

Praktické cvičení č. \_\_\_\_\_ datum \_\_\_\_\_ jméno \_\_\_\_\_

*Téma praktika:*

### **Srovnání dvou metod ke stanovení hořčíku**

*Okruhy k nastudování a dotazy:*

1. Jak se nazývá proces při zavedení nové metody, kterým ověřujeme důležité analytické parametry?
2. Jak se nazývá proces při ověření metody komerčního dodavatele, kterým ověřujeme důležité analytické parametry? Z jakých důvodů jej provádíme?
3. Co je to F-test a co T-test?

*Teorie:*

Stejně jako v každém jiném oboru, i laboratorních metodách dochází k vývoji. Staré metody jsou nahrazovány novějšími, u kterých je potřeba zjistit, zda jsou lepší, nebo alespoň stejně dobré jako ty předchozí.

V tomto cvičení si vyzkoušíte manuálně měřit sérový hořčík deseti vzorků na spektrofotometru metodou využívající xylidylovou modř. Následně změříte sérový hořčík těchto vzorků na automatickém analyzátoru metodou využívající chromogen chlorphosphonazo III.

Výsledky obou měření pak porovnáte běžně užívanými statistickými testy a vyhodnotíte oba způsoby měření (v praxi je potřeba porovnat alespoň 20 vzorků pro snížení vlivu náhodné chyby)

*Přístroje a pomůcky:*

**Manuální fotometr**

**Automatický biochemický analyzátor**

**Statistický program MedCalc**

**Soupravy na stanovení hořčíku využívající xylidylovou modř a chlorphosphonazo III**

*Úkoly:*

- 1) **Provést manuální stanovení hořčíku s xylidylovou modří dle následujícího návodu:**

#### **Stanovení hořčíku v krevním séru.**

PRINCIP METODY

Koncentrace hořčíku v séru se stanovuje fotometricky reakcí s xylidylovou modří. Vzniká purpurová diazoniová sůl; měří se při 505 a 600 nm na analyzátoru (při manuálním měření při 600 nm).

Reakce se provádí v alkalickém prostředí, vápenaté ionty jsou maskovány s EGTA.

**PŘÍPRAVA ČINIDLA:**

Používá se přímo.

## POSTUP ANALÝZY

	vzorek ( $\mu\text{l}$ )	standard ( $\mu\text{l}$ )	kontrol. vzorek ( $\mu\text{l}$ )	blank ( $\mu\text{l}$ )
Sérum	30	—	—	-
Standard	—	30	-	-
Kontrola	-	-	30	-
Blank	-	-	-	30
Činidlo 1	970	970	970	970
Činidlo 2	970	970	970	970

Po přidání činidla 1 promícháme a za 5 minut přidáme činidlo 2. Po dalších 5 minutách změříme absorbanci testu proti blanku vzorku při 600 nm.

## REFERENČNÍ INTERVAL

fS HOŘČÍK 0,70 — 1,07 mmol/l

**Poznámka:** Hlavní vlnová délka používaná na analyzátoru je 600 nm. Nepředstavuje ale maximum vzniklého barevného komplexu. Absorbance blanku (modrý roztok) je vyšší než absorbance vzniklého komplexu činidla s  $\text{Mg}^{2+}$  (fialový roztok). Absorbance komplexu při 600 nm klesá s rostoucí koncentrací hořečnatých iontů. Při výpočtu koncentrace odečteme absorbanci blanku od absorbance komplexu a získáme záporné číslo. Dále již pracujeme s absolutní hodnotou absorbance a vzorcem :

$$c_{\text{vz}} = \frac{c_{\text{st}}}{A_{\text{st}}} \times A_{\text{vz}} = F \times A_{\text{vz}}$$

- Na základě změřené absorbance a známé koncentrace standardu vypočtete faktor k výpočtu koncentrace neznámých vzorků:
- Měření ověřte na známé koncentraci kontrolního vzorku:
- Vypočtete koncentraci 10 neznámých vzorků a uveďte ji do tabulky:

Číslo vzorku	A	Konc. (mmol/l)
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

**2) Provést stanovení hořčíku s Chlorphosphonazo III ve stejných vzorcích na přístroji Cobas 8000 a koncentraci zapsat do tabulky:**

**PRINCIP:**

Kolorimetrická metoda s Chlorphosphonazo III.

Chlorphosphonazo III (CPZ III) se váže na hořčík a způsobuje tak nárůst absorbance. EGTA ( ethylen bis(oxyethylennitrilo)tetra-octová kyselina) inhibuje vazbu vápníku na CPZ III.

pH 7,5

$Mg^{2+}$  + CPZ III Mg-CPZ III komplex

Nespecifické interference absorbance jsou redukovány přítomností EDTA

(ethylenediaminetetraoctová kyselina), která uvolňuje hořčík z vazby na CPZ III pro přesné měření blanku vzorku.

pH 7,5

Mg-CPZ III komplex + EDTA Mg-EDTA + CPZ III

Rozdíl v absorbanci mezi Mg-CPZ III komplexu a komplexu po účinku EDTA je absorbancí způsobenou vazbou hořčíku.

**REAGENCIE - pracovní roztoky**

**R1** TESA: 145 mmol/L, pH 7,5; Chlorphosphonazo III: 0,2 mmol/L;

EGTA: 10 mmol/L; nereaktivní detergent, konzervans

**R2** TES: 100 mmol/L, pH 7,5; EDTA: 16 mmol/L; nereaktivní detergent; konzervans

a) N-tris(hydroxymetyl)-metyl-2-aminoetansulfonová kyselina

**PŘÍPRAVA ČINIDLA:**

Kazeta se používá se přímo.

Číslo vzorku	Konc. (mmol/l)
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

**3) Pomocí programu MedCalc provést statistické srovnání obou metod – korelace, lineární regrese, Passing-Bablok, rozdělovací graf.**

**4) Seznámit se s materiály a formuláři oddělení k zavádění nové metody.**