

Turbidimetrie a nefelometrie

Soustava, která obsahuje alespoň dva druhy hmoty, přičemž jeden druh je rozptýlen ve druhém ve formě více nebo méně jemných částic. Rozptýlený druh se nazývá **disperzní podíl**, spojitý druh **disperzní prostředí**. Pod pojmem druh hmoty se rozumí složka nebo fáze. Disperzní podíl může i nemusí představovat samostatnou fázi a svým chemickým složením se může, ale nemusí vždy lišit od disperzního prostředí. Podle toho mluvíme o **disperzní fázi** nebo **disperzní složce**. Převážná většina disperzí patří mezi vícesložkové soustavy.

Existuje mnoho typů disperzních soustav, které bývají klasifikovány podle různých hledisek:

- podle počtu fází na systémy
 - *homogenní* - disperzní podíl i disperzní prostředí tvoří jednu fázi,
 - *heterogenní* - disperzní podíl je od disperzního prostředí oddělen fázovým rozhraním;
 podle skupenství disperzního prostředí a disperzního podílu bývají heterogenní soustavy dále děleny:

Disperzní prostředí	Disperzní podíl	DISPERZE	
		koloidní	hrubé
plynné	plynný	–	–
	kapalný	aerosoly (mlhy)	děšť, mlhy
	tuhý	aerosoly (dýmy)	prach, dýmy
kapalné	plynný	pěny	bubliny, pěny
	kapalný	emulze	emulze
	tuhý	lyosoly	suspenze
tuhé	plynný	tuhé pěny	tuhé pěny, minerály s uzavřenými plyny
	kapalný	tuhé emulze	tuhé emulze, minerály s uzavřenými kapičkami
	tuhý	tuhé soly	tuhé směsi, např. eutektika

- podle počtu molekul v částici disperzního podílu
 - systémy *molekulární*: analytické disperze a roztoky makromolekul,
 - systémy *polymolekulární*: asociativní koloidy, lyofobní soly a hrubé disperze;
- podle velikosti částic disperzního podílu (lineárního rozměru d)
 - hrubé disperze - $d > 10^{-6}$ m,
 - koloidní disperze - 10^{-9} m $< d < 10^{-6}$ m,
 - analytické disperze - $d < 10^{-9}$ m (pravé roztoky);
- podle tvaru částic
 - globulárně disperzní – s izometrickými částicemi
 - laminárně disperzní – s anizometrickými částicemi, jejichž jeden rozměr je řádově menší než ostatní,
 - fibrilárně disperzní – s anizometrickými částicemi, jejichž jeden rozměr je řádově větší než ostatní;
- podle struktury disperzního podílu
 - na systémy s disperzním podílem ve formě částic,
 - na systémy, u nichž částice disperzního podílu vytvářejí souvislou prostorovou síť, která prostupuje kapalně disperzní prostředí (gely);
- podle rozdělení velikosti částic
 - monodisperzní (uniformní) – s částicemi stejné velikosti (s výjimkou analytických disperzí se vyskytují velmi zřídka),
 - paucidisperzní, obsahující několik diskrétních velikostních frakcí částic
 - polydisperzní (neuniformní) – obsahují částice mnoha různých velikostí

Rovnice pro intenzitu světla rozptýleného jednotkou objemu zředěné (nikoliv *krajně* zředěné) disperzní soustavy s kapalným disperzním prostředím a malými disperzními částicemi ($< \lambda/20$), odvozená na základě flukтуаční teorie:

$$I_{\theta} = I_0 \frac{4\pi^2 n_0^2 F(\theta) w}{N_A \lambda^4 r^2 \left(\frac{1}{M} 2Bw + \dots \right)} \left(\frac{dn}{dw} \right)^2$$

(Einsteinova-Debyeova rovnice pro rozptyl světla)

kde I_{θ} je intenzita světla rozptýleného objemovou jednotkou disperzní soustavy pod úhlem θ

I_0 je celková intenzita dopadajícího záření

n je index lomu disperzní soustavy

n_0 je index lomu čistého disperzního prostředí

w je hmotnostní koncentrace

M je molární hmotnost disperzního podílu

λ je vlnová délka primárního a rozptýleného světla

r je vzdálenost detektoru, měřícího intenzitu, od zdroje rozptýleného světla

θ úhel pozorování, sevřený primárním paprskem a paprskem rozptýleného světla, který dopadá do detektoru

$F(\theta)$ je funkce úhlu pozorování jejíž tvar závisí na charakteru primárního paprsku B druhý viriální koeficient – stejný jako u viriálního rozvoje pro vyjádření koncentrační závislosti osmotického tlaku, záporné hodnoty B charakterizují disperzní systémy, ve kterých převládají přitažlivé síly mezi částicemi. Disperzní částice pak jeví tendenci ke shlukování – proto je v daném okamžiku v některých objemových elementech koncentrace podstatně vyšší než v jiných. Nastávají silné fluktuace – se zápornou hodnotou B je spojena velká intenzita rozptýleného světla. Naopak při kladných hodnotách B převažuje vliv odpuzivých sil, které vedou k rovnoměrnějšímu rozdělení disperzních částic v prostoru, a tedy ke snížení průměrné fluktuace a nižší hodnotě I_θ .

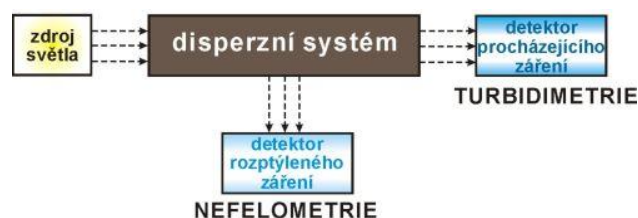
Turbidimetrie a Nefelometrie jsou metody využívající rozptylu světla částicemi v suspenzních a koloidních roztocích. Liší se jen umístěním detektoru. Slouží k určování koncentrace suspendované látky. Ke stanovení se používá metoda kalibrační křivky.

Nefelometrie

Nefelometrie měří rozptýlené záření nejčastěji ve směru kolmém na vstupující paprsek a užívá se jí pro nižší koncentrace rozptýlených částic. V případě turbidimetrie je detektor umístěn v ose paprsku a měříme tak záření prošlé vzorkem, které je ochuzené o rozptýlenou složku záření, je vhodná pro koncentrovanější roztoky.

Optické analytické metody využívající rozptylu světla na heterogenních částicích v koloidních roztocích a mikrosuspensích (turbidimetrie, nefelometrie) vychází ze základních podmínek pro měření:

- využívají zdroje UV-VIS monochromatického záření
- velikost částic musí být jednotná a blízká vlnové délce použitého záření
- reakční prostředí (koncentrace činidel, teplota) ovlivňuje velikost částic
- částice nesmí během měření sedimentovat – proto se přidávají ochranné koloidy
- rozptyl je založen na Tyndallově efektu (rozptýlené záření na částicích má stejnou vlnovou délku jako záření dopadající na koloidní částice)
- intenzita rozptýleného záření závisí také na objemu částic v objemové jednotce (na koncentraci).

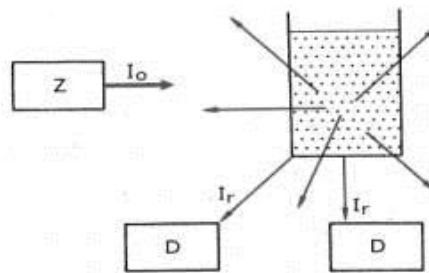


Obrázek 1: Rozdíly turbidimetru a nefelometru

Rozptýlené světlo (I_r) vychází z roztoku všemi směry (tzv. Tyndallovo světlo) a měří se (D) pod úhlem, který je odlišný od směru dopadajícího záření.

Pro nefelometrické měření jsou používány:

- nefelometrický nástavec k fotometru (Tyndallovo světlo se sleduje pod úhlem 90°)
- speciální přístroje – nefelometry



Obrázek 2: Schéma nefelometru

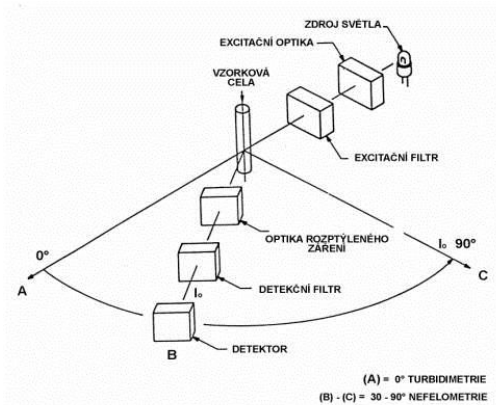
Konvenční nefelometry

Světelným zdrojem je obvykle žárovka s halogenovou atmosférou nebo xenonová výbojka. Optika těchto přístrojů obsahuje navíc interferenční filtr, neboť světelný zdroj poskytuje polychromatické světlo. Detektor je nastaven pod úhlem 70° až 90° , protože stupeň směrovosti světla z konvenčního zdroje je nízký.

Laserový nefelometr

Laserový nefelometr používá jako světelného zdroje helium-neonového laseru. Tento zdroj mono-chromatického světla je mimořádně intenzivní a má vysoký stupeň směrovosti. Laserový paprsek prochází přes kyvetu s měřeným roztokem a rozptýlené světlo se sleduje detektorem nastaveným pod úhlem 5 až 35° (fotonkou nebo fotonásobičem).

Pro přibližně stejné přístrojové vybavení obecně platí, že nefelometrie je asi o jeden řád citlivější než turbidimetrie. Schéma instrumentálního uspořádání je patrné z obrázku.



Obrázek 3: Rozdílné umístění detektorů pro turbidimetrii a nefelometrii, schéma obou přístrojů

Při nefelometrii se měří záření rozptýlené na částicích (obvykle komplexů antigen-protilátka), měří se tedy intenzita difúzního rozptylu. Vlnová délka difúzně rozptýleného záření a záření zdroje je stejná, i když v malém rozsahu dochází na částicích k emisi záření o delší vlnové délce. Optimální poměr mezi vlnovou délkou záření monochromatického zdroje a poloměrem částic je 10:1. Nefelometrické měření se provádí nejčastěji ve dvou modifikacích, „end-point“ nebo kinetické.

Měření „end-point“

- měření po uplynutí určitého časového intervalu
- nejčastěji jde o dobu 30-60 minut, ale je známo, že již po 10 minutách je přítomno dost imunokomplexu pro reprodukovatelné měření
- spolehlivost stanovení je též značně závislá na způsobu uchovávání reakčního produktu

Kinetické měření

Využívá vyhodnocení rychlosti nárůstu zákalu v čase

Lze stanovit minimálně 1 mg/l; vhodným přístrojovým uspořádáním za využití výpočetní techniky je možno mez stanovitelnosti snížit o jeden až dva řády

Zákalové metody ve vodném prostředí jsou používány především pro imunochemické reakce, vyznačují se vysokou přesností a dobrou reprodukovatelností.

Závislost odezvy nefelometru na koncentraci stanovované bílkoviny je obecně nelineární. Jde většinou o polynom druhého či třetího řádu. V případě vhodně zvolených podmínek je možno závislost aproximovat proložením přímkou. Obecně platí, že linearita měření je tím lepší, čím je koloidní disperze více naředěna nebo je menší velikost částic.

Stanovení specifických proteinů

Příkladem aplikace nefelometrie je stanovení jednotlivých plazmatických bílkovin. V současné době se prakticky výhradně používají imunochemické metody. Jedná se o skupinu metod využívající specifickou reakci antigenu (plazmatické bílkoviny) s protilátkou (frakce zvířecího hyperimunitního séra). Reakcí antigenu s protilátkou vznikají imunokomplexy, na jejichž vizualizaci a kvantifikaci jsou založeny jednotlivé metodiky stanovení. Laboratorně velmi výhodné (z hlediska rychlosti provedení, přesnosti i produktivity práce) jsou optické metody, kdy reakce probíhá v kapalném prostředí. V pufru (nejčastěji fosfátový) za přídavku polyetylenglykolu 6 000 nastane precipitace imunokomplexů. Jejich koncentrace je při stálém nadbytku protilátky úměrná koncentraci antigenu, tj. stanovované bílkoviny ve vzorku.

Interference

Na zákalové měření koloidů mají vliv vlastní zákalové séra. Silně lipemická séra je nutno ze zpracování vyřadit. Důvodem je hlavně obtížnost měření malého přírůstku turbidance (absorbance, zákalových jednotek) komplexů antigen-protilátka na relativně vysokém pozadí zákalu. Při nefelometrickém měření se vzorky ředí ve vyšším poměru než u turbidimetrie; ani tam by však neměl porovnávací roztok vzorků přesáhnout 25 % RLS. Barviva, produkty hemolýzy a žlučové pigmenty (ikterická a hemolytická séra), mají větší vliv na nefelometrii než na turbidimetrii.

Iontová síla vzorků

Ve fyziologickém rozmezí nemá významný vliv na reakci antigen-protilátka. Na stanovení má vliv použitý materiál reakčních nádob a jejich tvar (rovnoměrnost tvorby koloidně-disperzních komplexů a jejich stabilita), osvětlení (hlavně vlnové délky mimo viditelnou oblast) a teplota stanovení. Důležitý je vliv polyethylenglykolu.

Titration protilátek

Jde o orientační údaj, spíše jen o relativní hodnoty. Titry dvou šarží protilátek proti jedné bílkovině se mohou i dost výrazně lišit. S tím je třeba počítat při ředění protilátky a eventuální snížení titru kompenzovat nižším ředěním antiséra.

Některá omezení

Pro stanovení plazmatických bílkovin by se zásadně měly používat pouze protilátky k tomu účelu připravené. Pro zákalové měření koloidů jde o imunoglobulinové frakce příslušných antisér.

Afinita a avidita

Vysoká **afinita** znamená vysokou „přichylnost“ protilátek k jejich odpovídajícím antigenním epitopům. Je podstatná pro rychlost reakce, zatímco **avidita**, která ovlivňuje tvorbu komplexů (částic), je důležitá pro měření „end-point“. Obě charakteristiky nejsou nutně paralelní. Někdy může docházet i k vyloučení precipitátu, jestliže avidita a afinita jsou příliš vysoké. Tomu se dá zabránit změnou protilátky nebo snížením koncentrace polyetylenglykolu. Velmi rychlé reakce s vysoce afinními protilátkami mohou také být značným problémem při práci s automatickými analyzátory.

Turbidimetrie

Turbidimetrie je založena na měření stupně zákalu (turbidity). Na částicích dochází k rozptylu záření a částečně i jeho absorpci. Sleduje se pokles intenzity záření procházejícího absorbuující a rozptylující vrstvou. Měření se provádí v přímém směru, v ose světelného paprsku zdroje jako u fotometrických postupů. Při turbidimetrických měřeních je obtížné připravit reprodukovatelně suspenzi měřené reakční směsi, aby byla dostatečně stálá. K tomu účelu se používají ochranné koloidy (např. polyethylenglykol). Fotometrická citlivost je nepřímě úměrná vlnové délce, proto je vhodné měřit při nejkratší vlnové délce dosažitelné standardním fotometrem (340 nm v blízké UV oblasti).

Měření se provádí v přímém směru, v ose světelného paprsku zdroje. Ve zvláště zředěných disperzích (roztocích) je přechod mezi absorpční fotometrií a turbidimetrií neostrý, a proto lze měřenou veličinu T_b (turbidance), již odpovídá v absorpčním fotometru A u klasické absorpční fotometrie (absorbance), vyjádřit vztahem

$$T_b = (e + T)cL,$$

kde e je absorpční koeficient, T turbiditní koeficient, c je koncentrace, L je světelná dráha měřicí kyvety.

Závislost turbidance (absorbance) na koncentraci analytu je obecně nelineární (jde většinou o polynom 2. řádu). V případě vhodně zvolených podmínek je možno závislost aproximovat proložením přímkou. Turbidance závisí nepřímě na čtvrté mocnině vlnové délky. Proto se v současné době prakticky výhradně využívá měření v UV oblasti. Výrazný je vliv teploty, která ovlivňuje tvorbu i velikost částic.

K turbidimetrickému měření zákalu se obvykle využívají klasické absorpční fotometry a automatické analyzátory pracující metodou absorpční fotometrie.

Úloha 1: Podrobně se seznamte s obsluhou Turbidimetru HACH a proveďte jeho kalibraci

Pomůcky: Návod k obsluze, kyvety, turbidimetr, automatické pipety, špičky

Chemikálie: standardy 1 NTU a 20NTU, silikonový olej

Postup:

1. Připravte nádobku k použití tak, že ji řádně omyjete miliQ vodou
2. Otřete papírovým kapesníkem
3. Kápněte na každou vnější stěnu nádobky silikonový olej a rozetřete jej přiloženou utěrkou
4. Protřepejte nádobky se standardními roztoky po dobu 2-3 minut, aby se resuspendovaly veškeré částice
5. Protřepané standardy nechejte 5 minut odstát
6. Jemným převrácením lahvíček promíchejte roztoky po dobu 5-7 minut
7. Propláchněte nádobku standardem
8. Naplňte nádobku 5 ml 1.0 NTU standardu a nechejte stát 1 minutu
9. Zavřete nádobku a otřete z ní veškeré nečistoty
10. Vložte nádobku do přístroje
11. Přikryjte nádobku nástavce a vyčkejte 30 sekund
12. Přidržte tlačítko CAL a stiskněte tlačítko READ
13. Po chvíli se na displeji objeví dA
14. Stiskněte tlačítko CAL, na displeji se objeví C1.0 problikávající s 1.0 NTU
15. Naplňte novou nádobku 5 ml standardu 20 NTU a zavíčkujte
16. Odstraňte veškeré nečistoty z povrchu nádobky
17. Vložte nádobku do přístroje, zakryjte a vyčkejte 30 sekund
18. Stiskněte CAL, na displeji se objeví C20 problikávající s 20 NTU
19. Pro ukončení kalibrace stiskněte opět CAL. Na displeji se objeví CLd

Úloha 2: Turbidimetricky určete počet buněk pekařských kvasinek v neznámém vzorku

Pomůcky: Turbidimetr, turbidimetrické kyvety pipety, špičky, falkonky

Chemikálie: pekařské kvasnice, PBS 1x

Postup:

1. Ze zásobního roztoku připravte roztoky pro změření kalibrační přímky 10^3 - 10^7 buněk /ml.
2. Změřte a запиšte hodnoty turbidity pro připravené roztoky.
3. Změřte a запиšte hodnotu turbidity pro neznámý vzorek.
4. Určete koncentraci buněk v neznámém vzorku.

Literatura:

Vinter V a kol.: Experimenty pro přírodovědné kroužky, Přf UP Olomouc, 2013
http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/mereni_rozptylu_svetla.html
http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS3/hypertext/IVABV.htm