
| 153 | 4,1 | 143 | 152 | 4,1 | 145 | 157 | 4,2 | 147 |
| 154 | 4,2 | 140 | 153 | 4,2 | 143 | 157 | 4,2 | 146 |
| 152 | 4,1 | 145 | 151 | 4,1 | 143 | 158 | 4,2 | 148 |
| 154 | 4,2 | 143 | 152 | 4,1 | 145 | 156 | 4,2 | 147 |
| 153 | 4,1 | 143 | 151 | 4,1 | 144 | 156 | 4,2 | 146 |
| 152 | 4,1 | 142 | 152 | 4,1 | 144 | 157 | 4,2 | 147 |
| 152 | 4,1 | 143 | 151 | 4,1 | 141 | 156 | 4,2 | 146 |
| 153 | 4,1 | 143 | 152 | 4,1 | 143 | 156 | 4,2 | 146 |
| 152 | 4,1 | 142 | 152 | 4,1 | 144 | 156 | 4,2 | 146 |
| 153 | 4,1 | 143 | 153 | 4,2 | 144 | 155 | 4,1 | 144 |
| 153 | 4,1 | 143 | 153 | 4,2 | 145 | 157 | 4,2 | 145 |



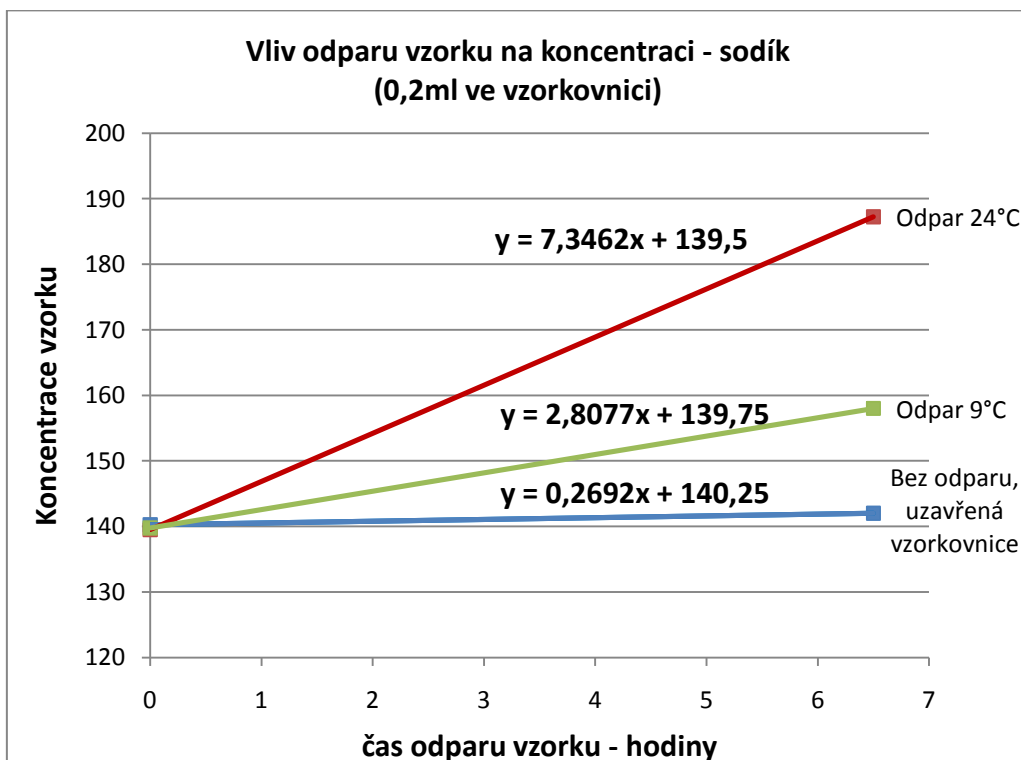
Obr. 3: Sloupcové grafy opakovaných stanovení iontů [mmol/l] v Ringerově roztoku
 Sloupce nad sebou se stejným pořadovým číslem patří stanovení z jedné vzorkovničky

Tab. XVI.: Výsledky stanovení iontů v Ringerově roztoku po kalibracích

| Na⁺ mmol/l | K⁺ mmol/l | Cl⁻ mmol/l |
|--|---------------------------------------|--|
| Kalibrace 1 | | |
| 152 | 4,1 | 142 |
| 151 | 4,1 | 144 |
| 151 | 4,1 | 144 |
| 151 | 4,1 | 144 |
| 151 | 4,1 | 144 |
| Kalibrace 2 | | |
| 153 | 4,2 | 142 |
| 152 | 4,1 | 144 |
| 152 | 4,1 | 144 |
| 152 | 4,1 | 144 |
| 151 | 4,1 | 143 |
| Kalibrace 3 | | |
| 154 | 4,2 | 142 |
| 150 | 4,1 | 143 |
| 151 | 4,1 | 143 |
| 150 | 4,1 | 143 |
| 152 | 4,1 | 144 |
| Kalibrace 4 | | |
| 152 | 4,1 | 141 |
| 153 | 4,2 | 145 |
| 153 | 4,1 | 144 |
| 151 | 4,1 | 143 |
| 152 | 4,1 | 143 |
| Kalibrace 5 | | |
| 153 | 4,2 | 142 |
| 153 | 4,2 | 146 |
| 152 | 4,1 | 146 |
| 152 | 4,1 | 145 |
| 152 | 4,1 | 143 |
| Kalibrace 6 | | |
| 153 | 4,2 | 141 |
| 153 | 4,2 | 145 |
| 152 | 4,1 | 144 |
| 152 | 4,1 | 144 |
| 153 | 4,2 | 145 |



Obr. 4: Graf zkoncentrování vzorku vlivem odparu, vzorkovnička s otvorem ve víčku, objem vzorku 0,5 ml, teplota 26,5°C, vlhkost vzduchu 36%



Obr. 5: Graf zkoncentrování vzorku vlivem odparu při různé teplotě, objem vzorku 0,2 ml

Tab. XVIII: Výsledky měření opakovaných stanovení v Ringerově roztoku v klidu a při rušení elektromagnetickým zářením se zdrojem v opakovaně vyzvánějším mobilním telefonu „Siemens C55“

| Klidové měření | | | Rušené měření | | |
|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Na ⁺ mmol/l | K ⁺ mmol/l | Cl ⁻ mmol/l | Na ⁺ mmol/l | K ⁺ mmol/l | Cl ⁻ mmol/l |
| 152 | 4 | 138 | 153 | 4,1 | 140 |
| 154 | 4,1 | 139 | 155 | 4,1 | 144 |
| 153 | 4,1 | 144 | 156 | 4,2 | 145 |
| 152 | 4,1 | 142 | 152 | 4,1 | 143 |
| 153 | 4,1 | 143 | 153 | 4,1 | 142 |
| 153 | 4,1 | 143 | 154 | 4,1 | 143 |
| 153 | 4,1 | 144 | 152 | 4,1 | 142 |
| 153 | 4,1 | 142 | 152 | 4,1 | 143 |
| 153 | 4,1 | 143 | 153 | 4,1 | 143 |
| 153 | 4,1 | 143 | 154 | 4,1 | 143 |
| 154 | 4,2 | 140 | 153 | 4,1 | 142 |
| 152 | 4,1 | 145 | 152 | 4,1 | 143 |
| 154 | 4,2 | 143 | 153 | 4,1 | 144 |
| 153 | 4,1 | 143 | 153 | 4,1 | 143 |
| 152 | 4,1 | 142 | 155 | 4,2 | 145 |
| 152 | 4,1 | 143 | 154 | 4,1 | 144 |
| 153 | 4,1 | 143 | 153 | 4,2 | 145 |
| 152 | 4,1 | 142 | 153 | 4,1 | 143 |
| 153 | 4,1 | 143 | 154 | 4,2 | 144 |
| 153 | 4,1 | 143 | 154 | 4,1 | 144 |

Tab. XXI: Výsledky stanovení iontů v Ringerově roztoku v průběhu teplotní změny na senzoru

| Teplota °C | Na ⁺ mmol/l | K ⁺ mmol/l | Cl ⁻ mmol/l | Teplota °C | Na ⁺ mmol/l | K ⁺ mmol/l | Cl ⁻ mmol/l |
|------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 19,2 | 155 | 4,2 | 136 | 24,0 | 157 | 4,1 | 140 |
| 20,2 | 156 | 4,1 | 140 | 26,7 | 158 | 4,3 | 143 |
| 20,2 | 155 | 4,1 | 137 | 26,7 | 157 | 4,2 | 143 |
| 20,4 | 157 | 4,2 | 140 | 27,0 | 158 | 4,3 | 144 |
| 20,4 | 156 | 4,1 | 138 | 27,0 | 156 | 4,2 | 142 |
| 20,4 | 156 | 4,1 | 139 | 28,5 | 158 | 4,2 | 144 |
| 20,4 | 155 | 4,1 | 138 | 28,5 | 157 | 4,1 | 146 |
| 20,6 | 156 | 4,1 | 139 | 28,6 | 159 | 4,3 | 146 |
| 20,6 | 156 | 4,1 | 138 | 28,6 | 156 | 4,2 | 146 |
| 20,6 | 157 | 4,1 | 139 | 29,5 | 157 | 4,2 | 146 |
| 20,6 | 156 | 4,1 | 141 | 29,5 | 157 | 4,2 | 147 |
| 20,5 | 156 | 4,1 | 138 | 29,6 | 157 | 4,2 | 147 |
| 20,5 | 155 | 4,1 | 138 | 29,6 | 155 | 4,1 | 145 |
| 20,5 | 155 | 4,1 | 137 | 29,6 | 156 | 4,1 | 146 |
| 20,6 | 156 | 4,1 | 140 | 29,6 | 156 | 4,2 | 146 |
| 20,6 | 156 | 4,1 | 139 | 29,9 | 157 | 4,2 | 148 |
| 20,7 | 157 | 4,2 | 141 | 29,9 | 156 | 4,2 | 146 |
| 20,7 | 156 | 4,1 | 139 | 30,0 | 156 | 4,2 | 146 |
| 20,0 | 157 | 4,2 | 140 | 30,0 | 157 | 4,2 | 147 |
| 20,0 | 155 | 4,1 | 138 | 30,0 | 157 | 4,2 | 146 |
| 21,0 | 158 | 4,2 | 142 | 30,0 | 157 | 4,2 | 148 |
| 21,0 | 156 | 4,1 | 139 | 30,2 | 156 | 4,2 | 147 |
| 22,2 | 157 | 4,1 | 140 | 30,2 | 156 | 4,2 | 146 |
| 22,2 | 157 | 4,1 | 139 | 30,2 | 157 | 4,2 | 147 |
| 23,0 | 157 | 4,1 | 139 | 30,2 | 156 | 4,2 | 146 |
| 23,0 | 154 | 4,1 | 139 | 30,2 | 156 | 4,2 | 146 |
| 23,5 | 157 | 4,1 | 139 | 30,2 | 156 | 4,2 | 146 |
| 23,5 | 156 | 4,1 | 140 | 30,2 | 155 | 4,1 | 144 |
| 24,0 | 157 | 4,1 | 139 | 30,2 | 157 | 4,2 | 145 |

Tab. XXIV: Výsledky sledování vlivu kondice ISE na vychýlení prvních naměřených hodnot sodných iontů v různých roztocích

| | Série 1 mmol/l | Série 2 mmol/l | Série 3 mmol/l | Série 4 mmol/l | Série 5 mmol/l | Série 6 mmol/l |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | 152 | 136 | 157 | 164 | 150 | 143 |
| 2 | 154 | 138 | 157 | 166 | 151 | 143 |
| 3 | 153 | 137 | 158 | 165 | 150 | 144 |
| 4 | 152 | 138 | 158 | 164 | 151 | 144 |
| 5 | 153 | 137 | 158 | 165 | 152 | 145 |
| 6 | 153 | 138 | 158 | 166 | 151 | 145 |
| 7 | 153 | 139 | 159 | 166 | 153 | 145 |

Tab. XXV: Výsledky sledování vlivu kondice ISE na vychýlení prvních naměřených hodnot draselných iontů v různých roztocích (série 3 a 6 bez obsahu K^+ nezapočítávány).

| | Série 1 mmol/l | Série 2 mmol/l | Série 3 mmol/l | Série 4 mmol/l | Série 5 mmol/l | Série 6 mmol/l |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | 4 | 4,4 | 0,4 | 5,1 | 4,1 | 0,2 |
| 2 | 4,1 | 4,5 | 0,3 | 5,2 | 4,1 | 0,2 |
| 3 | 4,1 | 4,4 | 0,3 | 5,1 | 4,1 | 0,2 |
| 4 | 4,1 | 4,4 | 0,2 | 5,1 | 4,1 | 0,2 |
| 5 | 4,1 | 4,4 | 0,2 | 5,1 | 4,1 | 0,2 |
| 6 | 4,1 | 4,5 | 0,2 | 5,1 | 4,1 | 0,2 |
| 7 | 4,1 | 4,5 | 0,2 | 5,2 | 4,1 | 0,2 |

Tab. XXVI: Výsledky sledování vlivu kondice ISE na vychýlení prvních naměřených hodnot chloridových iontů v různých roztocích

| | Série 1 mmol/l | Série 2 mmol/l | Série 3 mmol/l | Série 4 mmol/l | Série 5 mmol/l | Série 6 mmol/l |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | 138 | 101 | 138 | 151 | 139 | 122 |
| 2 | 139 | 102 | 140 | 156 | 141 | 126 |
| 3 | 144 | 101 | 142 | 154 | 141 | 126 |
| 4 | 142 | 101 | 141 | 153 | 142 | 125 |
| 5 | 143 | 101 | 143 | 154 | 142 | 126 |
| 6 | 143 | 101 | 142 | 154 | 142 | 126 |
| 7 | 144 | 102 | 143 | 154 | 142 | 126 |

Tab. XXVIII: Výsledky stanovení sérií měření na starém a novém senzoru

| Starý senzor | | | Nový senzor | | |
|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Na ⁺ mmol/l | K ⁺ mmol/l | Cl ⁻ mmol/l | Na ⁺ mmol/l | K ⁺ mmol/l | Cl ⁻ mmol/l |
| 157 | 4,2 | 146 | 150 | 4,1 | 139 |
| 157 | 4,2 | 147 | 151 | 4,1 | 141 |
| 157 | 4,2 | 147 | 150 | 4,1 | 141 |
| 155 | 4,1 | 145 | 151 | 4,1 | 142 |
| 156 | 4,1 | 146 | 152 | 4,1 | 142 |
| 156 | 4,2 | 146 | 151 | 4,1 | 142 |
| 157 | 4,2 | 148 | 153 | 4,1 | 142 |
| 156 | 4,2 | 146 | 151 | 4,1 | 141 |
| 156 | 4,2 | 146 | 152 | 4,1 | 141 |
| 157 | 4,2 | 147 | 152 | 4,1 | 142 |
| 157 | 4,2 | 146 | 152 | 4,1 | 140 |
| 158 | 4,2 | 148 | 150 | 4 | 140 |
| 156 | 4,2 | 147 | 151 | 4,1 | 142 |
| 156 | 4,2 | 146 | 151 | 4,1 | 142 |
| 157 | 4,2 | 147 | 151 | 4,1 | 141 |
| 156 | 4,2 | 146 | 152 | 4,1 | 141 |
| 156 | 4,2 | 146 | 153 | 4,1 | 142 |
| 156 | 4,2 | 146 | 152 | 4,1 | 142 |
| 155 | 4,1 | 144 | 151 | 4,1 | 140 |
| 157 | 4,2 | 145 | 153 | 4,1 | 142 |

Tab. XXXII: Výsledky stanovení iontů ve škále naředěných vzorků Ringerova roztoku

| Na⁺ | | |
|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| ředění | vypočteno mmol/l | stanoveno mmol/l |
| Neředěno | 147 | 153,33 |
| 5:1 | 122,5 | 129,67 |
| 5:2 | 105 | 111,67 |
| 2:1 | 98 | 106,00 |
| 1:1 | 73,5 | 80,83 |
| K⁺ | | |
| ředění | vypočteno mmol/l | stanoveno mmol/l |
| Neředěno | 4 | 4,17 |
| 5:1 | 3,33 | 3,5 |
| 5:2 | 2,86 | 2,98 |
| 2:1 | 2,67 | 2,78 |
| 1:1 | 2 | 2,1 |
| Cl⁻ | | |
| ředění | vypočteno mmol/l | stanoveno mmol/l |
| Neředěno | 155,5 | 142,67 |
| 5:1 | 129,58 | 118,67 |
| 5:2 | 111,07 | 99,67 |
| 2:1 | 103,67 | 92 |
| 1:1 | 77,75 | 66,5 |

Tab. XXXIV: Výsledky stanovení iontů v roztoku o konstantní koncentraci měřených iontů $\text{Na}^+=140,1275$, $\text{K}^+=4,4507$, $\text{Cl}^-=144,5782$ a proměnlivé koncentraci MgSO_4 určeného k nastavení škály iontové síly

| MgSO₄ mmol/l | Na⁺ mmol/l | K⁺ mmol/l | Cl⁻ mmol/l |
|--|--|---------------------------------------|--|
| 0 | 145 | 4,1 | 133 |
| | 144 | 4,1 | 133 |
| | 145 | 4,1 | 135 |
| | 145 | 4,1 | 133 |
| | 145 | 4,1 | 135 |
| 19,9713 | 145 | 4,1 | 145 |
| | 145 | 4,1 | 146 |
| | 143 | 4 | 145 |
| | 144 | 4,1 | 146 |
| | 143 | 4 | 146 |
| 39,9426 | 143 | 4,1 | 160 |
| | 141 | 4 | 158 |
| | 140 | 4 | 158 |
| | 143 | 4 | 161 |
| | 143 | 4,1 | 161 |
| 59,9139 | 140 | 4 | 168 |
| | 141 | 4 | 169 |
| | 140 | 4 | 169 |
| | 139 | 3,9 | 168 |
| | 141 | 4 | 170 |
| 79,8852 | 138 | 3,9 | 183 |
| | 138 | 3,9 | 176 |
| | 138 | 3,9 | 175 |
| | 138 | 3,9 | 176 |
| | 138 | 3,9 | 176 |
| 99,8565 | 138 | 3,9 | 183 |
| | 138 | 3,9 | 183 |
| | 138 | 3,9 | 184 |
| | 138 | 3,9 | 183 |
| | 137 | 3,9 | 183 |

Tab. XXXIX: Výsledky stanovení iontů v roztocích o konstantní koncentraci chloridu sodného (konstantní koncentraci sodného iontu) a proměnlivé koncentraci chloridu draselného

| Navážka | | Vypočtená koncentrace | | | Stanovená koncentrace | | |
|------------------|-----------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| NaCl g/100 ml | KCl g/100 ml | Na ⁺ mmol/l | K ⁺ mmol/l | Cl ⁻ mmol/l | Na ⁺ mmol/l | K ⁺ mmol/l | Cl ⁻ mmol/l |
| 0,7464 | 0,0000 | 127,6989 | 0,0000 | 127,6989 | 132,25 | 0,23 | 113,50 |
| 0,7519 | 0,0791 | 128,6399 | 10,61033 | 139,2502 | 132,00 | 10,73 | 124,75 |
| 0,7624 | 0,3809 | 130,4363 | 51,09323 | 181,5295 | 132,00 | 52,00 | 169,50 |
| 0,7516 | 0,7480 | 128,5885 | 100,3353 | 228,9239 | 128,25 | 100,05 | 217,50 |
| 0,7575 | 1,1245 | 129,5979 | 150,8384 | 280,4363 | 127,75 | 148,05 | 273,75 |

Tab. XLVIII: Výsledky stanovení iontů ve střídajících se krátkých sériích vzorků Ringerova roztoku a individuálního lidského krevního séra

| Vzorek | Na mmol/l | K mmol/l | Cl mmol/l |
|---------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| Ringer | 152 | 4,1 | 143 |
| | 152 | 4,1 | 144 |
| | 151 | 4,1 | 144 |
| | 152 | 4,1 | 144 |
| Serum | 141 | 5,5 | 105 |
| | 142 | 5,5 | 106 |
| | 142 | 5,5 | 106 |
| | 142 | 5,5 | 106 |
| Ringer | 154 | 4,2 | 142 |
| | 152 | 4,2 | 145 |
| | 152 | 4,2 | 145 |
| | 152 | 4,2 | 144 |
| Serum | 142 | 5,5 | 105 |
| | 142 | 5,5 | 106 |
| | 143 | 5,6 | 107 |
| | 142 | 5,5 | 107 |
| Ringer | 153 | 4,2 | 144 |
| | 152 | 4,2 | 144 |
| | 153 | 4,2 | 145 |
| | 152 | 4,1 | 144 |
| Serum | 143 | 5,6 | 106 |
| | 143 | 5,6 | 107 |
| | 143 | 5,6 | 107 |
| | 144 | 5,6 | 108 |
| Ringer | 154 | 4,2 | 143 |
| | 153 | 4,2 | 146 |
| | 153 | 4,2 | 145 |
| | 153 | 4,2 | 145 |
| Serum | 0 | 0 | 0 |
| | 130 | 5 | 96 |
| | 0 | 0 | 0 |
| | 121 | 4,7 | 89 |
| Ringer | 153 | 4,2 | 144 |
| | 150 | 4,1 | 145 |
| | 153 | 4,2 | 145 |
| | 152 | 4,1 | 146 |

Poslední série se sérem není hodnocena pro chybu stanovení způsobenou nedostatkem vzorku