

SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE ZAMUĆENJA PRI IZVEDBI TIMOL TESTA

DUŠANKA MIKAC-DEVIĆ i K. WEBER

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

(Primljeno 10. VIII 1962)

Izvršena su spektrofotometrijska određivanja zamućenja standardnih otopina barijeva sulfata za Mac Laganov timol test uz primjenu različitih fotometrijskih uređaja. Radeno je aparatima (turbidimetrima), kojih akceptor zračenja registrira samo paralelno usmjereno svjetlo, kao i aparatima na kojih receptor zračenja djeluje još i u objektu difuzno raspršeno svjetlo. Utvrđeno je da se u prvom slučaju dobivaju bolji i pouzdaniji rezultati. Tindalometrija nije prikladna za izvedbu timol testa. Utvrđeni su i drugi pokusni uvjeti koji daju optimalne rezultate kod turbidimetrijske izvedbe timol testa.

Spektralno fotometrijski mjerni postupci praktički se pretežno upotrebljavaju u *apsorpciometriji* za mjerenje apsorpcije svjetla određene dužine vala u nekim objektima analize, a u svrhu određivanja koncentracije tvari. Zapravo se mjeri ekstinkcija, djelomično gašenje svjetla, koja je uzrokovana apsorpcijom, a predstavlja linearnu funkciju koncentracije. Međutim, može ekstinkcija biti uzrokovana i raspršivanjem svjetla u mutnim koloidnim sistemima, pa će između *zamućenja* takvih sistema (otopina, aerosola i sl.) i njihove ekstinkcije, koja se mjeri spektrofotometrijski, postojati i jednostavni funkcionalni odnos. Zamućenje se može mjeriti načelno na dva načina:

1. mjeri se intenzitet raspršenog svjetla (tindalometrija),
2. mjeri se intenzitet svjetla koje prolazi kroz mjerni uzorak, odnosno, mjeri se ekstinkcija toga uzorka (turbidimetrija).

Prvi način mjerenja se više upotrebljava pri rješavanju znanstvenih problema, naročito na polju koloidne kemije, a drugi način veoma često služi za rutinsko određivanje koncentracije. Turbidimetrija, koja nas dje jedino zanima, može načelno poslužiti za određivanje koncentracije tvari koja stvara koloidno disperznu fazu, ali i za određivanje koncentracije tvari koja uzrokuje stvaranje koloidno disperzne faze neke druge tvari. U jednom i u drugom slučaju se praktički najviše radi na temelju *baždarnih krivulja* (pravaca), koje predstavljaju grafički

prikaz funkcionalnog odnosa turbidimetrijski mjerene ekstinkcije (zamućenja) prema koncentraciji tvari koja se koloidno taloži ili koja uzrokuje koloidno taloženje tvari kojoj se zamućenje mjeri.

Pri izvedbi mjerenja zamućenja (ekstinkcije, optičke gustoće) koloidno disperznih sistema pokazale su se neke teškoće koje su u vezi s upotrebljenom aparaturom, a koje su već dulje bile poznate i proučene pri određivanju optičke gustoće razvijenih fotografskih slojeva. Pokazalo se, naime (1), da postoji razlika u vrijednostima optičke gustoće, koja je dobivena mjerenjima u paralelno usmjerenom svjetlu (D_p), prema vrijednostima gustoće u difuznom svjetlu (D_d). Budući da koloidni sistemi redovno difuzno raspršć primarno svjetlo koje pada na njih, od navedenih načelno različitih optičkih gustoća (D_p i D_d) će se jedna ili druga pojaviti kao rezultat mjerenja, već prema principu upotrebene fotometrijske aparature. Bitna je pri tom udaljenost između objekta mjerenja i receptora zračenja fotometrijske aparature.

Ako na koloidni objekt, npr. zamućena otopina (hidrosol), pada paralelno usmjereni snop svjetla (S na slici 1a), taj objekt (K) će oslabiti svjetlo zbog difuznog raspršivanja. Kad se receptor zračenja (A) nalazi u neposrednoj blizini objekta, na taj receptor će djelovati svjetlo koje prolazi kroz objekt, ali i jedan dio difuzno raspršenog svjetla. Poradi djelovanja te komponente svjetla, optička gustoća će biti nešto umanjena. Mjeri se D_d .

Kad se, naprotiv, pod inače jednakim pokusnim uvjetima akceptor zračenja (A) nalazi u većoj udaljenosti od koloidnog objekta (K) prema slici 1b, na akceptor će djelovati samo svjetlo koje paralelno usmjerenom prolazi kroz objekt. Mjeri se D_p , pri čemu vrijedi:

$$D_p > D_d \quad (1)$$

Ovaj zaključak se može formulirati još na idući način: Ako se intenzitet primarnog svjetla označi sa J_0 , intenzitet nepromijenjeno propuštenog svjetla sa J_p , intenzitet difuzno raspršenog svjetla sa T , a apsorbirano svjetlo sa A , vrijedit će za navedeni prvi slučaj:

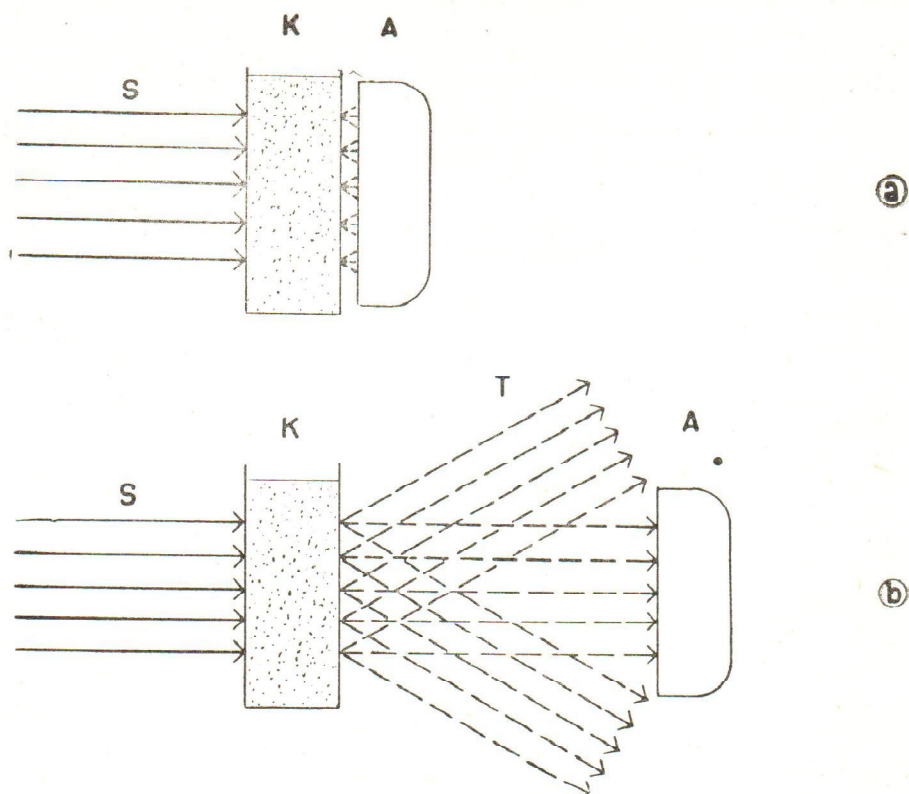
$$a) J_0 - A = J_p + T$$

Fotometrom se mjeri $J_p + T$. Za drugi slučaj, međutim, vrijedi:

$$b) J_0 - A - T = J_p \quad (3),$$

a receptor zračenja fotometra registrira u ovom slučaju samo J_p .

Tindalometrijsku aparaturu treba graditi tako, da njezin receptor zračenja prima samo raspršeno svjetlo T . Turbidimetrijska aparatura će, naprotiv, biti najbolja ako na njezin receptor zračenja djeluje samo svjetlo J_p .



Sl. 1. Sheme za princip turbidimetrijske aparature. *S* primarno svjetlo, *K* koloidno disperzni objekt (otopina), *A* akceptor zračenja (fotoelemeant, fotostanica, okular vizuelnog fotometra), *T* raspršeno (Tyndallov) svjetlo; *a* receptor zračenja prima paralelno usmjereno kao i difuzno raspršeno svjetlo, koje prolazi kroz objekt; *b* receptor zračenja prima samo paralelno usmjereno svjetlo, koje prolazi kroz objekt

Kod praktičke izvedbe turbidimetrijskih mjerenja upotrebljavaju se danas veoma često fotoelektrični spektralni fotometri, koji ne ispunjavaju naprijed skicirane uvjete, a osim toga daju još i neke druge greške. O tim greškama u turbidimetrijskim mjerenjima egzaktno su diskutirali *W. Heller* i *R. Tabibian* (2), a izrađeni su i dodatni uređaji za komercijalne spektralne fotometre (3), koji te greške eliminiraju. Bilo je, međutim, od interesa utvrditi kako se mogu primijeniti obični komercijalni spektralni fotometri s različitim konstrukcijama, bez posebnih dodatnih uređaja, pri izvedbi rutinskih turbidimetrijskih mjerenja na polju medicinsko kemijske analize.

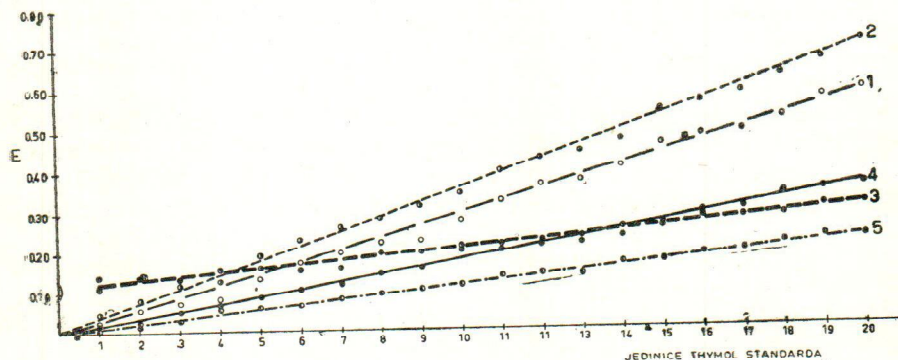
U medicinskoj biokemiji postoje različiti testovi mjerenja zamućenja koloidnih otopina. Jedna od važnih metoda za diferenciranje povećanja

pojedinih globulinskih frakcija bjelančevina je *test timol zamućenja* (4) kao funkcionalna proba za rad jetrene stanice. Djelomično obaranje bjelančevina provodi se u veronal puferu $\text{pH} = 7,8$ zasićenom otopinom timola, a nastalo zamućenje uspoređuje se prema originalnom postupku sa 20 standardnih zamućenja otopine barijeva sulfata. Metoda je kasnije modificirana (5) toliko, da se standardnim uzorcima suspenzije barijeva sulfata izmjere ekstinkcije fotometrijski, a na temelju tako dobivenog baždarenog pravca se fotometrijski određuje za uzorak analize odgovarajuća *jedinica timol zamućenja*. Ove praktičke jedinice se kreću u granicama od 1 do 20. Suvremena modifikacija Mac Laganova postupka našla je veliku primjenu, a usvojena je još i kao standardna metoda Američkog društva kliničkih kemičara (6).

Metodom izvedbe timol testa zamućenja nije propisan odgovarajući (standardni) aparat, ni optički filter, debljina sloja kivetu i sl. Praktički je uobičajeno vršiti mjerenja bilo kojim fotometrom ili spektrofotometrom, vizuelnim ili fotoelektričnim spravama, koji djelomično odgovaraju naprijed opisanom načinu rada a) odnosno b). Zbog toga je bilo poželjno izvršiti veći broj određivanja zamućenja standardnih uzoraka timol testa uz primjenu što većeg broja fotometrijskih uređaja u svrhu ispitivanja uloge mjerne aparature pri praktičkoj izvedbi toga testa.

REZULTATI RADA

Prva serija pokusa izvedena je s različitim spektralnim fotometrima pod standardnim uslovima, tj. sa crvenim svjetlom (dužina vala $650 \text{ m}\mu$, odnosno odgovarajući crveni filter) i kivetom s debljinom sloja od 1 cm. Upotrebljena su dva fotoelektrična spektralna fotometra s mo-



Sl. 2. Ekstinkcija (E) standardnih otopina za timol test; 1. Zeiss-Opton spektrofotometar ($650 \text{ m}\mu$), 2. Pulfrichov fotometar (S 61), 3. Labor-fotometar (crveni filter) 4. Elko II fotometar (S 57) 5. Beckman spektrofotometar ($650 \text{ m}\mu$)

monokromatorom (Zeiss-Opton i Beckman), dva fotoelektrična fotometra s filtrima (Labor i Elko II) i jedan vizuelni fotometar s filtrima (Pulfrich). Dobivene rezultate prikazuje grafički slika 2, na kojoj su nanižete izmjerene vrijednosti ekstinkcije (E) za svaku standardnu otopinu (1 do 20) timol testa. Jasno se vidi da najbolje rezultate, najstrmiji pravac, daje Pulfrichov fotometar, a najslabije Labor-fotometar. To nije u vezi s receptorom zračenja tih sprava (vizuelni, odnosno fotoelektrični aparat), nego s činjenicom da je udaljenost između objekta mjerenja, tj. koloidne zamućene otopine, i receptora zračenja bila najveća upravo pri radu s Pulfrichovim fotometrom, a najmanja pri radu s Labor-aparatom. U prvom slučaju se prema tome mjeri D_p , odnosno J_p , a u drugom slučaju D_d , odnosno $J_p + T$.

Tablica 1 daje vrijednosti za udaljenost kiveta sa standardnom otopinom od okulara, odnosno fotoelektričnog receptora zračenja (fotostanice ili fotoelementa), za sve fotometre koji su bili upotrebljeni u

Tablica I

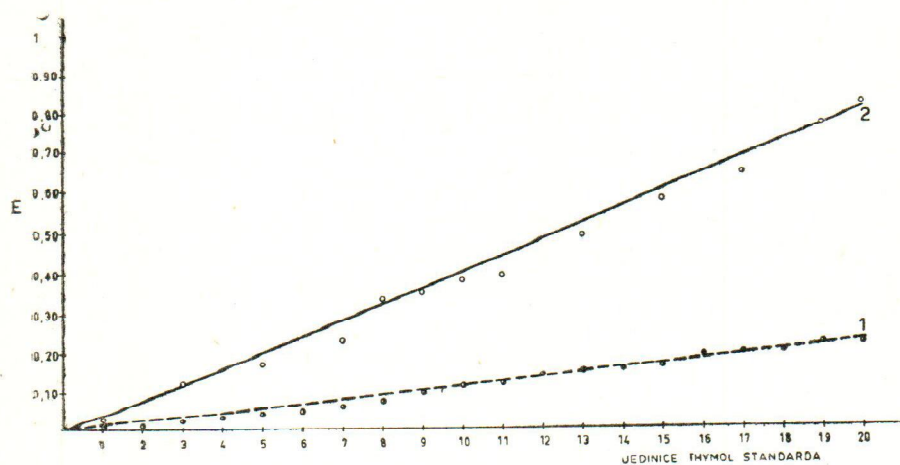
Udaljenost (d) receptora zračenja (fotoelementa, fotostanice, okulara) od objekta (kiveta)

Fotometar	d
Beckman	1,5
Labor	2
Zeiss (Jena) univerzalni	6
Elko II	7
Zeiss-Opton	12
Pulfrich	15

ovom radu. Usporedbom ovih udaljenosti s položajem baždarnih pravaca na slici 2 može se utvrditi da zaista u tome postoji uska veza između rezultata mjerenja i konstrukcije fotometra.

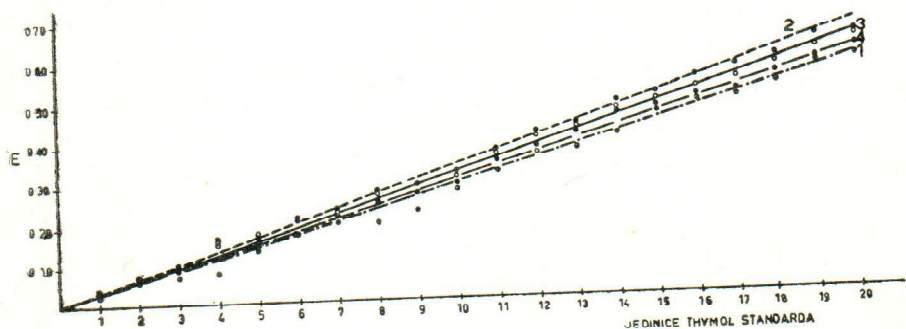
Utjecaj udaljenosti objekta od receptora zračenja još više se ističe u rezultatima mjerenja, koje prikazuje grafički slika 3. Ovi rezultati su dobiveni istim fotometrom (univerzalnim spektrofotometrom, Zeiss-Jena) pod jednakim pokusnim uvjetima. Samo se baždarni pravci razlikuju metodički u tome što je pravac 1 dobiven mjerenjima kad se kiveta sa standardnim otopinama nalazila skoro neposredno ispred receptora zračenja, a pravac 2 se odnosi na mjerenja kad je kiveta bila postavljena ispred monokromatora fotometra, dakle na zaista veliku udaljenost od receptora zračenja. Takva mjerenja su moguća s navedenim fotometrom, jer je on sastavljen od pojedinih zasebnih dijelova optičkog sistema. Baždarni pravac 2 na slici 3 odnosi se, dakle, na turbidi-

metrijska mjerenja u čisto paralelnom svjetlu (D_p), a pravac na mjerenja u difuznom svjetlu. Baždarni pravac 2 znatno je strmiji, a to u konkretnom slučaju znači da su mjerenja pouzdanija i sigurno se može utvrditi koja jedinica timol testa pripada uzorku analize.



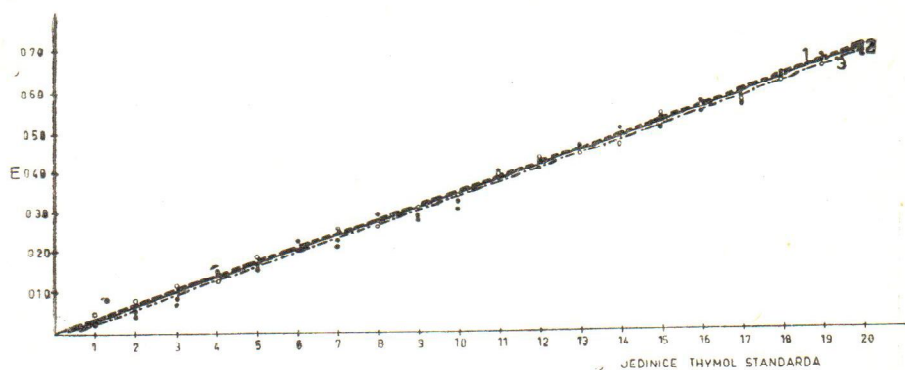
Sl. 3. Ekstinkcija (E) standardnih otopina za timol test; 1. kiveta neposredno ispred receptora zračenja, 2. kiveta u većoj udaljenosti od receptora zračenja (ispred monokromatora); Zeiss univerzalni spektrofotometar ($650 \text{ m}\mu$)

Uloga dužine vala upotrebljenog svjetla ispitivana je i u posebnim nizovima turbidimetrijskih mjerenja uz primjenu fotoelektričnog spektrofotometra Zeiss-Opton i vizuelnog Pulfrichova fotometra. Prvi aparat radi s monokromatorom, a drugi s optičkim filtrima. Kako se vidi iz grafičkog prikaza na slici 4., koji se odnosi na strogo monokromatsko



Sl. 4. Ovisnost ekstinkcije (E) standardnih otopina timol testa o dužini vala svjetla: 1. $650 \text{ m}\mu$, 2. $494 \text{ m}\mu$, 3. $530 \text{ m}\mu$ i 4. $619 \text{ m}\mu$. Zeiss Opton spektrofotometar, kiveta 1 cm

svjetlo, dužina vala upotrebljenog svjetla igra zaista neku ulogu. U skladu s teorijom, turbidimetrijski utvrđena ekstinkcija raste sa smanjenjem dužine vala upotrebljenog svjetla. Utjecaj dužine vala svjetla međutim nije znatan, a kod praktičkog analitičkog rada će i jedva igrati ulogu. Kada se zamućenje mjeri u primjenu optičkih filtara, dobiju se rezultati (vidi sliku 5) koji su skoro neovisni o upotrebljenom filtru, u određenim granicama dužine vala.



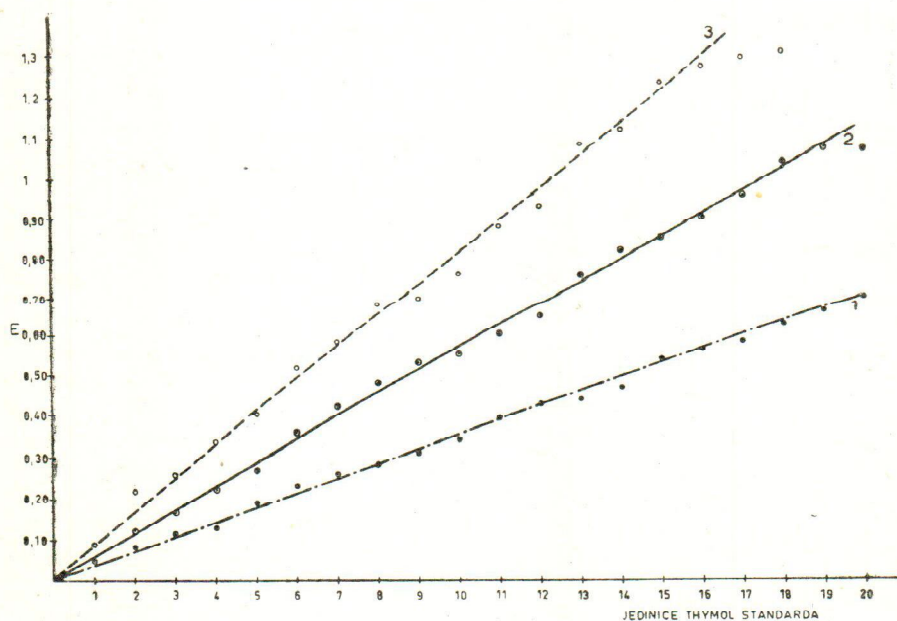
Sl. 5. Ovisnost ekstinkcije (E) standardnih otopina timol testa o spektralnom području upotrebljenog svjetla; 1. filter S 61, 2. filter S 50, 3. filter S 53; Pulfrich fotometar, kiveta 1 cm

Pri izvedbi timol testa preporučuje se raditi sa crvenim svjetlom zbog toga, što otopine koje su dobivene iz biološkog materijala često pokazuju selektivnu apsorpciju u ljubičastom i plavom spektralnom području, a nikada u crvenom području. Takva selektivna apsorpcija, koja je obično uvjetovana prisutnošću slabo obojenih tuđih tvari, može smetati kod fotometriiranja uz primjenu plavog ili ljubičastog svjetla, a ne smeta kad se radi sa crvenim svjetlom. S tim u vezi može se na temelju ovdje prikazanih pokusa ustvrditi, da se turbidimetrijska mjerenja pri izvedbi timol testa mogu provesti uz primjenu crvenog svjetla (monokromatskog ili filtriranog), a dobiveni rezultati za ekstinkciju neće biti zbog toga preniski. Rad sa svjetlom plavog ili ljubičastog spektralnog područja će biti, naprotiv, s obzirom na mogućnost spomenute selektivne apsorpcije analiznog objekta, nešto nesiguran.

U daljem nizu pokusa izvršena su mjerenja zamućenja standardnih otopina za timol test uz mijenjanja debljine sloja, s kivetama s debljinama sloja od 1, 2 i 3 cm. Pokusi su izvedeni s vizuelnim Pulfrichovim fotometrom uz primjenu crvenog svjetla (filter S61), a dobivene rezultate prikazuje grafički slika 6. Vidi se da debljina sloja igra zaista značajnu ulogu u tom smislu da se turbidimetrijski mjerena ekstinkcija (E) znatno povećava u navedenim granicama s porastom debljine sloja.

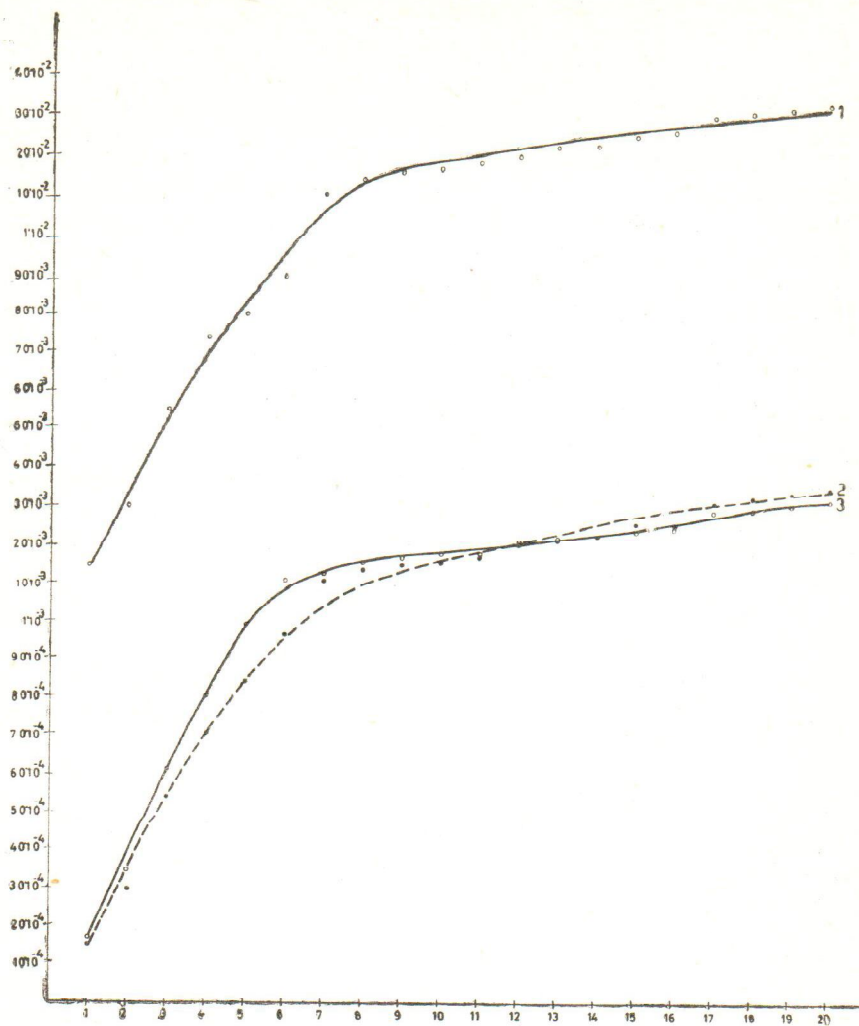
To znači, da se preporučuje raditi s većom debljinom sloja, dakako uz pretpostavku da se raspolože dovoljnom količinom materijala za analizu. Međutim, i pravac 1 na toj slici može prilično pouzdano poslužiti kao baždarni turbidimetrijski pravac, jer taj aparat daje vrijednost za D_p .

Da bi se utvrdilo kako se može tindalometrija primijeniti pri izvedbi timol testa, izvršen je niz pokusa s Aminco fotometrom uz primjenu istih standardnih otopina barijeva sulfata. Taj fotoelektrični fotometar velike osjetljivosti radi s fotomultiplikatorom, te dopušta izvedbu mjernih postupaka iz strogo određenog kuta između smjera primarnog svjetla i smjera mjerenja. Aparat može dakle poslužiti kao strogi tindalometar za rad pod raznim mjernim kutovima. Kad se uzima mjerni kut od 180° aparat, dakako, radi kao turbidimetar.



Sl. 6. Ovisnost ekstinkcije (E) standardnih otopina timol testa o debljini sloja; 1. kiveta od 1 cm, 2. kiveta od 2 cm, 3. kiveta od 3 cm; Pulfrich fotometar (S 61)

U vezi s ovdje prikazanom problematikom vršena su tindalometrijska mjerenja (mjeri se T) pod mjernim kutovima od 45° , 90° i 135° . Dobivene rezultate prikazuje grafički slika 7, koja daje ovisnost relativne jakosti raspršenog svjetla u ovisnosti o jedinici timol standarda barijeva sulfata. Vidi se da linearni odnos postoji samo za niske jedi-



Sl. 7. Ovisnost jakosti raspršenog svjetla o kutu mjerenja; 1. 45°, 2. 90° i 3. 135°; Aminco fotometar; ordinata: relativna jakost raspršenog svjetla, apscisa: jedinice standardnih otopina timol testa

nice, dakle za malene koncentracije. Može se zato kazati da taj način mjerenja dolazi u obzir samo u ograničenom području koncentracije, pa su rezultati zato donekle nesigurni. To se odnosi, dakako, samo na izvedbu timol testa, za koju tindalometrija očito nije prikladna.

ZAKLJUČAK

Za izvedbu Mac Laganova timol testa prikladni su turbidimetrijski mjerni postupci, kojima se zamućenje definira kao ekstinkcija (optička gustoća), kojoj je brojčana vrijednost uvjetovana difuznim raspršivanjem svjetla u mjernom objektu. Pri izvedbi takvih mjerenja treba izabrati takav fotometar (vizuelni ili fotoelektrički), kojega konstrukcija uvjetuje veći prostorni razmak između uzorka analize (kivete) i receptora zračenja (fotoelementa, fotostanice, okulara fotometra). Takvi aparati registriraju samo jakost svjetla koje paralelno usmjereno prolazi kroz objekt mjerenja (Jp), a na njihov receptor zračenja ne utječe difuzno raspršeno svjetlo (T). Takvim turbidimetrima pripadaju dovoljno strmi baždarni pravci za izvedbu timol testa.

Dužina vala upotrebljenog svjetla pri izvedbi mjerenja ne igra znatniju ulogu. Preporučuje se raditi sa crvenim svjetlom. Povećavanjem debljine sloja u određenim granicama, povećava se točnost određivanja timol jedinica. Tindalometrijska mjerenja se mogu samo ograničeno primijeniti pri izvedbi timol testa.

Literatura

1. Vidi npr. *Brandes H.*: *Agfa Veröff.* 4 (1935) 58; *Eggert J. i Küster A.*: *Agfa Veröff.* 4 (1935) 49, 3 (1933) 93.
2. *Heller W. i Tabibian R.*: *Journ. Coll. Scie.* 12 (1957) 25.
3. *Deželić G.*: *Croat. Chem. Acta* 33 (1961) 51.
4. *Mac Lagan, N. F.*: *J. Exper. Path.* 25 (1944) 234; *Nature* 154 (1944) 670.
5. *Shank, R. E., Hoagland, C. L.*: *J. biol. Chem.* 162 (1946) 133; *Ley, Lewis, Davidson*; *L. Lab. Clin. Med.* 31 (1946) 910.
6. *Reiner, M.*: *Standards Methods of Clin. Chem.* 1 (1953) 113.

Zusammenfassung

DIE SPEKTROPHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER TRÜBUNG BEI DER AUSFÜHRUNG DES THYMOLTESTS

Es wurden spektrophotometrische Bestimmungen der Trübung der Standard-Suspensionen von Bariumsulfat für den Mac Laganschen Tymoltest, bei Verwendung von verschiedenen Photometern durchgeführt. Es wurden Apparate verwendet, die so konstruiert sind, dass sich das Objekt der Messung (die trübe Lösung) unmittelbar vor dem Strahlungsrezeptor (Photoelement, Photozelle, Okular des visuellen Photometers) befindet, aber auch solche Apparate deren Bau eine grössere Entfernung zwischen dem Objekt und dem Rezeptor bedingt. Im ersten Falle misst man, wie näher begründet wird, ausser dem parallel-gerichtet durchgelassenes Licht (Jp), teilweise auch noch das diffus getreute Licht (Tyndall-Licht, T). Im zweiten Falle misst man nur das parallel durchgclassene Licht. Im ersten Falle spricht man von diffuser

optischer Dichte (D_d) und im zweiten Falle von paralleler optischer Dichte (D_p), wobei immer $D_d < D_p$ ist. Reine turbidimetrische Messungen sollen die Extinktion (E) der trüben Objekte so bestimmen, dass sie der parallelen Dichte entsprechen.

Bei der Bestimmung der Extinktion der Standard-Suspensionen wurden immer steilere Eichgeraden erhalten wenn Apparate verwendet wurden die D_p bestimmen. Dies ist gewöhnlich bei visuellen Photometern (Pulfrich Photometer) und bei Apparaten der Fall, die eine Änderung der Entfernung zwischen dem Objekt der Messung und dem Strahlungszreceptor ermöglichen (Zeiss Universalspektrophotometer). Es wurde auch der Einfluss der Wellenlänge des verwendeten Lichtes und der Schichtdicke des Messobjektes geprüft. Die Wellenlänge spielt keine grosse Rolle, grössere Schichtdicken geben hingegen wesentlich steilere Eichgeraden. Tyndallometrische Messungen eignen sich nicht zur Ausführung des Tymoltestes.

*Medizinische Fakultät
der Universität
Zagreb*

Eingegangen am 10. VIII. 1962.