



# **Ionty – Na, K, Cl, Mg, Ca, P, Fe, mikronutrienty, Pb**

**Ing. Martina Podborská, Ph.D.**

**OKB FN Brno**

**Zpracováno pomocí přednášek RNDr. Miroslavy Beňovské, Ph.D.**

**Školní rok 2015/2016**

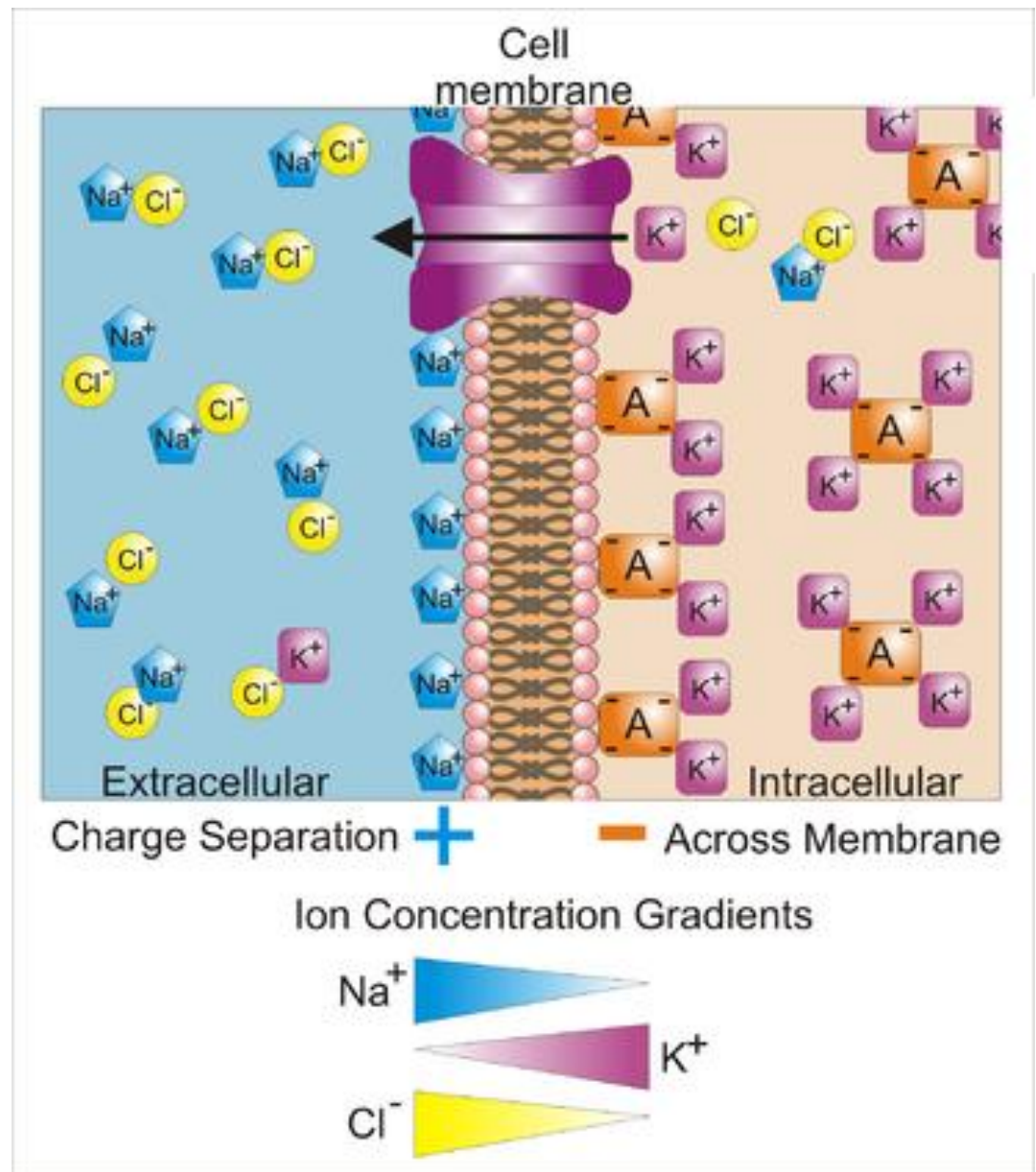
# Vnitřní prostředí

- ✓ voda
- ✓ ionty
- ✓ osmolalita

## ☐ hlavní fce iontů:

- ✓ součást tělesných tekutin, které jsou rozděleny na:
  - **Intracelulární (nitrobuněčná):**  
40% tělesné hmotnosti
  - **Extracelulární (mimobuněčná):**  
20% tělesné hmotnosti a dělí se na:
    - **Intravazální** = krevní plazma
    - **Intersticiální** = mezibuněčná tekutina

- ☐ **rozdíly v koncentracích iontů vně a uvnitř buňky způsobí, že vnitřní povrch membrány nese záporný náboj, vnější povrch pak náboj kladný + vznik membránového potenciálu**



Převzato z:

[https://cs.wikipedia.org/wiki/Membr%C3%A1nov%C3%BD\\_potenci%C3%A1l](https://cs.wikipedia.org/wiki/Membr%C3%A1nov%C3%BD_potenci%C3%A1l)



# Vnitřní prostředí – koncentrace iontů v tělesných tekutinách

Analyt	Plazma [mmol/l]	Intersticiální tekutina [mmol/l]	Intracelulární tekutina [mmol/l]
Na <sup>+</sup>	140	142	10
K <sup>+</sup>	4	4	155
Ca <sup>2+</sup>	2,5	1,3	< 0,001
Mg <sup>2+</sup>	1	0,7	15
Cl <sup>-</sup>	102	113	8
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	24	28	10
Fosfáty	1	1	65
Sulfáty	0,5	0,5	10
Organické kyseliny	4	5	2



# Sodík - Natrium ( $\text{Na}^+$ )

---

## □ hlavní fce:

- ✓ udržování normální distribuce vody, osmolality
- ✓ udržování osmotického tlaku plazmy
- ✓ udržování acidobazické rovnováhy
- ✓ reprezentuje 90 % všech kationtů v plazmě

## □ referenční rozmezí:

✓ S, P –  $\text{Na}^+$ : 135 – 145 mmol/l

✓ U –  $\text{Na}^+$ : dospělí 120 – 240 mmol/24h

děti do 1 roku 10 – 30 mmol/24h

□ celková zásoba  $\text{Na}^+$  v těle: 3 700 – 4 000 mmol

□ ztráty močí: 120 – 240 mmol/den





# Sodík - Natrium ( $\text{Na}^+$ )

---

## □ regulace koncentrace $\text{Na}^+$ v krvi:

- ✓ **aldosteron:** hormon kůry nadlečin, zvyšuje zpětnou reabsorpci  $\text{Na}^+$  (a vody) v ledvinách, zvyšuje vylučování  $\text{K}^+$
- ✓ **renin-angiotensin:** hormony, které regulují uvolnění aldosteronu; podnětem pro jejich tvorbu je pokles průtoku krve ledvinami
- ✓ **antidiuretický hormon (ADH):** zvyšuje vstřebávání vody v ledvinách, podnětem pro jeho tvorbu je zvýšení osmolality (nejčastěji zvýšením koncentrace  $\text{Na}^+$ )
- ✓ **natriuretické peptidy (ANP, BNP):** jsou secernovány v srdci, zvyšují vylučování vody a  $\text{Na}^+$  v ledvinách



# Sodík - Natrium ( $\text{Na}^+$ )

---

## □ klinické využití:

- ✓ **hyponatrémie (snížená koncentrace  $\text{Na}^+$  v krvi):**  
nadměrná sekrece ADH, nevhodným hrazením ztrát tekutin infuzemi glukózy, srdeční selhávání, hypoproteinémie, předávkování diuretik
- ✓ **hypernatrémie (zvýšená koncentrace  $\text{Na}^+$  v krvi):**  
nedostatečný příjem vody, zvýšené ztráty vody (průjmy, dehydratace), zvýšený přívod  $\text{Na}^+$  v parentální výživě



# Draslík - Kalium ( $K^+$ )

---

## □ hlavní fce:

- ✓ úloha v procesu přenosu nervosvalového signálu
- ✓ regulace buněčného metabolismu
- ✓ regulace sekrece některých hormonů (inzulín, glukagon, aldosteron, katecholaminy)
- ✓ hlavní intracelulární kationt (konc. v erythrocytech je 23x vyšší než v plazmě; vysoká koncentrace uvnitř buněk je zajištěna pomalou difuzí přes buněčnou membránu ven)
- ✓ ATPasová pumpa transportuje  $K^+$  a  $Na^+$  do buněk proti koncentračnímu gradientu
- ✓ interference: hemolýza zvyšuje hodnoty draslíku

## □ referenční rozmezí:

- ✓ **S, P –  $K^+$ : 3,8 – 5,1 mmol/l**
- ✓ **U –  $K^+$ : dospělí 45 – 90 mmol/24h**  
**děti do 1 roku 15 – 40 mmol/24h**

□ **celková zásoba  $K^+$  v těle:** 3 000 – 4 000 mmol

□ **ztráty močí:** 40 – 90 mmol/den



# Draslík - Kalium ( $K^+$ )

---

- ❑ koncentrace  $K^+$  v krvi je regulována **aldosteronem**
- ❑ závisí také na hodnotě pH krve:
  - ✓ **při poklesu pH (acidóza):**  $K^+$  se uvolňuje z fosfátového pufru a přechází z buněk do extracelulárního prostoru => ↑ konc.  $K^+$  v krvi
  - ✓ **při vzestupu pH (alkalóza):**  $K^+$  se v buňkách váže na fosfátový pufr, přechází z extracelulární tekutiny do buněk => ↓ konc.  $K^+$  v krvi
- ❑ **klinické využití:**
  - ✓ **hypokalémie:** snížená hladina  $K^+$ ; příčinou je přesun  $K^+$  do buněk (alkalóza, infuze glukózy s inzulinem, zvýšené ztráty  $K^+$  ledvinami)
  - ✓ **hyperkalémie:** zvýšená hladina  $K^+$ ; příčinou je přesun  $K^+$  z buněk do krve (acidóza, katabolismus, hemolýza), neschopnost vyloučit  $K^+$  ledvinami (renální selhání)



# Draslík - Kalium ( $K^+$ )

---

## □ klinické důsledky hypo a hyperkalémie:

- ✓ větší změny koncentrace  $K^+$  v krvi mohou mít vážné důsledky, protože ovlivňují nervosvalovou dráždivost
- ✓ velmi nízké konc.  $K^+$  vedou ke svalovým křečím, poruchám srdečního rytmu, zástavě činnosti střev (ileus), svalové slabosti a poruchám až k zástavě dechu
- ✓ konc  $K^+ > 6,5$  mmol/l mohou nastat poruchy srdečního rytmu a při hodnotách 9 mmol/l dochází k zástavě srdeční činnosti
- ✓ pseudohyperkalémie: ↑ konc.  $K^+$  stanovená „ve zkumavce“, pacient má však konc.  $K^+$  normální => je to způsobeno únikem  $K^+$  z krevních elementů do séra nebo plazmy, v odběrové zkumavce při hemolýze nebo při dlouhé době od odběru krve do oddělení séra (plazmy) od krevních elementů



# Chloridy (Cl<sup>-</sup>)

---

## □ hlavní fce:

- ✓ společně s hydrogenuhličitany (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) jsou hlavním aniontem v extracelulární tekutině
- ✓ udržují osmolalitu
- ✓ mají rozhodující vliv na acidobazickou rovnováhu

## □ referenční rozmezí:

- ✓ S, P – Cl<sup>-</sup>: 97 – 105 mmol/l
- ✓ U – Cl<sup>-</sup>: dospělí 120 – 240 mmol/24h  
děti do 1 roku 3 – 10 mmol/24h
- ✓ pot – Cl<sup>-</sup>: 10 – 30 mmol/l

## □ celková zásoba Cl<sup>-</sup> v těle: 2 400 mmol

## □ ztráty močí: 120 – 240 mmol/den





# Chloridy (Cl<sup>-</sup>)

---

- **klinické využití:**
- výchylnka v konc. Cl<sup>-</sup> vede většinou ke změně v konc. hydrogenuhličitanů tak, aby součet Cl<sup>-</sup> a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iontů zůstal konstantní :
  - ✓ **zvýšení konc. Cl<sup>-</sup> :** ↓ konc. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> v krvi => metabolická acidóza
  - ✓ **pokles konc. Cl<sup>-</sup>:** ↑ konc. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> v krvi => metabolická alkalóza
- ✓ **hypochlorémie:** ztráta Cl<sup>-</sup> zvracením, podáváním diuretik
- ✓ **hyperchlorémie:** zvýšený příjem anebo omezené vylučování Cl<sup>-</sup> ledvinami



# Vápník - Kalcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )

---

## □ hlavní fce:

- ✓ má zásadní význam pro vedení nervového vzruchu, nervosvalovou dráždivost, sílu svalového stahu
- ✓ vylučování řady hormonů
- ✓ krevní srážlivost
- ✓ tvorbu kostní hmoty
- ✓ laktaci

## □ referenční rozmezí:

- ✓ S, P –  $\text{Ca}^{2+}$  celkové: 2,25 – 2,75 mmol/l
- ✓ Ionizované  $\text{Ca}^{2+}$ : 1,15 – 1,32 mmol/l

## □ celková zásoba $\text{Ca}^{2+}$ v těle: 30 000 mmol (1,2 kg)

- ✓ z toho 99 % v kostní hmotě ve formě hydroxyapatitu, pouze 1% je k dispozici jako volně  $\text{Ca}^{2+}$  směnitelné

## □ ztráty močí: 0,9 – 5,5 mmol/den



# Vápník - Kalcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )

---

## □ klinické využití:

- ✓ hypokalcémie: může být způsobena nedostatkem vit. D, hypoparathyreozou, nedostatečným příjmem Ca v potravě, hypoproteinémií
- ✓ hyperkalcémie: přesun  $\text{Ca}^{2+}$  z kostí do krve (hyperparathyreóza, rozpad kostní hmoty)

## □ klinické důsledky hypo a hyperkalcémie:

- ✓ velmi nízké konc. ionizovaného  $\text{Ca}^{2+}$  svalovými křečemi
- ✓ vysoké konc.  $\text{Ca}^{2+}$  se projevují únavou, svalovou slabostí, při těžké hyperkalcémii hrozí i zástava srdce



# Hořčík - Magnesium ( $Mg^{2+}$ )

## □ hlavní fce:

- ✓ ovlivňuje nervosvalovou dráždivost (stabilizuje buněčné membrány)
- ✓ má klíčovou úlohu jako kofaktor mnoha enzymů vč. těch, které zajišťují energetický metabolismus (cukrů, tuků, bílkovin, NK)
- ✓ je nezbytný pro syntézu bílkovin, pro tvorbu kostní hmoty, v procesu srážlivosti
- ✓ v moči brání tvorbě konkrementů

## □ referenční rozmezí:

- ✓ **S, P –  $Mg^{2+}$ : 0,8 – 1,1 mmol/l**
- ✓ **U –  $Mg^{2+}$ : 1,7 – 8,2 mmol/24h**
- ✓ **Ionizovaný  $Mg^{2+}$ : 0,4 – 0,65 mmol/l (krev)**

## □ celková zásoba $Mg^{2+}$ v těle: 1 000 mmol (24 g)

- ✓ z toho v kostech asi 65 % a ve svalech asi 20 %; jen 2 % v extracelulární a intracelulární tekutině
- ✓ v krvi je 55% je „volný“ – ionizovaný  $Mg^{2+}$ ; 30 % je vázáno na bílkoviny (albumin), 15% se vyskytuje ve formě komplexních sloučenin (citrát, fosfát, atd.)

## □ ztráty močí: 1,7 – 8,2 mmol/den



# Hořčík – Magnezium ( $Mg^{2+}$ )

---

- **klinické využití:**
  - ✓ **hypomagnezémie:** může být způsobena alkalózou, zvýšenou ztrátou  $Mg^{2+}$  ledvinami, nedostatečný příjem
  - ✓ **hypermagnezémie:** příčinou může být selhání ledvin, acidóza
  
- **klinické důsledky hypo a hypermagnezémie:**
  - ✓ **velmi nízké konc.  $Mg^{2+}$**  vedou k tetanii a ke svalovým křečím, poruchám srdečního rytmu
  - ✓ **vysoké konc.  $Mg^{2+}$**  vedou ke svalovým slabostem, ke zvracení, k poruchám srdečního rytmu

# Jaké jsou doporučené metody?

Analyt	Doporučené rutinní metody	Referenční metoda	Certifikovaný referenční materiál
<b>Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ISE moduly</b> (přímá a nepřímá potenciometrie)</li> <li>• <b>FAES</b> (s Li nebo Cs vnitřní standard)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ID-MS</b></li> <li>• <b>FAES</b></li> <li>• <b>IC (navržená)</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SRM 909b NIST</li> <li>• SRM 956a</li> <li>• NIST/SRM 912a USA</li> </ul>
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>spektrofotometrické metody</b></li> <li>• <b>FAAS</b></li> <li>• <b>FAES</b></li> <li>• <b>ISE metoda bez ředění</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ID-MS</b></li> <li>• <b>FAAS</b></li> <li>• <b>IC (navržená)</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SRM 909b NIST</li> <li>• SRM 956a</li> <li>• NIST/SRM 915a USA (pouze sérum)</li> <li>• BCR/CRM 303, 304 (pouze sérum)</li> <li>• SRM 956b (pouze plná krev)</li> </ul>
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>spektrofotometrické metody</b></li> <li>• <b>FAAS</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FAAS</b></li> <li>• <b>IC (navržená)</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SRM 909b NIST</li> <li>• SRM 956a</li> <li>• BCR/CRM 303, 304 (pouze sérum)</li> <li>• NIST/SRM 929 USA (pouze sérum)</li> </ul>





# Natrium, Kalium, Chloridy (S,P,U) – metody stanovení

---

## 1. Doporučená rutinní metoda – ISE modul:

- jedná se o nepřímou potenciometrii s ředěním
- používá průtočné iontově selektivní elektrody (ISE) pro Na, K, Cl a referenční argentchloridovou elektrodu
- společné stanovení
- měří se rozdíl potenciálu mezi IS elektrodou a referenční elektrodou
- IS elektroda měří aktivitu, přepočet na koncentraci pomocí aktivitního koeficientu
- stanovení: nepřímá nebo přímá potenciometrie
- u naředěných vzorků se po dosažení rovnovážného stavu měří elektromotorická síla
- míchání je zajištěno pomocí ultrazvuku
- výkon ISE modulu (2 měřící jednotky) je až 1 800 testů/h



# Natrium, Kalium, Chloridy (S,P,U) – metody stanovení

---

## □ nepřímá potenciometrie:

- ✓ historicky starší je metoda nepřímá
- ✓ u této metody se analyzuje vzorek značně naředěný (např. 30x) diluentem o vysoké iontové síle
- ✓ generovaný elektrický potenciál je porovnáván a potenciálem standardních roztoků, čímž je zabráněno výkyvům vlivem teploty nebo elektrické nestabilitě
- ✓ koncentrace iontů se počítá podle Nerstovy rovnice
- ✓ výsledky odpovídají měření plamenovou emisní spektrofotometrií
- ✓ chyba způsobená přítomností proteinů a lipidů v plazmě (7%)
- ✓ naměřené hodnoty se počítají na celkový objem plazmy
- ✓ 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



# Natrium, Kalium, Chloridy (S,P,U) – metody stanovení

---

## □ nepřímá potenciometrie:

- ✓ u vzorků moče se koncentrace  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  stanovují vždy po naředění diluentem s vyšší iontovou silou

## □ přímá potenciometrie:

- ✓ objevila se s miniaturizací elektrod
- ✓ měří se neředěný vzorek
- ✓ neprosadila se



# Natrium, Kalium, Chloridy (S,P,U) – metody stanovení

---

## ISE elektrody:

- ✓ jednotlivé ISE elektrody
- ✓ elektrody integrované do jednoho modulu - tzv. „integrovaná chipová technologie“
- ✓ většina elektrod je na bázi tenkovrstvé ionoforové technologie (ionofory = látky, které umožňují transport iontů přes membránu)
- ✓ makrocyclické ionofory - molekuly s dutinami, ve kterých jsou pevně vázány ionty př. „crown etery“



# Natrium (S,P,U) – metody stanovení

---

## 1. Doporučené rutinní metody:

1.1 Metoda ISE bez ředění

1.2. Metoda ISE s ředěním

## 1.3 Plamenová emisní fotometrie (FAES s Li n. Cs):

- excitované atomy  $\text{Na}^+$  emitují spektrum s ostrou čarou při 768 nm
- tato metoda společně s  $\text{K}^+$  byla v laboratořích velmi běžná, ale nyní se již rutinně nepoužívá

## 1.4 Spektrofotometrická metoda - enzymatická:

- je založena na aktivaci enzymu  $\beta$ -galaktosidázy ionty  $\text{Na}^+$  a na hydrolýze chromogenního substrátu 2-nitro- $\beta$ -D-galaktopyranosidu na galaktózu a 2-nitrofenol
- rychlost hydrolýzy se měří kineticky při 420 nm
- rutinně se ale již nepoužívá



# Kalium (S,P,U) – metody stanovení

---

## 1. Doporučené rutinní metody:

1.1 Metoda ISE bez ředění

1.2. Metoda ISE s ředěním

1.3 Plamenová emisní fotometrie (FAES s Li spektrálním pufrem):

- excitované atomy  $K^+$  emitují spektrum s ostrou čarou při 589 nm
- tato metoda společně s  $Na^+$  byla v laboratořích velmi běžná, ale nyní se již rutinně nepoužívá

1.4 Spektrofotometrická metoda - enzymatická:

- je založena na aktivaci vhodného enzymu ionty  $K^+$
- např. stanovení pomocí tryptofanpyrolázy se substrátem tryptofanem
- metoda není doporučena





# Chloridy (S,P,U) – metody stanovení

---

## 1. Doporučené rutinní metody:

1.1 Metoda ISE bez ředění

1.2. Metoda ISE s ředěním

## 1.3 Coulometrie

- stanovení je založeno na generaci  $\text{Ag}^+$  ze stříbrné anody konstantní rychlostí
- ionty  $\text{Ag}^+$  reagují s  $\text{Cl}^-$  za vzniku nerozpustného  $\text{AgCl}$
- při dosažení bodu ekvivalence se generace  $\text{Ag}^+$  zastaví
- obsah  $\text{Cl}^-$  je přímo úměrný času, který se měří
- rutinně se nepoužívá

## 1.4 Spektrofotometrická metoda - enzymatická:

- je založena na reakci: 
$$2 \text{Cl}^- + \text{Hg}(\text{SCN})_2 \rightarrow \text{HgCl}_2 + 2 \text{SCN}^-$$
$$3 \text{SCN}^- + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}(\text{SCN})_3$$
- vzniklý produkt červeného thiokyanatanu železitého se pak měří fotometricky



# **Celkový vápník (S,P) – metody stanovení**

---

## **Doporučené rutinní metody:**

### **1. Spektrofotometrické:**

**1.1 Stanovení s o-kresolftaleinkomplexem**

**1.2 Stanovení s arsenazo III**

**1.3 Stanovení s NM-BAPTA**

**2. Plamenová atomová absorpční spektrofotometrie (FAAS)**

**3. Plamenová atomová emisní spektrofotometrie (FAES)**

**4. Metoda ISE bez ředění**

**5. Volné ionizované kalcium**



# Celkový vápník (S,P) – metody stanovení

---

## 1. Spektrofotometrické:

### 1.1 Stanovení s o-kresolftaleinkomplexem

- ❑ při pH 12 reagují  $\text{Ca}^{2+}$  s o-kresolftaleinkomplexem za vzniku stabilního purpurového komplexu s absorpčním maximem při 600 nm
- ❑  $\text{Mg}^{2+}$  je maskováno pomocí 8-hydroxychinolinu
- ❑ metoda je citlivá na vzdušný  $\text{CO}_2$
- ❑ nejvíce používaná metoda

### 1.2 Stanovení s arsenazo III

- ❑ v imidazolovém pufru při pH 6 tvoří  $\text{Ca}^{2+}$  s arsenazo III modrý komplex, který se stanovuje fotometricky
- ❑ při daném pH má činidlo specifickou afinitu k vápníku
- ❑ dražší, ale analyticky spolehlivější metoda



# Celkový vápník (S,P) – metody stanovení

---

## 1. Spektrofotometrické:

### 1.3 Stanovení s NM-BAPTA

- vápenaté ionty + 5-nitro-5'-metyl-BAPTA (pH 10)  $\longrightarrow$   
komplex Ca-NM-BAPTA – ten reaguje s EDTA (pH 7,3)  $\longrightarrow$   
komplex NM-BAPTA + Ca-EDTA
- úbytek absorbance při 600 nm je úměrný koncentraci vápníku
- nová vysoce stabilní metoda Roche



# **Celkový vápník (S,P) – metody stanovení**

---

## **2. Plamenová atomová absorpční spektrofotometrie (FAAS)**

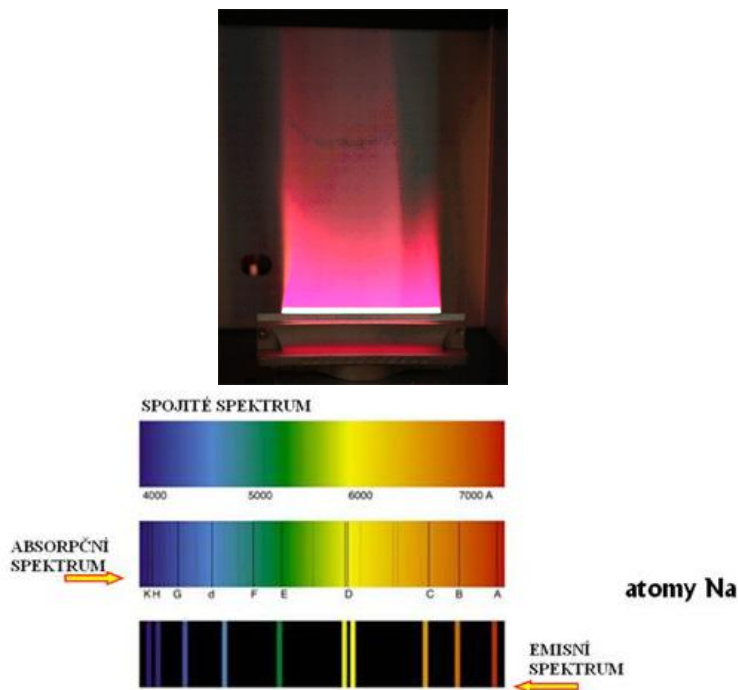
- ❑ **stanovovaný vzorek se naředí 1:50 roztokem  $\text{HClO}_4$  s přídavkem chloridu lantanitého nebo strontnatého**
- ❑ **analýza je v plameni acetylén-vzduch s Ca-lampou**
- ❑ **naředění podpoří disociaci z organických a anorganických sloučenin => uvolnění z fosfátů, snížení viskozity**
- ❑ **stanovení se běžně neprovádí**
- ❑ **avšak pro stanovení  $\text{Ca}^{2+}$  v moči/24h je tato metoda specifitější než fotometrické metody na analyzátorech, neboť umožňuje vzorek předem okyselit s HCl a rozpustit tak krystaly solí (pro stanovení souboru litiázy)**



# Celkový vápník (S,P) – metody stanovení

## 3. Plamenová atomová emisní spektrometrie (FAES)

- pro excitaci atomů Ca se využívá budící zdroj plamene acetylen-vzduch => zajistí potřebnou vyšší teplotu než zdroj propan-vzduch



- AES – emisní spektrum



- Atomový emisní spektrofotometr





## 5. Volné ionizované kalcium (B) – metody stanovení

---

- ❑ stanovení pomocí ISE elektrody v plné krvi (odebrané do heparinizovaných zkumavek či kapilár) na speciálním přístroji nebo na přístroji pro ABR stanovení
- ❑ měří se rozdíl potenciálu mezi vápníkovou ISE elektrodou, resp. pH elektrodou a referenční elektrodou
- ❑ vydává se výsledek naměřený i výsledek přepočítaný na pH 7,4
- ❑ ISE elektroda měří aktivitu, která je přepočítána na koncentraci pomocí aktivitního koeficientu
- ❑ proto musí mít kalibrátory stejnou iontovou sílu jako měřené vzorky (především stejnou koncentraci  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  iontů)



# **Celkové magnezium (S,P) – metody stanovení**

---

## **Doporučené rutinní metody:**

### **1. Spektrofotometrické:**

**1.1 Stanovení s xylidylovou modří (magon)**

**1.2 Stanovení s arsenazo III**

**1.3 Stanovení s Chlorphosfonazo III**

**1.4 Stanovení s calmagitem**

### **2. Plamenová atomová absorpční spektrofotometrie (FAAS)**

### **3. Volné ionizované magnezium**



# Celkové magnezium (S,P) – metody stanovení

---

## 1. Spektrofotometrické:

### 1.1 Stanovení s xylidylovou modří (magon)

- ❑  $Mg^{2+}$  + xylidylová modř v alkalickém prostředí
- ❑ vznik purpurové diazoniové soli s absorpčním maximem 600 nm
- ❑ ionty  $Ca^{2+}$  maskovány s EGTA (kyselina etylen glykol – bis(aminoetyl) tertraoctová)

### 1.2 Stanovení s arsenazo III

- ❑ ionty  $Mg^{2+}$  reagují v alkalickém prostředí s chromogenem arsenazo III
- ❑ vznik fialového komplexu s absorpčním maximem při 570 nm
- ❑ interferenci vápníku je zabráněno specifickým komplexotvorným činidlem



# Celkové magnezium (S,P) – metody stanovení

---

## 1. Spektrofotometrické:

### 1.3 Stanovení s Chlorphosfonazo III

- ❑ Chlorphosfonazo III (CPZ III) v neutrálním prostředí reaguje s ionty  $Mg^{2+}$  za vzniku komplexu Mg-CPZ III
- ❑ interferenci  $Ca^{2+}$  zabraňuje EGTA (ethylen bis(oxyethylennitrilo)tetra-octová kyselina), která inhibuje vazbu vápníku na CPZ III
- ❑ již se nepoužívá

### 1.4 Stanovení s calmagitem

- ❑ fotometrické stanovení se provádí rovněž v alkalickém prostředí při 520 nm
- ❑ kalcium může být maskováno s EGTA



# **Celkové magnezium (S,P) – metody stanovení**

---

## **2. Plamenová atomová absorpční spektrofotometrie (FAAS)**

- ❑ **stanovovaný vzorek se naředí 1:50 roztokem  $\text{HClO}_4$  s přídatkem chloridu lantanitého nebo strontnatého**
- ❑ **analýza je v plameni acetylén-vzduch**
- ❑ **naředění podpoří disociaci z organických a anorganických sloučenin => uvolnění iontů  $\text{Mg}^{2+}$  z komplexů s fosfáty a proteiny, snížení viskozity**
- ❑ **v laboratořích klinické biochemie se stanovení běžně neprovádí**



### **3. Volné ionizované magnezium (B) – metody stanovení**

---

- ❑ **stanovení pomocí ISE elektrody v plné krvi (odebrané do heparinizovaných zkumavek či kapilár) na speciálním přístroji nebo na přístroji pro ABR stanovení (Nova Biomedical)**
- ❑ **krátká životnost (1 měsíc) elektrod, nízká frekvence požadovaných stanovení => finanční náročnost**



# Fosfor anorganický (P) / fosfáty

---

## □ hlavní fce:

- ✓ udržování acidobazické rovnováhy v buňkách (fosfátový pufr a v ledvinách)
- ✓ energetický metabolismus – fosforylace živin pro jejich zpracování
- ✓ zásobní forma energie (ATP)

## □ referenční rozmezí:

- ✓ **S, P – fosfáty: dospělí 0,7 – 1,6 mmol/l**  
**děti 1-2 roky 1,5 – 2,2 mmol/l**
- ✓ **U – fosfáty: 25 – 50 mmol/24h**

## □ celková zásoba fosfátů v těle: 20 000 – 25 000 mmol (600-800 g)

- ✓ většina je uložena v kostech ve formě hydroxyapatitu, zbytek je většinou v intracelulární tekutině

## □ ztráty močí: 25 – 50 mmol/den





# Fosfor anorganický (P) / fosfáty

---

- **klinické využití:**
  - ✓ **hypofosfatémie:** bývá při hyperparathyreóze, hypovitaminóze D, při onemocnění střeva (porucha vstřebávání), alkoholismus
  - ✓ **hyperfosfatémie:** je fyziologická v době růstu, dále ji způsobuje selhání ledvin, hypoparathyreóza či předávkování vitamínu D
  
- **forma a přítomnost fosfátů v těle:**
  - ✓ fosfáty existují v séru jako monovalentní a divalentní anionty
  - ✓ poměr  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^-$  je při pH 7,1 1:4
  - ✓ 10% fosfátů je vázáno na protein, 35% tvoří komplexy s natriem, kalcium a magnesiem a zbývajících 55% je volných
  - ✓ v krvi jsou přítomny anorganické i organické fosfáty, ale běžně se v klinické biochemii stanovuje anorganický fosfor
  - ✓ organické estery jsou lokalizovány především v buněčných elementech



# Železo (Fe)

---

## □ hlavní fce:

- ✓ je nezbytné pro funkci buněk; je jedním z nejdůležitějším prvků v lidském těle
- ✓ jako součást hemu se účastní transportu kyslíku
- ✓ jako součást cytochromů podmiňuje přenos elektronů v dýchacím řetězci

## □ referenční rozmezí:

- ✓ S, P – Fe: muži 10,6 – 28,3  $\mu\text{mol/l}$   
                    ženy 6,6 – 26,0  $\text{mmol/l}$
- ✓ U – Fe: < 1,8  $\mu\text{mol/24h}$

## □ celková zásoba fosfátů v těle: 70 mmol (4-4,5 g)



# Železo (Fe)

## □ Distribuce Fe v organismu:

Forma	Funkce	Protein	Množství (g)
<b>Aktivní Fe</b>	transport kyslíku	hemoglobin	2,5 – 3,0
		myoglobin	0,3
	přenos elektronů	cytochromy, cytochromoxidáza	0,2
		rozklad H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
<b>Zásobní Fe</b>	zásoba Fe	ferritin, hemosiderin	0,8 – 1,0
<b>Transportní Fe</b>	transport Fe	transferin	0,003



# Železo (Fe)

---

## □ forma a přítomnost Fe v těle:

- ✓  $\text{Fe}^{3+}$  vázáno na transportní  $\beta$ -1-globulin nazývaný apotransferin
- ✓ stanovené koncentrace železa v séru 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
- ✓ **poměr navázané části Fe se nazývá saturace transferinu**



# Železo (Fe) – klinické využití

---

- ❑ **nedostatek Fe: způsoben jeho nedostatečným vstřebáváním ze střeva nebo chronickými ztrátami krve => sideropenie => může vyústit až v sideropenickou anémii**
- ❑ **nadbytek Fe: organismus není vybaven exkreční cestou pro železo, proto se za určitých okolností může přebytečné železo hromadit ve tkáních (může dojít k poškození tkání) =>**
  - ❑ **hemochromatóza: dědičné onemocnění způsobené zvýšenou resorpcí železa ze střeva**
    - ✓ **přebytečné železo se ukládá v parenchymatózních orgánech jako jsou játra, srdce, pankreas, nadledviny**
    - ✓ **v postižených orgánech působí toxicky a narušuje jejich funkci tím, že může katalyzovat chronické reakce vedoucí k tvorbě volných radikálů**
    - ✓ **hlavními klinickými projevy jsou hyperpigmentace kůže, hepatosplenomegalie a diabetes mellitus**

# Jaké jsou doporučené metody?

Analyt	Doporučené rutinní metody	Referenční metoda	Certifikovaný referenční materiál
<b>P</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• UV molybdatová metoda</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• neexistuje</li><li>• navrhovaná ID-MS, IC</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• DGKCH</li></ul>
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• spektrofotometrická metoda s ferrozinem</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• neexistuje</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• NIST/SRM 937 USA</li></ul>
<b>Pb<sup>2+</sup></b> (nepatří do mikronutrientů)	<ul style="list-style-type: none"><li>• ET-AAS</li></ul>		



# Fosfor (S,P, U) – metody stanovení

---

**Doporučené rutinní metody:**

## **1. UV – molybdátové metody**

**1.1 Stanovení s molybdenanem amonným**

**1.2 Stanovení s molybdenanem a vanadičnanem amonným**

---

## **1.1 Stanovení s molybdenanem amonným**

- **v prostředí  $\text{H}_2\text{SO}_4$  vznik fosfomolybdátového komplexu  $(\text{NH}_4)_3[\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}]$**
- **detekce při 340 nm (UV oblast)**
- **nebo následná reakce fosfomolybdátového komplexu s redukčním činidlem (kyselina aminonaftolsulfonová – nízká stabilita) => fosfomolybdenová modř (stanovení absorbance při 650 nm)**





# Fosfor (S,P, U) – metody stanovení

---

**Doporučené rutinní metody:**

**1. UV – molybdátové metody**

## **1.2 Stanovení s molybdenanem a vanadičnanem amonným**

- ❑ **v kyselém prostředí vznik žluté kyseliny molybdátovanadátosforečné**
- ❑ **analýza se provádí po deproteinizaci supernatantu**
- ❑ **jinak dochází k nadhodnocení anorganického fosforu, neboť při reakci dochází k hydrolýze organických esterů**
- ❑ **metoda není vhodná k automatizaci**



# Železo (S,P, U) – metody stanovení

---

**Doporučené rutinní metody:**

## **1. Spektrofotometrické metody s ferrozinem (S, P)**

- **Fe se stanovuje po uvolnění z transferinu a po redukci na  $Fe^{2+}$  reakcí se skupinou  $-N=CH-HC=N-$**
- **dochází k tvorbě barevných komplexů, které se stanovují fotometricky**

### **1.1 Stanovení s ferrozinem**

### **1.2 Stanovení s bathofenantrolinem**

- ✓ **vzhledem k nízké koncentraci Fe v moči nejsou pro tento materiál vhodné spektrofotometrické metody a používá se AAS**



# Železo (S,P) – metody stanovení

---

**Doporučené rutinní metody:**

## **1. Spektrofotometrické metody s ferrozinem**

### **1.1 Stanovení s ferrozinem**

- ❑  $\text{Fe}^{3+}$  se uvolní z komplexu s transferinem přidáním citrátového pufru ( $\text{pH} < 2$ )
- ❑  $\text{Fe}^{3+}$  je redukováno kyselinou askorbovou na  $\text{Fe}^{2+}$
- ❑  $\text{Fe}^{2+}$  tvoří s ferrozinem modrý komplex, jehož absorpční maximum je při 570 nm

### **1.2 Stanovení s bathofenantrolinem**

- ❑ v minulosti nejčastěji používána
- ❑ není však vhodná pro automatizaci
- ❑ Vzorek je deproteinizován a  $\text{Fe}^{3+}$  po přidavku kyseliny thioglykolové redukuje na  $\text{Fe}^{2+}$
- ❑ s bathofenantrolinem pak dává  $\text{Fe}^{2+}$  červený komplex, který je fotometricky stanoven



# Celková a volná vazebná kapacita železa

---

- ❑ **Stanovení celkové vazebné kapacity železa (TIBC = Total Iron Binding Capacity)**
  - ✓ je metoda, která je založena na přidavku nadbytku roztoku  $\text{FeCl}_3$
  - ✓ po vysycení transferinu se přidá pevný  $\text{MgCO}_3$
  - ✓ směs se promíchá, po 30 min odstředí a přebytečné  $\text{Fe}^{3+}$  se oddělí ve sraženině
  - ✓ v supernatantu se pak stanoví koncentrace  $\text{Fe}^{3+}$ , která odpovídá TIBC stanovené fotometricky
  - ✓ v současnosti minimální použití, nelze automatizovat
  
- ❑ **Stanovení volné vazebné kapacity železa**
  - ✓ v přítomnosti trisového pufru je k séru přidána známá koncentrace  $\text{Fe}^{2+}$  v nadbytku
  - ✓ ty se specificky vážou na transferin
  - ✓ nezreagované železnaté ionty jsou pak stanoveny s ferrozinem
  - ✓ rozdíl mezi koncentrací původně přidaných  $\text{Fe}^{2+}$  a stanovenou koncentrací  $\text{Fe}^{2+}$  odpovídá volné vazebné kapacitě
  - ✓ celková vazebná kapacita se pak vypočítá jako součet volné vazebné kapacity a koncentrace sérového železa



# Celková a volná vazebná kapacita železa

---

- Celková vazebná kapacita železa (TIBC = Total Iron Binding Capacity) je také metoda, která se využívá k výpočtu saturace transferinu:

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

✓ referenční rozmezí (S,P): 45 - 75  $\mu\text{mol/l}$

- Výpočet saturace transferinu vypočtené z koncentrace transferinu stanoveného imunoturbidimetricky ze séra:

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

✓ referenční rozmezí saturace transferinu: M 0,21 - 0,40  
Ž 0,20 - 0,36



# Stopové prvky – mikronutrienty (Zn, Cu, Se)

---

- ❑ v organismu se vyskytují ve velmi nízkých koncentracích
- ❑ nutnost dostatečně citlivých metod
- ❑ v preanalytické fázi zabránit kontaminaci biologického vzorku
- ❑ v analytické (příprava vzorku, kalibračních roztoků) fázi použití velmi čistých chemikálií (Suprapur) a dokonale deionizované H<sub>2</sub>O
- ❑ referenční metoda: Neutronová aktivační analýza (NAA)
- ❑ doporučenou metodou v klinické biochemii je:
  - ✓ Atomová absorpční spektrofotometrie (AAS) - s plamenovou (FAAS)  
- elektrotermickou atomizací  
(ET-AAS)
  - ✓ Atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-AES)



# Stopové prvky – mikronutrienty (Zn, Cu, Se)

Stopový prvek	Analyzovaný materiál	Stabilita	Speciální preanalytické požadavky	Referenční rozmezí
<b>Zn</b>	S, P, U	S 2 týdny (+4°C) 1 rok (-20°C)	zabránit kontaktu s gumou (obecná pravidla pro stopovou analýzu)	<b>S, P 9,5 – 19,0 μmol/l</b> <b>dU 3,0 – 9,0 μmol/24h</b>
<b>Cu</b>	S, P, U	S 2 týdny (+4°C) 1 rok (-20°C)	obecná pravidla pro stopovou analýzu	<b>S, P M 11,0 – 22,0 μmol</b> <b>Ž 12,5 – 24,0 μmol</b> <b>dU 0,2 – 0,9 μmol/24h</b>
<b>Se</b>	S, P, B	S 2 týdny (+4°C) 1 rok (-20°C)	obecná pravidla pro stopovou analýzu	<b>S, P 0,8 – 1,2 μmol</b> <b>dU 0,1 – 0,4 μmol/24h</b>





# Stopové prvky (Zn, Cu, Se) – metody stanovení

---

- doporučenou metodou v klinické biochemii je:
- ✓ **Atomová absorpční spektrofotometrie (AAS) - s plamenovou (FAAS):**
  - využívá se absorpce monochromatického záření vysílaného výbojkou vyzařující spektrální čáry daného prvku
  - aerosol vzorku je atomizován v plameni při 1 200 – 2 800°C
  - kapalný vzorek je nasáván přes zmlžovač a zmlžovací komoru do plamene, kde dochází k vypaření aerosolu vzorku, spálení organických součástí (mineralizace) a rozložení sloučenin na atomy v základním stavu (atomizace)
  - k potlačení nežádoucí ionizace se docílí přidáním solí alkalických kovů
- ✓ **Atomová absorpční spektrofotometrie (AAS) - elektrotermickou atomizací (ET-AAS):**
  - princip této metody je stejný jako u FAAS, rozdíl je ve způsobu atomizace => plamen je nahrazen atomizérem, elektricky vyhřívanou píčkou (kyvetou - nejčastěji z grafitu) s naprogramovaným teplotním režimem – kontrola teploty a času
  - metoda dosahuje velmi nízkých mezí detekce



# Stopové prvky (Zn, Cu, Se) – metody stanovení

---

- doporučenou metodou v klinické biochemii je:
- ✓ **Atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-AES):**
  - principem je sledování emitovaného záření výboje ICP (indukovaně vázaná plazma) po jeho disperzi na mřížce spektrometru
  - ICP výboj vzniká v proudu argonu při atmosférickém tlaku, vzniká po iniciaci plynu (Ar) – ten protéká křemennou plazmovou hlavicí v kruhové indukční cívce, kde protéká vysokofrekvenční proud a vzniká elektromagnetické pole
  - plazmový výboj dosahuje teplot  $5\,000^{\circ} - 10\,000^{\circ} \text{K}$  => 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



# Olovo (Pb)

---

- ❑ patří do těžkých kovů, nepatří mezi mikronutrienty
- ❑ je toxický pro lidský organismus
- ❑ vyšší obsah Pb v organismu ovlivňuje i krvetvorbu způsobuje zvýšení kyseliny  $\delta$ -aminolevulové a koproporfyrinů v moči (saturnismus – chronická otrava Pb)
- ❑ za normálních okolností se Pb vyskytuje v organismu jen v malých koncentracích, uvádí se proto dvě hladiny:
  - ✓ nízká normální hladina u neexponované populace
  - ✓ nejvyšší přípustný limit tj. koncentrace při které ještě nedochází k významnému poškození organismu
- ❑ metoda stanovení v nesrážlivé krvi (odběrová zkumavka s EDTA):
- ✓ **Atomová absorpční spektrofotometrie (AAS) - elektrotermickou atomizací (ET-AAS):**
  - stanovení Pb se provádí metodou ETA-AAS v grafitové kyvetě se Zeemanovou korekcí pozadí
  - atomy Pb absorbují záření o vlnové délce 283,3 nm
  - úbytek záření je úměrný koncentraci Pb ve vzorku