

Immunanalitika és fluorimetria laborleirat

A gyakorlat célja (1) egy kompetitív immunoassay elvégzésén keresztül az immunanalitikai módszerek megismerése, (2) fluorimetriás módszerrel egy üdítőital kinin-tartalmának meghatározása, (3) a mennyiségi meghatározás módszerei közül a kalibrációs és a standard addíciós módszer alkalmazása.

A gyakorlatra a **tankönyvből** (Pokol György: Analitikai kémia, Fluoreszcencia spektroszkópia (III.B. 3.2.1) és Immunanalitika (III. D) fejezetek), a **bevezető előadás** anyagából, valamint **ezen jegyzetből** kell felkészülni.

A laborgyakorlat érdemjegye elsősorban a beugró zh eredménye, amelyen a jegyzőkönyv és a gyakorlaton mutatott teljesítmény pozitív és negatív irányba is módosíthat!

A leirat végén található ellenőrző kérdések a felkészülést segítik, a beugró zh kérdései nem feltétlenül ezek közül kerülnek ki.

Immunanalitika

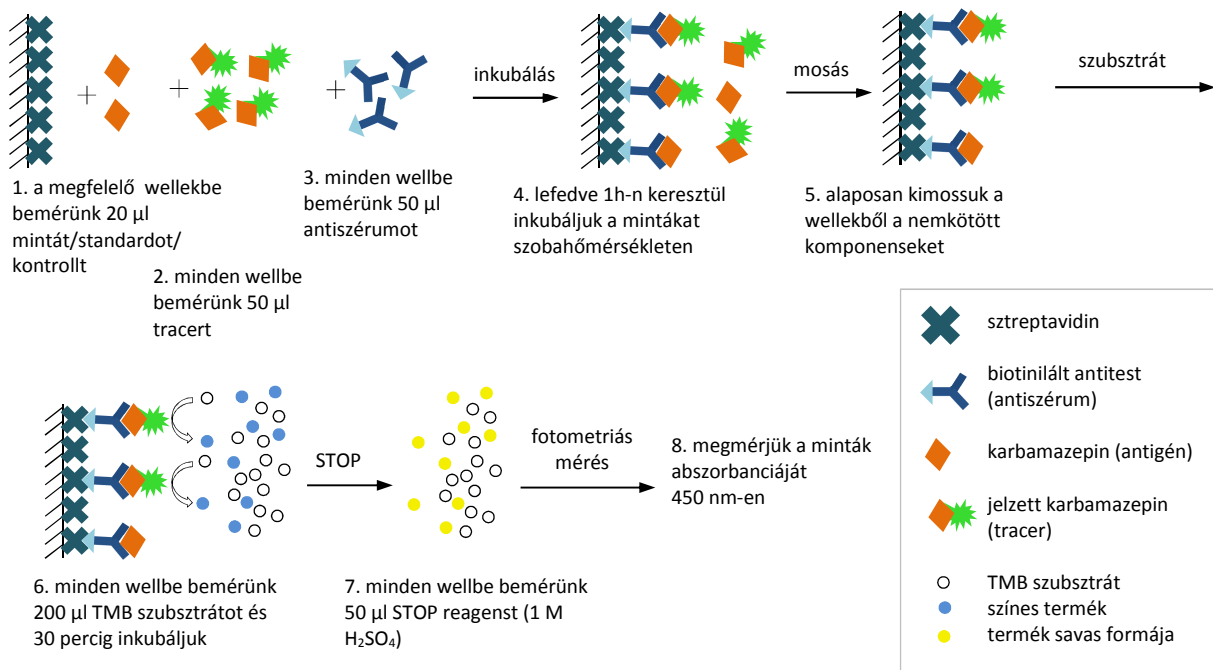
Az immunanalitikai mérést három csoportban fogják végezni, így több lehetősége lesz mindenkinek arra, hogy az immunoassay készlettel dolgozzon. Három egyforma készletet kapnak, de a csoportok között ne cserélgessék a készletek tartalmát.

A mérési módszer elve

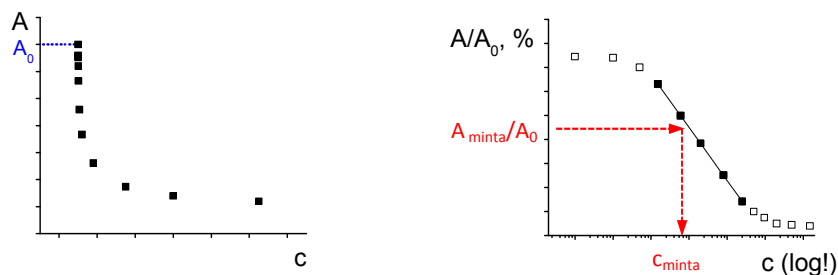
Vízminták karbamazepin tartalmát határozzuk meg, ami egy epilepszia-gyógyszer. A méréshez egy gyári készletet használunk, ami a kompetitív immunoassay elvén alapszik: a mérőedény falára rögzített, korlátozott számú anti-karbamazepin antitest kötőhelyekért verseng a mintában lévő karbamazepin és a mintához ismert mennyiségben adott jelzett karbamazepin (tracer). A vetélkedés eredményeképpen az edényben (wellben) megkötött jelzett karbamazepin mennyisége fordítottan arányos a minta karbamazepin-koncentrációjával. A jelző funkciót tormaperoxidáz (horseradish peroxidase, HRPO) enzim látja el, ami a színtelen tetrametil-benzidin (TMB) szubsztrát hidrogén-peroxiddal való oxidációját katalizálja. A 30 perc alatt keletkezett, színes termék mennyisége fotometriásan mérhető, és egyenesen arányos a wellben megkötött jelzett karbamazepin mennyiségével, ami pedig a minta karbamazepin-tartalmával fordítottan arányos.

A gyakorlaton alkalmazott készletben az antitest rögzítését a sztreptavidin fehérje és a biotin molekula közötti erős kötés kihasználásával oldották meg: a wellék falát sztreptavidinnel vonták be, az anti-karbamazepin antitestekhez pedig biotint kapcsoltak. A wellékhez adott antitest így a biotinton keresztül kikötődik a wellék falán rögzített sztreptavidinhez. A készlet minden szükséges reagenst, és ismert karbamazepin-koncentrációjú kalibráló standardokat tartalmaz. Ezen kívül egy ismert koncentrációjú, de a mérés során ismeretlen mintaként kezelt ún. kontroll mintát is tartalmaz, mellyel a munkánkat ellenőrizhetjük.

A meghatározás menete:



A standardok abszorbanca értékeiből kalibrációs egyenest szerkesztünk: a karbamazepin-koncentrációk **logaritmusának** függvényében ábrázoljuk a mért **relatív abszorbanciákat** (A/A_0 , %-os formában, ahol A_0 a vakmintához tartozó abszorbanca). A vakmintát nem ábrázoljuk, mivel a 0 koncentráció logaritmus nem értelmezett. A széles koncentráció-tartományban felvett adatok fordított S alakú görbét adnak. A középső, közelítőleg lineáris szakaszra egyenest illesztünk, melynek segítségével kiszámoljuk az ismeretlen minta és a kontroll minta karbamazepin-koncentrációját. A kontroll minta számított koncentrációját összevetjük a gyártó által megadott névleges koncentrációjával. Ha az eltérés kisebb, mint $\pm 15\%$, akkor a mérés elfogadható.



Az immunoassay várakozási idejét a jegyzőkönyv megírásával és a másik, fluorimetriás méréssel töltjük ki.

Fluorimetria

Tonik üdítőital kinin-tartalmát határozzuk meg fluorimetriásan. Ezt a mérést az összes hallgató együtt, egy csoportban végzi.

A mérési módszer elve és a műszer felépítése

A fluoreszcencia spektroszkópia a fotolumineszcencia tárgykörébe tartozó módszerek gyakorlatban leginkább elterjedt válfaja. A fotolumineszcencia molekulák, atomok és ionok esetében is megfigyelhető. **Fotolumineszcencia alatt azt a jelenséget értjük, amikor az anyag ultraibolya vagy látható fénysugárzás hatására gerjesztődik, majd az elnyelt energiát fény formájában, atomok esetében az elnyeltnél azonos, molekulák esetében az elnyeltnél nagyobb hullámhosszúságú (kisebb energiájú) fényként sugározza ki.** Az alábbiakban csak molekulák lumineszcenciájával foglalkozunk.

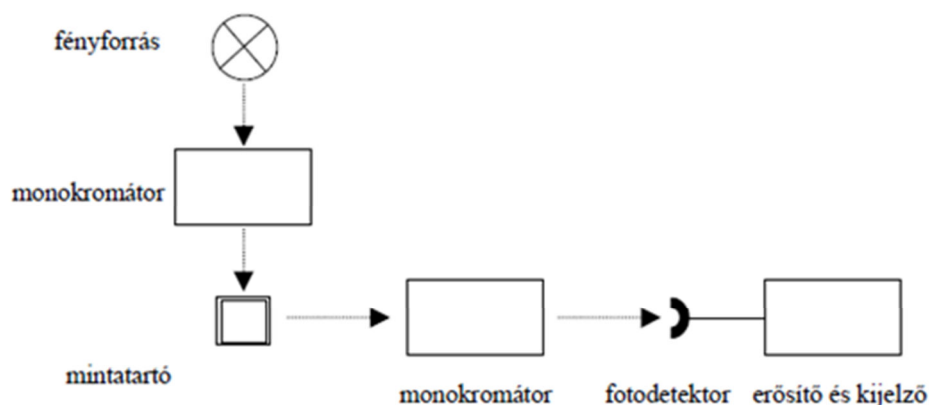
A folyamat során a gerjesztett állapot élettartama különböző lehet. Leggyakrabban az elektron a gerjesztést követően ns- μ s (10^{-9} - 10^{-6} s) időtartam elteltével visszakerül az alacsonyabb energiaszintre, vagyis a fényemisszió gyakorlatilag azonnal megszűnik a fénybesugárzás megszűntével. Ezt a fajta fotolumineszcenciát **fluoreszcenciának** nevezzük. Ezzel a hétköznapok során is találkozhatunk, hiszen UV megvilágítás hatására fluoreszkálnak a másolásvédelem céljából speciális festékkel színezett bankjegyek, ruhadarabok, stb.

A **foszforeszcencia** jelenségekor a fénykissugárzás jóval hosszabb folyamat, a megvilágítás beszüntetése után μ s-tól mintegy 100 másodpercig terjedő ideig, csökkenő intenzitással folytatódik. Ennek oka, hogy gerjesztett állapotban megváltozik az elektron spinállapota, új, az ún. triplett állapot jön létre, melyben az elektronok spinállapota párhuzamos (\uparrow és \uparrow). Mivel a triplett állapotból a szingulett alapállapotba való visszatérés kvantumkémiailag tiltott átmenet, ennek valószínűsége nagyon kicsi (de nem nulla) ezért a fénykissugárzás hosszú ideig tart.

A kémiai analízis gyakorlatában leginkább a fluoreszcenciának jut szerep.

Azok a molekulák mutatnak intenzív fluoreszcenciát, amelyek aromás jellegűek vagy többszörösen konjugált kettős kötést tartalmaznak, továbbá merev, sík szerkezetűek (pl. naftalin, antracén, fenantrén). Minden fluorofor anyag más és más hullámhosszú fényel besugározva készíthető fluoreszkálásra, ráadásul az emittált fénysugárzás spektruma is eltérő anyagról anyagra. Ebből következően a fluoreszcencia spektroszkópia igen szelektív analitikai módszer.

A fluoriméter, vagy másképpen spektrofluoriméter felépítése az alábbi ábrán látható.



1. ábra. A fluoreszcencia spektrofotométerek vázlatos felépítése

Az abszorpciós spektrofotométerekhez képest két jelentős különbséget figyelhetünk meg. Egyfelől itt két monokromátort kell alkalmaznunk, hiszen nemcsak a megvilágító fény hullámhosszúságát kell tudnunk szabályozni, hanem a kibocsátott fényből is ki kell tudnunk választani a kívánt (jellemző) hullámhosszúságú komponenst (egyszerű felépítésű célműszerekben a monokromátorokat színszűrők helyettesíthetik). A másik különbség, hogy itt a megvilágítást és a detektálást végző optikai elemek nem egy tengelyben vannak elhelyezve, hanem azok egymással szöget (leggyakrabban derékszöget) zárnak be. Ez az elrendezés biztosítja ugyanis leginkább, hogy a nem ritkán a besugárzó fényvel azonos hullámhosszon keletkező kibocsátott fénysugárzás¹ mérését ne zavarja az előbbi. A nagyfokú érzékenység oka az, hogy az eltérő gerjesztési és emissziós hullámhossz miatt az emissziós módszerekhez hasonlóan itt is lényegében zérus háttérjel mellett mérhetjük az analitikai jelet.

Megmutatható, hogy a fluoreszcenciás fénysugárzás intenzitása arányos a besugárzó fény intenzitásával, az okozott abszorpcióval és a koncentrációval. Közelebbről, egy adott emissziós hullámhosszon a kibocsátott fényintenzitás a következő általános formulával írható le:

$$I = k \cdot I_0 \cdot \epsilon \cdot c$$

ahol c a minta koncentrációja, ϵ az elnyelés (besugárzás) hullámhosszán érvényes moláris abszorpciós koefficiens, I_0 a besugárzó monokromatikus fény intenzitása, k pedig a küvettára és a műszerre jellemző állandók és a vizsgálandó vegyület ún. kvantumhasznosítását² összegző arányossági állandó. A koncentrációval való lineáris függés csak igen híg oldatokban, közelítőleg a 10^{-4} – 10^{-8} M tartományban teljesül; ezt jelentősen meghaladó koncentrációk esetén a kalibrációs görbe visszahajlását tapasztaljuk, aminek sok esetben az önabszorpció az oka (a fluoreszkáló komponens nem ritkán képes a maga által kibocsátott hullámhosszúságú fényt elnyelni¹). A fluoreszcencia intenzitását gyakran befolyásolja az oldat pH-ja és az oldószer anyagi minősége is. A fluoreszcencia spektrofotometriát különösen aromás szerves vegyületek (pl. növényvédőszer-maradványok, egyes szénhidrogének, stb.) kimutatására és mérésére használják környezeti minták elemzése során. Éppen ezért hasonló anyagok folyadékkromatográfiás analízisekor is használatosak fluoreszcens detektorok.

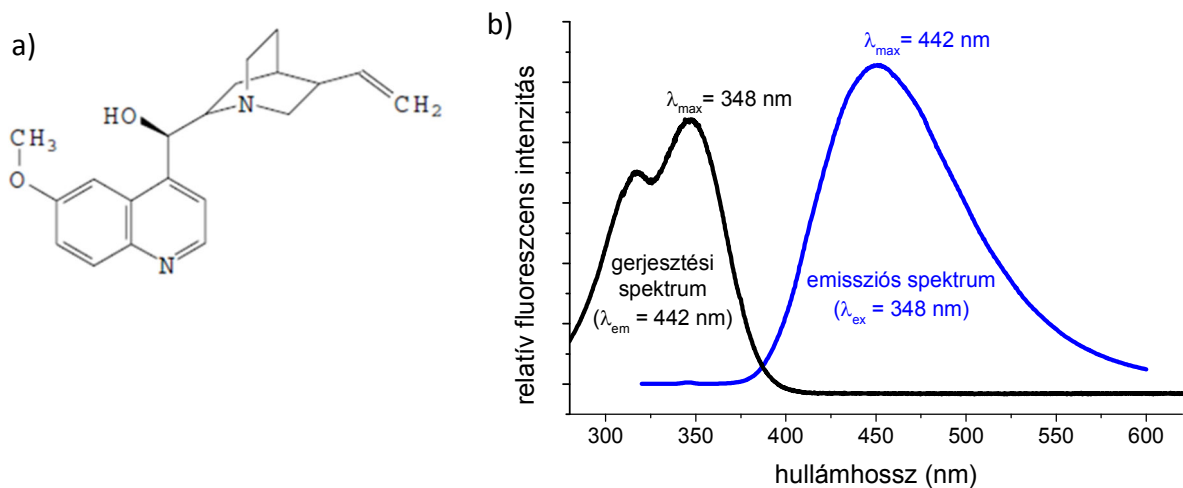
Tonik üdítőital kinin tartalmának meghatározása

Jelen gyakorlat során kinin-szulfát (szabatosan: kininin-szulfát) meghatározását fogják fluorimetriás módszerrel elvégezni. A kinin-szulfát a kinin kénsavval való reakciója eredményeképpen képződő só típusú vegyület. A fluoreszcencia szempontjából természetesen a kinin rész meghatározó, a szulfát sőt jelen esetben csupán annak jobb vízoldhatósága miatt használjuk.

Amint az a kinin alábbi szerkezeti képletén (2. ábra) is látható, ez a vegyület kondenzált gyűrűs molekularészlettel rendelkezik, vagyis várhatóan intenzív fluoreszkálást mutat.

¹ Ahogy a 2. ábrán látható, a gerjesztési spektrum és az emissziós spektrum átlapolhat.

² A kvantumhasznosítás azt jelenti, hogy a gerjesztett molekulák hányadrésze tér vissza alapállapotba fénykibocsátással.



2. ábra. A kinin szerkezeti képlete (a) és fluoreszcencia spektrumai (b)

Szükséges anyagok, eszközök és műszerek

50 ppm koncentrációjú kinin-szulfát törzsoldat

0,05 M H₂SO₄ oldat

7 db 25 cm³-es mérőlombik

2 db 100 cm³-es főzőpohár (a pipettázás segítésére)

1-1 db 200 és 1000 µl-es automata pipetta

küvetta

papírvatta

JASCO FP 920 típusú spektrofлуоримéтер

Először elkészítjük a kalibráló standardokat, meghígítjuk a tonik mintát, és elkészítjük az addicionált tonik mintát is. A kalibráló oldatokat az 50 ppm koncentrációjú kinin-szulfát törzsoldatból állítjuk elő 0,05 M kénsav-oldattal való hígítással. A szükséges koncentrációk: 0,1 ppm, 0,25 ppm, 0,5 ppm, 0,75 ppm és 1 ppm. A tonik mintát 100x-ra hígítjuk. Az addicionált tonik mintához az üdítőt szintén 100x-ra hígítjuk, de a végtérfogatra való kiegészítés előtt hozzáadunk 150 µl törzsoldatot (50 ppm kinin-szulfát).

Ezután sorban lemérjük az oldatokat: először a vakminta (0,05 M kénsav) segítségével háttérkorrekciót végzünk, vagyis a vakmintával nullázzuk a műszert (Autozero). A műszer ekkor eltárolja a vakmintára regisztrált jelet, s ezt a továbbiakban minden minta jeléből kivonja, és a kijelzőn már a háttérrel korrigált jel olvasható le. A kalibráló sort növekvő koncentrációk felé haladva mérjük le, majd a küvetta alapos átöblítése után a mintát, végül az addicionált mintát is megmérjük. A kalibráló oldatokra mért intenzitás értékekből kalibrációs egyenest szerkesztünk, és ennek segítségével meghatározzuk a tonik minta kinintartalmát (→ eredmény kalibrációval). Ezután csak a minta és az addicionált minta eredményét (tehát két adatot) felhasználva, a standard addíciós módszerrel is kiszámoljuk a minta koncentrációját (→ eredmény standard addícióval).

Ellenőrző kérdések

- Adja meg a következő fogalmak jelentését: antitest (ellenanyag), antigén, haptén, epitóp, immunkomplex.
- Milyen molekulák az ellenanyagok? Milyen a szerkezetük?

3. Mi a kémiai alapja az antigén–antitest kölcsönhatás rendkívüli szelektivitásának és erősségének?
4. Hogyan csoportosíthatóak az immunoassay módszerek?
5. Milyen jelölési technikák alkalmazhatóak?
6. Mutassa be egy immunometrikus assay menetét (a mérendő anyag antigén) és kalibrációs görbét.
7. Mutassa be egy kompetitív immunoassay menetét (a mérendő anyag antigén) és kalibrációs görbét.
8. Mit értünk a fotolumineszcencia jelensége alatt?
9. Mi a fluoreszcencia és foszforeszcencia közötti különbség?
10. Mi biztosítja a fluoreszcencia spektroszkópia módszerének nagy szelektivitását és nagy érzékenységét?
11. Mi a fluoreszcencia spektroszkópia tipikus mérési koncentráció tartománya?
12. Milyen képlettel írható le a fluoreszcenciás intenzitás koncentrációfüggése a lineáris tartományban? Minden betűhöz adjon betűmagyarázatot.
13. Szélesebb koncentrációtartományban milyen alakú kalibrációs görbe jellemző a fluoreszcenciás mérésekre és mi ennek az oka?
14. Általában milyen szerkezetű molekulák mutatnak intenzív fluoreszcenciát?
15. Rajzolja fel egy fluoriméter elvi elrendezését.