

KT XNCB
-HÓA SINH-

CÁC PHƯƠNG PHÁP
ĐO QUANG SỬ DỤNG TRONG
XÉT NGHIỆM HÓA SINH

*ThS. Nguyễn Văn Trung
Bm. Hóa sinh Khoa XNYH
Trường ĐHQT Hồng Bàng*

MỤC TIÊU

1. Trình bày được nguyên tắc phương pháp định lượng dựa trên sự hấp thụ ánh sáng.
2. Trình bày được phương pháp đo quang và các chế độ đo quang.
3. Hiểu được nguyên lý và cách vận hành của các máy đo quang
4. Thực hiện được các xét nghiệm định lượng theo các chế độ đo ABS, Standard, Factor, Kinetic.

Nguyên lý của xét nghiệm Hóa sinh

- ⊙ $X + R \rightarrow RX$
0 màu thuốc thử hợp chất màu
- $A + B \rightarrow C + D$
- Cường độ màu ~ với nồng độ chất X trong mẫu
- ⊙ Cần so sánh màu của mẫu với màu của chất chuẩn đã biết nồng độ, được tiến hành trong cùng đk như nhau.
- ⊙ Số liệu hóa cường độ màu thành những đại lượng có thể đo đếm và tính được.
- ⊙ => pp đo quang và máy quang phổ

Nguyên lý của xét nghiệm Hóa sinh

- ⊙ Hòa tan chất ph.tích vào một d. môi phù hợp hoặc cho chất đó tác dụng với một th. thử để tạo ra một hợp chất có phổ hấp thụ UV-VIS nhạy.
- ⊙ Chiếu vào dd mẫu chứa hợp chất ph. tích 1 chùm sáng có bước sóng phù hợp để chất ph. tích hay sản phẩm của nó hấp thụ bức xạ đó.
- ⊙ Chất phân tích cùng dung môi cần được chứa trong ống đo (cuvet) có chiều dày xác định.



100-600-10-44



104-10-40



104-B-10-40



105-B-10-40



101-10-40



104-002-10-40



110-10-40



105-201-15-40

Nguyên tắc hấp thụ ánh sáng

MÀU dd	Á.s hấp thụ	Bước sóng nm
ĐỎ, CAM	XANH, XANH VE	
XANH	ĐỎ	
MÀU VE	ĐỎ	
ĐỎ TÍA	XANH VE	
VÀNG	TÍM	

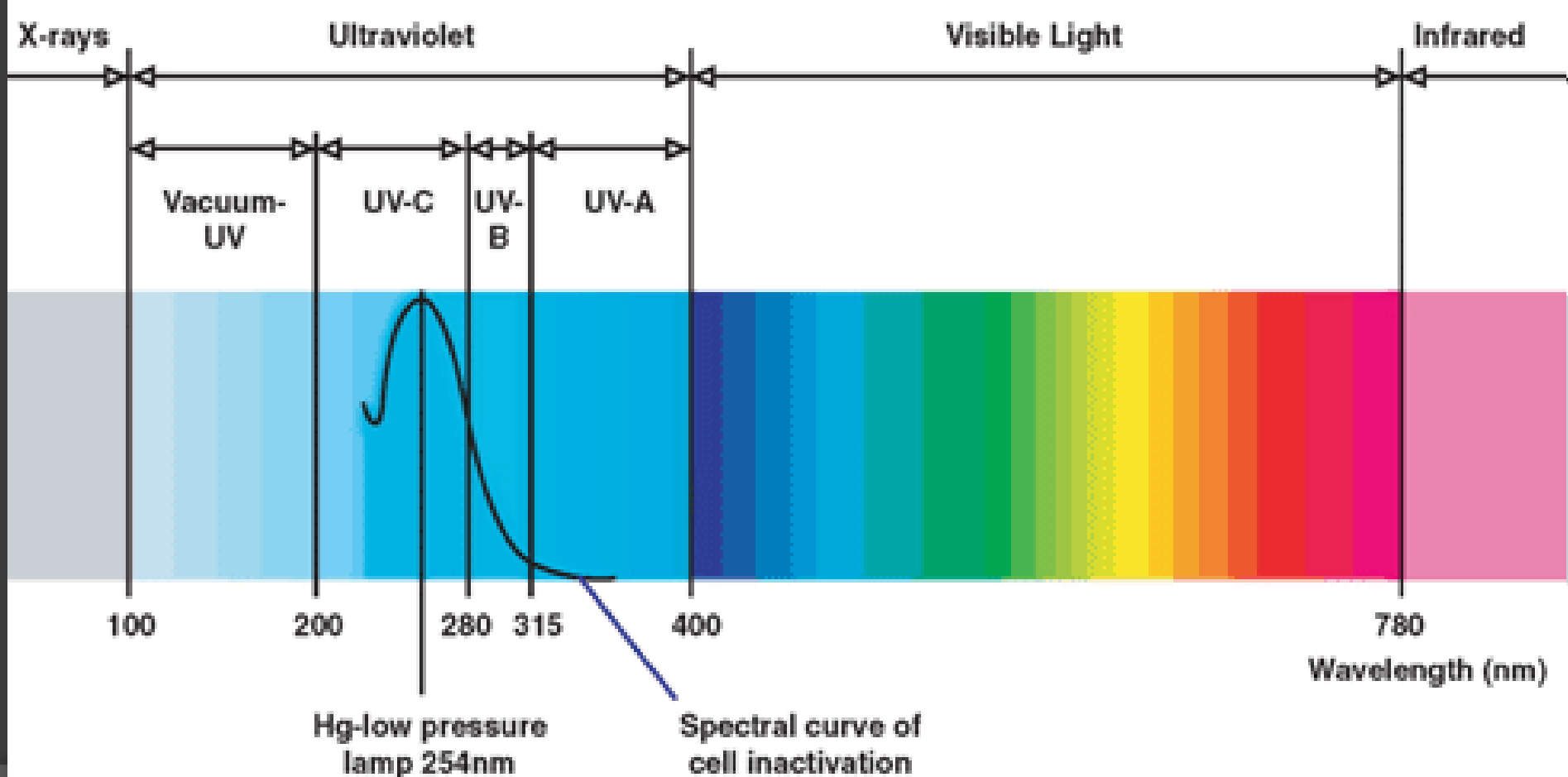
**PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH
DỰA TRÊN ĐỘ HẤP THỤ
PHÂN TỬ**

PHỔ HẤP THỤ PHÂN TỬ UV-VIS

- ◎ **UV = Ultra Violet = Tia cực tím**
- ◎ **VIS = Visible light = ánh sáng nhìn thấy (khả kiến)**

PHỔ BỨC XẠ ĐIỆN TỪ

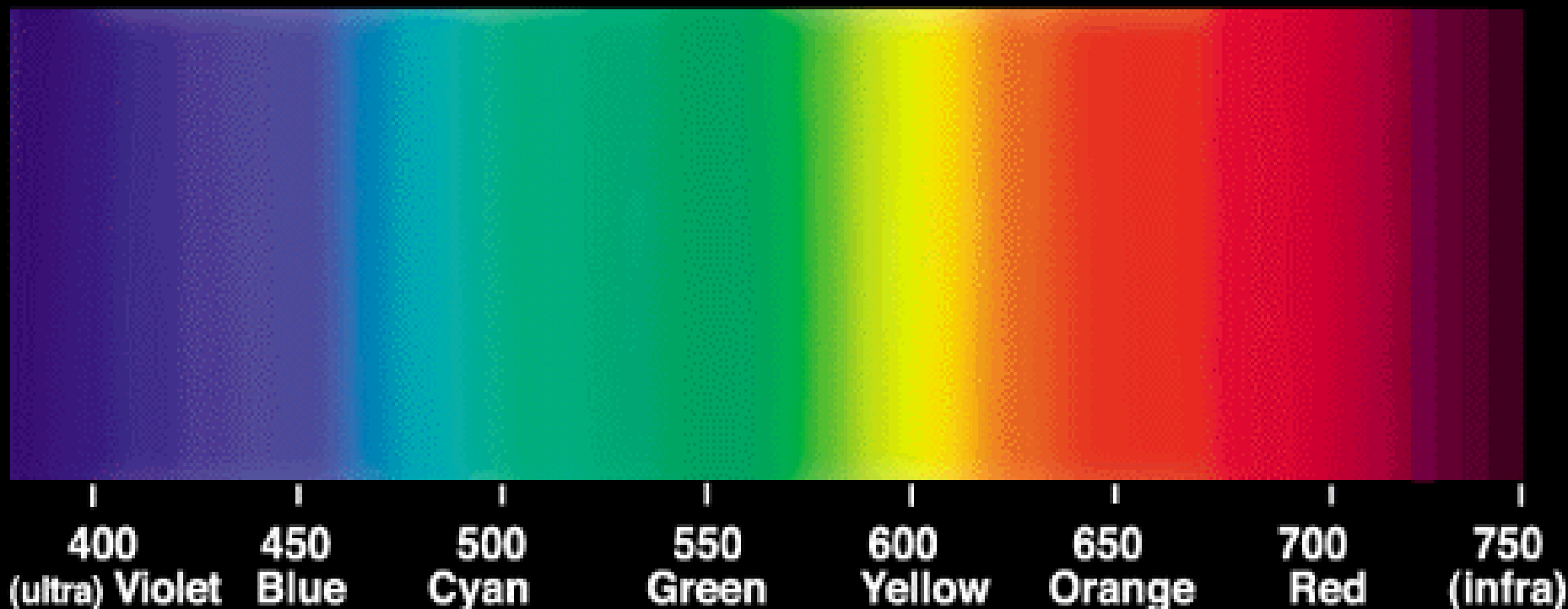
The Electromagnetic Spectrum



Phổ bức xạ khả kiến



THE VISIBLE SPECTRUM • Wavelength in Nanometers



Phổ hấp thụ phân tử UV-VIS

Bảng 1. Bước sóng ánh sáng khả kiến và màu sắc nhận được

Bước sóng (nanomet)	Màu sắc nhận được
340-400	Tử ngoại gần (không nhìn thấy)
400-430	Tím
430-500	Lam
500-570	Lục
570-620	Vàng - Cam
620-670	Đỏ chói
670-750	Đỏ sậm
Trên 750	Hồng ngoại gần (không nhìn thấy)

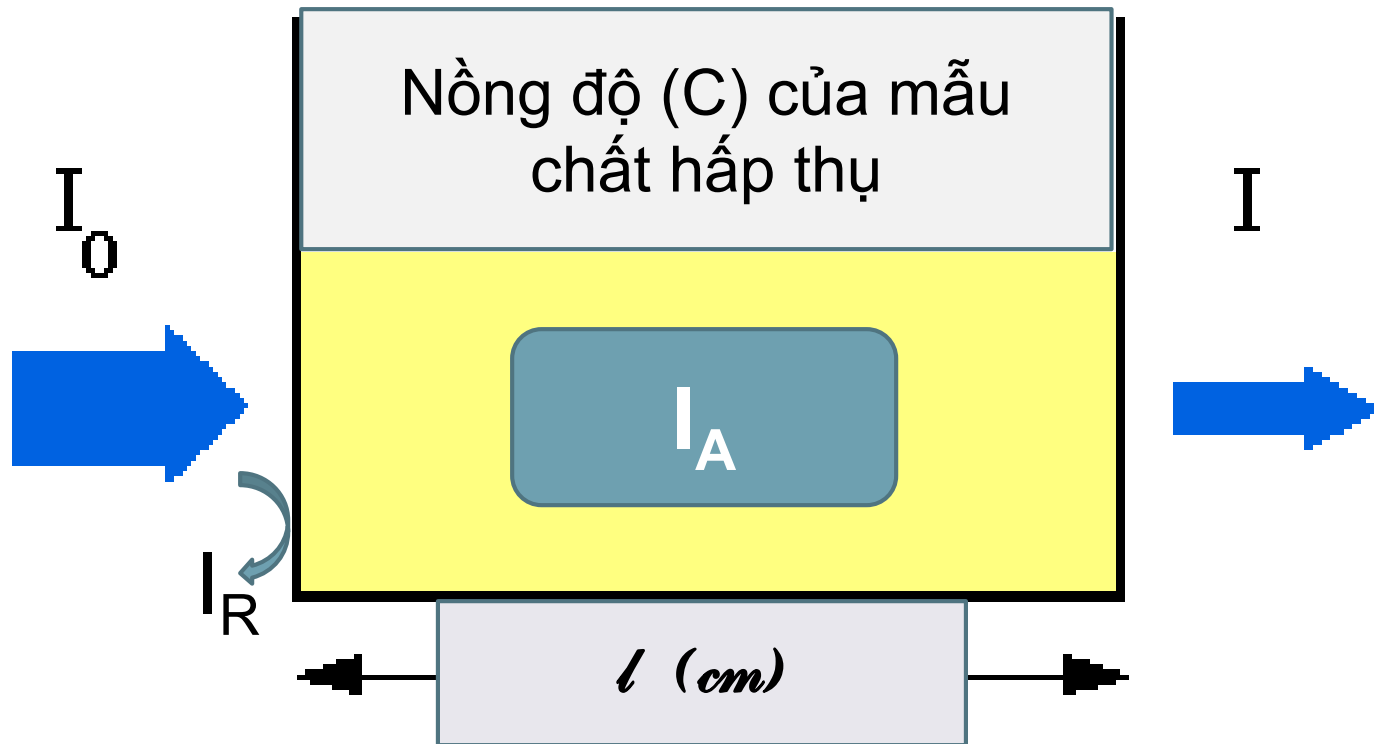
Tính chất ánh sáng

- ⊙ Các bức xạ điện từ có bản chất sóng (giao thoa, tán xạ, nhiễu xạ,...) và bản chất hạt (hạt photon = lượng tử ánh sáng).
- ⊙ Bước sóng λ là 1 trong các đại lượng đặc trưng của tính chất sóng của as, và nó tỉ lệ nghịch với năng lượng của photon.

Sự hấp thụ phân tử

- ◎ Các phân tử có cấu trúc khác nhau sẽ hấp thụ những ánh sáng có NL khác nhau.
- ◎ Phổ hấp thụ phân tử UV-VIS là phổ xuất hiện do sự tương tác của các điện tử hóa trị trong phân tử hay nhóm phân tử với chùm sáng kích thích có bước sóng nằm trong vùng UV-VIS tạo ra.

Định luật Lambert



$$I_0 = I + I_A + I_R$$

I_R không đáng kể

$$I_A = I_0 - I$$

Định luật Lambert

Cường độ của một chùm sáng đơn sắc khi đi qua một dung dịch chất hấp thụ sẽ **giảm theo** chiều dày của lớp dung dịch mà nó đi qua.

$$I = I_0 \cdot 10^{-kl}$$

I : cường độ chùm tia ló.

I_0 : cường độ chùm tia tới.

k : hệ số hấp thụ (hệ số tắt): phụ thuộc bước sóng của ánh sáng tới và bản chất chất hấp thụ.

l : chiều dày của lớp dung dịch, đơn vị cm.

Định luật Beer

Khi chất hấp thụ được hòa tan trong một dung môi trong suốt, hệ số hấp thụ k tỉ lệ thuận với nồng độ C của chất hấp thụ:

$$k = aC$$

a : hệ số hấp thụ phân tử gam: phụ thuộc λ ánh sáng tới, t° , chất hấp thụ. Không phụ thuộc thể tích và chiều dày lớp dung dịch.

C : nồng độ chất hấp thụ, đơn vị mmol/L.

ĐỊNH LUẬT LAMBERT - BEER

$$I = I_0 \cdot 10^{-a.C.l}$$

T : Transmittance: độ thấu quang

$$T = I / I_0 = 10^{-a.C.l}$$

A (ABS = Absorbance): độ hấp thụ quang
hay OD = Optical density: mật độ quang

$$A = \lg(1/T) = \lg(I_0/I) = \lg 10^{a.C.l} = a.C.l$$

Khi $C = 1 \text{ mmol/L}$, $l = 1 \text{ cm} \rightarrow a = A$. Lúc này
A chỉ phụ thuộc vào bước sóng của chùm
sáng tới.

ĐỊNH LUẬT LAMBERT - BEER

Điều kiện nghiệm đúng:

- ◎ Ánh sáng qua dd là as đơn sắc
- ◎ Nồng độ C không quá lớn, cũng không quá loãng (nằm trong khoảng tuyến tính A-C)
- ◎ Dung dịch trong suốt

PHƯƠNG PHÁP ĐO QUANG

NGUYÊN TẮC

- ◎ Áp dụng định luật Lambert – Beer

$$A = a.C.l$$

Với a và l không đổi: A tỉ lệ tuyến tính với C

- ◎ Tiến hành:

- Đo A của dd chuẩn (A_s), sử dụng 1 hoặc nhiều dd chuẩn với nhiều nồng độ chuẩn khác nhau (C_s)
- Đo A của dd mẫu (A_U)
- Từ $C_s, A_s, A_U \rightarrow C_U$

Tính kết quả

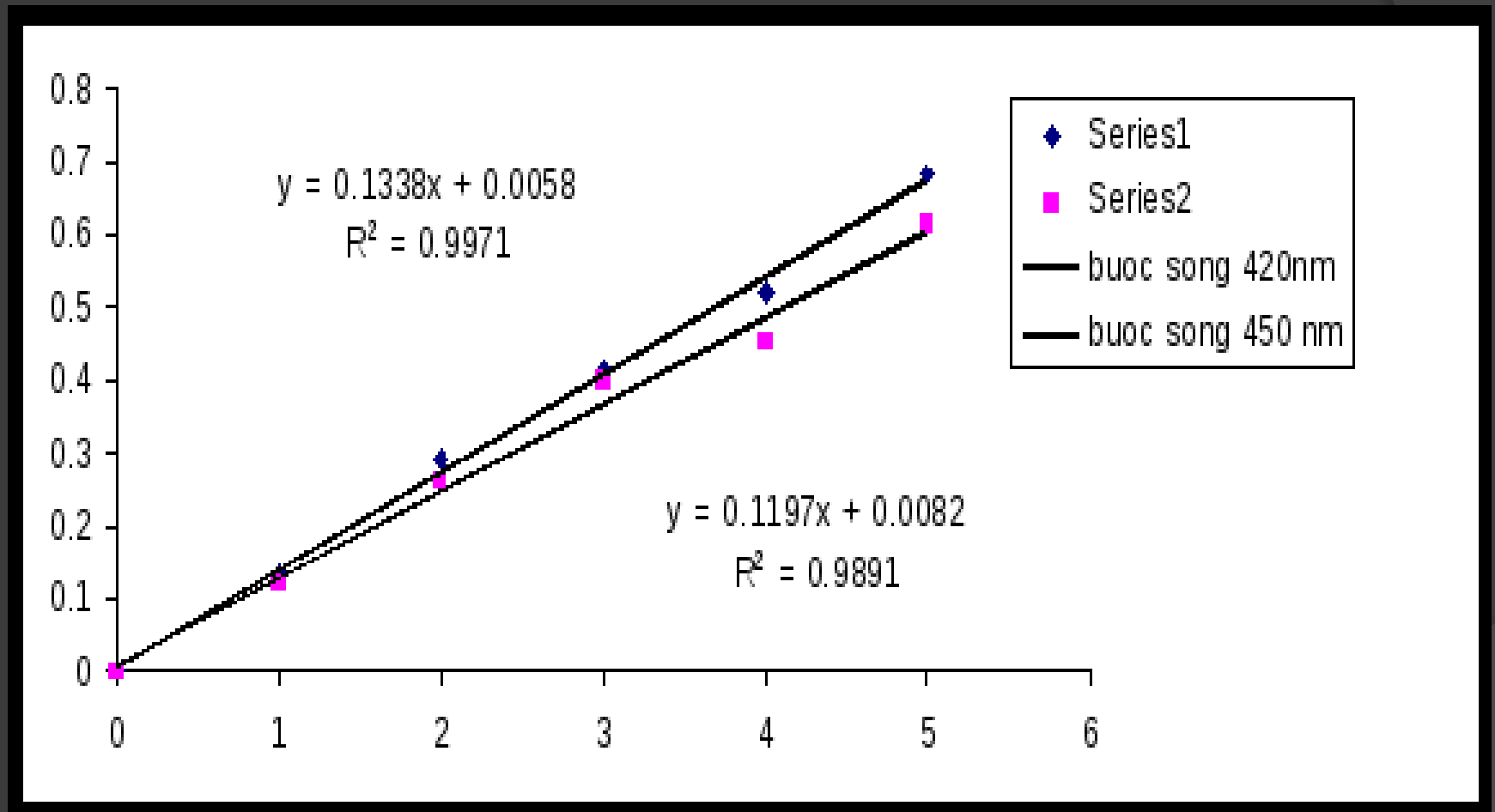
- Sử dụng 1 dd chuẩn:

$$C_U = \frac{C_s}{A_s} \times A_U$$

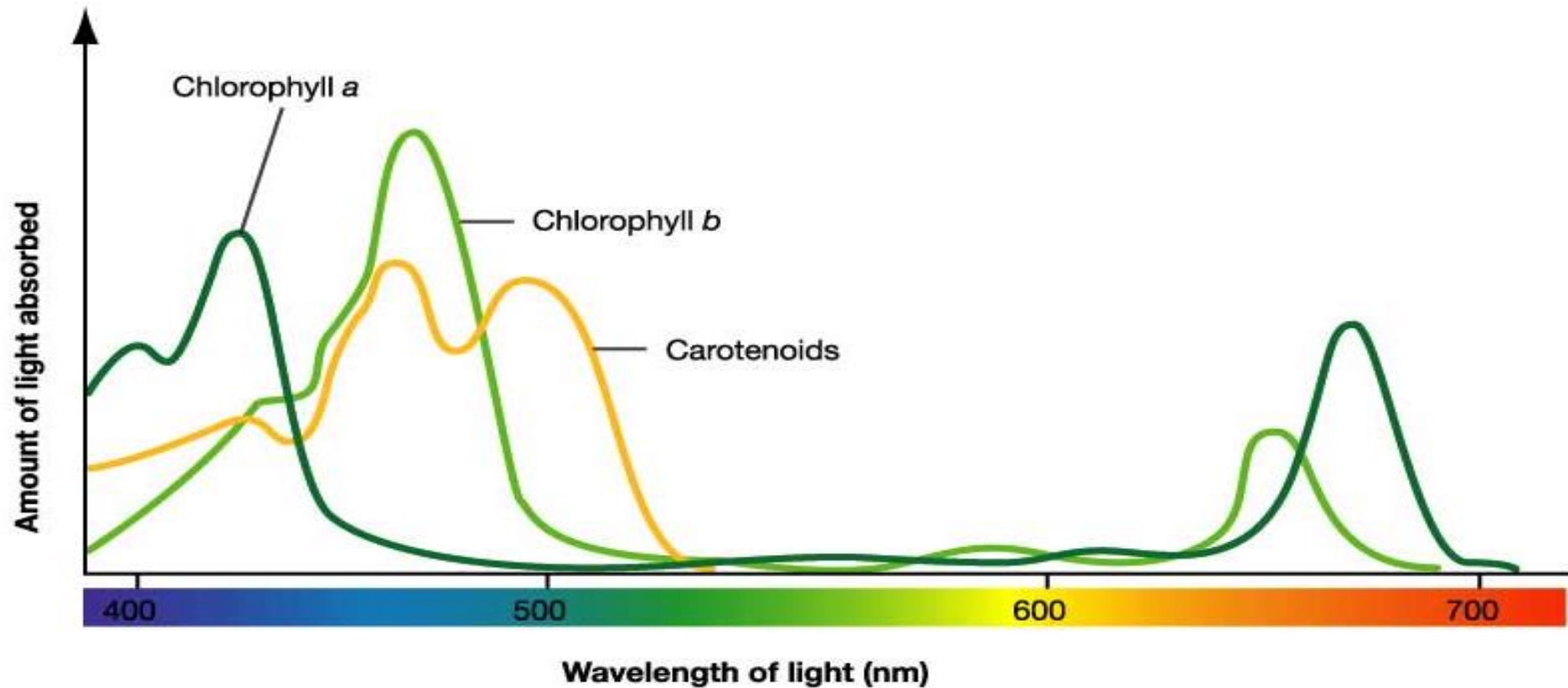
- Sử dụng nhiều dd chuẩn: 5 – 8 có C_s tăng dần
Dựng đồ thị chuẩn.

Dựa vào đồ thị tính C_U bằng cách gióng A_U lên đồ thị rồi chiếu xuống trục nồng độ.

Các phương pháp đường chuẩn



Tìm phổ hấp thụ tối đa cho mỗi dung dịch màu



Ưu điểm

- Độ chính xác cao.
- Độ nhạy cao
- Ứng dụng rộng rãi, thao tác dễ dàng với các máy quang phổ.

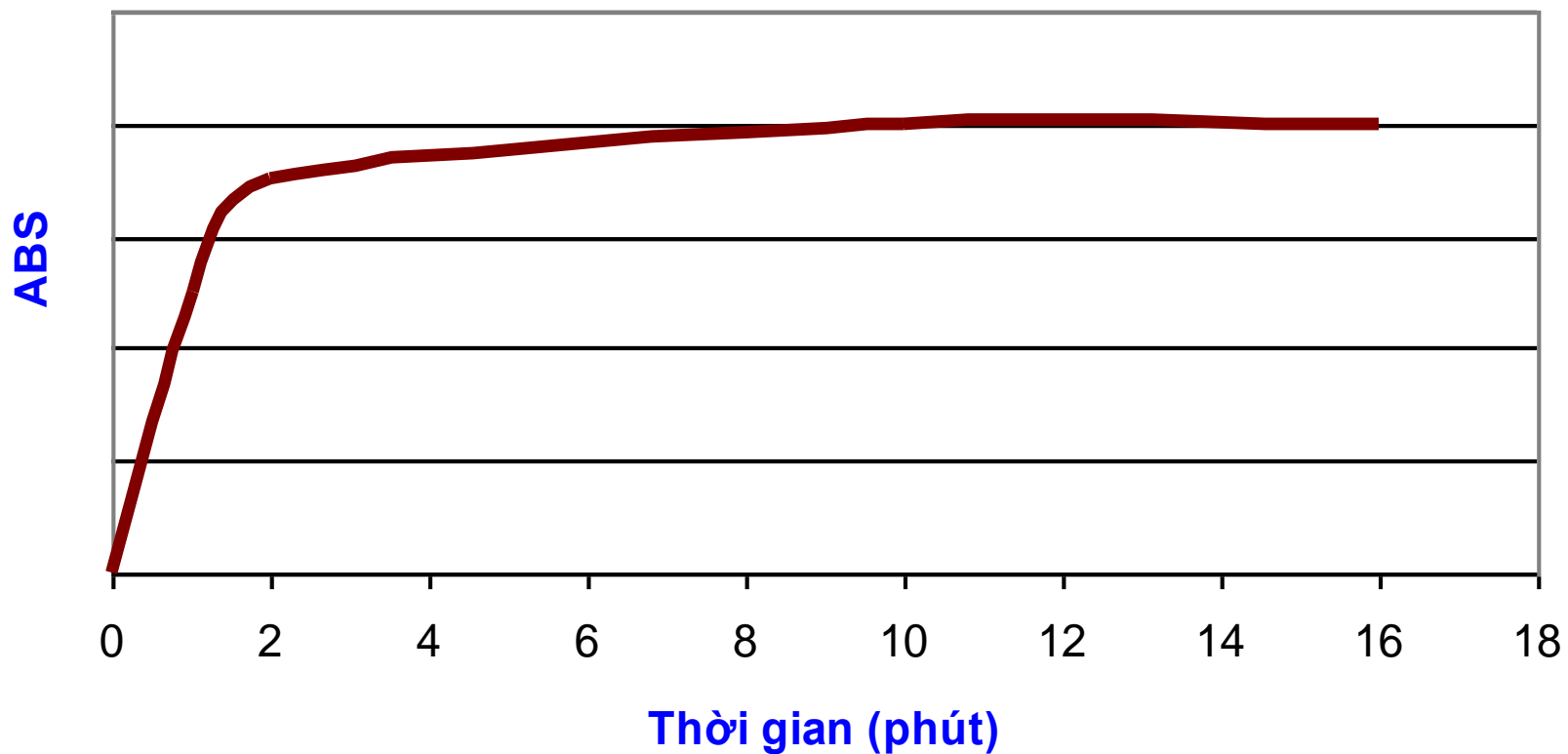
CÁC CHẾ ĐỘ ĐO QUANG

ĐO ĐIỂM CUỐI

- **Đo ở thời điểm: Sau khi Phản ứng xảy ra hoàn toàn.**
- **Mật độ quang đạt tối đa.**
- **C và ABS tỷ lệ với cường độ màu của dd.**
- **Sử dụng kèm dd chuẩn hoặc hệ số F**

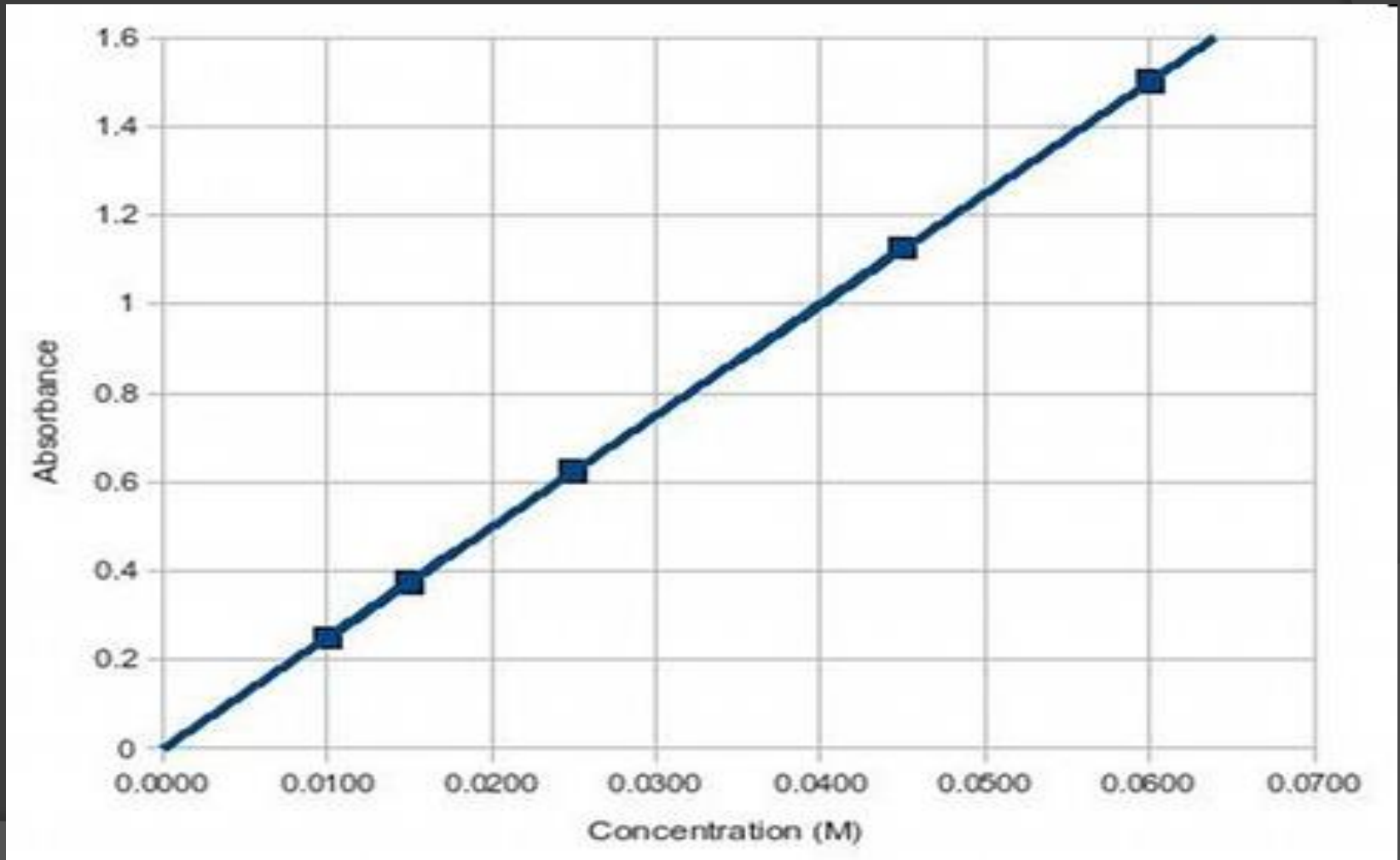
ĐO ĐIỂM CUỐI

ĐỒ THỊ BIẾN THIÊN ABS THEO
THỜI GIAN TRONG PHÉP ĐO ĐIỂM CUỐI



ĐO ĐIỂM CUỐI

Nồng độ của dd tỷ lệ với mật độ quang.



ĐO ĐỘNG HỌC - KINETIC

- ⊙ Thường dùng đo hoạt độ enzym.
- ⊙ Không tạo phức màu.
- ⊙ Đo độ đục kinetic
- ⊙ Thường sử dụng các bước sóng vùng tử ngoại.
- ⊙ Tính hiệu số mật độ quang trung bình trong 1 phút:

$$\Delta A/\text{min} = (A_2 - A_1) / t$$

t: thời gian tính từ lần đo A_1 đến lần đo A_2
(phút)

ĐO ĐỘNG HỌC - KINETIC

- Kinetic theo chuẩn:
- Kinetic theo hệ số (F: factor)

Kết quả:

$$U/L = \frac{\Delta A/\text{min} \times 1000 \times V \text{ (ml)} \times TF}{a \times V_s \text{ (ml)} \times l \text{ (cm)}}$$

Tổng thể tích dd phản ứng

Hệ số nhiệt độ

Hệ số hấp thụ phân tử

Thể tích mẫu

Chiều dài cuvet

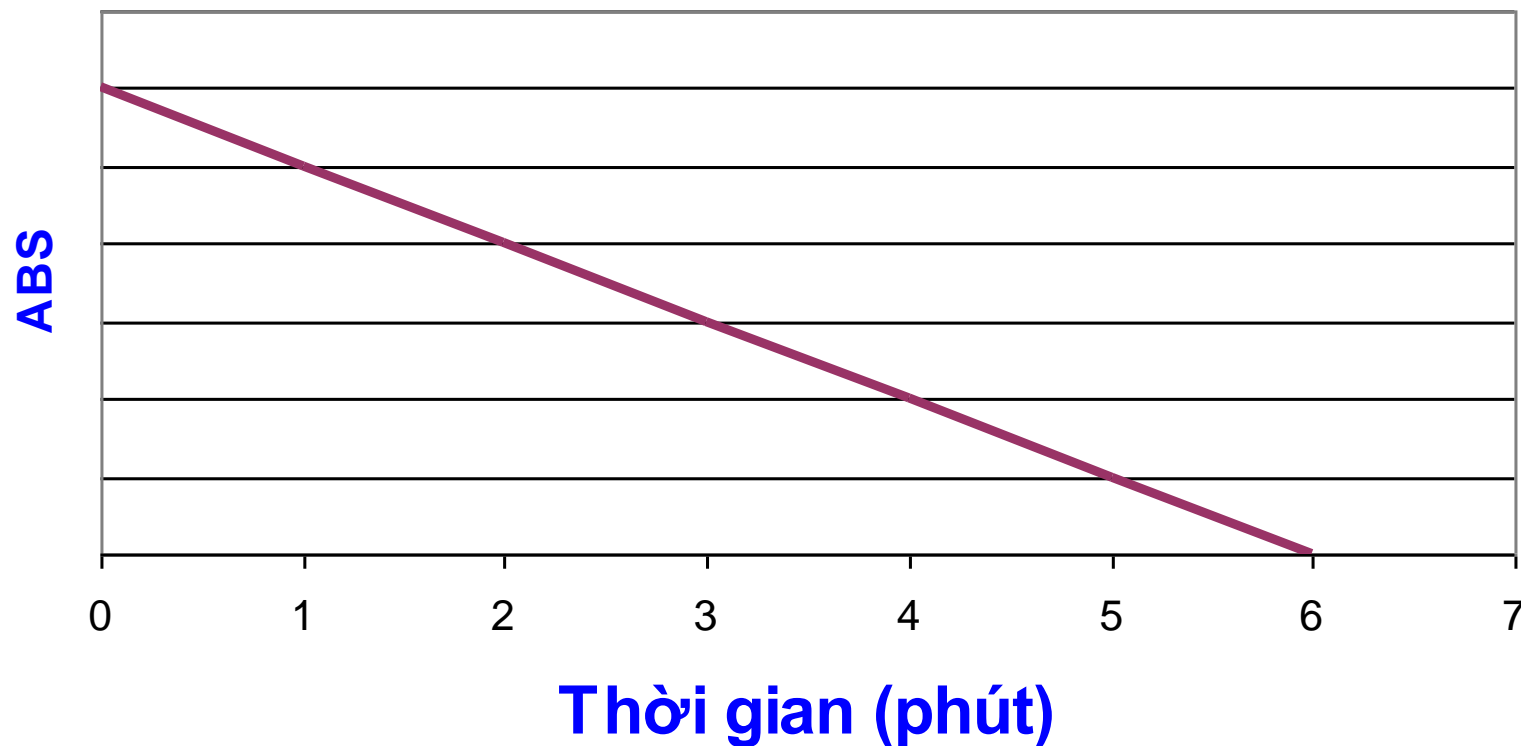
F= FACTOR

The diagram shows the formula for kinetic measurement. The numerator is $\Delta A/\text{min} \times 1000 \times V \text{ (ml)} \times TF$ and the denominator is $a \times V_s \text{ (ml)} \times l \text{ (cm)}$. A blue oval encircles the entire fraction. Arrows point from labels to specific parts of the formula: 'Tổng thể tích dd phản ứng' points to 'V (ml)', 'Hệ số nhiệt độ' points to 'TF', 'Hệ số hấp thụ phân tử' points to 'a', 'Thể tích mẫu' points to 'Vs (ml)', and 'Chiều dài cuvet' points to 'l (cm)'. The label 'F= FACTOR' is positioned below the denominator.

ĐO ĐỘNG HỌC - KINETIC

↓ ABS : Đo GOT, GPT

GIẢM ABS THEO THỜI GIAN



- Phản ứng :



(không định lượng trực tiếp được)



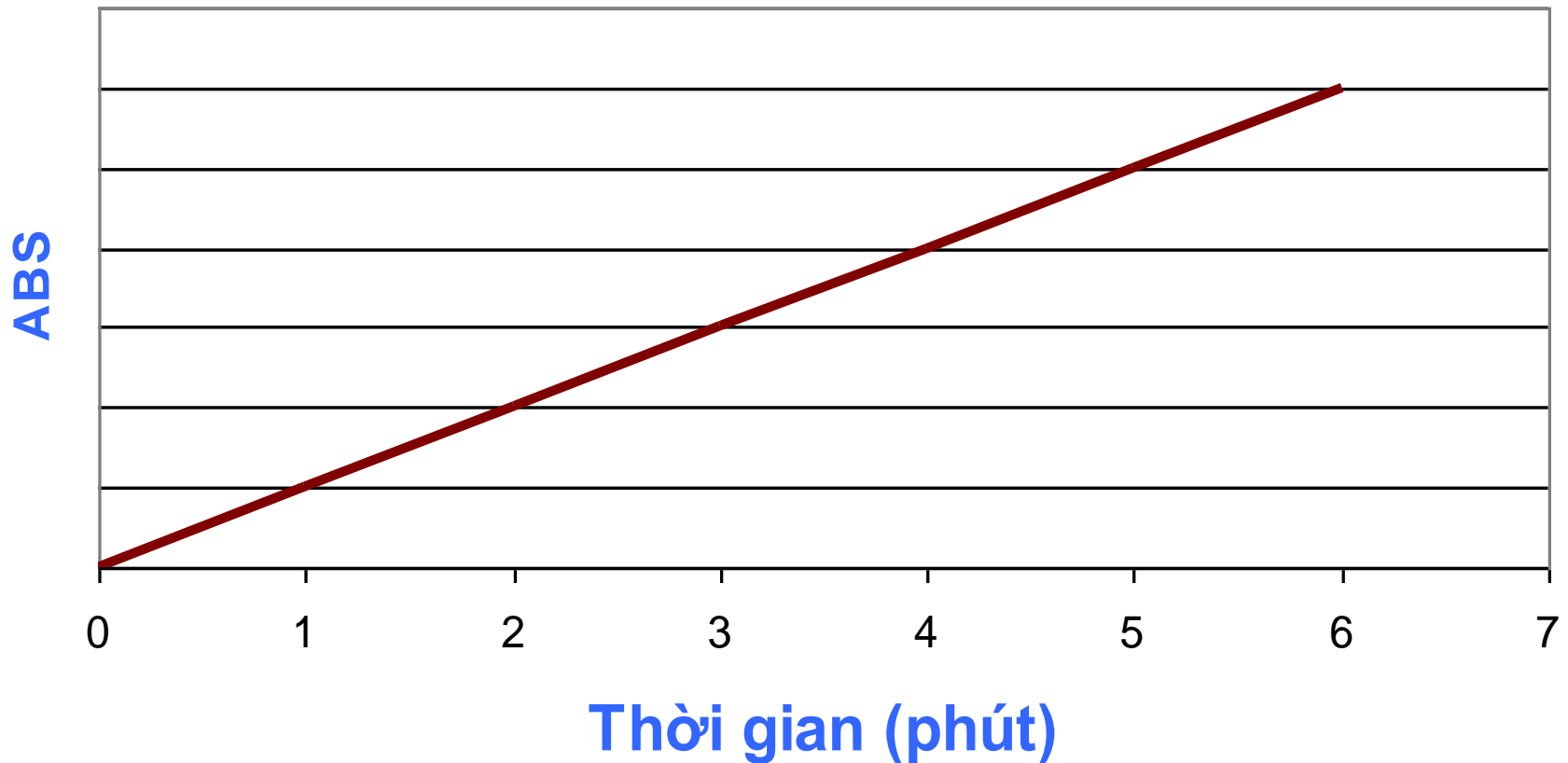
(định lượng thông qua K)

- C trong phản ứng đầu càng tăng thì K trong phản ứng sau càng giảm \implies ABS của K càng giảm .

ĐO ĐỘNG HỌC - KINETIC

↑ ABS : Đo GGT, AMYLASE

TĂNG ABS THEO THỜI GIAN



ĐO ĐỘNG HỌC – FIXED TIME

- ⊙ Khi phản ứng có ABS của dd không tuyến tính theo thời gian
- ⊙ Đo mật độ quang ở hai thời điểm nhất định
- ⊙ Tính hiệu số mật độ quang tại hai thời điểm.

$$\Delta A = A_2 - A_1$$

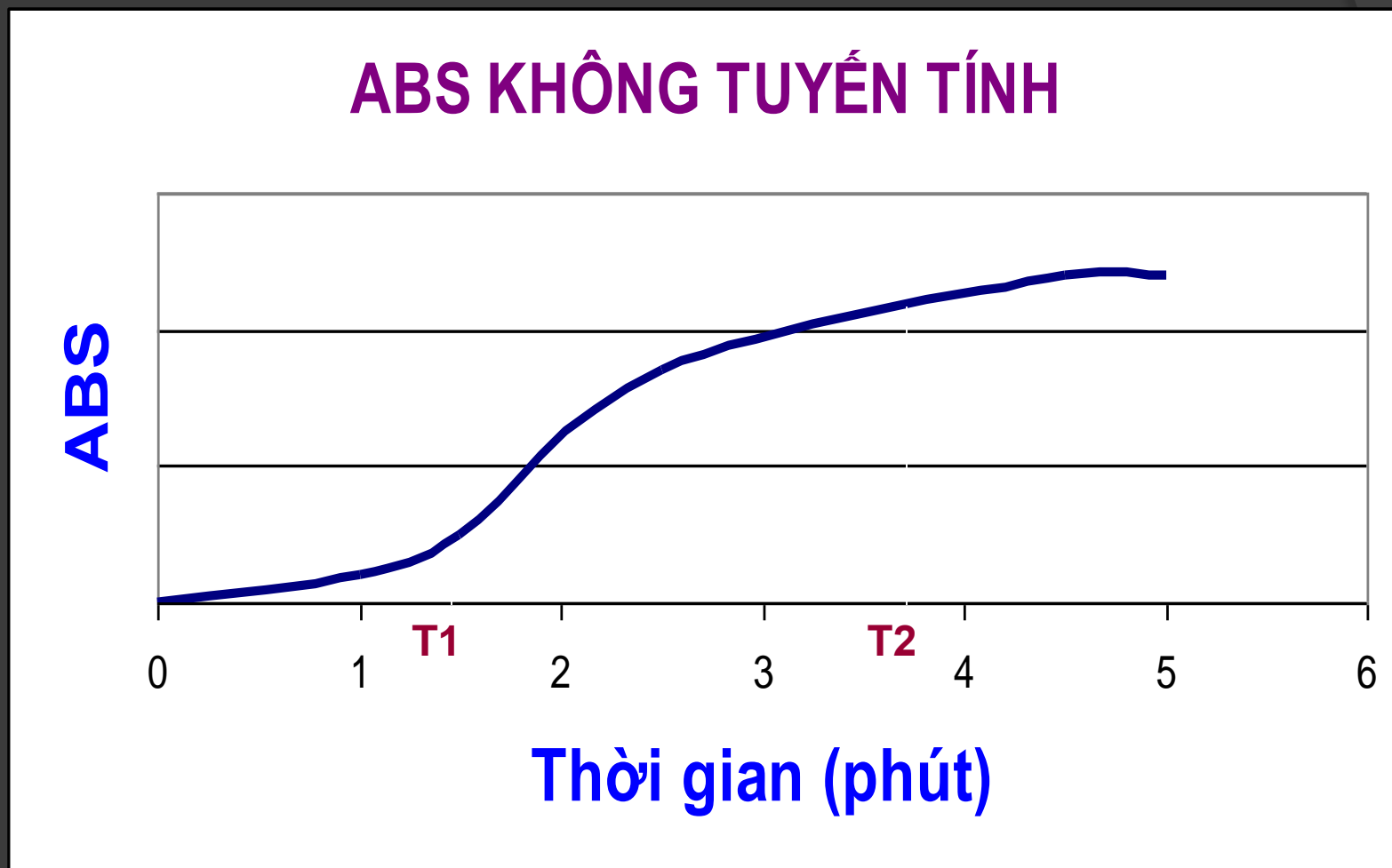
- ⊙ Fixed time chuẩn:

$$C_u = (\Delta A_u / \Delta A_s) \times C_s$$

- ⊙ Fixed time factor:

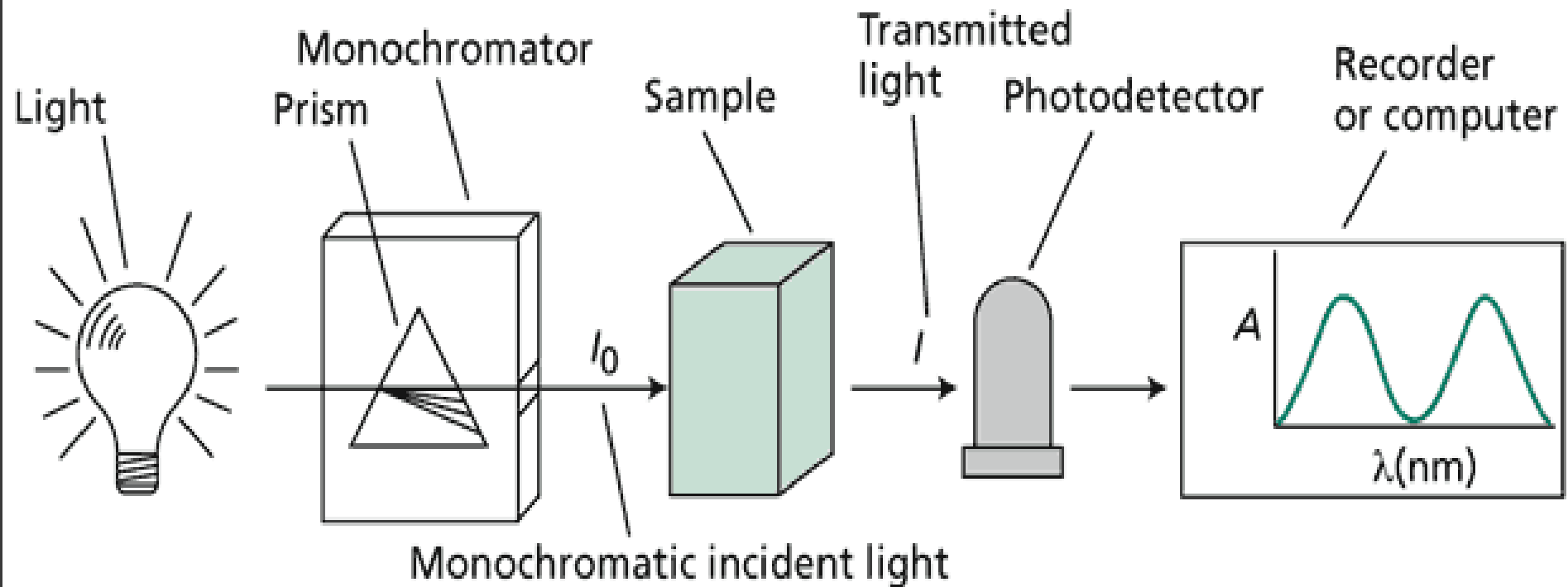
$$C_u = \Delta A_u \times F$$

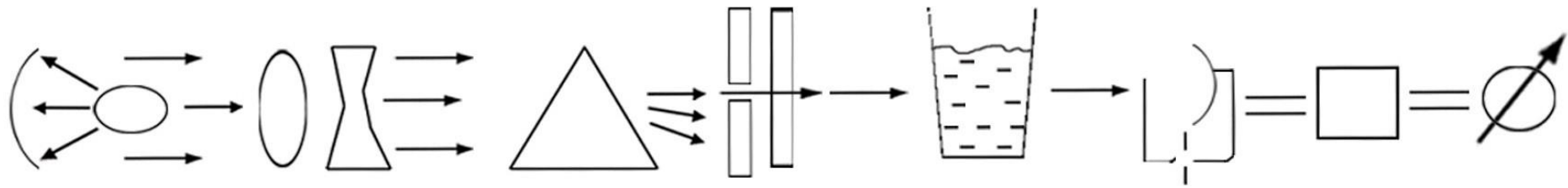
ĐO ĐỘNG HỌC – FIXED TIME



CẤU TẠO MÁY ĐO QUANG

QUANG PHỔ KẾ - SPECTROPHOTOMETER CẤU TẠO





(2) (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10)

(1) Đèn W (hoặc D)

(2) Gương cong

(3) Hệ thống thấu kính
tử

(4) Lăng kính hoặc cách

(5) Khe sáng

(6) Kính lọc phụ

(7) Cuvette đựng dd đo

(8) Tế bào quang điện

(9) Bộ khuếch đại

(10) Đồng hồ chỉ OD.

Câu hỏi lượng giá

- 1. Tại sao phải dùng ống Blank? Khi nào dùng Blank là nước cất, thuốc thử, thuốc thử cùng mẫu thử (sample blank)?
- 2. Tại sao phải dùng ống Standard? Khi nào dùng 1S, khi nào dùng nhiều S?
- 3. Tại sao phải chọn bước sóng khi đo? Khi nào phải dùng thêm bước sóng thứ 2?
- 4. Kể các XN dùng p.ứ sau: $X + R \rightarrow RX$ (màu)
- 5. Kể các XN dùng p.ứ sau: $A + B \rightarrow C + D$
 $C + E \rightarrow F$ (màu)

Câu hỏi lượng giá

6. Kể các XN dùng p.ứ sau: $A + B \rightarrow C + D$



(đo Abs của chất E)

7. Kể các XN dùng p.ứ sau: $A + B \rightarrow AB_{\downarrow} + B_{\text{dư}}$

