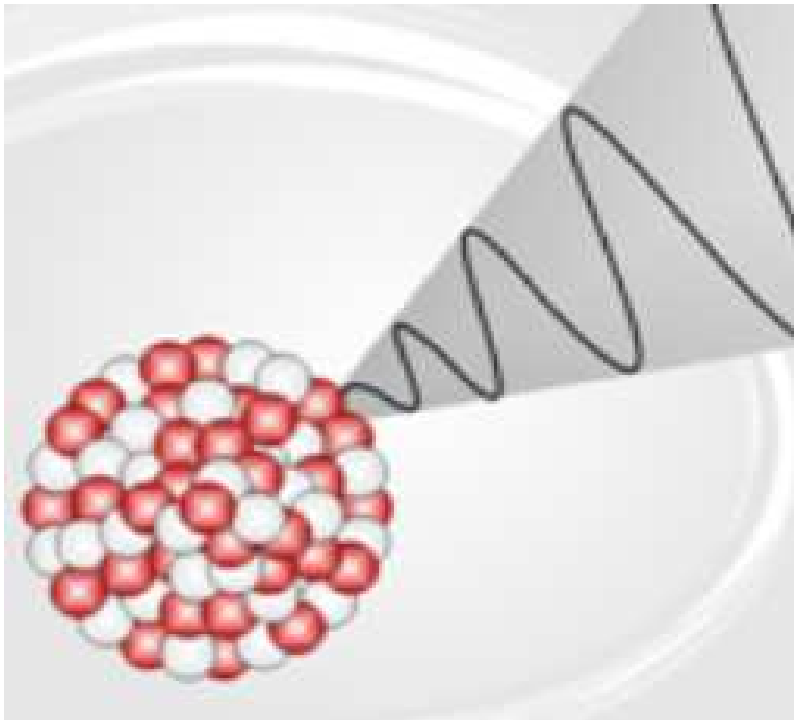


Optické metody



Obsah

- 1. Optické metody - princip, rozdělení**
- 2. Elektromagnetické záření**
- 3. Základní veličiny a vztahy používané ve spektrofotometrii – transmittance, absorbance, Lambertův-Beerův zákon, kalibrační závislost**
- 4. Absorbce, emise záření**
- 5. Spektrofotometry (uspořádání) - zdroj, monochromátor, optické prostředí, detektor**
- 6. Vertikální fotometrie**
- 7. Reflexní fotometrie**
- 8. Turbidimetrie, nefelometrie**

Optické analytické metody

- fyzikální metody, které získávají potřebné informace z měření optických vlastností a spekter zkoumaných látek.
- využívají interakce analytu se světlem - výměna energie, změna optických vlastností molekul a atomů měřené soustavy
- může jít o změnu barvy či její intenzity, luminiscenci, fluorescenci, změnu optické otáčivosti nebo o změnu rozptylu světla při průchodu vzorkem

Spektrofotometrie-rozdělení

Podle frekvence elektromagnetického záření:

UV spektr. – zahrnuje oblast záření $\lambda=190-400$ nm

VIS spektr. – oblast viditelného záření $\lambda=400-800$ nm

IČ spektr. – oblast IČ spekter se dělí na blízkou IČ $\lambda=800-2000$ nm, dalekou IČ $\lambda=10^5$ nm



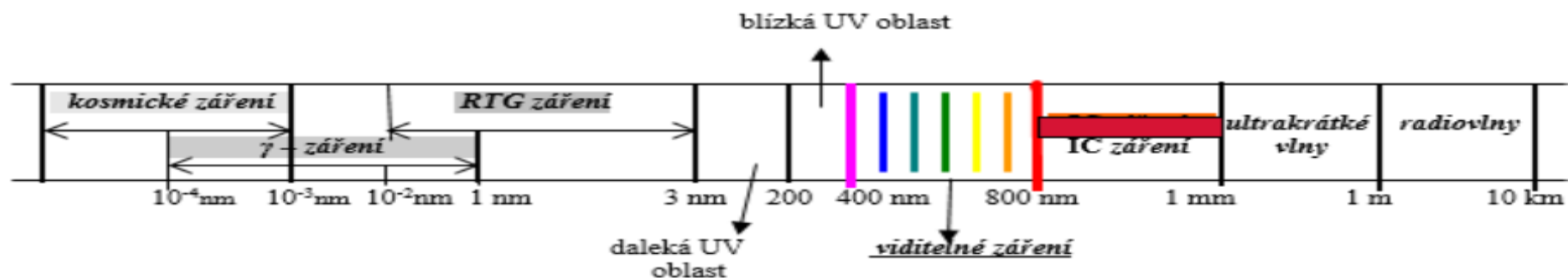
Optické metody-rozdělení

Spektrální: výměna energie mezi látkou a zářením

- **absorpční** – sledují absorpci záření vzorkem (UV, VIS, IČ)
- **emisní** – měření záření emitovaného vzorkem
- **luminiscenční metody:** fluorimetrie, fosforescence, chemiluminiscence

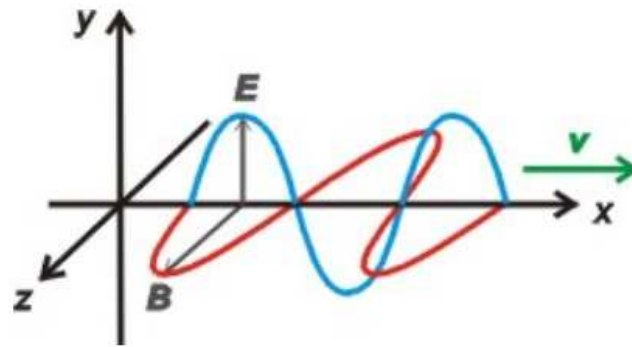
Nespektrální: změna vlastností záření

- **turbidimetrii, nefelometrii** – rozptyl záření
- **refraktometrie** – otáčení roviny polarizovaného světla

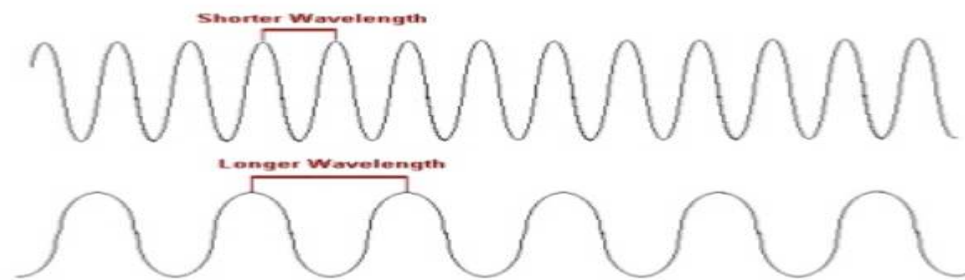


Optické metody

- jsou založeny na výměně energie mezi látkou a zářením
- Světlo je druhem elektromagnetického záření
- **Vlastnosti elektromagnetického záření** - má duální charakter

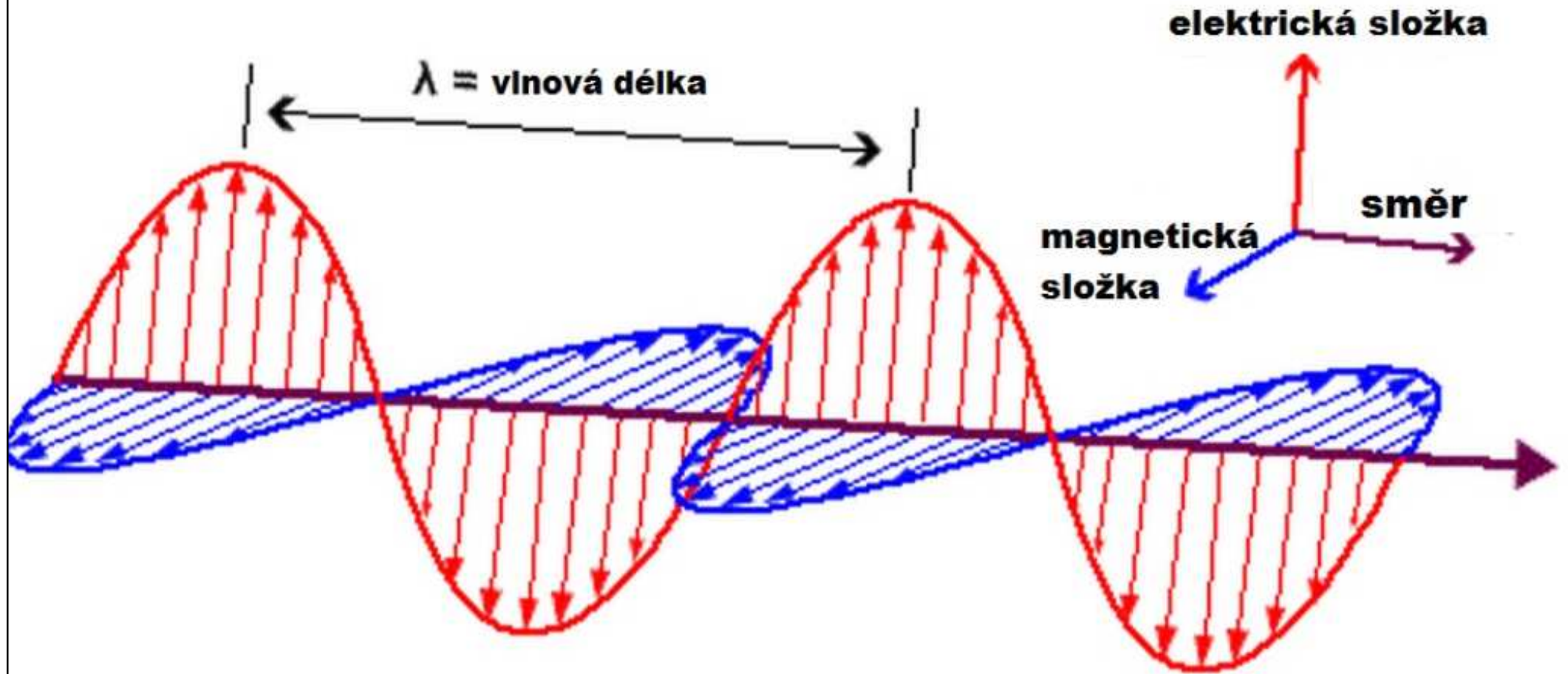


- Složku magnetickou a elektrickou
- Vzdálenost mezi dvěma vrcholy vln se nazývá vlnová délka- λ , udává se v nm



Elektromagnetické záření

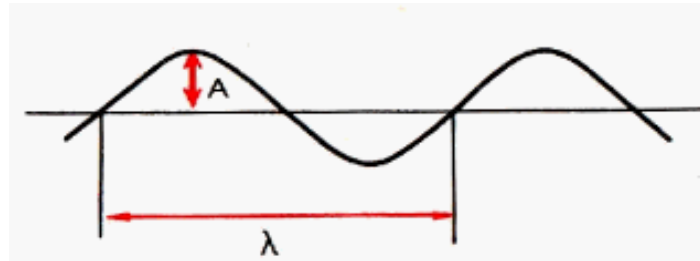
Elektromagnetické pole



Popisující veličiny elektromagnetického záření

- rychlost – c (m/s), ve vakuu 3×10^8 m/s

- vlnová délka - λ (nm)



- Frekvence světelných vln, kmitočet (=počet vln za sekundu) - ν (Hz, s⁻¹)

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

Popisující veličiny elektromagnetického záření

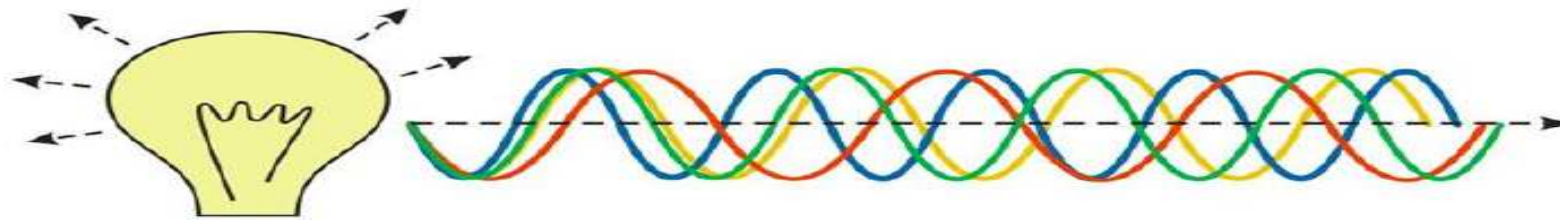
- energie fotonu světelného záření ε
- Energie fotonu je přímo úměrná jeho kmitočtu, h je Planckova konstanta ($6,625 \times 10^{-34}$ J/s)

$$\varepsilon = h\nu = h \frac{c}{\lambda}$$

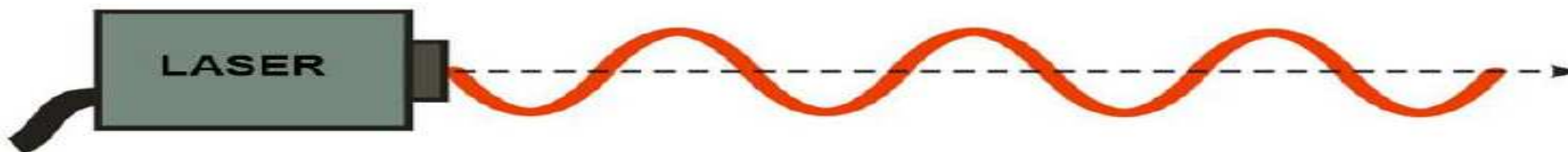
- Energie fotonu je nepřímo úměrná vlnové délce tzn. že světelné záření o kratší vlnové délce má vyšší energii, než světlo s delší vlnovou délkou
- Světlo v UV a VIS oblasti má kmitočet (počet vln za s) $10^{14} - 10^{15}$ Hz

Elektromagnetické záření - druhy

- **monochromatické** - světlo, které se skládá pouze z jedné vlnové délky (lépe velmi blízké vlnové délky); lze je získat z polychromatického světla pomocí různých monochromátorů (např. filtrů, hranolů nebo mřížek).
- **polychromatické** – skládá se z mnoha vlnových délek (sluneční světlo, světlo wolframové žárovky)



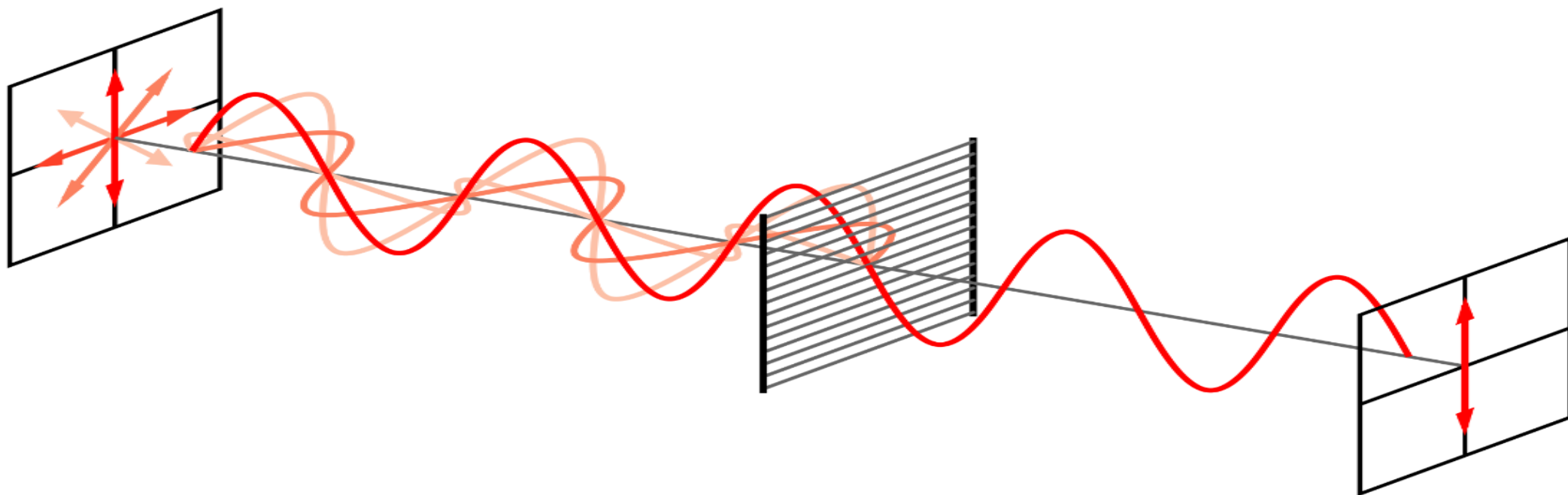
bílé světlo žárovky i slunce obsahuje všechny barvy (vlnové délky)



světlo laseru je monochromatické (jednobarevné) a koherentní (má stejnou fázi)

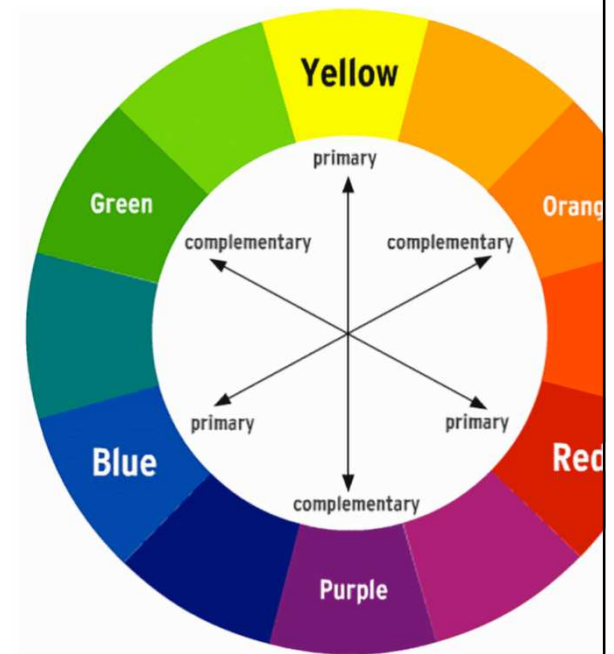
Elektromagnetické záření - druhy

- **polarizované světlo** – je záření, jehož kmity jsou pouze v jedné rovině kolmé na směr šíření záření. Lze je získat různými způsoby (lomem, odrazem, dvojlomem). Nejčastěji používáme tzv. Nikolův hranol, který je z islandského vápence.



Barevnost látek

- pokud absorbované záření má λ ležící v oblasti viditelné části spektra, látka se jeví lidskému oku jako **barevná**
- barvu látky určují vlnové délky odraženého záření jsou to vždy barvy (vlnové délky) doplňkové k barvě absorbovaného světla
- bílá barva – odráží záření všech vlnových délek
- černá barva – absorbuje všechny vlnové délky
- Doplňkové (komplementární) barvy – dvojice barev, které se vzájemně doplňují (tj. jejich spojením vznikne bílá barva)



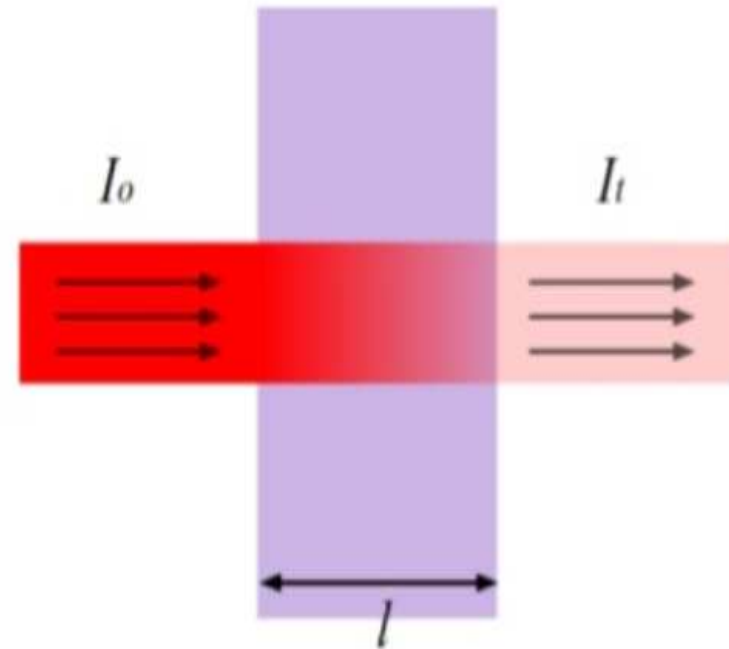
Barevnost látek

Absorbovaná vlnová délka (nm)	Barva absorbovaného světla	Barva látky
400–435	fialová	žlutozelená
435–480	modrá	žlutá
480–490	zelenomodrá	oranžová
490–500	modrozelená	červená
500–560	zelená	purpurová
560–580	žlutozelená	fialová
580–595	žlutá	modrá
595–605	oranžová	zelenomodrá
605–670	červená	modrozelená

Základní veličiny a vztahy používané ve spektrofotometrii

Propustnost (transmittance):
Množství světla určité vlnové délky, které prošlo vzorkem

$$T = \frac{I}{I_0}$$



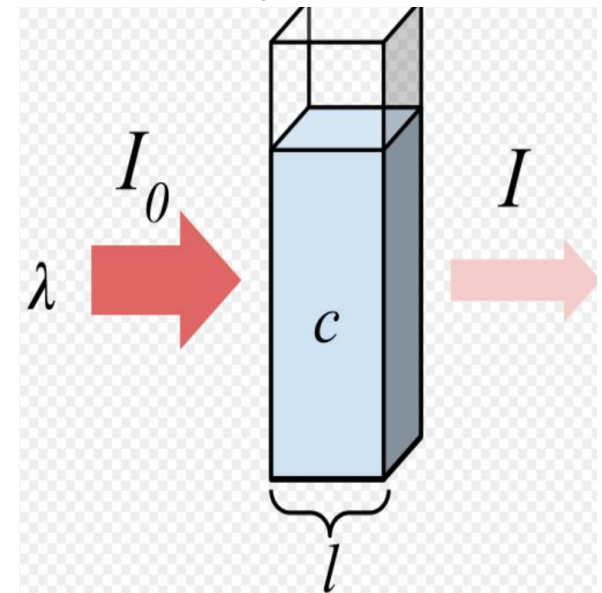
Kde I_0 je intenzita světla vstupujícího do vzorku a I_t je intenzita světla ze vzorku vystupujícího

Základní veličiny a vztahy používané ve spektrofotometrii

- **Absorbance:**

$$A = \log \frac{I_0}{I} = -\log T$$

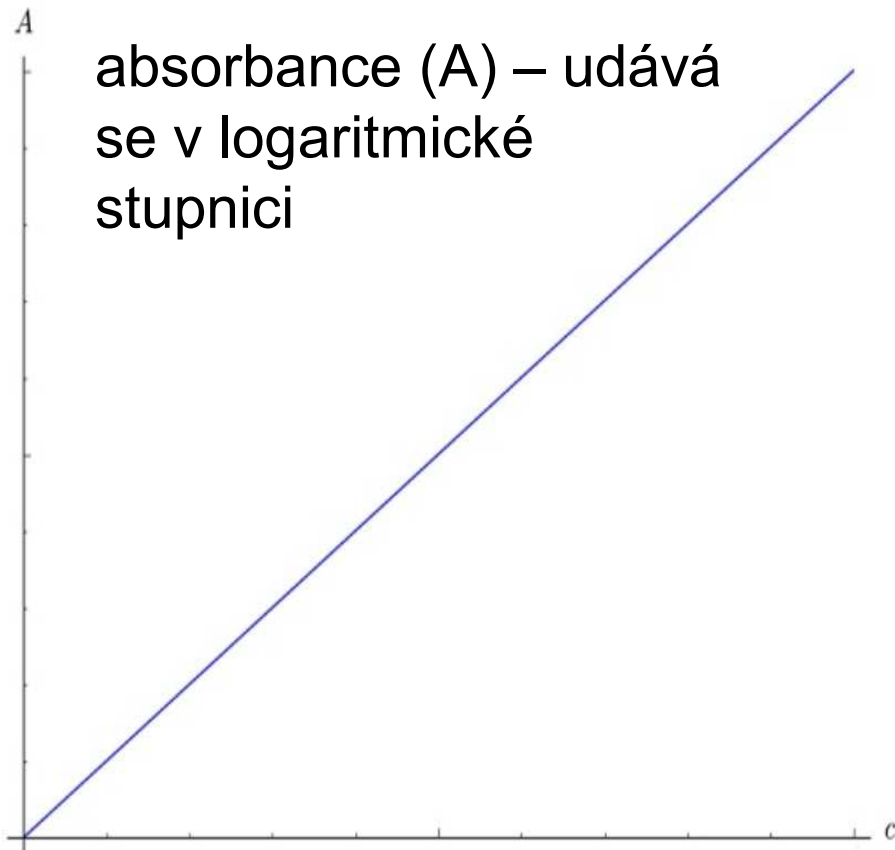
Bezrozměrná veličina, definovaná na základě transmittance, udává jaké množství světla bylo pohlceno vzorkem.



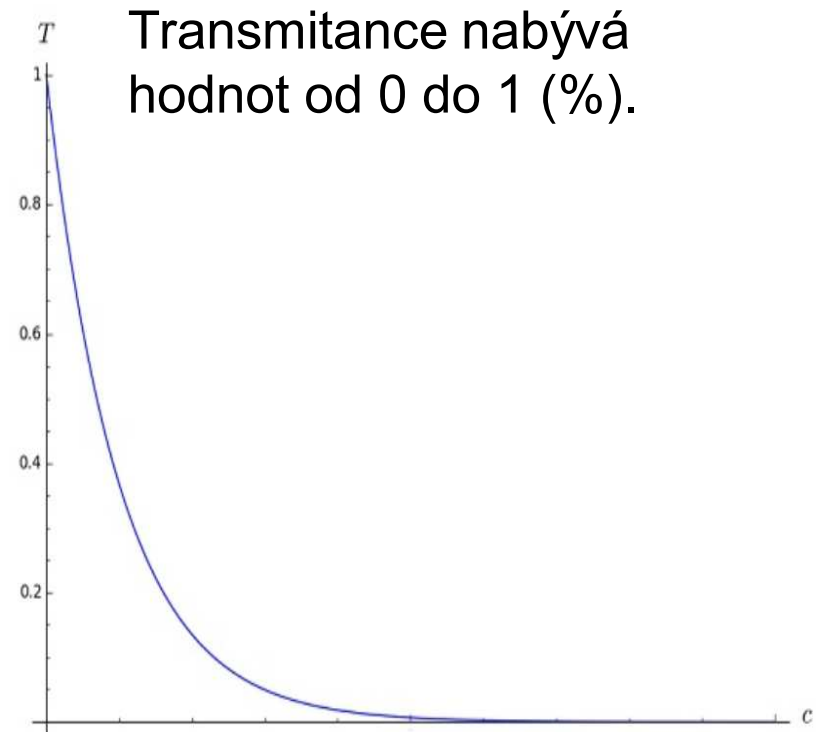
absorbance x transmittance

$$A = \log \frac{I_0}{I} = -\log T$$

$$T = \frac{I}{I_0}$$



Absorbance vs. Concentration



Transmittance vs. Concentration

Udávají o kolik se snížila intenzita původního záření po průchodu zkoumanou látkou

Základní veličiny a vztahy používané ve spektrofotometrii

Zákon Lambertův-Beerův:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon l c}$$

Intenzita světelného záření procházející absorbujičím prostředím klesá exponenciálně v závislosti na délce absorbujičící vrstvy a koncentraci absorbujičící látky

Zákon byl nezávisle empiricky odvozen fyziky [Bouguerem \(1729\)](#), [Lambertem \(1760\)](#) a [Beerem \(1852\)](#).

Lambertův-Beerův zákon platí pouze pro absorpci monochromatického záření.

Zákon Lambertův-Beerův

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} l c$$

- absorbance při dané vlnové délce přímo úměrná tloušťce absorbující vrstvy l
- koncentraci absorbujících částic ve vrstvě c
- konstanta úměrnosti pro danou látku a danou vlnovou délku absorbovaného záření je molární absorpční koeficient ε_{λ}

Základní veličiny a vztahy používané ve spektrofotometrii

molární absorpční koeficient ϵ_λ

fyzikální konstanta, která udává jak daná látka při určité koncentraci absorbuje monochromatické záření určité vlnové délky

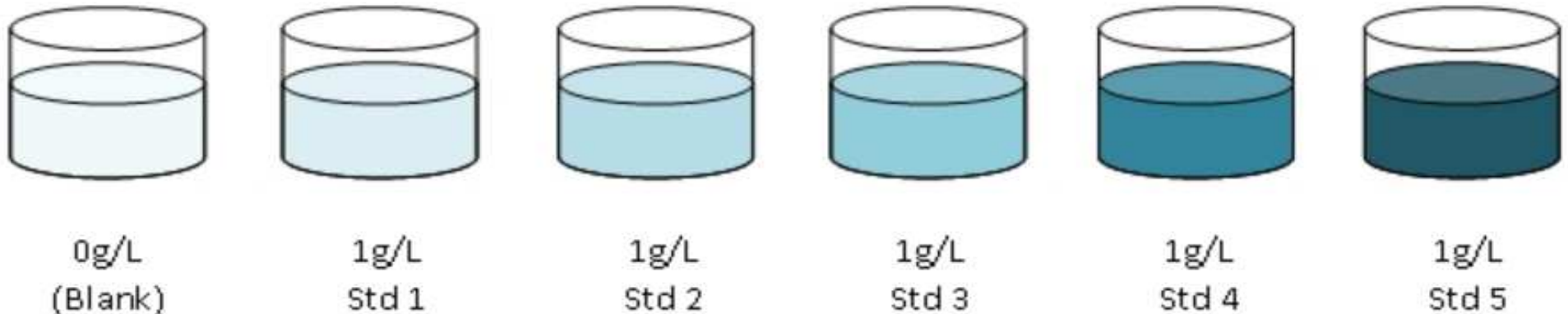
- takto lze zjistit koncentraci látek barevných, nebo látek absorbujících světlo v UV oblasti
- pokud látka v těchto oblastech neabsorbuje, je třeba ji převést na látku, která absorbuje více
- vztah mezi signálem (absorbancí) a koncentrací se určuje **kalibrace**

Kalibrační závislost

Praktické využití Lambertova-Beerova zákona

Provedení:

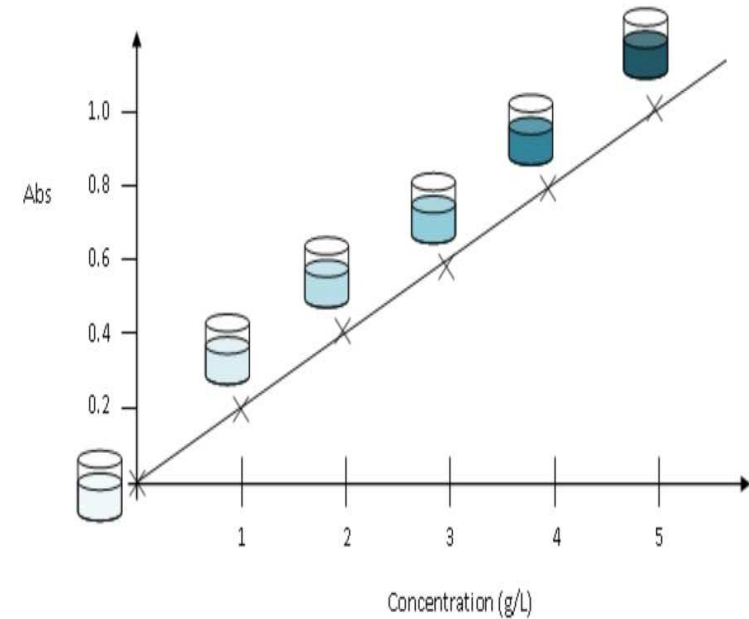
- změříme obvykle 5 standardních roztoků o známé vrůstající koncentraci při určité vlnové délce
- všechny roztoky se měří za stejných experimentálních podmínek (spektrometr, kyveta, pipety, doba inkubace..)
- blank = slepý pokus, obsahuje vše kromě stanovované látky



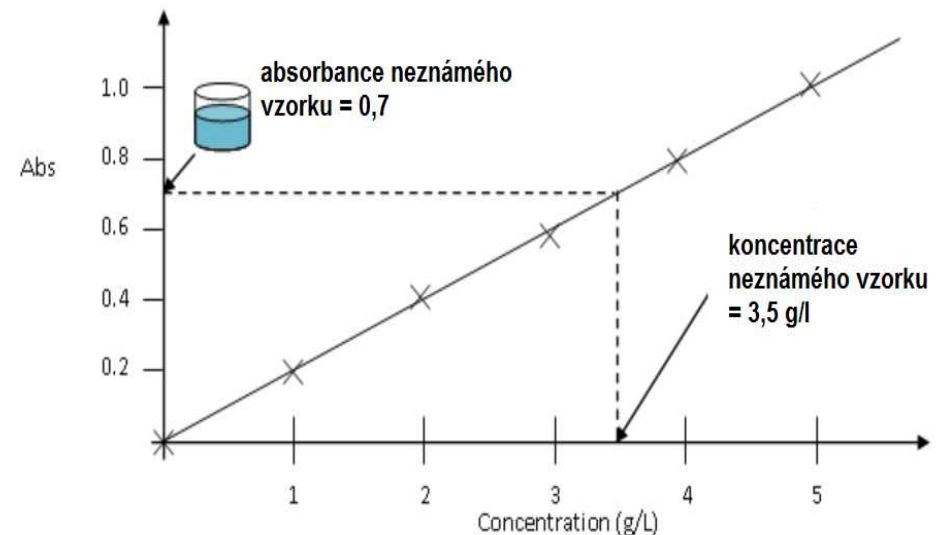
Kalibrační závislost

Sestrojení kalibrační křivky

- naměřené hodnoty absorbance standardů na ose y
- hodnoty koncentrace na ose x



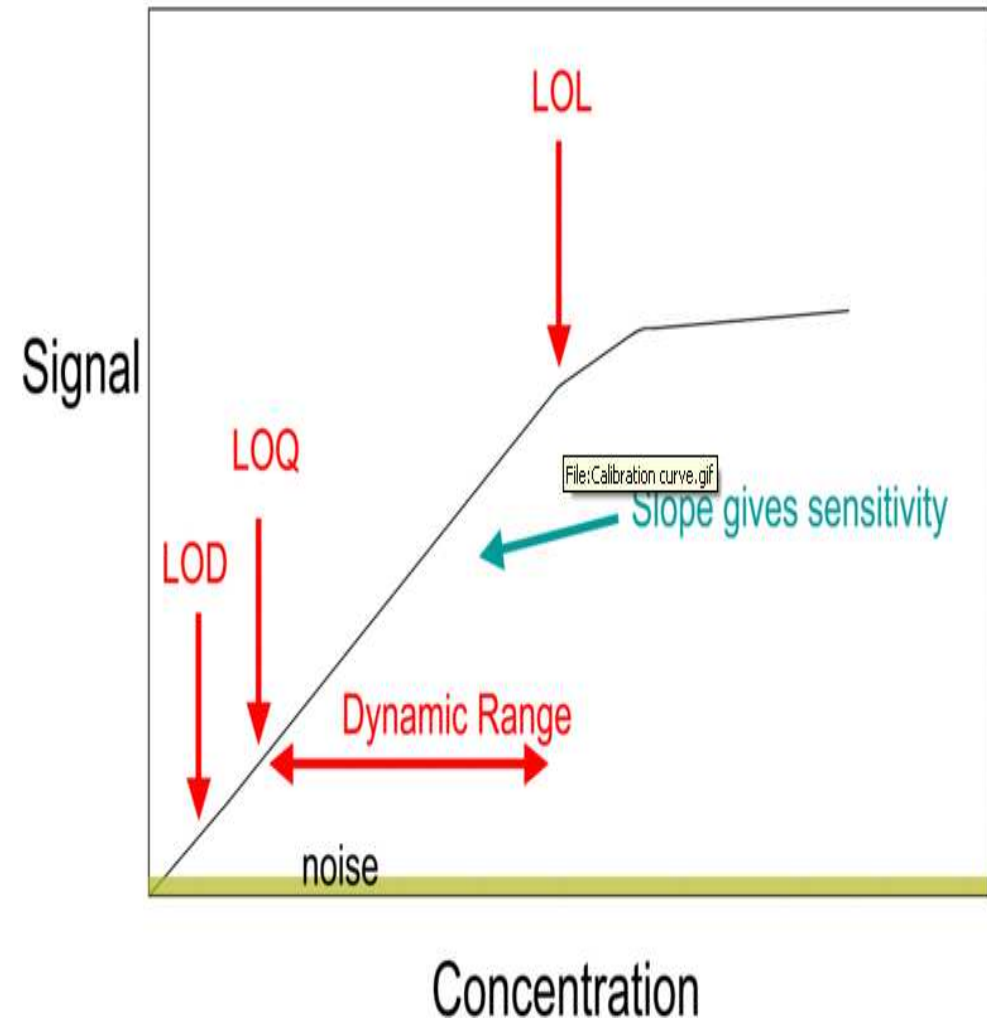
Pokud je závislost lineární, je možné změřit absorbanci a vypočítat koncentraci neznámého vzorku



Kalibrační závislost

Vzhledem k tomu, že poměr c_{st}/A_{st} je pro měřenou sérii konstantní používáme ho pro změřenou sérii jako **kalibrační faktor**, kterým vynásobíme naměřené hodnoty absorbance vzorků o neznáme koncentraci

LOD-dolní mez detekce
LOL- horní mez detekce
LOQ-mez stanovitelnosti



Limitace Lambertova-Beerova zákona

- Odchylka ϵ_λ při vysokých koncentracích ($>0,01$ mol/l) vlivem elektrostatických interakcí
- Částečný rozptyl světla na částicích přítomných ve vzorku
- Fluorescence nebo fosforescence vzorku
- Nedokonale monochromatické záření
- Nekoherentní světelné záření

Nejpřesnější výsledky jsou získávány v rozsahu absorbancí 0,2- 2,0 . Od hodnot absorbance $>$ výrazně narůstá chyba měření

Optické metody-rozdělení

Spektrální: výměna energie mezi látkou a zářením

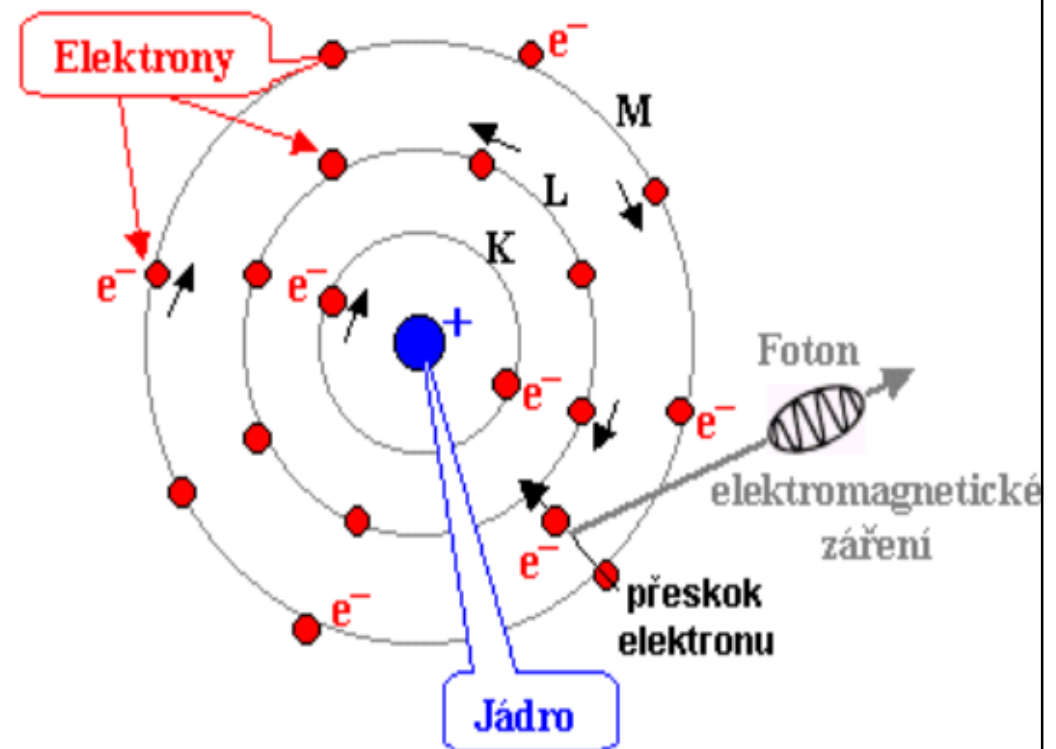
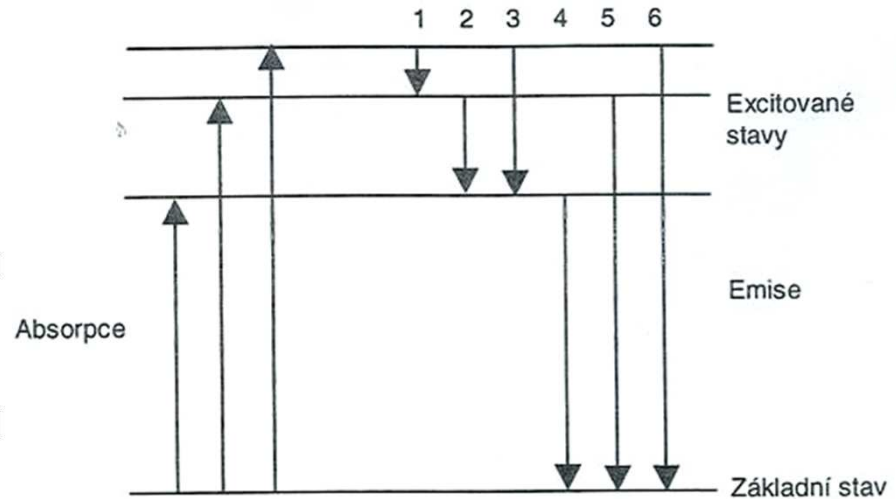
- **absorpční** – sledují absorpci záření vzorkem (UV,VIS, IČ)
- **emisní** – měření záření emitovaného vzorkem
- **luminiscenční metody:** fluorimetrie, fosforescence, chemiluminiscence

Nespektrální: změna vlastností záření

- **turbidimetrii, nefelometrii** – rozptyl záření
- **refraktometrie** – otáčení roviny polarizovaného světla

Absorpce vs. emise záření

- Emise záření: dodáním energie (např. kinetické, tepelné) jsou částice látky (složky studovaného vzorku) převedeny do vyššího energetického stavu. Při zpětném přechodu se energie vyzáří ve formě fotonu
- Absorpce záření:
- Částice látky absorbuje foton a přejde přitom do vyššího energetického stavu.
- návrat zpět do energeticky nižšího stavu již není sledován)

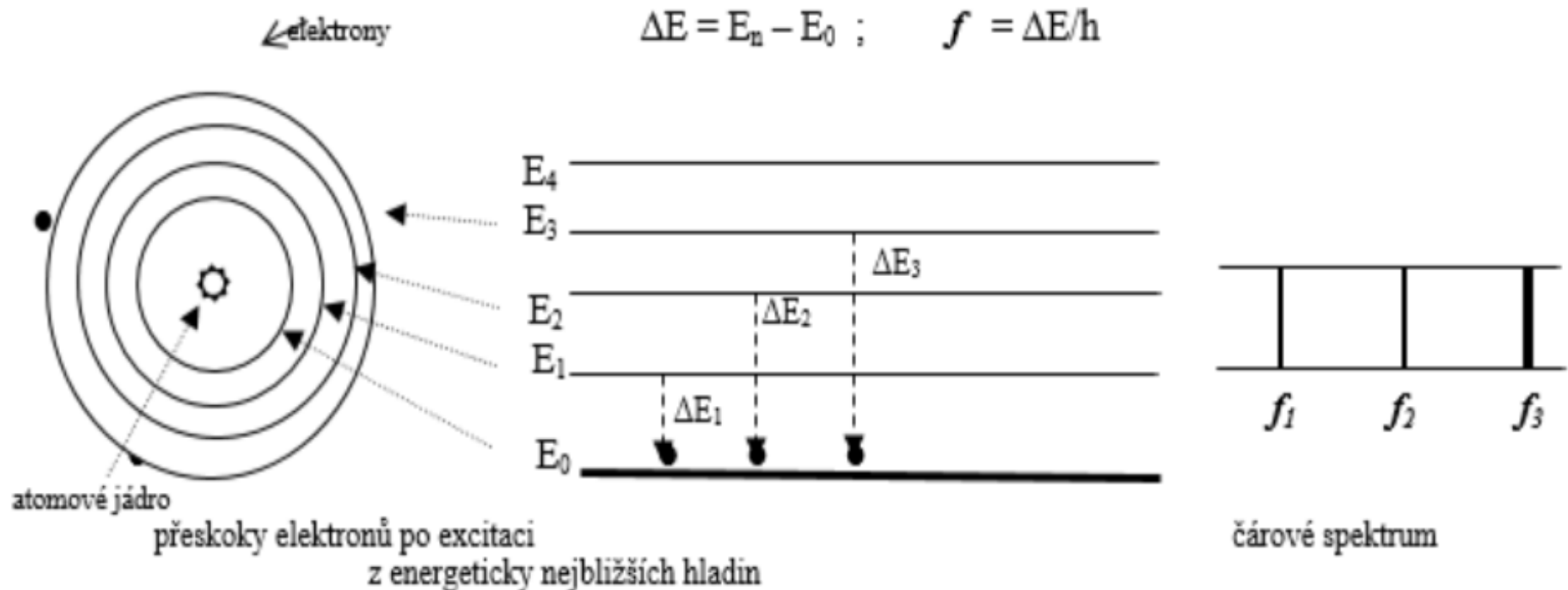


Atomová absorpční spektrofotometrie-AAS

- zabývá kvantitativním hodnocením změny intenzity záření (obvykle určité vlnové délky) po průchodu analytickým prostředím. Při průchodu elektromagnetického záření z oblasti UV nebo VIS části spektra měřeným roztokem dochází k absorpci záření.
- Přístroje, které se používají k měření intenzity záření v ultrafialové (UV) nebo viditelné (VIS) oblasti spektra se nazývají **fotometry** nebo **spektrofotometry**.

Atomová emisní spektrofotometrie

Při této technice se měří emise záření. K emisi záření charakteristické vlnové délky dochází při návratu elektronů z excitovaného stavu (vyvolaného plamenem) do základního stavu.



Spektrofotometry

- Přístroje, které se používají k měření intenzity záření v ultrafialové (UV) nebo viditelné (VIS) oblasti spektra
- Slouží pro měření absorpce světla vzorkem
- Absorbance je měřena při různých vlnových délkách

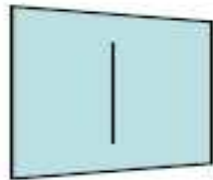


Uspořádání spektrofotometru

- **Zdroj světla**
- **Optický systém:** štěrby, zrcadla, čočky
- **Monochromátor nebo filtr:** k výběru určité vlnové délky
- **Absorpční prostředí:** kyveta s měřeným vzorkem
- **Detekční systém:** zařízení k měření světelného záření, které prošlo vzorkem



zdroj



štěrbina



výběr vlnové délky



vzorek



detektor

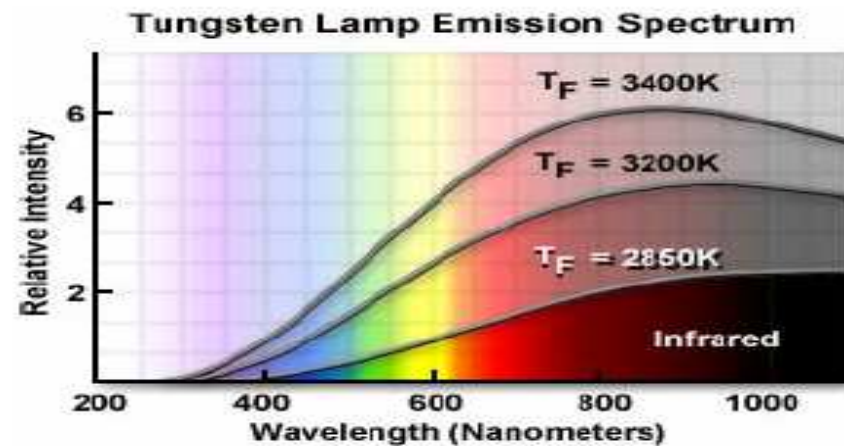
Zdroje záření a jejich použití

- **Wolframová žárovka** – měření absorpce ve viditelném spektru
- **Deuteriová (vodíková) výbojka** - měření absorpce v UV spektru
- **Xenonová výbojka**- měření absorpce v oblasti VIS UV spektru
- **Rtuťová výbojka** – měření v oblasti spektra 200-400 nm



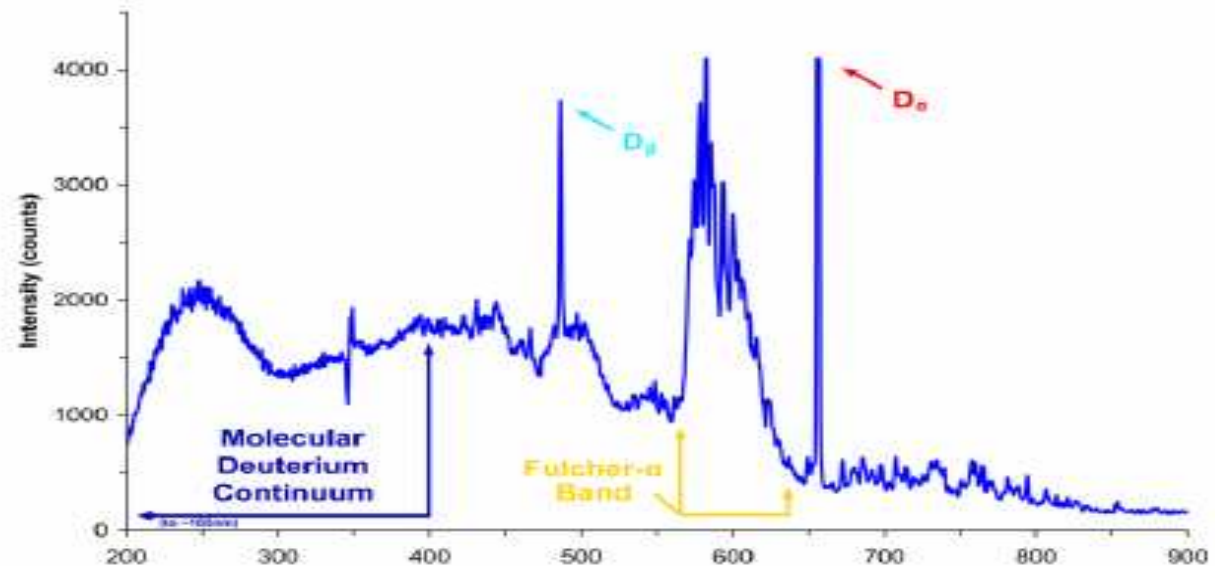
Wolframová žárovka – VIS oblast spektra

- Skleněná baňka naplněná inertním plynem obsahující páry jódu
- Uvnitř je wolframové vlákno, které je zahříváno stejnosměrným proudem



Deuteriová výbojka – UV oblast spektra

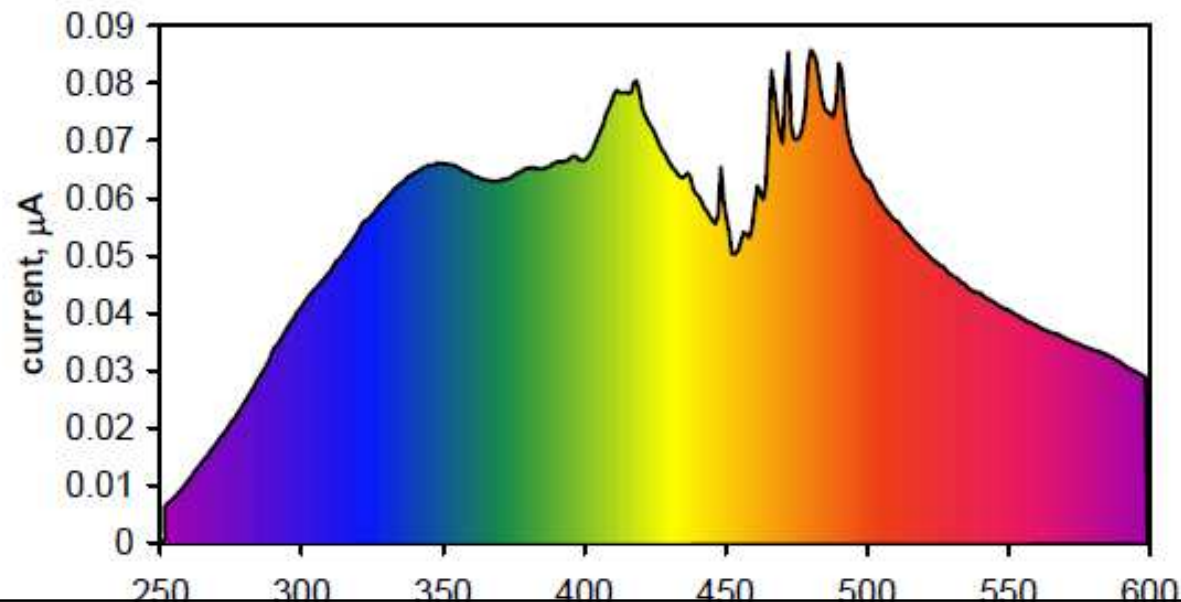
- Nízkotlaké, produkují světlo o vlnové délce 160-360 nm



Xenonová výbojka – blízká UV oblast nebo IČ oblast spektra

- Vysokotlaká (pevnější plášť), výboj vzniká mezi dvěma wolframovými vlákny, potřebuje intenzivní chlazení

Xenon Arc Lamp (XB0), relativně hladké spektrum
220nm – 1000nm



Spektrofotometr - fotometrické filtry

- Slouží k vymezení určitého (co nejužšího) pásu monochromatického světla ze spojitého záření.
- Charakteristikou filtru je tzv. **spektrální pološířka filtru (h, nm)** - odpovídá intervalu vlnových délek záření v polovině maximální propustnosti filtru (je odvozena z křivky propustnosti). Čím je rozsah pološířky filtru užší, tím je filtr lepší.
- Fotometrické filtry dělíme na dvě základní skupiny: **barevné absorpční a interferenční**

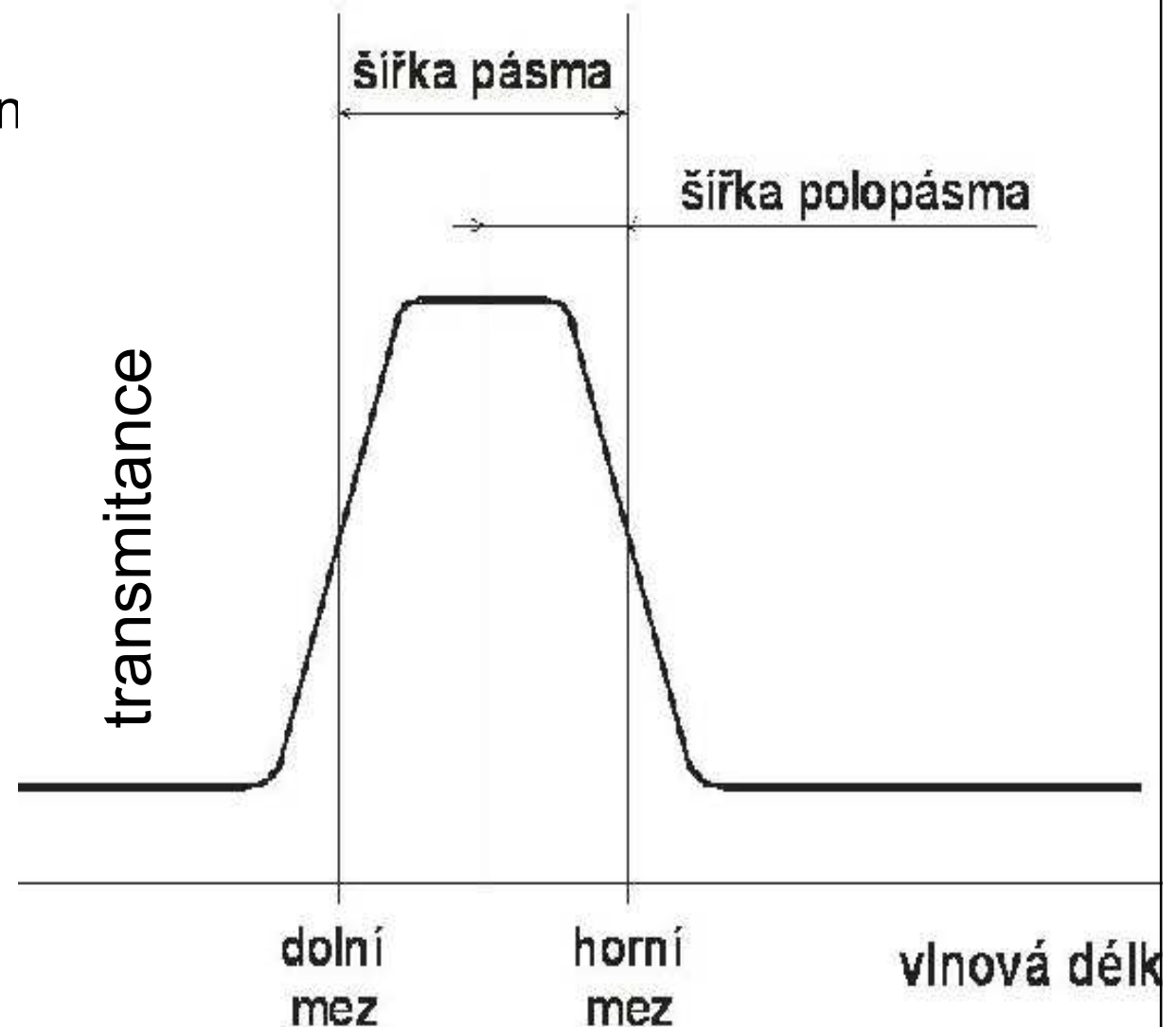


Spektrofotometr - fotometrické filtry

Spektrální pološířka

filtru (h, nm) - odpovídá intervalu vlnových délek záření v polovině maximální propustnosti filtru – transmittance, je odvozena z křivky propustnosti). Čím je rozsah pološířky filtru užší, tím je filtr lepší.

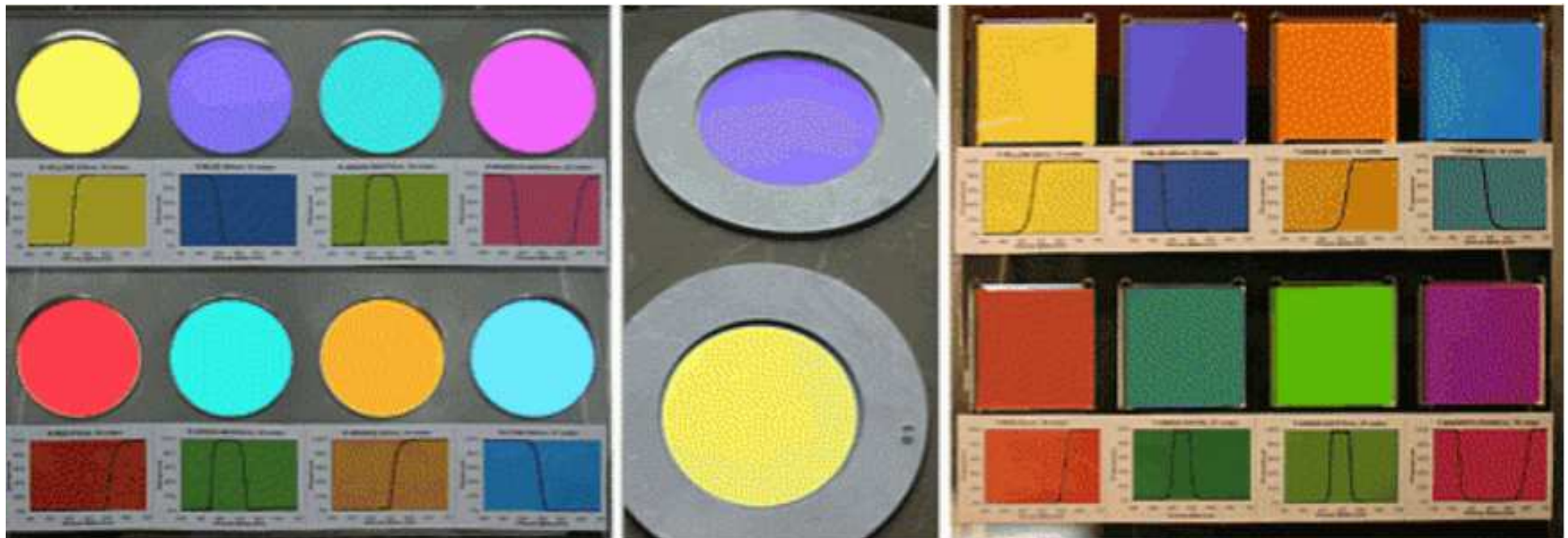
Křivka propustnosti



Fotometrické filtry

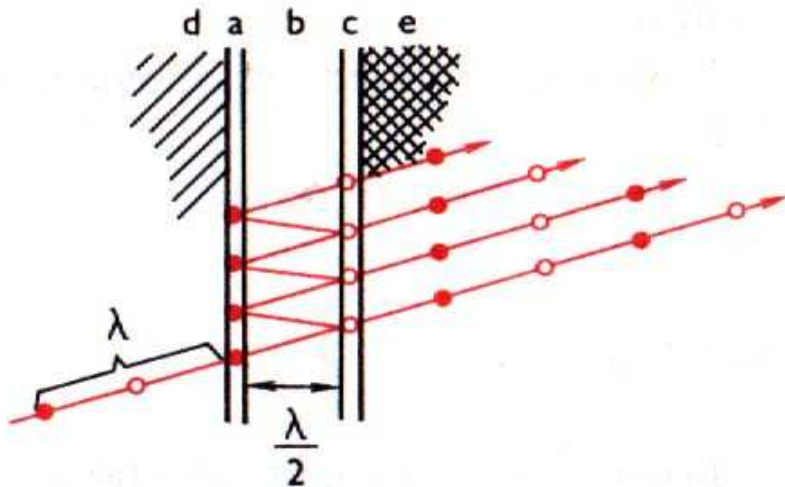
Barevné absorpční filtry - mají nižší spektrální čistotu filtrovaného záření, jejich pološířka je 30-80 nm

- **Pevné** - skla vyrobená z oxidy kovů, nebo pokrytá vrstvou želatiny s organickým barvivem
- **Kapalné** – obvykle kyvety s roztoky anorganických solí



Fotometrické filtry-interferenční filtry

Interferenční filtry využívají mnohonásobnou interferenci záření mezi hraničními plochami s výbornými odrazovými vlastnostmi, mají užší šířku pásma a vyšší pík transmittance (lepší propustnost) než barevné absorpční filtry. Nejvíce rozšířený je kovový Fabry-Perotův filtr.



a, c – polopropustné vrstvičky

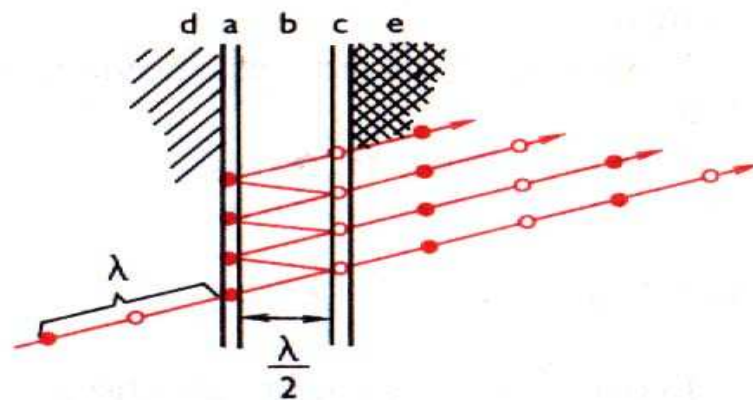
b – vrstva dielektrika o tloušťce $\lambda/2$

d, e – krycí vrstvy

Fotometrické filtry-interferenční filtry

Na základní desce je mezi dvěma stříbrnými polopropustnými vrstvičkami vrstva průhledného dielektrika o tloušťce $\lambda/2$, přičemž λ odpovídá požadované vlnové délce.

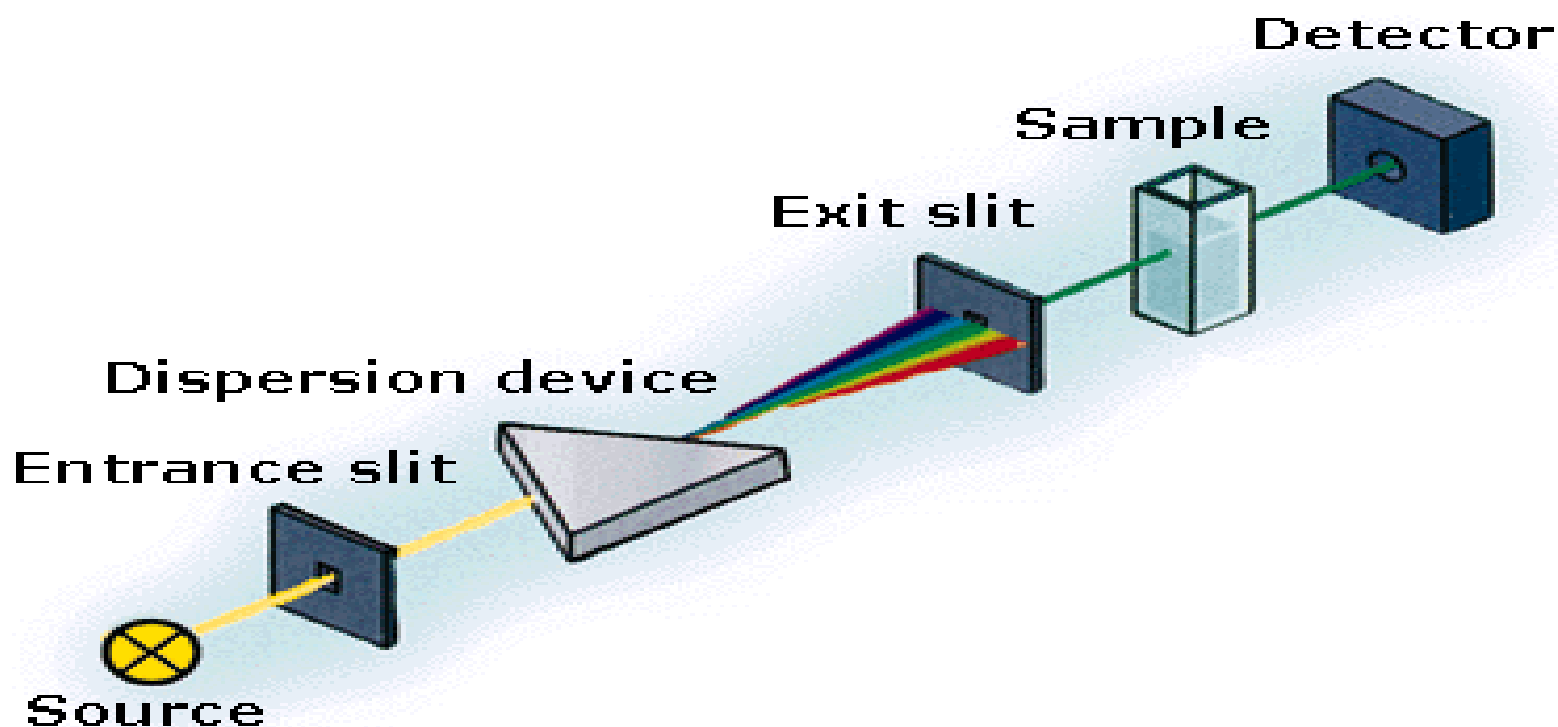
Mnohonásobnými odrazy od zrcadlových ploch filtru a po vícenásobné interferenci dopadajících paprsků různé vlnové délky, vznikají velmi úzká maxima s pološířkou 8 – 10 nm.



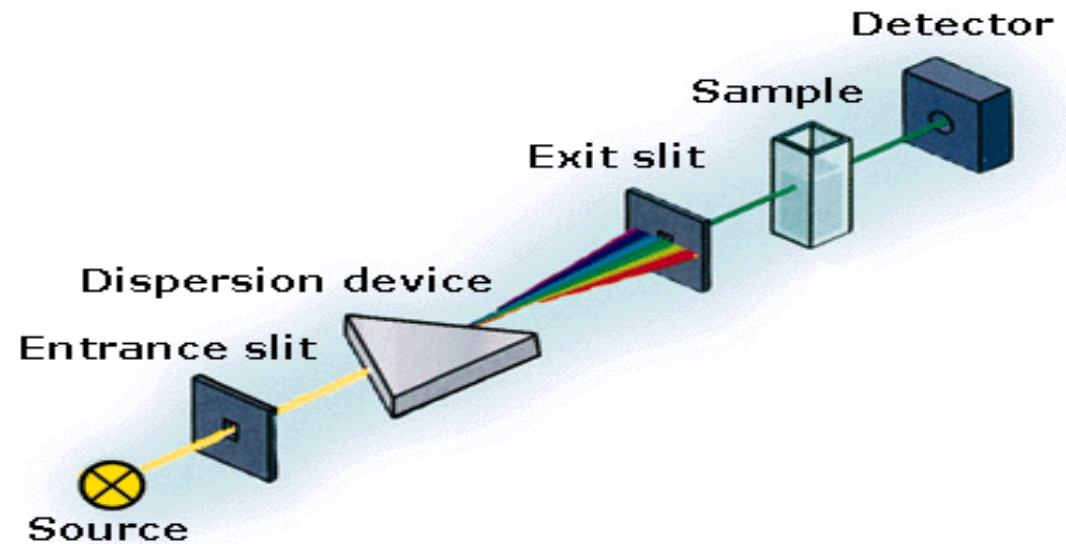
Spektrofotometr - monochromátory

Optická zařízení pomocí kterých se ze spektra polychromatického světla mechanicky vymezí pouze jeho určitá část.

Slouží pro kontinuální výběr různých vlnových délek



Monochromátor



Monochromátor se skládá:

- vstupní štěrbinu
- pomocné optiky (zrcadla, čočky)
- disperzního prvku - mřížka, hranol
- výstupní štěrbinu

Monochromátor- vstupní a výstupní štěrbina

Vstupní – vymezuje malou část světelného toku ze zdroje záření

Výstupní štěrbina – slouží k výběru záření určité vlnové délky, čím je užší tím užší je šířka pásma (bandpass) a větší **monochromaticnost záření**.

Poloha štěrbin je neměnitelná, požadovaná vlnová délka se nastavuje přímým otáčením disperzního prvku.

Monochromátor - pomocná optika

Zrcadla - jsou to plochy odrážející záření, jsou potažena obvykle vrstvou hliníku

- Rovinná – nejvíce používaná
- Dutá, kulová , parabolická

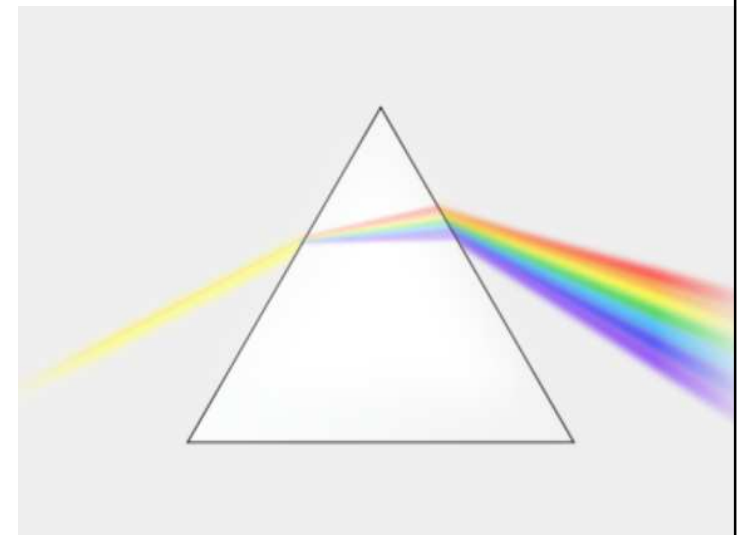
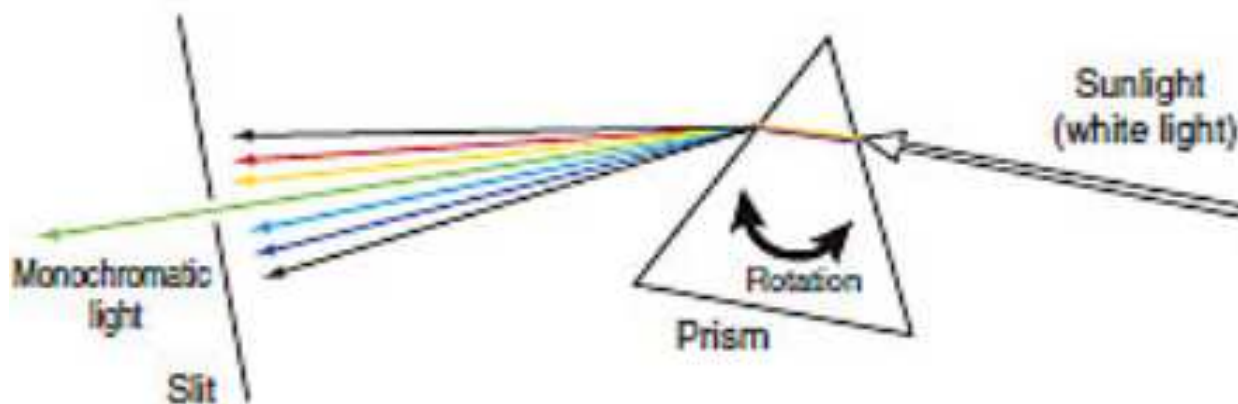
Čočky – optický zaostřovací systém

Optická vlákna – skleněná, křemenná usměrňují transport světla ve stísněných prostorech (vertikální fotometry k měření mikrotitračních destiček), mají větší světelné ztráty než zrcadla

Clony – používají se k omezení průřezu svazku paprsků, k odstínění okrajové oblasti čoček a zrcadel

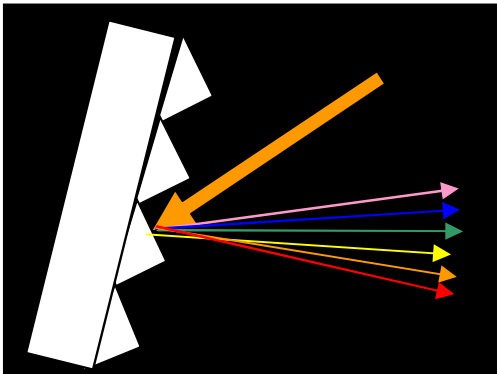
Disperzní prvek - optický hranol

- rozkládá polychromatické světlo na principu **lomu světla**
- světelné paprsky o kratší vlnové délce (modré světlo) se lámou více než paprsky s delší vlnovou délkou
- Skleněný hranol - pro rozklad světla ve VIS oblasti spektra (400-800 nm)
- Křemenný hranol – pro UV oblast (do 200 nm)



Disperzní prvek – difrakční reflexní mřížka

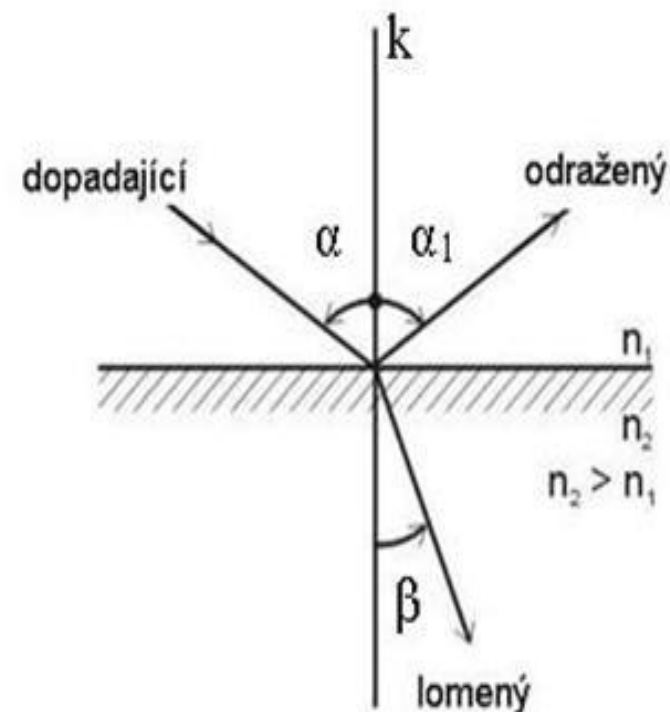
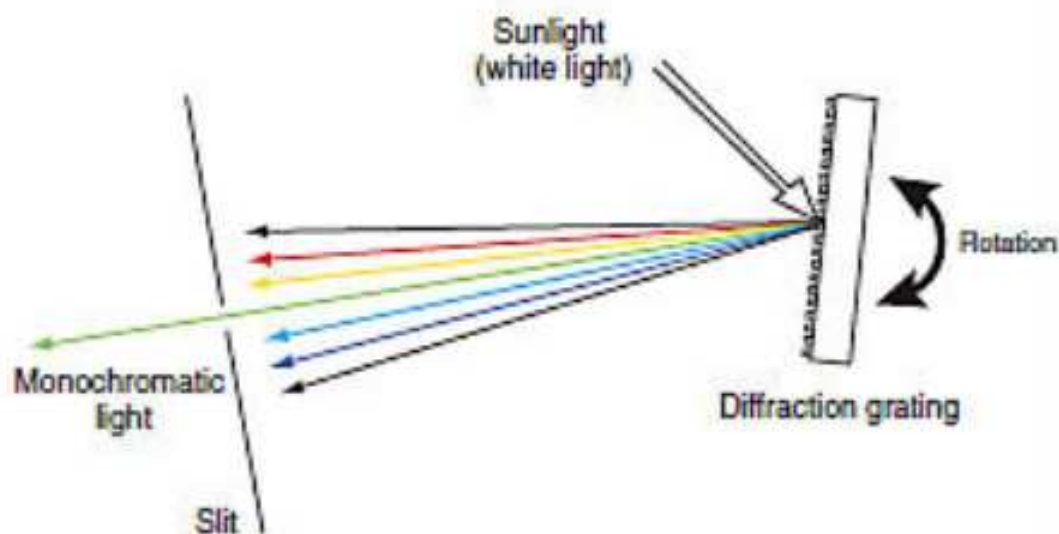
- pracuje na principu odrazu světla
- Je tvořena soustavou jemných rovnoběžných vrypů na skleněné destičce (nejkvalitnější až 1700 /1 mm)
- Na vybroušených ploškách mřížky dochází k složitým optickým procesům-odraz, interference světla, které vedou k tomu, že z mřížky vychází jednotlivé vlnové délky pod rozdílným úhlem, který závisí na vlnové délce záření
- Rozklad záření je lineární u všech vlnových délek
- Má lepší rozlišovací schopnost než hranol



Disperzní prvek – difrakční reflexní mřížka

mřížka

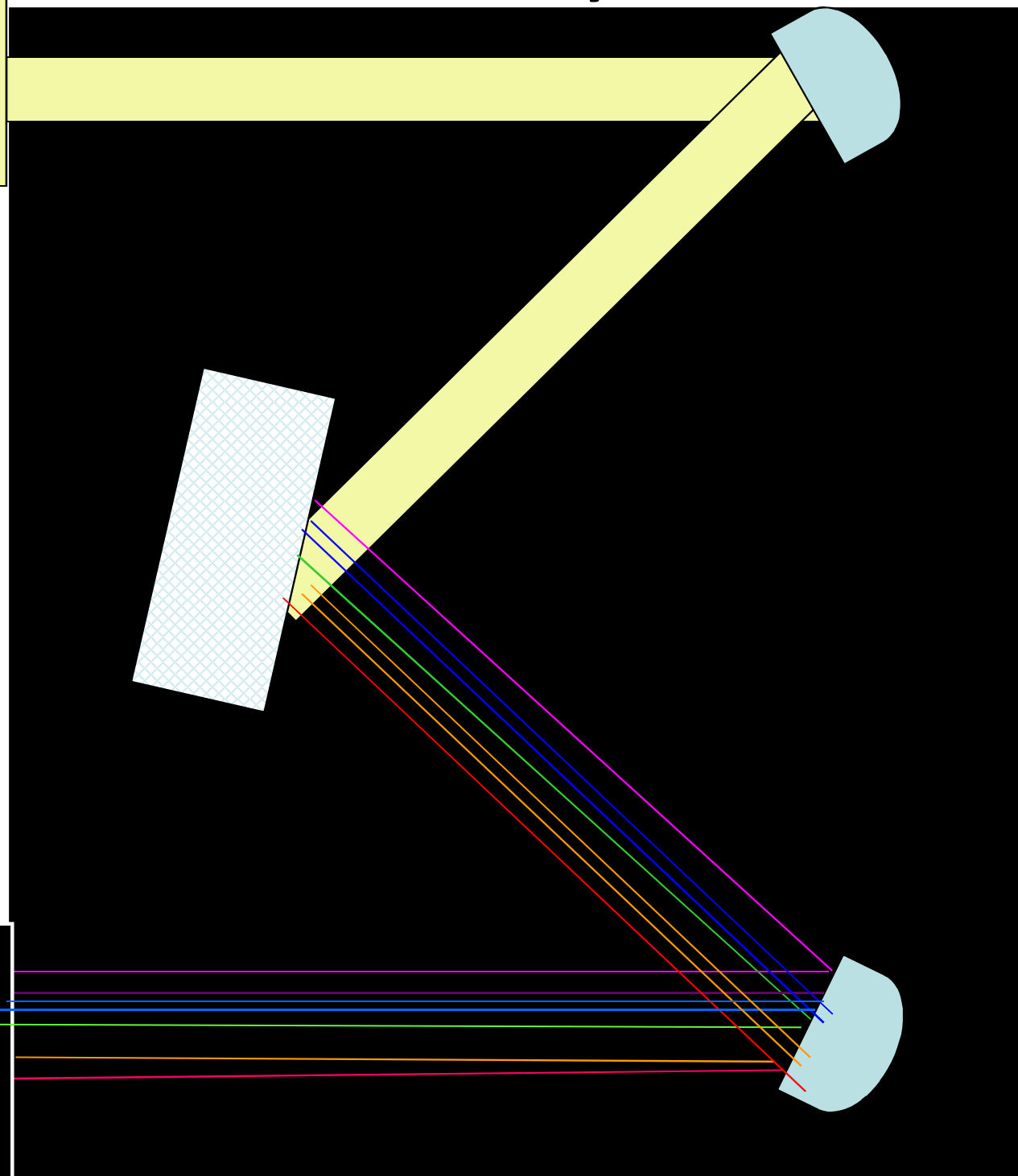
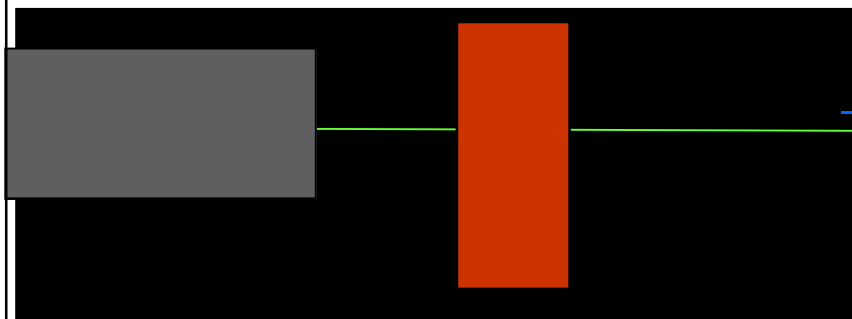
- hustota vrypů dle požadovaných vlnových délek
- IČ oblast . . . 30 – 300 vrypů/mm
- VIS a UV . . . 600 – 2 400 vrypů/mm
- rentgenová . 10 000 – 100 000 vrypů/mm



Výběr požadované vlnové délky

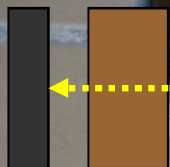


Přesným pohybem disperzního prvku monochromátoru je vzniklé světelné spektrum nasměrováno na výstupní štěrbinu tak, aby jím prošlo záření požadované vlnové délky



kyveta

detektor

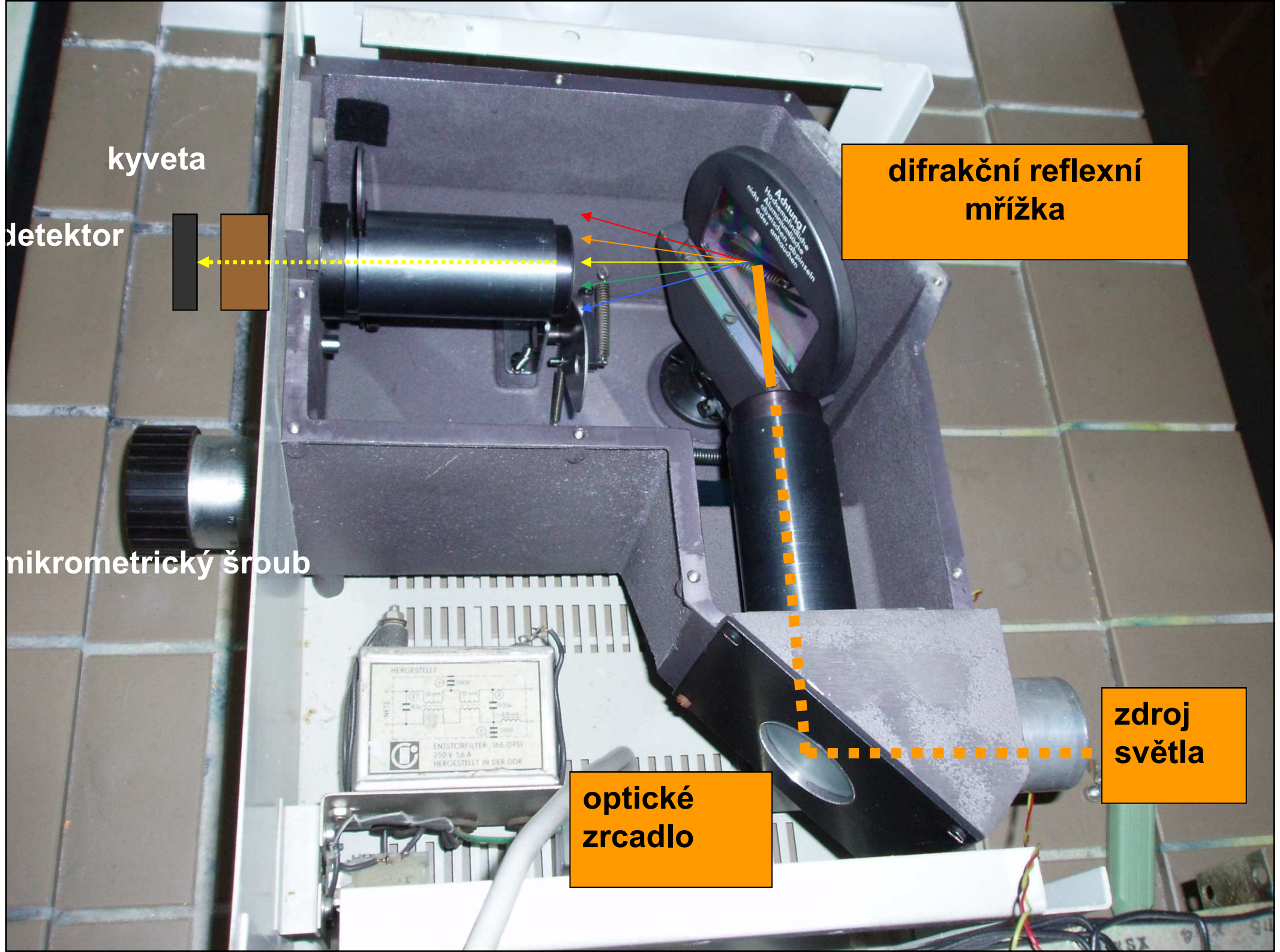
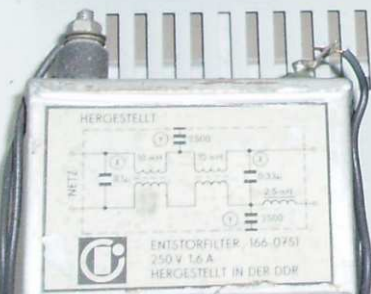


mikrometrický šroub

difrakční reflexní
mřížka

optické
zrcadlo

zdroj
světla



Spektrofotometr - Absorpční prostředí

Kyveta s měřeným vzorkem

Rozdělení:

- dle velikosti: Makro- (1-2 ml), semimikro- (<0,5 ml), mikro-(<100 μ l)
- dle typu: nalévací, průtokové
- dle materiálu: skleněné, plastové (akrylátové, polystyrenové), křemenné (UV oblast)
- automatických bioch. analyzátorech:
- kyvety na jedno použití
- trvalé – po změření se promyjí mycí stanicí

Absorpční prostředí spektrofotometru



zatavené kyvety z plastické fólie



postup miniaturizace kyvet

Spektrofotometr - detekční systém

Je složen z detektoru záření a elektronického zařízení pro zpracování jeho odezvy

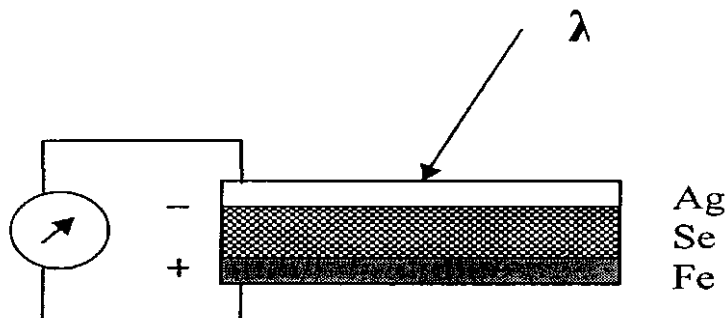
Detektory

Zařízení, které zprostředkovávají přeměnu energie záření na jinou formu – obvykle fotochemickou, elektrickou

- **Hradlový selenový fotočlánek**
- **Fotodioda**
- **Fotonásobič**
- **Detektor diodového pole**

Detektor – hradlový selenový fotočlánek

- Skládá se z polopropustné vrstvy stříbra nanesené na vrstvě selenu (polovodič) na kovovém podkladě
- Světelné záření o vlnové délce λ dopadající na polovodič působí uvolnění elektronů, které přecházejí do vrstvičky stříbra
- Tím vzniká elektrický proud, který je proporcionalní intenzitě světelného záření



Hradlový selenový fotočlánek.

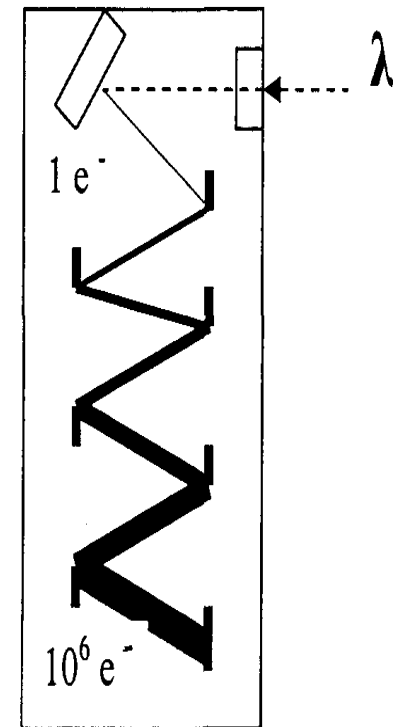
Detektor – fotodioda (fotonka)

Pracuje na principu fotoelektrického efektu

- Skládá se z fotosenzitivní katody (obsahuje Ag a různé alkalické kovy a jejich oxidy) a anody umístěné ve vakuu
- Fotokatoda uvolňuje při ozáření světlem elektrony, které jsou přitahovány anodou čímž vzniká el. proud, který je proporcionální intenzitě světelného záření

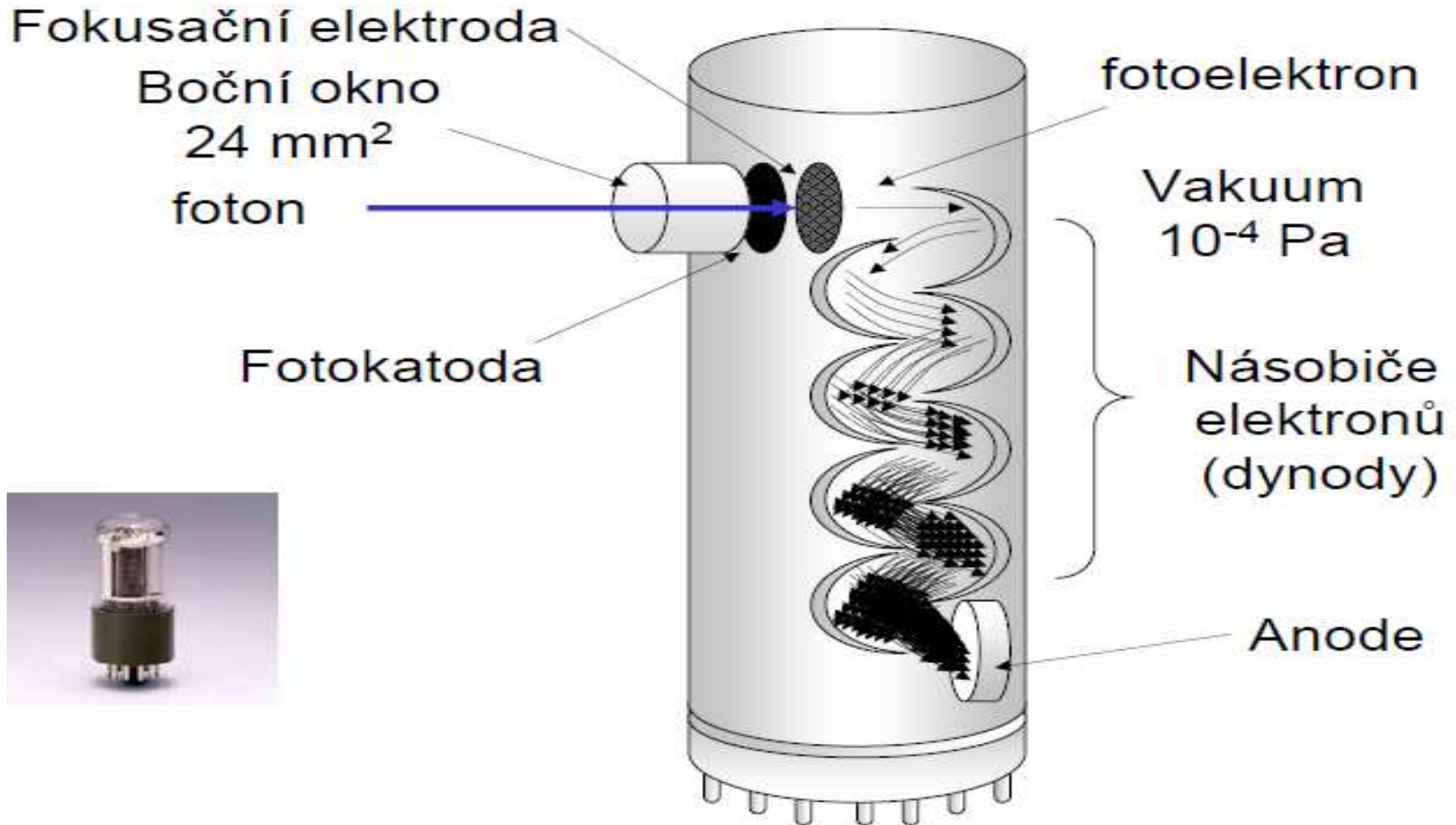
Detektor - fotonásobič

- Elektrony z fotokatody jsou postupně přitahovány k sérii dynod, na které je vloženo postupně se zvyšující napětí
- Když elektron narazí na dynodu uvolní z ní mnohem více elektronů, které jsou přitahovány k další dynodě
- Obsahuje až 10 dynod, z nichž každá následující má až o 50 V vyšší napětí
- Toto *vnitřní zesílení signálu* umožňuje převést i velmi slabé světelné záření na měřitelné hodnoty elektrického proudu



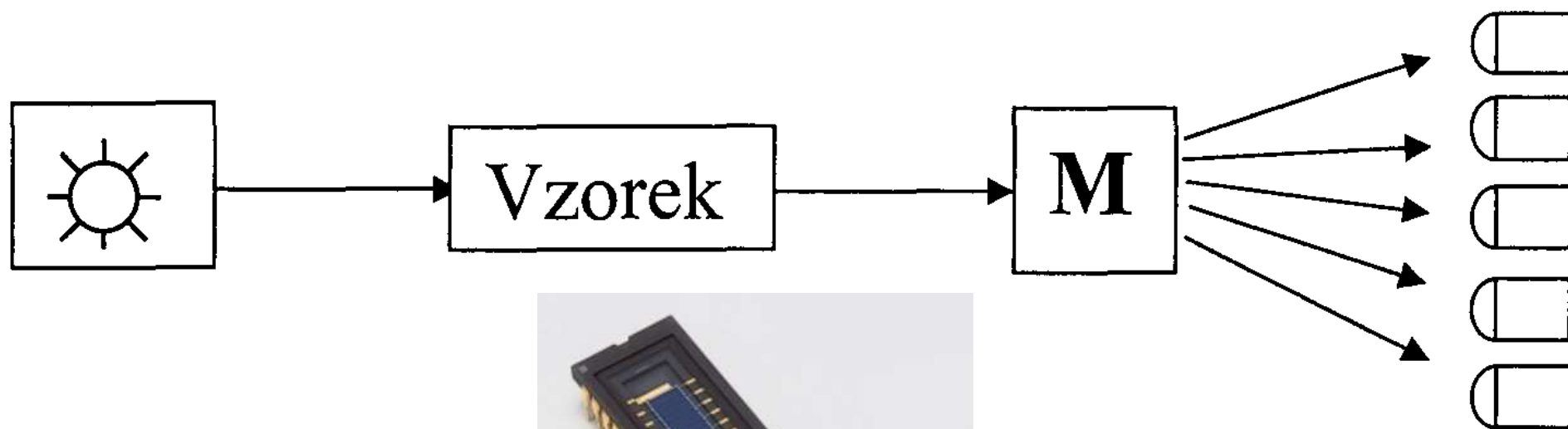
Fotonásobič.

Detektor - fotonásobič



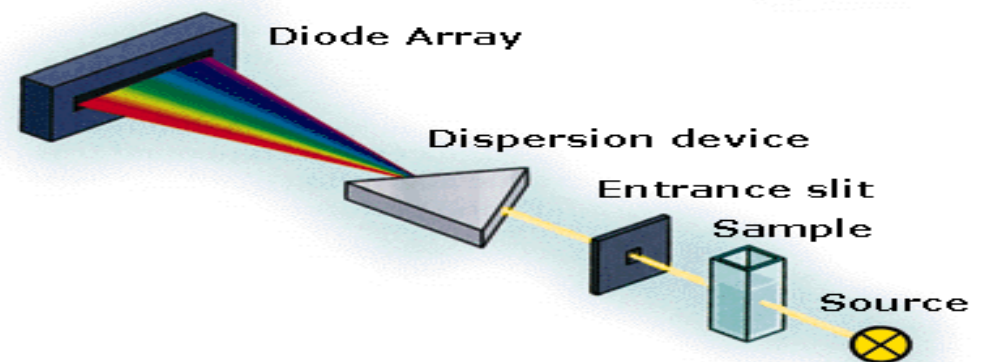
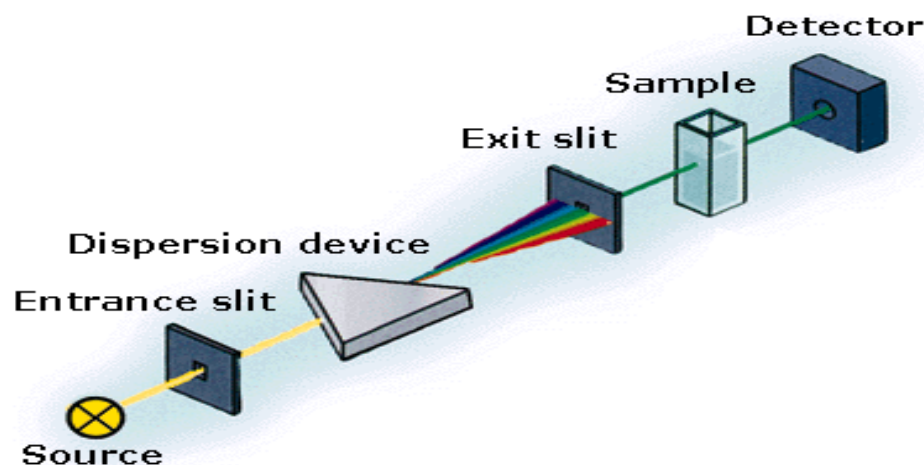
Detektor s diodovým polem

- Je tvořen velkým množstvím miniaturních fotodiod na malé ploše destičky, na kterou dopadá světelné záření po průchodu absorpčním prostředím a následně je rozložené monochromátorem na jednotlivé vlnové délky

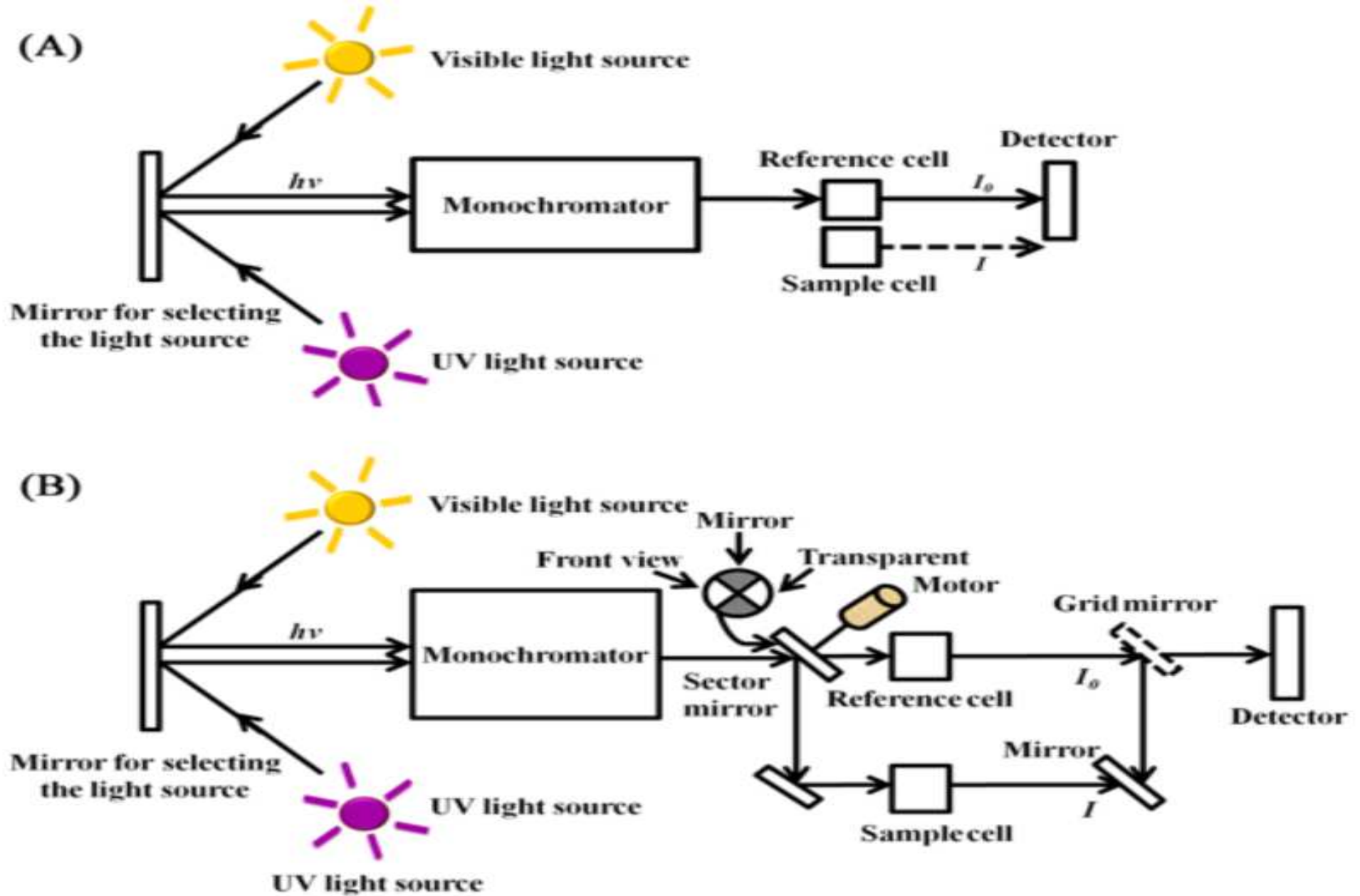


Detektor s diodovým polem

- Rozdíl oproti klasickému spektrofotometru – monochromátor je umístěn až za kyvetou se vzorkem
- Použití : v HPLC (UV/VIS detektor), automatické biochemické analyzátoary
- Usnadňuje tzv. bichromatické měření absorbance



jednopaprkový (A) x dvoupráskový spektrofotometr (B)



Kontrola kvality spektrofotometru

Linearita spektrofotometru – schopnost vykazovat lineární odezvu

- měření postupně řaděného roztoku o známé koncentraci
- Výsledkem je přímkový graf závislosti A (osa y) na c (osa x)
- Měření se provádí při λ - 257, 341, a 630 nm

Kontrola kvality spektrofotometru

Rozptýlené světlo

Světlo, které může dopadnout na detektor aniž by prošlo měřeným vzorkem (př. nedokonalé odstínění optického systému spektrofotometru)

- Ověřuje se vložení neprůsvitného bloku do nosiče kyvety a sledováním odezvy detektoru

Drift signálu

Schopnost detektoru udržovat konstantní hodnotu

- Sledování nulové linie

Vertikální fotometrie

Spektrofotometrická metoda, s uspořádáním kdy světelný paprsek prochází optickým prostředím ve vertikálním směru

Využití : proměření absorbance v jamkách mikrotitračních destiček, které se používají hlavně pro imunochemická stanovení na principu ELISA (analýzy s navázaným enzymem za využití imunosorbce)

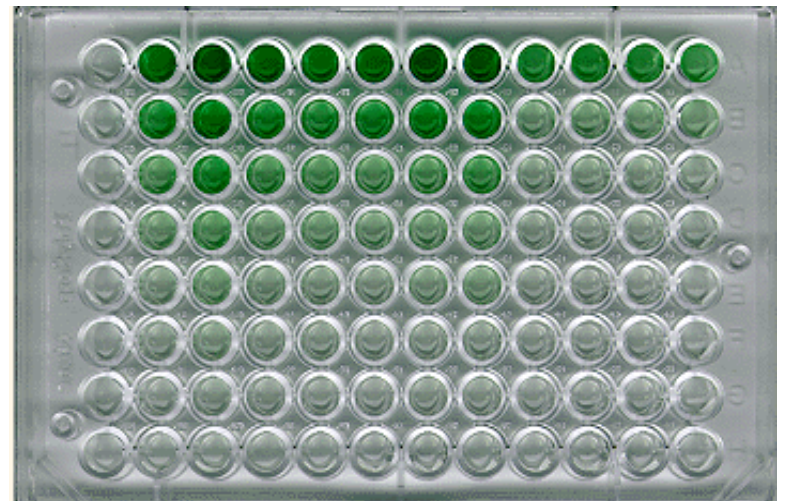


Vertikální fotometrie

Provádí se ve speciálních nádobkách uspořádaných do tzv. **mikrotitračních destiček**.

Každá destička obsahuje 96 jamek uspořádaných ve 12 řadách po 8 jamkách.

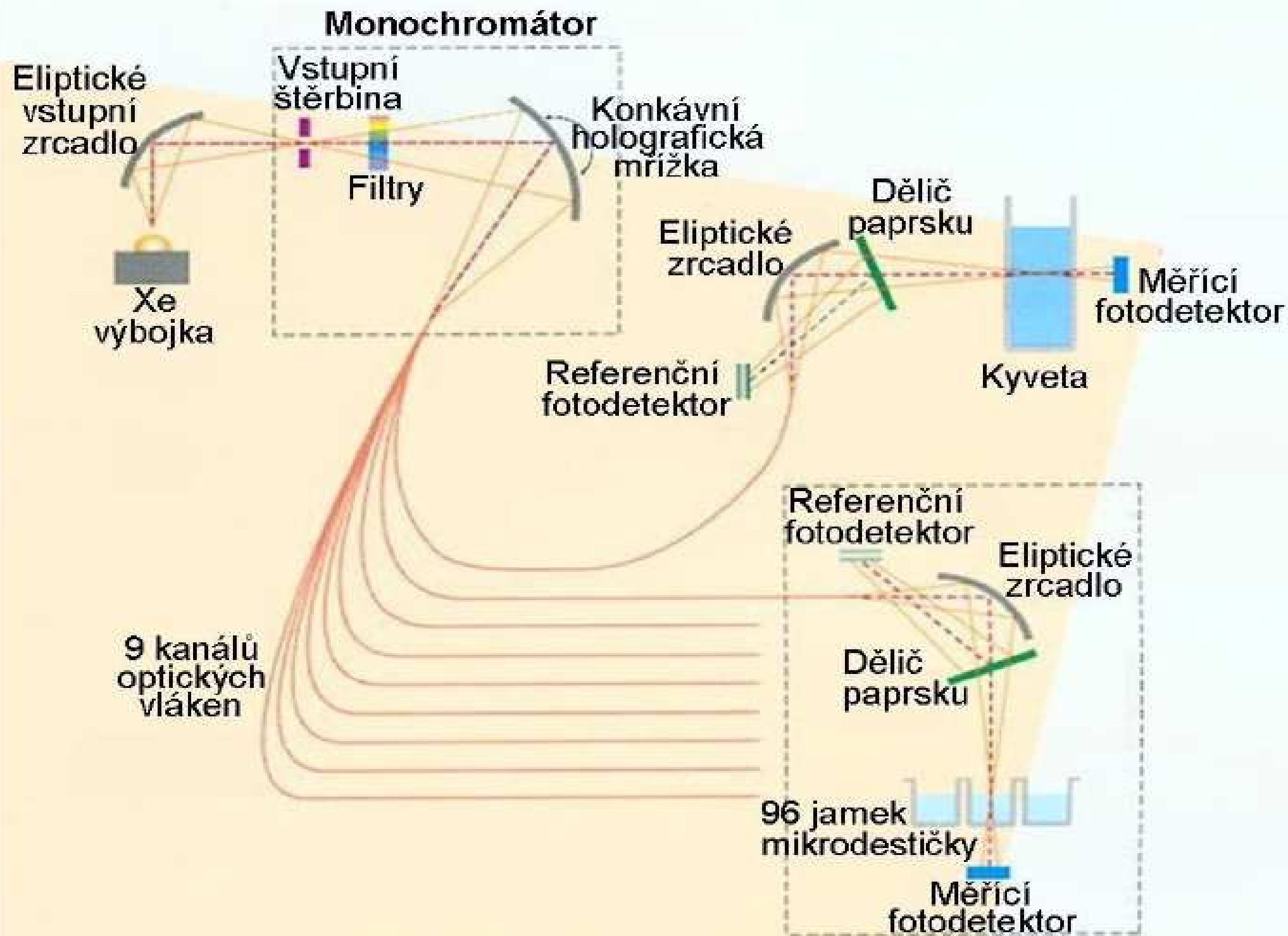
Pro měření výsledného produktu detekční reakce se používají **speciální vertikální spektrofotometry - ELISA readry mikrotitračních destiček**: je uspořádán tak, že světelný paprsek prochází optickým prostředím ve vertikálním směru.



Vertikální fotometrie

Princip: světelný paprsek ze zdroje prochází přes zvolený interferenční filtr (podle požadované vlnové délky) do optických kabelů,

- které zabezpečují distribuci do 9 oddělených kanálů: 8 z nich vedou přes jamky mikrotitrační destičky a dopadají na pole fotodiod, které detekují intenzitu světla.
- Devátý optický kabel je použit na kontrolu intenzity záření vycházejícího ze zdroje (obrázek č.8).
- Ve zlomku vteřiny se změří celá řada jamek (8), mikrotitrační destička se posune a může se měřit řada následující.



Vertikální fotometrie

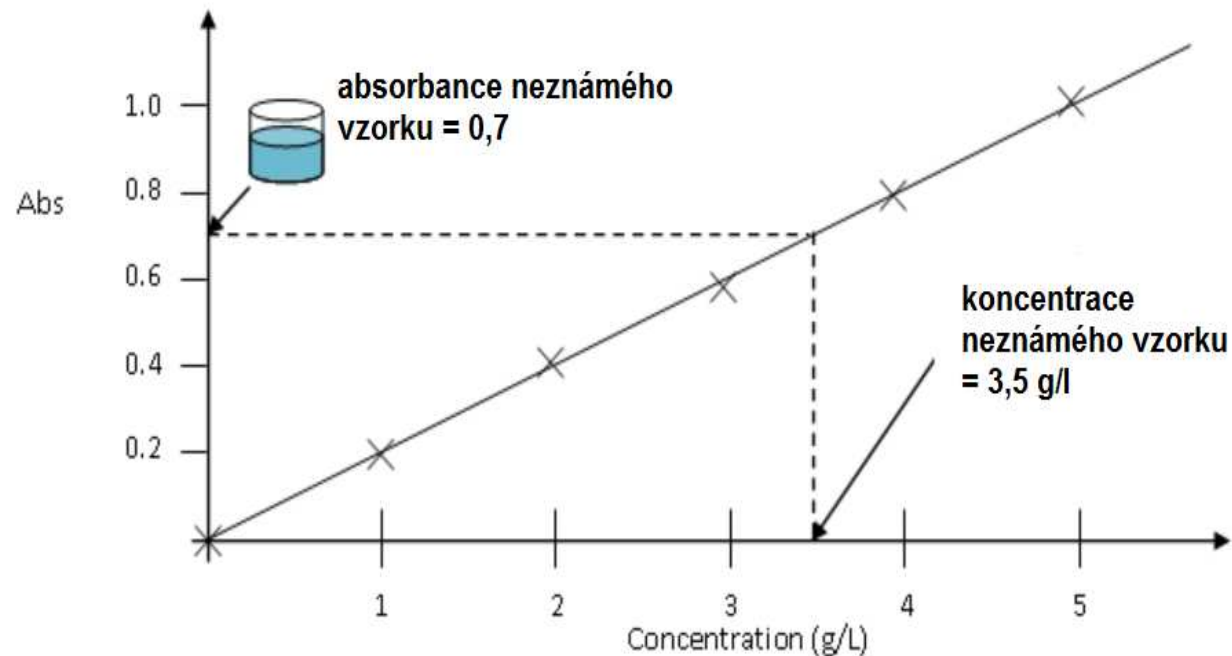
Součásti vertikálního fotometru:

- **zdroj záření:** nejčastěji používá halogenová žárovka nebo xenonová výbojka.
- **Interferenční filtry:** jsou umístěny v posuvném držáku filtrů, obvykle se používá 6 filtrů (pro λ 400-800 nm).
- **Optický systém:** se skládá 9 optických kabelů (světlovodiče), štěrbin a zrcadel pro vedení světelného paprsku ze zdroje do optického prostředí (jamka mikrotitrační destičky).
- **Detektor:** používají se fotodiody.

Rychlost měření je 5s (celá mikrotitrační destička - 96 jamek).

Vertikální fotometrie

- Vztah mezi změřeným signálem (absorpcí) a koncentrací se určuje **kalibrací**. Obvykle se změří absorbance **6-ti standardních roztoků** o známé vzrůstající koncentraci a blank (slepý pokus, obsahuje vše kromě stanovované látky) při určité vlnové délce.



Vertikální fotometrie

- Při ELISA metodě se vyžaduje měření všech vzorků v duplikátech.
- Poté software přístroje sestrojí kalibrační křivku (naměřené hodnoty absorbance standardů na ose y, hodnoty koncentrace na ose x), ze které odečte hodnoty koncentrací neznámých vzorků
- Při vertikální fotometrii závisí dosažené výsledky měření pouze na přesnosti pipetování kalibrátorů, kontrolních materiálů a vzorků.

Automatická ELISA linka

- Automatická linka provádí:
- automatické pipetování vzorků, reagensů, kalibrátorů a kontrol pomocí pipetovacího systému (2, 4, 8 jehel).
- Má zabudovanou čtečku čárového kódu, což umožňuje pozitivní identifikaci patientských vzorků.
- Linka má obvykle 3-4 místa pro umístění mikrotitračních destiček.
- Dále sestává z inkubátoru (místo pro inkubaci vzorků),
- promývačky a readeru mikrotitračních destiček.
- Transport destiček mezi jednotlivými částmi provádí pomocí robotického ramene. S
- systém provádí automatické ředění vzorků a je opatřen softwarem pro automatické vyhodnocení měření.

Reflexní fotometrie

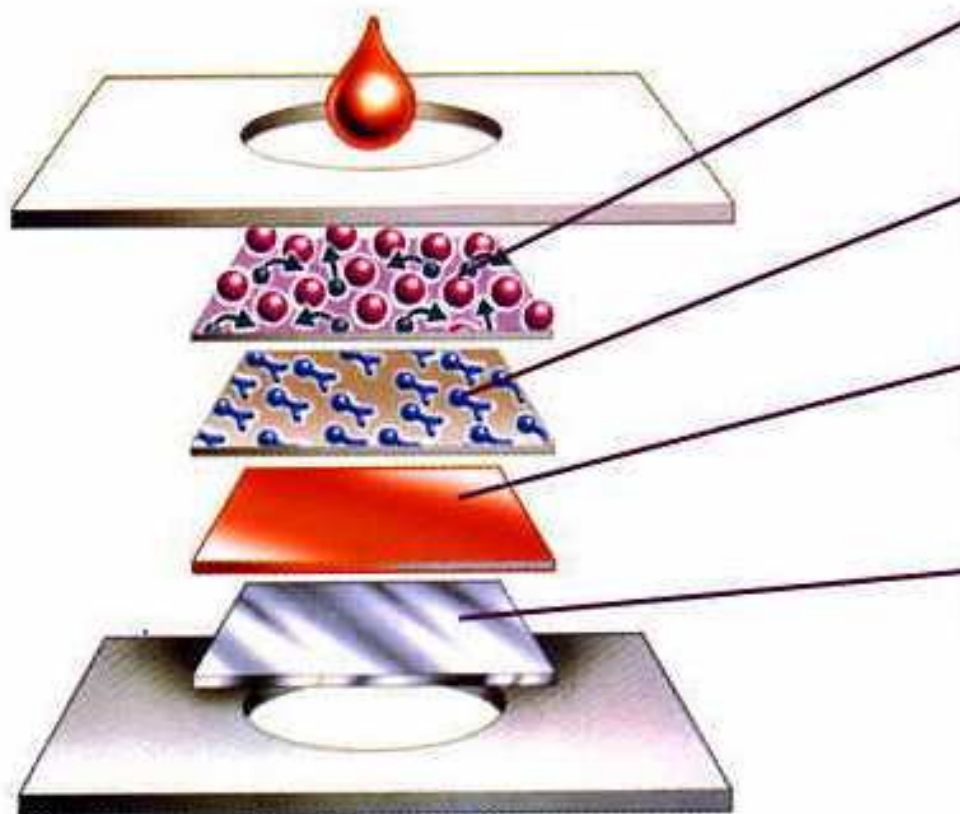
Princip

- měření intenzity záření odraženého od neprůhledné (homogenně zbarvené) podložky. Hodnotí se poměr intenzity dopadajícího světla a světla odraženého od barevné plochy
- Použití: suchá chemie, močová analýza, denzitometrické hodnocení tenkovrstevných chromatografů

Reflexní fotometrie

- Přístroj slouží ke kvantitativnímu vyhodnocení reakcí probíhajících na pevné fázi. Pevná fáze slouží jako nosič obsahující činidla aktivovaná vodou obsaženou v naneseném vyšetřovaném biologickém materiálu (krev, moč).
- Měří se intenzita záření odraženého od homogenně zbarvené podložky.(matrice)

Reflexní fotometrie



separační vrstva

reagenční vrstva

vrstva gelu

nosič

Reflexní fotometrie

Odraz světla od reagenční zóny:

- zrcadlový – na reflexní ploše zrcadla
- difuzní - je výsledkem interakce dopadajícího světla s molekulami reakční zóny (zahrnuje i absorpci a rozptyl)

Zdroj záření:

- halogenová lampa
- xenonová výbojka
- světloemitující dioda

Reflexní fotometrie

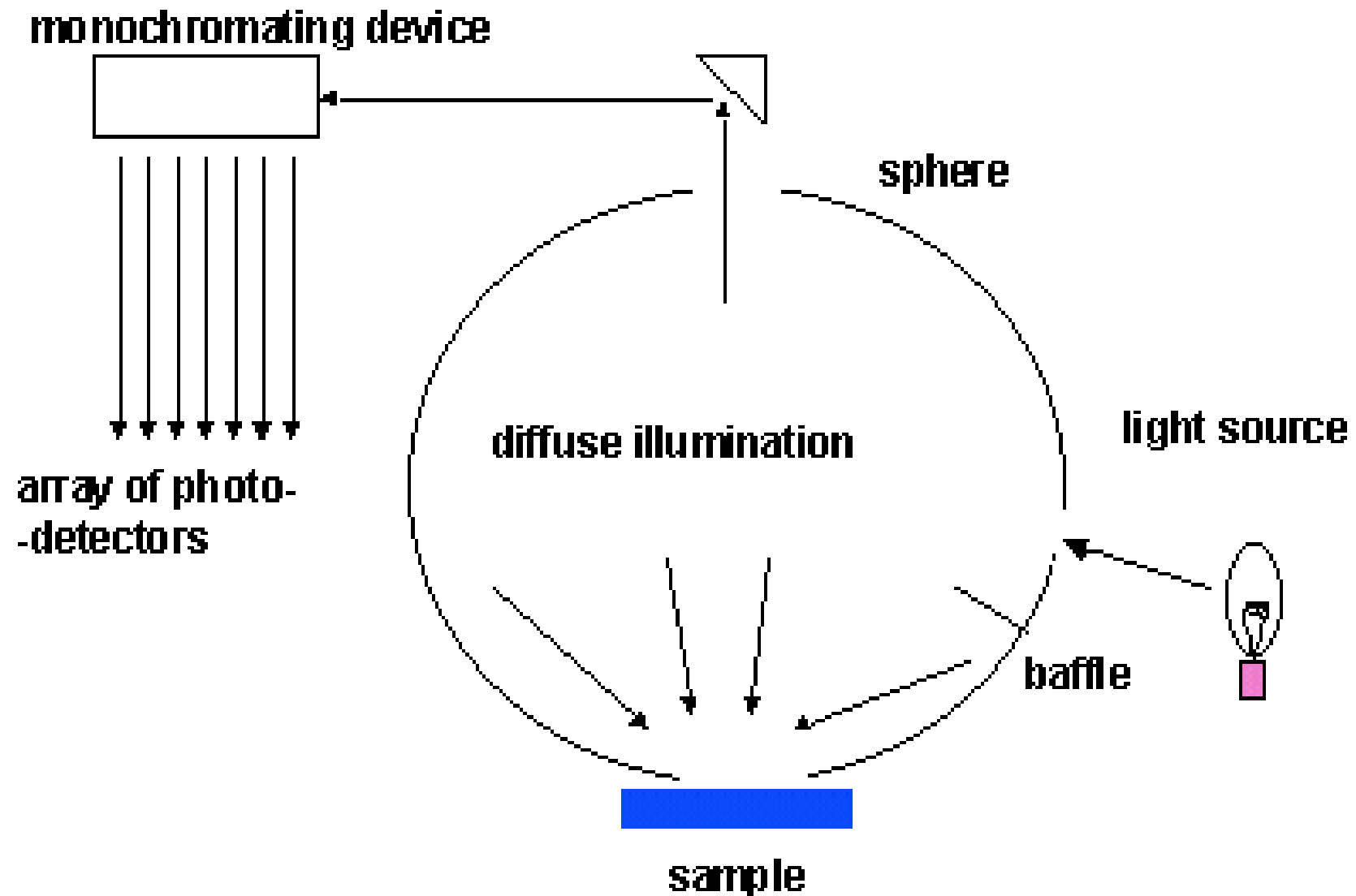
Ulbrichtova koule - jako zdroj difuzního světla:

- dutá koule jejíž vnitřní povrch je potažen vysoce reflexním materiálem (síran barnatý).
- Světlo ze zdroje se po vstupu do koule mnohonásobně odráží od stěn a jako dokonale difuzní dopadá na reagenční plošku

Reflexní fotometrie

- **Detektor záření:**
- uvnitř koule jsou umístěny dva detektory.
- Jeden měří světlo difuzně odražené od reagenční plošky a druhý je referenční

reflectance spectrophotometer

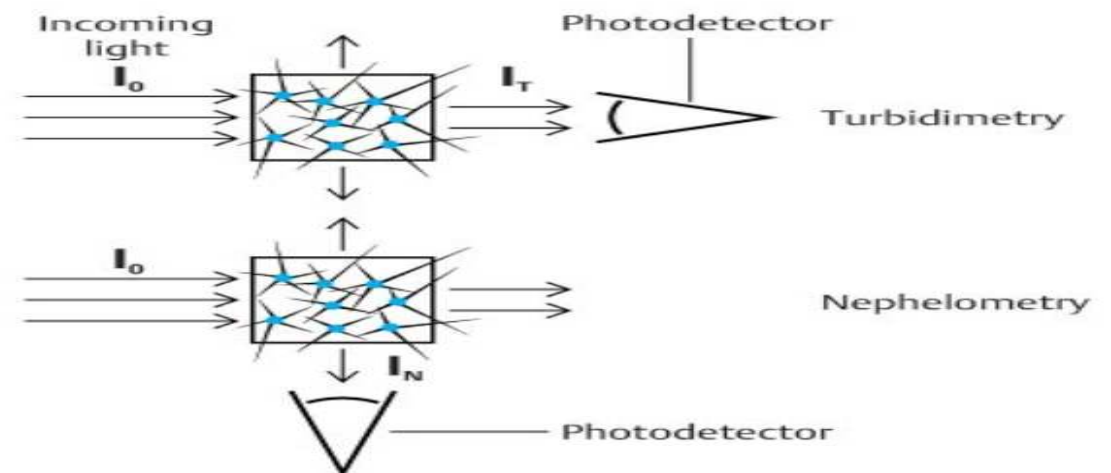


Turbidimetrie, nefelometrie

Turbidimetrie a nefelometrie

Patří mezi běžné analytické optické metody

- v klinické biochemii se používají k stanovení velké skupiny bílkovin – tzv. „specifických proteinů“
- využívají rozptylu světla na heterogenních částicích v koloidních roztocích a mikrosuspenzích



Turbidimetrie a nefelometrie

Princip

Rozptyl světla na heterogenních částicích je založen na **Tyndallově jevu**:

„Rozptýlené záření na částicích má stejnou vlnovou délku jako záření dopadající na koloidní částice“.

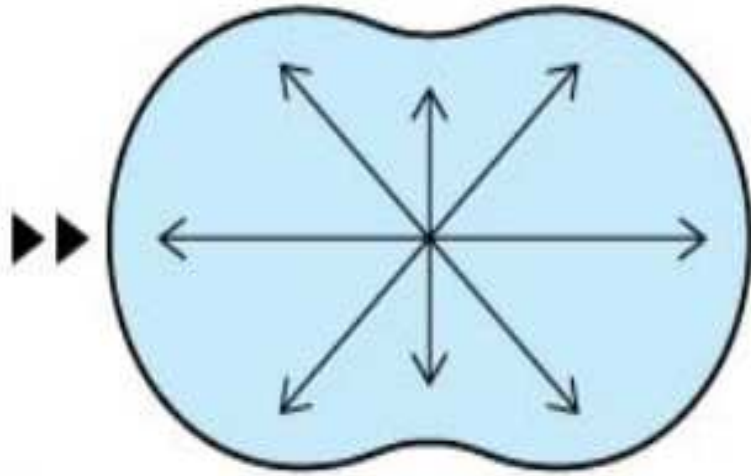
Rozptýlené světlo vychází z roztoku všemi směry.
(Tyndall, britský fyzik, 19 st.)

Turbidimetrie a nefelometrie

Tyndallův jev - dokonalý difúzní rozptyl

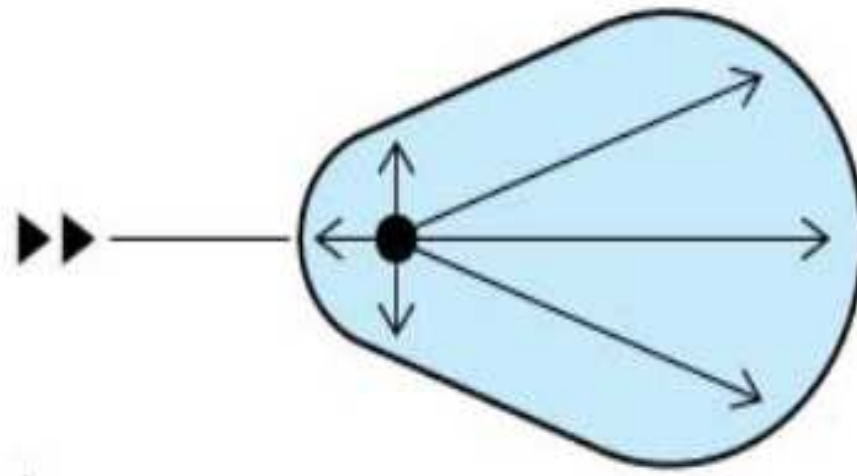
- platí pro částice které mají velikost menší než $1/10$ (př. IgG-20nm) vlnové délky dopadajícího záření
- U částice o velikosti větší $1/10 - 1$ (400-1400nm) násobek vlnové délky dopadajícího světelného záření je maximum rozptýleného světla směřováno dopředu a málo dozadu vzhledem k dopadajícímu záření – eliptický rozptyl

$(d \ll \lambda)$



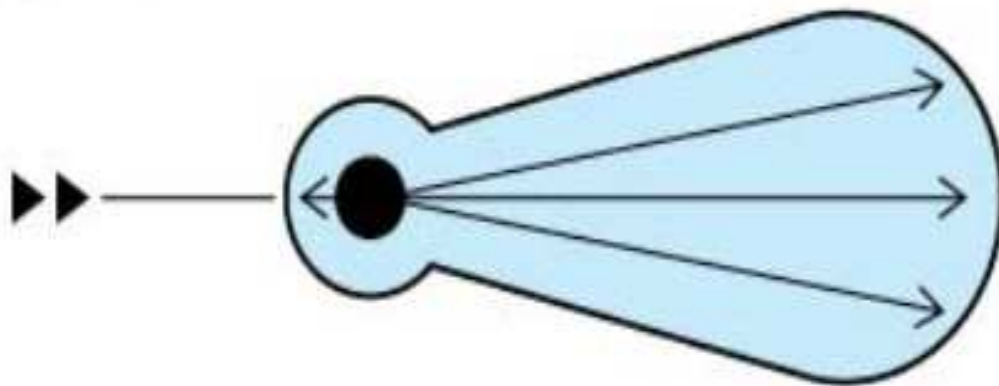
a

$(d \leq \lambda)$



b

$(d > \lambda)$



c

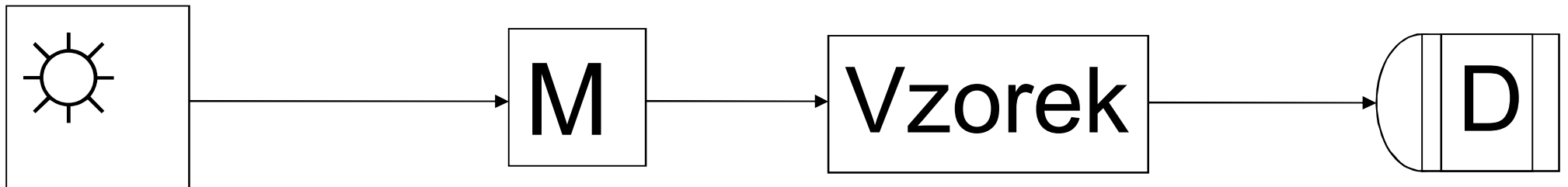
▶▶ = Incoming light beam
→ = Direction and intensity of the scattered light
 d = Particle diameter
 λ = Wavelength

Turbidimetrie

- Princip je založen na měření procházejícího **světla zeslabeného rozptylem** na částicích při průchodu světelného záření prostředím s velkými molekulami (bílkoviny)
- sleduje **pokles intenzity záření** procházející rozptylující vrstvou
- Na částicích dochází k rozptylu záření a částečně i jeho absorpci
- Závislost turbidance (odpovídá A) na koncentraci analytu je nelineární

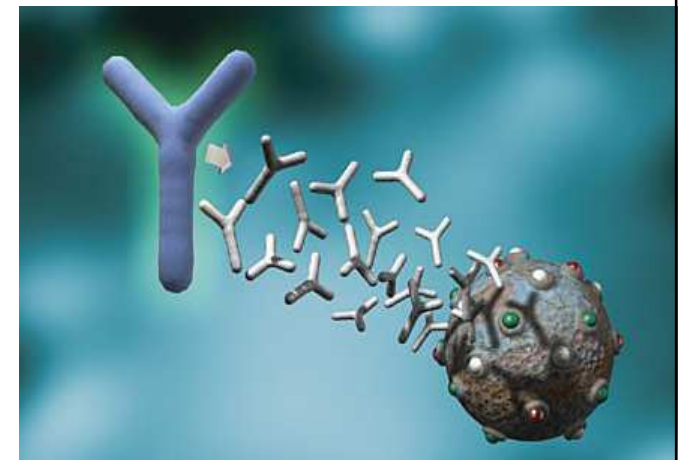
Turbidimetrie

- K turbidimetrickému měření zákalu se využívají **absorpční fotometry a spektrofotometry** - jednoúčelové turbidimetry se dnes v klinické biochemii nevyužívají
- měření se provádí v přímém směru, v ose světelného paprsku



Turbidimetrie

- měření stupně zákalu - **turbidity**
- využívají se **precipitační reakce mezi antigenem a protilátkou**
- Nutno získat dostatečně stálou suspenzi měřené reakční směsi - k tomuto účelu se používají **ochranné koloidy** (nejčastěji polyetylenglykol).

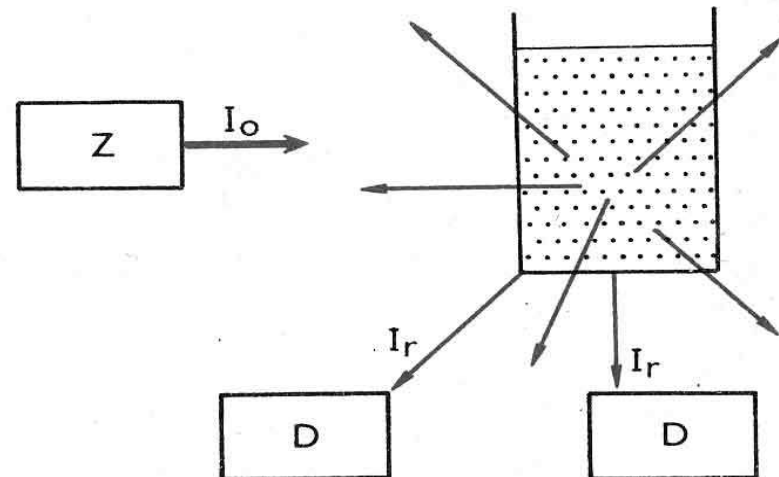


Turbidimetrie

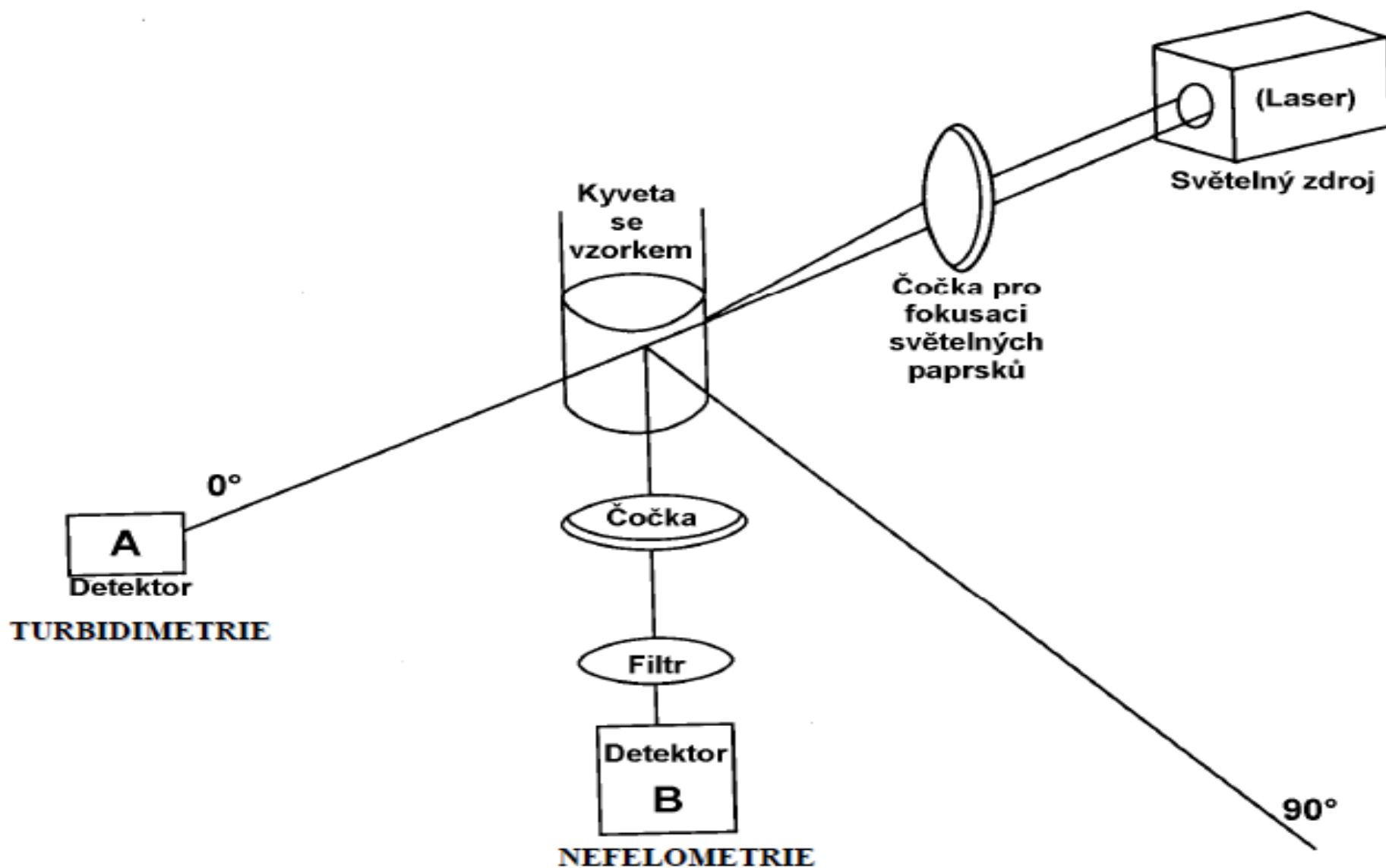
- Na biochemických analyzátoch dosahujú turbidimetrické metódy reprodukovateľnosť asi 5%
- Je treba znížiť vliv interferujících látek na minimum – jakýkoliv vliv, který způsobí vznik částic odlišné velikosti (koncentrace činidel, teplota)
- Hemolýza a ikterus ruší méně než při nefelometrii

Nefelometrie

- zabývá se měřením intenzity difúzně rozptýleného světla na částicích
- Pro tyto účely slouží buď nefelometrický nástavec k fotometru, u nichž se difúzně rozptýlené světlo sleduje pod úhlem 90° , nebo jsou vyvinuty speciální přístroje - nefelometry



Nefelometrie x turbidimetrie



Nefelometrie

Rozdělení

dle použitého zdroje záření:

- **Laserový nefelometr**
- **Konvenční nefelometry**

Laserový nefelometr

Helium neonový nebo argonový laser

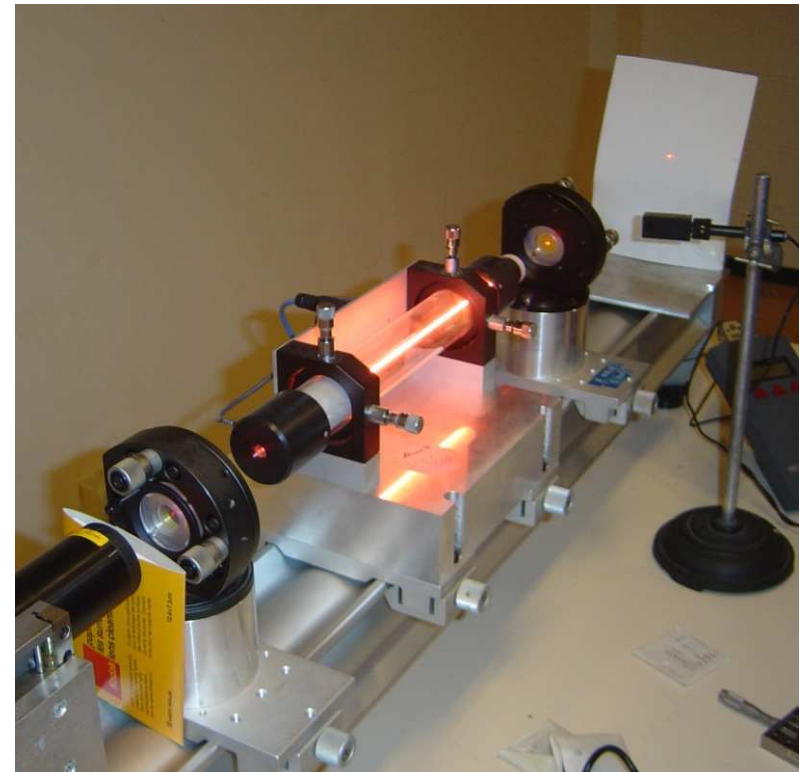
- Tento zdroj monochromatického světla je mimořádně intenzivní a má vysoký stupeň směrovosti paprsku
- Rozptýlené světlo se sleduje detektorem nastaveným pod úhlem 5 až 90° (fotonkou nebo fotonásobičem)

Laserový nefelometr

LASER = Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation = zesilování světla pomocí stimulované (vynucené) emise záření

Hlavní součásti laseru :

- *zdroj excitační energie*
- *aktivní prostředí*
- *rezonátor*



Laser

Hlavní součásti laseru :

- **zdroj excitační energie** – budící zdroj působící elektrický výboj
- **aktivní prostředí** -tj. látka obsahující oddělené kvantové energetické hladiny elektronů – může se jednat o plyn (nebo směs plynů), krystaly, polovodiče
- **rezonátor** – tvořen dvěma zrcadly:
 1. Koncové s odrazivostí 100%
 2. Výstupní s odrazivostí 99%, tzn. částečně propustné, umožňující vyzařování světelného paprsku

Konvenční nefelometry

Konvenční nefelometry

- používají jako světelný zdroj žárovku nebo xenonovou výbojku
- Monochromátor - interferenční filtr.
- Detektor je nastaven pod úhlem 70 až 90°

Xenonová oblouková lampa

- Poskytuje intenzivní světelné záření pomocí elektrického oblouku
- Skládá se z oválné baňky vyrobené z křemenného skla ve které jsou proti sobě umístěné katoda a anoda v atmosféře xenonu
- Teplota elektrického oblouku se pohybuje okolo 6000 °C
- Produkuje vysoce energetické, spojitě záření v UV oblasti

Xenonová oblouková lampa



Nefelometrie

Rozdělení podle typu měření

- **System měření v end point režimu**– po smíchání antigenu a protilátky proběhne měření po dosažení rovnovážného stavu - možnost falešně negativní (nízká) koncentrace antigenu. Proto je nutné nastavení systému tak, aby měření probíhala v oblasti lineární části křivky

Měření v tomto režimu je o řád citlivější než turbidimetrie (0,1 mg/l)

Nefelometrie

System měření v end point režimu

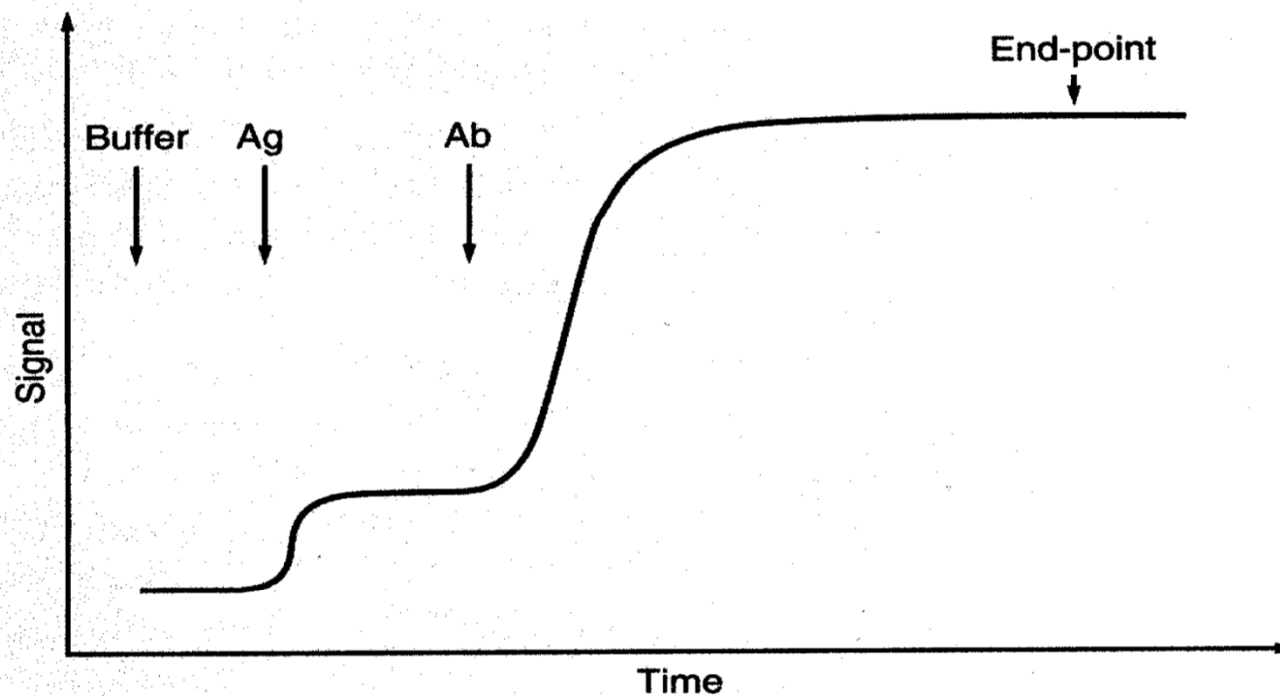


Figure 3. Signal development as a function of time. The addition of buffer, antigen (Ag), and antibody (Ab) to the reaction cuvette is indicated by arrows.

Nefelometrie

Rozdělení podle typu měření

System měření v kinetickém režimu

RATE-reakce je rychlejší, měří se přírůstek vzniku precipitátu v pravidelných časových intervalech, po dosažení rovnovážného stavu (desítky vteřin) se měření ukončuje

Nefelometrie

- **System měření v kinetickém režimu**

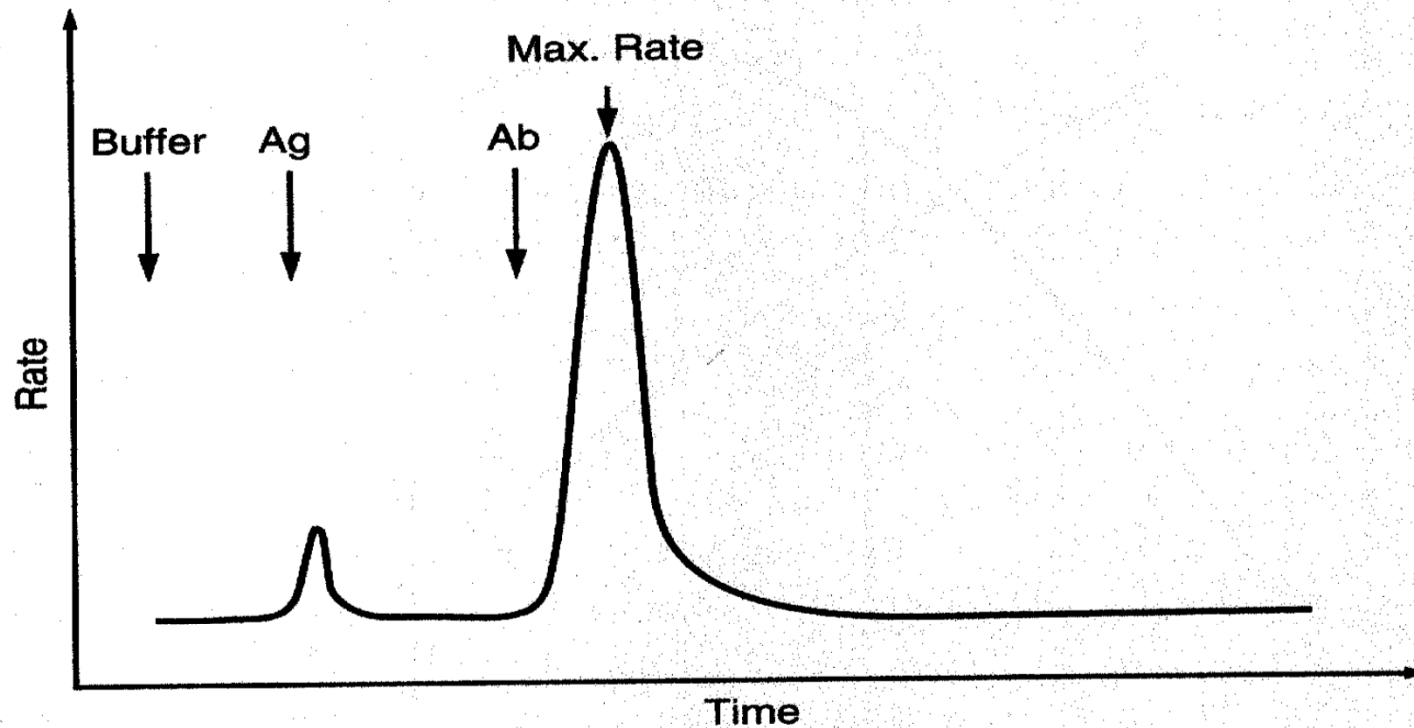
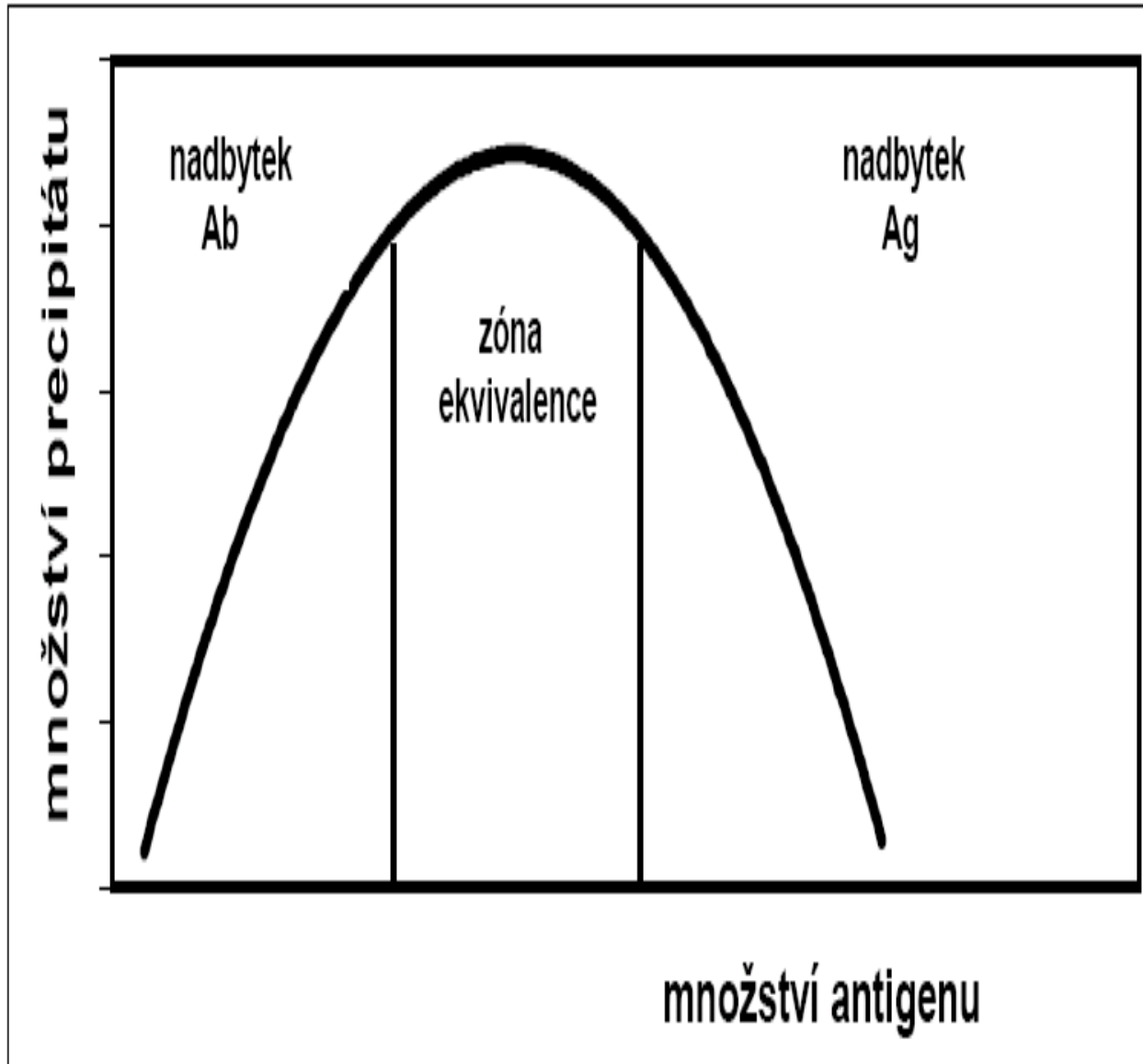


Figure 4. Reaction velocity (rate) as a function of time. The addition of buffer, antigen (Ag), and antibody (Ab) to the reaction cuvette is indicated by arrows.

Průběh imunoprecipitační reakce



Heidelbergova-Kendalova křivka:
Oblast ekvivalence

- **Oblast nadbytku protilátky**

Zákalové metody:
nefelometrie,
turbidimetrie

- **Oblast nadbytku antigenu**

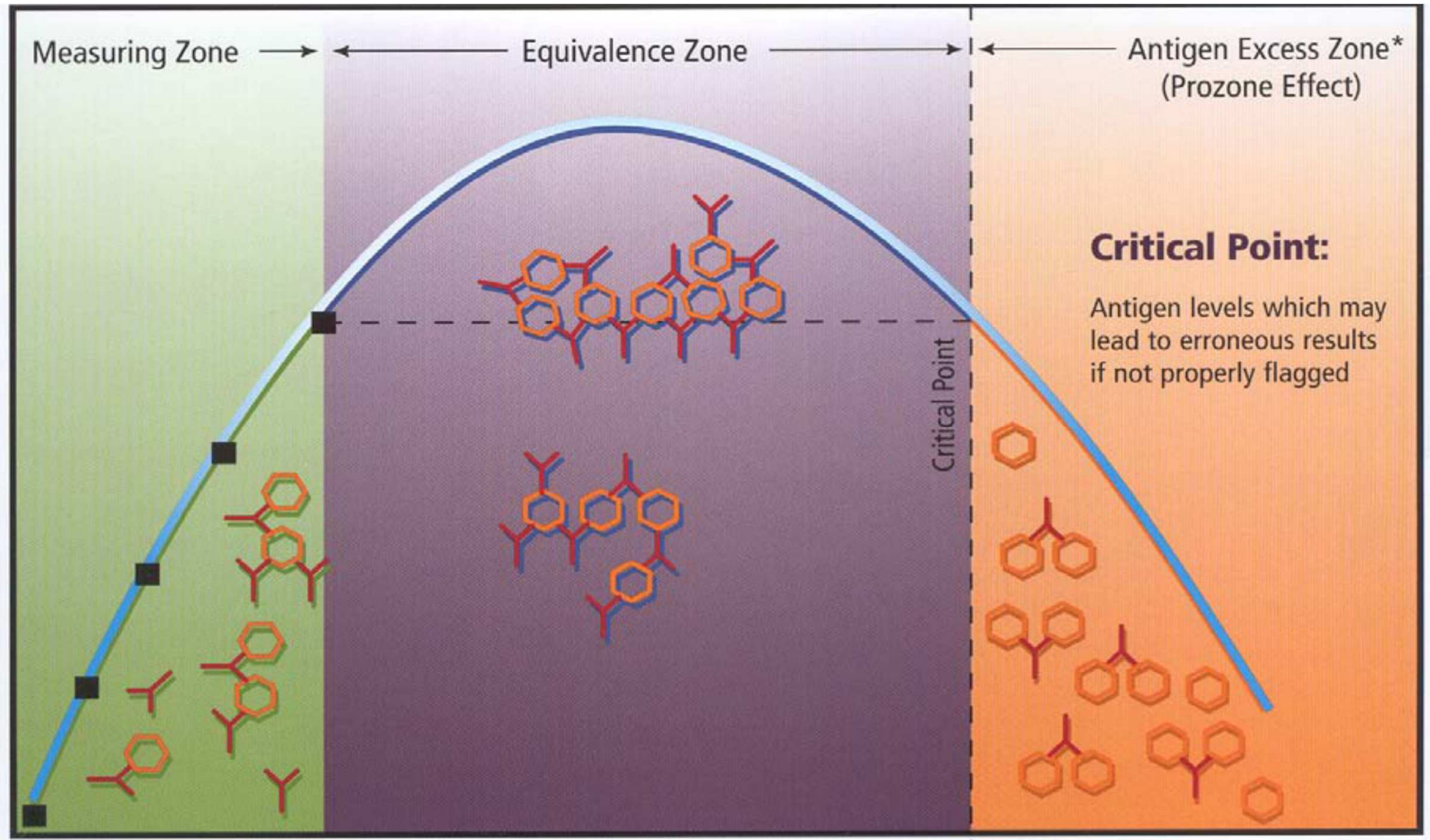
Ab - protilátka

Ag - antigen

Limitující faktory imunochemických stanovení

- Limitující faktor: precipitát se tvoří pouze při optimálním množství antigenu a protilátky, při nadbytku některé ze složek se precipitát začne rozpouštět.
- tzn. JEDNA HODNOTA KONCENTRACE PRECIPITÁTU TAK ODPOVÍDÁ DVĚMA KONCENTRACÍM ANTIGENU – možnost vydání falešně negativního výsledku

Imunoprecipitační křivka podle Heidelberga a Kendalla

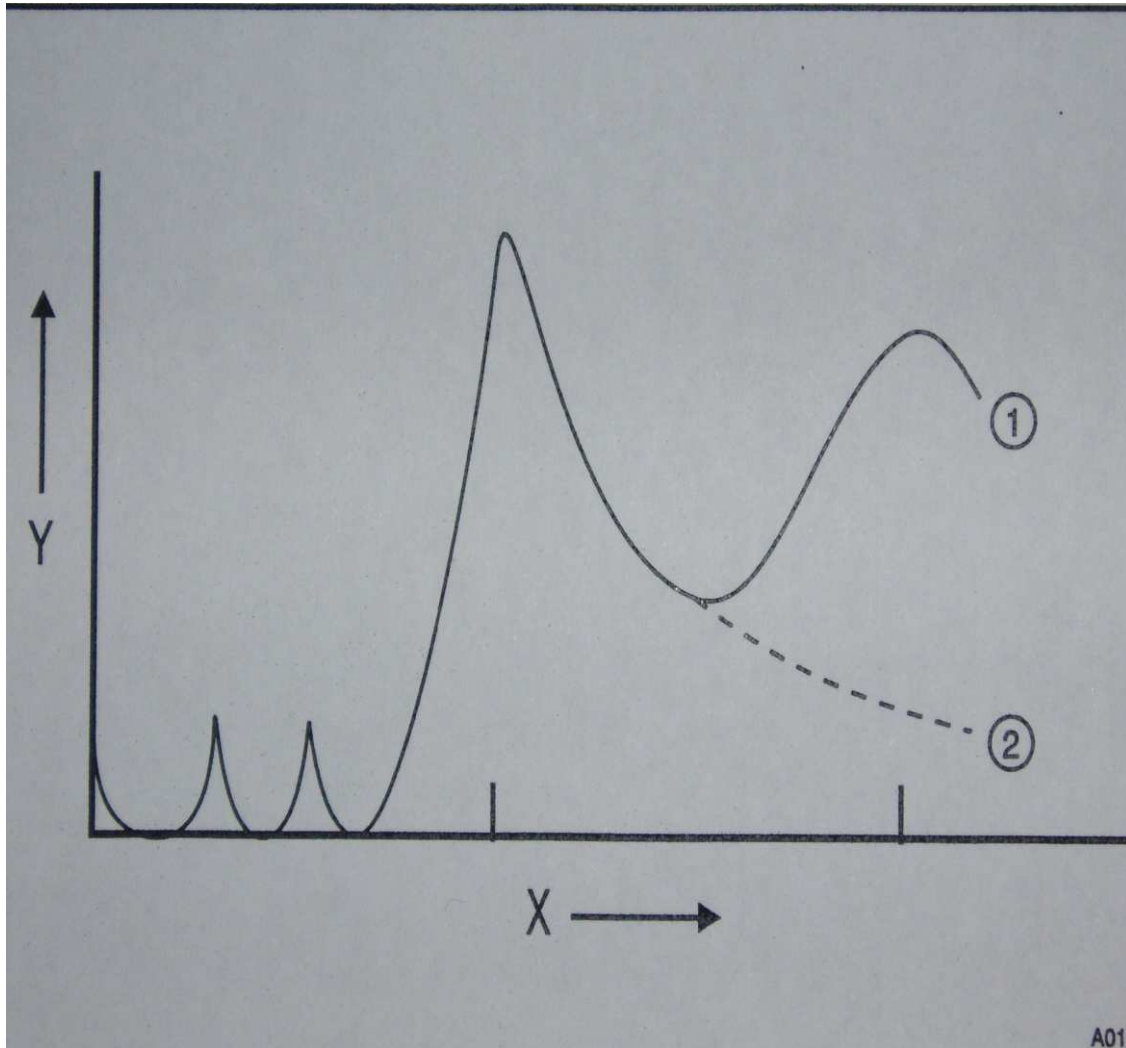


Detekce nadbytku antigenu

Několik způsobů:

- Kontrola přídavkem naředěného antigenu po proběhnuté imunoprecipotační reakci – následuje automatické opakování analýzy s vyšším ředěním.
- Přídavek malého množství vzorku k činidlu před vlastní reakcí – je-li po krátké inkubaci překročen koncentrační práh zjištěný při kalibraci, vzorek se měří automaticky znovu při vyšším ředění

Detekce nadbytku antigenu



1. V případě zachování nadbytku Ab dojde další tvorbě imunokomplexů a nárůstu intenzity rozptýleného světla
2. Pokud byla protilátka již spotřebována, nevede přidání dalšího antigenu k tvorbě imunokomplexů a na detektoru nezjistíme žádnou odezvu – reakce se automaticky opakuje při vyšším ředění

Imunochemický systém - IMMAGE 800

- Analyzátor výrobce Beckman Coulter
- využívá turbidimetrického a nefelometrického principu
- Pracuje v kinetickém režimu - měří zvýšení intenzity světla rozptýleného částicemi v kyvetě v čase



IMAGE 800 - reagenční část

- Reagenční karusel pro 24 reag. kazet
- Teplota 15°C
- 4 lahvičky s pufry bez chlazení
- Reag. kazety značené čárovým kódem
- Otevřený systém
- Softwarová kapacita -50 metod
- Kalibrační data- kal. křivka výrobce má 8-12 bodů, provádí se pouze jednobodové ověření

Vzorková část

- Vzorky ve zkumavkách s čár. kódem
- Vzorkový karusel pro 8 stojánků po 9 vzorcích
ředící roztoky pro vzorky
ředící segmenty pro ředění vzorků
- Kapacita: 180 testů za hodinu, v sérii lze provést 12 metod

Reakční část

- Reakční karusel – 39 reak. plastových kyvet, 1 referenční – známá hodnoty rozptylu, nastavení optického systému
- Teplota 37°C
- Optika – zdroje záření, detektory

Turbidimetrie

- měření stupně zákalu (turbidity) – v důsledku imunoprecipitační reakce
- Měří se snížení intenzity světla při průchodu roztokem částic v kyvetě v důsledku rozptylu světla
- Immage pracuje v kinetickém režimu – hodnotí rychlost nárůstu zákalu v čase
- NIPIA= imunoanalýza na částicích v blízké infračervené oblasti

Turbidimetrie

- Zdroj pro NIPIA: světlo emitující dioda – poskytuje monochromatické záření $\lambda = 940 \text{ nm}$
- Detekce záření: v přímém směru, v ose světelného paprsku zdroje v blízké IR oblasti (940 nm)
- Vyžití: stanovení FLC

Nefelometrie

- Zdroj: helium-neonový laser – dává monochromatické záření o $\lambda = 670 \text{ nm}$
- Detekce: detektor je umístěn v úhlu 90° ke směru laserového paprsku
- Využití: stanovení specifických proteinů v séru, v likvoru a moči

Nefelometrie

- Zdroj: helium-neonový laser – dává monochromatické záření o $\lambda = 670 \text{ nm}$
- Detekce: detektor je umístěn v úhlu 90° ke směru laserového paprsku
- Využití: stanovení specifických proteinů v séru, v likvoru a moči

Řešení problému s imunoprecipitační křivkou

- Nutno provést taková opatření, aby nedošlo k omylu při odečítání vyšších koncentrací antigenu
- IMMAGE : detekce nadbytku antigenu pomocí přidavku dalšího antigenu po ukončení reakce

Jestliže nenavázaná protilátka ...	Přídavek dalšího antigenu bude mít za následek...	System IMAGE...
Je přítomna	Zvýšení poměrové odezvy	Použije k výpočtu výsledku původní poměrovou odezvu
Není přítomna	Žádné zvýšení poměrové odezvy	Vzorek automaticky zopakuje s vyšším ředěním s testem na přebytek antigenu dokud nezíská správný výsledek

Automatizovaný nefelometr BN Pro Spec

- **Výrobce: Siemens (dříve Dade Behring)**
- **Max. provozní rychlost 180 analýz za hod.**
- **Pracuje v režimu po vzorcích**
- **K dispozici je více než 60 metod**
- **Zdroj světla: LED dioda (840 nm)**
- **Detektor – křemíková fotodioda je umístěn pod úhlem 13-24 °**

Automatizovaný nefelometr BN Pro Spec

- **Reagenční disk** je temperován na 8°C, v analyzátoru lze umístit 35 činidel
- **Reakční disk:** 60 polystyrénových kyvet pro opakované použití
- Měření probíhá při 37 °C
- Délka inkubace je 6-12 min.
- Vzorková část: lze umístit až 100 vzorků, umožňuje používat primární, sekundární zkumavky a kepy



Nefelometr Array 360

- Výrobce: Beckman Coulter
- Měření v kinetickém režimu
- Rychlost 40-80 analýz za hod.
- Zdroj světla: halogenová žárovka (400-620 nm)
- Detektor: křemíková fotonka
- K dispozici asi 60 metod
- Nevýhoda: pracovní teplota pouze 26,7 °C, velký mrtvý objem, stabilita kalibrace pouze 14 dní

Nefelometr - Delta

- Výrobce Radim
- Zdroj světla laser (670 nm)
- K dispozici 100 metod
- Rychlost 150 analýz za hod. (startovací čas 30 min., ukončovací čas 15 min. !)
- Reagenční část: 54 pozic pro reagensie, chlazená
- Reakční část: 120 omyvatelných kyvet, temperovaných na 37 °C
- Vzorková část: pro 80 vzorků



Turbox plus

- Jednoduchý manuální nefelometr
- Výrobce: ORION Diagnostica
- Lze měřit až 100 vzorků za hodinu
- Zdroj světla je LED dioda (635 nm)
- Detektor: 2 fotodiody
- Tovární kalibrace je na magnetické kartě

Děkuji za pozornost