

# Základy fotometrie, využití v klinické biochemii

# Základní vztahy ve fotometrii

**transmittance** (propustnost):  $T = I / I_0$

**absorbance**:  $A = \log (I_0 / I) = \log (1 / T) = -\log T$

**Lambertův-Beerův zákon**  $A_1 = \epsilon_1 l c$

**Lambertův-Beerův zákon platí pouze pro:**

monochromatické záření

zředěné roztoky ( $< 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ )

homogenní roztoky (nedochází k rozptylu záření na částicích vzorku)

vzorky, které nefluoreskují ani nefosforeskují při dané vlnové délce

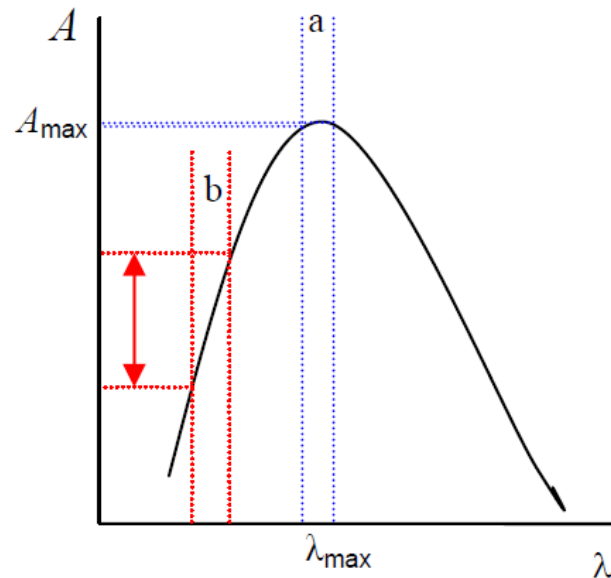
monomerní látky, které v roztoku neasociují

# Absorpční spektrum

Závislost absorbance na vlnové délce nazýváme **absorpční spektrum** (absorpční křivka).

Absorpční spektrum je charakteristické pro danou sloučeninu. (viz např. spektrofotometri hemoglobinu a derivátů)

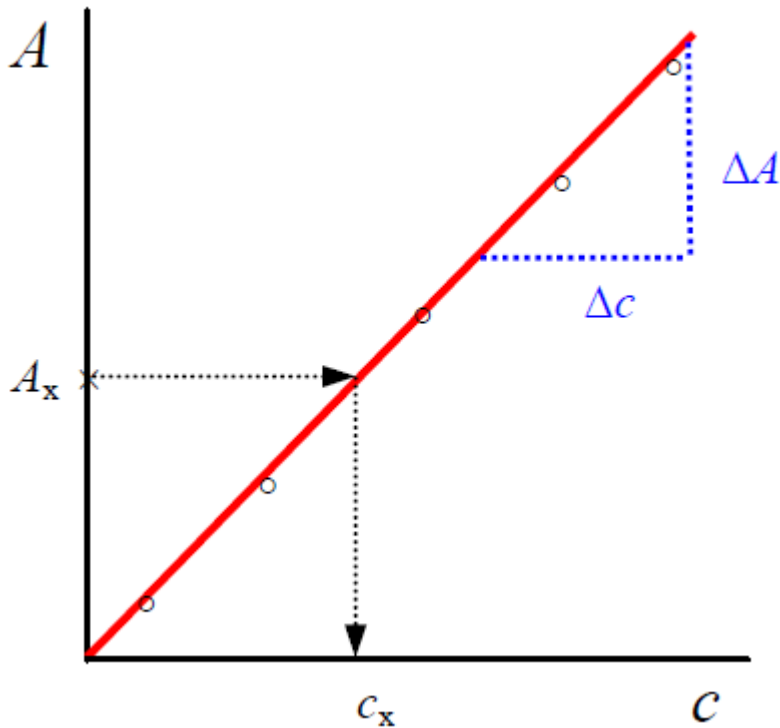
Praktický význam mají absorpční maxima křivky a jim příslušející vlnové délky. Ke stanovení koncentrací absorbujících látek se volí zpravidla vlnové délky těchto maxim



# Určení koncentrace vzorku

- V podstatě vždy při spektrofotometrických stanoveních koncentrace vychází z kalibračního grafu.
- K jeho zhotovení se připraví z nejčistšího preparátu stanovované látky (standardu) standardní roztok a jeho ředěním řada kalibračních roztoků.
- Každý kalibrační roztok se zpracuje stejným postupem jako vzorky s neznámou koncentrací.
- Poté se změří jejich absorbance proti rozpouštědлу nebo činidlu bez měřené látky (slepému vzorku/pokusu, angl. blank).
- Naměřené hodnoty se vynesou do grafu jako závislost absorbance kalibračních roztoků na jejich koncentraci.
- Závislost je lineární pro rozsah koncentrací, ve kterém platí Lambertův-Beerův zákon.
- Odchyłky od přímky jsou běžné u vysokých koncentrací. Body ležícími v lineární části grafu se proloží přímka (jejíž obecná rovnice je  $y = k x + q$ ).

# Kalibrační graf



Pokud se měří absorbance proti slepému vzorku, tak kalibrační přímka prochází počátkem souřadnic:

$$A = k c$$

$k$  je směrnice přímky (tj. tangenta úhlu, který svírá přímka s osou  $x$ ):

$$k = \frac{\Delta A}{\Delta c} c$$

Převrácená hodnota směrnice přímky  $1/k$  se nazývá **kalibrační faktor** ( $F$ ):

$$F = 1/k = \Delta c / \Delta A$$

Pro výpočet koncentrace analytu v neznámém vzorku potom platí:

$$c_x = A_x F$$

# Výpočet koncentrace srovnáním absorbance vzorku a standardu

Poněvadž standard i analyzovaná látka mají za daných experimentálních podmínek stejnou hodnotu molárního absorpčního koeficientu tj.

$$\epsilon_{\text{std}} = \epsilon_x$$

získáme po dosazení z Lambertova-Beerova vztahu za  $\epsilon$  rovnici

$$A_{\text{std}}/c_{\text{st}} \cdot l = A_x/c_x \cdot l$$

z které pro koncentraci analytu v neznámém vzorku vyplývá:

$$c_x = c_{\text{st}} A_x / A_{\text{st}}$$

# Které látky lze stanovit fotometricky?

- Látky barevné (tj. látky výrazně absorbující viditelné záření) lze spektrofotometricky stanovit přímo.
- Látky bez výrazného absorpčního maxima ve VIS/UV oblasti je třeba nejprve reakcí s vhodným činidlem (**derivatizací**) převést na zbarvený produkt.
- Podmínkou je, aby množství barevného produktu bylo úměrné koncentraci stanovované látky. Intenzita zbarvení roztoku tímto barevným produktem je pak přímo úměrná koncentraci analytu v původním analyzovaném roztoku a lze ji změřit spektrofotometrem.

# Krev

Žilní krev - odebírá se nejčastěji

Kapilární krev – méně často

Arteriální krev - odebírá pouze výjimečně, hlavně pro analýzu krevních plynů.



# Plazma, sérum

## Plazma a sérum

Plazma : příprava centrifugací  
nesrážlivé krve.

Sérum : příprava centrifugací  
srážlivé krve

Protisrážlivé prostředky:

heparin,

citrát, EDTA, oxalát - vazba  $\text{Ca}^{2+}$

# Moč

## Odběr moči

- Pro základní chemické vyšetření moči - zpravidla *první ranní* moč, která je poměrně koncentrovaná.
- Pro kvantitativní stanovení se vyšetřuje vzorek moči *sbírané* *určitý časový interval* (obvykle 3, 6, 12 nebo 24 h).

Pacienta je třeba poučit o podmínkách odběru a transportu. Pro většinu vyšetření se používá střední proud moči. Moč se zachytí do dobře vymyté nádoby. U žen je nutné zjistit poslední menses, upozornit na nutnost omytí genitálií vodou (ne dezinfekčním prostředkem).

# Pokyny pro správný sběr moči v delším časovém intervalu

- vyšetřovaný se vymočí např. v 7:00 h ráno a tato moč se vylije do odpadu.
- Od tohoto okamžiku začíná sběrné období a shromažďuje se veškerá moč (v zakryté nádobě v temnu a chladu, příp. s přídatkem konzervačního činidla).
- Poslední odběr je v okamžiku, kdy končí sběrné období.
- Celý sběr moči se dobře promíchá, v odměrném válci změří objem a poznamená do průvodky. Pak zpravidla postačí k vyšetření vzorek 10–20 ml.

# Princip a význam stanovení aminotransferáz (AST a ALT).

Viz **Principy laboratorních stanovení**

= enzymy otázky

Kinetická metoda stanovení enzymů

# Stanovení katalytické koncentrace ALP v séru

Viz **Principy laboratorních stanovení**

= enzymy otázky

Metoda konstantního času

# Enzymové stanovení glukosy v séru

Viz **Principy laboratorních stanovení**

= enzymy otázky

Využití enzymů jako analytických činidel