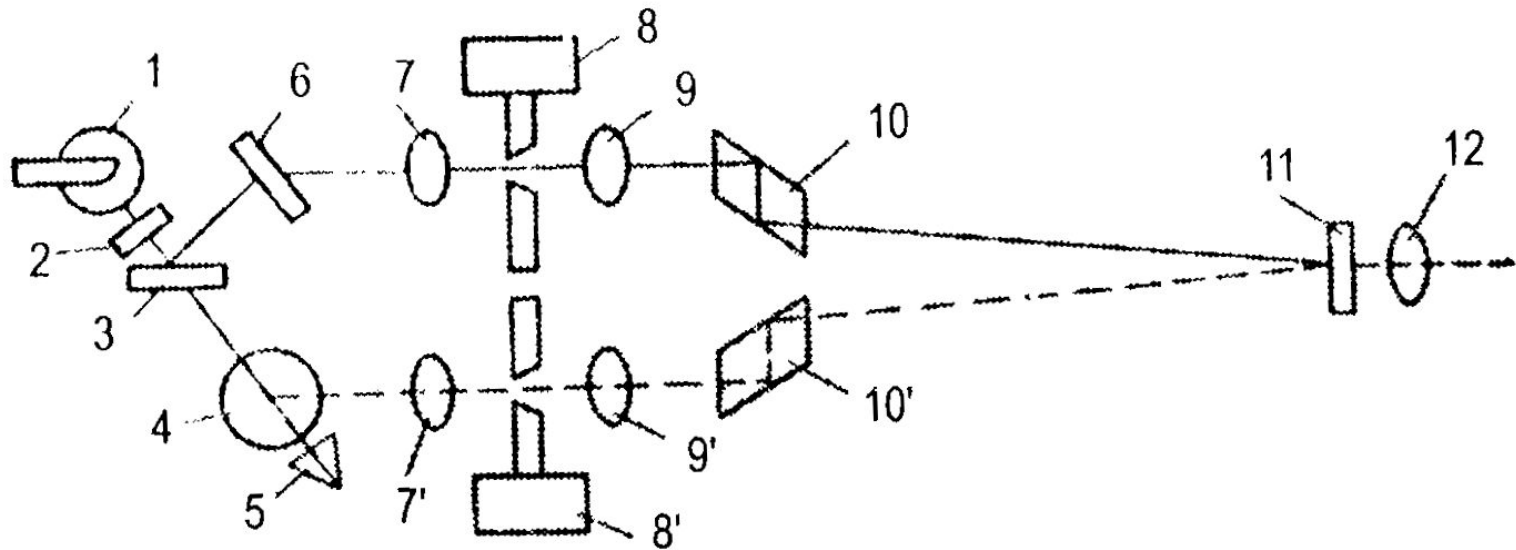


$$I_r = I_0 \cdot \frac{n_1^2 - n^2}{(n_1^2 + 2n^2)} \cdot \frac{NV^2}{\lambda^4 d^2} \cdot (1 + \cos^2 \beta),$$

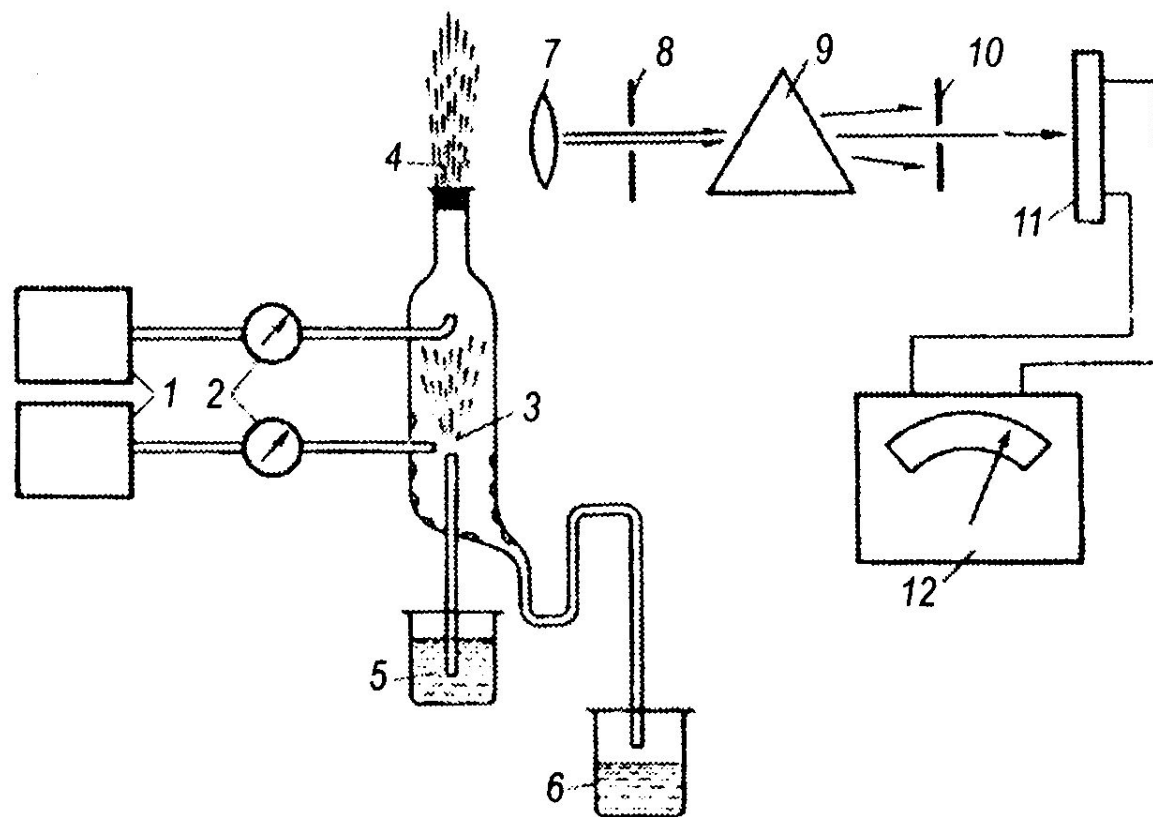
$$\frac{I_r}{I_0} = k \cdot C$$

Оптическая схема нефелометра

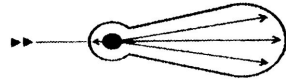
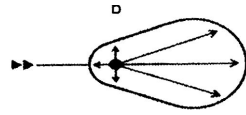
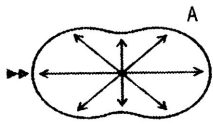


1 – лампа, 2,11 – светофильтры; 3 – стеклянная пластинка, разделяющая свет на 2 пучка; 4 – кювета с исследуемым раствором; 5 – ловушка света; 7, 8, 9 – линзы; 8 – уравнивательные диафрагмы; 10 – ромбические призмы; 12 - окуляр

Схема пламенного фотометра



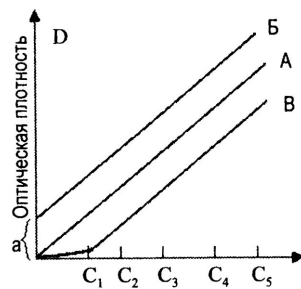
1 – цилиндры с топливом и воздухом; 2 – клапаны регуляции давления и устройства для измерения расхода газов; 3 – распылительная камера; 4 – устройство для осушения распылительной камеры; 5 – фокусирующая линза; 6 – входная щель монохроматора; 7 – призма, разделяющая свет по длине волны; 8 – выходная щель монохроматора; 9 – фотодетектор



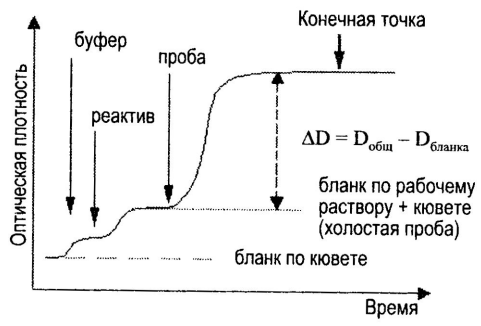
$$\lg \frac{I_t}{I_0} = k \frac{Cbd^3}{d^4 + \alpha\lambda^4},$$

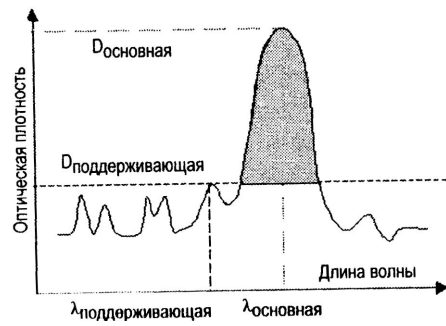
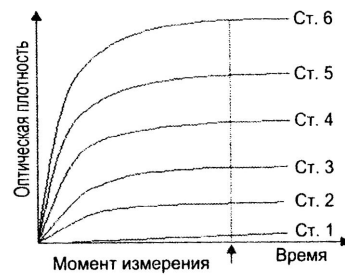
$$\lg \frac{I_t}{I_0} = tC \quad \text{или} \quad I_t = I_0 \cdot 10^{-tC}$$

$$D = \frac{0,38}{6,22 \times 10^3 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \text{ см}^{-1} \times 1 \text{ см}} = \frac{0,38}{6,22 \times 10^3 \text{ л} \times \text{моль}^{-1}} = 6,11 \times 10^{-5} \text{ моль/л}$$



$$A = \frac{V \times 1000}{\epsilon \times l \times \nu} \times \frac{\Delta D}{\text{мин}},$$





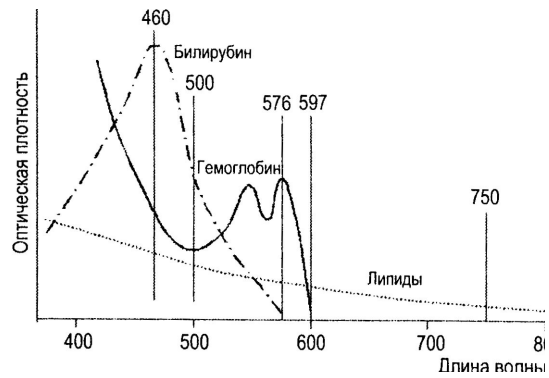
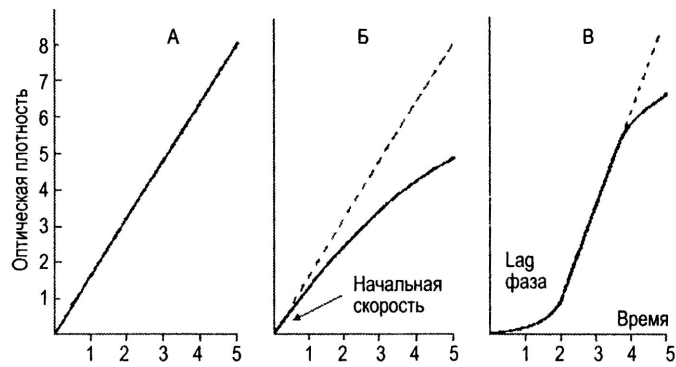
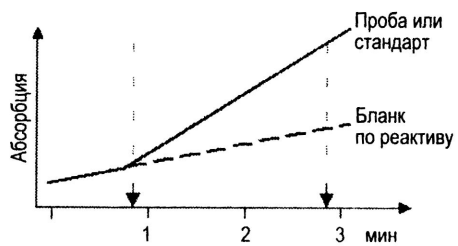
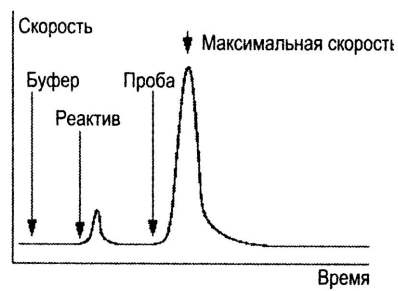
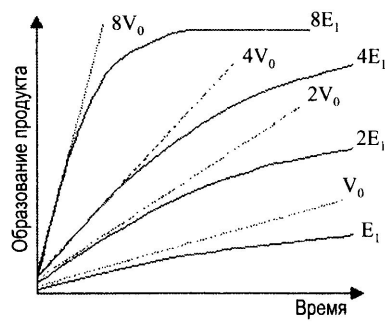


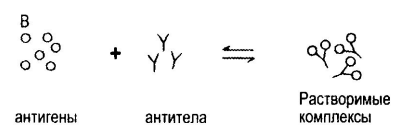
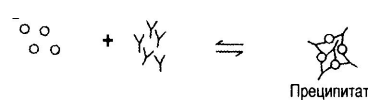
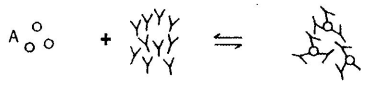
Таблица 11. Ранговые значения оптической плотности для оценки степени иктеричности, липимичности и гемолиза сыворотки крови

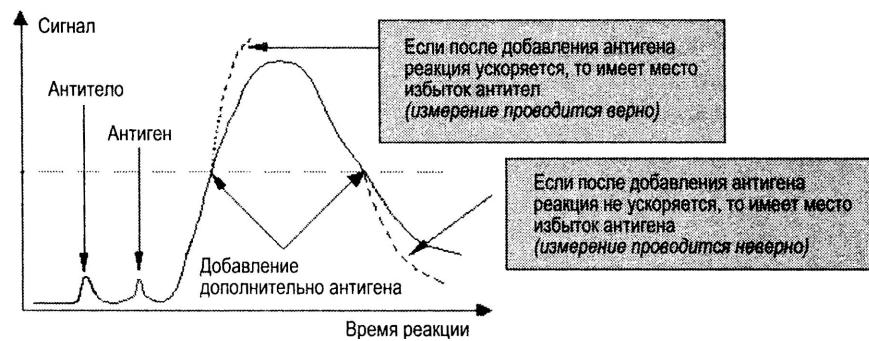
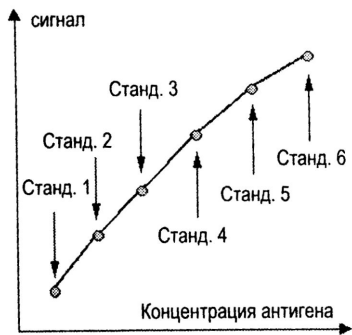
	Иктеричность (DD 460/500)	Гемолитичность (DD 576/597)	Липимичность (DD 597/750)
	< 0,040	< 0,002	< 0,006
	0,040–0,103	0,002–0,005	0,006–0,011
	0,104–0,204	0,006–0,009	0,012–0,020
	> 0,204	> 0,009	> 0,020

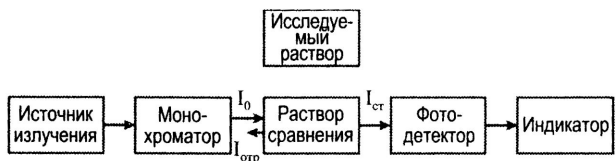




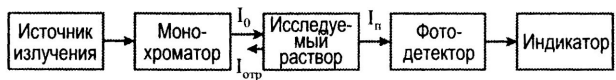
$$C_{\text{пробы}} = \frac{\Delta D_{\text{пробы}} - \Delta D_{\text{бланка}}}{\Delta D_{\text{стандарта}} - \Delta D_{\text{бланка}}} \times C_{\text{стандарта}}$$







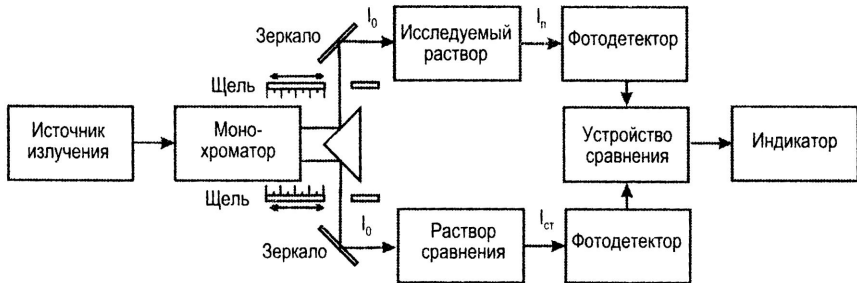
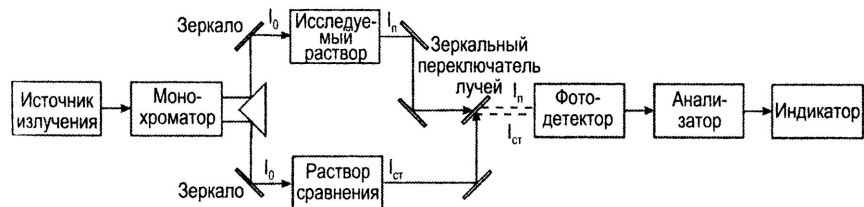
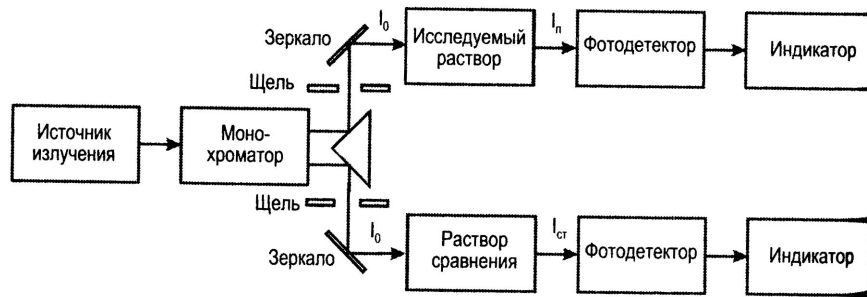
а)



б)

Исследуемый раствор

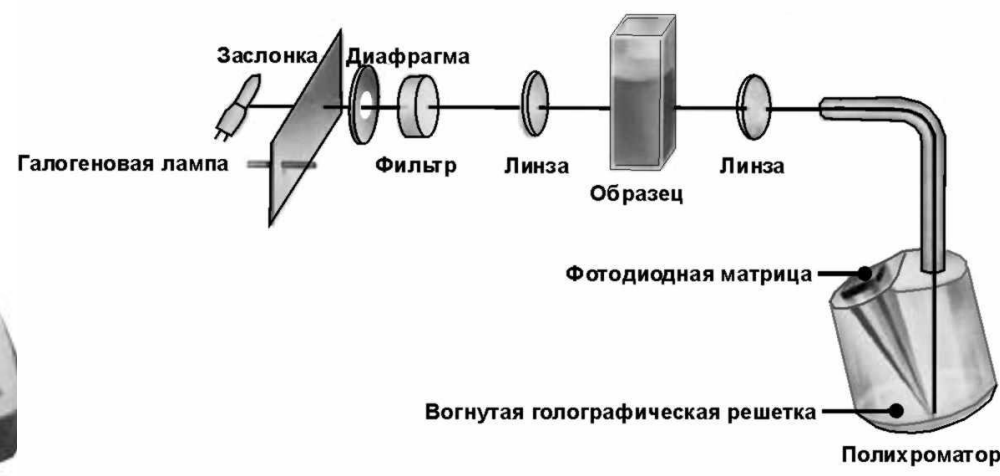
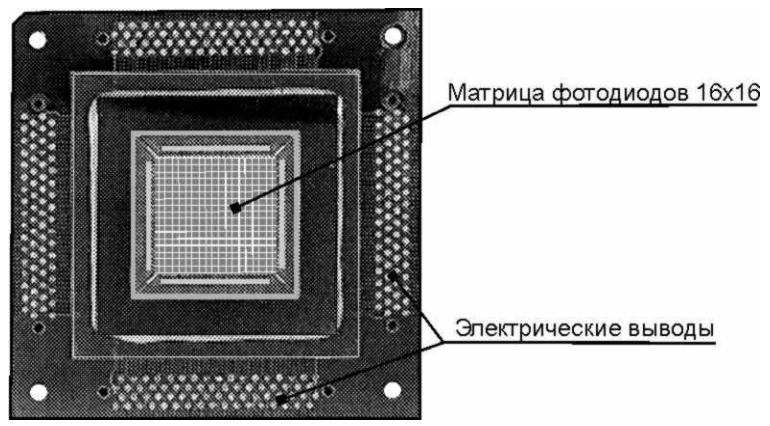
Раствор сравнения



КЛИНИЧЕСКИЙ СПЕКТРОФОТОМЕТР

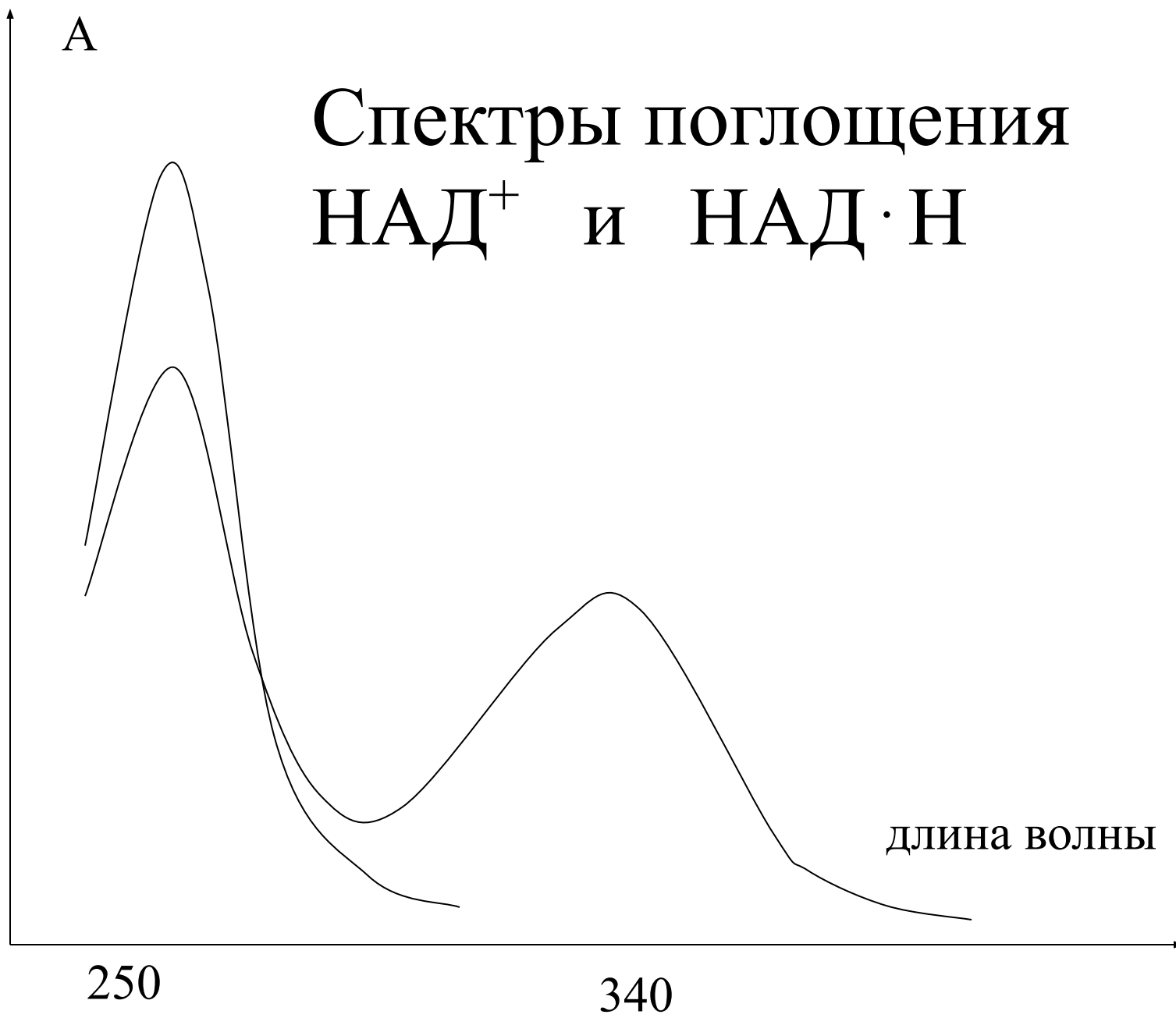


Спектрофотометр без монохроматора



Кормей-мульти – программируемый фотометр с проточной кюветой





Спектры поглощения NAD^+ и NADH

длина волны

250

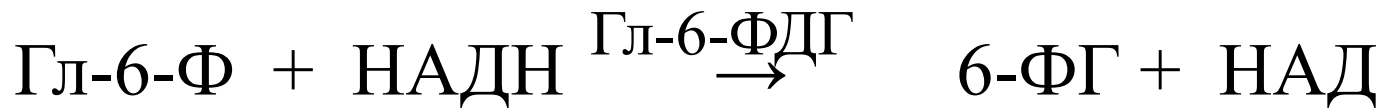
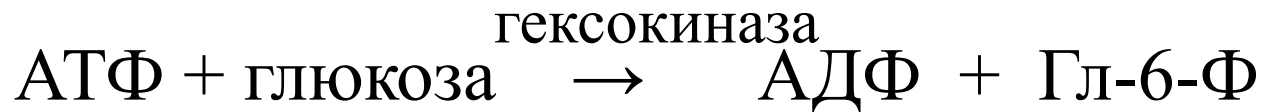
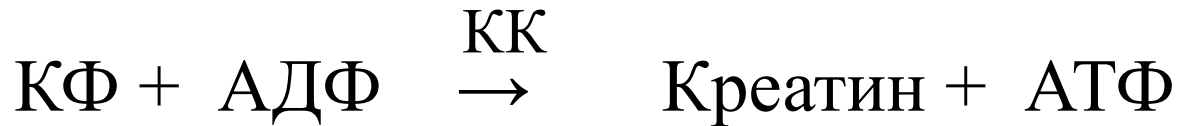
340

Сопряженные реакции

АЛТ

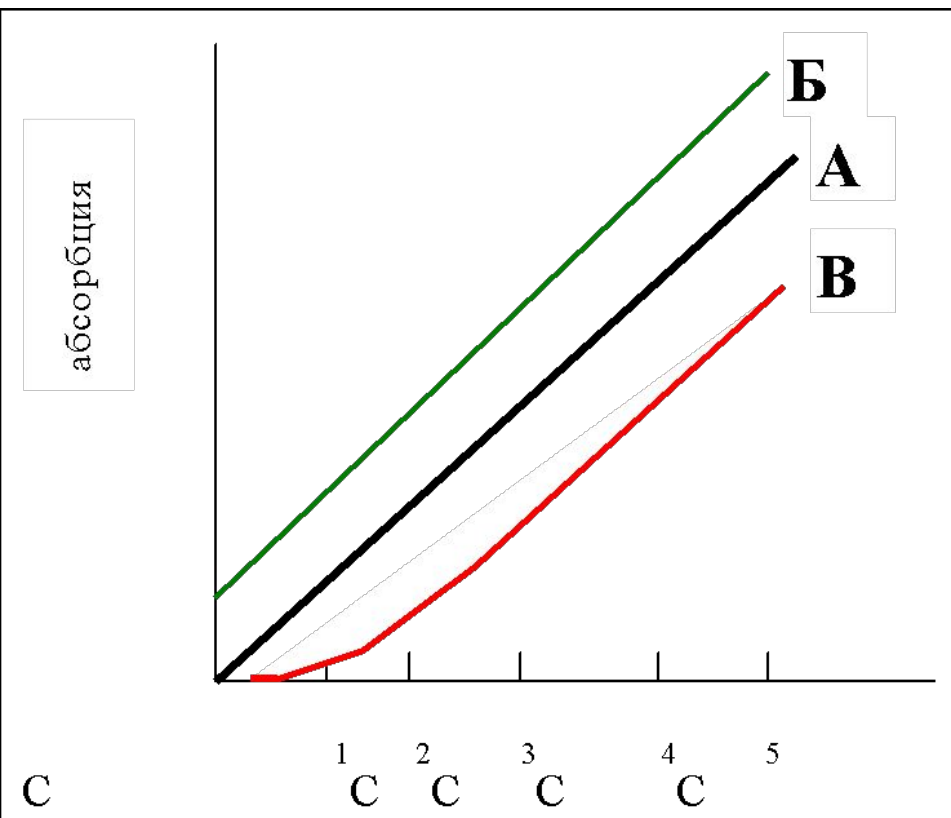


КК



Фотометрические методы анализа

ИЗМЕРЕНИЕ ПО КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ



Варианты при построении калибровочного графика при линейной зависимости экстинкции от концентрации исследуемого вещества:

А - закон Бугера-Ламберта-Бера, прямая выходит из нулевой точки, правильный вариант калибровочного графика
Б - имеет место влияние систематического фактора, желательно измерение по сравнению с холостой пробой, в которой бы этот фактор учитывался.

В - измерение неверное, низкие концентрации вещества не измеряются

Методы сравнения стандартного и опытного образца

- Анализируемая и стандартная проба обрабатываются в одинаковых условиях
- При больших сериях – стандартную пробу исследовать в начале серии и через каждые 20 проб
- Расчет ведут по стандарту или по фактору
- Расчет по стандарту: $C_i = D_i \times C_{ст}/D_{ст}$
- Расчет по фактору: $C = D \times F$

Методы определения без использования калибратора

- Фотометрические единицы (в случае отсутствия калибратора – средние молекулы, серомукоид) – оптическую плотность умножают на 100
- ($D = 0,3$, ответ – 30 единиц)

Методы определения без использования калибратора

- Определение концентрации по молярному показателю поглощения – применение закона Бургера

$C = D/lx\xi$ (концентрация определяется делением измеренной оптической плотности на известный для данного вещества молярный показатель поглощения при длине волны измерения: $C = D/\xi$)

Учитывать разведение образца

Спектральные характеристики хромогенов

Максимум поглощения в воде, $\lambda_{\text{макс}}$, нм	Молярный показатель поглощения, ϵ , (л/моль · см)	Субстрат	Хромоген	Применение в клинической химии
340	6220	НАД ⁺ , НАДФ ⁺	НАД·Н, НАДФ·Н	Оптический тест Варбурга
400	18300	p-нитро-фенил-фосфат	p-нитрофенол	Определение активности фосфомоноэстераз. При 400 нм поглощает субстрат, поэтому измерение проводят при 405 нм
420	21300	o-нитро-фенил- β -D-галактопиранозид	o-нитрофенол	Определение активности β -галактозидазы (лактазы), определение концентрации натрия энзиматическим методом
550	26600	фенолфталеин- β -D-глюкуро-нид	фенолфталеин	Определение активности β -глюкуронидазы
550			Комплекс Cu^{+2} с белком	Биуретовый метод определения белка
595			Комплекс белка с красителем Кумасси G250	Метод Брэдфорда определения белка в моче
600		тимолфталеинфосфат	тимолфталеин	Определение активности щелочной фосфатазы

Примеры:

- **Определение концентрации НАДН на основе определения оптической плотности**

Молярный показатель НАДН при 340 нм $6,22 \times 10^3$ л×моль⁻¹×см⁻¹. (ввести верхний символ). Измерена оптическая плотность в 1 см кювете – 0,38

Концентрация НАДН определяется по соотношению

$$C = \frac{D}{\epsilon l} = \frac{0,38}{6,22 \times 10^3 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \text{ см}^{-1} \times 1 \text{ см}} = \frac{0,38}{6,22 \times 10^3 \text{ л} \times \text{моль}^{-1}} = 6,11 \times 10^{-5} \text{ моль/л}$$

Определение содержания гемоглобина гемоглобинцианидным методом

Миллимолярный коэффициент при 540 нм = 11

Молекулярная масса гемоглобина – 64458, состоит из 4 съединицы

Эквивалентный вес Hb = 16114, т.е. 1 моль соответствует 16,114 Hb в крови

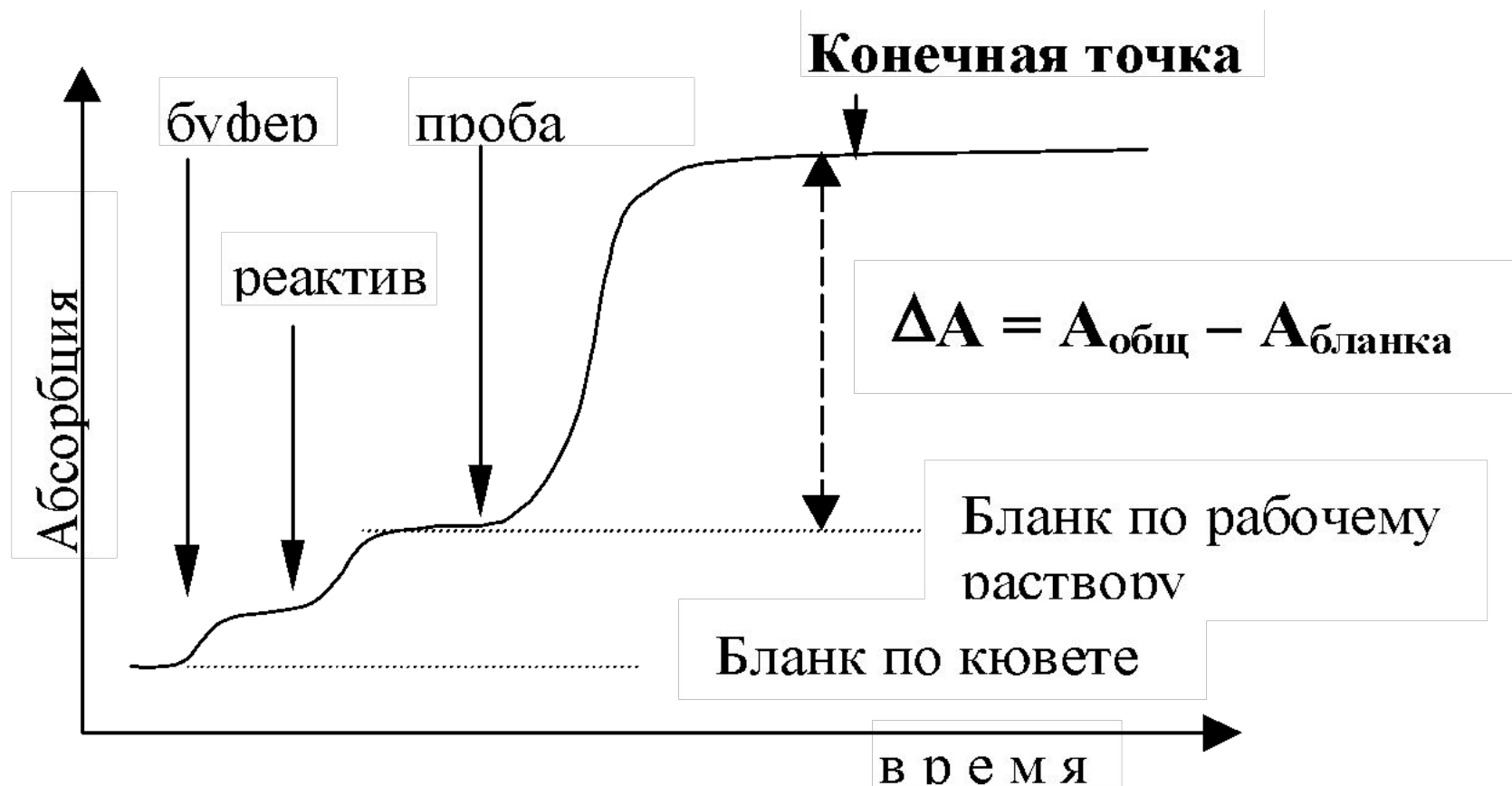
Кровь разводят трансформирующим раствором 1:251 (0,02 мл крови + 5,0 мл трансформирующего раствора)

$$\begin{aligned} \text{Hb в г/л} &= \\ &= \frac{\text{Оптическая плотность} \times \text{миллиэквивалентный вес} \times \text{разведение}}{\text{миллимолярный показатель поглощения} \times \text{толщина оптического слоя в см}} = \\ &= \frac{D \times 16,114 \times 251}{11,0 \times 1,0} = D \times 367,7 \end{aligned}$$

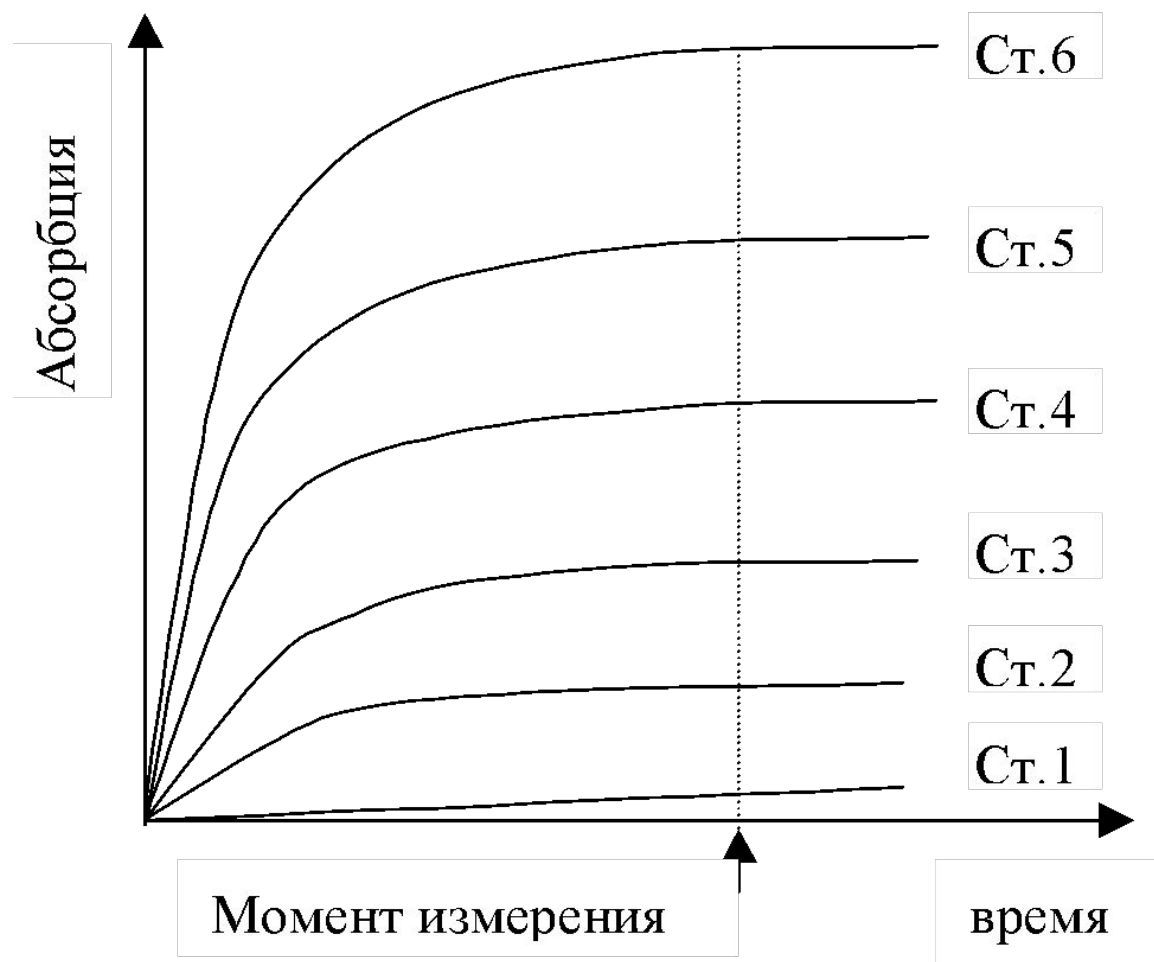
$$I_r = I_0 \cdot \frac{n_1^2 - n^2}{(n_1^2 + 2n^2)} \cdot \frac{NV^2}{\lambda^4 d^2} \cdot (1 + \cos^2 \beta),$$

$$\frac{I_r}{I_0} = k \cdot C$$

Измерение по конечной точке

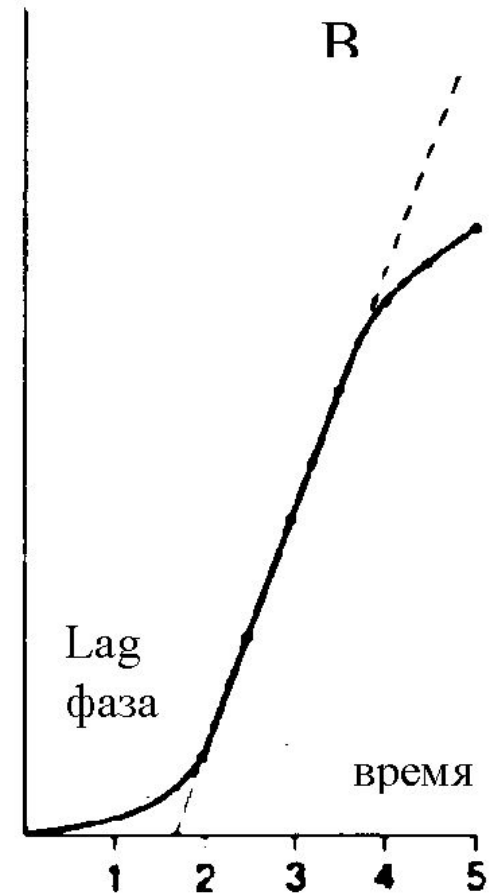
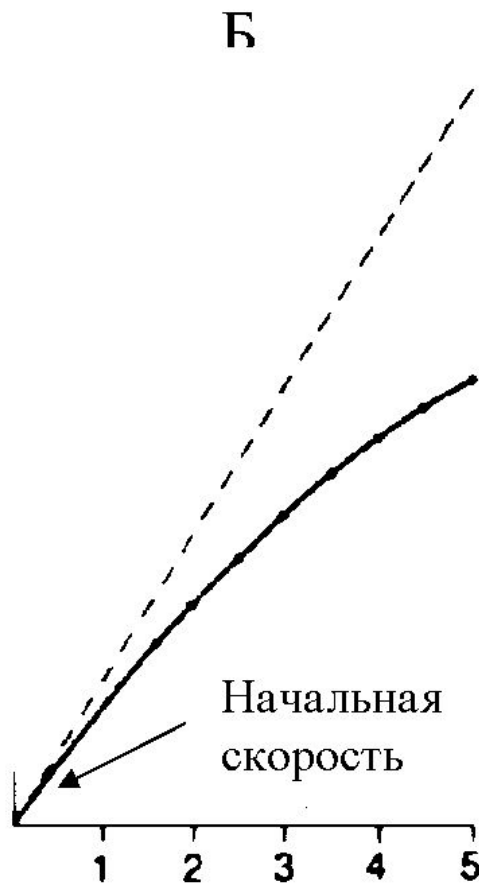
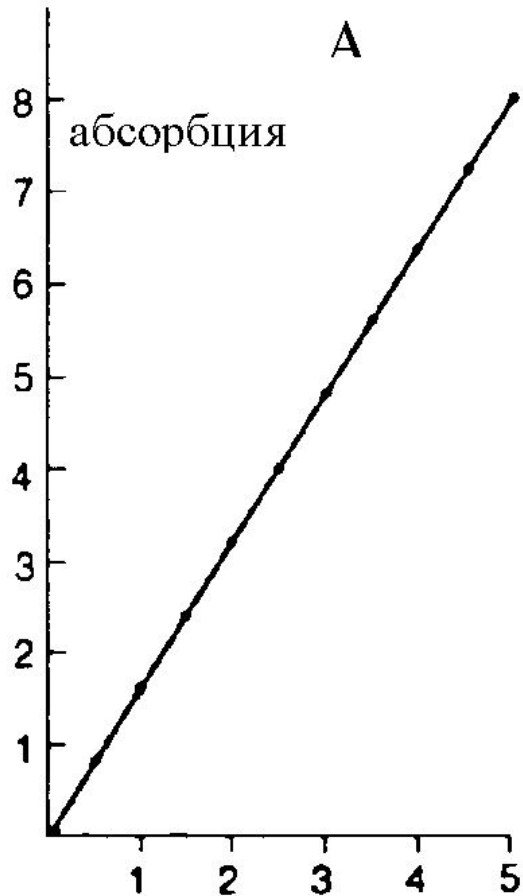


Точечное измерение. Сигнал развивается как функция времени для стандартов Исходная точка - нуль. Концентрация каждого стандарта измеряется 1 раз по конечной точке (по достижении стационарного уровня)



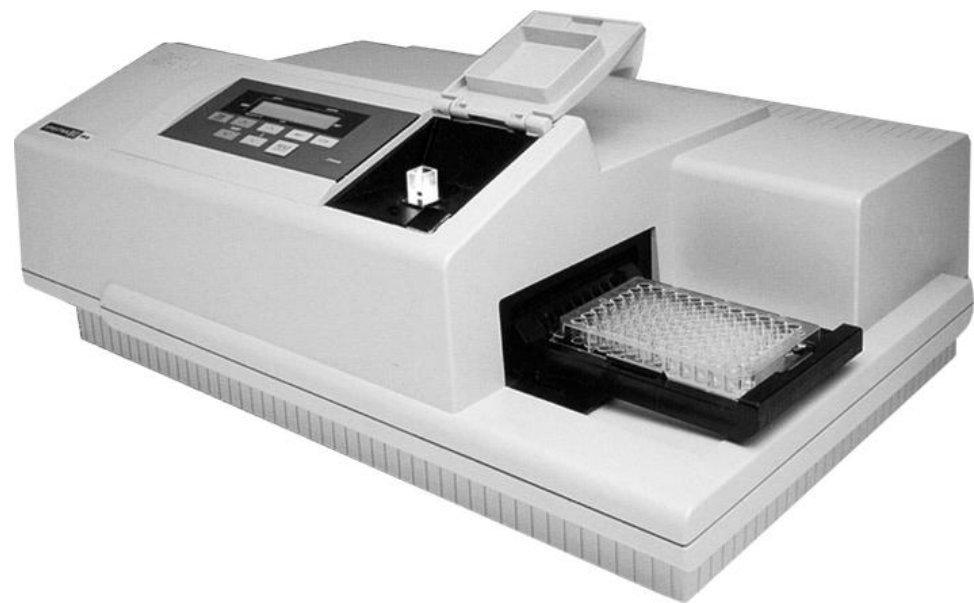
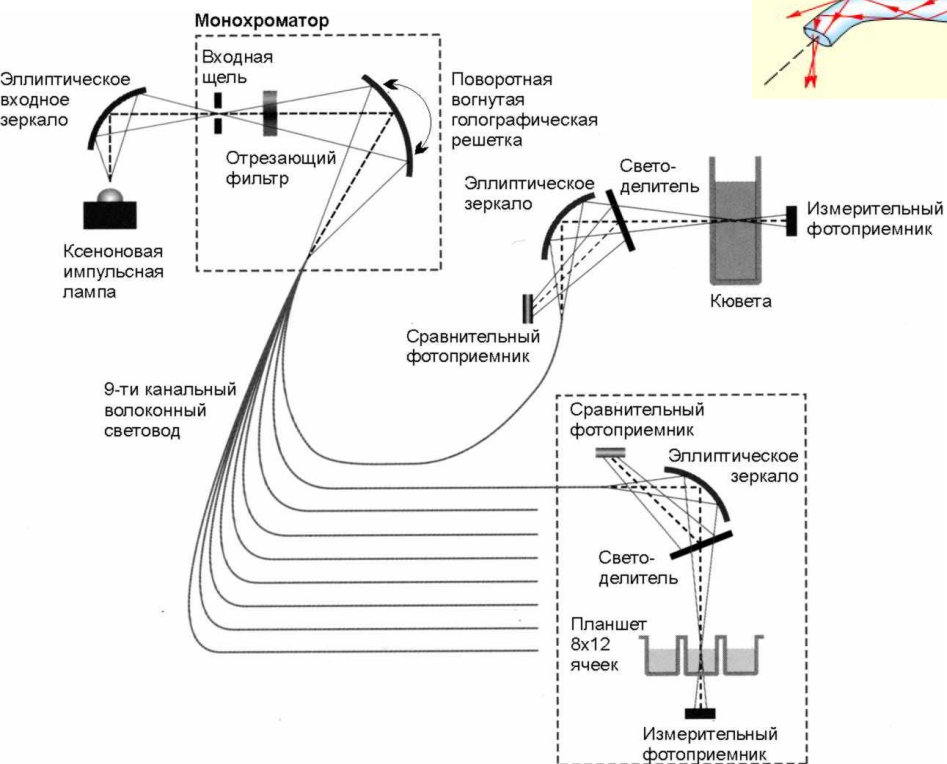
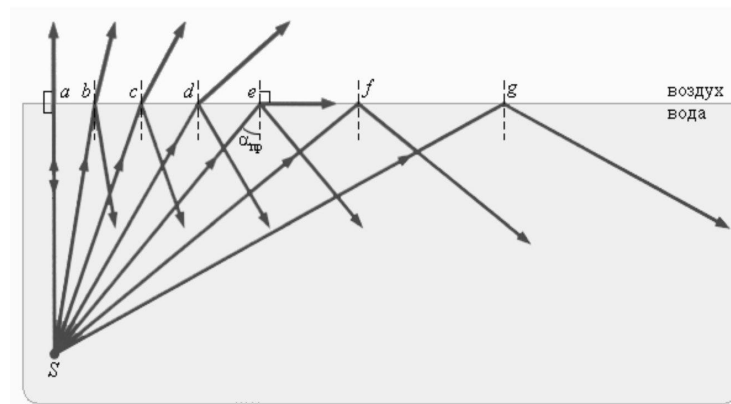
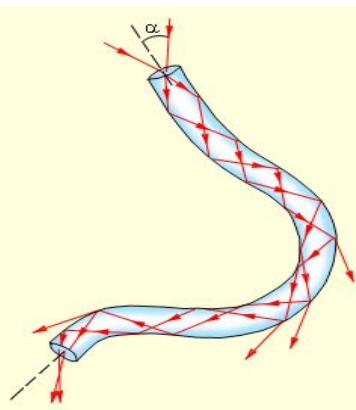
Измерение по кинетике

А - скорость постоянна, в любой период можно по скорости реакции оценивать активность фермента, Б - скорость реакции постоянно снижается, рекомендуется активность фермента оценивать по начальной скорости, В - линейный участок, на котором рекомендуется определять активность фермента, устанавливается в середине периода инкубации

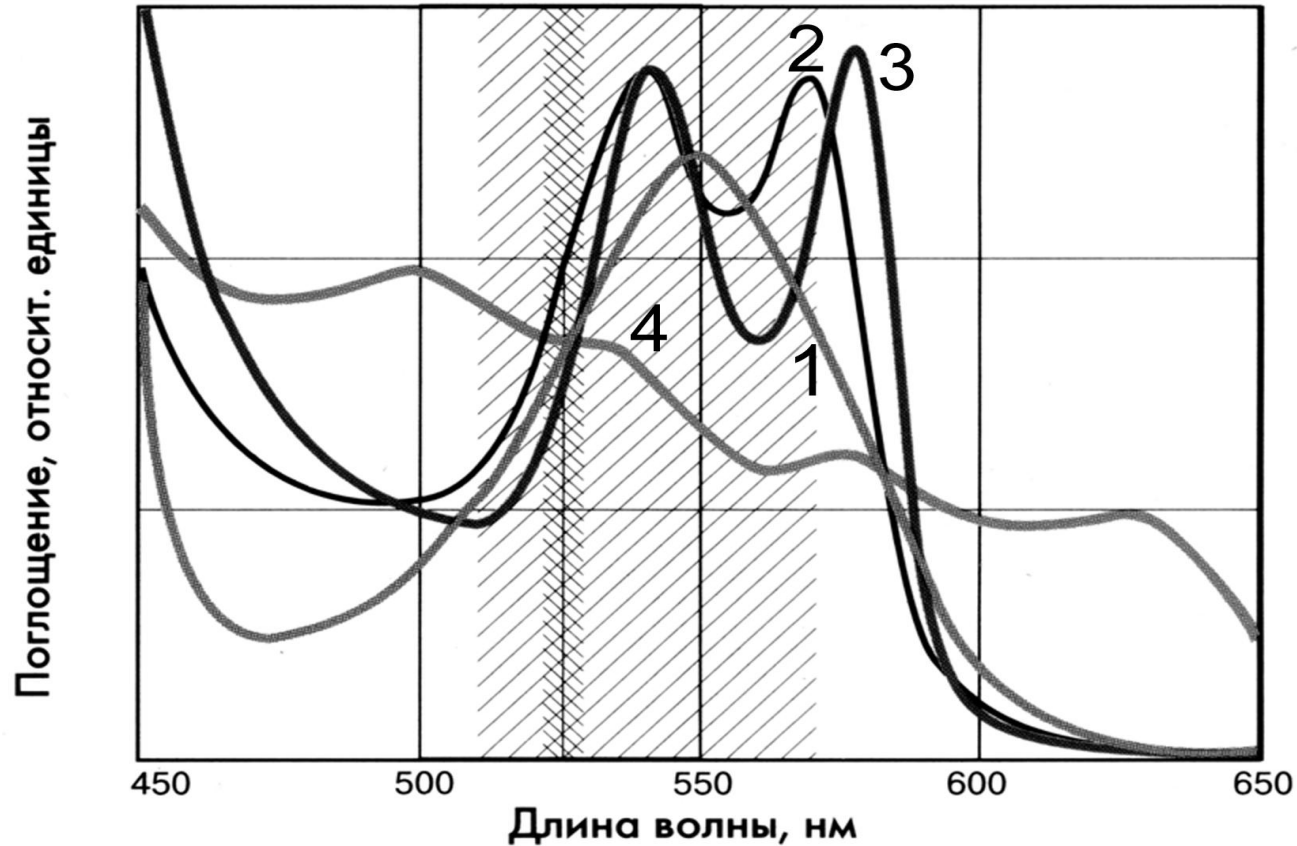


Кинетическое измерение требует обеспечения наряду с фотометрическим адекватным обеспечением, также точного поддержания температуры в измерительной кювете и правильного отсчета временных интервалов. Так, общепринятым считается поддержание температуры в измерительной ячейке в пределах $\pm 0,1$ °C

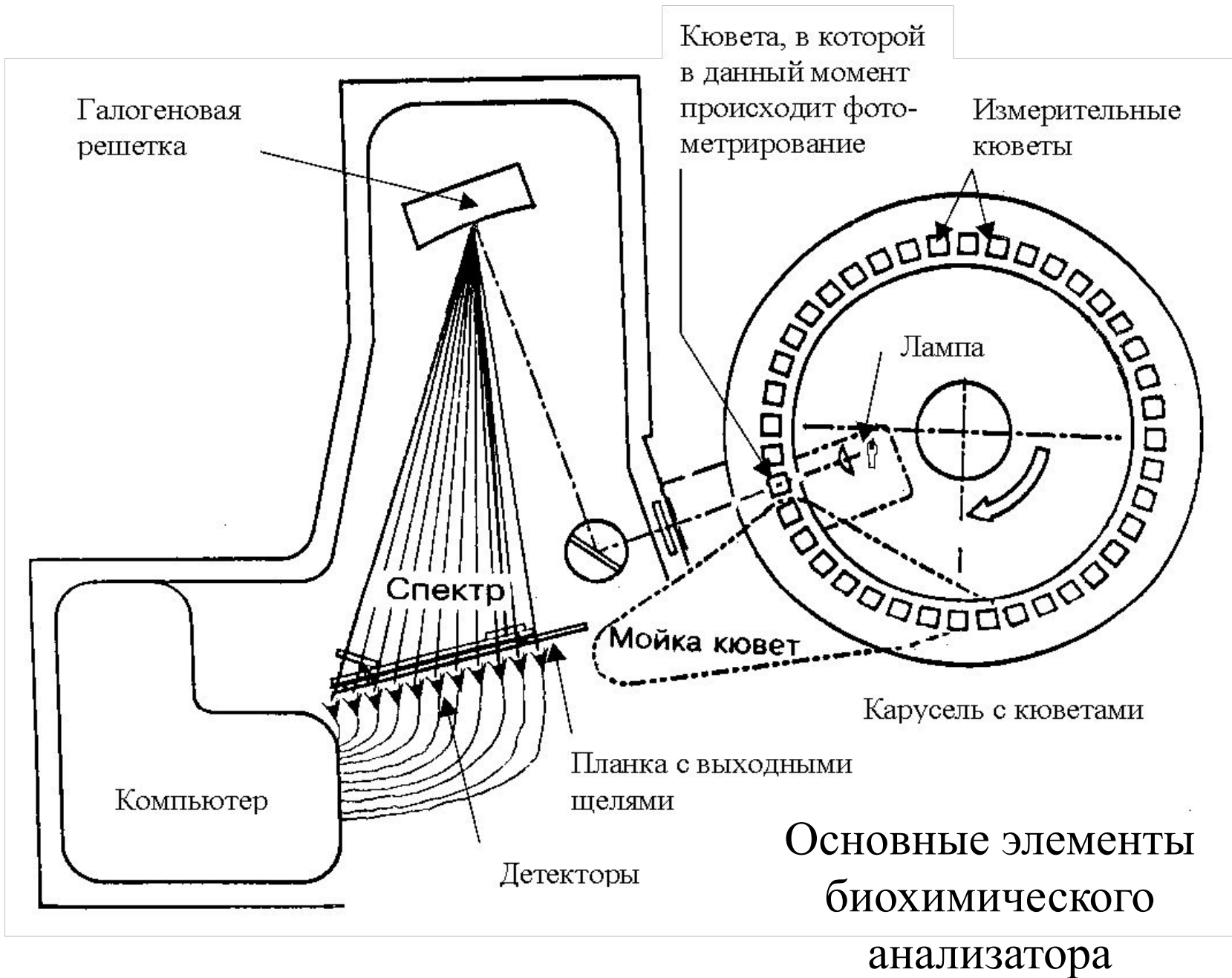
Волоконный световод минимизирует оптическую схему



Спектр поглощения производных гемоглобина



спектры поглощения производных гемоглобина: 1 – дезоксигемоглобина (HbH); 2 – карбоксигемоглобина (HbCO) 3 – оксигемоглобина (HbO_2); 4 – метгемоглобина (MetHb).



КДЛ амбулаторно- поликлинического звена

Состоявшееся решение - укрепить оснащенность ЛПУ оборудованием, в т.ч. лабораторным

- А) создан табель оснащения КДЛ
- Б) из Федерального Фонда выделены средства на закупку оборудования
- В) проведен тендер на закупку 4 комплектов (ЛОТов) лабораторного оборудования
- Г) на основании заявок с территорий составлен реестр распределения оборудования