

# Spektrofotometrisk måling af hæmoglobin

## Formål

At undersøge absorptionsspektret for hæmoglobin under forskellige forhold.

## Indledning

### Spektrofotometri

Når man foretager spektrofotometriske målinger, bruger man et spektrofotometer, dvs. et apparat der kan indstilles til at udsende lys med en bestemt bølgelængde. Hvilke bølgelængder lys et spektrofotometer kan udsende, afhænger af spektrofotometeret. Nogle spektrofotometre kan udsende lys fra ca. 300 nm (UV-lys) og op til 900 nm (infrarødt lys). Andre spektrofotometre kan kun udsende lys i det synlige område dvs. fra 400 nm til ca. 700 nm.

Enhver opløsning der indeholder ioner eller molekyler, vil absorbere lys med en eller anden bølgelængde.

Princippet i et spektrofotometer er at en lampe udsender lys, der går igennem et gitter, således at det lys der rammer kuvetten med prøveopløsningen, er af en bestemt bølgelængde. På den anden side af kuvetten er der placeret en fotocelle der registrerer hvor meget lys, der er passeret igennem kuvetten.

Det er ikke kun molekylerne eller opløste ioner der absorberer lys. Opløsningsmidlet der anvendes, vil også absorbere lyset, derfor skal et spektrofotometer nulstilles med en kuvette der kun indeholder opløsningsmidlet, den kaldes referencekuvetten. Den lysintensitet som apparatet registrerer for referencekuvetten, betegnes  $I_0$ . Lysintensiteten der registreres for kuvetten med prøven, betegnes  $I$ .

Absorbansen, dvs. den værdi som spektrofotometeret giver som resultat, følger Lambert-Beers lov:

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

Lambert-Beers lov kan også skrives:

$$A = k \cdot [\text{opløst stof}]$$

Hvor  $A$  er absorbansen,  $k$  er en proportionalitetskonstant, *ekstinktionskoefficienten*, og [opløst stof] er koncentrationen af opløst stof. Der er altså en lineær sammenhæng mellem absorbansen og koncentrationen af det opløste stof. Man kan derfor også bruge spektrofotometri til bestemmelse af koncentrationer af ioner eller molekyler i en opløsning.

Skal man bruge spektrofotometri til koncentrationsbestemmelse, starter man med at lave en standardkurve.

Skal man lave en standardkurve, laver man en række opløsninger med forskellige kendte koncentrationer af den ion eller det molekyle man vil undersøge. Derefter måler man absorbansen for de forskellige koncentrationer. Afbilder man absorbansen som funktion af koncentrationer på en graf, kan man, når man har målt absorbansen på den ukendt prøve, aflæse koncentrationen på grafen.

Når man arbejder med spektrofotometri og laver standardkurver, er der tre forhold man skal huske.

1. Standardkurven skal altid gå igennem punktet 0,0 på grafen da absorbansen er målt i forhold til opløsningsmidlets absorbans.
2. Når koncentrationen af det opløste stof bliver af en vis størrelse, det afhænger af stoffet, er der ikke længere en lineær sammenhæng mellem koncentrationen og absorbansen. Så man skal altid arbejde med koncentrationer, der ligger på den lineære del af grafen.
3. Undersøg altid ved hvilken bølgelængde absorbansen er størst for det stof der skal undersøges, og brug den bølgelængde.

## Materialer

### *Kemikalier*

- 50 mL hæmoglobin-buffer, pH = 7,4: 120 mM NaCl og 22 mM  $\text{PO}_4^{3-}$ , opløsningen fremstilles ved at afveje:
- 0,35 g NaCl
- 0,075 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 0,125 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

Det hældes i en 50 mL målekolbe og fyldes op med demineraliseret vand, pH justeres til 7,4 ved tilsætning af KOH

- 10 mL hæmoglobin-opløsning med konc. 10 g/L. Opløsningen fremstilles ud fra hæmoglobin der opløses i hæmoglobin-buffer:
- 10 mL 0,3 M natriumdithionit (0,726 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  opløst i hæmoglobin-buffer)

### *Apparatur*

- Spektrofotometer
- 2 mL eppendorfrør
- 3 stk. 1 mL kuvetter
- 1 mL automatpipette
- Spidser til 1 mL automatpipette

## Del 1

### Absorptionsmålinger for hæmoglobin

#### Fremgangsmåde

1. Indstil spektrofotometret på bølgelængden 540 nm.
2. Nulstil spektrofotometret på hæmoglobin-bufferopløsningen.
3. Kom 1 mL hæmoglobin-opløsning i en kuvette.
4. Mål absorbansen ved 540 nm for hæmoglobin-opløsningen, notér absorbansen.
5. Fjern 0,5 mL hæmoglobin-opløsning fra kuvetten.
6. Tilsæt 0,5 mL hæmoglobin-buffer til kuvetten. Bland indholdet i kuvetten ved at suge op og tømme pipetten nogle gange.
7. Mål absorbansen, notér absorbansen og fortyndingsgraden.
8. Gentag fortyndingen så der er i alt 6 målinger.

## Resultater

Koncentration g/L	Absorbans ved 540 nM

## Bearbejdning

- Lav en graf der viser absorbansen som funktion af koncentrationen.
- Notér den koncentration der giver en absorbans på 0,5.
- Beregn hæmoglobins ekstinktionskoefficient ud fra grafen.

## Del 2

### Absorptionsspektrum for reduceret og oxideret hæmoglobin

#### Fremgangsmåde

- Ud fra resultaterne fra øvelsen med sammenhængen mellem absorbans og koncentration laves en hæmoglobin-opløsning ud fra stamopløsningen og hæmoglobin-buffer der vil give en absorbans på 0,5.
- Kom hæmoglobin-buffer i en kuvette og den fortyndede hæmoglobin-opløsning i to andre kuetter. Den ene kuvette stille til side til senere.
- Nulstil spektrofotometret på hæmoglobin-buffer.
- Lav nu et absorptionsspektrum for hæmoglobin-opløsningen fra 420 nm til 700 nm.
- Overfør hæmoglobin-opløsningen til et 2 mL eppendorfrør. Hæmoglobin-opløsningen gennembobles forsigtigt med ilt, O<sub>2</sub>, fra en iltflaske.
- Kom hæmoglobin-opløsningen tilbage i kuvetten og lav et nyt absorptionsspektrum fra 420 nm til 700 nm.
- Der tilsættes 50 µL natriumdithionit-opløsning til kuvetten med hæmoglobin-buffer.  
– Nulstil spektrofotometret
- Tilsæt 50 µL natriumdithionit-opløsning til kuvette med hæmoglobin-opløsningen.
- Lav et absorptionsspektrum for hæmoglobin-opløsningen med natriumdithionit.
- Sammenlign farverne på kuvetten med hæmoglobin-opløsningen med natriumdithionit og kontrolkuvetten.

## Resultater

De to absorptionsspektrer.

## Bearbejdning

- Hvilken farve har hæmoglobin i kontrolkuvetten?
- Hvad forventer du at jerns oxidationstrin er i kontrolkuvetten, og hvordan er iltningen af hæmoglobinet? Begrund svarene ud fra absorptionsspektret.
- Kan det udleverede hæmoglobin binde ilt,  $O_2$ ? Hvorfor/hvorfor ikke?
- Ses der et farveskift med hæmoglobin efter iltgennemboblingen? Hvorfor/hvorfor ikke?
- Sker der en farveændring i hæmoglobin-opløsningen efter tilsætning af natriumdithionit i forhold til kontrolkuvetten?
- Er der forskel i hæmoglobins absorptionsspektrum før og efter tilsætningen af natriumdithionit? Hvorfor/hvorfor ikke?
- Hvilket oxidationstrin har jern i hæmoglobin efter tilsætningen af natriumdithionit?

## Del 3

### Absorptionsspektrum for iltet og ikke iltet hæmoglobin

#### Fremgangsmåde

- Tag kuvetten med hæmoglobin-opløsningen med dithionit fra del 2 og kontrollér hæmoglobin-opløsningen. Tilsæt 50  $\mu$ L natriumdithionit til kontrolopløsningen.
- Hæmoglobin-opløsningen fra del 2 hældes i et 2 mL eppendorfrør og gennembobles forsigtigt med ilt fra en iltflaske i ca. 1 min.
- Den gennemboblede hæmoglobin-opløsning hældes tilbage i kuvetten, og der laves et absorptionsspektrum fra 420 nm til 700 nm.

## Resultater

Absorptionsspektrer.

## Bearbejdning

- Sker der en farveændring i når hæmoglobin-opløsningen gennembobles med ilt? Sammenlign med kontrolkuvetten.
- Hvordan er jernatomets oxidationstrin i hæmoglobin-opløsningen, og er hæmoglobin iltet?
- Hvilke af behandlingerne af hæmoglobin i de tre forsøg giver en farveændring. Kan disse farveændringer sættes i relation til blodets farve i vores blodårer?
- Hvordan vil en gennembobling med carbondioxid påvirke hæmoglobins iltaffinitet?
- Hvordan vil en gennembobling med carbonmonoxid påvirke iltaffiniteten?
- Hvorfor er det vigtigt at vi bruger en buffer-opløsning til at lave opløsningerne med?