

Stanovení minerálů a stopových prvků

Roman Kand'ár



- Prvně: správně řečeno je, že stanovují:
 - Ionty sodné, popř. ionty sodíku a ne sodík !!!
 - Sodík je totiž kov a dosti reaktivní
 - Vzpomeňte, co se stane, vhodíme-li sodík do vody

- Jaké minerály a stopové prvky jsou nejčastěji v laboratořích klinické biochemie stanovovány ?
 - Ionty Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+}
 - Fosfáty (fosforečnany)
 - Ionty železa, mědi

- Ty další pak především ve specializovaných laboratořích, například v rámci toxikologie

- A které minerály a stopové prvky budeme stanovovat my ?
 - Ionty Ca^{2+} , Mg^{2+} , fosfáty a ionty železa
- Jaké metody se používají pro stanovení minerálů a stopových prvků ?
 - Na^+ , K^+ , Cl^-
 - **Elektrochemické metody (iontově selektivní elektrody, ISE)**
 - Plamenová fotometrie je již historie (Na^+ , K^+ , popř. Li^+)
 - Proč ?
 - » Dnes jsou laboratoře klinické biochemie automatizovány (vybaveny moderními automatickými analyzátory s ISE modulem)
 - » Proč tedy pořizovat zbytečně navíc plamenový fotometr, který je náročný na obsluhu
 - » **?** Otázka: Vysvětlete, proč se významně odlišují hodnoty hladin Na^+ a K^+ naměřené plamenovým fotometrem a iontově selektivní elektrodou

- **Ca²⁺, Mg²⁺, fosfáty, ionty železa (Fe³⁺)**
 - Dominantní jsou fotometrické metody
- **Ionty těžkých kovů (toxikologie)**
 - AAS (atomová absorpční spektrometrie)
 - ICP-OES (emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem)

- **Definitivní metody**
 - Neutron aktivační analýza
 - Hmotnostní spektrometrie s isotopovým zředováním
 - Jen několik specializovaných pracovišť na světě, velmi drahé a náročné na obsluhu

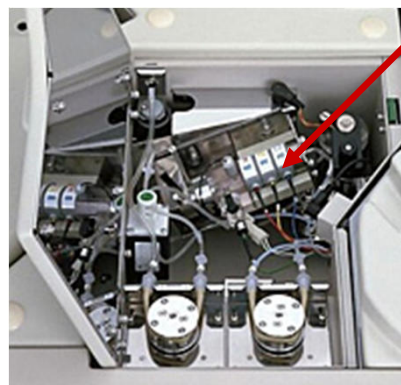
ISE



Stolní ionometr

<http://www.wtwkucerova.cz/ph/p740.jpg>

ISE součástí biochemického analyzátoru, zde Olympus AU 640, který je ve výbavě naší katedry



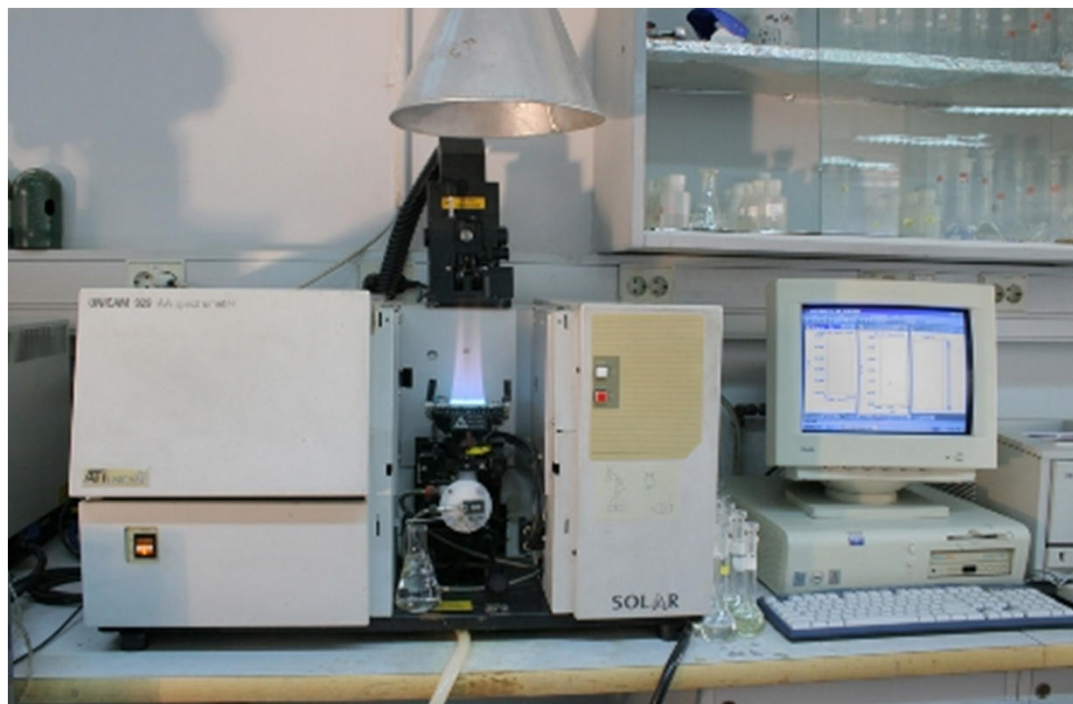
http://www.inter-med.web.tr/DI_CC_AU640_KF_5.jpg

Plamenový fotometr



http://www.thermofisher.cz/editor/filestore/product_details/7746_0005A.jpg

AAS



http://www.qcap-egypt.com/RadControls/Files/IMG_5163%20AAS.JPG



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

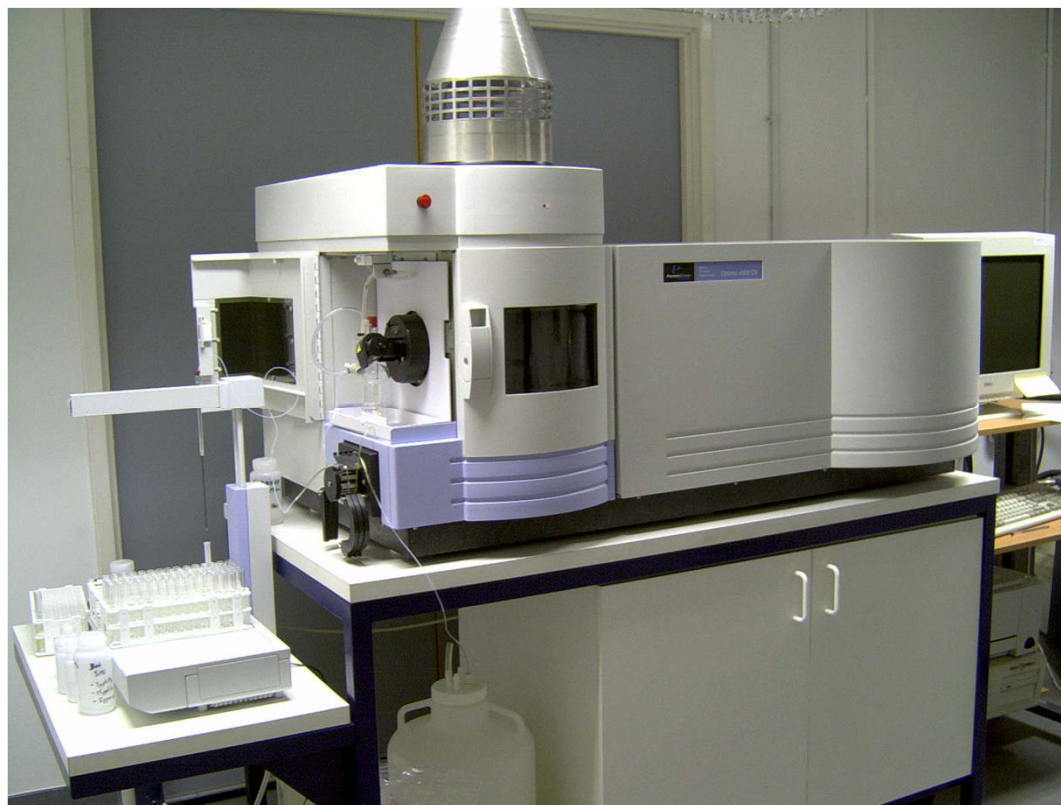


Univerzita
Pardubice

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

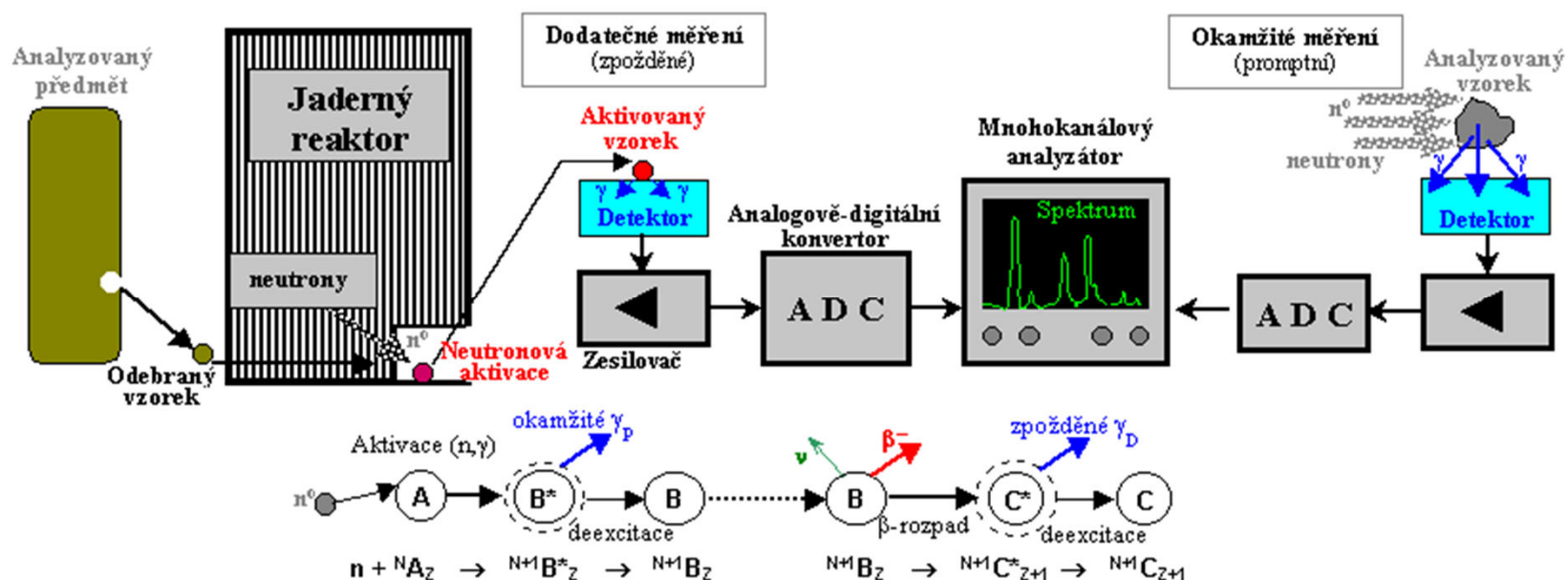
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

ICP-OES



<http://www.noc.soton.ac.uk/geochem/Facilities%20Links/images/ICP-OES.JPG>

Neutron aktivační analýza



<http://astronuklfyzika.cz/NeutronAktivAnalýza.gif>

ID-MS

Hmotnostní spektroskopie s isotopovým zředováním



http://www.geotargets.ca/en/technology_files/triton.jpg

- Nyní si probereme principy stanovení jednotlivých minerálů (stopových prvků), které budeme v laboratorním cvičení provádět
- Prvně však něco málo k návodu a co je to vlastně diagnostický set
- Diagnostický set
 - Vlastně krabice obsahující chemikálie potřebné pro stanovení dané látky, někdy standard („kalibrátor“)
 - A návod
 - Ty budete mít k dispozici. Omlouvám se, že většina je v jazyce anglickém.



- Probereme si návod pro stanovení iontů Mg^{2+} , ten je v češtině.
- Takže připravte si návod a jdeme na to:
 - Hořčík Liquid 250 (Mg L 2 x 125)
 - To nám říká, že budeme-li striktně dodržovat návod, měl by být tento set na asi 250 stanovení
 - **Princip metody**
 - To byste měli znát
 - Zjednodušíme si to:
 - **Ionty Mg^{2+} s jistou látkou (zde kalmagit) tvoří v alkalickém prostředí barevný komplex. Jelikož ionty Ca^{2+} také reagují, musí se vyvázet, např. EGTA (ethylenglykoltetraoctová kyselina)**
 - EGTA má mnohem větší afinitu k Ca^{2+} než k Mg^{2+}
 - Je pak jasné, že to není zrovna vysoce selektivní metoda pro stanovení Mg^{2+} , ale budiž

- Činidla
 - To jsou lahvičky s roztoky obsažené v setu
 - Zde máme 3, přičemž R3 je standardní roztok iontů Mg^{2+}
- Příprava a stabilita pracovních roztoků
 - Ujasněme si to:
 - Činidla: ty jsou dodávány výrobcem
 - Pracovní roztok: ten si připravujeme my, např. smícháním 2 činidel v nějakém poměru
 - Proč výrobce nedodává přímo pracovní roztok ?
 - » Protože činidla jsou sama o sobě stabilní třeba i 1 rok, naproti tomu pracovní roztoky několik hodin, popřípadě dní !
 - Takže mi si připravíme před vlastním měřením pracovní roztok tak, že si smícháme jeden díl činidla R1 s jedním dílem činidla R2 (pozn.: písmeno R od anglického slova reagent = činidlo, reagencie). Je dobré si připravit tolik, kolik budeme potřebovat, plus něco navíc
 - Stabilitu pracovního roztoku výrobce udává: 1 den při laboratorní teplotě a 4 dny, bude-li roztok v chladničce
 - Poznámka: vše řádně popisujte, ať víte co je co !

- **Vzorky**
 - **Biologický materiál, pro který se tento set hodí, nebo-li je odzkoušený**
 - **Sérum (hemolýza vadí !; co tedy vadí ?)**
 - **Plazma (jako antikoagulační činidlo je použit heparin)**
 - » **Proč ne například EDTA ? Zamyslete se, popřípadě vyhledejte. ?**
 - **Mozkomíšní mok**
 - **Moč**
- **Kalibrace**
 - **Doporučují svůj standard**
 - **Pokud máte sůl hořečnatou ve vysoké čistotě (např. $MgCl_2$), pak můžete použít z ní připravený roztok. Pozor však na vodu. Musí být **deionizovaná**, nejlépe o vodivosti $0,055 \mu S$**
 - **Jak se vyrábí deionizovaná voda ? ?**
- **Kontrola kvality**
 - **Opět doporučují jisté kontroly. Můžete použít jakoukoli certifikovanou kontrolu**

- **Postup měření**
 - **Vlnová délka**
 - Nejčastěji absorpční maximum toho co měříme (zde vzniklého komplexu Mg^{2+} s kalmagitem)
 - **Kyveta**
 - Nemusí být vždy 1-cm, ale pokud je jedna kyveta pro vzorek, druhá pro standard a třetí pro blank, pak musejí mít stejný rozměr, ideální by bylo měřit vše v jedné kyvetě, ale to je nereálné, protože po změření musíte kyvetu dokonale propláchnout a vysušit. V praxi je to řešeno tak, že kyvety v automatických analyzátoch bývají „prakticky“ stejně veliké (mají stejnou vzdálenost absorpčního prostředí)
 - My budeme používat devítikanálový fotometr, tam je to ještě obtížnější. Více si řekneme na laboratorním cvičení
 - **Teplota: 37 °C (to znamená, že kyvetový prostor musí být termostatovaný)**
 - **Objemový poměr sérum/reakční směs: 1/101**
 - » To znamená, že nemusíte dodržovat objemy dané v tabulce, ale poměr musí být zachován
 - » Tedy: pipetuji-li 10 μ l séra a přidávám 1,00 ml pracovního roztoku, pak objem reakční směsi je 10 + 1000 = 1010, takže poměr je 10/1010, krátíme deseti a výsledek je 1/101
 - » Budeme-li pipetovat 5 μ l séra, pak musíme přidat 0,50 ml pracovního roztoku, tedy také dvakrát méně, objem reakční směsi je 5 + 500 = 505, takže poměr je 5/505, krátíme pěti a výsledek je opět 1/101

- **Důležité !**
 - Přesně a správně pipetovat
 - Používat vysoce čisté zkumavky, mikrozkušavky, kádinky, válce apod.
- **Co znamená inkubujeme 5 minut a zbarvení je stabilní po dobu 1 hodiny**
 - Nic jiného než, že měřit absorbanci vzniklého komplexu je nutné mezi pěti minutami a jedné hodiny
 - Výrobce setu garantuje, že po pěti minutách „prakticky“ zreagovaly veškeré ionty Mg^{2+} s kalmagitem a po jedné hodině buď dochází k rozpadu vzniklého komplexu nebo se začíná zvyšovat interference dalších látek (možná iontů Ca^{2+})
- **Výpočet:**
 - **Využití Lambert-Beerova zákona:**

$$A_{ST} = c_{ST} \times l_{ST} \times \varepsilon_{ST}$$

$$A_{VZ} = c_{VZ} \times l_{VZ} \times \varepsilon_{VZ}$$

- ε : molární absorpční koeficient toho komplexu (tedy je jedno jestli máme ionty Mg^{2+} ze standardu nebo ze vzorku, pořád jsou to Mg^{2+} ionty, které reagují s kalmagitem za vzniku komplexu, takže vykrátíme)
- l : délka absorpčního prostředí (kyvety). Měla by být stejná nebo stejné velikosti jak pro vzorek, tak také pro standard. Takže také pokrátíme



- **Takže:**

$$c_{VZ} = \frac{A_{VZ}}{A_{ST}} \times c_{ST}$$

- Ta změna (Δ) je zde matoucí, protože my odečítáme absorbanci vzorku a standardu proti blanku a na blank „vynulujeme“ fotometr
- Co je to vlastně blank ?
 - Někdy se překládá jako slepá, slepé činidlo
 - Takový „ideální blank“ obsahuje všechny látky jako vzorek, jenom chybí ta látka, kterou stanovujeme, v našem případě ionty Mg^{2+}
 - Takže zde je ideální blank jen pro standard
 - Ovšem sežeňte sérum (nulové sérum), které neobsahuje žádné ionty Mg^{2+}
 - Navíc další látky obsažené v biologickém materiálu (sérum) jsou v různých hladinách
- **Přepočet jednotek**
 - **Není co dodat**
- **Referenční hodnoty**
 - **Definice viz přednášky**
 - **Znát, neznát, vždyť je lze kdekoli najít, navíc se liší**
 - **Díky čemu se liší ?**
 - **Použitá metoda, pohlaví, věk, rasa, životní styl**
 - **Takže zhruba orientačně vědět, že hodnoty jsou někde kolem 1 mmol/l (sérum)**

- **Výkonnostní charakteristiky**
 - Jde o tzv. analytické parametry dané soupravy
 - **Linearita:** říká nám, v které oblasti koncentrací je lineární závislost. Mimo tuto oblast mohou být již výsledky zkreslené. Zde uváděný údaj do 2,03 mmol/l je neúplný, neboť chybí hodnota pro spodní hranici, tudíž mělo by se uvádět, že linearita je od – do. Pravděpodobně spodní hodnota je 0,40 mmol/l, hodnota uváděná jako mez stanovitelnosti
 - **Mez detekce:** je obtížné definovat, jsou totiž různé definice
 - "Naměřená hodnota veličiny získaná daným postupem měření, pro kterou je pravděpodobnost nepravdivého tvrzení o nepřítomnosti složky v materiálu β , přičemž pravděpodobnost nepravdivého tvrzení o její přítomnosti je α ." (1, článek 4.18). TNI 01 0115:2009. Mezinárodní metrologický slovník - Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM).
 - » Co tomu říkáte ?
 - Naštěstí v tuto dobu pro nás nedůležité
 - **Mez stanovitelnosti:**
 - **Mez stanovitelnosti metody je nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno jako exaktní hodnota s požadovanou hodnotou nejistoty.**
 - » To už je srozumitelnější. Tato hodnota by neměla být nižší než nejmenší bod kalibrace, protože odečítáte koncentraci z kalibrace, extrapolace je nepřipustná. Navíc kalibrace by měla být lineární
 - **Pracovní rozsah**
 - To je zhruba ta linearita



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



Univerzita
Pardubice

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

- **Přesnost**
 - Intra-assay
 - Inter-assay
- **Pravdivost**
 - Bias
- **Porovnání s komerčně dostupnou metodou**
 - Lépe s referenční metodou, ještě lépe s definitivní metodou

- **Více přednášky**

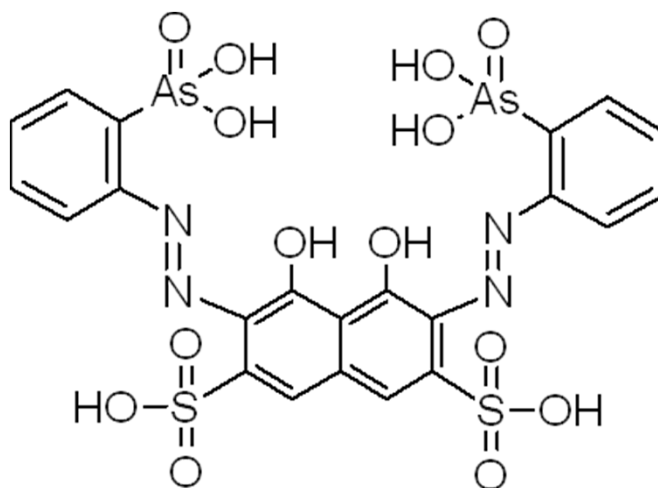
- **Interference**
 - Zde je uvedeno, které látky mohou s daným stanovením interferovat a od kterých přibližně koncentrací

- **Tak to je zhruba vše k danému setu**



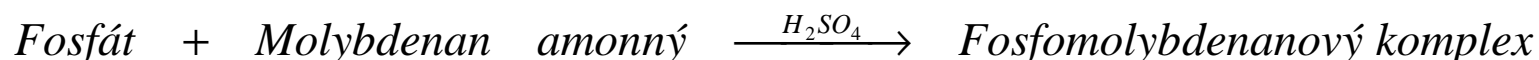
Principy metod

- Jak již bylo řečeno, pro vás je důležité znát principy, a to ještě obecně
- Hlavně se neučte postupy, není to důležité
- Princip stanovení iontů Mg^{2+} jsme si již popsali
- Nyní princip stanovení iontů Ca^{2+}
 - Při neutrálním pH tvoří ionty Ca^{2+} s arsenazo III komplex. Intenzita zbarvení tohoto komplexu je přímo úměrná koncentraci iontů Ca^{2+} ve vzorku
 - Jednoduše řečeno, opět tvorba barevného komplexu, zde výrobce používá arsenazo III, ale mohou to být i jiné látky s kterými tvoří ionty Ca^{2+} komplex.

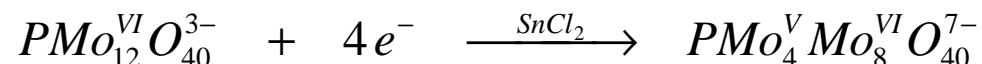


- **Stanovení fosfátů**

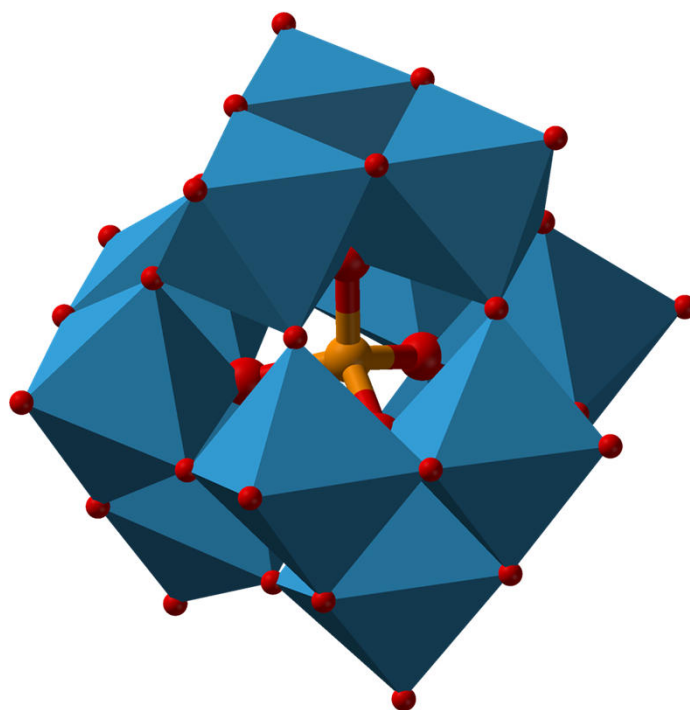
- HPO_4^{2-} a H_2PO_4^- v poměru asi 4:1 při pH krve 7,40
- Amonium molybdenan tvoří s fosforem za přítomnosti kyseliny sírové fosfomolybdenanový komplex vhodný pro fotometrické stanovení v UV oblasti
 - Děsná formulace, děsné názvosloví, ...
- Takže uveďme to na pravou míru:



- Je to zjednodušené, ale postačující
- Molybdenan amonný, je myšleno
 - *ortho*-Molybdenan amonný $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_4$ nebo
 - Heptamolybdenan amonný $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$
 - Vzniká komplex: $(\text{NH}_4)_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ (nažloutlý)
 - Redukcí vzniká molybdenová modř (také jedna z možností stanovení):



- Samozřejmě je to ještě složitější



<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/60/Phosphotungstate-3D-polyhedra.png>

- Stanovení iontů železa

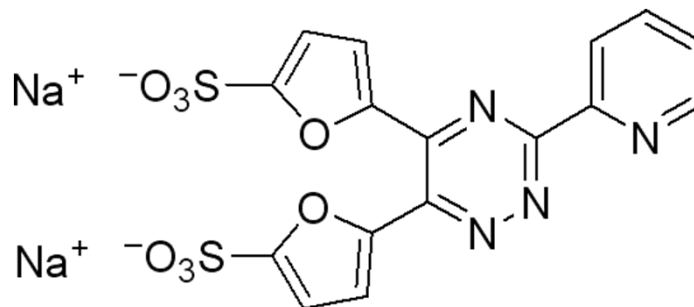
- Železo se v pufru o pH 4,8 uvolňuje z vazby na transferrin a redukuje se na železnaté ionty. Uvolněné ionty Fe^{2+} tvoří s Ferene S {(3-(2-pyridil)5,6-bis-2-(5-furylsulfonová kyselina)-1,2,4-triazin)} stabilní barevný komplex. Intenzita zabarvení je přímo úměrná množství železa ve vzorku. Interference mědi je eliminována reakčními podmínkami a přidavkem maskujícího činidla.

- Ujde to, až na ten pyridil

- Takže to opět zjednodušíme

- Ionty železa (Fe^{3+}) se okyslením uvolňují z vazby na transferrin (poznámávám, že 1 molekula transferrinu váže 2 ionty Fe^{3+}), poté následuje redukce na ionty Fe^{2+} , které reagují s danou látkou za vzniku barevného komplexu

- Jinak 3-(2-pyridyl)-5,6-di(2-furyl)-1,2,4-triazin-5',5''-disulfonová kyselina vypadá takto



<http://www.sigmaaldrich.com/structureimages/42/mfcd00040642.gif>