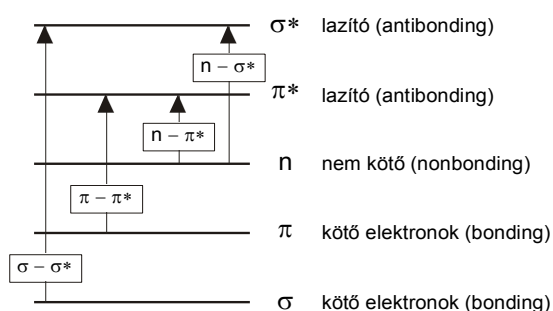


FOTOMETRIA

A spektrum egy anyag által elnyelt, vagy kibocsátott sugarak intenzitásának alakulása a hullámhossz függvényében. A biokémiában oldott anyagok molekuláspektrumát abszorpcióban vizsgáljuk. Az abszorpciós spektrum úgy jön létre, hogy az anyagra elektromágneses sugárzást bocsátunk és az anyag a fény különböző hullámhosszú komponenseiből különböző mennyiségeket nyel el. Az abszorpciós spektrofotométerek az anyagok fényáteresztő képességének változását regisztrálják a hullámhossz vagy frekvencia függvényében. Az energia elnyelési helyek és intenzitások az anyag jellemző sajátosságai.

Az energia elnyelése során nem csak az elektronok kerülnek magasabb szintre, de a molekulák rezgési és forgási állapota is megváltozik. Egy rezgési állapot gerjesztése általában sokféle forgási állapot gerjesztésével is együtt jár. E folyamatok szuperpozíciójának következtében a színekben nem éles színekvonalakat, hanem a sok közel eső vonal összeolvadásából származó sávokat észlelünk (elektronvibrációs-rotációs spektrum). Ezek a sávok jellemzőek azonban az illető molekula fajtájára és helyzetük-ből a molekulában szereplő kötéstípusokra és a molekula szerkezetére lehet következtetni. A fényelnyelés intenzitásának alakulása mennyiségi elemzésre alkalmas.

A molekulák fényabszorpciója az ultraibolya és látható spektrumintervallumban az elektroneloszlás megváltozását vonja maga után. A fényenergia a molekulában egyes elektronokat nagyobb energiájú gerjesztett pályára juttat. A magasabb elektronpályára került elektronok idővel eredeti helyükre visszakerülnek. A stabilizálódás kisebb lépésekben történik, így a felvett energia alacsonyabb energia formájában szabadul fel. Az elnyelt fényenergia hőenergiává alakul át. (A napon hagyott, sötét színű tárgyak jobban felmelegednek, mint a fényvisszaverő felületek.)



Ha atomok között kémiai kötés jön létre, a kötő elektronpár már nem az egyes atomokhoz, hanem a molekulához tartozik. A kötést létrehozó atompályák egy kisebb energiájú kötő (bonding) és egy nagyobb energiájú lazító (antibonding) molekulapályát hoznak létre. A molekulákban ezen kívül lehetnek még olyan vegyértékelektronok, melyek nem vesznek részt a kémiai kötésben, ezeket nem kötő (nonbonding), vagy „n” elektronoknak nevezzük. A szerves molekulákban ilyen „n” elektronok a nitrogén, oxigén, kén, halogének, stb. atompályáin

tartózkodnak.

Az ábra a kovalens kötést létrehozó, $\sigma - \sigma$, $\sigma - \pi$, $\pi - \pi$ elektronok és a nem kötő „n” elektronok jellemző molekulapályáinak viszonylagos energiaszintjeit mutatja be, megjelölve a lehetséges átmeneteket, melyek során az UV és látható fénysugárzás hatására a σ , π és „n” kötőpályákról a σ^* és π^* lazító pályákra történhet gerjesztődés.

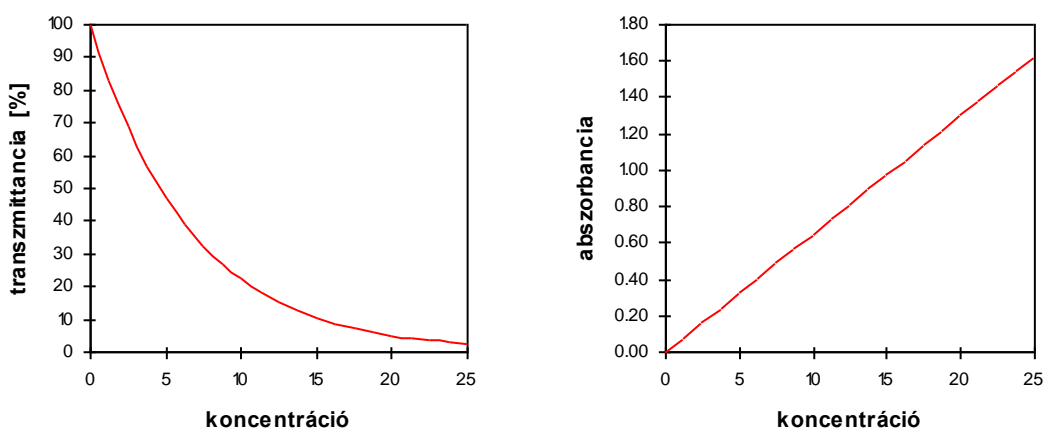
A legfontosabb átmenettípusok

- A $\sigma - \sigma^*$ átmenetek a telített szénhidrogénekben fordulnak elő, ezekben csak σ elektronok vannak. Gerjesztésükre a nagy energiájú, rövidhullámhosszú ($< 220 \text{ nm}$), ultraibolya sugarak alkalmasak.
- Kisebberjesztési energiát igényel a $\pi - \pi^*$ átmenet, mely kettős és hármas kötések, valamint aromás gyűrűket tartalmazó vegyületeknél jön létre. Az átmenet létrehozására az ultraibolya és látható fotonok alkalmasak.
- Az $n - \pi^*$ átmenet ugyancsak a fenti energiatartományban jelentkezik heteroatomot és kettős kötések tartalmazó vegyületeknél ($\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, $\text{N}=\text{O}$, stb.).

- d) Az $n - \sigma^*$ átmenetek létrehozására szintén az ultraibolya fotonok alkalmasak. Ez az átmenet heteroatomokat (S, N, Br, I, stb.) tartalmazó telített vegyületeknél figyelhető meg 210 nm körül, vagy az oxigén és klór vegyületeknél ennél kisebb hullámhosszakon.

A fotometria címszóba tartozó műszeres elemzési eljárások az ultraibolya (200 ~ 400 nm), látható (400 ~ 800 nm) és infravörös (2500 ~ 20000 nm) sugárzás intenzitásváltozásának mérésén alapulnak. Az adott intenzitású fény a vizsgálandó anyagon (oldaton) áthaladva, veszít intenzitásából. Ez az intenzitásváltozás arányos az oldat koncentrációjával. Oldatokban történő koncentrációmérésekre a fény ultraibolya és látható tartományát használják. A szem a kb. 400 ~ 700 nm-es sávot képes észlelni.

Azt a jelenséget, hogy a színes anyagon áthaladó fény intenzitása csökken az 1700-as évek elején **Bouguer** írta le. Azt a törvényt, mely szerint egy elnyelő testre ráeső és azon áthaladt monokromatikus fénysugár intenzitásarányának logaritmusai nem függ a beeső fénysugár intenzitásától, viszont egyenesen arányos a test vastagságával, felfedezője után **Lambert**-törvénynek nevezzük (1760). A színes anyagon áthaladó fény intenzitásváltozását az oldott anyag koncentrációjának függvényében **Beer** (1852) tanulmányozta először. Megállapította, hogy állandó rétegvastagság mellett a küvetába belépő és azt elhagyó fény intenzitásarányának logaritmusai arányos az oldat koncentrációjával. A spektrofotometria alaptörvényét ezért Bouguer-Lambert-Beer (BLB) törvényként említik.



A rétegvastagság és a koncentráció esetében azt tapasztaljuk, hogy egységnyi változására a fény elnyelése az anyagban azonos hányaddal változik (pl. egy tizeddel, azaz 10 %-kal csökken). Az ilyen összefüggés exponenciális egyenlettel írható le (mint pl. egy elsőrendű kémiai reakció):

$$I = I_0 \times e^{(-k \times c \times d)}$$

ahol, I az oldatból kilépő fény intenzitása, I_0 a belépő fény intenzitása, e a természetes logaritmus alapja ($e = 2.7183$), k az anyagra jellemző állandó, c az oldat koncentrációja (mol / ℓ), d a fény úthossza az oldatban (cm).

Az egyenletet logaritmizáljuk és átrendezzük. Tíz alapú logaritmusra váltva az átszámítási faktort ($\ln x / \log x = 2.3026$) beépítjük a k állandóba. Egyenletünk ezután a következőképpen néz ki:

$$\log \frac{I_0}{I} = A = \varepsilon \times c \times d$$

A az abszorbancia, ε a moláris extinkciókoefficiens (a k állandóból származtatva). Az egyenlet egy egyenes egyenlete. Ami a koncentrációmérés szempontjából lényeges: a koncentrációval egyenesen arányos a mért abszorbancia (extinkció).

Az abszorbancia a beeső fény intenzitásának és a kilépő fény intenzitása hányadosának a logaritmusai. A moláris extinkciókoefficiens az 1.0 mol / liter töménységű oldat abszorbancia értéke 1 cm fényúthossznál mérve.

A moláris extinkciókoefficiens értéke általában 5 ezer és 50 ezer között van, de előfordulnak 100 000 feletti értékek is. Ez azt jelenti, hogy fotometriával, rutinszerűen $5 \mu\text{mol} / \ell$ és $100 \mu\text{mol} / \ell$ töménységű oldatok koncentrációját mérhetjük.

A spektrofotometriában használatos fogalom a transzmittancia (T). A transzmittancia a fényát-eresztő képességet jelzi. Például $T = 0.8$ azt jelenti, hogy a küvetében levő oldaton a beeső fény 0.8-ad része (80 százaléka) jut át. Általában százalékban fejezik ki az értékét:

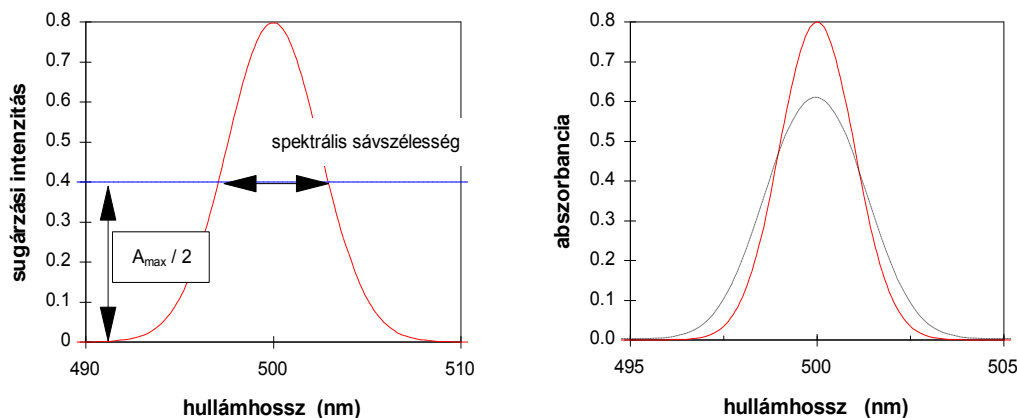
$$T = \frac{I}{I_0} \times 100$$

T értéke 100 %-tól ($A = 0.000$) a 0 %-ig ($A = \infty$) terjed. Az abszorbancia (extinkció) és a transzmittancia között összefüggés van:

$$\log \frac{100}{T} = \log \frac{I_0}{I} = A$$

az egyenletből: $A = 2 - \log T$ és $T = 10^{2-A}$

A BLB-törvény érvényességének egyik feltétele, a monokrom fényvel való mérés. A másik: a vizsgált koncentrációtartományban a koncentráció változásával az oldott anyag molekulái között, illetve a molekulákban, valamint az oldószer és az oldott anyagmolekulák között, az egymásra hatás miatt, fizikai vagy fizikai-kémiai változások nem jöhetnek létre (eltérés a BLB-törvénytől, koncentráció és abszorbancia között ekkor nem lineáris az összefüggés). A BLB-törvény híg oldatokra érvényes. A törvény érvényességéről különböző koncentrációjú oldatsorozat lemérésével, az így felvett kalibrációs görbe segítségével győződhetünk meg. A kalibrációs görbe felvételének célszerűségét egyéb szempontok is indokolják: a használt monokromatikus fény hullámhossz beállításának pontatlansága, másrészt a monokromatikus fény „tisztasága”, sávszélessége, amit a félsávszélességgel adunk meg. Éles fényelnyelési sávval rendelkező anyagok csúcsa az ábra szerinti változást szenvedik, ha nagy sávszélességű, nem teljesen monokromatikus, fényelnyelési sávval rendelkező anyagot vizsgálunk. Hasonlóan vonatkozik ez a koncentráció mérésére is, ahol egy adott hullámhossznál mérünk. A mért abszorbancia a csúcsban kisebb lesz, mint a homogén monokromatikus fényvel kapott érték.



A látható tartományban való mérésekhez a wolframszál izzólámpa használatos. Az izzószál maximális emissziót a közeli infravörös tartományban mutat. Az emisszió a hullámhossz csökkenésével egyre kisebb lesz, 350 nm alatt már nem elegendő az emittált fényenergia. A wolframszál magasabb hőfokon izzítható, ha kvarccsőbe van zárva és a cső kevés jódgózt tartalmaz (halogénizzó). Ekkor megnő a 400 nm alatti hullámhosszú komponens aránya a spektrumban. Bizonyos megkötésekkel így 320 nm körüli mérések is elvégezhetők.

Az ultraibolya spektrumtartományban (360 nm alatt) deutérium kisülési csövet használnak fényforrásként. A deutériummal töltött kvarccsőben (0.01 bar) elektromos kisülés hatására ionizálódó gáz a látható tartományban vonalas szinképet ad (486 és 656.1 nm), de 375 nm alatt már folytonos a spektrum.

A fotometriás mérésekhez monokromatikus, illetve azt megközelítő, szűk hullámhossz tartományra korlátozódó sávzélességű fényre van szükség. Régebben az igen jó monokromatikus fény előállítására a higany kisülési cső vonalas színeképét használták megfelelő szűrőzés után. Bár manapság a higany kisülési csövet már nem alkalmazzák, a korábbi méréseknél használt hullámhosszak alkalmazása, az összehasonlíthatóság kedvéért, megmaradtak. Ezek a hullámhosszak: 253.7, 364.9, 404.5, 435.8, 546.1, 576.9 és 579.0 nm. Így ma is gyakran mérjük a NAD(P)H fényelnyelését 365 nm-nél (elnyelési maximuma 340 nm), a foszfatáz aktivitásmérésénél a felszabaduló p-nitrofenolt 404.5 nm-nél, a fehérjét biuret reakcióval 546.1 nm-nél vagy Bradford módszerével 579 nm-nél.

Monokromatikus fény előállítására, diszperziós elemként, használatos volt az üvegből vagy kvarcból készült prizma. A prizma monokromátor működése azon alapul, hogy a prizma anyagának törésmutatója a rajta áthaladó fény hullámhosszának függvénye. A rövidebb hullámhosszúságú fény nagyobb mértékben tör meg. A prizmán áthaladó fehér fény színeire bomlik. A prizma elfordításával a fotométer kilépő nyílására a megfelelő hullámhosszúságú fény vetíthető. Hátránya a prizmának, hogy a nagyobb hullámhosszak tartományában a felbontás romlik, a spektrum zsugorodik, a prizma elfordulásával nem arányos a hullámhossz skála.

A mai spektrofotométerekben rácsmonokromátor van. Ennek hullámhossz skálája egyenletes beosztású. A rácsmonokromátorok reflexiós üzemmódban dolgoznak. A rács egy polírozott üveglap, amelyre nagyszámú (500 ~ 3000 barázda / mm) párhuzamos, egymástól egyenlő távolságra levő barázdát karcolnak. A rácsról visszavert fény diffrakciót szenved és ennek következtében első, második, stb. rendű spektrumok keletkeznek. A magasabb rendű, és gyengébb, spektrumokat vágó színszűrőkkel kiszűrjük, vagy nagyteljesítményű fotométereknél második rácsmonokromatórt építenek be. A mai rácsmonokromátorokat ionsugárral barázdálva, holografikusan állítják elő.

Gyakorlaton anyagában festett üveg színszűrőket és interferencia színszűrőket is használunk. A színszűrőn található szám az átbocsátott fény hullámhosszának súlypontját jelenti. A színszűrő, minőségétől függően, ettől az értéktől kisebb-nagyobb mértékben eltérő hullámhosszúságú fényt is átérteszt. A fény nem tökéletesen monokromatikus. Ezért az egyszerű, olcsó fotométereknél a standardgörbe felvétele szükségszerű. Mérésnél az oldat színével komplementer színű színszűrőt választunk (kék - sárga, piros - zöld).

Méréseinknél a vizsgálandó oldatot küvettába öntjük. A küvetták készülhetnek műanyagból (polisztirol), optikai üvegből vagy kvarcból. Nem agresszív oldatok esetében, a látható hullámhossz tartományban az olcsó műanyag küvetták használhatók. Általában 1 cm fényúthosszal rendelkező küvettákkal dolgozunk. Kisebb térfogatok fotometrálására szűkített küvetták alkalmasak, de a fény úthossza a küvettában itt is 1 cm.

A fényintenzitások mérését elektromos jellé való átalakítás útján végezhetjük el. Használunk úgynevezett elektronsokszorozó (photomultiplier) elektronsövet, vákuum fotocellát, félvezető fotodiódát vagy fototranzisztort. A detektorban nyert elektromos jelet elektronikusan felerősítik, illetve logaritmikus erősítéssel a jelet közvetlenül abszorbancia kijelzésre teszik alkalmassá.

Az abszorbancia mérése előtt a fotométert nullázni kell. A nulla abszorbancia (100 % transzmittancia) a mérésnél vonatkozási alap, ezért jó, ha egy stabil, reprodukálható fényelnyeléssel rendelkező, folyadékot választunk. Erre a célra a desztillált víz felel meg legjobban. Desztillált vízre nullázva mérjük a reagens vak és a próba abszorbanciáját, majd a próba abszorbanciájából (A_p) kivonva a reagens vak értékét (A_v) kapjuk a korrigált abszorbancia értékét ($A_p - A_v = A_{kor}$). Ezzel az értékkel számolhatunk, illetve szerkeszthetjük meg a standard görbénket. A koncentráció függvényében (független változó; x-tengely) ábrázoljuk az abszorbancia értékeket (függő változó; y-tengely). Szokás a koncentráció függvényében a nem korrigált abszorbancia értékeket (A_p) felvinni. Ebben az esetben a standard egyenes (görbe) nem megy át az origón, hanem metszi az y-tengelyt.

Lehetséges a fotométer nullázása a reagens vakra is. Ebben az esetben a reagens vakkal való abszorbancia korrekciót a fotométer nullázásával végezzük el és nincsen szükség az utólagos $A_p - A_v$ kivonásra. Hátránya a vakra való nullázásnak, hogy a nullázás művelete hosszadalmasabb, mint maga a mérés. A mérendő mintáknak külön-külön eltérő vakértékük van (pl. betegek szérummintái). Így mindegyik mintából vakot kell beállítani és erre nullázni. Modern számítógépek birtokában egyszerűbb egy nullázással (desztillált vízre), a mérés után a próbák abszorbanciáit számítógéppel korrigáltatni. Desztillált vízre nullázva jobban észlelhetjük a műszer alapértékének vándorlását. Számos esetben a

desztillált vízzel szemben mért reagens-vakértékeknek a szokásostól való eltérése a reagens szennyezett-ségére, alkalmatlanságára vagy szavatossági idejének lejártára utal.

Az abszorbancia mérésénél célszerűen úgy járunk el, ha a küvettába a mérendő oldatot kézi dugattyús pipettával visszük be. Ezzel elkerülhetjük, hogy a küvettát túltöltsük, és folyadék kerüljön a küvetta külső falára. Folyadékcsepp az optikailag megmunkált külső felületen a fénytörés miatt igen jelentős eltéréseket okozhat az abszorbancia értékekben. A nedves küvettával ugyanakkor a fotométerbe kerülnek olyan vegyszerek, amelyek az optikai felületeket elhomályosítják, illetve korróziót okoznak.

Sorozatok mérésénél helytelen gyakorlat a két mérés között a küvettát desztillált vízzel kiöblíteni. A küvettában visszamaradó vízcsepp, amelynek abszorbanciája 0.000, elegyedik a mérendő, fényelnyelő oldattal és csökkenti annak abszorbanciáját. Kisebb a hiba, ha pl. standardsornál egymás után mérjük le az abszorbanciákat. Több mintából álló ismeretlen koncentrációjú sorozatnál is, ha az abszorbanciák lényegesen nem térnek el egymástól, mérjük az abszorbanciákat egymás után vizes öblítés nélkül. Azt a problémát, ha a küvettában maradt oldat befolyásolja a következő mérés eredményét, „carry over”-nek nevezzük. Automata analizátoroknál jelentkezik a probléma, ahol a készülékbe be van építve a küvetta és mérésnél a mintákat a küvettán átszívják.

A következő példával lehet érzékeltetni a küvettában visszamaradt oldószer hatását az abszorbancia értékére. A küvettában visszamarad egy csepp desztillált víz. Egy csepp víz térfogata 40 µl körül van, abszorbanciája 0.000. Félmikro küvettában 0.5 ml körüli mintával dolgozunk. Legyen a fényt elnyelő mintánk abszorbanciája 0.600. A desztillált víz és a fényelnyelő oldat elegyedése után:

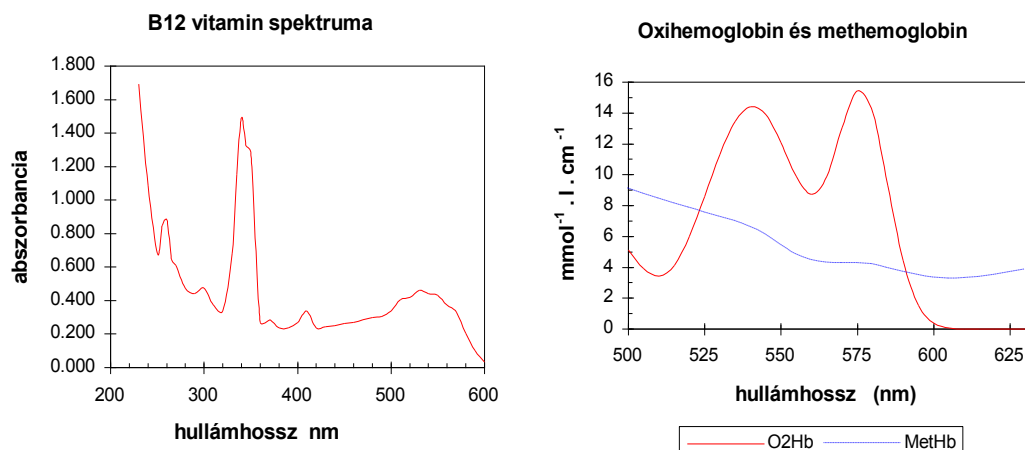
$$A = \frac{ml_{deszt.viz} \times A_{deszt.viz} + ml_{próba} \times A_{próba}}{ml_{deszt.viz} + ml_{próba}} = \frac{0.04 \times 0.000 + 0.5 \times 0.6}{0.04 + 0.5} = 0.555$$

Tehát 0.600 abszorbancia érték helyett a küvettában maradt egy csepp desztillált víz miatt 0.555 abszorbancia értéket mérünk (7.5 %-os csökkenés). Ha nagyon pontos méréseket akarunk végezni és a mérendő oldatunk térfogata elég nagy, helyesen járunk el, ha a mérendő oldat 0.3 - 0.5 ml-ével a küvettát kiöblítjük és a mérést ezután végezzük el.

A gyakorlatban 1.000 alatti abszorbancia értékeket szokás mérni. A mérés hibája az alacsony értékek felé a készülék kijelzésének ingadozása, a küvetták közötti abszorbancia eltérések (újlenyomat, szennyezés, műanyagküvettáknál karcolások) miatt meredeken növekszik. A nagy abszorbancia értékeknél a Lambert-Beer törvénytől való eltérés okozza a mérés hibájának növekedését. Matematikai úton levezethető, hogy a legpontosabb méréseket a 0.400 abszorbancia érték körül végezhetjük.

Egy vegyület azonosításánál a hullámhossz függvényében mért abszorbanciaváltozás (spektrum) is hasznosítható. A spektrum felvételénél monokromátorral rendelkező fotométeren a hullámhosszat fokozatosan változtatva abszorbanciamérést végzünk. Minden egyes mérést az oldószerre való nullázás előz meg. A abszcisszán felvitt hullámhossz függvényében ábrázoljuk az ordinátán az abszorbanciát (vagy átszámítás után a hullámhossz függvényében a moláris extinkciókoefficiens, vagy ennek logaritmusát). A vegyületek kromofor csoportjaitól függően eltérő lefutású görbéket kapunk. A spektrum alapján választhatjuk ki a koncentrációméréshez alkalmas hullámhosszat (a nagyobb érzékenység miatt általában a legnagyobb csúcspot).

A spektrumok felvétele egyfényutas fotométerrel a sok nullázás miatt hosszadalmas lenne. A kutatási célokat szolgáló, modern fotométerek kétfényutasak. Az egyik fénynyaláb méri az oldószer (reagensvak) fényelnyelését, a másik a minta abszorbanciáját. A fotocella a két fénynyaláb intenzitáskülönbségét jelzi ki, tehát azonnal a vakkal korrigált értékeket kapjuk. Ezen felül a mai készülékek egy számítógép elemeit tartalmazzák, vagy külön számítógép vezérli a fotométert és tárolja az adatokat.



A B₁₂ vitamin koncentrációját spektruma alapján 338 nm-nél mérjük. A következő ábra a hemoglobin két formájának spektrumát mutatja. Az oxihemoglobin két jellemző csúccsal rendelkezik a látható tartományban, a methemoglobin a nagyobb hullámhosszak felé csökkenő, lapos spektrumot ad. A két komponens egymás melletti meghatározása klinikai szempontból lehet fontos (egyidőben más hemoglobinformák is meghatározásra kerülnek). Erre az ad lehetőséget, hogy az abszorbanciák ($\log I_0 / I$) a koncentrációval egyenesen arányosak és az egyes spektrumok additívak.

Az akut cianid (CN⁻) mérgezést gyakran methemoglobint képző anyagok adásával (nátriumnitrit, metilénkék) kezelik. A methemoglobin a kétértékű vasat tartalmazó oxihemoglobinnal egy elektron elvonásával keletkezik. Mivel a methemoglobinnak nagy a CN⁻ affinitása képes megakadályozni a CN⁻ -nak a citokróm oxidáz citokróm a₃ komponensére való jutását. A cianidmérgezés a légzési lánc működésének felfüggesztését jelenti. Az oxihemoglobin egy részének feláldozásával, methemoglobinná alakításával, idő nyerhető, mely alatt a mitokondriális rodanáz a cianidot tiocianáttá (rodanid, CNS⁻) detoxikálja. A szervezet alacsony kéntartalékai limitálják a detoxikáló reakciót, ezért tiosulfát adása is szükséges. A sikeres kezelés feltétele, hogy kielégítő mennyiségben képezzünk methemoglobint. Egy 70 kg-os személyben, 150 g / ℓ hemoglobin-koncentrációval, 1 g KCN méregtelenítésére a hemoglobin 30 %-át kell methemoglobinná alakítani. A citokrómoxidázt így a vér oxigénkapacitásának rovására védjük meg. A megfelelő methemoglobin - hemoglobin egyensúly ellenőrzésére a két komponens koncentrációjának ismerete szükséges.

Két (vagy több) fényelnyelő anyag oldatánál az egyes komponensek spektrumai szuperponálódnak, a görbék eredőjét kapjuk. Monokromatikus fényrel specifikusan az egyes komponensek abszorpció maximumainál mérhetünk. Két, oldatban levő, fényelnyelő anyagnál a spektrum eredője:

λ_1 -nél

$$\varepsilon_A^{\lambda_1} \times c_A + \varepsilon_B^{\lambda_1} \times c_B = A^{\lambda_1}$$

λ_2 -nél

$$\varepsilon_A^{\lambda_2} \times c_A + \varepsilon_B^{\lambda_2} \times c_B = A^{\lambda_2}$$

Ha tehát két anyag esetében két hullámhossznál (λ_1 és λ_2) abszorbanciát mérünk, a fajlagos állandók (pl. moláris extinkciókoefficiensek, ε_A , ε_B) birtokában, kétismeretlenes egyenlet megoldásával a koncentrációk meghatározhatók. Példánkban legyen (hemoglobin - methemoglobin párosnál λ_1 és λ_2 500 és 577 nm):

$$\varepsilon_A^{\lambda_1} = 8.00 \text{ mmol}^{-1} \cdot \ell \cdot \text{cm}^{-1}; \quad \varepsilon_B^{\lambda_1} = 4.20 \text{ mmol}^{-1} \cdot \ell \cdot \text{cm}^{-1}; \quad \varepsilon_A^{\lambda_2} = 5.55 \text{ mmol}^{-1} \cdot \ell \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_B^{\lambda_2} = 15.31 \text{ mmol}^{-1} \cdot \ell \cdot \text{cm}^{-1}; \quad A_{\lambda_1} = 0.350; \quad A_{\lambda_2} = 0.625$$

$$8 \times c_A + 4.2 \times c_B = 0.350$$

$$5.55 \times c_A + 15.31 \times c_B = 0.625$$

Az egyenletet megoldva: az **A** komponens c_A koncentrációja $0.0276 \text{ mmol} / \ell = 27.6 \text{ } \mu\text{mol} / \ell$; a **B** komponens c_B koncentrációja $0.0308 \text{ mmol} / \ell = 30.8 \text{ } \mu\text{mol} / \ell$.

Ahány anyag van az oldatban annyi megfelelően választott hullámhossznál mért abszorbanciaértékre van szükség, és annyi ismeretlenes egyenlet megoldására (főleg néhány komponenst tartalmazó oldatoknál alkalmazható mérési eljárás; pl. a gyógyszeriparban multikomponensű oldatok, tabletták hatóanyagtartalmának ellenőrzésére).

Vannak sürgősségi ellátást végző klinikai laboratóriumok, ahol e célra kifejlesztett analízátor hemolizátumban, egy mintában, 6 hullámhossznál mér abszorbanciát. Ezzel a legrövidebb időn belül meghatározható: az oxihemoglobin, methemoglobin, redukált hemoglobin, szénmonoxid hemoglobin, cianomethemoglobin és a főtális hemoglobin koncentrációja a vérben.

Kezelési útmutató a SPEKTROMOM 410 fotométerhez

1. A fotocella választó gombot (fekete) a hullámhossznak megfelelő helyzetbe állítjuk — 600 nm felett vörös.
2. A mérésmód kapcsolót T % állásba hozzuk.
3. A színszűrőt kattanásig megemeljük (kb. 1 cm). A kijelzőn 0.000 körüli érték jelenik meg. A „ZÉRO” gombbal állítsunk 0.000-át (sötétáram).
4. A színszűrőt ütközésig lenyomva a „100 %” gombbal állítsunk a kijelzőn 100.0-at. Amennyiben a 100.0 nem fogható be, a „kék” gombbal korrigáljuk a lámpa áramát (I. - II. - III. fokozat).
5. A mérésmód kapcsolót „A” állásba hozzuk — a „CAL A” gombot benyomva tartva a „CAL A” forgatógombbal 1.000-át állítunk.
6. A nyomógombot elengedve „A” 0.000-át mutat a kijelző (1 - 2 ezred eltérés a nullától elfogadható). A mérendő anyagot behelyezve a küvettanyílásba, a kijelzőn az „A” abszorbancia értéke leolvasható.

Kezelési útmutató a SPECTRONIC 20 GENESYS spektrofotométerhez

1. Az A/T/C gomb (1) megnyomásával választhatunk az abszorbancia / transzmittancia / koncentráció üzemmódok között.
2. A nm Δ vagy ∇ nm (2) jelzett gomb megnyomásával válasszuk ki a mérés hullámhosszát (nm). A gomb nyomva tartásával a számértékek nagyobb léptékben változnak.
3. Helyezzük a fotométerbe a küvettát az oldószerrel (desztillált víz) és zárjuk a küvettaház fedelét.
4. Nyomjuk meg a 0 ABS / 100 % T gombot (3), ezzel a fotométert nullázzuk.
5. A mérendő mintát a küvettaházba téve az LCD kijelzőn (4) megjelenik a mintánk fényelnyelésének számszerű értéke (beállítástól függően abszorbancia, transzmittancia vagy koncentráció).

