

Министерство здравоохранения Республики Беларусь
Учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»

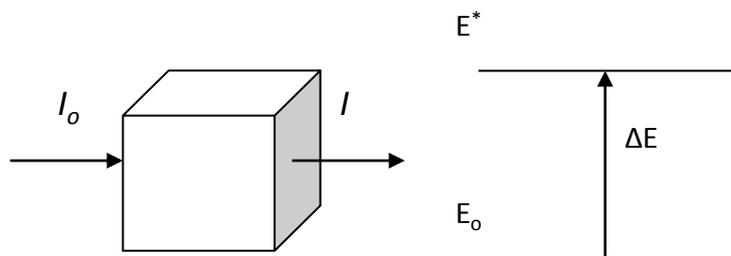
Лекция 2

Фотометрические методы анализа



Фотометрические методы анализа

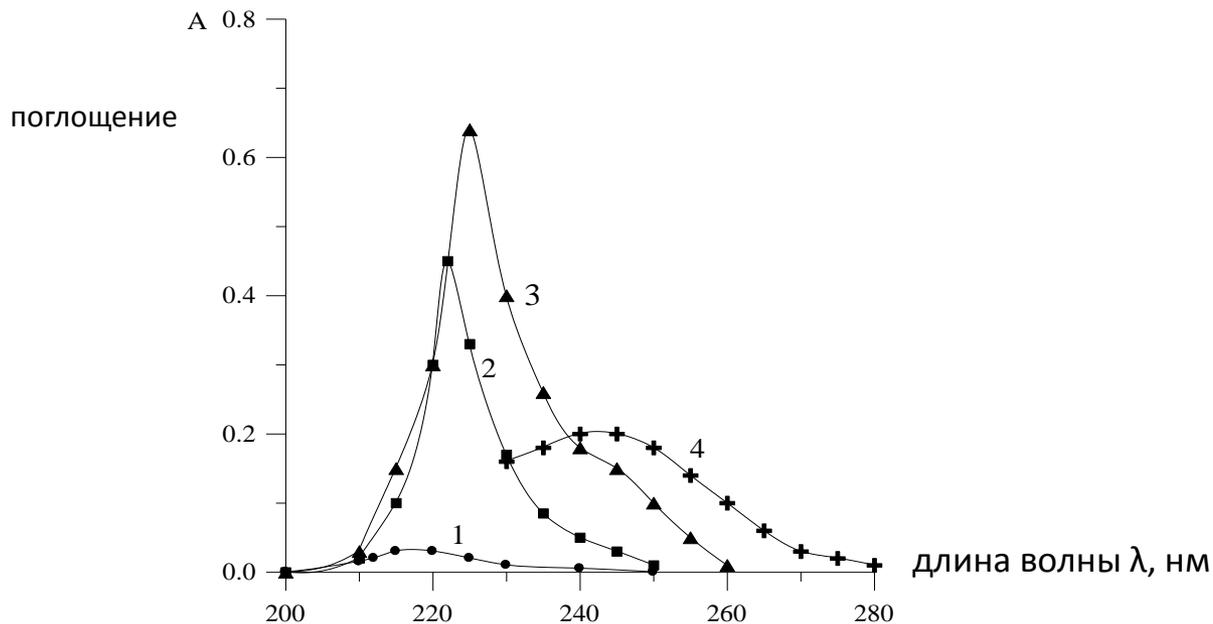
Методы, основанные на измерении избирательного поглощения светового излучения в видимой, бл.УФ, бл.ИК областях спектра истинными растворами исследуемого вещества (т.е. однородными нерассеивающими системами).



Закон Планка

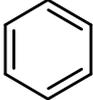
$$\Delta E = E^* - E_0 = h\nu = h \frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

$$E_{\text{кванта}} = E_{\text{возб. электрона}} = \Delta E \quad (2)$$



Хромофоры и ауксохромы

Хромофорные группы

- Карбонильная
- Карбоксильная
- Этиленовая
- Азометиновая >C=N—
- Нитрозо-группа —N=O
- Нитритная группа —O—N=O
- Нитратная —O—NO_2
- Бензол 

Ауксохромы

$\text{—NH}_2, \text{—N(CH}_3)_2, \text{—OH, —OCH}_3$

Хромофорная группа	Соединение	$\lambda_{\text{макс}}$, нм
Карбонильная	Ацетон (спирт)	270,0
	Ацетальдегид (спирт)	293,4
Карбоксильная	Уксусная кислота (H ₂ O)	204

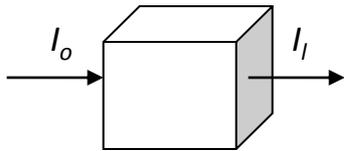
Поглощающие системы в фотометрии

- *Растворы аква-комплексов (ионов), обладающие поглощением в видимой области спектра; их молярный коэффициент поглощения (ϵ) не выше $n \cdot 10^2$.*
- *Органические соединения.*
- *Растворы солей элементов в высших степенях окисления (MnO_4^- , $Cr_2O_7^{2-}$ и т.д.)*
- *Растворы комплексов металлов с неорганическими ($\epsilon \sim n \cdot 10^3$) и органическими ($\epsilon \sim n \cdot 10^4$) лигандами.*

Основные законы поглощения

- **I. Закон Бугера-Ламберта**

$$I_o = I_l + I_a + I_r \quad (3),$$



Закон: «Относительное количество поглощенного электромагнитного излучения не зависит от интенсивности падающего излучения. Каждый слой равной толщины поглощает равную долю падающего монохроматического потока излучения».

$$-\frac{dI}{dl} = \alpha I \quad \text{или} \quad \frac{dI}{I} = -\alpha dl \quad (4)$$

$$\int_{I_o}^{I_l} \frac{dI}{I} = -\alpha \int_0^l dl \quad (5) \quad , \quad \ln I_l - \ln I_o = -\alpha l \quad (6) \quad I_l = I_o \cdot e^{-\alpha l} \quad (7)$$

$$I_l = I_o \cdot 10^{-kl} \quad (8) \quad \text{— Закон Бугера-Ламберта}$$

Если $K = \frac{1}{l}$, то $\frac{I_l}{I_o} = \frac{1}{10}$ (9).

Основные законы поглощения

- II. Закон Бера

Закон: «Поглощение потока электромагнитного излучения прямо пропорционально числу частиц поглощающего вещества, через которое проходит поток этого излучения»

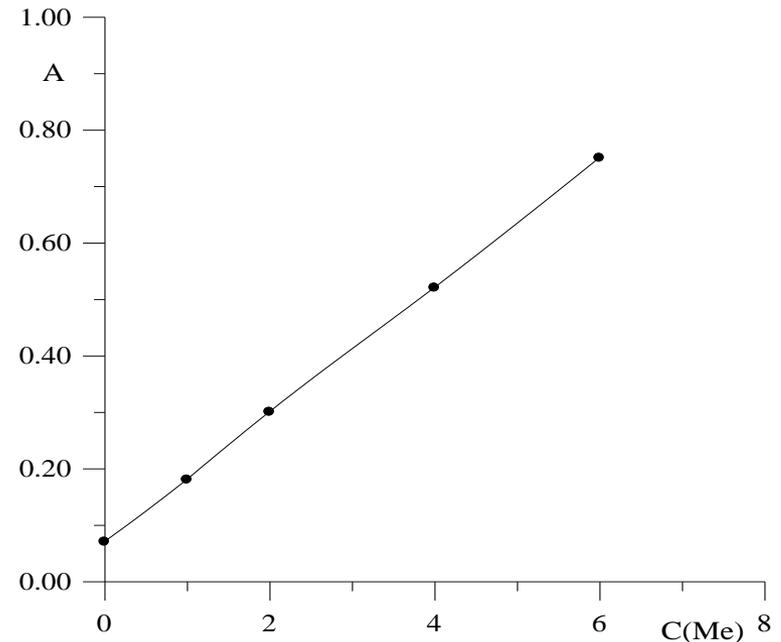
$$k = \varepsilon \cdot c \quad (10)$$

- III. Объединенный закон поглощения – закон Бугера-Ламберта-Бера – основной закон поглощения

$$I_l = I_o \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot l} \quad (11) \quad \text{или}$$

$$\lg \frac{I_o}{I_l} = \varepsilon \cdot c \cdot l = A \quad (12)$$

$$\lg \frac{I_o}{I_l} \quad \begin{array}{l} \text{оптическая} \\ \text{плотность} \text{ поглощающего} \\ \text{вещества} \end{array}$$



Основные фотометрические величины

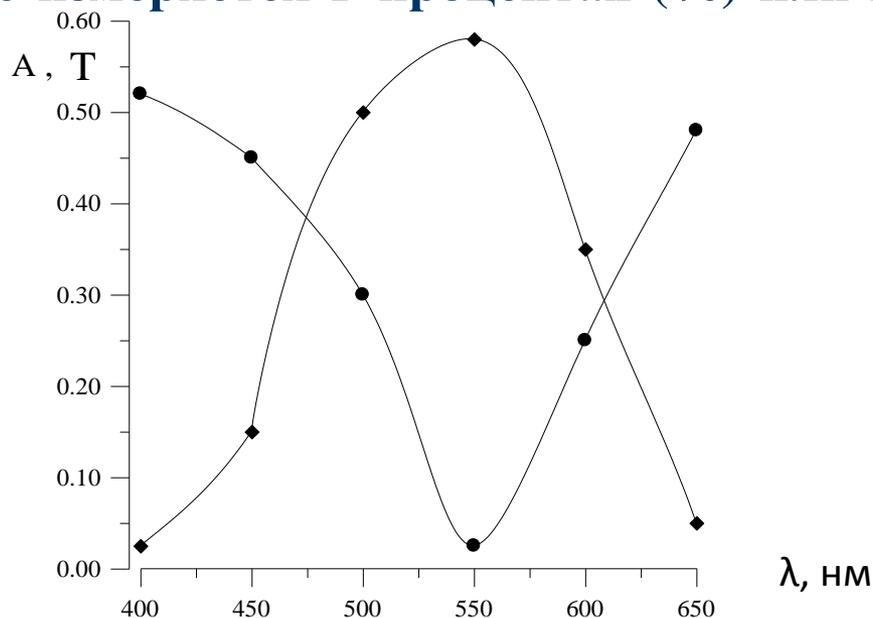
- **I. Оптическая плотность (A)** – аналитический сигнал, характеризующий способность раствора поглощать свет; величина безмерная.
- **II. Прозрачность или пропускание (T)** – отношение интенсивности монохроматического потока излучения, прошедшего через исследуемый объект, к интенсивности первоначального потока излучения. Величина T характеризует способность раствора пропускать свет. Пропускание измеряется в процентах (%) или в долях (от 0 до 1).

$$T = \frac{I_l}{I_o} = 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot l} \quad (13)$$

$$A = -\lg T \quad (14)$$

$$A = \lg \frac{1}{T} \cdot 100 = 2 - \lg T \quad (15)$$

$$T = 10^{-A} = e^{-2,3A} \quad (16)$$



Основные фотометрические величины

•III. Молярный коэффициент светопоглощения (погашения) (ϵ) – является основной характеристикой поглощения любой системы при данной длине волны; отражает индивидуальные свойства окрашенных соединений и является их определяющей характеристикой.

Физический смысл: молярный коэффициент светопоглощения представляет собой оптическую плотность раствора с концентрацией 1 моль/л, помещенного в кювету с толщиной поглощающего слоя 1 см; имеет размерность $\text{см}^2/\text{моль}$.

Молярный коэффициент светопоглощения зависит от:

•длины волны падающего света;

•температуры раствора;

•природы растворенного вещества.

•Молярный коэффициент светопоглощения является мерой чувствительности данной фотометрической реакции.

Молярный коэффициент светопоглощения бывает истинным и кажущимся.

Значение ϵ характеризует два существенно важных свойства поглощающей системы:

•постоянство значения ϵ говорит о соблюдении основного закона поглощения в определенном интервале концентраций;

•значение ϵ удобно использовать для сравнительной оценки чувствительности фотометрической реакции

Спектр поглощения – графическое изображение распределения поглощаемой веществом энергии по длинам волн. Спектры поглощения имеют одну и ту же форму независимо от толщины слоя раствора или концентрации вещества в растворе и характеризуются **сохранением положения максимума** при одной и той же длине волны.

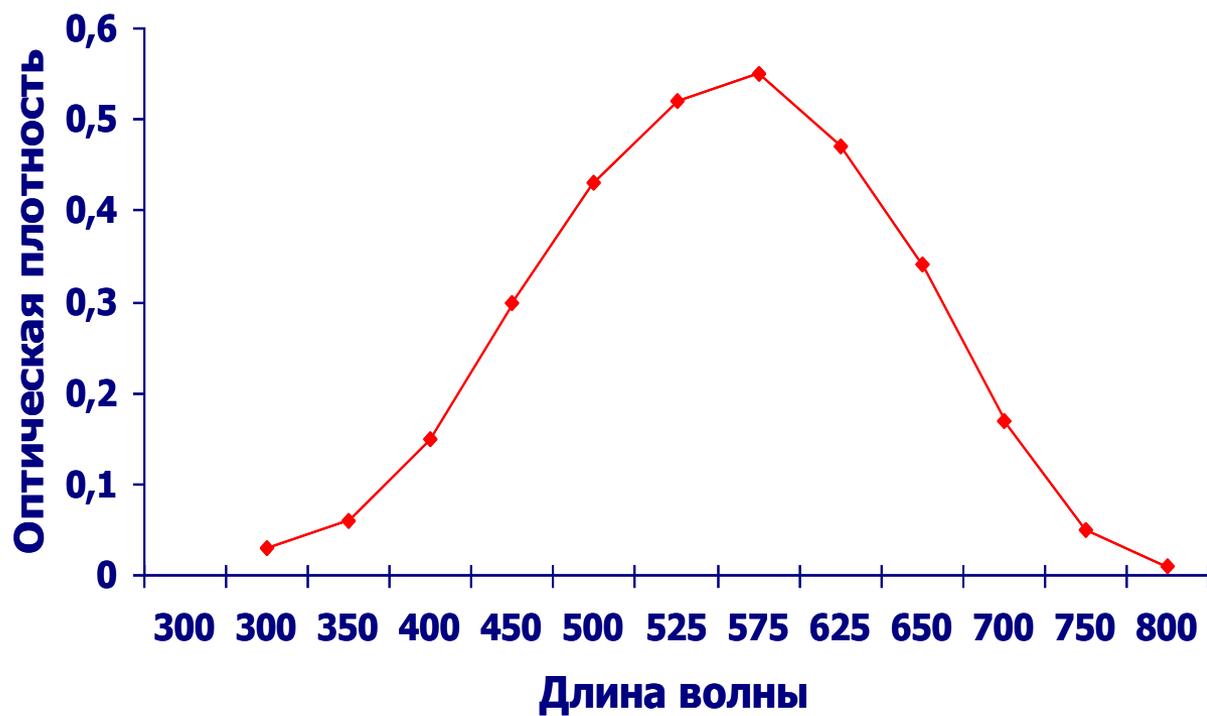
•Закон аддитивности (правило) – Фирордт (1873)

Если в растворе содержится n светопоглощающих компонентов, которые не вступают друг с другом в химическое взаимодействие, то при условии соблюдения основного закона светопоглощения оптическая плотность такого раствора будет равна сумме парциальных оптических плотностей всех содержащихся в растворе светопоглощающих компонентов.

$$A = \varepsilon_1 \cdot c_1 \cdot l + \varepsilon_2 \cdot c_2 \cdot l + \dots \varepsilon_n \cdot c_n \cdot l = l \sum_{i=1}^N \varepsilon_i \cdot c_i \quad (17)$$



Спектр поглощения



Причины отклонения от закона Бугера-Ламберта-Бера

Поведение поглощающих систем подчиняется закону Б-Л-Л при условии:

- монохроматичности светового потока;
- отсутствии химических изменений в поглощающей системе;
- постоянстве коэффициента преломления.

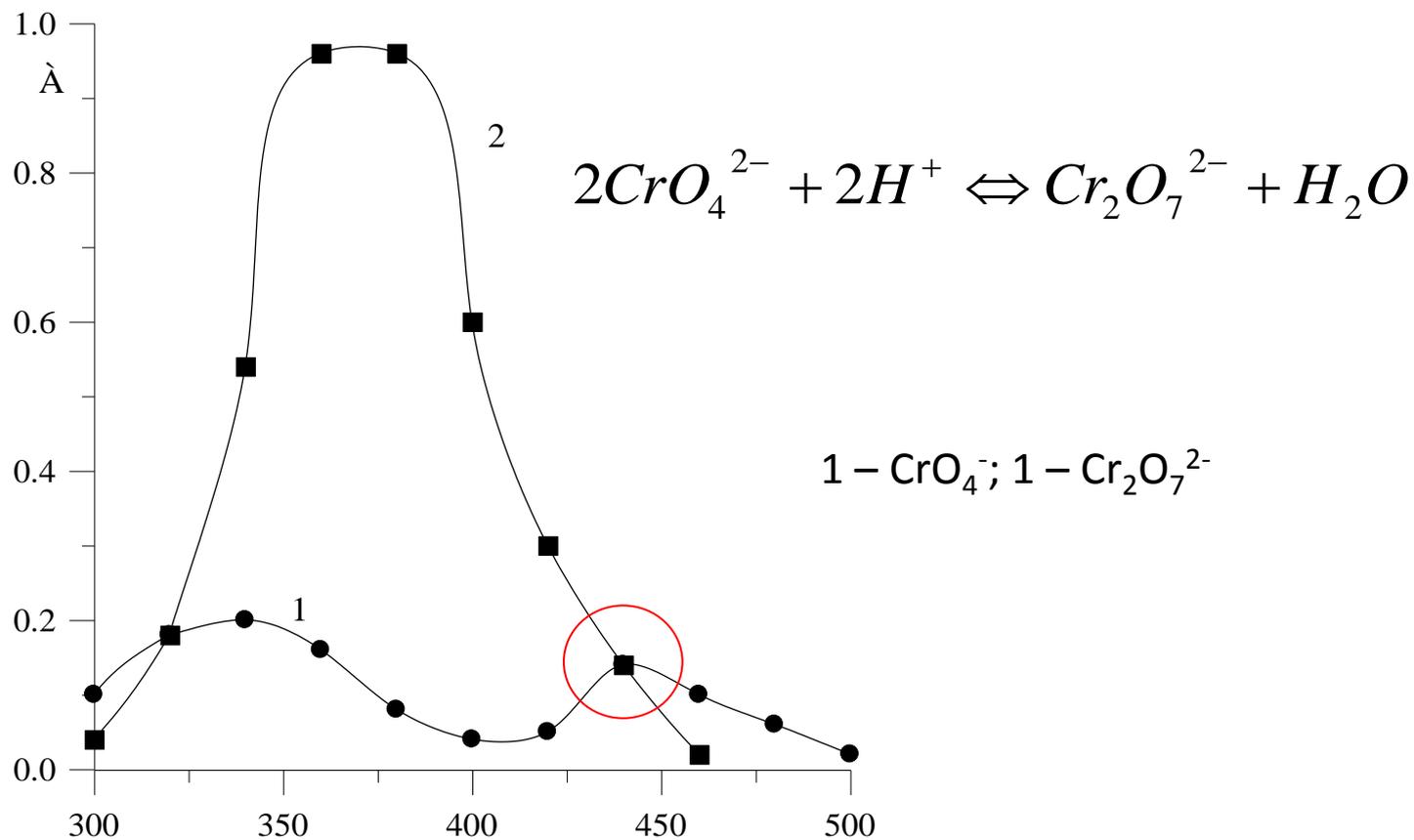
Причины отклонения:

I. кажущиеся:

1. физические (инструментальные) – немонохроматичность светового потока; рассеяние света; случайные излучения.
2. химические:
 - изменение ионной силы раствора;
 - изменение концентрации раствора;
 - изменение степени сольватации (гидратации);
 - изменение концентрации ионов $[H^+]$;
 - изменение степени диссоциации комплексного соединения при разбавлении.

II. истинные – изменение коэффициента преломления.

Влияние концентрации $[H^+]$ на формы существования частиц



Фотометрическая реакция

К фотометрическим реакциям прибегают в следующих случаях:

- определяемый компонент не окрашен или интенсивность его светопоглощения мала;
- полосы поглощения определяемого и посторонних компонентов перекрываются;
- определяемый компонент присутствует в виде множества различных химических форм.

Требования к фотометрическим реакциям

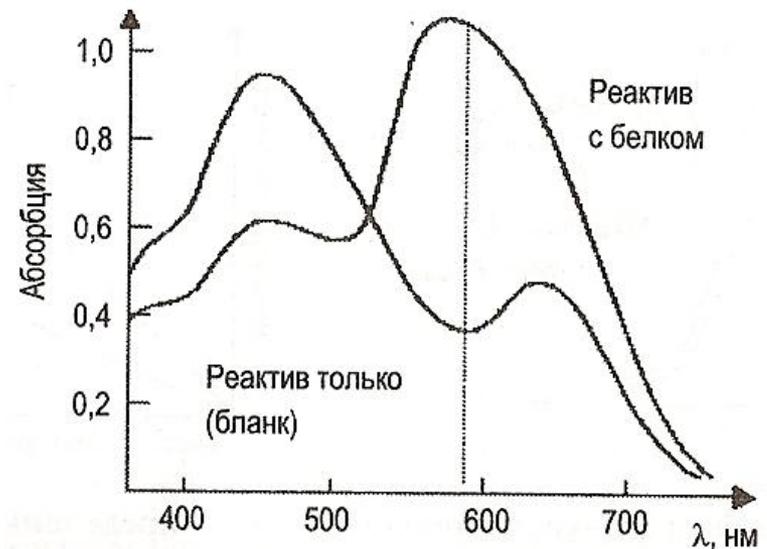
- В результате реакции должно образовываться вещество, поглощающее свет в УФ или видимой области спектра;
- фотометрические реакции, несмотря на различия в их химизме, должны протекать быстро, количественно, избирательно;
- поглощение продуктов фотометрической реакции должно быть хорошо воспроизводимым и постоянным во времени;
- важно, чтобы закон Б-Л-Б выполнялся в широком интервале концентраций определяемого вещества;
- если фотометрический реагент окрашен, то реакция должна обладать высокой контрастностью;
- образующееся комплексное соединение должно быть прочным;
- значение ε должно быть достаточно большим, т.е. реакция должна быть чувствительной.

Фотометрия. Основные принципы.

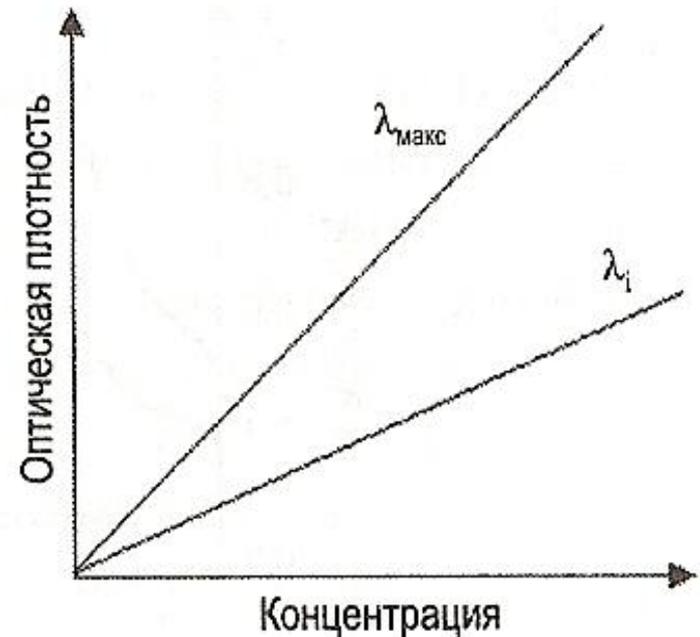
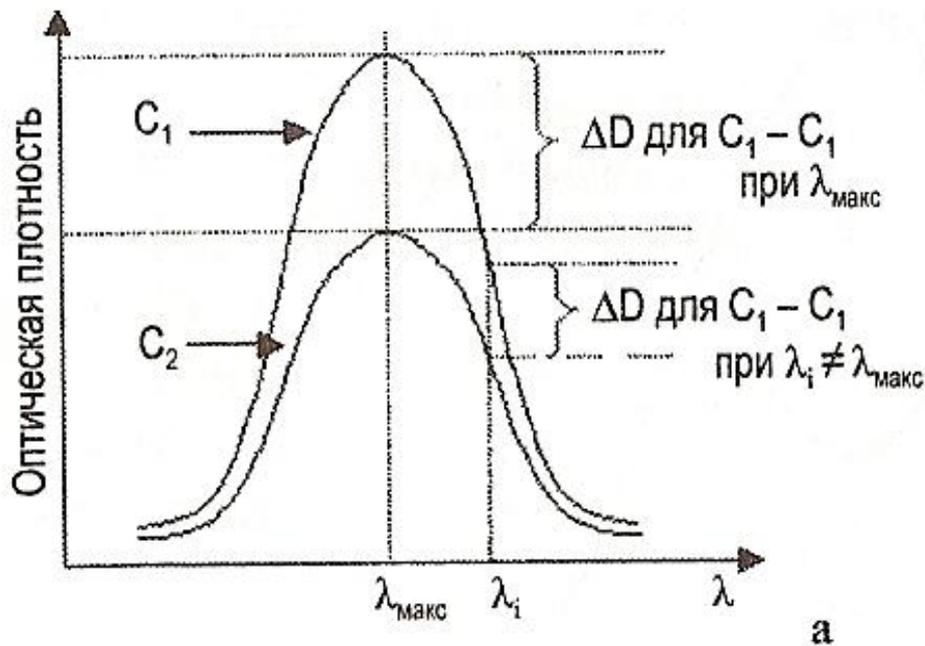
Изменение в многокомпонентных растворах.

Растворы в клинической химии часто представляют собой многокомпонентные системы. При фотометрическом измерении многокомпонентных систем используют принцип аддитивности, согласно которому поглощение отдельного вещества не зависит от других веществ, обладающих собственным поглощением. Поэтому, при данной длине волны оптическая плотность раствора из смеси компонентов, не взаимодействующих между собой, равна сумме оптических плотностей отдельных компонентов при той же длине волны. На рисунке представлены спектры поглощения реактива без белка и с белком. В обоих состояниях, как в свободном, так и в комплексе с белком реактив поглощает, но с разной интенсивностью.

Для оценки степени поглощения исследуемого раствора, содержащего какое-либо соединение, проводится сравнение интенсивности потока излучения, прошедшего через этот раствор, с интенсивностью потока излучения, прошедшего через раствор сравнения - бланк.



Измерение в максимуме спектральной полосы поглощения.



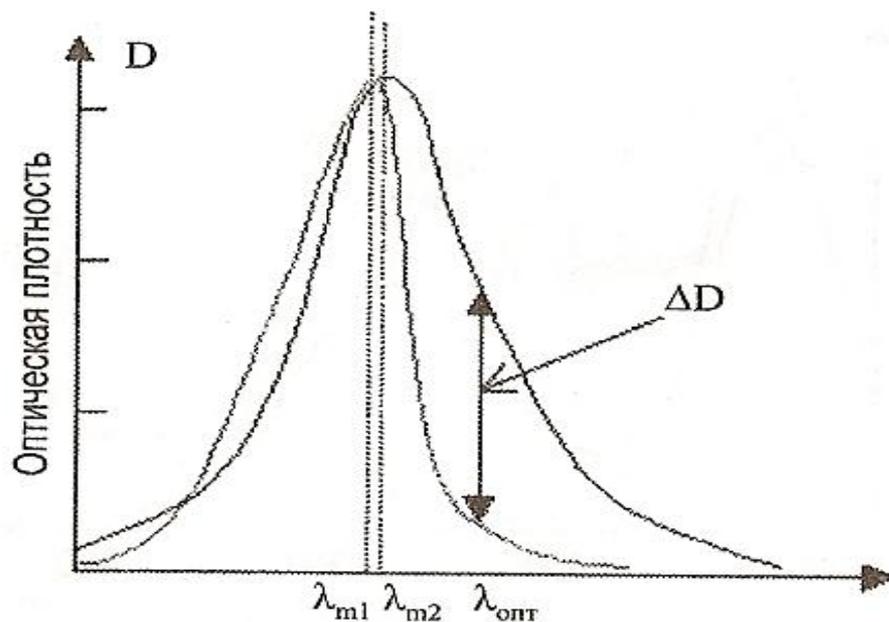
Исследование растворов рекомендуется проводить при длине волны облучения, соответствующей максимальному поглощению. В это случае чувствительность фотометрического исследования так-же максимальна.

Измерение на оптимальной длине волны.

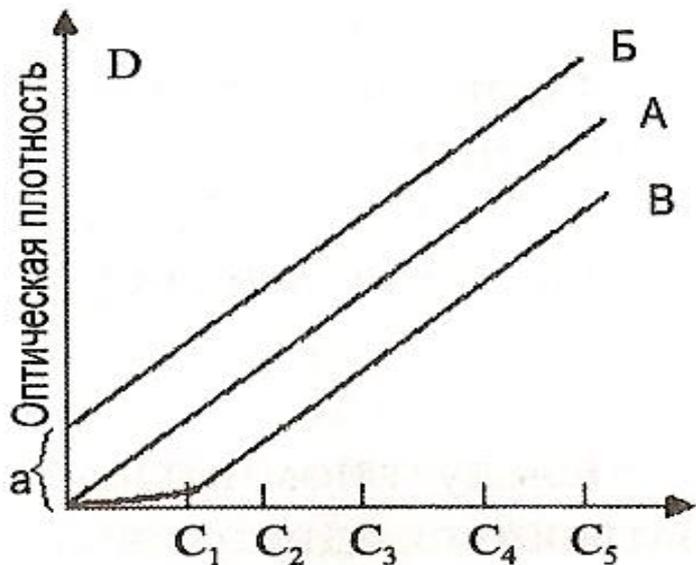
Если в многокомпонентной системе два или более компонентов имеют максимум поглощения в одной области, то часто измерение проводится на оптимальной длине волны, на которой существенно различаются оптические плотности рабочего раствора (бланк) и исследуемого вещества.

Пример 1: Определение креатинина по конечной точке. Субстрат реакции, пикриновая кислота, продукт реакции, щелочной пикрат, образующийся в результате реакции Яффе, имеют близкие спектры поглощения.

Пример 2: При определении магния методом с ксилидиловым синим, максимум поглощения реагента отмечается при длине волны 540 нм, а комплекса с магнием при длине волны 520 нм. В случае измерения при длине волны 545 (546) нм (часто устанавливаемый фильтр на фотометрах и б/х анализаторах) на фоне ОП рабочего реагента (бланк) будет слабо различима ОП анализируемого образца.



Измерение по калибровочной кривой.



Для построения калибровочного графика на оси абсцисс откладывается концентрация C , а на оси ординат плотность D . На оси D откладывают все полученные значения D_i , соответствующие концентрациям C_i .

Возможны 3 варианта калибровочного графика:

1. Вариант А. Калибровочный график имеет вид прямой и проходит через точку 0. В этом случае $F=C_i/D_i$
2. Вариант Б. Имеется систематическая ошибка, которую следует учитывать при расчете фактора. $F=C_i/(D_i-a)$. Желательно измерение с холостой пробой, в которой данная ошибка учитывается.
3. Вариант В. Данным калибровочным графиком пользоваться нельзя, так как не определяются низкие концентрации калибратора.

Метод сравнения стандартного и опытного образца.

Этот метод определения концентрации является наиболее приемлемым, так анализируемая и стандартная проба пробы обрабатываются в одинаковых условиях. Поэтому при больших сериях рекомендуется исследовать стандартную пробу в начале исследования определяя соотношение $C_{ст}/D_{ст}$, или фактор F.

Расчет ведут по стандарту или фактору.

Расчет по стандарту: обозначается в том случае, если используется уравнение:

$C_i = D_i \cdot C_{ст}/D_{ст}$, где C_i – искомая величина.

Расчет по фактору, случай когда используется уравнение:

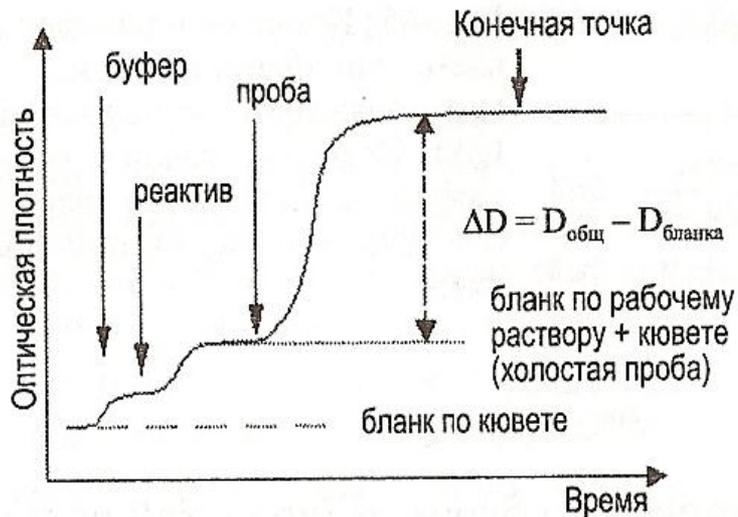
$$C = D \times F$$

Следует помнить, что в опытной и стандартной пробах должен обрабатываться одинаковый объем образца.

Пример: В реакции необходимо использовать 100 мкл образца. В качестве образца используется плазма в том же объеме, но в плазму при ее получении добавляют цитрат в отношении 1:9. Следовательно в 100 мкл плазмы содержится 90 мкл исследуемой биологической жидкости. Это следует учитывать при расчетах, вводя поправочный коэф-т.

Прим.: Данный метод расчета справедлив только на линейном диапазоне зависимости ОП от концентрации.

Измерение по конечной точке. (End point method)



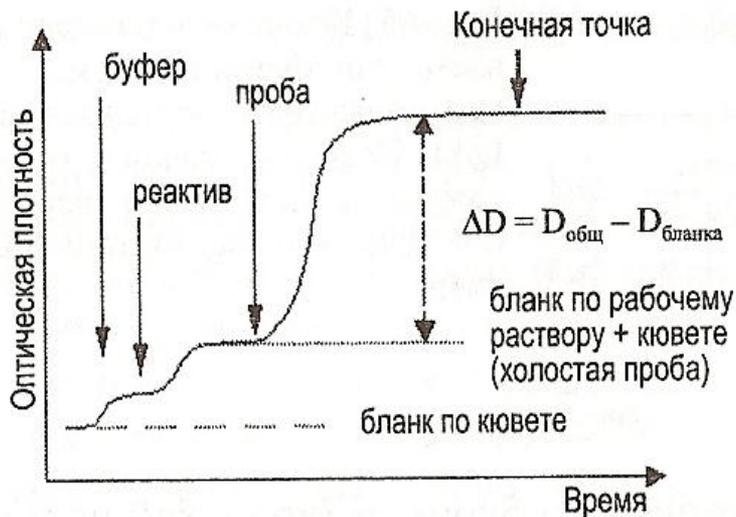
Реакция, сопровождающаяся изменением фотометрического сигнала, развивается за некоторый период времени и достигает определенного конечного состояния, так называемой конечной точки. Изменение сигнала как функция времени показано на рисунке. При измерении по конечной точке уровень сигнала соответствует

Количеству продуктов реакции в инкубационной среде после фиксированного времени инкубации. Поглощение измеряется после окончания реакции при стабильном уровне сигнала.

При работе с одноканальным фотометром измерение сопровождается значительной систематической ошибкой, связанной с влиянием на конечный результат рабочего реактива, отражением света от стенок кюветы и др. Для исключения влияния этих факторов используют измерение относительно бланка (холостой пробы). Как правило, бланк определяется по рабочему реактиву, т.е. готовому к работе реактиву перед измерением пробы. Оптическая плотность пробы рассчитывается: $D_{\text{пробы}} = D_{\text{к.точки}} - D_{\text{бланка}}$

Измерение с дифф. бланком (assay differential blank).

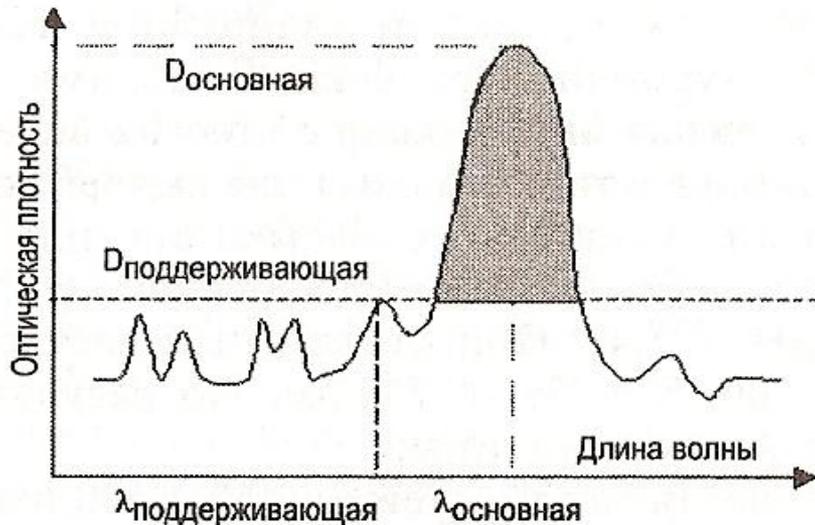
Данный тип измерения является разновидностью измерения с бланком. При измерении в одной кювете, когда отсутствует кювета сравнения, сопоставление конечного результата проводят в кювете с рабочим реактивом до момента добавления к нему исследуемой биопробы. Такой способ обычно обозначается как 2-х точечное



измерение. Важно при этом, чтобы система при измерении бланка достигла стабильного состояния. При добавлении в реакционную среду нескольких реактивов, бланк определяется при достижении стабильного состояния после внесения всех реактивов перед пробой.

Таким образом, бланк — это характеристика, отнесенная к шкале оптической плотности, бланк определяет оптическую плотность рабочего реактива.

Двухволновое измерение



В отдельных случаях необходимо учитывать интерферирующие (мешающие) факторы, например в случае гемолиза сыворотки или при использовании исчерпанных кювет. В таких случаях используют измерение на двух длинах волн.

В этом случае измеряется только сигнал, связанный с исследуемым анализом.

Двухволновое измерение, в случае, если отсекающая длина волны отстоит от основной не более чем на 100 нм может использоваться для оценки степени гемолитичности пробы.

Тем самым, врач может оценить результат с учетом слияния интерферирующих факторов.

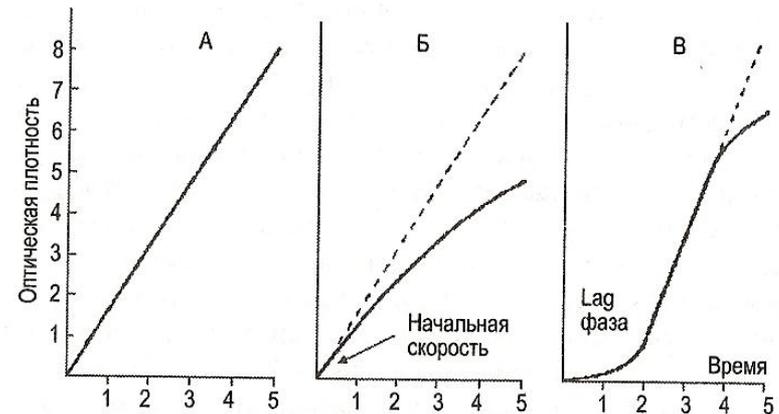
Ранговое значение	Гемолитичность (DD 576/579)
0(-)	<0,002
1(+)	0,002-0,005
2(++)	0,005-0,009
3(+++)	>0,009

Кинетические измерения (Kinetic measurement)

Кинетическое измерение подразумевает определение меняющейся в ходе реакции оптической плотности. Наиболее широко используется для определения активности ферментов.

Кинетическое измерение требует точного поддержания температуры в измерительной кювете, и точного отсчета временных интервалов. Общепринятым считается поддержание температуры в измерительной ячейке $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

Кинетические измерения проводят при следующих температурах: 25, 30, 37 $^{\circ}\text{C}$. Фактор температуры тоже следует учитывать, так как он вносит существенные изменения в показатели активности ферментов.



Виды кинетических реакций:

А – скорость постоянна в течение всего периода времени.

Б – скорость реакции постоянно снижается, рекомендуется оценивать активность по начальной скорости

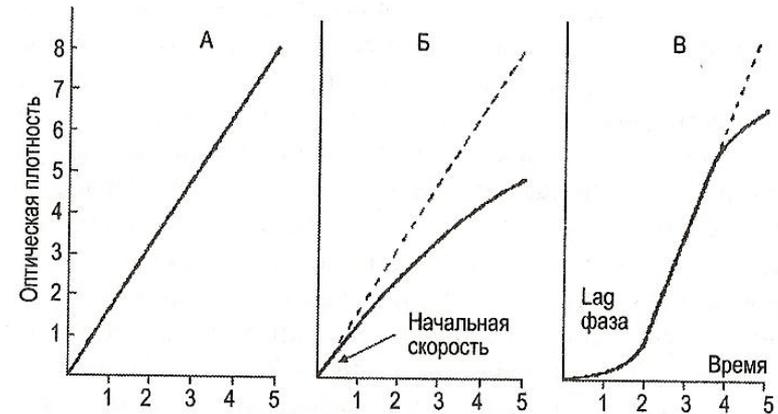
В – линейный участок (по которому определяется активность) устанавливается в середине периода инкубации

Кинетические измерения (Kinetic measurement)

Кинетическое измерение подразумевает определение меняющейся в ходе реакции оптической плотности. Наиболее широко используется для определения активности ферментов.

Кинетическое измерение требует точного поддержания температуры в измерительной кювете, и точного отсчета временных интервалов. Общепринятым считается поддержание температуры в измерительной ячейке $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

Кинетические измерения проводят при следующих температурах: 25, 30, 37 °C. Фактор температуры тоже следует учитывать, так как он вносит существенные изменения в показатели активности ферментов.



Виды кинетических реакций:

А – скорость постоянна в течение всего периода времени.

Б – скорость реакции постоянно снижается, рекомендуется оценивать активность по начальной скорости

В – линейный участок (по которому определяется активность) устанавливается в середине периода инкубации



СФ-46



СФ-26

КФК-3-01



Ф-5010

