



Plamenová fotometrie

Doc. MUDr. Petr Schneiderka CSc.

Tvorba a ověření e-learningového prostředí pro integraci výuky preklinických a klinických předmětů na LF UP a FZV UP v Olomouci

Reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/15.0313

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



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání

pro konkurenceschopnost



Univerzita Palackého
v Olomouci

Metody měření koncentrací iontů

- Metodami pro měření koncentrací sodíku, draslíku, lithia, příp. také vápníku a cesia v biologických tekutinách jsou:
 - *Plamenová emisní spektrofotometrie* (flame atomic emission spectroscopy, FAES)
 - Měření pomocí *iontově selektivních elektrod* nebo
 - *Fotometrie* chemicky vytvořených barevných komplexů těchto iontů.
 - Dříve náležely mezi běžné metody též titrace a polarografie

Metody se liší nejen principy stanovení a analytickými znaky, ale také pracovními a časovými nároky, možnostmi automatizace a materiálovými náklady.

Principy plamenové fotometrie (1)

- Plamenová fotometrie využívá schopnosti některých alkalických kovů a kovů alkalických zemin charakteristicky zbarvit plamen hořící směsi vhodného paliva a okysličovadla.
 - Lithium barví plamen červeně, sodík žlutě, draslík fialově, vápník cihlově červeně a cesium modrofialově.
- Zbarvení přítomných příměsí se odstraní filtrem nebo jiným monochromátorem, jímž se současně vybírá potřebná část emisního spektra.
- Fotometricky se měří intenzita zbarvení plamene, která je přímo úměrná koncentraci iontů ve vzorku.

Principy plamenové fotometrie (2)

- Vzorek se do plamene dopravuje ve formě aerosolu.
- Elektrony nejvyšší obsazené hladiny přítomných prvků (valenční elektrony) se teplem budicího zdroje excitují a zaujmou na zlomek sekundy vyšší energetickou hladinu.
- Při návratu do původních drah potom vyzáří (emitují) světlo, jehož vlnová délka je pro každý prvek charakteristická.

Principy plamenové fotometrie (3)

- Emisní spektra jsou čárová a počet čar je u uvedených prvků nevelký. Hlavní emisní čáry využívané pro měření leží ve viditelné oblasti spektra
- Charakteristické čárové spektrum vysílá prvek pouze tehdy, když je v plameni přítomen jako volný atom. Energie plamene tedy musí rozrušit chemické vazby a kation prvku musí přejít do stavu volného atomu.

Principy plamenové fotometrie (4)

- Množství atomů dotyčného prvku, tzv. stupeň atomizace, závisí na teplotě plamene a na složení hořící směsi.
- Počet excitovaných atomů představuje vždy pouze asi 10 % z celkového počtu přítomných atomů.
 - Teplota plamene propan-vzduch (1925 °C) dostačuje pro excitaci atomů alkalických kovů.
 - K excitaci vápníku je zapotřebí výhřevnější plamen, např. směsi acetylen-vzduch (2300 °C). Referenční metodou pro stanovení vápníku je atomová absorpční spektrofotometrie (AAS).

Plamenový fotometr

- Plamenový fotometr obsahuje:
 - Část pro úpravu vzorku zvanou atomizér,
 - Hořák s příslušnou přívodnou a regulační jednotkou,
 - Soustavu pro izolaci spektrálních čar a vymezení optické dráhy,
 - Detekční a měřicí část (viz schéma plamenového fotometru).
 - Pomocnými zařízeními jsou tlakové láhve s plyny, vzduchový kompresor a dilutor (zředovač) vzorku.

Součásti plamenového fotometru (1)

- Základní částí **atomizéru** je zmlžovač (nebulizér), v němž se metodou laminárního pneumatického zmlžování vytváří jemný aerosol s kapénkami o průměru asi 10 μm .
- Míchá se zde palivo s oxidovadlem (např. vzduchem) a se vzorkem a vzniklá směs se dopravuje k hořáku.

Součásti plamenového fotometru (2)

- Plamen, který vzniká v ústí **hořáku** zapálením této směsi, je zdrojem emisního záření.
 - Jeho teplota závisí na složení a vzájemných poměrech palivové směsi.
 - Pro snížení vlivu pozadí je do optické osy detektoru záření nastavena nesvítivá část plamene.
- K izolaci spektrálních čar, tj. k výběru vlnové délky vhodné pro účely měření, se používají interferenční **filtry**.
 - Jejich účelem je zajištění nejvyšší propustnosti pro světlo zvolené vlnové délky a omezení či zabránění průchodu světla jiných vlnových délek téhož prvku nebo ostatních přítomných prvků.

Součásti plamenového fotometru (3)

- **Optická soustava** plamenového fotometru se skládá z:
 - Parabolického zrcadla zesilujícího intenzitu světla.
 - Souboru kondenzorů soustřeďujících paprsek k optické ose.
- Pro **měření** intenzity emitovaného záření je plamenový fotometr vybaven fotoelektrickými články (fotočlánek nebo fotobuňka). Vzniklý proud je zesilován a analogově nebo digitálně indikován.

Přístrojové vybavení a měření (1)

- Plamenové fotometry používané v klinických laboratořích pracují s tzv. **vnitřním standardem**.
 - To znamená, že pro vyhodnocení signálu stanovovaného prvku se používá jiný srovnávací prvek - vnitřní standard.
 - Vnitřní standard se nesmí přirozeně vyskytovat v měřeném vzorku, ale jeho chování v plameni musí být podobné stanovovaným prvkům.
 - Vnitřním standardem bývá obvykle lithium nebo cesium.
 - Když je naopak zapotřebí stanovit lithium ve vzorku, např. při monitorování léčby solemi lithia, použije se jako vnitřní standard draslík.

Přístrojové vybavení a měření (2)

- Měřený vzorek se ředí roztokem vnitřního standardu o definované koncentraci. Koncentrace stanovovaného prvku je potom přímo úměrná poměru intenzit emitovaného světla tohoto prvku a vnitřního standardu.
- Metodou vnitřního standardu se eliminují možné chyby způsobené nestabilitou plamene, nehomogeností aerosolu, nerovnoměrným transportem vzorku a dalšími faktory.

Přístrojové vybavení a měření (3)

- **Kalibrace** při plamenové fotometrii je jednobodová
 - Při stanovení sodíku a draslíku se k ní používá roztok obsahující definované koncentrace obou iontů (140 mmol Na⁺/l a 5 mmol K⁺/l).
- Vícekanálová konstrukce plamenového fotometru umožňuje měřit současně více prvků: jeden kanál je referenční a je vyhrazen k měření vnitřního standardu, ostatní kanály slouží pro měřené prvky.



Videosekvence „Plamenový fotometr“



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

Videosekvence „Plamenový fotometr“ (1)

- Plamenovou fotometrii demonstrujeme na vícekanálovém přístroji FLM 3 (Radiometer), jehož palivem je směs propan-vzduch.
- Při čelním pohledu na plamenový fotometr je nahoře vidět černý komínek zčásti zakrývající **hořák**. Na předním panelu jsou umístěny ovládací prvky a digitální ukazatel.
- Pod nimi lze spatřit **nasávací jehlu** pro vzorky a kalibrační roztoky. Na levé straně přístroje je připevněn vzduchový filtr a před ním odpadní trubička pro přebytečný vzorek.
- Propan je dodáván z **tlakové láhve** a zdrojem stlačeného vzduchu je přídatný **kompresor**.

Videosekvence „Plamenový fotometr“ (2)

- Dalším periferním zařízením je mechanický **dilutor**, který slouží k ředění standardů a vyšetřovaných vzorků
- Obsluha přístroje je převážně manuální
- Obsluha shromáždí předem označené vzorky, u nichž je požadováno stanovení výše uvedených iontů a uvede plamenový fotometr do provozu

Videosekvence „Plamenový fotometr“ (3)

- Nejprve si pomocí dilutoru připraví příslušná ředění kalibrátorů sodíku a draslíku roztokem vnitřního standardu a provede jejich měření (kalibraci).
 - Vzorek séra nebo moči pro stanovení sodíku a draslíku se ředí v poměru 1:200,
 - Vzorek séra pro stanovení lithia se ředí 1:50.

Videosekvence „Plamenový fotometr“ (4)

- V dalším kroku se jednotlivé vzorky řadí vnitřním standardem a postupně se měří.
 - Vnitřním standardem pro stanovení Na^+ a K^+ je vodný roztok LiCl o koncentraci 3 mmol/l
 - Vnitřním standardem pro stanovení Li^+ je vodný roztok KCl o koncentraci 2 mmol/l.

Videosekvence „Plamenový fotometr“ (5)

- Na začátek a konec každé série měření vzorků pacientů se vkládají komerční kontrolní vzorky s definovanou koncentrací iontů (vnitřní kontrola kvality).
- Výsledky všech měření operátor/ka bezprostředně zaznamenává do protokolu a po skončení série je vkládá do laboratorního informačního systému anebo - při urgentním požadavku - je telefonicky hlásí žadateli.

Literatura

- Štern P. a kol.: Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia, Karolinum Praha, 2. vydání 2011
- Schneiderka P. a kol.: Stanovení analytů v klinické biochemii, 1.část, Karolinum Praha 1999
- Doležalová V. a kol.: Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii. Učební text IDVPZ Brno, 1995. ISBN 80-7013-198-5



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

Plamenový fotometr (zjednodušené schéma)

