

STANOVENÍ IONTŮ V BIOLOGICKÝCH TEKUTINÁCH

Anorganické látky se vyskytují v organismu v různém množství a složení. Najdeme je v tkáních a v biologických tekutinách. Jejich účast na různých funkcích organismu je velmi pestrá, přičemž některé z nich jsou bezprostředně nutné pro zachování života. Velmi úzký vztah je mezi minerálními látkami, metabolismem vody a kostní tkáň, krvetvorbou, permeabilitou buněčných membrán, elektrickými potenciály, nervosvalovou dráždivostí, acidobázickou rovnováhou apod.

Na rozdíl od metabolismu jiných látek (např. metabolismu glukosy), anorganické látky v organismu nevznikají ani nezanikají. Do organismu se musí dostávat potravou. Pomocí složitých regulačních mechanismů se udržuje rovnováha složení minerálů jak v tkáních, tak i v biologických tekutinách. Proto v mnoha případech nestačí jen znát aktuální koncentraci minerálních látek v krvi, ale i jejich ztráty z organismu. Právě vylučováním minerálních látek z organismu se reguluje rovnováha jejich složení. Při stanovení koncentrace anorganických látek v krvi se tak často stanovuje nejen koncentrace v krvi, ale i v odpadu – v moči.

SODÍK A DRASLÍK

Sodík a draslík jsou hlavní kationty tělních tekutin. Sodík je dominantní extracelulární (mimobuněčný) a draslík intracelulární (nitrobuněčný) iont. Ve svých funkčních prostorech se podílejí na udržování osmotického tlaku, acidobázické rovnováhy, nervosvalové dráždivosti a v menší míře i na dalších metabolických funkcích. Nejčastěji se oba kationty stanovují společně při podezření na poruchy vnitřního prostředí a při jejich úpravě. Vzhledem k jejich rozdílné koncentraci v extracelulární a intracelulární tekutině je velmi důležitý správný odběr krve. Sodík a draslík se stanovuje plamenovou fotometrií nebo iontově selektivními elektrodami.

Referenční hodnoty:

Na: v séru	135–145 mmol.l⁻¹
K v séru	3,8–5,1 mmol.l⁻¹
K do 15 let	3,6–5,5 mmol.l⁻¹
do 1 roku	4,0–6,2 mmol.l⁻¹

CHLORIDY

Chloridy jsou hlavním aniontem biologických tekutin. Z celkového množství je jich asi 80 % obsaženo v mimobuněčné tekutině. Jejich příjem je zabezpečen potravou ve formě NaCl, přičemž většina se jich vyloučí ledvinami. Za určitých okolností (teplota okolního prostředí, vlhkost, zvýšená tělesná teplota) dochází k závažným ztrátám pocením a zvracením. Chloridy v organismu udržují osmotický tlak a podílejí se na regulaci acidobázické rovnováhy. Chloridy se stanovují elektrochemicky, fotometricky nebo volumetricky.

Referenční hodnoty:

v séru: **97–108 mmol.l⁻¹**

v moči: **120–250 mmol/den**

Klinický význam:

Zvýšená koncentrace v séru **hyperchloridemie** je způsobena sníženým vylučováním chloridů močí při selhání ledvin, nadměrným přívodem chloridů za současné snížené funkce ledvin, dehydratací organismu (urputné průjmy) nebo respirační alkalózou v důsledku chronické hyperventilace (horečky, onemocnění CNS), popřípadě masivní aplikací kortikosteroidů.

Snížená koncentrace chloridů **hypochloridemie** je způsobena ztrátami chloridů zažívacím traktem (zvracení, odsávání kyselého obsahu žaludku), užíváním diuretik, těžkým katabolismem, respirační insuficiencí (chronická hyperkapnie) nebo mentální anorexie.

VÁPŇÍK

Z anorganických látek je v organismu nejhojněji zastoupen vápník. 99 % vápníku je v kostech ve formě různých anorganických sloučenin (hydroxyapatit), které způsobují tvrdost kostí a zároveň jsou pro organismus rezervou vápníku. Malé množství vápníku je v tělních tekutinách. Kromě výstavby kostí a zubů je vápník v organismu nezbytný pro srážení krve, udržování selektivní propustnosti buněčných membrán, pro aktivaci a inhibici hormonů a enzymů, pro regulaci nervosvalové dráždivosti. Hladina vápníku v krvi je výsledkem rovnováhy mezi jeho příjmem, výdejem (velmi důležitá je funkce ledvin),

tvorbou a odbouráváním kostní tkáně. Stanovení vápníku se provádí společně se stanovením fosforu, protože mají společné regulační mechanismy. Provádí se fotometrickými metodami, titračními metodami (komplexometrie), atomovou absorpční spektrofotometrií (AAS), plamenovou fotometrií nebo pomocí iontově selektivních elektrod (ISE).

Referenční hodnoty

v séru: **2,1–2,6 mmol.l⁻¹**

Rozdělení vápníku v plazmě je přehledně znázorněno v tabulce 12:

Tabulka 12. Rozdělení vápníku v plazmě

Celkový vápník v plazmě	
<p>Difuzibilní</p> <p>tj. schopný přecházet přes polopropustnou membránu (54–57 %)</p>	<p>Nedifuzibilní</p> <p>tj. vázán na bílkoviny (albumin) (43–46 %)</p>
<p>Ionizovaný (Ca²⁺)</p>	<p>Neionizovaný tj. vázaný v solích (5–6 %)</p>

Biologicky aktivní je pouze ionizovaný vápník. Některé poruchy metabolismu vápníku (např. rachitis) se nemusí projevit změnou koncentrace celkového vápníku v séru, ačkoliv ionizovaný vápník je už abnormální. Je to způsobeno tím, že jednak může dojít ke změně podílu ionizovaného a neionizovaného vápníku a jednak může být vápník, který chybí v biologických tekutinách, doplněn ze zásob v kostní tkáni. Velikost ionizovaného podílu (za současného zachování stálé koncentrace celkového vápníku) souvisí:

- s množstvím celkových bílkovin plazmy (ztráty bílkovin mají za následek zvýšení Ca²⁺)
- se změnami pH (acidóza zvyšuje a alkalóza snižuje podíl Ca²⁺)
- s koncentrací anorganického fosforu (vzestup koncentrace fosforu vede k poklesu Ca²⁺)

Příznaky akutní krátkodobé **hyperkalcemie** se projeví sníženou neurosvalovou dráždivostí, ospalostí, únavou, polyurií, zácpou a zvracením. Při dlouhodobé hyperkalcemii může dojít k poruše ledvin, vzniku močových konkrementů (oxalát vápenatý) a patologickému vápnění orgánů.

Příznaky **hypokalcemie** (tetanické křeče) se projeví při snížené koncentraci ionizovaného vápníku, přičemž celkový vápník může být normální. Dlouhodobá hypokalcemie vede ke změnám v mineralizaci kostí (osteomalacie, rachitis) a k poruše ledvinných funkcí.

FOSFOR

Fosfor patří mezi prvky pro organismus nepostradatelné. V organismu se vyskytuje anorganicky a organicky vázaný fosfor. **Anorganický fosfor** je většinou uložen v organismu extracelulárně, v plazmě se jedná o směs HPO_4^{2-} a H_2PO_4^- v poměru 4 : 1 při $\text{pH} = 7,4$. Většina organického fosforu v intracelulárním prostoru tvoří fosfor esterifikovaný např. v ATP, kreatinfosfátu, jako fosfát nukleotidů apod., v plazmě pak ve formě fosfolipidů (lipoidní fosfor). Zúčastňuje se na tvorbě kostní a zubní tkáně, má důležitou úlohu při **fosforylaci** – přeměně energie v buňkách. Podobně jako hladina vápníku i hladina fosfátů je kontrolována a regulována parathormonem, vitamínem D a kalcitoninem. Se změnami hladin hodnot fosforu v krvi a vylučování v moči se setkáváme za stejných okolností jako u vápníku, avšak často v zrcadlovém odraze. Metody stanovení jsou fotometrické a enzymové.

a) anorganický fosfor

Referenční hodnoty:

v séru:	dospělí:	0,7–1,6 mmol.l⁻¹
	děti:	až 2,2 mmol.l⁻¹
v moči:		25–50 mmol/den

Klinický význam:

Zvýšené koncentrace anorganického fosforu v séru **hyperfosfatemie** jsou způsobeny těžkým poškozením ledvin (chronická nefritida, tubulární insuficience), předávkováním vitamínem D, hypofunkcí štítné žlázy a příštítných tělísek, při hojení rozsáhlých zlomenin, mírně i po tělesných cvičeních a fyziologicky v době růstu u dětí. Snížené koncentrace v séru **hypofosfatemie** svědčí o hypovitaminóze vitamínu D (rachitis), poruchách střevního vstřebávání, hyperfunkci štítné žlázy a hyperparathyreóze. Přechodně také po požití cukrů, po infuzi glukosy, při nedostatečné výživě nebo při zvýšené ztrátě ledvinami (užívání diuretik).

b) lipoidní fosfor

Referenční hodnoty:

v séru: **3,2–3,6 mmol.l⁻¹**

Klinický význam:

Zvýšené koncentrace lipidního fosforu v séru mohou nastat po ozáření UV světlem, při hladovění nebo při některých jaterních chorobách.

HOŘČÍK

V organismu se hořčík nejvíce vyskytuje v kostech a ve svalech. V mimobuněčné tekutině se hořčík nalézá (méně jak 2 %) v ionizované formě a v menší míře vázaný na bílkoviny. V plazmě je hořčík rozložen podobně jako vápník:

difuzibilní (v komplexech a ionizované formě),

nedifuzibilní (pevně vázán na bílkovinu – albumin).

Referenční hodnoty:

v séru: **0,8–1,1 mmol.l⁻¹**

v moči: **0,6–5 mmol/den**

Klinický význam:

Příčinou zvýšené koncentrace v séru **hypermagnezemie** je chronická nedostatečnost ledvin s oligurií až anurií, nadměrné podávání hořčíku anebo akutní intoxikace alkoholem. Projevuje se útlumem nervosvalového přenosu, ospalostí, poklesem krevního tlaku, poruchami srdečního rytmu, dýchání a vědomí až zástavou srdce ($c > 8 \text{ mmol.l}^{-1}$). Snížené koncentrace hořčíku v krevním séru **hypomagnezemie** jsou způsobeny nedostatečným přívodem hořčíku potravou (hladovění), poruchami střevní absorpce (pankreatitida), při zvýšených ztrátách ledvinami (předávkování diuretiky) a při zvracení a průjmech. Také v těhotenství jsou hodnoty hořčíku nižší. Nedostatek hořčíku se projevuje závratěmi, zvýšením nervosvalové dráždivosti až křečemi (tetanie).

Při jeho nedostatku se zvýší nervosvalová dráždivost a naopak, při zvýšeném obsahu se tlumí centrální nervový systém. Hořčík je nepostradatelný pro činnost řady enzymů, kde působí jako aktivátor (např. u *fosfatas*). Rovněž je důležitý pro stabilitu ribozómů a mitochondrií. Hořčík stanovujeme metodou AAS, komplexometricky nebo fotometricky.

Iontově selektivní elektrody (ISE)

Měření z iontově selektivními elektrodami patří do kategorie potenciometrie. Základem potenciometrie je změna potenciálu vyvolaná akumulací náboje na rozhraní elektrody

s roztokem. V případě potenciometrických měření je možné látky stanovovat přímo (měřením příslušné veličiny, nebo nepřímo titrací vhodnými činidlem). Bylo navrženo mnoho typů elektrod, které dovolují přímé měření aktivity iontů. Tyto elektrody se nazývají iontově selektivní. Iontově selektivní elektroda je taková, u níž nastává mezi měřeným roztokem a povrchem elektrody výměna iontů, čehož je důsledek změny elektrického potenciálu elektrody. Tato změna v porovnání s potenciálem referentní elektrody umožňuje výpočet koncentrace iontů v roztoku. ISE přednostně reagují na určitý konkrétní druh iontů podle typu membrány, která odděluje zkoumaný roztok od elektrodového roztoku ve vnitřku elektrody. Elektrodový roztok má společný ion jako měřený roztok.

Pro měření s iontově selektivními elektrodami lze v zásadě použít jakýkoliv elektronický potenciometr nebo pH-metr, které mají dostatečně velký vstupní odpor.

Při měření s ISE lze postupovat tak, že se připraví řada roztoků o známé koncentraci, změří se jejich elektrodové potenciály (standardní roztoky jsou komečně dodávané). Z hodnot se sestrojí kalibrační přímka. Pak se změří elektrodový potenciál neznámých vzorků a hodnoty koncentrace se odečtou z kalibrační přímky.

PRAKTICKÁ ČÁST

1. Stanovení vápníku

Princip metody:

Při neutrálním pH tvoří vápenaté ionty s arsenazo III (1,8-dihydroxynaftalen-3,6-disulfonová kyselina 2,7-bis(azo-2-)fenylarsonové) komplex, který je vhodný k fotometrickému stanovení (modrý komplex - absorbance 650 nm). Intenzita zbarvení tohoto komplexu je přímo úměrná koncentraci vápníku ve vzorku. Metoda je lineární do 4 mmol.⁻¹.

Přístroje: spektrofotometr, stolní centrifuga.

Materiál a chemikálie: BIO-LA-TEST VÁPŇÍK Liquid 250 (Ca L 1 x 250) LYONORM KALIBRÁTOR, sada automatických pipet, plastové jednorázové zkumavky, plastová kyveta 1 cm

Činidlo: 100 mmol.l⁻¹ MES pufr (pH 6,5), 200 μmol.l⁻¹ arsenazo III.

Standard: 2,5 mmol.l⁻¹ Ca²⁺. Připraví se navážením 0,2498 g CaCO₃, který rozpustíme v 0,2 ml koncentrované HCl a doplníme do 1000 ml deionizovanou vodou.

Postup analýzy: Do jednotlivých zkumavek pipetujeme podle následující tabulky 13.

Tabulka 13. Stanovení vápníku

	Blank	Standard	Vzorek
Činidlo 1	1 ml	1 ml	1 ml
Destilovaná voda	10 µl	-	-
Standard	-	10 µl	-
Vzorek	-	-	10 µl

Směs se promíchá a inkubuje se 1 minutu při 37°C v 1 cm kyvetě (lze inkubovat i při teplotě 25°C nebo 30°C). Změří se absorbance vzorku A_{vz} a standardu A_{st} proti blanku činidla při 650 nm. Zbarvení je stabilní po dobu 1 hodiny.

Výpočet:

$$\text{Vápník (mmol.l}^{-1}\text{)} = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \cdot c_{st},$$

kde c_{st} je koncentrace standardu.

Poznámky:

Ke stanovení lze použít sérum nebo heparinovou plazmu. Stanovení v moči provádíme po zředění moče redestilovanou vodou v poměru 1+2 a po okyselení několika kapkami 0,1 mol.l⁻¹ HCl na hodnotu pH 3-4 (výsledek násobíme 3x). Objem vzorků (současně standardu i blanku) může být zvětšen až na 25 µl při zachování množství činidla (výsledek násobíme 2,5 x). Sklo používané pro stanovení vápníku musí být dokonale čisté a vyčleněné pro tyto účely. Po běžném mytí se doporučuje namočit sklo přes noc do asi 2% chelatonu 3 (EDTA) ve zředěném amoniaku 1+1, pak opláchnout dokonale redestilovanou vodou a vysušit.

Přepočet jednotek:

$$\text{mg.l}^{-1} \times 0,025 = \text{mmol.l}^{-1}$$

2.Stanovení fosforu***Princip metody:***

Kyselina fosforečná reaguje v kyselém prostředí s vanadičnanem a molybdenanem amonným za vzniku žlutě zbarvené kyseliny molybdátovanadátosfosforečné (absorbance 380-410 nm). Obsah anorganického fosforu v séru nebo moči se stanoví po deproteinaci. Stanovení lipidního fosforu se provádí ze sraženiny po její mineralizaci.

Přístroje: spektrofotometr, stolní centrifuga.

Materiál a chemikálie: BIO-LA-TEST FOSFOR (P 80), LYONORM KALIBRÁTOR, sada automatických pipet, plastové jednorázové zkumavky, plastové kyvety 1 cm.

Činidlo 1: 5 mmol.l⁻¹ fosforečnanový iont, 0,61 mol.l⁻¹ kyselina trichloroctová

Činidlo 2: 1,47 mol.l⁻¹ kyselina trichloroctová

Činidlo 3: 2 mmol.l⁻¹ vanadičnan amonný

Činidlo 4: 30 mmol.l⁻¹ molybdenan amonný.

Pomocné roztoky:

Mineralizační směs: Připraví se smícháním 2 ml destilované vody se 16 ml 70 % kyseliny chloristé a 2 ml 65 % kyseliny dusičné.

Pevný hydroxid sodný, p.a.

Příprava pracovních roztoků:

Roztok 1: činidlo 2 se smíchá se 70 ml destilované vody. Roztok je stálý.

Roztok 2: (pro stanovení anorganického fosforu) 1 díl činidla 3 se smíchá s 1 dílem činidla 4. Roztok se uchovává v PE lahvi.

Roztok 3: (pro stanovení lipidního fosforu) V 50 ml činidla 4 se rozpustí 0,2 g hydroxidu sodného. Takto upravený roztok se smíchá s činidlem 3 v poměru 1+1. Roztok je stabilní 1 den.

Roztok 4: činidlo 1 a roztok 1 se ředí v poměru 1+1. Roztok obsahuje 2,5 mmol.l⁻¹ fosfor. Stabilita je několik týdnů při (+15 až 25)°C.

Postup analýzy:

Stanovení anorganického fosforu: Postup stanovení anorganického fosforu je uveden v tabulce 14.

Tabulka 14. Stanovení anorganického fosforu

	Vzorek (ml)	Standard (ml)	Kontrolní roztok (ml)
Sérum (nebo ředěná moč)	0,20	-	-
Roztok 4	-	0,20	-
Destilovaná voda	0,60	0,60	0,80
Roztok 1	0,80	0,80	0,80

Promíchá se a po 10 minutách se vzorek odstředí 10 minut při 3000 g.

Supernatant	0,80	0,80	0,80
Roztok 2	1,00	1,00	1,00
Promíchá se a po 20 minutách se změří absorbance vzorku při (380-410 nm) A_{vz} a standardu A_{st} proti kontrolnímu roztoku.			

Moč se ředí destilovanou vodou v poměru 1+4 (výsledek se násobí 5x).

Stanovení lipidního fosforu

Ke sraženině po deproteinaci se přidá 0,50 ml mineralizační směsi, varná kulička a zahřívá se opatrně na vzdušné lázni, až se sraženina oddělí od dna. Pak se obsah zkumavky zahřívá do mírného varu, až se roztok odbarví a objeví se bílé dýmy kyseliny chloristé. Roztok se nechá vychladnout, přidá se 2,5 ml roztoku 3 a 2,00 ml destilované vody a promíchá se. Po 5 min se měří absorbance vzorku (A_{vz}) proti kontrolnímu roztoku (0,20 ml mineralizační směsi a 2,50 ml roztoku 3 se smíchá s 2,30 ml destilované vody). Standard se připraví a zpracuje stejným způsobem jak je popsáno výše při stanovení anorganického fosforu.

Výpočet:

$$\text{Fosfor anorganický (mmol.l}^{-1}\text{)} = 2,5 \cdot \frac{A_{vz}}{A_{st}}$$

$$\text{Fosfor lipidní (mmol.l}^{-1}\text{)} = 2,5 \cdot 1,39 \cdot \frac{A_{vz}}{A_{st}}$$

Poznámka:

Interferují fosfáty z mycích prostředků. Doporučuje se mytí chromsírovou směsí.

3. Stanovení hořčíku

Princip metody:

Hořčík tvoří v alkalickém prostředí barevný komplex s kalmagitem (kyselina 3-hydroxy-4-(2-hydroxy-5-methylfenylazo)-1-naftalensulfonová). Komplexon EGTA eliminuje interferenci vápníku. Analýza se provádí v částečně nevodném prostředí 2-methyl-2-amino-1-propanolu. Zbarvení komplexu se měří při 540 nm. Metoda je lineární do 2,03 mmol.l⁻¹.

Přístroje: spektrofotometr, stolní centrifuga, termostat 37°C.

Materiál a chemikálie: BIO-LA-TEST HOŘČÍK Liquid 250 (Mg L 2 x 125), LYONORM KALIBRÁTOR, sada automatických pipet, plastové jednorázové zkumavky, plastové kyvety 1 cm

Činidlo 1: 1 mol.l⁻¹ 2- methyl-2-amino-1-propanol, 0,21 mmol.l⁻¹ EGTA

Činidlo 2: 0,30 mmol.l⁻¹ kalmagit

Činidlo 3: standard 0,824 mmol.l⁻¹ Mg²⁺.

Pracovní roztok:

Smíchá se 1 díl činidla 1 s jedním dílem činidla 2. Stabilita pracovního roztoku je 24 hodin při teplotě (+20 až + 25)°C a 4 dny při (+2 až +8)°C.

Postup analýzy: Do zkumavek pipetujeme podle tabulky 15:

Tabulka 15. Stanovení hořčíku

	Blank činidla	Standard	Vzorek
Pracovní roztok	1 ml	1 ml	1 ml
Vzorek	-	-	10 µl
Standard	-	10 µl	-
Destilovaná voda	10 µl	-	-

Promíchá se a inkubuje se 5 minut při 37°C (lze provést i při 25 a 30°C). Změří se absorbance vzorku při 520 nm A_{vz} a standardu A_{st} proti blanku činidla. Zbarvení je stabilní po dobu 1 hodiny.

Výpočet:

$$\text{Hořčík (mmol.l}^{-1}\text{)} = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \cdot c_{st},$$

kde c_{st} je koncentrace standardu.

Poznámky:

Ke stanovení lze použít sérum nebo heparinovou plazmu. Při stanovení v moči ředíme destilovanou vodou v poměru 1+3 a takto zředěný vzorek moče upravíme několika kapkami 0,1 mol.l⁻¹ HCl na hodnotu pH 3-4. Výsledek násobíme 4x. Sklo pro analýzu hořčíku musí být dokonale čisté a vyčleněné jen pro tyto účely. Po běžném mytí se doporučuje namočit sklo přes noc do asi 2% EDTA ve zředěném amoniaku 1+1, pak dokonale opláchnout redestilovanou vodou a vysušit.

Přepočet jednotek:

$$\text{mg/100 ml} \times 0,412 = \text{mmol.l}^{-1}$$

mg/24 h x 0,0412 = mmol/24 h

4. Stanovení sodíku, draslíku, vápníku a chloridů pomocí iontově selektivních elektrod

Princip metody

Iontově selektivní elektrody pro stanovení sodíku, draslíku, vápníku a chloridů reagují každé selektivně na konkrétní ion přítomný v roztoku změnou potenciálu, který je závislý na jejich koncentraci. Porovnává se elektrodový potenciál standardu s elektrodovým potenciálem neznámého vzorku (vzorek séra).

Přístroje a pomůcky:

ionometr, iontově selektivní elektrody firmy Theta pro stanovení sodíku, draslíku, vápníku a chloridů

Materiál a chemikálie:

komerčně zakoupené standardy přesných koncentrací

Pracovní postup:

S jednotlivými iontově selektivními elektrodami provádíme kalibraci pomocí standardního roztoku, případně roztok vhodně naředíme a tak můžeme získat kalibrační přímkou. Ponořením elektrody do roztoku standardu, zjistíme potenciál nebo řadu potenciálů (při použití vhodně zředěných roztoků), s kterých vytvoříme kalibrační přímkou. Ponořením elektrody do neznámého vzorku (vhodně naředěné sérum), zjistíme potenciál a z kalibrační přímkou odečteme koncentraci příslušného iontu.

