

P. Schneiderka, Ústav patologické fyziologie LFUP a OKB FN Olomouc

## Plamenová fotometrie

### Úvod

Jednou z metod pro měření koncentrací iontů sodíku, draslíku, lithia, příp. také vápníku a cesia v biologických tekutinách je plamenová emisní spektrofotometrie, flame atomic emission spectroscopy (FAES). Ke stejnému účelu se dnes v klinických laboratořích častěji používá měření pomocí iontově selektivních elektrod nebo fotometrie chemicky vytvořených barevných komplexů těchto iontů. Dříve náležely mezi běžné metody také titrace a polarografie. Všechny tyto metody se liší nejen principy stanovení a analytickými znaky, ale také pracovními a časovými nároky, možnostmi automatizace a materiálovými náklady.

### Principy plamenové fotometrie a základní informace

Tato metoda využívá vlastnosti 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. Plamen je tedy zdrojem světla a fotometricky se měří intenzita jeho zbarvení, která je přímo úměrná koncentraci iontů ve vzorku.

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

Emisní spektra jsou čárová a počet čar je u výše 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 musí rozrušit chemické vazby a kation prvku musí přejít do stavu volného atomu. 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). V laboratorní praxi se to ale nepoužívá a referenční metodou pro stanovení vápníku je atomová absorpční spektrofotometrie (AAS).

### Přístrojové vybavení a měření

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, a detekční a měřicí část (**viz schéma plamenového fotometru**). Pomocnými zařízeními jsou tlakové láhve s plyny, vzduchový kompresor a dilutor vzorku.

Základní částí **atomizéru** je zmlžovač (nebulizér), v němž se metodou laminárního pneumického 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.

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. Optická soustava plamenového fotometru se dále skládá z parabolického zrcadla zesilujícího intenzitu světla, a ze 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.

Plamenové fotometry užívané v klinických laboratořích pracují s tzv. vnitřním standardem, což znamená, že pro vyhodnocení signálu stanovovaného prvku používají jiný srovnávací prvek nazývaný **vnitřní standard**. Ten 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 třeba naopak stanovit lithium ve vzorku, např. při monitorování léčby solemi lithia, použije se jako vnitřní standard draslík. 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, nehomogenitou aerosolu, nerovnoměrným transportem vzorku a dalšími faktory.

**Kalibrace** při plamenové fotometrii je jednobodová a při stanovení sodíku a draslíku se k ní používá roztok obsahující definované koncentrace obou iontů (140 mmol Na<sup>+</sup>/l a 5 mmol K<sup>+</sup>/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 měření prvků.

### Videosekvence „Plamenový fotometr“

Plamenovou fotometrii demonstrujeme na starším 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 přídavný **kompresor**.

Dalším periferním zařízením je mechanický **dilutor**, který slouží k ředění standardů a vyšetřovaných vzorků.

Obsluha přístroje je převážně manuální. Operátor(ka) shromáždí předem označené vzorky, u nichž je požadováno stanovení výše uvedených iontů a uvede plamenový fotometr do provozu. 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. Vnitřním standardem pro stanovení Na a K je vodný roztok LiCl o koncentraci 3 mmol/l a vnitřním standardem pro stanovení lithia je vodný roztok KCl o koncentraci 2 mmol/l.

V dalším kroku se vnitřním standardem ředí jednotlivé vzorky a postupně se měří. 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 nebo při urgentním požadavku je telefonicky hlásí žadateli.

## **Doporučená 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