

Natrium, kalium, chloridy – S,P,U

- **Stanovení na ISE modulech**
- **Společné stanovení**
- **Tři ISE elektrody, jedna referenční (argentchloridová elektroda)**
- **Měří se rozdíl potenciálu mezi IS elektrodou a referenční elektrodou**
- **ISE elektroda měří aktivitu, přepočet na koncentraci pomocí aktivitního koeficientu**
- **Nepřímá a přímá potenciometrie**

Metoda nepřímá - historicky starší

- Analýza vzorku značně naředěného (např. 30x) diluentem o vysoké iontové síle
- Generovaný elektrický potenciál porovnáván s potenciálem standardních roztoků – korekce na teplotu nebo elektrické nestability
- Koncentrace iontů se počítá podle Nerstovy rovnice

Metoda nepřímá

- Výsledky odpovídají měření plamenovou emisní spektrofotometrií
- Chyba způsobená přítomností proteinů a lipidů v plasmě (7%)
- Naměřené hodnoty se počítají na celkový objem plasmy
- Např. koncentrace 145 mmol Na⁺/l bude ve vodné fázi (počítáme-li 93% vodné fáze) ve skutečnosti 156 mmol Na⁺/l
- Negativní chyba známa po řadu let
- S miniaturizací elektrod - přímá metoda - neprosadila se

ISE elektrody

- Jednotlivé ISE elektrody
- Elektrody integrované - integrovaná chipová technologie
- Na bázi tenkovrstvé ionoforové technologie (ionofory umožňují transport iontů přes membránu)
- Makrocyclické ionofory - molekuly s dutinou, ve které jsou pevně vázané ionty - crown etery

Sodík (Natrium)

- Doporučená rutinní metoda: FAES (s Li spektrálním pufrem), ISE direct, ISE indirect
- Referenční metoda: ID-MS, FAES, IC (navržená)
- Hlavní extracelulární kationt – reprezentuje 90 % všech kationtů v plasmě
- Hraje centrální roli v distribuci vody
- Výrazně se podílí na osmotickém tlaku v extracelulární tekutině

Sodík (Natrium)

Referenční rozmezí:

S/P 136-145 mmol/l

moč dospělí 70-270 mmol/24 hod

děti do 1 roku 10-30 mmol/24 hod

Stanovení Na pomocí ISE:

- skleněná sodíková elektroda
- nebo crown éterový případně crown malonátový ionofor integrovaný do iontověselektivní plastové membrány (PVC, teflon)

Enzymatické stanovení Na (nedoporučuje se):

- Metoda založena na aktivaci enzymu β -galoktosidasy ionty sodíku
- Hydrolýza chromogenního substrátu 2 – nitrofenyl - β - D - galaktopyranosidu na galaktosu a 2-nitrofenol
- Rychlost hydrolýzy se měří kineticky při 420 nm

Stanovení Na plamenovou emisní spektrofotometrií

- Excitované atomy Na emitují spektra s ostrou čarou při 768 nm
- Rutinně se již nepoužívá

Draslík (Kalium)

- Doporučená rutinní metoda: FAES (s Li spektrálním pufrem), ISE direct, ISE indirect
- Referenční metoda: ID-MS, FAES, IC (navržená)
- Hlavní intracelulární kationt - koncentrace v erythrocytech je 23x vyšší než v plasmě
- Vysoká koncentrace uvnitř buňek zajištěna pomalou difuzí přes buněčnou membránu ven
- Na^+ , K^+ - ATPasová pumpa transportuje kalium do buněk proti koncentračnímu gradientu
- Interference: Hemolýza zvyšuje hodnoty draslíku

Draslík (Kalium)

Referenční rozmezí:

S/P		3,5-5,1 mmol/l
moč	dospělí	25-125 mmol/24 hod
	děti do 1 roku	15- 40 mmol/24 hod

Stanovení K pomocí ISE:

- PVC membrána, v ní zabudován valinomycin (na principu iontové výměny)

Stanovení K plamenovou emisní spektrofotometrií:

- Excitované atomy K emitují spektra s ostrou čarou při 589 nm
- Rutinně se nepoužívá

Enzymatické stanovení K:

- Metoda založena na aktivaci vhodného enzymu ionty draslíku
- Např. tryptofanasa se substrátem tryptofanem
- Metoda není doporučena

Chloridy

- Doporučená rutinní metoda: Coulometrie, ISE direct, ISE indirect
- Referenční metoda: Coulometrie
- Hlavní extracelulární aniont - největší frakce anorganických aniontů v plasmě
- Zásadní role v normální distribuci vody
- Výrazný podíl na osmotickém tlaku v extracelulární tekutině

Chloridy

Referenční rozmezí:

S/P

98-109 mmol/l

moč dospělí

110-250 mmol/24 hod

děti do 1 roku

3-10 mmol/24 hod

Stanovení Cl pomocí ISE:

- **Polymerní membrána – v ní kvarterní amoniové soli**
- **Např. trioktylpropylamonium chlorid dekanol**
- **Membrána zajišťuje iontovou výměnu solí z membrány s chloridovými ionty**
- **Některé firmy používají chloridovou elektrodu v pevné fázi (AgCl)**

Coulometrie:

- **Stanovení chloridů založeno na generaci Ag^+ ze stříbrné anody konstantní rychlostí (konst. proud)**
- **Ionty stříbra reagují s chloridy \rightarrow chlorid stříbrný**
- **V bodě ekvivalence se generace stříbrných iontů zastaví**
- **Obsah chloridů přímo úměrný času**
- **Rutinně se nepoužívá**

Spektrofotometrické stanovení Cl^-

- $2\text{Cl}^- + \text{Hg}(\text{SCN})_2 \rightarrow \text{HgCl}_2 + 2 \text{SCN}^-$
- $3\text{SCN}^- + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}(\text{SCN})_3$
- červený thiokyanatan železitý se fotometruje
- v současnosti se nedoporučuje

Natrium, kalium, chloridy- B

- Stanovení v plné krvi
- Provádí se na přístrojích na měření ABR pomocí ISE elektrod na Na, K a Cl v heparizovaných stříkačkách nebo kapilárách

Vápník (Kalciium)

- Doporučená rutinní metoda:
FAAS, FAES, ISE direct, ISE indirect,
fotometricky s o-kresolftalexonem, s
arsenazo III
- Referenční metoda: ID-MS, FAAS,
IC (navržená)

Vápník (Kalciium)

Referenční rozmezí:

Vápník celkový

S/P 2,15-2,55 mmol/l

moč M 2,4-7,5 mmol/24 hod

Ž 2,4-6,2 mmol/24 hod

Vápník ionizovaný

krev 1,12-1,32 mmol/l

Stanovení vápníku v S,P,B :

Tři formy

- $\frac{1}{2}$ vázána na bílkoviny (80% na albumin, zbytek na globuliny)
- 6% - ve formě komplexních sloučenin (citrát, laktát, hydrogenuhličitan, fosfát).
- necelá $\frac{1}{2}$ vápník ionizovaný (volný)

- Fyziologicky aktivní pouze ionizovaný vápník
- Jeho koncentraci regulují hormony PTH a 1,25-dihydroxyvitamin D.
- Stanovení ionizovaného kalcia se masově neprovádí

a) Celkový vápník – S,P:

Fotometrické metody:

Stanovení s o-kresolftaleinkomplexonem:

- Při pH 12 reagují vápenaté ionty s o-kresolftaleinkomplexonem
- Vznik stabilního purpurového komplexu s abs. max. 600 nm
- Magnesium maskováno s 8-hydroxychinolinem
- Metoda citlivá na vzdušný CO₂ - komínky

a) Celkový vápník – S,P:

Fotometrické metody:

Stanovení s arsenazo III:

- Imidazolový pufr, pH 6
- vápenaté ionty + arzenazo III → modrý komplex
- činidlo má specifickou afinitu k vápníku (pH 6)

Stanovení s NM-BAPTA:

- Vápenaté ionty + 5-nitro-5'-metyl-BAPTA (pH10) → komplex Ca-NM-BAPTA – ten reaguje s EDTA (pH7,3) → komplex Ca-EDTA

Úbytek absorbance při 600 nm je úměrný koncentraci vápníku

- Nová vysoce stabilní metoda Roche

a) Celkový vápník – S,P:

Stanovení pomocí AAS:

- Naředění (1:50) roztokem chloridu lantanitého nebo stronnatého v kyselém prostředí
- Plamen acetylén-vzduch, Ca-lampa
- Naředění podpoří disociaci → uvolnění z fosfátů, snížení viskozity
- Stanovení se běžně neprovádí

b) Volné (Ionizované) kalcium - B

- Pomocí ISE na speciálním přístroji nebo přístroji na ABR
- Měří se rozdíl potenciálu mezi Ca ISE, resp. pH elektrodou a referenční elektrodou
- Vydává se i výsledek přepočítaný na pH 7,4
- ISE elektroda měří aktivitu – ta je přepočítávána na koncentraci pomocí aktivního koeficientu
- Kalibrátory musí mít stejnou iontovou sílu (koncentrace sodných a chloridových iontů)
- Stanovení se provádí z plné krve odebrané do heparinizovaných stříkaček či kapilár

Stanovení vápníku v moči

- Fotometrické stanovení ze sbírané moče
- Specifičtější stanovení pomocí AAS
- Vzorek předem okyselit s HCl, rozpustit potenciální krystaly solí
- U pacientů se sklonem ke zvýšené tvorbě krystalů (pro stanovení souboru litiázy) okyselit celý objem sbírané moče
- AAS v některých laboratořích v moči rutinně

Hořčík (Magnesium):

- Doporučená rutinní metoda: FAAS, enzymová UV metoda, fotometrické metody
- Referenční metoda: FAAS, IC (navržená)
- Stanovení v séru nebo v plasmě:
- V séru nebo plasmě se magnesium vyskytuje ve třech formách. 55% hořečnatých iontů je volných, asi 30% je vázáno na bílkoviny, zejména na albumin a 15% - se vyskytuje ve formě komplexních sloučenin (citrát, fosfát atd.).

Hořčík (Magnesium)

Referenční rozmezí:

hořčík celkový

S/P 0,65-1,05 mmol/l

moč 3,0-5,0 mmol/24 hod

hořčík ionizovaný

krev 0,40-0,65 mmol/l

a) Celkové magnesium:

Fotometrické metody:

Stanovení s xylidylovou modří (magon):

- Mg^{2+} + xylidylová modř v alkalickém prostředí
- Vznik purpurové diazoniové soli, abs. max. 600 nm
- Ca^{2+} maskovány s EGTA (kyselina etylen glykol – bis(aminoetyl) tertraoctová)

Stanovení s Arzenazo:

- Mg^{2+} reagují v alkalickém prostředí s chromogenem arzenazo
- Vznik fialového komplexu, abs. max. 570 nm
- Interferenci vápníku zabráněno specifickým komplexotvorným činidlem

a) Celkové magnesium – pokr.:

Fotometrické metody:

Stanovení s Chlorphosphonazo III

Chlorophosphonazo III (CPZ III) reaguje s hořečnatými ionty za vzniku komplexu Mg-CPZ III.

Interferenci Ca^{2+} zabraňuje EGTA (ethylen bis(oxyethylenitrilo)tetra-octová

kyselina) - inhibuje vazbu vápníku na CPZ III

pH 7,5

a) Celkové magnesium – pokr.:

Stanovení s calmagitem:

- Fotometrické stanovení se provádí rovněž v alkalickém prostředí při 520 nm. Kalcium může být maskováno s EGTA.

Stanovení s AAS:

- Stanovení se provádí po naředění séra (1:50) roztokem chloridu lantanitého nebo strontnatého v kyselém prostředí. Tím se uvolní hořečnaté ionty z komplexů s fosfáty a proteiny. Dojde rovněž ke snížení viskozity. Ke stanovení se používá plamen acetylén-vzduch. V laboratorních klinické biochemie se běžně neprovádí.

Volné magnesium - B:

- **Stanovení s ISE – spec. přístroj nebo přístroj na ABR (Nova Biomedical)**
- **Krátká životnost (1 měsíc), nízká frekvence stanovení, finanční náročnost**
- **Stanovení se provádí z plné krve odebrané do heparinizovaných stříkaček či kapilár**

Stanovení Mg v moči:

- **Fotometrické stanovení ze sbírané moče**
- **Specifičtější stanovení pomocí AAS**
- **Vzorek předem okyselit s HCl, rozpustit potenciální krystaly solí**
- **U pacientů se sklonem ke zvýšené tvorbě krystalů (pro stanovení souboru litiázy) okyselit celý objem sbírané moče**
- **AAS v některých laboratořích v moči rutinně**

Fosfor anorganický

- Doporučená rutinní metoda: UV molybdatová metoda
- Referenční metoda: neexistuje (navrhovaná ID-MS, IC)

Stanovení v séru, plasmě a moči:

- Poměr H_2PO_4^- : HPO_4^{2-} je v kyselém prostředí 1:1, při pH 7,4 1:4 a v alkalické oblasti 1:9
- 10% fosfátů v séru vázáno na protein, 35% tvoří komplexy s natriem, kalcíem a magnesiem, zbývajících 55% volných
- V krvi anorganické i organické fosfáty
- Stanovuje se fosfor anorganický, organické estery lokalizovány v buněčných elementech

Fosfor anorganický

Referenční rozmezí:

S/P	dospělí	0,9-1,5 mmol/l
	děti 1-2 roky	1,5-2,2 mmol/l
moč		13,0-42,0 mmol/24 hod

Stanovení P s molybdenanem amonným:

- Prostředí kyseliny sírové
- Vznik fosfomolybdátového komplexu $(\text{NH}_4)_3[\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}]$
- a) detekce při 340 nm
- b) nebo následná reakce fosfomolybdátového komplexu s redukčním činidlem (kyselina aminonaftolsulfonová – nízká stabilita) → fosfomolybdenová modř - 650 nm

Stanovení P s molybdenanem a vanadičnanem amonným:

- Kyselé prostředí
- Vznik žluté kyseliny molybdatovanadatofosforečné
- Analýza po vysrážení bílkovin ze supernatantu
- Jinak nahodnocení anorganického fosforu (při reakci dochází k hydrolýze organických esterů)
- Není vhodná k automatizaci

Železo

- Doporučená rutinní metoda: fotometrie s ferrozinem
- Referenční metoda: neexistuje

Stanovení v séru nebo plasmě:

- Fe^{3+} vázáno na transportní beta1-globulin apotransferin .
- Měřená koncentrace železa odpovídá Fe^{3+} vázanému v sérovém transferinu, nezahrnuje železo obsažené v séru jako volný hemoglobin
- Běžně Fe^{3+} obsazuje pouze jednu třetinu vazebných míst v transferinu
- Navázaná část - saturace transferinu

Železo

Referenční rozmezí:

S/P	M	10,6-28,3 umol/l
	Ž	6,6-26,0 umol/l

Princip stanovení Fe:

- Po uvolnění z transferinu a po redukci na Fe^{2+} reakcí se skupinou $-\text{N}=\text{CH}-\text{HC}=\text{N}$
- Tvorba barevných komplexů
- Fotometrické stanovení

Stanovení železa s ferrozinem:

- **Železo se uvolní z komplexu s transferinem přidáním citrátového pufru ($\text{pH} < 2$)**
- **Fe^{3+} redukováno kyselinou askorbovou na dvojmocné**
- **Fe^{2+} s ferrozinem modrý komplex, abs. max. 570 nm**

Stanovení železa s bathofenantrolinem:

- **V minulosti nejčastěji používána**
- **Není však vhodná pro automatizaci (deproteínace),**
- **pak se trojmocné železo s kyselinou thioglykolovou redukovalo na dvojmocné.**
- **S bathofenantrolinem pak dává Fe^{2+} červený komplex.**

Interference při stanovení Fe:

- Při fotometrických stanoveních hemolýza zanedbatelný vliv
- Větší vliv hemolýza při stanovení pomocí AAS

Stanovení Fe v moči:

- AAS
- Provádí se zřídka
- Nízká koncentrace železa v moči – nevhodné fotometrické metody

Celková a volná vazebná kapacita železa:

- Celková vazebná kapacita železa (TIBC) je metoda, která se využívá k výpočtu saturace transferinu:

$$\text{Saturace transferinu (\%)} = \frac{\text{Koncentrace Fe v séru}}{\text{Konc. TIBC}} \times 100$$

- V současnosti minimální použití

Výpočet saturace transferinu – provádí se z koncentrace transferinu a železa

$$\text{Saturace transferinu (\%)} = \frac{\text{Koncentrace Fe v séru (umol/l)}}{\text{Konc. Transferinu (g/l)}} \times 3,98 \times 100$$

Referenční rozmezí:

S/P celková vazebná kapacita
45-75 $\mu\text{mol/l}$

saturace transferinu železem

M 0,21-0,40

Ž 0,20-0,36

Stanovení celkové vazebné kapacity železa:

- V minulosti – nelze automatizovat
- Přídavek nadbytku roztoku chloridu železitého - vysycení transferinu
- Přidat pevný uhličitan hořečnatý – reaguje s přebytečným Fe
- Směs se promíchá, po půl hodině odstředí
- V supernatantu se stanoví koncentrace Fe odpovídající celkové vazebné kapacitě železa

Stanovení volné vazebné kapacity železa:

- Alkal. pufr, přídavek známé konc. Fe^{2+} v nadbytku.
- Specifická vazba na transferin
- Nezreagované Fe^{2+} stanoveny s ferrozinem
- Rozdíl mezi koncentrací původně přidávaných Fe^{2+} a stanovenou koncentrací = volné vazebné kapacity
- Celková vazebná kapacita - součet volné vazebné kapacity a sérového železa

Stopové prvky

- v organismu ve velmi nízkých koncentracích ($\mu\text{mol/l}$)
- dostatečně citlivá metoda
- v preanalytické fázi zabránit kontaminaci biologického vzorku

Stopové prvky

ZINEK

- **Analyzovaný materiál:** S, P, U
- **Stabilita:** S 2 týdny (+4 °C), 1r (-20 °C)
- **Speciální preanalytické požadavky:** zabránit kontaktu s gumou
- **Referenční rozmezí:**

S,P	9,5 – 19,0 $\mu\text{mol/l}$
dU	3,0 – 9,0 $\mu\text{mol/24h}$

Stopové prvky

MĚĎ

- **Analyzovaný materiál:** S, P, U
- **Stabilita:** S 2 týdny (+4 °C), 1r (-20 °C)
- **Speciální preanalytické požadavky:** obecná pravidla pro stopovou analýzu
- **Referenční rozmezí:**

S,P	M	11,0-22,0	μmol/l
	Ž	12,5-24,0	μmol/l
dU		0,2 – 0,9	μmol/24h

Stopové prvky

SELEN

- **Analyzovaný materiál:** S, P, B
- **Stabilita:** S 2 týdny (+4 °C), 1r (-20 °C)
- **Speciální preanalytické požadavky:** obecná pravidla pro stopovou analýzu
- **Referenční rozmezí:**

S,P	0,8 – 1,2	µmol/l
dU	0,1 – 0,4	µmol/24h

METODY STOPOVÉ ANALÝZY PRVKŮ

Referenční metoda: Neutronová aktivační analýza (NAA)

nedestruktivní

Doporučené metody:

- **ATOMOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIE**
 - PLAMENOVÁ (FAAS)
 - S ELEKTROTERMICKOU ATOMIZACÍ (ETA-AAS)
- **ATOMOVÁ EMISNÍ SPEKTROMETRIE S INDUKČNĚ VÁZANÝM PLAZMATEM (ICP-AES) a její modifikace**

METODY STOPOVÉ ANALÝZY PRVKŮ

ATOMOVÁ EMISNÍ SPEKTROMETRIE S INDUKČNĚ VÁZANÝM PLAZMATEM

- výboj vzniká v proudu argonu – ten protéká plazmovou hlavicí v kruhové indukční cívce kde protéká vysokofrekvenční proud a vzniká elektromagnetické pole**
- teplota 5000° - 10000° K**
- dochází snadno k vypaření aerosolu vzorku, disociaci, atomizaci a excitaci atomů prvků**
- čarovou emisí excitovaných atomů a iontů je tvořeno záření**
- záření je monochromatizováno v mřížkovém spektrálním přístroji a detekováno**
- multiprvková analýza**