

Spektrofotometri

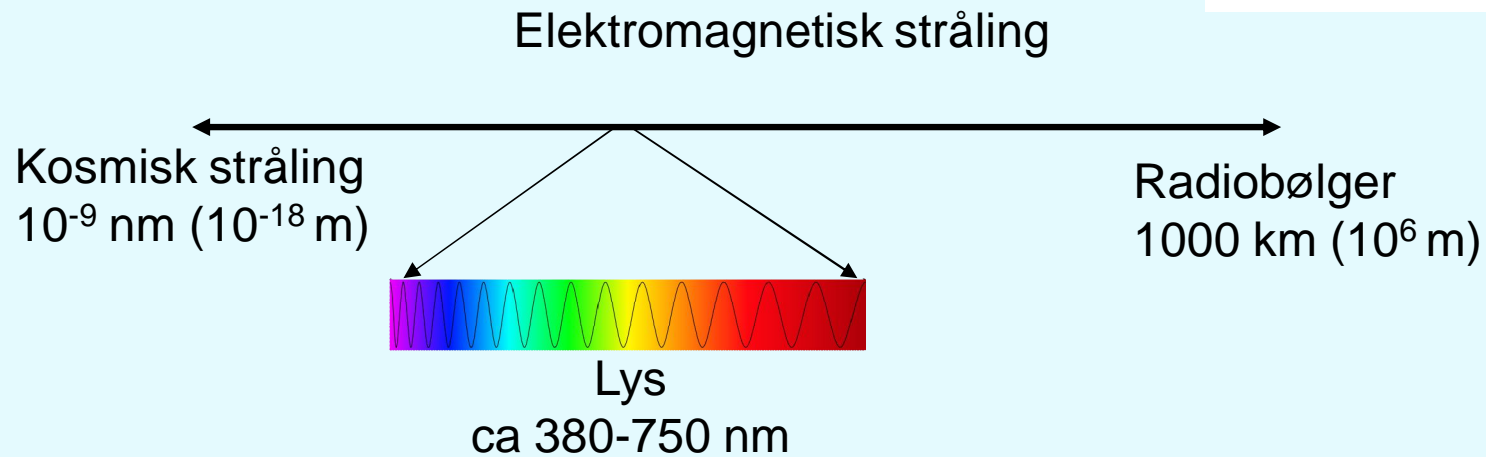
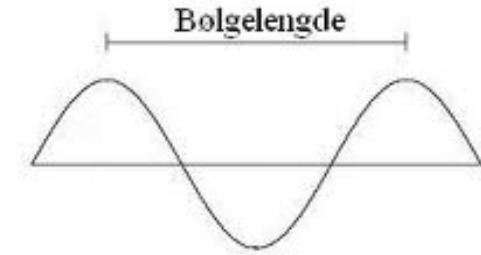
Olav Klingenberg

Avdeling for medisinsk biokjemi

OUS-Rikshospitalet

- Lys
- Basale konsepter
 - Transmittans
 - Absorbans
- Instrumentering
- Anvendelse
- Feilkilder

Lys

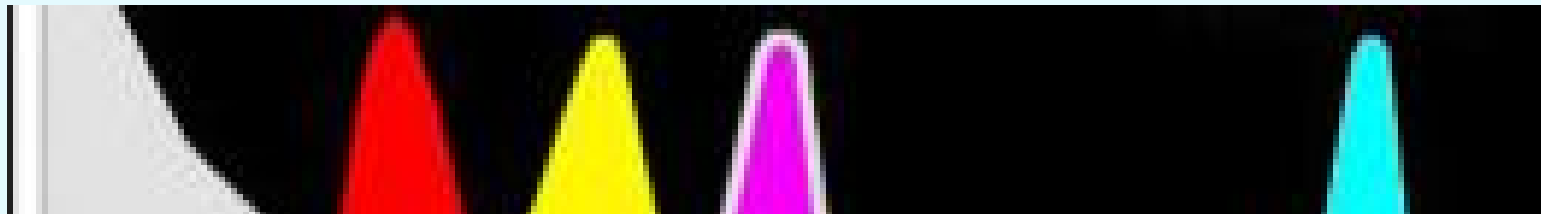


- Bølge- og partikkelegenskaper - fotoner
- Energi: proporsjonal med lysets frekvens
omvendt proporsjonal med bølgelengde

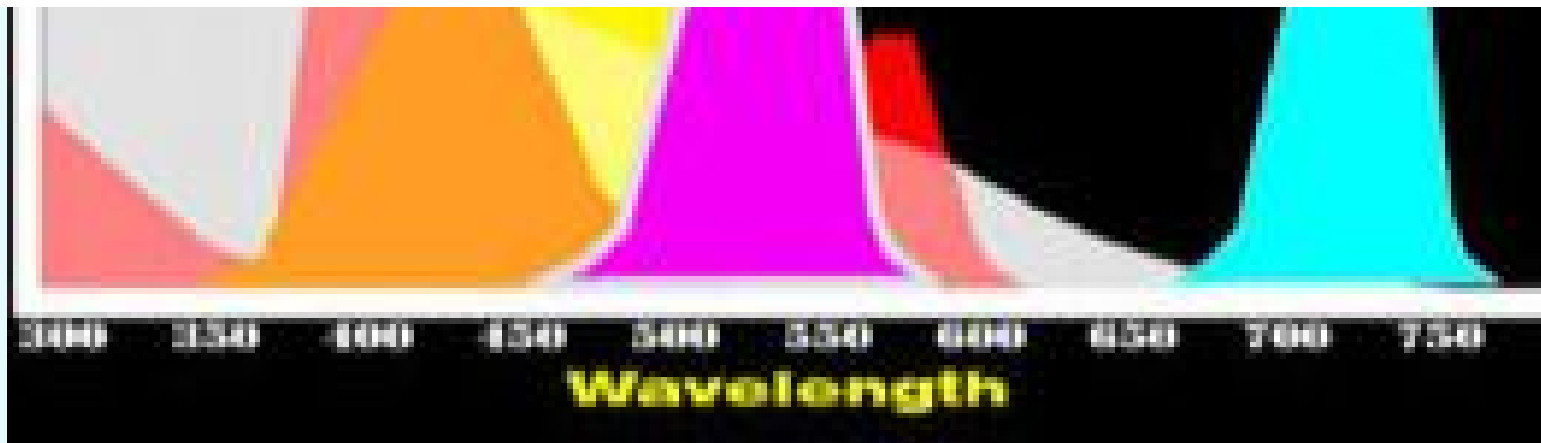
Fotometri - måling av lys

Spektrofotometri - måling av lysintensitet ved valgt(e) bølgelengde(r)

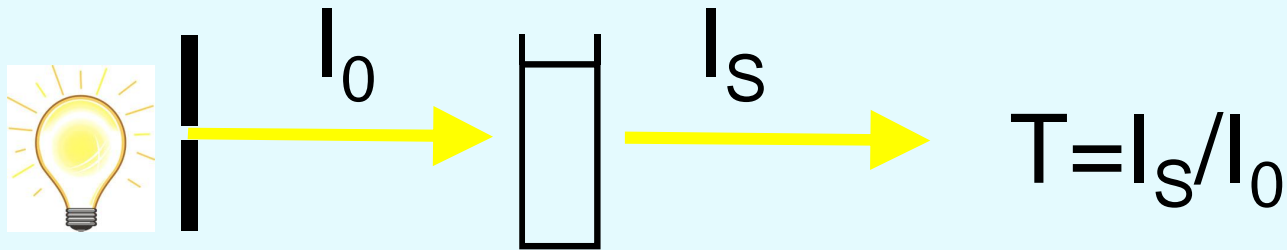
- Ulike stoffer kan absorbere lys i deler av spekteret



Noen basale størrelser

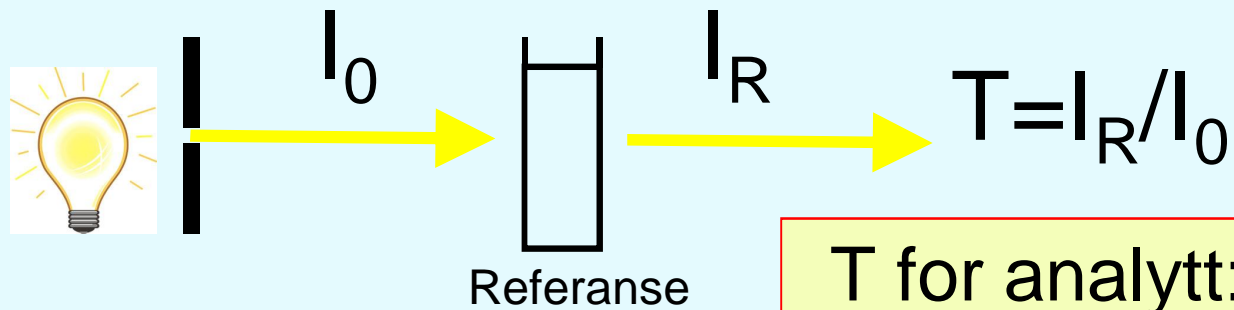


Transmittans



- Refleksjon
- Absorbert av løsningsmiddel
- Disse faktorene må elimineres

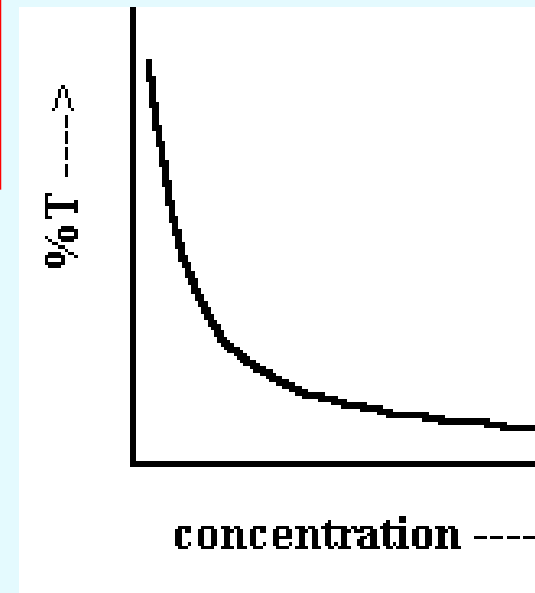
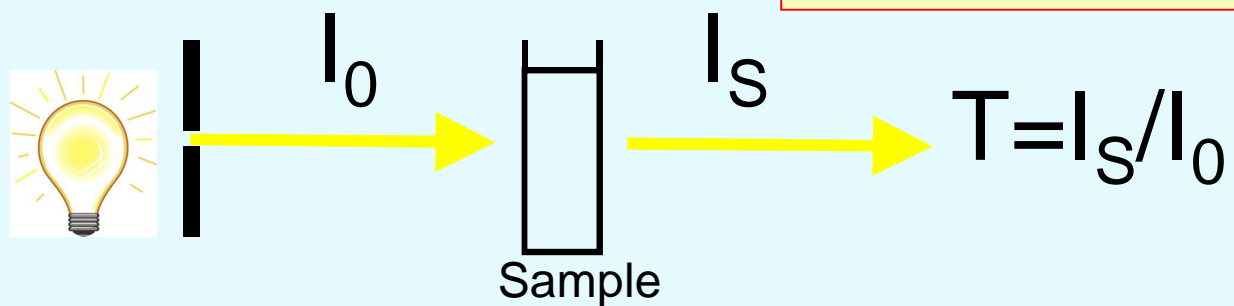
Transmittans



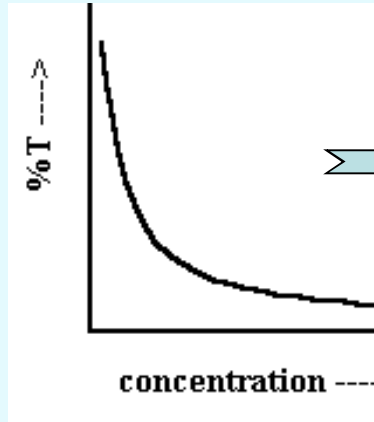
$$T = 100\%$$

T for analytt:

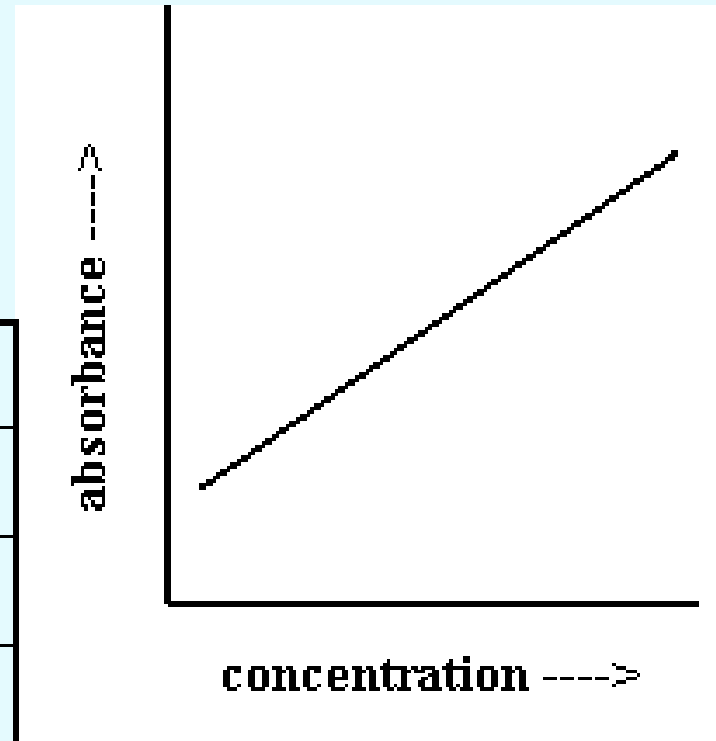
$$I_S / I_R$$



Transmittans - Absorbans



- $A = -\text{Log}(I_S/I_R) = -\text{Log}T$



Absorbans	Transmittans
0,1	~79,4 %
1	10 %
2	1 %
3	0,1 %

Beer-Lamberts lov

$$A=abc$$

A - Absorbans

a - absorptivitet

b - Lysvei (cm)

c - konsentrasjon

Forutsetninger:

Monokromatisk lys

Lav abs. av løsn.middel

Ikke optisk interferens

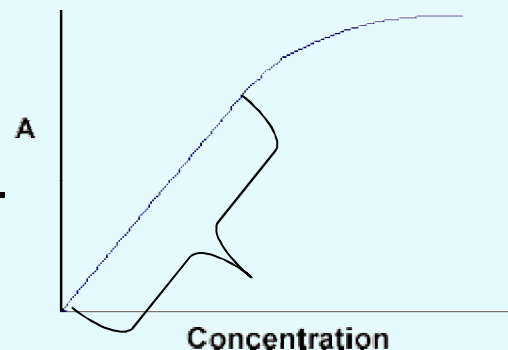
Ikke pågående kjemisk reaks.

Konsentrasjonsnivå →

Når $b=1$ cm og c er uttrykt i mol/L uttrykkes a som ϵ .

ϵ er konstant for et gitt stoff ved gitt bølgelengde og gitte betingelser for pH, løsningsmiddel, temp. etc

ϵ - molar ekstinksjonskoeffisient eller molar absorbtivity



Anvendelse av Beer-Lamberts lov

- $A=abc$
- $a=A/bc$
- $A_c/b_c c_c = A_u/b_u c_u$
- $A_c/c_c = A_u/c_u$
- $c_u = c_c * A_u/A_c$
- $c_u = A_u * K$

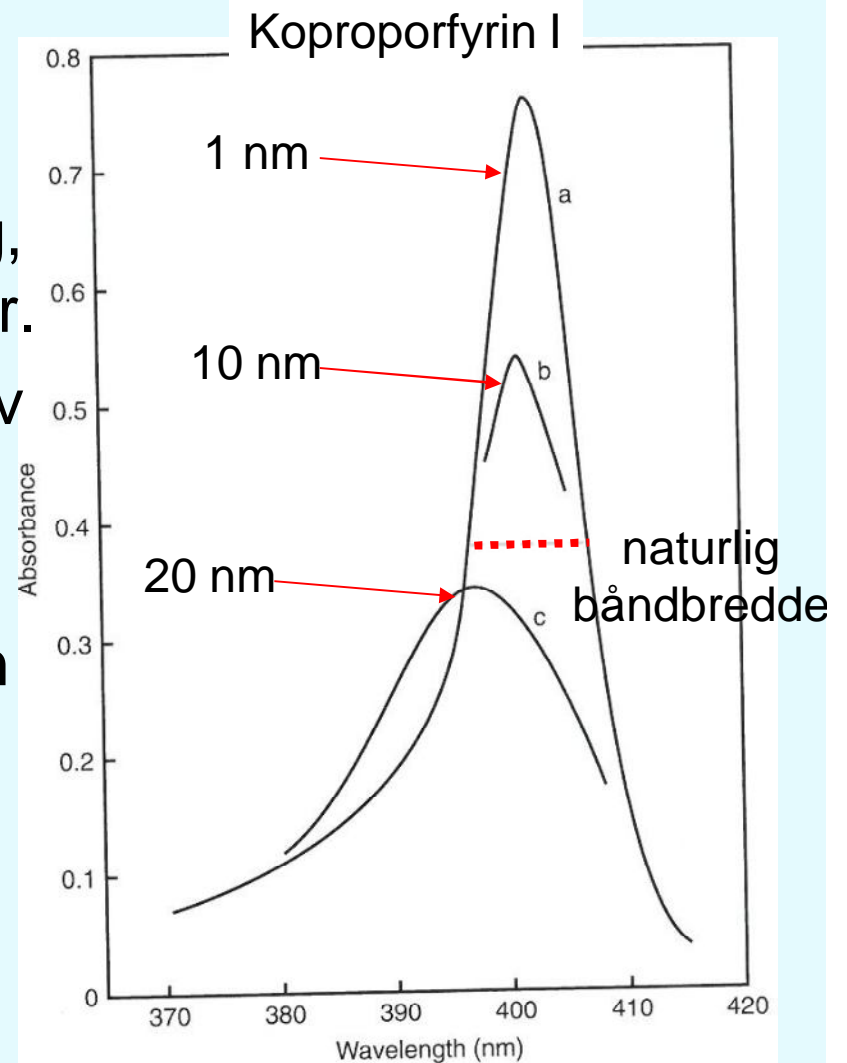
A - Absorbans
a - absorptivitet
b - Lysvei (cm)
c - konsentrasjon

Subscript c - calibrator
Subscript u - ukjent

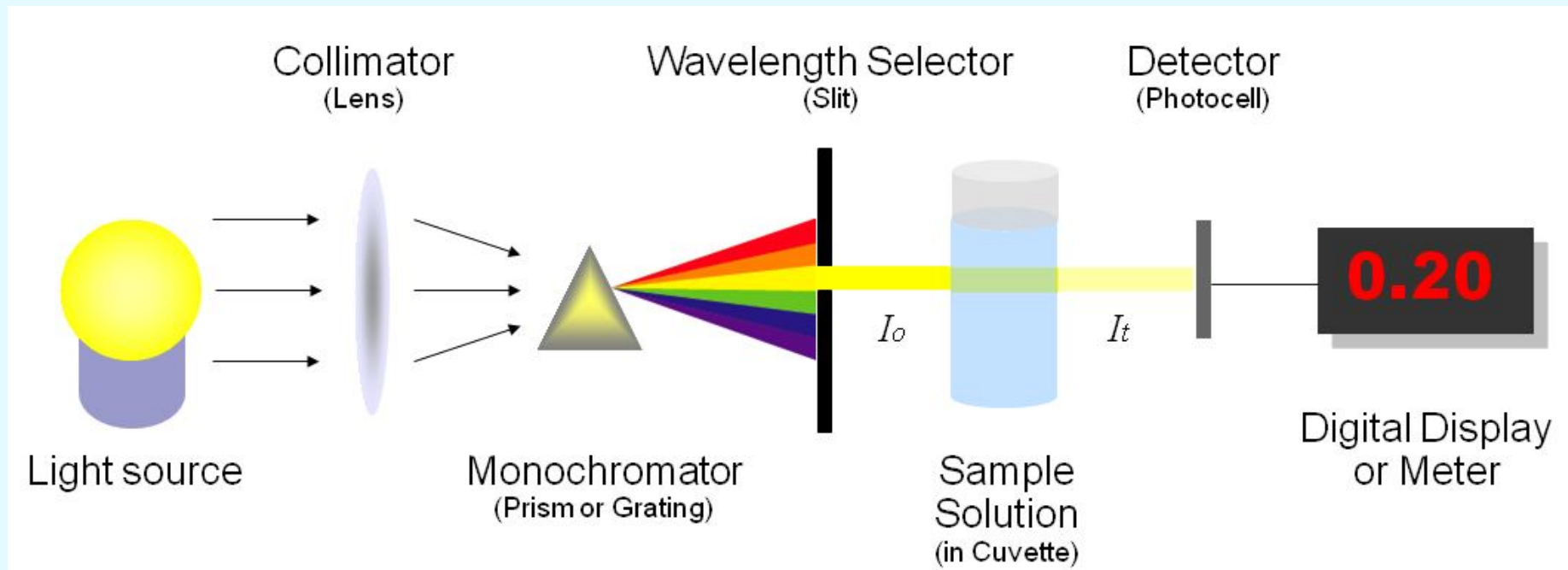
K - Kalibreringskonstant
funnet ved måling av
absorbans av kalibrator
med kjent konsentrasjon

Spektral båndbredde

- Instrumentets lys
- Smal spektral båndbredde gunstig, særlig ved smale absorbanstopper.
- Forutsetning for Beer-Lamberts lov
- Øker sensitivitet og linearitet
- Naturlig båndbredde- båndbredde ved halvparten av max absorpsjon
- Spektral båndbredde $\leq 10\%$ av naturlig båndbredde

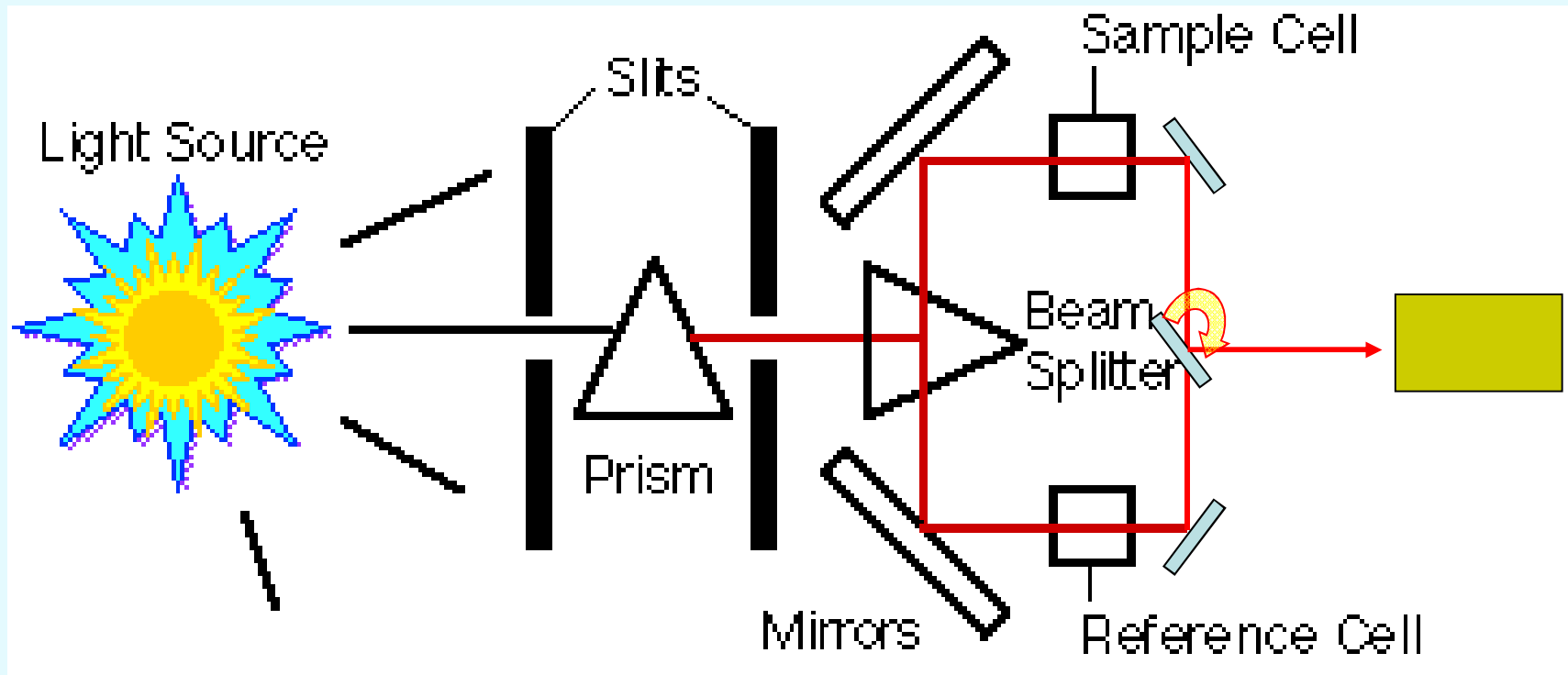


Instrumentering - to hovedtyper



enkelstråle

Instrumentering



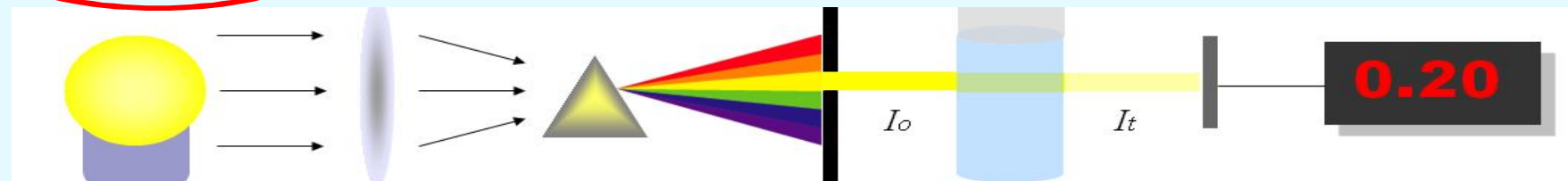
dobbeltstråle
(in space eller in time)

Lyskilde

Monokromator

Kuvette

Detektor



-Gløde
-LASER

TABLE 3-3 Various Types of Lasers and the Wavelengths at which They Operate

Laser	Wavelength(s) (nm)
Argon fluoride	193
Argon fluoride	248
Helium-cadmium	325 or 442
Nitrogen	337
Argon (blue)	488
Argon (green)	514
Helium-neon (green)	543
Light emitting diode—GaP	550 or 700
Rhodamine 6G dye (tunable)	570-650
Laser diode (AlGaInP, GaAlAs)	633-1,660
Helium-neon (red)	633
Ruby (CrAlO ₃) (red)	694
Light emitting diode—GaAs	880
Light emitting diode—Si	1100
Neodymium-YAG (yttrium aluminum garnet)	1064
Carbon dioxide	9300, 9600, 10,300, or 10,600

Lyskilde

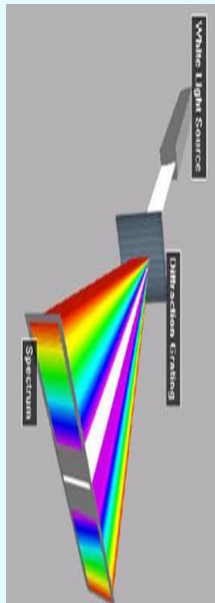
Monokromator

Kuvette

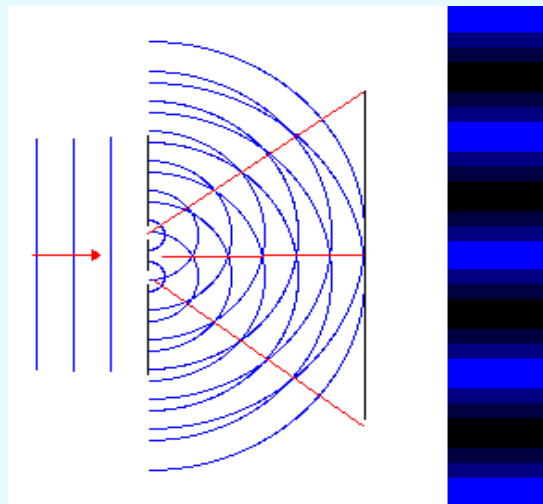
Detektor



Gløde
LASER



Prisme
Diffr.gitter
(Filter)



Lyskilde

Monokromator

Kuvette

Detektor



Gløde
LASER

Prisme
Diffr.gitter
(Filter)

Glass-lys
Kvarts-UV
Plast-begge-
engangs



Lyskilde

Monokromator

Kuvette

Detektor

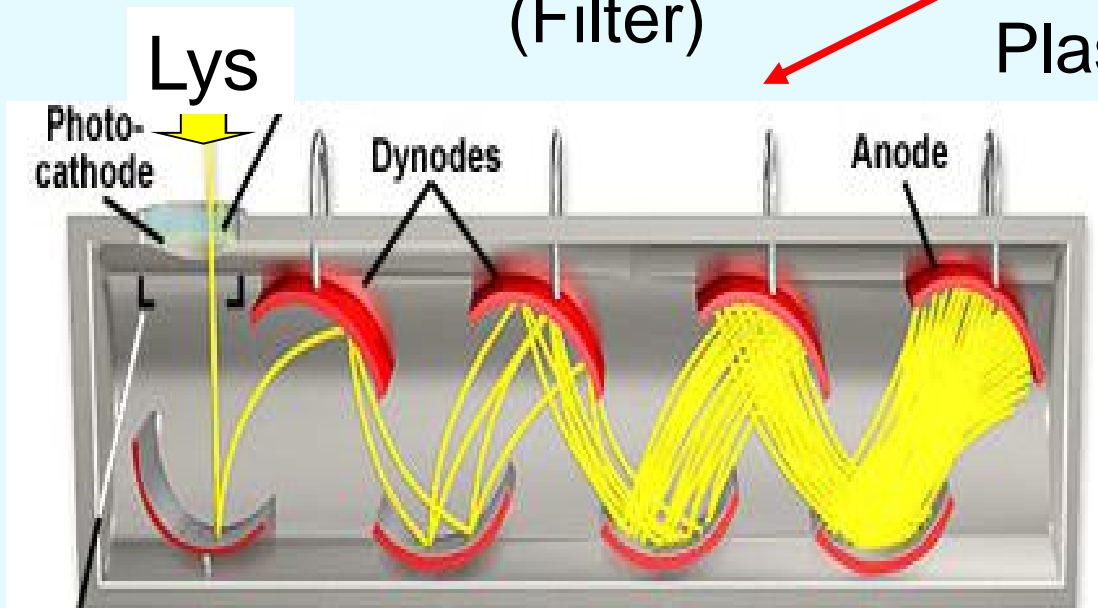


Gløde
LASER

Prisme
Diffr.gitter
(Filter)

Glass
Kvarts
Plast

Fotomultiplikatorrør
Fotodiode
-fotosensitivt
halvledermateriale
-resolusjon
Tid
Bølgelengde

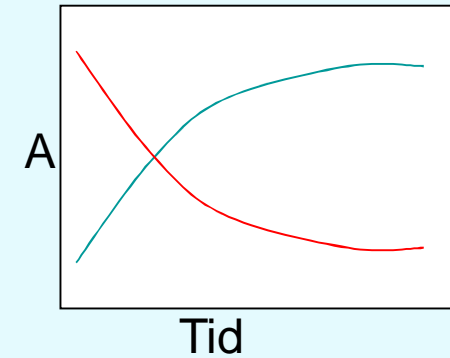


Anvendelse

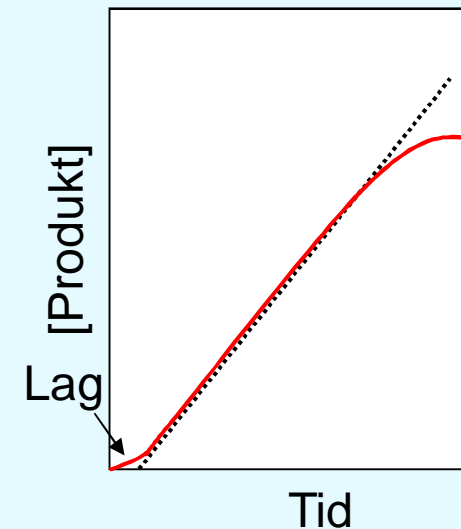
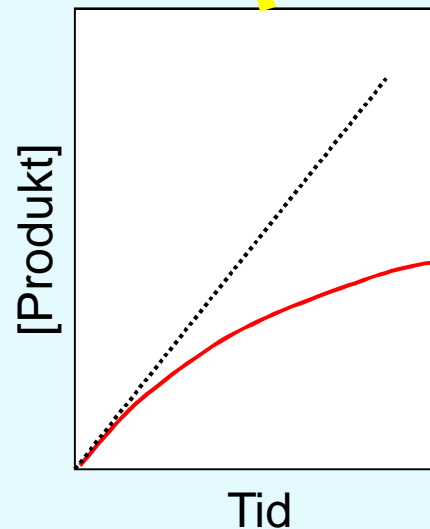
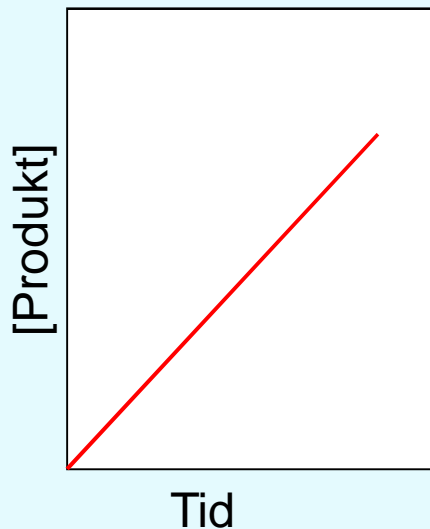
- Klinisk enzymymology
- Fargebindingsassay
- Kromogene assay

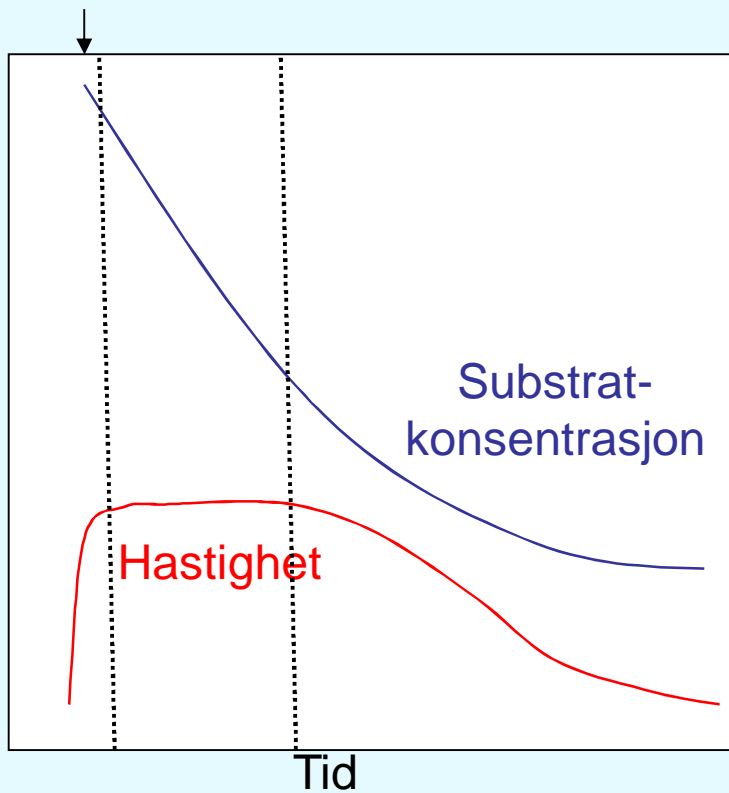
Klinisk enzymologi

- Måle endring i kons av substrat eller produkt
- Redusert absorbans fra substrat
- Økt absorbans fra produkt (best)



Optimalisering av reaksjon

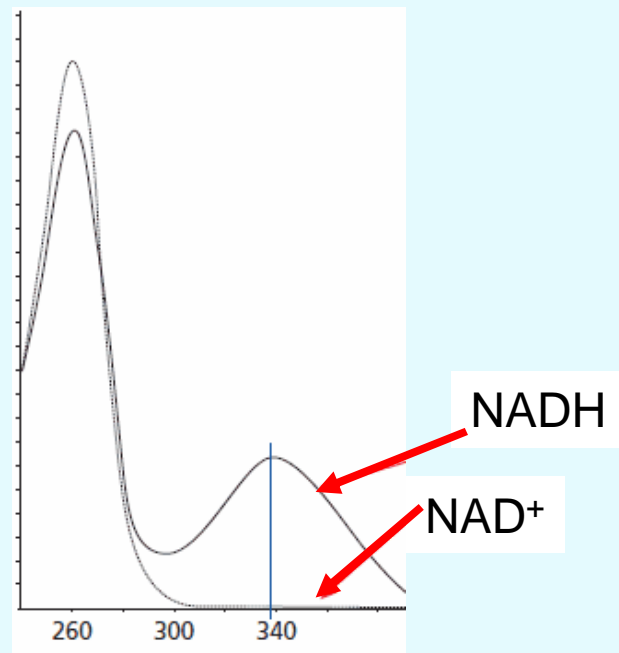
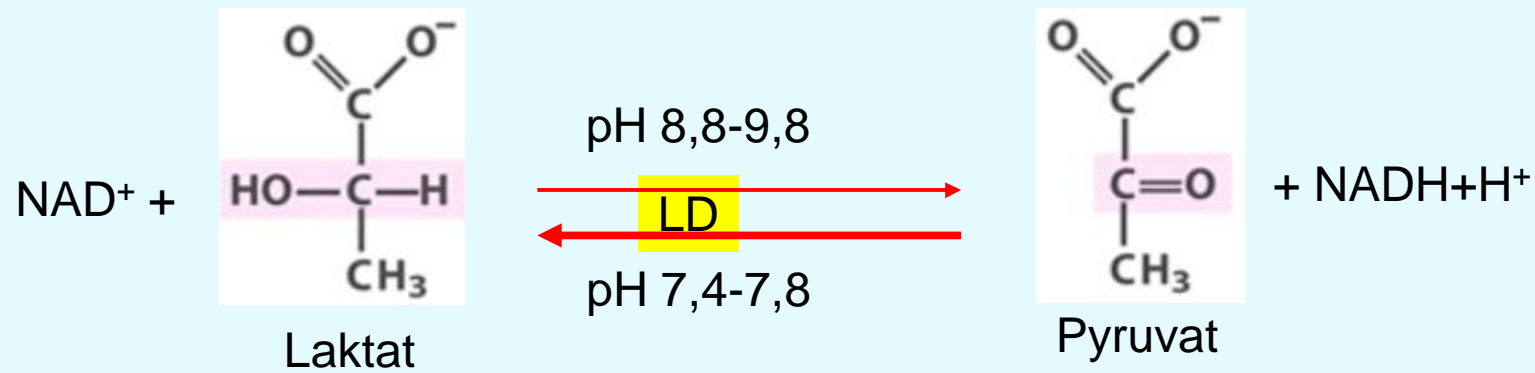




Måle i lineært område, hastighet da avhengig av enzymkonsentrasjon

Fast tid vs.
Kontinuerlig monitorering

Eksempel: LD



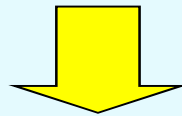
P → L
og
L → P

IFCC

Fargebinding, total-Ca

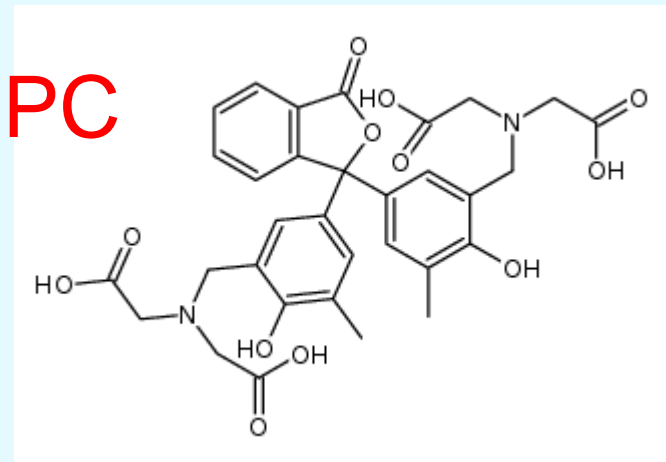
o-kresolftalein complexon **CPC**

+ Ca^{2+}

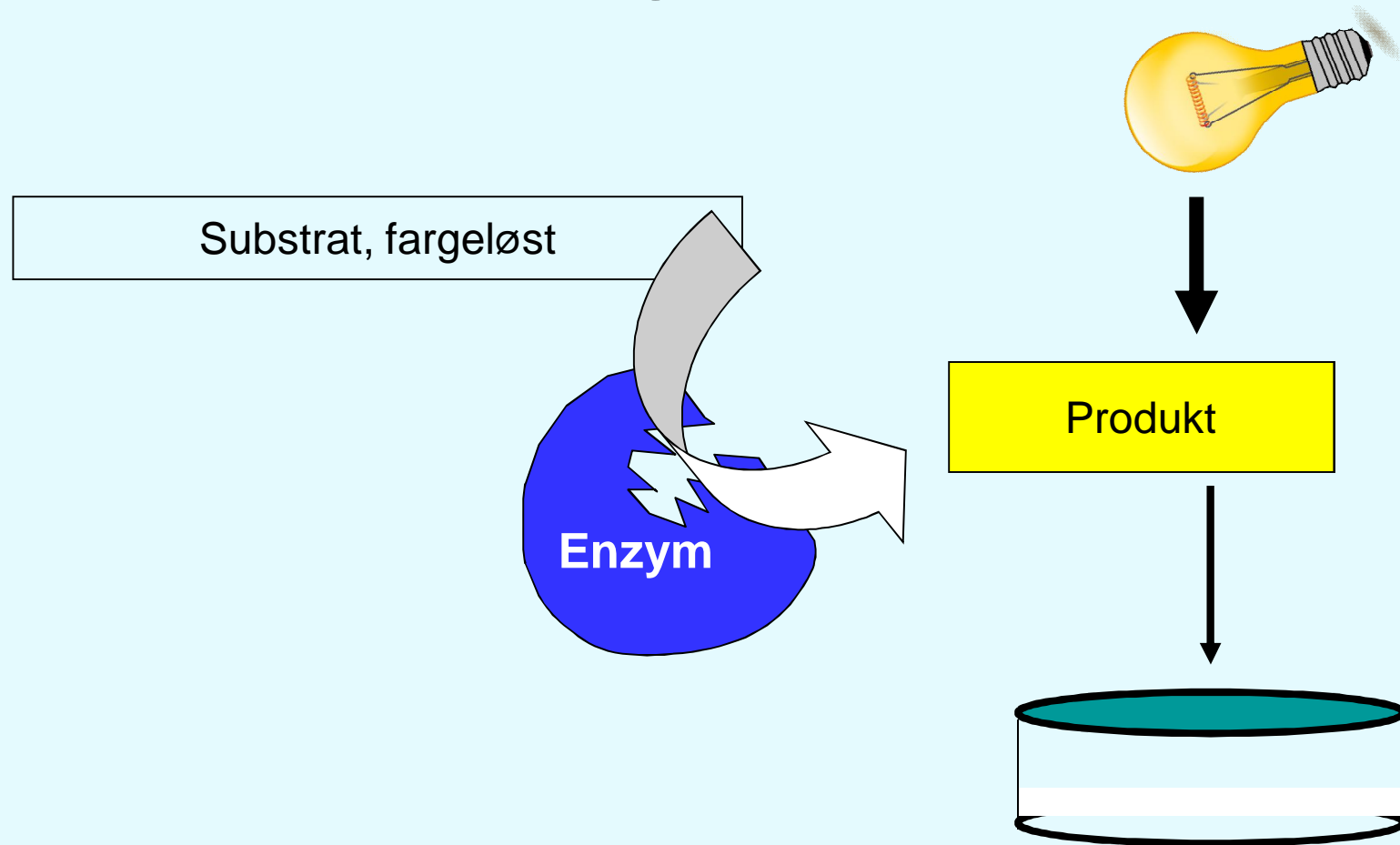


Ca^{2+} -**CPC**

+ rødfarge, 570-580 nm

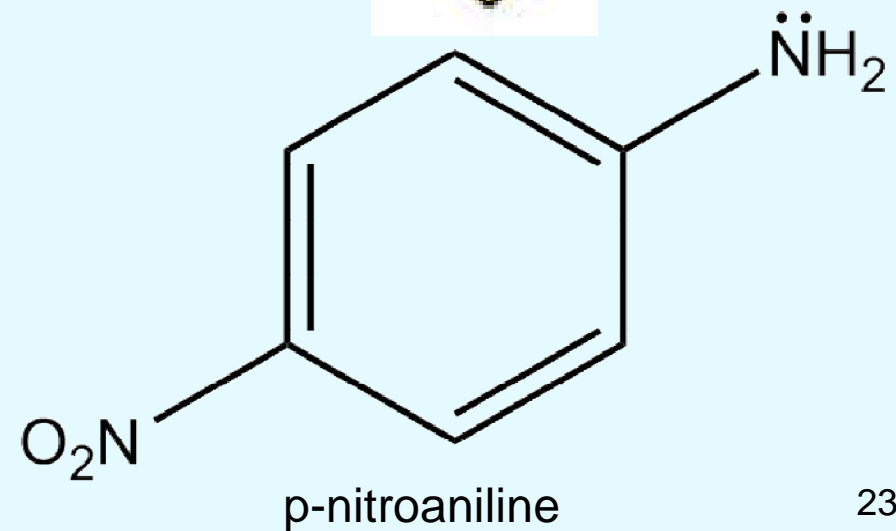
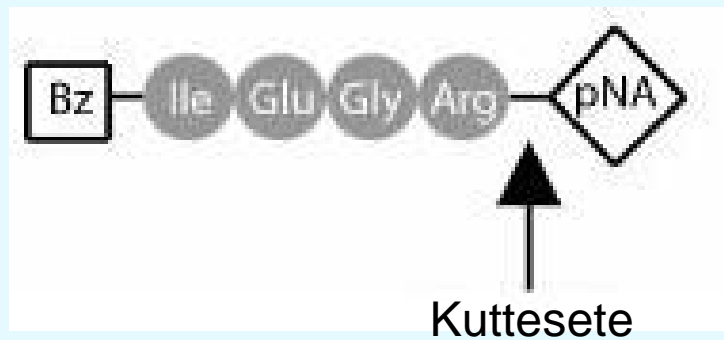


Kromogent assay



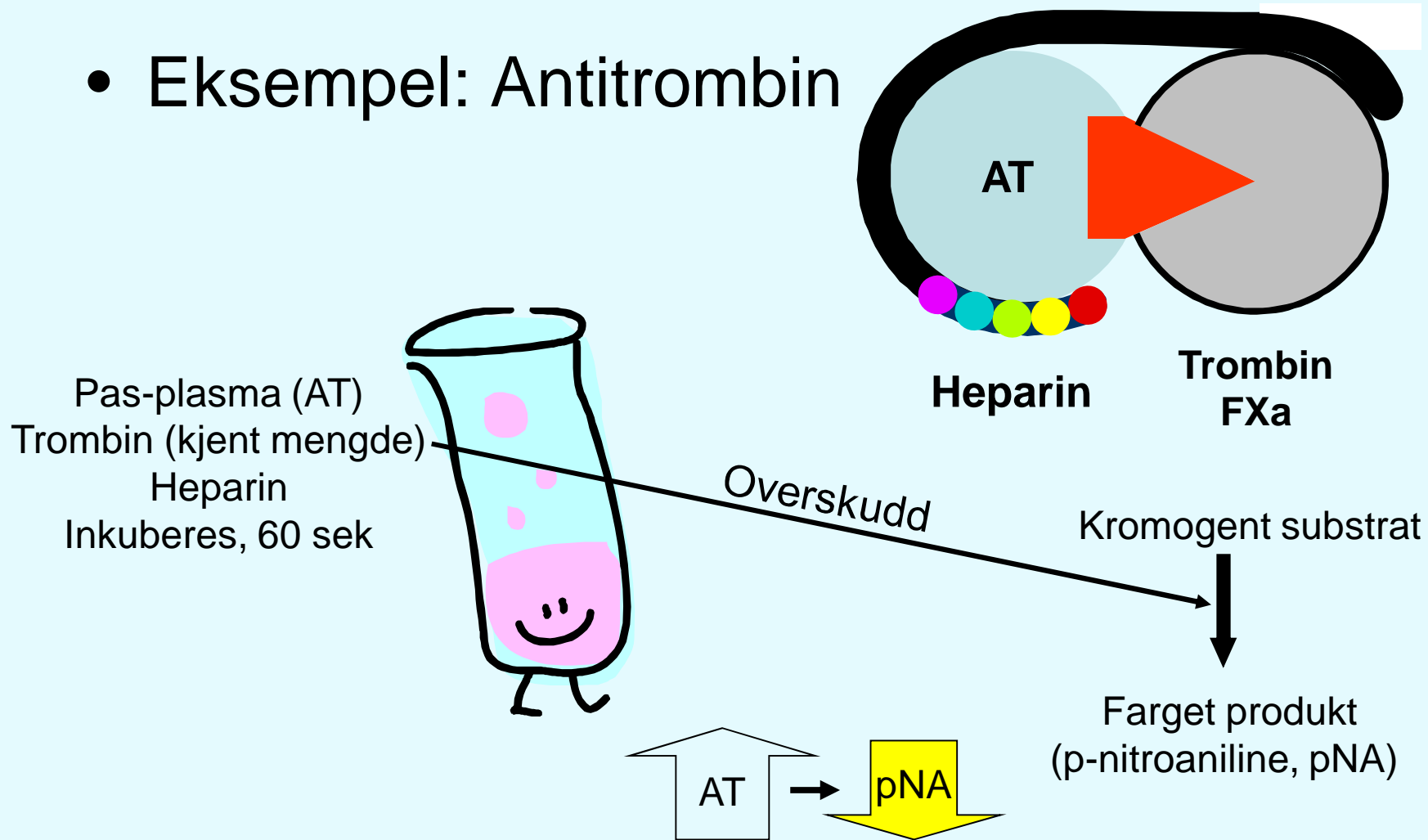
Kromogent substrat

Spesifikk
gjenkjennelsessekvens



Kromogent assay

- Eksempel: Antitrombin



Feilkilder

- MANGE !
- I prøve - Optisk interferens
 - lysspredende substanser (lipemi, klotting...)
 - fargede substanser -bilirubin -hemolyse
- I instrument
 - Monokromator - endret bølgelengde