

Программа семинара:

1. Биохимический анализ. Фотометрия. Основные принципы.

Биохимический анализ. Фотометрия.

Основные принципы.

Фотометрия – совокупность оптических методов и средств измерения фотометрических величин светового потока. Основным понятием фотометрии является поток излучения, смысл которого в мощности переносимого электромагнитного (оптического) излучения.

Спектрофотометрия – определение зависимости фотометрических величин от длины волны излучения.

Спектроскопия (или эмиссионный спектральный анализ) – определение излучательной способности веществ в зависимости от длины волны излучения.

В аналитической химии и классической лабораторной диагностике широкое применение нашли фотометрические методы количественного анализа, основанные на переводе определяемых компонентов в поглощающее свет соединения с последующем определением их количеств путем измерения светопоглощения растворов.

Биохимический анализ. Фотометрия.

Основные принципы.

Колометрический и фотометрический методы анализа.

Колометрический метод: измерение проводится без выделения узкого диапазона длин волн, т.е. измеряются характеристики всего светового потока.

Фотометрический метод: для измерения выделяется характерный для поглощения данным веществом оптический диапазон и измерение проводится на определенной длине волны. Фотометрический метод является более объективным, чем колометрический, поскольку результаты его менее зависимы от поглощения света другими (интерферирующими) окрашенными веществами.

Фотометрический анализ – один из самых старых и распространенных физико-химических методов, для него требуется относительно простое оборудование, в тоже время он характеризуется высокой чувствительностью и возможностью определения большого количества органических веществ.

Биохимический анализ. Фотометрия.

Основные принципы.

Фотометрические свойства растворенного вещества

$$T+R+A=1$$

T – коэф-т светопропускания

R – коэф-т отражения

A – коэф-т поглощения

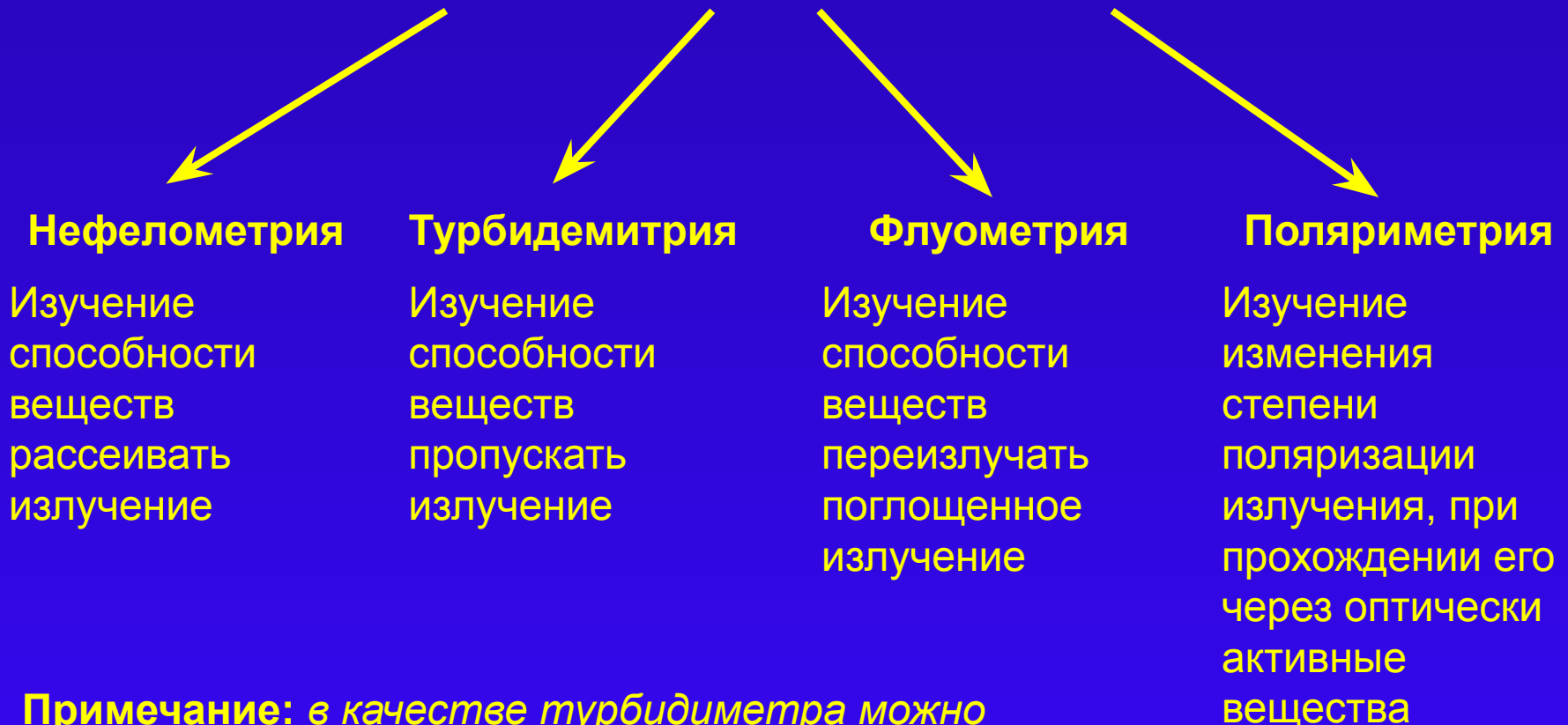
Фотометры – приборы регистрирующие поглощение света веществом (A).

Отражательные фотометры - приборы регистрирующие отражение света веществом (R).

Биохимический анализ. Фотометрия.

Основные принципы.

Фотометрические методы (Дополнительное применение)

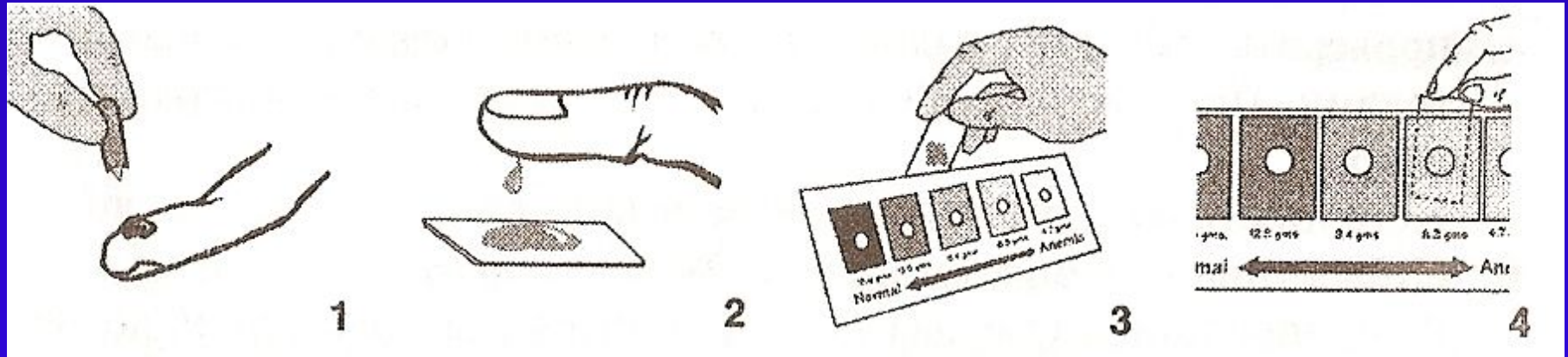


Примечание: в качестве турбидиметра можно использовать большинство фотометров и Б/Х анализаторов, так этот способ не требует особой конструкции прибора.

Биохимический анализ. Фотометрия.

Основные принципы.

Колометрия. Методы измерений.



Наиболее простой пример: скрининговый полуколичественный метод определения гемоглобина по WHO GEMOGLOBIN COLOR SCALE. Содержание гемоглобина оценивается по цвету капли капиллярной крови, помещаемой на бумагу. Цвет крови определяется методом сравнения со шкалой цветности имеющейся в наборе.

Другие коллометрические визуальные методы: метод разбавления, метод уравнивания интенсивности окраски.

Биохимический анализ. Фотометрия.

Основные принципы.

Фотоэлектрические методы. Терминология.

В медицинской литературе часто используется достаточно вольное обращение с терминами физических величин, что объясняется прямым применением англоязычных выражений в русской интерпретации.

Часто употребляемое в инструкциях на реагенты обозначение оптической плотности «А» или «Е» (вместо «D») некорректно. Также некорректно называть оптическую плотность поглощением или экстинкцией. Термин экстинкция относится к характеристикам процессов рассеивания света, а не поглощения.

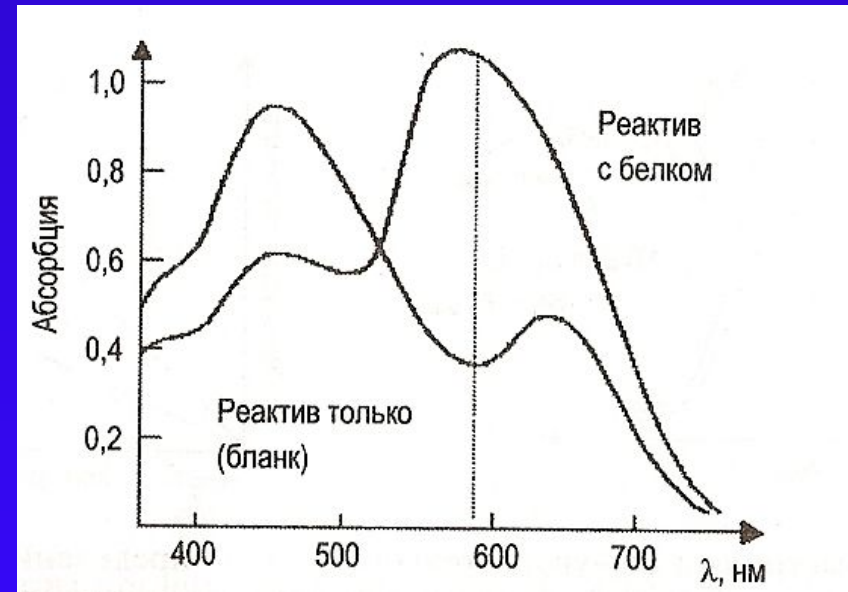
Биохимический анализ. Фотометрия.

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.

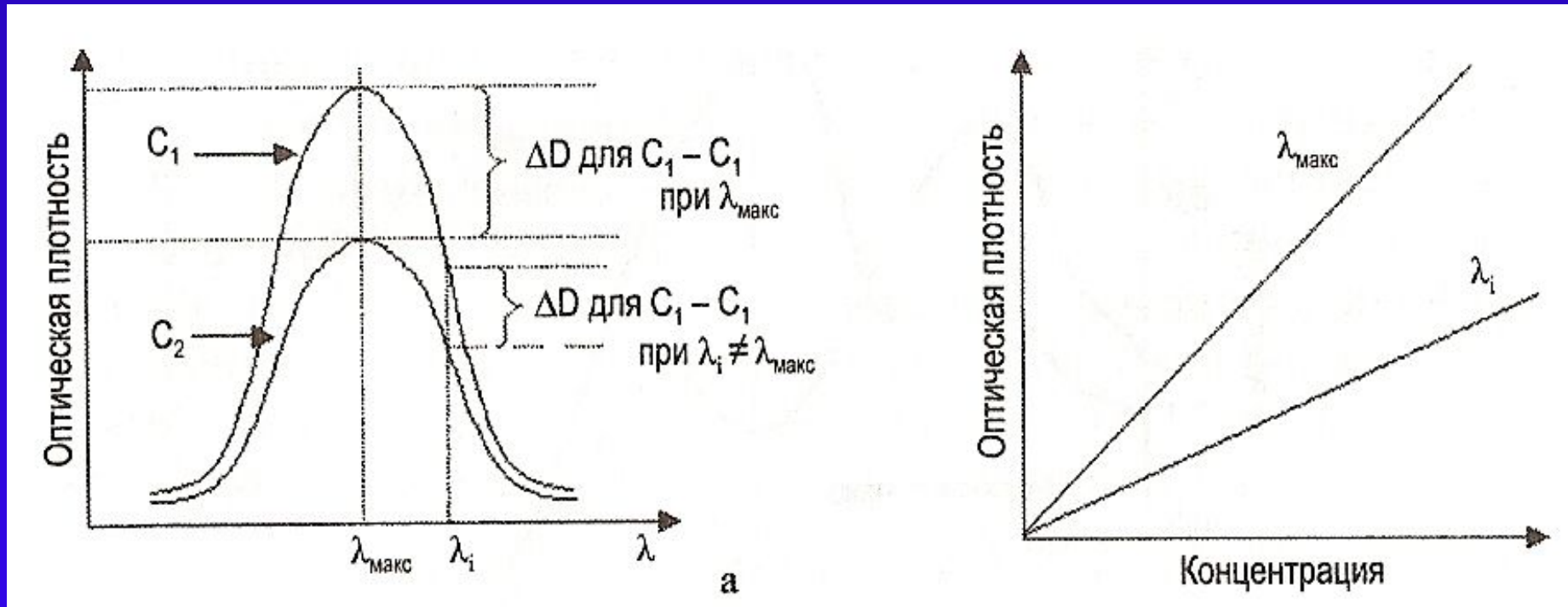
Для оценки степени поглощения исследуемого раствора, содержащего какое-либо соединение, проводится сравнение интенсивности потока излучения, прошедшего через этот раствор, с интенсивностью потока излучения, прошедшего через раствор сравнения - бланк.



Биохимический анализ. Фотометрия.

Основные принципы.

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.

Биохимический анализ. Фотометрия.

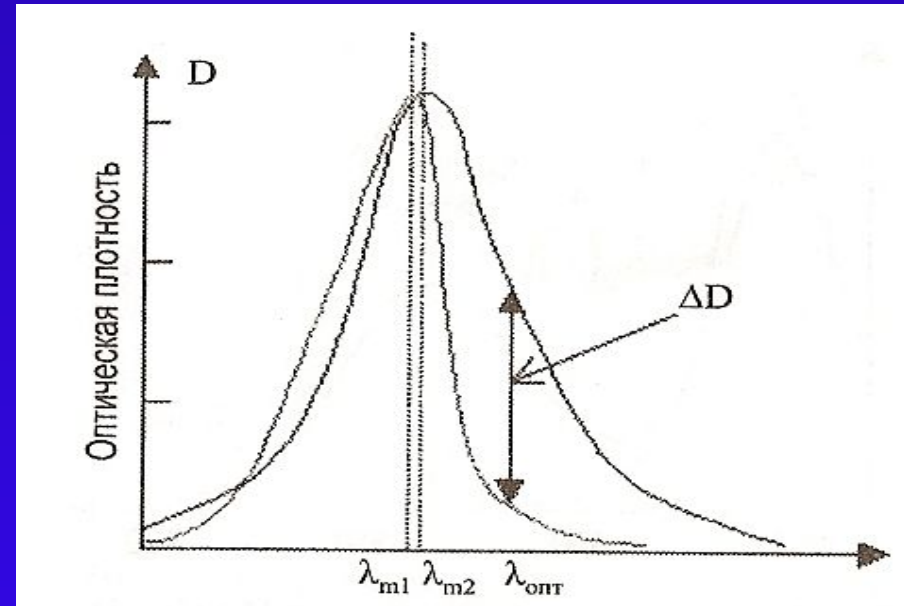
Основные принципы.

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 (бланка) 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



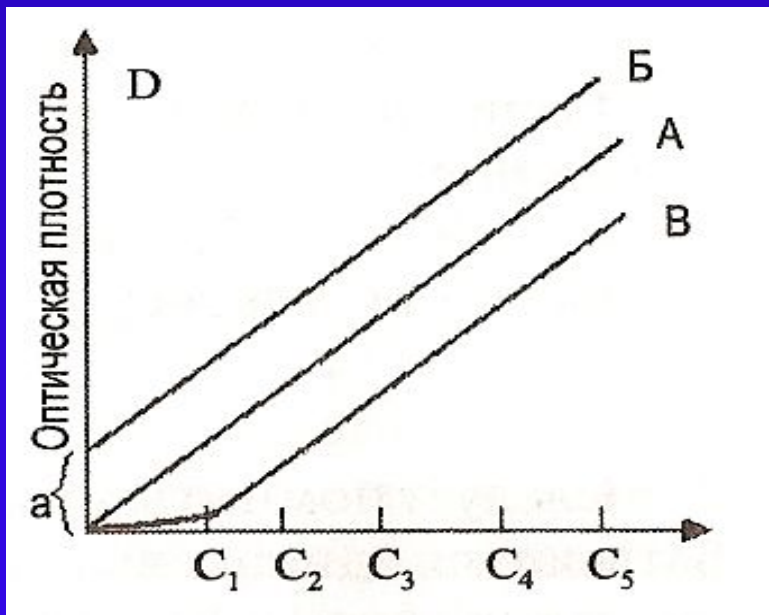
комплекса с магнием при длине волны 520 нм. В случае измерения при длине волны 545 (546) нм (часто устанавливаемый фильтр на фотометрах и б/х анализаторах) на фоне ОП рабочего реагента (бланк) будет слабо различима ОП анализируемого образца.

Биохимический анализ. Фотометрия.

Основные принципы.

Фотометрические методы биохимического анализа.

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.

Биохимический анализ. Фотометрия.

Основные принципы.

Фотометрические методы биохимического анализа.

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 ил 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.

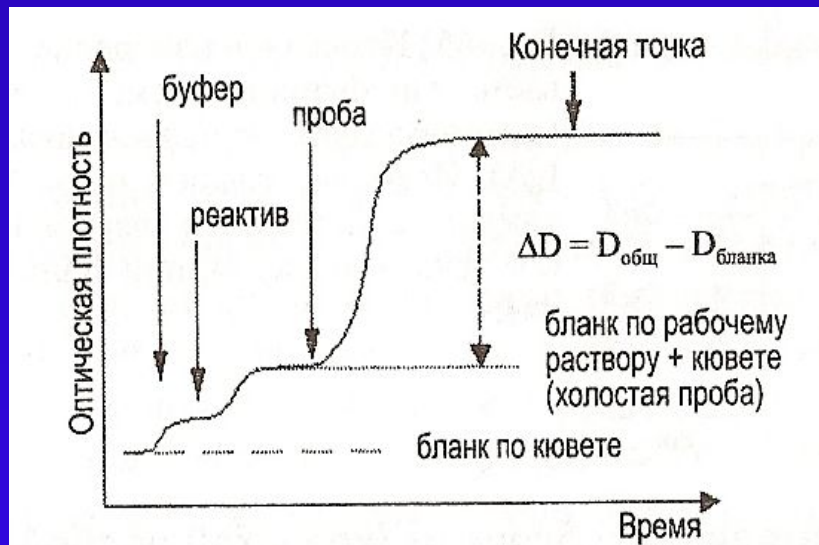
Пример: В реакции необходимо использовать 100 мкл образца. В качестве образца используется плазма в том же объеме, но в плазму при ее получении добавляют цитрат в отношении 1:9. Следовательно в 100 мкл плазмы содержится 90 мкл исследуемой биологической жидкости. Это следует учитывать при расчетах, вводя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

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

Биохимический анализ. Фотометрия.

Основные принципы.

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: $D_{\text{пробы}} = D_{\text{к. точки}} - D_{\text{бланка}}$

Биохимический анализ. Фотометрия.

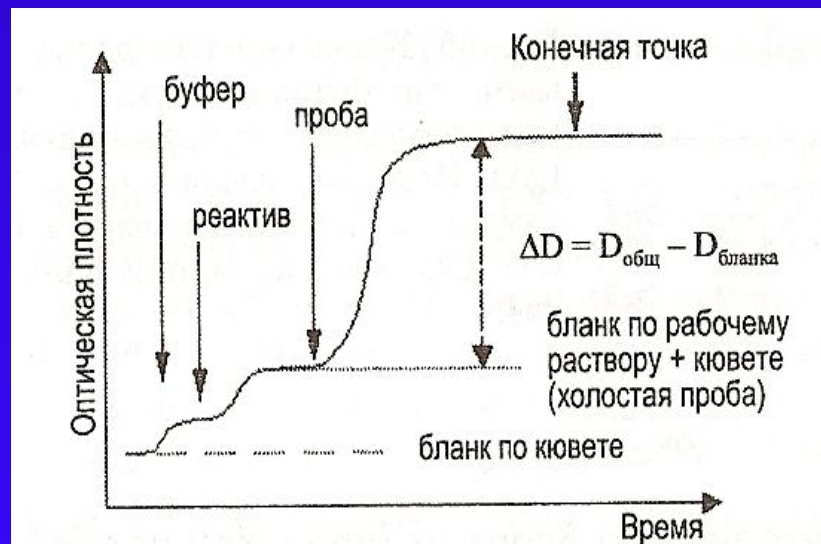
Основные принципы.

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.

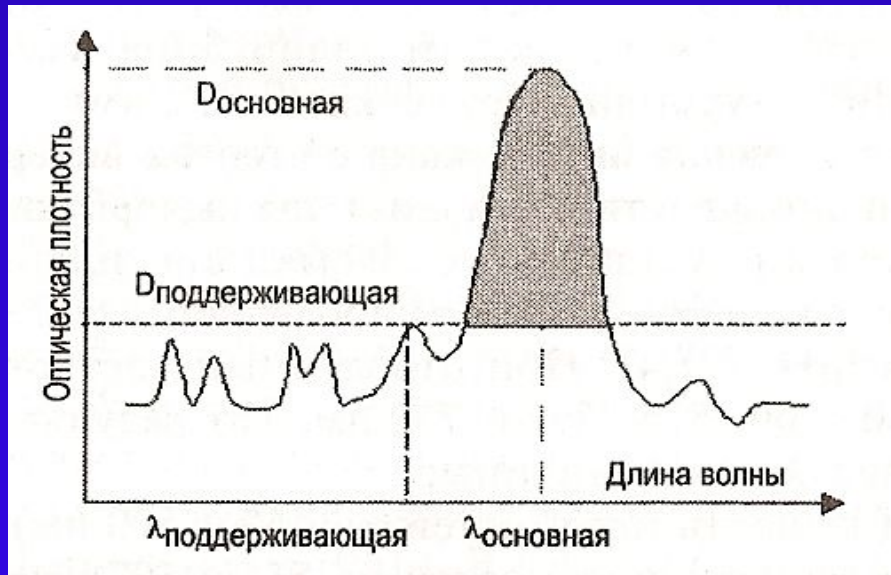
Таким образом, бланк – это характеристика, отнесенная к шкале оптической плотности, бланк определяет оптическую плотность рабочего реактива.



Биохимический анализ. Фотометрия.

Основные принципы.

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 аналитом.

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

Биохимический анализ. Фотометрия.

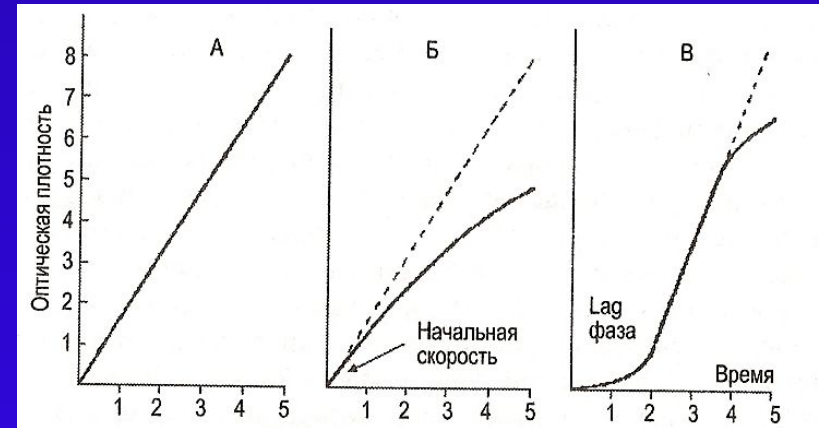
Основные принципы.

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

Биохимический анализ. Фотометрия.

Основные принципы.

Турбидиметрия.



Турбидиметрия в клинической химии используется в основном для определения индивидуальных белков. Особенностью является построение калибровочного графика с использованием не менее пяти различных концентраций, так как калибровочный график имеет нелинейный характер.

В качестве стандартов и контрольных материалов для турбидиметрии необходимо использовать специально подготовленные стандарты и контрольные сыворотки, содержащие индивидуальные белки.