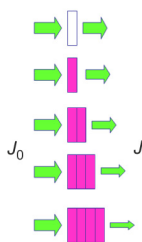
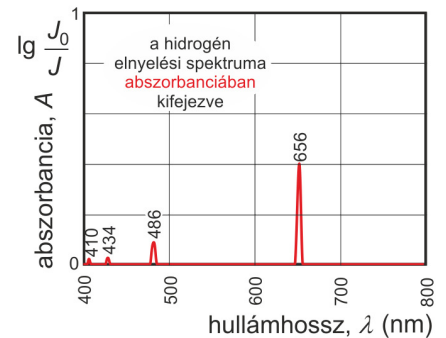
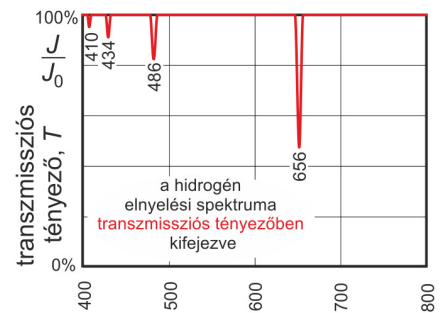
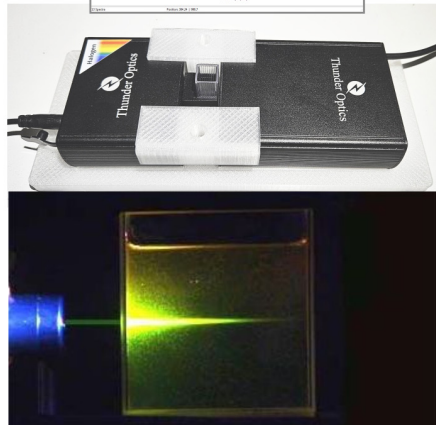
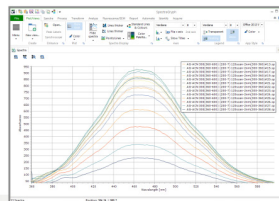
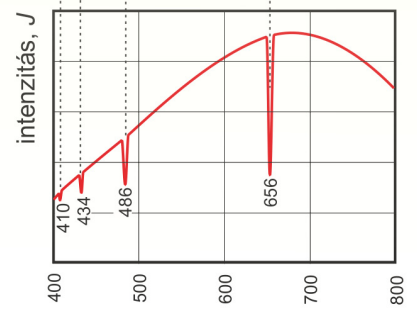
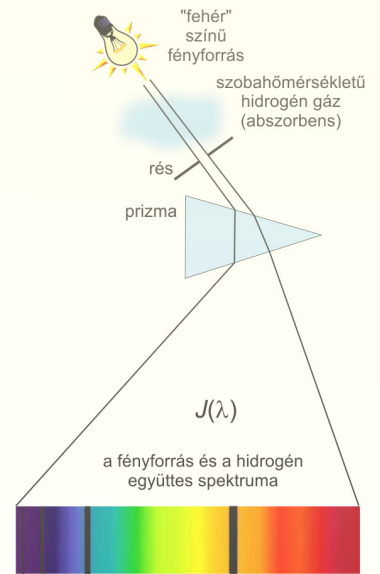
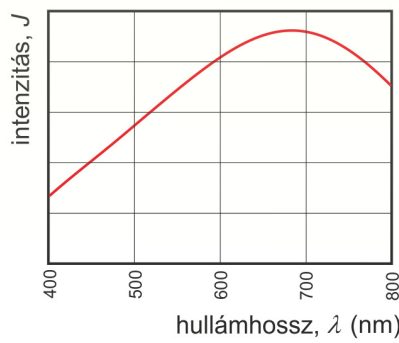
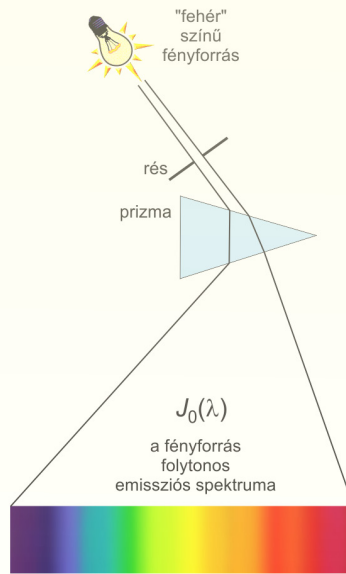
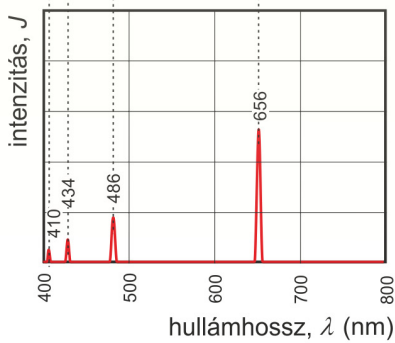
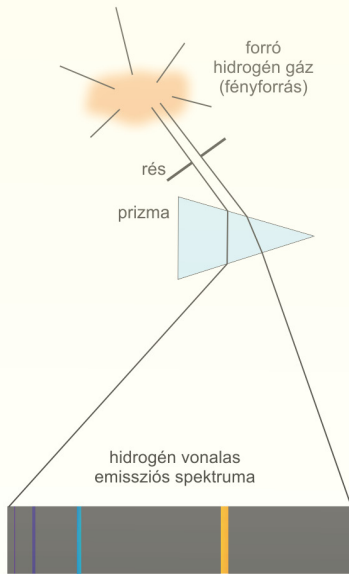


# FÉNYABSORPCIÓ

## A SPEKTROFOTOMETRIA FIZIKAI ALAPJAI



## ALAPFOGALMAK

**FÉNYABSORPCIÓ:** A fény fotonjainak elnyelődése az anyagban. Atomi szinten az elnyelt foton energiája a külső elektronok gerjesztésére fordítódik.

**EXTINKCIÓ ( $E$ ), OPTIKAI DENZITÁS ( $OD$ ):** Az anyagra merőlegesen beeső ( $J_0$ ) és a merőlegesen kilépő fényintenzitás ( $J$ ) hányadosának tízes alapú logaritmus (lg ( $J_0/J$ )).

**ABSORBANCIA ( $A$ ):** Az anyagra merőlegesen beeső ( $J_0$ ) és a merőlegesen kilépő fényintenzitás ( $J$ ) hányadosának tízes alapú logaritmus (lg ( $J_0/J$ )) akkor, ha a fény szóródásából eredő intenzitáscsökkenés elhanyagolható és csak fényabszorpció lép fel.

**MOLÁRIS EXTINKCIÓS EGYÜTTHATÓ ( $\epsilon(\lambda)$ ):** Az anyag fényelnyelésére jellemző, hullámhossztól és anyagi minőségtől függő mennyiség. Megadja az egységnyi koncentrációjú, és egységnyi rétegvastagságú oldat **optikai denzitását**. (Független az anyag vastagságától és koncentrációjától.)

**LAMBERT-BEER TÖRVÉNY:** Híg oldatokra érvényes összefüggés, mely szerint az oldat **abszorbanciája** arányos a koncentrációval ( $c$ ) és az anyag vastagságával ( $x$ ):  $\lg (J_0/J) = \epsilon(\lambda) \cdot c \cdot x$ , ahol az arányossági tényező a **moláris extinkciós együttható** ( $\epsilon(\lambda)$ ).

**KOMPLEMENTER SZÍNEK:** Az egymást additív színkeveréssel fehér fénné kiegészítő színek. Ilyen színpárok pl. a sárga-kék, a zöld-vörös, stb. Ha egy anyag egy bizonyos színt elnyel, az anyag visszavert, vagy áteső fényben látszó színe az elnyelt szín komplementere lesz.

A **gyakorlat célja** az abszorpciós spektroszkópia alapelveinek megismerése, továbbá különböző oldatok koncentrációjának meghatározása spektrofotometria segítségével.

A **biológiai struktúrák megismerésében** a fény és az anyag kölcsönhatásának vizsgálata nagy jelentőségű. A kölcsönhatás következtében az anyagra eső fény intenzitásának megváltozása hasznos információt nyújt a kölcsönhatásban levő molekulák elektron-, illetve térszerkezetére, valamint a molekulák koncentrációjára vonatkozóan. A spektrofotometriai eljárással a fényelnyelés hullámhossztól való függését vizsgáljuk, továbbá híg oldatok koncentrációját tudjuk meghatározni. Ezek együttvéve biztosítják a módszer széleskörű alkalmazási lehetőségét a biológiában és az orvosi gyakorlatban.

Az egyik legfontosabb alkalmazási terület a **laboratóriumi diagnosztika**. A vérben, vizeletben és egyéb testfolyadékokban különböző anyagok (pl. glükóz, koleszterin, stb.) koncentrációját abszorpció mérése alapján határozzák meg.

## ELMÉLETI ÖSSZEFOGLALÁS

Egy anyagrétegen áthaladó fénynyaláb a fény elnyelődése (abszorpciója), illetve szóródása miatt gyengül. A gyakorlaton vizsgált híg oldatoknál a szóródás elenyésző, ezért a gyengülést a fény abszorpciója okozza (1. ábra). Az abszorpció mértékének jellemzésére leggyakrabban az **abszorbancia** ( $A$ ) mennyiséget használjuk:

$$A = \lg \frac{J_0}{J}, \quad (1)$$

ahol  $J_0$  az anyagba merőlegesen belépő,  $J$  pedig a merőlegesen kilépő fény intenzitása. Ha a vizsgált oldatban a fényszóródás elhanyagolható, akkor az abszorbancia értéke megegyezik az **extinkcióval** ( $E$ ), vagy **optikai denzitással** ( $OD$ ).

Az anyagokat elnyelőképességük alternatívájaként átteresztőképességükkel is jellemezhetjük. Áteresztőképésen, vagy **transzmissziós tényezőn** ( $T$ ) a

$$T = \frac{J}{J_0} \cdot 100 (\%) \quad (2)$$

hányadost értjük, amit legtöbbször százalékban adunk meg. Az alábbi táblázat a fent megismert mennyiségek közötti összefüggésekre világít rá.

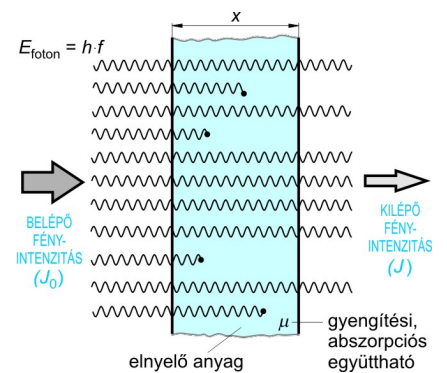
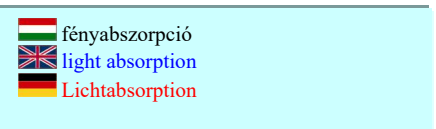
abszorpció:	$J_0$ (rel. egys)	$J$ (rel. egys)	$J_0/J$	$A = \lg (J_0/J)$	$T = J/J_0$ (%)
nincs	100	100	1	0	100%
kicsi	100	50	2	0,301	50%
közepes	100	10	10	1	10%
nagy	100	1	100	2	1%
végtelen	100	0	$\infty$	$\infty$	0%

Az abszorpció mértéke különböző hullámhosszakon más és más lehet, ezt mutatja meg az **abszorpciós spektrum**, ahol az abszorbanciát ábrázoljuk a hullámhossz függvényében.

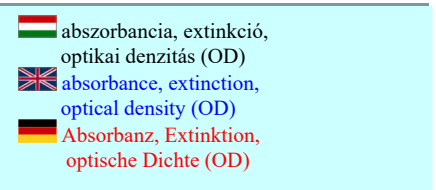
Az atomok, molekulák abszorpciós spektruma összefügg elektronszerkezetükkel. A kötött elektronok ugyanis különböző, jól meghatározott (kvantált) energiájú állapotokban létezhetnek. Ennek megfelelően azt várjuk, hogy ha az alapállapotú elektronnal pontosan akkora energiát közlünk, ami megfelel valamely magasabb kötött állapot energiaszintjére ( $E_2$ ) és az adott alapszint energiájára ( $E_1$ ) közötti különbségnek, akkor az elektron gerjesztett állapotba kerül. Így, ha egy ilyen atomokból álló rendszert ennek az energiakülönbségnek ( $E_2 - E_1$ ) megfelelő energiájú (frekvenciájú, hullámhosszú, színű) fénnyel világítunk meg, akkor a rendszer a fotonok egy részét elnyeli, abszorbeálja:

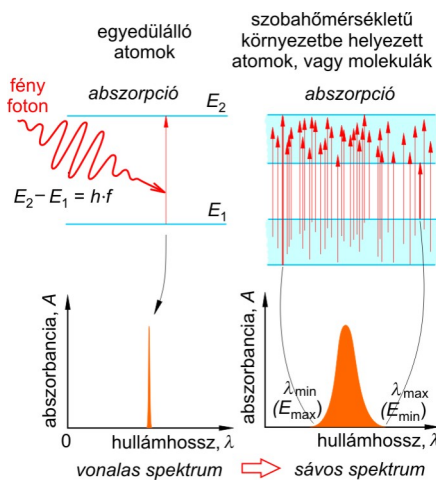
$$E_2 - E_1 = E_{\text{foton}} = h \cdot f = h \frac{c}{\lambda}, \quad (3)$$

ahol ( $E_2 - E_1$ ) a gerjesztéshez szükséges energia,  $E_{\text{foton}}$  a foton energiája,  $h$  a Planck állandó,  $f$  a fény frekvenciája,  $\lambda$  a hullámhossza,  $c$  a fénysebesség.

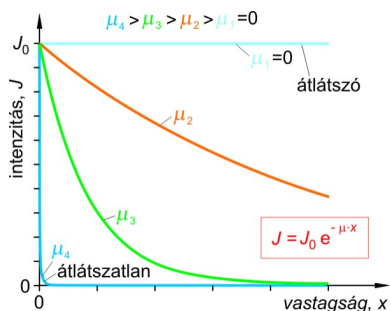


1. ábra. A fény elnyelődése az anyagban.

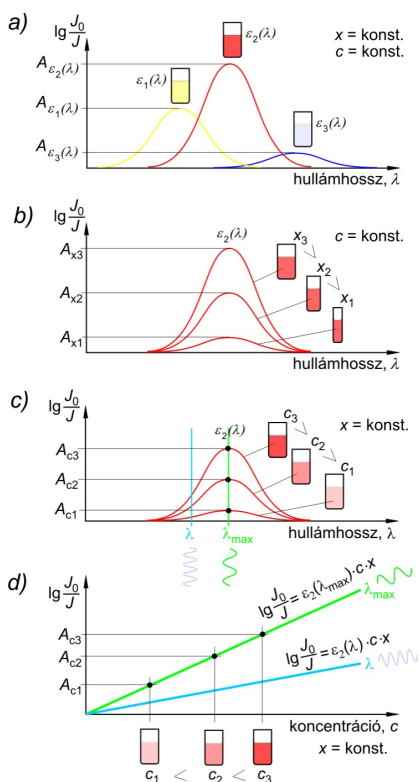




2. ábra. A fény elnyelésének atomi szintű folyamata, ill. a vonalas spektrum sávossá szélesedése.



3. ábra. A közegben haladó fény intenzitásának függése a rétegvastagságtól különböző gyengítési együtthatók esetén.



4. ábra. Abszorpciós spektrum függése a) az anyagtól, b) a vastagságtól, és c) a koncentrációtól. d) Az abszorbancia koncentrációfüggése (két különböző hullámhosszon).

A gerjesztés után a rendszer a kapott többletenergiát leadva igyekszik visszakérülni az alapállapotba. Ez a folyamat a legtöbb esetben sok kis lépésben történő hőleadást jelent a környezet számára (relaxáció).

A fentiekben vázolt egyszerű gondolatmenet nem ad választ arra, hogy mi az oka annak, hogy azonos típusú molekulák oldatainak abszorpciós spektruma nem az elméletnek megfelelő, diszkrét fotonenergiáknál (hullámhosszagnál) jelentkező éles maximumokból (vonalakból) áll, hanem jelentősen kiszélesedett „sávok” alkotják. Az sem ad erre kielégítő magyarázatot, ha tudjuk, hogy molekulák esetén az elektronok energiaállapotait kismértékben megváltoztatják a molekula rezgési és forgási állapotai.

A kiszélesedés jelensége két tényezőre vezethető vissza. Az egyik az, hogy a molekulák valamilyen, oldószerben oldott állapotban (környezetben, egymáshoz igen közel) vannak jelen, a másik pedig, hogy a mérések általában szobahőmérsékleten, 290 - 300 K környékén történnek. A környezet, azaz az oldószer molekuláinak jelenléte, illetve azok jelentős mértékű hőmozgása már önmagában is kiszélesedést okoz. Ehhez azonban még hozzájárul az is, hogy az oldott anyag molekuláinak állapotait a környezettel (oldószerrel) való kölcsönhatások kis mértékben megváltoztatják, tehát a sok-sok molekula nem azonos, hanem kicsit eltérő energiával gerjeszhető (2. ábra).

A fényelnyelés mértékét a fényszóródás említett elhanyagolása miatt az általános gyengülési törvényéből kiindulva kaphatjuk meg:

$$J = J_0 e^{-\mu \cdot x}, \quad (4)$$

ahol  $J_0$  a közegbe merőlegesen belépő,  $J$  a közegből merőlegesen kilépő fény intenzitása,  $\mu$  az anyag minőségére, illetve a kölcsönható fény hullámhosszára is jellemző sugárgyengítési együttható,  $x$  pedig az elnyelő réteg vastagsága (3. ábra).

A (4) összefüggésből kifejezhető a korábban bevezetett abszorbancia:

$$A = \lg \frac{J_0}{J} = \lg e \cdot \mu \cdot x. \quad (5)$$

**Híg oldatok** esetében — ha az adott hullámhossz tartományban az oldószer nem abszorbeál (átlátszó, mint pl. a látható tartományban a víz, vagy az alkohol) a  $\mu$  abszorpciós együttható arányos az oldat koncentrációjával ( $c$ ), és a (5) összefüggés jobb oldala az alábbiak szerint választható szét:

$$\lg e \cdot \mu \cdot x = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot x, \quad (6)$$

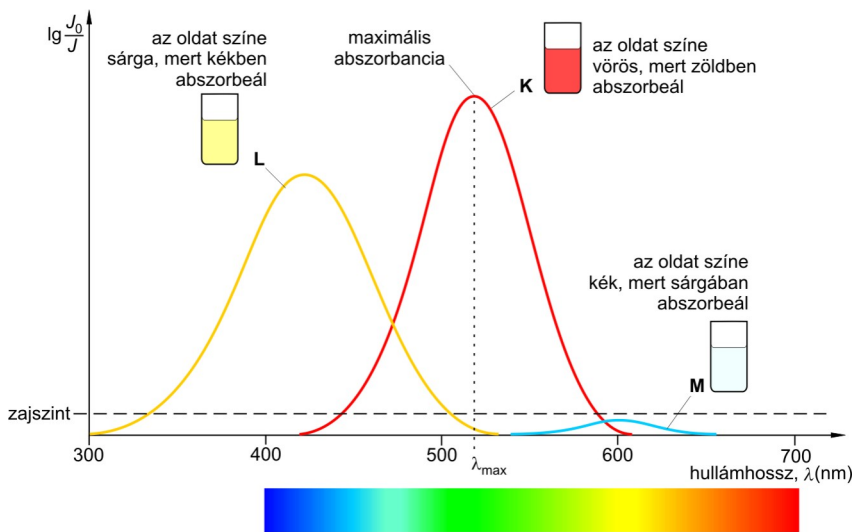
ahol  $\varepsilon(\lambda)$  az ún. **moláris extinkciós együttható** (röviden extinkciós együttható), amelynek értéke az anyagra jellemző módon függ a hullámhossztól. Megadja az egységnyi koncentrációjú és egységnyi rétegvastagságú oldat optikai denzitását. (Független az anyag vastagságától és a koncentrációtól. A moláris jelző arra utal, hogy a  $c$  koncentrációt M-ban, azaz mol/l-ben mérjük.) Híg oldatokra érvényes a **Lambert-Beer törvény**:

$$\lg \frac{J_0}{J} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot x. \quad (7)$$

Abszorpciós spektrumként leggyakrabban az abszorbancia ( $\lg(J_0/J)$ ) hullámhossz szerinti eloszlását adják meg (4. a., b., c. ábra). A (7) összefüggés szerint tehát az oldat **abszorbanciája** függ az oldat **anyagától** (4. a. ábra), arányos az oldat **vastagságával** (4. b. ábra) és az oldat **koncentrációjával** (4. c. ábra). Egy oldat abszorbanciáját ( $A$ ) megmérve, az  $\varepsilon(\lambda)$  és az  $x$  ismeretében a koncentráció meghatározható. Ezt használják ki az orvosi laboratóriumi diagnosztikában. A 4. d. ábrán az egyenesek eltérő meredekségéből látható, hogy az  $\varepsilon(\lambda)$  minden hullámhosszon más és más. A koncentráció legpontosabban az abszorpciós spektrum maximumának hullámhosszán ( $\lambda_{\max}$  a 4. c. ábrán) határozható meg, ugyanis az ehhez tartozó egyenes a legmeredekebb (4. d. ábra). Ez az ún. **kalibrációs görbe**.

## AZ ABSZORPCIÓS SPEKTRUM TULAJDONSÁGAI ÉS MÉRÉSE

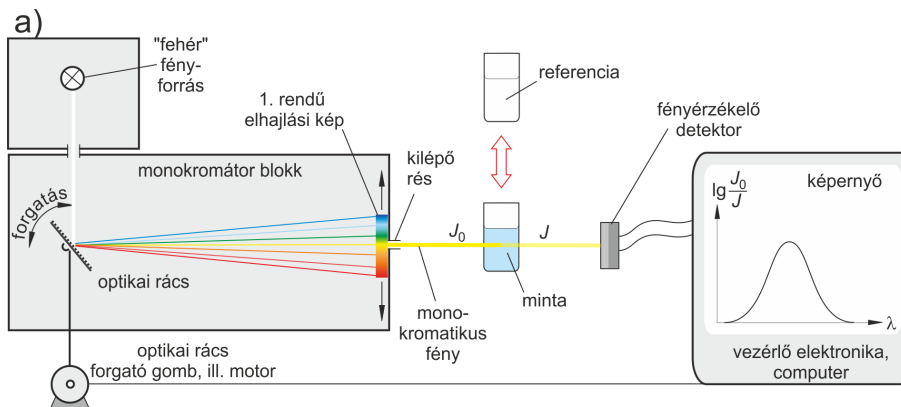
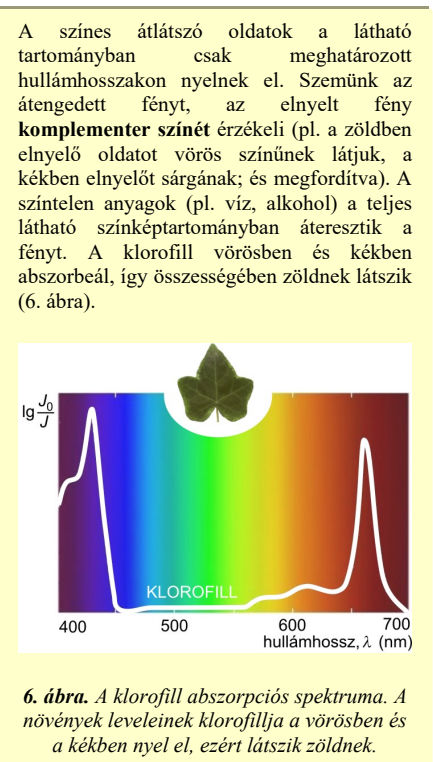
Az 5. ábrán három különböző anyag azonos koncentrációjú és rétegvastagságú oldatának abszorpciós spektrumát mutatjuk be (L, K és M görbék). Látjuk, hogy a különböző anyagok különböző hullámhossz-tartományokban abszorbeálnak és hogy abszorpciós tartományaikban extinkciós együtthatóik ( $\varepsilon(\lambda)$ ) lényegesen különböznek egymástól (a görbék magassága eltérő).



5. ábra. Három különböző anyag azonos koncentrációjú és rétegvastagságú oldatának abszorpciós spektruma. Az M jelű oldat annyira színtelen, hogy a spektrofotométer zajszintje miatt nem mérhető.

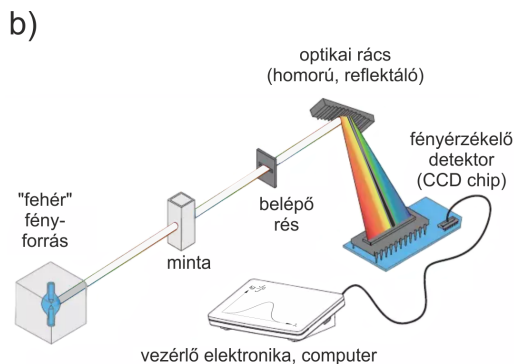
Az abszorpciós spektrum maximumának helyei (egy oldat esetén több maximum is lehetséges!) kapcsolatba hozhatók — a (3) összefüggés figyelembe vételével — a molekulaszervezetre jellemző elektrongerjesztési energiákkal.

Ha azonban ugyanazon oldat különböző koncentrációit ( $c$ ) vizsgáljuk, a maximum nagysága — azonos rétegvastagság mellett — az oldat koncentrációjával egyenes arányban változik (lásd (7) összefüggés, és a 4. c. ábra). Ezt az arányosságot koncentráció-meghatározásra használhatjuk fel.



7. ábra. Klasszikus (a) és modern (b) abszorpciós spektrofotométer felépítése.

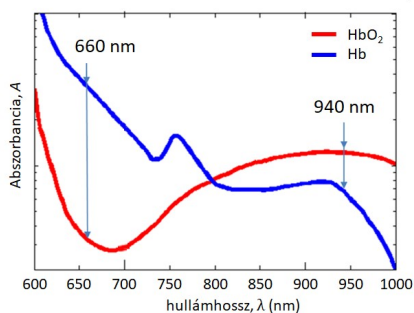
Az abszorpciós spektrumokat abszorpciós spektrométerrel (spektrofotométerrel) mérjük meg (7. ábra). Az egyszerűbb felépítésű spektrométerrel minden hullámhosszon külön méri a minta és a referencia (oldószer) hullámhossztól függő abszorbanciáját. Korszerűbb berendezések széles (pl. 190 - 900 nm) hullámhossz tartományban automatikusan dolgoznak, amely magában foglalja a láthatón kívüli ultraibolya (UV,  $\lambda < 400$  nm), ill. infravörös (IR,  $\lambda > 800$  nm) tartományt is. Az ún. kétutas spektrométerek egyidőben veszik fel a minta és a referencia adatait, így az abszorbancia hullámhosszfüggvénye a beépített számítógép segítségével azonnal megjeleníthető.



A referencia-oldat mérésére azért van szükség, hogy a detektor hullámhossztól függő érzékenységét, ill. az oldószer esetleges színességét (hullámhossztól függő abszorbanciáját) figyelembe vehessük.

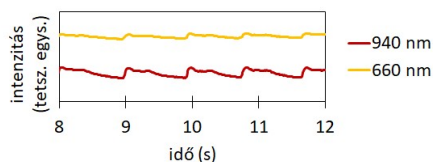
A spektrofotometriai módszer alkalmas komplexek vizsgálatára is. (A komplex olyan vegyület, amelyben a kémiai kötés létrehozásában a fémion  $d$  elektronpályái is részt vesznek.) A biológiai szempontból fontos fehérjék egyik csoportja, a kromoproteidok proszretikus csoportjai (koenzimok) közül több (pl. hemin, citokrómok) szerves vegyületek (ligandum) és fémionok komplexe. A fémionok a szerves vegyület elektronszerkezetét megváltoztatják, aminek következtében a vegyületek fényelnyelésében (színében) és biológiai funkcióiban is változás áll be. Egyaránt fontos lehet e komplexek mennyiségének (koncentrációjának) és stabilitásának a meghatározása. Ezekre a kérdésekre is választ kaphatunk spektrofotometriai úton.

A gyakorlaton bemutatjuk az Ames MiniLab PC **mini-fotométert**, amely alkalmas hemoglobin koncentráció meghatározására teljes vérben, urea, glükóz, bilirubin (felnőtt és újszülött), koleszterin, HDL-koleszterin, triglicerid koncentráció meghatározására szérumban vagy plazmában. Minden esetben alkalmasan megválasztott reagenssel való reakció után 546 nm-en történő abszorbanciamérésre vezetjük vissza a koncentráció meghatározását.



8. ábra. A hemoglobin és az oxigénnel telített hemoglobin abszorpciós spektruma.

Fontos szerepe van a hemoglobin fényelnyelésének a napjainkban rohamosan fejlődő optikai tomográfiában is, amely a szöveteken áthaladás közben szóródó infravörös fény intenzitásának változásai alapján hozza létre a képet. Mivel a hemoglobin abszorpciója az infravörös tartományban sokkal jelentősebb, mint általában a szövetalkotó sejteké, ha vérben gazdag szöveten halad át a fény, akkor a szórt fény intenzitása csökken. Ennek alapján lehetőség van pl. az agy oxigén ellátásának vizsgálatára, vagy a koponyában kialakult hematoma méretének és helyének meghatározására.



9. ábra. Pulzoximéterrel mért tipikus regisztrátum.

A fentiek alapján híg színes oldatok koncentráció-meghatározását a látható tartománybeli abszorbancia mérésére vezethetjük vissza, ami méréstechnikailag viszonylag egyszerű feladat és a módszer automatizálásra is kiválóan alkalmas. Ezért az orvosi laboratóriumokban az utóbbi időben arra törekszenek, hogy az ismeretlen koncentrációjú és igen kis extinkciós együtthatójú (gyakorlatilag szintelen) oldatokat alkalmas reagens segítségével nagy extinkciós együtthatójú színes oldatokká alakítsák át. A reagens kellő fölöslege esetén a termék koncentrációja megegyezik az eredetileg meghatározni kívánt koncentrációval. Így a termékre vonatkozó és előzetesen felvett koncentráció-abszorbancia kalibrációs grafikon segítségével az ismeretlen koncentráció spektrofotometriai úton, az abszorbancia akár csak egy hullámhosszon való megméréssel meghatározható.

## A MÉRÉS MENETE

### 1. BEMUTATÓ MÉRÉS — PULZOXIMETRIA

Az oxigén felvétel és szállítás szempontjából fontos hemoglobin molekula pulzoximetriás vizsgálata azon alapul, hogy a különböző állapotú hemoglobin molekulák optikai spektruma eltérőek (8. ábra). Az oxigénnel telített hemoglobin ( $HbO_2$ ) abszorbanciája 650-700 nm-en alacsony, míg 900 nm felett, az infravörös tartományban jellemzően magasabb. Az oxigénnel nem telített hemoglobin spektruma ( $Hb$ ) ezzel ellentétesen fut. A pulzoximetria során adott hullámhosszú fényrel átvilágítunk egy viszonylag vékony testrészt (pl.: ujjbegy vagy fülcimpa) és a másik oldalon mérjük a kilépő fény intenzitását. Ebben a vékony szövetben az artériás vérben kívüli szövetek fényelnyelését állandónak tekintjük, így a kilépő fény intenzitásának változása az artériás vér mennyiségének változásától fog függeni. Mivel az artériás vér mennyisége a szívfrekvenciának (pulzus) megfelelően pulzáló jeleget mutat, a mért jelen is meg fog jelenni ez a pulzálás (9. ábra). Innen ered az eljárás elnevezése („pulzoximetria”) is. (Bizonyos készülékek ferdén beeső, majd részben elnyelődő és részben szóródó fénynyalábbal dolgoznak, esetükben nem szükséges a kérdéses testrészt teljes átvilágítása.) A mért abszorbancia a Lambert-Beer törvény alapján a vizsgált szövet rétegvastagságától is függ, ez azonban pontosan nem ismert és páciensenként eltérő. Annak érdekében, hogy az oxigénnel telített hemoglobin koncentrációját meghatározhassuk, két eltérő hullámhosszú fénynyalábot alkalmazunk (pl. 660 nm hullámhosszú vörös és 940 nm hullámhosszú infravörös). A két eltérő hullámhosszon mért abszorbanciák arányából egy tapasztalati képlet segítségével kiszámítható az oxigénszaturáció.

Az oxigénfelvétel mértékét azonban nem csak a hemoglobin koncentráció nagysága határozza meg. A hemoglobin molekula hatékony oxigén megkötése nagymértékben függ a hem-csoportokban található vas ionok oxidációs állapotától is. A methemoglobinban található  $Fe^{3+}$  ion például nem alkalmas oxigén megkötésre, így a fiziológiás funkció ellátására sem. A hemoglobin molekulában lévő  $Fe^{2+}$  ionok is csak akkor képesek az oxigén felvételére, ha a vasionok megfelelő kötőhelye szabad (deoxyhemoglobin), vagy csak lazán kötött ligandumot tartalmaz ( $CO_2$ ). Az erős kovalens kötéssel kapcsolódó ligandumok, mint például a CO molekula, vagy a  $CN^-$  ion a hemoglobin normális működését megbénítja. Mivel a vas ionok oxidációs száma és kémiai környezete a hemoglobin molekula fényrel való kölcsönhatását és így az abszorpciós spektrumát is módosítja a spektrumok alapján a vérben található hemoglobin típusára, az esetleges patológiás elváltozásokra is felvilágosítást kaphatunk.

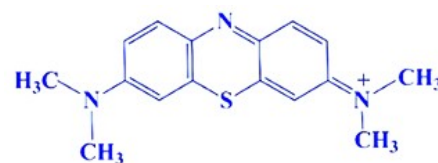
### 2. METILÉNKÉK KONCENTRÁCIÓJÁNAK MEGHATÁROZÁSA

Modellanyagként metilénkék vizes oldatát használjuk. A **metilénkék** (10. ábra) oldata kék színű (sárgában nyel el), igen nagy extinkciós együtthatójú. A gyakorlaton ezért nagy hígításban vizsgáljuk az anyagot.

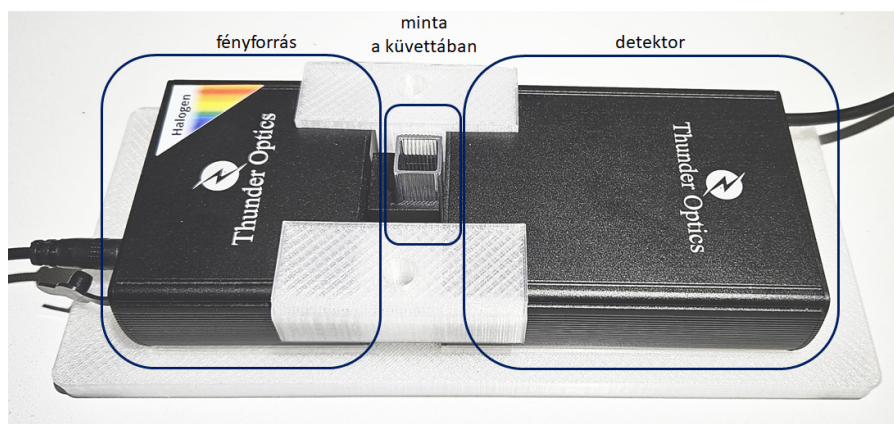
A metilénkék oldat abszorpciós maximumához tartozó hullámhossz ( $\lambda_{max}$ ) megállapítása céljából felvesszük az oldatok abszorpciós spektrumait. A spektrumok felvételét a Thunder Optics spektrofotométer segítségével (11. ábra), egyénileg végezzük.

## FELADATOK

1. Felvesszük az ismert koncentrációjú oldatok abszorpciós spektrumait.
2. A legtöményebb oldat spektrumán leolvassuk és jegyzőkönyvbe vezetjük a  $\lambda = 400, 450, 500, 550, 600, 620, 640, 660, 680, 700, 750$  és  $800$  nm hullámhosszakhoz tartozó abszorbancaértékeket. A leolvasott adatok segítségével a jegyzőkönyvben ábrázoljuk a metilénkék abszorpciós spektrumát.
3. A kapott abszorpciós spektrumokról leolvassuk a maximumhoz tartozó hullámhosszat ( $\lambda_{\max}$ ). Ez minden oldatnál ugyanaz a hullámhossz lesz. A (3) összefüggés alapján kiszámítjuk az elektronátmenethez szükséges átlagos energiát a  $\lambda_{\max}$  felhasználásával.
4. Az ismert koncentrációjú oldatok  $\lambda_{\max}$  hullámhosszon mért abszorbancait a koncentráció függvényében ábrázolva kalibrációs egyenest készítünk.
5. Felvesszük az ismeretlen koncentrációjú oldat abszorpciós spektrumát, majd leolvassuk a  $\lambda_{\max}$  hullámhosszon mért abszorbancait. A kalibrációs egyenes segítségével meghatározzuk az ismeretlen koncentrációt.



10. ábra. A metilénkék molekula szerkezete.



11. ábra. A Thunder Optics spektrofotométer részei.