

# 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<sup>+</sup>/l bude ve vodné fázi (počítáme-li 93% vodné fáze) ve skutečnosti 156 mmol Na<sup>+</sup>/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  $\beta$ -galoktosidasy ionty sodíku
- Hydrolýza chromogenního substrátu 2 – nitrofenyl -  $\beta$  - 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
- $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - 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  $\text{Ag}^+$  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 $\text{Cl}^-$

- $2\text{Cl}^- + \text{Hg}(\text{SCN})_2 \rightarrow \text{HgCl}_2 + 2 \text{SCN}^-$
- $3\text{SCN}^- + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}(\text{SCN})_3$
- 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 CO<sub>2</sub> - 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  $\text{Ca}^{2+}$  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 molybdátová metoda
- Referenční metoda: neexistuje (navrhovaná ID-MS, IC)

## Stanovení v séru, plasmě a moči:

- Poměr  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  :  $\text{HPO}_4^{2-}$  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, kalcium 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:

- $\text{Fe}^{3+}$  vázáno na transportní beta1-globulin apotransferin .
- Měřená koncentrace železa odpovídá  $\text{Fe}^{3+}$  vázanému v sérovém transferinu, nezahrnuje železo obsažené v séru jako volný hemoglobin
- Běžně  $\text{Fe}^{3+}$  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  $\text{Fe}^{2+}$  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 ( $\text{pH} < 2$ )**
- **$\text{Fe}^{3+}$  redukováno kyselinou askorbovou na dvojmocné**
- **$\text{Fe}^{2+}$  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  $\text{Fe}^{2+}$  červený komplex.**

## Interference:

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

## Stanovení 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.  $\text{Fe}^{2+}$  v nadbytku.
- Specifická vazba na transferin
- Nezreagované  $\text{Fe}^{2+}$  stanoveny s ferrozinem
- Rozdíl mezi koncentrací původně přidávaných  $\text{Fe}^{2+}$  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
	Ž	12,5-24,0	μmol
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
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**