

Klinicko-biochemická diagnostika

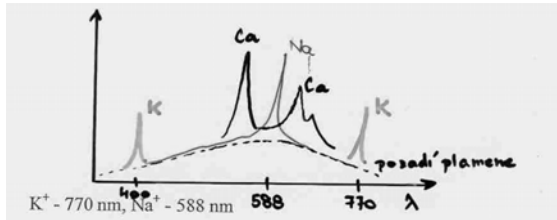
1. Kvalitativní analýza
2. Semikvantitativní analýza – diagnostické proužky
- 3. Kvantitativní analýza**

- Spektroskopické metody
 - **Absorpční**
 - Fotometrie – UV/VIS (kolorimetrie) - bar. Látky, NAD(P)H
 - *Atomová absorpční spektroskopie (AAS)* – Ca, Mg, Fe, Cu, Mg, Mn, Zn, ...
 - **Emisní**
 - Plamenová emisní fotometrie (PES) – Na, K, (Ca, Mg, Li),...
- Potenciometrické metody
 - pH
 - Krevní plyny – pCO₂, pO₂
 - Iontově selektivní elektrody – Na, K, Ca
- Elektroforetické metody – bílkoviny, isoenzymy, lipoproteiny
- Imunochemické metody – bílkoviny, peptidy, hormony, TDM
- *Chromatografické metody* – glykovaný Hb, léčiva, metabolity,...

Analýza anorganických látek

KATIONY: Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Fe, Zn, ...

PES – vzorek se rozprašuje do plamene (propan ~ 1925 °C, acetylen ~ 3000 °C)



AAS – řádově citlivější; Ca, Mg, Zn, Cu, Al, Fe

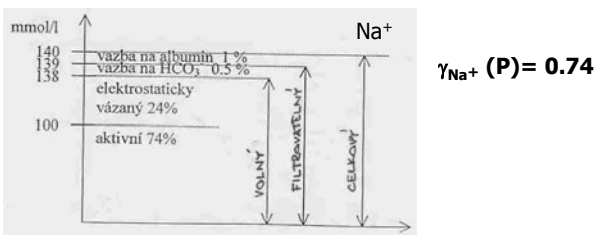
ISE – měří **aktivitu** iontů (závisí na iontové síle, vazbě na bílkoviny a anionty)

$a_{Me} = c_{Me} \cdot \gamma_{Me}$... molární

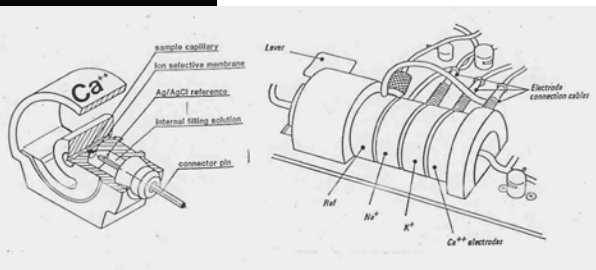
$a_{mMe} = m_{Me} \cdot \gamma_{Me}$... molální

$\rho_{H_2O}(P) = 0.93 \text{ kg/kg}$

$\gamma_{Me}(P) = \gamma_{Me} \cdot \rho(H_2O) / \rho_{H_2O}(P)$



ISE

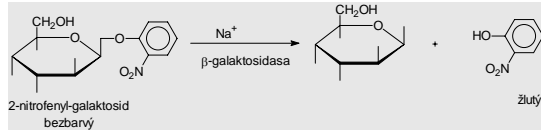


Na⁺ (128-145 mmol/l), K⁺ (3.0-5.2 mmol/l)

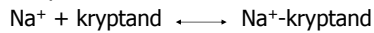
většinou kvantifikovány souběžně

1. PES
2. ISE – Na (speciální sklo), K (valinomycinová eloda)
3. fotometrické metody

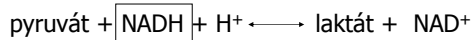
a) Na⁺ enzymaticky



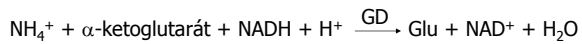
Vyvázení nadbytku Na⁺:



b) K⁺ enzymaticky



interference Na⁺ (Na-kryptand),
NH₄⁺ (preinkubace s glutamátdehydrogenasou)



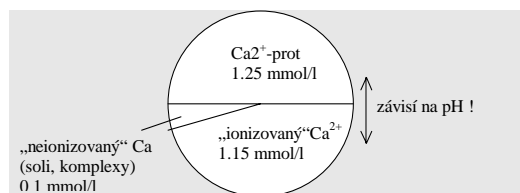
c) vazba do chromogenních crown-etherů (18-crown-6)

Ca²⁺ (2.5 mmol/l)

volný

Vázaný s bílkovinami

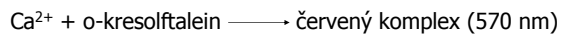
transport plasmou na albuminu (nespecifická vazba, 12-30 Ca na molekulu Alb, kompetice mezi H⁺ a Ca²⁺),
vazba na globuliny (Alb/globuliny ~ 7/2),
vazba i s HCO₃⁻, laktát, citrát ..



Stanovení Ca²⁺

Celkový Ca

- PES, AAS
- Fotometrie – tvorba barevných komplexů (alizarin, methylthymolová modř, o-kresolftaleinkomplexon)

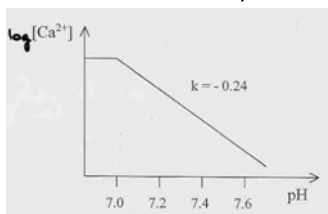


Ionizovaný Ca - ISE

Iontově selektivní membrána:

Iontoměnič – na bázi organofosfátů (dioktylfenylfosfát)

Neutrální nosiče s vhodnými sterickými a elektrostatickými vlastnostmi



$$Y_{\text{Ca}^{2+}} = 0.29$$

Komplikace – koncentrace Ca²⁺ závisí na pH

⇒ **standardizace na pH 7.4**

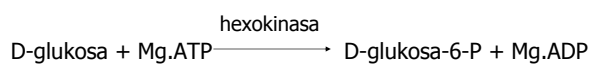
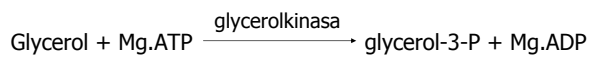
Mg²⁺ (0.65 – 1.05 mmol/l), 71% volný, 22% Alb, 7% globuliny

Poskytuje **barevné komplexy** s řadou látek

Methylthymolová modř ⇒ komplex 510 a 600 nm

kalmagit ⇒ fialový komplex 532 nm

Enzymové metody (komplex Mg.ATP)



Fe (7.16 – 28.6 μmol/l), 500 - 1600 μg/L

AAS

kolorimetrie

Fe²⁺ - barevné komplexy s řadou látek
bathofenantrolin, trispyridyltriazin (TPTZ), ferrozin
(3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-fenylsulfonát)-1,2,4-triazin)

1. Disociace Fe z transferinu (kyselé prostředí)
2. Redukce Fe³⁺ na Fe²⁺ (hydrazin, hydroxylamin, kys. thioglykolová, askorbová, siřičitan, ...)
3. Tvorba komplexů a fotometrie

Stanovení ferritinu 15 - 200 μg/L

TIBC – celková vazebná kapacita 2500 - 4000 μg/L
nepřímé stanovení transferinu

Saturace transferinu nadbytkem Fe, odstranění nadbytku adsorbentem (ionexy, MgCO₃), stanovení koncentrace Fe v původním vzorku a po nasycení

ANIONTY: Cl⁻ (101 – 111 mmol/l)

1. Merkurimetrická titrace

$2 \text{Cl}^- + \text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \Rightarrow \text{HgCl}_2 + 2 (\text{NO}_3)^-$
nadbytek Hg²⁺ + bisfenylkarbazon ⇒ modrý komplex

2. Coulometrická titrace (referenční metoda)
titrace Ag⁺ vznikajících elektrolýzou Ag elektrody, měří se doba rozpouštění elektrody do ekvivalentního bodu)

3. Fotometrické stanovení - thiokyanátová metoda

$\text{Hg}(\text{SCN})_2 + 2 \text{Cl}^- \Rightarrow \text{HgCl}_2 + 2 \text{SCN}^-$
 $3 \text{SCN}^- + \text{Fe}^{3+} \Rightarrow \text{Fe}(\text{SCN})_3$... **červený komplex**

Anorganický fosfor (0.81 –1.55 mmol/l)

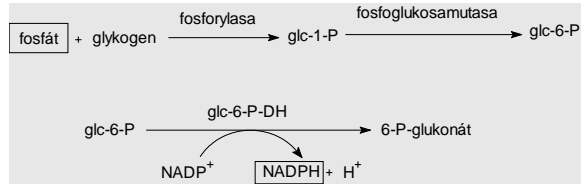
H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻

(1:1 acidosa, 1:9 alkalosa, 1:4 pH 7.4,
100:1 pH 4.5 v moči)

1. tvorba fosfomolybdenových komplexů v kyselém prostředí
 - měřeny přímo : (NH₄)₃[P(Mo₃O₁₀)₄] ... 340 nm
 - po redukci na fosfomolybdenovou modř ... 600 nm (kys. askorbová, kys. aminonaftolsulfonová, SnCl₂, ..)

2. Enzymové metody

Schulz:



Scopes:

