

Optické analytické metody se zaměřením na spektrofotometrii

Představení kapitoly

Tato kapitola se věnuje optickým analytickým metodám, které jsou základními nástroji klinické biochemie. Jejich princip spočívá v interakci elektromagnetického záření se vzorkem a měření jeho absorpce, emise, fluorescence nebo rozptylu. Největší důraz je kladen na spektrofotometrii, která tvoří základ rutinní laboratorní diagnostiky.

Obsah

1	Optické metody: obecný přehled.....	1
2	Absorpce záření.....	3
2.1	Absorpční spektrum	4
2.2	Absorpční metody – spektrofotometrie	4
2.2.1	Spektrofotometr – složení	6
2.2.2	Využití spektrofotometrie v medicíně	7
3	Fluorescence.....	9
4	Emise	10
5	Rozptyl světla.....	11

1 Optické metody: obecný přehled

Optické analytické metody tvoří jednu z nejdůležitějších skupin instrumentálních technik v klinické biochemii. Jejich princip spočívá v interakci elektromagnetického záření (světla) s molekulami ve vzorku. Elektromagnetické záření se chová současně jako vlnění i jako proud fotonů. Vlnění je charakterizováno vlnovou délkou, ta se značí řeckým písmenem λ (lambda) a uvádí se v nanometrech. Vztah mezi energií fotonu a vlnovou délkou (nebo frekvencí) je následující:

$$E = h \times f = h \times \frac{c}{\lambda}$$

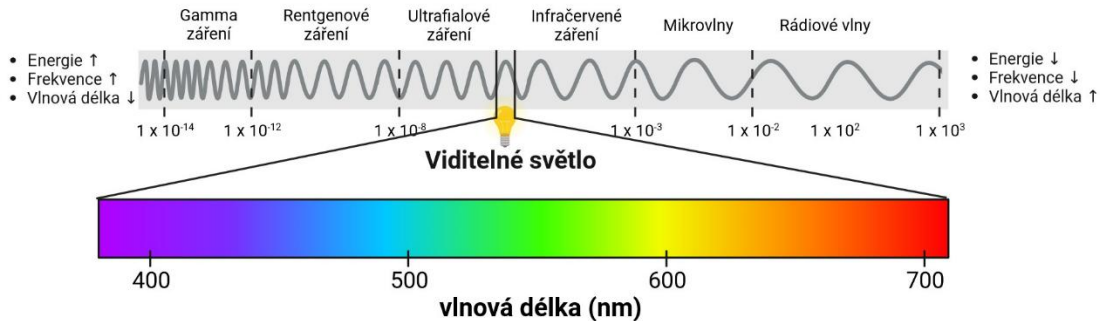
h....Planckova konstanta

c.....rychlost světla

f.....frekvence

Rovnice vlastně říká, že energie (E) fotonu roste s frekvencí elektromagnetického vlnění (f) – tedy s počtem kmitů, které vlna vykoná za sekundu. Protože vyšší frekvence znamená kratší vlnovou délku (λ), platí také, že čím kratší je vlnová délka, tím větší je energie fotonu.

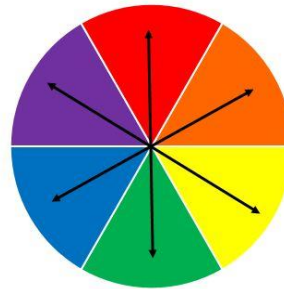
Světlo je viditelná část elektromagnetického záření. Vlnové délky viditelného světla (VIS) leží mezi vlnovými délkami ultrafialového záření (UV) a infračerveného záření, tedy v intervalu 390–760 nm.



Obr. č.1: Elektromagnetické záření

Látka může světlo buď emitovat (vyzařovat) nebo absorbovat (pohlcovat). Jestliže látka záření nějaké vlnové délky absorbuje, záření neabsorbované vlnové délky projde až k našemu oku. Pokud látka absorbuje veškeré dopadající/procházející záření, vnímáme ji jako černou. Pokud veškeré VIS světlo propouští, je vnímána jako bezbarvá. Pokud ovšem látka absorbuje jen záření některých vlnových délek ve VIS oblasti, je barevná. Absorbuje-li látka např. červenou barvu, vidíme ji jako zelenou (doplňková barva k červené je zelená, viz obrázek níže).

Barva	Vlnová délka
červená	~ 625 - 750 nm
oranžová	~ 590 - 625 nm
žlutá	~ 565 - 590 nm
zelená	~ 520 - 565 nm
azurová	~ 500 - 520 nm
modrá	~ 430 - 500 nm
fialová	~ 380 - 430 nm



Obr. č.2: Vlnové délky odpovídající barvám světla. Doplňkové barvy.



Zajímavost: Proč má krev červenou barvu? Oxyhemoglobin absorbuje zelené a modré světlo, a proto se nám jeví jako červený. Když se hemoglobin rozštěpí na bilirubin a biliverdin, barvy se mění → to vysvětluje postupné „zelenání“ a „žloutnutí“ modřin.

Základní měření interakcí elektromagnetického záření s hmotou se zakládá na tom, že část světla je pohlcena, část projde, část může být znovu vyzařena nebo odkloněna. Tyto děje lze popsat buď přímo definovanými veličinami (absorbance, transmittance), nebo měřením intenzity vznikajícího světla (emise, fluorescence, rozptyl).

- Absorbance – vyjadřuje, jak velká část světla byla ve vzorku pohlcena.
- Transmittance – vyjadřuje, jak velká část světla prošla vzorkem.
- Emise – sleduje se intenzita světla, které vzorek sám vyzařuje.
- Fluorescence – sleduje se intenzita světla, které vzorek vyzařuje po předchozím pohlcení záření.
- Rozptyl – sleduje se intenzita světla, které vzorek odchýlil od původního směru.

2 Absorpce záření

Při průchodu monochromatického světla barevným roztokem dochází k jeho absorpci: to znamená že intenzita záření, které opouští vzorek (I), je menší než intenzita záření, které do vzorku vstoupilo (I_0). Poměr těchto veličin vyjadřuje propustnost – **transmittance (T)**.

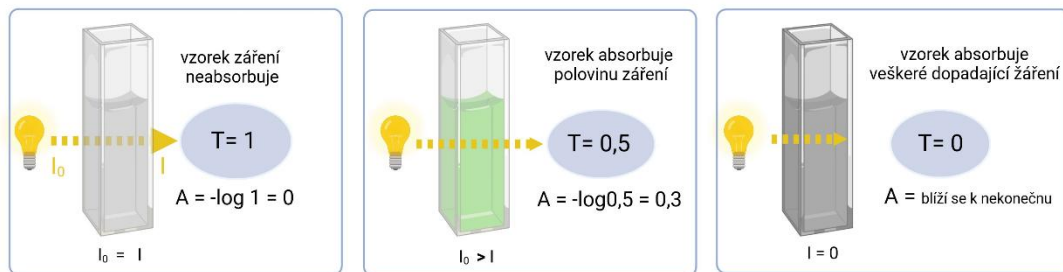
$$T = \frac{I}{I_0} \quad \begin{array}{l} I_0 \dots \text{dopadající záření} \\ I \dots \text{prošlé záření} \end{array}$$

Absorbance (A) je definována jako logaritmus převrácené hodnoty transmittance

$$A = -\log T = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I}$$

Transmittance udává relativní množství prošlého záření. Čím více vzorek záření absorbuje, tím je transmittance nižší. Hodnoty transmittance se pohybují v intervalu 0;1 tedy 0 až 100 %. Pro hodnoty absorbance platí, že čím více vzorek záření absorbuje, tím je absorbance vyšší.

Absorbance má tu přednost, že je přímo úměrná koncentraci stanovené látky, zatímco transmittance se mění nelineárně. Proto se v laboratorní praxi pro kvantitativní stanovení analytů využívá absorbance, nikoli transmittance.

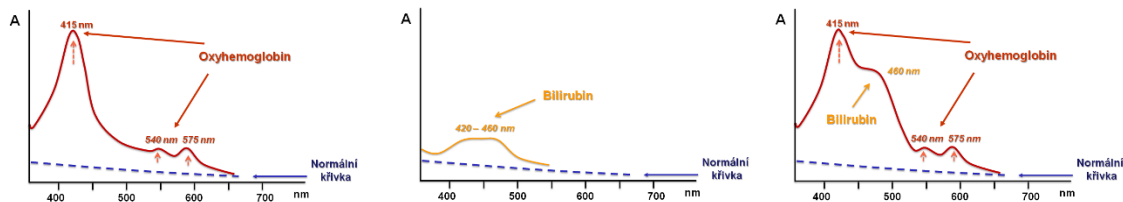


Obr. č. 3: Vztah mezi transmittancí a absorbancí

2.1 Absorpční spektrum

Každá absorbující látka má své charakteristické absorpční maximum (jedno nebo více). To lze zjistit proměřením absorbance při jednotlivých vlnových délkách. Získáme pak absorpční spektrum. Absorpční spektrum je graf popisující závislost absorbance na vlnové délce, kde na ose x je vynesena vlnová délka a na ose y je absorbance. Je-li v roztoku přítomno více absorbujících látek, zjištěná hodnota absorbance je součtem hodnot absorbancí jednotlivých složek ve směsi.

V lidském organismu nenajdeme příliš mnoho barevných látek, výjimku tvoří hemoglobin a jeho metabolity a také kožní pigment melanin. Hemoglobin je tvořen z hemu (tetrapyrrol s navázaným Fe^{2+}) a bílkoviny globinu. Oxygenovaný hemoglobin se nazývá oxyhemoglobin. Bilirubin vzniká degradací uvolněného hemoglobinu při rozpadu erytrocytů. V klinické praxi se například stanovuje bilirubin přímou spektrofotometrií u novorozenců při podezření na novorozeneckou žloutenku.



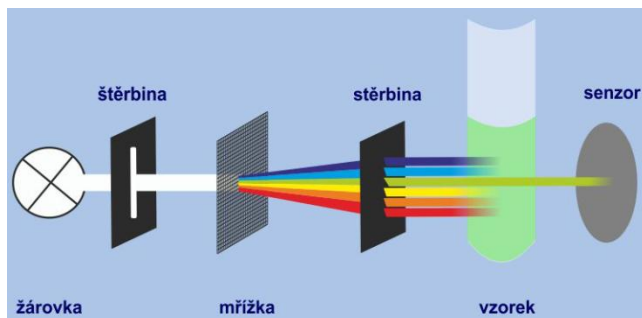
Obr. č. 4: Absorpční spektra oxyhemoglobinu (vlevo) a bilirubinu (střed); vpravo jejich směs s viditelným překryvem v oblasti 415–460 nm. Tento princip využívá spektrofotometrie likvoru k odlišení čerstvého krvácení (hemoglobin) od staršího (bilirubin) při diagnostice subarachnoidálního krvácení.

2.2 Absorpční metody – spektrofotometrie

Absorpční metody vycházejí z principu pohlcování světla o určité vlnové délce molekulami ve vzorku. Světelný paprsek prochází kyvetou, a detektor zaznamenává rozdíl intenzity před a po průchodu. Výsledkem je hodnota absorbance, která je přímo úměrná koncentraci látky podle Lambert-Beerova zákona. Měřit lze prakticky všechny biologické kapaliny, například sérum, plazmu, moč nebo mozkomíšní mok. Uplatnění v medicíně je velmi široké – od měření koncentrace glukózy, lipidů a bilirubinu po stanovení aktivity enzymů, a tvoří tak základ rutinní klinické biochemie. Měřicí přístroje se nazývají **spektrofotometry** a v moderních laboratořích jsou již často integrované do automatizovaných biochemických analyzátorů.

Princip měření:

Spektrofotometr se skládá ze zdroje světla, monochromátoru a detektoru. Monochromátor je zodpovědný za propouštění světla o konkrétní vlnové délce. Z výstupní štěrbině vychází monochromatické světlo (definované vlnové délky), kterou lze na přístroji nastavit. Světlo následně projde vzorkem v kyvetě. Intenzita prošlého světla je měřena detektorem. Nejprve se změří intenzita světla procházejícího slepým vzorkem (blankem, referenčním vzorkem), tj. roztokem obsahujícím všechny složky vyjma stanovované barevné látky. Když světlo prochází vzorkem, jeho intenzita se snižuje v důsledku absorpce částicemi v roztoku. Spektrofotometr měří rozdíl mezi intenzitou dopadajícího světla (I_0) a intenzitou světla, které prošlo vzorkem (I).



(zdroj: <https://anl.zshk.cz/vyuka/fotometricke-metody.aspx>)

Lambertův-Beerův zákon

Mezi koncentrací látky v roztoku a jeho absorbancí roztoku existuje lineární vztah, tedy více koncentrovaný roztok absorbuje více záření. To nám umožňuje vypočítat koncentraci látky v roztoku měřením jeho absorpce. Absorbance je také přímo úměrná optické dráze (l) a vlastnostem absorbující látky (ϵ_λ). Platnost zákona je omezena na zředěné roztoky (v silně koncentrovaných roztocích vztah nebude lineární).

Vztah mezi absorbancí a koncentrací je dán rovnicí:

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot l$$

- **A** ... absorbance (bezrozměrná veličina)
- **ϵ** ... molární absorpční koeficient ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), charakteristický pro látku a vlnovou délku
- **c** ... koncentrace ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
- **l** ... délka optické dráhy (cm, obvykle 1 cm kyveta)

Platnost zákona je omezená na **zředěné roztoky**. Ve vysokých koncentracích dochází k odchylkám (nelinearita).



Zajímavost: Barva červeného vína je přímo závislá na koncentraci anthokyaninů a dalších barviv přítomných ve slupkách hroznů. Čím více těchto látek se během kvašení a macerace vyluhuje, tím intenzivnější barvu víno má. Jde o ukázkový příklad „přirodního“ Lambert–Beerova zákona – vyšší koncentrace → vyšší absorbance → sytější barva.

Platnost a limity zákona

Lambertův-Beerův zákon neplatí vždy – odchylky mohou vznikat:

- při **příliš vysokých koncentracích** (interakce molekul, rozptyl světla),
- při **nevhodné kyvetě** (poškrábané, zakalené sklo),
- při **nesprávné vlnové délce** (mimo absorpční maximum),
- při **chemických změnách analyzované látky** během měření (např. oxidace $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$).

Lineární oblast Lambert–Beerova zákona – vztah mezi koncentrací látky a absorbancí platí jen v určitém rozmezí.

– při **nižší absorbanci** ($<0,1$) je rozdíl mezi I_0 a I velmi malý → měření je nepřesné a snadno ovlivnitelné šumem přístroje.

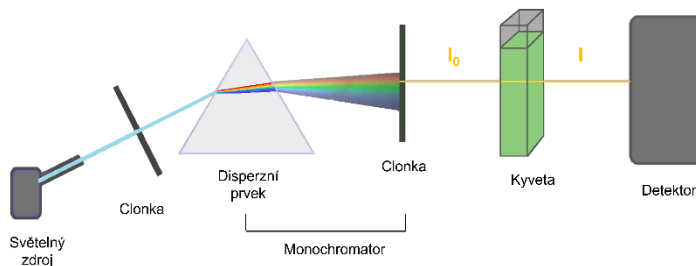
– při **vyšší absorbanci** ($>1,0$) už téměř žádné světlo neprochází → detektor zachytí jen minimální intenzitu, vznikají chyby a odchylky od linearity.



Otázka: Jaký je vztah mezi absorbancí a koncentrací podle Lambert-Beerova zákona? Proč by se měla absorbance při měření pohybovat v intervalu **0,1–1,0**?

2.2.1 Spektrofotometr – složení

Spektrofotometr je přístroj, který měří množství světla absorbovaného roztokem. Skládá se z několika klíčových komponent, z nichž každá plní specifickou funkci.



Obr. č. 5: Schéma spektrofotometru.



(zdroj:
<https://lcms.cz/products/1311>)

Hlavní části spektrofotometru:

1. Zdroj světla:

- Pro oblast viditelného spektra (VIS, 400–700 nm) se používá wolframová lampa.
- Pro ultrafialové spektrum (UV, 200–400 nm) je nutná deuterová výbojka.
- Kvalitní spektrofotometry kombinují oba zdroje pro širší rozsah měření.

2. Monochromátor:

- Zařízení, které vybere z bílého světla pouze jednu vlnovou délku.
- Používají se filtry, hranoly nebo difrakční mřížky.
- Umožňuje specifické měření absorbance při požadované λ .

3. Kyveta:

- Malá nádobka ze skla nebo plastu, která obsahuje měřený vzorek.
- Standardní délka kyvety je 1 cm.
- Důležité je zajistit její čistotu a správné zasazení do dráhy paprsku.

4. Detektor:

- Fotodioda nebo fotonásobič, který měří intenzitu světla po průchodu vzorkem.
- Signál je převeden na elektrický impuls a dále zpracován.

5. Výstupní jednotka:

- Zobrazovací panel, tiskárna nebo digitální přenos do laboratorního systému.
- Zobrazuje absorbanci, transmitanci nebo vypočtenou koncentraci.



Otázka: Která část spektrofotometru je zodpovědná za volbu konkrétní vlnové délky?

2.2.2 Využití spektrofotometrie v medicíně

Spektrofotometrie má široké použití v klinických laboratořích. Umožňuje rychlé, reprodukovatelné a většinou jednoduché stanovení látek, které samy vykazují absorpci v UV/VIS oblasti, nebo je možné je kvantitativně chemickou reakcí na absorbující převést. Měření se provádí při vlnové délce, při které roztok maximálně absorbuje (absorpční maximum). To je jednoznačnou, na koncentraci nezávislou charakteristikou barevné látky. Při VIS spektrofotometrii absorpční maximum odpovídá barvě komplementární k barvě roztoku. Pomocí spektrofotometrie můžeme stanovit přirozeně absorbující látky přímo (např. analýza absorpčních maxim hemoglobinu a bilirubinu pro určení přítomnosti a stáří krvácení). Nepřímé stanovení látek, které samy nejsou barevné, je možné. Je třeba je chemickou reakcí převést na barevné produkty. Stanovujeme je tedy pomocí tzv. indikačních reakcí.

Spektrofotometrie umožňuje **měření koncentrace biomolekul, sledování enzymových aktivit i detekci protilátek v rámci imunodiagnostiky**. Výhodou je rychlost, přesnost a možnost automatizace.

Stanovení koncentrací biomolekul (vybrané analýzy):

Tyto látky patří mezi základní ukazatele metabolismu a jejich koncentrace se v laboratoři sledují velmi často.

- **Glukóza (cukr v krvi):** měří se pomocí enzymů, které glukózu přemění na barevný produkt. Intenzita barvy pak odpovídá množství glukózy. Hodnotí se především u pacientů s podezřením na **diabetes mellitus**.
- **Cholesterol:** stanovuje se podobně enzymaticky. Výsledná barva ukáže, kolik cholesterolu je ve vzorku, např. v krvi. Důležité pro sledování rizika **aterosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění**.
- **Močovina:** měří se pomocí enzymu ureázy, který močovinu rozkládá a vzniklý produkt se dá opět převést na barevnou reakci. Významné při posuzování funkce **ledvin**.

K měření **bílkovin** v séru se používají barevné (kolorimetrické) reakce:

- **Biuretová metoda:** měďnaté ionty reagují s peptidovými vazbami bílkovin a vznikne **modrofialová barva**. Je to jednoduchá a spolehlivá metoda, běžně používaná v laboratoři.

Enzymatické aktivity:

V laboratoři se často sleduje aktivita enzymů v krvi – jejich zvýšená hladina ukazuje na poškození určité tkáně.

- **ALT (alaninaminotransferáza) a AST (aspartátaminotransferáza):** zvýšení signalizuje poškození jaterních buněk (např. při hepatitidě).
- **GGT (gamaglutamyltransferáza):** zvyšuje se hlavně při onemocněních jater a žlučových cest, často také při abúzu alkoholu.
- **ALP (alkalická fosfatáza):** bývá zvýšená při cholestáze (stáze žluči) nebo při kostních onemocněních (např. Pagetova choroba, nádory kostí).

Princip měření spočívá v tom, že se ke vzorku přidá vhodný substrát a enzym z krve katalyzuje jeho přeměnu. Při reakci buď vzniká, nebo mizí barevná látka (nebo látka absorbující UV světlo). Spektrofotometr průběžně sleduje **změnu absorbance v čase** a rychlost této změny odpovídá aktivitě enzymu. Výsledek se pak vyjadřuje v jednotkách U/l (jednotka enzymové aktivity = množství enzymu, které přemění 1 μ mol substrátu za minutu).



Otázka: Můžeme se setkat se situací, kdy se nestanovuje přímo dotyčná látka (enzym, molekula), ale například koenzym jako je NADH. Dokázali byste vysvětlit princip stanovení a proč je vlnová délka 340 nm specifická pro měření enzymových reakcí využívajících NADH?

Imunoanalytické metody:

Mezi často využívané imunoanalytické metody patří **ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**. Je to metoda, při které se využívá vazba antigen–protilátka. Na tuto vazbu je navázán enzym, který po přidání substrátu vyvolá barevnou reakci. Spektrofotometr pak změří intenzitu zbarvení, která je přímo úměrná množství sledované látky ve vzorku – například hormonu, viru nebo protilátce.

3 Fluorescence

Fluorescence je fyzikální jev, při němž molekula absorbuje světlo o kratší vlnové délce (např. ultrafialové) a následně vyžádí světlo o delší vlnové délce v oblasti viditelného spektra. Molekuly schopné tohoto děje označujeme jako **fluorofory**. Samotný proces je velmi rychlý – probíhá v řádu nanosekund.

Princip fluorescenčních metod spočívá v **excitaci vzorku světelným zdrojem** (UV lampa, laser) a následné **detekci emitovaného záření**, jehož intenzita je úměrná koncentraci fluorescenční látky. Fluorescenci mohou vykazovat přirozené biomolekuly (např. porfyriny, flaviny) nebo látky, které jsou speciálně označeny fluorofory.

Fluorescenční metody umožňují analýzu široké škály biologických vzorků – od **tekutin** (např. krevní sérum), přes **buněčné suspenze**, až po **tkáňové řezy**. K měření a vizualizaci fluorescenčních signálů se používají různé přístroje:

- **Fluorimetry** – určují intenzitu, spektrum a dobu fluorescence,
- **Fluorescenční mikroskopy** – zobrazují lokalizaci fluoroforů v buňkách a tkáních,
- **Průtokové cytometry** – měří fluorescenci jednotlivých buněk procházejících laserem, hojně využívané v hematologii a imunologii.

Významnou aplikací je **imunofluorescence**, kde fluorofory značené protilátce vážou specifický antigen, což umožňuje jeho velmi citlivou a specifickou detekci. Fluorescenční značení se ale využívá i mimo oblast proteinů, například k detekci **nukleových kyselin** – typicky ve fluorescenční in situ hybridizaci (FISH) nebo v real-time PCR s fluorescenční detekcí.

Díky své vysoké **citlivosti a specifitě** má fluorescence v medicíně široké uplatnění – od detekce hormonů, vitaminů a nádorových markerů, až po detailní sledování buněk a jejich struktur v diagnostice i výzkumu.



Poznámka: Je vhodné odlišit fluorescenci od fosforescence – zatímco fluorescence probíhá během nanosekund, fosforescence je jev pomalejší, trvající až sekundy či minuty.



Zajímavost: Tonik obsahuje chinin, který pod UV lampou modře fluoreskuje. To je důvod, proč tonik na diskotékách „svítí“. Zubní pasty nebo bílé oblečení často obsahují optické zjasňovače, které fluoreskují v modré oblasti – díky tomu vypadají bělejší.

4 Emise

Emise je jev, při němž atomy nebo molekuly po dodání energie (např. plamenem, elektrickým výbojem či plazmatem) přecházejí do excitovaného stavu. Při návratu do základního stavu uvolňují energii ve formě světelného záření. Každý prvek vyzařuje světlo o charakteristických vlnových délkách, čímž vzniká **emisní spektrum**, které je pro něj typické. Díky tomu lze získat jak **kvalitativní informaci** (jaký prvek je přítomen), tak **kvantitativní informaci** (v jaké koncentraci). Intenzita vyzařovaného světla je totiž přímo úměrná množství daného prvku ve vzorku.

Pro měření se používají **plamenné fotometry** nebo **emisní spektrometry**, v moderní praxi často s využitím plazmového zdroje (**ICP – indukčně vázané plazma**). Vzorky bývají kapalné, typicky **krevní sérum nebo moč**.

V klinické biochemii mají emisní metody význam zejména při stanovení koncentrací **elektrolytů** – sodíku, draslíku, vápníku a hořčíku. Tyto prvky jsou nezbytné pro správnou funkci organismu: podílejí se na udržování **vodní a iontové rovnováhy**, na **činnosti nervového a svalového systému** i na **regulaci srdeční činnosti**. Vyšetření elektrolytů je proto zásadní pro diagnostiku a monitorování **onemocnění ledvin, srdečních chorob i metabolických poruch**.



Zajímavost: Každý prvek má charakteristické emisní spektrum. Využívají se k identifikaci hvězd: složení hvězdné atmosféry se zjišťuje analýzou jejich světla. Princip je stejný jako u plamenné fotometrie v laboratoři. Známy je i barevný ohňostroj: červená barva (Sr), zelená (Ba), modrá (Cu).

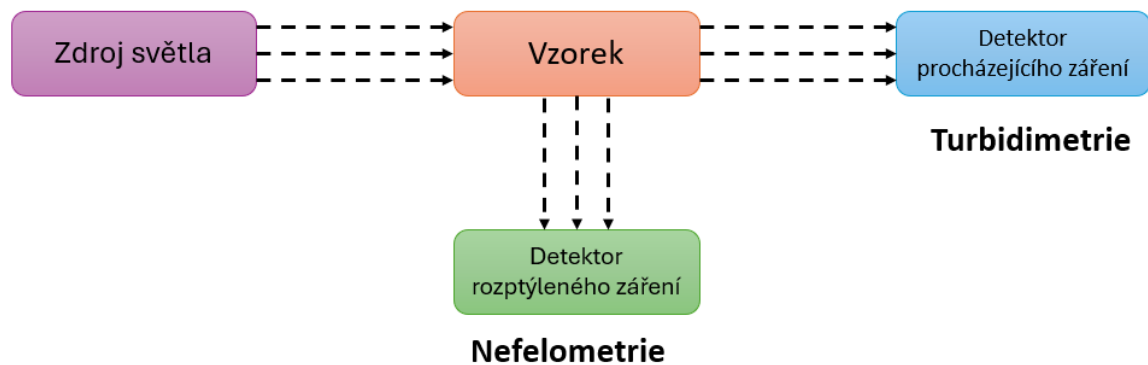
5 Rozptyl světla

Rozptyl světla nastává tehdy, když světelný paprsek narazí na částice přítomné v roztoku a změní svůj směr. Na tomto principu jsou založeny dvě příbuzné metody – **turbidimetrie** a **nefelometrie**.

- **Turbidimetrie** měří pokles intenzity světelného paprsku, který prošel vzorkem.
- **Nefelometrie** sleduje intenzitu světla rozptýleného do stran pod určitým úhlem.

Obě metody umožňují stanovit koncentraci nerozpuštěných částic nebo makromolekul. Jako vzorky se nejčastěji používají **sérum, plazma a moč**, protože obsahují proteiny, imunokomplexy nebo buněčné elementy.

V klinické praxi se metody rozptylu světla využívají například ke stanovení koncentrace **bílkovin** (imunoglobuliny, fibrinogen, C-reaktivní protein) nebo k **hodnocení zákalu moči** při infekcích močových cest. K měření slouží turbidimetry, nefelometry nebo spektrofotometry vybavené postranními detektory.



Obr. č. 5: Schéma umístění detektoru u metod založených na rozptylu světla.



Otázka: Který typ optické metody by byl nejvhodnější pro měření zakalení moči u podezření na infekci močových cest?

Shrnutí

Optické metody jsou rychlé, citlivé a nepostradatelné v klinické biochemii. Základní měřitelné jevy zahrnují absorpci, transmitanci, fluorescenci, emisi a rozptyl světla. Nejvýznamnější metodou je UV/VIS spektrofotometrie, založená na Lambert-Beerově zákonu, která umožňuje měřit koncentraci látek i stanovovat enzymové aktivity. V praxi se rutinně využívá ke stanovení glukózy, lipidů, bilirubinu, hemoglobinu, enzymů či nukleových kyselin. Správná interpretace výsledků vyžaduje znalost možných interferencí – například vlivu hemolýzy, ikteru nebo lipémie. Moderní laboratorní systémy umožňují plnou automatizaci těchto měření, což zajišťuje vysokou přesnost a reprodukovatelnost.

Kontrolní otázky

1. Jaký je rozdíl mezi absorbancí a transmitancí?
2. Jak zní Lambert-Beerův zákon a jaké veličiny zahrnuje?
3. Jak se liší turbidimetrie a nefelometrie?
4. Uvedte příklad přímého a nepřímého stanovení látky pomocí spektrofotometrie.
5. Jaké jsou nejčastější interference při spektrofotometrickém měření v klinické biochemii?
6. Jaký je význam slepého vzorku (blanku) při spektrofotometrii?