

RADIOANALYTICKÉ METODY

III. Radioreagenční metody

J. John

(s využitím podkladů doc. RNDr. Adolfa Zemana, CSc.)

http://www.jaderna-chemie.cz/data/documents/vyuka/john/RAM_III_RRM.pdf

Elektronická verze připravena s podporou



Třídění

Indikátorové metody

1. Indikátorová analýza
 - 1a. Analýza přirozeně rad. látek
2. Izotopová zředovací analýza
3. **Radioreagenční metody**
 - 3a. Radiometrické titrace

Interakční metody

Aktivační

4. Aktivační analýza

Neaktivační

5. Metody založené na absorpci a rozptylu jad. záření
6. Emisní metody

Radioreagenční metody

Radioreagenční metody

Stanovení látky pomocí chemické reakce s vhodným činidlem – jedno radioaktivní.

Varianty:

1. Jednoduché RRM
2. Metody spojené s uvolňováním radioaktivity (radio-release)
3. Metody založené na izotopové výměně
4. Metody koncentračně závislého rozdělení
5. Radioimunologická analýza RIA
6. Radiometrické titrace

Jednoduché radioreagenční metody

Stanovovaná látka reaguje kvantitativně s činidlem.

Označeno činidlo, stanovovaná látka, nebo pomocná látka.

a) Metody s radioaktivně značeným činidlem

Princip - použití činidel, jejichž aktivita se dá vyjádřit počtem molů

$$\frac{A_1}{n_1} = \frac{A_3}{n_1 - n_x} = \frac{A_2}{n_x}$$

n_x - látkové množství stanovované látky

n_1 - látkové množství přidané radioreagencie

A_1 - aktivita přidané radioreagencie

A_2 - aktivita produktu

A_3 - aktivita přebytku radioreagencie

$$n_x = n_1 \left(1 - \frac{A_3}{A_1} \right) = \frac{A_2}{A_1} n_1$$

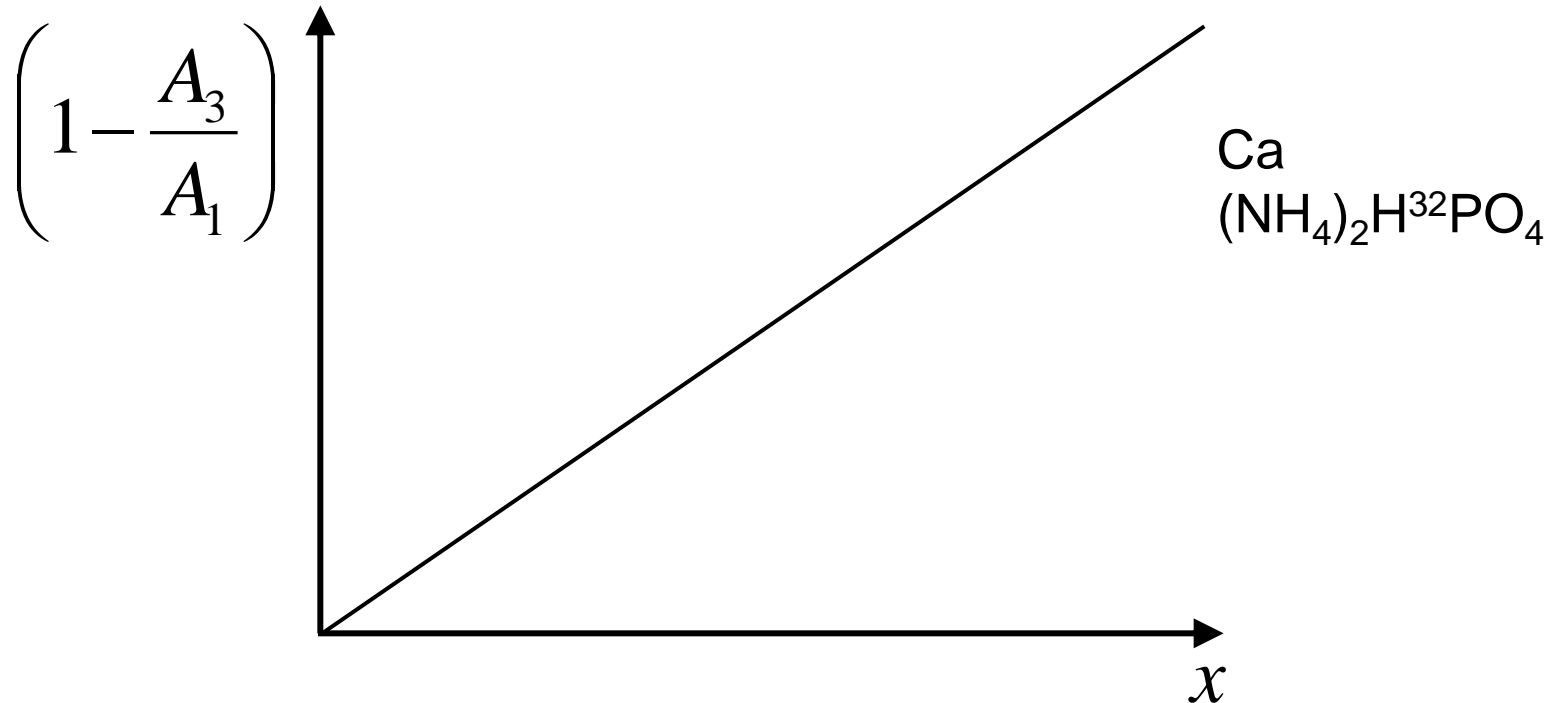
Jednoduché radioreagenční metody (2)

Příklad:

Stanovení fluoridů srážením $^{45}\text{CaCl}_2$.

Sraženina se zcentrifuguje, měří se aktivita alikvotu $^{45}\text{CaCl}_2$ a alikvotu centrifugátu.

Podobně např. Ca a Mg v cementu srážením $(\text{NH}_4)_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$.



Jednoduché radioreagenční metody (3)

Mez stanovitelnosti – limitována hlavně potížemi při fázovém dělení \Rightarrow použití kolektorů (např. sraženina schopná zachytit i koloidní sraženiny – např. hydroxid železitý pro srážení Ag^{131}I nebo TlI pro srážení $\text{Zr}(\text{}^{32}\text{P}_2\text{O}_7)_2$ apod.).

Separace pomocí *papírové chromatografie*: srážení přímo na papíře – chromatografická separace nezreagovaného činidla – měření aktivity skvrn.

Příklad: separace Ca, Sr, Ba a Pb a srážení pomocí $^{35}\text{SO}_4^{2-}$; separace Th, Be, Al, Mn, Ba, Sr, a Ca a srážení $^{32}\text{PO}_4^{3-}$.

Výhody srážecích radioreagenčních metod:

1. Neváží se (měří se jen aktivita).
2. Koprecipitace příměsí nevadí (pokud netvoří sloučeninu s radioaktivním činidlem).
3. Sraženina se nemusí vysoušet (stačí měřit aktivitu supernatantu).
4. Lze měřit aktivitu extrémně malých množství sraženin (např. na papíře), které již nelze vážit.
5. Při použití kolektorů je není třeba oddělovat od sraženiny.

Jednoduché radioreagenční metody (4)

Fázové dělení sraženin je někdy zjednodušeno, např. je-li jedna složka plynná. Příklad: Stanovení síry v oceli – S uvolníme jako H_2S , který zavedeme do roztoku $^{115}\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ – CdS odfiltrujeme, měříme aktivitu roztoku.

Mez stanovitelnosti – obecně omezena

- produktem rozpustnosti,
- specifickou aktivitou radioreagencie a
- účinností fázového dělení.

Některé metody citlivost až jednotky ppm.

Fázové dělení lze i *extrakcí*. Cheláty – problematické měření ^3H , ^{14}C nebo ^{35}S , proto spíše iontové asociáty

- *kadmium* extrakcí $\text{Cd}(\text{Py})_2$ ^{131}I do benzenu,
- *fluoridy* extrakcí fluorotantalichnanu ^{182}Ta diisobutylketonem z 6,5M H_2SO_4 :
$$^{182}\text{Ta}_2(\text{SO}_4)_5 + 14\text{HF} \rightarrow 2\text{H}_2^{182}\text{TaF}_7 + 5\text{H}_2\text{SO}_4$$
$$\text{H}_2^{182}\text{TaF}_7(\text{aq}) + 2\text{R}_2\text{CO}(\text{org}) \rightarrow (\text{R}_2\text{COH})_2^+ \cdot ^{182}\text{TaF}_7^{2-}(\text{org})$$
- *fosfor* extrakcí fosfomolybdenanu $\text{H}_3\text{P}^{99}\text{Mo}_{12}\text{O}_{40}$ nebo fosfomolybdenanu-fosfowolframenu ^{185}W diisobutylketonem

Jednoduché radioreagenční metody (5)

b) Metody s radioaktivně značenou stanovovanou látkou

$$\frac{A_1}{n_x + n_1} = \frac{A_2}{n_2} = \frac{A_3}{n_x + n_1 - n_2}$$

Platí, že $A_1 = A_2 + A_3$

n_x - látkové množství stanovované látky

n_1 - látkové množství přidaného indikátoru

n_2 - látkové množství (menší než ekvivalentní)
NEAKTIVNÍHO činidla

A_1 - aktivita přidaného indikátoru

A_2 - aktivita produktu

A_3 - aktivita nezreagované části
radioaktivní složky

I.

$$n_x = \frac{A_1}{A_2} n_2 - n_1$$

III.

$$n_x = \frac{A_1}{A_1 - A_3} n_2 - n_1$$

II.

$$n_x = \left(\frac{A_3}{A_2} + 1 \right) n_2 - n_1$$

Jednoduché radioreagenční metody (6)

Z (I) je zřejmé, že se jedná o **variantu metody izotopového zředování**:

$$\begin{aligned}n_x &= \frac{A_1}{A_2} n_2 - n_1 = \\&= \frac{A_1}{a_2} n_1 = \frac{A_1 \cdot n_1}{a_2 \cdot n_1} - n_1 = \\&= n_1 \cdot \left(\frac{a_1}{a_2} - 1 \right)\end{aligned}$$

Jednoduché radioreagenční metody (7)

Radiometrická mikroanalýza (Ehrenberg):

K neznámému množství x přidáme radioaktivní indikátor (množství m_1 , aktivita A_1) – vysrážíme množstvím činidla, ekvivalentním přidanému množství – centrifugujeme, změříme centrifugát A_3 .

$$\frac{A_1}{x + m_1} = \frac{A_3}{x} \left(= \frac{A_2}{m_1} \right)$$

Totéž jako III
pro $n_1 = n_2$:

$$n_x = \frac{A_1}{A_1 - A_3} n_2 - n_1 =$$

$$xA_1 = xA_3 + m_1A_3$$

$$x = \frac{A_3}{A_1 - A_3} m_1$$

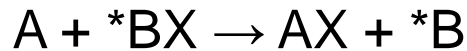
$$= \left(\frac{A_1}{A_1 - A_3} - 1 \right) n_1 =$$

$$n_x = \frac{A_3}{A_1 - A_3} \cdot n_1$$

Jednoduché radioreagenční metody (8)

c) Analýza s použitím třetí komponenty

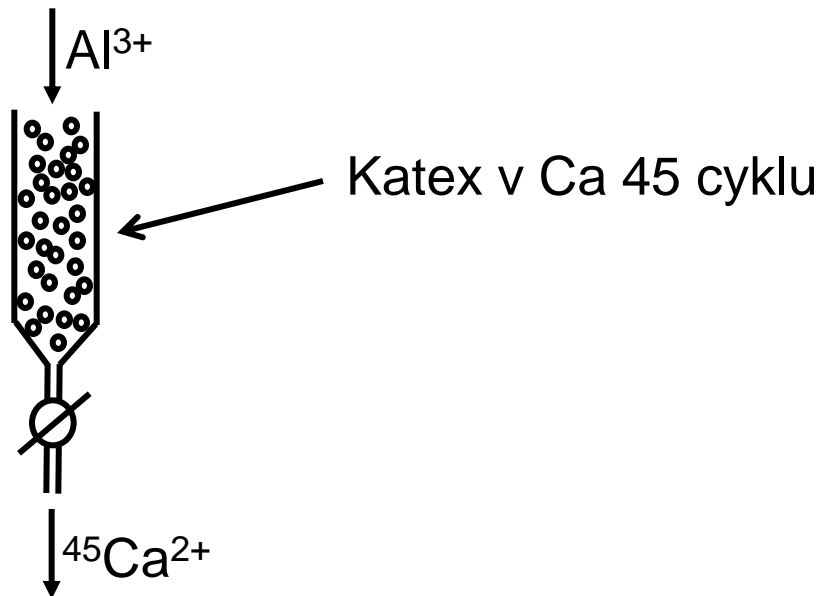
Radioaktivně značená komponenta *B soutěží se stanovovanou složkou A v tvorbě sloučeniny s třetí komponentou X. Vytvořená sloučenina je v jiné fázi než A nebo B:



Vytěšňovací metody (Radio-Exchange)

Příklad:

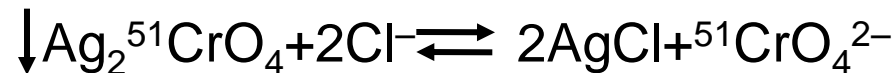
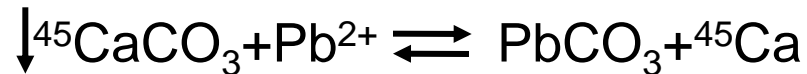
Stanovení Al prolitím roztoku kolonou naplněnou katexem v ^{45}Ca cyklu (Al^{3+} vytěsňuje $\text{Ca}^{2+} \Rightarrow$ aktivita eluátu je úměrná množství hliníku).



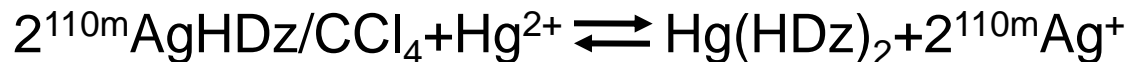
Jednoduché radioreagenční metody (9)

Vytěšňovací metody (Radio-Exchange) – 2

Využití sraženin (sraženina radioaktivního rozpustnější než stanovovaného).



Využití chelátů (chelát radioaktivního má nižší K_{ex} než stanovovaného).



Pb^{2+} se extrahuje do CCl_4 jako $\text{Pb}(\text{DTC})_2$,

+ ${}^{204}\text{Tl}^{3+}_{\text{STD}}$ třep.:

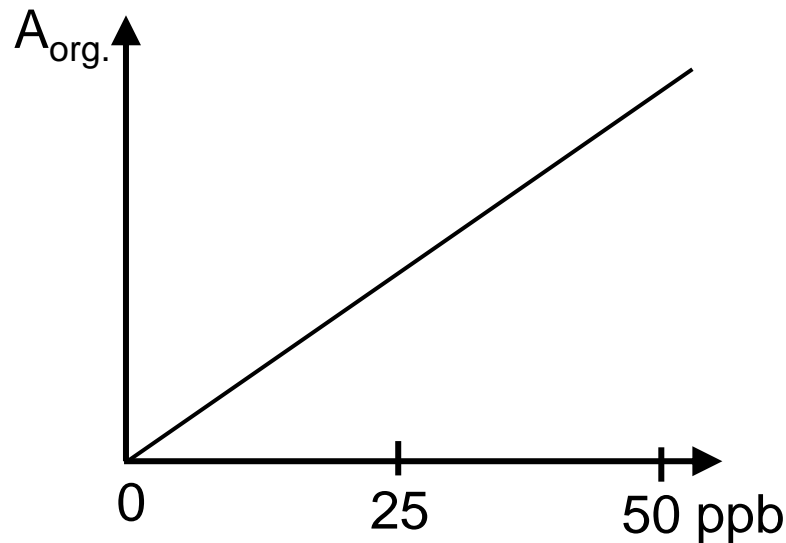


Jednoduché radioreagenční metody (10)

Vytěšňovací metody (Radio-Exchange) – 3

Stanovení metylrtuti CH_3Hg^+ a fenylrtuti PhHg^+

- EXTRAKCE $\text{CH}_3\text{HgCl} + 3\text{M HCl}$ do C_6H_6 (benzenu)
- TŘEPÁNÍ organické fáze s nadbytkem $2 \times 10^{-5} \text{ M K}^*\text{I}$ v 1% ASK 1 m



Radioreagenční metody

Varianty:

1. Jednoduché RRM
- 2. Metody spojené s uvolňováním radioaktivity (radio-release)**
3. Metody založené na izotopové výměně
4. Metody koncentračně závislého rozdělení
5. Radioimunologická analýza RIA
6. Radiometrické titrace

Metody spojené s uvolňováním radioaktivity (Radio-Release metody)

Neaktivní stanovovaná látka při styku s radioaktivním činidlem v důsledku chemické reakce uvolní část radioaktivity.

Uvolněná radioaktivní látka opouští původní fázi, aniž by byla nahrazena!

Metody založené na použití:

- 1) Radioaktivních kryptonátů.
- 2) Radioaktivně značených kovů.
- 3) Radioaktivně značených solí a jiných látek.

Radio-Release metody (2)

1) Radioaktivní kryptonáty.

Sloučeniny klathrátového typu - Van der Waalsovy síly; stálé do 900 – 1000°C.

Příprava difuzí (častěji) nebo implantací. Ostřelování taveniny hydrochinonu ^{85}Kr .

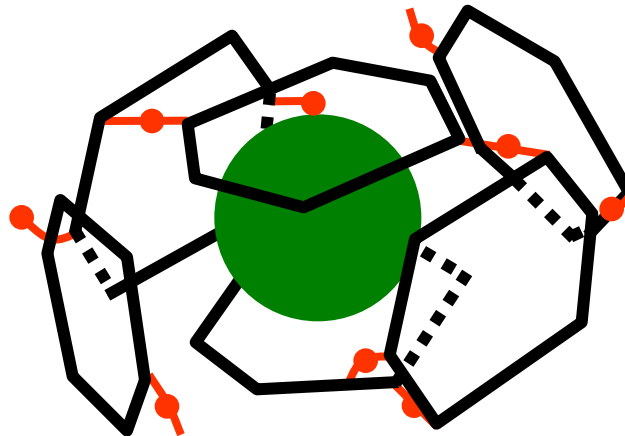
^{85}Kr ($T_{1/2}=10,27\text{r}$, β^- 0,695 MeV, γ 0,1495 MeV; 0,540 MeV)

OSTŘELOVÁNÍ: ~ 100 at. průměrů

DIFÚZE : 0,1 – 1 μm

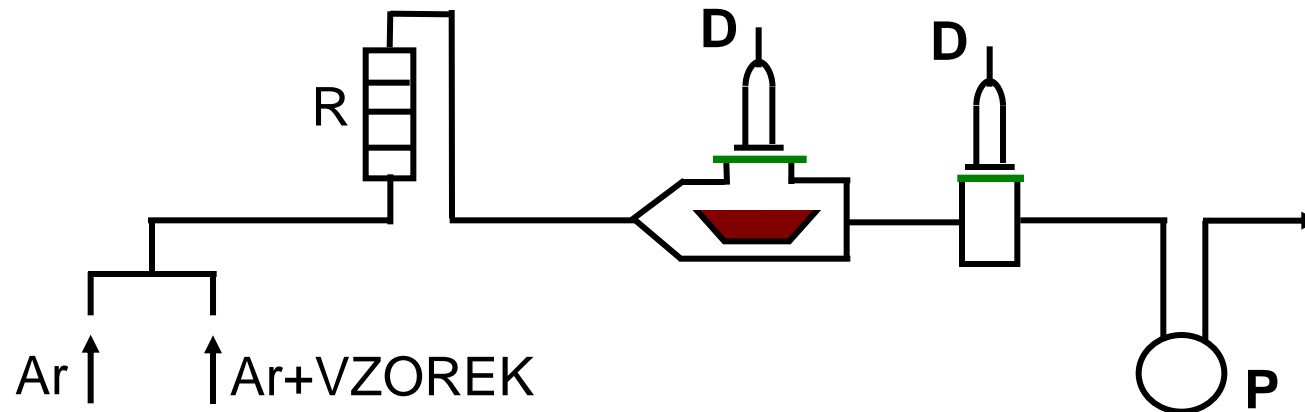
při 0,7 – MPa, Pt – 0,04 Bq/cm²

300°C, BN ~ 35 MBq/cm²



Radio-Release metody (3)

Stanovení plynů



O₂: 10⁻⁹ % - 10 % Cu, 1000 °C

O₃: 10⁻⁹ % Cu, 200 °C, KLATHRÁT

H₂: 10⁻³ % PtO₂, 435 °C

SO₂: 10⁻⁷ % SO₂+I₂[⁸⁵Kr]+2H₂O ⇌ H₂SO₄+2HI+⁸⁵Kr

SO₂+2NaClO₃ ⇌ 2ClO₂+Na₂SO₄

ClO₂+ [C₆H₄(OH)₂]₃·⁸⁵Kr ⇌ ⁸⁵Kr

H₂O: 2H₂O+CaC₂[*Kr] ⇌ Ca(OH)₂+C₂H₂+*Kr

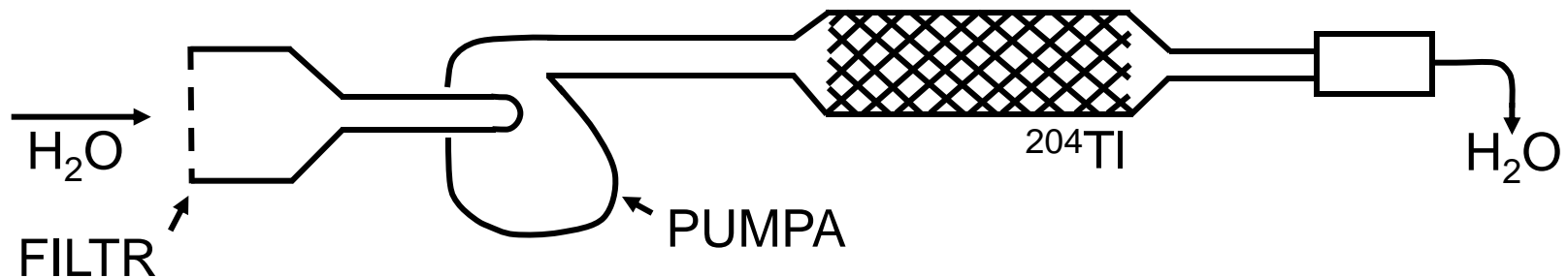
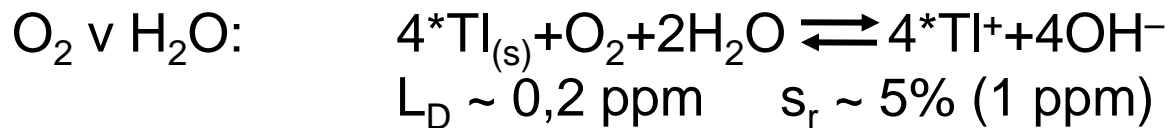
Kryptonáty jako pomocné látky při radiometrických titracích.

Radio-Release metody (4)

2) Radioaktivně značené kovy.

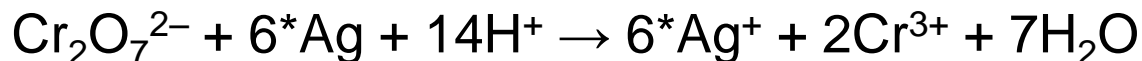
Použití: např. oxidující látky ve vodě.

- Kov nesmí reagovat s vodou,
- s oxidujícími látkami musí vznikat ionty, které se v daném prostředí nesrážejí,
- vysoká měrná aktivita (nejvhodnější ^{204}Tl , $^{110\text{m}}\text{Ag}$).



Lze i pomocí nakryptonovaného stabilního Tl.

Stanovení dvojchromanu



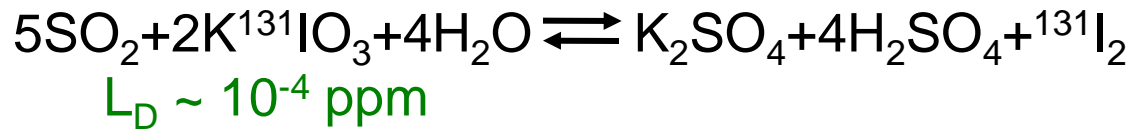
Plíšek $^{110\text{m}}\text{Ag}$ jako míchadlo. Ruší Fe(III) , Cl^- , vyšší konc. NO_3^- .

Provádí se v prostředí H_2SO_4 po neutralizaci amoniakem.

Radio-Release metody (5)

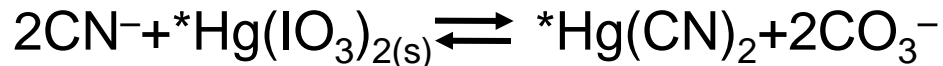
3) Jiné látky.

SO₂ (ve vzduchu):



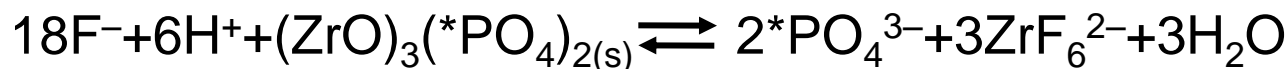
Řada stanovení, při nichž stanovovaná látka vytváří rozpustný komplex s komponentou sraženiny:

CN⁻ :



Komplex může vznikat i s neradioaktivní komponentou sraženiny:

F⁻ :



Radioreagenční metody

Varianty:

1. Jednoduché RRM
2. Metody spojené s uvolňováním radioaktivity (radio-release)
- 3. Metody založené na izotopové výměně**
4. Metody koncentračně závislého rozdělení
5. Radioimunologická analýza RIA
6. Radiometrické titrace

Metody založené na izotopové výměně

Dvě různé formy prvku M: **MX** a **MY**

Jedna neaktivní a druhá označena: ***M**

Izotopová výměna \Rightarrow radioaktivní přechází do neaktivní formy

V izotopové rovnováze měrné aktivity forem M stejné, platí

$$\frac{A_1}{x} = \frac{A_2}{m}$$

A_1 a A_2 – rovnovážné aktivity MX a MY

x a m – množství M v MX a MY.

Pokud je izotopová výměna dostatečně rychlá a formy lze kvantitativně oddělit, zjistíme **x** podle

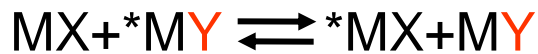
$$x = m \frac{A_1}{A_2}$$

Heterogenní i homogenní izotopová výměna.

Heterogenní výměna

Obvykle: vodný roztok M třepeme s roztokem komplexu M v organickém rozpouštědle. – **Žádné volné komplexotvorné činidlo!** Jedna z forem označena.

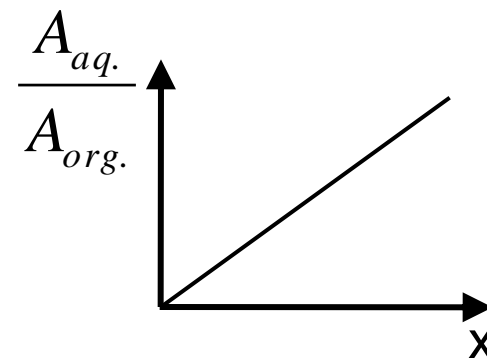
1) Značení organické fáze.



$$\frac{A_{MX}}{x} = \frac{A_{MY}}{m} \left(= \frac{A_{TOT}}{x + m} \right)$$

$$x = \frac{A_{MX}}{A_{MY}} m = \frac{A_{TOT} - A_{MY}}{A_{MY}} m = \left(\frac{A_{TOT}}{A_{MY}} - 1 \right) m$$

$$\left(A_{TOT} = A_{MX} + A_{MY} \right)$$



Heterogenní výměna (2)

Značení organické fáze – 2.

Příklady:

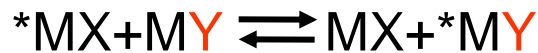
- Stanovení stop **rtuti** třepáním analyzovaného roztoku s roztokem dibutylthiofosforečnanu rtuťnatého (^{203}Hg) v CCl_4 .
- Stanovení stop **zinku (kadmia)** třepáním mezi analyzovaným roztokem a dithizonátem zinečnatým (^{65}Zn , ^{109}Cd) v CCl_4 .
- Stanovení **fosforu** třepáním molybdátosfosforečné kyseliny $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}(\text{aq})$ s molybdátosfosforečnanem tetrafenylarsonia $[\text{AsPh}_4]_3^{32}\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ v 1,2- dichlorethanu.

Lze i izotopová výměna mezi dvěma různými oxidačními stupni (např. výměna mezi $\text{J}^-(\text{aq})$ a J_2 v benzenu, apod.).

Heterogenní výměna (3)

2) Značení vodné fáze.

Ve vodné fázi máme $x + y$, kde y je množství M v přidaném radioizotopu.



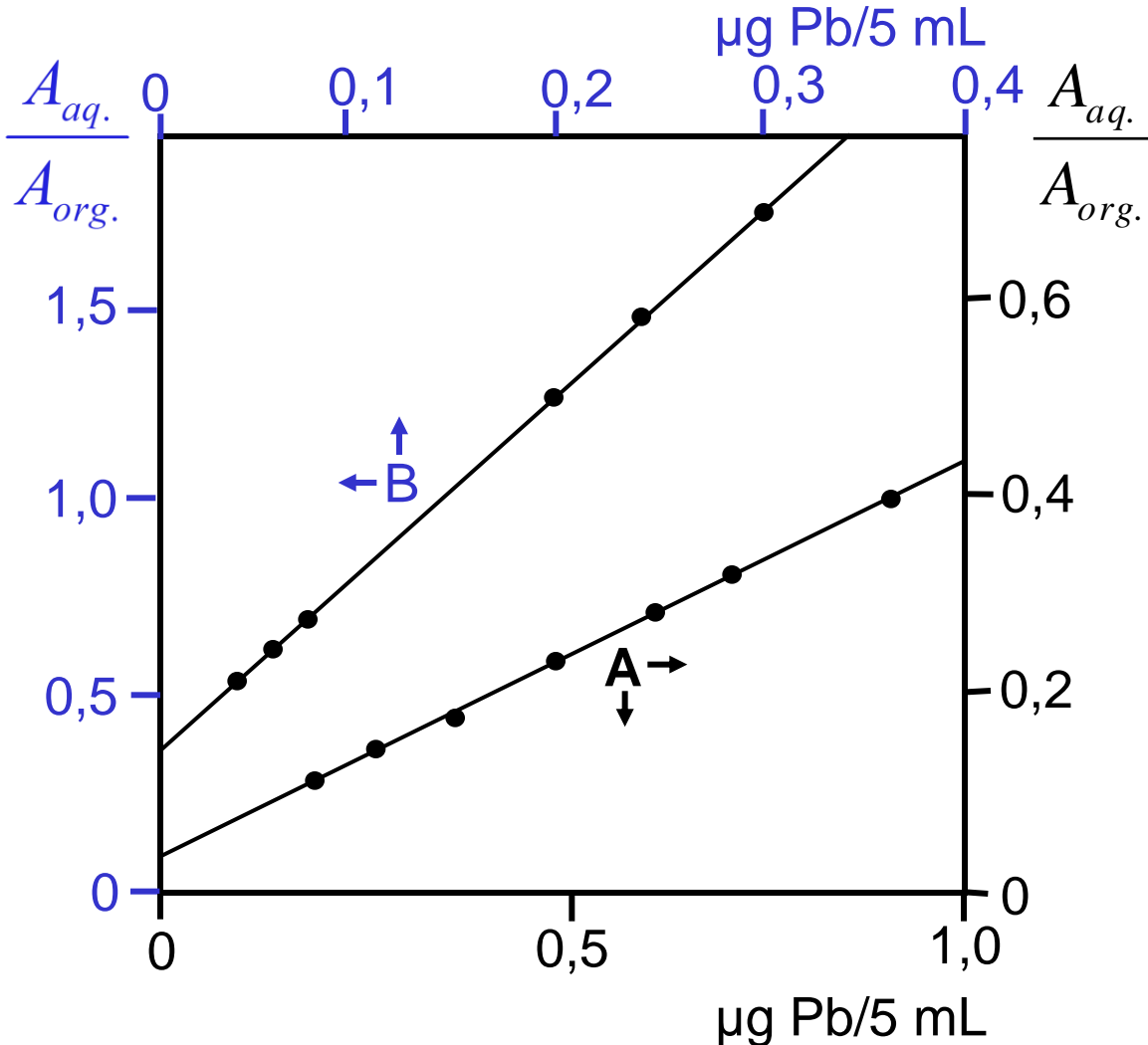
$$\frac{A_{MX}}{x + y} = \frac{A_{MY}}{m} = \frac{A_{TOT}}{x + y + m}$$

$$x = \frac{A_{MX}}{A_{MY}} m - y$$

Heterogenní výměna (4)

Značení vodné fáze – 2, Příklad:

Stanovení Pb označeného ^{212}Pb třepání vinanového komplexu s diethyldithiokarbamidem olovnatým $\text{Pb}(\text{DTC})_2$ v CCl_4 .



5 ml vzorku + ^{212}Pb +
1 ml pufr pH ~ 9,5 (NH_4^- -
vinan + KCN)
třepat s 3 ml
 $\text{Pb}(\text{DTC})_2/\text{CCl}_4$

$\text{Pb}(\text{DTC})_2$:
 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ + pufr pH ~ 12
(NH_4^- -vinan + KCN +
NaOH) + NaDTC
třepat s CCl_4

^{212}Pb :
Ex $^{212}\text{Pb}(\text{DTC})_2$ z ^{232}Th při
pH ~ 12, reex 1M HCl

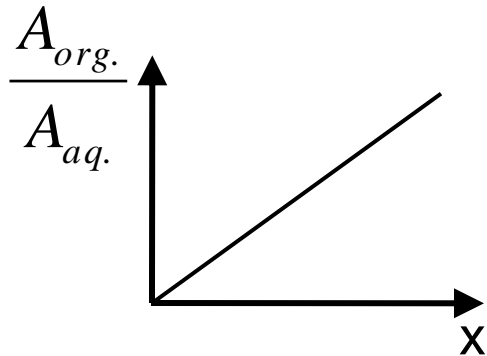
Homogenní výměna

1) Výměna v organické fázi.

- Prvek vyextrahujeme do org. rozpouštědla – komplex XA
- K extraktu přidáme standardní roztok jiného komplexu (XB)
- V rovnováze oddělíme formy, měříme aktivity.

Příklad:

Bi: EXTRAKCE Bi z analyzovaného vzorku ve formě $\text{Bi}(\text{DTC})_3/\text{CCl}_4$ při $\text{pH}=11$ + std. roztok *BiI_3 v amylacetátu. Reex. BiI_3 acet. pufrem.



Homogenní výměna (2)

Výměna v organické fázi – 2.

Příklady (2):

As: EX. As^{III} ze VZ jako As(DTC)₃/CCl₄ z 0,005 mol·L⁻¹ H₂SO₄
+ std. roztok ⁷⁶AsI₃/CCl₄
Reex. AsI₃ 0,01 mol·L⁻¹ CH₃COOH

Sb: EX. Sb^{III} jako jodid do CCl₄ z 5 mol·L⁻¹ HClO₄
+ std. roztok *Sb(DTC)₃/CCl₄
Reex. SbI₃ acetátovým pufrem

Homogenní výměna (3)

Výměna v organické fázi – 3.

Zvláštní případ – jedno činidlo, prvek ve dvou oxidačních stavech

Tl: EX. Tl^I DTC/CCl₄ z 1 mol·L⁻¹ NaOH (VZOREK)
+ ²⁰⁴Tl(DTC)₃/CCl₄ (STD.)

EX. Tl^I – pH > 3
Tl^{III} – z kyselého i alkalického roztoku

Reex. Tl^I 0,5 mol·L⁻¹ H₂SO₄

Ce: 1) VZ. + ¹⁴⁴Ce; EX. Ce^{III} (pH > 2,5) ^{HDEHP}/_{toluen}

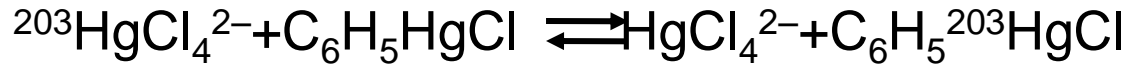
2) + std. Ce^{IV} – chelát s ^{HDEHP}/_{toluen}

3) Reex. Ce^{III} 0,5 mol·L⁻¹ HNO₃

Homogenní výměna (4)

2) Výměna ve vodné fázi.

Příklad: Stanovení ultramalých množství **Hg** výměnou mezi Cl⁻ komplexy Hg(II) a chloridem fenylrtuti (²⁰³Hg). Dělení forem extrakcí fenylrtuti do benzenu

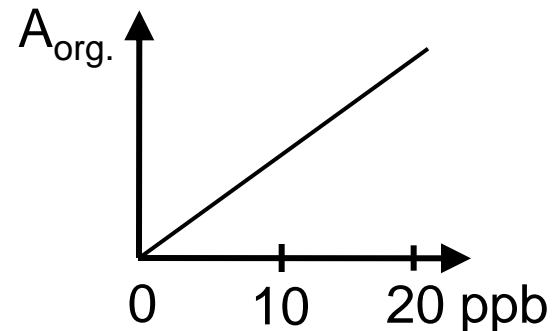


IZ. VÝMĚNA: 2,5-3 mol·L⁻¹ HCl, 5-10 min

SEPARACE: EX. Ph*HgCl benzenem

$$\frac{A_{\text{HgCl}_4^{2-}}}{m} = \frac{A_{\text{PhHgCl}}}{x} \quad m \gg x$$

$$x = k \cdot A_{\text{PhHgCl}} \cdot m$$



Homogenní výměna (5)

Výměna ve vodné fázi – 2.

Příklad 2: Stanovení metylrtuti **MeHg** výměnou mezi $^{203}\text{Hg}_2^{2+}$ a síranem metylrtuti. Dělení forem extrakcí metylrtuti do benzenu.

CH_3HgCl :

IZ. VÝMĚNA: $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$, ↓ AgCl , $T_{1/2}=140 \text{ min}$
~ 20 hod.

POSTUP: 5 mL VZ. v $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$
+ 0,5 mL $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ *HgNO}_3$
+ 0,5 mL $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ *AgNO}_3$
(20 hod.)
+ 2 mL $\text{HCl}_{\text{konc.}}$
EX. 4 mL benzen

Radioreagenční metody

Varianty:

1. Jednoduché RRM
2. Metody spojené s uvolňováním radioaktivity (radio-release)
3. Metody založené na izotopové výměně
- 4. Metody koncentračně závislého rozdělení**
5. Radioimunologická analýza RIA
6. Radiometrické titrace

Metody koncentračně závislého rozdělení

Využívají závislosti rozdělení látky mezi dvě fáze na její počáteční koncentraci.

Rozdělení není dáno stechiometrickým poměrem, ale rovnovážnou konstantou procesu.

- Saturační analýza
- Nesaturační analýza

1. Saturační analýza

Příčinou změny rozdělení je úbytek (nedostatek) volného činidla – koncentrace látky blízká koncentraci činidla.

Obvykle:

A označíme *A a přidáme B \Rightarrow vzniká AB (obvykle v jiné fázi než nezreagované A).



Potom:

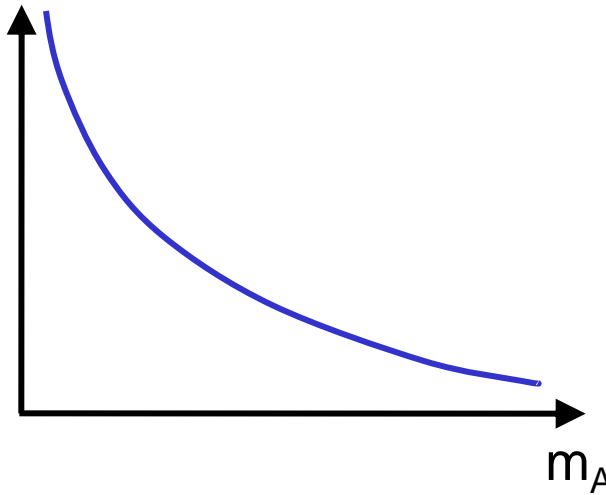
Poměr AB k nezreagovanému A zpravidla poroste s poklesem množství A.

Metody koncentračně závislého rozdělení (2)

Saturační analýza – 2, Příklad:

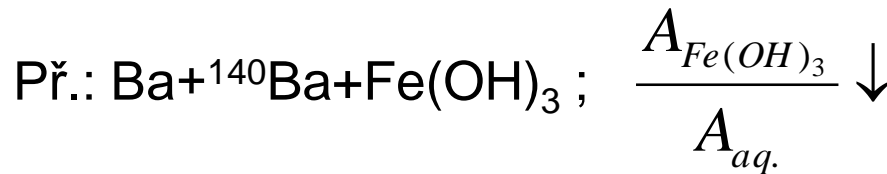
Stanovení stop barya z jeho rozdělení mezi sraženinu $\text{Fe}(\text{OH})_3$ a roztok.

$$\frac{A_{AB}^*}{A_A^*}$$



$$m_{*A} = \text{konst.}$$

$$m_B = \text{konst.}$$



$$c_{\text{Ba}} \uparrow (\text{„saturace“})$$

Metody koncentračně závislého rozdělení (3)

2) Nesaturační analýza.

Příčinou změny rozdělení posun chemické rovnováhy.

Nedochází k saturaci činidla (často několika řádový rozdíl koncentrací).

Příklad:

Stanovení chloridů z aktivity roztoku po kontaktu se sraženinou

$^{110m}\text{AgCl}$ – rozdělení řídí produkt rozpustnosti.

Posun chemické rovnováhy, 0 saturace

Př. Stanovení Cl^-



Radioreagenční metody

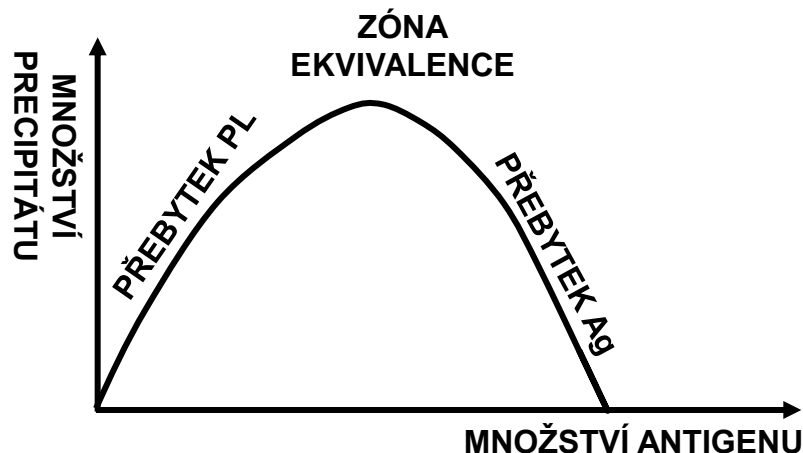
Varianty:

1. Jednoduché RRM
2. Metody spojené s uvolňováním radioaktivity (radio-release)
3. Metody založené na izotopové výměně
4. Metody koncentračně závislého rozdělení
- 5. Radioimunologická analýza RIA**
6. Radiometrické titrace

Radioimunologická analýza RIA

Imunochemie

- Chemismus imunity.
- IMUNITA – odolnost proti škodlivinám (vysokomolekulárním).
- ANTIGEN (**Ag**) – vysokomolekulární cizorodá látka vyvolávající vznik PROTILÁTKY (**Ab**).
- HAPTEN – antigen s $M < 2000$
- IMUNOLOGICKÁ REAKCE – vazba antigenu s protilátkami (pouze vazebná místa)
 - při vícenásobných vazbách prostorová síť – precipitace
 - antigen nereaguje s protilátkou ve stechiometrickém poměru.



Radioimunologická analýza RIA (2)

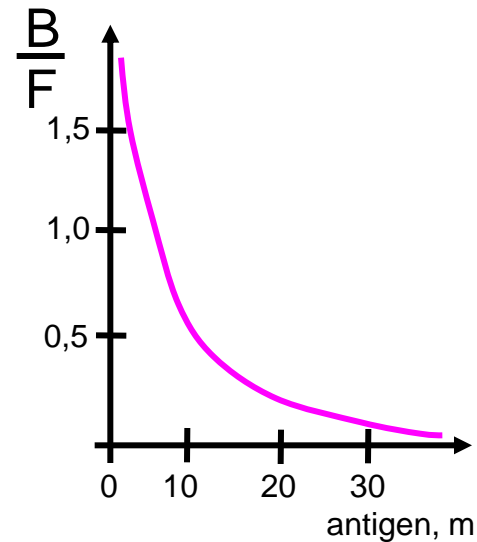
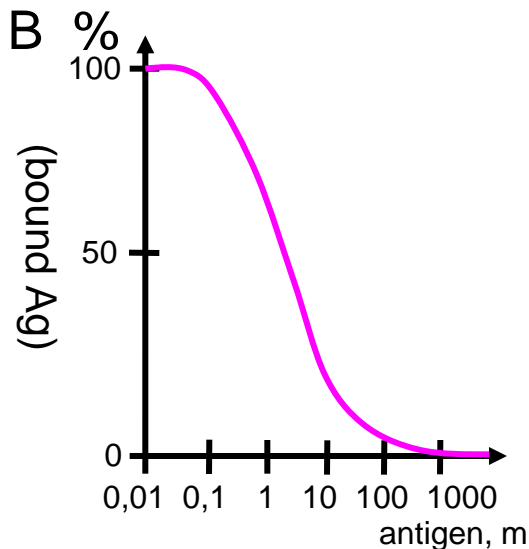
Metoda koncentračně závislého rozdělení.

Princip: Yalowová a Berson 1960, Ekins 1960.

Citlivost: až 10^{-12} g antigenů.

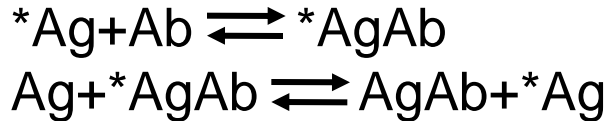
Postup:

- Roztoky s různou koncentrací stanovovaného Ag.
- Přidáme konstantní množství *Ag.
- Přidáme konstantní množství specifické Ab (menší než pro saturaci).
- Oddělíme komplex Ag-Ab.
- Vynášíme poměr aktivit komplexu (B) a volného (nezreagovaného) antigenu (F) v závislosti na počáteční koncentraci antigenu.



Radioimunologická analýza RIA (3)

Příklad:



$$K = \frac{[Ag - Ab]}{[Ag][Ab]} = 1$$

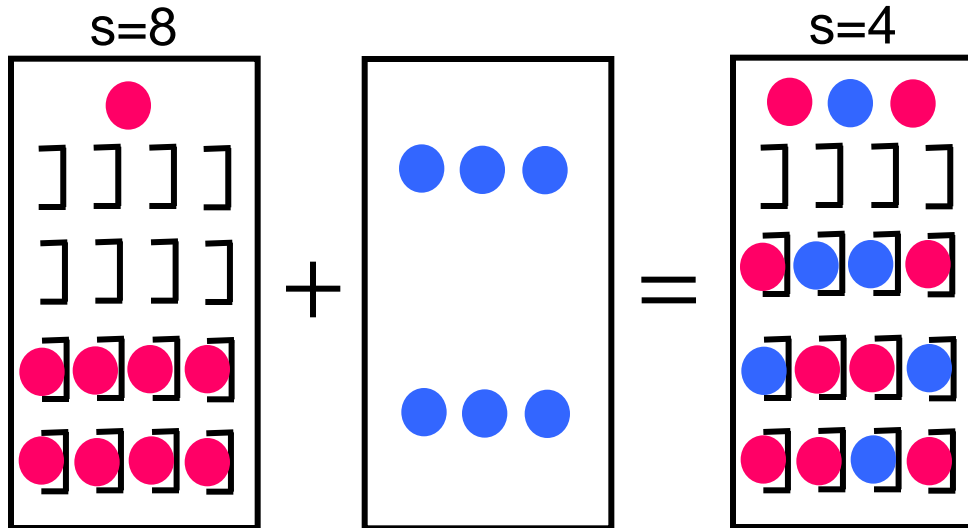
(V praxi $K = 10^7 - 10^9$)

$$s = \frac{B}{F} = \frac{*Ag - Ab}{*Ag}$$

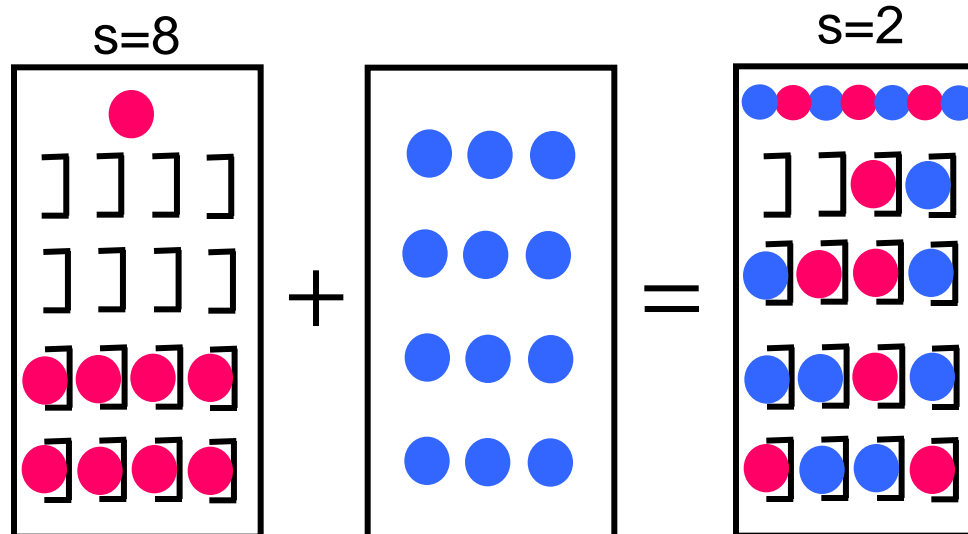
- ZNAČENÝ ANTIGEN – *Ag
- NEZNAČENÝ ANTIGEN – Ag
- PROTILÁTKA – Ab (antibody)

Radioimmunologická analýza RIA (4)

Příklad – 2: Rozdělení pro 2 různé vzorky:



$$K = \frac{12}{3 \cdot 4} = 1$$



$$K = \frac{14}{7 \cdot 2} = 1$$

Radioimunologická analýza RIA (5)

První použití – stanovení **insulinu** (^{131}I) a **vitaminu B-12** (^{60}Co).

Dnes – stovky látek:

1. Peptidické hormony (např. insulin aj.)
2. Steroidní hormony
3. Nehormonální látky (léčiva, plasmatické bílkoviny, morfin, opiáty, atd.)

Smysl RIA:

Umožňuje **ZJISTIT ANTIGENY PŘÍMO A HNED!**

Klasicky:

- Pomnožení viru (1 až 4 týdny)
- Důkaz přítomnosti protilátek (2 až 4 týdny – než se protilátky objeví v séru).

Radioimunologická analýza RIA (6)

Radionuklidy:

¹²⁵I ($T_{1/2} = 57,4$ d), EZ (100 %), $E_{\gamma} = 35$ keV

⁵⁷Co ($T_{1/2} = 270$ d), EZ, $E_{\gamma} = 14 - 136$ keV

Separace:

1. Chromatografie (sloupcová, elektroforéza, gelová filtrace) – rozdíl v migraci Ag a Ag-Ab.
2. Precipitace Ag-Ab (solemi – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 ; dioxan, EtOH, aceton, PEG....)
3. Adsorpce Ag – silikagel, akt. uhlí, skleněný prášek, bentonit, atd.
4. Metoda dvojí protilátky - komplex Ag-Ab je precipitován další protilátkou.

Radioimunologická analýza RIA (7)

Modifikace RIA.

1960: objev

1973 – 1975: cca 4.000 publikací

1977: 60 – 70 publikací měsíčně

Od 80tých let postupný ústup – náhrada neaktivními variantami.

IRMA (Immunoradioassay): značí se protilátka (*Ab)

EIA (Enzyme Immunoassay): Ab nebo Ag se „označí“ enzymem (např. peroxidázou) – měří se inhibice enzymatické aktivity (např. jako přeměna substrátu značeného ^{14}C , ^3H , ^{35}S , ^{32}P na produkt).

Fluoroimmunoassay: měří se fluorescence komplexu Ag-Ab označeného fluoreskující značkou (marker).

Neaktivní – nahrazuje RIA!

Radioreagenční metody

Varianty:

1. Jednoduché RRM
2. Metody spojené s uvolňováním radioaktivity (radio-release)
3. Metody založené na izotopové výměně
4. Metody koncentračně závislého rozdělení
5. Radioimunologická analýza RIA
- 6. Radiometrické titrace**

Radiometrické titrace

Tři varianty:

1. Titrovaný roztok aktivní, odměrný neaktivní
2. Titrovaný neaktivní, odměrný aktivní
3. Oba aktivní

- 1) Srážecí RT
- 2) RT založené na tvorbě komplexů (RKT)
 - a) Extrakční RKT
 - b) Extrakční RKT s využitím I.Z.
 - c) RKT s použitím neizotopních indikátorů v pevné fázi
 - d) ionexové RKT
 - e) RKT s využitím papírové chromatografie, zonální elektroforézy, fokusované iontové výměny

Radiometrické titrace (2)

3) RT založené na redox reakcích

s použitím:

a) extrakce

b) radioaktivních sraženin

c) amalgámů radioaktivních kovů

d) radioaktivních kovů

4) RT s použitím radioaktivních kryptonátů

5) Radiocoulometrické titrace

6) RT založené na interakci ionizujícího záření s látkou

a) RT využívající zpětného rozptylu

b) RT využívající absorpce β

c) RT využívající absorpce neutronů

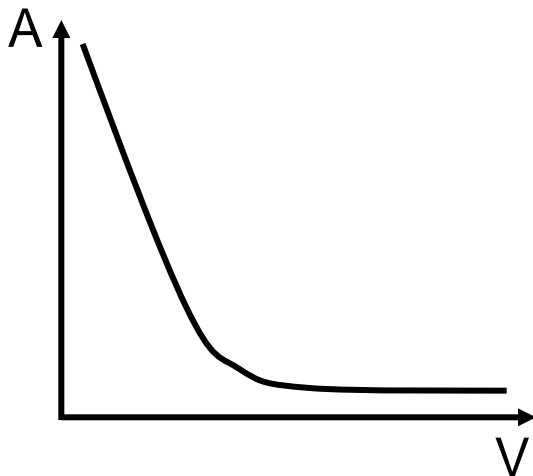
Radiometrické titrace (3)

1) Srážecí RT.

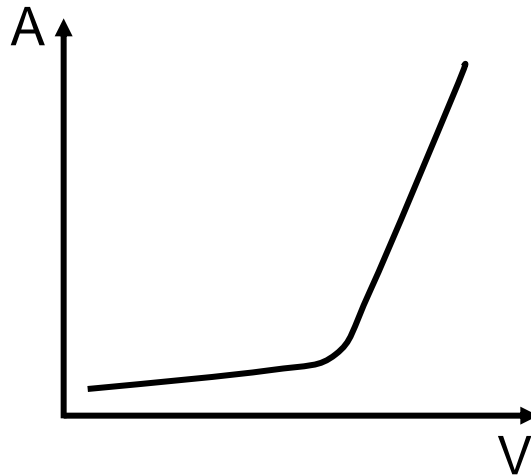
Přesnost omezena stejnými faktory jako u srážecích neaktivních titrací (stechiometrie, adsorpce, vedlejší reakce).

Příklad: Titrace *Ag chloridy a opačně:

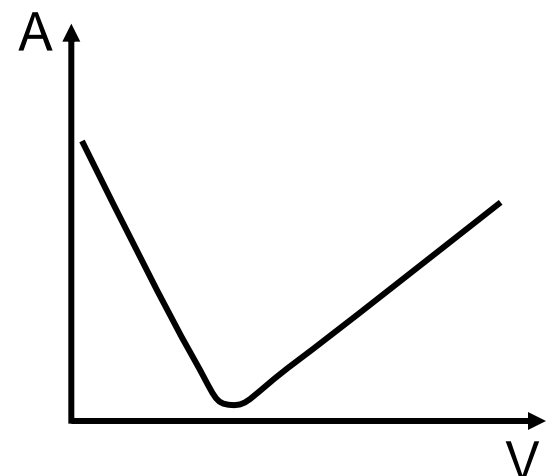
Radiometrická titrace



Aktivní titrovaný r.



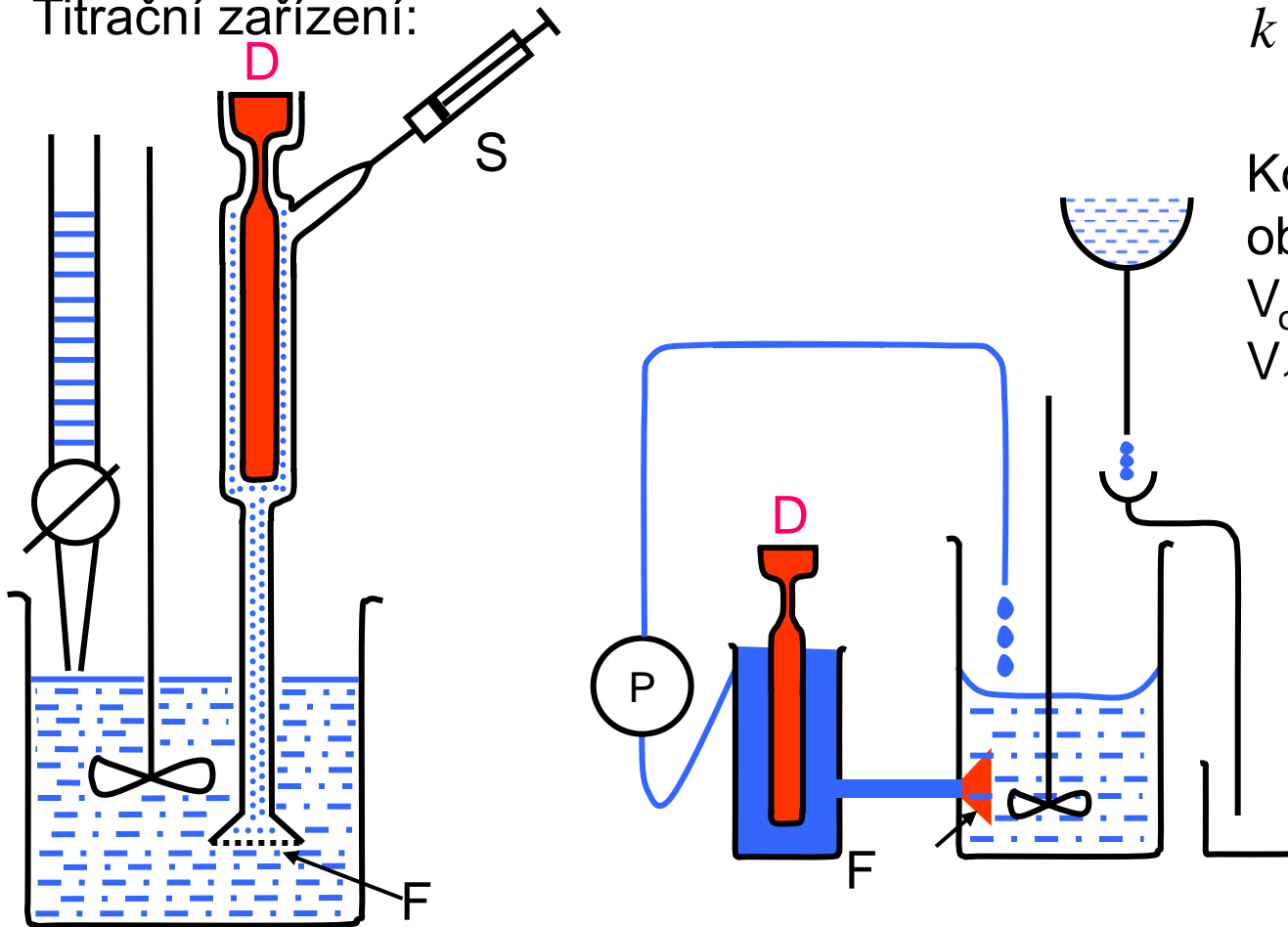
Aktivní odměrný r.



Oba aktivní

Radiometrické titrace (4)

Titrační zařízení:



$$k = \frac{V_0 + V_1}{V_0}$$

Korekce na změnu objemu:

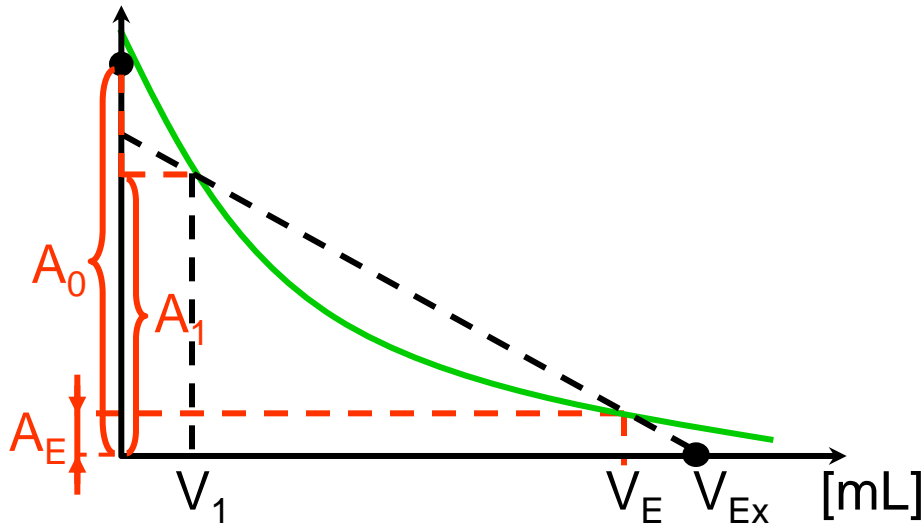
V_0 – původní objem
 V_1 – odměrný r.

Problémy s fritou \Rightarrow často **centrifugační metoda** (sada vzorků, stejné objemy vzorku + dest. voda + odměrný roztok tak, aby byl výsledný objem konstantní, separace centrifugací).

Radiometrické titrace (5)

Zjištění bodu ekvivalence V_{EX} výpočtem:

1) Titrace aktivního roztoku neaktivním



$$A_0: V_{Ex} = \frac{(A_0 - A_1)}{V_1}$$

$$V_{Ex} = \frac{A_0 V_1}{A_0 - A_1}$$

$$V_E = \frac{V_1 (A_0 - A_E)}{A_0 - A_1}$$

Nutno znát:

a) počáteční aktivitu A_0 titrovaného roztoku

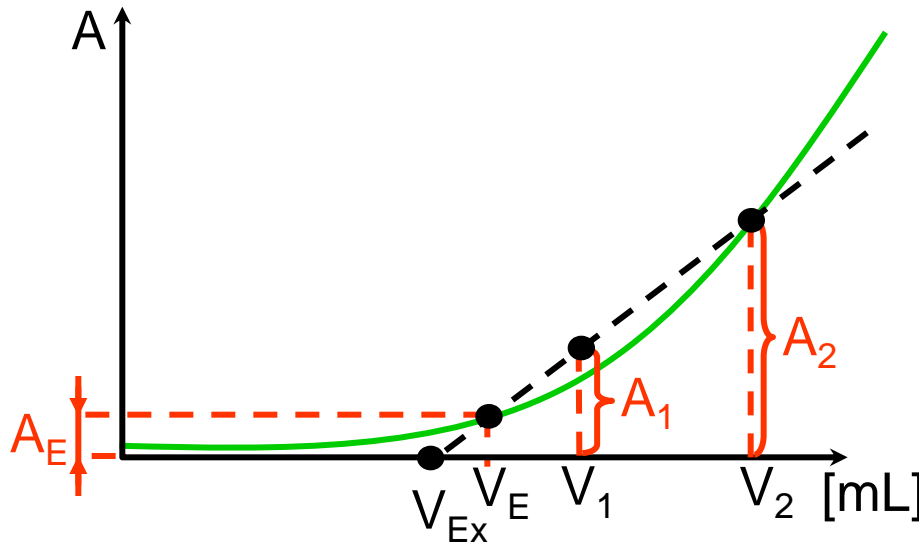
b) aktivitu A_1 po přidání V_1 ml odměrného roztoku ($V_1 < V_{EX}$)

Pozor: $V_E \neq V_{EX}$! (rozpustnost sraženiny – K_s)

Radiometrické titrace (6)

Zjištění bodu ekvivalence V_{EX} výpočtem - 2:

1) Titrace neaktivního roztoku aktivním



$$A_2 V_1 - A_2 V_{Ex} = A_1 V_2 - A_1 V_{Ex}$$

$$V_{Ex} (A_2 - A_1) = A_2 V_1 - A_1 V_2$$

$$\frac{A_2}{V_2 - V_{Ex}} = \frac{A_1}{V_1 - V_{Ex}} \quad V_{Ex} = \frac{A_2 V_1 - A_1 V_2}{A_2 - A_1}$$

$$V_E = \frac{V_1 (A_2 - A_E) - V_2 (A_1 - A_E)}{A_2 - A_1}$$

Nutno stanovit aktivity A_1 a A_2 po přidání V_1 , resp. V_2 ml
odměrného roztoku (V_1 i $V_2 > V_{EX}$)

Radiometrické titrace (7)

Stanovení dvou iontů vedle sebe:

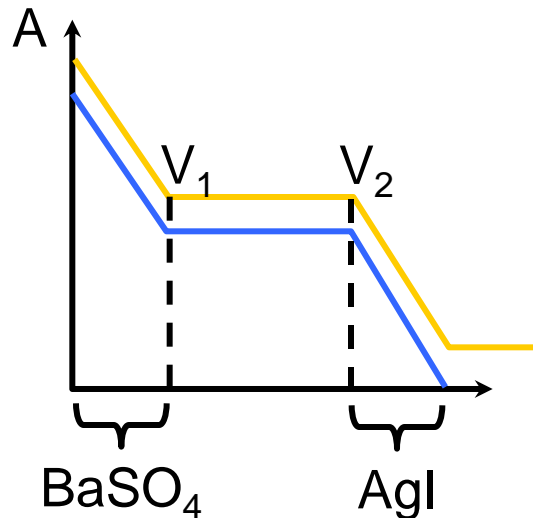
1. Titrace dvěma odměrnými činidly

Jodidy ($^{131}\text{I}^-$) + $^{35}\text{SO}_4^{2-}$;

titrujeme nejdříve BaCl_2

(srážíme BaSO_4), pak AgNO_3

(srážíme AgI)

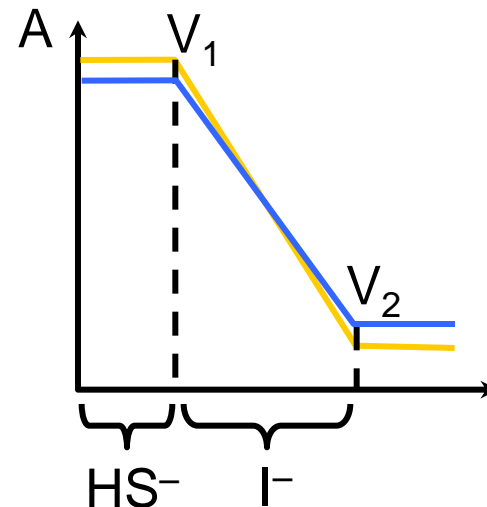


2. Jedno odměrné činidlo

(označíme iont tvořící
rozpustnější sraženinu)

Sulfidy + jodidy, titrace AgNO_3

(značíme ^{131}I)



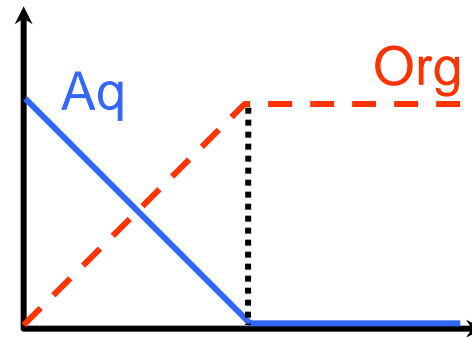
Radiometrické titrace (8)

2) Radiokomplexometrické titrace.

a) Extrakční titrace

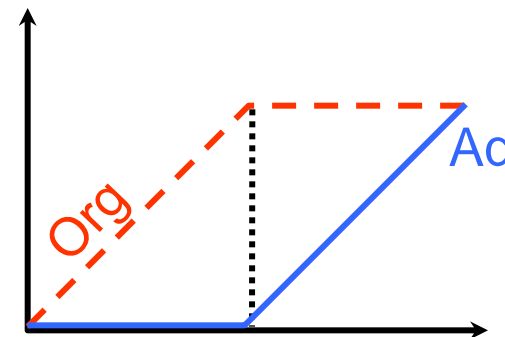
1. Značená stanovovaná látka

Př. Hg + *Hg, extrakce H₂Dz
v CCl₄



2. Značený odměrný roztok

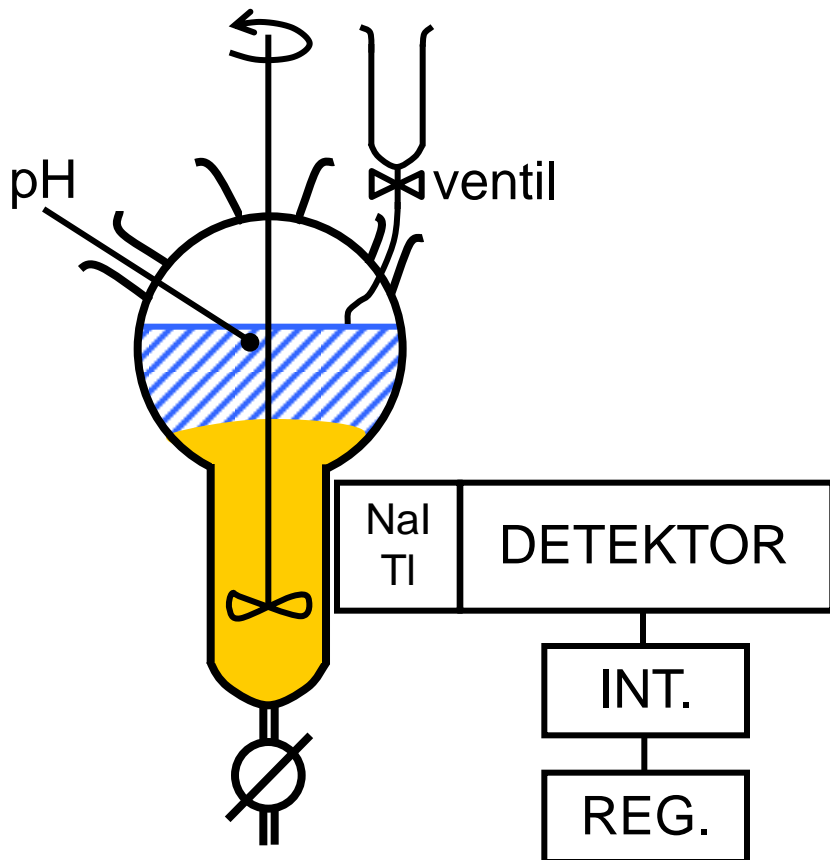
Př. Stanovení CNS⁻ titrací
*CoSO₄, extrakce
*Co(CNS)₂ do
izoamylaalkoholu



Radiometrické titrace (9)

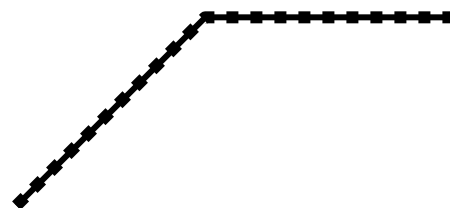
Příklad:

Extrakční titrace s označenou stanovovanou látkou

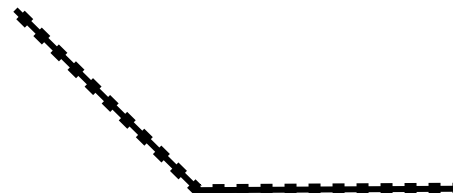


Elektromagnetický ventil se otevře současně se spuštěním míchačky.

- 1) Titrace Sc značeného ^{46}Sc alkalickým roztokem TTA (pH=6,8); Ex. $\text{Sc}(\text{TTA})_3$ do CHCl_3



- 2) Titrace Cu značené ^{64}Cu vodným roztokem NaDTC do benzenu

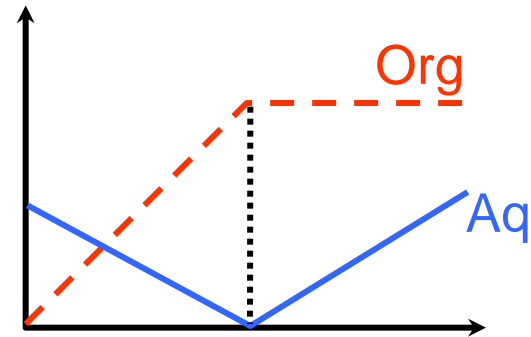


Radiometrické titrace (10)

Extrakční titrace - 2

3. Stanovovaný i odměrný aktivní

Př. Do org. fáze přechází pouze produkt



4. Dvě složky vedle sebe

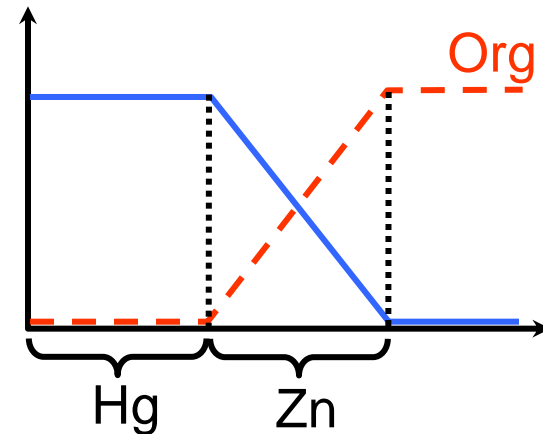
(označíme tu, která má menší K_{ex})

Př. Stanovení Hg a Zn extrakcí

H_2Dz :

$pK_{ex}(Hg) = 23$, $pK_{ex}(Zn) = 2$

\Rightarrow označíme Zn



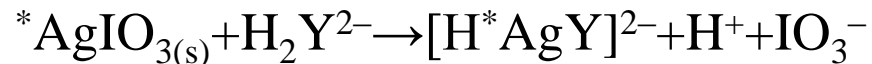
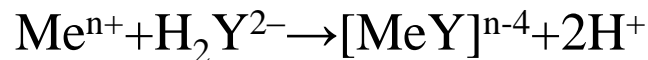
Radiometrické titrace (11)

Radiokomplexometrické titrace - 2.

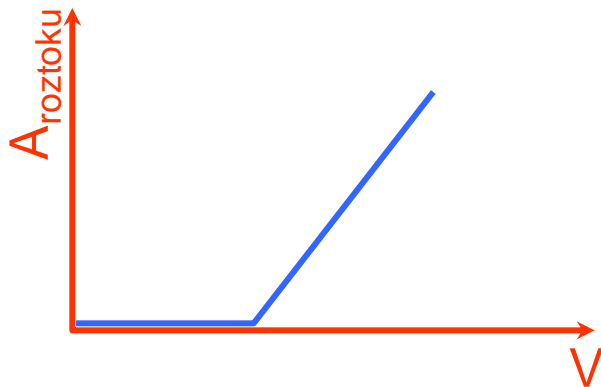
c) RKT s použitím neizotopního indikátoru v tuhé fázi

Princip: Jestliže L tvoří s Me_1 silnější komplex než s Me_2 , můžeme sraženinu $*Me_2B$ použít jako indikátor při titraci Me_1 pomocí L.

a) titrace přímá:



(Mg, Sn, Ca, K III)



Radiometrické titrace (12)

RKT s použitím neizotopního indikátoru v tuhé fázi - 2

b) obrácené titrování:

NADBYTEK K III, pH~10, +*AgIO₃

TITRACE NADBYTKU K III kovem tvořícím s EDTA silnější komplex než s Ag. (stanovení Al, retitrace Ca(NO₃)₂)

TITRACE Ni KCN: [Ni(CN)₃]⁻

INDIKÁTOR *Ag(DTC)/CCl₃

*AgDTC+2CN⁻→*Ag(CN)₂⁻+ [DTC]⁻

Radiometrické titrace (13)

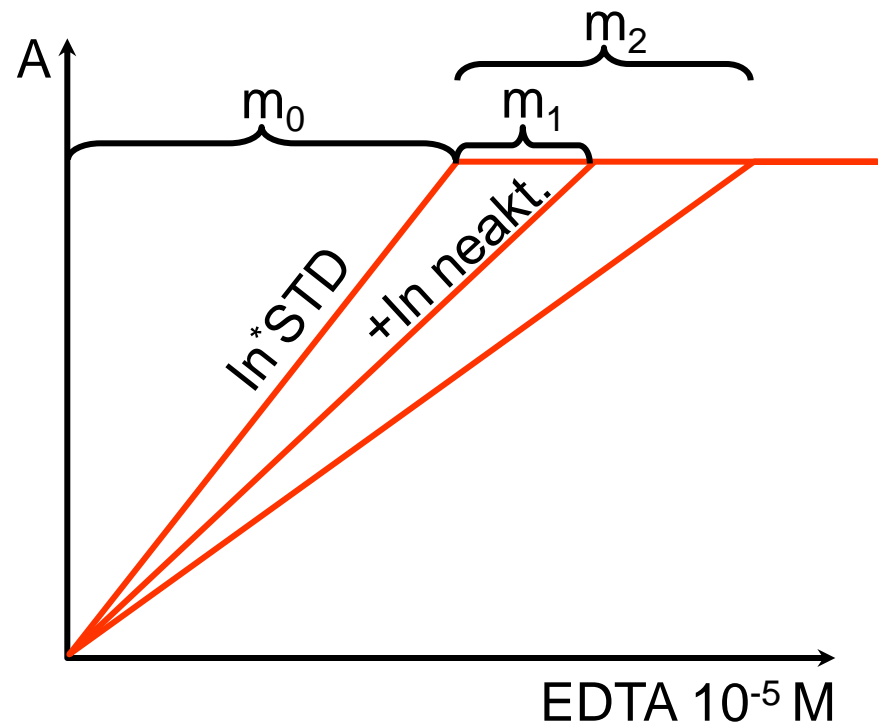
Radiokomplexometrické titrace - 3.

d) Ionexové RKT

Princip: Titrujeme činidlem, které tvoří s M pevnější komplex než je vazba M na ionex, propouštíme ionexem, měříme aktivitu eluátu.

1. Izotopní značení

Př.: Stanovení In^{3+}
označeného $^*\text{In}$ titrací
EDTA – komplex $[\text{InY}_4^-]$
(In^{3+} se zachytí na katexu,
komplex projde)



Radiometrické titrace (14)

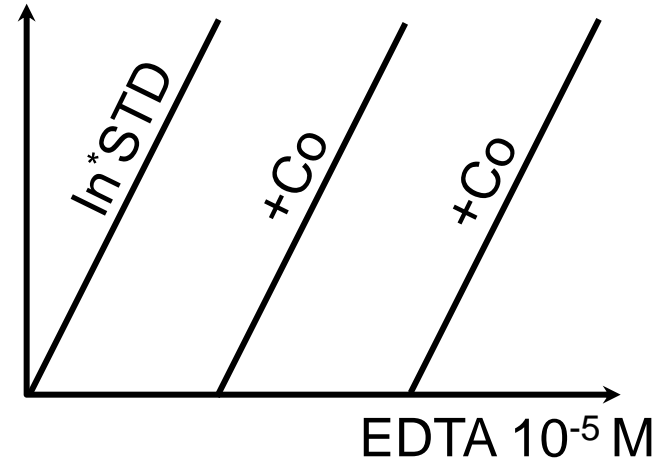
Ionexové RKT - 2

2. Neizotopní značení

Př.: Stanovení Co^{3+} titrací

EDTA, indikátor $^*\text{In}$

$\beta_{\text{CoY}} > \beta_{\text{InY}} \Rightarrow$ zpočátku se In^{3+} zachytí na katexu, projde jen komplex CoY (eluát zpočátku neaktivní)



Radiometrické titrace (15)

3) RT založené na redox reakcích.

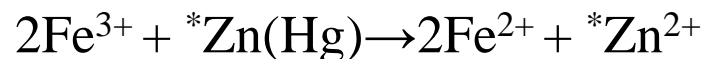
a) IND. SRAŽENINA:

I₂ titrován Na₂S₂O₃, ind. *AgSCN:



b) IND. AMALGAM:

titrace kyselinou askorbovou Fe³⁺, ind. ⁶⁵Zn(Hg)



c) IND. RAD. KOVY:

titrace H₂AsO₃ ionty Ce⁴⁺, ind. *Ag – síťka

d) EXTRAKCE:

titrace S₂O₃²⁻ pomocí ¹³¹I₂, ex. CCl₄

Radiometrické titrace (16)

4) RT s použitím radioaktivních kryptonátů.

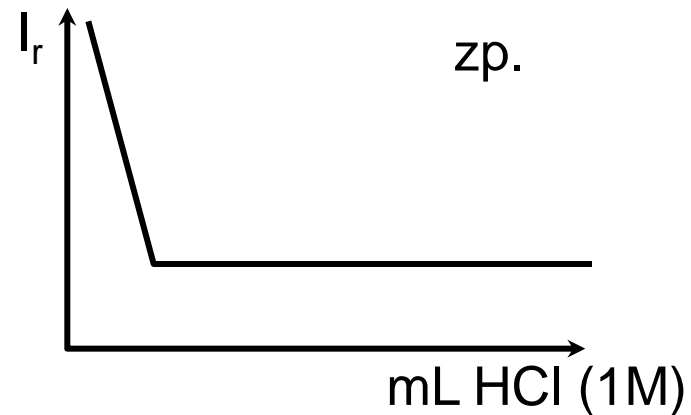
- a) Acidimetrické – ind. sklo [^{85}Kr]
- b) Alkalimetrické – ind. Mg[^{85}Kr], Zn[^{85}Kr]

Radiometrické titrace (17)

5) RT využívající absorpce nebo rozptylu záření.

a) RT využívající zpětného rozptylu β

Př. Stanovení Ag^+ titrací HCl :
měření zp. rozptylu β v AQ.



b) RT využívající absorpce β

Př. Stanovení Cl^- titrací AgNO_3 :
měření absorpce β v AQ

