

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Natálie Sadilová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví (B0914P360004)

Natálie Sadilová

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví (B0914P360004)

**VALIDACE METODY STANOVENÍ ACETONU
V SÉRU/KRVI METODOU PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Miroslav Balvín

PLZEŇ 2024

Místo tohoto a následujícího listu bude v tištěné verzi vloženo zadání bakalářské práce s razítkem.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 31. 3. 2024

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Sadilová Natálie

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Validace metody stanovení acetonu v séru/krvi metodou plynové chromatografie

Vedoucí práce: Mgr. Miroslav Balvín

Počet stran – číslované: 54

Počet stran – nečíslované: 21

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 27

Klíčová slova: aceton, ketolátky, plynová chromatografie, validace metody

Souhrn:

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou stanovení acetonu v séru/krvi metodou plynové chromatografie. Aceton patří do skupiny ketolátek, jejichž stanovení hraje v soudním lékařství významnou roli. Stanovení těchto látek může být prospěšné zejména u posmrtných vzorků, přičemž analýza těchto biologických materiálů může být nápomocná pro objasnění nejasných příčin smrti. Teoretická část této bakalářské práce zahrnuje tři kapitoly, které shrnují poznatky o acetonu, plynové chromatografii a validaci metody. První kapitola se zabývá chemickými vlastnostmi acetonu, metabolismem a poruchami metabolismu acetonu, které popisují hlavně diabetes mellitus a stav hladovění. V kapitole plynová chromatografie je popsán hlavní princip metody a instrumentace plynového chromatografu. Třetí kapitola zahrnuje význam validace, popis analytických parametrů a porovnání rozdílů mezi validací a verifikací. V praktické části se nachází metodika a výsledky výzkumu. Popsány jsou zde laboratorní postupy a výsledky analytických parametrů důležité pro validaci metody. Praktickou částí bylo potvrzeno, že metoda je pro stanovení acetonu vhodná.

Abstract

Surname and name: Sadilová Natálie

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Validation of the method for the determination of acetone in serum/blood by gas chromatography

Consultant: Mgr. Miroslav Balvín

Number of pages – numbered: 54

Number of pages – unnumbered: 21

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 27

Keywords: acetone, ketone bodies, gas chromatography, method validation

Summary:

This bachelor thesis focuses on the determination of acetone in serum/blood by gas chromatography. Acetone belongs to the group of ketone bodies, the determination of which plays an important role in forensic medicine. The determination of these substances can be particularly useful in post-mortem samples, and analysis of these biological materials may be helpful in clarifying unclear causes of death. The theoretical part includes three chapters, which summarize the knowledge about acetone, gas chromatography and method validation. The first chapter deals with the chemical properties of acetone, metabolism and disorders of acetone metabolism, mainly describing diabetes mellitus and starvation state. The gas chromatography chapter describes the main principles of the method and the instrumentation of the gas chromatograph. The third chapter includes the importance of validation, a description of the analytical parameters and a comparison of the differences between validation and verification. The practical part contains the methodology and results of the research. In this part are described laboratory procedures and results of analytical parameters important for method validation. The practical part confirms that the method is suitable for the determination of acetone.

Předmluva

Cílem této práce bylo provést validaci analytické metody pro stanovení acetonu v séru/krevi metodou plynové chromatografie. Tento proces zahrnuje ověření opakovatelnosti, linearity, selektivity a dalších analytických parametrů, které jsou klíčové pro dosažení spolehlivých a přesných výsledků. Toto téma bakalářské práce jsem si vybrala proto, že jsem si chtěla prohloubit znalosti ohledně plynové chromatografie a také si v praxi vyzkoušet, co obnáší validace metody.

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce Mgr. Miroslavu Balvínovi za vstřícný přístup, odborné vedení, trpělivost a věnovaný čas při vedení mé bakalářské práce. Mé poděkování patří i Bc. Kristýně Kavákové za její obrovskou nápomocnost při měření, které se objevuje v praktické části. V poslední řadě chci poděkovat i Ústavu soudního lékařství za veškeré laboratorní vybavení, které mi zde pro zpracování praktické části bakalářské práce bylo zprostředkováno.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	12
SEZNAM OBRÁZKŮ	13
SEZNAM TABULEK	14
SEZNAM ZKRATEK	15
ÚVOD.....	17
TEORETICKÁ ČÁST	18
1 ACETON	18
1.1 Základní informace o acetonu.....	18
1.1.1 Popis, vlastnosti a využití acetonu.....	18
1.1.2 Přítomnost acetonu v běžném životě	19
1.1.3 Aceton inhalačně	19
1.1.4 Vliv acetonu na zdraví.....	20
1.2 Metabolismus acetonu	21
1.2.1 Produkce acetonu.....	21
1.2.2 Degradace acetonu.....	22
1.3 Poruchy metabolismu acetonu	22
1.3.1 Diabetes mellitus	23
1.3.2 Hladovění	25
1.3.3 Požití a inhalace acetonu	25
1.4 Význam acetonu v soudním lékařství.....	26
2 PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE	27
2.1 Princip metody	27
2.2 Instrumentace	29
2.2.1 Nosný plyn.....	30
2.2.2 Dvoustupňový regulátor	30
2.2.3 Injektor	31
2.2.4 Kolona	33
2.2.5 Detektor	34
2.2.6 Chromatografický software	40
3 VALIDACE METODY	41
3.1 Význam validace.....	41
3.2 Jednotlivé analytické parametry	42
3.2.1 Selektivita	42
3.2.2 Linearita a kalibrační křivka.....	43
3.2.3 Preciznost	43

3.2.4	Mez detekce (LoD)	44
3.2.5	Mez stanovitelnosti (LoQ)	45
3.2.6	Přenos	45
3.2.7	Robustnost	45
3.3	Porovnání validace a verifikace	45
PRAKTICKÁ ČÁST		47
4	CÍL A ÚKOLY PRÁCE	47
4.1	Hlavní cíl	47
4.2	Dílčí cíle	47
5	VÝZKUMNÉ OTÁZKY	48
6	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	49
6.1	Analytické parametry metody	49
6.2	Kazuistiky	49
7	METODIKA PRÁCE	50
7.1	Použité chemikálie	50
7.2	Laboratorní pomůcky a spotřební materiál	50
7.3	Přístrojové vybavení	50
7.4	Laboratorní postupy	52
7.4.1	Kontrolní měření	52
7.4.2	Příprava kalibrátorů	53
7.4.3	Opakovatelnost	55
7.4.4	Reprodukovatelnost	55
7.4.5	Linearita, kalibrační křivka	56
7.4.6	Carryover	56
7.4.7	Selektivita a interference	56
7.4.8	Mez detekce (LoD)	56
7.4.9	Mez stanovitelnosti (LoQ)	57
7.4.10	Vzorky ke kazuistikám	57
8	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	58
8.1	Analytické parametry metody	58
8.1.1	Opakovatelnost	58
8.1.2	Reprodukovatelnost	59
8.1.3	Linearita, kalibrační křivka	59
8.1.4	Carryover	62
8.1.5	Selektivita a interference	62
8.1.6	Mez detekce (LoD)	63
8.1.7	Mez stanovitelnosti (LoQ)	64

8.2	Kazuistiky	64
8.2.1	Kazuistika č. 1	65
8.2.2	Kazuistika č. 2	66
	DISKUZE	68
	ZÁVĚR	70
	SEZNAM LITERATURY	71
	SEZNAM PŘÍLOH	74
	PŘÍLOHY	75
	Příloha A – Povolení sběru informací ve FN Plzeň	75

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 - Kalibrační křivka	61
----------------------------------	----

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Chemická struktura acetonu	18
Obrázek 2 - Schéma plynového chromatografu	29
Obrázek 3 - Schématický nákres injektoru pro kapilární kolony	32
Obrázek 4 - Headspace autosampler Thermo Tri Plus 300 a plynový chromatograf Thermo Trace 1310 Series	51
Obrázek 5 - Kapilární kolona wide bore Thermo TG-ALC PLUS II (30 m x 0,53 mm x 1 μ m)	51
Obrázek 6 - Chromatogram testovaného vzorku	53
Obrázek 7 - Kalibrační křivka	61
Obrázek 8 - Chromatogram z prvního měření selektivity	63
Obrázek 9 - Chromatogram znázorňující poměr signálu k šumu	64

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Koncentrace acetonu v krevní plazmě	26
Tabulka 2 - Výkonnostní parametry validace a verifikace analytického postupu.....	46
Tabulka 3 - Příprava kalibrátorů.....	54
Tabulka 4 - Výsledky opakovatelnosti a její statistické parametry	58
Tabulka 5 - Výsledky reprodukovatelnosti a její statistické parametry	59
Tabulka 6 - Linearita	60
Tabulka 7 - Carryover.....	62
Tabulka 8 - Selektivita a interference.....	62
Tabulka 9 - Referenční hodnoty acetonu v krvi	65
Tabulka 10 - Autorkou práce naměřené koncentrace acetonu ke kazuistice č. 2.....	67

SEZNAM ZKRATEK

BHB	β -hydroxybutyrát
AKA	alkoholická ketoacidóza
NADH.....	nikotinamidadenindinukleotid
DKA	diabetická ketoacidóza
AcAc.....	acetoacetát
GC.....	plynová chromatografie (gas chromatography)
GLC	gas-liquid chromatography
GSC	gas-solid chromatography
TCD	tepelně vodivostní detektor
FID.....	plamenově ionizační detektor
ECD	detektor elektronového záchytu
NPD	dusíkově – fosforový selektivní detektor
FPD.....	plamenově fotometrický detektor
MS	hmotnostní spektrometrie
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
TOF.....	Time of Flight
°C	stupeň Celsia
μ l	mikrolitr
mmol/l.....	milimol na litr
μ mol/l.....	mikromol na litr
ml	mililitr
m	metr

mm..... milimetr

nm..... nanometr

eV elektronvolt

m/z poměr hmotnosti k náboji

LoD..... mez detekce (Limit of Detection)

LoQ..... mez stanovitelnosti (Limit of Quantification)

g/l gram na litr

μl/l mikrolitr na litr

mg/l..... miligram na litr

kg/m³..... kilogram na metr krychlový

AM..... aritmetický průměr

SD..... směrodatná odchylka

CV..... variační koeficient

ÚVOD

Historie acetonu sahá až do roku 1798, kdy anglický lékař John Rollo zaznamenal nasládlou vůni této látky v dechu svého diabetického pacienta. I když si to neuvědomoval, my nyní víme, že tento zápach byl způsoben acetonem obsaženým v jeho dechu. Téměř o šedesát let později, v roce 1857, po vyšetření moči diabetického pacienta, byla identifikována tato látka jako aceton. Již v této době byl aceton považován za charakteristický rys diabetického kómatu. Na přelomu devatenáctého a dvacátého století byla široce rozšířena myšlenka, že aceton je velmi špatně, pokud vůbec, metabolizován. Podle tehdejších znalostí byl zastáván názor, že se jedná pouze o odpadní produkt metabolismu, který pravděpodobně v metabolismu není důležitý. Nyní víme, že i když aceton není primárně produktem, který by byl v lidském těle vytvářen pro nějakou specifickou fyziologickou funkci, jeho detekce může poskytovat důležité informace o metabolickém stavu organismu. Měření acetonu může sloužit jako diagnostický nástroj zejména při monitorování diabetu nebo stavu hladovění. (Wexler, 2014; Ruzsányi a Kalapos, 2017)

V současné době je známo, že aceton je chemická látka, jejíž velké množství je vyráběno průmyslově. Část vyrobeného acetonu je využita pro výrobu dalších chemických sloučenin, které poslouží například k výrobě plastů či různých vláken. V malé míře je aceton přítomen i v lidském těle, kde přirozeně vzniká rozkladem tuků. (U.S. Public Health Service, 1994)

Aceton patří do skupiny ketolátek, jejichž stanovení hraje v soudním lékařství významnou roli. Stanovení těchto látek může být prospěšné zejména u posmrtných vzorků, přičemž analýza těchto biologických materiálů může být nápomocná pro objasnění nejasných příčin smrti. Výsledky mohou být užitečné ve chvíli, je-li podezření, že příčinou smrti byla například diabetická či alkoholická ketoacidóza. Při diagnostice těchto smrtelných příčin hraje hlavní roli detekce β -hydroxybutyrátu, acetonu, ethanolu a isopropanolu.

TEORETICKÁ ČÁST

1 ACETON

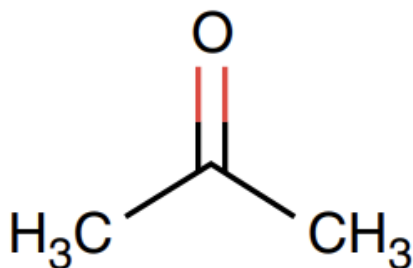
1.1 Základní informace o acetonu

1.1.1 Popis, vlastnosti a využití acetonu

Systematický název pro aceton je propan-2-on. Vzhledově se jedná o bezbarvou kapalinu s bodem varu přibližně 56 °C, která je považována za výborné organické rozpouštědlo. Proto bývá často využíván k rozpuštění různých látek. Jeho další předností je dobrá mísitelnost s vodou, alkoholem, chloroformem a většinou olejů. Aceton je neutrální látka, nevykazuje ani kyselost, ani zásaditost. Typickým znakem je jeho obzvlášť specifický výrazný zápach a nasládlá chuť. Aceton je těkavá látka, snadno přechází z kapalného skupenství do plynného stavu a šíří se vzduchem. Jelikož se jedná o vznětlivou látku, ve směsi se vzduchem může při setkání s jiskrou či plamenem způsobit požár nebo výbuch. Z tohoto důvodu by při manipulaci s acetonem měla být dodržována bezpečnostní opatření, která budou v souladu s jeho vlastnostmi. (U.S. Public Health Service, 1994; Wexler, 2014)

Aceton se získává fermentací či chemickou syntézou, při které vzniká buď jako hlavní produkt, nebo jako vedlejší. Jedná se především o syntézu kumenu, který je používán za účelem výroby dalších důležitých chemických látek, například fenolu či pro nás stěžejního acetonu. (Wexler, 2014)

Obrázek 1 - Chemická struktura acetonu



Zdroj: Wexler, 2014

1.1.2 Přítomnost acetonu v běžném životě

Malé množství acetonu se nachází i v našem těle. Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují více či méně naše setkání s touto látkou. S acetonem můžeme běžně přijít do styku v domácnosti, protože bývá součástí řady domácích chemikálií. Nejčastěji se jedná o odlakovače na nehty, některé odstraňovače barev, vosky, leštidla a čisticí prostředky s příměsí acetonu. Koncentrace acetonu ve vzduchu a ve vodě obecně nenabývá vysokých hodnot. Je potvrzeno, že množství acetonu ve vzduchu ve městech je v porovnání s venkovskými oblastmi vyšší. V domácnosti bývá zpravidla koncentrace acetonu ve vzduchu lehce vyšší než ve vzduchu venkovním. Aceton je v zanedbatelném množství přítomen i v několika druzích zeleniny a ovoce. Zpracování nebo balení potravin na toto množství acetonu nemá žádný vliv. (U.S. Public Health Service, 1994)

Aceton se v přírodě přirozeně nevyskytuje ve velkém množství, ale lze jej nalézt v některých přírodních procesech a zdrojích jako vedlejší produkt. Některé bakterie mohou produkovat aceton při rozkladu organických látek a v malých koncentracích může být aceton přítomen ve vzduchu v důsledku lesních požárů. Kvůli své mísitelnosti s vodou je i významným kontaminantem podzemních vod. Dále se nachází ve výfukových plynech vozidel, tabákovém kouři a na skládkách odpadů. Do životního prostředí se však větší množství acetonu dostává průmyslovými procesy, nikoliv těmi přírodními. (Wexler, 2014)

1.1.3 Aceton inhalačně

Naše tělo běžně obsahuje malé množství acetonu, který zde vzniká procesem odbourávání tuků. U zdravého člověka by se koncentrace acetonu v krvi měla pohybovat v rozmezí $0,015 \pm 0,005$ mmol/l ($=0,9 \pm 0,3$ mg/l). Kromě tohoto přirozeného procesu existují i další cesty, jak se aceton může do našeho těla dostat. Koncentraci acetonu může ovlivňovat expozice acetonu jako je například přímý kontakt acetonu s pokožkou, dýchání vzduchu s obsahem acetonu, či konzumace jídla a pití obsahující aceton. (U.S. Public Health Service, 1994; Schlatter et al., 2014)

Aceton z žaludku a plic je absorbován velmi rychle. Krevním oběhem lze absorbovat i aceton z kůže, ale tato absorpce trvá déle. Aceton se dostává do všech tělesných orgánů, ale nezůstává tam dlouho. Játra ho rozkládají na látky, které nejsou pro tělo škodlivé. Tyto vzniklé chemické látky jsou dále využity k výrobě glukózy a tuků, které představují energii pro normální tělesné funkce. Ne všechno množství přijatého acetonu se rozloží. Aceton, který nepodléhá rozkladu, opouští naše tělo převážně vydechaným vzduchem a jeho malé

množství, kolem 7 % endogenního acetonu, se vylučuje i močí. (U.S. Public Health Service, 1994; Wexler, 2014)

Tělesné přijímání a vylučování acetonu je závislé na tom, jak moc jsme acetonu byli vystaveni a také jak dlouho. Čím vyšší je hladina acetonu, tím déle ho tělo vylučuje. Téměř všechny aceton by měl však opustit naše tělo do tří dnů po ukončení expozice. (U.S. Public Health Service, 1994)

Vyšší hladiny acetonu bývají zaznamenány u pacientů s ketogenní dietou, s nekompenzovaným diabetem a při hladovění. Z tohoto důvodu je aceton citlivým indikátorem při kontrole cukrovky a ketogenní diety. (Wexler, 2014)

1.1.4 Vliv acetonu na zdraví

U některých jedinců může být koncentrace acetonu v těle vyšší než koncentrace udávaná u zdravých lidí. Příkladem jsou kojenci, těhotné ženy, diabetici a lidé, kteří mají fyzické trauma anebo pijí větší množství alkoholu. Zvýšené hladiny u těchto lidí obvykle nezpůsobují zdravotní problémy. Při vystavení vysoké koncentraci acetonu v prostoru může člověku hrozit podráždění očí, nosu, hrdla a dýchacích cest. V závažnějším případě se mohou projevit i bolesti hlavy, závratě, neklid, zmatenost a zvýšení tepové frekvence. Tyto faktory se odvíjí od toho, jak dlouho byl člověk vystaven takto vysoké koncentraci acetonu. V případě déle trvajícího přímého kontaktu acetonu s kůží může hrozit riziko jejího podráždění a i poškození kožních buněk. Při podání intravenózní injekce acetonu byl u lidí vyvolán pokles krevního tlaku a ospalost. Při vdechnutí či požití působí narkoticky. Po akutním požití acetonu se mohou objevit příznaky zahrnující nevolnost, zvracení, krvácení do žaludku a parestézii. Požitím velkého množství látky hrozí až bezvědomí a poškození kůže v ústech. Z hlediska tvorby rakoviny není aceton klasifikován jako lidský karcinogen. (U.S. Public Health Service, 1994; Wexler, 2014)

Laboratorně lze prokázat, že vysoké hladiny acetonu jsou doprovázeny i zvýšením koncentrací dalších látek v těle. Jedná se zejména o koncentraci glukózy a laktátu v krvi. Acetonem je okamžitě ovlivněna i funkce centrálního nervového systému, což je při akutní intoxikaci největší problém. Život ohrožujícím faktorem je právě negativní narušení tohoto systému, nikoli metabolické účinky acetonu. (Wexler, 2014)

Aceton je možné měřit z vydechaného dechu, krve a moči. Pomocí naměřeného acetonu je možné určit, zda jsme byli v přítomnosti acetonu a případně jakému množství

jsme byli vystaveni. Na jeho přítomnost v lidském těle může lékaře upozornit i pacientův dech, z kterého lze zápach acetonu cítit. (U.S. Public Health Service, 1994)

1.2 Metabolismus acetonu

Existuje několik cest vedoucích k produkci acetonu či k jeho chemickému rozkladu (degradaci). (Ruzsányi a Kalapos, 2017)

1.2.1 Produkce acetonu

V lidském těle existují dva hlavní fyziologické zdroje acetonu. Prvním zdrojem je dekarboxylaci acetoacetátu, druhým zdrojem je oxidace isopropanolu. (Ruzsányi a Kalapos, 2017)

1.2.1.1 Dekarboxylace acetoacetátu na aceton

Acetoacetát je u savců hlavním zdrojem, ze kterého vzniká aceton. Acetoacetát může v těle vznikat lipolýzou, či rozkladem ketogenních aminokyselin, přičemž jeho prekurzorem je acetylkoenzym A. Přeměna acetoacetátu na aceton může být buď výsledkem neenzymatické reakce dekarboxylace acetoacetátu na aceton, nebo reakcí za přítomnosti enzymu. Ve druhém případě je reakce katalyzována enzymem označeným jako acetoacetátdekarboxyláza. Tento enzym byl poprvé identifikován u bakterie *Clostridium acetobutylicum* a jeho aktivita byla nalezena například i v krysích tkáních, játrech a plazmě. Dále byla zaznamenána i neenzymatická dekarboxylace acetoacetátu, ke které dochází i bez spolupráce již předtím zmíněného enzymu. (Ruzsányi a Kalapos, 2017)

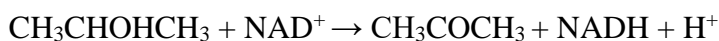
Reakce znázorňující přeměnu acetoacetátu na aceton:



Přičemž $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COO}^-$ představuje acetoacetát, $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COOH}$ představuje kyselinu acetyloctovou a CH_3COCH_3 představuje aceton. (Kalapos, 1999)

1.2.1.2 Oxidace isopropanolu na aceton

Reakce znázorňující přeměnu isopropanolu na aceton:



Přičemž $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$ představuje isopropanol a CH_3COCH_3 představuje aceton.

Tato reakce je katalyzována hlavně alkoholdehydrogenázou. V malém množství se reakce účastní i kataláza. Nejdůležitější částí reakce je deprotonace, která probíhá ve dvou po sobě následujících krocích. Tento způsob vede ke vzniku acetonu. Opačná reakce, redukce acetonu na isopropanol, se považuje za degradaci ketonu. (Ruzsányi a Kalapos, 2017)

1.2.2 Degradace acetonu

Je zjištěno, že na metabolismu acetonu se podílí cytochrom P450. Jsou známy dvě hlavní cesty, jimiž se docílí degradace acetonu. Obě z nich zahrnují přeměnu acetonu na hydroxyaceton pomocí izoenzymu cytochromu P450, konkrétně formy CYP2E1. Tento izoenzym je indukován řadou vnějších faktorů, včetně hladovění a diabetes mellitus. Tyto dvě dráhy jsou však příliš komplikované, proto je nebudu rozebírat detailněji. Zmíním pouze konečné produkty degradace acetonu, což může být pyruvát, L-laktát, formiát a acetát. (Ruzsányi a Kalapos, 2017)

1.3 Poruchy metabolismu acetonu

V některých případech může docházet k poruchám metabolismu acetonu. Takto narušený metabolismus je většinou doprovázen i následnou změnou koncentrací ostatních ketolátek, zejména acetoacetátu a β -hydroxybutyrátu. Jejich fyziologická koncentrace se pohybuje mezi 100-250 $\mu\text{mol/l}$. Jestliže dojde k tomu, že aktuální koncentrace ketolátek překročí horní hranici, lze pro tento stav využít termín ketóza. Z důvodu, že acetoacetát a β -hydroxybutyrát jsou látky kyselé povahy, může po jejich nahromadění klesat pH krve pod 7,35. Tomuto stavu potom říkáme ketoacidóza. (Ruzsányi a Kalapos, 2017)

Ketoacidóza se řadí do skupiny metabolických acidóz. Je vyjadřována jako stav, při kterém dochází ke snižování pH krve vlivem produkce β -oxidativních látek. Prvním příkladem, který podmiňuje vznik těchto látek, je alkoholismus. V tomto případě vzniká alkoholická ketoacidóza. Dále může být produkce tohoto typu látek vyvolána v důsledku diabetu. Za těchto podmínek se jedná o diabetickou ketoacidózu. (Elliot, Smith, Cassidy, 2010)

Při ketoacidóze dochází k biochemickému narušení rovnováhy v těle. Stav nastává poté, kdy tělo využívá mastné kyseliny prostřednictvím β -oxidačního procesu, což je alternativní palivová cesta. Mastné kyseliny podléhají přeměně na acetoacetát, jehož dekarboxylací vzniká aceton a redukcí β -hydroxybutyrát. Tyto vzniklé produkty se souhrnně

nazývají ketolátky. Zvýšená produkce těchto látek je typickým znakem ketoacidózy. Jejich nadměrná přítomnost v těle člověka má za následek snižování pH krve pod hranici 7,3, přičemž za běžných podmínek bývá pH krve v rozmezí 7,36-7,44. Zvýšená produkce ketolátek může být zapříčiněna různými zdravotními příčinami. Nejčastějšími faktory zpravidla bývá hladovění nebo cukrovka. (Elliot, Smith, Cassidy, 2010)

1.3.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus postihuje přibližně 8 % populace na světě. Typickým znakem diabetu je absolutní nebo relativní nedostatečný účinek inzulínu. Tato nedostatečnost má za následek narušení metabolismu. Příčiny vzniku tohoto onemocnění mohou být velmi rozmanité. Nejčastěji může vznikat v návaznosti na autoimunitní poruchu, obezitu, potransplantační stav, alkoholismus a poranění slinivky. Ať už je příčina vzniku jakákoliv, metabolické změny se budou projevovat stejně – vzestupem hladiny cukru v krvi a intenzivní lipolýzou. V případě nedostatku inzulínu se mastné kyseliny uvolňují z tukové tkáně a pomocí dalších procesů dochází ke zvýšení hladiny acetylkoenzymu A. Toto množství produkovaného acetylkoenzymu A se nestačí cyklem trikarboxylových kyselin vyčerpávat, což podněcuje zvýšenou tvorbu ketolátek. (Ruzsányi a Kalapos, 2017)

Důležité je zmínit, že plazmatické koncentrace acetonu u diabetiků obecně stoupají nejméně o dva řády. V extrémních případech může být překročena hladina 12 mmol/l. U těchto diabetických pacientů se přibližně 50 % acetoacetátu přeměňuje na aceton. Dokonce i u léčených diabetických pacientů je koncentrace acetonu vyšší než u normální populace. (Ruzsányi a Kalapos, 2017)

1.3.1.1 Diabetická ketoacidóza

Jedná se o celkem běžnou, přesto potenciálně život ohrožující ketoacidózu. DKA se vyskytuje v souvislosti akutní komplikace diabetu. Velmi charakteristické jsou pro ni následující znaky. Hladina glukózy je zvýšená, což je rozdílné proti AKA, při níž se hladina glukózy nějak zásadně nezvyšuje. Koncentrace ketonů se však stejně jako u AKA rovněž zvyšuje. Větší výskyt DKA je zaznamenán hlavně u pacientů s diabetem prvního typu, nicméně za stresových podmínek mohou být k DKA náchylní i pacienti s diabetem druhého typu. Příčinou vzniku této ketoacidózy může být absolutní i relativní nedostatek inzulínu. Rozvoj DKA může souviset s infekcí zhoršující glukózovou toleranci, dále s mechanickými problémy s inzulínovou pumpou, či nezavedenou inzulínovou terapií.

Na rychlosti rozvoje se mohou podílet i léky ovlivňující metabolismus sacharidů. (Putula et al., 2023)

Patofyziologie

Patofyziologie DKA souvisí s nerovnováhou v poměru inzulínu a kontraregulačních hormonů. Mezi kontraregulační hormony řadíme konkrétně glukagon, kortizol, katecholaminy a růstový hormon. DKA se projevuje u pacientů s absolutním nebo relativním nedostatkem inzulínu. Snížené množství inzulínu vede ke zvýšené jaterní glukoneogenezi a glykogenolýze. Glukagon naopak glykogenolýzu stimuluje. Nedostatek inzulínu má za následek i hyperglykémii. Ta nastává poté, co dochází ke ztrátě transportu a využití glukózy závislé na inzulínu v periferních tkáních. (Calimag et al., 2023)

Hormonální nerovnováhu představuje hlavně snížené množství inzulínu a zvýšené množství katecholaminů, kortizolu a růstového hormonu. Touto hormonální změnou se aktivuje lipáza vedoucí k rozkladu triglyceridů a tím dochází k uvolňování volných mastných kyselin. Jakmile jsou volné mastné kyseliny transportovány do jaterních mitochondriích, podléhají beta-oxidaci za vzniku acetylkoenzymu, a to vede ke zvýšené produkci ketoláték. Hromadí se hlavně acetoacetát a β -hydroxybutyrát. (Calimag et al., 2023)

Klinické projevy

Mezi prvotní symptomy patří nevolnost, zvracení, bolesti břicha a změněné dýchání. Kvůli těmto příznakům se pacient nejčastěji rozhodne pro návštěvu pohotovosti. Dále se může vyskytovat polydipsie, polyurie, slabost, malátnost a letargie. U pacientů se také projevují známky dehydratace, jako jsou suché sliznice, tachykardie a hypotenze. Vysoká hladina acetonu způsobuje u pacientů charakteristický ovocný zápach v jejich dechu. (Calimag et al., 2023)

Laboratorní charakteristika

Biochemická kritéria se opírají hlavně o hyperglykémii, metabolickou acidózu a ketózu. DKA způsobuje poruchu vody a elektrolytů. Glukóza způsobuje hypertonicitu plazmy, která podporuje osmotickou diurézu a natriurézu. To má za následek ztrátu elektrolytů – sodíku, draslíku, vápníku, hořčíku, fosfátu a chloridů. Hlavní cíle léčby zahrnují odstranění dehydratace, úpravu hyperglykémie, ketózy a acidózy. (Calimag et al., 2023)

1.3.2 Hladovění

Omezení potravin může vést postupným hladověním až ke smrti, které předchází metabolické změny. Aby se zamezilo tomu nejhoršímu případu, organismus se snaží co nejdéle bojovat a přizpůsobovat svůj metabolismus. V takových případech reaguje organismus přísným pořadím událostí, kterými se snaží o jeho co nejdelší udržení. Tyto reakce by tak měly prodlužovat dobu potřebnou k vyléčení postiženého jedince a zvyšovat tak šanci na jeho přežití. Posloupnost dějů objevujících se při hladovění začíná vyčerpáním zásoby jaterního glykogenu, dále pokračuje zahájením lipolýzy a konečnou fází je zahájení intenzivní proteolýzy se současnou ketogenezí a glukoneogenezí v játrech. Těmito procesy dochází k poklesu potřeby glukózy a ke zvýšení ketolátek, které se využívají v periferních tkáních. (Ruzsányi a Kalapos, 2017)

Během hladovění se v lidském těle hromadí ketolátky, jedná se o acetoacetát, β -hydroxybutyrát a aceton. Aceton je na rozdíl od AcAC a BHB neutrální sloučenina, proto neovlivňuje ani koncentraci hydrogenuhličitanů v krvi, ani pH. Zásadou toho, že aceton je rozpustný ve vodě i v lipidech, je distribuován po celém těle. Koncentrace všech zmíněných ketolátek je závislá na délce trvání hladovění a jejich plazmatické koncentrace jsou přibližně o 30 % vyšší než koncentrace v plné krvi. (Owen et al., 1983)

Adaptace na hladovění je ovlivněna i regulací hormonálních změn. Výsledkem intenzivní lipolýzy je zvýšení hladiny acetylkoenzymu A, která takto překračuje kapacitu pro oxidaci acetylkoenzymu A. Důsledkem toho je tvorba ketolátek v jaterním lalůčku. Ty jsou poté vylučovány do krve, čímž se koncentrace těchto cirkulujících ketonů zvyšuje. Při maximální acetonémii může být až 37 % z celkového množství acetátu přeměněno na aceton. (Ruzsányi a Kalapos, 2017)

Ačkoliv lidé s normální váhou i lidé s nadváhou vytvářejí zvýšené hladiny ketolátek, u lidí s nadváhou je proces produkce mnohem pomalejší. Dalším zajímavým faktem je, že těhotné ženy jsou k rozvoji ketózy náchylnější než ty, které gravidní nejsou. (Ruzsányi a Kalapos, 2017)

1.3.3 Požití a inhalace acetonu

Aceton se řadí k toxickým látkám. Buď je v těle metabolizován, nebo je beze změny vylučován přes plíce a ledviny. Je zaznamenáno mnoho případů otrav acetonem. Většinou vznikají v důsledku vdechování par, absorpce kůží či požití. Tyto otravy mohou být zcela

náhodné, může k nim docházet vlivem pracovní expozice, anebo jsou v některých případech plně úmyslné, například když se jedná o pokus o sebevraždu. (Ruzsányi a Kalapos, 2017)

Zneužívání acetonu ve formě inhalování je poměrně častá záležitost, nejčastěji tyto praktiky vidíme u mladých lidí anebo u lidí s omezenými finančními prostředky. Aceton je preferován hlavně kvůli svým narkotickým účinkům. Samotným vdechováním acetonu je však velmi obtížné se otrávit. (Ruzsányi a Kalapos 2017)

Tabulka 1 - Koncentrace acetonu v krevní plazmě

Fyziologický či patofyziologický stav		Rozmezí acetonu [mmol/l]
Trénovaní jedinci bez zdravotních problémů		0,015±0,005
Netrénovaní jedinci bez zdravotních problémů	Vynechávající fyzické aktivity	0,043±0,032
	Po fyzické aktivitě	0,121±0,135
Diabetičtí jedinci	Kompenzovaní diabetici	1,69±0,78
	Nekompenzovaní diabetici	3,26±0,79
	Posmrtná koncentrace	6,21±4,59
Hladovějící pacienti	Po dobu 3 dnů	0,29±0,04
	Po dobu 21 dnů	1,37±0,19

Zdroj: Ruzsányi a Kalapos, 2017

1.4 Význam acetonu v soudním lékařství

Klinická analýza posmrtných vzorků může být velmi nápomocná při vyšetřování některých zdánlivě přirozených úmrtí. Výsledky mohou být užitečné ve chvíli, je-li podezření, že příčinou smrti byla diabetická či alkoholická ketoacidóza, utonutí, anafylaxe, časný infarkt myokardu, nebo sepse. Při diagnostice těchto smrtelných příčin hraje hlavní roli detekce určitých látek. Nejčastěji se jedná o β -hydroxybutyrát, aceton, ethanol a isopropanol. (Elliot, Smith, Cassidy, 2010)

2 PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE

2.1 Princip metody

Plynová chromatografie neboli GC (*gas chromatography*), patří do skupiny analytických separačních metod. Slouží zejména k rozdělení jednotlivých látek z komplexních směsí za účelem poskytnout o těchto oddělených složkách další informace. Plynová chromatografie poskytuje spolehlivou informaci o tom, které látky byly obsaženy v původní směsi a také informaci o jejich množství. Tato metoda má široké využití, může být využita k analýze plynů, kapalin i pevných látek, přičemž ty bývají většinou rozpuštěny v těkavých rozpouštědlech. Metodami plynové chromatografie lze oddělovat a kvantitativně stanovovat organické látky s bodem varu do 400 °C. (Poole, 2012; Baker et al., 1969; Štulík, 2004)

Mnoho sloučenin lze analyzovat i pomocí jiných chromatografických metod, avšak pro analýzu plyných a velmi těkavých vzorků je plynová chromatografie jedinou vhodnou technikou. (de Coning a Swinley, 2019)

Mezi hlavní výhody této metody patří jednoduché a rychlé provedení analýzy, spolehlivost, účinná separace látek a malé množství vzorku potřebné k analýze. Metoda není příliš drahá, je velice efektivní a poskytuje vysoce přesné kvantitativní analýzy. (McNair et al., 2019)

Pro plynovou chromatografii je charakteristická přítomnost dvou nemísitelných fází. Tyto dvě fáze jsou hlavní klíčové prvky, které umožňují rozdělování jednotlivých složek vzorku na základě jejich rozdílné distribuce. Jedná se o fázi stacionární, nepohyblivou, a o fázi mobilní, pohyblivou. Stacionární fáze je pevná nebo kapalná vrstva umístěná uvnitř chromatografické kolony. Mobilní fázi představuje plyn, který zajišťuje transport vzorku kolonou od injektoru k detektoru. Při styku obou fází dochází k specifickým interakcím mezi složkami vzorku a stacionární fází během průchodu chromatografickou kolonou. Výsledkem je také nepřetržitá řada za sebou následujících adsorpčních a desorpčních procesů, přičemž adsorpcí rozumíme hromadění látky v objemu, na povrchu nebo v pórech stacionární fáze. Doba, po kterou zůstávají různé složky v koloně, je tedy rozdílná, což vede k rozdělení jednotlivých složek na chromatogramu. Látka, která je silněji adsorbovaná, prochází kolonou pomaleji než ty, které se adsorbují slaběji. Interakce mezi fázemi je závislá především na typu stacionární a mobilní fáze. Aby byla interakce zajištěna, je dále zapotřebí,

aby fáze byly v kontaktu dostatečně dlouho. Průtoková rychlost mobilní fáze proto nesmí být příliš vysoká. (de Coning a Swinley, 2019; Doležalová, 1995; Čerňák a Čerňáková, 1982)

Důležitým parametrem v plynové chromatografii je retenční čas. Tento pojem představuje čas, který trvá sloučeninám ve vzorku projít chromatografickou kolonou od injektoru k detektoru. Poskytuje informace o čase, který sloučeniny stráví v koloně předtím, než jsou detekovány. Retenční čas je obvykle vyjadřován v minutách nebo sekundách a je zaznamenán na chromatogramu. Získání informací o retenčním čase je důležité při identifikaci sloučenin ve vzorku a při porovnání s referenčními standardy. Dvě nebo více složek mohou mít stejný retenční čas, ale žádná složka nesmí mít dva různé retenční časy. Tento parametr může být ovlivněn mnoha faktory, zejména typem stacionární fáze, typem nosného plynu, délkou kolony a teplotou. Zvyšování teploty obvykle zkracuje retenční časy, protože zahříváním se zvyšuje pohyblivost molekul. (de Coning a Swinley, 2019; McNair et al., 2019)

Stacionární fáze

Podle druhu stacionární fáze rozlišujeme plynovou chromatografii na GSC (*gas-solid chromatography*) a GLC (*gas-liquid chromatography*). V případě GSC je využívána pevná stacionární fáze, nosný materiál je pokryt tenkou vrstvou pevné látky, příkladem může být silikagel nebo polymerní materiály. V GLC se využívá kapalná stacionární fáze, v tomto případě je na povrch nosného materiálu, kterým je obvykle křemičitá, kovová nebo skleněná kapilára, nanесena kapalná vrstva. Jako kapalné stacionární fáze se často používají například polyethylenglykoly, polysiloxany nebo polyestery. Ve většině případů se používá metoda GLC, GSC má však taky své využití a bývá vhodná především při separaci plynů. (de Coning a Swinley, 2019; Volka, 1995)

Mobilní fáze – nosný plyn

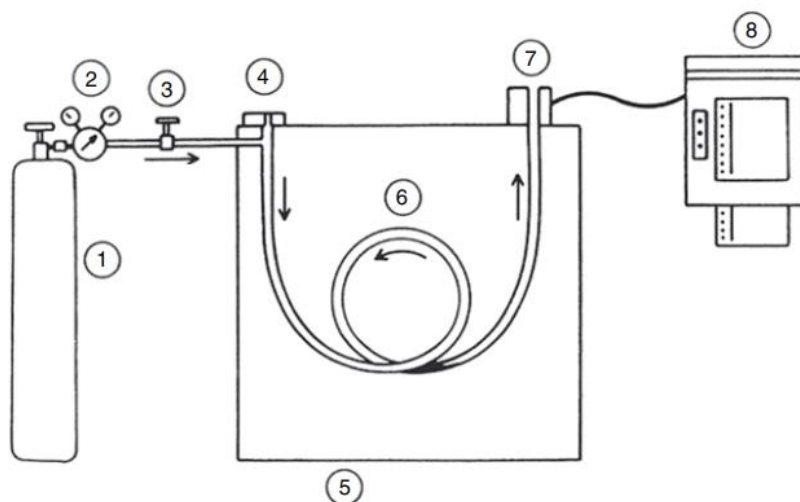
Mobilní fází v plynové chromatografii je pokaždé plyn, obvykle se jedná o vodík, helium, dusík, argon. Volba nosného plynu závisí na mnoha faktorech. Důležitým požadavkem je, aby příslušný plyn byl inertní vůči analytu i stacionární fázi. Dále zohledňujeme zejména viskozitu, účinnost, čistotu, reaktivitu, typ používaného detektoru a cenu plynu. Zdrojem nosného plynu bývají nejčastěji tlakové láhve. Tato fáze se kolonou pohybuje konstantní rychlostí. Zároveň platí, že nic se nemůže kolonou pohybovat rychleji než nosný plyn, který slouží k přenosu směsi z injektoru přes kolonu, a nakonec do detektoru.

Dále také platí, že vše, co se pomocí mobilní fáze pohybuje skrze kolonu, se pohybuje stejnou rychlostí. Z výsledků GC by se mohlo zdát, že jejich pohyb trvá různou dobu, ale tento rozdíl nespočívá v mobilní fázi, ale v té stacionární. To je založeno na tom, že jednotlivé složky mají různou afinitu ke stacionární fázi a podle toho tam stráví delší nebo kratší dobu. Na tomto principu je založena separace. (de Coning a Swinley, 2019)

2.2 Instrumentace

Základní části, ze kterých se plynový chromatograf skládá, jsou vyobrazeny na následujícím obrázku.

Obrázek 2 - Schéma plynového chromatografu



Zdroj: McNair et al., 2019

Popis částí podle příslušných čísel:

1. Zdroj nosného plynu
2. Dvoustepňový regulátor
3. Průtokový regulační ventil
4. Injektorový prostor
5. Termostat
6. Kolona
7. Detektor
8. Vyhodnocovací zařízení

Souhrnně řečeno, plynový chromatograf funguje následovně. Inertní nosný plyn nepřetržitě proudí z tlakové láhve souvisle přes injektor, kolonu a detektor. Vyšetřovaný vzorek je vstříkovan, obvykle mikrostříkačkou, do dávkovacího zařízení, kde dochází k jeho odpaření. V plynném skupenství je poté přenášen do kolony, která je z vnitřní strany pokryta tenkou vrstvou stacionární fáze. Vzorek se na základě rozdílné distribuce jednotlivých složek rozdělí mezi mobilní a stacionární fázi. Nakonec prochází nosný plyn s vyšetřovaným analytem přes detektor, který měří množství vzorku a vydává elektrický signál. Tento signál je přenášen do vyhodnocovacího zařízení, které vytváří elektronický nebo písemný záznam analýzy, respektive chromatogram. Ve většině případů je součástí takového záznamu i výpočet plochy píku, kvantitativní údaje o rozdělených složkách a retenční časy. Následovně bude každá z těchto hlavních částí popsána podrobněji. (McNair et al.; 2019)

2.2.1 Nosný plyn

Nejdůležitějším faktorem při výběru nosného plynu je kompatibilita s detektorem, který má být použit pro specifickou analýzu. Jako nosné plyny se běžně používají dusík, argon, helium a vodík. (de Coning a Swinley, 2019)

Hlavním úkolem nosného plynu je transport vzorku přes kolonu. Důležité je, aby příslušný plyn byl inertní a chemicky nereagoval se vzorkem. Nejčastěji používaným nosným plynem je helium, zejména kvůli jeho kompatibilitě se všemi běžnými detektory. Helium je drahé, proto se z ekonomického hlediska postupně přechází na vodík. Výhodou vodíku je v porovnání s heliem rychlejší a účinnější separace, avšak velkou nevýhodou je riziko možnosti vzniku požáru a výbuchu. (McNair et al.; 2019)

Dalším často využívaným nosným plynem je dusík. Dusík je oblíbený, protože je relativně levný a vykazuje vysokou čistotu. V některých případech je však preferován argon z důvodu větší čistoty a inertnosti, ale jeho cena je vyšší. (de Coning a Swinley, 2019)

Je důležité, aby byla zachována čistota nosného plynu. Případné nečistoty mohou chemicky poškodit stacionární fázi v koloně a následně jí zničit. Obzvláště náchylné jsou polyesterové a polyamidové kapalné fáze. (McNair et al., 2019)

2.2.2 Dvoustupňový regulátor

Hlavním regulačním prvkem v průtokovém systému je dvoustupňový regulátor, který je připojen k tlakové láhvi s nosným plynem. Jeho součástí by měl být pojistný ventil

a vstupní filtr, který zabraňuje vniknutí pevných částic do regulátoru. Nové chromatografy jsou již vybaveny elektronickým řízením průtoku nosného plynu. (McNair et al., 2019)

2.2.3 Injektor

Jedná se o zařízení, které slouží k zavedení analyzovaného vzorku do plynového chromatografu. Ten je dovnitř vpravován nejčastěji pomocí speciálních injekčních stříkaček s obvyklou celkovou kapacitou 5 až 10 μl . Aplikace pevných látek do injektoru je sice složitější, ale nepředstavuje neřešitelný problém. Mnoho pevných vzorků lze rozpustit ve vhodném rozpouštědle a dále se s nimi zachází stejně jako se vzorky kapalnými. V případě plyných vzorků se používá plynotěsná injekční stříkačka o objemu 1 až 5 ml, která představuje nejjednodušší a nejméně nákladný způsob přenosu plynu do injektoru. Pokud je vzorek v kapalném skupenství, je zapotřebí, aby byl nejdříve převeden do stavu par. Uvnitř dávkovacího zařízení se nachází vyhřívaná trubička neboli liner, ve kterém případně dochází ke zplynění vzorku a jeho páry jsou následně pomocí nosného plynu vedeny do kolony. (McNair et al., 2019; Bruno, 2011)

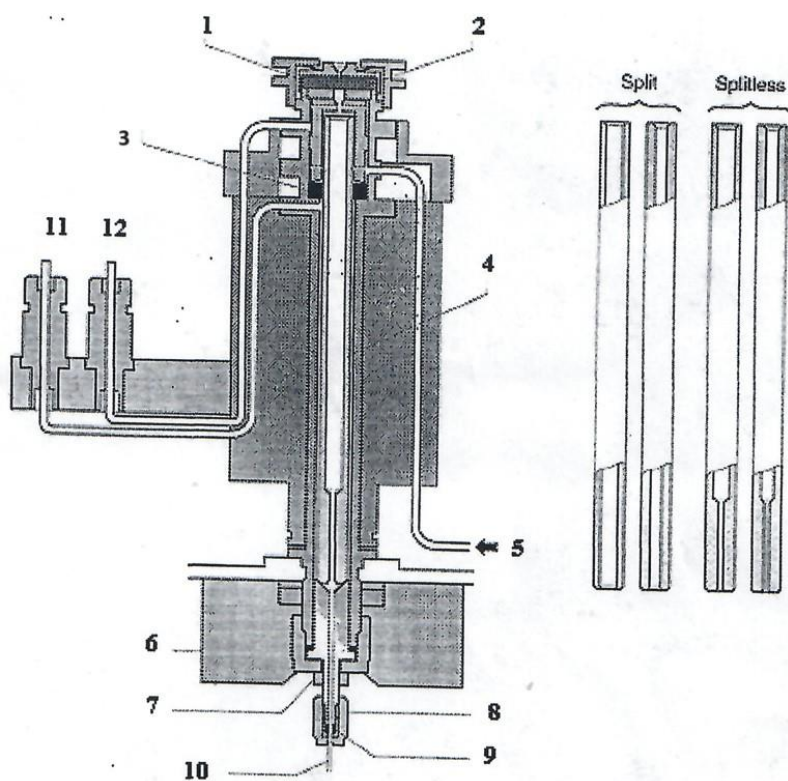
Analyty lze dávkovat manuálně nebo pomocí automatických dávkovačů, tzv. autosamplerů. Při manuálním vstřikování je potřeba, aby došlo ke správnému naplnění stříkačky kapalným vzorkem. V případě použití mikrolitrové stříkačky je žádoucí, aby z ní byl zpočátku odstraněn veškerý vzduch. Toho docílíme opakovaným nasáváním kapaliny do stříkačky a jejím rychlým vypuzením zpět do kapaliny. Poté se nasaje požadovaný objem vzorku, který je přes samouzavírací septum vystříknut do plynového chromatogramu. Septum obvykle bývá vyrobeno z polymerního silikonu a vyznačuje se vysokou teplotní stabilitou. Průměrně septum vydrží kolem padesáti vstřiků, proto je nutné dbát na jeho pravidelnou výměnu. Může ovšem vydržet i déle, to je ovlivněno dle konkrétní praxe. (McNair et al., 2019)

Vzorky se do plynového chromatografu mohou vstřikovat i automaticky pomocí mechanických zařízení, která se dají aplikovat téměř na jakýkoli injektor. Toto zařízení obsahuje zásobník, který může pojmout přibližně sto vzorků v malých speciálních lahvičkách. Jedná se o autosamplery, které se při analýzách využívají velmi často. Po propláchnutí rozpouštědlem se nasaje požadovaný vzorek a poté se jeho fixní objem vstříkne do zařízení. Velkou výhodou autosamplerů je jejich možný provoz i bez obsluhy a větší přesnost, než které bychom docílili ručním vstřikováním. Jehla injekční stříkačky

propíchně septum vždy ve stejném místě, čehož bychom ručním vstříkáním nebyli schopni. Toto zvyšuje životnost septa až o 50 %. (McNair et al., 2019; Bruno, 2011)

Dalším příslušenstvím, které se používá u chromatografických injektorů, jsou automatické headspace autosamplery. Při headspace analýzách dochází k rovnovážnému stavu par nad hladinou. Toto zařízení čerpá z prostoru nad povrchem vzorku, kde dochází k odpařování složek do plynného skupenství a po určité době k vytvoření rovnovážného stavu par těkavých analytů. (Bruno, 2011)

Obrázek 3 - Schématický náčrt injektoru pro kapilární kolony



Zdroj: Instruction Manual GC 8000 Top Series, Pragolab, 1994

Popis částí podle příslušných čísel:

1. Krytka septa
2. Septum
3. Grafitové těsnění
4. Skleněný liner
5. Přívod nosného plynu
6. Tepelná izolace

7. Upevňovací matice
8. Převlečná matice
9. Grafitové těsnění
10. Kapilární kolona
11. Odfuk – odvádí přebytečné páry z nástříku
12. Oplach septa – zabraňuje přehřívání septa

2.2.4 Kolona

Kolona představuje klíčovou část pro plynovou chromatografii, a to zejména z důvodu, že její součástí je stacionární fáze potřebná pro separaci. Kolona je namontována v termostatu, který ji udržuje při teplotách od 40 do 400 °C a zajišťuje velmi přesnou a stabilní regulaci teploty potřebnou pro správný průběh celé metody. (McNair et al., 2019; de Coning a Swinley, 2019)

Podle základního dělení rozlišujeme dva typy kolon:

- Náplňové kolony (*packed columns*)
- Kapilární kolony (*capillary columns*)

2.2.4.1 Náplňové kolony

Náplňové kolony představují starší typ, který se v současné době k separacím využívá méně často. Používají se trubice s relativně velkým průměrem. Specificky jsou využívány kolony o délkách 1 až 10 m a průměrech mezi 2 a 6 mm, které jsou vytvářeny většinou z oceli nebo skla. Hojně se uplatňují při preparativních separacích. (Bruno, 2011)

2.2.4.2 Kapilární kolona

Tato varianta se zaměřuje na využití dlouhých kolon o délce 10 až 60 m sestávajících z navinutých kapilárních trubic s průměrem 0,05 až 0,52 mm. V porovnání s náplňovými kolonami vykazují trubice pro kapilární kolony relativně malý průměr. Jedná se o kolony, které jsou obvykle vyrobeny z taveného oxidu křemičitého a potaženy ochrannou polyimidovou vrstvou. Stacionární fáze je potažena v tenké vrstvě na vnitřním povrchu trubice. (Bruno, 2011)

Míru účinnosti oddělování ve chromatografické koloně můžeme vyjádřit pomocí jednotky zvané jako teoretický počet pater (*theoretical plates*). Čím vyšší je počet pater, tím lepší je schopnost kolony oddělovat složky vzorku. Kapilární kolony jsou

charakterizovány velmi vysokou účinností s teoretickým maximem až 500 000 pater, což je výrazné zlepšení ve srovnání s náplňovými kolonami, kde může být maximální účinnost kolem 10 000 pater. (Bruno, 2011)

Využití kapilárních kolon je vhodné pro všechny typy separací kromě analýzy velmi těkavých látek. Zvláště užitečné jsou pro separace komplexních směsí obsahující více než sto jednotlivých složek. Jejich výhodou je proti náplňovým kolonám vyšší citlivost a rychlejší analýza. (Bruno, 2011)

Použití kapilárních kolon má i řadu nevýhod, které je třeba zohlednit. Komerčně dostupné kapilární kolony jsou ve srovnání s náplňovými kolonami velmi drahé. Vzhledem k tomu, že kolony jsou tak malé, i kapacita pro vzorky je poměrně malá. Při použití náplňových kolon mohou být vstřikovací objemy až 5 μl , zatímco nižší kapacita kapilárních kolon umožňuje vstřikovat objemy mezi 0,5 a 2 μl . Aby se zabránilo přetížení kolony, je téměř vždy nutné použít na vstřikovacím portu rozdělovač průtoku. Dalším důsledkem nízké kapacity je požadavek na použití nejvíce citlivých detektorů, zejména plamenově ionizační či detektor elektronového záchytu. (Bruno, 2011)

2.2.5 Detektor

Chromatografický detektor má za úkol generovat snímatelnou a kvantitativní odpověď na přítomnost oddělených složek při jejich výstupu z kolony. Na jejich přítomnost reaguje zvýšením signálu. Signály detektoru jsou úměrné množství každé rozpuštěné látky, což umožňuje kvantitativní měření. Existuje několik různých typů detektorů, při výběru toho nejvhodnějšího zohledňujeme hlavně povahu vzorku a úroveň citlivosti, kterou požadujeme. (McNair et al., 2019)

Detektory spadají do dvou obecných kategorií – univerzální a selektivní. Univerzální detektory dokáží detekovat všechny anebo většinu sloučenin, které se eluují. Selektivní detektory jsou schopné detekovat pouze specifické třídy sloučenin. Další důležitou vlastností je destruktivnost. Nedestruktivní detektory umí detekovat jednotlivé složky, aniž by je chemicky změnily. To je výhodné například v případě spojování detektorů. Nejpoužívanější detektory v souvislosti s plynovou chromatografií jsou zmíněny dále. (Bruno, 2011; McNair et al., 2019)

2.2.5.1 Tepelně vodivostní detektor (TCD)

Téměř všechny první plynové chromatografy byly vybaveny TCD. V současnosti se využívají zejména pro náplňové kolony a při měření anorganických sloučenin. TCD měří tepelnou vodivost nosného plynu s analytem v porovnání s tepelnou vodivostí čistého nosného plynu. Zapotřebí jsou alespoň dvě dutiny, které jsou vyvrtané do kovového bloku. Každá z těchto dutin obsahuje vlákno, které je nejčastěji vyrobeno z wolframu či platiny. První dutinou prochází nosný plyn s analytem, zatímco druhou dutinou prochází pouze čistý nosný plyn. Při průchodu čistého nosného plynu zůstává teplota vlákna konstantní. Rozdílná tepelná vodivost nosného plynu s analytem však vede k mírnému zvýšení teploty vlákna a tím i ke zvýšení jeho elektrického odporu, který je přímo úměrný koncentraci analytu. (McNair et al., 2019)

Zatímco citlivost tohoto detektoru je ve srovnání s jinými detektory poněkud nízká, nabízí i některé výhody. Díky jeho univerzálnosti bude reagovat i na anorganické sloučeniny jako je voda, oxid uhličitý a oxid uhelnatý. Má nízkou cenu, snadno se obsluhuje, nevyžaduje velkou údržbu a vůči vzorkům je nedestruktivní. (Bruno, 2011; Poole, 2012)

2.2.5.2 Plamenově ionizační detektor (FID)

Jedním z nejběžněji používaných je detektor FID, který se řadí k tzv. ionizačním detektorům. Tento typ detektoru využívá principu ionizace pomocí hořícího plamene. Analyt z kolony vstupuje do kyslíko-vodíkového plamene, jež generuje elektrony, které interagují s molekulami vzorku a tvoří ionty. Nárůstem těchto iontů se vytváří elektrický proud, který generuje signál. Malý elektrický proud může vznikat i z nečistot ve vodíku a z vodíkových sloučenin. FID reaguje na všechny organické sloučeniny, které hoří v kyslíko-vodíkovém plamenu, proto je vhodný pro analýzu organických látek. Pro účinný provoz musí být plyny, hlavně vodík, čistý a bez organické příměsi, aby se nezvyšovalo ionizační pozadí. (McNair et al., 2019)

Sloučeniny, které neobsahují organický uhlík, jsou nehořlavé a nejsou tímto detektorem detekovány. Nejvýznamnějším příkladem takové sloučeniny je voda. Další nevýhodou tohoto detektoru je to, že na vzorek působí destruktivně, a tudíž nemůže být následován dalším detektorem. (McNair et al., 2019; Bruno, 2011)

Jeho žádoucí vlastností je vysoká citlivost, konstrukčně je relativně jednoduchý, snadno se obsluhuje a udržuje, je levný a zajišťuje detekci sloučenin s uhlíkovouází.

Vyznačuje se vysokým odporem k znečištění a zajišťuje stabilní, reprodukovatelný a dlouhodobý bezporuchový výkon. Díky vysoké citlivosti je FID vhodný pro použití s kapilárními kolonami, které slouží k analýze velmi malého množství materiálu. (McNair et al., 2019; Bruno, 2011)

2.2.5.3 Dusíkově – fosforový selektivní detektor (NPD)

Konstruktivně je podobný detektoru FID. Bylo zjištěno, že FID ukazuje selektivně vyšší citlivost, když se v blízkosti plamene nachází sůl alkalického kovu. Detektor NPD je vysoce stabilní, vysoce citlivý a vykazuje zvýšenou detekci pro fosfor, dusík a některé látky obsahující halogen. Použití tohoto detektoru je omezeno především na analýzu pesticidů. (McNair et al., 2019; Bruno, 2011)

2.2.5.4 Detektor elektronového záchytu (ECD)

Detektor ECD se skládá z ionizační komůrky, která obsahuje radioaktivní zdroj β záření, a z trysky přivádějící inertní plyn, obvykle dusík. Zdrojem ionizace emitující β částice je ^3H nebo ^{63}Ni . β částice ionizují nosný plyn za vzniku kladných iontů a volných elektronů. Ionizační komůrka je připojena ke zdroji nízkonapětového potenciálu. Vlivem elektrického pole se indukuje pohyb elektronů směrem k anodě, čímž se vytváří určitý tok iontů. Volné elektrony vykazují vyšší pohyblivost než pozitivně nabití ionty. Právě díky této pohyblivosti stihnou volné elektrony dosáhnout anody dříve, než dojde k jejich společné rekombinaci. Když následně elektrofilní sloučeniny prochází detektorem, dochází k reakci mezi touto sloučeninou a volnými elektrony. Důsledkem toho je, že rychle se pohybující elektrony jsou nahrazeny pomalými negativními ionty. Tyto pomalé ionty potřebují více času k tomu, aby se dostaly k anodě. Při vstupu elektrofilní látky do detektoru tedy dojde k poklesu toku, což má za následek vznik detekčního signálu. (Poole, 2012)

ECD je nedestruktivní a velmi citlivý na sloučeniny s vysokou elektronegativitou, zejména halogeny (chlor, brom, fluor). Čím větší je elektronegativita prvku, tím vyšší je citlivost detektoru. Lze ho vyhrát až na 400 °C, což je výhodné pro detekci materiálů o vyšší molekulové hmotnosti. Často je využíván pro detekci halogenových uhlovodíků a pesticidů. (McNair et al., 2019)

2.2.5.5 Plamenově fotometrický detektor (FPD)

Detektor FPD pracuje na principu plamenové fotometrie a je vybaven dvěma zaměřitelnými filtry. Jeden pro sloučeniny obsahující síru (filtr 394 nm) a druhý pro sloučeniny obsahující fosfor (filtr 526 nm). Jedná se o jeden z nejselektivnějších detektorů. Jeho vysoká citlivost zajišťuje spolehlivé stanovení stopových množství síry a fosforu ve sloučeninách s jejich obsahem. Je vhodný například k analýze pesticidů, kontrole znečištění ovzduší a analýze ropy. (McNair et al., 2019)

2.2.5.6 Hmotnostní spektrometr (MS)

V oblasti chromatografie bývá často využito spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, známo též jako GC-MS. GC-MS je oblíbená zejména pro poskytování velmi bohatých informací ohledně vyšetřovaných vzorků. I přesto, že k měření touto metodou postačuje pouze malé množství vzorku, je schopná poskytovat údaje jak o kvalitativní identifikaci neznámých látek (struktura, elementární složení, molekulová hmotnost), tak o jejich kvantifikaci. (de Coning a Swinley, 2019)

Mezi nejjednodušší a nejčastěji používané hmotnostní analyzátoři jsou kvadrupólový, analyzátoři iontové pasti a „*Time of Flight*“ (TOF) hmotnostní analyzátoři. K dispozici jsou i složitější systémy, ale ty jsou dražší a na provoz složitější. (McNair et al., 2019)

Systémy GC a MS jsou navzájem velmi kompatibilní. Oba jsou vyhřívané, pracují s látkami plynného skupenství a u obou systémů jsou zapotřebí malá množství vzorků. Jediným zásadním rozdílem je, že chromatografy pracují při atmosférickém tlaku, zatímco hmotnostní spektrometry vyžadují vysoké vakuum. Dnes většina systémů GC-MS používá kapilární kolony, přičemž kapiláry z taveného oxidu umožňují inertní a vysoce účinný přenos mezi oběma systémy. Vzorek je vstřikován do plynového chromatografu a separované analyty jsou dále kontinuálně přiváděny do hmotnostního spektrometru. (McNair et al., 2019)

Ionizační zdroj

Molekuly analytu musí být nejprve ionizovány, aby je bylo možné podle poměru hmotnosti k náboji separovat a poté detekovat. Existuje mnoho ionizačních technik, ale za tu nejběžnější a nejjednodušší je považována elektronová ionizace. Elektronová ionizace je jedním z mechanismů, který je používán k přeměně molekul plynu na ionty

s kladným nábojem. Je tomu tak kvůli nárazu elektronů na molekuly, které tím ztrácí svůj vnější elektronový obal. Elektrony jsou emitovány wolframovým nebo rhodiovým vláknem umístěným vně iontového zdroje. Tento elektronový paprsek je poté směřován ke zdroji iontů a má energii mezi 20 až 70 eV. Některé z elektronů se uvnitř iontového zdroje srazí s molekulami, což způsobuje jejich ionizaci. V závislosti na struktuře molekuly, teplotě a množství dostupné energie se vytvoří různé fragmenty, například fragmentové ionty, neutrální ionty nebo volné radikály. Všechny tyto druhy iontů jsou dále elektrostaticky fokusovány do iontového paprsku. Celý tento proces se děje v systému s vysokým vakuem. Tato ionizační technika produkuje téměř výhradně kladné ionty. (McNair et al., 2019; de Coning a Swinley, 2019)

Mezi alternativní způsoby ionizace patří chemická ionizace. Při chemické ionizaci se reakční plyn zavádí do iontového zdroje, kde se ionizuje elektronovým paprskem. Tím vzniká kationt podléhající dalším reakcím za vzniku sekundárních iontů. Sekundární iont poté slouží jako činidlo, které jemně ionizuje vzorek. Tento proces obecně vede k menší fragmentaci. Nejběžnějšími reakčními plyny jsou methan, isobutan a amoniak. Pouze asi 5 až 10 % všech systémů GC-MS má schopnost chemické ionizace. (McNair et al., 2019; de Coning, Swinley, 2019)

Analyzátory

Po ionizaci jsou nabitě částice (ionty) odpuzovány a přitahovány do hmotnostního analyzátoru. Zde jsou ionty odděleny dle jejich poměru hmotnosti k náboji (m/z) magnetickým či elektrickým polem. Typické hmotnostní analyzátory pro GC-MS jsou kvadrupólové analyzátory, detektory iontové pasti nebo TOF analyzátory. (McNair et al., 2019)

Kvadrupólový hmotnostní analyzátor se skládá ze čtyř rovnoběžných válcových tyčí neboli elektrod. Ty jsou vyrobené z kovu nebo pokoveného křemene a jsou paralelně elektricky spojené, dvě jsou nabitě kladně a další dvě záporně. Tento kvadrupól funguje jako hmotnostní filtr. Hmotnostní separace je založena na pohybu iontů v elektrickém poli, které je vytvořeno změnou napětí mezi soustavou tyčí. Při určitém napětí mohou procházet a vstupovat do detektoru pouze ionty se specifickým poměrem hmotnosti k náboji (m/z). Všechny ostatní ionty, respektive ionty vykazující jiný poměr m/z , se srazí s tyčemi, ztratí svůj náboj a budou odčerpány pryč pomocí vakuového systému. Během krátké chvíle může

být plně naskenován celý dostupný hmotnostní rozsah (obvykle 50 až 850 m/z). Výhodou kvadrupólového analyzátoru je jednoduchost, rychlost a jeho malé rozměry, což jej činí ideálním pro systémy GC-MS. (McNair et al., 2019; de Coning a Swinley, 2019; Wittmann, 2007)

Analyzátor TOF je hmotnostní spektrometr, který měří dobu, kterou ionty se stejnou kinetickou energií potřebují k překonání známé vzdálenosti. Skládá se z dlouhé letové trubice se zdrojem iontů na jednom konci a detektorem na konci druhém. Po ionizaci jsou ionty urychlovány pomocí elektrického pole. Ionty s nižší hmotností získají větší rychlost než ionty s vyšší hmotností, z čehož plyne, že k detektoru dorazí dříve. Rozdíly v době letu se poté používají k určení hmotností molekul. Tyto systémy jsou sice rychlejší a citlivější než kvadrupólové konstrukce, ale tyto výhody nekompenzují relativně vysokou cenu těchto přístrojů. (McNair et al., 2019; de Coning a Swinley, 2019)

Alternativně lze pro hmotnostní separaci použít analyzátor iontových pastí. Jedná se o jednodušší verzi kvadrupólového analyzátoru, kde je prstencová elektroda, na kterou je aplikováno pouze vysokofrekvenční napětí. Prstencová elektroda slouží v podstatě jako monopol, který vymezuje stabilní oblast pro nabitě druhy uvnitř kruhového prostoru elektrody. Separované látky z GC vstupují do horní koncové elektrody, přičemž některé analyty jsou ionizovány a pak zachyceny ve stabilních trajektoriích uvnitř prstencové elektrody. Napětí lze měnit tak, aby se postupně uvolňovaly ionty s vybranými poměry m/z do detektoru. Iontové pastí jsou konstrukčně jednoduché, cenově nenáročné a schopné rychlého skenování pro aplikace GC-MS. Nevýhodou je však poměrně nízká přesnost měření, což má za následek vyšší nejistotu stanovených toků. (McNair et al., 2019; Wittmann, 2007)

Detektor

Po separaci vzniklých iontů se použije detektor, který slouží k registrování jejich přítomnosti a ke generování hmotnostního spektra. Hmotnostní spektrum je znázorněno grafem a vykresluje intenzitu detekovaných iontů v závislosti proti jejich příslušným poměrům hmotnosti k náboji. Tato data jsou charakteristická pro každou sloučeninu a díky nim je možné určit molekulové hmotnosti látek a chemické struktury každé sloučeniny. (McNair et al., 2019)

2.2.6 Chromatografický software

V současné době se jako vyhodnocovací zařízení téměř vždy používá počítač. Počítače vykazují větší flexibilitu při získávání a redukci dat, ovládání přístroje, zobrazování a přenosu do jiných zařízení. Výsledkem je záznam obsahující příslušný chromatogram a také doplňující informace o oddělených složkách. Výška a plocha píku v chromatogramu umožňuje stanovit množství analytů ve vzorku. (Poole, 2012)

3 VALIDACE METODY

3.1 Význam validace

Účelem každé analytické metody je poskytovat konzistentní, spolehlivá a přesná data. Aby bylo možno dosáhnout tohoto cíle, je nezbytné před použitím metody určit její vlastnosti, a i její případné nedostatky. Je důležité zohlednit i vnější faktory, které mohou mít na vlastnosti metody negativní vliv. Slovo „validace“ pochází z latinského termínu *validus*, což lze přeložit jako hodnotný, pevný, silný. Tento význam slov má přeneseně naznačovat, že něco je pravdivé a spolehlivé. Přesně tyto vlastnosti jsou pro validaci stěžejní. (Peris-Vicente et al., 2015)

Díky validaci metody se kontroluje, zda každé budoucí měření v rutinní analýze poskytne koncentraci analytu dostatečně blízkou skutečné hodnotě. Validace představuje zásadní krok při vývoji metody. Tento krok je v laboratoři nutno provést, aby se prokázalo, že laboratoř je schopna produkovat analytické údaje s vysokou spolehlivostí. (Peris-Vicente et al., 2015)

Validace metody slouží k potvrzení, že daná metoda splňuje požadavky pro zamýšlené analytické použití. Validace je vyžadována pro každou novou nebo upravenou metodu, jejímž cílem je poskytovat reprodukovatelné a spolehlivé výsledky. Tím by se mělo docílit toho, že výsledky budou srovnatelné i v případě, že měření bude prováděno různými pracovníky laboratoře. Totéž by mělo platit i napříč různými laboratořemi, pokud budou splněny stejné podmínky a bude využíváno totožné zařízení. (Bhardwaj et al., 2016)

Analytické metody je zapotřebí validovat či revalidovat:

- před jejich zavedením do rutinního používání;
- při převzetí metody z jiné laboratoře;
- kdykoliv se změní podmínky, pro které byla metoda validována;
- při rozšíření použití metody o další účel;
- při významné změně instrumentace.

Revalidace je nutná, pokud se změní nebo rozšíří rozsah metody, pokud je změněno přístrojové vybavení, nebo pokud je chromatograf přemístěn na místo vykazující jiné podmínky prostředí, přičemž tyto změny nebyly zohledněny při první validaci. Revalidace se rovněž doporučuje v případě, jestliže se metoda po delší dobu nepoužívá, nebo pokud se během běžného používání objevují ve výsledcích nesrovnalosti. (Peris-Vicente et al., 2015)

Ve vztahu k analytické metodě se posuzují validační parametry, které musí být před zahájením vývoje metody zcela specifikovány. Mezi typické validační parametry řadíme selektivitu, linearitu, přesnost (opakovatelnost, mezilehlá preciznost, reprodukovatelnost), mez detekce, mez stanovitelnosti, robustnost. Výsledky těchto parametrů mají odhalit, zda analytické výsledky získané při budoucích stanoveních vzorků budou konzistentní a bude-li na ně spolehnouti. (Bhardwaj et al., 2016)

Od úspěšně validované metody se očekává, že bude dlouhodobě poskytovat hodnoty s dostatečnou kvalitou. Pokud vlastnosti metody neodpovídají minimálním analytickým požadavkům, je třeba metodu odpovídajícím způsobem upravit a proces validace opakovat. Tento proces vývoje by měl správně trvat tak dlouho, dokud validační parametry nebudou splňovat stanovené požadavky. (Peris-Vicente et al., 2015)

I přes to, že provádění validace je časově náročné a v určité míře často narušuje běžný chod laboratoře, tento proces v sobě skrývá pozitiva. Používání validované metody eliminuje opakování analýz, což z dlouhodobého hlediska vede k časové úspoře. (Peris-Vicente et al., 2015)

3.2 Jednotlivé analytické parametry

3.2.1 Selektivita

Selektivita vyjadřuje schopnost metody vyhodnotit analyt v přítomnosti dalších látek. Vysoká selektivita zajišťuje, že výsledky měření jsou skutečně spojeny pouze s analytem, který je předmětem analýzy. Selektivita, definována jako schopnost rozlišit a identifikovat cílový analyt v přítomnosti jiných složek nebo interferencí, je klíčová pro získání spolehlivých výsledků. V praxi to znamená minimalizaci vlivu ostatních látek na měření. Jedním z přístupů k posouzení selektivity je zjistit, jak se měření mění v přítomnosti látek, které by se ve vzorcích mohly potenciálně vyskytovat. Výsledná hodnota analytu v těchto testovacích směsích, tedy ve směsích obsahujících analyt, a i ostatní složky,

se porovnává s hodnotou získanou z roztoku, který obsahuje pouze analyt. (Bhardwaj et al., 2016)

3.2.2 Linearita a kalibrační křivka

Kalibrační křivka představuje grafické znázornění vztahu mezi měřenými hodnotami (signálem) a skutečnými hodnotami (koncentrací) analytu v analytické metodě. Kalibrační křivce předchází série měření, při kterých jsou měřeny kalibrační standardy o známých koncentracích analytu. (Peris-Vicente et al., 2015)

Obvykle bývá kalibrační křivka lineární. Body na kalibrační křivce jsou získány pomocí odpovídajících signálů a pomocí kalibračních standardů, jejichž koncentrace je známá. Její rozsah by měl být zvolený na základě očekávané koncentrace vyšetřované látky během analýzy vzorku. Poté, co je kalibrační křivka vytvořena, může být použita k určení koncentrace neznámých vzorků na základě jejich naměřených signálů. (Peris-Vicente et al., 2015)

Linearita analytické metody se týká schopnosti poskytovat signál přímo úměrný koncentraci sledované látky ve vzorku. Měla by být hodnocena v celém pracovním rozsahu analytické metody. Linearita se nejprve hodnotí grafickým vynesemím závislosti mezi koncentrací látky a signálu. Dále jsou tato data zpracována lineární regresní analýzou, která slouží pro výpočet konstant kalibrační křivky a vyhodnocení korelačního koeficientu. Je doporučeno minimálně šest kalibračních standardů o zvyšujících se koncentracích a každá kalibrační úroveň by měla být vypočtena pomocí tří nezávislých opakování. Korelační koeficient charakterizuje těsnost vzájemné závislosti. Čím blíže se nachází hodnotě 1, tím těsnější je vzájemná závislost. Kalibrační křivka je akceptována při hodnotě korelačního koeficientu větším než 0,990. (Chandran a Singh, 2007; Peris-Vicente et al., 2015)

Rozsah analytické metody je interval mezi minimálním a maximálním množstvím analytu ve vzorcích, ve kterém metoda poskytuje kvantitativní výsledky s přijatelnou úrovní přesnosti a linearity. Výsledkem by měla být lineární křivka v celém rozsahu. (Chandran a Singh, 2007)

3.2.3 Preciznost

Preciznost vyjadřuje míru shody mezi výsledky, které jsou naměřeny při několika měřeních homogenního vzorku za specifikovaných podmínek. Míra preciznosti bývá vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka výsledků. Podle předem specifikovaných

podmínek lze rozlišit další validační parametry, které zahrnují reprodukovatelnost, opakovatelnost a mezilehlou preciznost. (Bhardwaj et al., 2016)

3.2.3.1 Opakovatelnost

Opakovatelnost se získává provedením několika analýz homogenních roztoků. Je důležité, aby byly splněny následující podmínky. Všechny homogenní roztoky musí být připraveny pouze jedním člověkem v prostorech jedné laboratoře. Dále je důležité dodržet, aby se analýzy prováděly za použití jednoho přístroje a aby všechna měření byla provedena během jednoho stejného dne. (Chandran a Singh, 2007)

U opakovatelnosti mají význam tři druhy připravených roztoků, z nichž každý má jinou koncentraci vyšetřovaného analytu. Zapotřebí je roztok o nízké, střední a vysoké koncentraci. Pro správné provedení opakovatelnosti je potřeba zajistit alespoň pět stanovení od každého z těchto tří roztoků, z čehož se následně počítá relativní směrodatná odchylka. (Chandran a Singh, 2007)

3.2.3.2 Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost je důležitá, pokud se metoda používá v různých laboratořích. Jestliže se metoda přenáší z jedné laboratoře do druhé, je samozřejmé, že podmínky těchto míst nebudou totožné. Jedná se například o rozdílné zkušenosti pracovníků, taktéž jejich odlišnou důslednost při práci, dále rozdíly v teplotě a vlhkosti vzduchu a také nestejné podmínky v přístrojích, zejména složení mobilní fáze, stacionární fáze a pH. Reprodukovatelnost tedy není závislá na tom, aby byla stanovena během jednoho dne. Primárně slouží k ověření, zda při měření získají různé laboratoře stejné výsledky. (Chandran a Singh, 2007)

3.2.3.3 Mezilehlá preciznost

O mezilehlou preciznost se jedná ve chvíli, kdy se na analýze podílí více lidí, je použito více přístrojů a měření probíhá v rámci několika různých dní. Cílem tohoto stanovení je identifikace faktorů, které přispívají k variabilitě výsledků, a také snaha o to najít mechanismus, jak je kontrolovat. (Chandran a Singh, 2007)

3.2.4 Mez detekce (LoD)

Mez detekce vyjadřuje nejnižší koncentraci analytu ve vzorku, kterou lze detekovat. Nemusí však být nutně kvantifikována přesná hodnota. Pro neinstrumentální metodu může

stačit pouze jednoduché vizuální vyšetření. V případě chromatografických metod, které vykazují šum pozadí, lze mez detekce odhadnout na základě poměru signálu k šumu. Při nejnižší koncentraci analytu ve vzorku je generován signál, který se liší od signálu slepého vzorku. Tento signál musí být alespoň třikrát větší než šum pozadí. Mez detekce je tedy založená na poměru signálu k šumu (3:1). Poměr signálu k šumu je určen vztahem $s = H/h$, kde H je výška vrcholu odpovídající složky a h je absolutní hodnota největšího kolísání šumu od základní linie chromatogramu slepého vzorku. (Bhardwaj et al., 2016; Chandran a Singh, 2007)

3.2.5 Mez stanovitelnosti (LoQ)

Mez stanovitelnosti je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být s určitou jistotou kvantitativně stanoveno. U analytických metod, které vykazují šum pozadí, se mez stanovitelnosti stanovuje na základě poměru signálu k šumu (10:1). (Bhardwaj et al., 2016)

3.2.6 Přenos

Přenos neboli *carryover* může z velké míry ovlivňovat přesnost analytické metody. Přenos je způsoben zbytkovým analytem z vysoce koncentrovaného vzorku, který byl analyzován předtím. Tento zbytkový analyt nemusí ovlivnit jen další vzorek v sekvenci, ale může také znehodnotit několik následných vzorků. (Kollipara et al., 2011)

K přenosu může docházet i ve chvíli, kdy pozdě eluující zbytky z chromatografické kolony mohou ovlivňovat vzorky během dalších analýz. Vyhodnocení přenosu probíhá na základě analýzy série slepých vzorků a vzorků obsahujících vyšetřovanou látku. (Kollipara et al., 2011)

3.2.7 Robustnost

Robustnost je definována jako schopnost analytické metody zůstat neovlivněna malými změnami parametrů metody, které jsou v průběhu metody provedené záměrně. Obvykle se zkoumají faktory jako pH, teplota, výběr kolony, složení mobilní fáze a objem nástříku. (Chandran a Singh, 2007)

3.3 Porovnání validace a verifikace

Validace je definována jako ověření, zda specifikované požadavky jsou přiměřené pro zamýšlené použití. K validaci je nutné poskytnutí objektivních důkazů, že požadavky pro zamýšlený účel byly splněny. V klinických laboratořích se obvykle používají

již validované metody. Proces validace se uplatňuje v případech, kdy jsou v laboratoři používány jiné typy metod, které byly vyvinuty pracovníky laboratoře, nebo pokud dojde ke změně metod validovaných výrobcem. (Friedecký, Šprongl, Kratochvíla, Plzák, 2011)

Verifikace představuje poskytnutí objektivního důkazu, že daná metoda splňuje stanovené požadavky. Laboratoře pomocí verifikace potvrzují, že jsou schopny dosáhnout analytických dat, jež jsou deklarována výrobcem či jinou laboratoří. Verifikací se tedy rozumí, že měřicí postup a systém jsou plně funkční v konkrétní laboratoři. Jedná se o proces ověřování výkonnostních parametrů metod, které již byly validovány. (Friedecký, Šprongl, Kratochvíla, Plzák, 2011)

Tabulka 2 - Výkonnostní parametry validace a verifikace analytického postupu

Validace	Verifikace
<ul style="list-style-type: none"> • Opakovatelnost • Mezilehlá preciznost • Vychýlení (bias) • Pracovní rozsah • Mez detekce a mez stanovitelnosti • Robustnost 	<ul style="list-style-type: none"> • Opakovatelnost • Mezilehlá preciznost • Vychýlení (bias) • Pracovní rozsah

Zdroj: Friedecký, Šprongl, Kratochvíla, Plzák, 2011

PRAKTICKÁ ČÁST

Všechna měření pro získání výsledků k praktické části byla prováděna v toxikologické laboratoři na Ústavu soudního lékařství ve Fakultní nemocnici Plzeň.

4 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

4.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem této práce je validace metody stanovení acetonu v séru/krvi pomocí plynové chromatografie.

4.2 Dílčí cíle

1. Stanovit jednotlivé analytické parametry, které jsou pro validaci stěžejní.
2. Stanovit koncentraci acetonu v daných biologických vzorcích a popsat kazuistiku.

5 VÝZKUMNÉ OTÁZKY

Aceton se řadí do skupiny ketolátek, jejichž koncentrace v těle se za různých fyziologických a patologických stavů zvyšuje. Stanovení hladiny acetonu v biologickém materiálu má z pohledu soudního lékařství veliký význam. Zejména u vzorků vyšetřovaných *post mortem* mohou být zjištěné koncentrace ketolátek nápomocné při určování příčin smrti. Cílem této práce je ověřit, zda použitá metoda stanovení koncentrace acetonu v biologickém materiálu zemřelých může být použita jako jeden z diagnostických nástrojů k průkazu hyperglykemického kómatu. K zodpovězení této otázky nám pomůže právě validace metody, při které budou vyhodnoceny jednotlivé analytické parametry.

6 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

6.1 Analytické parametry metody

V praktické části byla potřeba vyhodnotit jednotlivé analytické parametry, jejichž výsledky jsou důležité pro určení, zda je metoda úspěšně validována a zda ji lze používat pro konkrétní účel. V mém případě se jednalo o následující analytické parametry – opakovatelnost, reprodukovatelnost, linearitu, mez detekce, mez stanovitelnosti, carryover a selektivitu. Při měřeních jednotlivých parametrů byly využity zejména připravené roztoky o příslušných koncentracích acetonu v rozmezí 0,020 až 0,791 mg/l.

6.2 Kazuistiky

V bakalářské práci budou popsány dvě kazuistiky, v kterých ve značné míře figuruje aceton. Jedná se o pacientku a pacienta, jejichž vzorky byly vyšetřovány na Ústavu soudního lékařství. Pro zjištění hladiny acetonu u ženy bylo využito sérum. V případě muže se jednalo o dva druhy biologického materiálu, a to plnou krev a mozkomíšní mok.

7 METODIKA PRÁCE

7.1 Použité chemikálie

- Toluén
- Vnitřní standard – terciární butanol (2-methylpropan-2-ol)
- Směsný vzorek těkavých látek
- Destilovaná voda
- Aceton
- Methanol
- Ethanol
- Isopropanol (propan-2-ol)
- n-propanol (propan-1-ol)

7.2 Laboratorní pomůcky a spotřební materiál

- Odměrné baňky se zátkou, kádinky a jiné laboratorní sklo
- Plynotěsná stříkačka Hamilton
- Automatické pipety a plastové špičky
- Šroubovací headspace vialky a víčka se septy
- Vortex

7.3 Přístrojové vybavení

Pro validaci metody stanovení acetonu byl použit plynový chromatograf Thermo Trace 1310 Series s headspace autosamplerem Thermo Tri Plus 300.

Pracovní podmínky:

- Termostat s kapilární kolonou wide bore Thermo TG-ALC PLUS II (30 m x 0,53 mm x 1 μ m)
- Plamenově ionizační detektor (FID)
- Zdroje plynů (dusíku, vodíku) dodávány rozvodem z tlakových nádob plynů, nosný plyn dusík čistoty 4,0 a vodík čistoty nejméně 4,0
- Teplota nástřiku 150 °C, teplota detektoru 180 °C
- Autosampler Thermo Tri Plus 300 se vzorkovým karuselem se 120 pozicemi

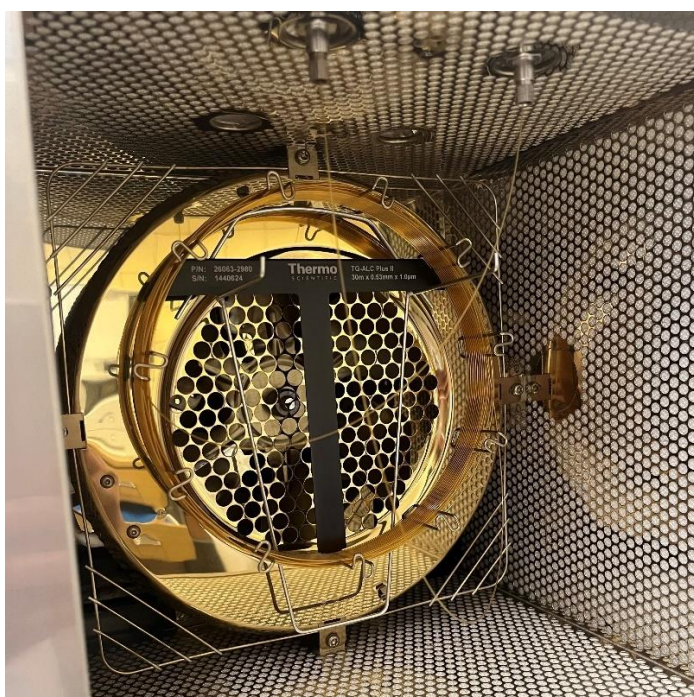
- Ovládací a vyhodnocovací hardware a software Chrom-Card

Obrázek 4 - Headspace autosampler Thermo Tri Plus 300 a plynový chromatograf Thermo Trace 1310 Series



Zdroj: vlastní

Obrázek 5 - Kapilární kolona wide bore Thermo TG-ALC PLUS II (30 m x 0,53 mm x 1 µm)



Zdroj: vlastní

7.4 Laboratorní postupy

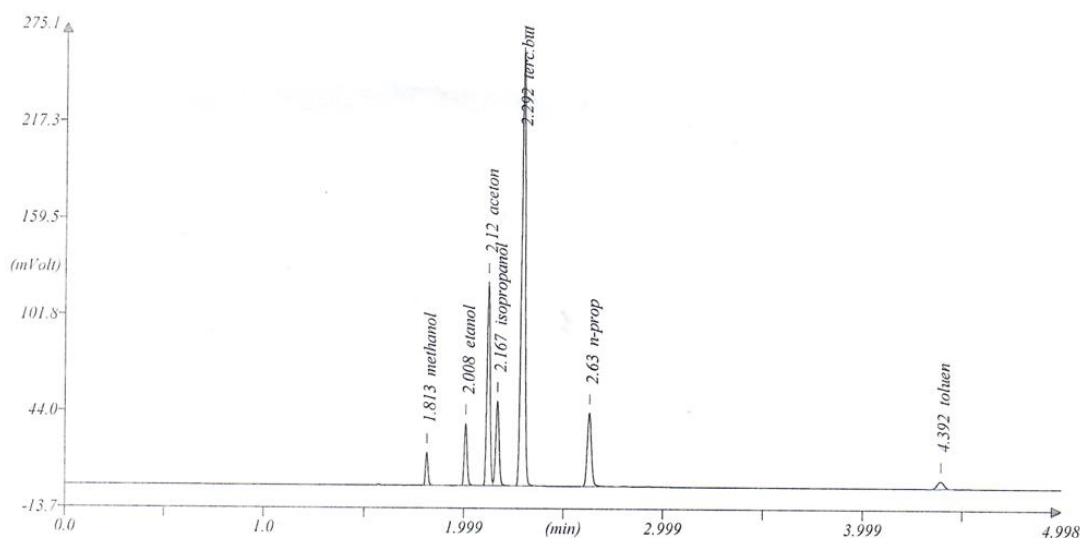
7.4.1 Kontrolní měření

Před provedením série analýz měřených pro předloženou bakalářskou práci byla vždy ověřena funkčnost přístroje - 1. analýza libovolného vzorku se sledovanými analyty (ověření základní funkčnosti zařízení), 2. analýza testovací směsi těkavých látek (kontrola retenčních časů analytů, hrubá kontrola stanovení koncentrací jednotlivých analytů), 3. analýza negativního vzorku (k vyloučení kontaminace přístroje, použitých pomůcek a chemikálií). Tyto výsledky sloužily pro celkovou kontrolu, že plynový chromatograf správně zachycuje látky, které byly do daných vzorků opravdu napipetovány. V každý den měření byly tyto typy vzorků připraveny stejným způsobem, takže výsledné chromatogramy z jednotlivých dní by měly vykazovat bez malých rozdílů srovnatelné výsledky. Tyto chromatogramy z různých dní jsem porovnála a zjistila jsem, že předchozí podmínky byly splněny. Toto zjištění sloužilo jako potvrzení toho, že plynový chromatograf pracuje za neměnných podmínek a podává reprodukovatelné a spolehlivé výsledky.

Vzorek testu zachycoval jednotlivé analyty rozdělené ze směsi těkavých látek. Testovací vzorek se skládal ze 100 μl toluenu, 200 μl vnitřního standardu neboli terciárního butanolu a 100 μl směsného vzorku těkavých látek. Směsný vzorek těkavých látek obsahuje methanol, ethanol, aceton, isopropanol a n-propanol. Z chromatogramů, které znázorňují směs těkavých látek, jsem jeden vybrala a tento příklad vložila níže.

Obrázek 6 - Chromatogram testovaného vzorku

Retention Time (min)	Component Name	Original Conc g/kg	Area (.1*uV*sec)
1.81	methanol	0.206	170878
2.01	etanol	0.188	377344
2.12	acetone	0.508	1317696
2.17	isopropanol	0.189	595104
2.29	terc. but	Int. STD #	3479538#
2.63	n-prop	0.216	662815
4.39	toluen	3.236	111030



Zdroj: vlastní

7.4.2 Příprava kalibrátorů

Rozpuštěním acetonu v destilované vodě byly připraveny pracovní roztoky o různých koncentracích acetonu, jejichž hodnoty byly vybrány podle předem zvoleného pracovního rozsahu. Konkrétně se jednalo o teoretické koncentrace 20, 100, 400, 600, 800, 1000 a 2000, přičemž všechny v jednotkách mg/l. Výsledkem tedy bylo sedm pracovních roztoků acetonu, které byly využívány pro následující měření analytických parametrů.

Na příkladu nejnižší koncentrace ukážu výpočet, kterým bylo zjištěno správné ředění, díky kterému vznikne roztok o zamýšlené koncentraci 20 mg/l. Vycházela jsem ze základního vzorce hustoty, který je definován vztahem hmotnosti m a objemu látky V a vypadá následovně: $\rho = \frac{m}{V}$. Hustota acetonu je za standardních podmínek 0,791 kg/m³.

Příklad: chceme získat koncentraci 20 mg/l o objemu 250 ml.

$$\rho = \frac{m}{V}$$

Pro 1 l roztoku platí: $0,791 = \frac{20}{V}$

$V=25,28 \mu\text{l/l}$ acetonu v 1 l roztoku

Při použití 250ml odměrné baňky je nutné výsledek vydělit 4.

$\frac{25,28}{4} = 6,32 \mu\text{l}/250 \text{ ml} \rightarrow$ Takto malé množství není prakticky možné přesně napipetovat, proto jsem brala v potaz pouze celé číslo, tudíž 6. Pak je ale nutné vypočítat si přesnou koncentraci, kterou roztok bude mít při přidání 6 μl do odměrné baňky o 250 ml, jejíž objem bude doplněn destilovanou vodou.

$0,791 \times 24 = m \rightarrow$ Počítám s číslem 24 (6×4), protože výsledek vyjde opět v mg/l.

$m=18,984 \text{ mg/l} \rightarrow$ Takto koncentrovaný bude roztok o zamýšlené koncentraci 20 mg/l.

Stejným způsobem byly vypočteny i informace důležité pro tvorbu ostatních pracovních roztoků. Všechny výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka 3 - Příprava kalibrátorů

Zamýšlená koncentrace [mg/l]	Skutečná koncentrace [mg/l]	Množství acetonu [μl] do objemu [ml]
20	18,984	6 $\mu\text{l}/250 \text{ ml}$
100	94,92	30 $\mu\text{l}/250 \text{ ml}$
400	395,5	50 $\mu\text{l}/100 \text{ ml}$
600	632,8	20 $\mu\text{l}/25 \text{ ml}$
800	791,0	50 $\mu\text{l}/50 \text{ ml}$
1000	1107,4	70 $\mu\text{l}/50 \text{ ml}$
2000	1977,5	125 $\mu\text{l}/50 \text{ ml}$

Zdroj: vlastní

7.4.3 Opakovatelnost

K měření opakovatelnosti byly využity tři pracovní roztoky acetonu, konkrétně se jednalo o roztoky vykazující známou koncentraci 0,019; 0,396 a 0,791 g/l. Tyto koncentrace byly zvoleny podle toho, aby pokryly kalibraci. Účelem bylo zajistit splnění fyziologické dávky (do 20 mg/l), toxické dávky (400 mg/l) a letální dávky (800 mg/l). V doporučeném postupu v rámci validace stojí, že každý vzorek se testuje minimálně v šesti replikacích během jedné série měření. V mém případě bylo od každého roztoku připraveno a změřeno 10 vzorků, v celkovém počtu jich tedy bylo 30. Do jednotlivých vialek jsem napipetovala 200 μ l vnitřního standardu, v mém případě terciárního butanolu, a 100 μ l roztoku o příslušné koncentraci. Vzorky byly analyzovány výše uvedeným plynovým chromatografem s výše uvedenými parametry metody. Pro každou sérii měření byly vypočítány základní statistické parametry – aritmetický průměr (AM), směrodatná odchylka (SD) a variační koeficient (CV) při vyloučení odlehlých hodnot.

Všechny analýzy byly provedeny za použití jednoho přístroje a všechny připravené vzorky byly naměřeny v jednom stejném dni, podmínky potřebné ke splnění opakovatelnosti byly tedy splněné.

7.4.4 Reprodukovatelnost

Stejně tak jako u opakovatelnosti, pro reprodukovatelnost byly stěžejní tři připravené pracovní roztoky o známé koncentraci. Taktéž se jednalo o roztoky o koncentraci 0,019; 0,396 a 0,791 g/l. Do vialek jsem pipetovala 200 μ l vnitřního standardu a 100 μ l příslušného roztoku. Rozdílné od předchozího parametru bylo to, že k měření postačily pouze 2 vialky pro každý roztok, byly tedy měřeny v dubletu. Koncentrace pro daný roztok byly zprůměrovány a výsledná hodnota byla poté použita pro stanovení reprodukovatelnosti. Doporučeno je každý vzorek analyzovat v šesti až deseti různých analýzách realizovaných v různých dnech.

Já jsem takto postupovala v několika různých dnech, abych postupně získala 6 výsledků pro jeden ze tří roztoků. Tyto výsledky se dále porovnávají a pro každý vzorek se vypočítávají základní statistické parametry – AM, SD a CV při vyloučení odlehlých hodnot.

7.4.5 Linearita, kalibrační křivka

Pro znázornění kalibrační křivky bylo využito všech sedm připravených roztoků. Použití této široké škály je pro linearitu metody důležité, aby došlo k pokrytí celého pracovního rozsahu měření a bylo možné určit rozsah koncentrací analytu, ve kterém lze metodu použít s důvěrou. Všechny vzorky jsem připravila pomocí 100 μl vnitřního standardu a 200 μl roztoku o dané koncentraci. Každý vzorek byl změřen v tripletu, pouze kromě nejvyšší koncentrace, u které byly změřeny vzorky dva. Výsledkem je stanovení směrnice kalibrační křivky a hodnota spolehlivosti R^2 .

7.4.6 Carryover

U chromatografických analýz je do měření potřeba začlenit i kontroly k vyloučení carryover efektů. V mém případě byl carryover proveden pomocí destilované vody, vnitřního standardu a připraveného standardu o koncentraci 0,791 g/l. K analýze byly zapotřebí tři druhy vzorků: 1 slepý vzorek, 5 negativních vzorků a 5 vzorků o teoretické koncentraci 0,800 g/l. Slepý vzorek byl tvořen pouze 100 μl destilované vody, negativní vzorky se skládaly ze 100 μl destilované vody a 200 μl vnitřního standardu a vzorky s analytem se skládaly ze 100 μl roztoku o koncentraci 0,791 g/l a 200 μl vnitřního standardu. Celkem jsem tedy měřila 11 vzorků, přičemž analýza začala slepým vzorkem, následoval negativní a pak vzorek s analytem. Negativní vzorek a vzorek s analytem byly měřeny střídavě.

7.4.7 Selektivita a interference

Pro změření selektivity bylo potřeba připravit směsný roztok pro identifikaci těkavých látek. Odměrnou baňku o 100 ml jsem naplnila do poloviny vodou a mikrostříkačkou Hamilton jsem napipetovala 100 μl methanolu, 100 μl ethanolu, 100 μl isopropanolu a 100 μl n-propanolu. Zbytek baňky jsem doplnila po rysku.

Po vytvoření směsného roztoku bylo možné napipetovat jednotlivé vzorky do vialek. Celkem se jednalo o 5 stejných vzorků, přičemž každý se skládal z 50 μl připraveného standardu o koncentraci 0,791 g/l, 50 μl směsného roztoku a 200 μl vnitřního standardu.

7.4.8 Mez detekce (LoD)

Nejprve bylo zapotřebí naředit připravený roztok o nejnižší koncentraci 20 mg/l. 1 ml tohoto standardu jsem přidala k 10 ml destilované vody a pak tento obsah promíchala,

tím vznikl roztok o koncentraci 2 mg/l (Ac 2). Dále jsem 1 ml Ac 2 smíchala s 1 ml destilované vody se vznikem roztoku o výsledné koncentrací 1 mg/l (Ac 1).

Měřilo se následovně:

1. 3x prázdná vialka („vzduch“) → což splňuje úlohu slepých vzorků a slouží k vyčištění stroje
2. 2x 200 μ l vnitřního standardu → zkontrolovat, zda není kontaminovaný
3. 2x 200 μ l vnitřního standardu + 100 μ l destilované vody → úloha negativních vzorků, po stanovení bylo nutno vždy zkontrolovat
4. 3x 200 μ l vnitřního standardu + 100 μ l Ac 1 → z vyšlého chromatogramu byl zkoumán signál/šum.

Mez detekce je definována jako koncentrace analytu, jehož výška píku odpovídá třinásobku výšky šumu základní linie.

7.4.9 Mez stanovitelnosti (LoQ)

Mez stanovitelnosti je definována jako koncentrace analytu, jehož výška píku odpovídá desetinásobku výšky šumu základní linie.

7.4.10 Vzorky ke kazuistikám

Součástí bakalářské práce budou i dvě kazuistiky. Jedná se o přeživší pacientku, u které bylo zkoumaným biologickým materiálem sérum, a o zemřelého pacienta, v jehož případě se *post mortem* vyšetřovala plná krev a mozkomíšní mok. Vzorek každého biologického materiálu se měřil v dubletu a jejich příprava probíhala následovně: na první vzorek bylo využito 200 μ l vnitřního standardu a 100 μ l séra, na druhý vzorek 200 μ l vnitřního standardu a 100 μ l plné krve a na třetí vzorek 200 μ l vnitřního standardu a 100 μ l mozkomíšního moku. Vzorky přeživší pacientky nebyly měřeny mnou, ale byly naměřeny na mou kalibrační křivku a výsledky mi poté byly zprostředkovány. Vzorek pacienta už jsem měřila já.

8 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

8.1 Analytické parametry metody

Pro validaci metody byly určeny následující parametry: opakovatelnost, reprodukovatelnost, linearita, carryover, selektivita a mez detekce.

8.1.1 Opakovatelnost

Pro opakovatelnost byly zvoleny roztoky o koncentracích 0,019 (A); 0,396 (B) a 0,791 (C) g/l.

Tabulka 4 - Výsledky opakovatelnosti a její statistické parametry

Počet měření	Opakovatelnost		
	A	B	C
1	0,019	0,414	0,818
2	0,018	0,407	0,817
3	0,018	0,436	0,820
4	0,018	0,397	0,869
5	0,018	0,396	0,812
6	0,018	0,454	0,806
7	0,018	0,452	0,811
8	0,018	0,454	0,774
9	0,018	0,382	0,800
10	0,018	0,383	0,791
AM	0,018	0,418	0,812
dolní mez	0,015	0,355	0,690
horní mez	0,021	0,481	0,934
SD	0,000	0,029	0,025
CV (%)	0,00	6,94	3,08
bias (%)	-5,26	5,56	2,65
výtěžnost (%)	94,74	105,56	102,65

Zdroj: vlastní

Všechny výsledky se nachází v rozmezí dolní a horní meze, metoda tedy vyhovuje opakovatelnosti. Za odlehlé hodnoty se považují takové, které vykazují odchylku od AM ± 15 %.

8.1.2 Reprodukovatelnost

Pro reprodukovatelnost byly zvoleny roztoky o koncentracích 0,019 (A); 0,396 (B) a 0,791 (C) g/l.

Tabulka 5 - Výsledky reprodukovatelnosti a její statistické parametry

Počet měření	Reprodukovatelnost		
	A	B	C
1	0,020	0,387	0,828
2	0,020	0,398	0,804
3	0,020	0,396	0,806
4	0,020	0,380	0,803
5	0,023	0,382	0,780
6	0,022	0,394	0,822
AM	0,021	0,389	0,807
dolní mez	0,018	0,331	0,686
horní mez	0,024	0,447	0,928
SD	0,001	0,007	0,015
CV (%)	4,76	1,80	1,86
bias (%)	10,53	-1,77	2,02
výtěžnost (%)	110,53	98,23	102,02

Zdroj: vlastní

Všechny výsledky se nachází v rozmezí dolní a horní meze, metoda tedy vyhovuje reprodukovatelnosti. Za odlehlé hodnoty se považují takové, které vykazují odchylku od AM ± 15 %.

8.1.3 Linearita, kalibrační křivka

Použitými kalibračními standardy byli standardní roztoky acetonu o teoretické koncentraci 0,020 až 2,0 g/l.

Tabulka 6 - Linearita

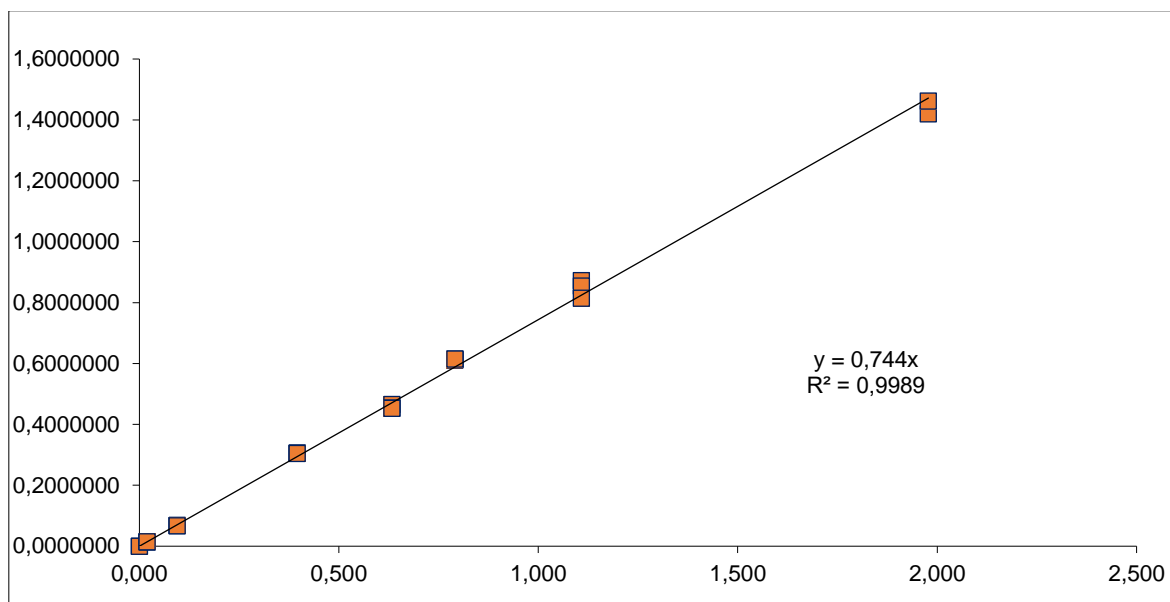
Koncentrace kalibrátorů	Plocha	Plocha IS	Plocha/plochaIS	Vypočtené koncentrace
0,000	0	0	0,0000000	0,000
0,000	0	0	0,0000000	0,000
0,019	59020	4057814	0,0145448	0,020
0,019	55687	3959221	0,0140651	0,019
0,019	61585	4386692	0,0140391	0,019
0,095	268547	3982488	0,0674320	0,091
0,095	278612	4111588	0,0677626	0,091
0,095	280444	4180927	0,0670770	0,090
0,396	1201116	3927897	0,3057911	0,411
0,396	1200645	3924464	0,3059386	0,411
0,396	1263531	4142913	0,3049861	0,410
0,633	1921823	4132891	0,4650069	0,625
0,633	1799988	3964957	0,4539742	0,610
0,633	1939753	4286323	0,4525448	0,608
0,791	2482111	4056747	0,6118476	0,822
0,791	2293281	3732801	0,6143593	0,826
0,791	2438482	3967876	0,6145560	0,826
1,108	3379253	3875207	0,8720187	1,172
1,108	3193693	3739451	0,8540540	1,148
1,108	3277943	4022989	0,8148029	1,095
1,978	5464540	3847443	1,4203043	1,909
1,978	5598716	3828829	1,4622528	1,965

Zdroj: vlastní

Plochou je myšlena plocha píku kalibračního standardu a plochou IS rozumíme plochu píku vnitřního standardu. Výsledky ve sloupci plocha/plocha IS vyjadřují podíl těchto dvou hodnot. Vypočtené koncentrace poté byly dopočítány pomocí směrnice o hodnotě 0,744, kterou jsem získala při vynesení kalibrační křivky v programu MS Excel. Stejným způsobem byla zjištěna i hodnota spolehlivosti R^2 , která vyšla 0,9989. Kalibrační křivku lze tedy akceptovat a metodu lze uznat za lineární.

Následující graf zobrazuje kalibrační křivku, na jejíž ose x leží koncentrace kalibrátorů a osa y zaznamenává sloupec plocha/plochaIS.

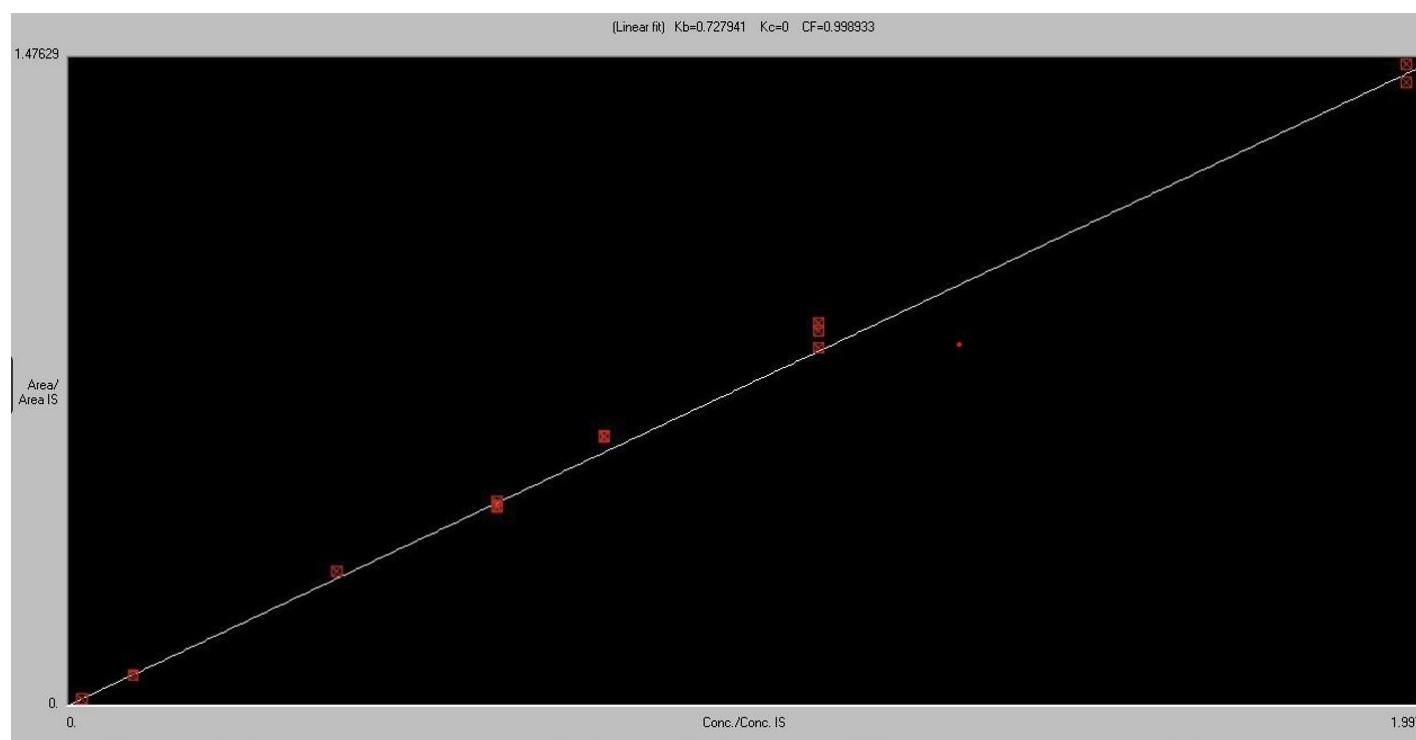
Graf 1 - Kalibrační křivka



Zdroj: vlastní

Stejná kalibrační křivka je zobrazena i na obrázku Obrázek 7. Tato byla získána přímo vyhodnocovacím softwarem.

Obrázek 7 - Kalibrační křivka



Zdroj: vlastní

8.1.4 Carryover

Použitým materiálem byla destilovaná voda, připravený standard o koncentraci 0,791 g/l a vnitřní standard.

Tabulka 7 - Carryover

Měření	Koncentrace standardů [g/l]	Naměřená koncentrace [g/l]
1	0,000	0,000
2	0,800	0,873
3	0,000	0,000
4	0,800	0,886
5	0,000	0,000
6	0,800	0,889
7	0,000	0,000
8	0,800	0,926
9	0,000	0,000
10	0,800	0,932
11	0,000	0,000

Zdroj: vlastní

Z nulových hodnot u všech negativních vzorků lze vyčíst, že k vzájemnému ovlivnění jednotlivých vzorků nedochází a nic se nepřenáší.

8.1.5 Selektivita a interference

Použitým materiálem byl směsný roztok pro identifikaci těkavých látek, připravený standard o koncentraci 0,791 g/l a vnitřní standard.

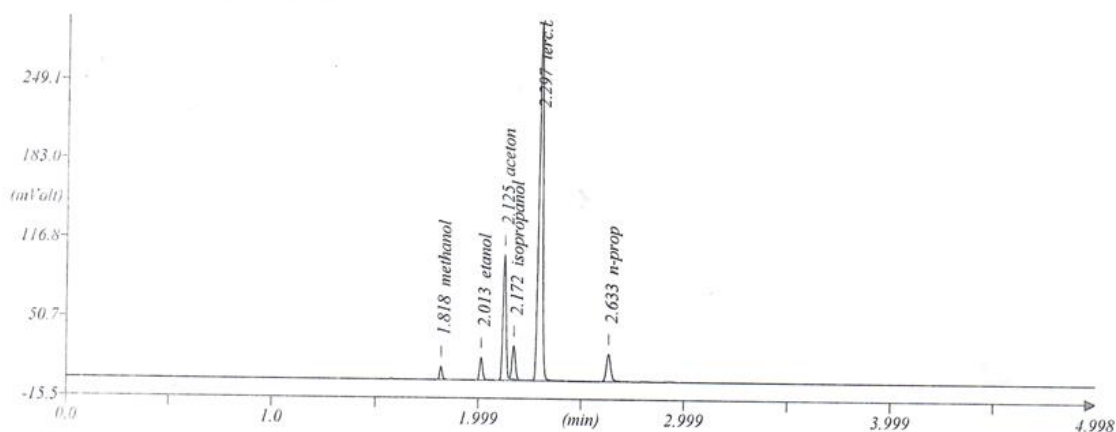
Tabulka 8 - Selektivita a interference

Měření	Naměřená koncentrace [g/l]
1	0,391
2	0,290
3	0,389
4	0,376
5	0,374

Zdroj: vlastní

Obrázek 8 - Chromatogram z prvního měření selektivity

Retention Time (min)	Component Name	Original Conc g/kg	Area (.1*uV*sec)
1.82	methanol	0.098	93684
2.01	etanol	0.082	189695
2.13	aceton	0.391	1135283
2.17	isopropanol	0.084	302492
2.30	terc.but	Int.STD #	3990053#
2.63	n-prop	0.096	337921



Zdroj: vlastní

Přítomnost dalších těkavých látek neovlivňuje hodnotu koncentrace acetonu, metoda je tedy selektivní. Hodnotu 2. měření považujeme za odlehlou.

8.1.6 Mez detekce (LoD)

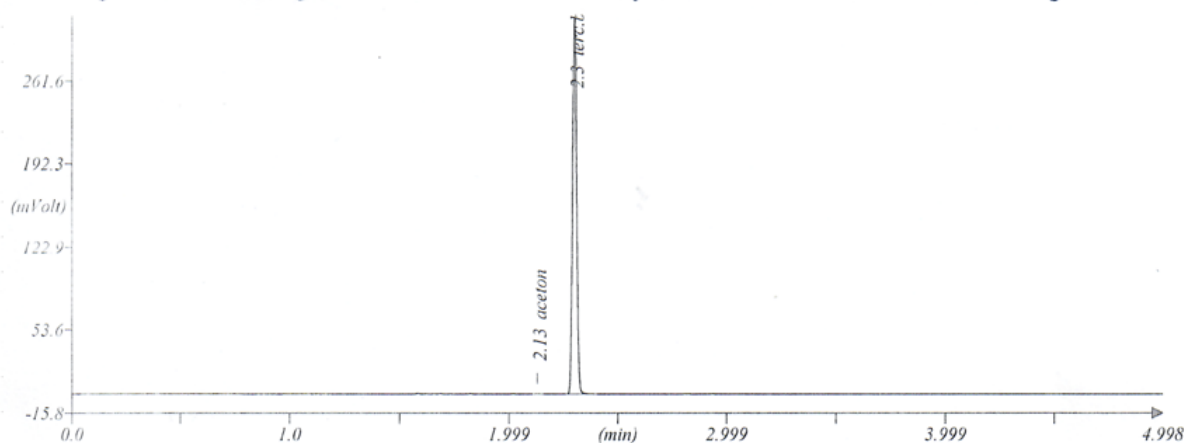
Při zjišťování meze detekce byl použit roztok o koncentraci 0,001 g/l, který byl vytvořen naředěním připraveného roztoku o teoretické koncentraci 0,020 g/l. Mez detekce je definována jako třinásobek poměru signálu k šumu, zjištění poměru signálu k šumu bylo tedy zásadní pro uznání, že tento analytický parametr byl splněn. Na následujícím chromatogramu lze vidět, že poměr signálu k šumu vyšel 3,3, a tudíž tohle kritérium bylo splněno. Za mez detekce tedy považujeme koncentraci 0,001 g/l.

Obrázek 9 - Chromatogram znázorňující poměr signálu k šumu

Retention Time (min)	Component Name	Original Conc g/kg	Area (.1*uV*sec)
2.13	acetone	0.001	2913
2.30	terc.but	Int.STD #	4153405#

Signal to noise report

Signal peak name : acetone
 Signal peak RT (min): 2.130
 Signal value (uV): 270.5
 Noise eval from/to (min): 2.03-2.09
 Peak to peak noise (uV): 82.0
 Signal to noise ratio : 3.3
 Warning Chromatogram has been subjected to manual integration.



Zdroj: vlastní

8.1.7 Mez stanovitelnosti (LoQ)

Mez detekce je definována jako desetinásobek poměru signálu k šumu. Teoretickou mez stanovitelnosti lze vypočítat ze vzorce $LoQ = 3 \times LoD$, pak by se v mém případě tento parametr rovnal hodnotě $LoQ = 0,003 \text{ g/l}$.

8.2 Kazuistiky

Pro interpretaci výsledných hodnot koncentrace acetonu u obou kazuistik byla využita následující tabulka. Tabulka shrnuje referenční hodnoty acetonu v krvi, které jsou uvedeny v literatuře The International Association of Forensic Toxicologists, členská sekce.

Tabulka 9 - Referenční hodnoty acetonu v krvi

Fyziologický či patofyziologický stav	Koncentrace acetonu
Normální koncentrace u zdravých jedinců	0,001 – 0,020 g/l
Koncentrace u diabetiků	0,100 – 0,450 g/l
Toxická koncentrace	0,200 – 0,400 g/l
Koncentrace u diabetických acidóz	0,325 – 0,450 g/l
Letální koncentrace	od 0,550 g/l

Zdroj: The International Association of Forensic Toxicologists, členská sekce

8.2.1 Kazuistika č. 1

Pohlaví: žena RR

Datum analýzy: 7. 11. 2023

Číslo vzorku: 1023/23

Jednalo se o ženu ve věku 50 let, u které byl prokázán syndrom závislosti na alkoholu. V psychiatrické ambulanci požila ze svých zásob neznámé množství dezinfekce Cutasept. Žena nezvracela, v 11:00 byla převezena na urgentní příjem. Pacientka se chovala neklidně, s nemocničním personálem nespolupracovala, ale jinak byla stabilní. Po telefonické konzultaci s toxikologickým centrem Praha bylo zjištěno, že dezinfekce Cutasept obsahuje alkohol a zároveň je bez přítomnosti dalších látek, které by mohly způsobit další intoxikaci.

ÚKBH Lochotín provedlo enzymatické měření ethanolu z odběrů provedených v časech 11:30, 13:22 a 14:42. Koncentrace ethanolu byly menší než 0,100 g/l, což se vyhodnocuje a posuzuje jako vzorek negativní.

V 15:35 dorazily do toxikologické laboratoře na Ústav soudního lékařství 2 zkumavky krve, které byly odebrány v 15:00 hodin. Požadavkem bylo stanovení methanolu, acetonu a isopropanolu metodou plynové chromatografie.

Plynovou chromatografií byl ve vyšetřované krvi pacientky prokázán aceton ve vyšší toxické koncentraci 0,22 g/l. Dále byl stanoven isopropanol o vyšší toxické koncentraci 0,6 g/l. Methanol nebyl prokázán. Výsledek vyšetření byl telefonicky sdělen v 16:30 hodin.

Výsledek neodpovídá informacím z toxikologického střediska. Desinfekce Cutasept podle bezpečnostního listu obsahuje 63 % propan-2-olu.

8.2.2 Kazuistika č. 2

Pohlaví: muž DD

Datum a hodina úmrtí: 30. 11. 2023 v 10:00

Číslo vzorku: 1104/23

Muž (nar. 2003) byl nalezen doma na podlaze bez zjevných poranění a bez traumatických změn. Den před smrtí opakovaně zvracel. Muž měl diabetes mellitus 1. typu, který měl být léčen aplikací inzulínu, ten si však muž zřejmě neaplikoval. Po jeho nalezení byla nařízena pitva, která byla provedena dne 4. 12. 2023.

Pitvou se prokázalo, že morfologický nález byl chudý a smrt nevysvětlující. Ukázalo se, že se u muže jednalo o opakované dekompenzace diabetu. Měl přeplněný močový měchýř, což značí, že před smrtí byl v dlouhém bezvědomí. Dále byl u něj nalezen tuhý otok mozku. Mimo diabetu však neměl jiné zdravotní potíže a byl zdravý člověk.

Na ÚKBH byly biochemickým vyšetřením naměřeny následující hladiny analytů:

- glukóza v mozkomíšním moku: 30,0 mmol/l;
- laktát v mozkomíšním moku: 42,30 mmol/l;
- glykovaný hemoglobin: 112,0 mmol/l.

Pomocí sumy glukózy a laktátu (tzv. Traubeho suma) je možné vyjádřit, zda se jedná o ketoacidózu. Ta se uznává při hodnotách vyšších než 23,4 mmol/l. Glykovaný hemoglobin v těle má běžně koncentraci v rozmezí 20 až 42 mmol/l. Muž měl naměřenou hladinu vysoce nad normou, což svědčí o dlouhodobé dekompenzaci. Koncentrace acetonu byla stanovena 0,90 g/l. Závěrem je, že příčinou smrti bylo hyperglykemické kóma.

Stanovená koncentrace acetonu ze vzorku muže byla 0,90 g/l. S jistotou lze tedy určit, že se jedná o letální koncentraci.

Koncentraci acetonu z biologického materiálu muže jsem zkoušela pomocí plynové chromatografie také změřit. Hodnoty mi vyšly sice odlišné, ale i tak je z nich vyšší koncentrace acetonu patrná. Usuzuji, že tyto rozdíly ve výsledcích mohou souviset

s časovým odstupem mezi měřením pro účely pitvy a mým měřením, a také s chybou v pipetování, protože samotné nasátí vzorku do špičky bylo komplikované a moje zkušenosti při práci s pipetou ještě nejsou tak bohaté.

Tabulka 10 - Autorkou práce naměřené koncentrace acetonu ke kazuistice č. 2

Biologický materiál	1. měření [g/l]	2. měření [g/l]	Průměr hodnot [g/l]
Krev	0,50	0,621	0,5605
Mozkomíšní mok	0,68	0,697	0,6885

Zdroj: vlastní

DISKUZE

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo pomocí jednotlivých analytických parametrů dokázat, že metoda plynové chromatografie je pro stanovení acetonu v séru/krevi vhodná. Tento cíl shrnuje první výzkumná otázka, pro jejíž zodpovězení bylo klíčové stanovení následujících analytických parametrů – opakovatelnost, reprodukovatelnost, linearita, mez detekce a stanovitelnosti, carryover a selektivita.

Prvním z měřených analytických parametrů byla opakovatelnost. Pro stanovení opakovatelnosti bylo dostačující změřit 10 vzorků od každého ze tří standardních roztoků o odlišných koncentracích acetonu. Tyto roztoky byly zvoleny tak, aby byl pokryt rozsah dávky fyziologické, dávky toxické a dávky letální. Horní a dolní mez byla pro každý z použitých roztoků vypočtená za pomoci aritmetického průměru. Horní a dolní mez je určena na základě toho, že odchylky od aritmetického průměru mohou být maximálně 15 %. Všechny vzorky, které jsem v rámci opakovatelnosti měřila, se v tomto rozsahu nachází. Variační koeficient u roztoku o koncentraci 0,019 g/l je 0,00. Variační koeficient u roztoku o koncentraci 0,396 g/l je 6,94 a variační koeficient u roztoku o koncentraci 0,791 g/l je 3,08. Výsledek variačního koeficientu udává relativní míru variability v datových souborech. Čím nižší je hodnota CV, tím menší je variabilita mezi opakovanými měřeními a tím je metoda považována za přesnější a stabilnější.

Stejně roztoky byly použity i v případě reprodukovatelnosti. Taktéž se testovaly vzorky o třech koncentračních hladinách. Rozdílné od opakovatelnosti bylo, že vzorky byly měřeny v dubletu. Pro daný den se poté dvě hodnoty pokaždé zprůměrovaly. Stejným způsobem jako u prvního parametru v předchozím případě byla dopočítána horní a dolní mez. Všechny hodnoty se v příslušném rozsahu nacházely. Výsledky byly získány ze šesti různých dní, podmínky nutné pro správné určení reprodukovatelnosti byly tedy splněny.

Dalším validačním parametrem, který sloužil k ověření metody, byla linearita metody. Ta byla testována na základě analýz, které byly provedené v pracovním rozsahu 20-2000 g/l. Po vynesení hodnot koncentrací a poměru ploch píku do grafu vznikla kalibrační křivka. Získaná hodnota spolehlivosti R^2 je 0,9989. Tato hodnota je větší než 0,990, což značí, že metoda je v testovaném rozsahu lineární a lze jí akceptovat.

Mez detekce byla zjištěna pomocí analýzy roztoku se sníženou koncentrací acetonu. Roztok o teoretické koncentraci 0,020 g/l byl zředěn tak, aby konečná koncentrace byla

0,001 g/l. Podmínkou meze detekce je, aby hodnota poměru signálu k šumu (S/N) byla větší nebo rovna 3. V případě roztoku o koncentraci 0,001 g/l tato podmínka byla splněna, konkrétně vyšel poměr signálu k šumu 3,3. Pro tento parametr byl původně testován roztok o koncentraci 0,0005 g/l. V jeho případě však předchodí kritérium nebylo splněno, nebyl třikrát větší od šumu, jak je u meze detekce požadováno.

Podmínkou meze stanovitelnosti je, aby hodnota poměru signálu k šumu byla větší nebo rovna 10. Tento parametr lze teoreticky stanovit jako $LoQ = 3 \times LoD$, v mém případě by se pak mez stanovitelnosti rovnala hodnotě 0,003 g/l.

Posledními parametry byl carryover a selektivita. Carryover charakterizuje míru přenosu analytu z jednoho vzorku do dalšího vzorku. Otestování carryoveru tedy bylo důležité, aby nedocházelo ke zkreslení výsledků analýzy. Pomocí nulových hodnot u všech negativních vzorků bylo prokázáno, že nedochází k žádnému přenosu analytů. U selektivity lze říci, že přítomnost dalších těkavých látek neovlivňuje hodnotu koncentrace acetonu a metoda je tím pádem selektivní. Závěrem měření tedy je, že látky, které byly součástí směšného roztoku, s acetonem neinterferují.

Součástí této bakalářské práce je i druhá výzkumná otázka. Ta se zabývá popisem dvou kazuistik a zároveň interpretováním výsledných koncentrací acetonu, které byly u těchto dvou případů zjištěny. Já měla příležitost stanovit aceton v biologickém materiálu ke kazuistice č. 2. Jednalo se o vzorek plné krve a mozkomíšního moku. Výsledky mého měření vyšly rozdílně od skutečné hodnoty, která mi byla později sdělena společně s anamnézou pacienta. Tuhle chybu připisuji především nedokonalému pipetování, které vzniklo z důvodu mých nedostatečných zkušeností s touto činností. Na rozdílnost výsledků se pravděpodobně podílel i časový odstup mezi měřením pro účely pitvy a mým měřením. Vzorek plné krve byl ve stavu, kdy šel do špičky nasát stěží, z tohoto důvodu byla analýza vzorku složitější.

Stanovená koncentrace acetonu u kazuistiky č. 1 byla 0,22 g/l. Stanovená koncentrace acetonu u kazuistiky č. 2 byla 0,90 g/l, v případě mého měření vyšla koncentrace 0,5605 g/l. Na základě referenčních hodnot acetonu v krvi, které jsou uvedeny v literatuře The International Association of Forensic Toxicologists, bylo určeno, že v případě první kazuistiky se jednalo o toxickou koncentraci a v případě druhé kazuistiky šlo o koncentraci vysoce letální.

ZÁVĚR

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo validovat metodu stanovení acetonu v séru/krvi za pomoci plynové chromatografie.

Bakalářská práce je složená z teoretické části a praktické části. Součástí teoretické části je bližší přiblížení pojmů, které jsou pro tuhle práci klíčové. První kapitola pojednává o acetonu. Jsou zde rozebrány základní informace o acetonu, dále je zde blíže popsán jeho metabolismus, především produkce acetonu, a v poslední řadě je zde popsán diabetes mellitus a hladovění. Je tomu tak z důvodu, že se jedná o stavy, při kterých dochází k hromadění ketolátek v těle. Tématem druhé kapitoly je plynová chromatografie. Tato část se nejvíce věnuje základnímu principu fungování této chromatografické metody a také popisu instrumentace, která je k analýze využívána. Třetí kapitola se zaměřuje na validaci metody a jednotlivé analytické parametry, které jsou pro validaci stěžejní. V poslední řadě je zde vysvětlen i rozdíl mezi validací a verifikací.

Praktická část byla zaměřena na validaci metody. Pomocí testovaných validačních parametrů bylo nutno vyhodnotit, zda metoda splňuje všechna potřebná kritéria a zda je možné jí používat v klinických laboratořích. V úvahu se braly následující analytické parametry – opakovatelnost, reprodukovatelnost, linearita, mez detekce, mez stanovitelnosti, carryover a selektivita. Závěrem je, že pomocí výsledků interpretovaných v praktické části bylo prokázáno, že požadavky kladené na tuhle analytickou metodu byly splněny.

SEZNAM LITERATURY

1. *Toxicological profiles - Acetone*. Online. U.S. Public Health Service, 1994.
2. KALAPOŠ, M.P. Possible physiological roles of acetone metabolism in humans. Online. *Medical Hypotheses*. 1999, roč. 53, č. 3, s. 236-242. ISSN 03069877. Dostupné z: <https://doi.org/10.1054/mehy.1998.0752>. [cit. 2024-01-04].
3. WEXLER, Philip. *Encyclopedia of Toxicology*. 3rd ed. Academic Press, 2014. ISBN 0123864542.
4. RUZSÁNYI, Veronika a PÉTER KALAPOŠ, Miklós. Breath acetone as a potential marker in clinical practice. Online. *Journal of Breath Research*. 2017, roč. 11, č. 2. ISSN 1752-7163. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/1752-7163/aa66d3>. [cit. 2024-01-22].
5. ELLIOTT, Simon; SMITH, Christopher a CASSIDY, Diane. The post-mortem relationship between beta-hydroxybutyrate (BHB), acetone and ethanol in ketoacidosis. Online. *Forensic Science International*. 2010, roč. 198, č. 1-3, s. 53-57. ISSN 03790738. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.10.019>. [cit. 2023-11-18].
6. HOWARD, Robert D. a BOKHARI, Syed Rizwan A. "Alcoholic Ketoacidosis." *StatPearls*, StatPearls Publishing, 6 September 2022.
7. DUFFENS, Kurt a MARX, John A. Alcoholic ketoacidosis—A review. Online. *The Journal of Emergency Medicine*. 1987, roč. 5, č. 5, s. 399-406. ISSN 07364679. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0736-4679\(87\)90146-6](https://doi.org/10.1016/0736-4679(87)90146-6). [cit. 2023-11-19].
8. PUTULA, Elena; HUHTALA, Heini; VANHAMÄKI, Sini; LAATIKAINEN, Tiina; TAHKOLA, Aapo et al. Clinical characteristics and prognoses of patients with diabetic ketoacidosis in Finland. Online. *Diabetes Epidemiology and Management*. 2023, roč. 10. ISSN 26669706. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.deman.2023.100129>. [cit. 2023-12-03].
9. CALIMAG, Angela Pauline P.; CHLEBEK, Sylvia; LERMA, Edgar V. a CHAIBAN, Joumana T. Diabetic ketoacidosis. Online. *Disease-a-Month*. 2023, roč. 69, č. 3. ISSN 00115029. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2022.101418>. [cit. 2023-12-03].

10. OWEN, Oliver E.; CAPRIO, Sonia; REICHARD, George A.; MOZZOLI, Maria A.; BODEN, Guenther et al. 6Ketosis of starvation: A revisit and new perspectives. Online. *Clinics in Endocrinology and Metabolism*. 1983, roč. 12, č. 2, s. 359-379. ISSN 0300595X. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0300-595X\(83\)80046-2](https://doi.org/10.1016/S0300-595X(83)80046-2). [cit. 2024-03-11].
11. POOLE, C. F. *Gas chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 2012. ISBN 978-012-3855-404.
12. DE CONING, Piet a SWINLEY, John. *A practical guide to gas analysis by gas chromatography*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, [2019]. ISBN 978-012-8188-880
13. MCNAIR, Harold Monroe; MILLER, James M. a SNOW, Nicholas H. *Basic gas chromatography*. Third edition. Hoboken, NJ: John Wiley, 2019. ISBN 978-111-9450-788.
14. BRUNO, Thomas J. A REVIEW OF CAPILLARY AND PACKED COLUMN GAS CHROMATOGRAPHS. Online. *Separation and Purification Methods*. 2011, roč. 29, č. 1, s. 27-61. ISSN 0360-2540. Dostupné z: <https://doi.org/10.1081/SPM-100100002>. [cit. 2024-02-06]
15. ČERNÁK, Jozef a ČERNÁKOVÁ, Marta. *Laboratorní technika: učebnice pro zdravotnické školy, studijní obor zdravotní laborant*. 2. Praha: Avicenum, 1982. ISBN (viaz.).
16. ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody: učební text pro posluchače Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
17. VOLKA, Karel. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995, 236 s. ISBN 80-708-0227-8.
18. DOLEŽALOVÁ, Věra. *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*. Vyd. 4., přeprac. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, 286 s. ISBN 80-701-3198-5.
19. BAKER, R. N., ALENTY, A. L., ZACK, J. F. Simultaneous Determination of Lower Alcohols, Acetone and Acetaldehyde in Blood by Gas Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 1969, s. 312-314. ISSN 0021-9665. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/7.5.312

20. SCHLATTER, J., CHIADMI, F., GANDON, V., CHARIOT, P. Simultaneous determination of methanol, acetaldehyde, acetone, and ethanol in human blood by gas chromatography with flame ionization detection. *Human & Experimental Toxicology*. 2014, s. 74-80. ISSN 0960-3271. Dostupné z: doi:10.1177/0960327113482845
21. BHARDWAJ, S. K.; DWIVEDI, K. a AGARWAL, D. A review: GC method development and validation. Online. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016, s. 1-7. ISSN 2231-5012. [cit. 2024-02-29].
22. CHANDRAN, S. a SINGH, R. S. P. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. Online. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007, s. 4-14. Dostupné z: <https://doi.org/10.1691/ph2007.1.5064>. [cit. 2024-03-01].
23. PERIS-VICENTE, Juan; ESTEVE-ROMERO, Josep a CARDA-BROCH, Samuel. Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An Overview. Online. *Analytical Separation Science*. 2015, č. 5, s. 1757 - 1808. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9783527678129.assep064>. [cit. 2024-03-03].
24. KOLLIPARA, Sivacharan; BENDE, Girish; AGARWAL, Nitin a , Brijesh. Online. *Chromatographia*. 2011, roč. 73, č. 3-4. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10337-010-1869-2>. [cit. 2024-03-05].
25. FRIEDECKÝ, Bedřich; ŠPRONGL, Luděk; KRATOCHVÍLA, Josef a PLZÁK, Zbyněk. Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích. Online. 2011. Dostupné z: <https://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2011/2011-1/dop-validace.pdf>. [cit. 2024-03-06].
26. WITTMANN, Christoph. Online. *Microbial Cell Factories*. 2007, roč. 6, č. 1. ISSN 14752859. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-6>. [cit. 2024-03-09].
27. The International Association of Forensic Toxicologists, členská sekce

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A – Povolení sběru informací ve FN Plzeň

PŘÍLOHY

Příloha A – Povolení sběru informací ve FN Plzeň



Vážená paní

Natálie Sadilová

Studentka oboru *Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví*

*Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví
Západočeská univerzita v Plzni*

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro vnější vztahy a spolupráci s LF Fakultní nemocnice Plzeň **uděluji souhlas** se získáváním / zpracováním informací o laboratorních metodách / analýzách / výsledcích, používaných na pracovišti *Ústavu soudního lékařství (ÚSL) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem *„Validace metody stanovení acetonu v séru/krvi metodou plynové chromatografie“*.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vedoucí zdravotní laborantka souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být zcela anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené, odborné praxe na ÚSL a pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je **pan Balvín Miroslav, Mgr., vedoucí odborný pracovník v laboratorních metodách ÚSL FN Plzeň**.

Po zpracování Vámi zjištěných údajů **poskytnete** zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová

Manažerka pro vzdělávání lékařů

Útvar náměstkyně pro vnější vztahy a spolupráci s LF

Fakultní nemocnice Plzeň

Edvarda Beneše 1128/13, 301 00 Plzeň

Tel: 377 401 663

E-mail: chabrov@sfnplzen.cz

22. 2. 2024