임상검사기기학 및 기초통계

중원대학교 임상병리학과

홍석현

3장

광학분석



■ 임상화학 분석의 주요 대상과 분석 방법

분석법 선택	혈청 중 농도(mol/L)	주요 대상 성분*
분광광도 분석법	2.0×10^{-3} 이상 고농도	글루코스, 요소질소, 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, 인지질, 칼슘
	1.0×10^{-4}~2.0×10^{-3}	총 단백, 알부민, 요산, 트라이글리세라이드, HDL-콜레스테롤, 유리
	중간농도	지방산, 무기인, 마그네슘
	1.0×10^{-5}~1.0×10^{-4}	크레아티닌, 암모니아질소, 철, 구리
	1.0×10^{-6}~1.0×10^{-5}	총 빌리루빈, 직접 빌리루빈
	1.0×10^{-8} 이하 저농도	효소(AST, ALT, LD, ALP, CK, AMY, ChE, γ-GT)
이온선택 전극법	2.0×10^{-3} 이상 고농도	소듐, Cl, 포타슘, 중탄산, 칼슘
효소 전극법**		글루코스
불꽃 광도법**		소듐, 포타슘
전량 적정법**		염화물
원자흡수 분광광도법**		마그네슘, 철, 구리
면역화학 분석법	1.0×10^{-8} 이하 저농도	호르몬, 약제, 미량 단백질
전기영동법		단백 분획, 리포단백분획, 효소의 아이소자임 분석
크로마토그래피법		글리코헤모글로빈

현재 거의 사용x

* 혈청 중 농도(mol/L)는 기준 범위의 대략적인 중앙치로 분류하였다.
** 현재 일상 검사에서는 거의 사용되지 않는다.

- 광학분석(Optical Analysis)

➢ 광학분석법

1) 분광광도 분석법(Spectrometry)

2) 형광 광도법(Fluorometry)

3) 화학발광 분석(Chemiluminescence)

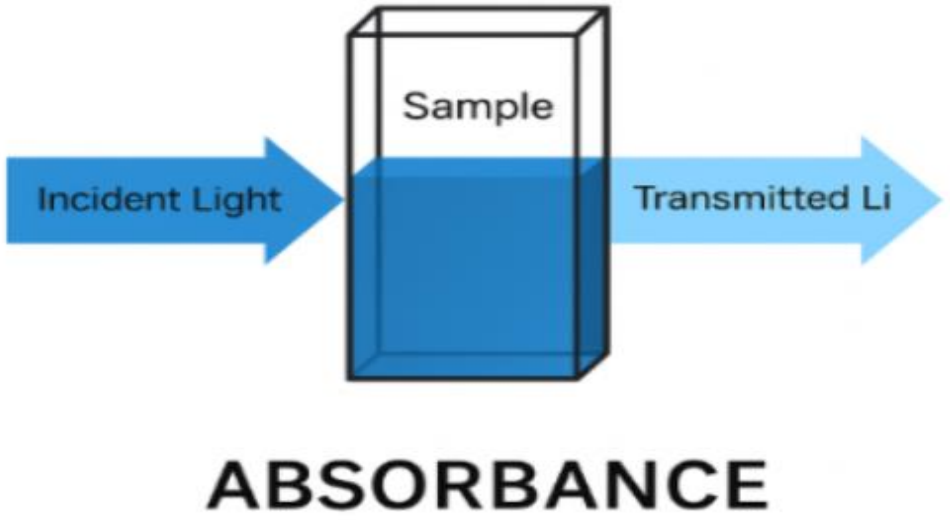
4) 원자흡광광도법
(AAS, Atomic Absorption Spectrometer)

5) 염광광도법(Flame photometry)

6) 반사율 광도법
(Reflectance photometry)

7) 탁도 측정법
(Turbidimetry/Nephelometry)

※ **흡광(Absorbance)** vs 형광(Fluorescence) vs 발광(Luminescence)



1. 시료에 빛을 비췄을 때, 얼마나 빛이 흡수 되었는가를 보는 방식
2. 빛이 줄어드는 것을 측정

→ 빛이 얼마나 흡수되었는지, 얼마나 줄어들었는지 수치로 표현

1) 빛을 비췄을 때 숫자가 증가하면(농도가 높으면) 시료가 빛을 덜 흡수한 상태
2) 숫자가 작아지면(농도가 낮으면) 많은 빛이 흡수되었다는 의미
3) 예시: ELISA, BCA 단백질 정량 등

• 광학분석(Optical Analysis)

- 임상검사실의 많은 측정이 광학분석에 기초하여 이루어짐.

- 일정 조건에서 흡수된 빛(absorbed), 투과된 빛(transmitted), 산란된 빛(scattered), 반사된 빛(reflected), 방출된 빛(emitted), 굴절된 빛(refracted)을 측정.
  → 빛을 이용하여 **물질의 성질이나 성분, 농도** 등을 분석하는 방법

- 주로 자외선, 가시광선, 적외선 등 사용

- 투과(반사)된 빛이 우리 눈에 보이게 됨. 투과(반사)된 빛의 보색이 흡수
  흡수되는 빛 + 반사(투과)되는 빛 = 흰색(보색관계)

• 투과 vs 반사

➢ 투과(반사)된 빛이 우리 눈에 보이게 됨. 투과(반사)된 빛의 보색이 흡수
흡수되는 빛 + 반사(투과)되는 빛 = 흰색(보색관계)

구분	반사	투과	공통점
빛의 경로	표면에서 튕김	물질을 통과	눈에 들어오는 빛으로 색을 인식
색의 원리	반사된 빛	투과된 빛	
보색 관계	반사된 빛의 보색이 흡수	투과된 빛의 보색이 흡수	동일한 원리

➢ 보이는 색 = 흡수되지 않은 빛(반사 또는 투과된 빛)

➢ 보색 관계에서만 성립함

• 광학분석(Optical Analysis)

표 5.1 광학적 방법의 범위

종류	예시
흡광	원자 흡광, 분광광도계, 반사율 광도계
방사	형광 분광법, 형광 에너지 전달 분광법, 형광 측정법, 발광 측정법 (생체 발광, 화학발광 또는 전기화학발광 반응에서 발광), 인광 측정법
형광	형광 분광법
산란	혼탁법, 산란법

표 5.2 자외선, 가시광선, 짧은 적외선 스펙트럼 특정 색상

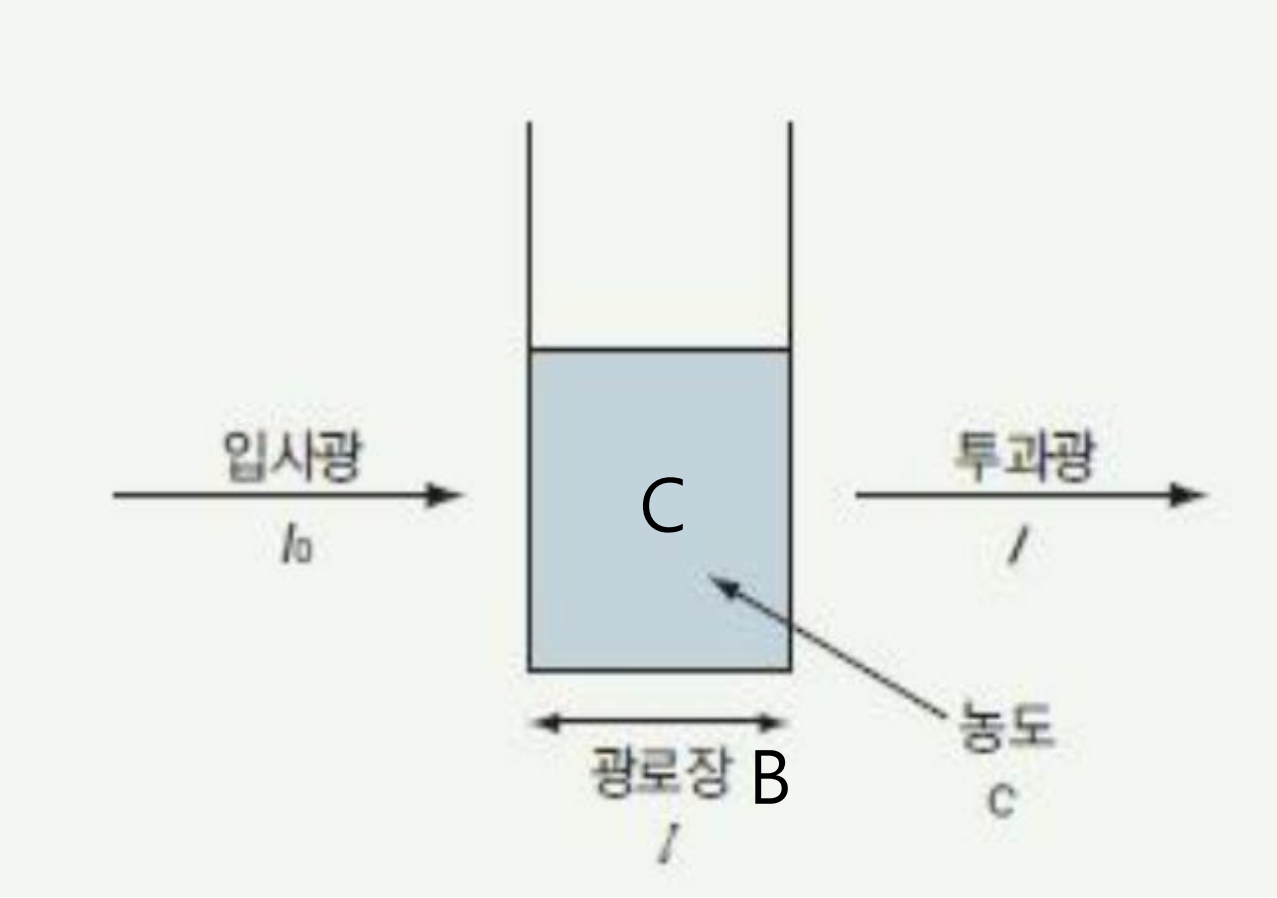
파장, nm	이름	색상[a]	
<380	자외선[b]	보이지 않음	
380~440	가시광선	보라색	황색–녹색
440~500		청색	황색
500~580		녹색	적색
580~600		노란색	청색
600~620		주황색	녹색–청색
620~750		적색	청색–녹색
750~2,500	근적외선	보이지 않음	
2,500~15,000	중적외선		
15,000~1,000,000	원적외선		

[a] 육안 색상이며 표시된 파장 간격은 대략적인 수치이다.

[b] 자외선(UV) 부분은 근자외선(220~380 nm), 원자외선(<220)으로 더 분할될 수도 있다. 이 구분은 실리카 큐벳이 ≥220 nm에서 효과적으로 빛을 전달한다는 근거가 있다.

※ 투과도(transmittance)

➢ 투과도



- 투과도(T)

$T = \frac{I}{I_0}$(투과광/입사광)

- 투과율(T%)

$T\% = \frac{I}{I_0} \times 100 \rightarrow T \times 100$

※ 흡광도 – Beer-Lambert's 법칙

➢ 흡광도(Absorbance)

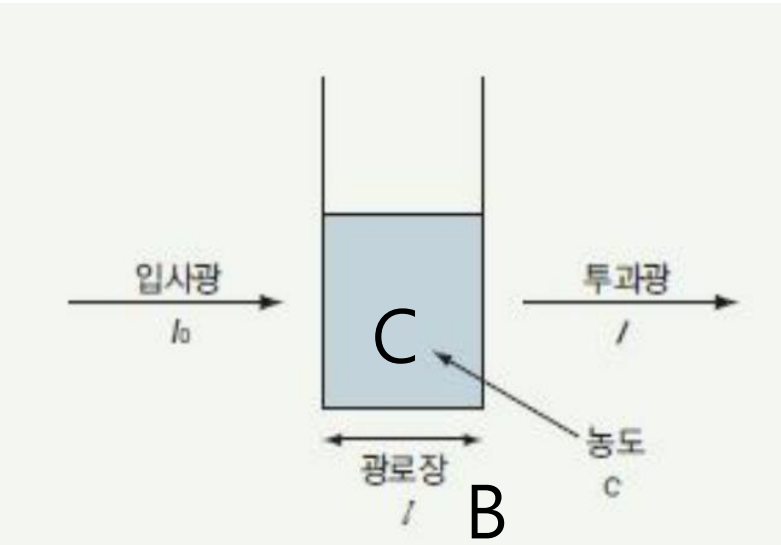
1) Beer's 법칙
 - Cuvette(Cell)의 두께가 일정할 때 용액의 흡광도(A)는 용액의 농도(C)와 비례 <A ∝ C>

2) Lambert's 법칙
 - 용액의 농도가 일정할 때 흡광도(A)는 Cell의 투과 경로 길이(B, 광로장)에 비례 <A ∝ B>

3) Beer-Lambert's 법칙
 - 흡광도(A)는 용액의 농도(C)와 Cell의 투과 경로 길이(B, 광로장)에 비례 <A ∝ B, C>



<Cuvette>



➢ 흡광도(A)
→ Cell의 투과 경로 길이(B) x 용액의 농도(C)에 비례
→ A= εBC

$$I = I_0 \times 10^{-\varepsilon BC}$$

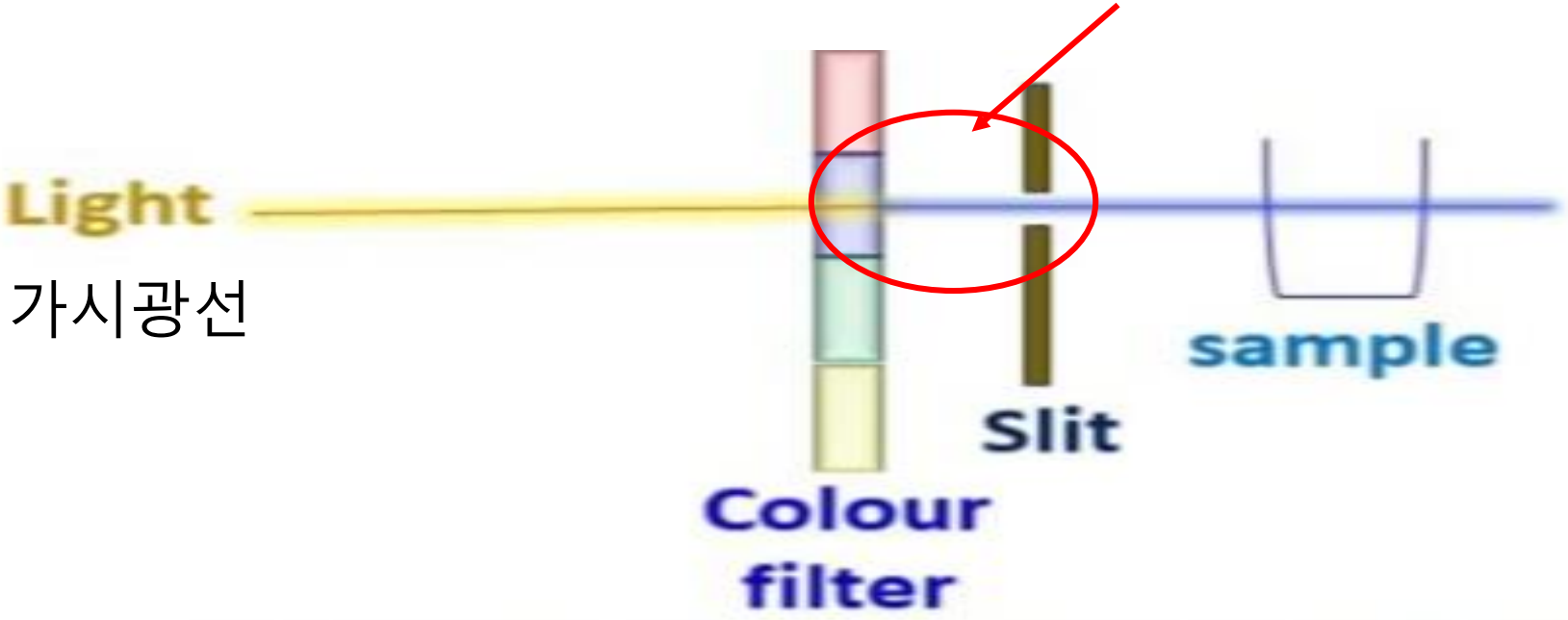
$$A = \varepsilon BC = \log I_0/I$$
$$= \log 100 / \%T = 2\text{-}\log\%T$$

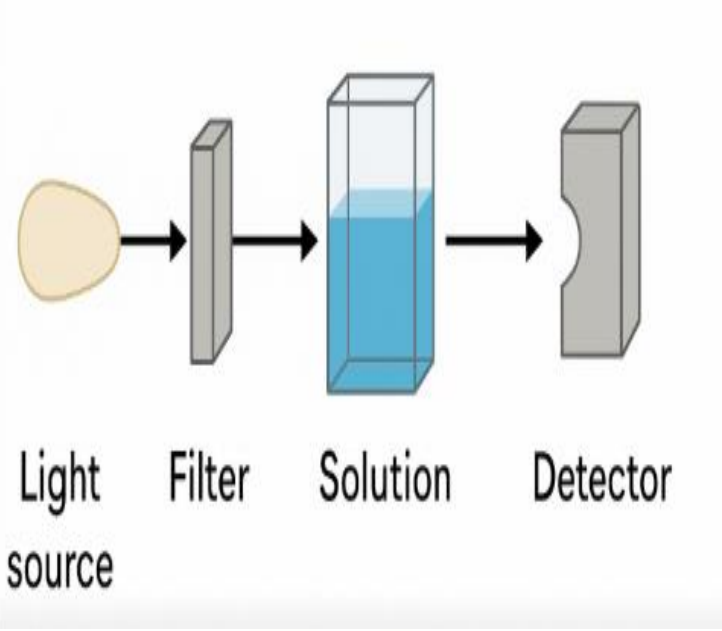
• 광도분석법(photometry)

➢ 광도분석법(photometry)

- 혈청 내 목표 성분 정량을 위해 **가시광선**을 투과하여 빛을 측정
- 가시광선의 전체 스펙트럼을 활용(약 400~800nm 파장)
- 광원에서 나오는 빛의 강도(밝기)를 필터(filter)를 통해 측정

☞[광원] – [필터] – [용액] – [검출기: 단일 파장 측정]





• 분광광도 분석법(spectrophotometry)

1. 분광광도 분석법(spectrophotometry)

- 혈청 내 목표 성분 정량을 위해 **단색광 장치(monochromator)**로 분광하여 빛을 흡수하여 측정(가시광선 영역 등 활용)
- 특정 파장의 강도를 측정

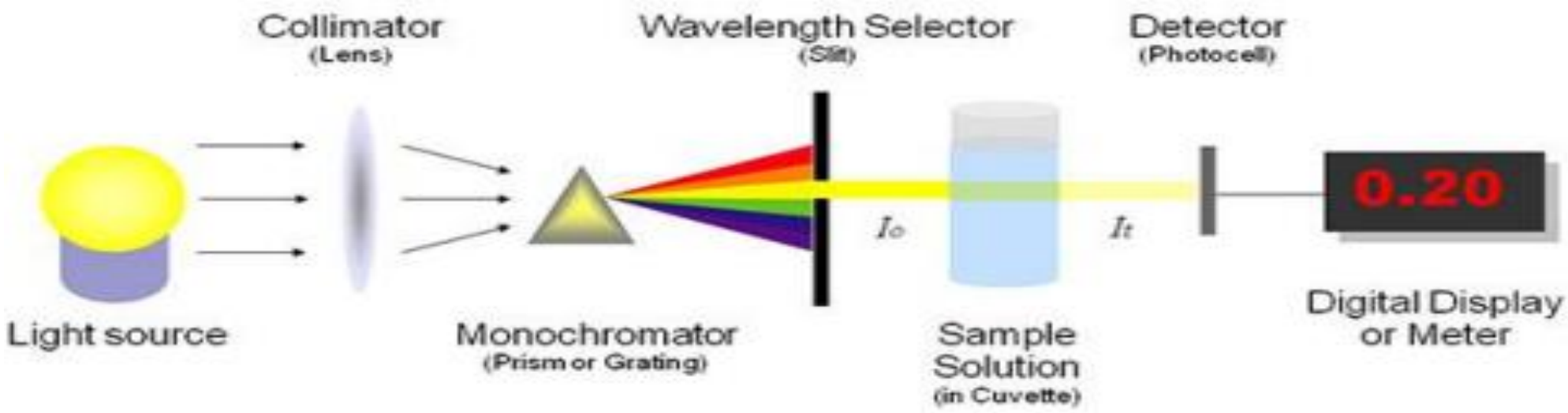
☞ [광원] – [**프리즘/회절격자**] – [용액] – [검출기: 다중 파장 측정]

단색광 장치



가시광선

- 분광광도 분석법(spectrophotometry)



< 광원부 – 분광부(단색광 장치, 파장선택부) – 시료부 – 측광부 – 판독부>

1) 빛을 **단색광 장치(monochromator)**로 좁게 분광함

2) 분광한 빛을 용액(Serum+reagent)에 통과시켜 투과하는 빛을 측정

3) 투과율(T%)을 바탕으로 흡광도(Absorbance)을 계산하여 농도 측정 → A= 2-logT%

• 분광광도계(Spectrometer) 구조

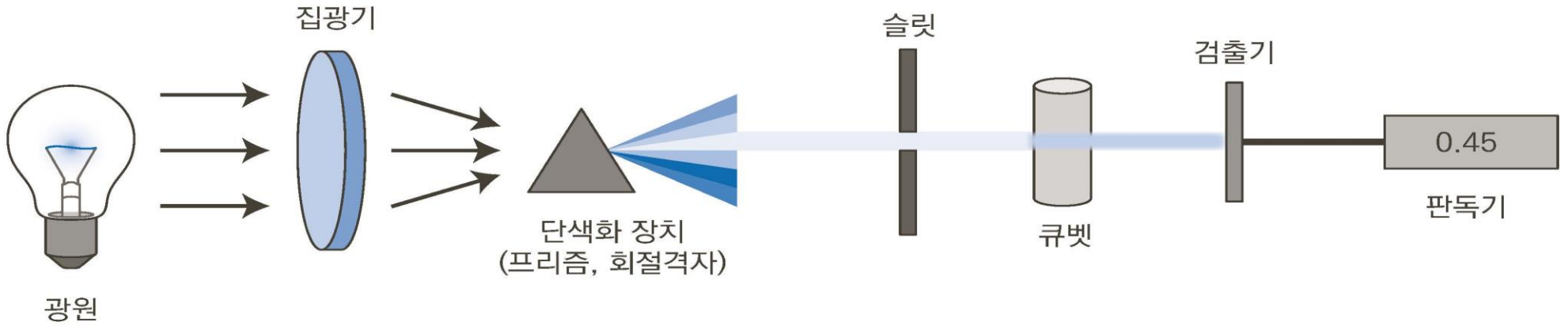
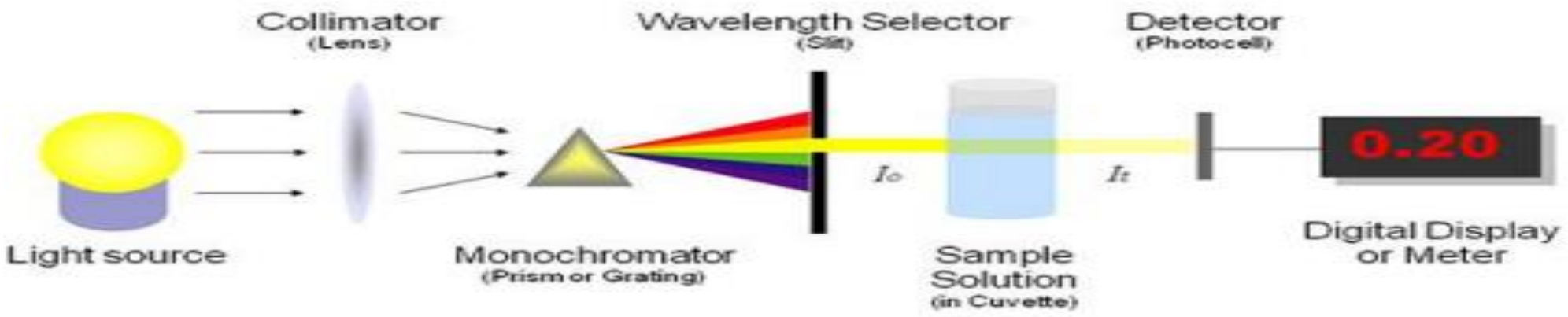


그림 5.5 ▶ 분광광도계의 모식도

구성	광원부	분광부 (단색광장치)	시료부	측광부(수광부, 검출부)	판독부
의미	빛을 발생	단색광을 얻기 위한 장치	유색 용액의 흡광도를 측정하는 용기	시료를 통과한 빛(광신호)을 전기에너지로 변환하는 장치	전기에너지를 시각적으로 판독
종류	텅스텐 램프, 할로겐 램프, 수소 램프, Xenon램프, Hg램프	filter, prism, Grating (회절격자)	Cuvette (유리,석영,플라스틱)	**광전자 증배관(PMT),** 광전 포토다이오드, 광전지, 광전관	디지털 장치



① Light source(광원): 빛을 발생시키는 장치

② Monochromator(분광부, 단색광장치)

: 단색광을 얻기 위해 사용하는 장치(주로 prism, 회절격자)

③ Slit(조리개) : 빛의 세기 및 감도, 해상도를 조절→ 좁은 슬릿 = 높은 파장 분해능

④ Cuvette(시료부)

: 샘플과 시약을 넣어 반응을 일으킨 후 생된 유색 용액의 흡광도를 측정하는 용기

⑤ Photodetector(측광부, 수광부, 검출부): 시료를 통과한 빛을 감지하여 광전효과를 통해 전기에너지로 변환하는 장치(주로, 광전자증배관)

⑥ 판독부: 측광부에서 감지된 전류의 양을 투과율 또는 흡광도로 표시

- 광학분석(Optical Analysis)

➢ 광학분석법

1) 분광광도 분석법(Spectrometry)

2) 형광 광도법(Fluorometry)

3) 화학발광 분석(Chemiluminescence)

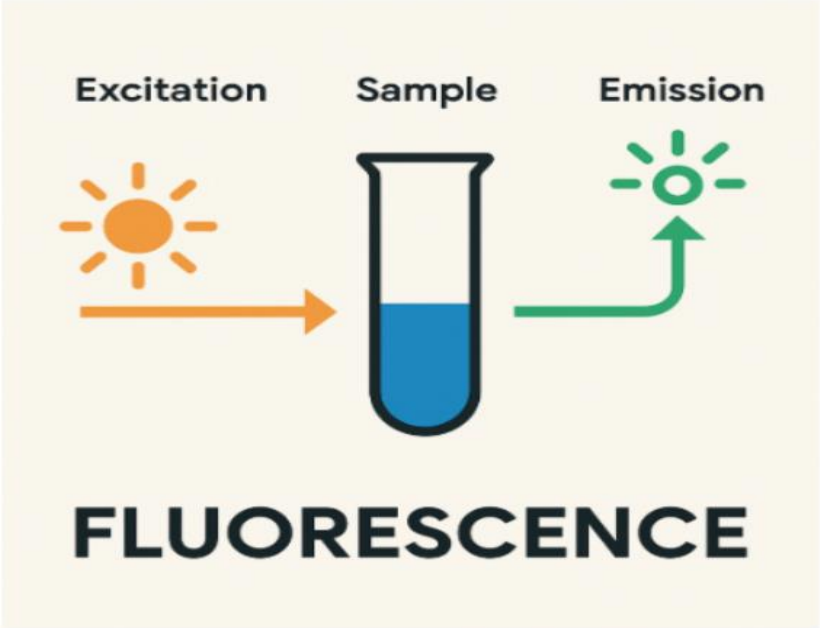
4) 원자흡광광도법
(AAS, Atomic Absorption Spectrometer)

5) 염광광도법(Flame photometry)

6) 반사율 광도법
(Reflectance photometry)

7) 탁도 측정법
(Turbidimetry/Nephelometry)

※ 흡광(Absorbance) vs **형광(Fluorescence)** vs 발광(Luminescence)



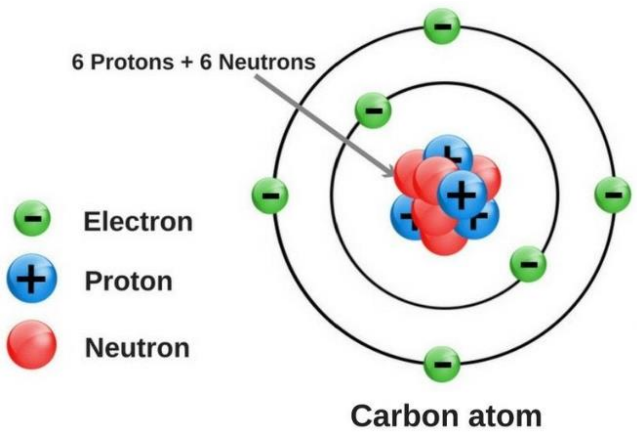
1. 빛을 흡수하고, 다시 다른 빛(형광)을 비추는 것을 의미
2. 특정 파장의 빛(Excitation)을 비추면, 시료가 에너지를 받아 다른 파장(Emission)의 빛을 방출함
   1) Excitation과 Emission의 파장이 다르기 때문
   2) 예시: DNA 정량, SYBR Green PCR정량 등

※ 주기율표

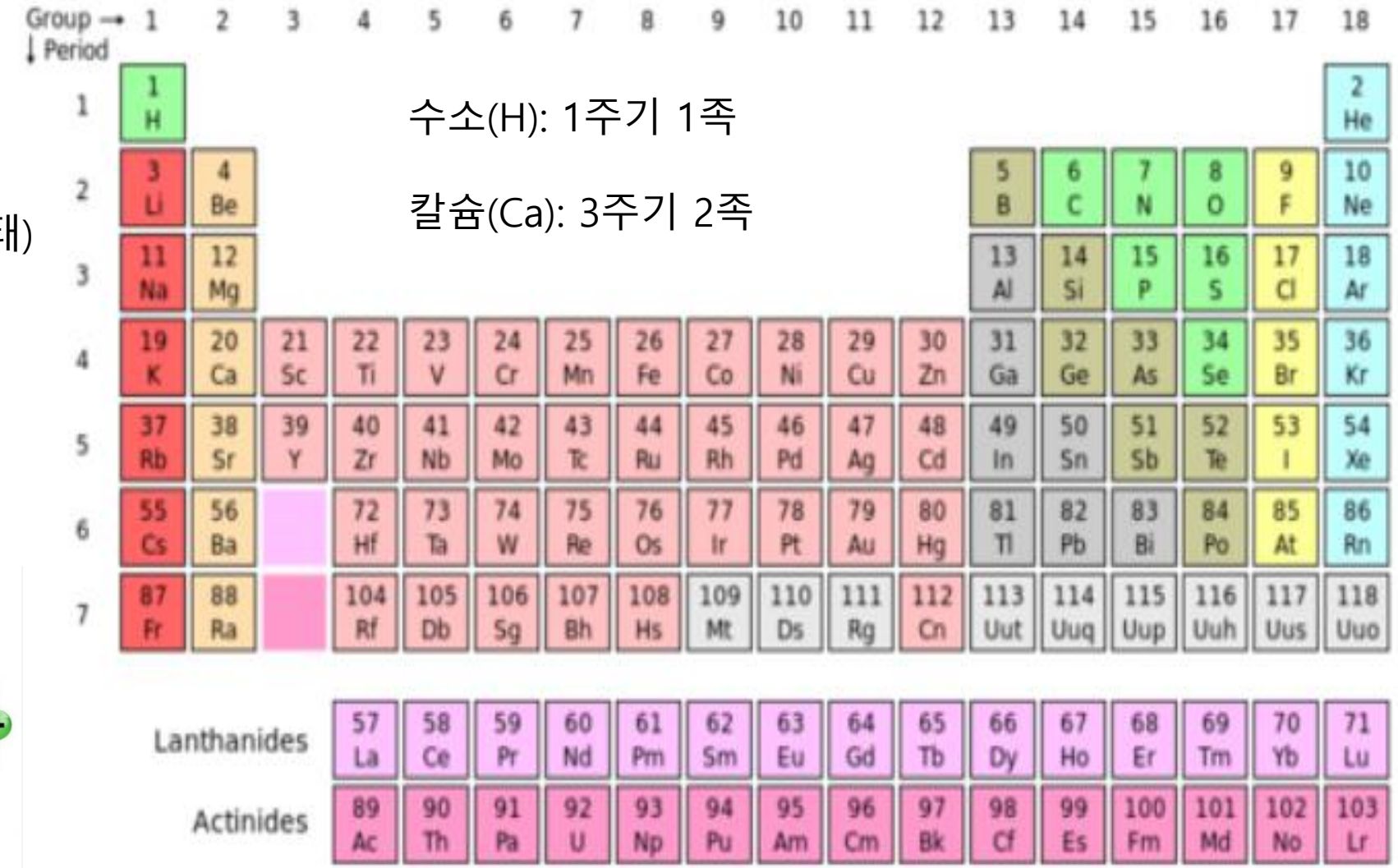
➢ 주기율표의 번호
= 양성자 = 전자
→ 기저상태(바닥, 안정상태)

But, 양성자 ≠ 전자
→ 들뜬상태(여기, 불안정상태)

ex) 탄소(C) 6번
양성자: 6개
전자 : 6개
→ 바닥상태(안정상태)



➢ 가로: 족(group, family) →1~18 / 세로: 주기(period) →1~7

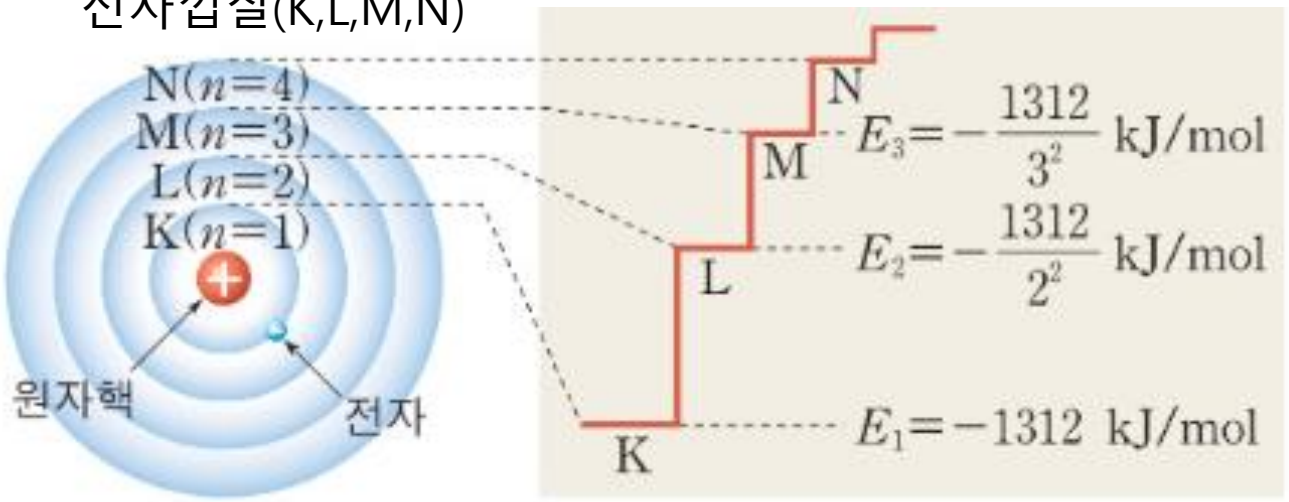


수소(H): 1주기 1족

칼슘(Ca): 3주기 2족

※ 에너지 흡수, 방출

전자껍질(K,L,M,N)



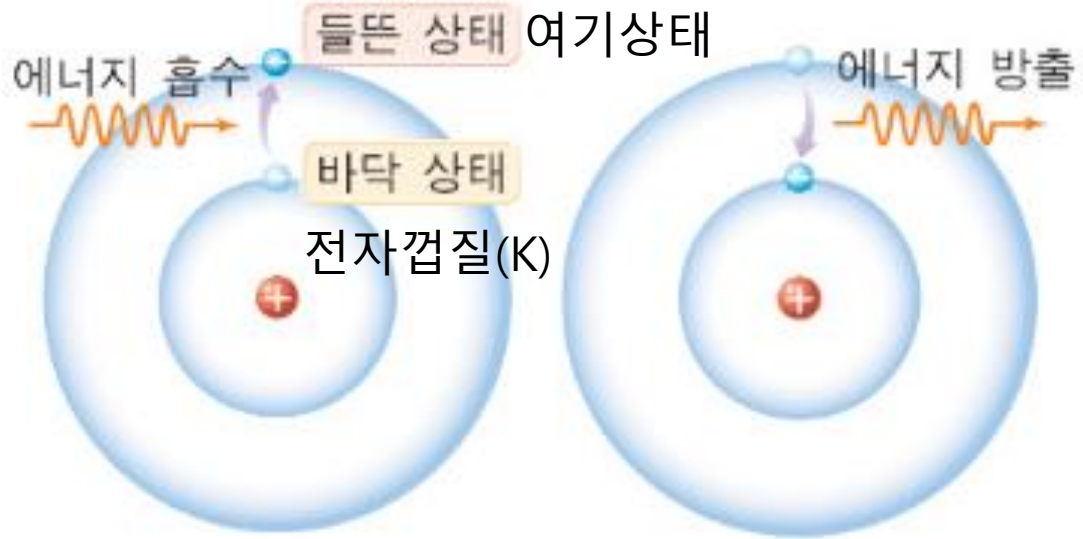
➢ 전자껍질
- K열(n=1) : 에너지가 가장 낮음
- L열(n=2)
- M열(n=3)
- L열(n=4)

……

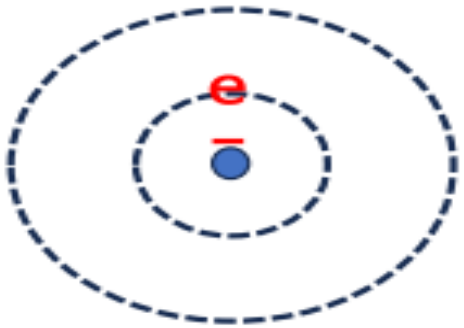
↓

→ 바깥쪽 전자(n이 클수록)일 수록 에너지가 커짐

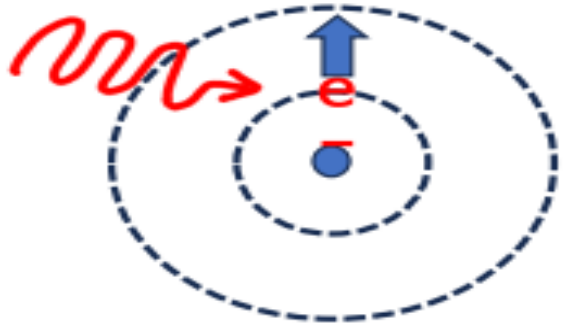
전자껍질(L)



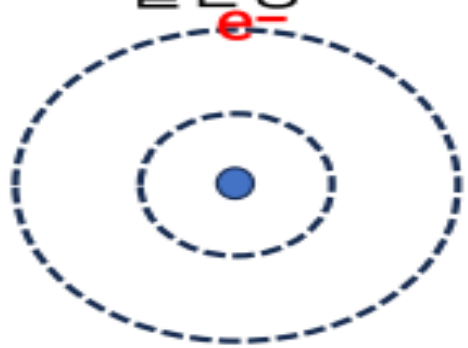
들뜬상태(여기상태) vs 바닥상태(기저상태)



빛(에너지)의 흡수(absorption)

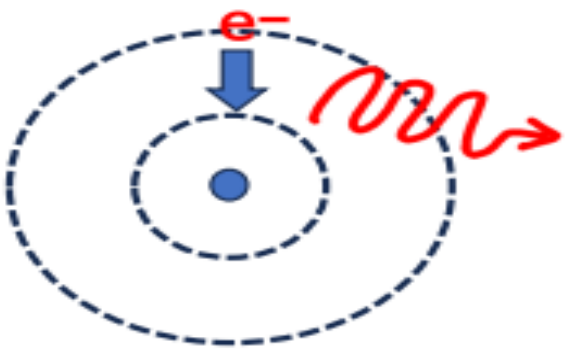


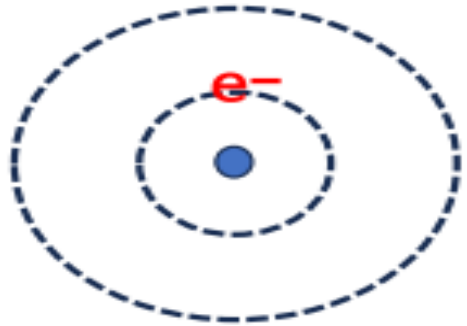
불안정



들뜬상태(여기상태)

빛(에너지)의 방출(emission)



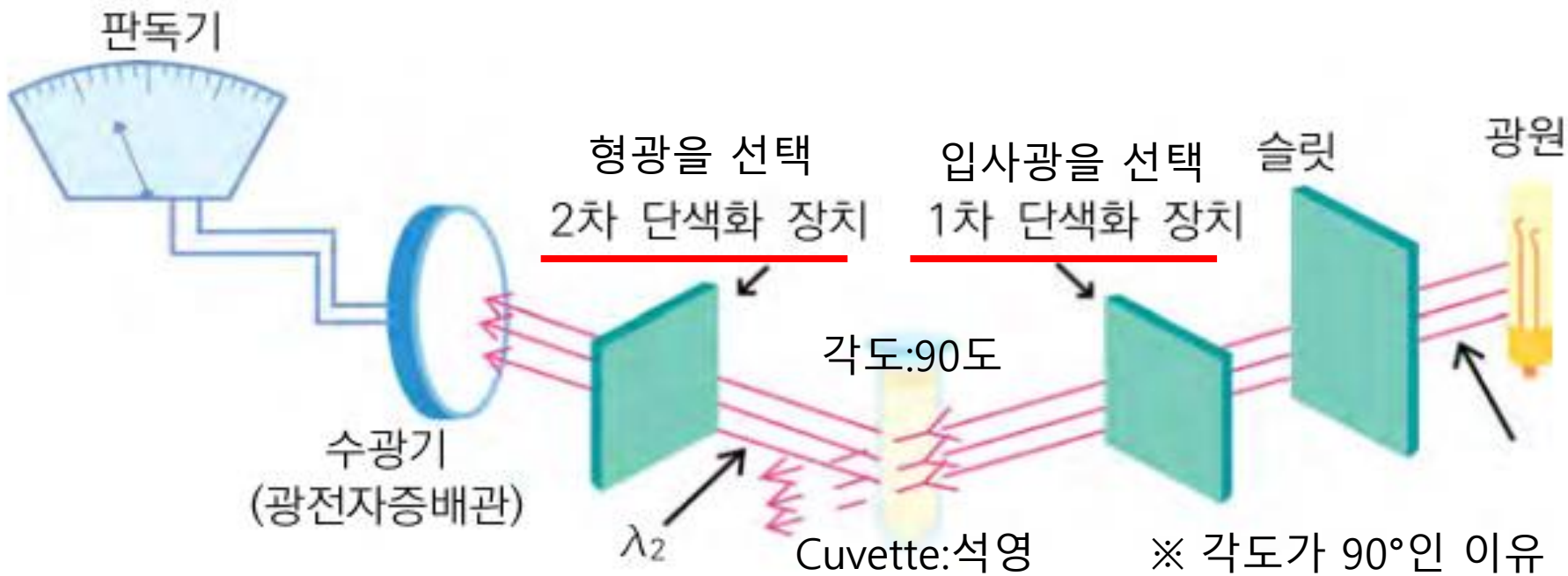


바닥상태(기저상태)

• 형광 분석법 – 형광 광도계(fluorometer)

➢ 형광 광도계: 단색화 장치2개 (분광광도계는 단색화장치 1개)

< 광원부 – 분광부(1차) – 시료부 – 분광부(2차) - 측광부 – 판독부>



※ 각도가 90°인 이유
→ 빛이 산란된 빛에 의한 간섭을 최소화

그림 4-12 형광광도계

- 형광 분석법 – 형광 광도계(fluorometer)

< 광원부 – 분광부(1차) – 시료부 – 분광부(2차) - 측광부 – 판독부>

1) 측정물질: 저농도물질(10^{-8}~ 10^{-10} mol/L) → 호르몬, 비타민, 포르피린 등

2) 환경적 변화에 민감 → pH, 온도, 용매, 광 산란, 큐벳 재료

3) 전해질 측정에 적합하지 않음 → 이온선택전극법 사용

4) 농축 용액: 형광이 유의하게 감소 (희석하여 측정)

5) 1차 단색화 장치[여기 분광부, Excitation(여기,들뜸) monochromator]
→ 시료에 비추는 빛의 파장 선택
2차 단색화 장치[형광 분광부, Emission(방출) monochromator]
→ 시료에서 나온 형광의 파장 선택

• 분광광도계 VS 형광 광도계

광도계	광원부	분광부 (단색광장치)	시료부	측광부(수광부, 검출부)	판독부
형광	Xenon램프, Hg램프	filter, prism, Grating (회절격자) ★ **2개 사용**(1,2차)	4면 Cuvette (석영) * 시료부와 측광부 **각도: 90°**	광전자 증배관(PMT)	디지털 장치 (방출되는 형광 세기 측정)
분광	텅스텐 램프, 할로겐 램프, 수소 램프, Xenon램프, Hg램프	filter, prism, Grating (회절격자)	2면 Cuvette (유리,석영,플라스틱) * 시료부와 측광부 각도: 일직선	**광전자 증배관(PMT),** 광전포토다이오드, 광 전지, 광전관	디지털 장치 (투과율, 흡광도 측정)

※ 석영: 자외선 투과
유리, 플라스틱: 자외선 투과 불가

표 4-3 주요 생체분자의 여기광과 최대 형광 파장

화합물	여기광 파장(nm)	최대 형광 파장(nm)	화합물	여기광 파장(nm)	최대 형광 파장(nm)
비타민 A	325	470	세로토닌	295	340
비타민 B_1	370	445	ATP	285	395
비타민 B_2	270, 370, 445	520	NADH(NADPH)	340	435
비타민 B_6	340	400	에스트라디올	285	330
비타민 E	295	330	에스트론	285	325
비타민 B_{12}	275	305	알코올 탈수소 효소(간)	325	440
엽 산	365	450	젖산 탈수소 효소	330	440
에피네프린	285	325	말산 탈수소 효소	351	447
노르에피네프린	285	325	글리세르알데하이드-3-인산 탈수소 효소	340	462

- 광학분석(Optical Analysis)

➢ 광학분석법

1) 분광광도 분석법(Spectrometry)

2) 형광 광도법(Fluorometry)

3) 화학발광 분석(Chemiluminescence)

4) 원자흡광광도법
(AAS, Atomic Absorption Spectrometer)

5) 염광광도법(Flame photometry)

6) 반사율 광도법
(Reflectance photometry)

7) 탁도 측정법
(Turbidimetry/Nephelometry)

※ 흡광(Absorbance) vs 형광(Fluorescence) vs **발광(Luminescence)**



1. 자체적으로 빛을 만들어 내는 반응
2. 시료가 화학 반응에 의해 자체적으로 빛을 내는 현상
   1) 자체적으로 빛을 생성하기 때문에 **광원이 필요없음**
   2) 예시: Luciferase 반응

• 화학발광 분석(Chemiluminescence Analysis)

➢ 화학발광 광도계

1) **광원이 없음**

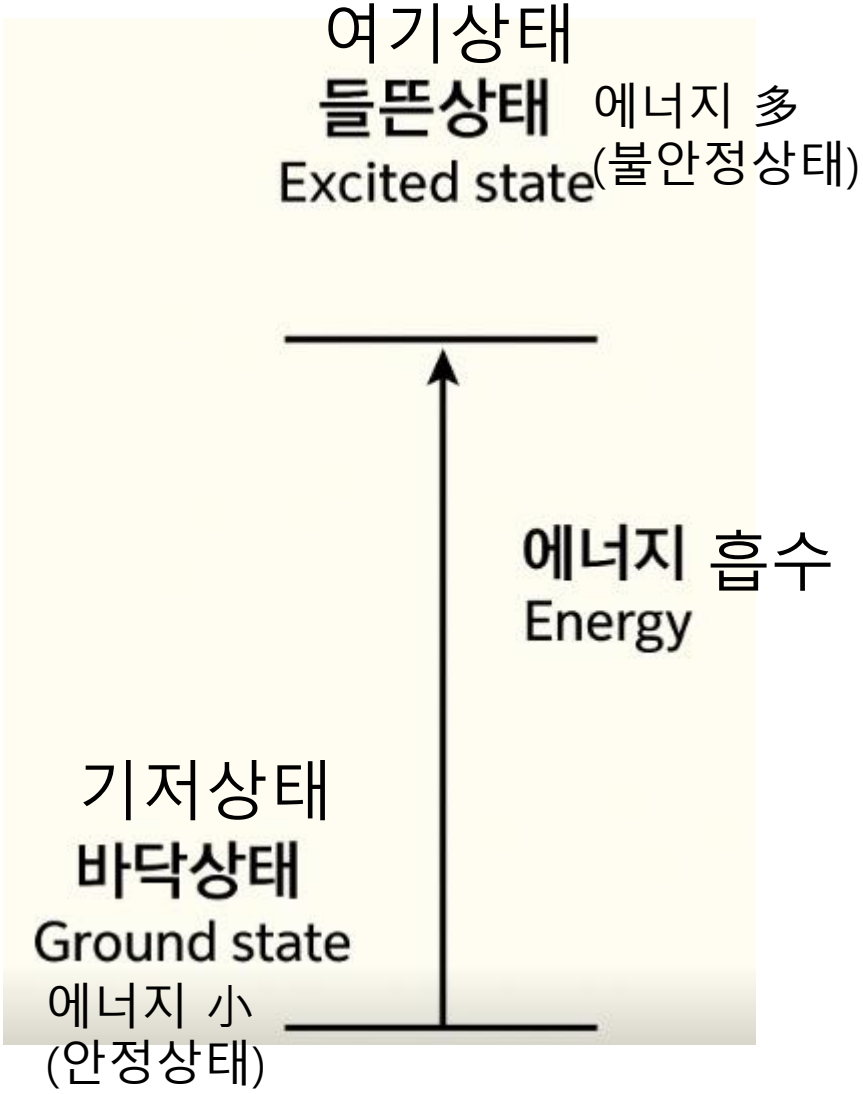
2) 원리: 화학 반응에 의해 일어나는 발광 현상 이용

: 들뜬 상태(Excited)의 분자가 기저상태(Ground)로 떨어지는 과정에서 그 에너지가 빛으로 방출

3) 측정 장비: 루미노미터(Luminometer)

4) 최근에는 면역 반응과 조합하여 사용

→ ChemiluminescenceImmunoassay(CLIA)



• 화학발광 분석(Chemiluminescence Analysis)

➢ 화학발광 광도계

*광원부 X

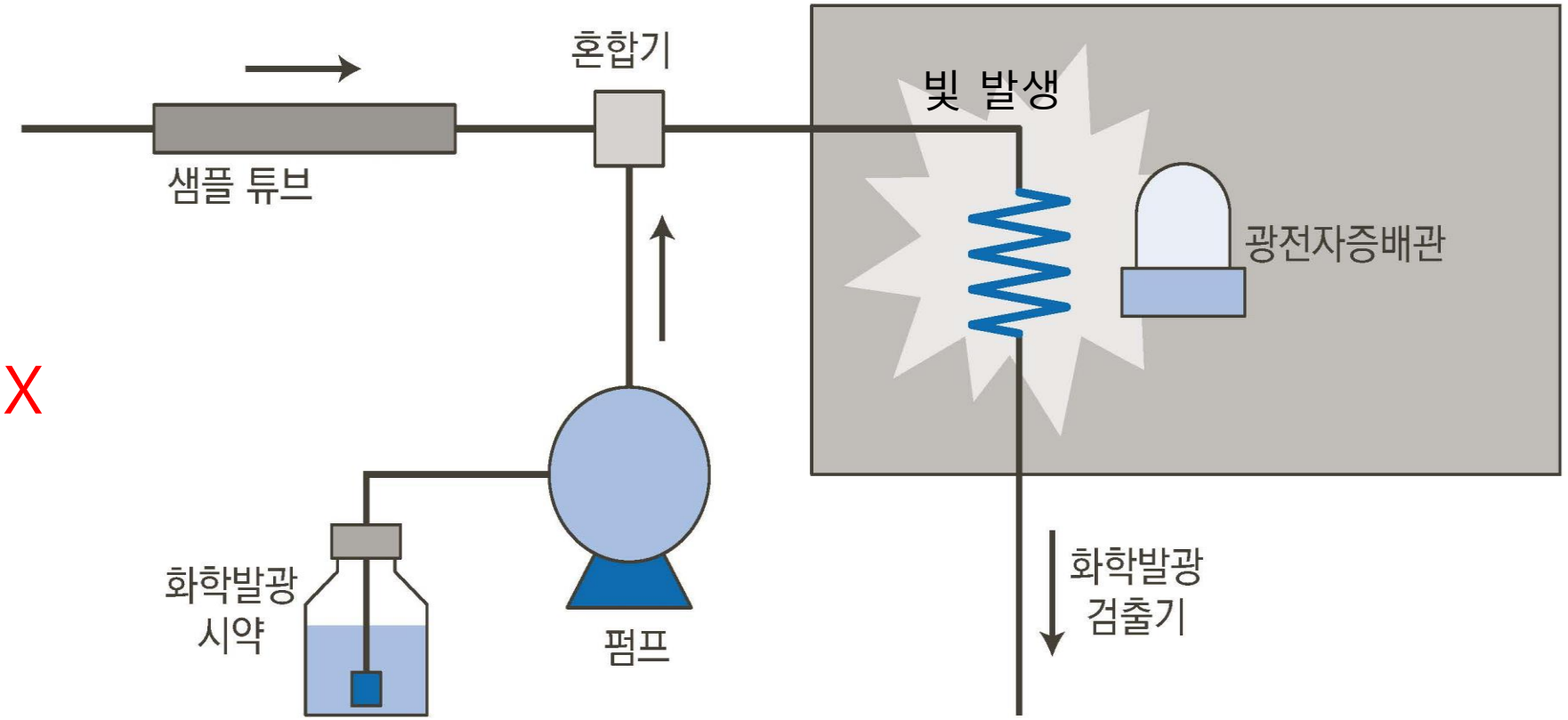
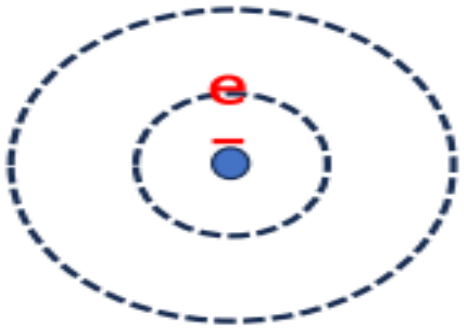
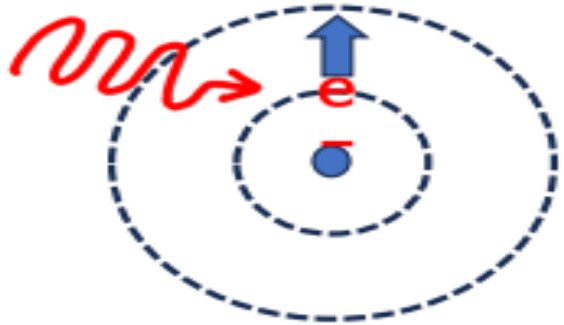


그림 5.17 ▶ 화학발광광도계

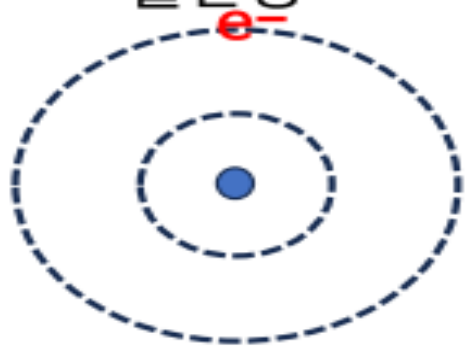
들뜬상태(여기상태) vs 바닥상태(기저상태)



빛(에너지)의 흡수(absorption)

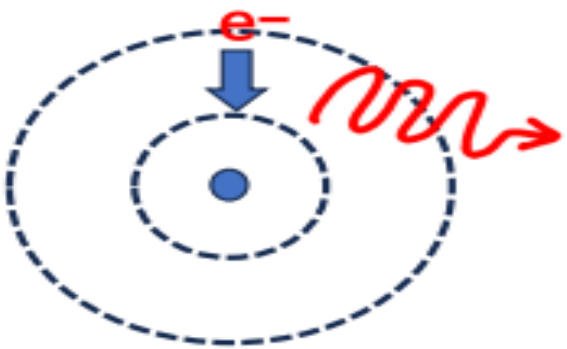


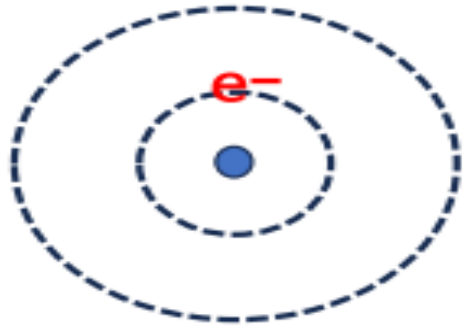
불안정



들뜬상태(여기상태)

빛(에너지)의 방출(emission)





바닥상태(기저상태)

- 광학분석(Optical Analysis)

➢ 광학분석법

1) 분광광도 분석법(Spectrometry)

2) 형광 광도법(Fluorometry)

3) 화학발광 분석(Chemiluminescence)

4) 원자흡광광도법
(AAS, Atomic Absorption Spectrometer)

5) 염광광도법(Flame photometry)

6) 반사율 광도 분석법
(Reflectance photometry)

7) 탁도 측정법
(Turbidimetry/Nephelometry)

※ 빛(에너지) 흡수, 방출

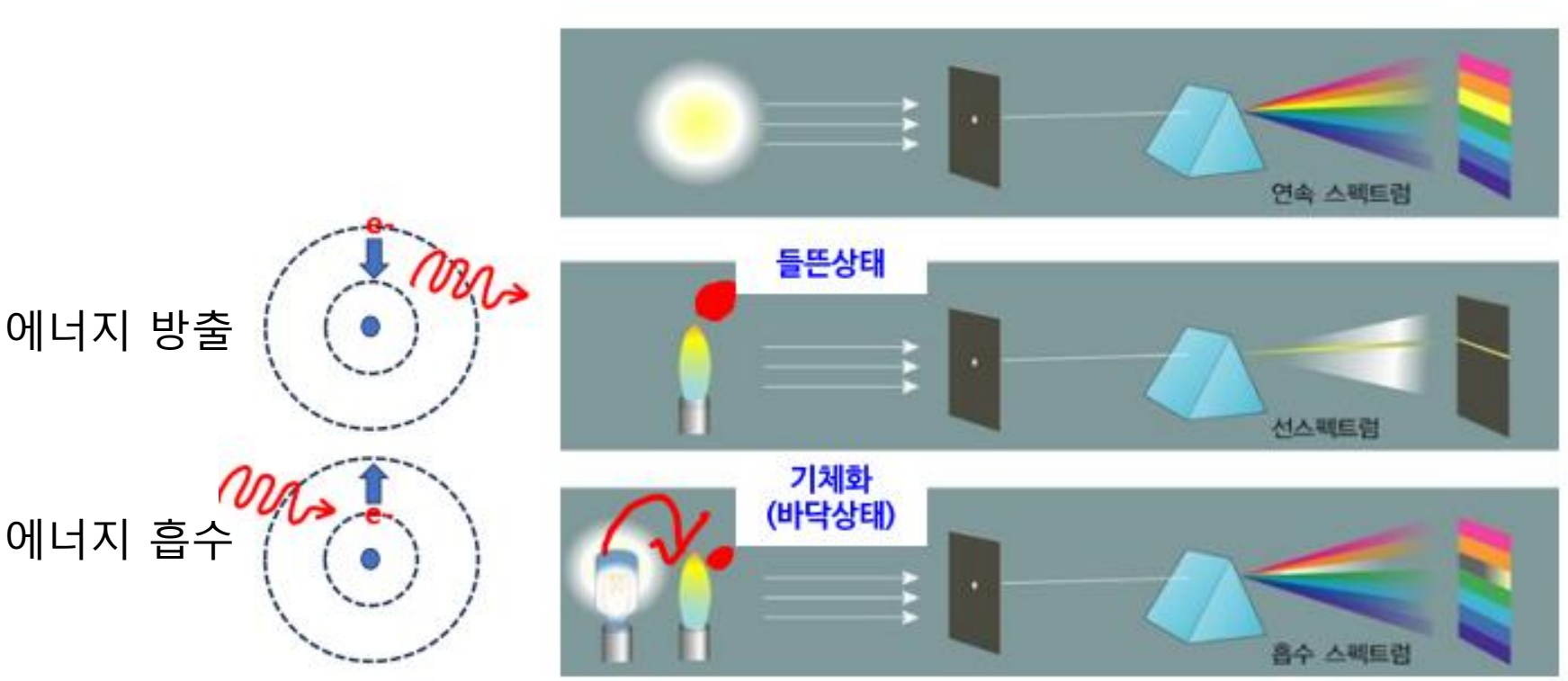


흡수(absorption) : 원자흡광분석법

방출(Emission) : 염광 분석법

- 전자의 바닥상태(기저상태, 안정화상태) → 빛, 열 → 에너지 흡수
- 전자의 들뜬상태(여기상태, 불안정화상태) → 전자 불안정 → 에너지 방출 → 빛, 열 방출 → 전자의 바닥상태

※ 스펙트럼(연속 vs 선 vs 흡수)





FEP 염광광도법
:어두운 바탕
에 밝은 색 선

AAS 원자흡광 광도법
:밝은바탕(연속스펙트럼)
에 어두운 선

- 연속 스펙트럼: 햇빛에서 나옴 → 색깔이 끊어지지 않고 연속적
- 선 스펙트럼: 각각의 화학 원소는 고유한 선 스펙트럼을 가짐 → 물질 구분 가능
  ex) 나트륨(황색), 칼륨(자색), 리튬(적색)
- 흡수 스펙트럼: 각각의 화학 원소는 고유한 흡수 스펙트럼을 가짐 → 물질 구분 가능

• 원자흡광광도법(Atomic Absorption Spectrophotometry, AAS)

➢ 원자흡광 광도계

- 금속원자가 빛을 흡수하는 것을 측정

- 금속원소 측정(미량 금속 원소)
(칼슘, 구리, 납, 리튬, 마그네슘, 수은, 아연 등)

- 광원: 속빈음극램프(Hollow Cathode Lamp)
→ 불활성 기체 포함(아르곤, 네온)

- 버너

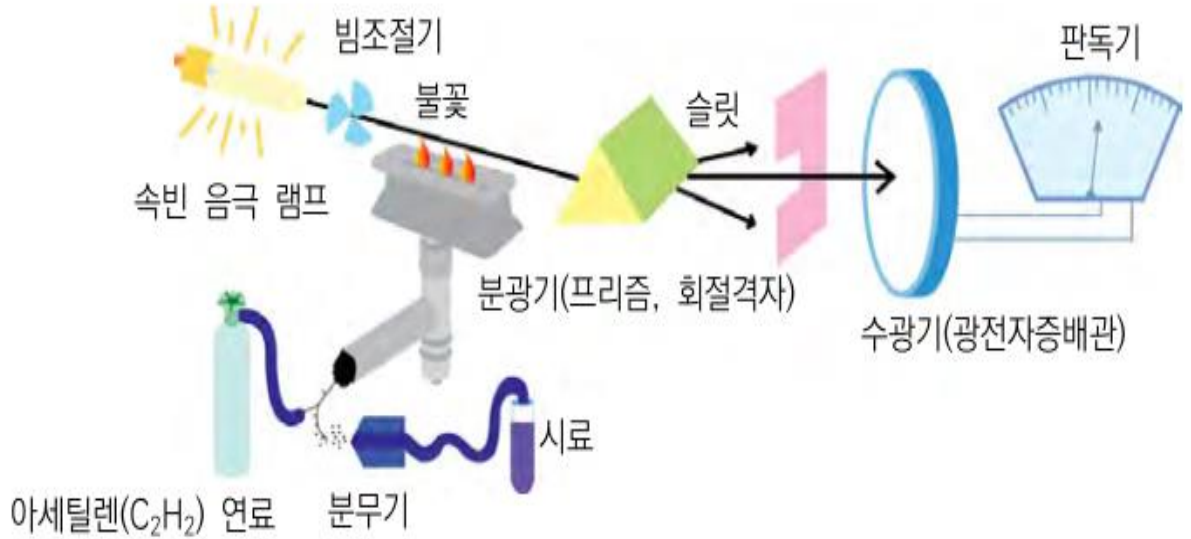
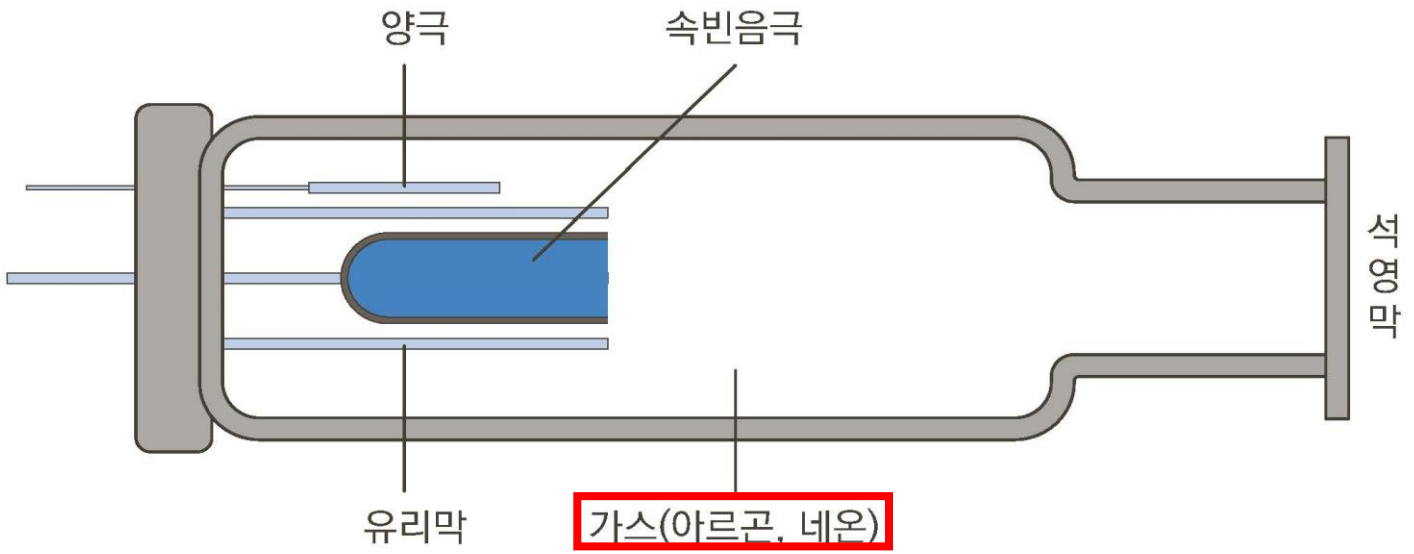
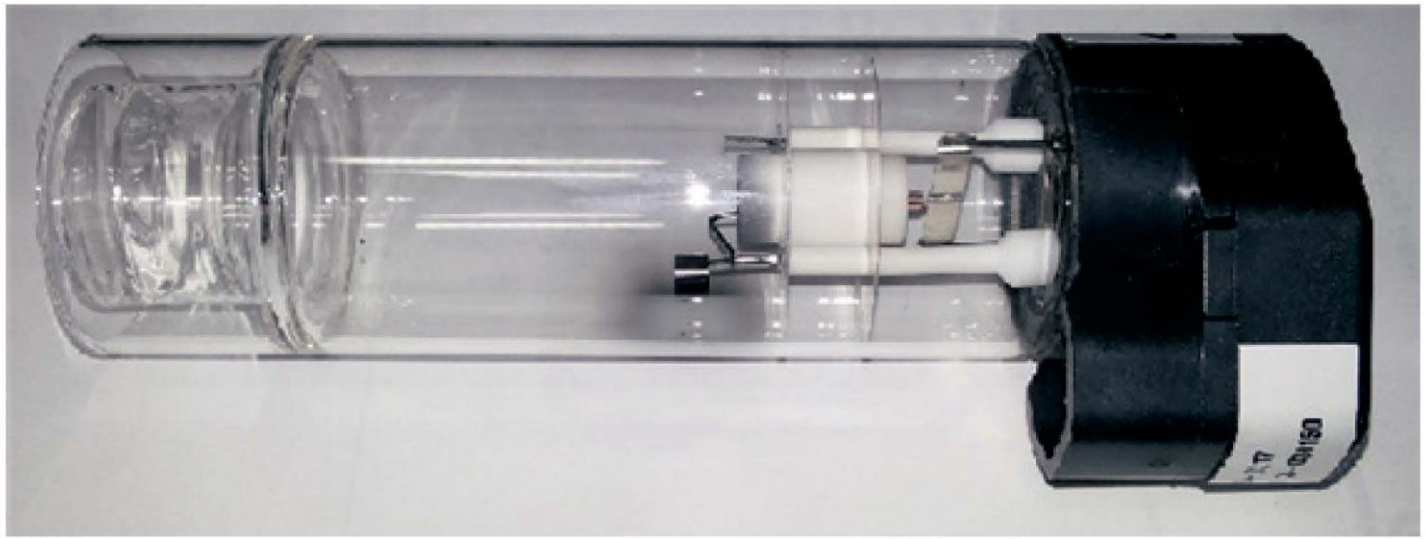


그림 4-13 원자흡광광도계의 기본 구조

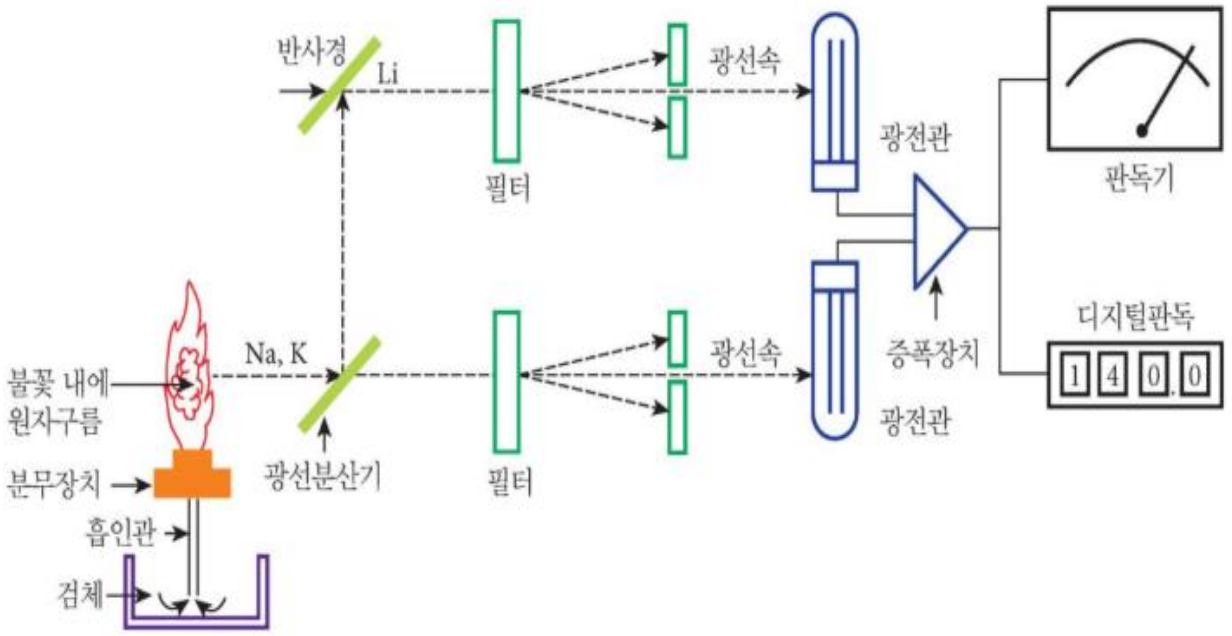
• 원자흡광광도법(Atomic Absorption Spectrophotometry, AAS)

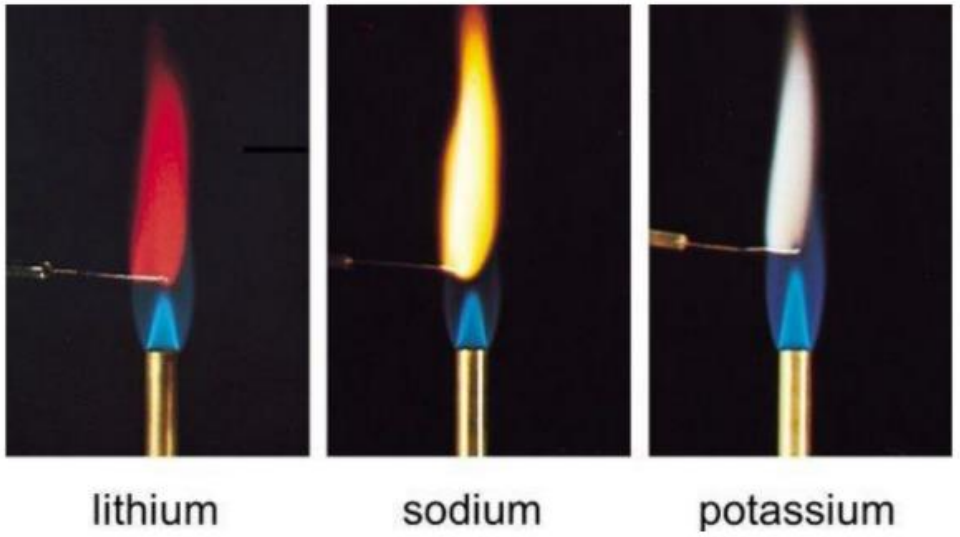




• 염광광도법(불꽃광도법): Flame photometer(FEP)

➢ 광원부와 시료부가 없음(현재는 사용 안함)





➢ Li: red / Sodium(Na): yellow / Potassium(K): violet / Magnesium: blue

- 광학분석(Optical Analysis)

➢ 광학분석법

1) 분광광도 분석법(Spectrometry)

2) 형광 광도법(Fluorometry)

3) 화학발광 분석(Chemiluminescence)

4) 원자광도분석법
(AAS, Atomic Absorption Spectrometer)

5) 염광분석법(Flame photometry)

6) 반사율 광도법
(Reflectance photometry)

7) 탁도 측정법
(Turbidimetry/Nephelometry)

- 반사율 광도법(Reflectance photometry)

➢ 반사율 광도법

- 건조된 시약과 시료를 반응시켜 목적 성분을 정량
- 반사된 빛을 측정하여 물질의 양을 구함
- **시약: 건조상태**, 시료: 액상(주로 혈청)
- **Beer-Lambert's법칙이 성립하지 않음**
- 주로 Dry chemistry방법으로 측정하는 장비에 사용
- 예시: 요 시험지(Urine dipstick)



<Urine dipstick>

- 반사율 광도법(Reflectance photometry)

➢ 반사율 광도계

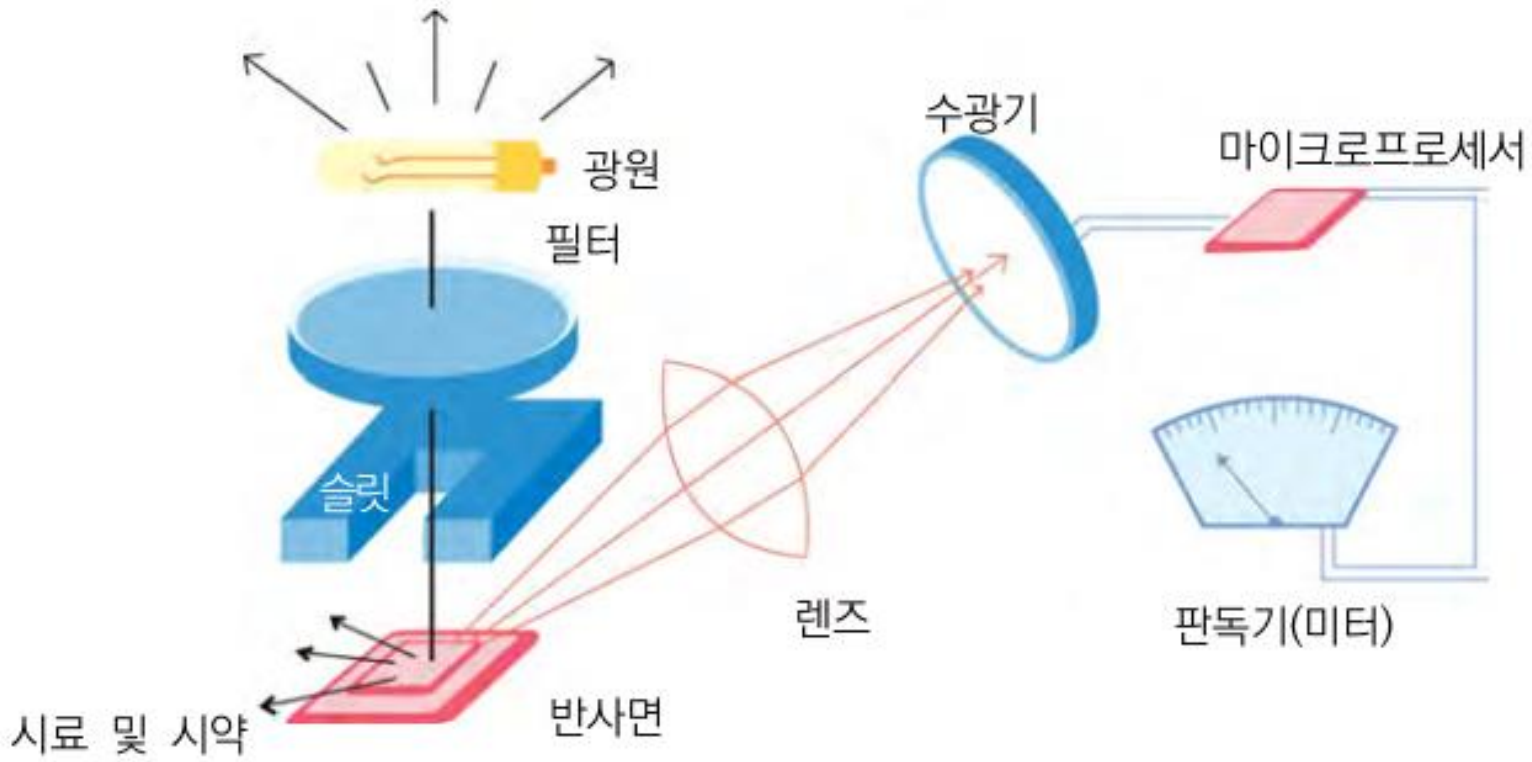
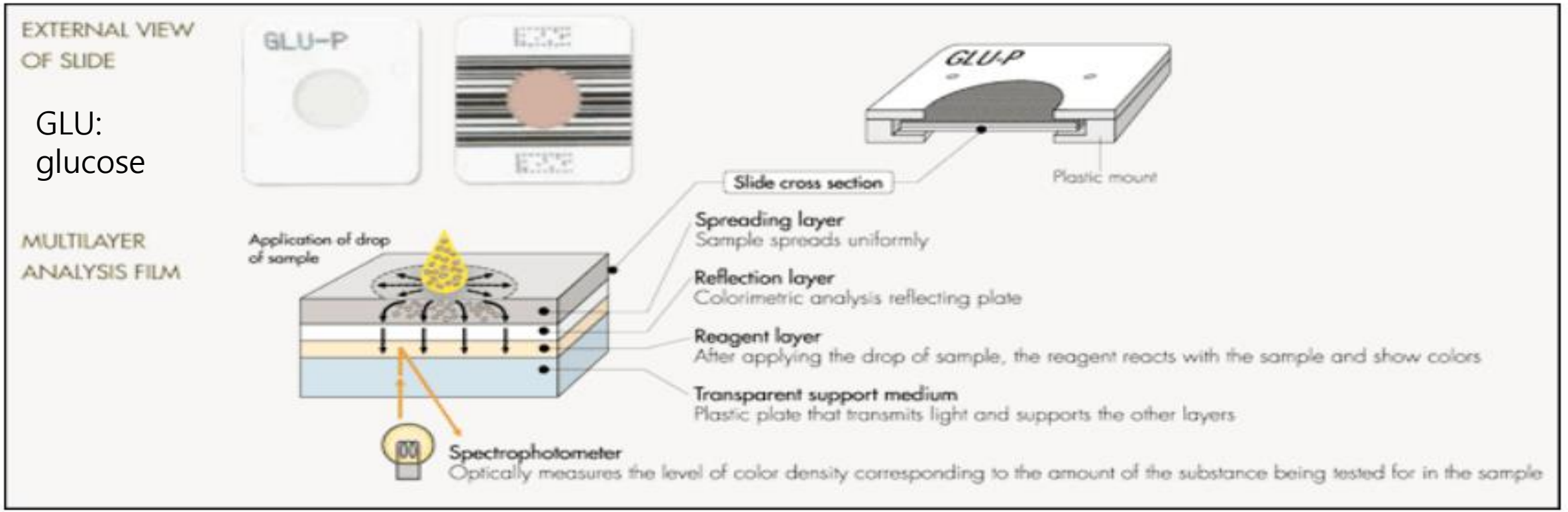


그림 4-16 반사율광도계

- 반사율 광도법(Reflectance photometry)

➢ Dry chemistry: 다층 필름 방식

- 시약층에서 시료와 시약을 반응 → 목적 성분의 농도에 의한 정색 정도에 따라 입사광과 반사광의 비율을 산출 → 성분 정량



- 반사율 광도법(Reflectance photometry)

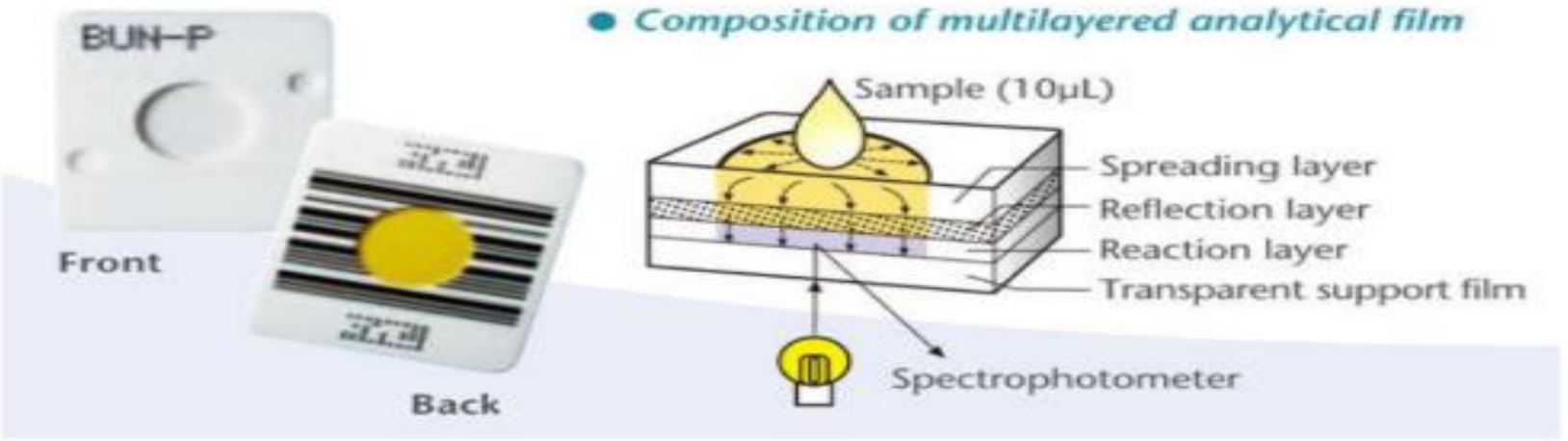






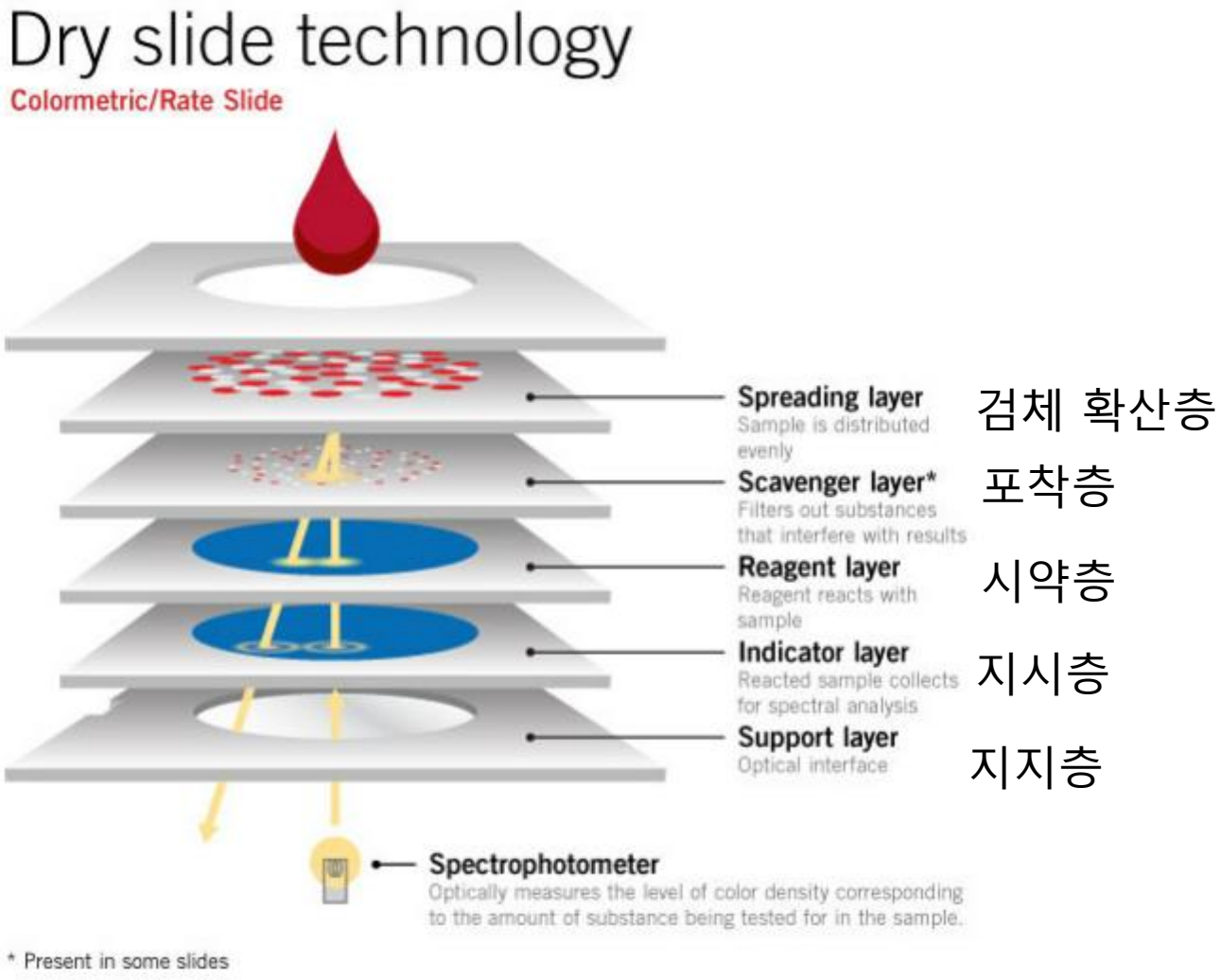






- 반사율 광도법(Reflectance photometry)

➢ Dry chemistry: 다층 필름 방식





• Dry chemistry vs Wet chemistry

항목	Dry chemistry	Wet chemistry
상태(시약)	고체(건조)상태	액체
간편성	간편한 검사 과정	복잡한 검사 과정
다양성	다양성 검사 불가능	다양한 검사 가능
정확도 · 정밀도	낮음	높음
적용분야	POCT	일반 검사실
시약 보관	보관 용이(냉장 불필요)	냉장 및 냉동 시설 필요
Beer-Lambert's 법칙	성립 하지 않음	성립함

- 탁도 측정법(Turbidimetry/Nephelometry)

➢ 산란광(scattered light)을 측정

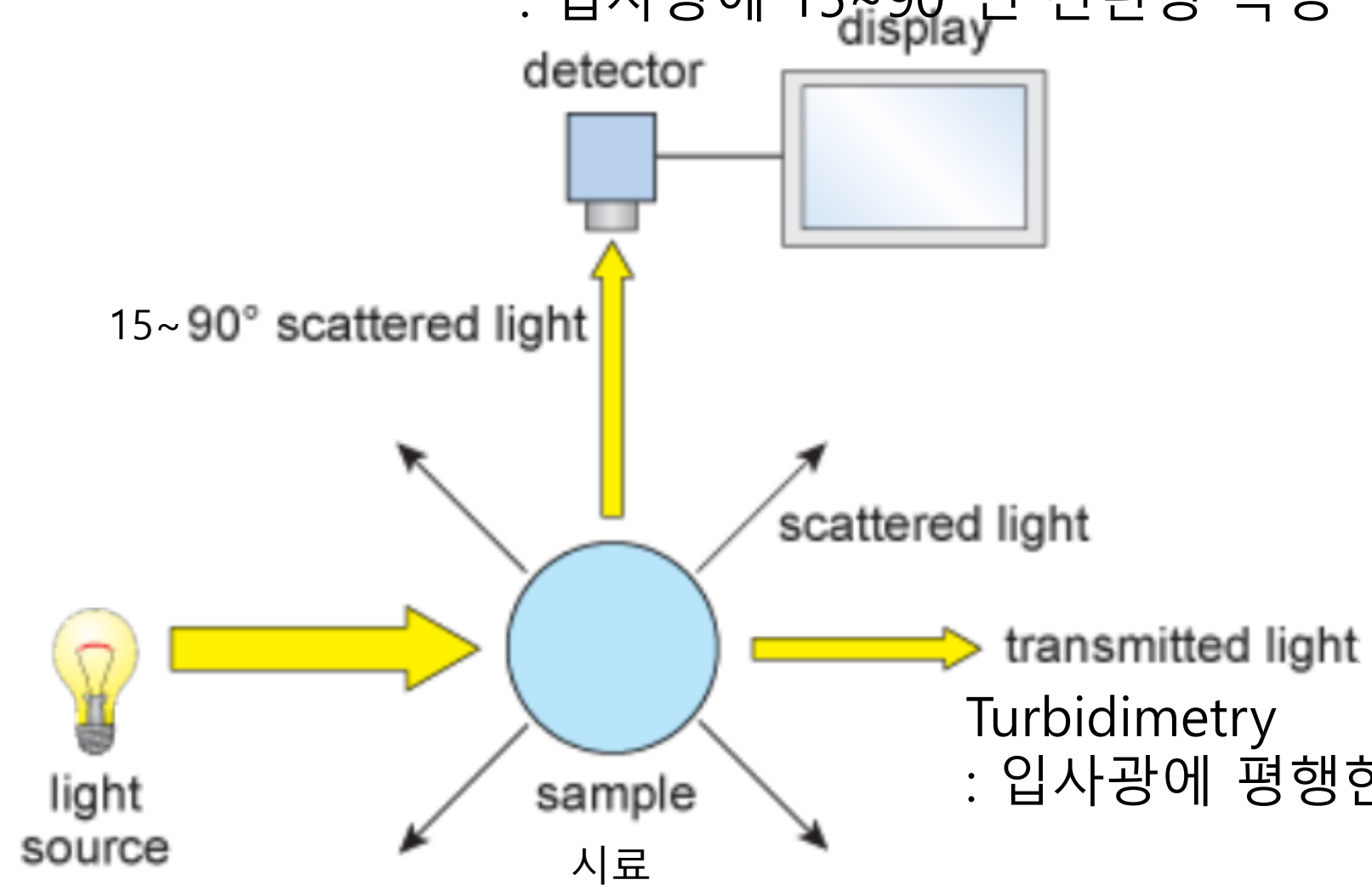
- 항원-항체 복합 면역분석 측정 ex) 면역글로불린
- 혈청 단백질 분석에 이용

➢ 분류

- Turbidimetry(비탁법) → '혼탁도 광도계'에 이용
- Nephelometry(네펠로법) → '산란광 광도계'에 이용

- 탁도 측정법(Turbidimetry/Nephelometry)

Nephelometry
: 입사광에 15~90°인 산란광 측정



Turbidimetry
: 입사광에 평행한 투과광 측정

광원: Laser