

# Optické metody Absorpční fotometrie

- Kvantitativní hodnocení změny intenzity záření po průchodu analytickým prostředím
- **Zákon Lambert-Beerův:**

$$\log \frac{\Phi_0}{\Phi} = A = a \cdot c \cdot l$$

$\Phi_0$  = světlo vstupující do měřeného prostředí

$\Phi$  = světlo z měřeného prostředí vystupující

$A$  = absorbance

$a$  = absorpční koeficient pro danou vlnovou délku

$c$  = koncentrace roztoku

$l$  = délka optické dráhy (tj. tloušťka vrstvy roztoku)

# Optické metody – Absorpční fotometrie

- Absorbance je přímo úměrná látkové koncentraci a tloušťce absorbující vrstvy
- Fotometry – filtry
- Spektrofotometry - monochromátor
- **3 základní části :**
  - zdroj (žárovka, výbojky)
  - filtr nebo monochromátor (vstupní a výstupní štěrbina, mřížka)
  - detektor (fotonka, fotonásobič, diodové pole)

# Optické metody – Vertikální fotometrie

## Paprsek prochází kyvetou vertikálně

### ■ Světlovody

- skleněná vlákna přivádějí světlo: ze zdroje do osmi nebo více jamek najednou, odvádějí prošlé světlo k detektoru

### ■ Určení:

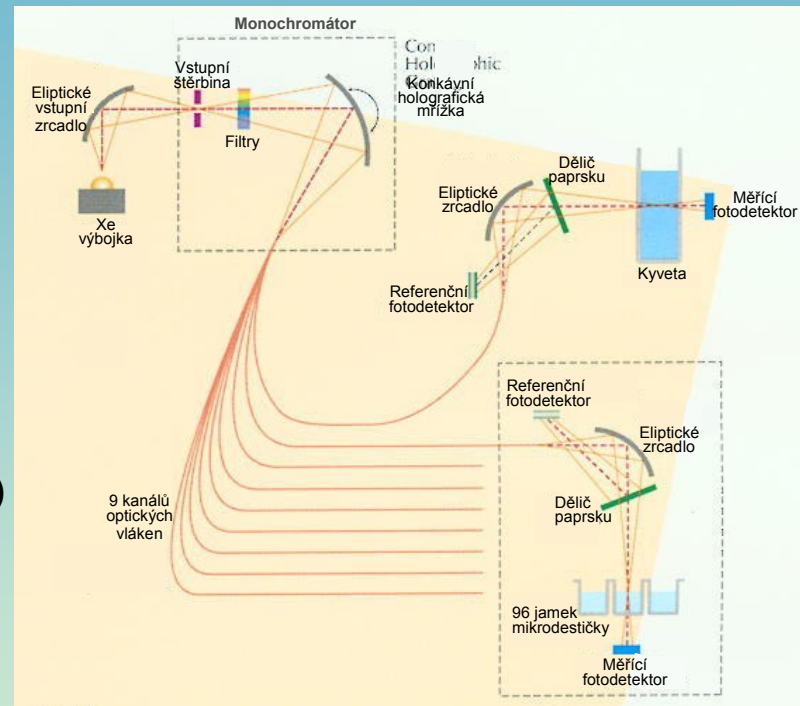
- mikrotitrační destička (měření 5 s)
- proužek s 8 jamkami

### ■ Konstantní plocha kruhové základny:

- pro stejnou koncentraci je **konstantní součin absorbance a délky optické dráhy** roztokem:

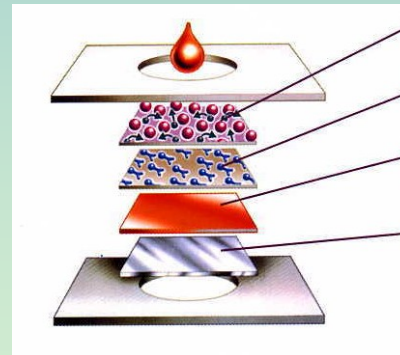
$$A_1 \cdot l_1 = A_2 \cdot l_2$$

### ■ Krátká optická dráha ( $\approx 3$ mm) solidní výsledky.



# Optické metody – Reflexní fotometrie

- **Odražené záření** od homogenně zbarvené podložky
- **Matrice:** impregnovaná **vlákna** nebo **vícevrstvý film**
- Impregnovaná vlákna – plná krev, sérum, plasma, moč
- Vícevrstvý film
  - homogenní matrice (sérum, plasma)



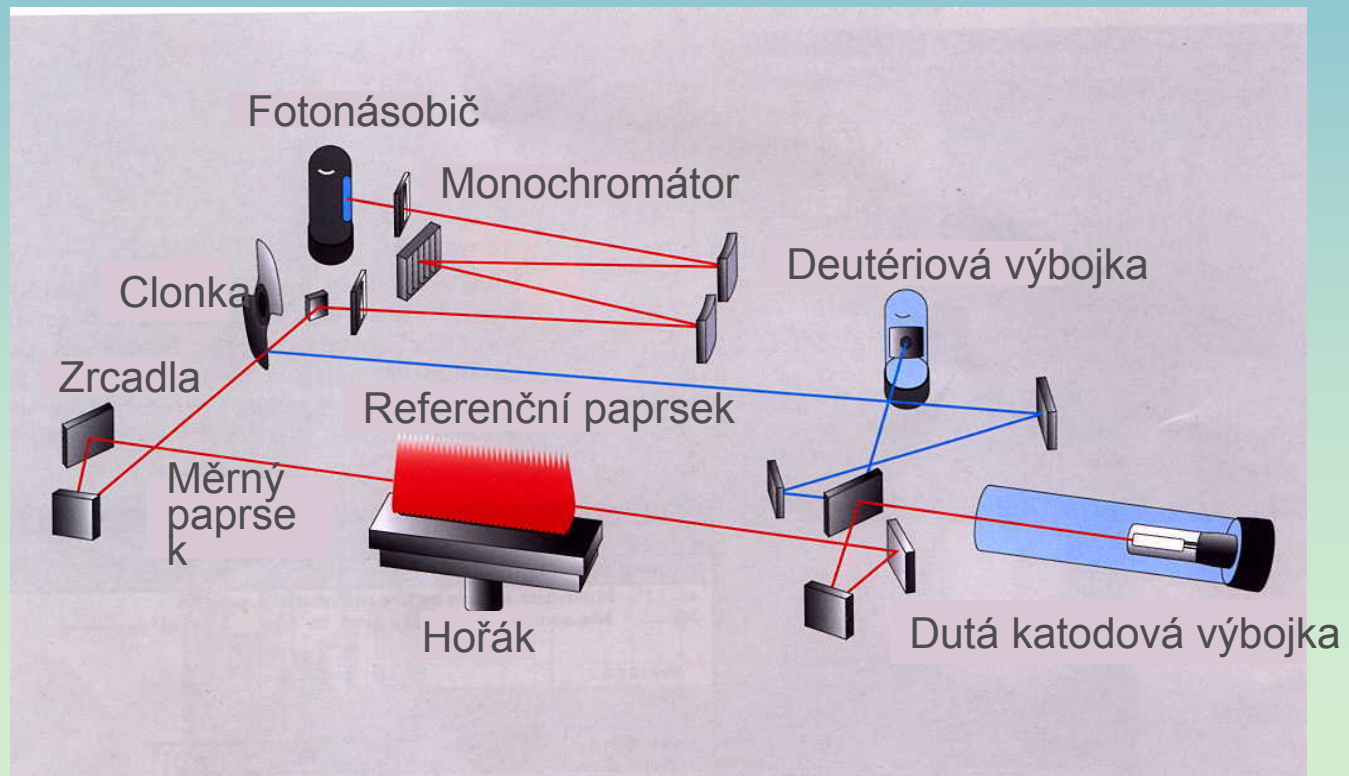
Suchá činidla aktivována vodou obsaženou ve vzorku

# Optické metody – Atomová absorpční spektrofotometrie

- Absorpce elektromagnetického záření v UV a VIS
- Atomizace 2000 až 3000 °C
- **Volné atomy (Ca, Mg, Cu, Zn, Fe) absorbují výhradně záření takových vlnových délek, které mohou samy vyzařovat**
- **Paprsek světla vhodné vlnové délky**
  - prochází plamenem, do něhož je rozprašován vzorek
  - veden přes **elektrickou pec**, do které se zavádí vzorek (citlivější)

# Optické metody – Atomová absorpční spektrofotometrie

- Zdroj: **dutá katodová výbojka** (katoda z kovu, pro který je lampa určena)
- Izolace analyzované spektrální čáry **monochromátorem** (mřížka)
- Detektor: **fotonásobič**

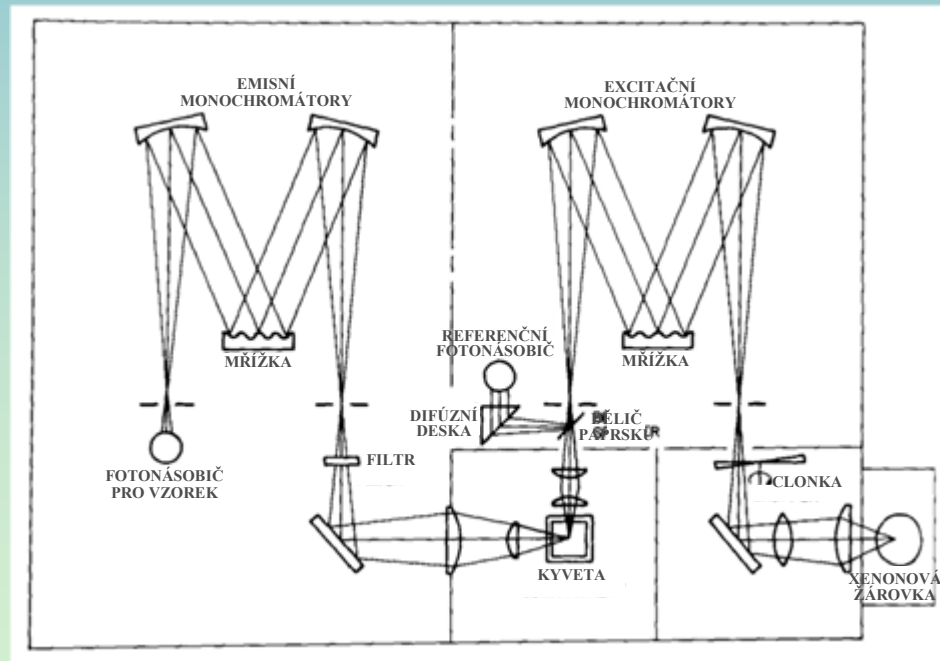


# Optické metody – Fluorimetrie

- **Fotoluminiscence** – po ozáření látky vyzařují světlo
  - ➔ **intenzita je přímo úměrná koncentraci fluoreskující sloučeniny**
- Emitované záření má vyšší vlnovou délku než excitační záření
  - méně energie

# Optické metody – Fluorimetrie

- Základní konstrukce fluorimetru - měří pod úhlem  $90^\circ$  :
  - zdroj: žárovka nebo xenonová výbojka
  - 2 optické separační prvky: filtr nebo monochromátor
  - kyveta s roztokem měřeného vzorku
  - fotonásobič





# Optické metody – Chemiluminiscence

- Excitace fotonů vyvolána chemickou reakcí:
  - po nástřiku syntetizovaného činidla
  - s biologickou substancí (luciferasa světlušek - **bioluminiscence**)
  - oxidací na anodě (**elektrochemiluminiscence**)
- Uspořádání za kyvetou odpovídá fluorimetrum
- **Přímá emise fotonu** - krátké záblesky světla
- **Transfer energie na fluoreskující sloučeniny** - dlouhodobá světelná emise

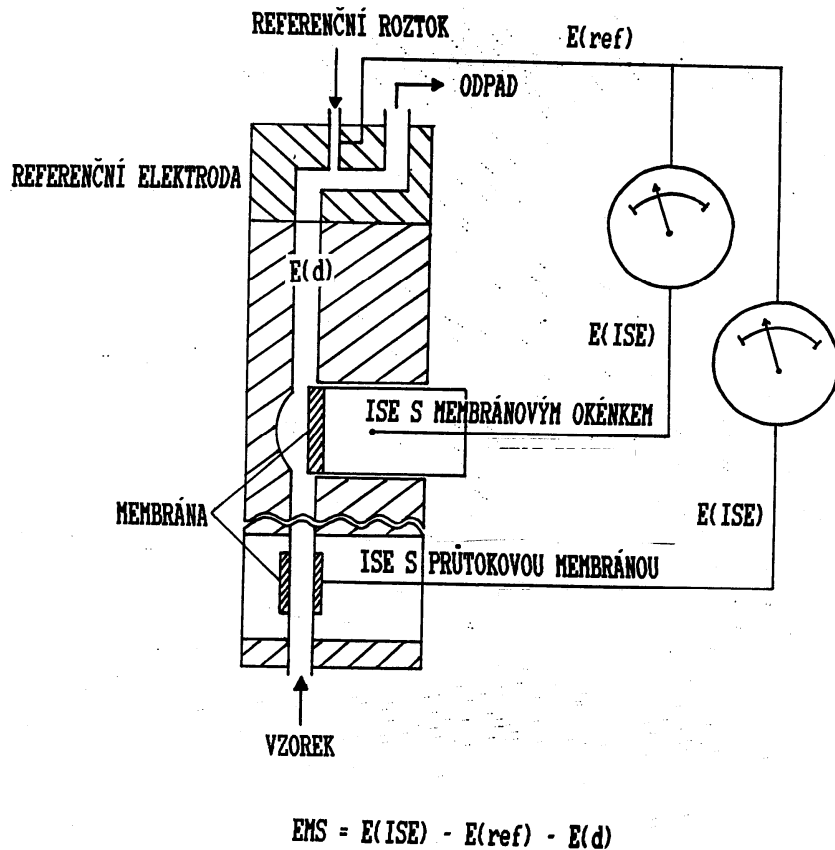
# Optické metody – Turbidimetrie

- **Měření procházejícího světla zeslabeného rozptylem na částicích**
- Reprodukovatelné a stálé suspenze
  - **ochranné koloidy** (polyetylenglykol).
- Měření absorpčními fotometry a spektrofotometry
- Citlivost - nepřímo úměrná vlnové délce
- **Použití: imunochemické metody**

# Optické metody – Nefelometrie

- Nefelometrie je o řád citlivější než turbidimetrie
- Měření intenzity **difusně rozptýleného světla** na dispergovaných částicích
- **Laserový nefelometr**
  - Zdroj helium-neonový laser (1 vlnová délka)
  - Detektor (fotonka nebo fotonásobič) pod úhlem 5 - 35 °
- **Konvenční nefelometry**
  - Zdroj žárovka nebo xenonová výbojka (interferenční filtr)
  - Detektor pod úhlem 70 - 90°

# Elektrochemické metody – Potenciometrie



Měří se rozdíl potenciálů mezi dvěma elektrodami

- **referenční** (srovnávací) má konstantní potenciál
- **indikační** (měrná) potenciál závisí na aktivitě měřeného analytu ve zkoumaném roztoku
- napětí mezi oběma elektrodami se měří **digitálním voltmetrem**

# Elektrochemické metody – Potenciometrie

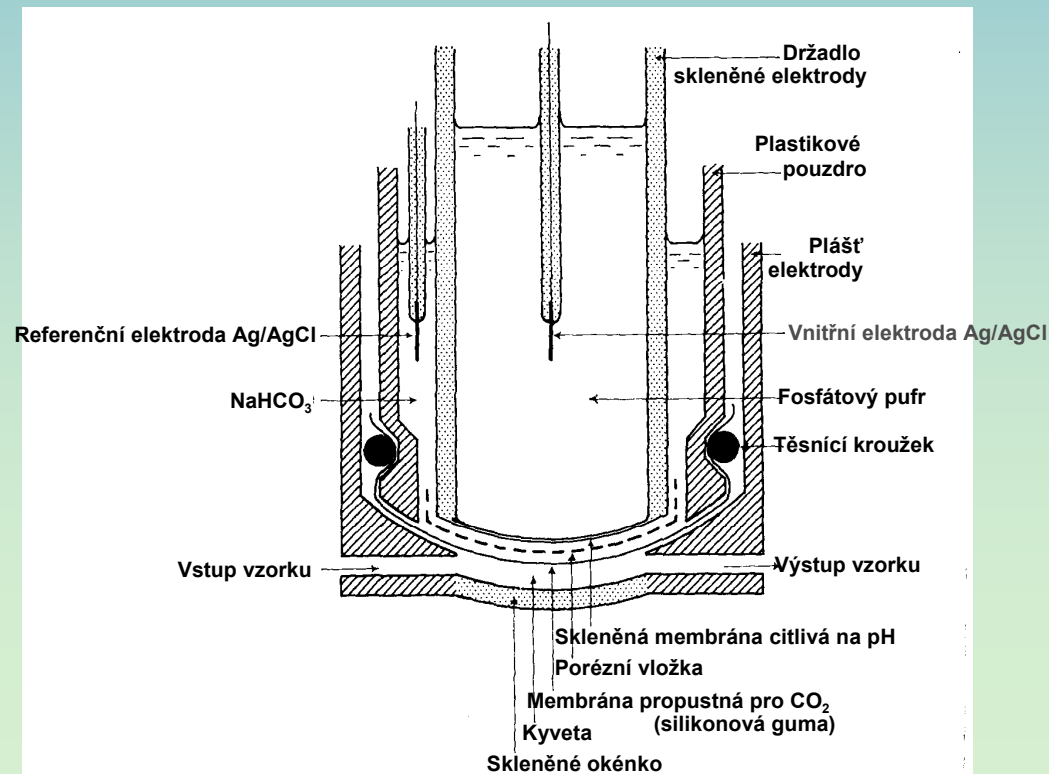
## Iontově selektivní elektrody (ISE)

- **Nepřímé metody** - diluent o vysoké iontové síle (moč)
- **Přímá metoda** - bez ředění
- ISE: ponorné, průtočné a suché elektrodové systémy
- **Membrána**
  - sklovina
  - iontoměničový roztok, nasáklý do vhodné pórovité struktury (kapalná membrána)
- Referenční elektroda - Ag/AgCl
- **Použití ISE:** Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, CO<sub>2</sub>, Cl<sup>-</sup>

# Elektrochemické metody – Potenciometrie

## ■ Složená CO<sub>2</sub> elektroda

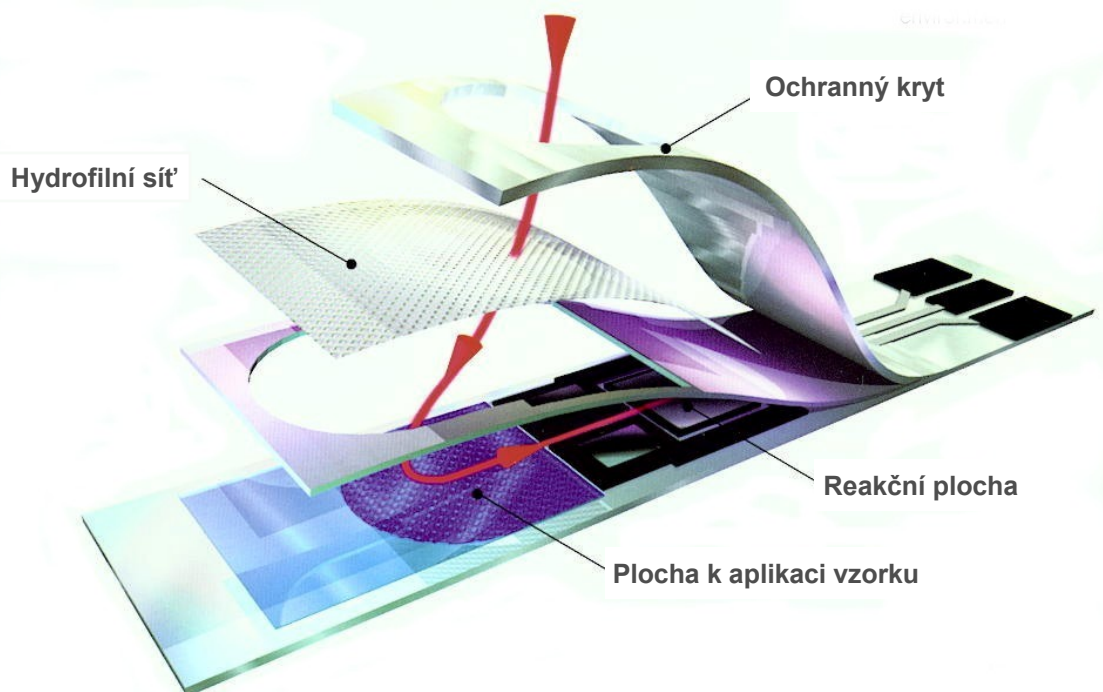
- skleněná elektroda oddělena od měřeného prostředí membránou propouštějící CO<sub>2</sub>
- difusí CO<sub>2</sub> do vodného prostředí vzniká disociovaná H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- množství H<sup>+</sup> je stanoveno pH elektrodou



# Elektrochemické metody – Potenciometrie

## Enzymové elektrody

- předřazení membrány s imobilizovaným enzymem před elektrochemické čidlo
- substrát difunduje do enzymové membrány ⇨ reaguje s imobilizovaným enzymem na produkt
  - Detekce: **potenciometricky** nebo **ampérmetricky**

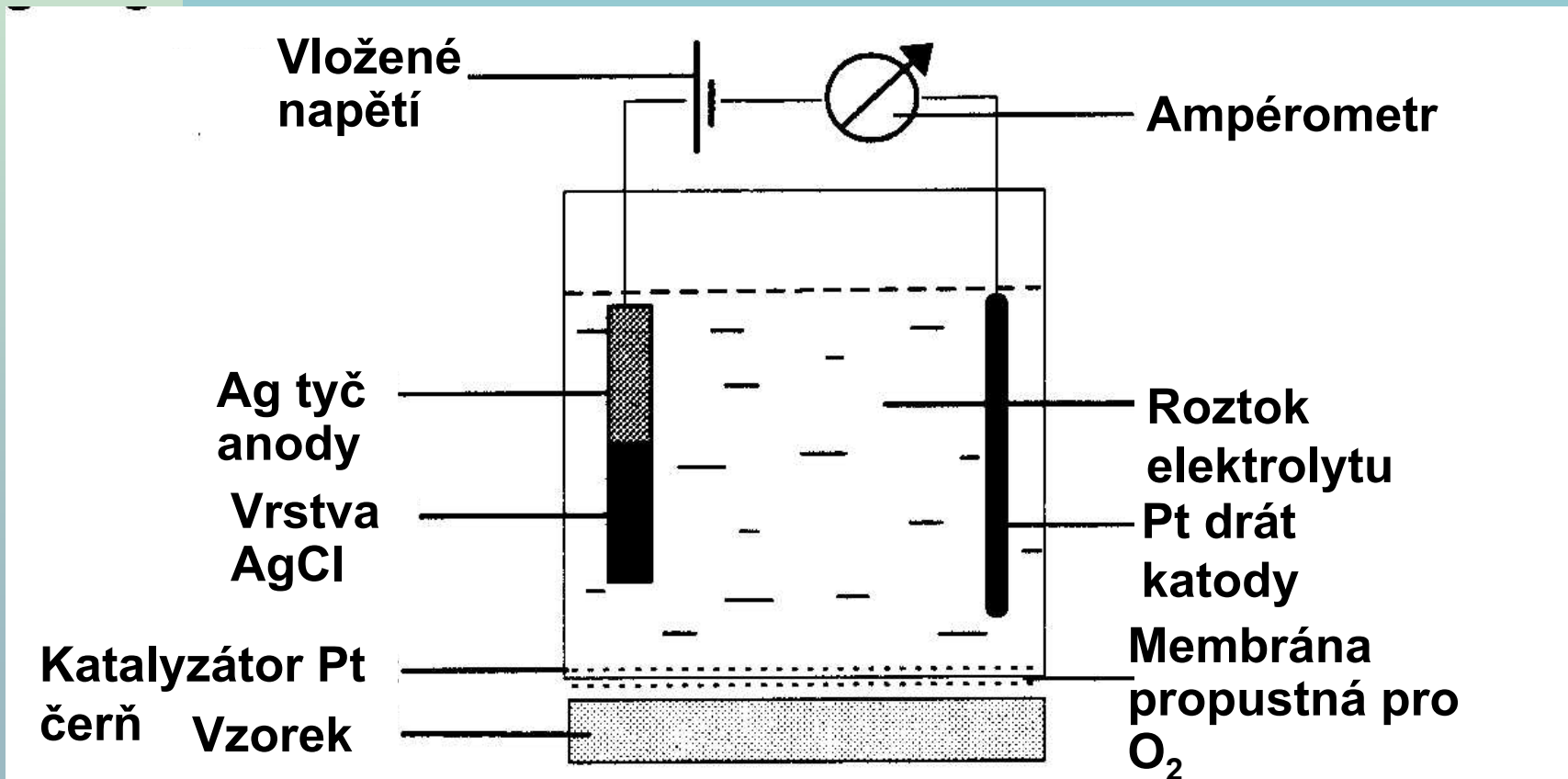


### Použití:

- glukóza, laktát, močovina, kreatinin
- kombinované elektrochemické analyzátoři
- statimové moduly biochemických analyzátoři

# Elektrochemické metody – Ampérometrie

- Měření proudu za konstantního potenciálu
- Ampérometr - detektor elektronů v oxidačně-redukčních reakcích (stanovení glukosy)





# Elektrochemické metody – Polarografie

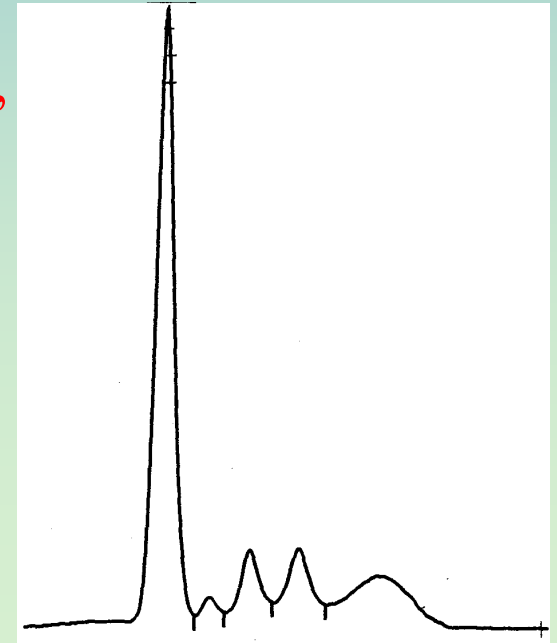
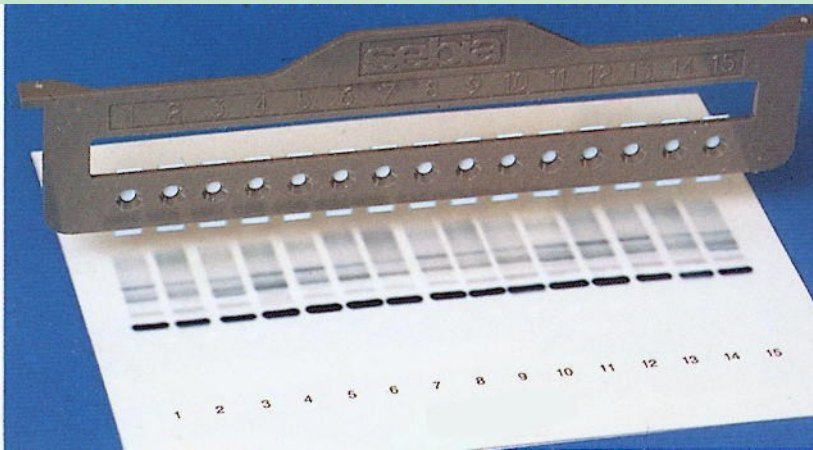
- Eliminace vlivu velikosti kapky krve na výsledek analýzy
- Biologický materiál je umístěn vně měřící jednotky  
⇒ nemůže ji znečistit
- **Měření intenzity proudu při konstantním vnějším potenciálu (přepětí)**
- **Clarkova elektroda** ⇒ stanovení kyslíku
- **Použití: acidobazické analyzátory ( $pO_2$ )  
analyzátory glukosy**

# Elektroforetické metody – Zónová elektroforéza

- Nejrozšířenější elektroforetická metoda
- **Pohyblivost látky** v elektrickém poli závisí na:
  - velikosti náboje
  - velikosti molekul
  - vlastnostech prostředí
- **Nosiče:**
  - acetylcelulóza, gely (agarózový, polyakrylamidový).
- **Postup: fixace, barvení, odbarvení fólie, vysušení**
  - elektroforéza trvá 15 - 30 minut
- **Distribuce**
  - podle **velikosti náboje**: acetylcelulóza, agaróza
  - na základě **elektrického náboje** i podle **velikosti molekul**: polyakrylamidový gel s gradientem hustoty  $\Rightarrow$  **molekulové síto**

# Elektroforetické metody – Zónová elektroforéza

- **Vyhodnocení: denzitometr**
  - elektroforeogram se automaticky posunuje nad štěrbinou, kterou prochází světlo zvolené vlnové délky
  - v místě frakcí dochází k částečné absorpci záření
  - zbytek světla dopadá na čidlo  $\Rightarrow$  signál
  - analogový záznam se zpracovává integrátorem  $\Rightarrow$  číselné výsledky
- **Použití: stanovení frakcí bílkovin, lipoproteinů, glykoproteinů, jednotlivých izoenzymů**

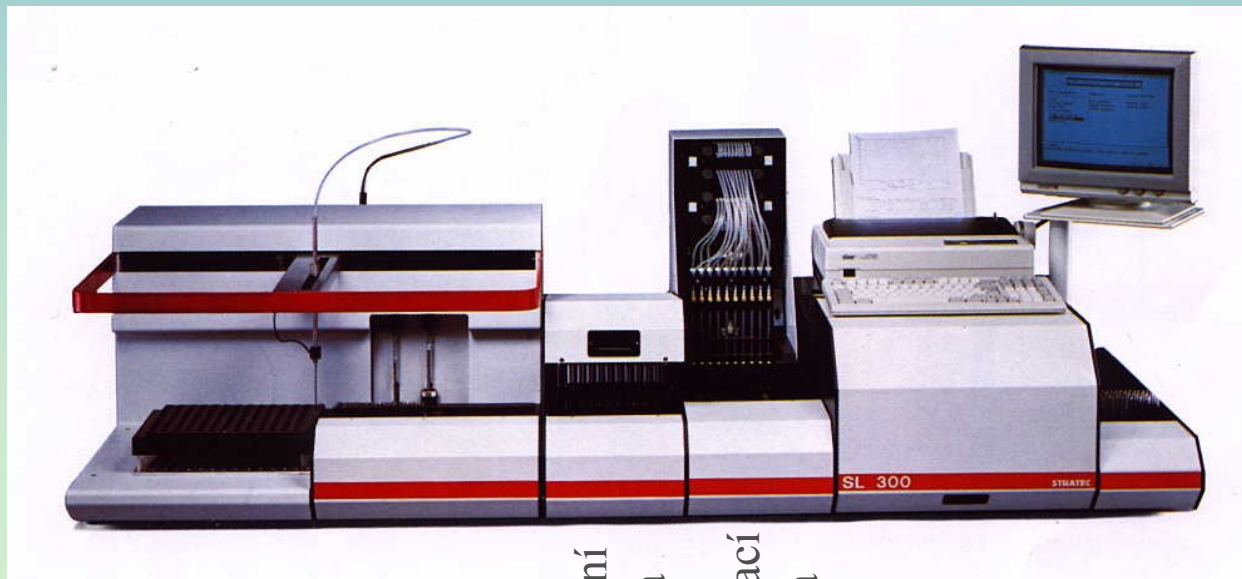


# Fyzikální metody – Osmometrie

- **Osmotický tlak** - tlak rozpuštěných, zejména nízkomolekulárních látek a iontů v roztoku odděleném **polopropustnou membránou** od samotného rozpouštědla
- Osmotický tlak je **přímo úměrný celkovému počtu rozpuštěných nebo disociovaných částic**
- **Osmolalita** (mmol/kg) - látková koncentrace osmoticky aktivních částic v 1 kg rozpouštědla  $\sim 2[\text{Na}^+] + [\text{močovina}] + [\text{glukosa}]$
- **Osmometry**
  1. **snížení bodu tuhnutí** roztoku v závislosti na koncentraci částic v roztoku - citlivý teploměr
  2. **zvýšení bodu varu**
- **Použití:** stanovení osmotického tlaku v séru a moči

# Izotopové metody – $\gamma$ -počítače

- Značení  $^{125}\text{I}$  -  $\gamma$ -zářič (tvrdé záření)
- Použití :  $\gamma$ -měřiče **IMUNOCHEMIE**
  - vícekanálové: více vzorků současně
  - měření počtu impulsů/min
  - detekční systém: krystaly NaI kompaktně spojené s fotonásobičem



Pipetovací  
jednotka

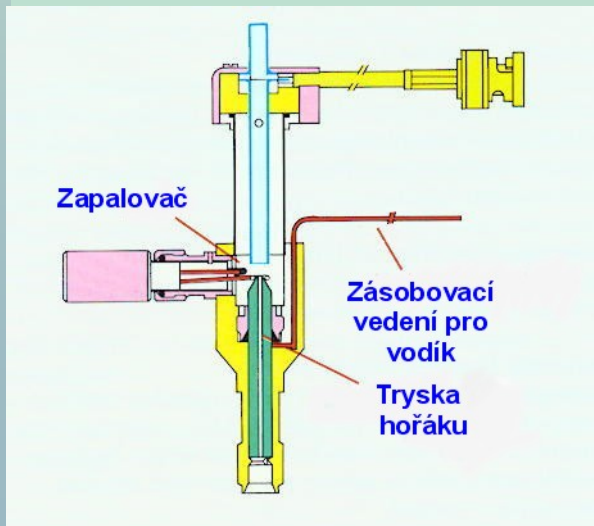
Inkubační  
jednotka

Promývací  
jednotka

Detekční  
jednotka

# Chromatografické metody – Plynová chromatografie

- Dělení směsi látek na základě **distribuce** mezi mobilní a stacionární fáze
    - **mobilní fáze - plyn**
    - **stacionární fáze:**
      - ▣ většinou kapalina na nosiči
    - vzorky se nastříkují do vyhřívaného dávkovače
    - dochází ke zplynění vzorku
    - jeho páry jsou nosným plynem ( $N_2$ , Ar) unášeny do vyhřívané kolony
      - ▣ pracovní teplota až  $400\text{ }^\circ\text{C}$
- Detektory:** integrují signál



- ▣ **plameno-ionizační:** ionizace rozdělených složek v plameni  $H_2$ -vzduch

**Použití:** léčiva, jejich metabolity, alkohol, org.kyseliny, hormony, steroidy

# Chromatografické metody – Vysoko účinná kapalinová chromatografie

## ■ Dělení ve dvoufázovém systému:

- **distribuce mezi kapalnými fázemi** (mobilní a stacionární – nemísitelné)
- pronikání molekul z mobilní fáze do pórů tuhých částic (molekulová síta)
- **Kolony - obrovská účinnost** (několik set tisíc pater destilační kolony)
- obsahují nosné částice se stacionární fází
- průtok mobilní fáze pod tlakem 1 – 100 MPa

☒ dělení zpravidla eluční metodou

Detektory: **UV-VIS, detektor diodového pole,**

☒ signál se integruje

**Použití:** termolabilní látky (enzymy) - i několik set analýz za 24 h

