PHƯƠNG PHÁP ĐO QUANG

Mục tiêu :

1. Trình bày được các định luật cơ bản về sự hấp thu ánh sáng .
2. Trình bày được ứng dụng phương pháp đo quang trong các xét nghiệm hóa sinh lâm sàng.

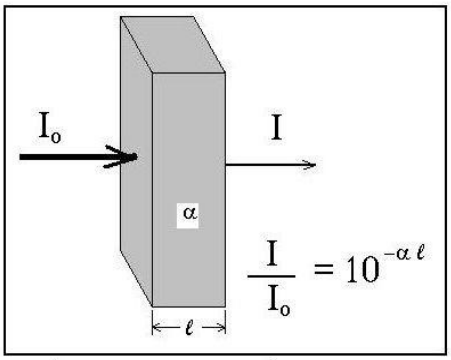
I. ĐỊNH LUẬT CƠ BẢN VỀ SỰ HẤP THU ÁNH SÁNG :

1. Định luật Lambert – beer :

Cường độ của một chum tia đơn sáng đơn sắc khi đi qua một dung dịch chất hấp thụ tỷ lệ nghịch với chiều dày của lớp dung dịch mà nó đi qua :

$$I = I_o \cdot 10^{-kl} \qquad (1)$$

I_o : cường độ chùm sáng tới
I : cường độ chum sáng ló ra ngoài
L : chiều dày của môi trường chất hấp thụ
k : hệ số hấp thụ (phụ thuộc vào bản chất của chất màu và dung môi, bước sóng của chùm tia và nhiệt độ.



The Beer Lambert Law

2. Định luật Beer :

Sự giảm cường độ dòng sáng khi đi qua một dung dịch chất hấp thụ phụ thuộc vào số lượng các tiểu phần chất hấp thụ mà ánh sáng đó gặp phải trên đường đi, nghĩa là phụ thuộc vào nồng độ C của dung dịch chất hấp thụ :

$$k = a.C \qquad (2)$$

a : hằng số hấp thụ
C : nồng độ chất hấp thụ

3. Định luật Lambert-beer :

Kết hợp 2 phương trình (1) và (2) ta có :

$$I = I_o \cdot 10^{-aCl}$$

**Một số đại lượng về sự hấp thu ánh sáng cần biết :

a. Độ thấu quang T : (độ truyền quang) (Transmittance)

$$T = I/I_o = 10^{-aCl}$$

b. <u>Độ hấp thụ quang A</u> (ABS : Absorbance) hay mật độ quang OD (Optical Density) :

$$A = OD = \lg 1/T$$
$$= \lg 1/10^{-aCl}$$
$$= \lg 10^{aCl}$$
$$= aCl$$

Trong cùng một điều kiện , khi k và L không đổi, mật độ quang tỷ lệ với nồng độ của dung dịch (OD = kLC). Do đó nếu so sánh nồng độ C chưa biết của 1 dung dịch với nồng độ mẫu C_o, ta có:

$A = kLC$
$A_o = kLC_o$
$\Longrightarrow$ $A/A_o = C/C_o$
$\Longrightarrow$ **$C = A/A_o \times C_o$**

Nếu biết được tỷ số giữa mật độ quang của ống đo, ống mẫu và nồng độ C_o của ống mẫu, ta sẽ tính được nồng độ C của ống cần đo.

II. <u>PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG ĐO QUANG</u> :

Dựa trên cơ sở mật độ quang của dung dịch tỷ lệ với nồng độ của chất đó. Đo mật độ quang của các dung dịch bằng MÁY ĐO QUANG (photometre hay spectrophotometer).

Đặc điểm chủ yếu của máy là dòng sáng sau khi đi qua dung dịch được chiếu lên tế bào quang điện để chuyển thành dòng điện mà cường độ của nó đo được nhờ 1 điện kế nhạy, được khuếch đại rồi chuyển sang bộ phận ghi nhận kết quả.

Trong phép định lượng đo quang, thong thường qua các kỹ thuật xét nghiệm tương ứng ta chuyển chất cần xác định X không có màu thành hợp chất có màu RX bằng thuốc thử R thích hợp.

X	+	R	$\longrightarrow$	RX	$\Longrightarrow$	ĐO ĐỘ HẤP THỤ (D_o)
Chất cần Xác định		Thuốc thử		Sản phẩm có độ hấp thụ ở bước sóng Xác định (khả kiến-cận UV-340nm-UV)		Đo mật độ quang D_o nhờ MÁY ĐO QUANG

-Dung dịch đo quang phải trong suốt.

-Xác định nồng độ C chưa biết của 1 chất bằng cách làm song song với 1 ống chuẩn có nồn g độ C_o đã biết trước :

$$\mathbf{C = A/A_o \times C_o}$$

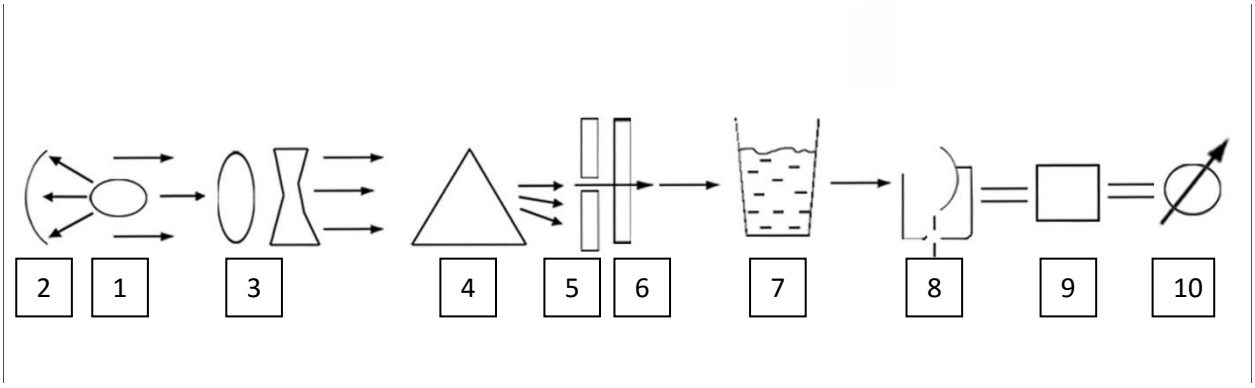
-Hoặc bằng cách lập 1 biểu đồ mẫu hoặc dùng hệ số (factor = C_o/A_o)

**Dùng mẫu trắng : khi dung dịch đo có chứa các chất khác (như thuốc thử tạo màu) cũng hấp thu các tia sử dụng. Pha 1 mẫu trắng (dd không hay dd blank) giống như khi chuẩn bị dd đo, cũng cho thuốc thử tạo màu vào, chỉ khác là không cho chất cần xác định vào . Đo D củ add đo đối chiếu với mẫu trắng.

III. CẤU TẠO CỦA MÁY QUANG PHỔ :

Hiện nay , các phòng xét nghiệm hóa sinh thường sử dụng 2 loại máy : quang kế (photometer) và quang phổ kế (spectrophotometer) . Điểm khác biệt chính giữa 2 loại máy này là nguồn sáng , máy quang phổ kế có bộ phận tạo phổ liên tục (sự dụng lăng kính hoặc cách tử) nghĩa là tạo các chùm tia đơn sắc có bước sóng (λ) đặc trưng theo ý muốn , trong khi máy quang kế không có bộ phận này mà chỉ có kính lọc màu tạo ra tia sáng đơn sắc có bước song tương ứng với màu của kính lọc.

Cấu tạo của 1 máy quang phổ thường có 10 bộ phận như sau :



(1) Nguồn sáng : Đèn tungsten (w) cho ánh sáng khả kiến và đèn hydrogen hoặc deuterium (D_2) cho phổ phát xạ liên tục trong vùng tử ngoại .

(2) Gương phản xạ : có tác dụng hất toàn bộ các tia sáng phát ra từ nguồn sáng về 1 phía.

(3) Hệ thống thấu kính hội tụ và phân kỳ : có tác dụng chỉnh cho các tia sáng đi song song với nhau.

(4) Bộ phận tạo ánh sáng đơn sắc (monochromator) : có thể là lăng kính (reflectance grating) hoặc cách tử (prism) – chỉ có ở máy quang phổ kế.

(5) Khe sáng : có tác dụng chỉ cho 1 tia sáng đơn sắc đi qua.

(6) Kính lọc phụ : có tác dụng lọc các tia tạp khỏi dòng sáng của tia đơn sắc.

(7) Cuvet đựng dung dịch chất hấp thụ

(8) Bộ phận phát hiện : là tế bào quang điện (phototube) : có tác dụng tiếp nhận dòng tia đơn sắc sau khi đã bị dung dịch đo hấp thụ 1 phần, tạo nên 1 dòng quang điện.

(9) Bộ khuếch đại : có tác dụng khuếch đại dòng quang điện.

(10) Bộ phận hiển thị kết quả : đồng hồ đo thể hiện độ hấp thụ quang (ABS) hay độ truyền qua (T).

- Các thông số thu được trên bộ chỉ thị :
  - **Trị số bách phân truyền** : T% = 0 – 100
  - **Mật độ quang học hay Độ hấp thu :**
    OD (Abs) = 0.000 – 2.000

IV. ÁP DỤNG PHƯƠNG PHÁP ĐO QUANG TRONG CÁC XÉT NGHIỆM HÓA SINH LÂM SÀNG :

1. Phương pháp đo điểm cuối (end point method) :

Đo số lượng sản phẩm tạo thảnh từ thời điểm to bắt đầu đến thời điểm t kết thúc phản ứng, khi tất cả chất cần xác định (substrate) đã được tiêu thụ hết.

** Có thể đo và tính kết quả : - So với chuẩn.
- Nhân với hệ số (factor)

** Kỹ thuật thực hiện :

a. PP hóa học : dùng các phản ứng hóa học đặc hiệu cho các chất cần xác định .

Ví dụ :

- Creatinin : phản ứng Jaffe, a.picric.
- Ure : kỹ thuật Bousquet , dùng DAM (diacetyl monoxim)
- Protein : phản ứng biuret , dùng sulfat đồng / môi trường kiềm.
- Cholesterol : phản ứng Liebermann – Burchard.
- Glucose : dùng ortho – toluidine , hoặc phản ứng khử Somogyi – Nelson …

b. PP enzyme : dùng enzym là thuốc thử tác dụng đặ hiệu , chuyên biệt trên cơ chất xác định, cho kết quả đúng, xác thực hơn phương pháp cổ điển,hóa học, tiến hành nhanh , vi định lượng nên hiện nay được áp dụng rất phổ biến.

Ví dụ : dùng glucose oxidase cho glucose
Urease cho ure
Cholesterol oxidase cho cholesterol
Uricase cho acid uric…

2. Phương pháp đo động học (kinetic method)

Theo dõi động học, một cách lien tục quá trình diễn tiến của phản ứng, qua các thời điểm to, t1, t2 , t3 … … trong khoảng tuyến tính của phản ứng.

**Kỹ thuật thực hiện động học Enzym:

Đo vận tốc tạo thành sản phẩm từ thời điểm to, t1, t2, t3… …Hoạt tính enzyme được tính bằng cách nhân trung bình của các ΔDo/min với hệ số riêng của phản ứng (F), ra kết quả là số đơn vị U/L

Kỹ thuật này được áp dụng để xác định hoạt tính của các thông số enzyme như GOT, GPT, CPK, ALP, amylase, … …)

__Lưu ý**__ : trị số đối chiếu (giá trị bình thường) của các thông số có tùy thuộc vào loại kỹ thuật xét nghiệm, điều kiện tiến hành, nhiệt độ, … … ngoài ra các biến thiên sinh lý cũng có gây ảnh hưởng lên kết quả xét nghiệm. Khi nhận định kết quả nên lưu ý đến các yếu tố trên.