

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Dominika Giampaglia

Stanovení kreatininu pomocí pulsní amperometrie

Determination of creatinine using pulsed amperometry

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Hana Dejmková, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá stanovením kreatininu pomocí kombinace průtokové injekční analýzy (FIA) a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s pulsní amperometrií, elektrochemickou technikou založenou na vkládání potenciálových pulsů na zlatou pracovní elektrodu.

Stanovení probíhalo v zásaditém prostředí borátového pufru s roztokem kreatininu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Byla optimalizována délka čistícího a aktivačního pulsu a pH nosného roztoku. Na elektrodu byl nejprve vkládán čistící puls o velikosti +1,8 V po dobu 100 ms, dále byl vkládán aktivační potenciál -0,5 V po dobu 150 ms a poté měřící potenciál +0,2 V po 300 ms. Z proměřených pH bylo vybráno optimální pH=9,4.

K borátovému pufru byl přidán methanol a později i acetonitril, aby bylo vyzkoušeno, zda je možné s těmito organickými rozpouštědly stanovovat kreatinin a zda bude možné průtokovou injekční analýzu nahradit metodou HPLC. Methanol v systému způsoboval deformaci píků, acetonitril v systému nezpůsoboval deformaci píků, při vyšším obsahu docházelo k destabilizaci základní linie.

Dále byla proměřena kalibrační závislost v rozsahu koncentrací od $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ do $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pomocí PAD v kombinaci s FIA. U vyšších koncentrací docházelo k rozdělení píků.

Pomocí PAD s HPLC byl proměřen samotný kreatinin o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a kreatinin ve směsi s kyselinou močovou a kyselinou askorbovou o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Podmínky měření byly stejné jako vybrané optimální podmínky u PAD s FIA. Kalibrační závislost byla touto metodou také proměřena, a to v koncentračním rozsahu od $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ do $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Kreatinin byl pomocí PAD s HPLC stanovován také ve vzorku moči. Nalezená koncentrace se shodovala s výsledkem referenční metody – Jaffé metoda.

Abstract

This diploma thesis deals with the determination of creatinine using a combination of flow injection analysis (FIA) or high-performance liquid chromatography (HPLC) with pulse amperometry, an electrochemical technique based on the application of potential pulses on a gold working electrode.

The determination was performed in a basic environment of borate buffer with creatinine concentration of $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. The length of the cleaning and activation pulse was optimized as well as the pH of the running buffer. A cleaning pulse of +1.8 V was first applied to the electrode for 100 ms, then an activation potential of -0.5 V was applied for 150 ms and then a measuring potential of +0.2 V for 300 ms. The optimal pH was selected as pH=9,4.

Methanol and acetonitrile were added to the borate buffer to test whether creatinine could be determined in presence of these organic solvents and whether flow injection analysis could be transformed into HPLC. Methanol in the system caused peak deformation, acetonitrile did not cause the peak deformation in the system, at higher contents the baseline was destabilized.

Furthermore, the calibration dependence in the range of concentrations from $2.5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ to $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ was measured using PAD in combination with FIA. At higher concentrations, peaks splitted.

Creatinine solution of the concentration of $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, alone and in the mixture with uric acid and ascorbic acid with a concentration of $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ were measured by PAD with HPLC. The measurement conditions were the same as the selected optimal conditions for the PAD with FIA. The calibration dependence was also measured by this method, in the concentration range from $2.5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ to $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Creatinine was also determined by PAD with HPLC in urine sample. The found values coincided with the result of the reference method - the Jaffé method.

Klíčová slova

Kreatinin

Zlatá elektroda

Průtoková injekční analýza

Pulsní amperometrická detekce

Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Key words

Creatinine

Gold electrode

Flow injection analysis

Pulsed amperometric detection

High-performance liquid chromatography

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou ČR (projekt č. 20-01589S).

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Haně Dejmkové, Ph.D. za odborné rady a pomoc při zpracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mi umožnila studovat a ve studiu mě podporovala.

1 Obsah

1	Cíl práce	10
2	Teoretická část	11
2.1	Kreatinin	11
2.1.1	Chemické a fyzikální vlastnosti kreatininu	11
2.1.2	Stanovení kreatininu v moči	12
2.1.3	Hodnoty koncentrací kreatininu v séru a v moči	13
2.1.4	Metody stanovení kreatininu	13
2.2	Pulsní amperometrie	15
3	Experimentální část	17
3.1	Použité chemikálie	17
3.2	Použitá aparatura	17
3.3	Další použitá aparatura	18
3.4	Příprava chemikálií	18
3.4.1	Příprava zásobního roztoku	18
3.4.2	Příprava borátového pufru	18
3.4.3	Příprava roztoků kyseliny askorbové a kyseliny močové	18
3.5	Podmínky měření	19
4	Výsledky a diskuze	20
4.1	Základní měření pomocí pulsni amperometrie	20
4.2	Změna délek čistícího a aktivacího pulsu	22
4.3	Vliv změny pH borátového pufru na měření	25
4.4	Borátový pufr v kombinaci s mobilní fází (methanol, acetonitril)	26
4.5	Kalibrační závislost FIA	28
4.6	Pulsni amperometrie kombinovaná s HPLC	30
4.7	Kalibrační závislost HPLC	31

4.8 Stanovení kreatininu ve vzorku moči pomocí pulsní amperometrie v kombinaci s HPLC	33
5 Závěr	36
6 Literatura.....	37

Seznam zkratek

FIA	Průtoková injekční analýza (flow injection analysis)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
pH	Vodíkový exponent (potential of hydrogen)
PAD	Pulsní amperometrická detekce (pulsed amperometric detection)
GFR	Rychlost glomerulární filtrace
CZE	Kapilární zónová elektroforéza (capillary zone electrophoresis)
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie (micellar electrokinetic chromatography)
E	Redoxní potenciál [V]
I	Elektrický proud [A]
t	Čas [s]
c	Molární koncentrace [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]
R^2	Koeficient determinace
RSD	Relativní směrodatná odchylka

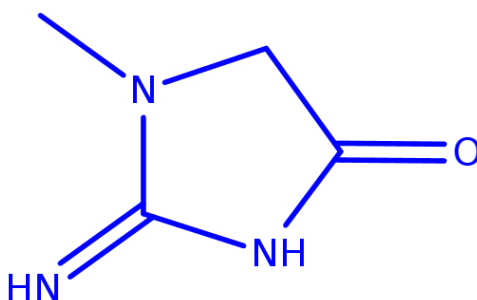
1 Cíl práce

Tato diplomová práce se věnuje stanovení kreatininu, který je odpadním produktem svalů a je převážně vylučován ledvinami, pomocí kombinace průtokové injekční analýzy (FIA) a HPLC s pulsní amperometrií. Jejím cílem je optimalizovat jednotlivé parametry měření – změny parametrů pulsního programu, pH pufru či složení nosného roztoku – a zjistit robustnost stanovení vůči těmto parametrům. Ověření vyvinuté metody bude provedeno stanovením obsahu kreatininu ve vzorku moči a porovnáním výsledku s referenčním měřením Jaffé metodou na přístroji Roche/Hitachi cobas c.

2 Teoretická část

2.1 Kreatinin

Strukturní vzorec:



Sumární vzorec: $C_4H_7N_3O$

Systematický název: 2-amino-1-methyl-4-imidazolidinon

CAS číslo: 60-27-5 [1]

Jedná se o bílé krystaly. Molekulární hmotnost kreatininu odpovídá hodnotě $113,120 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Rozkládá se při $300 \text{ }^\circ\text{C}$. Rozpustnost kreatininu ve vodě je $90 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

2.1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti kreatininu

Kreatinin patří mezi cyklické dusíkaté organické látky a vzniká ve svalech jako odpadní produkt spontánní cyklizací z kreatinu a kreatinfosfátu (po odtržení fosfátu) a ireverzibilní neenzymatickou dehydratací. Kreatin je převážně tvořen v játrech, a to methylací glykocyaninu pomocí S-adenosylmethioninu. Po transportu kreatinu do jiných orgánů (mozku, svalů), dochází k jeho fosforylaci na vysokoenergetickou molekulu fosfokreatin. Kreatin dokáže v těle uchovávat fosfáty v podobě fosfokreatinu a tím sloužit jako zdroj energie

pro svaly (svalovou kontrakci). Kreatinkináza katalyzuje přeměnu kreatinu na fosfokreatin během níž dochází k již výše zmíněné spontánní tvorbě kreatininu [2-5].

Hlavní zdroj kreatininu u člověka je kosterní svalstvo. Kreatinin je z těla vylučován převážně ledvinami, hlavně glomerulární filtrací, ale i proximální tubulární sekrecí. Většina kreatininu je vylučována močí. Hladina kreatininu, jak v krvi, tak v moči, je dobrým ukazatelem selhání ledvin, svalů, či štítné žlázy. Množství kreatininu, které se vytvoří, závisí na velikosti člověka, celkové svalové hmotě, ale také na způsobu stravování člověka, jelikož konzumací červeného masa se zvyšuje příjem kreatinu [3][5-6]. Hladina kreatininu také slouží jako kalibrační index, na základě konstantní míry vylučování kreatininu každý den, pro hodnocení markerů onemocnění [7].

Základním parametrem funkce ledvin je rychlost glomerulární filtrace (GFR). Jedná se o množství glomerulárního filtrátu (primární moči) vytvořeného za jednotku času. GFR lze relativně přesně stanovit pomocí clearance určitých látek, například právě kreatininu, kdy dochází ke sběru moči. Tyto látky musejí vyhovovat některým podmínkám. Musí se jednat o malé molekuly, které jsou volně filtrované do moče. Nedochází u nich k tubulární sekreci ani reabsorpci. A v neposlední řadě musí být jejich koncentrace v glomerulárním filtrátu a plazmě stabilní. Další metodou stanovení je metoda bez sběru moči, a to stanovení sérového kreatininu [2][8-9].

2.1.2 Stanovení kreatininu v moči

Pro stanovení kreatininu v moči pro posouzení funkčnosti ledvin se používá metoda sbírané moči. Nejčastěji se moč sbírá po dobu 24 hodin do speciální odběrové nádoby. Po odebrání a odevzdání sbírané moči do laboratoře musí být přesně zaznamenáno, jaký objem moči, za jakou dobu byl odebrán. Hladina kreatininu v moči se stanovuje také pro přibližnou standardizaci sloučenin, které jsou vylučovány močí, a vše je vztaženo k objemu sbírané moči. Před začátkem vyšetření (sbírání moči) není vhodné příliš sportovat nebo držet dietu s vysokým obsahem proteinu, protože by mohlo dojít ke zkreslení výsledků. Hodnota kreatininu také závisí na věku pacienta a jeho tělesné hmotnosti [2][7][10-11].

2.1.3 Hodnoty koncentrací kreatininu v séru a v moči

Hodnoty koncentrací v séru/plazmě a v moči jsou ovlivňovány nejen funkcí ledvin, štítné žlázy, svalů a ovlivnitelnými faktory, např. fyzická aktivita, strava, hmotnost pacienta, ale také neovlivnitelnými faktory, a to věkem a pohlavím. Hodnoty koncentrací kreatininu jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1 Očekávané hodnoty koncentrací kreatininu v biologických materiálech u dospělých [12-13].

Druh biologického materiálu	Pohlaví	
	Ženy	Muži
Sérum/plazma	44 – 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	62 – 106 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Ranní moč	2 470 – 19 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	3 450 – 22 900 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Sbíraná moč (24 h.)	7 000 – 14 000 $\mu\text{mol}\cdot(24\text{h})^{-1}$	9 000 – 21 000 $\mu\text{mol}\cdot(24\text{h})^{-1}$

2.1.4 Metody stanovení kreatininu

Jednoduchou metodou pro stanovení kreatininu je kolorimetrická Jaffé reakce. Jedná se o spektrofotometrický test, který spočívá v reakci kreatininu s kyselinou pikrovou v zásaditém prostředí, při které vzniká barevný komplex. Jaffé metoda je často využívanou metodou pro stanovení kreatininu v laboratořích [14-16].

Pomocí chromatografických metod lze kreatinin stanovovat vysoce selektivně a rychle v biologických vzorcích, ale nákladnost nástrojů a časová náročnost přípravy vzorků jsou nevýhodami těchto metod pro rutinní analýzy [17]. Běžnou metodou pro stanovení kreatininu simultánně s dalšími látkami (např. kyselina močová, kreatin, tryptofan) je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Kreatinin je stanovován ve vzorcích moči a krve. Je používána ultrafialová a fluorimetrická detekce [18-22]. Metoda HPLC je odrazovým můstkem pro různá stanovení kreatininu. Pomocí hydrofilní interakční kapalinové chromatografie je možné stanovovat kreatinin v mléce a pomerančovém džusu s fotometrickou detekcí, přičemž mez detekce dosahuje hodnoty $3,9\cdot 10^5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ [23]. Pro stanovení kreatininu ve vzorcích moči

lze použít HPLC s kationtoměničovou kolonou s absorpční fotometrickou detekcí. Touto metodou byla získána mez detekce $3,4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ [24]. Tyto metody potřebují časově náročnější přípravu vzorku [23-24].

Koncentrace látek, které jsou vylučovány močí, se často standardizují na kreatinin. Pomocí průtokové injekční analýzy s tandemovou hmotnostní spektrometrií je možné stanovovat kreatinin v butylované moči. Butylace má zlepšit citlivost měření [25].

Jednou z dalších metod stanovení kreatininu je kapilární zónová elektroforéza (CZE). Poměr kyseliny octové a kreatininu lze použít pro rychlou diagnostiku infekce močových cest. Pomocí CZE lze v moči současně stanovovat kreatinin a acetát za použití bezkontaktního vodivostního detektoru [26]. Kapilární zónová elektroforéza se často používá pro svou jednoduchost, rychlost, citlivost a nízké náklady [27-28].

Kvůli vývoji citlivějších, selektivnějších metod měření kreatininu dochází k porovnávání jednoduché klinické metody – Jaffé reakce s dalšími metodami. Metoda micelární chromatografie (MEKC) je rychlá separační metoda, která vykazuje vysoké rozlišení a je zapotřebí malých objemů vzorků. Je vhodná pro stanovení kreatininu v séru, protože většina sérových proteinů eluuje až po kreatininu [14].

Další metoda s elektrochemickou průtokovou kvyetou na bázi biosenzoru je vhodná pro stanovení kreatininu v moči. Enzymatické biosenzory umožňují měření kreatininu jen s malou předúpravou vzorku. Tato metoda je vhodnější pro stanovení čistších vzorků – zředěné moči. Ve srovnání s Jaffé reakcí byly tyto metody rychlé a přesné [16].

Pro stanovení kreatininu v moči lze také využít voltametrické metody. Konkrétně metodu se čtvercovými vlnami za použití zlaté elektrody s modifikovaným filmem. Oxidace mědi, která je přítomná na povrchu zlaté elektrody, způsobí interakci iontů mědi (Cu^{2+}) s kreatininem. Touto metodou byl získán lineární rozsah od $4,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ do $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ [29]. Cyklickou voltametrií lze také využít v kombinaci s amperometrickým kreatininovým biosenzorem na bázi kovalentně imobilizovaných enzymů a karboxylových uhlíkových trubiček. Byla získána mez detekce $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ [30].

Pro stanovení kreatininu bylo vyvinuto velké množství různých biosenzorů, např. potenciometrické, amperometrické, konduktometrické, z nanomateriálů a další. Vývoj těchto biosenzorů má za cíl snížení nákladů, složitosti rutinních analýz biologických vzorků, časové náročnosti [31-32]. Elektrochemický biosenzor je přístroj, který poskytuje selektivní

kvantitativní analytickou informaci. Biomolekula je imobilizována na chemicky modifikované elektrodě, která je z vodivých, polovodivých nebo iontově vodivých materiálů. Potenciometrické biosenzory měří nabíjecí potenciál na pracovní elektrodě ve srovnání s referenční elektrodou ve chvíli, kdy mezi nimi protéká nulový nebo nevýznamný proud, takže vlastně poskytuje informace o iontové aktivitě při elektrochemické reakci. V amperometrických biosenzorech je proud založen na heterogenní reakci přenosu elektronu (oxidace nebo redukce elektroaktivních látek) a je úměrný jejich koncentraci [31-32].

2.2 Pulsní amperometrie

Klasická amperometrická detekce je elektrochemická technika využívaná v kombinaci s průtokovou analýzou, kapilární elektroforézou a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Konstantní potenciál je vkládán na pracovní elektrodu a je měřen proud jako funkce času. Vybraný vložený potenciál urychluje redoxní reakce na povrchu pracovní elektrody, přičemž naměřený proud je úměrný koncentraci analytu. Selektivita měření pomocí amperometrické detekce spočívá ve správném výběru potenciálu měření a vhodného materiálu pracovní elektrody. Nevýhodou této metody je, že dochází k znečišťování povrchu elektrody vedlejšími produkty reakce nebo nečistotami z roztoků, což způsobuje ztrátu aktivity elektrody [33-35].

Alternativou pro odstranění nedostatků amperometrické detekce je pulsni amperometrie. Jedná se o kvantitativní elektrochemickou metodu, která zvyšuje výkon pracovních elektrod při amperometrické detekci. Tato metoda je založená na vkládání více po sobě jdoucích katodických a anodických potenciálů na pracovní elektrodu. Při těchto potenciálech dochází k amperometrickému měření v kombinaci s potenciostatickým čištěním pracovní elektrody a k reaktivaci jejího povrchu po každém cyklu vkládání těchto pulsů. Bez vkládání vhodných pulsů, které způsobují zvýšení reprodukovatelnosti a citlivosti signálu, by docházelo k adsorpci analytů na povrch pracovní elektrody, a tudíž k deaktivaci povrchu elektrody [33][36].

Pro udržení čistého a reaktivního povrchu pracovní elektrody je potřeba nastavit vhodné potenciály, které by umožnily kontinuální měření bez znečišťování elektrod. Důležitým potenciálem je detekční (měřicí) potenciál, při kterém dochází k detekci analytu. Velký pozitivní anodický potenciál způsobí oxidaci povrchu pracovní elektrody, a tudíž tvorbu povrchového oxidu. Třetím vkládaným potenciálem je negativní katodický potenciál, který je

redukční a slouží k reaktivaci povrchu pracovní elektrody. K obnovení aktivity povrchu elektrody dochází odstraněním povrchového oxidu [36-38].

Základní modem pro pulsní amperometrii je vložení měřicího potenciálu, který zapříčiní elektrochemickou reakci na pracovní elektrodě. Pokud by se na elektrodu vkládal pouze měřicí potenciál, na elektrodě by se po nějaké době vytvořil povrch z produktů reakce, blokující její další průběh. Pro odstranění produktů reakce se na elektrodu vloží kladný anodický potenciál, kterým se povrch elektrody zoxiduje a odstraní produkty. Pro reaktivaci povrchu se na elektrodu vkládá ještě záporný katodický potenciál, který elektrodu zredukuje. Existují i módy určené pro analyty, které vyžadují k reakci oxidovaný povrch elektrody a mají pořadí pulsů převrácené. Analyty se váží na zoxidovaný povrch přes vazbu na kyslík, který je buď na elektrodě, nebo ho mají analyty ve své struktuře [36][37][39-42].

Pulsní amperometrická detekce s výhodou využívá jako pracovní elektrody mikroelektrody. Mikroelektrody umožňují lepší přenos hmoty (analytu) na povrch elektrody, schopnost lépe reagovat na změnu vloženého potenciálu [40][43-44], umožňují vylepšení poměru signál/šum a dochází k minimálnímu ovlivňování měření změnami průtoku [44]. Výsledkem je zvýšení citlivosti, vyšší účinnost chromatografie i menší spotřeba rozpouštědel.

Pomocí pulsní amperometrie, převážně ve spojení s průtokovou injekční analýzou, kapilární elektroforézou nebo kapalinovou chromatografií, lze stanovovat mnoho organických látek. Ke zvýšení citlivosti detekce dochází u látek, které jsou pro detekci za konstantního potenciálu brány jako elektricky neaktivní, včetně látek, které nemají dobré optické vlastnosti pro spektrofotometrickou detekci. Takovými látkami jsou polární alifatické sloučeniny, např. sacharidy či aminy, a makromolekuly, např. peptidy a proteiny. Jako pracovní elektrodu lze použít zlatou (Au) elektrodu v zásaditém prostředí, nebo platinovou (Pt) elektrodu v kyselém prostředí [33][36][39]. V kombinaci s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií byla použita pro detekci paracetamolu a kyseliny askorbové [45], stanovení nízkomolekulárních alifatických aldehydů [46] nebo stanovení sacharidů v nápojích či v séru [47]. Průtoková injekční analýza s pulsní amperometrickou detekcí byla využita pro stanovení antibiotik – tetracyklinů [48] a doxocyklinů [49]. Pulsní amperometrická detekce byla také zkombinována s mikročipovou kapilární elektroforézou. Touto metodou docházelo ke snížení množství potřebného vzorku i reagensí, nákladů na vybavení a potřebný materiál a také času analýzy. Byly stanovovány aminy, antibiotika [50] a markery renálních funkcí [51].

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Kreatinin ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich)

Destilovaná voda (Millipore, USA)

Kyselina chlorovodíková (0,5 M, Penta, Praha)

Hydroxid sodný (8 M, Fluka Analytica, Německo)

Kyselina askorbová (Sigma-Aldrich)

Kyselina močová (Sigma-Aldrich)

Tetraboritan disodný (Lachema, Brno)

Acetonitril (Honeywell – Riedel-de Haën, gradient grade $\geq 99,9\%$)

Methanol (Honeywell – Riedel-de Haën, gradient grade $\geq 99,9\%$)

3.2 Použitá aparatura

Pro měření pomocí průtokové injekční analýzy (FIA) byla použita pumpa Beta Gradient Pump. Smyčka o objemu 20 μl byla upevněna na dávkovač typu Sampler Injector D (ECOM, spol. s.r.o., Česká republika). Autolab PGSTAT204 řízený softwarem NOVA verze 2.1 (Metrohm Autolab B.V., Utrecht, Nizozemsko) byl použit jako detektor, pracující v tříelektrodovém zapojení v cele typu wall-jet s pracovní zlatou elektrodou (průměr 3 mm, Metrohm), referentní argentchloridovou elektrodou (Eco-Tribo Polarograph, R 008-05, Česká republika) a s pomocnou platinovou elektrodou (Eco-Tribo Polarograph, P 016-06, Česká republika).

Pro měření pomocí HPLC byla použita stejná aparatura jako u FIA, navíc byla do systému zapojena chromatografická kolona Gemini C18 (LC Column: 150x4,6 mm; 5 μm ; 110 Å) (Phenomenex).

3.3 Další použitá aparatura

pH metr (digitální měřicí přístroj Conductivity and pH meter 3510 (Jenway, UK))
s kombinovanou skleněnou elektrodou

Magnetická míchačka (Microstirrer Magnetic Stirrer, VELP Scientifica, Europe)

Ultrazvuková čistička (PSO2000A, Powersonic, USA)

3.4 Příprava chemikálií

3.4.1 Příprava zásobního roztoku

Zásobní roztok kreatininu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky v pufru. Pro rychlejší rozpuštění kreatininu byl použit ultrazvuk. Pro měření byl použit 10x zředěný roztok kreatininu, koncentrace roztoku byla $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

3.4.2 Příprava borátového pufru

Borátový pufr byl připraven z tetraboritanu disodného a destilované vody na výslednou koncentraci $30 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Vypočtené množství tetraboritanu disodného bylo zváženo a kvantitativně převedeno do odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku. Potřebné pH borátového pufru bylo získáno přidáváním 8 M hydroxidu sodného, nebo 0,5 M kyseliny chlorovodíkové.

3.4.3 Příprava roztoků kyseliny askorbové a kyseliny močové

Roztoky kyseliny močové a kyseliny askorbové o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byly připraveny rozpuštěním přesně odváženého množství každé kyseliny zvlášť v pufru o vybraném pH v odměrných baňkách. K měření byly použity 10x zředěné roztoky.

3.5 Podmínky měření

Optimalizace podmínek byla prováděna s roztokem kreatininu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Základní nastavení, převzaté z literatury [40], zahrnovalo měření v borátovém pufru o pH 9,4 a potenciálový program, vkládající na zlatou elektrodu tři potenciály, potenciál čistící, aktivační a měřicí. Potenciál čistící měl velikost +1,8V a byl vkládán na zlatou elektrodu po dobu 100 ms, potenciál aktivační měl velikost -0,5V a byl vkládán na elektrodu po dobu 150 ms a měřicí potenciál měl velikost +0,2V a na elektrodu byl vkládán po dobu 300 ms. Změny, prováděné oproti tomuto základnímu nastavení, jsou popsány v jednotlivých kapitolách práce.

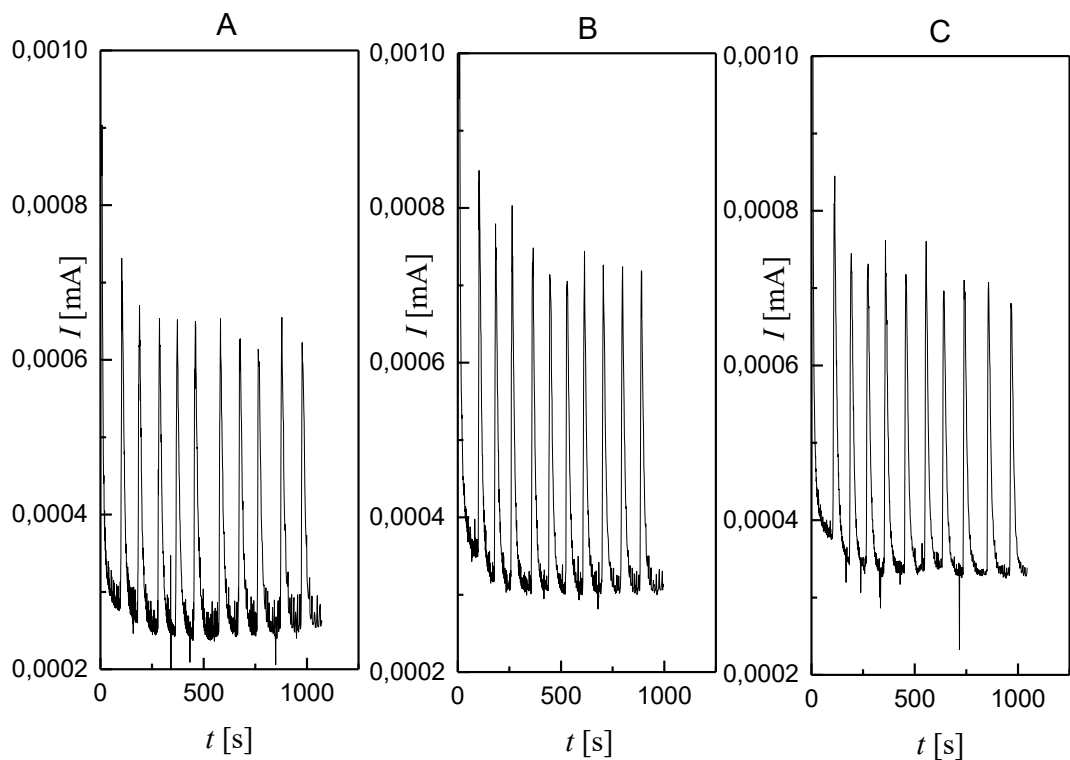
Každé měření bylo provedeno minimálně ve třech sériích po pěti nástřících. Povrch pracovní zlaté elektrody byl před každým novým měřením vyleštěn na alumině.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Základní měření pomocí pulsní amperometrie

V první části práce byla pulsní amperometrie kombinována s průtokovou injekční analýzou (FIA) a bylo sledováno elektrochemické chování kreatininu v roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Výchozí podmínky měření byly zvoleny na základě dříve publikované práce [40], která kombinovala pulsní amperometrii s kapilární elektroforézou: pH pufru 9,4, čistící potenciál o velikosti +1,8 V a délce trvání 100 ms, aktivační potenciál o velikosti -0,5 V a délce trvání 150 ms a dále měřící potenciál o velikosti +0,2 V a délce trvání 300 ms. Podle Obr. 1 je zřejmé, že kreatinin lze pomocí kombinace FIA a pulsní amperometrie za těchto podmínek stanovovat.

S ohledem na nejasnou specifikaci, jakým způsobem použitá instrumentace zaznamenává proud při pulsním měření, byla při dalším měření rozdělena doba vkládání měřícího potenciálu na zlatou elektrodu mezi čekací a měřící část. Nejprve byl na elektrodu vkládán měřící potenciál po dobu 300 ms, jak bylo děláno během měření za výchozích podmínek. Poté byla měřící část zkrácena na 100 ms a před měřením bylo čekáno 200 ms; v další sérii měření bylo čekáno po dobu 290 ms a měřeno 10 ms. Všechna tři měření jsou vyobrazena na Obr. 1. Měření nevykazovalo signifikantní rozdíl od měření za výchozích podmínek, což je možné vyčíst z Tab. 2. Z toho lze usoudit, že měření je prováděno jednorázově na konci vkládaného pulsu a trvá kratší dobu než 10 ms.



Obr. 1 Amperogramy kreatininu (koncentrace $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v závislosti na změně čekací doby před vložení a doby vkládání měřícího potenciálu $+0,2 \text{ V}$ na zlatou pracovní elektrodu: (čekací doba 0 ms , měřící puls 300 ms , (A)); (čekací doba 200 ms , měřící puls 100 ms , (B)); (čekací doba 290 ms , měřící puls 10 ms , (C)). PAD s FIA, nosný roztok pH $9,4$; čistící potenciál $+1,8 \text{ V}$ (100 ms), aktivační potenciál $-0,5 \text{ V}$ (150 ms).

Tab. 2 Parametry měření za různé doby vkládání měřícího potenciálu ($+0,2 \text{ V}$) na elektrodu.

Délka měřícího pulsu [ms]	Výška prvního píku [A]
300	$4,55 \cdot 10^{-7}$
100	$4,07 \cdot 10^{-7}$
10	$4,29 \cdot 10^{-7}$

4.2 Změna délek čistícího a aktivačního pulsu

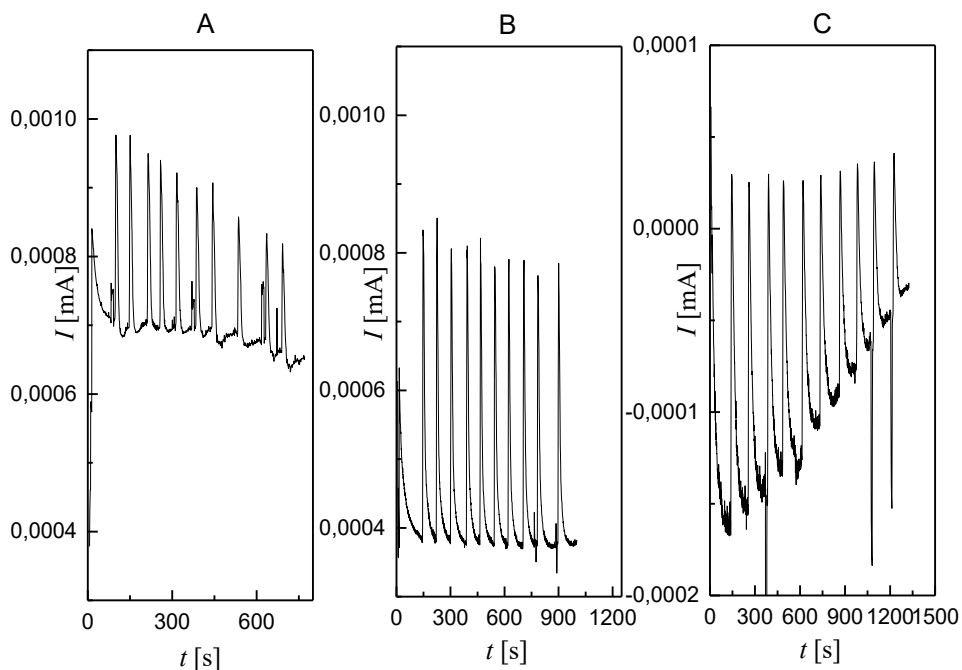
V další sérii měření bylo sledováno, zda změna délky trvání čistícího, nebo aktivačního potenciálu, nebo obou zároveň bude mít vliv na velikosti signálu, stabilitu základní linie nebo stabilitu celkového měření, čímž je myšleno, zda se píky v průběhu měření nezmenšují v důsledku znečištění zlaté elektrody nebo se nedeformují.

Obr. 2(B) znázorňuje měření za původních podmínek. S těmito výsledky byly porovnávány měření s modifikacemi parametrů pulsu.

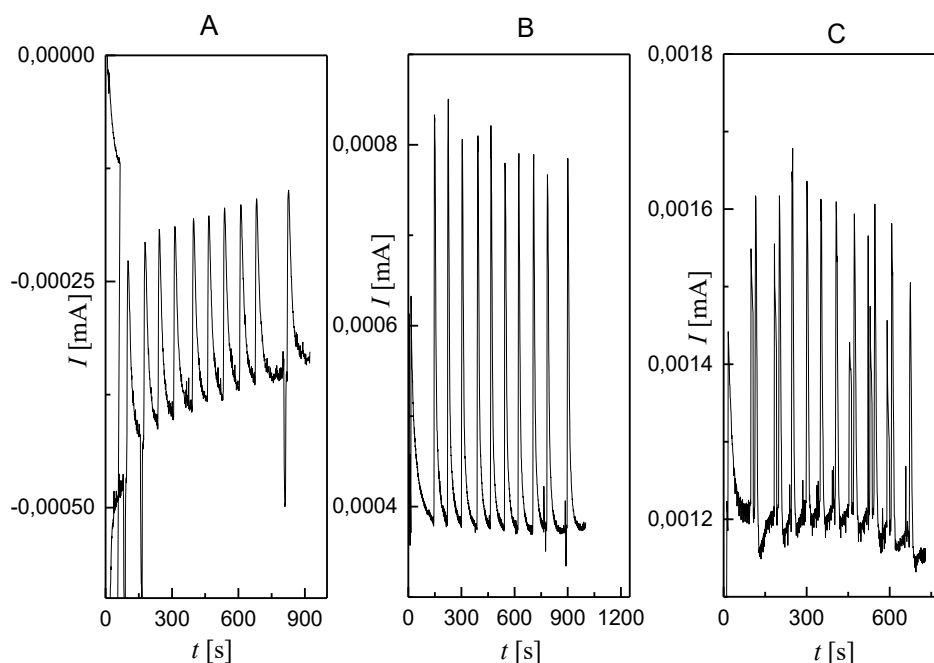
Nejprve byla měněna délka pulsu čistícího potenciálu; oproti původním 100 ms – byla snížena na 50 ms a zvýšena na 150 ms (Obr. 2). Po snížení doby vkládání čistícího potenciálu na zlatou elektrodu docházelo ke znečišťování elektrody, zhoršení stability základní linie a k deformaci píků. Při zvýšení délky pulsu docházelo ke snížení velikosti signálu.

Aktivační potenciál byl také vkládán na elektrodu oproti původním 150 ms ve snížené délce 75 ms, a ve zvýšené délce 300 ms (Obr. 3). Při porovnání původních podmínek se sníženou délkou aktivačního potenciálu bylo zjištěno snížení signálu. Proud měření byl v záporných hodnotách, a to se dá vysvětlit tak, že pomocí aktivačního potenciálu dochází k odstraňování oxidů ze zlaté pracovní elektrody, které vznikají vkládáním čistícího potenciálu na elektrodu. Jelikož čas k odstraňování oxidů byl snížen mohlo docházet k redukci nezredukovaných oxidů i u měřícího potenciálu. Během měření se zvýšenou délkou aktivačního potenciálu, který byl vkládán na zlatou elektrodu docházelo ke snížení stability základní linie.

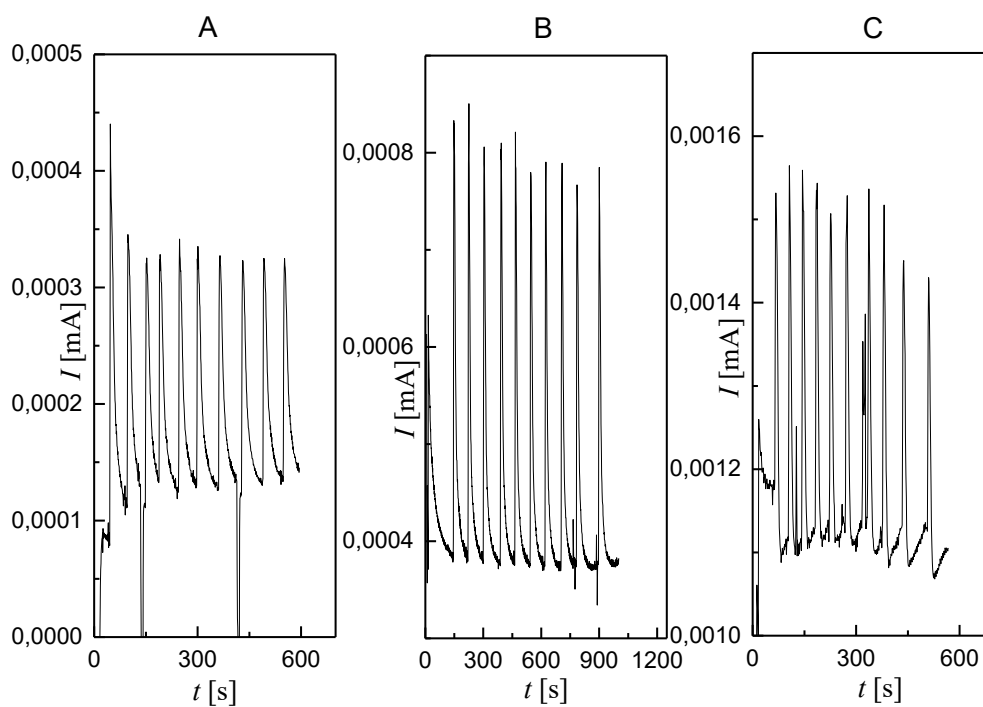
V dalších měřeních byly délky obou potenciálů (aktivačního i čistícího) nejprve sníženy a v dalším měření byly zvýšeny (Obr. 4). Během snížení délek těchto potenciálů došlo ke snížení signálu a ke znečišťování elektrody. Po zvýšení délek aktivačního a čistícího potenciálu zároveň docházelo ke snížení stability základní linie. Parametry délek aktivačního a čistícího pulsu a výšky píků jsou v Tab. 3.



Obr. 2 Amperogramy kreatininu (koncentrace $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v závislosti na snížení doby, původních podmínkách a zvýšení doby vkládání čistícího potenciálu +1,8 V na zlatou pracovní elektrodu: (+1,8 V, 50 ms, (A)); (+1,8 V, 100 ms, (B)); (+1,8 V, 150 ms, (C)). PAD s FIA, nosný roztok pH 9,4; měřicí potenciál +0,2 V (300 ms), aktivační potenciál -0,5 V (150 ms).



Obr. 3 Amperogramy kreatininu (koncentrace $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v závislosti na snížení doby, původních podmínkách a zvýšení doby vkládání aktivačního potenciálu -0,5 V na zlatou pracovní elektrodu: (-0,5 V, 75 ms, (A)); (-0,5 V, 150 ms, (B)); (-0,5 V, 300 ms, (C)). PAD s FIA, nosný roztok pH 9,4; měřicí potenciál +0,2 V (300 ms), čistící potenciál +1,8 V (100 ms).



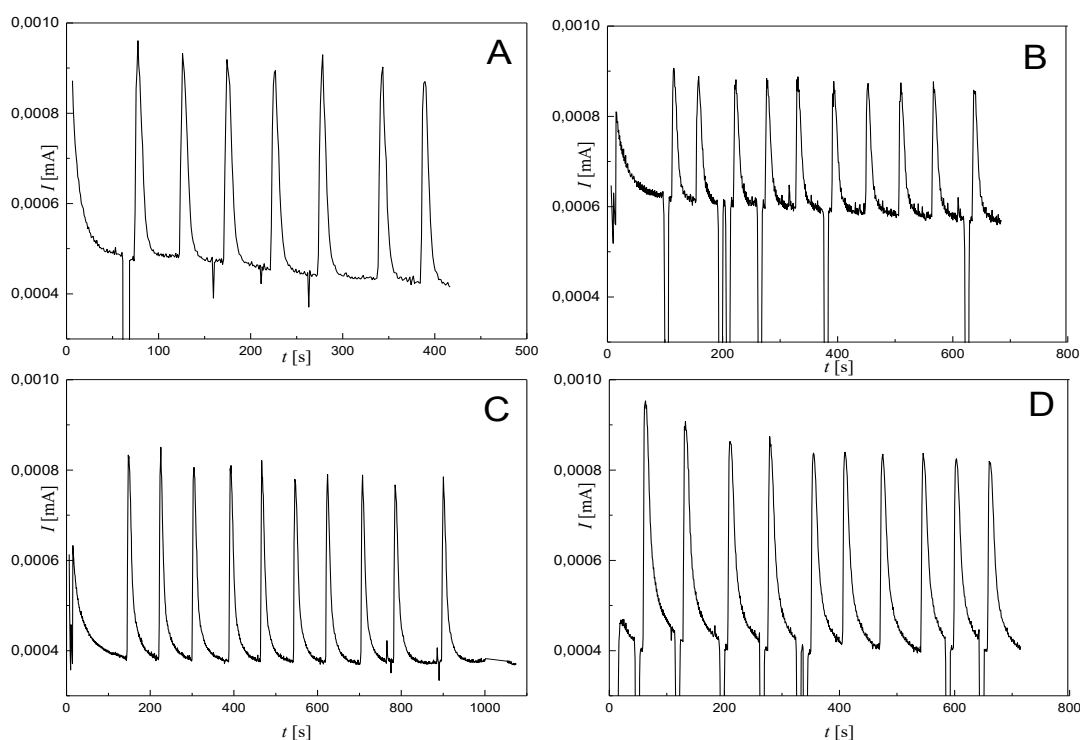
Obr. 4 Amperogramy kreatininu (koncentrace $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v závislosti na snížení doby, původních podmínkách a zvýšení doby vkládání čistícího a aktivačního potenciálu na zlatou pracovní elektrodu: (+1,8 V, 50 ms; -0,5 V, 75 ms (A)); (+1,8 V, 100 ms; -0,5 V, 150 ms (B)); (+1,8 V, 150 ms; -0,5 V, 300 ms (C)). PAD s FIA, nosný roztok pH 9,4; měřící potenciál +0,2 V (300 ms).

Tab. 3 Parametry měření při změnách délek pulsu aktivačního a čistícího potenciálu.

Délka čistícího pulsu [ms]	Délka aktivačního pulsu [ms]	Výška píku [A]	RSD [%]
50	150	$2,82 \cdot 10^{-7}$	20,3
100	150	$4,49 \cdot 10^{-7}$	5,7
150	150	$1,80 \cdot 10^{-7}$	18,0
100	75	$1,84 \cdot 10^{-7}$	14,3
100	300	$4,5 \cdot 10^{-7}$	16,9
50	75	$3,51 \cdot 10^{-7}$	3,8
150	300	$4,3 \cdot 10^{-7}$	6,9

4.3 Vliv změny pH borátového pufru na měření

Ve výchozích podmínkách pro stanovování kreatininu měl borátový pufr pH 9,4. Byly sledovány ještě hodnoty pH 8, 9 a 10. Grafy jednotlivých pH jsou zobrazeny na Obr. 5. Při snižování pH na hodnotu 9 docházelo ke snížení signálu a u pH 8 a 10 docházelo ke zvýšení signálu. Hodnoty výšek píků u jednotlivých pH a hodnoty znečišťování elektrody v procentech jsou uvedeny v Tab. 4. pH 8 nebylo vybráno, protože u něho docházelo k nepatrně většímu znečištění elektrody a opakovatelnost měření při tomto pH nebyla dobrá, u pH 9 docházelo k velkému snížení signálu a u pH 10 docházelo ke znečištění elektrody. Pro další měření tudíž bylo ponecháno původní pH nosného elektrolytu.



Obr. 5 Amperogramy kreatininu (koncentrace $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v závislosti na změně pH nosného roztoku: pH 8 (A); pH 9 (B); pH 9,4 (C); pH 10 (D). PAD s FIA, pulsní program: čistící potenciál (+1,8 V, 100 ms), aktivací potenciál (-0,5 V, 150 ms), měřící potenciál (0,2 V, 300 ms).

Tab. 4 Parametry výšek a snížení velikosti píků při různých pH nosného roztoku.

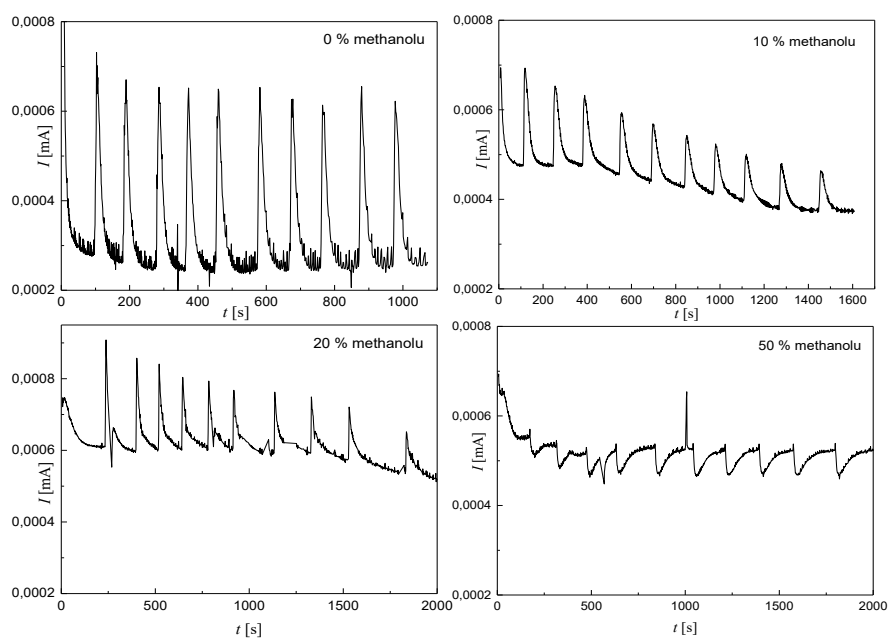
pH borátového pufru	Výška prvního píku [A]	Snížení píků [%]
8	$5,37 \cdot 10^{-7}$	11,5
9	$2,84 \cdot 10^{-7}$	6,4
9,4	$4,71 \cdot 10^{-7}$	8,3
10	$5,20 \cdot 10^{-7}$	20,7

4.4 Borátový pufr v kombinaci s mobilní fází (methanol, acetonitril)

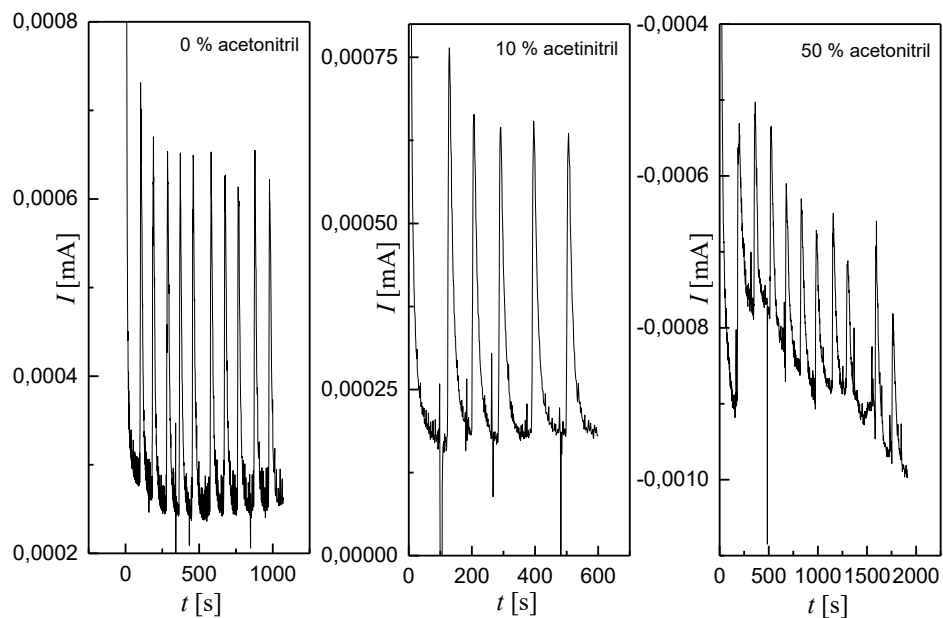
Při stanovení kreatininu pomocí HPLC se dá očekávat použití mobilní fáze s obsahem methanolu a acetonitrilu, proto bylo testováno, jak přítomnost těchto rozpouštědel ovlivní amperometrickou detekci.

K borátovému pufru bylo přidáno 10 %, 20 % a 50 % methanolu (Obr. 6). Při zvyšování obsahu methanolu v systému docházelo k postupnému snižování velikosti signálu, ke znečišťování elektrody a k destabilizaci základní linie, vyšší obsah methanolu způsobil i naměření reverzních píků.

Podobné měření bylo provedeno s acetonitrem, kdy bylo k borátovému pufru přidáno 10 % a 50 % acetonitrilu (Obr. 7). Při nízkém obsahu acetonitrilu nedocházelo k velkým rozdílům oproti měření za původních podmínek. Vyšší obsah acetonitrilu způsobil destabilizaci základní linie, deformaci píků i znečišťování zlaté elektrody.



Obr. 6 Amperogramy kreatininu (koncentrace $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v závislosti na množství methanolu v nosném roztoku: 0 %, 10 %, 20 % a 50 %. PAD s FIA, (+1,8 V, 100 ms), (-0,5 V, 150 ms), (0,2 V, 300 ms).

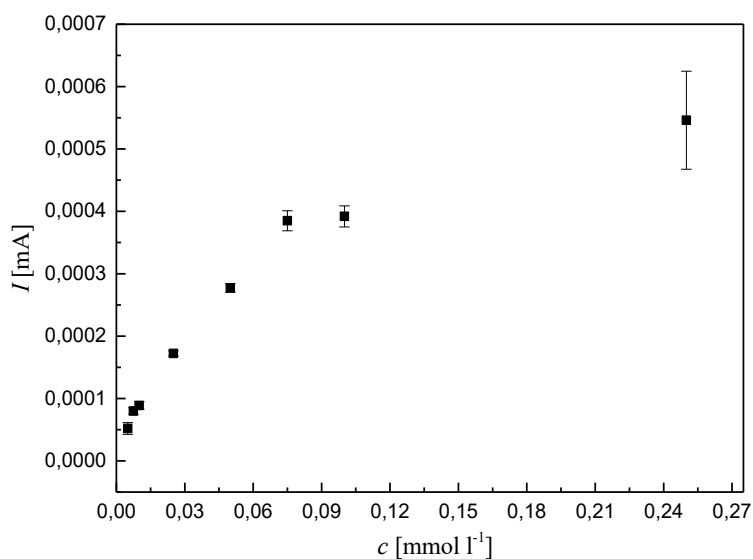


Obr. 7 Amperogramy kreatininu (koncentrace $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v závislosti na množství acetonitrilu v nosném roztoku: 0 %, 10 % a 50 %. PAD s FIA, (+1,8 V, 100 ms), (-0,5 V, 150 ms), (0,2 V, 300 ms).

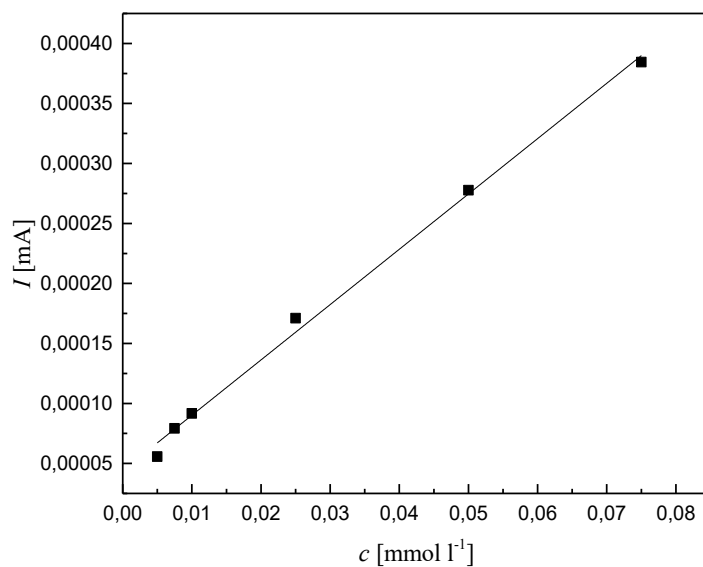
4.5 Kalibrační závislost FIA

Koncentrační závislost byla proměřena pomocí pulsní amperometrie s průtokovou injekční analýzou (FIA) za optimálních podmínek, tj. čistící potenciál o velikosti +1,8 V vkládán na pracovní elektrodu po dobu 100 ms, aktivační potenciál -0,5 V vkládán po dobu 150 ms a měřicí potenciál +0,2 V vkládán po dobu 300 ms. Nosný roztok měl pH 9,4. Byly změřeny koncentrace roztoku kreatininu od $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ do $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. U vyšších koncentrací kreatininu docházelo k rozdělení píků.

Kalibrační závislost není v celém koncentračním rozmezí lineární, což je patrné z Obr. 8. Lineární je v rozsahu koncentrací $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ až $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, tato část kalibrační závislosti je zobrazena na Obr. 9. Linearitu závislosti potvrzuje koeficient determinace, přesahující hodnotu 0,99. Úsek na ose y může být způsoben vyšším šumem během měření. Všechny parametry kalibrační závislosti jsou v Tab. 5.



Obr. 8 Kalibrační závislost kreatininu pro koncentrace $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ do $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Nosný roztok o pH 9,4; (+1,8 V, 100 ms), (-0,5 V, 150 ms), (+0,2 V, 300 ms).



Obr. 9 Kalibrační závislost kreatininu pro koncentrace $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ do $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Nosný roztok o pH 9,4; (+1,8 V, 100 ms), (-0,5 V, 150 ms), (+0,2 V, 300 ms).

Tab. 5 Parametry kalibrační závislosti měření kreatininu.

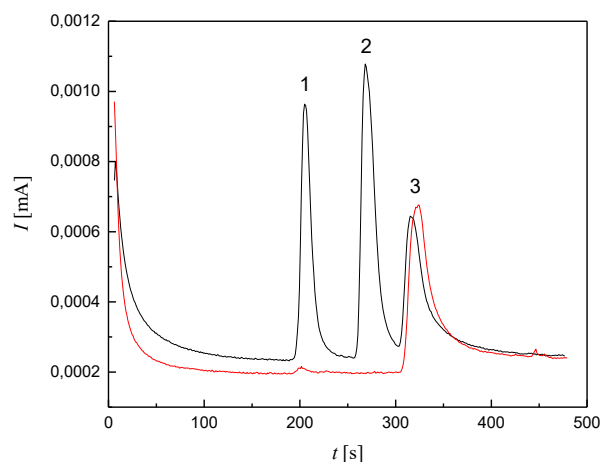
Koncentrační rozmezí [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]	Směrnice [$\text{A} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$]	Úsek [A]	R^2
$7,5 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-6}$	0,0047	$4,23 \cdot 10^{-8}$	0,995

4.6 Pulsní amperometrie kombinovaná s HPLC

Ve druhé části práce byla pulsni amperometrie kombinována s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Jako výchozí podmínky byly vybrány ty, které se projevovaly jako optimální během měření pomocí pulsni amperometrie v kombinaci s FIA. Čistící potenciál o velikosti +1,8 V byl vkládán na pracovní zlatou elektrodu po dobu 100 ms, aktivační potenciál o velikosti -0,5 V byl na elektrodu vkládán po dobu 150 ms a měřicí potenciál o velikosti +0,2 V byl na zlatou elektrodu vkládán po dobu 300 ms. Jako mobilní fáze byl zvolen samotný borátový pufr o pH 9,4. Kolona byla vybrána Gemini C18 (LC Column: 150x4,6 mm; 5 μ m; 110 Å). Kolona a mobilní fáze byly vybrány na základě literární rešerše [52-53].

V první fázi měření byl proměřen roztok samotného kreatininu a směsi kreatininu, kyseliny askorbové a kyseliny močové. Tyto dvě látky byly s kreatininem proměřeny kvůli předpokládané možnosti interferencí jejich signálů. Obr. 10 znázorňuje chromatogram těchto tří látek.

Při měření samotného kreatininu se jeho pík objevoval přibližně ve 300. vteřině. Po změření směsi kreatininu, kyseliny močové a kyseliny askorbové a porovnání chromatogramů těchto dvou měření je možné určit, že kreatininu odpovídá pík 3.

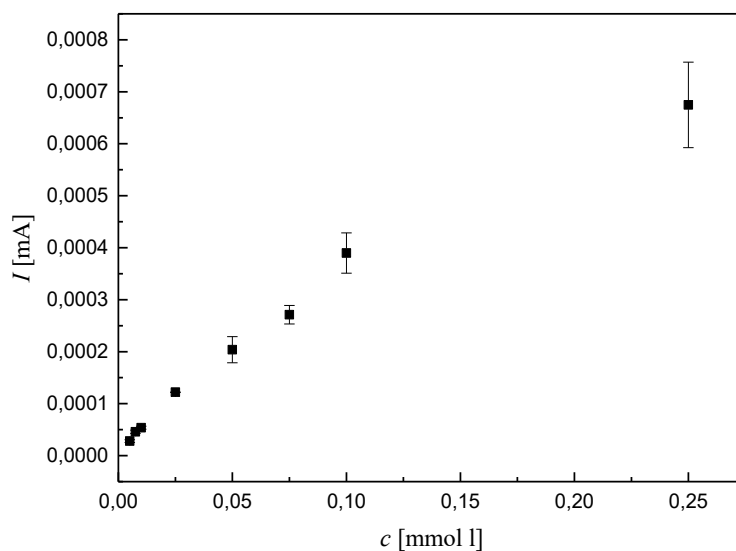


Obr. 10 Chromatogram kreatininu (koncentrace $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a směsi kreatininu, kyseliny askorbové a kyseliny močové (koncentrace $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). PAD s HPLC; pulsni program: čistící potenciál (1,8 V, 100 ms); aktivační potenciál (-0,5 V, 150 ms); měřicí potenciál (+0,2 V, 300 ms); Pík: 1 – kyselina askorbová; 2 – kyselina močová; 3 – kreatinin.

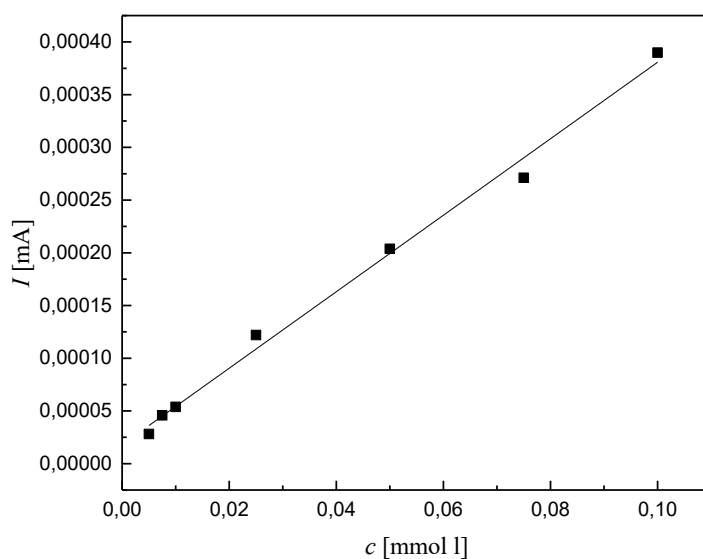
4.7 Kalibrační závislost HPLC

Koncentrační závislost byla také proměřena pomocí pulsní amperometrie kombinované s vysokoučinnou kapalinovou chromatografií za stejných podmínek jako byla proměřena kalibrační závislost s průtokovou injekční analýzou. Byly změřeny koncentrace roztoku kreatininu od $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ do $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Kalibrační závislost není v celém koncentračním rozmezí lineární. Při porovnání parametrů kalibrační závislosti (Tab. 6), celého rozsahu koncentrací (Obr. 11) a vybrané lineární části, která je v rozsahu koncentrací $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ až $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Obr. 12), je patrný rozdíl v koeficientu determinace, který se u rozsahu koncentrací $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ až $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ více blíží jedné a úsek má také nižší hodnotu než u celého rozsahu koncentrací.



Obr. 11 Kalibrační závislost kreatininu pro koncentrace $2,5 \cdot 10^{-4}$ až $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Mobilní fáze: borátový pufr o pH 9,4; (+1,8 V, 100 ms), (-0,5 V, 150 ms), (+0,2 V, 300 ms).



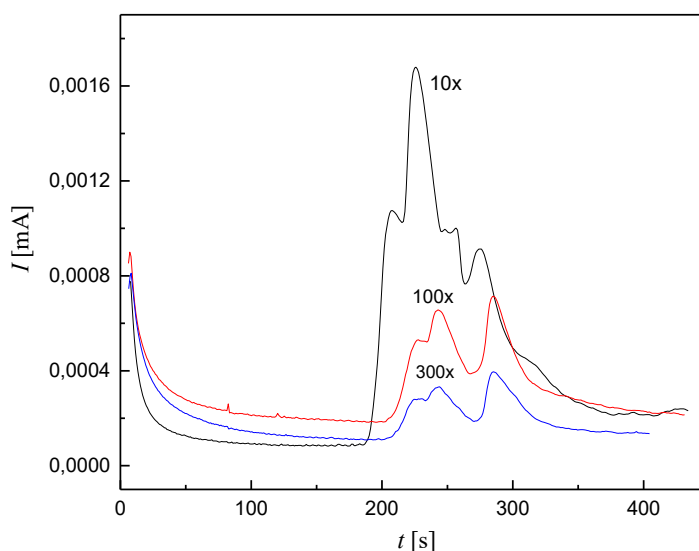
Obr. 12 Kalibrační závislost kreatininu pro koncentrace $1 \cdot 10^{-4}$ až $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.
 Mobilní fáze: borátový pufr o pH 9,4; (+1,8 V, 100 ms), (-0,5 V, 150 ms), (+0,2 V, 300 ms).

Tab. 6 Parametry kalibrační závislosti měření kreatininu.

Koncentrační rozmezí [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]	Směrnice [$\text{A} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$]	Úsek [A]	R^2
$2,5 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-6}$	0,0027	$5,05 \cdot 10^{-8}$	0,965
$1 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-6}$	0,0044	$1,11 \cdot 10^{-8}$	0,994

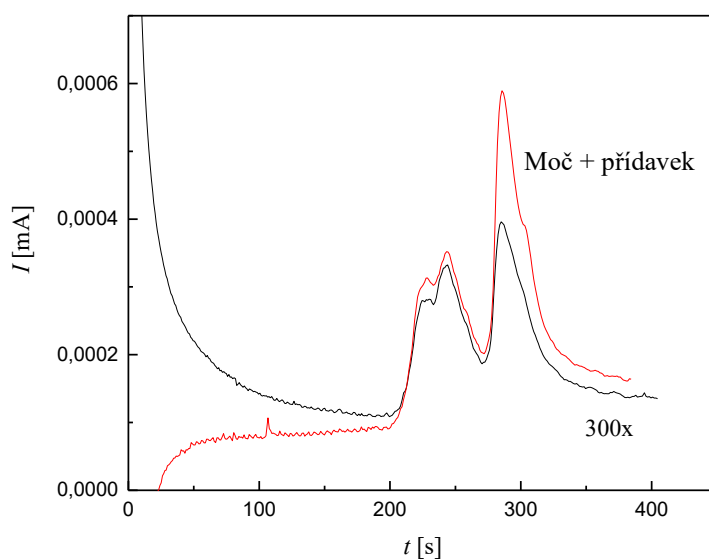
4.8 Stanovení kreatininu ve vzorku moči pomocí pulsní amperometrie v kombinaci s HPLC

Pro ověření funkčnosti metody byl stanoven kreatinin ve vzorku moči pomocí pulsní amperometrické detekce v kombinaci s HPLC. Moč musela být zředěna pomocí borátového pufru, jelikož koncentrace kreatininu v moči je zhruba o dva řády vyšší, než je možné touto metodou za těchto podmínek stanovit. Při měření kalibrační závislosti bylo zjištěno, že při vyšších koncentracích kreatininu dochází k rozdvojení píku, a tudíž by nebylo možné píky kvalitně kvantifikovat. Moč byla naředěna 10x, 100x a 300x a byla porovnána míra rozlišení píku. Chromatogramy naředěných močí jsou na Obr. 13. Při jejich porovnání je zřejmý rozdíl v rozlišení jednotlivých píků. U 10 naředěné moči je pík kreatininu málo odseparovaný od zbytku látek, tudíž špatně odečitatelný. Při zvyšování ředění vzorku moči docházelo ke zvyšování rozlišení jednotlivých píků. Ředění 300x bylo vybráno jako optimální, jelikož další ředění nebylo možné, protože by bylo dosaženo nízké koncentrace kreatininu ve vzorku moči, která by už nebyla v lineárním rozsahu kalibrační závislosti.



Obr. 13 Chromatogram znázorňující měření různě ředěného vzorku moči. PAD s HPLC: pulsní program: čistící potenciál (1,8 V, 100 ms); aktivační potenciál (-0,5 V, 150 ms); měřící potenciál (+0,2 V, 300 ms).

K určení koncentrace byla použita jednak metoda kalibrační přímky, jednak metoda standardního přídatku. Díky proměření různých možností ředění kvůli rozlišení píků a referenční hodnotě bylo možné přibližně určit, jakou koncentraci bude 300x zředěná moč mít. Do celkového objemu 10 ml bylo přidáno 0,5 ml $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku kreatininu, 1 ml 30x naředěné moči a 8,5 ml borátového pufru pH 9,4. Tím bylo dosaženo přídatku kreatininu o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a moč byla zředěna 300x. Jako referenční hodnota bylo použito stanovení metodou Jaffé, provedenou laboratoří nemocnice ve Slaném. Hodnota koncentrace kreatininu změřená touto metodou je uvedena v Tab. 7. Na Obr. 14 je možné vidět porovnání 300x naředěné moči a roztoku se standardním přídatkem. V Tab. 7 jsou znázorněny údaje o koncentraci kreatininu, výšce píku kreatininu a vypočtené koncentrace kreatininu dle kalibrační závislosti u 300x naředěné moči a u moči se standardním přídatkem. Po dopočítání vypočítané koncentrace kreatininu podle kalibrační závislosti (Tab. 7) na nezředěný vzorek moči je hodnota $15,03 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \pm 1,49 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Pomocí metody standardního přídatku vyšla koncentrace kreatininu $15,31 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \pm 0,98 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Tab. 7). Chyba měření je zapsána jako směrodatná odchylka. Vypočítané hodnoty koncentrace pomocí kalibrační závislosti a standardního přídatku jsou si hodně podobné. Od hodnoty získané Jaffé metodou se koncentrace trochu liší, což může být způsobeno ředěním. Přihlédnutím ke směrodatné odchylce se koncentrace stanovená PAD s HPLC a metodou standardního přídatku blíží k hodnotě stanovené Jaffé metodou.



Obr. 14 Chromatogram porovnání 300x naředěné moči s roztokem moči se standardním přídavkem. PAD s HPLC: pulsní program: čistící potenciál (1,8 V, 100 ms); aktivační potenciál (-0,5 V, 150 ms); měřicí potenciál (+0,2 V, 300 ms).

Tab. 7 Porovnání naměřených a vypočítaných hodnot koncentrací a výšek pík kreatininu; koncentrace kreatininu bez ředění zapsaná s chybou měření - směrodatná odchylka.

	Jaffé metoda	300x naředěná moč	Metoda standardního přídavku
Koncentrace kreatininu	16,46 mmol·l ⁻¹	0,055 mmol·l ⁻¹	300x naředěná moč + 0,05 mmol·l ⁻¹
Výška píku	-	2,44·10 ⁻⁷ A	4,83·10 ⁻⁷ A
Vypočítaná koncentrace kreatininu podle kalibrační závislosti	-	0,050 mmol·l ⁻¹	0,051 mmol·l ⁻¹
Koncentrace kreatininu bez ředění	16,46 mmol·l ⁻¹	15,03 mmol·l ⁻¹ ± 1,49 mmol·l ⁻¹	15,31 mmol·l ⁻¹ ± 0,98 mmol·l ⁻¹

5 Závěr

Jako optimální podmínky pro stanovení kreatininu byl vybrán pufr o pH 9,4, čistící potenciál měl velikost +1,8 V a byl na zlatou pracovní elektrodu vkládán po dobu 100 ms, aktivační potenciál o velikosti -0,5 V, který byl na pracovní elektrodu vkládán po dobu 150 ms a měřící potenciál o velikosti +0,2 V a byl vkládán na elektrodu po dobu 300 ms. Tyto podmínky platily pro pulsní amperometrii v kombinaci s FIA i HPLC. Za těchto podmínek byly proměřeny dvě kalibrační závislosti. Obě kalibrační závislosti byly proměřeny v rozmezí koncentrací od $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ do $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Vyšší koncentrace kreatininu nebylo možné kvalitně kvantifikovat, protože docházelo k rozdělení píku. U pulsní amperometrie v kombinaci s FIA byla dosažená mez detekce $6,05 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a mez stanovitelnosti $2,02 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. U pulsní amperometrie v kombinaci s HPLC byla dosažená mez detekce $1,75 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a mez stanovitelnosti $5,82 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. U obou metod není mez stanovitelnosti, ani mez detekce v řádech pro stanovení stopových prvků. Pro stanovení kreatininu v moči tyto hodnoty stačí, jelikož se v moči kreatinin vyskytuje ve vysoké koncentraci.

Pro měření vzorku moči pomocí pulsní amperometrie v kombinaci s HPLC musela být moč nejprve zředěna, a to 300x. Po stanovení moči a přepočítání výšky píku pomocí kalibrační závislosti na koncentraci kreatininu, byla zjištěna hodnota $0,050 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Koncentrace kreatininu v moči stanovená pomocí PAD s HPLC byla $15,03 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \pm 1,49 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Koncentrace kreatininu stanovená pomocí standardního přídatku byla $14,43 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \pm 0,92 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Referenční Jaffé metoda poskytla výslednou hodnotu koncentrace kreatininu $16,46 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. V rozmezí směrodatné odchylky u stanovení pomocí PAD s HPLC i u metody standardního přídatku je i výsledná hodnota koncentrace kreatininu stanovená pomocí Jaffé metody. Mírně rozdílné hodnoty koncentrací kreatininu ve vzorku moči stanovené pomocí metod PAD s HPLC a standardního přídatku oproti Jaffé metody mohou být způsobené ředěním původního vzorku moči.

6 Literatura

- [1] „Reaxys.“ Creatinine:
https://www.reaxys.com/#!/results/substances/0/RX001__4796508813947188675/UlgwMDE9UyNIMDA4PUMjSDAwOT1S/list/7c5be6e1-da53-4ea9-a96a-76e65fd25c3a/1/desc/IDE.NUMREF///
[staženo 20.5.2021].
- [2] J. Racek, “Klinická biochemie”, Galén, Praha, 2006. ISBN 8072623249.
- [3] M.J. Pedrozo-Peñafiel, T. López, L.M. Gutiérrez-Beleño, M.E.H. Maia Da Costa, D.G. Larrudé, R.Q. Aucelio, “Voltammetric determination of creatinine using a gold electrode modified with Nafion mixed with graphene quantum dots-copper”, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 878, 2020.
- [4] M.L. Bishop, J.L. Duben-Engelkirk, E.P. Fody, “Clinical Chemistry: Principles, Procedures, Correlations”, Lippincott, Philadelphia, 2000.
- [5] K. Kashani, M.H. Rosner, M. Ostermann, “Creatinine: From physiology to clinical application”, *European Journal of Internal Medicine*, 72, 9-14, 2020.
- [6] E.P. Randviir, C.E. Banks, “Analytical methods for quantifying creatinine within biological media”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 183, 239–252, 2013.
- [7] S. Narayanan, H.D. Appleton, “Creatinine: a review”, *Clinical Chemistry*, 26, 1119-1126, 1980.
- [8] R.J. Leatherby, C. Theodorou, R. Dhanda, “Renal physiology: blood flow, glomerular filtration and plasma clearance”, *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 22, 439-442, 2021.
- [9] T. Zima, “Laboratorní diagnostika”, Galén, Praha, 2002. ISBN 80-7262-201-3.
- [10] S.B. Hashmi, L. Jafri, H. Majid, J. Talati, W. Aziz, A.H. Khan, “Relationship of spot urine oxalate to creatinine ratio and 24 hours urinary oxalate excretion in patients with urolithiasis”, *Annals of Medicine and Surgery*, 60, 330-333, 2020.
- [11] https://www2.ikem.cz/plm_lp/_LP_12324-L0000006.htm [staženo 20.7.2021]
- [12] B.C. Mazzachi, M.J. Peake, V. Ehrhardt, “Reference Range and Method Comparison Studies for Enzymatic and Jaffé Creatinine Assays in Plasma and Serum and Early Morning Urine”, *Clinical Laboratory*, 46, 53-55, 2000.
- [13] W. Junge, B. Wilke, A. Halabi A, et al., “Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffé method”, *Clinica Chimica Acta*, 344, 137-148, 2004.

- [14] D.A. Walsh, E. Dempsey, “Comparison of electrochemical, electrophoretic and spectrophotometric methods for creatinine determination in biological fluids”, *Analytica Chimica Acta*, 459, 187-198, 2002.
- [15] Ł. Tymecki, J. Korszun, K. Strzelak, R. Koncki, “Multicommutated flow analysis system for determination of creatinine in physiological fluids by Jaffe method”, *Analytica Chimica Acta*, 787, 118-125, 2013.
- [16] C.H. Nieh, S. Tsujimura, O. Shirai, K. Kano, “Amperometric biosensor based on reductive H₂O₂ detection using pentacyanoferrate-bound polymer for creatinine determination”, *Analytica Chimica Acta*, 767, 128-133, 2013.
- [17] C.J. Kochansky, T.G. Strein, “Determination of uremic toxins in biofluids: creatinine, creatine, uric acid and xanthines”, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 747, 217-227, 2000.
- [18] J.F. Jen, S.L. Hsiao, K.H. Liu, “Simultaneous determination of uric acid and creatinine in urine by an eco-friendly solvent-free high performance liquid chromatographic method”, *Talanta*, 58, 711-717, 2002.
- [19] J. Zhao, H. Chen, P. Ni, B. Xu, X. Luo, Y. Zhan, P. Gao, D. Zhu, “Simultaneous determination of urinary tryptophan, tryptophan-related metabolites and creatinine by high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorimetric detection”, *Journal of Chromatography B*, 879, 2720-2725, 2011.
- [20] K.J. Shingfield, N.W. Offer, “Simultaneous determination of purine metabolites, creatinine and pseudouridine in ruminant urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography”, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 723, 81-94, 1999.
- [21] S.K. George, M.T. Dipu, U.R. Mehra, P. Singh, A.K. Verma, J.S. Ramgaokar, “Improved HPLC method for the simultaneous determination of allantoin, uric acid and creatinine in cattle urine”, *Journal of Chromatography B*, 832, 134-137, 2006.
- [22] V.F. Samanidou, A.S. Metaxa, I.N. Papadoyannis, “Direct simultaneous determination of uremic toxins: Creatine, creatinine, uric acid, and xanthine in human biofluids by HPLC”, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 25, 43-57, 2002.
- [23] Y. Zuo, Y. Yang, Z. Zhu, W. He, Z. Aydin, “Determination of uric acid and creatinine in human urine using hydrophilic interaction chromatography”, *Talanta*, 83, 1707-1710, 2011.
- [24] Y. Yokoyama, S. Tsuji, H. Sato, “Simultaneous determination of creatinine, creatine, and UV-absorbing amino acids using dual-mode gradient low-capacity cation-exchange chromatography”, *Journal of Chromatography A*, 1085, 110-116, 2005.
- [25] H. Jurdáková, R. Górová, G. Addová, A. Šalingová, I. Ostrovský, “FIA-MS/MS determination of creatinine in urine samples undergoing butylation”, *Analytical Biochemistry*, 549, 113-118, 2018.

- [26] W. Grochocki, M.J. Markuszewski, J.P. Quirino, "Simultaneous determination of creatinine and acetate by capillary electrophoresis with contactless conductivity detector as a feasible approach for urinary tract infection diagnosis", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 137, 178-181, 2017.
- [27] E. Liotta, R. Gottardo, L. Bonizzato, J.P. Pascali, A. Bertaso, F. Tagliaro, "Rapid and direct determination of creatinine in urine using capillary zone electrophoresis", *Clinica Chimica Acta*, 409, 52-55, 2009.
- [28] J. Rodríguez, J.J. Berzas, G. Castañeda, N. Mora, M.J. Rodríguez, "Very fast and direct capillary zone electrophoresis method for the determination of creatinine and creatine in human urine", *Analytica Chimica Acta*, 521, 53-59, 2004.
- [29] M.J. Pedrozo-Peñafiel, T. López, L.M. Gutiérrez-Beleño, M.E.H. Maia Da Costa, D.G. Larrudé, R.Q. Aucelio, "Voltammetric determination of creatinine using a gold electrode modified with Nafion mixed with graphene quantum dots-copper", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 878, 115-125, 2020.
- [30] S. Yadav, A. Kumar, C.S. Pundir, "Amperometric creatinine biosensor based on covalently coimmobilized enzymes onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/polyaniline composite film", *Analytical Biochemistry*, 419, 277-283, 2011.
- [31] C.S. Pundir, S. Yadav, A. Kumar, "Creatinine sensors", *Trends in Analytical Chemistry*, 50, 42-52, 2013.
- [32] A.J. Killard, M.R. Smyth, "Creatinine biosensors: principles and designs", *Trends in Biotechnology*, 18, 433-437, 2000.
- [33] W. Siangproh, W. Leesutthipornchai, W. Dungchai, O. Chailapakul, "Electrochemical detection for flow-based system: a Review", *Journal of Flow Injection Analysis*, 26, 5-25, 2009.
- [34] W. Dungchai, O. Chailapakul, C.S. Henry, "Electrochemical detection for paper-based microfluidics", *Analytical Chemistry*, 81, 5821-5826, 2009.
- [35] T. You, X. Yang, E. Wang, "Applications of microelectrodes in capillary electrophoresis/electrochemical detection", *Electroanalysis*, 11, 459-464, 1999.
- [36] J. Fedorowski, W.R. LaCourse, "A review of pulsed electrochemical detection following liquid chromatography and capillary electrophoresis", *Analytica Chimica Acta*, 861, 1-11, 2015.
- [37] V.P. Hanko, W.R. LaCourse, C.O. Dasenbrock, J.S. Rohrer, "Determination of sulfur-containing antibiotics using high-performance liquid chromatography with integrated pulsed amperometric detection", *Drug Development Research*, 53, 268-280, 2001.

- [38] W.R. LaCourse, D.C. Johnson, "Optimization of waveforms for pulsed amperometric detection (PAD) of carbohydrates following separation by liquid chromatography", *Carbohydrate Research*, 215, 159-178, 1991.
- [39] M. Trojanowicz, "Recent developments in electrochemical flow detections – a review: Part ii. Liquid chromatography", *Analytica Chimica Acta*, 688, 8-35, 2011.
- [40] M.A. Islam, P. Mahbub, P.N. Nesterenko, B. Paull, M. Macka, "Prospects of pulsed amperometric detection in flow-based analytical systems - A review", *Analytica Chimica Acta*, 1052, 10-26, 2019.
- [41] D.S. Austin-Harrison, D.C. Johnson, "Pulsed amperometric detection based on direct and indirect anodic reactions: a review", *Electroanalysis*, 1, 189-197, 1989.
- [42] W.R. LaCourse, S.J. Modi, "Microelectrode applications of pulsed electrochemical detection", *Electroanalysis*, 17, 1141-1152, 2005.
- [43] J. Fedorowski, W.R. LaCourse, "A review of pulsed electrochemical detection following liquid chromatography and capillary electrophoresis", *Analytica Chimica Acta*, 861, 1-11, 2015.
- [44] A. Guzmán, L. Agüí, M. Pedrero, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, "Flow injection and HPLC determination of furosemide using pulsed amperometric detection at microelectrodes", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33, 923-933, 2003.
- [45] W.T.P. dos Santos, D.T. Gimenes, E.G.N. de Almeida, S. de P. Eiras, Y.D.T. Albuquerque, E.M. Richter, "Simple Flow Injection Amperometric System for Simultaneous Determination of Dipyrone and Paracetamol in Pharmaceutical Formulations", *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20, 1249-1255, 2009.
- [46] I.G. Casella, M. Contursi, "Determination of aliphatic aldehydes by liquid chromatography with pulsed amperometric detection", *Journal of Chromatography A*, 1063, 129-135, 2005.
- [47] Y. Cai, J. Liu, Y. Shi, L. Liang, S. Mou, "Determination of several sugars in serum by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection", *Journal of chromatography A*, 1085, 98-103, 2005.
- [48] S. Palaharn, T. Charoenraks, N. Wangfuengkanagul, K. Grudpan, O. Chailapakul, "Flow injection analysis of tetracycline in pharmaceutical formulation with pulsed amperometric detection", *Analytica Chimica Acta*, 499, 191-197, 2003.
- [49] T. Charoenraks, S. Palaharn, K. Grudpan, W. Siangproh, O. Chailapakul, "Flow injection analysis of doxycycline or chlortetracycline in pharmaceutical formulations with pulsed amperometric detection", *Talanta*, 64, 1247-1252, 2004.

- [50] C.D. García, C.S. Henry, "Direct determination of carbohydrates, amino acids, and antibiotics by microchip electrophoresis with pulsed amperometric detection", *Analytical Chemistry*, 75, 4778-4783, 2003.
- [51] C.D. García, C.S. Henry, "Direct detection of renal function markers using microchip CE with pulsed electrochemical detection", *Analyst*, 129, 579-584, 2004.
- [52] S.K. George, M.T. Dipu, U.R. Mehra, P. Singh, A.K. Verma, J.S. Ramgaokar, "Improved HPLC method for the simultaneous determination of allantoin, uric acid and creatinine in cattle urine", *Journal of Chromatography B*, 832, 134-137, 2006.
- [53] L. Kremova, D. Solichova, B. Melichar, M. Kasparova, J. Plisek, L. Sobotka, P. Solich, "Determination of neopterin, kynurenine, tryptophan and creatinine in human serum by high throughput HPLC", *Talanta*, 85, 1466-1471, 2011.