



INSTRUMENTALNE METODE V ANALIZNI KEMIJI

Breda Pivk



SPLOŠNE INFORMACIJE O GRADIVU

Izobraževalni program:

Tehnik laboratorijske biomedicine

Ime modula:

Fizikalno-kemijske laboratorijske metode – FKM

Naslov učnih tem, ki jih obravnava učno gradivo:

- Zgodovinski razvoj in osnove analiznih metod.
- Sestavni deli instrumentov za optično spektrometrijo.
- Instrumenti za merjenje absorbance.
- Instrumenti za merjenje emisije, sipanja in refleksije svetlobe.
- Druge analizne metode in instrumenti.

Naslov učnega gradiva:

Instrumentalne metode v analizni kemiji

Avtorica: Breda Pivk

Avtorica slikovnega gradiva: Breda Pivk

Recenzentka: Valerija Vadnov

Lektorica: Petra Vončina

Datum: januar 2011



To delo je ponujeno pod Creative Commons Priznanje avtorstva-Nekomercialno-Deljenje pod enakimi pogoji 2.5 Slovenija licenco.



POVZETEK

Učno gradivo v splošnem delu obravnava osnovne sestavne dele instrumenta, sestavne dele optičnih instrumentov, osnove absorbimetrije in pripadajoče izrazoslovje. V nadaljevanju (specialnem delu) obravnava instrumente, ki temeljijo na merjenju absorpcije, emisije, sipanja in refleksije svetlobe na vzorcu, elektroanalizne instrumente, osmometer, analizatorje, najpogostejše separacijske metode in instrumente v medicinskih laboratorijih in osnove radiokemijskih metod. Poleg značilnosti instrumentov gradivo obravnava tudi teoretične osnove, ki so potrebne za razumevanje delovanja posameznih instrumentov.



KLJUČNE BESEDE: *instrument, blok shema, Beer-Lambertov zakon, analizne metode, vzorec.*



KAZALO

UVOD.....	5
1. ZGODOVINSKI RAZVOJ IN OSNOVE ANALIZNIH METOD	6
RAZVOJ ANALIZNIH METOD V LABORATORIJSKI MEDICINI.....	7
INSTRUMENT KOT PRIPOMOČEK ZA MERJENJE KONCENTRACIJE SNOVI	9
ELEKTROMAGNETNA VALOVANJA.....	13
OSNOVE OPTIČNIH METOD	19
2. SESTAVNI DELI INSTRUMENTOV ZA OPTIČNO SPEKTROMETRIJO	33
IZVORI SVETLOBE	35
ELEMENTI ZA IZBIRO VALOVNE DOLŽINE.....	40
KIVETE	51
DETEKTORJI SVETLOBE.....	54
3. INSTRUMENTI ZA MERJENJE ABSORBANCE.....	60
ABSORBIMETRIČNE MERITVE VZORCEV V TEKOČI OBLIKI.....	61
ABSORBIMETRIČNE MERITVE VZORCEV V PLINASTI OBLIKI.....	68
4. INSTRUMENTI ZA MERJENJE EMISIJE, SIPANJA IN REFLEKSIJE (ODBOJA) SVETLOBE	77
MERJENJE EMISIJE SVETLOBE	78
MERJENJE SIPANJA SVETLOBE NA DELCIH SUSPENZIJE	91
ANALIZA Z REAGENTI, KI SO VEZANI NA TRDNE DELCE - »SUHA KEMIJA«.....	95
5. DRUGE ANALIZNE METODE IN INSTRUMENTI	99
ELEKTROANALIZNE METODE	100
OSNOVE TERMIČNIH IN KRIOSKOPSKIH METOD	107
CENTRIFUGIRANJE IN ELEKTROFOREZA	111
ANALIZATORJI	120
RADIOKEMIJSKE METODE	127



PREDSTAVITEV CILJEV UČNE ENOTE

Dandanes se izvajajo analize bioloških vzorcev v medicinskih laboratorijih na najsodobnejših instrumentih. Poznavanje principa delovanja instrumentov je pomembno zato, da razumemo napake, do katerih lahko pride pri delu z njimi in da te napake tudi odpravljamo. Zavedati se moramo, da je delo z instrumenti vse kaj drugega, kot le pritiskanje na gumb. Poznavanje delovanja preprostih instrumentov je osnova za razumevanje bolj zapletenih. V tem učbeniku so predstavljene osnove nekaterih instrumentalnih metod in instrumentov, ki so zasnovani na teh metodah. Specifični instrumenti niso opisani, ker se med seboj razlikujejo glede na proizvajalca, z razvojem tehnologije pa se spreminjajo tudi njihove lastnosti (novi modeli).

Cilji:

- Na kakšnem principu delujejo instrumenti (npr. spektrometer), ki jih uporabljate pri vajah, in instrumenti, s katerimi ste se seznanili v medicinskih laboratorijih?
- Ali vsi instrumenti delujejo po enakem principu?
- Kakšna je občutljivost instrumentov, s katerimi merimo koncentracijo snovi v vzorcih?
- Kako izvajamo meritve koncentracije snovi v vzorcih in kako vemo, ali je rezultat analiz točen?
- Kako obdelamo vzorec, da ga lahko izmerimo z določenim instrumentom?



UPORABA INSTRUMENTOV V LABORATORIJSKI MEDICINI

V učnem gradivu **Instrumentalne metode v analizni kemiji** boste spoznali teoretične osnove delovanja instrumentov, ki se uporabljajo v laboratorijski diagnostiki, svoje znanje pa boste uporabili in nadgradili med opravljanjem poklica tehnika laboratorijske biomedicine.

UVOD

Zaradi hitrega razvoja znanosti in tehnologije se danes uporabljajo v laboratorijski biomedicini drugačni analizni postopki in instrumenti, kot so se nekoč. Instrumenti postajajo vse bolj avtomatizirani, tako da večino postopkov, ki so jih izvajalci laboratorijskih preiskav včasih opravljali ročno, sedaj naredi analizator. Pojavila se je večja potreba po poznavanju sestavnih delov instrumentov, načinu njihovega delovanja in vzdrževanja.

V ta namen je bil leta 1984 uveden v program *laboratorijski tehnik* nov predmet, ki se je takrat imenoval *osnove instrumentalnih metod v klinični kemiji in klinični biokemiji*. Nekaj let kasneje so se vsebine tega predmeta priključile vsebinam predmeta z naslovom *analizna kemija*. S prenovno programa *laboratorijski tehnik* se je preimenovalo tudi ime programa v *tehniki laboratorijske biomedicine*. Učne vsebine, ki so opisane v tej učni enoti, so se posodobile in se priključile strokovnemu modulu *fizikalno-kemijske laboratorijske metode*.

Učni sklop *instrumentalne metode v analizni kemiji* obravnava teoretične osnove instrumentov za kemijske analize, ki se uporabljajo v medicinskih laboratorijih. Vsebinsko se povezuje z nekaterimi vsebinami kemije in fizike, od strokovnih modulov pa najbolj z medicinsko biokemijo in deloma z laboratorijsko hematologijo.

Ker je težko dobiti podatke o nekaterih sestavnih delih novejših instrumentov, npr. sestava ionoselektivnih elektrod pri potenciometričnih meritvah in princip delovanja fotodiod, so te vsebine opisane bolj na splošno. Splošen je tudi opis analizatorjev, ker bi podrobnejši opis specifičnih instrumentov zavzel preveč prostora, presegel število ur tega modula, poleg tega pa se zgradba in delovanje analizatorjev tako hitro spreminja, da bi bil opisan instrument zastarel že kmalu po objavi učnega gradiva.

1. ZGODOVINSKI RAZVOJ IN OSNOVE ANALIZNIH METOD



CILJI UČNE TEME

V zadnjih stotih letih so analizne metode dosegle skokovit napredek. Včasih zdravniki niso postavljali diagnoze na osnovi rezultatov laboratorijskih preiskav, danes pa si postavitev diagnoze brez pomoči laboratorija ne moremo več predstavljati. V medicinskih laboratorijih izvajajo analize bioloških vzorcev s pomočjo instrumentov. Za razumevanje pojma instrument je potrebno poznavanje osnovnih značilnosti instrumentov.

Cilji:

- Kratek zgodovinski razvoj analiznih metod v medicinskih laboratorijih.
- Instrument kot pripomoček za merjenje koncentracije snovi in njegove splošne značilnosti.
- Elektromagnetna valovanja s poudarkom na svetlobi.
- Vrste optičnih metod.
- Osnove absorbimetrie.

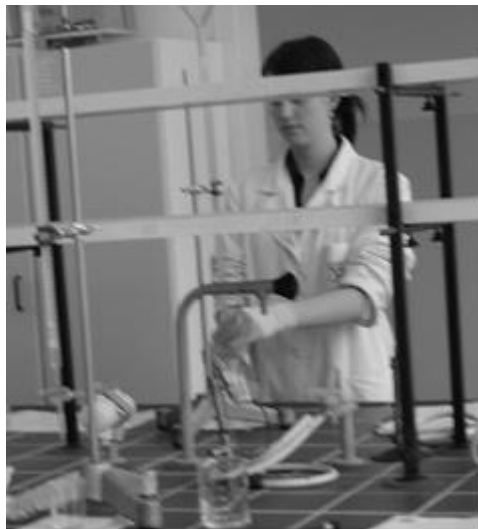


KLJUČNE BESEDE: zgodovina analiznih metod, instrument, svetloba, elektromagnetno valovanje, Beer-Lambertov zakon, absorpcijske krivulje.

RAZVOJ ANALIZNIH METOD V LABORATORIJSKI MEDICINI

Biološki vzorci (kri, urin, serum, punktati itd.) vsebujejo celo vrsto snovi, poznavanje njihovih koncentracij pa je nepogrešljiva pomoč pri diagnostiki bolezenskih stanj.

Do približno leta 1920 so vsi analizni postopki temeljili na klasičnih analiznih metodah, kot so gravimetrija in volumetrija, uporabljali pa so tudi že stoletja znane organoleptične in fizikalne preiskave.



Slika 1 - 1 *Izvajanje volumetrične analize*

Prvi strokovno organizirani biokemijski laboratorij v Sloveniji je nastal šele leta 1940 v Ljubljani. Oprema je bila zelo skromna. Biološke vzorce so pregledovali organoleptično (barva, vonj, motnost), fizikalno (merjenje volumna in relativne gostote), gravimetrično, volumetrično in ekstrakcijsko. Zadnje tri metode so bile zamudne in so rabile veliko količino biološkega vzorca (makro metode).

Z razvojem prvega kolorimetra okrog leta 1950 – pri nas je ISKRA izdelala prvi kolorimeter leta 1963 – se je razvila nova veja fizikalne kemije, imenovana optična spektroskopija. Ta bazira na lastnostih snovi, da absorbirajo, emitirajo, fluorescirajo ali sipajo svetlobo.

Optične metode so hitre, enostavne, točne, ponovljive, specifične, z lahkoto jih avtomatiziramo in jih lahko uporabljamo za merjenje koncentracije številnih snovi v bioloških vzorcih. Danes so v medicinskih laboratorijih najbolj razširjene.

Za manjše število preiskav se uporabljajo elektroanalizne metode, še manj pa se, z izjemo centrifugiranja, uporabljajo separacijske metode.

Novejšega datuma so imunokemijske metode, ki so specifične in primerne za merjenje zelo majhnih koncentracij snovi v bioloških vzorcih. Z njimi ugotavljajo krvne skupine, merijo koncentracijo hormonov, zdravil in številnih drugih snovi.

Še novejšega datuma so termične metode in kemiluminiscenca.

V nekaterih laboratorijih uporabljajo instrumente, ki delujejo na principu suhe kemije.

Razvoj instrumentov gre v smeri avtomatizacije ob uporabi računalnikov. Želja proizvajalcev je izdelati čim hitrejši aparat, ki bi porabil čim manj biološkega materiala. Računalniki pri tem nudijo skoraj neomejene možnosti uporabe.



Slika 1 - 2 Medicinski laboratorij nekoč

<http://medtech.umn.edu/medtech/about/history/home.html> (17. 6. 2010)



Slika 1 - 3 Medicinski laboratorij danes

Laboratorij bolnišnice Golnik-Kopa



Domača naloga

1. Raziščite, na katerih bioloških vzorcih lahko izvajamo kvalitativne analize in ugotovite njihov pomen.
2. S katerimi enotami izražamo kvalitativne preiskave? Poimenujte nekaj primerov.
3. Primerjajte makro in mikro metode.
4. Analizirajte pojem ekstrakcijske metode in ugotovite, kje se uporabljajo v vsakdanjem življenju.
5. Ali veste, kaj merimo z metodo »suhe kemije«?
6. Kaj so imunokemijski postopki? Napišite splošen primer imunokemijske reakcije.

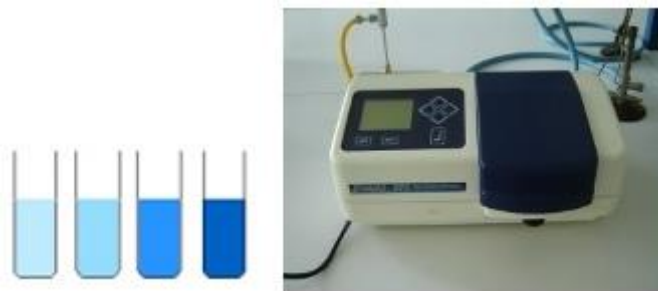
INSTRUMENT KOT PRIPOMOČEK ZA MERJENJE KONCENTRACIJE SNOVI



MERJENJE KONCENTRACIJE SNOVI Z INSTRUMENTOM

Pri praktičnem pouku strokovnih modulov ste se srečali z različnimi instrumenti. Največ meritev ste izvedli s spektrometrom. Spojino, ki jo merimo (npr. beljakovine), pretvorimo z reagentom v obarvani produkt, intenziteto obarvane raztopine (signal), pa izmeri instrument (spektrometer). Intenziteta barve produkta je odvisna od koncentracije snovi. Barvo bi lahko odčitali tudi vizualno, vendar bi bil odčitek nezanesljiv, poleg tega pa bi za primerjavo barv potrebovali obarvane standardne raztopine.

Katero analizo ste pri vajah iz medicinske biokemije izvedli tako, da ste koncentracijo določili vizualno? Opišite jo.



Slika 1 - 4 Instrument, ki meri koncentracijo vzorca na osnovi intenzitete njegove obarvanosti.

SESTAVNI DELI INSTRUMENTA

Ker koncentracije snovi v vzorcu ne moremo zaznati s čutili, potrebujemo za to določen instrument.

Instrument za kemične analize pretvarja signal, ki ni direktno merljiv, v za človeka sprejemljivo in razumljivo obliko. Instrument predstavlja povezavo med sistemom, ki ga preučujemo (npr. vzorcem seruma) in preiskovancem.

Čeprav je vsak instrument kompleksen, na splošno ne vsebuje več kot štirih osnovnih sestavnih delov.

Osnovni sestavni deli instrumenta so: tvorec signala, vhodni pretvornik ali detektor, obdelovalec signala ali procesor in izhodni pretvornik ali čitalec.



Slika 1 - 5 Blok shema instrumenta

Tvorec signala

Tvorec signala proizvaja analitični signal iz komponent vzorca. **Preprost** tvorec signala je lahko že sam **vzorec** (pri pH-metru), ker je **analitični signal aktivnost vodikovih ionov** v raztopini.

Za večino instrumentov velja, da je tvorec signala bolj kompleksen (sestavljen).

Glede na vrsto **analitičnega signala** lahko analizne metode razdelimo v naslednje skupine:

1. optične metode,
2. elektroanalizne metode,
3. termične metode,
4. separacijske metode,
5. RIA metode.



Pomni

Vsak tvorec signala vsebuje **vzorec** in, razen pri pH-metru, tudi **druge sestavne dele**. **Tvorec signala ne more biti le izvor svetlobe, ker z instrumentom merimo sestavine v vzorcu** (serum, kri, urin itd.), kot so npr. natrij, kalij, beljakovine, glukoza, krvne celice, hemoglobin.

Vhodni pretvornik ali detektor

Vloga vhodnega pretvornika je pretvarjanje enega tipa signala v drugega. Večina detektorjev pretvarja analitični signal v električnega (npr. svetlobo v električni tok), ker električni signal z lahkoto ojačimo in ga spremenimo v obliko, ki je primerna za čitanje.

Obdelovalec signala ali procesor

Obdelovalec signala spreminja pretvorjeni signal v obliko, ki je najbolj primerna za čitanje. Lahko ojači signal, ga oslabi, integrira, pretvori enosmerni električni tok v izmenični in obratno, pretvori električno napetost v jakost itd.

Čitalec

Izhodni signal gre na čitalec. Ta je lahko v obliki merilca (skale s kazalcem), rekorderja (riše krivuljo), digitalne naprave (izpiše številke) in osciloskopa (grafično predstavi oscilacije). Na čitalcu se izhodni signal še enkrat pretvori, da ga lahko odčitamo. Najpogostejša čitalca sta merilec in digitalna naprava, medtem ko se rekorderji pri večini instrumentov kupujejo posebej in to v primeru, ko želimo dobiti poleg številčnega še grafični zapis.

Primeri sestavnih delov instrumenta



SESTAVNI DELI POLARIMETRA

Kaj je pri polarimetru, ki ste ga obravnavali v 3. letniku, signal, ki ga merimo (analitični signal)? Navedite tudi, kaj je tvorec signala, vhodni pretvornik, obdelovalec signala in čitalec.



Slika 1 - 6 Polarimeter

pH-meter meri aktivnost vodikovih ionov v raztopini.

Sestavni deli pH-metra so:

1. tvorec signala: vzorec,
2. analitični signal: aktivnost vodikovih ionov,
3. vhodni pretvornik: steklena (indikatorska) in kalomelova (referenčna) elektroda,
4. vhodni signal: električna napetost,
5. obdelovalec signala: ojačevalec,
6. izhodni signal: ojačena električna napetost,
7. čitalec: skala ali digitalni zapis.

Refraktometer meri lom svetlobe na vzorcu.

Sestavni deli refraktometra so:

1. tvorec signala: prizma, vzorec, leče, svetloba (zunanja svetloba ali svetloba žarnice),
2. analitični signal: lomljena svetloba,
3. vhodni pretvornik: oko,
4. obdelovalec signala: možgani,
5. čitalec: skala.

Fotometer meri oslabljeni svetlobni žarek, ki pride iz vzorca.

Sestavni deli fotometra so:

1. tvorec signala: izvor svetlobe (žarnica), optični filter, vzorec,
2. analitični signal: oslabljeni svetlobni žarek,
3. vhodni pretvornik: fotoelektrični detektor (fotocelica),
4. vhodni signal: električni tok,
5. obdelovalec signala: /,
6. izhodni signal = vhodni signal,
7. čitalec: merilec električnega toka (amperimeter).

Na osnovi prikazanih primerov je razvidno, da obstajajo skupne značilnosti vseh instrumentov. Nekateri njihovi sestavni deli so enostavni (ena sama komponenta), sestavljeni (več komponent), lahko pa del instrumenta nadomešča tudi človeški organ oziroma čutilo.



PONOVIMO

1. Ocenite uporabnost organoleptičnih metod in raziščite njihovo uporabnost v praksi.
2. Naštejte in razložite delovanje sestavnih delov instrumenta.
3. Razložite sestavne dele instrumenta na praktičnih primerih.
4. Sklepajte, v katerih primerih igrajo naši možgani vlogo obdelovalca signala.
5. Katere vrste čitalcev poznate?
6. Kako delimo instrumentalne metode glede na analitični signal?

ELEKTROMAGNETNA VALOVANJA



MOČ ELEKTROMAGNETNIH ŽARČENJ

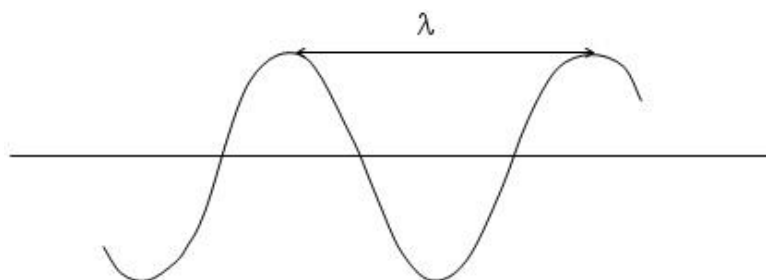
Sončna svetloba ima veliko moč. Vsi ste že kdaj slišali za sončne celice, ki proizvajajo električno energijo. Energijo dajejo svetlobi fotoni, ki imajo določeno frekvenco. Zakaj sončna svetloba ne vsebuje večjega spektra UV-svetlobe, ki bi bila za nas usodna? Kateri žarki, ki ste jih spoznali pri praktičnem pouku, so za nas najnevarnejši in zakaj?



Slika 1 - 7 Sončna svetloba

Definicija pojma elektromagnetno valovanje

Elektromagnetno valovanje je valovanje električnega in magnetnega polja, ki valujeta v smeri pravokotno druga na drugo. V prostoru se elektromagnetno valovanje širi s hitrostjo svetlobe. Elektromagnetno valovanje se obenem obnaša kot **valovanje** in kot **curek fotonov**, čemur pravimo **valovno-delčni dualizem**. **Fotoni** so energetske paketi, kvanti energije elektromagnetnega valovanja. Elektromagnetno valovanje ima določeno frekvenco in valovno dolžino.



Slika 1 - 8 Prikaz sinusoidnega valovanja svetlobe

Glede na valovno dolžino razvrščamo elektromagnetna valovanja na: kozmične žarke, gama žarke, rentgenske žarke (x-žarki), ultravijolično valovanje (UV-valovi), svetlobo (vidni valovi), infrardeče valovanje (IR-valovi), mikrovalove in radijske valove.

Tabela 1 - 1 Prikaz elektromagnetnih valovanj

vrste radiacij	λ
kozmični žarki	$< 0,1 \text{ pm}$
gama žarki	$< 0,1 \text{ nm}$
x-žarki E	$0,1 - 10 \text{ nm}$
UV-valovi	$< 380 \text{ nm}$
vidni valovi	$380 - 750 \text{ nm}$
IR-valovi	$> 750 \text{ nm}$
mikrovalovi	$750 \times 10^3 - 3750 \times 10^3 \text{ nm}$
radijski valovi	$\text{nad } 25 \times 10^7 \text{ nm}$

Valovanje z **daljšo valovno dolžino** ima **nižjo frekvenco** in **obratno**. Največ energije nosijo fotoni z najvišjo frekvenco (in najkrajšo valovno dolžino).

Elektromagnetno valovanje ima hitrost svetlobe, ta pa je premosorazmerna s frekvenco in valovno dolžino.

Velja: $c = v \cdot \lambda$
 $c = 3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$

Legenda:

c ... hitrost svetlobe

v ... frekvenca (nihaji/s = Hz)

λ ... valovna dolžina

Odnos med energijo in frekvenco fotonov izrazimo z enačbo: $E = h \cdot v$

Legenda:

E ... energija

h ... Planckova konstanta = $6,626 \times 10^{-34} \text{ Js}$

Če iz enačbe $c = v \cdot \lambda$ izpeljemo frekvenco (v), dobimo naslednjo enačbo: $v = \frac{c}{\lambda}$

Obe enačbi ($E = h \cdot v$ in $v = \frac{c}{\lambda}$) oz. obe lastnosti elektromagnetnega valovanja lahko

povežemo v formulo: $E = h \cdot \frac{c}{\lambda}$

Iz enačbe vidimo, da imajo fotoni z daljšo valovno dolžino nižjo energijo in obratno. UV-svetloba je torej energetsko močnejša od vidne svetlobe, obe pa imata energetsko močnejše fotone od IR-svetlobe.

SVETLOBA



PREPUSTNOST SVETLOBE

Izberite si nek predmet in ga opazujte skozi obarvana stekla ali prozorno plastiko različnih barv. Kakšen je predmet, ko ga gledate s prostim očesom v primerjavi z opazovanjem skozi obarvana stekla? Iz izkušnje z opazovanjem predmetov skozi obarvana stekla boste bolje razumeli vzroke obarvanosti predmetov in raztopin, absorpcijo svetlobe na obarvanih raztopinah in prepustnost svetlobe skozi optične filtre različnih barv.



Definicija pojma svetloba

Svetloba je del elektromagnetnega valovanja. V to družino sodijo tudi radijski valovi, vidna svetloba, infrardeča svetloba in ultravijolična svetloba. Ponavadi si pod pojmom svetloba predstavljamo vidno svetlobo, ki jo zaznava človeško oko. Podobno kot druga elektromagnetna valovanja ima tudi svetloba **dvojno naravo**. Predstavlja **elektromagnetno valovanje** in je sestavljena iz **elementarnih delcev** ali **fotonov**.

Svetlobo opišemo s tremi neodvisnimi parametri:

1. intenziteto (enakovredno lahko tudi s svetilnostjo ali amplitudo), ki pove, kako svetla se zdi svetloba,
2. frekvenco (ali valovno dolžino), ki jo zaznamo kot barvo svetlobe,
3. polarizacijo, ki pove smer ravnine valovanja svetlobe in je v normalnih okoliščinah ne zaznamo.

Vidna svetloba

Sončna svetloba in bela svetloba žarnice vsebujeta **ves vidni spekter svetlobe**. Človeško oko zazna kot vidno svetlobo elektromagnetno valovanje blizu **400 nm do okoli 700 nm**. Vrednosti spodnje in zgornje meje vidne svetlobe se po različnih virih razlikujejo. Elektromagnetnih valovanj izven vidnega dela spektra človeško oko ne zazna. Vidna svetloba zajema svetlobo vijoličnega, modrega, zelenega, rumenega, oranžnega in rdečega dela spektra.

Tabela 1 - 2 Vidni spekter

valovna dolžina (nm)	barva	komplementarna barva
400–435	vijolična	rumeno zelena
435–480	modra	rumena
480–500	modro zelena	rdeča
500–560	zelena	škrlatna
560–580	rumeno zelena	vijolična
580–590	rumena	modra
590–650	oranžna	zeleno modra
650–750	rdeča	modro zelena



Te zanima?

Optično vlakno lahko prenaša svetlobo, ki četudi je ne vidimo, prenaša podatke. Te podatke lahko pretvorimo v zvok ali sliko. Kodiranje podatkov uporabljamo tudi pri radiu. Radijski valovi prenašajo podatke tako, da spreminjajo frekvenco ali amplitudo nosilnega elektromagnetnega valovanja. Le-to potuje po električnem prevodniku in v njem inducira električni tok, kar uporabljamo pri antenah. V neprevodnih snoveh lahko snov absorbira energijo elektromagnetnega valovanja in se na ta način segreje, pojav pa izkoriščamo pri mikrovalovnih pečicah.

Kdaj bomo videli določeno barvo?

Površino, ki **razpršeno odbija vse valovne dolžine enako**, vidimo **belo**. Temna **črna površina absorbira** vse valovne dolžine in **jih ne odbija**.

Če ima v spektru sončne svetlobe ali bele svetlobe žarnice katera od prisotnih valovnih dolžin večjo intenziteto od ostalih, ta odloča o barvnem vtisu mešanice svetlob. Če v spektru bele svetlobe neka barva manjka, dajejo preostale barve skupaj vtis barve, ki jo imenujemo komplementarno manjkajoči. Beseda komplementarnost pomeni skladnost ali dopolnjevanje.

Vzrok, da so nekatere raztopine obarvane, je v absorpciji določenih valovnih dolžin iz barvne mešanice svetlobe.

Raztopino vidimo v barvi, ki jo prepušča. Absorbirana in prepuščena svetloba sta si med seboj komplementarni. Komplementarnost barv bele svetlobe prikazuje krog barv. Če tako obarvan krog zavrtimo, vidimo belo barvo. Na ta način dokažemo, da je bela svetloba zmes vseh valovnih dolžin oziroma barv vidne svetlobe. Barva svetlobe je odraz ali funkcija njene valovne dolžine.



Slika 1 - 9 Krog barv

Primeri prepustnosti in absorbiranja vidne svetlobe

Zelena raztopina bo prepuščala zeleno barvo, absorbirala pa rdečo (komplementarno). Rdeča raztopina bo prepuščala rdečo barvo, absorbirala pa zeleno (komplementarno). Zelen optični (stekleni) filter bo prepustil zeleno barvo, absorbiral pa bo komplementarno (rdečo). Za merjenje intenzitete rdeče obarvane raztopine bomo zato rabili zeleni optični filter, ker ta prepušča zeleno barvo, ki se bo na rdeči raztopini najbolj absorbirala.

Infrardeča svetloba

Človeško oko je najbolj občutljivo za **zeleno svetlobo** v okolici valovne dolžine 550 nm. Z višanjem valovne dolžine se jakost odziva niža, dokler pri okoli 700 nm sevanja ne zaznamo več. Ta meja je po definiciji spodnja meja IR-spektra, medtem ko za zgornjo mejo valovnih dolžin, na meji z mikrovalovnim področjem, ni enotno sprejetega dogovora.

Latinska predpona **infra-** pomeni »pod« in označuje, da je frekvenca IR-valovanja pod frekvenco rdeče svetlobe, ta pa ima v spektru vidne svetlobe najnižjo frekvenco (najvišjo valovno dolžino). Velik obseg IR-spektra lahko razdelimo na bližnje (700–5000 nm), srednje (5–30 μm) in daljne (30 μm –1 mm) IR-sevanje.

Ultravijolična svetloba

Latinska predpona **ultra-** pomeni prek ali onstran in se nanaša na to, da leži območje UV-valovanja v spektru za območjem vijolične barve. Slednja ima v vidnem območju spektra najkrajšo valovno dolžino.

Območje UV-valovanja lahko razdelimo na območje valovnih dolžin 200–380 nm ter na »ekstremno« ali »vakuumsko« UV-območje (10–200 nm). Meja »vakuumskih« UV-žarkov je postavljena na 200 nm, ker se žarki s krajšimi valovnimi dolžinami v zraku absorbirajo. Ta neprepustnost je posledica močne absorpcije v molekulah kisika v zraku. Za meritve v območju 150–200 nm uporabljamo dušikovo atmosfero, ker le čisti dušik prepušča žarke omenjenih valovnih dolžin.

Pri preučevanju vpliva UV-valovanja na okolje in zdravje človeka se UV-območje pogosto razdeli na UV-A (315–380 nm), imenovano tudi dolgovalovno območje ali »črna svetloba«, UV-B (280–315 nm), imenovano tudi srednjevalovno območje ter UV-C (10–280 nm), imenovano kratkovalovno ali »baktericidno« območje.

Običajno steklo je prozorno za žarke UV-A, neprepustno pa za žarke s krajšimi valovnimi dolžinami. Kvarčno steklo je, odvisno od kakovosti, lahko prepustno celo za žarke iz območja »vakuumskih« ultravijoličnih žarkov.

Emisijski in absorpcijski elektromagnetni spekter

Nekatere molekule ali atomi pri sprejemanju energije svetlobe prehajajo v višje energetske stanje (elektroni prehajajo v višji energetski nivo). Če je to stanje nestabilno, se višek energije osvobaja kot emitirana svetloba. Različne valovne dolžine takega sevanja dajejo **emisijski spekter** dane snovi. Emitirane/oddane valovne dolžine se pojavijo kot barvne črte na temnem ozadju.

Če je višje energetske stanje **stabilno**, se določene valovne dolžine dovedene svetlobe **absorbirajo**. Te valovne dolžine tvorijo **absorpcijski spekter** dane snovi. Absorbirane valovne dolžine se pojavijo kot temne črte (absorpcijske črte) na svetlem ozadju.



PONOVIMO

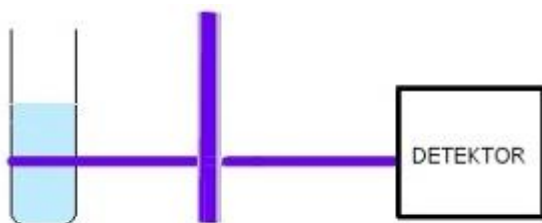
1. Zakaj pravimo, da ima svetloba dvojno naravo?
2. Kaj so fotoni?
3. Izpeljite enačbo, ki ponazarja odnos med energijo svetlobe in njeno valovno dolžino.
4. Primerjajte vidno, IR- in UV-svetlobo. Katera od teh ima najvišjo energijo in katera najnižjo? Razložite odgovor.
5. Katere valovne dolžine vsebuje vidni del spektra svetlobe?
6. Razložite, kdaj bomo videli raztopino obarvano.
7. Zakaj vidimo belo barvo, če zavrtimo krog barv?
8. Katere valovne dolžine vsebuje IR-spekter svetlobe?
9. Zakaj ne moremo izvajati meritev pod 200 nm?
10. Razložite emisijski in absorpcijski elektromagnetni spekter.

OSNOVE OPTIČNIH METOD



MERJENJE ENERGIJE SVETLOBE

Intenziteto svetlobe, ki jo vzorec absorbira ali oddaja, merimo z eno od optičnih metod. Kakšne lastnosti mora imeti snov, da lahko za njeno merjenje uporabljamo določeno optično metodo? Poimenujte nekaj optičnih metod, ki ste jih izvajali pri praktičnem pouku. Ali je pri vseh optičnih metodah eden od sestavnih delov instrumenta tudi izvor svetlobe?



Slika 1 - 10 Vzorec prepušča ali oddaja določen del obarvane svetlobe.

Princip in delitev optičnih metod

Princip optičnih metod je merjenje **energije svetlobe** določene valovne dolžine ali pasu valovnih dolžin, ki jih vzorec absorbira, sipa, oddaja, suka ali lomi.

Optične metode delimo na:

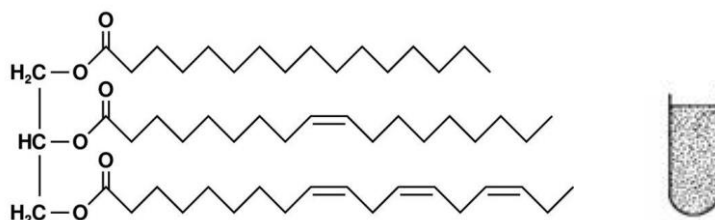
1. **Absorbimetrične metode**, ki temeljijo na tem, da preiskovana snov absorbira svetlobo, merimo pa prepuščeno svetlobo.
2. **Emisijske metode**, ki temeljijo na merjenju svetlobe, ki jo preiskovana snov odda.
3. **Metode**, ki temeljijo na **sipanju svetlobe** v suspenziji.
4. **Druge optične metode**, kamor uvrščamo **refraktometrijo**, **polarimetrijo** in **reflektometrijo**, pri katerih merimo lom svetlobe, zasuk optično polarizirane svetlobe in odboj svetlobe na preiskovani raztopini.

ABSORBIMETRIJA



MERJENJE ABSORBANCE

V medicinskih laboratorijih najpogosteje ugotavljajo koncentracijo snovi na osnovi merjenja absorbance. Določena snov je merljiva, če s specifičnim reagentom tvori produkt, ki absorbira svetlobo določene valovne dolžine. Pri vajah iz medicinske biokemije in laboratorijske hematologije ste na osnovi merjenja absorbance merili koncentracije številnih snovi. Navedite nekaj analitov, ki ste jih merili absorbimetrično, napišite kemijske reakcije njihovega merjenja in način izračunavanja koncentracije. V katerih primerih meritev ne bi bila točna?



Slika 1 - 11 Triglicerid

Definicija pojma absorbimetrija

Pod pojmom **absorbimetrija** razumemo merjenje koncentracije snovi, ki imajo lastnost, da absorbirajo svetlobo določene valovne dolžine ali določen pas valovnih dolžin.

Instrumenti, ki izvajajo absorbimetrične meritve (fotometri, spektrometri), merijo **prepuščeno svetlobo** oz. svetlobo, ki se na vzorcu ne absorbira (transmitanco ali T), to pa z logaritmiranjem pretvorijo v **absorbanco** (A). Zato pravimo, da pomeni absorbimetrija merjenje **absorbance**.

Izrazoslovje v absorbimetriji

Pri absorbimetričnih meritvah so v uporabi naslednji strokovni izrazi: fotometrija, kolorimetrija, spektrometrija in atomska absorpcijska spektrometrija. Vsi štirje izrazi ponazarjajo merjenje **absorbance**, razlika med njimi pa je v vrsti svetlobe, ki jo instrumenti merijo (vidno svetlobo, UV-svetlobo, posamezne valovne dolžine, pas valovnih dolžin).

Absorpcijska fotometrija ali **fotometrija** v širšem pomenu besede označuje merjenje absorbance (ene valovne dolžina ali pasu valovnih dolžin), v ožjem pomenu besede pa merjenje absorbance določenega **pasu valovnih dolžin**.

Kolorimetrija označuje merjenje absorbance pasu valovnih dolžin **vidne svetlobe** oz. merjenje obarvanih raztopin.

Absorpcijska spektrometrija ali **spektrometrija** oz. **spektrofotometrija** označuje merjenje absorbance **ene valovne dolžine**.

Atomska absorpcijska spektrometrija označuje merjenje absorbance ene valovne dolžine, ki se absorbira na **atomih** v plinastem stanju.

Monokromatska svetloba pomeni svetlobo **ene valovne dolžine**, npr. 500 nm.

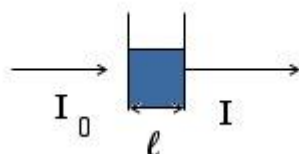
Polikromatska svetloba pomeni svetlobo več valovnih dolžin v določenem valovnem območju, npr. 350–750 nm.

Pas valovnih dolžin pomeni **ozek del** spektra polikromatske svetlobe, npr. 350–380 nm.

Spekter svetlobe pomeni širše območje valovnih dolžin polikromatske svetlobe (npr. spekter vidne svetlobe, spekter UV-svetlobe).

Beer-Lambertov zakon

Pri absorbimetričnih meritvah velja **Beer-Lambertov zakon**. Vpadna svetloba določene valovne dolžine ali pasu valovnih dolžin (I_0) se v raztopini absorbira, iz nje pa prehaja prepuščena svetloba (I).



Slika 1 - 12 Prikaz prehoda svetlobe skozi kiveto z vzorcem

Ugotovili so, da je razmerje med prepustnostjo svetlobe in koncentracijo snovi logaritmčno, kar ponazarja sledeča formula: $T = I/I_0 = 10^{-\epsilon C \ell}$

Za izračun koncentracije iz izmerjene prepustnosti enačbo logaritmiramo in za izraz $\epsilon C \ell$ uvedemo pojem »absorbanca« (A).

Logaritmiranje enačbe: $\log T = \log I/I_0 = \log 10^{-\epsilon C \ell}$

Velja: $\log 10^{-\epsilon C \ell} = -\epsilon C \ell = -A$

Enačbo $\log T = \log I/I_0 = \log 10^{-\epsilon C \ell}$ množimo z minusom in dobimo:

$-\log T = -\log I/I_0 = \epsilon C \ell = A$

$-\log T = \log 1/T$

$-\log I/I_0 = \log I_0/I$

$\log 1/T = \log I_0/I$

Rezultat logaritmiranja je naslednja enačba: **$\log 1/T = \log I_0/I = \epsilon C \ell = A$**

Legenda:

A ... absorbanca

C ... množinska koncentracija

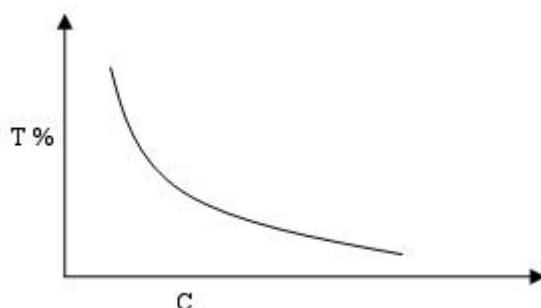
T ... prepustnost svetlobe ali transmitanca

ϵ ... molarna absorbanca ali absorbanca raztopine s koncentracijo 1 mol/L

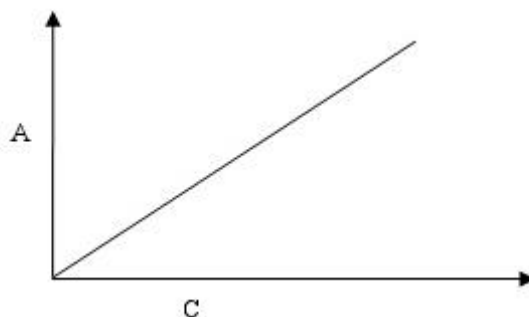
ℓ ... debelina tekočinskega sloja, skozi katerega gre svetloba (premer kivete)

I ... intenziteta prepuščenega žarka

I_0 ... intenziteta vpadnega žarka



Slika 1 - 13 Prikaz odnosa med T in C



Slika 1 - 14 Prikaz odnosa med A in C

Molarna absorbanca (ϵ)

Molarna absorbanca je konstanta in predstavlja vrednost **absorbance** raztopine čiste snovi s koncentracijo 1 mol/L pri določeni valovni dolžini.

Vrednost molarne absorbance se uporablja za izračun koncentracije snovi na osnovi njene izmerjene absorbance pri določenem premeru kivete. Uporabljamo jo takrat, kadar nimamo na voljo standardne raztopine ali nam ni poznan faktor za pretvorbo absorbance v koncentracijo. Vrednost molarne absorbance lahko poiščemo v literaturi ali pa jo izračunamo.

Čim višja je molarna absorbanca neke snovi, občutljivejša je meritev. Ker visokih vrednosti molarnih absorbanc ne moremo direktno izmeriti, si lahko pripravimo primerno razredčitev raztopine čiste snovi (standarda) in vrednost izmerjene absorbance pomnožimo z razredčitvijo tako, da dobimo vrednost absorbance enomolarne raztopine oziroma vrednost ϵ .

Primer izračuna molarne absorbance (ϵ)

Absorbanca standardne raztopine = 0,5

Koncentracija standardne raztopine = 0,2 mmol/L

$\ell = 1$ cm

1. Izračun iz enačbe $A = \epsilon \cdot C \cdot \ell \rightarrow \epsilon = A / C \cdot \ell$

2. Izračun (s sklepnim računom):

$$0,2 \text{ mmol/L} \text{ ----- } 0,5$$

$$\underline{1 \text{ mol/L} \text{ ----- } x}$$

$$x \text{ (molarna absorbanca ali } \epsilon) = \frac{0,5}{0,2 \cdot 10^{-3}} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 2500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

3. Izračun z upoštevanjem razredčitve standardne raztopine:

$$\text{Razredčitev (R)} = \frac{1000 \text{ mmol/L}}{0,2 \text{ mmol/L}} = 5000\text{-kratna razredčitev}$$

$$\epsilon = A_{st} \cdot R = 0,5 \cdot 5000 = 2500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Enote ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) so izpeljane iz enačbe $\epsilon = A / C \cdot \ell$.

Enota za koncentracijo je mol/L, enota za polmer kivete je cm, absorbanca pa nima enot.

Vloga slepega vzorca pri meritvah absorbance

Oznaka I_0 predstavlja svetlobo, ki jo prepušča slepi vzorec (reagent ali topilo). Del svetlobe se namreč absorbira, sipa ali lomi že na sami kiveti in prav tako tudi na reagentu ali topilu. Če instrumenta ne bi umerili s slepim vzorcem, bi dobili napačne rezultate. Meritve se v praksi izvajajo tako, da s pomočjo slepega vzorca umerimo instrument na 100 % prepustnost (vrednost A je takrat nič), nato pa izmerimo najprej standard, nato pa še vzorec.

V tem primeru ne potrebujemo vrednosti za molarno absorbanco, ker se ta pokrajša, če delimo enačbi $A_{vz} = \epsilon \cdot C_{vz} \cdot \ell$ in $A_{st} = \epsilon \cdot C_{st} \cdot \ell$



Te zanima?

Na 100 % prepustnost umerimo instrument na več načinov: s spremembo ojačitve signala iz detektorja, s premikanjem odprtine reže in s spreminjanjem napetosti na izvoru svetlobe, s čimer se spremeni tudi intenziteta svetlobe.

Veljavnost Beer-Lambertovega zakona

Absorbimetrično meritev tekočih vzorcev lahko izvajamo samo takrat, kadar merimo koncentracijo snovi, ki imajo sposobnost **absorbirati svetlobo** in so raztopljene v mediju, prepustnem za svetlobo.

Beer-Lambertov zakon velja le, če so izpolnjeni naslednji pogoji:

1. svetloba mora biti monokromatska, razen če je vzorec sposoben absorbirati pas valovnih dolžin,
2. na vzorec pade le svetloba, ki se na vzorcu lahko absorbira,
3. koncentracija snovi ne sme biti previsoka (absorbanca praviloma ne sme presegati vrednosti 1,0) niti prenizka (absorbanca ne sme biti pod vrednostjo 0,05).

Meritve absorbance naj bi praviloma izvajali v območju **0,1–1,0**.

Vzroki **neželenih valovnih dolžin** so lahko posledica sestavnih delov instrumenta ali dodatnih sevanj neželenih valovnih dolžin na detektor, npr. **vdiranje zunanje svetlobe skozi razpoke aparata**, če je instrument izpostavljen prevelikemu sevanju zunanje svetlobe. Snov, katere absorbanco merimo, tudi **ne sme fluorescirati**.

Koncentracija vzorca, ki ga merimo, praviloma ne sme biti večja od 10^{-3} mol/L. Zgornja meja koncentracije meritvenega območja snovi je odvisna od njene molarne absorbance. Čim višja je molarna absorbanca, višja bo vrednost absorbance.

Vzroki napačnih odčitkov pri nizkih vrednostih absorbance so nihanje intenzitete izvora svetlobe (žarnice), premajhna občutljivost detektorja in napake pri ojačitvi. Stabilnost izvora svetlobe je bistvena za merjenje nizkih vrednosti absorbance.

Z dvožarkovnimi instrumenti avtomatsko korigiramo spremembe v intenziteti svetlobe.



Domača naloga

1. Absorbanca čiste snovi s koncentracijo 0,5 mmol /L je 0,5. Kolikšna je molarna absorbanca? Izračunajte jo na tri načine.
2. V katerem primeru bo metoda merjenja absorbance občutljivejša (da lahko merimo nizke koncentracije vzorcev):
 - a. če bo vrednost molarne absorbance višja
 - b. če bo vrednost molarne absorbance nižjaOdgovor dokažite računsko.

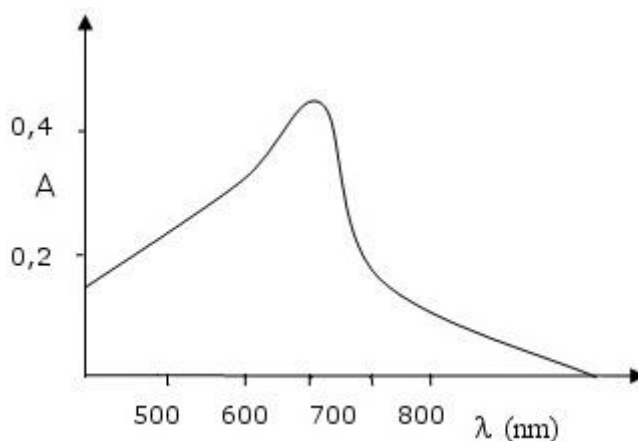


PONOVIMO

1. Na primerih razložite izraze polikromatska svetloba, monokromatska svetloba in pas valovnih dolžin.
2. Razložite pojme fotometrija, kolorimetrija, spektrometrija in atomska absorpcijska spektrometrija.
3. Razložite izraz absorbanca. Ali je to svetloba, ki se na vzorcu absorbira?
4. Grafično prikažite odnos med absorbanco in koncentracijo ter transmitanco in koncentracijo.
5. Razložite, v katerem primeru velja oz. ne velja Beer-Lambertov zakon.
6. Zakaj ne smejo biti instrumenti direktno izpostavljeni zunanji svetlobi?
7. Razložite, zakaj ne moremo izmeriti le transmittance, da bi na preprost način (npr. s sklepnim računom) izračunali koncentracijo snovi.
8. Razložite, zakaj je potrebno umerjanje instrumenta na 100 % T.
9. Kaj se dogaja v kiveti z vzorcem, ko gre skozi njo svetloba določene valovne dolžine?

ABSORPCIJSKE KRIVULJE

Vsaka raztopina čiste snovi ima točno določeno **absorpcijsko krivuljo**. Dobimo jo tako, da izmerimo absorbance raztopine pri vseh valovnih dolžinah določenega spektralnega območja.



Slika 1 - 15 Absorpcijska krivulja spojine Fe-dipiridil kompleksa (produkta reakcije železa z dipiridilom)

Na absciso (os x) koordinatnega sistema nanesemo valovne dolžine (λ), na ordinato (os y) pa izmerjene vrednosti absorbanc.

Krivulje imajo lahko enega ali več vrhov oziroma absorpcijskih maksimumov.

Oblike absorpcijskih krivulj ostanejo pri različnih koncentracijah iste snovi nespremenjene, spremeni se le njihova lega glede na os y.

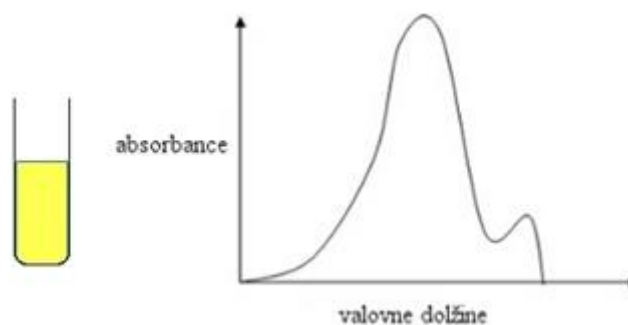
Analize izvajamo pri valovni dolžini maksimalne vrednosti absorbance absorpcijske krivulje.

Če ima snov zelo ozek maksimum, moramo analizo izvajati z instrumenti, ki imajo možnost izbire monokromatske svetlobe s čim večjo spektralno čistostjo. V nasprotnem primeru bi dobili napačne (prenizke) rezultate. Če ima snov več maksimumov, si za meritve izberemo valovno dolžino, pri kateri maksimum ni niti preozek niti preširok. Na ta način lahko izvajamo meritve tudi na instrumentih, ki namesto posameznih valovnih dolžin oddajajo pas valovnih dolžin.



UPORABNOST ABSORPCIJSKIH KRIVULJ

Izdelajte absorpcijsko krivuljo raztopine $K_2Cr_2O_7$ v izbranem območju valovnih dolžin. Kaj bi lahko ugotovili iz oblike absorpcijske krivulje? Ali bi se po dodatku drugih sestavin (primesi) v raztopino $K_2Cr_2O_7$ krivulja spremenila?



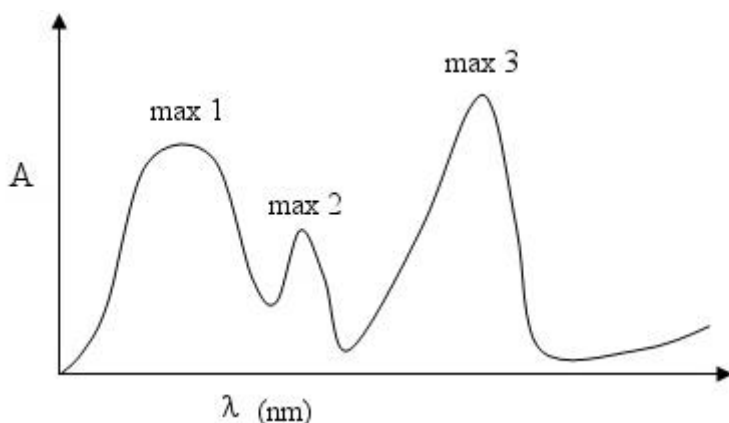
Slika 1 - 16 Kiveta z raztopino $K_2Cr_2O_7$ in absorpcijska krivulja

Absorpcijske krivulje lahko uporabljamo:

1. za testiranje nove metode (izberemo valovno dolžino, pri kateri bomo izvajali meritve),
2. za dokaz in merjenje koncentracije določene snovi v vzorcu,
3. za ugotavljanje primesi v raztopini določene snovi,
4. za testiranje delovanja instrumenta.

Testiranje nove metode

Kadar uvajamo novo metodo, moramo iz maksimuma absorpcijske krivulje izbrati valovno dolžino, pri kateri bomo kasneje izvajali meritve absorbance. Izbrati moramo valovno dolžino takšnega maksimuma, ki ne sme biti niti preozek niti preširok. Za meritve je v primeru krivulje na sliki 1-17 najbolje izbrati valovno dolžino maksimuma 1, kljub temu da ta ni najvišji. Zaradi večje širine tega maksimuma lahko za meritve uporabljamo tako spektrometer kot tudi fotometer. Fotometer namreč vsebuje filter, ki iz polikromatske svetlobe prepusti na vzorec pas valovnih dolžin, medtem ko s spektrometrom lahko izberemo posamezno valovno dolžino. V primeru, da izvajamo meritve samo na spektrometrih, je bolje, da izberemo maksimum 3.



Slika 1 - 17 Prikaz absorpcijske krivulje s tremi maksimumi

Dokaz in določanje koncentracije snovi v vzorcu

Iz oblike krivulje določimo, za katero spojino gre (kvalitativna analiza), iz njene višine pa njeno koncentracijo na osnovi Beer-Lambertovega zakona.

Za izračun koncentracije snovi moramo imeti podatek za njeno molarno absorbanco in absorbanco. Absorbanco snovi odčitamo iz maksimuma absorpcijske krivulje.

Koncentracijo snovi **izračunamo** tako, da absorbanco maksimuma delimo z molarno absorbanco in pomnožimo z razredčitvijo.

$$R \cdot A = \varepsilon C \ell \quad \rightarrow \quad C = \frac{A}{\varepsilon} \cdot R$$

R ... razredčitev

Določanje čistosti snovi

Če se pri izdelavi absorpcijske krivulje preiskovane snovi pojavljajo dodatne krivulje v primerjavi s krivuljo čiste snovi, spojina oz. njena raztopina vsebuje primesi.



KONZORCIJ ŠOLSKIH CENTROV



REPUBLIKA SLOVENIJA
ŠOLSTVO IN ŠPORT
SŠFKZ



Naložba v vašo prihodnost
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA
Evropski socialni sklad

Primer vpliva primesi v vzorcu na meritev absorbance

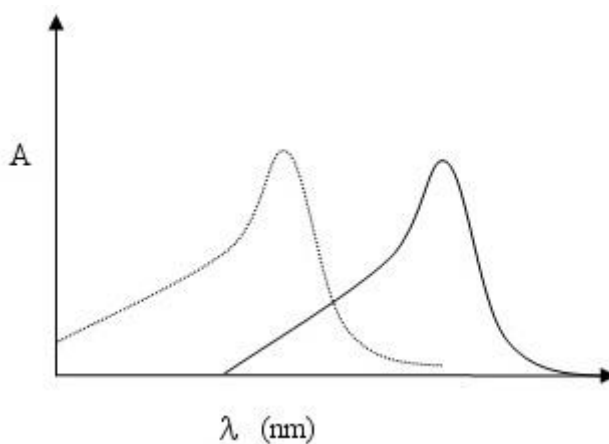
Površinsko aktivne snovi (detergenti) imajo v UV-območju zelo visoke vrednosti absorbanc. Zato prisotnost že zelo majhnih količin detergentov močno ovira meritve v UV-območju. Vzrok napak pri meritvah je slabo opran laboratorijski pribor.

Testiranje delovanja instrumenta

Na voljo imamo raztopino z znano koncentracijo snovi in z znano absorpcijsko krivuljo. Z njo testiramo instrument tako, da z njim izmerimo absorbance raztopine pri različnih valovnih dolžinah in narišemo absorpcijsko krivuljo.

Če se prava (standardna) absorpcijska krivulja prekriva z izmerjeno, je instrument glede valovnih dolžin in točnosti absorbanc brezhiben.

Če je krivulja **pomaknjena v levo** ali **desno** glede na standardno krivuljo, izbrane valovne dolžine niso prave. Eden od mnogih vzrokov napačnih valovnih dolžin je lahko že neprimeren transport instrumenta.



Slika 1 - 18 Prikaz netočnih valovnih dolžin instrumenta. Krivulji se razlikujeta po tem, da imata enake vrednosti absorbanc pri različnih valovnih dolžinah.

Če je krivulja pomaknjena **navzgor** ali **navzdol** glede na standardno krivuljo, je instrument izmeril napačne absorbance. Eden od vzrokov je slabša intenziteta izvora svetlobe.



KONZORCIJ ŠOLSKIH CENTROV

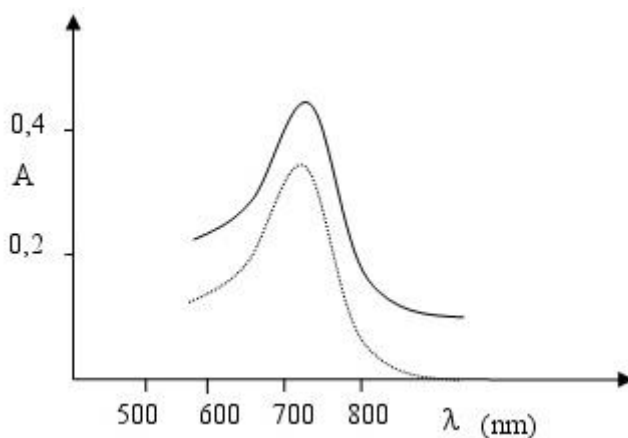


REPUBLIKA SLOVENIJA
ŠOLSTVO IN ŠPORT

SŠFKZ



Naložba v vašo prihodnost
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA
Evropski socialni sklad



Slika 1 - 19 Črtkana krivulja predstavlja prenizke absorbance raztopine pri istih valovnih dolžinah v primerjavi s standardno krivuljo.



PONOVIMO

1. Definirajte pojem absorpcijska krivulja.
2. Primerjajte absorpcijsko krivuljo z umeritveno krivuljo.
3. Kaj bi potrebovali za izdelavo absorpcijske krivulje?
4. Kako bi na osnovi absorpcijske krivulje ugotovili:
 - a. da snov v raztopini ni čista
 - b. da instrument kaže napačne valovne dolžine
 - c. da instrument meri napačne absorbance
5. Sklepajte, v katerih primerih bi za meritev absorbance izbrali valovno dolžino, pri kateri maksimum ni niti preozek niti preširok.
6. Ugotovite, kako bi iz absorpcijske krivulje izračunali koncentracijo vzorca in kako bi prišli do podatkov, potrebnih za izračun.



KONZORCIJ ŠOLSKIH CENTROV



REPUBLIKA SLOVENIJA
ŠOLSTVO IN ŠPORT

SŠFKZ

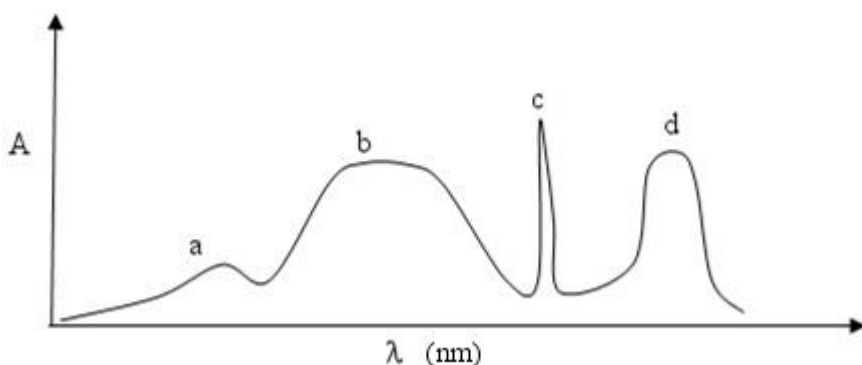


Naložba v vašo prihodnost
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA
Evropski socialni sklad



Domača naloga

1. Iz enačbe izpeljite stare in nove (SI) enote za molarno absorbanco. Stara enota za ℓ (premer kivete) je cm, za C je mol/L, absorbanca pa nima enot.
2. Z enačbo $A = \log 1/T$ izračunajte vrednosti absorbanc na podlagi podatkov za T %. Iz vrednosti T % in izračunanih vrednosti absorbanc narišite skalo.
T % = 100 %, T % = 80 %, T % = 70 %, T % = 50 %, T % = 40 %, T % = 20 %.
3. Katera svetloba se bo absorbirala na modri raztopini? Odgovor poiščite s pomočjo kroga barv.
4. Kako bi pri spektrometru ugotovili, da kaže prave absorbance in prave valovne dolžine?
5. Kateri maksimum bi izbrali za določanje valovne dolžine, pri kateri bomo izvajali meritve: a b c d ?
Razložite odgovor.



POVZETEK

Biološke vzorce so sprva pregledovali organoleptično. Kasneje so razvili instrumente, ki so bili na začetku preprosti, nato pa vse bolj izpopolnjeni. Vsi instrumenti za merjenje koncentracije snovi vsebujejo tvorec signala, detektor, procesor in čitalec. Največje število metod v medicinskih laboratorijih je optičnih, med temi pa prevladujejo absorbimetrične. Poznavanje osnov elektromagnetnih sevanj je bistvenega pomena za razumevanje optičnih metod. Pri vseh optičnih metodah merimo intenziteto svetlobe, ki izhaja iz vzorca. Za absorbimetrične metode je značilno, da se svetloba na vzorcu absorbira. Zanesljive so le v primeru, kadar velja Beer-Lambertov zakon. Za boljše razumevanje absorbimetrije moramo poznati tudi absorpcijske krivulje in njihovo uporabnost v praksi.



MEDPREDMETNO POVEZOVANJE

Povezava s tujim jezikom:

- ✚ Dijaki izdelajo slovar strokovnih izrazov, ki se navezujejo na lastnosti svetlobe in izrazoslovje v absorbimetriji.

Povezava s slovenščino in projektnim delom:

- ✚ Dijaki izdelajo poročilo o analiznih metodah v okviru strokovne ekskurzije ali projektnega dela na šoli.

Povezava s fiziko:

- ✚ Timski pouk: ponovitev elektromagnetnega valovanja in lastnosti svetlobe.

Povezava z analizo kemijo (vsebinski sklop modula FKM):

- ✚ Razvrstitev analiznih metod.
- ✚ Uporaba polarimetra in refraktometra.
- ✚ pH-metrija.
- ✚ Razlaga in uporaba Beer-Lambertovega zakona.
- ✚ Izražanje koncentracije snovi.

Povezava z matematiko:

- ✚ Timski pouk: logaritmiranje.
- ✚ Izdelava grafov, odčitavanje grafov in njihovo razumevanje.

Povezava z medicinsko biokemijo:

- ✚ Merjenje absorbance produktov kemijskih reakcij snovi v bioloških vzorcih in izračun koncentracije.
- ✚ Določanje koncentracije snovi iz umeritvene krivulje.

2. SESTAVNI DELI INSTRUMENTOV ZA OPTIČNO SPEKTROMETRIJO



CILJI UČNE TEME

Instrumenti za optično spektrometrijo imajo enako vlogo in podobne sestavne dele. Za razumevanje delovanja teh instrumentov je pomembno poznavanje dogajanja v vzorcu, na podlagi tega pa nato ni težko sestaviti blok sheme posameznega instrumenta.

Cilji:

- Blok sheme instrumentov za optično spektrometrijo.
- Vrste izvorov svetlobe.
- Vloga električnih napajalnikov.
- Značilnosti elementov za izbiro valovne dolžine.
- Vrste kivet.
- Značilnosti detektorjev svetlobe.

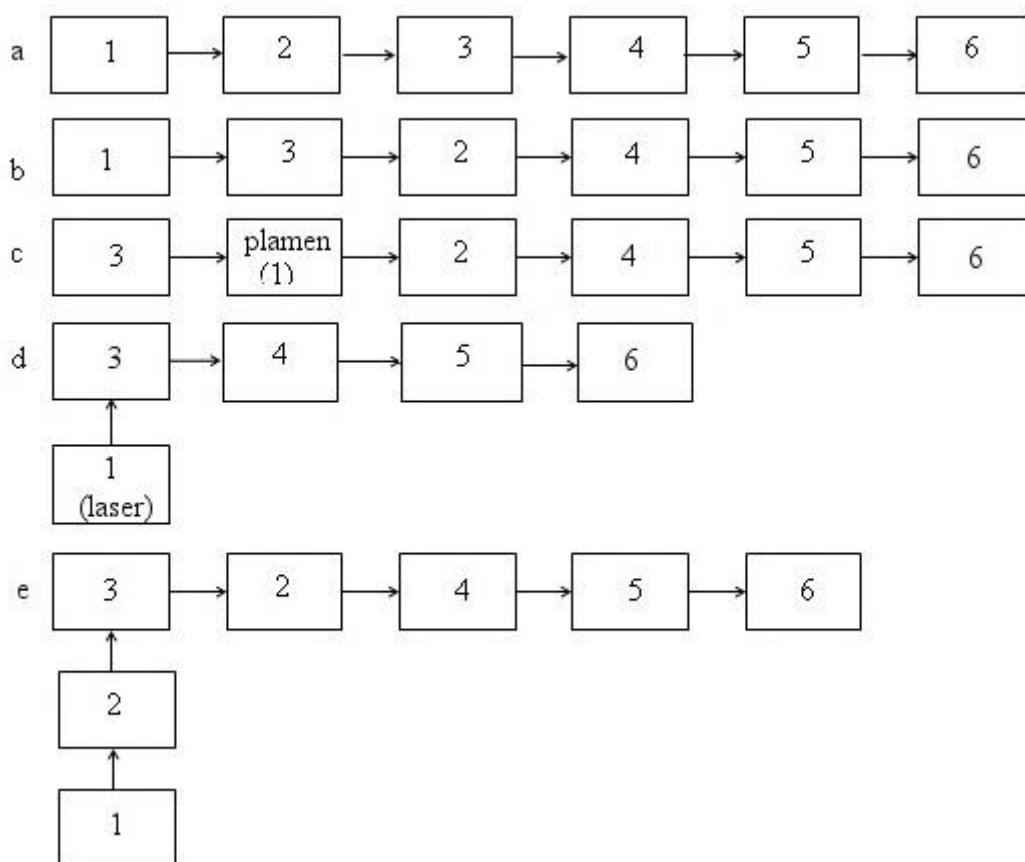


KLJUČNE BESEDE: svetloba, spektri svetlobe, žarnice, optični filtri, monokromatorji, prizma, uklonska mrežica, kivete, fotoelektrični detektorji.



BLOK SHEME INSTRUMENTOV ZA OPTIČNO SPEKTROMETRIJO

Nekatere optične metode temeljijo na absorpciji, emisiji, fluorescenci in sipanju svetlobe na vzorcu. Instrumenti za te tehnike se po konfiguraciji med seboj razlikujejo, vsebujejo pa podobne osnovne sestavne dele, ki se med seboj razlikujejo le v kvaliteti. Primerjajte med seboj instrumente na sliki 2 - 1.



Slika 2 - 1 Splošni sestavni deli instrumentov v optični spektrometriji

Legenda:

- | | | |
|---|--|---------------------|
| a in b ... absorpcijska spektrometrija (absorbimetrija) | c ... emisijska spektrometrija (plamenska fotometrija) | d ... nefelometrija |
| e ... fluorescentna spektrometrija | | |
| 1 ... izvor svetlobe | 2 ... element za izbiro valovne dolžine | 3 ... vzorec |
| 4 ... fotodetektor | 5 ... procesor | 6 ... čitalec |

IZVORI SVETLOBE

V spektrometriji uporabljamo različne izvore svetlobe, da bi zagotovili njihova različna spektralna območja (vidno, UV-, IR-).

Glede na območje sevanja poznamo:

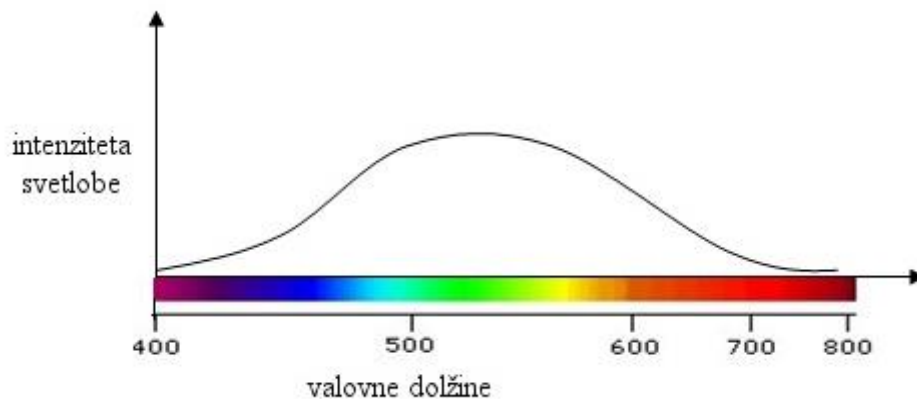
1. izvore vidne svetlobe,
2. izvore UV-svetlobe,
3. izvore IR-svetlobe,
4. izvore svetlobe, ki oddajajo vidno, UV- in bližnjo IR-svetlobo.

Svetloba, ki jo oddajajo izвори svetlobe, je lahko zvezna, črtasta ali monokromatska.

ZVEZNI IZVORI SVETLOBE

Zvezni izвори svetlobe oddajajo vse valovne dolžine v določenem spektralnem območju.

V spektrometriji se od zveznih izvorov svetlobe najpogosteje uporabljajo: halogenska žarnica, devterijeva žarnica in ksenonova žarnica.



Slika 2 - 2 Prikaz zveznega spektra vidnega izvora svetlobe - žarnica seva različne intenzitete posameznih valovnih dolžin.

Volframove žarnice so vsebovali starejši optični instrumenti. Oddajajo zvezni spekter vidne svetlobe, velik del njihove energije (kar 90 %) pa gre v izgubo v obliki IR-svetlobe oz. **toplote**. Zato so takšne žarnice močno segrevale notranjost instrumentov.

Toplota žarnice vpliva na prepustnost vzorca in na ostale dele instrumenta, zato jo je potrebno z ustreznimi filtri odstraniti.



Slika 2 - 3 Volframova žarnica

Halogenska žarnica se uporablja za meritve v **vidnem** in **bližnjem UV-območju**. Moč sevanja te žarnice je večja, širši pa je tudi njen spekter valovnih dolžin v primerjavi z volframovo žarnico.



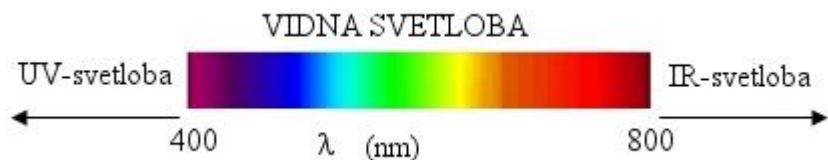
Slika 2 - 4 Halogenska žarnica

<http://img5s3.schaefer-shop.de/produktbild/halogenska-zarnica-36v400w-msde10010832ad1.jpg> (11. 12. 2010)



Pomni

Bližnje UV-območje pomeni tisto UV-svetlobo, ki meji na spodnjo mejo **vidnega območja** svetlobe, npr. 365 nm. Daljno UV-območje je tista svetloba, ki je daleč pod spodnjo mejo vidne svetlobe, npr. 200 nm. Podobno velja tudi za bližnjo in daljno IR-svetlobo.



Vodikova in devterijeva žarnica sta **UV-izvora svetlobe**. Devterijeva žarnica ima od vodikove večjo moč sevanja in se zato danes uporablja namesto vodikove. Običajen tip devterijeve žarnice, ki ne zahteva vodnega hlajenja, daje spekter svetlobe v območju 220–620 nm.

Ksenonova žarnica je izvor UV- in vidne svetlobe. Ima veliko moč sevanja. Pokriva širši spekter valovnih dolžin od halogenske in devterijeve žarnice. Daje spekter svetlobe v območju 220–1100 nm. Uporablja se kot izvor svetlobe pri fluorimetrih. Njena slaba lastnost je, da v ozračje **seva ozon**.



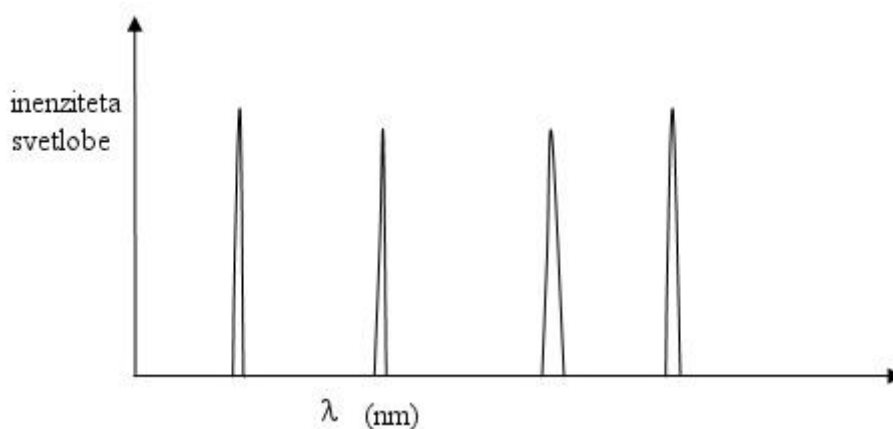
Pomni

Med žarnice, ki se uporabljajo za merjenje **vidne svetlobe**, prištevamo halogenske žarnice (volframove se danes ne uporabljajo več), med žarnice za merjenje **ultravijolične svetlobe** pa prištevamo devterijeve in vodikove žarnice, kljub temu da vsaka od teh žarnic seva tudi del svetlobe izven spektra, za katerega se uporabljajo.

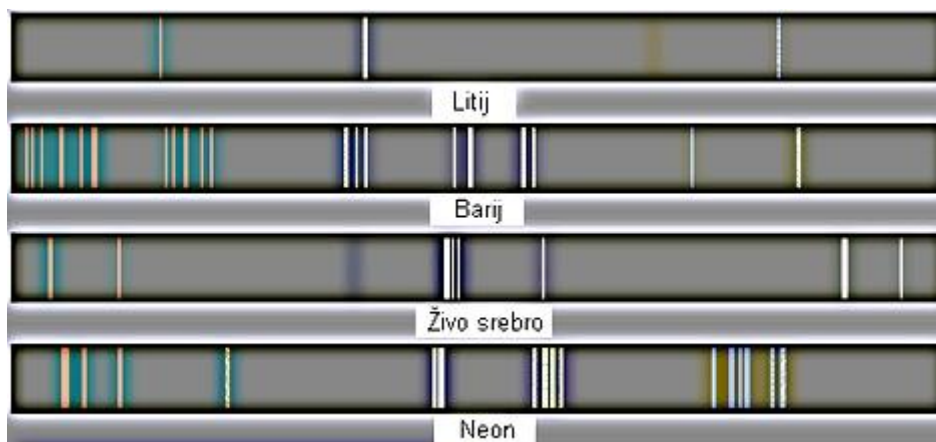
ČRTASTI IZVORI SVETLOBE

Črtasti izvori svetlobe oddajajo **posamezne valovne dolžine** tako v vidnem, kot v UV-območju. Njihova prednost je, da so valovne dolžine izredno čiste, pomanjkljivost pa je ta, da za analizo nimamo možnosti izbrati katerekoli valovne dolžine, ampak le tiste, ki jih posamezni črtasti izvor svetlobe oddaja.

Primeri črtastih izvorov svetlobe so: natrijeva svetilka, živosrebrova svetilka in votla katodna svetilka.



Slika 2 - 5 Grafični prikaz črtastega spektra svetlobe



Slika 2 - 6 Prikaz črtastega spektra posameznih elementov

MONOKROMATSKI IZVORI SVETLOBE

Monokromatski izvori svetlobe oddajajo le eno zelo čisto valovno dolžino, zato instrumenti z monokromatskimi izvori svetlobe ne potrebujejo **elementa za izbiro valovne dolžine**. Med monokromatske izvore svetlobe spadajo različne vrste **laserjev**, ki dajejo zelo visoko intenziteto svetlobe z valovnim območjem **0,01 nm** in manj.

Laser

Izraz laser je kratica za **L**ight **A**mplification by **S**timulated **E**mission of **R**adiation, kar pomeni ojačevanje svetlobe s stimulirano emisijo sevanja.



Te zanima?

Leta 1960 je Theodore H. Maiman predstavil prvi LASER z rubinovim kristalom, ki je oddajal kratke bliske rdeče svetlobe in je postal nepogrešljivo orodje na različnih področjih, tako tudi v analizi kemiji kot sestavni del instrumentov. Pomanjkljivosti prvih laserjev so bile, da so oddajali le omejeno število posameznih valovnih dolžin. Danes lahko laserji omogočijo že katerokoli izbrano valovno dolžino.

V laserju se nakopiči energija, ki se potem v trenutku sprosti v zelo močnem svetlobnem curku.

Laser je sestavljen iz **treh** osnovnih delov:

1. **Iz sredice ali medija.** Ta je lahko kristal ali cev s tekočino ali plinom, kamor dovajamo energijo. Od kristalov je najbolj v rabi rubinov kristal, od plinov pa zmes helija in neona.
2. **Iz napajalne naprave,** ki lahko proizvaja močne bliske svetlobe ali močne radijske valove.
3. **Iz resonatorja,** ki ustvarja stoječe elektromagnetno valovanje in natančno usmerja laserski curek. Vsebuje dve vzporedni zrcali, eno je neprepustno, drugo pa polprepustno.

Laser običajno **deluje** tako, da se nastala radiacija večkrat odbija na dveh ogledalih, ko prehaja skozi lasersko sredico. Pri vsakem prehodu skozi medij se fotoni pomnožijo. Rezultat tega je tudi, da je izhajajoča svetloba strogo paralelna, ker se neparalelna svetloba že prej odbije in izloči iz medija.

Laser aktiviramo s pomočjo zunanjega vira energije, kot npr. z električnim tokom ali z električno razelektritvijo. Na ta način dobimo nekaj fotonov, ki sprožijo plaz novih fotonov z enako energijo.

NAPAKE MERITEV, KI SO POSLEDICA IZVORA SVETLOBE

Žarnica mora biti pravilno vstavljena v instrument, ker so od tega odvisni rezultati meritev. Po daljšem času uporabe začne svetilnost žarnice sčasoma padati. Tega s prostim očesom ne opazimo, je pa vzrok velikih napak, ki se pokažejo pri meritvah. Zato moramo žarnice večkrat preveriti in jih po potrebi zamenjati z novimi.

Na rezultate meritev vpliva tudi stabilnost izvora svetlobe, ki je močno odvisna od zunanje električne napetosti.

Da bi zagotovili konstantno svetilnost izvora svetlobe, moramo imeti na razpolago zelo stabilne **električne napajalnike** (angl. »*power supply*«). Ti so kombinacija transformatorja, usmernika in stabilizatorja, ki zagotavljajo ustrezno napetost, spremenijo izmenični tok v enosmernega in ga stabilizirajo.



PONOVIMO

1. Razložite izvore črtaste svetlobe in navedite nekaj primerov žarnic, ki oddajajo črtasto svetlobo.
2. Razložite izvore zvezne svetlobe in navedite primere žarnic, ki oddajajo zvezno vidno svetlobo, zvezno UV-svetlobo ter zvezno vidno in UV-svetlobo.
3. Ugotovite, kako bi spoznali, da volframova žarnica oddaja večino energije v obliki IR-svetlobe.
4. Razložite vlogo laserja in predvidite, kje bi ga lahko uporabljali v analitiki.
5. Ocenite, kakšen bi bil vpliv izvora svetlobe na spremembo rezultatov meritev istega vzorca.
6. Primerjajte med seboj spekter svetlobe in pas valovnih dolžin.

ELEMENTI ZA IZBIRO VALOVNE DOLŽINE

Elementi za izbiro valovne dolžine iz polikromatske svetlobe izberejo ustrezno valovno dolžino. Ležijo lahko med izvorom svetlobe in vzorcem, v nekaterih instrumentih pa tudi za vzorcem (atomske absorpcijske spektrometre).

Med elemente za izbiro valovne dolžine spadajo optični filtri in monokromatorji.

OPTIČNI FILTRI

Optični filtri iz polikromatske svetlobe izolirajo **pas valovnih dolžin**.

Poleg vloge elementa za izbiro valovne dolžine imajo tudi druge vloge. Uporabljajo se za odstranjevanje svetlobe, ki bi motila pri analizah, lahko pa se uporabljajo za nadzor ali naravnavanje vrednosti absorptanc namesto standardnih raztopin. Filtri, ki se uporabljajo namesto standardnih raztopin, vsebujejo nevtralno barvo, ki je nanešena na nosilec. Ti filtri imajo konstantno absorpcijo v širšem spektralnem območju.

Optične filtre delimo na:

1. absorpcijske filtre: uporabni so le za vidno svetlobo,
2. interferenčne filtre: uporabni so za vidno, UV- in IR-svetlobo,
3. sestavljene filtre.



VLOGA OPTIČNIH FILTROV

Kako bi eksperimentalno ugotovili, kateri filter bi uporabili za raztopino določene barve (npr. rumeno)?



Absorpcijski filtri

Najobičajnejši absorpcijski filtri so:

1. filtri iz obarvanega stekla,
2. filtri iz barve, suspendirane v želatino, ki jo obdajata dve stekleni plošči.

Poznamo tudi filtre, ki vsebujejo raztopine organskih barv in obarvane plastične mase. Obarvana stekla so bolj odporna na spremembo temperature kot filtri, ki vsebujejo želatino.

Delovanje

Delovanje absorpcijskih filtrov temelji na absorpciji določenega dela spektra vidne svetlobe, preostanek svetlobe pa prepusti.

Valovno območje filtrov nam pove, kolikšen delež valovnih dolžin bo določen filter prepustil. V literaturi so podatki za **efektivno valovno območje** ali **polovično valovno območje** (angl. »*half bandwidth*« ali »*effective bandwidth*«) posameznih filtrov.

Običajno se uporabljajo absorpcijski filtri s polovičnim valovnim območjem **30–50 nm**.

Absorpcijski filtri, ki zagotavljajo najožje valovno območje, absorbirajo tudi velik del prepuščenega pasu valovnih dolžin. Maksimalna prepustnost takšnih filtrov je lahko celo manjša od 10 %.



KONZORCIJ ŠOLSKIH CENTROV

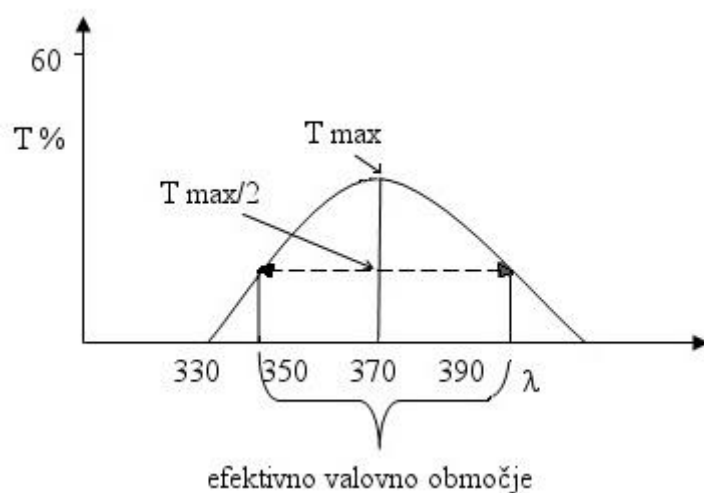


REPUBLIKA SLOVENIJA
ŠOLSTVO IN ŠPORT

SŠFKZ



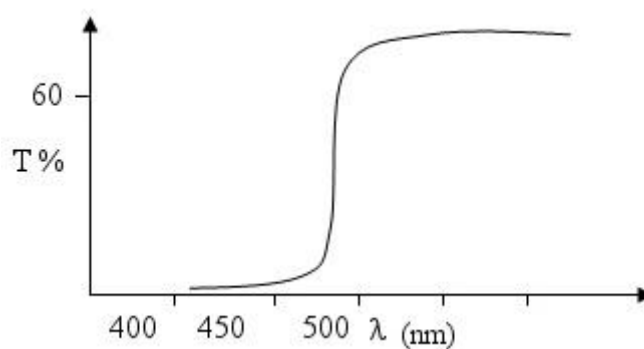
Naložba v vašo prihodnost
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA
Evropski socialni sklad



Slika 2 - 7 Graf prepustnosti absorpcijskega filtra

Filtri, ki odrežejo območje valovnih dolžin (angl. »cut off« filtri)

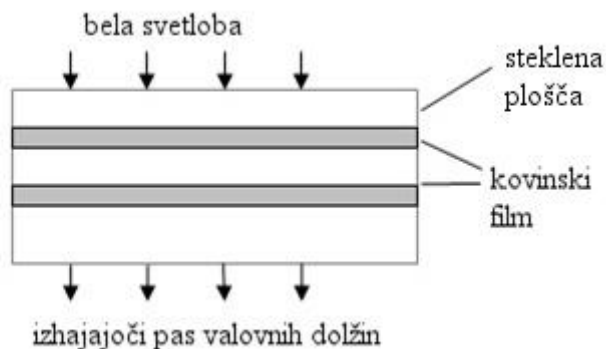
Poleg običajnih absorpcijskih filtrov, ki prepustijo pas valovnih dolžin, poznamo tudi filtre, ki odrežejo določen spekter valovnih dolžin, ostale pa prepustijo skoraj 100 %. Angleško jih imenujemo »cut off« filtri. Uporabljajo se za odstranitev neželenih valovnih dolžin in kot sestavni del sestavljenih filtrov.



Slika 2 - 8 Graf prepustnosti »cut off« filtra

Interferenčni filtri

Interferenčni filtri vsebujejo v sredini prozorno plast, ki je običajno CaF_2 ali MgF_2 . Na vsaki strani jo obdaja polprepustni kovinski film, ki je običajno iz srebra (Ag). Vse to obdaja steklo ali kateri drugi prepustni material. Debelina sredinske plasti mora biti točno določena, ker je od nje odvisno, katere valovne dolžine bo filter prepustil.

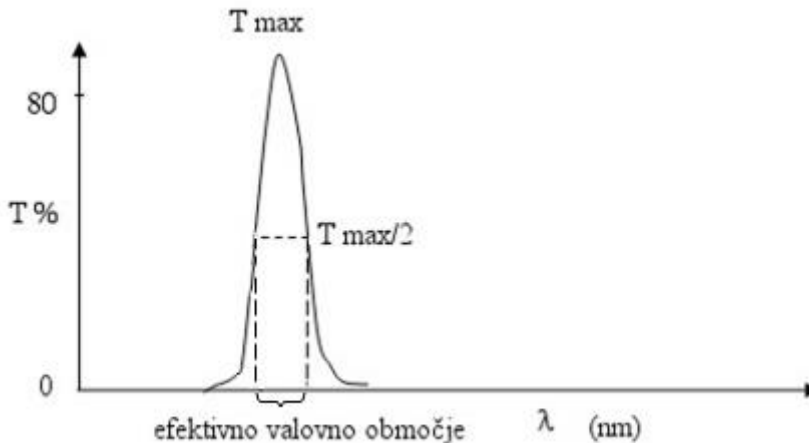


Slika 2 - 9 Shematski prikaz interferenčnega filtra

Delovanje

Delovanje interferenčnih filtrov temelji na odklonu določenega dela spektra svetlobe, skozi pa prehaja ozek pas svetlobe (**4–20 nm**) točno določenih valovnih dolžin, ki se med prehodom skozi filter tudi ojači.

Maksimalna prepustnost svetlobe je lahko celo **90 % in več**.



Slika 2 - 10 Graf prepustnosti interferenčnega filtra

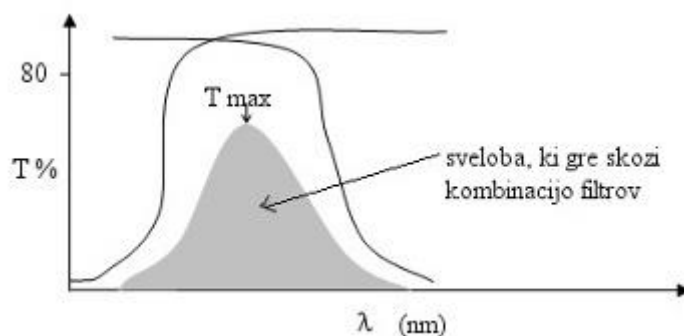
V primerjavi z absorpcijskimi filtri imajo interferenčni filtri naslednje prednosti:

1. dajejo ožji pas valovnih dolžin,
2. njihova prepustnost je večja kot pri absorpcijskih filtrih,
3. uporabni so za vidno, UV- in IR-svetlobo.

Njihova pomanjkljivost je edino ta, da so dražji od absorpcijskih filtrov.

Sestavljeni optični filtri

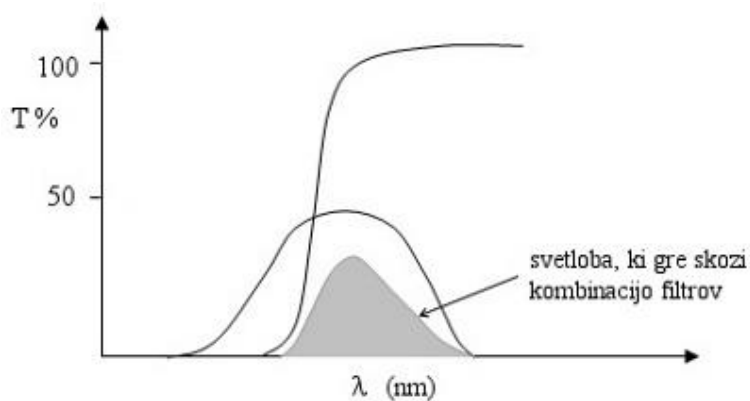
Sestavljeni optični filtri se uporabljajo kot element za izbiro valovne dolžine pri fotometrih. Najpogosteje so sestavljeni iz dveh »cut off« filterov, ki sta stisnjena skupaj.



Slika 2 - 11 Graf prepustnosti kombinacije dveh »cut off« filterov

Poleg kombinacije dveh »cut off« filterov poznamo tudi kombinacijo dveh običajnih absorpcijskih filterov, kombinacijo absorpcijskega filtra s »cut off« filtrom in interferenčnega filtra s »cut off« filtrom.

Rezultat takšne kombinacije je ožje valovno območje in manjša prepustnost svetlobe v primerjavi s prepustnostjo posameznih filterov.



Slika 2 - 12 Graf prepustnosti kombinacije »cut off« filtra in običajnega absorpcijskega filtra



KONZORCIJ ŠOLSKIH CENTROV



REPUBLIKA SLOVENIJA
ŠOLSTVO IN ŠPORT

SŠFKZ



Naložba v vašo prihodnost
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA
Evropski socialni sklad



Domača naloga

1. Narišite kombinacijo:
 - a. dveh interferenčnih filtrov,
 - b. interferenčnega in absorpcijskega filtra,
 - c. interferenčnega in »cut off« filtra.
2. Označite pri vseh kombinacijah efektivno valovno območje. Kaj opazite?
3. Na slikah 2 - 11 in 2 - 12 označite efektivno valovno območje kombinacije optičnih filtrov. Katere prednosti in pomanjkljivosti vidite pri obeh kombinacijah?

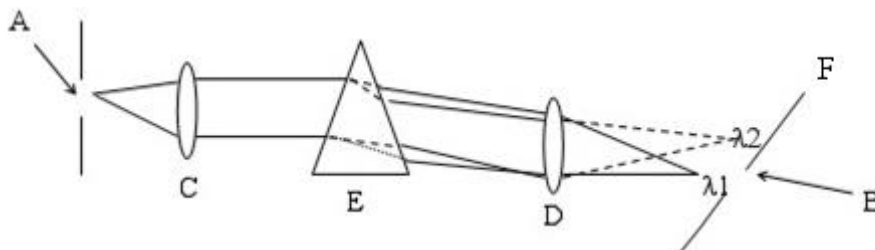
MONOKROMATORJI

Monokromatorji iz polikromatske svetlobe izberejo določeno valovno dolžino. Uporabljajo se lahko za vidno, UV- in IR-območje. Medtem ko optični filtri prepuščajo pas valovnih dolžin, monokromatorji prepuščajo izbrane valovne dolžine.

Po zgradbi so si monokromatorji zelo podobni. Njihov glavni sestavni del je **disperzni sistem** (prizma ali uklonska mrežica), ki razprši vpadno svetlobo na posamezne valovne dolžine. Poleg disperznega sistema vsebujejo monokromatorji tudi reže, leče in ogledala. **Ogledala** v monokromatorju **podaljšujejo optično pot** svetlobnega žarka, s tem se razdalja med žarki posameznih valovnih dolžin povečuje, skozi izhodno režo monokromatorja pa posledično prehaja bolj čista svetloba.

Monokromator na prizmo

Glavni in osrednji del monokromatorja na prizmo je prizma, ki razcepi polikromatsko svetlobo na posamezne valovne dolžine.



Slika 2 - 13 Monokromator na prizmo

Legenda:

A ... vhodna reža
D ... žariščna leča

B ... izhodna reža
E ... prizma

C ... zbiralna leča (kolimator)
F ... žariščna ravnina

Delovanje

Skozi vhodno okence in nato skozi vhodno režo monokromatorja (A) prehaja polikromatska svetloba, ki jo zbere zbiralna leča (C) in pošlje paralelno na prizmo (E). Na prizmi se vsaka valovna dolžina lomi pod določenim kotom, izhajajoče valovne dolžine pa zbere žariščna leča (D) in jih pošlje na žariščno ravnino (F), kjer leži izhodna reža (B). Izhodna reža prepusti izbrano valovno dolžino, ki gre skozi izhodno okence, od koder zapusti monokromator.

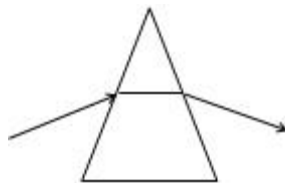
Prizma

Prizma enakomerno razprši vpadno polikromatsko svetlobo na različne valovne dolžine. Svetloba, ki pade na prizmo, mora biti paralelna.

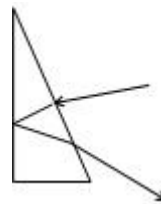
Prizme so lahko sestavljene iz navadnega ali kremenčevega stekla. Navadno steklo prepušča le vidno svetlobo (spektralno območje je 350–2000 nm), kremenčevo steklo pa tudi UV-svetlobo.

Glede na obliko poznamo dve vrsti prizem:

1. prizma, ki ima kot 60° ,
2. Littrowa prizma, ki ima kot 30° , na eni strani pa ima ogledalo.



Slika 2 - 14 Prizma pod kotom 60°



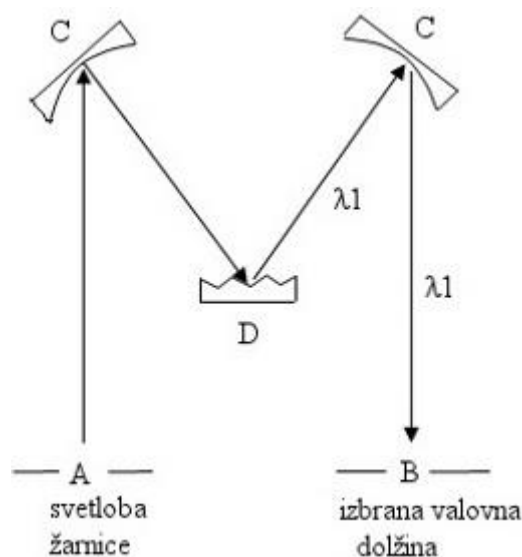
Slika 2 - 15 Littrowa prizma

Na površini prizme se svetloba lomi dvakrat:

1. prvič, ko prehaja iz optično redkejšega medija v optično gostejšega;
2. drugič, ko prehaja iz optično gostejšega medija (prizme) nazaj v optično redkejšega (zrak).

Monokromator na uklonsko mrežico

Pri monokromatorju na uklonsko mrežico ima vlogo disperznega sistem uklonska mrežica, ki podobno kot prizma razprši polikromatsko svetlobo na posamezne valovne dolžine. Konkavni ogledali svetlobo usmerita na uklonsko mrežico in na izhodno režo.



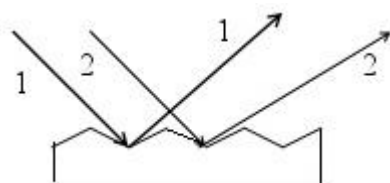
Slika 2 - 16 Monokromator na uklonsko mrežico

Legenda:

- | | |
|-------------------------|--|
| A ... vhodna reža | B ... izhodna reža in žariščna ravnina |
| C ... konkavna ogledala | D ... uklonska mrežica |

Uklonske mrežice

Uklonske mrežice so ravne ali ukrivljene steklene ali plastične površine, v katere so z diamantnim nožem vrezane številne zareze. Zarezice morajo biti paralelne in enake velikosti. Na dobro obdelano površino je nanešen tanek sloj aluminija. Ker je bila izdelava takih uklonskih mrežic predraga, so začeli izdelovati odlitke teh mrežic.



Slika 2 - 17 Uklonska mrežica

Ukrivljene ali konkavne uklonske mrežice imajo prednost pred ravnimi, ker razpršijo (dispergirajo) svetlobo in jo tudi usmerijo na izhodno režo. Zaradi tega ni nujno potrebna žariščna leča ali ogledalo. Z zmanjšanjem števila optičnih elementov se tudi zveča energija radiacije, ki prehaja skozi monokromator.

Od števila zareze je odvisno, v kakšen namen se bo uklonska mrežica uporabljala. Večje število zareze imajo uklonske mrežice za vidno in UV-območje (najpogosteje se uporabljajo tiste z 1200–1400 zareze/mm), manjše število zareze pa imajo uklonske mrežice za IR-območje (10–200 zareze/mm).

Poleg opisanega refleksnega tipa uklonske mrežice poznamo tudi transparentne uklonske mrežice, vendar se v današnjih aparatih uporabljajo skoraj izključno le refleksijske.

Uklonske mrežice imajo pred prizmo **prednosti**:

1. disperzija je konstantna in boljša pri enaki velikosti disperzijskega sistema;
2. refleksijski tip uklonske mrežice razprši poleg vidne tudi IR- in daljno UV-svetlobo, kar pri steklenih prizmah ni možno, ker absorbira UV-svetlobo.

Uklonske mrežice imajo tudi **pomanjkljivost**, da sevajo nekoliko več motečih valovnih dolžin v primerjavi s prizmo. Moteča sevanja uspešno odstranimo z optičnimi filtri.

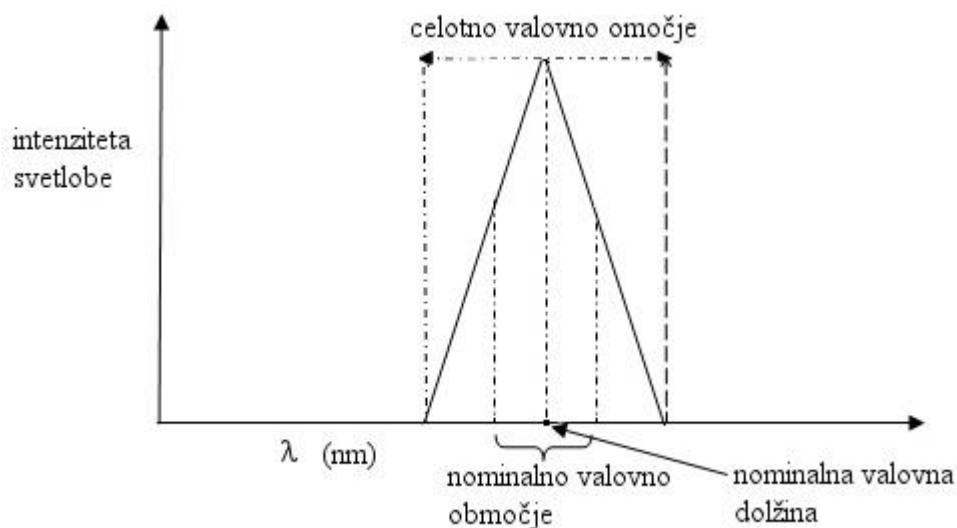
Monokromatorske reže

Monokromatorske reže so sestavljene iz dveh kovinskih ploščic, katerih robova morata biti zelo ostra in strogo paralelna ter morata ležati v isti ravnini. Odprtina rež je lahko fiksna ali pa se spreminja s pomočjo mikrovijakov.

Vhodna reža služi za zožitev vhodne svetlobe, ki pride iz žarnice. Na ta način nastavimo intenziteto svetlobe I_0 .

Skozi **izhodno režo** prehaja zelena valovna dolžina. To dosežemo s premikanjem disperznega sistema. Čim ožja je izhodna reža, bolj je žarek očiščen drugih valovnih dolžin, njegova intenziteta pa je manjša.

Eksperimentalno so ugotovili, da je najbolje, če sta odprtini vhodne in izhodne reže enaki. Če je širina obeh rež enaka, lahko predstavimo svetlobo, ki prehaja skozi izhodno režo v obliki enakokrakega trikotnika.



Slika 2 - 18 Svetloba, ki bi šla teoretično skozi izhodno režo monokromatorja.

Nominalna valovna dolžina je izbrana valovna dolžina in seka trikotnik točno na sredini. Po dogovoru so določili tudi **nominalno valovno območje**, podobno kot efektivno valovno območje pri filtrih. Nominalno valovno območje vključuje 75 % svetlobe, ki pride skozi izhodno režo monokromatorja.

Celotno valovno območje predstavlja dvakratno vrednost nominalnega valovnega območja. Do nominalnega valovnega območja pridemo tako, da celotno valovno območje, ki ga prepušča monokromator, razdelimo na štiri dele (slika 2 - 18).

Tudi pri najbolj izpopolnjenih monokromatorjih izhajajoča svetloba ni popolnoma čista. Večjo čistost lahko dosežemo edino z uporabo črtastih izvorov svetlobe.

Zaradi optičnih aberacij dejanska izhajajoča svetloba nima oblike popolnoma simetričnega trikotnika, zato je tudi dejansko efektivno valovno območje nekoliko širše od nominalnega (teoretičnega).

Okenca monokromatorja

Monokromator obdajata vhodno in izhodno okence, ki ščitata reže pred prahom in parami. Zaradi prehoda UV-svetlobe so okenca običajno iz kremenčevega stekla.

Moteča sevanja monokromatorja

Zaradi različnih vzrokov dobimo v žarku, ki pride iz monokromatorja, neželene valovne dolžine. To imenujemo moteča sevanja.

Vzroki motečih sevanj so:

1. odboj žarka na optičnih delih in na ohišju monokromatorja,
2. sipanje žarka na delcih prahu v okolici monokromatorja in na optičnih površinah.

Moteča sevanja so zmanjšali na minimum:

1. z uvedbo omejevalcev razprševanja, ki predstavljajo optično oviro;
2. s tem, da so prebarvali notranje površine ohišja s črno barvo.

Črna barva absorbira svetlobo, ki zaide na njeno površino. Na ta način je odboj žarkov onemogočen.



KONZORCIJ ŠOLSKIH CENTROV



REPUBLIKA SLOVENIJA
ŠOLSTVO IN ŠPORT
SŠFKZ



Naložba v vašo prihodnost
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA
Evropski socialni sklad



PONOVIMO

1. Katero barvo svetlobe bi prepustil rumeni filter, katero pa bi absorbiral? Odgovor na vprašanje poiščite v krogu barv.
2. V katere namene se uporabljajo optični filtri?
3. Razložite in na grafu prikažite efektivno valovno območje optičnih filtrov.
4. Primerjajte interferenčni filter z absorpcijskim.
5. Razložite pomanjkljivost kombiniranih optičnih filtrov.
6. Ugotovite, zakaj so v literaturi navedena polovična valovna območja optičnih filtrov in ne celotna valovna območja.
7. Razložite delovanje monokromatorja na prizmo in na uklonsko mrežico.
8. Kaj se zgodi, ko pade svetlobni žarek na prizmo?
9. Zakaj mora biti svetloba, ki pade na disperzni sistem, paralelna?
10. Kaj pomeni za meritev, če spremenimo širino reže?
11. Ugotovite, katere dele monokromatorja premikamo takrat, ko spreminjamo valovno dolžino nekega spektrometra.
12. Predvidite, kako bi teoretično lahko povečali čistost valovne dolžine svetlobnega žarka, ki ga prepusti izhodna reža monokromatorja.
13. Razlikujte med celotnim valovnim območjem in nominalnim valovnim območjem monokromatorja.
14. Razložite vlogo okenc monokromatorja.
15. Razložite moteča sevanja monokromatorja. Kako so jih zmanjšali na minimum?

KIVETE

Kivete so prozorne »posodice«, v katerih se izvajajo optične meritve tekočih vzorcev. Narejene so iz materiala, ki prepušča svetlobo v določenem spektralnem območju. Debelina njihovih sten mora biti enakomerna, premer kivet pa mora biti povsod enak in točno določen.

Kiveta je lahko že vgrajena v instrument (pretočna kiveta) ali pa jo vstavljamo ročno. Drugače je pri analizatorjih, ki jih obravnava 5. poglavje.



RAZLIKE MED KIVETAMI

Izmed oglatih plastičnih kivet izberite eno in jo pri določeni valovni dolžini spektrometra ali fotometra umerite na vrednost absorbance nič. Nato izmerite absorbance ostalih kivet. Svoja opazanja si zapišite. Opazili boste, da se rezultati meritev posameznih kivet med seboj razlikujejo. Razložite vzroke razlik. Kako bi čim bolj zmanjšali vpliv kivet na točnost meritev? Ali na točnost meritev poleg lastnosti kivet vpliva še kaj drugega?

VRSTE KIVET

Po **obliki** delimo kivete na **okrogle** in **oglate**. Okrogle kivete uporabljamo za manj natančne meritve, ker pri nepravilni ukrivljenosti in debelini stekla pride do dodatnih sipanj svetlobe.

Oglate kivete so zaradi natančnejše izdelave primernejše od okroglih kivet. Njihova prednost je tudi v tem, ker jih je veliko lažje izdelati kot okrogle kivete.

Glede **na sestavo** delimo kivete na **steklene**, **plastične**, **kvarčne (iz kremenčevega stekla)** in iz **kristaliničnega NaCl**.

Steklene kivete so najobičajnejše in prepuščajo svetlobo valovnih dolžin 350–2000 nm.

Plastične kivete uporabljamo namesto steklenih kivet in so namenjene enkratni uporabi. Če jih zaradi varčevalnih ukrepov uporabljamo večkrat, jih moramo obvezno po nekajkratni uporabi zavreči. Njihova površina postane namreč hrapava in motna.

Kivete iz kremenčevega stekla ali kvarčne kivete uporabljamo za **UV-območje** pod 350 nm. Te prepuščajo tudi vidno in IR-svetlobo, vendar so za uporabo v vidnem območju predrage. Uporabljajo se tudi za fluorimetrične ali nefelometrične meritve, ker nimajo brušenih oz. matiranih stranic.

Ploščice iz kristaliničnega NaCl uporabljamo za IR-območje.



Slika 2 - 19 *Steklena kiveta*



Slika 2 - 20 *Kvarčna kiveta*

Standardni **premer** kivete je 10 mm, poznamo pa tudi kivete premera od 1 mm do 100 mm. Kivete s premerom pod 10 mm uporabljamo za snovi, ki močno absorbirajo svetlobo, ali pa imamo na razpolago zelo malo vzorca. Kivete s premerom nad 10 mm uporabljamo za snovi, ki slabo absorbirajo svetlobo oziroma za zelo razredčene raztopine. Za majhne volumne vzorcev (pod 100 mikrometrov) uporabljamo semimikro ali mikro kivete.



a



b



c

Slika 2 - 21 *Kiveta s premerom nad 10 mm (a), semimikro kiveta (b) in mikro kiveta (c).*

Pretočne kivete so stalno vstavljene v prostor za kivete in omogočajo večje število meritev v enoti časa. Pomanjkljivost teh kivet, zlasti tistih z majhnim volumnom je, da kljub splakovanju ostane v kiveti še nekaj predhodnega vzorca, ki povzroča napake pri meritvah. Če je vzorec močno obarvan ali zelo viskozen, je napaka še večja. Temu pojavu pravimo angleško »*carry over*« **efekt**. Izognemo se mu, da predhodni vzorec splaknemo z naslednjim.



Slika 2 - 22 *Pretočna kiveta*

Zahteve, ki morajo biti izpolnjene pri delu s kivetami

Kivete morajo biti med merjenjem pravilno vstavljene v instrument. Biti morajo popolnoma **čiste**, brez prask in prstnih odtisov. Zaradi prstnih odtisov imajo nekatere oglate kivete matirani nasprotni steni, za kateri primemo kiveto. Kadar izvajamo meritve pod kotom (fluorimetrične in nefelometrične meritve), kivete ne smejo imeti matiranih površin. Za zelo natančne meritve morajo biti kivete kalibrirane z absorbirajočo raztopino. Imeti morajo oznako, iz katerega materiala so narejene in za katero spektralno območje so namenjene. Če te oznake ni, menimo, da so namenjene za meritve v vidnem območju svetlobe. V kivetu mora biti dovolj tekočine, zahtevan volumen v kivetu pa je odvisen od vrste instrumenta, s katerim izvajamo meritve. Če je v kivetu premalo tekočine, so meritve napačne.



PONOVIMO

1. Razložite, zakaj se za razredčene raztopine z nizko absorbanco uporabljajo kivete večjega premera.
2. Ugotovite, kako bi pravilno določili koncentracijo nekega vzorca, ki ima absorbanco nad 1,0.
3. Ocenite prednost in pomanjkljivost pretočnih kivet.
4. Primerjajte med seboj uporabnost plastičnih, steklenih in kvarčnih kivet.
5. Ali bi bil rezultat točen, če bi v kiveto natočili premalo ali preveč vzorca? Razložite odgovora.
6. Predlagajte, kakšne naj bi bile kivete v primeru, da merimo svetlobo pod kotom.

DETEKTORJI SVETLOBE



UPORABNOST DETEKTORJEV SVETLOBE

Vsi poznate vrata, ki se samodejno odprejo, ko se jim približate. Vrata reagirajo na svetlobni žarek nekega za oči neopaznega izvora svetlobe. Prekinitev svetlobnega žarka zazna fotoelektrični detektor (fotocelica), ki pretvori svetlobo v električni tok, ta pa preko mehanizma povzroči odprtje vrat. Razmislite, kje vse bi še lahko uporabili fotoelektrične detektorje.



<http://www.pst.si/index.php?md=Galerija>
(11. 12. 2010)

VRSTE DETEKTORJEV SVETLOBE IN NJIHOVE ZNAČILNOSTI

Detektorje svetlobe delimo v dve skupini: fotonski detektorji in toplotni ali IR-detektorji. Svetloba, ki ima dovolj energije, se meri s fotonskimi detektorji, svetloba z nižjo energijo (IR-svetloba) pa s toplotnimi detektorji.

Fotonski detektorji imajo **aktivno površino**, ki je sposobna absorbirati fotone.

Poznamo dve skupini fotonских detektorjev:

1. **fotoemisijski** – absorbirana energija svetlobe povzroči **emisijo** (oddajanje) elektronov in s tem nastanek fototoka (električnega toka, ki ga povzročijo fotoni),
2. **fotoprevodniški** – energija svetlobe povzroči na aktivni površini zvečanje prevodnosti, ki jo merimo.

Fotoemisijo in spremembo prevodnosti lahko sprožijo le UV-, vidna in bližnja IR-svetloba, ki imajo dovolj energije. Za ostali del IR-svetlobe uporabljamo toplotne detektorje.

FOTONSKI DETEKTORJI

Fotonski detektorji svetlobe, ki pretvorijo svetlobni signal v električni, se imenujejo tudi **fotoelektrični detektorji**.

Lastnosti idealnih fotoelektričnih detektorjev

Nastali električni signal mora biti **premosorazmeren** z močjo svetlobnega žarka, ki pade na detektor. Fotoelektrični detektorji morajo biti **uporabni** za čim **širši spekter valovnih dolžin** in za **šibka žarčenja**. Čim **hitreje** morajo **pretvoriti svetlobo** v električni signal, električni signal pa mora biti tak, da ga z **lahkoto ojačimo** pri čim **manjšem šumu**.

Šum predstavlja vsa onečiščenja električnega osnovnega signala s strani samega detektorja kot tudi ostalih elektronskih delov instrumenta, iz katerih zaidejo elektroni na detektor.

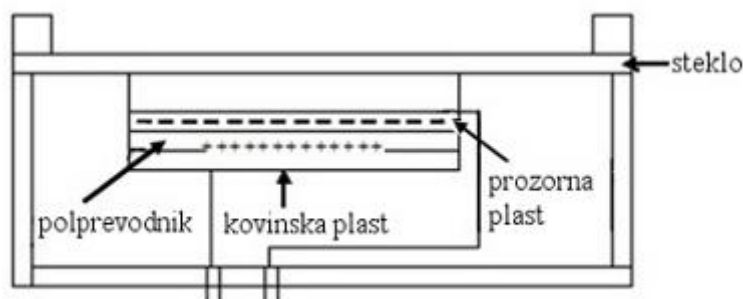
Temni tok

Pri mnogih detektorjih svetlobe se srečujemo s pojavom konstantnega majhnega električnega signala, ki ni rezultat pretvorbe analitičnega signala. Imenujemo ga **temni tok** ali angl. »*dark current*«. Temni tok je električni tok, ki teče skozi detektor v temi (detektor ni obsevan s svetlobo žarnice). Instrumenti, pri katerih se pojavlja temni tok, so dodatno opremljeni s kompenzacijsko napravo, ki omogoča uravnavo temnega toka na nič.

Fotoelektrični detektorji so: fotoelement, fotocelica, fotopomnoževalka, fotodioda in fotoprevodniški detektor.

Fotoelement

Spodnjo plast fotoelementa sestavlja **kovinska površina** iz železa ali bakra. Na njo je nanesen **polprevodnik** iz selenovega ali bakrovega oksida, ta pa je prekrit s tanko **prozorno** plastjo kovine, ki je lahko zlato, srebro ali svinec. Prozorna (transparentna) kovinska plast služi kot **kolektor** (zbiralec) **elektronov**. Vse to je zaščiteno s prozornim plaščem.



Slika 2 - 23 Fotoelement

Delovanje

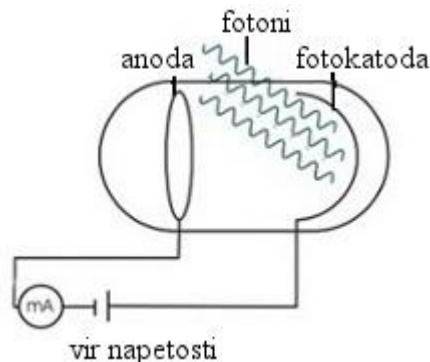
Svetloba pade na prozorno kovinsko plast in gre skozi njo do polprevodnika. Na polprevodniku povzroči izbijanje elektronov in pozitivno nabite delce (vrzeli). Elektroni potujejo proti kolektorju elektronov, vrzeli pa v obratno smer. Elektroni so prosti in lahko potujejo po zunanjem krogu do vrzeli. Rezultat tega pojava je fototok, ki je premosorazmeren z intenziteto svetlobe, ki padejo na polprevodnik.

Uporabnost

Fotoelementi so primerni sestavni deli za poceni preproste prenosne instrumente. Ne potrebujejo zunanjega izvora napetosti, fototok pa lahko direktno merimo z občutljivim galvanometrom. Uporabni so le za merjenje vidne svetlobe z maksimalno občutljivostjo pri valovni dolžini okrog 550 nm. Njihova slaba stran je, da po daljšem času osvetljevanja začne fototok postopoma upadati.

Fotocelica

Fotocelica je vakuumirana cilindrična cev, ki vsebuje polcilindrično katodo in žičnato anodo. Konkavni del katode vsebuje fotoemisijsko snov (snov, ki oddaja elektrone po obsevanju s svetlobo), ta pa je lahko iz različnih materialov. Lahko je visoko občutljiva ali pa je občutljiva le na rdečo ali UV- svetlobo. Fotocelice običajno delujejo pri napetosti 90 voltov.



Slika 2 - 24 *Fotocelica*

<http://www.fiz.e-va.si/lessons/25/fotocelica.jpg>
 (17. 11. 2010)

Delovanje

Svetloba pade na katodo, iz nje izbije elektrone, ti pa se zaradi napetosti med anodo in katodo pospešeno gibljejo proti anodi. Nastane fototok, ki je premosorazmeren z intenziteto svetlobe, ki pade na katodo fotocelice.

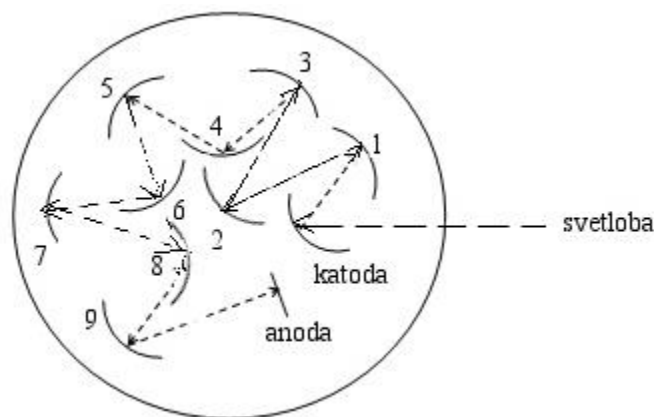
Pri fotocelicah se pogosto pojavlja temni tok, ki je rezultat s toploto povzročenih elektronov in naravne radiaktivnosti atomov kalija (^{40}K) v steklu, ki obdaja fotocelico.

Uporabnost

Fotocelica se običajno uporablja za merjenje UV-, vidne in bližnje IR-svetlobe (za spektralno območje 180–1000 nm).

Fotopomnoževalka

Fotopomnoževalka je sestavljena iz ene **katode** (podobno kot pri fotocelici), ene **anode** in več vmesnih elektrod med katodo in anodo, imenovanih **dinode**, ki jih je 9–14. Vsaka dinoda je bolj pozitivna od predhodne, prva dinoda pa je bolj pozitivna od katode. Katoda, anoda in dinode so nameščene v vakuumirani cevi.



Slika 2 - 25 Fotopomnoževalka

Za delo fotopomnoževalke je potrebna visoka napetost od 500 do 2000 voltov. Če hočemo dobiti točne rezultate, mora biti izvor visoke napetosti stabilen.

Delovanje

Svetloba pade na katodo in iz nje izbije elektrone. Ti se pospešeno gibljejo proti prvi dinodi in iz nje izbijejo sekundarne elektrone. Ti udarijo ob drugo dinodo in sprožijo plaz novih elektronov itd. Vsak elektron, ki pade na kovinsko ploščico dinode, izbije iz nje enega do štiri nove elektrone. Pri fotopomnoževalki z devetimi dinodami vsak foton izbije do 10^7 elektronov, ki jih zbere anoda. Nastali fototok je premo sorazmeren z intenziteto svetlobe, ki pade na katodo fotopomnoževalke.

Slaba stran fotopomnoževalke je sorazmerno **visok temni tok**, katerega glavni vzrok je s toploto povzročeno sevanje elektronov.

Uporabnost

Fotopomnoževalka je zelo primerna za merjenje svetlobe z manjšo intenziteto. Je zelo občutljiva na vidno in UV-svetlobo ter zelo hitro reagira na svetlobo.

Fotodiode

Po občutljivosti so fotodiode nekje vmes med fotocelico in fotopomnoževalko. Večina fotodiod je namenjena za spektralno območje 400–1100 nm, nekatere pa reagirajo tudi na nižje valovne dolžine (do okoli 200 nm).

Fotoprevodniški detektorji

Delujejo na principu padca upora oz. spremembe električne prevodnosti, ko pade svetloba določene valovne dolžine na fotosenzibilno površino detektorja.

Merimo spremembo električne prevodnosti, ki je premosorazmerna z intenziteto svetlobnega žarka, ki pade na detektor.

Fotoprevodniški detektorji so najobčutljivejši detektorji za bližnjo IR-svetlobo valovnih dolžin 750–3000 nm.

TOPLOTNI ALI IR-DETEKTORJI

Toplotni detektorji izkoriščajo toplotno energijo IR-svetlobe in se zato uporabljajo za merjenje IR-svetlobe daljših valovnih dolžin, ki je ni mogoče izmeriti s fotonskimi detektorji. Svetlobni žarek pade na majhno črno telo in se na njem absorbira. Posledica je zvišanje temperature, ki jo merimo. Pod najboljšimi pogoji doseže črno telo spremembo temperature do nekaj tisoč stopinj celzija.

Poglaviten problem pri merjenju IR-svetlobe s toplotnimi detektorji je vpliv zunanje toplote. Zato je detektor v vakuumu in zaščiten pred zunanjo toploto. Instrument, ki vsebuje toplotni detektor, ima za izvorom svetlobe prekinjevalec žarka (čoper), ki enkrat pošlje žarek svetlobe na detektor, takoj zatem pa mimo njega. Na ta način se vplivi zunanje toplote odštevajo. Primeri toplotnih detektorjev so: termočlen, termistor, piroelektrični detektor idr.



PONOVIMO

1. Razvrstite detektorje svetlobe glede na njihovo delovanje.
 2. Kakšne lastnosti morajo imeti idealni fotoelektrični detektorji?
 3. Primerjajte med seboj fotoelement, fotocelico in fotopomnoževalko v smislu njihovega principa delovanja in uporabnosti.
 4. Razložite, kaj je temni tok in v katerih primerih se pojavlja.
 5. Opišite princip delovanja toplotnih detektorjev.
-



POVZETEK

Večina instrumentov za optično spektrometrijo vsebuje izvor svetlobe, element za izbiro valovne dolžine, kiveto, detektor svetlobe in čitalec. Izvor svetlobe je lahko zvezni, črtasti ali monokromatski. Elementi za izbiro valovne dolžine iz polikromatske svetlobe izolirajo izbrano valovno dolžino, ki pade na kiveto z vzorcem. Od lastnosti kivet je odvisna prepustnost svetlobnega žarka. Prepuščeni svetlobni žarek pade na fotoelektrični detektor, ki transformira svetlobo v električni tok. Detektorji svetlobe so fotonski in toplotni. Fotonski detektorji delujejo na principu padca svetlobe na fotosenzibilno površino, energija fotonov pa povzroči nastanek fototoka ali spremembo prevodnosti. Toplotni detektorji izkoriščajo toplotno energijo IR-svetlobe.



MEDPREDMETNO POVEZOVANJE

Povezava s tujim jezikom:

- ✚ Izdelava slovarja sestavnih delov optičnih instrumentov.

Povezava s fiziko in IKT:

- ✚ Timski pouk: zvezni in črtasti spektri svetlobe.
- ✚ Timski pouk: laserski izvori svetlobe.
- ✚ Dijaki z uporabo učbenikov za fiziko in z ustreznimi elektronskimi orodji pripravijo predstavitev o zakonitosti fotoefekta in delovanju fotocelice ali obnovijo znanje pri timskem pouku.

Povezava z matematiko:

- ✚ Odčitavanje grafov in njihovo razumevanje.

3. INSTRUMENTI ZA MERJENJE ABSORBANCE



CILJI UČNE TEME

Največje število metod v medicinskih laboratorijih je optičnih, od teh pa prevladujejo absorbimetrične. Absorbimetrične meritve izvajamo s fotometri ali spektrometri. Neko snov lahko merimo absorbimetrično, če jo spremenimo v takšno obliko, ki lahko absorbira svetlobo točno določene valovne dolžine. Le redke snovi v vzorcu samodejno absorbirajo svetlobo brez predhodne kemijske reakcije. Takšne snovi so npr. elektroliti v atomarni obliki. Zato moramo ione elektrolitov pod vplivom dovolj visoke energije atomizirati, s tem pa jih pretvorimo v plinasto stanje. Pri elektrolitih torej merimo absorbanco atomov v plinastem stanju, medtem ko ostale sestavine (npr. beljakovine, encime, neproteinske dušikove spojine idr.) merimo v tekočih vzorcih. Nekatere elektrolite lahko merimo tudi v tekočinah brez pretvorbe v atomarno stanje (npr. železo, kalcij), za njih pa so na voljo tudi drugi analizni postopki.

Cilji:

- Sestava in delovanje fotometrov.
- Sestava in delovanje spektrometrov (spektrofotometrov).
- Osnove atomske spektrometrije.
- Sestava in delovanje atomskega absorpcijskega spektrometra.

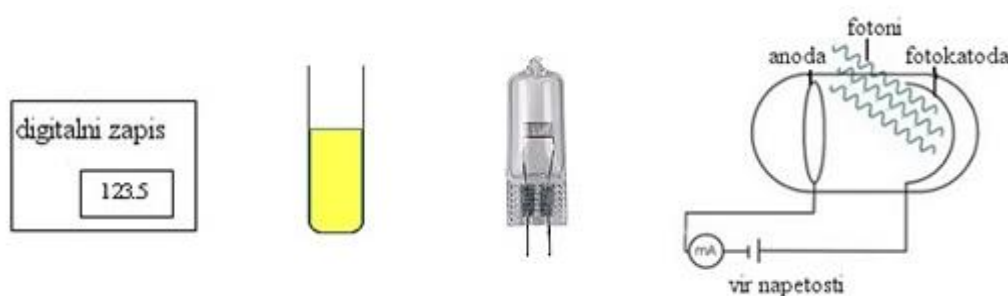


KLJUČNE BESEDE: fotometer, spektrometer, absorbanca, enožarkovni instrumenti, dvožarkovni instrumenti, votla katodna svetilka, atomski absorber, atomizacija.



DELOVANJE INSTRUMENTA ZA MERJENJE ABSORBANCE

Sestavne dele optičnih instrumentov ste že dodobra spoznali. Na voljo imate fotoelektrični detektor, izvor svetlobe, čitalec in vzorec (vzorec je lahko v kiveti ali pa je razpršen v plamenu). V pravilnem vrstnem redu jih vstavite v namišljeni optični instrument in opišite delovanje tega instrumenta. Pri tem upoštevajte lastnosti posameznih sestavnih delov.



ABSORBIMETRIČNE MERITVE VZORCEV V TEKOČI OBLIKI

Snov, ki jo želimo izmeriti v vzorcu (serum, plazma, urin), moramo s kemijsko reakcijo pretvoriti v takšno obliko, ki absorbira svetlobo točno določene specifične valovne dolžine. Absorbanco tekočih vzorcev merimo s fotometri ali spektrometri (spektrofotometri).

FOTOMETER

Fotometri so preprosti, poceni instrumenti za merjenje absorbance, ki imajo kot element za izbiro valovne dolžine različne filtre. Lahko jih je vzdrževati. Kadar za izvedbo analize ni potrebna velika spektralna čistost, so prav tako točni kot bolj zapleteni spektrometri.

Okvirno delimo fotometre v dve skupini:

1. enožarkovni za vidno ali UV-območje,
2. dvožarkovni za vidno ali UV-območje.

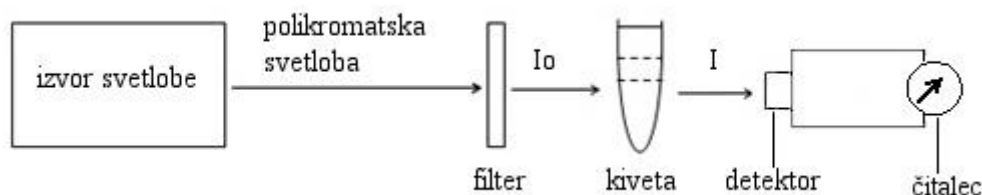
Enožarkovni fotometer

Enožarkovni fotometer meri, kot že ime pove, spremembo intenzitete **enega žarka svetlobe**, ki prehaja skozi merilno kiveto.



Slika 3 - 1 Enožarkovni fotometer

Osnovni sestavni deli enožarkovnega fotometra so: izvor svetlobe, optični filter, kiveta, detektor in čitalec. Poleg osnovnih sestavnih delov vsebuje še lečo, ki ustvari paralelno svetlobo, zaslonko, ki uravnava svetlobo na 100 % prepustnost in tudi ojačevalec.



Slika 3 - 2 Osnovni sestavni deli enožarkovnega fotometra

Delovanje

Polikromatska svetloba izvora svetlobe pade na izbrani optični filter, ki prepusti določen pas valovnih dolžin. Ta gre skozi kiveto z raztopino (slepim vzorcem, standardno raztopino oz. vzorcem), nato pa na detektor. Detektor pretvori svetlobo v električni tok, ki se odčitava na čitalcu.

Umerjanje in meritve

Princip dela je pri vseh novejših enožarkovnih fotometrih enak. Izberemo ustrezen optični filter. Kiveto napolnimo s slepim vzorcem in instrument umerimo na vrednost 0 (absorbanca je 0, transmitanca pa 100 %). Nato kiveto izpraznimo, jo napolnimo s standardno raztopino in izmerimo njeno absorbanco. Z vnosom koncentracije standardne raztopine in s potrditvijo vnosa z ukazom »enter« instrument samodejno izračuna faktor. Brez znanega faktorja instrument ne more izmeriti koncentracije vzorca. Šele po izmerjenem standardu ali po vnosu poznane faktorja v fotometer se lahko lotimo meritev vzorcev. Izmerimo absorbanco, koncentracijo, če želimo pa tudi transmittanco vzorcev. Če gre za isto preiskavo, po vsaki opravljeni meritvi vzorca umerjanje instrumenta ni potrebno.

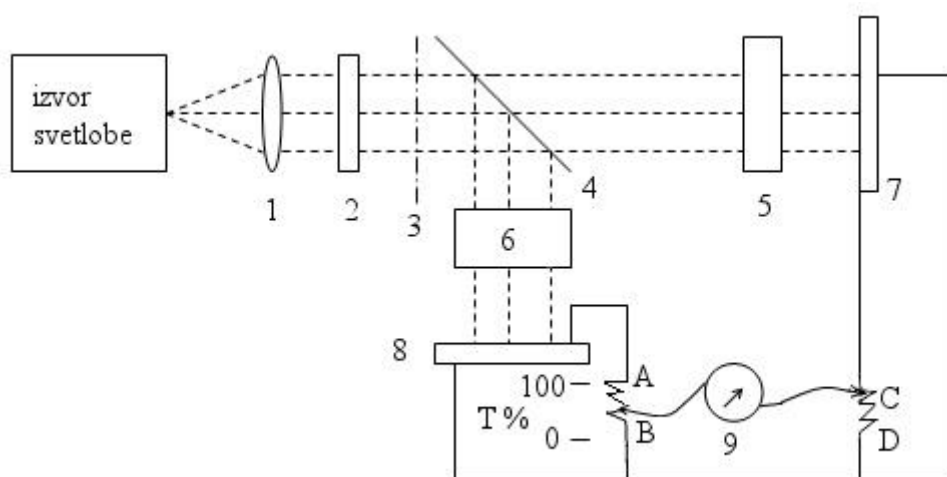
V primeru, da v instrument zaradi pozabljenosti ne vnesemo koncentracije standardne raztopine, instrument pokaže vrednost koncentracije 0, ker množi absorbanco vzorca s faktorjem 0.

Ko enkrat izmerimo faktor in se ta časovno bistveno ne spreminja, za analizo določene snovi v nadaljevanju ne potrebujemo več standardne raztopine, ampak je dovolj, da v instrument vnesemo le vrednost faktorja, ki je potreben za izračun koncentracije vzorcev.

Dvožarkovni fotometer

Dvožarkovni fotometri so manj pogosti kot dvožarkovni spektrometri.

Dvožarkovni fotometri imajo za razliko od enožarkovnih **dva žarka, dve kiveti in dva detektorja**.



Slika 3 - 3 Shema dvožarkovnega fotometra

Legenda:

- | | | |
|-----------------------------|-------------------------------|--|
| 1 ... leča | 2 ... filter | 3 ... zaslonka |
| 4 ... polprepustno ogledalo | 5 ... kiveta za vzorec | 6 ... kiveta za slepi vzorec ali referenčna kiveta |
| 7 ... vzorčni fotodetektor | 8 ... referenčni fotodetektor | 9 ... ničelni čitalec |

Delovanje

Svetloba iz izvora svetlobe pade na lečo, ki ustvarja paralelne žarke. Leča pošlje svetlobo na izbrani optični filter, ki prepusti pas valovih dolžin. Od tam gre do polprepustnega ogledala. Del svetlobe se na polprepustnem ogledalu odbije, del pa prehaja skozi. Tako dobimo dva žarka. Odbiti žarek je referenčen in gre skozi primerjalno kiveto na referenčni fotodetektor. Prepušeni žarek gre skozi polprepustno ogledalo na vzorčno kiveto, nato pa na vzorčni fotodetektor.

Umerjanje in meritev

Umerjanje dvožarkovnega fotometra izvajamo tako, da izberemo valovno dolžino z ustreznim filtrom, obe kiveti napolnimo s slepim vzorcem, ki je običajno topilo, in umerimo instrument na 0 ali 100 % T. To naredimo tako, da drsnik na levi strani naravnamo na vrednost 100 % T. Desni drsnik premikamo toliko časa, da dobimo na obeh straneh enaki napetosti. Kadar sta napetosti na obeh straneh enaki, ni fototoka in galvanometer pokaže vrednost nič.

Meritev izvajamo tako, da v referenčni kiveti pustimo slepi vzorec, vzorčno kiveto pa napolnimo s standardno raztopino ali z vzorcem, kar povzroči odklon galvanometra, ker napetosti na obeh straneh galvanometra nista več enaki. Padec napetost na desni strani povzroči zmanjšana prepustnost svetlobe standardne raztopine in vzorcev.

Razliko v napetosti izravnamo s premikanjem levega drsnika, dokler na galvanometru spet ne dobimo vrednosti 0.

Sprememba napetosti oziroma fototoka je premosorazmerna spremembi prepustnosti svetlobe v vzorčni kiveti, ki jo neposredno odčitamo na levem čitalcu. Instrument ima poleg skale, ki prikazuje T %, tudi skalo z vrednostmi absorbanc.

Značilnost dvožarkovnih optičnih instrumentov

Pri **dvožarkovnih instrumentih** (fotometrih, spektrometrih, fluorimetrih ...) dobimo dva žarka s pomočjo polprepustnega ogledala ali pa s pomočjo **prekinjevalca žarka** ali **čoperja**. Le redko imajo dvožarkovni instrumenti dva izvora svetlobe. V tem primeru bi potrebovali tudi dva »power supplyja«.

Meritve z dvožarkovnimi instrumenti so točnejše, ker instrument odšteva žarek, ki gre skozi slepi vzorec od žarka, ki gre skozi vzorec. S tem se izognemo napakam zaradi nihanja napetosti izvora svetlobe.

SPEKTROMETER (SPEKTROFOTOMETER)

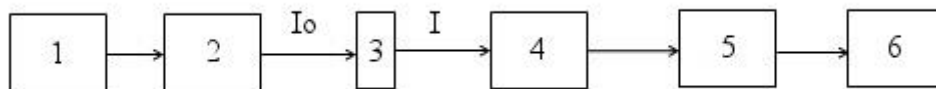
Bistvena razlika med fotometri in spektrometri je v **elementu za izbiro valovne dolžine**. Fotometri imajo **optične filtre**, spektrometri pa **monokromator**. Spektrometri vsebujejo (poleg monokromatorja) tudi filtre, ki se samodejno vklapljajo in nimajo vloge elementa za izbiro valovne dolžine. »Vidni« spektrometri merijo intenziteto vidne svetlobe, UV-vidni ali angl. »UV-visible« spektrometri pa merijo intenziteto svetlobe v večjem spektralnem območju: vidno in UV-svetlobo.

Spektrometre delimo na:

1. enožarkovne: vidne in UV-vidne,
2. dvožarkovne: vidne in UV-vidne.

Enožarkovni spektrometer

Osnovni sestavni deli enožarkovnega spektrometra so: zvezni izvor svetlobe, monokromator, kiveta, fotodetektor, ojačevalec in čitalec.



Slika 3 - 4 Blok shema enostavnega enožarkovnega spektrometra

Legenda:

- | | | |
|-----------------------------|--------------------|---------------|
| 1 ... zvezni izvor svetlobe | 2 ... monokromator | 3 ... kiveta |
| 4 ... fotodetektor | 5 ... ojačevalec | 6 ... čitalec |

Spektrometri, namenjeni merjenju **vidne in UV-svetlobe** (UV-vidni), imajo dva izvora svetlobe, npr. halogensko in devterijevo žarnico. Spodnja meja valovnih dolžin pri takšnih spektrometrih je 190–210 nm, zgornja meja pa 800–1000 nm.

Imajo lahko vstavljivo ali **pretočno kiveto (pretočni spektrometri)**.



Slika 3 - 5 Vstavljiva kiveta v enožarkovnem spektrometru

http://www.solunetti.fi/tiedostot/kuvat_solubiologia/Virtuaalilaboratorio/Laitteistot/spektrofotometri_auki_p.jpg (11. 12. 2010)



Slika 3 - 6 *Pretočna kiveta s sesalno cevko v enožarkovnemu spektrometru*
<http://www.spectrophotometer-lab.com/images/flow-through-cell.jpg> (12. 12. 2010)

Novejši izpopolnjeni spektrometri

Večina novejših spektrometrov ima kot detektor fotopomnoževalko, v monokromatorju imajo uklonsko mrežico, čitalci pa so digitalni.

Vsi današnji spektrometri imajo poleg osnovnih sestavnih delov še **zaslon** in **dodatne filtre**.

Zaslon preprečuje vdor zunanje svetlobe na detektor. S tem se izognemo možnosti, da bi detektor pregorel, če odpremo pokrov instrumenta pred prostorom za kiveto.

Dodatni filtri so nameščeni pred in za monokromatorjem. Njihova vloga je, da še bolj selekcionirajo izbrano valovno dolžino in absorbirajo moteča sevanja. Zelo pomemben je filter za izvorom svetlobe, ki absorbira IR-del svetlobe in s tem prepreči segrevanje instrumenta.

Dodatna ogledala zagotavljajo spektrometrom daljšo optično pot svetlobe in s tem tudi večjo čistost izbrane valovne dolžine.

Kiveta (pretočna ali običajna) je lahko **termostatirana**, kar je pomembno pri merjenju aktivnosti encimov.

Kot dodatek imajo lahko spektrometri še **rekorder** in **tiskalnik**.

Nekateri spektrometri **avtomatsko dozirajo vzorec** in **reagent**, funkcije pa so povezane z računalnikom.

Maksimalna **čistost** valovnih dolžin pri izpopolnjenih spektrometrih je **0,05–0,10 nm**.



Slika 3 - 7 Izpopolnjeni dvožarkovni spektrometer in notranji del s kivetama.

Umerjanje in meritve

Spektrometra (enožarkovni in dvožarkovni) delujeta po enakem principu kot fotometra (enožarkovni in dvožarkovni). Bistvena razlika med spektrometrom in fotometrom je v čistosti valovnih dolžin, ki jih merimo. Tudi umerjanje in meritve vzorcev poteka pri spektrometru podobno kot pri fotometru (umerjanje s slepim vzorcem na vrednost 0, meritve standardne raztopine in meritve koncentracije vzorcev s pomočjo faktorja).



PONOVIMO

1. Primerjajte sestavo in delovanje enožarkovnega fotometra z dvožarkovnim.
2. V katerem primeru je meritev s fotometri možna in velja Beer-Lambertov zakon, kljub temu da svetloba, ki jo merimo, ni monokromatska?
3. Primerjajte sestavo tvorca signala fotometra s tvorcem signala spektrometra.
4. Naštejte in opišite sestavne dele izpopolnjenega spektrometra.
5. Opišite umerjanje fotometra (spektrometra) in meritve koncentracije.
6. Razložite prednost dvožarkovnih instrumentov pred enožarkovnimi.
7. Ugotovite, po čem bi spoznali, da je instrument dvožarkoven.
8. Primerjajte vlogo filtrov pri fotometru s filtri spektrometra.
9. Zakaj uporabljamo pri UV-vidnem spektrometru dva izvora svetlobe?
10. Na osnovi dvožarkovnega fotometra predvidite sestavo dvožarkovnega spektrometra, narišite njegovo blok shemo in napišite njegovo delovanje.

ABSORBIMETRIČNE MERITVE VZORCEV V PLINASTI OBLIKI



MERJENJE KONCENTRACIJE KOVINSKIH IONOV

Razložite izraze atom, molekula in ion. Ali najdemo v naravi atome v prosti obliki? Kako bi iz kationov dobili atome? Analizirajte izraze atomska spektrometrija, atomska absorpcijska spektrometrija, atomska fluorescenčna spektrometrija in atomska emisijska fotometrija. Na osnovi poznavanja pojmov absorpcijska, fluorescenčna in emisijska sklepajte, kaj bi lahko merili v okviru postopkov atomske spektrometrije in kako bi izvajali posamezne meritve.



http://matura.cosmopolitan.si/media/cache/Photo/2010/03/09/atom_gallery_image.jpg
(5. 7. 2010)

ATOMSKA SPEKTROMETRIJA

Atomi kovin imajo lastnost, da v plinastem agregatnem stanju **absorbirajo**, **emitirajo** ali **fluorescirajo** energijo v obliki elektromagnetnega valovanja (UV-žarke, vidno svetlobo ali x-žarke).

Posamezni elementi, ki so v atomarnem stanju, kar pomeni da niso ionizirani, absorbirajo, emitirajo ali fluorescirajo **omejeno število** za njih **značilnih** valovnih dolžin.

Pri molekulah ali bolj kompleksnih ionih opazimo širše spektre valovnih dolžin zaradi dodatnih vibracijskih in rotacijskih kvantnih stanj teh spojin. V primeru meritev atomov (v plinastem stanju) je potrebno vzorec dobro atomizirati.

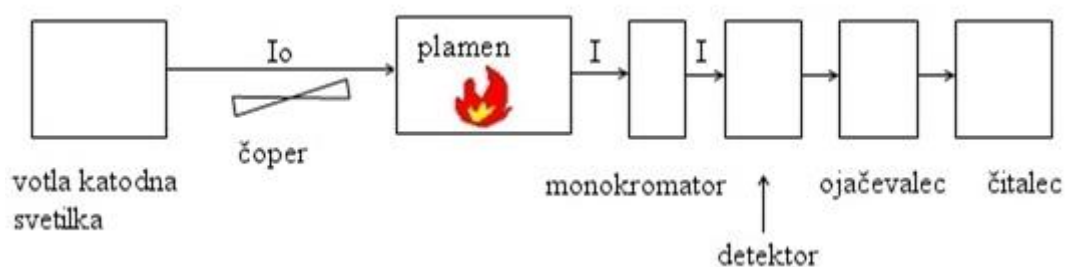
Atomsko spektrometrijo delimo na:

1. atomsko **absorpcijsko** spektrometrijo,
2. atomsko **emisijsko** fotometrijo,
3. atomsko **fluorescenčno** spektrometrijo.

Metode so hitre, specifične in občutljive. Pri vseh treh metodah se molekule in ioni v vzorcu, ki je v tekoči obliki, pod vplivom visoke temperature razgradijo do atomov - atomizirajo.

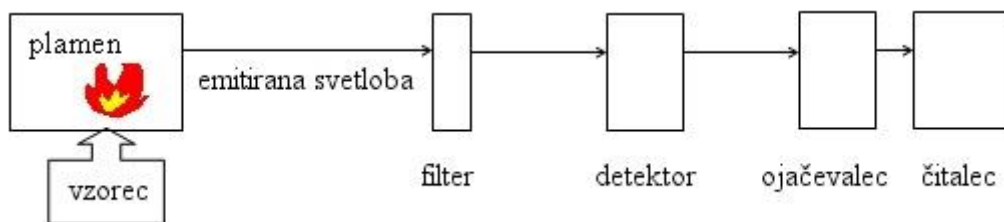
Merimo lahko absorbanco, emisijo ali fluorescenco nastalih atomov, ta pa je prenosoraz-merna koncentraciji molekul oz. ionov v tekočem vzorcu.

Instrument, ki temelji na **atomske absorpcijske spektrometriji** in meri absorbanco atomov v plamenu, je **atomske absorber** ali **atomske absorpcijske spektrometer**.



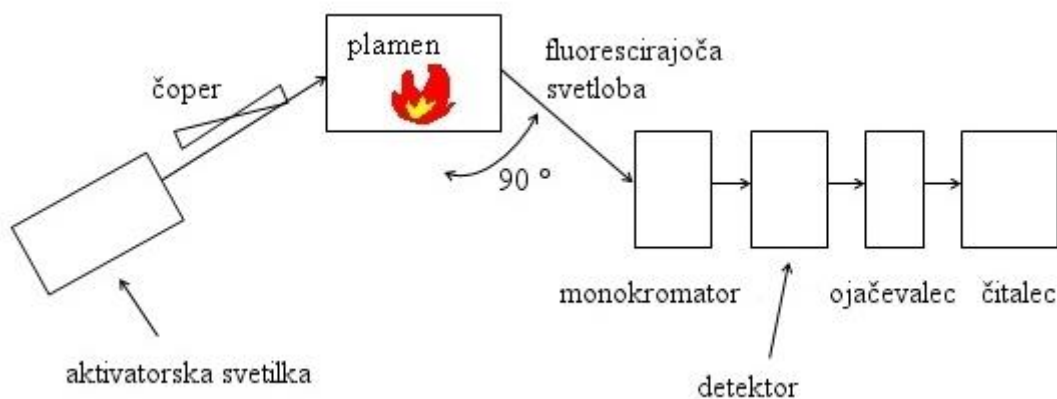
Slika 3 - 8 Blok shema atomskega absorberja

Instrument, ki temelji na **atomske emisijski fotometriji** in meri emisijo atomov v plamenu, je **atomske emisijski fotometer** ali **plamenski fotometer**.



Slika 3 - 9 Blok shema atomskega emisijskega fotometra (plamenskega fotometra)

Instrument, ki temelji na **atomske fluorescenčni spektrometriji** in meri **fluorescenco** atomov v plamenu, je **atomske fluorescenčni spektrometer**.



Slika 3 - 10 Blok shema atomskega fluorescenčnega spektrometra

ATOMSKA ABSORPCIJSKA SPEKTROMETRIJA

Atomi imajo lastnost, da absorbirajo svojo **lastno svetlobo**. Na tem principu je zasnovana **atomska absorpcijska spektrometrija**.

Z atomsko absorpcijsko spektrometrijo merimo koncentracijo dvovalentnih in trovalentnih **kationov** (kalcijeve, železove, magnezijeve, bakrove ...). Merimo lahko tudi koncentracijo enovalentnih litijevih ionov.

Vzorec, ki ga želimo analizirati, je v tekoči obliki, v tekočini pa ni prostih atomov, temveč so molekule in ioni.

Kationi v tekočinah niso sposobni absorbirati svoje lastne svetlobe, zato moramo vzorec, če ga želimo meriti z atomsko absorpcijsko spektrometrijo, atomizirati. Atomizacija lahko poteka v **plamenu** (s toplotno energijo) ali **neplamensko** (s segrevanjem z električnim tokom oz. z električno energijo).

Primer **atomizacije** Ca^{2+} ionov: $\text{Ca}^{2+} \xrightarrow{\text{energija}} \text{Ca}^0$ - absorbira svetlobo
ion atom (nima naboja)

Med segrevanjem v plamenu ali pod vplivom električnega toka nekaj atomov tudi preide v višji energetske nivo (vzbujeno stanje), vendar vzbujeni atomi niso sposobni absorbirati svetlobe, temveč le **nevzbujeni**.

Svetloba določene valovne dolžine, ki jo pošljemo v razpršene **atome**, se na **nevzbujenih** atomih absorbira in merimo njihovo **absorbanco**. Absorbanca atomov je premo sorazmerna koncentraciji kationov v vzorcu.

ATOMSKI ABSORBERJI

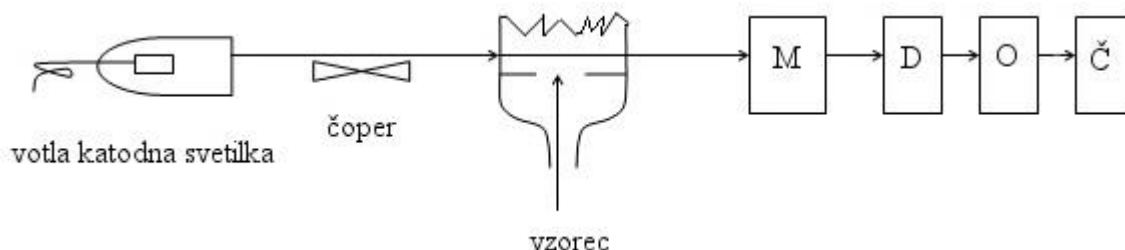
Instrumenti, ki delujejo na principu atomske absorpcijske spektrometrije, se imenujejo **atomske absorpcijske spektrometrije** ali skrajšano **atomske absorberji**. Glede na način atomizacije ločimo dve vrsti atomskih absorberjev: plamenski in neplamenski atomski absorberji. Neplamenski atomski absorberji so novejši.

Atomski absorberji (plamenski ali neplamenski) so lahko enožarkovni ali dvožarkovni. Prednost dvožarkovnih atomskih absorberjev je, da se odstrani vpliv nihanja napetosti izvora svetlobe.

Nekateri atomski absorberji vsebujejo še dodatno devterijevo žarnico.

Enožarkovni plamenski atomski absorber

Vsi enožarkovni plamenski atomski absorberji vsebujejo izvor svetlobe (votla katodna svetilka), prekinjevalec žarka, gorilnik, monokromator, detektor in čitalec. Prekinjevalec žarka je potreben zaradi odstranitve vpliva zunanje svetlobe.



Slika 3 - 11 Shema enožarkovnega plamenskega atomskega absorberja

Legenda:

M ... monokromator
 D ... detektor
 O ... ojačevalec
 Č ... čitalec

Delovanje

Vzorec razpršimo v plamen. Topilo izpari, organske snovi zgorijo, anorganske pa se atomizirajo. V plamen pošljemo svetlobo, ki ima črtasti spekter. Določen del svetlobe se na atomih, ki so v osnovnem stanju, absorbira, preostanek pa gre naprej na monokromator in detektor. Merimo prepuščeno svetlobo, ki jo instrument preračuna v absorbanco. Absorbanca je premosorazmerna koncentraciji kationov v vzorcu.



Slika 3 - 12 Prikaz absorpcije svetlobnega žarka na nevzbujenih atomih v plamenu

Več kot 95 % atomov v plamenu je v nevzbujenem stanju, v vzbujenem pa le do 5 %. Majhen del vzorca v plamenu ostane tudi v molekularnem stanju.

Zaradi lažjega razumevanja predstavljajo neobarvani atomi na sliki 3 - 12 atome v nevzbujenem stanju, obarvani pa atome v vzbujenem stanju.

Le atomi v **nevzbujenem stanju** so sposobni **absorbirati** svetlobo, medtem ko atomi v vzbujenem stanju ob prehodu nazaj na osnovno stanje sevajo različne valovne dolžine, ki motijo pri meritvah. Zato mora biti monokromator nameščen za plamenom in ne pred njim.



Slika 3 - 13 Atomi absorpcijski spektrometer

http://img.directindustry.com/images_di/photo-g/flame-atomic-absorption-spectrometer-f-aas-192868.jpg (2. 7. 2010)

Umerjanje in meritev

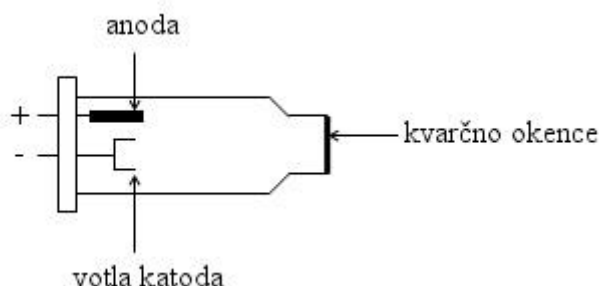
Plamenski atomski absorber **umerimo** podobno kot spektrometer, saj je atomska absorpcijska spektrometrija **absorbimetrična metoda**. Potrebno je izbrati pravilno votlo katodno svetilko in preveriti njeno jakost, naravnati širino rež monokromatorja, izbrati točno valovno dolžino, naravnati temni tok na nič in s slepim vzorcem naravnati instrument na 100 % prepustnost in koncentracijo na 0. Instrument umerimo s standardno raztopino in šele nato lahko začnemo z merjenjem koncentracije vzorcev.

Izvor svetlobe

Valovno območje svetlobe, ki ga atomi absorbirajo, mora biti širše od valovnega območja izbrane valovne dolžine. Če bi bilo obratno, bi se premalo vpadne svetlobe absorbiralo in Beer-Lambertov zakon ne bi veljal. Zato mora biti optična čistost vpadne valovne dolžine zelo velika - pod 0,05 nm oziroma bolj natančno, valovno območje mora biti 0,002 nm. Ker z nobenim monokromatorjem iz zvezne svetlobe ne moremo izolirati tako čiste valovne dolžine, uporabljamo črtaste izvore svetlobe.

Zagotoviti moramo prave valovne dolžine črtastega izvora svetlobe, kar nam omogočajo votle katodne svetilke, ki vsebujejo element, ki ga določamo.

Votla katodna svetilka je steklena cilindrična cev (dolžine 15 cm in premera 5 cm). Cev je vakuumirana in napolnjena z žlahtnim plinom, ki je lahko neon, argon ali helij. Plak v njej je okoli 0,533 kPa (ali po starem 4 mm Hg). To pomeni, da vsebuje relativno malo molekul žlahtnega plina. V cev sta vgrajeni katoda in anoda. Anoda je volframova paličica. Katoda je v obliki votlega cilindra in je sestavljena iz materiala, ki ga določamo, ali pa je ta material nanešen na nek kovinski nosilec. Na koncu steklene cevi je okence, skozi katerega prehaja sevana svetloba. Okenca so iz različnih materialov, odvisno od tega, katere valovne dolžine morajo prepuščati. Za UV-svetlobo morajo biti iz kremenčevega stekla.



Slika 3 - 14 Shema votle katodne svetilke

Pod vplivom napetosti, ki vlada med katodo in anodo, pride do ionizacije molekul žlahtnega plina. Ioni plina, ki so pozitivno nabiti, se pospešeno gibljejo proti katodi, udarijo ob njo in iz nje izbijajo atome. Ti atomi so lahko v osnovnem ali vzbujenem stanju. Vzbujeni atomi se v delčku sekunde vračajo v svoje osnovno energetska stanje in oddajajo svetlobo črtastega spektra. Izbiti atomi se nato odlagajo nazaj na površino katode (zato je katoda votla), nekaj pa jih uide tudi na površino steklene cevi. Zato postane cev po daljši uporabi črna.

Za merjenje koncentracije kalcijevih ionov uporabljamo kalcijevo votlo katodno svetilko, za merjenje koncentracije železovih ionov uporabljamo železovo votlo katodno svetilko, za merjenje koncentracije cinkovih ionov uporabljamo cinkovo votlo katodno svetilko itd. Votle katodne svetilke imajo takšno katodo, ki vsebuje element, ki ga določamo in zato sevajo le tisto svetlobo, ki jo lahko elementi, ki jim merimo koncentracijo, absorbirajo.

Gorivo

Kot gorivo se lahko uporablja:

1. Zmes acetilena in zraka, ki daje temperaturo plamena 2450 °C. To gorivo je primerno za merjenje koncentracije večine elementov, zlasti zemljoalkalijskih kovin.
2. Zmes acetilena in N_2O , ki daje temperaturo plamena 3000 °C. Uporablja se za merjenje koncentracije elementov, kot so: Al, Ti, Si, Be itd.
3. Zmes propana in zraka, ki daje temperaturo plamena 1950 °C. Uporablja se za merjenje koncentracije alkalijskih kovin, ker so le-te nestabilne pri višjih temperaturah.

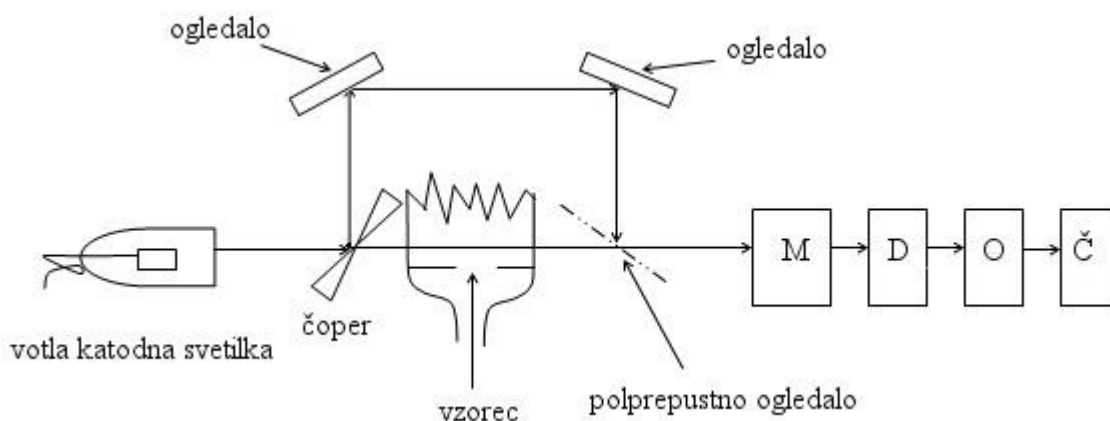
Značilnosti plamena morajo biti takšne, da dosežemo čim boljše pogoje atomizacije elementov. Plamen mora biti homogen, nesvetleč in mora vsebovati točno določeno razmerje posameznih sestavin goriva.

Element za izbiro valovne dolžine je običajno monokromator na uklonsko mrežico.

Detektor je fotopomnoževalka, **čitalec** pa je digitalni zapis.

Dvožarkovni plamenski atomski absorber

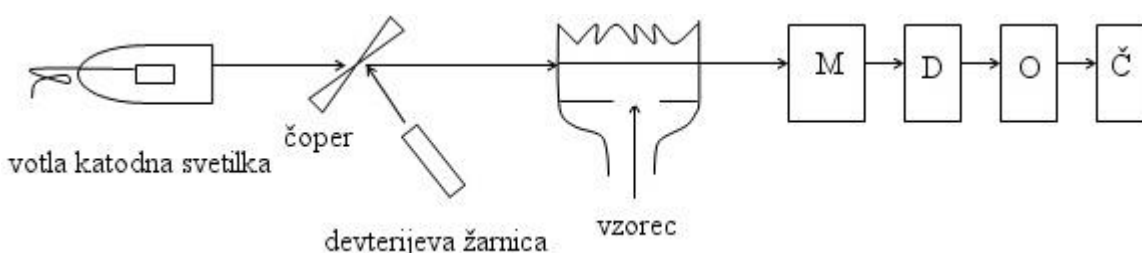
Dvožarkovni plamenski atomski absorber odšteva referenčni žarek od žarka, ki gre skozi plamen, v katerem je vzorec. S tem se izognemo napakam zaradi nihanja napetosti izvora svetlobe.



Slika 3 - 15 Shema dvožarkovnega plamenskega atomskega absorberja

Enožarkovni plamenski atomski absorber z dodatno devterijevo žarnico

Enožarkovni plamenski atomski absorber z dodatno devterijevo žarnico so izdelali zaradi **interferenc** v plamenu. V plamenu so poleg **atomov** prisotne tudi spojine v **molekularnem** stanju, te pa neselektivno absorbirajo svetlobo in tako povzročajo napačne rezultate. Plamenski atomski absorber z dodatno devterijevo žarnico odpravlja omenjene interference.



Slika 3 - 16 Shema enožarkovnega plamenskega atomskega absorberja z dodatno devterijevo žarnico

Neplamenski atomski absorber

Pri neplamenskem atomskem absorberju poteka atomizacija neplamensko - s segrevanjem z električnim tokom. Občutljivost meritev s takšnimi instrumenti je večja, večje pa je tudi sipanje

svetlobe na delcih, ki so prisotni poleg atomov, ki jih merimo. Ti delci so proteini in različne soli. Pri neplamenski atomizaciji je teh delcev več kot pri plamenski.

Za atomizacijo se uporabljajo miniaturne grafitne peči, katerih glavni del je grafitna cev. Ta ima na sredini odprtino premera približno 2 mm, kamor se s pomočjo mikro pipete dovaja vzorec. Že v nekaj sekundah je dosežena temperatura 3000 °C. Po dovajanju vzorca (10 µL–100 µL) se temperatura cevi postopno povečuje.

V **prvi fazi** segrevanja poteka izparevanje tekočine (temperatura je okoli 100 °C).

V **drugi fazi** se temperatura poviša, da poteče sežig oziroma karbonizacija vzorca.

V **tretji fazi** se temperatura še bolj poviša, da poteče atomizacija vzorca.

V **četrti fazi** poteka čiščenje cevi, ki traja približno 5 sekund, temperatura v cevi pa je še za nekaj sto stopinj višja od temperature atomizacije.

Vse to poteka v atmosferi brez kisika, da zaradi prisotnosti zračnega kisika ne bi prišlo do izgorevanja grafita.

Napake pri meritvah z atomskimi absorberji

Atomski absorberji so lahko podvrženi vplivom različnih interferenc v plamenu. Temu se izognemo z uporabo devterijeve žarnice poleg običajne votle katodne svetilke.

Motijo tudi različni anioni v vzorcu, npr. fosfati pri določanju Ca^{2+} in Mg^{2+} . Fosfati se s Ca^{2+} in Mg^{2+} ioni vežejo v kompleks. Temu se izognemo z dodatkom lantanovih ali stroncijevih ionov, ki vežejo fosfate.

Do interferenc pride tudi pri neplamenskih atomskih absorberjih.



PONOVIMO

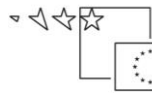
1. Katere snovi lahko merimo z atomskim absorpcijskim spektrometrom?
 2. Primerjajte atomski absorber s spektrometrom.
 3. Narišite blok shemo in ob njej razložite delovanje enostavnega enožarkovnega plamenskega atomskega absorberja.
 4. Opišite merjenje koncentracije kationov s plamenskim atomskim absorberjem.
 5. Zakaj je monokromator pri plamenskem atomskem absorberju za plamenom?
 6. Zakaj mora biti pri atomskem absorberju izvor svetlobe črtasti in ne zvezni?
 7. Razložite delovanje votle katodne svetilke.
 8. Katere napake se lahko pojavljajo pri meritvah z atomskim absorberjem? Kako se tem napakam izognemo?
-



KONZORCIJ ŠOLSKIH CENTROV



REPUBLIKA SLOVENIJA
ŠOLSTVO IN ŠPORT
SŠFKZ



Naložba v vašo prihodnost
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA
Evropski socialni sklad



POVZETEK

Absorbanco in koncentracijo snovi v tekočinah merimo s fotometri in spektrometri. Način merjenja z enožarkovnimi instrumenti se razlikuje od merjenja z dvožarkovnimi. Bistvena razlika med fotometri in spektrometri je v elementu za izbiro določene valovne dolžine. Fotometri in spektrometri lahko vsebujejo vstavljive ali pretočne kivete, kivete pa so lahko tudi termostatisirane. Vsi sodobni fotometri in spektrometri imajo možnost neposrednega merjenja koncentracije, imajo povezavo s tiskalnikom, nekateri pa tudi z računalnikom in rekorderjem. Za merjenje absorbance in koncentracije nekaterih kationov, zlasti tistih, za katere še niso izdelali ionoselektivnih elektrod, uporabljamo atomske absorpcijske spektrometre. Izvori svetlobe pri teh instrumentih so specifične votle katodne svetilke, atomizacija vzorca, ki ga merimo, pa lahko poteka s plamenom ali neplamensko (z električnim tokom).



MEDPREDMETNO POVEZOVANJE

Povezava z medicinsko biokemijo:

- ✚ Merjenje koncentracije sestavin v bioloških vzorcih na osnovi merjenja absorbance (glukoze, beljakovin, holesterola, neproteinske dušikove spojine, encimov idr.).
- ✚ Izdelava umeritvene krivulje in odčitavanje koncentracije vzorca iz umeritvene krivulje.

Povezava z laboratorijsko hematologijo in transfuziologijo:

- ✚ Merjenje koncentracije hemoglobina.
- ✚ Merjenje osmotske rezistence eritrocitov.

Povezava s tujim jezikom:

- ✚ Timski pouk: dijaki s pomočjo slikovnega gradiva (blok sheme instrumenta) poimenujejo instrument za merjenje absorbance in opišejo njegovo delovanje.

Povezava s kemijo, fiziko in IKT:

- ✚ Dijaki z uporabo učbenikov za fiziko in kemijo ter ustreznimi elektronskimi orodji pripravijo predstavitev o atomih, molekulah, ionih, energijskih stanjih elektronov v atomu, absorpcijskih spektrih svetlobe ali obnovijo znanje pri timskem pouku.



KONZORCIJ ŠOLSKIH CENTROV



REPUBLIKA SLOVENIJA
ŠOLSTVO IN ŠPORT
SŠFKZ



Naložba v vašo prihodnost
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA
Evropski socialni sklad

4. INSTRUMENTI ZA MERJENJE EMISIJE, SIPANJA IN REFLEKSIJE (ODBOJA) SVETLOBE



CILJI UČNE TEME

Skupna značilnost instrumentov za merjenje emisije, sipanja in odboja svetlobe je ta, da pri njih ne merimo absorbance. Metode, ki temeljijo na merjenju emisije svetlobe, niso tako pogoste kot absorbimetrične metode. Plamenska fotometrija se uporablja za merjenje koncentracije enovalentnih ionov, vendar se v zadnjih desetletjih bolj redko uporablja, ker je ni mogoče avtomatizirati. Fluorimetrija se uporablja za merjenje snovi, ki so prisotne v nizkih koncentracijah (hormoni, nekateri encimi, druge specifične beljakovine). Z metodami, ki temeljijo na sipanju svetlobe, merimo spremembo motnosti vzorca (npr. turbidimetrično merjenje koncentracije trigliceridov). Reflektometrično metodo oz. metodo »suhe kemije« uporabljamo za dokaz prisotnosti snovi v urinu s testnimi trakovi in tudi za merjenje koncentracije snovi v vzorcih.

Cilji:

- Teorija emisije svetlobe.
- Instrumenti za merjenje emisije svetlobe: plamenski fotometer, fluorimeter, atomski fluorescenčni spektrometer.
- Instrumenti za merjenje sipanja svetlobe na delcih suspenzije: turbidimeter, nefelometer.
- Osnove »suhe kemije« in reflektometer.



KLJUČNE BESEDE: *vzbujeno stanje, emisija, plamenski fotometer, fluorescenca, fluorimeter, suspenzija, turbidimeter, nefelometer, umeritvena krivulja, reflektometer.*

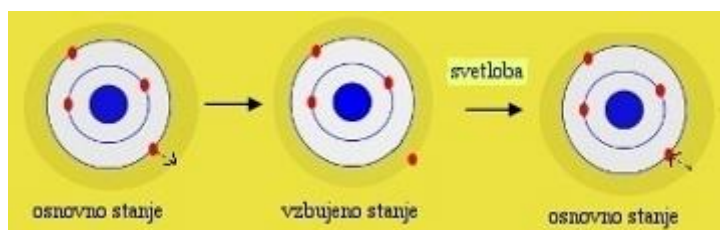
MERJENJE EMISIJE SVETLOBE

Značilnost vseh instrumentov za merjenje emisije svetlobe je, da vzorec pod vplivom dovolj visoke energije seva svetlobo določene valovne dolžine, ki jo merimo. Vzorec je lahko v tekočem stanju, lahko pa ga tudi atomiziramo in merimo sevanje njegovih vzbujenih atomov. Z atomsko emisijsko spektrometrijo običajno merimo koncentracijo enovalentnih ionov, z molekulsko emisijsko spektrometrijo (fluorimetrijo) pa koncentracijo molekul v vzorcu.



MERJENJE KONCENTRACIJE KATIONOV NA OSNOVI MERJENJA EMISIJE SVETLOBE

Ali se vam je že kdaj zgodilo, da je med kuhanjem slana voda prekipela in je polita tekočina obarvala plamen plinskega štedilnika? Kakšna je bila obarvanost plamena? Ali bi znali razložiti pojav? S tem »poskusom« ste nehote dokazali prisotnost natrijevih ionov v politi tekočini (kvalitativna reakcija). Na osnovi poznavanja sestavnih delov instrumentov za optično spektrometrijo in reakcije ionov v plamenu vam ne bo težko razložiti emisijskega merjenja koncentracije kationov.



Slika 4 - 1 Energetska stanja atoma

Teorija emisije svetlobe

Če atomom ali molekulam dovajamo dovolj energije, njihovi zunanji elektroni preidejo v višje energetske stanje, kar imenujemo vzbujeno ali ekscitirano stanje. Ker tako stanje ni stabilno, se elektroni vračajo v eno od bolj stabilnih (nižjih) energetskih stanj ali pa v osnovno energetsko stanje. Pri tem se sprosti energija v obliki svetlobe. Odvisno od vzorca je emitirana (oddana) svetloba v obliki črtastega ali zveznega spektra. Zvezni spekter dobimo, če povzročimo vzbujanje trdnih in tekočih vzorcev, ali pa zapletenih molekul z mnogimi energetskimi stanji, ki so si blizu. Črtasti spekter dobimo, če povzročimo vzbujanje atomov, ki so v plinastem stanju. Za atome v plinastem stanju je značilno, da se obnašajo kot neodvisne enote in zato oddajajo svetlobo, ki vsebuje maloštevilne za njih specifične valovne dolžine.

Vzbujeno stanje snovi lahko izzovemo na več načinov: z obstreljevanjem z elektroni ali z drugimi elementarnimi delci, s segrevanjem z električnim tokom ali v plamenu in z absorpcijo elektromagnetnega valovanja (npr. z UV-svetlobo).

Vzbujanje kovin poteka dosti lažje kot vzbujanje nekovin.

ATOMSKA EMISIJSKA FOTOMETRIJA (PLAMENSKA FOTOMETRIJA)

Plamenska fotometrija se uporablja za analizo alkalijskih in zemljoalkalijskih **kovin**. Alkalijske kovine (Li, Na, K) se v plamenu z lahkoto vzbujajo. Nekoliko težje gre z vzbujanjem zemljoalkalijskih kovin, ker so za njih potrebne **višje temperature plamena**.

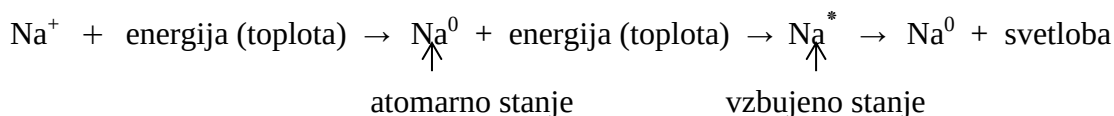
Vsaka kovina daje za njo značilen emisijski črtasti spekter, na osnovi katerega lahko merimo njeno koncentracijo.

Kljub temu da se alkalijske kovine z lahkoto prevedejo v vzbujeno stanje, pride v vzbujeno stanje le 1–5 % vseh enovalentnih atomov v plamenu. Preostanek atomov iste kovine (do 99 %) ostane v nevzbujenem stanju in ni merljiv. Zato plamenska fotometrija ni tako občutljiva metoda kot atomska absorpcijska spektrometrija, pri kateri za razliko od plamenske fotometrije merimo nevzbujene atome.

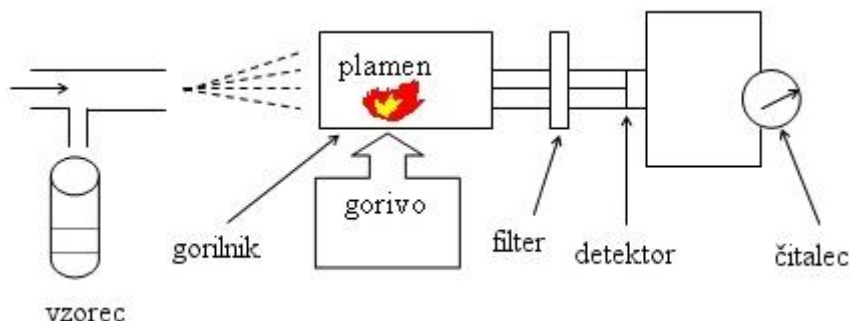
Enostaven atomski emisijski fotometer (plamenski fotometer)

Meritev koncentracije kationov izvajamo tako, da vzorec s pomočjo razprševalca usmerimo v plamen. V plamenu voda upari, organske snovi zgorejo, anorganske snovi pa se najprej **atomizirajo** in nato **ekscitirajo** (preidejo v vzbujeno stanje). Vzbujeno stanje ni stabilno in zato se elektroni vračajo v osnovno energetska stanje, ob tem pa atomi oddajo energijo v obliki črtastega spektra svetlobe.

Prikaz prehoda natrijevih ionov v vzbujeno stanje in oddajanje svetlobe:



Z optičnim filtrom izoliramo eno od valovnih dolžin črtastega spektra emitirane svetlobe (npr. pri natriju je valovna dolžina 589 nm). Intenziteta svetlobe je premosorazmerna koncentraciji natrijevih ionov. Detektor prevede svetlobo v električni tok, ki se ojači, nato pa odčita na čitalcu.



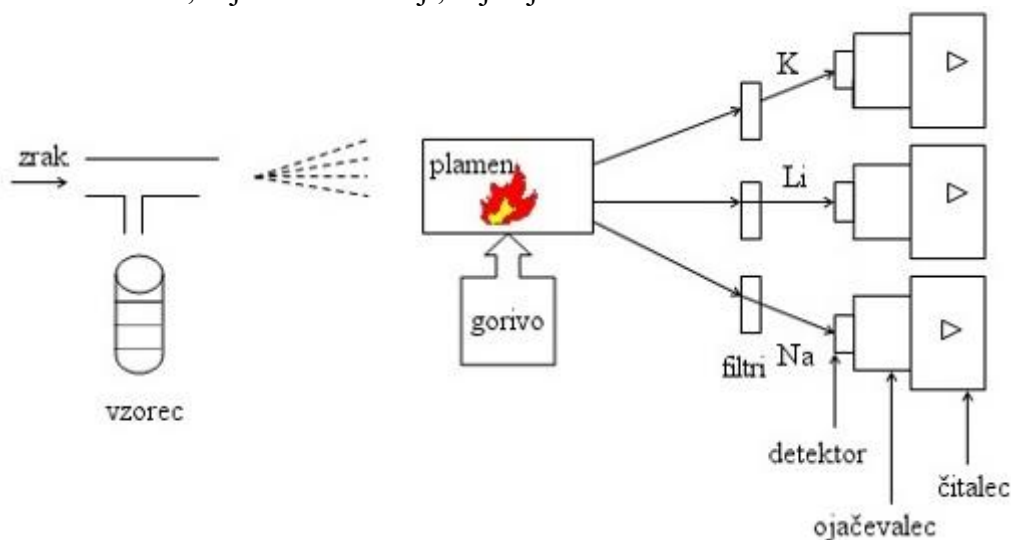
Slika 4 - 2 Shema enostavnega plamenskega fotometra

Zaradi nihanja temperature plamena in dostikrat tudi zaradi neenakomernega dovoda vzorca (odprtina, skozi katero dovajamo vzorec, se lahko delno zamaši) dobimo zelo nezanesljive rezultate. To pomanjkljivost so odpravili z uvedbo bolj izpopolnjenega plamenskega fotometra, imenovanega **plamenski fotometer z internim standardom**.

Plamenski fotometer z internim standardom

Najpogostejši plamenski fotometri z internim standardom so tisti, ki istočasno merijo koncentracijo dveh kovinskih ionov, npr. Na^+ in K^+ . Poleg kalijevih in natrijevih ionov lahko s plamenskim fotometrom merimo tudi koncentracijo litijevih in kalcijevih ionov, redko pa tudi ostale dvovalentne kovinske ione.

Sestavni deli plamenskega fotometra **z internim standardom** so: gorilnik, trije elementi za izbiro valovne dolžine, trije fotodetektorji, trije ojačevalci in čitalci.



Slika 4 - 3 Shema plamenskega fotometra z internim standardom

Umerjanje in meritev

Demineralizirani vodi (slepemu vzorcu), vzorcem in standardom (za kalij in natrij) se dodaja enaka količina internega standarda (običajno instrument sam dozira interni standard). Kot interni standard so izbrali raztopino litijevih ali cezijevih ionov zato, ker teh dveh elementov ni v organizmu in ker se njun emisijski spekter močno razlikuje od spektra natrija in kalija. Standard v normalnem referenčnem območju vsebuje naslednji vrednosti: za kalij 5,0 mmol/L, za natrij 140 mmol/L.

V plamen razpršimo standardno raztopino kalijevih in natrijevih ionov (ki ji je primešan interni standard) in izvedemo kalibracijo.

S slepim vzorcem (zmes demineralizirane vode in internega standarda), ki ga razpršimo v plamen, naravnamo instrument na vrednost 0. Če je umerjanje uspešno, lahko pričnemo z meritvami vzorcev.

V plamen razpršimo zmes vzorca z internim standardom in izmerimo njegovo koncentracijo. Tako kot pri enostavnem plamenskem fotometru, tudi pri plamenskem fotometru z internim standardom v plamenu voda izpari, organske snovi zgorejo, anorganske pa se atomizirajo in deloma ekscitirajo. Ob vračanju elektronov v osnovno energetska stanja atomi oddajo karakteristično svetlobo. Sevana svetloba prehaja skozi ustrezne filtre (litijeva ali cezijeva svetloba skozi filter za interni standard, natrijeva svetloba skozi natrijev filter in kalijeva svetloba skozi kalijev filter).

Svetloba, ki jo oddajajo atomi internega standarda, je konstantna, ker je v vseh raztopinah (slepemu vzorcu, standardu, vzorcih) enaka koncentracija ionov internega standarda. Med meritvami vzorcev in standardov se svetloba internega standarda, ki je bila na začetku naravnana na 0, odšteva od svetlobe, ki jo oddajajo natrijevi in kalijevi atomi. Intenziteta sevanja atomov internega standarda se spremeni le takrat, kadar pride do sprememb v temperaturi plamena ali v doziranju vzorcev. Takrat se proporcionalno spremeni tudi intenziteta sevanja natrijevih in kalijevih atomov. Ker se fototok, ki je posledica sevanja atomov internega standarda, odšteva od fototoka zaradi sevanja kalijevih in natrijevih atomov, ne pride do napačnih rezultatov. Tako se izognemo predhodno omenjenim napakam, kot so napake v doziranju vzorcev in napake zaradi spremembe temperature plamena.

Sestavni deli plamenskih fotometrov

V praksi se uporabljajo le plamenski fotometri z internim standardom.

Kot **gorivo** se lahko uporabljata zmes propana in zraka ali butana in zraka, ki se uporabljata za merjenje enovalentnih ionov. Temperatura plamena je s takšnim gorivom do približno 1930 °C. Za merjenje dvovalentnih ionov se uporablja zmes acetilena in zraka, temperatura plamena s takšnim gorivom pa je okrog 2000 °C (2050–2325 °C).

Razpršeni vzorec (aerosol) gre lahko neposredno v plamen ali pa se najprej zmeša z zmesjo goriva in zraka. Drug način razprševanja se uporablja pri manj vročih plamenih.

Elementi za izbiro valovne dolžine so lahko filtri ali monokromatorji, **fotodetektorji** so običajno fotopomnoževalke, **čitalci** pa so digitalni.



Slika 4 - 4 Plamenski fotometer z internim standardom
za merjenje natrijevih in kalijevih ionov

Plamenski fotometri, ki **avtomatsko dozirajo vzorec**, so opremljeni z nosilcem vzorcev ali »krožnikom«, kamor vstavimo posodice za vzorce. Za doziranje internega standarda imajo napravo, imenovano **dilutor**.

Ponovljivost vzorcev na osnovi nadzora kakovosti »včeraj-danes« je pri dobrih plamenskih fotometrih boljša od 1 % (koeficient variacije ali KV je pod 1 %).

Napake pri meritvah s plamenskim fotometrom

Plamenski fotometer mora biti zaščiten pred vdorom zunanje svetlobe.

Temperatura plamena mora biti **konstantna**, ker je od nje odvisno, koliko svetlobe bo vzorec emitiral. V primeru, da bi bila temperatura plamena previsoka, do česar pa pri plamenskem fotometru ne pride, bi prišlo do **ionizacije** elementa, ki ga merimo. Zunanji elektron bi pobegnil iz atoma in nastali ion ne bi mogel oddajati svetlobe. Konstantno temperaturo plamena zaradi neenakomernega dovoda goriva težko dosežemo.

Pri plamenskih fotometrih lahko pride do **spektralnih napak** in do napak, ki so posledica **lastne absorpcije**.

Do **spektralnih napak** pride takrat, kadar so si sevane valovne dolžine preblizu in izoliramo poleg zelene valovne dolžine tudi tiste, ki so ji najbližje.

Do **lastne absorpcije** pride pri previsoki koncentraciji kationov. Sosednji neekscitirani atomi vzorca absorbirajo svetlobo, ki jo oddajajo vzbujeni atomi. Temu se lahko izognemo z ustrezno razredčitvijo vzorca.



KONZORCIJ ŠOLSKIH CENTROV



REPUBLIKA SLOVENIJA
ŠOLSTVO IN ŠPORT
SŠFKZ



Naložba v vašo prihodnost
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA
Evropski socialni sklad



PONOVIMO

1. Razložite teorijo emisije svetlobe.
2. Razložite delovanje enostavnega plamenskega fotometra.
3. Primerjajte enostaven plamenski fotometer s fotometrom z internim standardom.
4. Pri enostavnem plamenskem fotometru navedite tvorec signala, vhodni pretvornik, procesor in čitalec.
5. Opišite umerjanje plamenskega fotometra z internim standardom in meritev koncentracije vzorca.
6. Zakaj se pri plamenskem fotometru kot interni standard uporabljajo litijevi ali cezijevi ioni?
7. Do česa bi prišlo, če bi bila temperatura plamena pri plamenskem fotometru previsoka?
8. Razložite napake, do katerih lahko pride pri delu s plamenskim fotometrom. Kako bi se tem napakam izognili?

FLUORIMETRIJA

Redke spojine v trdnem, tekočem ali plinastem agregatnem stanju imajo lastnost, da pod vplivom **UV-svetlobe** ali **kratkovalovne vidne** emitirajo svetlobo. To sposobnost so izkoristili za merjenje njihove koncentracije.

Metoda, s katero merimo takšne snovi, se imenuje **fluorimetrija**, instrumenti, s katerimi izvajamo meritve, pa **fluorimetri**. Fluorimetrija ni široko uporabna metoda, saj fluorescira le omejeno število organskih spojin.

Valovna dolžina svetlobe, ki jo določene snovi oddajajo, je lahko enaka valovni dolžini vpadne svetlobe (**resonančna fluorescenca**), ali pa je od nje daljša (**fluorescenca**). Vzrok fluorescence je postopno vračanje vzbujenih elektronov preko več energetskega nivojev v nižja energetska stanja. Fluorescirajoča snov odda svetlobo druge valovne dolžine takoj po obsevanju, to je v nekaj **mikrosekundah**. Ko prenehamo z obsevanjem, fluorescirajoča snov preneha fluorescirati.

Pojav, ko neka snov oddaja svetlobo še nekaj časa potem, ko smo že prenehali z obsevanjem, se imenuje **fosforescenca**.

Močno fluorescirajo:

1. aromatske spojine, npr. benzen, aromatski aldehidi, fenoli itd.;
2. spojine s konjugiranimi dvojnimi vezmi;
3. redke spojine z alifatskimi skupinami.

Nekatere snovi fluorescirajo same po sebi brez predhodne obdelave, druge pa šele po kemični reakciji, kot je oksidacija, redukcija, razgradnja itd.

Znani so primeri merjenja koncentracije oligoelementov v telesnih tekočinah na osnovi vezave z organskim reagentom v kompleks, ki fluorescira. Nastali produkt merimo fluorimet-rično.

Fotoluminiscenca je **splošen izraz**, ki pomeni, da neka snov oddaja svetlobo, če jo obsevamo s svetlobo z dovolj energije. Snovi lahko že po naravi fotoluminiscirajo, lahko pa fotoluminiscenco povzročimo sami.

Fotoluminiscenco opazimo tudi pri redkih **anorganskih spojinah**. Povzroča jo nestehiometrična sestava kristalne mreže, npr. preveč kationov ali premalo anionov in vgrajevanje minimalnih količin tuje snovi (npr. Mn, Cr, Co, Cu in Sn) v kristalne mreže. Take anorganske spojine imenujemo **luminifori**. Večinoma gre za okside, sulfide, selenide, fluoride in sulfate elementov druge skupine periodnega sistema. Te spojine v glavnem fluorescirajo, nekatere pa tudi fosforescirajo.



Slika 4 - 5 Fotoluminiscenca

<http://sl.wikipedia.org/wiki/Luminiscenca>

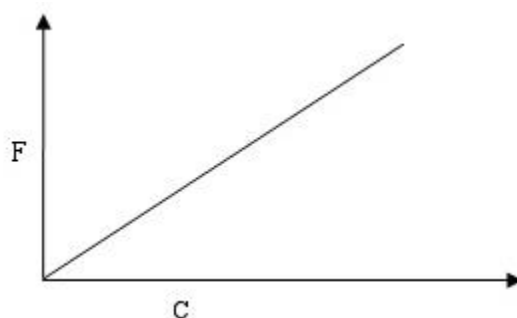
Merjenje fluorescence

Merjenje fluorescence se razlikuje od merjenja absorbance. Večina fluorimetričnih postopkov je 1000-krat do 10000-krat bolj občutljivih od absorbimetričnih metod.

Pri absorbimetriji merimo $\log I_0/I$, pri fluorimetriji pa merimo emitirano svetlobo določene valove dolžine, ki jo izoliramo iz spektra fluorescirajoče svetlobe.

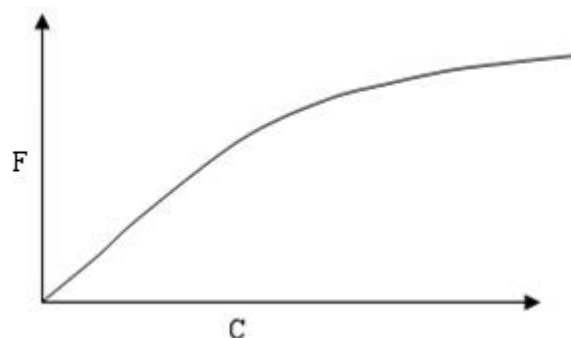
Tudi pri fluorimetričnih analizah lahko razvijemo enačbo, ki kaže razmerje med fluorescenco in koncentracijo snovi, vendar na fluorescenco vpliva toliko faktorjev, da je bolje odčitati rezultate iz umeritvene krivulje.

V primeru zelo razredčenih raztopin, ki imajo vrednost absorbance pod 0,05, je odnos med fluorescenco in koncentracijo linearen. Takrat velja enačba: **$F = K \cdot C$**



Slika 4 - 6 Odvisnost med fluorescenco in koncentracijo pri $A < 0,05$

V primeru višjih koncentracij ni več linearnosti in fluorescenca je nižja od teoretične. Eden od vzrokov nižjih vrednosti fluorescence je lastna absorpcija - prenos emitirane svetlobe na druge nevzbujene molekule.



Slika 4 - 7 Odvisnost med fluorescenco in koncentracijo pri $A \geq 0,05$

Na meritve fluorescence poleg valovne dolžine vpadne svetlobe in koncentracije vzorca vplivajo tudi številni drugi dejavniki, kot so: temperatura, težke kovine, pH vrednost analita, prisotnost raztopljenega kisika in nestabilnost analita. Šele s poznavanjem in upoštevanjem omenjenih vplivov smo lahko prepričani v točnost dobljenih rezultatov.

Vpliv temperature

Pri večini molekul z zviševanjem temperature fluorescenca pada.

Vpliv prisotnosti težkih kovin

Fluorescenca molekul pada v topilih, ki vsebujejo težke kovine, ker te absorbirajo vpadno ali emitirajočo svetlobo.

Vpliv vrednosti pH

Vrednost pH običajno močno vpliva na točnost fluorimetričnih meritev. Če je le mogoče,

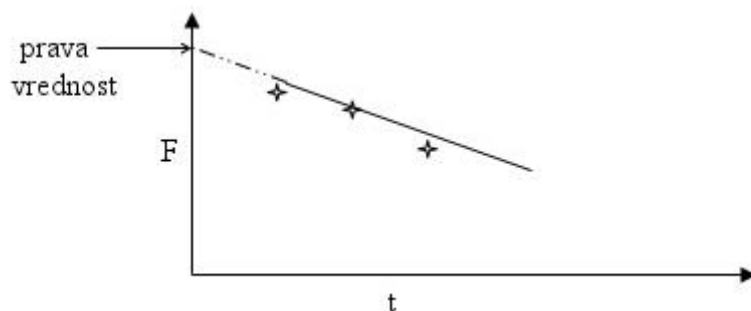
moramo meritve izvajati pri takšni vrednosti pH, da je intenziteta fluorescence konstantna, četudi je občutljivost meritev nekoliko manjša. Na pH so zlasti občutljive aromatske spojine.

Vpliv raztopljenega kisika

Prisotnost raztopljenega kisika v raztopini pogosto zniža fluorescenco snovi, ker se lahko snov oksidira.

Vpliv stabilnosti raztopine

Pogosto opažamo, da po določenem času osvetljevanja z UV-svetlobo intenziteta fluorescence pada. V tem primeru moramo izvesti meritev zelo hitro, meriti čas merjenja in dobljene vrednosti fluorescence v časovnih presledkih vnesti v diagram. Pravo vrednost fluorescence dobimo z ekstrapolacijo točk na čas 0.



Slika 4 - 8 Padanje fluorescence v časovnih enotah

INSTRUMENTI ZA MERJENJE FLUORESCENCE

Fluorescenco merimo s **fluorimetri**. To so instrumenti, ki meritev vzorca izvajajo pod kotom 90° glede na vpadno svetlobo. Delimo jih na enožarkovne in dvožarkovne.

Vsi imajo po dva elementa za izbiro valovne dolžine. Fluorimetri z monokromatorjema se imenujejo tudi **spektrofluorimetri**, fluorimetri s filtri pa se v ožjem pomenu besede imenujejo **fluorimetri**.

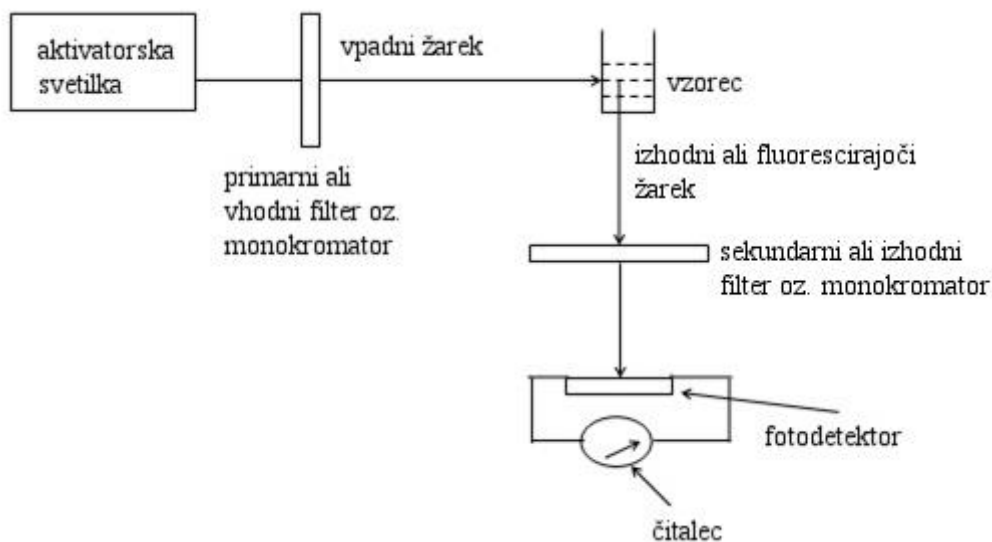
Izvor svetlobe mora imeti večjo intenziteto kot pri absorbimetriji. Najpogosteje se uporablja **ksenonova žarnica**, lahko se uporablja črtasti izvor svetlobe (živosrebrova žarnica) ali laserski izvor svetlobe.

Kiveta pri fluorimetrih je iz kremenčevega stekla z vsemi štirimi prozornimi površinami, **fotodetektor** pa je fotopomnoževalka.

Enožarkovni fluorimeter (spektrofluorimeter)

Enožarkovni fluorimeter meri intenziteto svetlobnega žarka, ki ga oddaja vzorec pod vplivom svetlobe določene valovne dolžine, ki pade na vzorec. Osnovni sestavni deli enožarkovnega

fluorimetra so: izvor svetlobe, dva elementa za izbiro valovne dolžine, kiveta, fotodetektor in čitalec. Fotodetektor je nameščen pod kotom 90° .



Slika 4 - 9 Blok shema preprostega enožarkovnega fluorimetra

Delovanje

Izbrana valovna dolžina, ki jo prepusti element za izbiro valovne dolžine, pade na vzorec in na njem povzroči fluorescenco. Vzorec oddaja svetlobo na vse strani, merimo pa samo svetlobo, ki pade pod kotom 90° glede na vpadni žarek. Fluorescirajoča svetloba prehaja skozi sekundarni filter in se na fotodetektorju pretvori v električni tok. Rezultat odčitamo na čitalcu.

Valovno območje vpadnega žarka mora biti čim ožje, da lahko vpadni žarek aktivira le spojino, ki jo želimo meriti. Običajno spojina oddaja širok pas valovnih dolžin (okoli 200 nm) tako, da izbor izhodnega filtra ni kritičen.

Namesto filtrov lahko uporabljamo vhodni in izhodni monokromator. Meritve s takim instrumentom (spektrofluorimetrom) so točnejše.

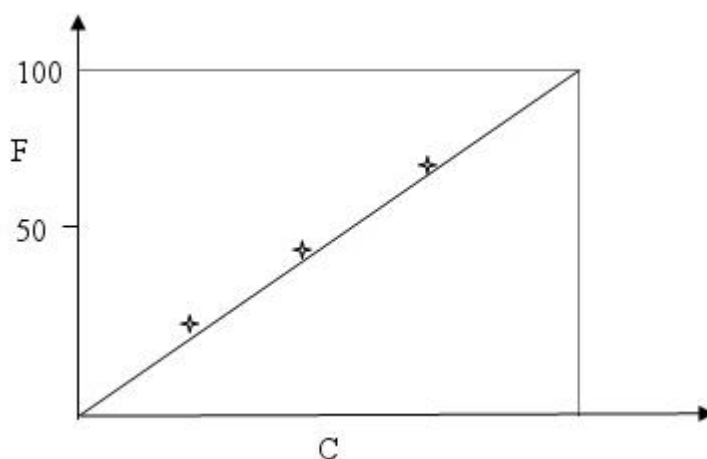
Umerjanje in meritev

Instrument **umerimo** na elektronsko ničlo pri odprtem prostoru za kiveto. Odprt pokrov povzroči, da pade zaslon pred detektor instrumenta in s tem onemogoči njegovo obsevanje s svetlobo. Temni tok naravnamo na 0 pri maksimalni ojačitvi.

Zapremo pokrov prostora za kivete in izmerimo fluorescenco standardnih raztopin in vzorcev. Standardne raztopine uporabimo za izdelavo umeritvene krivulje, iz katere kasneje odčitamo koncentracijo vzorcev.

Umeritvena krivulja

Najvišji standard naravnomo na najvišjo vrednost fluorescence ($F = 100$), ostale standarde pa izmerimo. Dobljene vrednosti vnesemo v diagram in narišemo umeritveno krivuljo.



Slika 4 - 10 Umeritvena krivulja pri fluorimetričnih meritvah

Dvožarkovni fluorimeter (spektrofluorimeter)

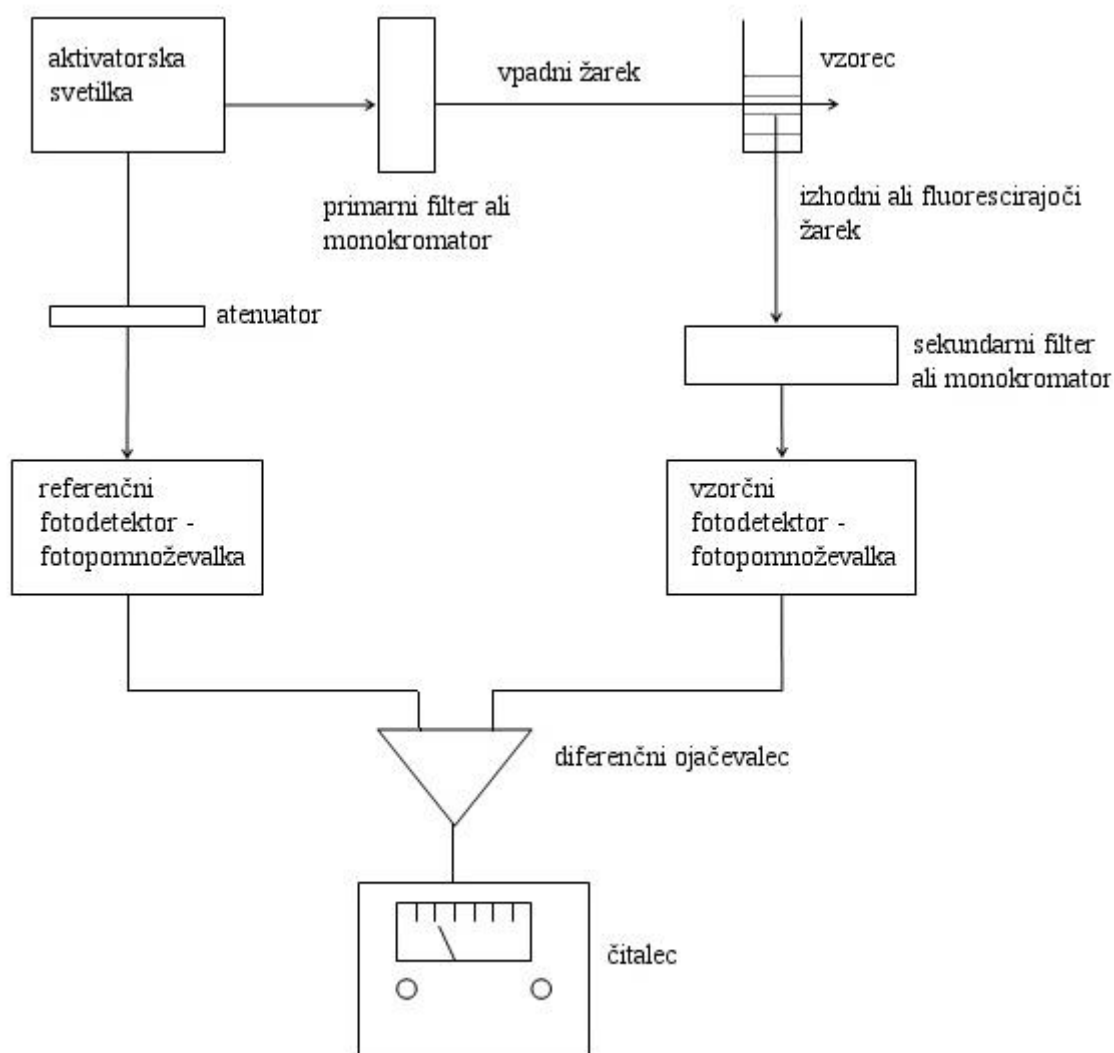
Dvožarkovni fluorimetri nimajo dveh kivet. Za oslabitev primerjalnega žarka imajo slabilec žarka ali atenuator.

Delovanje

Prvi žarek gre skozi element za izbiro valovne dolžine. Žarek izbrane valovne dolžine pade na vzorec in na njem povzroči fluorescenco. Vzorec oddaja svetlobo na vse strani, merimo pa samo svetlobo, ki pade pod kotom 90° glede na vpadni žarek. Fluorescirajoča svetloba prehaja skozi sekundarni filter, se na fotodetektorju pretvori v električni tok in ojači na diferenčnem ojačevalcu.

Drugi žarek (referenčni žarek) ne prehaja skozi element za izbiro valovne dolžine, ampak se direktno oslabi na slabilcu žarka ali atenuatorju (100-krat ali večkrat), tako da je njegova intenziteta približno enaka intenziteti sevanja vzorca. Oslabljeni žarek se na referenčnem fotodetektorju pretvori v električni tok in na ojačevalcu ojači ter odšteje od fluorescirajočega žarka.

Na čitalcu odčitamo rezultat.



Slika 4 - 11 Blok shema dvožarkovnega fluorimetra (spektrofluorimetra)

Atomski fluorescenčni spektrometer

Pri atomskih fluorescenčnih spektrometrih svetloba aktivatorske svetilke povzroči fluorescenco atomov vzorca. Fluorescenco merimo pod kotom 90° glede na vpadni žarek. Absorpcija in fluorescenca potekata na atomih v plamenu ali atomih, dobljenih neplamensko (z električnim tokom). Zato tudi tukaj ločimo plamenske in neplamenske atomske fluorescenčne spektrometre, ki so lahko enožarkovni ali dvožarkovni. Atomski fluorescenčni spektrometri so občutljivejši od atomskih absorpcijskih spektrometrov.



KONZORCIJ ŠOLSKIH CENTROV

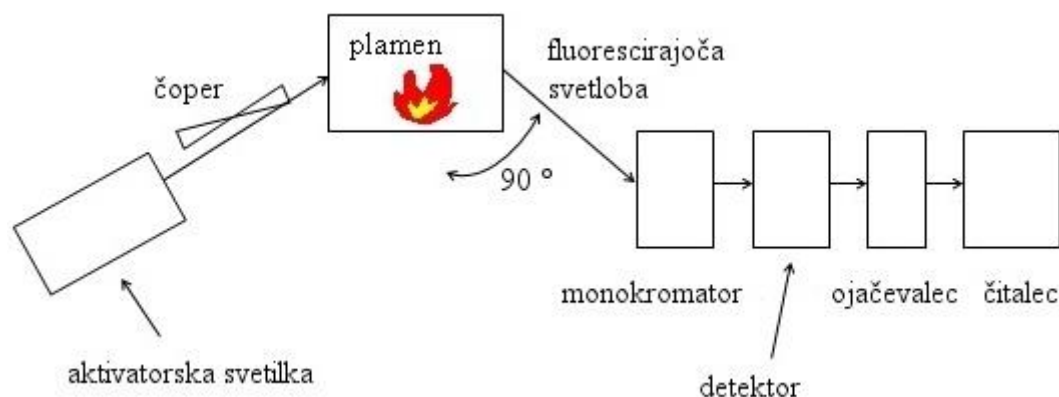


REPUBLIKA SLOVENIJA
ŠOLSTVO IN ŠPORT

SŠFKZ



Naložba v vašo prihodnost
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA
Evropski socialni sklad



Slika 4 - 12 Atomski fluorescenčni spektrometer



PONOVIMO

1. Naštejte instrumente za merjenje emisije svetlobe.
2. Razložite izraze resonančna fluorescenca, fluorescenca, fosforescenca in fotoluminiscenca.
3. Katere organske snovi fluorescirajo in kaj je vzrok fotoluminiscence anorganskih spojin?
4. Kdaj je fluorescenca premosorazmerna s koncentracijo?
5. Navedite vplive na fluorescenco.
6. Poimenujte sestavne dele fluorimetrov in spektrofluorimetrov.
7. Primerjajte enožarkovni fluorimeter (spektrofluorimeter) z dvožarkovnim.
8. Razložite umerjanje fluorimetra in meritev.
9. Ugotovite, zakaj stranici kivete pri fluorimetričnih meritvah ne smeta biti brušeni.
10. Kako moramo ravnati v primeru, kadar fluorescenca po obsevanju pada, da dobimo točno vrednost meritve?
11. Razložite delovanje atomskega fluorescenčnega spektrometra.

MERJENJE SIPANJA SVETLOBE NA DELCIH SUSPENZIJE



MERJENJE KONCENTRACIJE SNOVI NA OSNOVI MERJENJA MOTNOSTI

V urinu ugotovite prisotnost beljakovin z dodatkom vodne raztopine sulfosalicilne kisline. Kakšen je produkt reakcije? Kako bi meritev s sulfosalicilno kislino izvedli kvantitativno?



Slika 4 - 13 *Spektrometer, ki meri koncentracijo snovi na osnovi merjenja motnosti vzorca.*

Rezultat nekaterih **kemijskih reakcij** je nastanek **suspenzije**, npr. kadar obarjamo proteine s sulfosalicilno ali perklorno kislino. Delci v suspenziji absorbirajo, odbijajo in lomijo svetlobo, rezultat pa je zmanjšana intenziteta žarka, ki pride iz suspenzije v primerjavi z vpadnim žarkom.

NEFELOMETRIJA IN TURBIDIMETRIJA

Snovi, ki jih merimo, s specifičnim reagentom pretvorimo v netopno obliko (suspenzijo). Vpadna svetloba se na delcih suspenzije sipa, prepuščeno ali sipano svetlobo pa izmerimo. Intenziteta izmerjene svetlobe je premo sorazmerna koncentraciji vzorca.

Pri **turbidimetriji** merimo **prepuščeni žarek**, pri **nefelometriji** pa merimo **sipano svetlobo** pod kotom. Običajno pri nefelometriji izvajamo meritve pod kotom 90° , ni pa nujno. Kot merjenja je lahko tudi manjši od 90° .

Pri obeh metodah moramo izbrati tako **valovno dolžino**, da bo **sipanje** svetlobe na delcih suspenzije **čim večje**.

Na sipanje svetlobe vplivajo poleg **valovne dolžine** in **števila delcev** (koncentracije) tudi **velikost** in **oblika** delcev ter ostale značilnosti suspenzije, kot so temperatura, pH, koncentracija ionov in stabilnost suspenzije. Na stabilnost suspenzije vpliva čas od priprave do meritve suspenzije.

Nefelometrija je občutljivejša metoda od turbidimetrije in se zato uporablja za merjenje koncentracije **razredčenih** suspenzij, kjer je sipanje svetlobe majhno. Nefelometrično lahko

merimo nizke koncentracije beljakovin v serumu, kot npr. imunoglobuline, komplementni sistem, hormone idr. Te snovi pretvorimo v netopno obliko z imunokemijsko reakcijo.

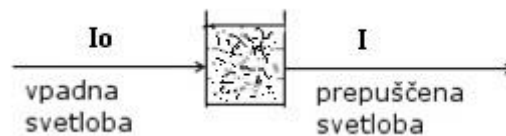
Turbidimetrija se uporablja takrat, kadar je sipanje svetlobe veliko. Turbidimetrično lahko merimo aktivnost serumske lipaze, koncentracijo proteine v urinu in drugo.

INSTRUMENTI ZA MERJENJE SIPANJA SVETLOBE

Turbidimetrične meritve izvajamo s **turbidimetri**, nefelometrične pa z **nefelometri**. Za turbidimetrične meritve lahko uporabljamo običajne fotometre ali spektrometre, nefelometri pa se od teh dveh instrumentov bistveno razlikujejo.

Turbidimeter

Pri **turbidimetru** merimo prepuščeno svetlobo oz. tisto svetlobo, ki se na delcih suspenzije ne sipa. Vpadno svetlobo označujemo z I_0 , prepuščeno pa z I .



Slika 4 - 14 Prehod svetlobe skozi suspenzijo

Izmerjeno vrednost imenujemo motnost ali turbiditeta (S).

$$S = \log I_0/I$$

Motnost (S), ki jo merimo, ni enaka absorbanci, kljub temu da jo odčitamo na isti skali oz. digitalnem zapisu kot absorbanco.

$$S = \log \frac{I_0}{I} \neq \varepsilon \cdot C \cdot l$$

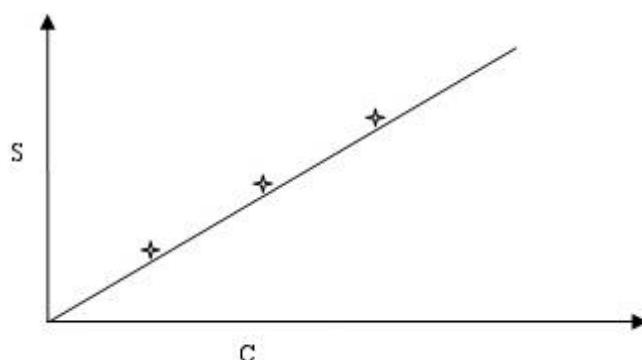
Umerjanje in meritev

Turbidimeter (fotometer, spektrometer) s slepim vzorcem umerimo na vrednost 0.

Če hočemo izmeriti koncentracijo snovi v vzorcu, moramo predhodno izdelati umeritveno krivuljo.

Umeritvena krivulja

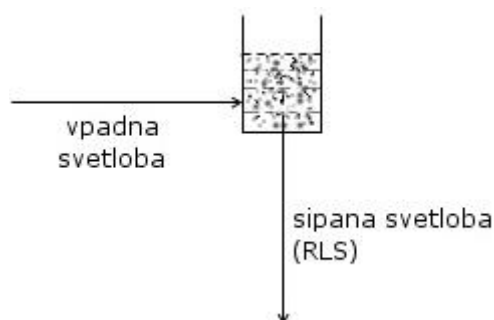
Umeritveno krivuljo izdelamo podobno kot pri absorbimetričnih meritvah. Na seriji standardov padajoče koncentracije izvedemo kemijsko reakcijo (enako kot na vzorcih), nato pa jim izmerimo motnost. Na x-os (absciso) vnašamo koncentracije standardov, na y-os (ordinato) pa izmerjene vrednosti motnosti (S ali $\log I_0/I$). Iz umeritvene krivulje odčitamo koncentracijo izmerjenih vzorcev.



Slika 4 - 15 Umeritvena krivulja pri turbidimetru

Nefelometer

Nefelometer meri sipano svetlobo določene valovne dolžine pod kotom.

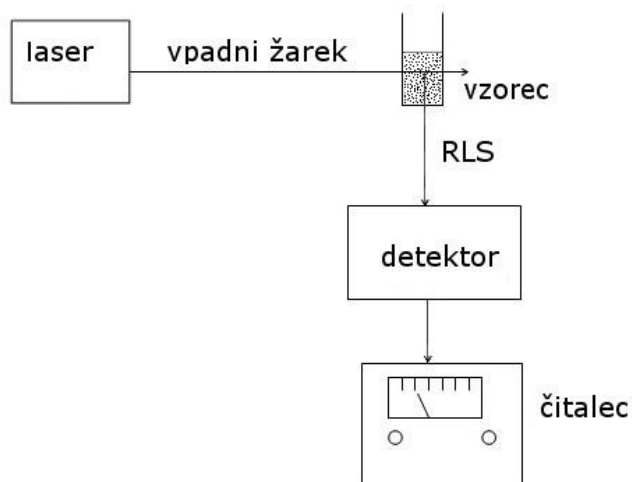


Slika 4 - 16 Sipanje svetlobe na suspenziji pod kotom 90°

Legenda:

RLS ... relativna sipana svetloba ali angl. »relative light scattering«

Nefelometri imajo podobne optične elemente in elektroelemente kot spektrometri, le da je fotodetektor nameščen pod kotom glede na vpadno svetlobo. Svetlobo določene valovne dolžine izberemo s filtrom ali monokromatorjem, merimo pa sipanje svetlobe iste valovne dolžine pod določenim kotom. Zadnja desetletja se vse več uporabljajo **laserski nefelometri**. Laserski žarki so monokromatski, zato pri nefelometrih z laserskimi izvori svetlobe monokromator ni potreben.



Slika 4 - 17 Laserski nefelometer

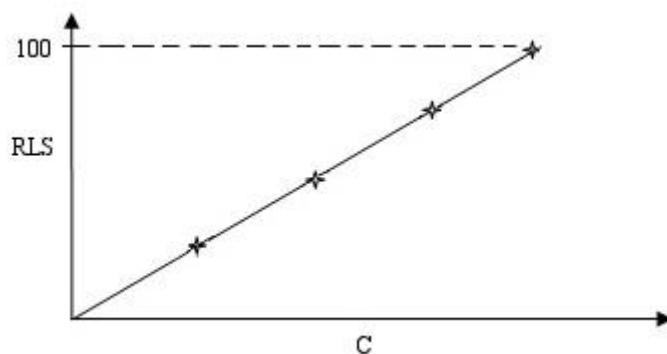
Umerjanje in meritev

Instrument umerimo s slepim vzorcem na vrednost 0. Nato merimo sipanje svetlobe (RLS) **standardov** in **vzorcev**. Če hočemo izmeriti koncentracijo snovi v vzorcu, moramo predhodno izdelati umeritveno krivuljo.

Umeritvena krivulja

Najvišji standard **naravnamo** na **določeno vrednost RLS** (vrednost je lahko 100 ali več), **ostale standarde** pa **izmerimo**. Izmerjene vrednosti RLS in odgovarjajoče koncentracije vnesemo v diagram in narišemo umeritveno krivuljo.

Modernejši nefelometri nam sami izdelajo umeritveno krivuljo iz danih podatkov in jo primerjajo s predhodno izdelano.



Slika 4 - 18 Umeritvena krivulja pri nefelometru



PONOVIMO

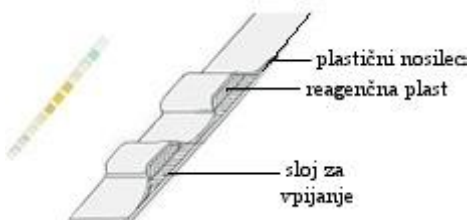
1. Razložite princip nefelometričnih in turbidimetričnih meritev.
2. Primerjajte instrumenta za turbidimetrično in nefelometrično meritev. Narišite njuni blok shemi.
3. Od česa je odvisno sipanje svetlobe?
4. Zakaj nefelometer ne potrebuje dveh elementov za izbiro valovne dolžine?
5. Razložite, kako bi naredili umeritveno krivuljo pri nefelometričnih meritvah.
6. Kako bi umerili nefelometer in kako turbidimeter? V čem je razlika?
7. Ali pri instrumentih za merjenje emisije svetlobe velja Beer-Lambertov zakon? Razložite odgovor.
8. Narišite blok shemi nefelometrov z laserskim in zveznim izvorom svetlobe.

ANALIZA Z REAGENTI, KI SO VEZANI NA TRDNE DELCE - »SUHA KEMIJA«



UGOTAVLJANJE VSEBNOSTI SNOVI V URINU S TESTNIM TRAKOM

Testni trak potopite v urin in vizualno odčitajte parametre, ki jih meri testni trak. Postopek ponovite z urinskim analizatorjem. Kako meri testni trak analite v urinu? Na kakšen način odčitava rezultate urinski analizator?



Slika 4 - 19 Testni trak

Definicija pojma »suha kemija«

Suha kemija je dobeseden prevod iz angleške besede »dry chemistry«.

V medicinskih laboratorijih jo izvajajo že več kot 30 let, saj s testnimi trakovi merijo sestavine v urinu.

Danes lahko z metodo »suhe kemije« merimo nekatere analite tudi kvantitativno in to ne samo v urinu, ampak tudi v serumu (encimi, spojine neproteinskega dušika, proteini, glukoza, bilirubin itd.). Izraz »suha kemija« ni pravilen, ker kemijske reakcije ne potekajo v suhem, ampak je za reakcijo potrebna voda. Kljub temu se je ta izraz uveljavil v biokemijskih laboratorijih.

REFLEKTOMETRIJA

Reagenti pri reflektometričnih meritvah so nanešeni na testne trakove ali testne ploščice. **Testni trakovi** so namenjeni za dokaz pristnosti sestavin v urinu, testne ploščice pa za kvantitativno merjenje sestavin v bioloških vzorcih (serum, urin, likvor).

Ko pride vzorec v stik z reagenti na testnih trakovih ali ploščicah, jih voda iz vzorca raztopi in poteče reakcija med analitom in reagenti. Rezultat kemijskih reakcij so obarvani produkti. Ker intenzitete barve ni mogoče meriti s klasično absorpcijsko fotometrijo, so uporabili metodo, imenovano **refleksijska fotometrija** ali **reflektometrija**.

Princip reflektometrije je, da svetloba ustrezne valovne dolžine obseva obarvani produkt, intenziteta odbite svetlobe pa omogoča kvantitativno določanje analita.

Beseda refleksija izhaja iz latinske besede »*reflexio*« in pomeni »nazaj odbiti«. Svetloba se v nosilcih za reagente (v reagenčni ploščici) **odbija** in **sipa**.

REFLEKTOMETRI

Meritve refleksije izvajamo z **reflektometri**. Reflektometri so posebno oblikovani optični instrumenti, ki imajo podobne optične elemente in elektroelemente kot fotometri. Vsebujejo izvor svetlobe, leče, diafragme, sistem filtrov in detektor.

Meritev

Testni trak, ki smo ga predhodno potopili v urin, vstavimo v reflektometer. Svetloba določene valovne dolžine pade na obarvano reagenčno plast, kjer se absorbira, prepuščeni del svetlobe pa se odbije od plasti testnega traku. Odbito svetlobo zazna detektor, ki jo pretvori v električni signal, ta pa se prenese v mikroprocesor.

Na osnovi odbite svetlobe instrument izračuna vsebnost analita v vzorcu in izpiše rezultat.



Slika 4 - 20 Reflektometer za kvalitativne urinske analize

Testne ploščice za kolorimetrično merjenje so sestavljene iz porazdelitvene plasti, reagenčne plasti in nosilne plasti. Na porazdelitveno plast se nanaša vzorec, v reagenčni plasti potekajo kemijske reakcije, nosilna plast pa služi za odboj svetlobe.

Skozi prozorno plast pade svetlobni žarek v reagenčno plast, kjer se absorbira. Na ta način se izmeri jakost barve reagenčne plasti. Prepuščena svetloba pade na nosilno plast, kjer se odbije in pade na detektor. Detektor pretvori svetlobo v električni tok. Signal se prenese na mikroprocesor, ki izračuna koncentracijo vzorca.

Poleg testne ploščice za kolorimetrično merjenje so v uporabi tudi testne ploščice za potenciometrično merjenje, s katerimi merimo elektrolite. Vsebujejo ionoselektivno elektrodo za enkratno uporabo, z njo pa merimo razliko potencialov med vzorcem preiskovanja in raztopino z znano ionsko sestavo.



PONOVIMO

1. Opišite princip reflektometričnih meritev.
 2. Primerjajte reflektometrično merjenje sestavin v urinu s kvantitativnim določanjem sestavin v bioloških vzorcih.
 3. Kako so sestavljeni reflektometri in kako delujejo?
-



POVZETEK

Nekatere snovi pod vplivom neke energije preidejo v vzbujeno stanje, z vračanjem v osnovno energetska stanje pa sevajo svetlobo določene valovne dolžine, ki jo merimo. Instrumenti, ki merijo emisijo svetlobe, so: plamenski fotometer, atomski fluorescenčni spektrometer in fluorimeter. Atomski fluorescenčni spektrometer in fluorimeter merita fluorescenco, plamenski fotometer pa meri emisijo svetlobe pod vplivom temperature plamena. Instrumenti za merjenje sipanja svetlobe merijo motnost vzorca. Pri fluorimetrični, turbidimetrični in nefelometrični metodi moramo pred meritvijo vzorca narediti umeritveno krivuljo, iz katere kasneje odčitamo koncentracijo. Fluorimetrija in nefelometrija sta primerni metodi za merjenje snovi v nizkih koncentracijah. Metoda »suha kemija« se uporablja za ugotavljanje prisotnosti in koncentracije snovi v vzorcih s testnimi trakovi in ploščicami, na katerih so nanešeni reagenti v trdni obliki. Vzorec pride v kontakt z reagenti na nosilcu, jih raztopi in z njimi reagira. Reakcijski produkt merimo z reflektometri.



MEDPREDMETNO POVEZOVANJE

Povezava z medicinsko biokemijo:

- ✚ Merjenje enovalentnih ionov s plamensko fotometrijo.
- ✚ Fluorimetrično merjenje sestavin v bioloških vzorcih.
- ✚ Turbidimetrično merjenje aktivnosti lipaze in koncentracije trigliceridov.
- ✚ Urinske analize s testnimi trakovi.

Povezava s kemijo:

- ✚ Atomi, ioni in molekule.

Povezava s kemijo, fiziko in IKT:

- ✚ Dijaki z uporabo učbenikov za fiziko in kemijo in z ustreznimi elektronskimi orodji pripravijo predstavitev o emisijskih spektrih svetlobe ali obnovijo znanje pri tiskem pouku.

Povezava s fiziko in IKT:

- ✚ Dijaki z uporabo učbenikov za fiziko in kemijo in z ustreznimi elektronskimi orodji pripravijo predstavitev o fotoluminiscenci ali obnovijo znanje pri tiskem pouku.

Povezava s fiziko:

- ✚ Odboj svetlobe.

5. DRUGE ANALIZNE METODE IN INSTRUMENTI



CILJI UČNE TEME

Elektrolite in nekatere pline (kisik, ogljikov dioksid) merimo z elektroanaliznimi metodami, pri katerih merimo enega od električnih parametrov. Nekatere elektroanalizne metode so že vgrajene oz. jih vgrajujejo v avtomatizirane analizatorje. Z avtomatiziranimi analizatorji oz. skrajšano analizatorji v medicinskih diagnostičnih laboratorijih izvajajo pretežni del preiskav. Prisotni so tako v biokemijskih kot v hematoloških laboratorijih. Preiskave, ki niso množične ali jih ni mogoče avtomatizirati, se še vedno izvajajo posamično oz. »ročno«. Zaradi pomembnosti centrifugiranja, ki se uporablja praktično povsod, so v tem poglavju opisane tudi značilnosti centrifugiranja kot ene od separacijskih metod. Radiokemijske metode so vrsta imunokemijskih metod, ki se izvajajo v specialnih laboratorijih.

Cilji:

- Osnove elektroanaliznih metod in instrumenti, ki se uporabljajo v medicinskih laboratorijih.
- Značilnosti analizatorjev.
- Osnove krioskopskih metod in značilnosti osmometra.
- Osnove centrifugiranja in vrste centrifug.
- Elektroforeza v medicinskih laboratorijih in instrumenti, ki izvajajo elektroforezo.
- Osnove radiokemijskih metod.



KLJUČNE BESEDE: *elektrode, plinske analize, analizatorji, osmometer, centrifugiranje, elektroforeza, radioimunske metode.*

ELEKTROANALIZNE METODE



MERJENJE KONCENTRACIJE SNOVI Z ELEKTROANALIZNIMI METODAMI

Pri pouku fizike ste obravnavali izraze, kot so električni naboj, električni tok, električni potencial, električna prevodnost in elektrokemična celica. Razložite omenjene izraze. Kaj je vzrok prevodnosti vodnih raztopin? Ali demineralizirana voda prevaja električni tok? Katere sestavine ste oziroma bi lahko merili na osnovi merjenja električnih parametrov?



Slika 5 - 1 *Konduktometer*

OSNOVE ELEKTROANALIZNIH METOD

Za merjenje koncentracije nekaterih sestavin so izkoristili električne lastnosti raztopin. Metode, ki merijo enega od električnih parametrov (napetost, upornost, tok), se imenujejo elektroanalizne metode. Z njimi merimo koncentracijo elektrolitov, parcialni tlak plinov (pO_2 , pCO_2) in pH. Lahko merimo tudi aktivnost encimov v primeru, da v reakciji nastaja ali se porablja eden od plinov (CO_2 ali O_2). Sprememba jakosti električnega parametra je premo sorazmerna koncentraciji snovi, ki jo merimo.

Postopke meritev koncentracije elektrolitov z elektroanaliznimi instrumenti lahko tudi avtomatiziramo.

Elektroanalizne metode delimo v tri skupine:

1. metode, ki so odvisne od sorazmerja med koncentracijo snovi in enim od električnih parametrov (napetosti, prevodnosti, toka);

2. metode, pri katerih uporabljamo enega od električnih parametrov za ugotavljanje končne točke titracije;
3. snov, ki jo analiziramo, pretvorimo z električnim tokom v merljivo obliko.

Osnovni element pri elektroanaliznih metodah je **elektrokemična celica** (galvanska ali elektrolitična). Ta je sestavljena iz dveh polčlenov z različnima potencialoma, ki morata biti med seboj povezana tako, da je sklenjen tokokrog.

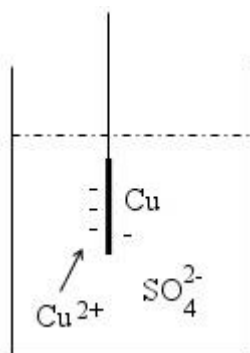
Če hočemo izmeriti električno napetost, potrebujemo:

1. referenčno elektrodo s točno določenim električnim potencialom;
2. indikatorsko elektrodo, s pomočjo katere dobimo razliko električnih potencialov;
3. voltmeter, ki zazna to spremembo.

Nastanek električnega potenciala

Če **kovino** potopimo v raztopino njenih ionov, bodo imeli **kovinski atomi** tendenco oddajanja **elektronov**, ki vstopajo v raztopino. Kovinski **ioni v raztopini** imajo tendenco sprejemanja oddanih elektronov. Ko se elektroni vežejo na kovinske ione, nastanejo kovinski atomi, ki se nalagajo na površino v raztopino potopljene kovine. V bližini kovine se tako ustvari naboj, ki je odvisen od tega, katera reakcija poteka hitreje. Če poteka prva reakcija hitreje, bodo prebitni elektroni na površini kovine tvorili negativni naboj, vzdolž kovinske površine pa bodo razporejeni pozitivni ioni iz raztopine.

Tako nastane električni potencial. Če tak polčlen povežemo z drugim polčlenom, ki ima drugačen potencial, bodo stekli skozi oba sistema elektroni (električni tok). Če ta sistem povežemo z obratno napetostjo, električni tok preneha teči. To je osnovni princip merjenja električne napetosti.



Slika 5 - 2 Bakrova žica, potopljena v raztopino CuSO_4 , oddaja elektrone, bakrovi ioni v raztopini pa jih sprejemajo in se nalagajo na žico.

INDIKATORSKE ELEKTRODE

Elektroanalizni instrumenti merijo vsebnost analita z **indikatorskimi elektrodami**, ki spremenijo **svoj potencial**, kadar jih potopimo v vzorec. Spremembo potenciala lahko izmerimo le takrat, kadar imamo na voljo **referenčno elektrodo**. Referenčna elektroda ima konstanten neodvisen električni potencial, kar pomeni, da se ne spremeni, če jo potopimo v vzorec.

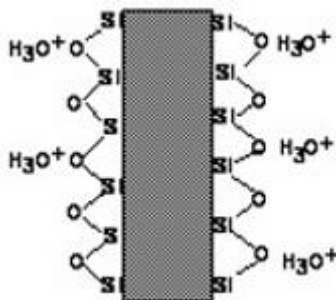
Indikatorske elektrode delimo v dve veliki skupini: kovinske in membranske.

Kovinske indikatorske elektrode se uporabljajo za merjenje kationov. Primer kovinske elektrode je Cu-elektroda, potopljena v raztopino bakrovih ionov (vzorca). Poleg bakrove poznamo še srebrovo, živosrebrovo, kadmijevo, cinkovo in svinčevo elektrodo.

Membranske elektrode se uporabljajo za merjenje koncentracije **ionov** ali **molekul** v vzorcih. Med elektrode za merjenje koncentracije **ionov** prištevamo **pH-elektrodo** in **ionoselektivne elektrode**. Med elektrode za merjenje koncentracije **molekul** prištevamo plinske in encimske elektrode.

pH-elektroda

pH-elektroda vsebuje posebno steklo, ki reagira na spremembo pH na ta način, da se spremeni njen potencial. Potencial povzroči vezava oksonijevih ionov na površino stekla.



Slika 5 - 3 Vezava oksonijevih ionov na stekleno membrano steklene elektrode

Celica za merjenje pH je sestavljena iz **referenčne** (kalomelove) in **indikatorske** (steklene) elektrode, ki sta povezani z voltmetrom. Merimo razliko potencialov med elektrodama ali napetost, ki je prenosorazmerna spremembi pH.

Rezultat odčitamo na analognem ali digitalnem čitalcu. Pred tem moramo pH-meter umeriti z raztopino **standarda**, ki ima točno določen pH, ta pa mora biti **blizu vrednosti pH raztopin**, ki jih merimo.



Slika 5 - 4 pH-meter

pH-metri za merjenje pH krvi delujejo na enakem principu kot običajni pH-metri, le da so prirejeni za merjenje pH majhnih vzorcev. Kri iz brizge vsrkamo v kapilaro, ki jo sestavlja steklo, občutljivo na spremembo pH. Meritve izvajamo **anaerobno**. Sistem je termostatisan na 37 °C, da so ohranjeni isti pogoji kot v organizmu; pH je namreč odvisen od temperature.

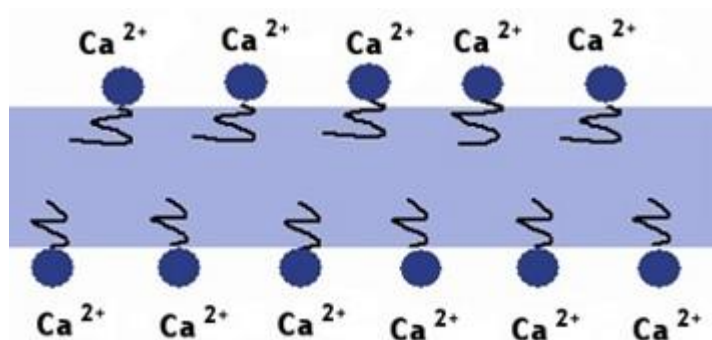
Ionoselektivne elektrode (ISE)

Ionoselektivne elektrode uporabljamo za merjenje koncentracije anionov in kationov v tekočinah.

Princip delovanja ionoselektivnih elektrod je podoben kot pri stekleni elektrodi za merjenje vodikovih ionov.

Imeti moramo **ionospecifično membrano**, ki **veže** točno določene ione, in **referenčno elektrodo**, na osnovi katere lahko izmerimo razliko potencialov oz. napetost. Na obeh straneh membrane sta raztopini enakih ionov, vendar z različnimi koncentracijami. Na eni strani je standardna raztopina ionov določene koncentracije, na drugi pa raztopina ionov, ki jih merimo (vzorec). Kadar membrana ločuje dve raztopini (vzorec in standardno raztopino) z različno koncentracijo **enakih** ionov, se vzdolž nje razvije električni potencial, ki ga merimo.

Membrana je lahko kristalinična (sestavljena je iz soli, ki precipitirajo ione iz raztopine) ali nekristalinična. Nekristalinična membrana je lahko steklena, tekočinska, ali pa tekočinska, ki je sestavni del nekega trdnega polimera.



Slika 5 - 5 Ionospecifična membrana, ki veže kalcijeve ione

Primeri anionskih ionoselektivnih elektrod:

- elektroda za merjenje CN^- ,
- elektroda za merjenje Cl^- ,
- elektroda za merjenje F^- ,
- elektroda za merjenje SCN^- .

Primeri kationskih ionoselektivnih elektrod:

- elektroda za merjenje K^+ - vsebuje membrano iz antibiotika valinomicina,
- elektroda za merjenje Na^+ ,
- elektroda za merjenje Ca^{2+} - vsebuje tekočo membrano,
- elektroda za merjenje Cu^{2+} ,
- elektroda za merjenje Ag^+ ,
- elektroda za merjenje NH_4^+ ,
- elektroda za merjenje Pb^{2+} .

Valinomicin so sprva uporabljali za zdravljenje infekcijskih bolezni. Zaradi stranskega učinka znižanja koncentracije kalijevih ionov v organizmu so ga prenehali uporabljati, njegove značilnosti pa so kasneje izkoristili za sestavo elektrode, ki je selektivno merila koncentracijo kalijevih ionov.

Ca-elektroda je občutljiva tudi na K^+ , Na^+ in Mg^{2+} (na K^+ in Na^+ je 1000-krat manj občutljiva, na Mg^{2+} pa 50-krat manj v primerjavi z občutljivostjo na Ca^{2+} ione).

PLINSKE ANALIZE KRVI

Pri plinski analizi krvi izmerimo najmanj **tri parametre sočasno**: pH, parcialni tlak ogljikovega dioksida ($p\text{CO}_2$) in parcialni tlak kisika ($p\text{O}_2$).

Pred vsako serijo analiz moramo instrument umeriti. pH umerjamo z dvema pufroma različnih koncentracij v fiziološkem območju, parcialni tlak plinov pa s po dvema plinoma različnih parcialnih tlakov. Ker so parcialni tlaki plinov in vrednosti pH odvisne od temperature, mora biti instrument termostatisiran na $37\text{ }^\circ\text{C}$.

Za vsako plinsko preiskavo imamo v instrument vgrajeno **specialno elektrodo** tako, da za analizo zadostuje že majhen vzorec krvi.

pCO₂-elektroda

$p\text{CO}_2$ -elektroda meri parcialni tlak ogljikovega dioksida ($p\text{CO}_2$) v krvi. Zgrajena je iz pH-elektrode, iz membrane, prepustne za CO_2 in razredčene raztopine bikarbonatnega pufru. Membrana obdaja zunanjo površino pH-elektrode, vmes pa je tanek film pufru.

Ko pride aspirirani vzorec krvi v stik z membrano, prepustno za CO_2 , CO_2 difundira iz krvi skozi membrano v pufer in mu zniža pH.

Reakcija ogljikovega dioksida z vodo v pufru: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$

Steklena elektroda reagira na spremembo pH pufru, ta pa povzroči spremembo napetosti.

Sprememba pH-vrednosti pufru oz. sprememba napetosti je premosorazmerna parcialnemu tlaku CO_2 ($p\text{CO}_2$) v krvi.

Čitalec je umerjen tako, da izpiše rezultat v enotah $p\text{CO}_2$.

pO₂-elektroda

$p\text{O}_2$ -elektroda, imenovana tudi Clarkova elektroda, meri parcialni tlak kisika ($p\text{O}_2$) v krvi. Sestavljena je iz katode, ki je platinasta žička in anode, ki je Ag/AgCl-žica. Kontakt med njima predstavlja raztopina elektrolita, ki je ločena od vzorca z membrano, prepustno za O_2 .

Ko pride aspirirani vzorec krvi v stik z membrano, prepustno za O_2 , raztopljeni O_2 difundira iz krvi skozi membrano in se reducira na katodi.

Redukcija kisika na katodi: $\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^- \rightarrow 4\text{OH}^-$

Vir elektronov, potrebnih za redukcijo kisika, predstavlja anoda, kjer poteka oksidacija srebrovih ionov.

Oksidacija srebrovih ionov na anodi: $\text{Ag} \rightarrow \text{Ag}^+ + \text{e}^-$

Vsaka molekula kisika reagira s štirimi elektroni, ki jih proizvaja anoda. To je tisti pretok elektronov, ki povzroča spremembo električnega toka, ki ga merimo. Pri konstantnem izvoru napetosti je sprememba jakosti električnega toka premosorazmerna s pO_2 v krvi.

Merimo **jakost električnega toka pri konstantnem izvoru napetosti**, medtem ko pri pH-metriji merimo napetost takrat, kadar električni tok ne teče.

Odvzem krvi in ravnanje z vzorci za plinske analize

Samo analiza **arterijske** in **arterializirane kapilarne krvi** daje uporabne rezultate za oceno oksigenacije in acido-baznega statusa. Arterijska kri je **homogene** sestave ne glede na mesto odvzema, vzorci venske krvi pa kažejo samo lokalno stanje.

Moderni instrumenti za plinsko analizo krvi danes skoraj onemogočajo napake pri merjenju po aplikaciji vzorca v aparat. Nasprotno pa študije kažejo, da so napačni rezultati kljub temu pogosti. Ugotovili so, da je v 80 odstotkih temu vzrok **nepravilni odvzem in ravnanje z vzorci** pred analizo (predanalitične napake). To je posledica velike nestabilnosti parametrov, ki jih merimo (zlasti pO_2).

Bolnik mora biti pri **odvzemu** krvi **sproščen**. Za odvzem krvi se uporabljajo **brizge**. Morebitno prisoten zračni mehurček je potrebno takoj iztisniti, brizgo tesno zapreti in pazljivo premešati. Stik vzorca z atmosferskim zrakom znatno spremeni večino parametrov.

Kot **antikoagulant**a se smeta uporabljati le natrijev ali litijev **heparin**.

Vzorec krvi moramo neposredno pred analizo dobro **premešati**, ker se lahko **razplasti**.

V krvnih celicah, predvsem levkocitih in trombocitih, potekajo **presnovni procesi** tudi po odvzemu krvi. Pri tem se porablja kisik, nastaja pa ogljikov dioksid in nekatere soli nehlapnih kislin, npr. laktat. Intenzivnost teh procesov lahko zmanjšamo z **znižanjem temperature**. Zato moramo vzorce, ki jih ne moremo analizirati prej kot v 30 minutah, hraniti **na ledu**. Analizo moramo nato opraviti prej kot v dveh urah.

Encimske elektrode

Pri encimskih elektrodah gre za kombinacijo neke specifične elektrode (npr. pO_2) z encimsko reakcijo. Na tem principu so razvili instrument za merjenje koncentracije glukoze, urata in holesterola. Vsaka od teh reakcij zahteva kisik, ki se porablja za oksidacijo substrata. Substrati so glukoza, sečna kislina in holesterol, odvisno od tega, kaj merimo. Oksidacijo katalizira specifična oksidaza. Hitrost porabe kisika pri oksidaciji meri pO_2 -elektroda, poraba kisika pa je premosorazmerna s koncentracijo substrata, ki ga merimo.

Primer encimske elektrode je tudi steklena elektroda, prevlečena z gelom, ki je impregniran z encimom ureazo. Urea prodira v gel, kjer jo ureaza spremeni v amonijev ion, ta pa spremeni pH, ki ga meri steklena elektroda.



PONOVIMO

1. Kaj je elektrokemična celica?
2. Kaj potrebujemo, če hočemo izmeriti električno napetost?
3. V katere tri skupine delimo elektroanalizne metode?
4. Razložite nastanek električnega potenciala.
5. Primerjajte referenčne elektrode z indikatorskimi.
6. Opišite celico za merjenje pH-vrednosti in pH-meter za kri.
7. Kaj merijo instrumenti za plinske analize krvi?
8. Opišite predanalitske napake plinskih analiz.
9. Razložite zgradbo in delovanje $p\text{CO}_2$ -elektrode.
10. Razložite zgradbo in delovanje $p\text{O}_2$ -elektrode.
11. Opišite delovanje encimskih elektrod.

OSNOVE TERMIČNIH IN KRIOSKOPSKIH METOD

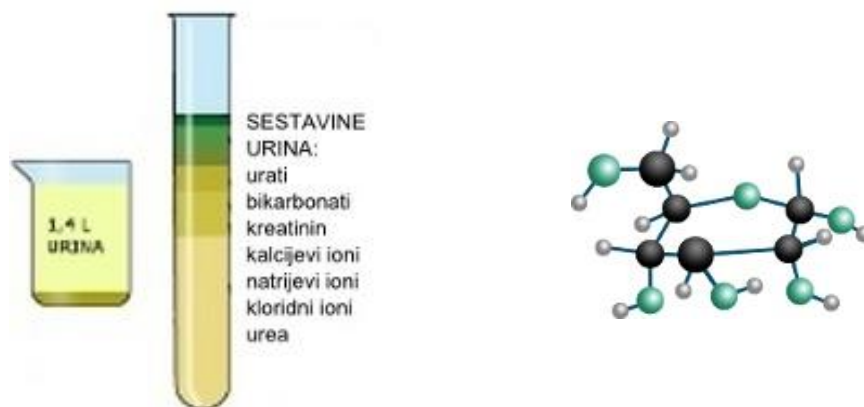
Pri **termičnih metodah** merimo spremembo temperature kot karakterističen signal in na osnovi tega določimo koncentracijo snovi. Merjenje temperature izvajamo z električnimi merilniki, kot so uporovni termometer, termistor in termočlen.

KRIOSKOPSKA METODA



MERJENJE OSMOLALNOSTI

Osmolalnost nam pove stanje števila delcev (ionov in molekul) v kilogramu vode. Če jo merimo v urinu, nam pove, kakšna je sposobnost ledvic, da koncentrira urin. Na osnovi opažanj, da imajo raztopine nižje zmrzišče, so zasnovali tudi metodo merjenja osmolalnosti.



Slika 5 - 6 Ioni in molekule v urinu zdrave osebe

S **krioskopsko metodo** določamo koncentracijo raztopine na osnovi merjenja njenega zmrzišča (sprememba temperature - ΔT), ki ga primerjamo z zmrziščem vode. Temperatura zmrzišča je odvisna od števila raztopljenih delcev v topilu (osmolalnosti) in s tem tudi od koncentracije raztopine.

Razmerje med temperaturo zmrzišča in koncentracijo nam predstavlja naslednja enačba:

$$\Delta T = 1,86 \cdot \Phi \cdot n \cdot C$$

Legenda:

Φ ... osmotski koeficient, ki nam pove stopnjo disociacije snovi v topilu

n ... število ionov

C ... koncentracija v mol/kg vode (molalnost)

1 mol neelektrolita v 1 kg vode (molalna raztopina) zniža točko zmrzišča za vrednost 1,86 °C.

Primeri:

Za NaCl je osmotski koeficient enak 0,91–0,95 v območju koncentracij 0,05–1,1 mol/kg vode, kar pomeni, da 91–95 % NaCl razpade na iona $\text{Na}^+ + \text{Cl}^-$.

Za **neelektrolite** (npr. raztopina glukoze, ki je nedisociirana) je n enak 1.

Za **enovalentne elektrolite** (npr. KCl) je n enak 2, ker KCl disociira na dva iona: $\text{K}^+ + \text{Cl}^-$.

Za **dvovalentne elektrolite**, (npr. CuSO_4) je n enak 2, lahko pa tudi 3, kot pri CaCl_2 :

- n je 2, ker CuSO_4 disociira na $\text{Cu}^{2+} + \text{SO}_4^{2-}$
- n je 3, ker CaCl_2 disociira na $\text{Ca}^{2+} + 2 \text{Cl}^-$

Tudi pri **trivalentnih elektrolitih** je n odvisen od aniona, na katerega je vezan trovalentni kation. Pri raztopini AlCl_3 je n enak 4, ker disociira na $\text{Al}^{3+} + 3 \text{Cl}^-$.

Molalnost ni internacionalna enota (SI-enota), vendar se še vedno uporablja v zvezi z osmolalnostjo in znižanjem zmrzišča.

Osmometer

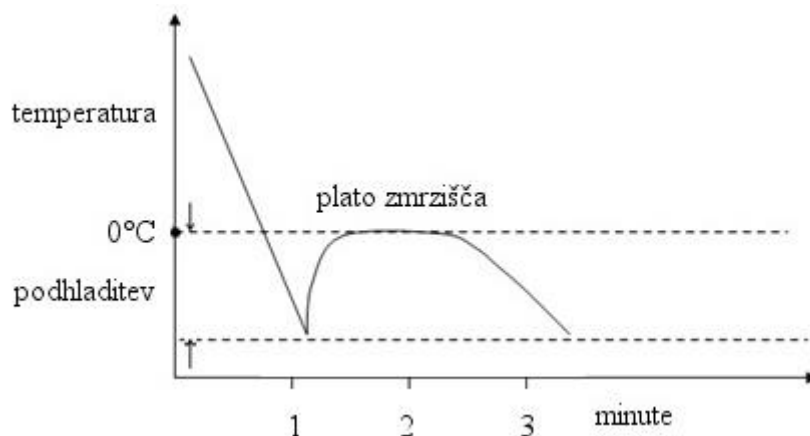
Osmometer je instrument za merjenje znižanja zmrzišča oziroma osmolalnosti.

Sestavljen je iz posodice za vzorec, vibracijske paličice, električnega merilnika temperature, zamrzovalnika in čitalca.

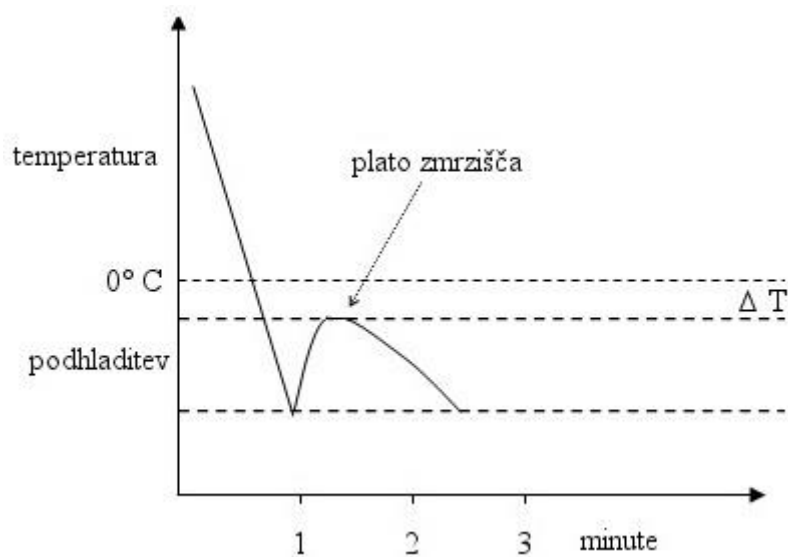
Tekočino (vodo, standardno raztopino ali vzorec) pipetiramo v posodico za vzorec, v posodico vstavimo še merilec temperature skupaj z vibracijsko paličico. Vse skupaj vstavimo v zamrzovalnik. Tam se tekočina podhladi pod točko zmrzišča. Pri določeni temperaturi podhladitve se vklopi vibracijska paličica, ki mehansko povzroči kristalizacijo tekočine. Pri tem se sprošča toplota in temperatura začne naraščati do točke zmrzišča (plato), nato pa po določenem času začne zopet padati. Instrument izpiše zmrzišče tekočine (tisti del, ki je na krivulji zmrzišča prikazan kot plato).

Zmrzišče vode je 0°C , raztopine pa imajo nižje zmrzišče. Zmrzišče je odvisno od koncentracije raztopine in stopnje disociacije raztopljenih snovi. Vsak instrument je potrebno predhodno umeriti na standard in večkrat preveriti vrednost zmrzišča vode.

Enote za osmolalnost so miliosmoli/kg vode in jih lahko neposredno odčitamo iz čitalca. Ob prehodu na SI-enote so spremenili tudi enote za osmolalnost tako, da jih po novem izražamo v stopinjah Kelvina.



Slika 5 - 7 Krivulja zmrzišča vode



Slika 5 - 8 Krivulja zmrzišča raztopine (vzorca)



Slika 5 - 9 Osmometer

<http://www.labena.si/ba/images/stories/IZDELKI/advanced/slike/osmometer1-m.jpg>
 (17. 6. 2010)



KONZORCIJ ŠOLSKIH CENTROV



REPUBLIKA SLOVENIJA
ŠOLSTVO IN ŠPORT

SŠFKZ



Naložba v vašo prihodnost
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA
Evropski socialni sklad



PONOVIMO

1. Definirajte pojem krioskopske metode.
2. Primerjajte molarnost z molalnostjo.
3. Definirajte pojem osmolalnost.
4. Napišite odnos med osmolalnostjo in koncentracijo ter osmolalnostjo in temperaturo zmrzišča.
5. Razložite izraza »n« in »osmotski koeficient«. Kaj pomeni, če ima neka spojina osmotski koeficient 1,0?
6. Koliko ionov vsebuje molekula AlCl_3 ? Razložite odgovor.
7. Primerjajte krivulji zmrzišča vode in neke raztopine.
8. Opišite osmometer in razložite njegovo delovanje.

CENTRIFUGIRANJE IN ELEKTROFOREZA

Med separacijske metode spadajo poleg **centrifugiranja** in **elektroforeze** tudi destilacija, ekstrakcija, kromatografija, dializa in ultrafiltracija.

Najpogosteje uporabljena separacijska metoda v medicinskih laboratorijih in tudi nasploh je **centrifugiranje**. Elektroforeza se uporablja le za specialne preiskave.

CENTRIFUGIRANJE



CENTRIFUGIRANJE VZORCA KRVI

Kri želimo centrifugirati pri centrifugalni sili $600 \times g$ ($\text{RCF} = 600 \times g$), da dobimo s trombociti bogato plazmo. Izmerite polmer centrifuge in izračunajte, pri katerih vrtljajih na minuto morate kri centrifugirati. Na kaj morate paziti, kadar centrifugirate?

Princip in postopek centrifugiranja

Raztopljene ali suspendirane delce v raztopini ločimo od topila s silo, ki deluje v centrifugi. Pred centrifugiranjem moramo v centrifugo pravilno vstaviti epruvete (centrifugirke) z

določeno vsebino. Centrifugirke so epruvete, namenjene centrifugiranju. Imeti morajo enakomerno debele stene in so sestavljene iz materiala, ki ne poka.

Centrifugo naravnomo na število vrtljajev in čas centrifugiranja. Ker so v literaturi namesto vrtljajev na minuto podatki večinoma v enotah »g«, ki ponazarjajo rotacijsko centrifugalno silo (RCS ali angl »RCF«), moramo za vsako centrifugo posebej izračunati število vrtljajev na minuto. Oznaka za vrtljaje na minuto (vrt./min) je tudi angleška kratica *rpm* (»rotation per minute«).

Za izračun vrtljajev na minuto potrebujemo poleg podatka za rotacijsko centrifugalno silo (RCS) še podatek za polmer centrifuge (*r*), nato pa lahko izračunamo število vrtljajev na minuto z uporabo enačbe: $RCS = 1118 \cdot r \cdot rpm^2 \cdot 10^{-8}$.

Polmer pri tej enačbi je izražen v centimetrih, predstavlja pa razdaljo med osjo rotacije ter dnem centrifuge v horizontalnem položaju.

Primer izračuna števila vrtljajev na minuto pri centrifugi s polmerom 12 cm in rotacijsko centrifugalno silo 2000 g:

$$2000 = 1118 \cdot 12 \cdot rpm^2 \cdot 10^{-8}$$

$$rpm = \sqrt{\frac{2000 \cdot 10^8}{1118 \cdot 12}}$$

Rezultat: $rpm = 3861$ vrt. /min

Centrifuge

Poznamo več vrst centrifug, ki jih izbiramo glede na: namen uporabe, vrsto rotorja, število vrtljajev, število mest za epruvete (kapaciteta centrifuge), velikost vložkov, ki nosijo epruvete, hrupnost centrifuge in denarne zmožnosti za nakup. Izbirati moramo take vložke za centrifugiranje, ki se lahko razkužijo.

Vrste centrifug so: klasične centrifuge, mikrocentrifuge, hlajene centrifuge in ultracentrifuge.

Klasične centrifuge se med seboj razlikujejo po tipu rotorja.



Slika 5 - 10 Klasična centrifuga

Mikrocentrifuge (mikrofuge) zmorejo veliko število vrtljajev zaradi manjšega premera rotorja. Uporabljajo se za vzorce majhnih volumnov.

Primer: mikrocentrifuge za centrifugiranje kapilarne krvi.

Hematokritne centrifuge so **mikrocentrifuge**. Namenjene so bile za določanje hematokrita. Zmorejo zelo veliko število vrtljajev (rpm = okrog 10.000 vrt./min). Zelo majhen volumen krvi se centrifugira v hepariniziranih kapilarah.



Slika 5 - 11 Hematokritna centrifuga

Hlajene centrifuge so vse bolj iskane, ker zagotavljajo stabilnost snovi v biološkem materialu. Pri dolgotrajnem centrifugiranju se namreč sprošča toplota.



PONOVIMO

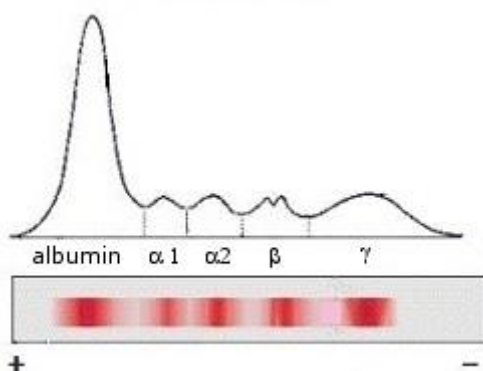
1. Katere centrifuge poznate in kateri so kriteriji za izbiro centrifuge?
2. Od česa je odvisna relativna centrifugalna sila pri centrifugah?
3. Ali lahko pri vseh centrifugah uporabljamo enako število vrtljajev na minuto? Razložite odgovor.
4. Kakšno prednost imajo hlajene centrifuge pred običajnimi (nehlajenimi)?
5. Predvidite uporabnost mikroflug v analitiki.

ELEKTROFOREZA



UPORABA ELEKTROFOREZE V LABORATORIJSKI MEDICINI

Katere snovi se merijo v medicinskih laboratorijih z elektroforezo? Kakšen je princip meritev?



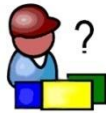
Slika 5 - 12 *Elektroforeza proteinov*

<http://pro2services.com/Lectures/Winter/Proteins/protelec.gif>

Osnove elektroforeze

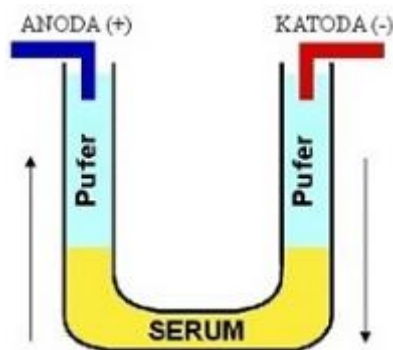
Elektroforeza je metoda za ločevanje komponent vzorca v električnem polju. Zaradi električnega polja potujejo nabiti delci z različno hitrostjo, odvisno od naboja, proti anodi ali

katodi. Z elektroforezo ločimo delce z različnimi naboji, kot tudi delce z enakimi naboji, če so različne velikosti ali oblike, ker nanje delujejo različne zaviralne sile.



Te zanima?

Elektroforezo je v tridesetih letih dvajsetega stoletja razvil Arne Tiselius. Leta 1948 so mu za njegove dosežke podelili Nobelovo nagrado za kemijo.



Slika 5 - 13 *Prehod proteinov od katode proti anodi*

Elektroforezo lahko primerjamo s kromatografijo. Pri kromatografiji poteka ločitev snovi na osnovi fizikalnih procesov, poleg tega pa je transport snovi odvisen od toka topila.

Sprva so elektroforezo uporabljali le za ločevanje **proteinov**. Postopek je bil zapleten in dolgotrajen. Kasneje so razvili elektroforezo za ločevanje drugih sestavin, postopki pa so postajali vse bolj avtomatizirani. V medicinski biokemiji uporabljajo elektroforezo za ločevanje **proteinskih frakcij**, **lipoproteinov**, **izoencimov**, **hemoglobinov** in **imunoglobulinov** v bioloških vzorcih.

Postopek klasične elektroforeze

Vzorec (serum, plazma, urin ...) nanašamo na določen porozni nosilec, navlažen s pufrom. Včasih se je kot nosilec uporabljal papir, kasneje pa so začeli uporabljati druge nosilce, kot so gel (škrob, agar, agar, poliakrilamid) in celuloza acetat. Aparaturo, ki vsebuje katodo in anodo, priključimo na električno napetost, kar povzroči gibanje nabitih molekul vzorca po nosilcu proti nasprotno nabiti elektrodi. Proti anodi se najhitreje gibljejo molekule oz. delci z najbolj negativnim nabojem.



Slika 5 - 14 Aparatura za klasično elektroforezo

<http://www.hexalab.co.rs/images/galerija/biohemija/biohemija06.jpg>
(12. 12. 2010)

Postopki elektroforeze se razlikujejo glede na: sestavo pufra, pH-vrednost pufra, čas trajanja elektroforeze in električno napetost.

Molekule vzorca (proteini, lipoproteini, hemoglobini, encimi) se razdelijo na več frakcij (lis) v različni oddaljenosti od izhodišča. Frakcije postanejo vidne (obarvane) z dodatkom različnih snovi. Za maščobe se uporabljajo v maščobah topne barve, za encime se uporablja primeren substrat itd.

V praksi pride do mnogih prekrivanj posameznih lis. Običajno se jasno ločita le najpočasnejša in najhitrejša. Delež posameznih sestavin (lis) dobimo tako, da izmerimo njihovo gostoto z **denzitometrom**.

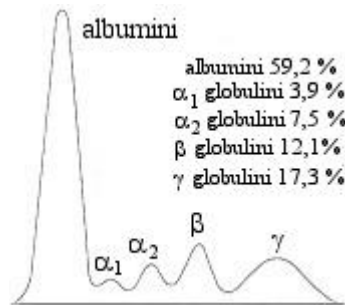
Denzitometer

Denzitometer je specialen kolorimeter za odčitavanje lis na elektroforetskih trakovih. Vsebuje izvor svetlobe, ki pošlje svetlobni žarek skozi filter na transparentni elektroforetski trak. Od tam gre prepuščena svetloba na fotodetektor, ki svetlobo pretvori v električni tok. Ko gre svetloba skozi prozoren oz. neobarvan del traku, instrument to zazna kot ničlišče (angl. »baseline level«). Ko gre svetlobni žarek skozi liso, se ta na njej absorbira, oslabljena svetloba pa pade na fotodetektor (merimo absorbanco). Aparat zazna vse absorbance na posameznih delih lis, nariše graf in napiše maksimalne vrednosti. Denzitometer integrira površino pod vsakim maksimumom krivulje, tako da dobimo relativne deleže vsake frakcije. Če je koncentracija celokupnih proteinov znana, lahko izračunamo (ali izračuna instrument) koncentracije posameznih proteinskih frakcij (g/L).

Klasična elektroforeza serumskih proteinov (proteinogram)

Pri pH 8–10 imajo vsi serumski proteini negativni naboj in potujejo proti anodi. Kot pufer se lahko uporablja barbituratni pufer, ki ima pH 9,2. Albumini nosijo največji naboj in zato tudi najhitreje potujejo. Gama globulini imajo najmanjši naboj in se zato tudi najpočasneje gibljejo. Na celuloza acetatnem nosilcu se proteini ločijo na pet proteinskih frakcij, na agarozu gelu pa na šest ali več.

Po končani elektroforezi je potrebno frakcije obarvati (z barvilom Ponceau S), razbarvati ozadje in narediti nosilce prozorne ali transparentne, da jih je mogoče odčitati.



Slika 5 - 15 Normalen proteinogram s petimi proteinskimi frakcijami

Zvečana frakcija alfa globulinov ob znižanem albuminu se pojavlja pri akutnih vnetjih, zvečana gama frakcija pa kaže na sum monoklonskih protiteles oz. na plazmocitom. Pri elektroforezi plazme moti fibrinogenska lisa v beta frakciji.

Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza temelji na osnovah klasične elektroforeze s to razliko, da se komponente vzorca ločijo v **kapilari**.

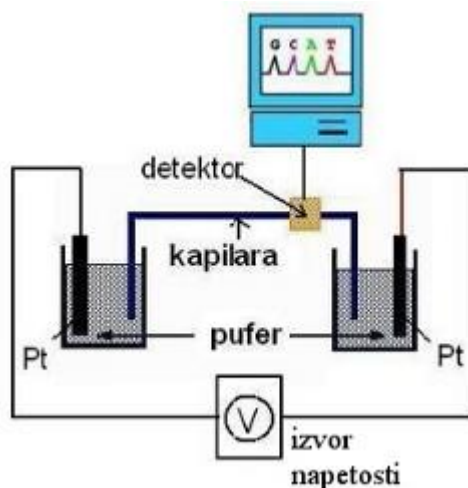
Prvi začetki kapilarne elektroforeze so povezani z letoma 1979 in 1981, ko je metoda doživela svoje prve znanstvene objave. V letih, ki so sledila, je doživela pravi razcvet in danes predstavlja orodje, ki je nepogrešljivo v vsakem sodobnem laboratoriju. Uveljavila se je kot dobra alternativa tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti in daje z njo primerljive rezultate, hkrati pa za analizo porabi manjše volumne vzorcev in topil. Prvič so jo uporabili v klinične namene za analizo serumskih proteinov.

S kapilarno elektroforezo lahko analiziramo širok spekter vzorcev. V nekaterih modernejših laboratorijih uporabljajo kapilarno elektroforezo za analize serumskih proteinov, za ločitev različnih vrst hemoglobina, za identifikacijo monoklonskih protiteles, za analizo DNA (npr. za ugotavljanje Downovega sindroma) itd.

Prednost metode je majhna poraba vzorcev in pufrov, hiter čas analize in avtomatizacija.

Glavna omejitev kapilarne elektroforeze je nizka meja detekcije, saj zaradi majhnega premera kapilare in posledično nizkega volumnskega pretoka ne moremo uporabljati klasičnih detektorjev, primernih za HPLC.

Aparatura za kapilarno elektroforezo vsebuje vir visoke napetosti, dve elektrodi, dva rezervoarja s pufrom, kapilarno, detekcijski sistem in sistem za zapis in obdelavo signala.

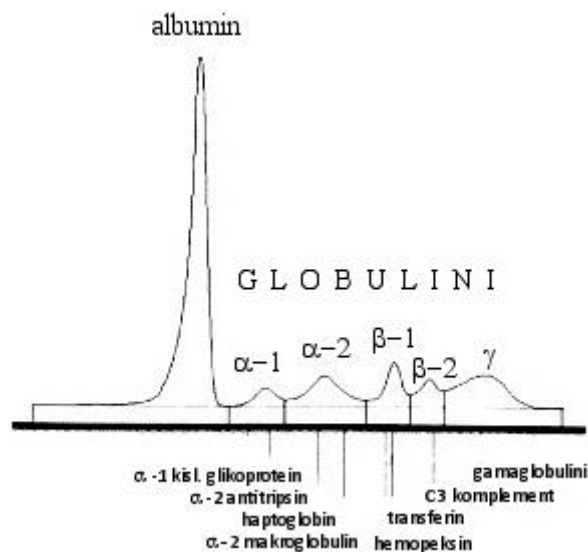


Slika 5 - 16 Aparatura za kapilarno elektroforezo

Detekcija frakcij je lahko amperometrična, konduktometrična, potenciometrična, kemiluminiscenčna, fluorescenčna ali z masno spektrometrijo. Detekcija z merjenjem intenzitete UV-vidne svetlobe, ki pade na kapilaro z vzorcem, je najpogostejša, a tudi najmanj občutljiva. Če molekule vzorca ne morejo absorbirati svetlobe oziroma ne fluorescirajo, jih lahko pred elektroforezo kemijsko obdelamo.

Kapilarna elektroforeza serumskih beljakovin

Pri kapilarni elektroforezi serumskih beljakovin se na račun dveh ločenih frakcij beta globulinov (**beta 1 in beta 2**) proteini ločijo na 6 frakcij. V **beta 1 frakciji** sta prisotna hemopeksin in transferin, v **beta 2** pa C3 komponenta komplementnega sistema. V ta namen so se nekoliko spremenile tudi **referenčne vrednosti proteinograma**, npr. znižal se je delež **albuminov**.



Slika 5 - 17 Razporeditev proteinskih frakcij pri kapilarni elektroforezi

Napake pri elektroforezi

Pri elektroforezi (klasični in kapilarni) opazimo pojav gibanja delcev v smeri, ki je nasproti gibanju delcev vzorca. Pojav imenujemo **elektroendoosmoza** ali **elektroosmoza**.

Ko priključimo napetost, začnejo hidratirani oziroma solvativirani kationi potovati proti katodi. Elektroosmozni tok zmanjšamo s povečanjem ionske moči ali viskoznosti pufra, z zmanjšanjem pH pufra, z dodatkom organskih topil (etanol, metanol, acetonitril) ali z zmanjšanjem napetosti.



PONOVIMO

1. Opišite princip elektroforeze.
2. Primerjajte elektroforezo s kromatografijo.
3. Primerjajte klasično elektroforezo s kapilarno elektroforezo.
4. Razložite delovanje denzitometra.
5. Na katere načine detektiramo frakcije elektroforeze?
6. Katere so pomanjkljivosti elektroforeze?

ANALIZATORJI



ANALIZATORJI V MEDICINSKIH LABORATORIJIH

Navedite enega od analizatorjev, ki ste jih spoznali v času delovne prakse. Poimenujte tudi nekaj preiskav, ki jih ta analizator izvaja. Kaj je analizator naredil sam in kaj so morali narediti laboratorijski tehniki? Ali veste, na katerem principu je analizator izvajal posamezne meritve?



Splošne značilnosti analizatorjev

V medicinskih laboratorijih (biokemijskih in hematoloških) so večino ročno izvajanih preiskav zamenjali avtomatizirani postopki z analizatorji.

Analizatorji ali »avtomati«, kot so jih včasih imenovali, so avtomatizirani instrumenti, ki so namenjeni analiziranju večjega števila vzorcev. Izvajajo enake ali podobne kemijske reakcije, kot so jih včasih ročno, le da so hitrejši in bolj zanesljivi. Opravijo skoraj vse faze dela, ki jih je včasih moralo opraviti laboratorijsko osebje: preverjajo stanje instrumenta, umerjajo instrument, pipetirajo vzorce in reagente, mešajo, segrevajo, merijo produkte kemijskih reakcij z merjenjem absorbanse, fluorescence idr., na koncu pa izračunajo in izpišejo koncentracije analiziranih parametrov.

Analizatorji so skrajšali čas preiskav oz. povečali število opravljenih preiskav v določenem času, olajšali delo laboratorijskemu osebju in zmanjšali njihove individualne napake pri delu. So hitri, natančni, točni in varčni, saj za svoje delo potrebujejo majhne volumne vzorcev in reagentov. Z različnimi alarmi (zvočnimi ali pisnimi) opozorijo tudi na morebitne napake.

Zgradba in delovanje analizatorjev

Analizatorji so sestavljeni iz **analitičnega** in **elektronskega** dela. V analitičnem delu se izvajajo vse kemijske reakcije, vključno z meritvijo. Ta del moramo dobro poznati, da lahko manjše napake tudi sami odpravimo, medtem ko je elektronski del v pristojnosti elektrotehnikov.



Te zanima?

Včasih so proizvajali dve vrsti analizatorjev, ki so jih poimenovali selektivne ali enokanalne in kontinuirane ali večkanalne. Večkanalni analizatorji so iz enega vzorca istočasno opravili veliko število preiskav (9, 12, 16). Vzorce so pipetirali drugega za drugim. Da bi jih ločili med seboj, so mednje dodajali zračne mehurčke. Takšni instrumenti so bili neracionalni in potratni, ker vsi preiskovanci niso imeli naročenih vseh preiskav, analizator pa jih je kljub temu opravil. Iz tega razloga se večkanalni analizatorji v biokemijskih laboratorijih ne uporabljajo več, njihove različice pa se uporabljajo v hematoloških laboratorijih.

Način dela z analizatorji je odvisen od posameznega analizatorja, za vse pa velja, da jih je potrebno dnevno, tedensko in mesečno vzdrževati po predpisih proizvajalca.

Odstranjevanje vzorcev in produktov reakcij

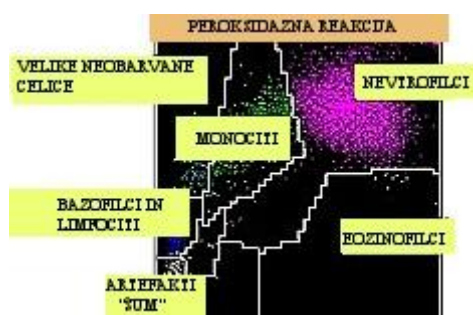
Vzorci krvi in krvnega seruma se morajo po končani analizi zaradi morebitne ponovitve **shranjevati** v hladilniku še **sedem dni**. Po pretečenem času se odvržejo v za njih namenjene zbiralnike in uničijo s sežigom. Sežig opravljajo za to zadolžene in usposobljene službe (pogodbeni izvajalci). Produkti reakcije se lahko zbirajo v plastične zbiralnike, ki imajo na dnu varikino in zlijejo v odtok. Pri nekaterih analizatorjih, ki nimajo toksičnih reagentov, gredo produkti reakcije neposredno v odtok.

HEMATOLOŠKI ANALIZATORJI



ANALIZA VZORCA KRVI S HEMATOLOŠKIM ANALIZATORJEM

Oglejte si rezultate hematološkega analizatorja in dobljene vrednosti ovrednotite. Opišite postopek merjenja in način ugotavljanja posameznih parametrov. Ugotovite, v katerih primerih bi bile potrebne ponovitve analize krvi in razložite, zakaj.



Slika 5 - 18 Diferencialna krvna slika

Značilnosti hematoloških analizatorjev

Hematološki analizatorji so različica večkanalnih analizatorjev. Pri njih dozirna glava razdeli točno določen volumen aspiriranega vzorca krvi na več kanalov in istočasno izvede analize večjega števila parametrov.

Poleg osnovnih hematoloških preiskav (merjenje št. konc. krvnih celic, merjenje masne konc. hemoglobina in merjenje eritrocitnih konstant, kot so MCV, MCH, MCHC) izvaja tudi preiskave, kot je diferencialna krvna slika, RDW, PCV in PDW.

Pri novejših hematoloških analizatorjih analitik ne pride v stik s krvjo, ker ima analizator tako imenovani zaprti sistem dela (pipetiranje iz zaprte epruvete - igla prebode gumijasti zamašek epruvete z vzorcem).

Odvzem krvi in delo s krvnimi vzorci

Laboratorijsko osebje mora pri odvzemu krvi skrbeti za lastno zaščito in za zaščito preiskovancev. Uporabljajo sterilni pribor za odvzem krvi, rokavice za enkratno uporabo in tudi zaščitne maske, kadar je to potrebno. Vzorci za analizo so vzorci krvi z določenim antikoagulantom, ki morajo biti pravilno označeni. Po odvzemu morajo stati vsaj 25 minut, da se vrednosti v krvi stabilizirajo.

Dobro premešan vzorec je predpogoj za kvalitetno izvedeno analizo. Nekateri analizatorji vzorec pred aspiracijo tudi sami premešajo, drugi (enostavnejši) pa te možnosti nimajo, zato mora za to poskrbeti laboratorijsko osebje.

Analizator po aspiraciji določenega volumna dobro premešane krvi opravi zahtevane analize in v kratkem času (povprečno v eni minuti) izpiše rezultate. Rezultate je po analizi potrebno pregledati in oceniti. Na osnovi ocene in postavljenih kriterijev laboratorija se izvajalci preiskav odločajo o ponovitvi določene analize in o izdelavi krvnega razmaza za diferencialno krvno sliko. Če so rezultati v redu, jih izvajalec laboratorijskih preiskav potrdi, nato pa se prenesejo v laboratorijski informacijski sistem (LIS) ter tudi natisnejo.

Princip delovanja hematoloških analizatorjev

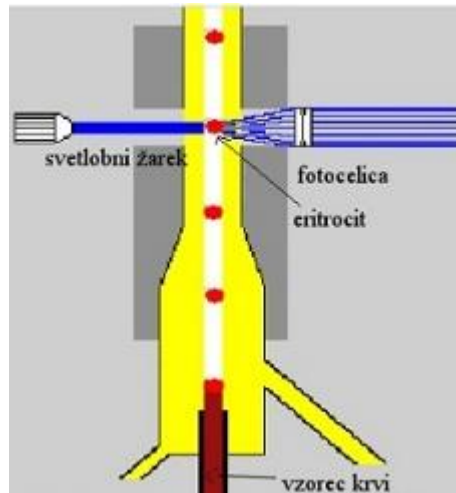
Hematološki analizatorji so si med seboj zelo različni, zato jih v smislu določanja števila krvnih celic v grobem lahko razdelimo v dve skupini:

- analizatorji, ki delujejo na principu spremembe električne prevodnosti raztopine med dvema elektrodama zaradi prisotnosti krvnih celic,
- analizatorji, ki delujejo na principu elektro-optične tehnike.



Slika 5 - 19 Hematološki analizator

Nekateri analizatorji diferencirajo levkocite na podlagi velikosti celic in oblike jedra. Krvni dodajo reagent, ki povzroči spremembo citoplazemske membrane. Membrana limfocitov se močno skrči, membrana monocitov običajno zelo malo, granulociti pa ne spremenijo velikosti. Med limfocite uvrsti aparat celice velikosti 30–100 fL, med monocite uvrsti celice velikosti 100–150 fL, med granulocite pa celice nad 150 fL.



Slika 5 - 20 Hemocitometer (sestavni del hematološkega analizatorja, ki šteje eritrocite na principu elektro-optične tehnike)

Kalibracija

Hematološke analizatorje je potrebno **kalibrirati**. Kalibracijo naredijo serviserji, pri nekaterih pa jo lahko izvaja tudi laboratorijsko osebje po navodilih serviserjev. Kalibracija se izvaja s predpisanim kalibracijskim materialom za določen analizator po predpisanem postopku. Vsak tip analizatorja ima svoja specifična navodila glede kalibracije. Kalibracijski material ima točno določene vrednosti analitov, ki jih meri analizator. Ima tudi omejen rok uporabnosti.

Nadzor kakovosti

Pri hematoloških analizatorjih se zaradi točnosti rezultatov izmerjenih vzorcev izvaja **nadzor** delovanja. Nadzor se mora izvajati vsakodnevno pred pričetkom dela (dopoldanska in popoldanska izmena) in tudi po potrebi (zamenjava reagentov, servisni posegi, redno vzdrževanje analizatorja, sum na napačen rezultat vzorca).

BIOKEMIJSKI ANALIZATORJI



ANALIZA VZORCA Z BIOKEMIJSKIM ANALIZATORJEM

Razmislite, katere biokemijske preiskave, ki ste jih izvedli pri praktičnem pouku, bi se lahko izvedle tudi z analizatorjem. Katere faze dela so pri teh preiskavah avtomatizirane?

Značilnosti biokemijskih analizatorjev

Večina postopkov v biokemijskih analizatorjih temelji na merjenju absorbance.

Biokemijski analizatorji lahko analizirajo samo en parameter (npr. glukozni analizator, instrument za CRP), skupine parametrov (srčni markerji) ali pa veliko število parametrov.

Izbira analizatorja je odvisna od potreb posameznega izvajalca zdravstvenih storitev. Tisti analizatorji, ki izvajajo več analiz, imajo prednost, da lahko za vsak posamezni vzorec programiramo vrsto zahtevanih preiskav. Preiskave opravljajo sukcesivno (druga za drugo), to pomeni, da isti vzorec pipetirajo tolikokrat, kot je število zahtevanih preiskav, za vsako analizo pa dodajo ustrezen reagent.

Zgradba in delovanje biokemijskih analizatorjev

Analizatorji se **razlikujejo** po kapaciteti (število opravljenih preiskav v eni uri) in po sestavi analitičnega dela. Pomemben analitičen del sestavljata **sistem za pipetiranje** in sistem **reakcijskih kivet**. **Sistemi za pipetiranje** imajo lahko enega ali dva pipetorja (aspiracijske igle). Nekateri uporabljajo en pipetor tako za reagent kot za vzorec, drugi pa imajo ločena sistema, posebej za vzorec in posebej za reagent.

Da bi se izognili **vplivu predhodnega vzorca** in medsebojnemu mešanju reagentov, s tem pa posledično napakam pri analizah, je zelo pomembno **dobro izpiranje** sistema za pipetiranje in reakcijskih kivet. Med posameznimi pipetiranjmi se morajo pipetorski sistemi izpirati z demineralizirano vodo visoke kvalitete. Za pridobivanje vode običajno skrbi poseben sistem, katerega princip delovanja sloni na uporabi ionsko izmenjevalnih kolon ali inverzne osmoze. Nekateri analizatorji uporabljajo za izpiranje namesto vode posebno predpisano tekočino.

Kemijske reakcije potekajo v **kivetah**, kjer se po pipetiranju vzorca in reagenta vsebina dobro premeša (z ultrazvokom, z mešalčkom, s stresanjem). Reakcijska mešanica se inkubira pri določeni temperaturi, nato pa se izmeri končni produkt reakcije (analize).

Pri analizatorjih z veliko kapaciteto so lahko kivete stalne. Izdelane so iz visoko kvalitetnega kvarčnega stekla in se zamenjajo po določenem času oz. po določenem številu analiz (npr. analizatorji Olympus). Pri drugih analizatorjih se kivete sproti izdelujejo z varjenjem trakov posebne umetne folije, ki prepušča UV-svetlobo (npr. aparati Dimension firme Siemens).

Pri analizatorjih z manjšo kapaciteto so lahko reakcijske kivete iz umetne mase za enkratno uporabo in se po končani analizi zavržejo. So lahko v obliki šaržerjev ali v obliki reakcijskega krožnika (angl. »carousel«).



Slika 5 - 21 Kivete v obliki šaržerja

Nekateri sodobni analizatorji določajo tudi stopnjo **hemolize**, **ikteričnosti** in **lipemičnosti** (HIL) serumskega vzorca.

TEST	RESULT	REF. INTERVAL	UNITS
HIL	512		Ind
GLU	96	HIL interf	mg/dL
BUN	12	7-18	mg/dL

Slika 5 - 22 Prikaz rezultatov analize glukoze in sečnine ter indeksa **hemolize**, **ikteričnosti** in **lipemičnosti** (HIL): $H = 5$, $I = 1$, $L = 2$



PONOVIMO

1. Ugotovite podobnosti in razlike med biokemijskimi in hematološkimi analizatorji.
2. Zakaj so bili večkanalni kontinuirani biokemijski analizatorji v preteklosti za uporabo neprimerni?
3. Opišite načine pipetiranja in spiranja analizatorjev.
4. Naštejte vrste kivet pri različnih analizatorjih.
5. Razložite način kalibracije in kontrole dela hematoloških analizatorjev.

RADIOKEMIJSKE METODE



IMUNOKEMIJSKE IN RADIOKEMIJSKE ANALIZE V MEDICINSKIH LABORATORIJIH

Napišite primer imunokemijske reakcije. Navedite nekaj primerov uporabnosti imunokemijskih reakcij v laboratorijski medicini. Zakaj se radioimunokemijske reakcije kljub njihovi zanesljivosti ne uporabljajo bolj množično? Katere nevarnosti povzroča radioaktivno sevanje v organizmu? Kako nas zaščitijo, kadar nas rentgenizirajo?



http://img.siol.net/08/242/633556073718716114_radioaktivnost.jpg
 (17. 6. 2010)

Osnove imunokemijskih in radiokemijskih metod

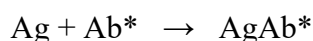
Princip imunokemijskih metod je merjenje neke snovi na osnovi reakcije med antigeni in protitelesi. Merimo lahko **produkt reakcije**, npr. **motnost**, ali pa je protitelesom dodana **neka spojina**, ki jo merimo (encimi, snovi ki flurescirajo, izotopi). Pri radiokemijskih metodah merimo radioaktivnost izotopov po končani imunokemijski reakciji.

Radiokemijske metode so od vseh metod najbolj točne, občutljive in specifične. Odstotek napak pri teh metodah je zelo majhen. Uporabljajo se za določanje tistih snovi, ki so v naravi oziroma v organizmu prisotne v zelo majhnih koncentracijah (hormoni, vitamin B₁₂). Slaba stran teh metod je radioaktivno sevanje in odstranjevanje radioaktivnih odpadkov, čeprav sevanje radioaktivnih izotopov, ki se pri teh metodah uporabljajo, ni veliko.

Radioimunski test (angl. »radioimmunoassay«) - RIA

Prvi radioimunski test je bil objavljen leta 1960 v zvezi z merjenjem koncentracije hormona insulina v organizmu. Kasneje so začeli z RIA-metodami meriti številne druge spojine, kot so peptidni in steroidni hormoni, encimi, vitamini in tudi zdravila.

RIA-metoda temelji na imunokemijski reakciji med antigenom (Ag) in protitelesom (Ab). Antigene vsebuje spojina, ki jo merimo, na protitelesa pa je vezan radioaktivni izotop.



Zvezdica pomeni, da je določena spojina označena z radioaktivnim izotopom (radioizotopom).

Izotopi so kemijski elementi, ki nimajo enakega števila protonov in nevtronov. Lahko so stabilni ali nestabilni.

Radioizotopi so nestabilni, njihova razpolovna doba pa je različna. Sevajo energijo v obliki alfa, beta ali gama žarkov, merjenje intenzitete njihovega sevanja pa se uporablja pri radio-kemijskih metodah.

Alfa žarki: (dva protona + dva nevtrona) - helijeva jedra ${}^4_2\text{He}$.

Beta žarki: elektroni ali pozitroni.

Gama žarki: fotoni (elektromagnetno valovanje).

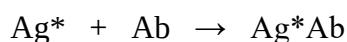
Radioizotopi so lahko naravni ali umetni. Preko niza izotopov razpadejo do končnega produkta. Končni produkt njihovega razpada so stabilni svinčevi ali bizmutovi izotopi.

Mnogi radioizotopi se uporabljajo v medicinski diagnostiki kot označevalci ali markerji. Z njimi označimo reagente, nato pa z RIA-tehnikami merimo koncentracijo snovi v vzorcih.

Kompetitivna inhibicija

Ker imunokemijske reakcije niso kvantitativne (vedno ostane še nekaj nezreagiranega antigena in bi prišlo do lažno nižjih rezultatov), so uvedli metodo, s katero so ugotovili razmerje med prosto in vezano obliko antigena. Metoda se imenuje **kompetitivna inhibicija**.

Protitelesom znane koncentracije dodamo znano koncentracijo radioaktivnega antigena (Ag^*), ki je v prebitku glede na koncentracijo protiteles:



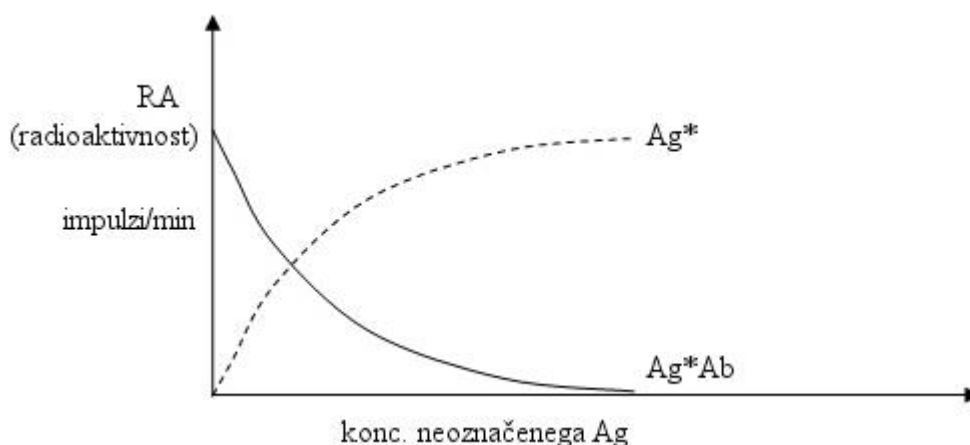
Protitelesa ne vežejo vseh Ag^* . Inkubacijski zmesi dodamo znane koncentracije neoznačenega antigena (Ag -standardi). Neoznačen antigen tekmuje z Ag^* za vezalna mesta na protitelo. Po dodatku višje koncentracije neoznačenega standarda (Ag -standard) se zmanjšuje koncentracija Ag^*Ab -kompleksa in povečuje koncentracije prostega Ag^* v primerjavi s stanjem pred dodatkom neoznačenega standarda (Ag -standard).

Merimo radioaktivnost Ag^*Ab -kompleksa ali prostega Ag^* .

Iz podatkov za koncentracije standardnih raztopin in izmerjenih radioaktivnosti narišemo **umeritveno krivuljo**.

Razmerje med označenim in neoznačenim antigenom je pred vezavo in po vezavi s protitelesi (Ab) enako.

Oblika krivulje je odvisna od koncentracije protiteles. Večja ko je koncentracija protiteles, bolj strma je krivulja. Nižja ko je koncentracija protiteles, slabša je vezava.



Slika 5 - 23 Odvisnost radioaktivnosti Ag^* in Ag^*Ab od koncentracije snovi, ki jo merimo (neoznačen Ag). Koncentracija Ab je konstantna. Obe krivulji sta komplementarni.

Po imunokemijski reakciji analita v vzorcu izmerimo radioaktivnost produkta reakcije in rezultat odčitamo iz umeritvene krivulje. Če hočemo izmeriti radioaktivnost Ag^* ali Ag^*Ab , moramo fazi pred meritvijo ločiti z eno od adsorpcijskih tehnik. Najpogostejše eno od faz vežemo na steno epruvet, v katerih izvajamo reakcijo. Tekočino, ki vsebuje drugo fazo, odlijemo in izmerimo njeno radioaktivnost. Najpogostejše uporabljamo naslednje radioaktivne izotope: ^{14}C , 3H , ^{125}I , ^{131}I . Izbira epruvet za merjenje radioaktivnosti je odvisna od uporabe izotopa in od separacijskega postopka.

Merilci radioaktivnosti

Za ^{125}I in ^{131}I uporabljamo gama števec. Ti vsebujejo kristal NaI, ki pod vplivom žarčenja oddaja iskre (scintile), te pa zazna fotopomnoževalka, ki jih spremeni v impulze električnega toka, ki se seštevajo. Tekočinski scintilacijski števeci (LSC) merijo 3H in ^{12}C , lahko pa tudi ^{131}I in ^{125}I .

Prednosti in pomanjkljivosti RIA-metod

Poleg omenjene so razvili tudi številne druge RIA-tehnike. RIA-metode imajo poleg številnih prednosti (visoka točnost, specifičnost in občutljivost) tudi mnogo **pomanjkljivosti** (neobstoječnost reagentov, drage aparature, posebno usposobljen kader, škodljivost zdravju, shranjevanje reagentov in odpadkov).

Radioaktivne odpadke zaprejo v debele kovinske ali betonske posode in jih običajno potopijo v globoke predele oceanov ali odlagajo v opuščenih rudnikih. Problem predstavlja shranjevanje radioaktivnih odpadkov v laboratorijih in njihovo odvažanje na primerna mesta.

Zaradi naštetih pomanjkljivosti so RIA-metode začele izpodrivati druge tehnike, zlasti EIA (encim imuno poskus - angl. »assay«). Pomanjkljivost EIA-metod je premajhna točnost rezultatov. Zaradi prednosti RIA-metod so te kljub številnim pomanjkljivostim še vedno nenadomestljive pri številnih diagnostičnih preiskavah.



PONOVIMO

1. Kaj so radioizotopi?
2. Kaj so alfa, beta in gama žarki?
3. Ali je reakcija med antigenom in protitelesom stehiometrična? Razložite odgovor.
4. Kako izmerimo koncentracijo preiskovane snovi na podlagi imunokemijske reakcije?
5. Opišite metodo kompetitivne inhibicije.
6. Navedite prednosti in pomanjkljivosti RIA-metod.
7. Kako moramo ravnati z radioaktivnimi odpadki?
7. Zakaj RIA-metode kljub nevarnosti za zdravje in okolje še vedno uporabljajo?



POVZETEK

Koncentracijo snovi lahko merimo tudi z elektroanaliznimi, termičnimi, separacijskimi in imunokemijskimi metodami. Z elektroanaliznimi metodami merimo pH, koncentracijo nekaterih ionov in parcialni tlak kisika ter ogljikovega dioksida. S termičnimi metodami merimo osmolalnost. Centrifugiranje je ena od najuporabnejših separacijskih metod ločevanja delcev od topila. Število vrtljajev na minuto pri centrifugah je odvisno od polmera centrifuge. Elektroforeza je postopek ločevanja snovi na osnovi njihovega naboja, ločitev pa poteka pod vplivom električnega toka. Uporablja se za ločevanje proteinskih frakcij, hemoglobinov, izoenzimov idr. Večina analiznih metod je danes avtomatiziranih, prednost avtomatizacije pa je večja točnost meritev in prihranek na času. Radiokemijske metode temeljijo na imunokemijski reakciji, reagenti pa so označeni z radioaktivnimi izotopi. So točne, občutljive in specifične, imajo pa tudi številne slabe lastnosti. Ker imunokemijske reakcije niso stehiometrične, je potrebno za določanje koncentracije analita narediti umeritveno krivuljo po točno določenem postopku.



MEDPREDMETNO POVEZOVANJE

Povezava s kemijo:

- ✚ Definicija pojma pH.
- ✚ Stopnja disociacije.
- ✚ Izotopi.

Povezava z analizo kemijo modula fizikalno kemijske laboratorijske metode:

- ✚ Računanje in merjenje pH.
- ✚ Elektrode, električni potencial.

Povezava s tujim jezikom in z IKT:

- ✚ Prevod strokovnih člankov s svetovnega spleta in izdelava slovarja strokovnih izrazov, povezanih z imunokemijskimi metodami.

Povezava z medicinsko mikrobiologijo:

- ✚ Dokaz specifičnih protiteles proti povzročiteljem bolezni.

Povezava z medicinsko biokemijo:

- ✚ Potenciometrično merjenje koncentracije elektrolitov.
- ✚ Izvedba plinske analize in diagnostični pomen.
- ✚ Merjenje znižanja zmrzišča oz. osmolalnosti.
- ✚ Elektroforeza proteinov, lipoproteinov in izoenzimov.
- ✚ Centrifugiranje oborin z običajno centrifugo.
- ✚ Analize seruma z biokemijskimi analizatorji.
- ✚ Dokaz specifičnih proteinov in tumorskih markerjev z imunokemijskimi reakcijami.

Povezava s fiziko in IKT:

- ✚ Dijaki z uporabo učbenikov za fiziko in kemijo ter z ustreznimi elektronskimi orodji pripravijo predstavitev o električnem naboju, toku, napetosti in potencialu ali obnovijo znanje pri tiskem pouku.
- ✚ Dijaki z uporabo učbenika za fiziko in z ustreznimi elektronskimi orodji pripravijo predstavitev o gibanju električnih delcev v električnem polju ali obnovijo znanje pri tiskem pouku.

Povezava z laboratorijsko hematologijo in transfuziologijo:

- ✚ Dokaz talasemije na osnovi elektroforeze hemoglobinov.
- ✚ Dokaz plazmocitoma na osnovi proteinograma in elektroforeze monoklonskih imunoglobulinov.
- ✚ Centrifugiranje krvi z običajno in s hematokritno centrifugo.

- + Analize krvi s hematološkimi analizatorji.
- + Imunokemijsko določanje specifičnih antigenov in protiteles v transfuziologiji.

Povezava z delovno prakso:

- + Analize s hematološkimi in biokemijskimi analizatorji.

Povezava s fiziko, kemijo in IKT:

- + Dijaki z uporabo učbenikov za fiziko in kemijo ter z ustreznimi elektronskimi orodji pripravijo predstavitev o temah: izotopi, radioaktivnost, merjenje radioaktivnosti, zaščita pred radioaktivnimi žarki, problematika shranjevanja radioaktivnih odpadkov ali obnovijo znanje pri timskem pouku.

TERMINOLOŠKI SLOVAR

Ab	protitelo (angl. Antibody)
aberracija	odklon, popačenje
absorbanca	$\log I_0/I$
absorpcijska krivulja	graf, ki prikazuje odnos med izmerjenimi absorbancami pri različnih valovnih dolžinah v določenem spektralnem območju
Ag	telesu tuja snov, ki v organizmu sproži tvorbo protiteles, beseda je sestavljena iz angl. besed »Antibody g enerator«
analit	snov, ki jo analiziramo
Beer-Lambertov zakon	ponazarja linearen odnos med absorbanco in koncentracijo in logaritmičen odnos med transmitanco in koncentracijo
»carry over« efekt	vpliv predhodnega vzorca pri pretočnih kivetah
»cut off« filtri	filtri, ki izrežejo določen spekter svetlobe, ostalo svetlobo pa prepustijo skoraj 100 %
čoper	prekinjevalec žarka
črtasti spekter svetlobe	posamezne valovne dolžine v določenem spektralnem območju svetlobe
disperzni sistem	prizma ali uklonska mrežica, njuna vloga pa je, da razpršita polikromatsko svetlobo na posamezne valovne dolžine
ekscitacija	povzročitev prehoda elektronov v višji energetski nivo
elektroforeza	prehajanje nabitih delcev skozi neki nosilec v električnem polju
enožarkovni instrument	nima primerjalnega žarka svetlobe
fluorescenca	oddajanje svetlobe pod vplivom obsevanja snovi s svetlobo določene valovne dolžine
fosforescenca	oddajanje svetlobe potem, ko smo snov že prenehali obsevati
fotometrija	splošen naziv za merjenje intenzitete svetlobe, v ožjem pomenu besede pa pomeni merjenje svetlobe pasu valovnih dolžin
indikatorske elektrode	njihov potencial je odvisen od raztopine, v katero so potopljene
kiveta	posodica za vzorec, v katero vstopa in iz katere izstopa žarek svetlobe določene valovne dolžine
kolorimetrija	merjenje intenzitete obarvane svetlobe (vidne svetlobe)
kompensacija	nadomestilo, izravnava
luminiscenca	skupen izraz za fluorescenco in fosforescenco
monokromator ali monohromator	sestavni del optičnega instrumenta, katerega vloga je, da iz polikromatske svetlobe izbere eno samo valovno dolžino; v starejši literaturi navajajo kot monokromator prizmo, kar pa ni točno, ker je prizma le sestavni del monokromatorja
monokromatska svetloba	svetloba ene valovne dolžine
optični filter oz. filter	prepušča pas valovnih dolžin
pas valovnih dolžin	ožje valovno območje svetlobe

polikromatska svetloba	več valovnih dolžin
polprepustno ogledalo	ogledalo, ki del svetlobnega žarka prepusti, del pa odbije
referenčne elektrode	imajo konstantni električni potencial, ki ni odvisen od raztopine, v katero so potopljene
RIA	angl. R adio I mmuno A ssay ali radioimunski poskus
RLS	angl. R elative L ight S cattering ali relativna sipana svetloba
S	oznaka za turbiditeto ali motnost
slepi vzorec	vzorec, ki ga uporabljamo za umerjanje instrumenta na ničlišče
spekter svetlobe	širše valovno območje svetlobe, npr. vidni spekter
spektrometrija (spektrofotometrija)	merjenje intenzitete svetlobe določene valovne dolžine, ki prehaja skozi vzorec
transmitanca (prepustnost)	I/I_0 ali delež svetlobe, ki jo prepusti kiveta v odvisnosti od vpadne svetlobe
umeritvena krivulja	diagram, ki prikazuje odnos med izmerjenimi vrednostmi (A, F, RLS ...) in koncentracijami standardnih raztopin
valovno območje	območje svetlobe, ki ga prepušča filter ali monokromator (angl. <i>bandwidth</i>).
zvezni spekter svetlobe	vse valovne dolžine svetlobe v določenem spektralnem območju

ABECEDNO KAZALO

A

absorpcijske krivulje	26
absorpcijski filtri	41
absorpcijski spekter	18
analiza z reagenti, ki so vezani na trdne delce	95
analizatorji	120
atomska absorpcijska spektrometrija	21, 69
atomska spektrometrija	68
atomski fluorescenčni spektrometer	89

B

Beer-Lambertov zakon	21
----------------------------	----

C

centrifuge	112
centrifugiranje	111

Č

čitalec	11
črtasti izvori svetlobe	37

D

denzitometer	116
dvožarkovni fluorimeter in spektrofluorimeter	88
dvožarkovni fotometer	63

E

elektroanalizne metode	100
elektroforeza	114
elektroosmoza	119
elementi za izbiro valovne dolžine	40
emisijski spekter	18
encimske elektrode	106
eno in večkanalni analizatorji	99
enožarkovni fluorimeter	87
enožarkovni fotometer	61
enožarkovni spektrometer	65

F

fluorimetrija	83
fosforescenca	83
fotocelica	56
fotodiode	58
fotoelement	55
fotometer	61
fotometrija	21
fotonski detektorji	55
fotopomnoževalka	57
fotoprevodniški detektorji	58

H

halogenska žarnica	36
hematološki analizatorji	122

I

indikatorske elektrode	102
interferenčni filtri	42, 43
iono-selektivne elektrode (ISE)	103
izhodni pretvornik ali čitalec	9
izvori svetlobe	35

K

kapilarna elektroforeza	117
kivete	51
kolorimetrija	21
kompetitivna inhibicija	128
krioskopska metoda	107
kсенonova žarnica	37

L

laser	38
-------------	----

M

merjenje fluorescence	84
molarna absorbanca (ϵ)	23
monokromatorji	45
monokromatorske reže	48
monokromatska svetloba	21
monokromatski izvori svetlobe	38
moteča sevanja monokromatorja	49

N

napake pri merjenju s plamenskimi fotometrom	82
nastanek električnega potenciala	101
nefelometer	93
nefelometrija in turbidimetrija	91
neplamenski atomski absorberji	74

O

obdelovalec signala ali procesor	11
okenca monokromatorja	49
optični filtri	40
osmometer	109
osnove termičnih in krioskopskih metod	107

P

pas valovnih dolžin	21
pCO ₂ -elektroda	105
plamenska fotometrija	79
plamenski fotometer	79

plamenski fotometer z uporabo internega standarda	80
plinske analize krvi	105
pO ₂ -elektroda	105
polikromatska svetloba	21
pretočne kivete	52
prizme	46
proteinogram	116

R

radioimunski poskus (radioimmunoassay) - RIA128	127
RCS	112
reflektometrija in reflektometri	96

S

sestava reflektometra	96
sestavljene optični filtri	44
sestavni deli instrumentov za optično spektrometrijo	33
spekter svetlobe	21
spektrofluorimeter	87
spektrometer (spektrofotometer)	64
spektrometrija	21

T

teorija emisije svetlobe	78
turbidimeter	92
tvorec signala	9

U

uklonske mrežice	47
umeritvena krivulja pri fluorimetričnih meritvah	88

V

veljavnost Beer-Lambertovega zakona	25
vhodni pretvornik ali detektor	9, 11
vidni spekter	16
vodikova in devterijeva žarnica	36
volframova žarnica	35
vrste radiacij	14

Z

zaslon	66
zvezni izvori svetlobe	35



1. Curtius, H. C., Roth, M. (1974). Clinical Biochemistry. W.de G.
2. Henry, R. J. in sod. (1974). Clinical Chemistry, Principles and technics, 2nd ed. Hagerstown: Medical Department.
3. Kako deluje LASER? (1991). Sodobna tehnika II. Ljubljana: Tehniška založba Slovenije.
4. Malešič, I. (1993). Suha kemija v laboratorijski diagnostiki. Farmacevtski vestnik; 43: 37–43. Ljubljana.
5. McKie, R. (1987). LASERS, Alladin Books.
6. Marc, J. (junij 1995). Kislinsko-bazično ravnovesje in plinska analiza krvi, Zbornik predavanj. Seminar za tehnike laboratorijske medicine. Ljubljana: Slovensko združenje za klinično kemijo.
7. Mlekuž, S. (1995). Teoretične osnove in uporabnost fluorescenčne spektroskopije v farmaciji. Farmacevtski vestnik; 46: 305–328. Ljubljana.
8. Pešić, D. in sod. (1981). Atomska apsorpciona i emisija spektrometrija. Institut za nuklearne nauke »Boris Kidrič«. Vinča-Beograd: Centar za permanentno izobrazovanje »Škola«.
9. Pivk, B. (2001). Analizna kemija - Instrumentalne analize, Ljubljana: SŠFKZ.
10. Prezelj, M. (maj 1995). Osnove in teorija refleksijske spektrometrije. Zbornik predavanj. Seminar za tehnike laboratorijske medicine. Ljubljana: Slovensko združenje za klinično kemijo.
11. Purdy, W. C. (1965). Electroanalytical methods in biochemistry. McGraw-Hill book company.
12. Skoog, A.D. (1994). Analytical Chemistry, An introduction, 6th ed. Philadelphia Saunders College.
13. Skoog, A.D., West M.D. (1976). The Fundamentals of Analytical Chemistry. 3rd ed. New York, Holt Reinhart Winston.
14. Skoog, A. D., West, M.D., Holler, J. E. (1996). The Fundamentals of Analytical Chemistry, 7th ed. Philadelphia Saunders College.
15. Skoog, A. D., F. J. Holler, A. T. Nieman. (1997). Principles of instrumental analysis, 5th ed.. Saunders College.
16. Štravs, B. (1988). Medicinska biokemija. Zagreb.
17. Velika ilustrirana enciklopedija.(1983). Znanost: Mladinska knjiga.
18. Kapilarna elektroforeza. (2010). Pridobljeno 15. marca:
http://sl.wikipedia.org/wiki/Kapilarna_elektroforeza.
19. Veber, M. (2010). Elektroanalizne metode - osnove. Pridobljeno 5. junija 2010:
<http://www.fkkt.uni-lj.si/attachments/dsk5824/farmacija-elektrokemija1.ppt>.
20. Veber, M. (2010). Atomska spektroskopija. Pridobljeno 5. junija 2010:
http://www.fkkt.uni-lj.si/attachments/dsk6031/farmaceuti-atomska_spektrometrija.ppt.

21. pH-meter. Pridobljeno 15. junija 2010:
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0f/PH_Meter.jpg.
22. Ultravijolčno valovanje. Pridobljeno 25. septembra 2010:
http://sl.wikipedia.org/wiki/Ultravijoli%C4%8Dno_valovanje.