

Stanovení nízkomolekulárních látek

- Klasické metody – „chemicky“
 - Levné, jednoduché
 - Enzymové metody
 - Specifita, selektivita
 - Vysoká reakční rychlost (37 oC)
 - Mírné reakční podmínky T, pH
- ⇒ automatické analyzátoary

Využití enzymů jako analytických činidel

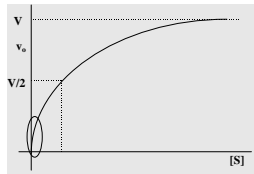


- End-point (reakce musí být rychlá a citlivá)
- Kineticky (většinou metoda konstantního času)

Rovnice Michaelis-Mentenové:

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$[S] \ll K_m \quad v = \frac{V \cdot [S]}{K_m} = \text{konst.} \cdot [S]$$

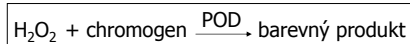
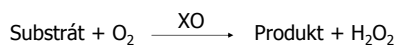


Možnost sledování enzymové aktivity

- Substrát či produkt dokážeme specificky detegovat přímo

Pokud ne, následuje druhá.. (obvykle opět enzymová) detekční (indikátorová) reakce

- **Nejčastější indikátorové reakce**
 H_2O_2 – vzniká při reakcích oxidas (využívají k oxidaci O_2)

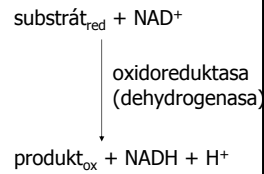
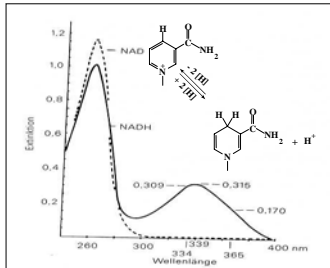
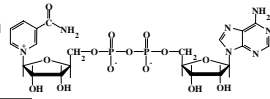


V klinické diagnostice nejčastěji 4-aminoantipyrin + subst. fenol ⇒ CHINONIMIN (červený, 555 nm)

Možnost sledování enzymové aktivity

Nejčastější indikátorové reakce

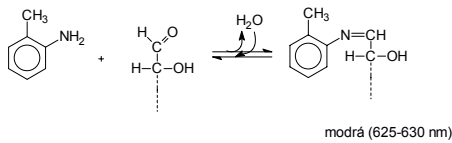
Warburgův optický test 340 nm
NADH, NADPH



Stanovení glukosy

Chemické metody

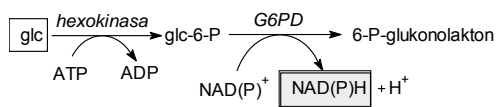
1. redukční vlastnosti monosacharidů
2. o-toluidinová metoda



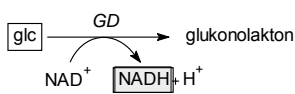
Stanovení glukosy

Enzymové metody

3. hexokinasová



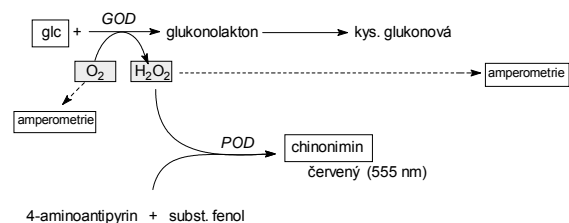
4. glukosadehydrogenasová



Stanovení glukosy



5. glukosaoxidasaová



4-aminoantipyrin + subst. fenol

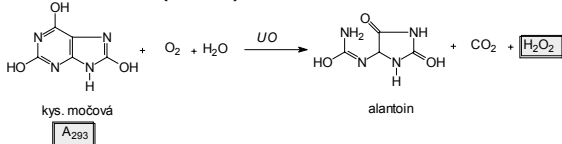
Stanovení kyseliny močové

Chemická metoda

- Oxidace kys. fosfowolframovou → fosfowolframová modř (720 nm)

Enzymová metoda

- Urát oxidasa (urikasa)

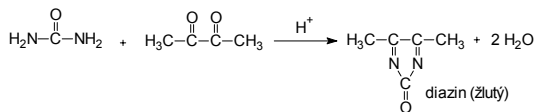
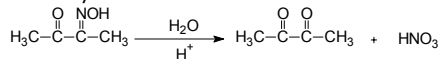


Stanovení močoviny (BUN)

Chemické metody

- Reakce s diketonem a jejími oximy

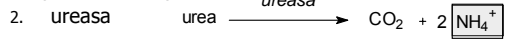
bisacetylmonoxim



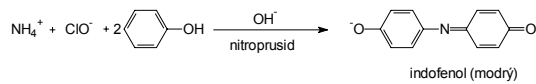
Dobře automatizovatelná, ale fotosenzitibilní, nestálá barva

Stanovení močoviny (BUN)

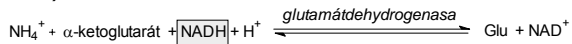
Enzymové metody



a) Berthelot



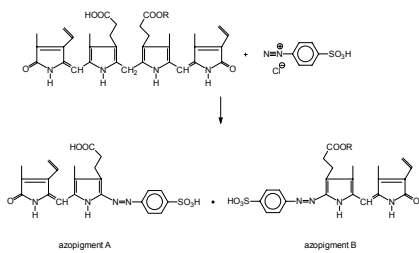
b) GD



c) ISE

Stanovení bilirubinu

1. Obecná metoda: kopulace s diazotovanou kys. sulfanilovou



- ⇒ acidobazický indikátor H^+ - fialový (~ 560 nm) – Malloy-Evelyn
 neutrální OH^- - červený
 - modrý (~ 600 nm) – Jendrassik-Gröf

Stanovení bilirubinu

2. přímá spektrofotometrie – „bilirubinometr“ – 454 nm (+ 540 nm odečet HbO₂) – neonatální diagnostika
 3. enzymaticky – bilirubinoxidasa (oxidace na biliverdin - 405-460 nm)

konjugovaný bilirubin – „přímý“, konjugovaný s kyselinou glukuronovou

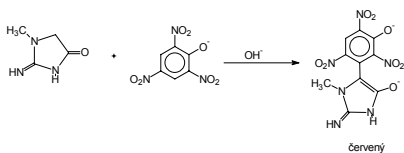
nekonjugovaný bilirubin – „nepřímý“, adsorbovaný na Alb, nutno solubilizovat: kofein-benzoát sodný (Jendrassik-Gröf), DMSO, močovina, MetOH

⇒ kvantitativní stanovení celkového a konjugovaného bilirubinu

Δ-bilirubin – kovalentně vázaný na Alb

Stanovení kreatininu

1. Jaffé - 1886



nespecifická (interference – askorbát, pyruvát, aceton, glc, kys. močová, proteiny, teplota, doba stanovení)

⇒ separace kreatininu (Lloydovo činidlo, floridin, HPLC)

⇒ kinetické stanovení

2. Enzymové metody

kreatininamidohydrolasa ⇒ kreatin

kreatininiminohydrolasa ⇒ N-methylhydantoin + NH₃

Stanovení cholesterolu

Chemické metody

modifikace Liebermann-Burchardovy metody

několikanásobná oxidace cholesterolu v prostředí HAc, H₂SO₄, Ac-anhydridu

⇒ tvorba nenasycených vazeb ⇒ cholestahexaen-sulfonová kyselina – zelenomodré zbarvení

Enzymové metody (celkový, volný, esterifikovaný, HDL)

cholesterolesterasa: ChE → Chol + FFA

cholesteroloxidasa: Cholesterol + O₂ → Cholest-4-en-3-on + H₂O₂

HDL-cholesterol: srážení LDL a VLDL - heparin + Mg²⁺
- kys. fosfowolframová + Mg²⁺
