

POLITECHNIKA ŁÓDZKA



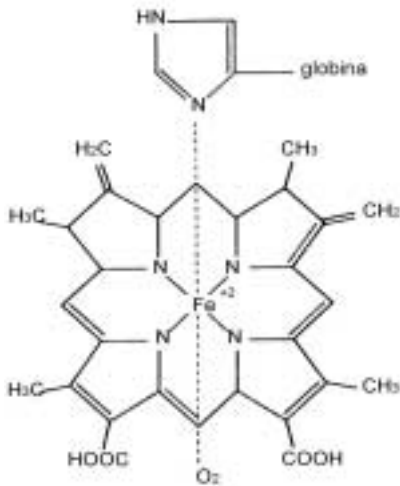
**INSTRUKCJA Z LABORATORIUM W
ZAKŁADZIE BIOFIZYKI**

Ćwiczenie 8

**SPEKTROFOTOMETRYCZNA ANALIZA
LUDZKIEJ HEMOGLOBINY**

I. WSTĘP TEORETYCZNY

Hemoglobina (Hb) jest białkiem złożonym z grupy prostetycznej zwanej hemem (złączonej z atomem dwuwartościowego żelaza) i białka prostego - globiny.



Na cząsteczkę hemoglobiny przypadają cztery grupy hemu (każda z nich może przyłączyć cząsteczkę tlenu) i cztery globiny (składającej się z czterech łańcuchów: dwóch alfa i dwóch beta). W kapilarach płuc hemoglobina wiąże tlen tworząc **oksyhemoglobinę (HbO₂)** (krew tętnicza, utlenowana), przy czym cząsteczka O₂ jest odwracalnie związana z żelazem

dwuwartościowym. Następnie krążąc po całym organizmie roznosi tlen do wszystkich tkanek. W hemoglobinie pod wpływem środków utleniających dokonuje się zamiana dwuwartościowego jonu żelaza na jon trójwartościowy, mocniej wiążący O₂ i taką postać hemoglobiny nazywa się **methemoglobiną (MetHb)**.

W warunkach prawidłowych 1 g hemoglobiny może związać 1,34 cm³ tlenu. Proces wiązania tlenu przez hemoglobinę, w wyniku którego powstaje oksyhemoglobina nazywa się utlenowaniem. Nie towarzyszy mu zmiana stopnia utlenienia żelaza hemowego. Wiązaniu tlenu przez hemoglobinę towarzyszy zmiana kształtu cząsteczki polegająca na przemieszczeniu poszczególnych podjednostek względem siebie.

Spektroskopia optyczna obejmuje metody badania materii przy użyciu promieniowania elektromagnetycznego z zakresu widzialnego, które może być w danym układzie wytwarzane lub może z układem oddziaływać. Zajmuje się ona interpretacją widm.

W jednym ze sposobów pomiarów spektroskopowych, padające promieniowanie elektromagnetyczne może oddziaływać ze składnikami układu

(związki chemiczne, jony, ugrupowania atomów, atomy i inne). Jako wynik tych oddziaływań może być obserwowana:

- a) absorpcja promieniowania elektromagnetycznego,
- b) odbicie,
- c) refrakcja,
- d) polaryzacja,
- e) rozproszenie (zjawisko Ramana) lub wtórna emisja (luminescencja, fosforescencja czy fluorescencja)

Zjawisko absorpcji stanowi podstawę spektrofotometrii absorpcyjnej w nadfiolecie i zakresie widzialnym. Podstawowe prawo spektrofotometrii absorpcyjnej to prawo Lamberta-Beera, które wyraża się następująco:

$$A = \epsilon c l$$

ϵ – molowy współczynnik absorpcji;

c – stężenie roztworu;

l – grubość warstwy absorpcyjnej.

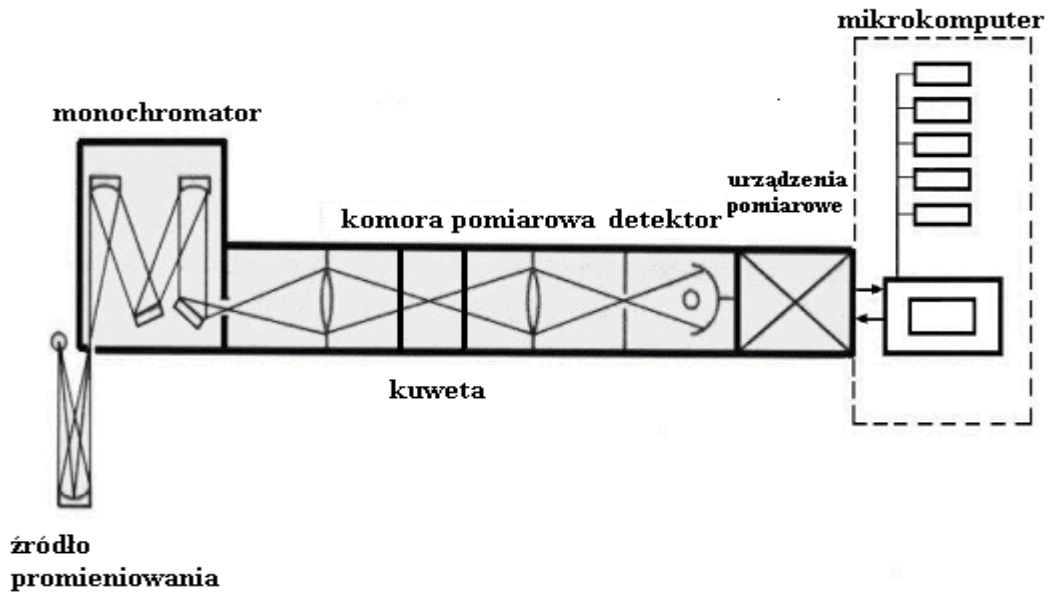
Prawo mówi o tym, że absorbancja światła monochromatycznego jest proporcjonalna do stężenia c roztworu i do grubości l warstwy absorpcyjnej.

Hemoglobina występująca w formie utlenowanej, jako oksyhemoglobina, ma barwę jasnoczerwoną i badana na spektrofotometrze wykazuje dwa piki absorpcyjne w żółtej i zielonej części widma (578 nm i 540 nm). Hemoglobina odtlenowana ma barwę czerwono-fioletową i w spektrofotometrze obserwuje się pik absorpcyjny przy długości fali równej 565 nm. Methemoglobina ma barwę brunatną i pochłania światło przy długościach fali $\lambda = 631$ nm; 576 nm; 540 nm i 500 nm.

Metody spektrofotometryczne stosuje się w widmowej analizie chemicznej, przy wyznaczaniu zdolności emisyjnej, absorpcyjnej i odbijającej ciał, badaniu optycznych własności powierzchni oraz charakterystyk źródeł światła.

II. OPIS BUDOWY STANOWISKA

Spektrofotometr jest urządzeniem pomiarowym, umożliwiającym pomiar transmitancji i/lub absorbancji ciał stałych, ciekłych i gazowych w funkcji długości fali. Ogólny schemat blokowy spektrofotometru przedstawia poniższy rysunek.



Schemat blokowy spektrofotometru.

III. PRZEBIEG ĆWICZENIA

1. Włączyć spektrofotometr (przełącznik na tylnym panelu) oraz drukarkę.
Odczekać około 1 min, aż instrument automatycznie wykona własny test.
Wynik testu wydrukuje drukarka.
2. Wykonanie linii bazowej.
 - a) nalać do kuwety pomiarowej wodę destylowaną (ok. 1 ml);
 - b) umieścić kuwetę w uchwycie wewnątrz spektrofotometru i zamknąć pokrywę pomieszczenia pomiarowego;

UWAGA! *Należy pamiętać, by nie dotykać powierzchni czynnych kuwety (powierzchnie gładkie).*

- c) nacisnąć przycisk „SKAN”. Z widocznego menu na wyświetlaczu, wybrać „Baseline Menu”. Zatwierdzić przyciskiem „E” (Enter);
- d) z następnego menu wybrać „Store Baseline”.
- e) wpisać i zatwierdzić parametry linii bazowej.
 - Enter Start WL [nm]: 450
 - Enter End WL [nm]: 700
 - Enter Speed [nm/min]: 600

Linia bazowa może być wykonana na całym (dostępnym dla instrumentu) przedziale długości fali (325 nm÷1000 nm) lub na części tego przedziału.

- f) po wybraniu parametrów nacisnąć przycisk “RUN / PRINT”. Odczekać, aż instrument dokona kalibracji linii bazowej.

W momencie błędnego wpisywania parametrów, można anulować aktualnie wpisywaną wartość naciskając przycisk „C” (Cancel). W przypadku zauważenia pomyłki po zatwierdzeniu wielkości, linię bazową należy wykonać od początku.

UWAGA !!! Przed wykonaniem dalszej części ćwiczenia należy koniecznie założyć rękawiczki lateksowe.

3. Obserwacja widm hemoglobiny i jej pochodnych.

A. Oksyhemoglobina.

W wyniku kontaktu hemoglobiny z powietrzem atmosferycznym uzyskuje się pochodną hemoglobiny - oksyhemoglobinę.

- a) Wykonać 80-krotne rozcieńczenie otrzymanego preparatu oksyhemoglobiny;
- b) Umieścić w kuwecie 1ml przygotowanej próbki;
- c) Kuwetę umieścić w pomieszczeniu pomiarowym;

- c) powtórzyć czynności opisane w punktach **c ÷ e** dla oksyhemoglobiny (część pierwsza ćwiczenia);
- d) w trakcie drukowania wyniku wyjąć kufkę i przez 1 min mieszać próbkę pipetą;
- e) wykonać następny pomiar widma;
- f) powtarzać punkt **d** i **e** do momentu, aż otrzymywane widmo będzie przypominało widmo oksyhemoglobiny (ok. 3 razy)
- g) uzyskane wyniki ująć w tabeli

Tabela 1

Czas pomiaru	Numer Pomiaru	Absorbancja		
		dł. fali $\lambda_1 = 554\text{nm}$	dł. fali $\lambda_2 = 540\text{nm}$	dł. fali $\lambda_3 = 578\text{nm}$

C. Methemoglobina.

- a) umieścić w kufce 1ml 80-krotnie rozcieńczonego preparatu oksyhemoglobiny;
- b) dodać do kufki 15 μl 0,164% żelazicyjanku potasu i wymieszać;
- c) wykonać dla tej próbki następujące czynności:
 - pomiar widma tuż po wymieszaniu i wydruk wyników;
 - podczas drukowania wykonać następny pomiar widma;
 - w celu obserwacji zachodzących zmian wykonać 3 razy pomiary widma, w krótkich odstępach czasu;
- d) dodać do kufki jedną porcję ditioninu sodu, zamieszać;
- e) wydrukować otrzymane widmo.
- f) Uzyskane wyniki zapisać w tabeli:

Tabela 2.

Czas pomiaru	Numer pomiaru	Absorbancja			
		dł. fali $\lambda_1 = 500 \text{ nm}$	dł. fali $\lambda_2 = 540 \text{ nm}$	dł. fali $\lambda_3 = 576 \text{ nm}$	dł. fali $\lambda_4 = 630 \text{ nm}$

4. Wykonanie krzywej wzorcowej dla oksyhemoglobiny.

- a) rozcieńczyć oksyhemoglobinę: 40; 80; 160; 640; 1280-krotnie ;
Należy pamiętać, aby uzyskać 1 ml każdego rozcieńczenia.
- b) dokonać pomiaru widm i odczytać dla każdego rozcieńczenia wartości absorbancji dla charakterystycznych pików.
- c) wykonać wykres **zależności absorbancji od stężenia preparatu**, wiedząc, że stężenie oksyhemoglobiny wynosi 140 mg / ml.

Tabela 3.

Rozcieńczenie (krotność)		Absorbancja	
		Stężenie[mg/ml]	długość fali 540 nm
40			
80			
160			
320			
640			
1280			
Nieznane rozcień.			

5. Wyznaczenie stężenie nieznaną próbki zaproponowanej przez prowadzącego.

- a. otrzymaną próbkę o nieznanym stężeniu umieścić w kuwecie pomiarowej spektroskopu,

- b. zbadać widmo próbki i odczytać z wykresu absorbancję charakterystycznych pików,
- c. odczytać z wcześniej wykonanej krzywej wzorcowej, wartości stężenia dla tej próbki.

IV. SPRAWOZDANIE POWINNO ZAWIERAĆ

1. Krótki wstęp teoretyczny.
2. Cel przeprowadzonego ćwiczenia.
3. Załączone wykresy widm absorpcji – uzyskane dla hemoglobiny i wszystkich jej pochodnych.
4. Tabele pomiarowe.
5. Wykresy obrazujące kinetykę zmian stężenia hemoglobiny i methemoglobiny w badanej próbce.
6. Wykres zależności absorbancji oksyhemoglobiny od jej stężenia (krzywa wzorcowa).
7. Wartość odczytanego stężenia hemoglobiny w nieznanej próbce.
8. Dyskusję i wnioski.

V. PYTANIA KONTROLNE

1. Rola krwi i jej skład.
2. Budowa hemoglobiny.
3. Budowa i zasada działania spektrofotometru.
4. Zastosowanie spektrofotometrów.

Literatura

1. Kłyszajko–Stefanowicz L. *Ćwiczenia z biochemii* PWN Warszawa – Poznań 1980 rok.
2. Nowicka-Janowska T. *Spektrofotometria UV/VIS w analizie chemicznej* PWN Warszawa 1988 rok.