

55

C00

TK 41-892

1972  
international book year



F

KFKI-72-56

Szőke J.  
László Z.  
Kovács S.

A LUMINOMETRIA ALKALMAZÁSA  
A KLINIKAI LABORATÓRIUMBAN  
ÉS AZ ORVOSTUDOMÁNYI KUTATÁSOKBAN

*Hungarian Academy of Sciences*

CENTRAL  
RESEARCH  
INSTITUTE FOR  
PHYSICS



BUDAPEST

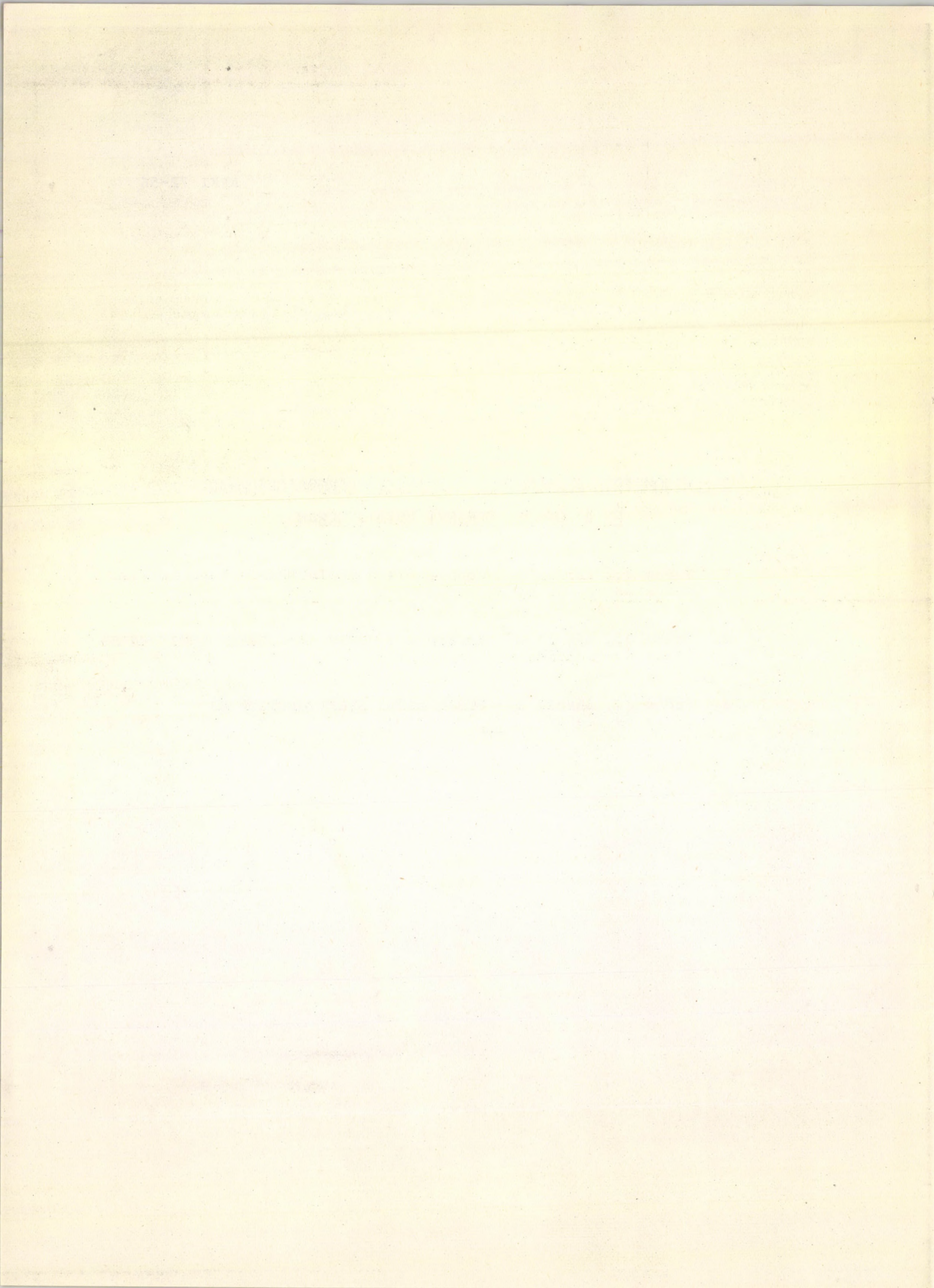
2017



Faint, illegible text or markings at the bottom of the page, possibly bleed-through from the reverse side.

A LUMINOMETRIA ALKALMAZÁSA A KLINIKAI LABORATÓRIUMBAN  
ÉS AZ ORVOSTUDOMÁNYI KUTATÁSOKBAN

1. Szőke J., László Z., Kovács S.: A LUMINOMETRIA ELVI ALAPJAI  
*Orvos és Technika*, 8, 136 (1970)
2. Szőke J., László Z., Kovács S.: RUTIN ANALITIKAI LUMINOMÉTER  
*Orvos és Technika*, 9, 175 (1971)
3. Szőke J., László Z.: GERJESZTÉSI SPEKTRIFOTOMÉTER  
*Orvos és Technika*, 10, 76 (1972)



## A luminometria alkalmazása a klinikai laboratóriumban és az orvostudományi kutatásokban

### I. A luminometria elvi alapjai

Az orvosi — de mondhatjuk egész általánosan úgy is, hogy analitikai — laboratóriumokban ma a leggyakrabban használt módszer a fotometria. Az utóbbi időben azonban egyre gyakrabban jelentkeznek olyan feladatok, melyeknél közel azonos szerkezetű, tehát csaknem azonos elnyelési színképpel rendelkező anyagok koncentrációját kell egymás mellett meghatároznunk, vagy a fotometrikus érzékenység nem elegendő a jelenlevő anyag koncentrációjának kívánt pontosságú meghatározásához. Az ilyen problémák megoldásában rendszerint hatékony segítséget kínál a luminometria.

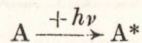
Alapelveit tekintve, a módszer több mint fél évszázados múltra tekint vissza, széles körű gyakorlati alkalmazását azonban csak az elektronika nagyfokú fejlettsége tette lehetővé.

Ennek a közleménysorozatnak kettős célja van. Egyrészt ismertetni kívánja a hazai luminométerek fejlesztése kapcsán elért eredményeket, illetve a hazai berendezések használatával kapcsolatos tapasztalatokat, másrészt egy rövid általános elvi bevezetéssel segítséget kíván nyújtani a laboratóriumokban dolgozó kollegáknak — e viszonylag új módszer fogalmainak megértésében — hiszen munkájuk során egyre sűrűbben találkozhatnak velük.

#### 1. Fizikai alapismeretek

##### 1.1. A molekulák stacionárius energiaállapotai. Átmenetek.

A molekulafizikai modell szerint a molekulák csak meghatározott (diszkrét) energiaállapotokban létezhetnek. Szobahőmérsékleten a stabilis molekulák az energiaminimumhoz közeli energiatartalommal rendelkeznek, s azt mondjuk, hogy a molekulák alapállapotban vannak. Jól definiált (pl. foton-) energia közlésével a molekula az A alapállapothól A\* gerejstett állapotba vihető. Formálisan:



A gerejstés során a  $h\nu$  energiát az atomokat összekötő egyik legnagyobb energiájú elektron veszi fel (egyelektronos gerejstés), amelynek hatására az elektron elhagyja eredeti pályáját és egy magasabb diszkrét energiatartalmú pályára ugrik át. Ezt nevezzük elektronátmenetnek. Az elektromágneses sugárzási tér hatására létrejött gerejstések valószínűségét a kiválasztási szabályok határozzák meg, melyek közül molekulákra a legszigorúbb a *spintiltás szabálya*, amely kimondja, hogy a spinváltozással járó átmenetek tiltottak, azaz a gerejst-

tési folyamat alatt nem változik meg a molekulában levő elektronok spinállapota.

Stabilis molekulákban az atomok nemesgáz konfigurációval rendelkeznek, s az atomok között minden kötőpályán két ellentett spinű elektron foglal helyet. Az elektronok spinkvantumszámának értéke  $-1/2$  vagy  $+1/2$  lehet. A spinmultiplicitás, amely azt mondja meg, hogy valamely molekula hányféle spinállapotban fordulhat elő, a  $2S+1$  képlettel számolható, ahol S a molekula összes elektronjára vonatkoztatott spinkvantumszámok összegének abszolút értékét jelenti. Stabilis molekulákban a  $-1/2$  és  $+1/2$  spinkvantumszámú elektronok száma egyenlő, a multiplicitás: 1 (szinglet); szabad gyökökben egy páratlan elektron fordul elő, s az ilyen molekulákra számított S érték  $1/2$ , a multiplicitás: 2 (duplet); komplex molekulákban előfordulnak olyan fémionok, amelyek belső héjjaiban több, nem kompenzált spinű elektron is létezik, így a multiplicitás lehet még nagyobb is: 3 (triplet); 4 (kvadruplet) stb. Szinglet alapállapotú molekulák gerejstésekor a spintiltás szabálya szerint nem változik meg a multiplicitás, mert a gerejstéssel egyidőben nem történik spinátfordulás. Az ilyen átmeneteket nevezzük szinglet-szinglet átmeneteknek. A jelenségek rövid leírására szimbolikus jelöléseket használunk. A szinglet alapállapotot  $S_0$ -lal, az ugyancsak szinglet gerejstett állapotokat  $S_1, S_2, \dots, S_n$ -nel szokás jelölni, aszerint, hogy hányadik gerejstett állapotról van szó. Az átmenetet a megfelelő állapotok között nyíllal jelöljük. Például:  $S_1 \leftarrow S_0$ . (A nemhivatalos megállapodás szerint a balra mutató nyíl abszorpciót, a jobbra mutató nyíl emissziót jelent.)

Megfelelő körülmények között — tilalmi szabály ellenére — a szinglet alapállapotú molekulák gerejstésekor spinátfordulás is történhet. Ekkor a molekula gerejstett állapotának spinmultiplicitása: 3 (triplet). A triplet állapotok jelölésére a T betű használatos. Elvileg minden szinglet állapot mellett létezik egy triplet állapot (azaz minden átmenet kombinálódhat spinátfordulással). Az alapállapot és a legelső triplet gerejstett állapot közötti abszorpció átmenet szimbolikus leírása tehát:  $T_1 \leftarrow S_0$ .

A multiplet állapotok energiatartalma, nagyszimmetriájú molekulában vagy térben azonos, azt mondjuk, hogy ezek az állapotok degeneráltak. Csökkenő szimmetria esetén a degenerált energiaszintek felhasadnak, s ekkor a színképben is meg nyilvánul a multiplet szerkezet.

Az elektronugrással egyidejűleg gerejstődhetnek különböző molekuláris rezgések (vibrációk) is. Az utóbbiak jelölésére a kis ( $\nu$ ) betű szolgál, amelynek jobb alsó indexével azonosítjuk a rezgéstípust. Az ilyen elektronugrást és rezgési átmenetet egyidejűleg tartalmazó átmeneteket „vibronic” (az angol vibrational és electronic szavak összevonásából keletkezett) átmeneteknek nevezzük.

<sup>1</sup> Központi Fizikai Kutató Intézet, Budapest.

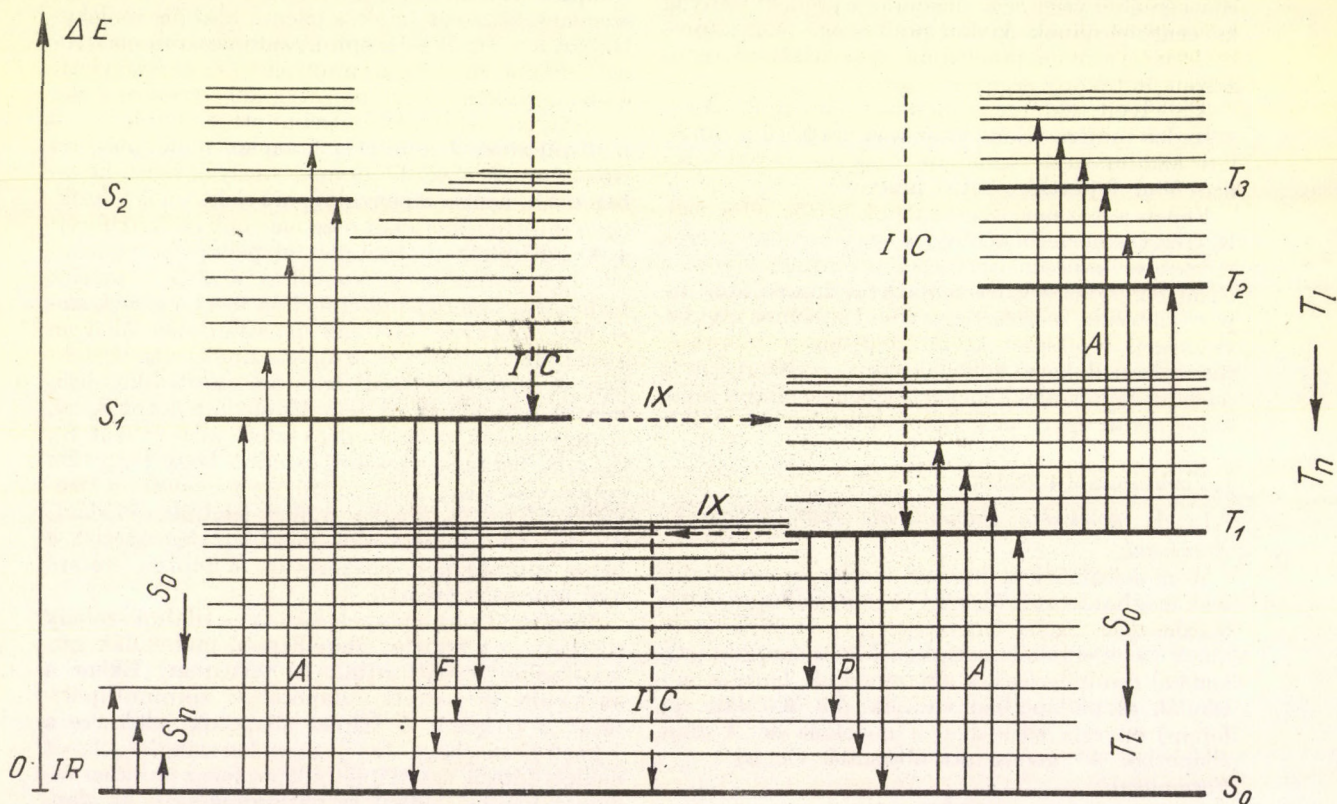
<sup>2</sup> Tolna megyei Tanács Balassa János Kórház Laboratóriuma, Szekszárd.

<sup>3</sup> Elektrotechnika KTSZ, Budapest.

Vibronic átmenet pl. az  $S_1(v_{C=0}) \leftarrow S_0(v_0)$ , amely az alapállapot rezgési átmenettel nem kombinált tiszta elektronállapotából, abszorpció hatására történik, az  $S_1$  elektronállapotban egyidejű karbonil-rezgés gerjesztéssel. (Lásd az 1. ábrával kapcsolatos magyarázatot.) Kondenzált állapotban mindig ilyen vibronic átmenetekből épül fel az ultraibolya, látható abszorpció és a lumineszcencia színekép. A vibronic színekép finom részletei rendszerint csak különleges spektroszkópai eljárással deríthetők fel (gőzszínekép, mélyhőmérsékletű színeképvizsgálat stb.), mert az egyes átmenetek energiakülönbsége kicsi, és színeképi sávjaik nagymértékben átfedik egymást, így szerkezetnélküli, elmosódott színeképet kapunk.

helyezkedő különböző energiafelvevő rendszerek részleteiben átadhatja. Az utóbbi *sugárzásmentes energia-degradációs folyamatnak* nevezik. A jelen vizsgálódásunk szempontjából csak a sugárzásos (*radiatív energia-degradációs* mechanizmusok érdekesek, melyet összefoglaló névvel lumineszcenciának nevezünk. Az eddig tárgyalt összes abszorpció és emisszió radiatív, továbbá az intramolekuláris sugárzásmentes folyamatok az 1. ábrán látható Jablonski-diagram segítségével egyértelműen tanulmányozhatók.

A vastag vonalak a „tiszta” (rezgés-kombinációtól mentes) elektronállapotokat jelölik, a vékony vonalak az alapállapottal kombinálódni képes rezgési átmeneteket reprezentálják, míg a vertikális



1. ábra. Stacionárius energia-állapotok közötti átmenetek típusai sokatomos molekulákban  
 Jelmagyarázat.  $S_0$  = szinglet-alapállapot;  $S_1, S_2, \dots, S_n$  különböző energiájú szinglet gerjesztett állapotok;  $T_1, T_2, \dots, T_n$  különböző energiájú triplet állapotok; A felfelé mutató nyilak abszorpciót, a lefelé mutató nyilak emissziót, a szaggatott nyilak sugárzásmentes átmeneteket jelölnek. (Az azonos multiplicitású állapotok között IC, a különböző multiplicitású állapotok között IX).

A = abszorpció; F = fluoreszcencia; P = foszforeszcencia; IR = az infravörös színeképet létrehozó átmenetek; E = energia-különbség skála. (Az alapállapot energia értékét zérusnak vesszük.)

Megjegyzés. A vastag vonalak rezgés-kombinációtól mentes elektron állapotokat jelentenek. A vékony vonalak az elektron állapotokkal kombinálódó normálrezgések frekvenciái.

Az elektronugrás igen gyorsan, kb.  $10^{-15}$  sec alatt bekövetkezik. Ugyancsak rövid az  $A^*$  gerjesztett állapot élettartama\* is ( $10^{-7}$ – $10^{-9}$  sec).

A gerjesztés révén felvett energiátöbbletet a molekula kisugározhatja, vagy a szomszédságában el-

\* Élettartamnak nevezünk azt az időt, amely alatt a gerjesztett molekulák száma a kezdeti érték  $1/e$ -ed részére csökken.

nyilak az átmenetek típusait jelzik. A kihúzott nyíl a sugárzásos (radiatív), a szaggatott nyíl a sugárzásmentes átmenetet jelöli. A felfelé mutató nyíl energiafelvételt (abszorpciót), a lefelé mutató nyíl energia-degradációt (ha radiatív: emissziót) jelent.

A diagram jobb oldalán egy második gerjesztett állapotrendszer van feltüntetve, a jobboldalihoz képest alacsonyabb értékeknél. Ezek a már említett multiplet állapotok, amelyek a gerjesztett ál-

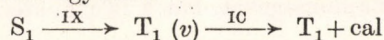
lapotú elektronok spinátfordulásával jönnek létre.

Az energiacsökkenést a maximális multiplicitás elve alapján értelmezhetjük. A spinmultiplicitás növekedésével csökken az állapot energiátartalma. Ha a molekulát bomlás nélkül, valamely sokadik  $S_n$  állapotba gerjesztjük, a molekula az 1. ábrán IC-vel jelölt, belső energia elvezetéses mechanizmussal (az angol „internal conversion” szavak rövidítése) igen gyorsan (kb.  $10^{-13}$  sec alatt) sugárzásmentesen elveszíti az első gerjesztett állapot feletti energiátartalmát, azaz a gerjesztett molekula  $S_1$  állapotba kerül. Az átmenetek energiakülönbsége hővé alakul  $S_n \rightarrow S_1 + \text{cal}$ . Az  $S_1$  állapot élettartama rövid és több egymással versengő, radiatív és sugárzásmentes energia-degradációs mechanizmus igyekszik a gerjesztő energiát a molekulából eltávolítani. Ezek a következők:

a)  $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_f$ , azaz a molekula az első gerjesztett szinglet állapotból  $h_f$  energia kisugárzásával visszatér az alapállapotba. Ezt a radiatív átmenetet nevezzük fluoreszcenciának. A fluoreszcencia lecsengési ideje (az az idő, amely alatt az  $S_1$  állapotú molekulák száma  $1/e$ -ed részére csökken)  $10^{-7}$ – $10^{-9}$  sec közé esik.

b)  $S_1 \rightarrow T_1(v)$ , azaz egy  $S_1$  állapotból a gerjesztési energia spinátfordulással átmegy a triplet állapotnak az  $S_1$  állapotához legközelebb eső, alacsonyabb energiájú vibrációval kombinált nivójára, majd belső konverzióval (IC) a rezgés-kombinációtól mentes  $T_1$  tiszta elektron állapotba jut.

Az energiakülönbség hőenergiává (cal) alakul. Az  $S_1 \rightarrow T_1(v)$  átmenetet „intersystem crossing”-nak nevezzük, s IX-szel jelöljük. Az egész folyamat bruttó egyenlete



Az IX átmenet általában lassú,  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  sec. Vannak azonban olyan körülmények, amelyek az átmenet valószínűségét megnövelik. Ilyenek az oldatban levő paramágneses ionok (átmeneti fémek, ritkaföldfémek, aktinidák, molekuláris oxigén) vagy a molekulában, esetleg a környezetében jelenlévő magas rendszámú atom\* (pl. U, I), továbbá a mélyhőmérséklet. Az átmenet sebessége ilyenkor elérheti a  $10^{-7}$ – $10^{-9}$  sec értéket is.

c)  $S_1 \rightarrow S_0 + \text{cal}$  (IC) sugárzásmentes átmenet, amelynek lecsengési ideje  $\infty$  és  $10^{-9}$  sec között változhat. Az energiát ilyen esetekben az intramolekuláris rezgések veszik fel, vagy ütközés révén átadódik valamely szomszédos molekulára, s így annak kinetikus vagy vibrációs energiájává válik.

d)  $T_1 \rightarrow S_0 + h\nu$  radiatív folyamat, amelynek révén a  $T_1$  gerjesztett állapot megszűnik. A lecsengési idő lényegesen hosszabb, mint az  $S_1 \rightarrow S_0$  esetében:  $10^{-4}$ – $10^0$  sec. Az átmenetet foszforeszcenciának nevezzük. A fluoreszcencia fény rezgésszáma nagyobb, mint a foszforeszcencia fényé ( $\nu_f > \nu_p$ ).

## 1.2. A kvantum-hatásfok ( $\Phi$ )

Analitikai szempontból fontos a radiatív folyamat minél több fotont szolgáltatson a mérés-

sekhez. Ha a gerjesztő fotonok mindegyike radiatív úton távozik a gerjesztett molekulából, akkor az egyes fotonok — bár veszíthetnek energiájukból — darabszáma változatlan marad. A sugárzásmentes energia-degradációs mechanizmusok működése következtében az egyes gerjesztett molekulák nem szolgáltatnak fotont, s ilyenkor az emittált fotonok száma kisebb, mint a gerjesztő fotonok száma. A radiatív és sugárzásmentes folyamatok relatív arányának kifejezésére definiáljuk a kvantum hatásfokot ( $\Phi$ ).

$$\Phi = \frac{\text{emittált fotonok száma}}{\text{gerjesztő fotonok száma}}$$

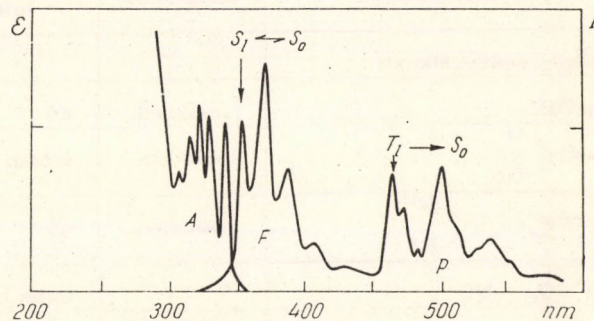
Számos olyan adalékanyagot ismerünk, amelyek növelik a sugárzásmentes energia-degradációt (kioltó, kvencselő anyagok). Analitikai eljárásoknál betöltött szerepükre később még visszatérünk.

A triplet állapot hosszú élettartama alatt nagyon hatékonyak lehetnek a „kioltó” (sugárzásmentes energia-eltávolító) mechanizmusok. Emiatt a foszforeszcencia rendszeren kis hatásfokú, nehezen mérhető, s nagyon érzékeny a miliőre.

## 1.3. A színeképek

Az abszorpciós színekép főleg az UV színeképtartományban (200–400 nm között) jelentkezik. Kisebb számban található olyan vegyületek is, melyek színeképe átnyúlik, vagy nagyon kifejezett a látható színeképtartományban is (pl. színreakciók). A színekép rendszerint széles sávokból áll, melyen néha finomszerkezetet találunk. A sávokat általában 1–1 elektronugráshoz rendeljük, melyek hosszuhullámú oldalán lokalizáljuk a tiszta elektronugrás frekvenciáját; míg a sáv többi részét az elektronugrással kombinálódó molekuláris (normál) rezgéseknek tulajdonítjuk („vibronic” spektrum). Ha az elektronugráshoz tartozó részsávok szélesek, az átfedések során teljes összeolvadás jön létre (szerkezet nélküli sáv), ha a részsávok keskenyek, bizonyos fokú finomszerkezet észlelhető (lásd 2. ábra A görbe).

A fluoreszcencia színekép az abszorpciós színekép hosszuhullámú oldalán kezdődik. A „tiszta” elektronugrás helye azonos mindkét színeképben\*, me-



2. ábra. Elektrongerjesztési színeképtípusok (fenantrén) A: abszorpciós színekép; F: fluoreszcencia színekép; P: foszforeszcencia színekép; I: fluoreszcencia vagy foszforeszcencia-intenzitás önkényes egységekben; e: molekuláris extinkciós koefficiens

\* A paramágneses ionok a spinpálya kölcsönhatás, a rendszámú atomok, az erős magtérhatás révén k meg a spinátfordulás valószínűségét.

\* Itt a Frank—Condon eltolódást zérusnak vesszük. További részleteket lásd Hercules idézett könyvében.

lyet rezonancia átmenetnek nevezünk. A rezgés-kombináció azonban — szemben az abszorpciós színekkel — csökkenti a részsávok frekvenciáját. A fluoreszcencia színek és az abszorpciós színek első sávja ( $S_1$ -átmenethez tartozó sáv) jó közelítéssel tükörszimmetrikusak, a szimmetriasíkot a rezonancia frekvencia helyére lokalizáljuk. A fluoreszcencia színeképet a 2. ábra  $F$  görbéje szemlélteti.

A foszforeszcencia színeképet — mint azt az energia diagramon (1. ábra) láttuk — a fluoreszcencia színeképhez képest jóval kisebb energiák, azaz a hosszuhullámok felé eltolódva jelentkeznek. Az első sáv „tisztá” elektronugrás, amely ugyancsak az alapállapot normálrezgéseivel kombinálódik.\* A foszforeszcencia színeképet a 2. ábra  $P$  görbéje szemlélteti.

A hatásfokkal kapcsolatos megfontolásaink alapján világos, hogy ha a gerjesztő fény frekvenciája nagyobb, mint a rezonancia frekvenciáé, minden gerjesztő fotonból egy  $S_1$  gerjesztett állapot jön létre, amely az adott feltételek mellett meghatározza a kvantumhatásfokot. Azt mondhatjuk tehát, hogy az abszorpciós színek területén (a rezonancia átmenetnél rövidebb hullámhosszaknál) a hatásfok konstans. Ebből nyilvánvaló, hogy az emittált fény intenzitása függ az abszorbeált fény intenzitásától. A legkedvezőbb gerjesztési feltételek megkeresésére gerjesztési színeképet nyújt biztos alapot.

Ekkor konstans fotonszámú gerjesztés mellett a gerjesztő fény frekvenciájának (vagy hullámhosszának) függvényében vizsgáljuk az emittált fény intenzitását, s az abszorpciós színekkel közel hasonló lefutású színeképet kapunk. Az abszorpciós

és gerjesztési színeképet eltéréseiből következtethetünk a molekulán belüli energia-transzfer mechanizmusokra is. A 2. ábrán  $G$ -vel jelöltük, szaggatottan rajzoltuk a gerjesztési színeképet.

## 2. A lumineszkáló anyagok

A luminometria magától értetődően csak olyan rendszerek vizsgálatára alkalmas, melyekben a vizsgálandó anyag koncentrációjával arányosan (növekvő vagy csökkenő irányban) változik a minta lumineszcencia-képessége. Bár szobahőmérsékleten, oldatban, a jól lumineszkáló anyagok száma nem túlságosan nagy, a vizsgálati feltételek alkalmas megválasztásával (közeg, kémiai átalakítás, stb.) a legtöbb analitikai feladatnak megtalálhatjuk a luminometriás megoldását. Most röviden összefoglaljuk azokat a tapasztalati tényeket, amelyek az egyes vegyületcsoportok lumineszcenciájával kapcsolatosan ismeretesek\*.

### Szerves vegyületek:

Az alifás és aliciklusos szénhidrogének nem mutatnak saját fotolumineszcenciát a látható és UV színek területén.

Az alifás és aliciklusos karbonilvegyületek rendszerint látható fényt emittálnak. Mivel abszorpciójuk 280 nm körül van, valószínű, hogy a gerjesztő fény hatására keletkezett fotokémiai bomlástermék lumineszkál. Ilyen esetben csak az analitikai eljárás igen gondos reprodukálása esetén várhatunk megbízható eredményeket.

Az aromás vegyületek mutatják a legkedvezőbb emissziós tulajdonságokat, bár a kémiai szerkezet

\* Egy molekula lumineszcenciájáért felelős molekulaszerkezeti egységet — az abszorpciós spektroszkópiában használatos „kromofor” szóképzés analógiájára — fluoroformnak, foszforofornak vagy általánosabban értelemben luminoformnak nevezzük. Itt nem foglalkozunk a szilárd „foszforok”-kal, mert ezek lumineszcenciája nem molekuláris eredetű.

\* A fluoreszcencia és foszforeszcencia színeképekben — ha van finomszerkezet — a tiszta elektronátmenet és a részsávok közötti hullámszám-különbség jó közelítéssel azonos.

Szubsztituensek hatása az aromás rendszer lumineszcenciájára

1. táblázat

| Szubsztituens  | Frekvencia | Hatása az emisszió intenzitására | $I_p/I_f^*$ | Megjegyzés                  |
|--|------------|----------------------------------|-------------|-----------------------------|
| alkil-, szulfo-, alkoxi-   | —          | —                                | nő          | —                           |
| —OH  | csökken    | nő                               | —           | pH érzékeny                 |
| —C $\begin{matrix} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{OH} \end{matrix}$                       | csökken    | erősen csökken                   | —           | pH érzékeny                 |
| —NH <sub>2</sub> ; —N $\begin{matrix} \diagup \text{R}^1 \\ \diagdown \text{R}^2 \end{matrix}$ | csökken    | nő                               | —           | pH érzékeny                 |
| —NO <sub>2</sub> ; —NO   | —          | teljes kioltás                   | → ∞         | —                           |
| Oxo-   | —          | —                                | → ∞         | H-híd felfüggeszti a hatást |
| —SH  | csökken    | csökken                          | —           | —                           |
| Halogének<br>Cl <sup>-</sup> ↓<br>Br <sup>-</sup> ↓<br>I <sup>-</sup>                          | csökken    | ↓ csökken                        | ↓ nő        | —                           |

\*  $I_p/I_f$  A foszforeszcencia és fluoreszcencia fényintenzitás hányadosa



ismeretében nem tudjuk előre megmondani, hogy milyen lumineszcencia várható. Ezért, ha lehetséges, vizsgálandó anyagainkat igyekszünk olyan átalakításnak alávetni (gyűrűzárás, aromatizáció, aromás vegyület kondenzációja stb.), hogy jól lumineszkáló aromás vegyület keletkezzék.

Az aromás szénhidrogének erősen lumineszkálnak. Minél nagyobb a konjugált rendszer, vagy a kondenzált gyűrűk száma, annál hosszabb hullámhosszú fényel gerjeszthetők, és az emittált színeként karakterisztikusabb, mint az emissziós.

A szubsztitúció döntő módon befolyásolja az aromás vegyület lumineszcencia-képességét. A szubsztitúcióval kapcsolatos legfontosabb általános megállapításokat az 1. táblázatban gyűjtöttük össze.

Heterociklikus vegyületek — hasonlóan az aromás ketonokhoz — elsősorban foszforeszcenciát mutatnak. Nagyon érzékenyek a közegben esetlegesen jelenlevő elektronakceptorokra.

A szervetlen vegyületek közül az ionok, egyszerű homogén felépítésű molekulák, kis atomszámú, monodentát ligandokkal képzett komplexvegyületek oldatai szobahőmérsékleten nem nemesgáz szerkezetű, belső (főleg f) héjjal rendelkező elemek (ritkaföldfémek, aktinidák).

A legtöbb fémionnak létezik olyan, rendszerint keláttípusú komplexe, amelynek jellegzetes, intenzív lumineszcenciája lehetőséget biztosít lumineszcenciás mikroanalízisre.

### 3. A lumineszcencia-analitikai eljárások típusai és jellegzetes tulajdonságai

Számos olyan biológiai és orvosi szempontból fontos anyag ismeretes, amelyek analitikájában — az érzékenység és szelektivitás terén — a lumineszcencia alkalmazása nagy fejlődést jelentett. Az elmúlt egy-két évtized kutatási eredményeként éppúgy lehetséges ezen az úton szénhidrátokat, lipideket, fehérjéket, nukleinsavakat és lebontási termékeiket meghatározni, mint a különböző járulékos tápanyagokat, állati és növényi szövetekre ható gyógyszereket és mérgeket, anorganikus ionokat stb. (Részleteket lásd Udenfriend idézett könyvében és az Analytical Chemistry 1960, 1962, 1964, 1966, 1968, 1970. évi áprilisi számaiban közölt White referátumokban.)

#### 3.1. Reakció típusok

Nem célunk az egyes eljárások ismertetése, de szükséges, hogy a gyakorlatban leghasználatosabb analitikai eljárások fő típusait áttekintsük. Ezek a következők:

a) „Nativ” lumineszcencia mérése. A meghatározandó anyag saját, erős lumineszcenciáját mérjük. Példa erre a szerotonin meghatározása 3 N savban. ( $\lambda_g = 350$  nm,  $\lambda_e = 540$  nm. A szervezetben előforduló többi indolszármazék ilyen körülmények között nem lumineszkál!)

b) Kémiaailag indukált lumineszcencia. A vizsgálandó anyagot kémiai reakcióval jól lumineszkáló terméké alakítjuk. Pl. a kortizolnak nincs nativ lumineszcenciaképessége. Etanol-kénsav hatására ismeretlen szerkezetű, erősen lumineszkáló anyag keletkezik belőle ( $\lambda_g = 470$  nm,  $\lambda_e = 530$  nm).

c) Kvencco-lumineszcenciás analízis. Ebben az esetben a meghatározandó anyag szelektív kvenccselője (kioltó anyaga) valamely jól lumineszkáló vegyületnek. Példaként említhetjük az acetont amely meghatározható a  $\beta$ -naftol vizes oldatának szelektív kvenccselése alapján.

d) Enzim-kofaktor módszer. Olyan anyagok meghatározására használható, amelyek enzimátikus átalakítását a kofaktor lumineszcencia-képességének megjelenése vagy eltűnése kíséri. E típus példája lehet a tejsav meghatározása laktát dehidrogenáz segítségével, amelynél a  $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$  kofaktor átalakulást intenzív fluoreszcencia kíséri.

e) Enzimaktivitás mérése. Az enzimhatás következtében keletkező vagy elbomló anyagok fénykibocsátó-képességének változását mérjük időfüggvényben. Minthogy a szubsztrát-koncentráció nagy az enzim-koncentrációhoz képest, a Michaelis-Menten elmélet értelmében a koncentráció, s ezzel az emittált fény intenzitása lineárisan változik az idő függvényében. Példaként említhetjük a  $\beta$ -glukoronidáz aktivitásának mérését, amelynél az enzim a gyengén fluoreszkáló umbelliferon-glukuronidból, az enzim-koncentrációtól függő sebességgel, erősen fluoreszkáló umbelliferont szabadít fel. Ezt a reakciótypust a leggyakrabban hidrolitikusan bontó enzimek vizsgálatánál használjuk.

#### 3.2. A módszer érzékenysége

A lumineszcencia-analitikai eljárások nagyon érzékenyek. Általában ppm koncentrációjú anyag kényelmesen mérhető. Gyakran találkozunk olyan módszerekkel, amelyekkel  $10^{-2}$ – $10^{-3}$  ppm-nyi mennyiségek is mérhetők, s extrém esetben a  $10^{-4}$  ppm is elérhető. A rendkívüli esetektől eltekintve azt mondhatjuk, hogy a lumineszcenciás módszer legalább egy nagyságrenddel érzékenyebb, mint a spektrofotometria.

#### 3.3. A szelektivitás

A szokásos analitikai módszerekkel szemben kitűnik a lumineszcencia nagyfokú szelektivitásával. A gerjesztési viszonyok nagyfokú variálhatósága, az emittált fény színeképi jellegzetessége, hatások,  $I_p/I_f$  arány, a kioltó anyag iránti specifikus érzékenysége mind olyan tényezők, amelyek a szelektivitást nagymértékben növelik.

#### 3.4. A koncentráció és lumineszcencia fényintenzitás összefüggése

Adott  $d$  rétegvastagságú küvetében egy  $C$  mol/l koncentrációjú oldat  $I_F$  fluoreszcencia-intenzitása, ha megfelelő hullámhosszú, párhuzamos  $I_0$  intenzitású sugárral gerjesztjük, amelyre a luminofor molekuláris extinkciós koefficiense  $\epsilon$ , kvantumhatásfok pedig,  $\Phi_F$ , a következő egyenlettel írható le:

$$I_F = 2,3 \cdot I_0 \cdot \Phi_F \cdot \epsilon \cdot C \cdot d,$$

azaz az  $I_F$  lineáris függvénye a luminofor koncentrációnak. A meghatározás linearitás-hibája kisebb, mint 4%, ha a

$$C \cdot d \leq 0,02.$$

Az  $I_p/I_f$  érték analitikai eljárásoknál általában kicsi, ezért az  $I_F$ -re megadott összefüggés jó közelítéssel a teljes lumineszcenciára is használható.

A foszforeszcencia színképi komponens analitikai felhasználása (foszforimetria) hasonló elvek szerint történik. Az  $I_P$  összefüggés megegyezik az  $I_F$ -re megadottal, csupán két korlátozás van:  $\Phi_P$  helyett a foszforeszcencia hatásfokot  $\Phi_F$  kell venni, s a lineáris összefüggés kisebb koncentrációtartományra érvényes mint a fluoreszcencia esetében ( $\epsilon_{Cd} \leq 0,05$ ).

### 3.5. A kvencselő hatás koncentráció-függése

Ha a kioltó anyag nélküli minta (referens) lumineszcencia intenzitását  $F_0$ -val jelöljük, akkor  $C_q$  koncentrációjú kioltó (kvencselő) anyag jelenlétében a mért lumineszcencia intenzitás  $F_q$ . E mennyiségek közötti összefüggést matematikailag a Stern–Volmer törvény írja le, miszerint

$$C_q = k \frac{R_0 - F_q}{F_q}$$

ahol a  $k$  kioltás valószínűségi állandója (a kalibrációs görbe meredeksége), míg a fényintenzitásokból képzett hányados a kioltás mértékét fejezi ki.

### 4. Méréstechnikai alapelvek

A luminométereket — attól függően, hogy milyen optikai felbontórendszerrel készülnek, három csoportra oszthatjuk:

1. szűrős készülékek
2. egy-monokromátoros készülékek
3. két-monokromátoros készülékek (spektroluminométerek)

Mindhárom készüléktípus a 3. ábrán látható blokk-séma szerint épül fel.

Az egyes készüléktípusok szerkezeti jellegzeteségei és teljesítőképessége az alábbiakban foglalható össze:

#### 4.1. Szűrős készülékek

Fényforrásuk kisteljesítményű (40–100 W közötti) kis, közepes vagy nagynyomású Hg-lámpa.

A lámpának vonalas színképpűnek kell lennie, mert csak akkor várható, hogy a viszonylag szélessávú  $M_1$  gerjesztő-szűrő csak a gerjesztő vonalat engedi át, és nem jelentkezik nagy háttér az  $M_2$ -szűrőnél. E célra nagyon kedvező tulajdonságokkal rendelkezik az OSRAM HQE-40 típusú Hg–Cd-lámpa.

A sugármenet analitikai készülékek mintaterében derékszögű, azaz a gerjesztés és megfigyelés iránya derékszöget zár be, és mivel a luminoforok száma kicsi a gerjesztő fotonokéhoz képest, az oldaton áthaladó gerjesztő fény az egész rétegvastagságban egyenlő intenzitású lumineszcenciát hoz létre. Ebből következik, hogy a lumineszcencia fénykihasználás és a gerjesztő fény elimináció derékszögű elrendezésben a legkedvezőbb. Szerkezeti célokra használt készülékek mintaterében előnyösebben használható a hegyesszögű sugármenet. Ekkor ugyanis a luminoforok koncentrációja nagyobb, mint a gerjesztő fotonoké, s a mintának csak vékony rétege abszorbeál és világít (vagy a minta világítása a cellában — rétegvastagság függvényében — erősen csökkenő tendenciát mutat).

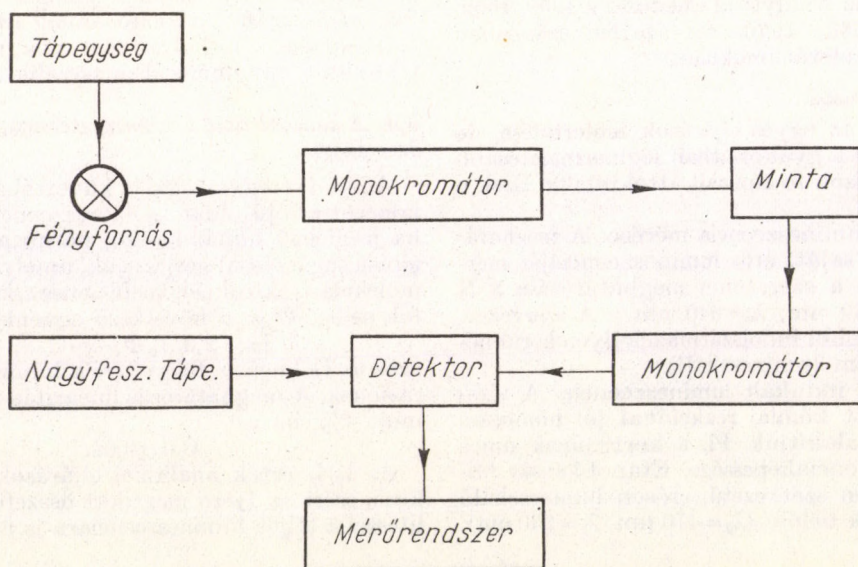
Az  $M_1$  célszerűen kb. 30% transzmissziójú fémlinterferencia szűrő.

A használható gerjesztő vonalak: 254\*, 313\*, 365, 405, 436 nm. (A csillaggal jelzett hullámhosszak izolálásához folyadék-szűrőket kell alkalmazni, s ügyelni kell arra, hogy minden optikai elem vagy reflektáló típusú legyen, vagy transzmissziós típus esetén kvarcból készüljön.)

A fényforrás tápáramának kb.  $10^{-4}$  stabilitásúnak kell lennie.

Az  $M_2$  fluoreszcencia vágószűrők azt a célt szolgálják, hogy a mintán szóródó gerjesztő fényt a detektorból kiszűrjék, és ha lehet, minél több lumineszcencia fényt engedjenek át. A leghasználatosabbak a Corning és a Schott fluoreszcencia vágószűrők, melyek típusait a 4. ábrán láthatjuk.

A detektor minden készüléktípusban fotomultiplier. Szűrős készülékeknél 300 nm felett előnyösen használhatók az olcsó RCA 931 A, 200 és 300

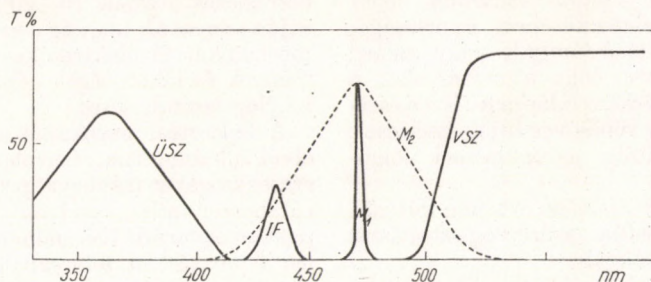


3. ábra. A luminométerek szerkezetének elvi vázlata

nm között az IP21 és IP28, ill. a nekik megfelelő egyéb típusok (pl. EMI 9662), amelyek jól üzemeltethetők 500–1000 V közötti feszültségen. A legfontosabb multiplier-típusok katóderzékenységének hullámhosszfüggését az 5. ábrán mutatjuk be.

A berendezés a nagyfeszültség hosszú idejű

ben tud tenni (lumineszcencia színképi differenciáló vizsgálatok). Ekkor fényforrásként 200 W-os nagy nyomású Hg-gőzlámpákat (OSRAM) használunk, amelyet interferencia szűrővel monokromatizálunk. Gerjesztő vonalként használható a 366, a 404 és 436 nm-es Hg-vonal. A differenciáló eljárás

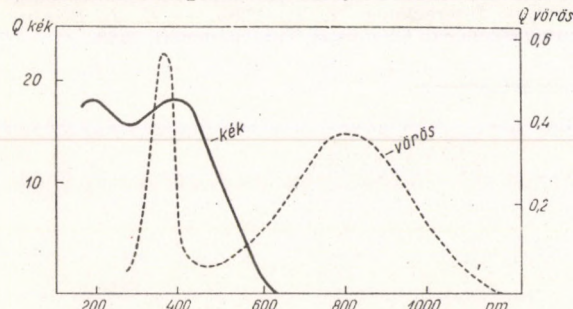


4. ábra. Különböző monokromatizáló elemek karakterisztikája

ÜSZ: üvegszűrő a 366 nm-es Hg vonalra (ugyanilyen jellege van az UV-ban használt folyadék szűrőknek is.)  
IF = interferencia-szűrő a látható színkép tartomány-

ban; VSZ = vágószűrő (a görbétől a rövid hullámok felé elnyel, a hosszú hullámok felé áttereszti.  $M_1$  = Monokromátor keskeny réssel (Beckman monokromátor 0,01 mm réssel 400 nm-nél)  $M_2$  = u. az széles réssel (Beckman monokromátor 0,3 mm-es réssel.)

$10^{-4}$  stabilitását igényli. A fotoáram mérésére ideális kompenzációs elektrométert használni. A lumineszcencia-mérés megkívánja, hogy a fotométer a fényintenzitásnak legalább 5 nagyságrendes változását tudja mérni. Az érzékenységi határnak el kell érnie a 100 pL-t.



5. ábra. Kék és vörösérzékeny multiplierok katóderzékenysége hullámhosszfüggvényben.  $Q$  = kvantumhatásfok

#### 4.2. Egy-monokromátoros készülékek

Kétfélek lehetnek aszerint, hogy a monokromátor az  $M_1$  vagy az  $M_2$  helyen szerepel-e. Ha az  $M_1$  monokromátor, akkor a készülék alkalmas kis sáv szélességű gerjesztésre, folytonos színképi fényforrás esetén is. Ilyen esetben célszerű gerjesztési differenciálás céljára xenonlámpát használni fényforrásként. Az analitikai luminométerekben rendszerint 150 W-os Hanovia (USA) vagy 160 W-os OSRAM (esetleg Tungram) gyártmányú xenonlámpát használunk. A készülék több alkatelemre megegyezik a szűrős fotométernél ismertekkel, azzal a különbséggel, hogy itt már célszerű nagyérzékenységgű, kis zajú, nagy erősítésű speciális multiplierket használni. Magyarországon e célra a legkönnyebben hozzáférhetők az EMI cég gyártmányai, melyek közül a 6256 S és B kék-, illetve 9684 B vörösérzékeny látszik a legmegfelelőbbnek.

Ha az  $M_2$  egység monokromátor, akkor a készülék finom különbségeket csak az emittált színkép-

rás hatékonyabbá tételére a monokromátort motorikus meghajtással kell ellátni, és a színképet kompenzográfval kell regisztrálni. Detektorai ugyanazok, mint az előzőnek.

Az egy-monokromátoros készülékekben fényáram stabilizálás vagy arányregisztrálás szükséges.

#### 4.3. Spektro-luminométerek

A spektro-luminométerek elsősorban a kutatás eszközei. A gerjesztő és lumineszcencia sugárzás monokromátoron halad keresztül, azaz egyesíti az egy-monokromátoros készülékek két típusának tulajdonságait. Analitikai célra azonban előnyösebbek az egy-monokromátoros készülékek, mivel a vágószűrők segítségével a teljes lumineszcencia színkép (fluoreszcencia + foszforencia, vagy foszforencencia) fényintenzitás együtt mérhető.

A 4. ábrán a monokromátorok részfüggvényét is felrajzoltuk, s világosan látszik, hogy a teljes lumineszcencia színképet áttereszti sáv szélességnél — a részfüggvény kisebb meredeksége miatt — a gerjesztő vonal nagy „háttérrel” eredményez, s ebből világos, hogy analitikai célra az egy-monokromátoros berendezések a legmegfelelőbbek.

A spektroluminométerek érzékenysége általában megegyezik az egy-monokromátoros analitikai berendezésekével, csak itt a felhasználás más irányú. Nem a (kimutathatóság) mérhetőség határán akarunk koncentrációt meghatározni, hanem színképet akarunk nyerni, sok esetben a lehető legkisebb réssel (finomszerkezet-vizsgálatok).

A spektro-luminométerek az előző két típustól mindemellett abban különböznek, hogy ezekben a mérés teljesen automatikus. A monokromátorok frekvencia vagy hullámhossz továbbítása előre programozható módon motorikusan történik.

A spektro-luminométerekben Hg- és Xe-lámpát egyaránt használhatunk. A teljesítményt gyakran megnöveljük (500 W-os Hg- vagy 450–1000 W-os Xe-lámpával, az utóbbihoz azonban 50 A-es tápáram szükséges).

Analitikai felhasználású készülékeknel általában 300 mm fókusztávolságú kollimátor tükörrel rendelkező rács vagy kvarcprizmás monokromátorok szükségesek. Szerkezetkutatási célokra használt nagyfelbontású monokromátorok kollimátorának fókusztávolsága elérheti a 4–8 m-t is.

A spektro-luminométerek detektor- és mérőrendszere általában megegyezik az egy-monokromátoros berendezésekével. Fontos szempont lehet azonban a félvételek elkészítésének gyorsasága, különösen nagy intenzitású lámpák vagy szilárd minták használata esetén, hogy a mérés alatt a mintát minél kisebb sugárkárosodás érje. Ilyen esetben oszcilloszkópos vagy képcsöves kijelzéssel, esetleg nagysebességű digitális jelrögzítéssel dolgozunk.

A gerjesztési feltételek konstans értéken tartását referens detektor biztosítja (arányregisztrálással vagy fényáram stabilizálással).

A modern spektro-luminométerek számos adattal rendelkeznek. Alkalmask hegyesszögű és derékszögű lumineszcencia, gerjesztési és reflexiós színek felvételére, s a nagyobb készülékek (értékük lényegesen meghaladja az 1 millió forintot) alkalmask depolarizációfok, mélyhőmérsékletű színek, forgatóképességi diszperziós görbék felvételére is.

#### 5. Hazai törekvések, eredmények

A hazai kutatás rendkívüli mértékben igényli a luminometriás analízisek alkalmazását. Import beszerzési nehézségek miatt arra nem lehet gondolni, hogy az előzőekben ismertetett készüléktípusokat

a szükséges darabszámban külföldről szerezzük be, ezért a felhasználó, elméleti és konstrukciós szakemberek társulásával megvizsgáltuk a luminometriás mértéstechnika bevezethetőségének hazai feltételeit, s létrehoztuk az egyes műszertípusok mintapéldányait.

A készülék esszenciális elemeit, a fényforrásokat, detektorokat, felbontó elemeket, melyek a teljes berendezés árának 10–20%-át teszik ki, import útján szereztük be, míg a szükséges optikai, finommechanikai és elektronikus egységeket a követelmények és lehetőségek célszerű összehangolásával házilag hoztuk létre.

A fejlesztési munkánál az ún. „építő modell”-elvet alkalmaztuk. Létrehoztunk olyan standard részegységeket (tápegységek, detektorrendszer, mérőrendszer stb.), melyek mindegyik készüléktípusban egyaránt használhatók. Ily módon a készülék fejlesztése a felhasználó részéről csak újabb, kiegészítő egységek vásárlására korlátozódik.

A következő közleményekben ismertetjük az előzőekben vázolt készüléktípusok hazai megoldásait, alkalmazásuk területét és a használatuk során szerzett tapasztalatokat.

#### TOVÁBBKÉPZÉSRE AJÁNLOTT IRODALOM

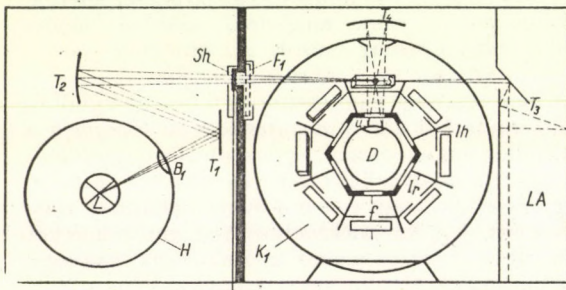
*P. Pringsheim*: Fluorescence and Phosphorescence Interscience N. Y. 1949. — *Th. Förster*: Fluorescence organischer Verbindungen Vanderhoeck und Ruprecht Göttingen, 1951. — *S. Udenfriend*: Fluorescence Assay in Biology and Medicine Academic Press N. Y., 1962. — *D. M. Hercules*: Fluorescence and Phosphorescence Analysis Interscience N. Y., 1965. — *E. J. Bowen*: Luminescence in Chemistry Van Nostrand, 1968.

DR. SZÓKE JÓZSEF<sup>1</sup>  
 DR. KOVÁCS SÁNDOR<sup>2</sup>  
 LÁSZLÓ ZOLTÁN<sup>3</sup>

## A luminometria alkalmazása a klinikai laboratóriumban és az orvostudományi kutatásokban

### II. Rutin analitikai luminométer

A szűrős készülékek képezik a luminométer műszercsalád legegyszerűbb tagjait. Felépítésük és információszolgáltató képességük tekintetében megfelelnek a szűrős fotométereknek és felhasználásuk fő területe a rutin analitika. Emiatt lényeges, hogy a szerkezeti elemek kiképzése könnyű kezelhetőséget és nagy üzembiztonságot nyújtson a felhasználó laboratórium számára.



1. ábra. A rutin analitikai luminométer szerkezeti vázlata (Az ábrajelzéseket lásd a szövegben)

Rutin analitikai luminométerünk\* szerkezeti vázlatát az 1. ábra szemlélteti. Az egyes részekkel kapcsolatos elvi megfontolásokat az 1. közleményben [6] foglaltuk össze, ezért most csak a megvalósított berendezés és a használata révén szerzett tapasztalatok ismertetésére térünk ki. Részletebben foglalkozunk a mérési módszerekkel, mert ezek általános jelentőségűek, de nem elég általánosan ismertek és alkalmazottak.

#### A készülék leírása

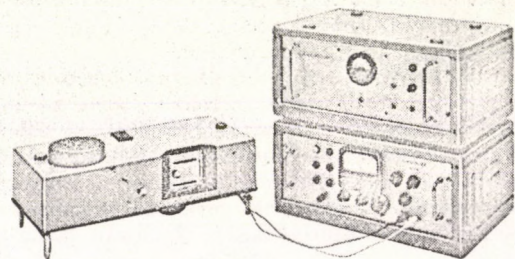
A rutin analitikai luminométer 3 részegységből áll: fényforrás-tápegységből, optikai berendezésből (ez lényegében fotométer) és az elektronikus mérőrendszerből (2. ábra).

A fényforrás tápegység szolgál az OSRAM HQE-40 típusú Hg—Cd spektrállámpa egyenáramú táplálására. Stabilitása a hálózat 180 és 240 V feszültségtartományában jobb, mint  $2 \cdot 10^{-4}$ , hosszú üzemeltetés esetén is. A lámpa tápárama 0,4 vagy 0,5 A átkapcsolhatóan aszerint, hogy a lámpából kisebb vagy nagyobb fénytelsítményt kívánunk kivenni. (Megjegyezzük, hogy 0,4 A-rel üzemeltetve napi 5 órás átlagüzemet számítva, egy lámpa élettartama meghaladja a 3 évet, míg 0,5 A esetében az átlagos élettartam nem nagyobb 1 évnél. Tapasztalataink szerint rövid idejű nagyobb telje-

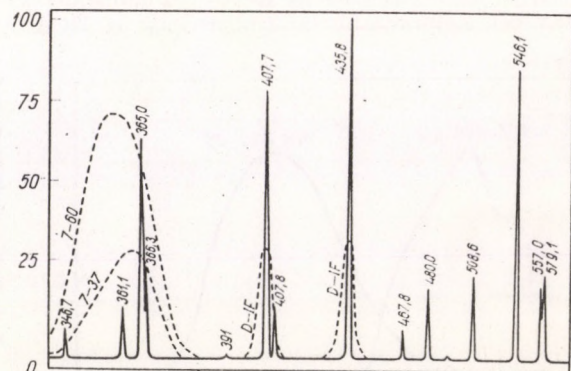
sítmény nem károsítja számottevő mértékben a lámpát.)

A fényforrás gerjesztésre alkalmas vonalait a 3. ábrán láthatjuk, spektrofotométerrel mérve, detektor és készülék-karakterisztika-korrekciónélkül. (Lényegében ugyanilyen érzékenységgű és karakterisztikájú az itt alkalmazott fotométer is.) A gyakorlat szempontjából az erősnek látszó vonalak közül is csak azok alkalmazhatók gerjesztésre, amelyek az ultraibolyába és a látható színekék tartományába esnek (blue light). A számításba jövő vonalak száma tehát csekély: 365, 404 + 407 és 436. Kedvező feltételek és nagy detektorérzékenység esetén a 332 + 313, esetleg a 461 nm-es vonalcsoport is felhasználható gerjesztésre. A lámpa többi vonala elsősorban spektrofotométer-hitelesítésnél használható.

Az optikai sugármenet az 1. ábrán, a berendezés fényképe a 2. ábrán látható. Az L lámpa fénye a H lámpaház B<sub>1</sub> nyílásán, mint blendén keresztül



2. ábra. A rutin analitikai luminométer fényképe



3. ábra. Az OSRAM HQE-40 típusú Hg—Cd spektrállámpa emissziós színepe egy-ugaras spektrofotométerrel mérve. Detektor: EMI 6256. Kvaremonokromátor, az abszcissza prizmadiszperzió-lénebris. A szaggatottan bejelölt ábrák a rutin analitikai luminométerben alkalmazott gerjesztő szűrők karakterisztikáját szemléltetik

<sup>1</sup> Központi Fizikai Kutató Intézet, Budapest.

<sup>2</sup> Tolna Megyei Tanács Ballasa János Kórház Laboratóriuma, Szekszárd.

<sup>3</sup> Elektrotechnikai KTSZ, Budapest.

\* A készülék beszerezhető a MIGÉRT kereskedelmi vállalatnál keresztül.

a  $T_1$  siktükörre esik, amely a fényt a  $T_2$  leképző tükörre vetíti. A fény az  $Sh$  optikai zár („shutter”) on keresztül, továbbá az  $B_1$  cserélhető filteren (optikai szűrőn) át a mintatérbe jut és az  $S$  minta közepébe képezi le a lámpa világítótestének éles képét. A nem abszorbeált, s az  $S$  mintán áthaladó sugár a  $B_2$  nyíláson keresztül a készülék elzárt  $LA$  terébe jut, ahol a  $T_3$  fekete felületről az ugyancsak feketére festett fénylabirint falára eső szórt sugárzás maradéktalanul abszorbeálódik.

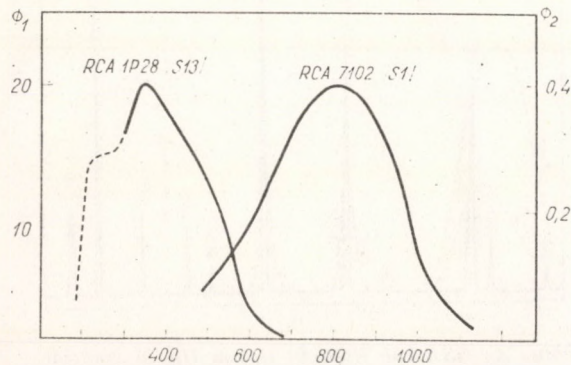
Az  $Sh$  optikai zár (shutter) elzárja a fényutat, vagy teljesen szabaddá teszi azt aszerint, hogy a műszer elülső falán levő nikkelezett gombot ütközésig benyomjuk vagy ütközésig kihúzzuk. Zárt shutter esetén a mintatérben tökéletes fénymentesség uralkodik.

A mintában keletkezett szekunder sugárzás (fluoreszcencia vagy foszforeszcencia) főleg a fókuszpontból indul ki és a tér minden irányában halad. A készülék ebből azokat a kb.  $20^\circ$ -os kúp-szög alatt érkező sugarakat hasznosítja, amelyek a lámpa éles képe és a detektornyílás által határolt térfogatban jelen vannak. A szórt gerjesztő sugárzás eliminálására szolgálnak a  $K_1$  mintatartó tárcsán radiálisan és hexagonálisan elhelyezett  $lr$ ,  $la$ ,  $ls$ ,  $lh$  terelőlemezek.

A mintáknak a detektorral szemben levő oldalán a  $T_4$  homorú tükör foglal helyet, azzal a céllal, hogy a detektorral ellenkező irányban haladó sugarak egy részét a mintán keresztül az érzékelő felületére vetítse. Ez a tükör csaknem kétszeresére emeli a detektált fény mennyiségét (a veszteség főleg önabszorpció következménye).

Gerjesztő sugárzás szűrői közül a 365 nm-es vonal izolálására üveg alakú relatíve széles sávú Corning 7-37 vagy 7-60 (esetleg Schott UG-4 jelű) szűrőt, míg hosszabb hullámhosszú, látható színképvonalakhoz (405, 436) fém-interferencia szűrőket használunk. A készülék gerjesztő szűrőinek transzmissziós karakterisztikái a 3. ábrán láthatók.

A  $D$  detektorház (lásd 1. ábrán) a mintatér közepén foglal helyet, a benne levő kékérzékes RCA 1P21; 931A; EMI 9665 B stb., vagy a beépített foglalatba illő vörösérzékes RCA 7102 multiplier-rel. A két legfontosabb multiplier-típus az RCA



4. ábra. Az RCA 1P21 és 7102 típusú fotomultiplier hullámhossz-érzékenység karakterisztikája.  $\phi_1$  és  $\phi_2$  ordináták az 1P21, illetve 7102 típusú multiplierrek kvantumhatásfokát jelentik

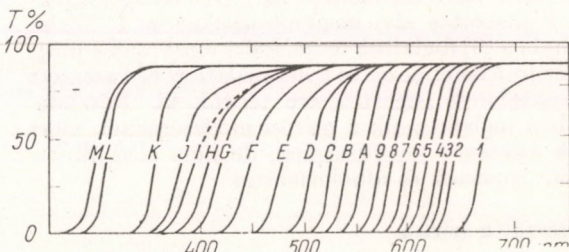
1P21 és az RCA 7102 érzékenység karakterisztikáját a 4. ábra mutatja. A detektorház  $U$  megvilágító nyílása a készülék hátlapja felé néz, így mintacserék során a kívülről bejutó szórt fények minimálisra vannak csökkentve. Ezt segítik elő a mintatartó tárcsa terelőlemezei is.

A  $D$  detektorház külső felületén szerelték fel a 6 darab vágószűrő befogadására szolgáló  $K_2$  szűrőtárcsát, és alatta a 8 minta befogadására alkalmas mintatartó tárcsát. Mindkét tárcsa a készülék elülső oldalán profilmozgatással tetszőleges arretált helyzetbe állítható.

A mintatartóban különböző méretű és alakú makro- ( $1 \times 1 \times 4$  cm) és mikro- (pl.  $0,5 \times 1 \times 2$  cm-es vagy 3 mm átmérőjű, 2 cm magas henger alakú) követváltak helyezhetők el.

A készülék  $25 \times 40$  mm-es vágószűrői cserélhetők. Alkalmassak e célra megfelelő méretre vágott Schott vagy Corning szűrők. Az utóbbiak transzmissziós adatait az 5. ábrán láthatjuk.

A mérőrendszer nagyfeszültségű tápegységből és elektrométerből áll. A nagyfeszültségű tápegység a multiplier dinóda-feszültségét szolgáltatja, s folyamatosan szabályozható 500 és 1300 V között. Megjegyezzük, hogy — bár a méréstartomány lehetővé teszi, — a készülékbe beépített multipliereket nem célszerű tartós üzemben 1000 V-nál nagyobb feszültségen használni, mert könnyen károsodhatnak. A nagyfeszültség rövid idejű stabilitása 1000 V-on jobb mint  $5 \cdot 10^{-5}$ , a hosszúidejű stabilitása normálüzemben egy év alatt sem rosszabb  $10^{-4}$ -nél. Célszerű évenként utánszabályozást kérni.



5. ábra. A luminométerben alkalmazható CORNING vágószűrők (a szekunder sugárzás izolálására)

Az elektrométer nagy bemenő-impedanciájú egyenáramú híd, amelyet analitikai berendezésekhez, a nagyobb pontosság érdekében kompenzációs technikával használunk. E célra gondosan szerkesztett, precíziós (0,1%-os) lineáris helipottal kompenzáló áramkört építettünk, így a mérési eredményt egy 1000 osztású mikrodiál értékeiben nyerjük. Használhatjuk a mérőrendszert regisztrálóval vagy digitális konverterrel együtt is. Ekkor a hídgyensúly felborulását mérjük. A mérőrendszer ilyen irányú alkalmazásáról a 4. és 5. közleményben számolunk be.

A mérés pontosságára és reprodukálhatóságára utaló elektromos paraméterek közül a fotométer műszerbeállítási pontossága a legkisebb érzékenység esetén is jobb mint 0,1%, azaz 1 mikrodiál-osztás. Az elektrométer saját sötétárama (multiplier nélkül)  $2 \cdot 10^{-10}$  A. A mutatós-műszer érzékenysége: 4 mV/osztás (a legkisebb érzékenység

mellett). A detektálási határ kisebb, mint 1 nA. A sötétáram elcsúszása kisebb, mint 0,3 műszerosztás/óra, 900 V-on mérve.

A mérőrendszer fontos kezelőszerve a háttérkompenzációs potenciométer. Nagyon fontos a mérések gyorsaságának és hibaforrásainak csökkentése szempontjából, hogy egy relative gyengén fluoreszkáló, esetleg erősebben szóró minta esetén — amikor megfelelő háttérkorrigáló referencia rendelkezésre áll — a készülék „sötétáramá”-t úgy tudjuk eltolni, hogy ezzel a referens anyag háttérértékét maradéktalanul kompenzálhassuk. Ekkor a minta mért fénykiterése teljes mértékben a lumineszcenciához rendelhető. A készülék háttérkompenzáló képessége felöleli a mérő potenciométer teljes méréstartományát. (Tehát a mérendő fényintenzitással egyenlő háttérintenzitás is korrigálható.)

### A mérési eljárás

A mérés alapját a mérőpotenciométer képezi. Három jellegzetes pontját (zero, 1000 és a csúszó-érintkező) az ÜZEMMÓD kapcsoló illeszti a hídhoz, amelyen a megfelelő jelölések: 0 (zero), *H* (hitelesítés) és *M* (mérés). A mérés során minden művelettel a mutató műszert (null-indikátor) a megfelelő kezelőszervvel kompenzáljuk zérusra (lásd az alábbi pontokat). A mérés egyes lépései a következők:

1. A mintákat behelyezzük a mintatartóba (egyszerre 8 fér bele) a következő sorrendben:

vak, standard, mérendő minták (1...6).

A vak megfelel a gyakorlatban használt fogalomnak, tehát minden reagenst tartalmaz, a meghatározandó anyagon kívül. A „standard”-tól célszerű, ha megkívánjuk, hogy nagyobb legyen az emissziója, mint a legtöményebb mérendő anyagé.\*

2. A „vak”-ot a fényútba állítjuk, s nyitott shutter mellett az ÜZEMMÓD kapcsoló „0” állásában a SÖTÉTÁRAM gombbal a műszert nullázzuk. Ez a beállítási mód eltér a spektrofotometrikus méréstől és háttérsugárzás korrigálására, szolgál.

3. A „standard”-ot állítjuk a fényútba, az ÜZEMMÓD kapcsolót *H* (hitelesítés)-re állítjuk, majd a műszert az érzékenységszabályozó gombokkal (NAGYFESZÜLTÉSÉG, MUNKAELLENÁLLÁS, ÉRZÉKENYSÉG) nullára kompenzáljuk. Ezzel a művelettel a „standard” érzékét 1000-re állítjuk be.

4. A 2. és 3. pontban leírtakat többször ellenőrizzük egy mérési sorozat elején, mert az érzékenység megváltoztatása a háttérkompenzáció értékét is jelentős mértékben megváltoztathatja.

5. Az ÜZEMMÓD kapcsolót *M* (mérés)-re állítjuk. Mintát teszünk a fényútba, a műszert a MÉRŐPOTENCIOMÉTER-rel nullázzuk és állását 3 számjegynyi pontossággal leolvassuk.

\* Kijelölés vizsgálatoknál a „Hitelesítés”-t 0 koncentrációjú mérendő anyaggal végezzük. A standard koncentrációt pedig közepes értéknek választjuk, oly módon, hogy a hozzárendelhető fényintenzitás kb. 500-as dial-osztású fotoáramot eredményezzen.

6. Kalibrációs görbe segítségével meghatározzuk a minták koncentrációját.

A vázolt mérési eljárás mellett praktikus jelentősége az alábbi négy módszernek van:

#### a) Koncentráció-hitelesítéses eljárás:

Alkalmazása esetén mérőhelipoton leolvasott eredmények közvetlenül a keresett koncentrációértékeket adják. Ekkor a „standard”-del nem 1000-re hitelesítünk a 3. pont szerint, hanem az ÜZEMMÓD kapcsoló *M* (mérés) állásában a MÉRŐHELI-POT-on beállítjuk a „standard” tényleges koncentrációértékét, majd az érzékenységszabályozó gombokkal zérusra kompenzáljuk a nulla-indikátort. A 4. pont utasításait végrehajtjuk oly módon, hogy a 3. pont helyett az itt közölt koncentráció-hitelesítéses eljárást alkalmazzuk. Ezt a módszert csak olyan esetekben használhatjuk, ha a meghatározási módszer kalibrációs görbéje lineáris.

#### b) Eljárás kis emissziós értékek meghatározására:

Ha a mérendő anyag koncentrációja nagyon kicsi, a mért emissziós értékek is kicsik és ez nagyon pontatlan koncentrációmeghatározást tesz lehetővé. A MUNKAELLENÁLLÁSOK precíziós értékei lehetőséget biztosítanak nagyobb numerikus értékek leolvasására is. A módszer a következő: ha a mérési eredmény túl kicsinek bizonyult, akkor megbecsüljük, hogy kb. hány-szoros értéke volna kedvező számunkra mérési eredményként. Ennek megfelelően forgatjuk el az óramutató járásával egyező irányba a MUNKAELLENÁLLÁS kapcsolót. Az érzékenységszabályozással a sötétáram értéke is megváltozik, tehát azt utána kell szabályozni a beállított fokozatban a 2. pont szerint. A leolvasott mérési értéket osztjuk az érzékenység-növelés értékével.

#### c) Eljárás a „standard”-nél nagyobb emissziós intenzitások mérésére:

A módszer az előbbivel teljes mértékben megegyezik, azzal a különbséggel, hogy a MUNKAELLENÁLLÁS-kapcsolót most az óramutató járásával ellenkező irányba kell elforgatnunk, s a végén az érzékenység-csökkentés mértékével szoroznunk kell.

#### d) Eljárás nagy (kompenzálhatatlan) háttérsugárzás esetén:

Háttérkompenzáció helyett sötétáramot kompenzálunk. Leolvassuk a „vak” értékét és az előírás szerint mérjük a minták emisszióját. A standard-dal a műszerkiterést 1000-re állítjuk az erősítő-gombok segítségével (sötétáram ellenőrzés!), majd sorban leolvassuk a mintáknak megfelelő mikro-dial-osztást. A valódi koncentrációt (*C*) — lineáris kalibrációs görbét — feltételezve az alábbi összefüggésből nyerjük:

$$C = \frac{m-v}{1000-v} \cdot C_s$$

A képletben *m* a minta, *v* pedig a háttérsugárzás értéke. Mindkettő a mérőpotenciométer mikro-dial-osztás értékét jelenti. *C<sub>s</sub>* a standard oldat koncentrációja.

| Meghatározandó anyag         | A minta eredete   | Gerjesztő szűrő | Vágó szűrő | Reagens | Konc. tart. ppm | Irodalom |
|------------------------------|-------------------|-----------------|------------|---------|-----------------|----------|
| Mg .....                     | szérum vizelet    | 436             | 510        | Oxin    | 0,1—10          | [1]      |
| Katecholaminok .....         | vizelet           | 405<br>391      | 495        | —       | 0,01—<br>0,25   | [2]      |
| Uroporphyrin .....           | vizelet           | 405<br>391      | 595        | —       | 0,001—<br>0,05  | [3]      |
| Coproporphyrin .....         | vizelet           | 391<br>405      | 595        | —       | 0,001—<br>0,05  | [4]      |
| Cortisol és Corticosterol .. | vizelet<br>szérum | 436             | 550        | —       | 0,001—<br>0,1   | [5]      |

### Mérési pontosság, érzékenység

A luminométerektől ugyanolyan mérési pontosságot várunk, mint a transzmissziós fotométerektől, azaz kedvező mérési feltételek mellett 1% abszolút és 0,3% reprodukciós pontosságot.

Az ismertett berendezés maradéktalanul teljesíti ezt a követelményt. A luminometriában szokásos hitelesítő anyagot, a kinin-szulfátot használva 1 ppm koncentrációban, a mérés a fenti értékeken belüli eredményeket szolgáltat. Kis koncentrációk esetében a pontosság ugyanúgy alakul, mint az abszorpciós módszereknél.

Az érzékenység a luminométerek esetében elsősorban alkatrész kérdés. A multiplier sötétárama, erősítése, karakterisztikája, a nagyfeszültség stabilitása és értéke, valamint az alkalmazott szűrőkészlet határozza meg, hogy egy adott feladatot milyen feltételek mellett oldhatunk meg. Nem elhanyagolható szempont azonban a mintatér geometriájának kialakítása sem, amely a háttérsugárzás értékét határozza meg. Az ismertett berendezésnél bizonyos kompromisszumot kellett tennünk az árcsökkenés érdekében. Olcsó multipliert használtunk, üvegszűrőkkel monokromatizáltunk (meglehetősen rossz hatásfokkal!). Az érzékenység becslésére a következő megfontolással élhetünk: a kinin-szulfát 1 ppm koncentrációjú oldatának legkedvezőbb mérési feltételét állítjuk be és megállapítjuk, hogy mekkora érzékenység-tartalékkal rendelkezünk. Ezzel az értékkel osztva az 1 ppm-et, nyerünk egy fiktív kinin-szulfát határérzékenység-koncentráció értéket. Készülékünk esetében ez az érték:  $3 \cdot 10^{-4}$  ppm. A gyakorlatban 0,01 ppm koncentrációt tekinthetjük a mérés alsó határának, mert alatta a háttérsugárzás értéke elfedi a tényleges mérési információkat.

### A készülék laboratóriumi alkalmazása

Az ismertett készüléket a Szekszárdi Megyei Kórház Központi Laboratóriumában állítottuk üzembe. Az elmúlt 3 év alatt meghibásodás nélkül üzemelt, s a következő méréseket végeztük rajta rendszeresen, jó eredménnyel (újabb módszerek beállítása folyamatban van).

### Összefoglalás

Rutin analitikai luminométer szerkezeti felépítését és használatának módját ismertetik a szerzők. Fényforrása Hg—Cd lámpa (OSRAM HQE-

40). A gerjesztő vonalakat üveg (366 nm) és féminterferencia (404+407, illetve 436 nm) szűrőkkel, míg a lumineszcencia fényt 6 db CORNING gyártmányú vágószűrővel izolálják. Detektora RCA 1P21 típusú fotomultiplier, amelynek dinódafeszültségét egy  $2,5 \cdot 10^{-5}$  stabilitású nagyfeszültségű tápegység szolgáltatja 500 és 1000 volt között folyamatosan. A mérés pontossága:  $\pm 0,3\%$ . A készülék makro- (max. 5 ml) és mikro- (min. 10  $\mu$ l) minták mérésére alkalmas.

### Irodalom

- Schachter, D.: J. Lab. Clin. Med. 1959, 54, 763. —
- v. Euler, U. S. and Lishajko, F.: A Physiol. Scand. 1959, 45, 122. —
- Schwartz, S., Berg, N. H., Bossmayer, I., Dinsmore, H.: Methode of Biochemical Analysis 3, 221. Interscience Publ. 1960. N. Y. —
- Talman, E. L.: Standard Methods of Clinical Chemistry Vol. 2. pp. 137—147. Academic Press N. Y. 1958. —
- Dörner, G. und Stahl, F.: Deutsch. Med. Wochenschr. 1965, 90, 1917. —
- Szöke, J., Kovács, S. és László Z.: Orvos és Technika 1970, 5, 136.

Д-р Й. Сёке, З. Ласло, д-р Ш. Ковач: „Применение люминометрии в клинической лаборатории и в научно-исследовательских работах. II. Часть. Аналитический люминометр для рутинных работ.“

Авторы описывают конструктивное построения и методы применения аналитического люминометра для рутинных работ. Источником света служит лампа Н—С (О РАМ Н Е-40). Резонансные линии получают с помощью стеклянных (366 нм.) и металлоинтерференционных (404+407, или 436 нм.) фильтров, в то время, как люминесцентный свет — с помощью ограничительного фильтра (6 шт.) производства СОР. В качестве детектора использовался фотоумножитель типа динодное напряжение для которого обеспечивалось высоковольтным стабилизированным ( $2,5 \cdot 10^{-5}$ ) блоком питания с плавной регулировкой напряжения в пределах 500 и 1500 в. Точность измерения:  $\pm 0,3\%$ . Прибор пригоден для измерений макро- (макс. 5 мл) и микро- (мин. 10 мкл) проб.

J. Szöke, Z. László, S. Kovács: The use of luminometry in the clinical laboratories and in medical research. Part II. Luminometer for routine analyses

Authors describe the construction and mood of appliance of a luminometer adopted to the routine laboratory work. The light source is provided by a Hg—Cd lamp (OSRAM HQE-40). The generating lines are isolated by glass (366 nm) and metal interference filters (404+407 and 436 nm) respectively while 6 Corning-product cutting filters serve to the isolation of the luminescence light. A photomultiplier Typ RCA 1P21 is applied as a detector, the dinode voltage of which is supplied by a  $2,5 \cdot 10^{-5}$  stability high voltage unit continuously between 500 and 1500 Volts. Measuring accuracy is  $\pm 0,3$  per cent. The instrument suits to the measurements both of macro (5 ml maximum) and micro samples (10  $\mu$ l minimum).



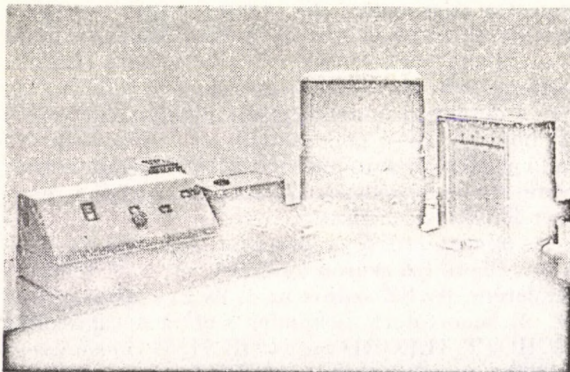
DR. SZÓKE JÓZSEF  
Központi Fizikai Kutató  
Intézet

LÁSZLÓ ZOLTÁN  
Elektrotechnikai KTSZ,  
Budapest

## A luminometria alkalmazása a klinikai laboratóriumban és az orvostudományi kutatásokban

### III. Gerjesztési spektrofotométer

E közleménysorozat összefoglaló részében [1] „egymonokromátoros berendezések” cím alatt ismertettük azt a készülékmegoldást, amely egy abszorpciós spektrofotométer monokromátorát használja fel a gerjesztő fény monokromatizálására, míg az emittált sugárzást vágószűrőkkel mentesíti a szórt gerjesztő sugárzástól. Ennek a módszernek az az előnye a másik egymonokromátoros megoldással (a spektroluminometriával) szemben, hogy a gerjesztési frekvenciát — nagyintenzitású, folytonos fényforrás alkalmazása esetén — tetszőlegesen változtathatjuk. Jó (meredek abszorpciós élű) vágószűrőket használva, a lumineszcencia fény (a spektrum) legnagyobb része a fotometrikus mérés rendelkezésére áll. Kvantitatív analitikai szempontból ez a berendezés mindenképpen előnyösebben alkalmazható, mint a spektroluminométer, ahol a szűrős gerjesztés miatt csak vonalas színeképi fényforrást használhatunk (tehát elveszik a gerjesztési differenciálás lehetősége), és a monokromátor alkalmazása miatt az emittált sugárzásnak csak csekély része jut a detektorra. Ekkor ugyanis a berendezés kellő érzékenységét csak a mérőrendszer fokozott teljesítő képességével tudjuk pótolni.



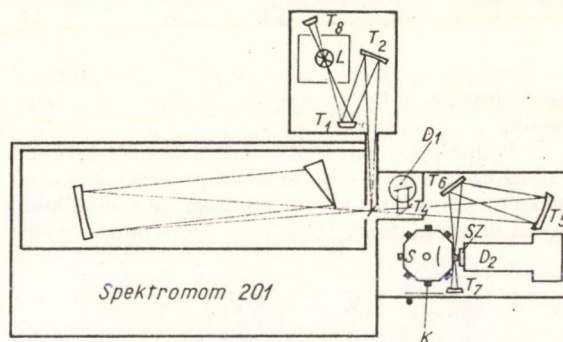
1. ábra. A Spektromom 201-ből kialakított gerjesztési spektrofotométer fényképe regisztrálással összekapcsolva

A jelen közleményben ismertett gerjesztési spektrofotométert egy Spektromom 201 típusú spektrofotométer monokromátorához kapcsolt adapterekkel állítottuk elő (1. ábra). Előnyösen alkalmazható az ilyen építőelemekből összeállítható berendezés olyan helyeken, ahol a feladatok kis sorozatban, de nagy választékban szükségesek a felhasználó részére, mivel az adapterek sokkal olcsóbbak, mint a sorozatelemző célkészülékek. Termélekenységben is alig maradnak el mögötte, s minimális „műszeres szakismeret”-tel biztonságosan alakíthatjuk át berendezésünket éppen a kívánt méréstípusnak megfelelően.

### A készülék felépítése

A készülékhez felhasználható bármely egysugaras spektrofotométer monokromátora. (Spektromom, Beckman DU, Unicam SP 500, Jobin et Ivon, CØ-4, Zeiss SPM-2 stb.) Ehhez csatlakozik a 2. sz. blokkvázlat szerint egy fényforrás és egy mintatér adapter (mindkettő megfelelő tápegységekkel és mérőegységgel ellátva).

A spektrofotométer eredeti lámpaháza helyén foglal helyet a 160 W-os xenon-, vagy 200 W-os higanygőz-, rövidívű, nagynyomású fényforrást tartalmazó lámpaház. Xenon fényforrásként használható a TUNGSRAM gyártmányú XHP 150, amelynél azonban jobb minőségű az OSRAM XBO 160. Higanygőzlámpákban kicsi a választék. A legjobb tapasztalatokat az OSRAM HBO 200 típusú fényforrásokkal szereztük.

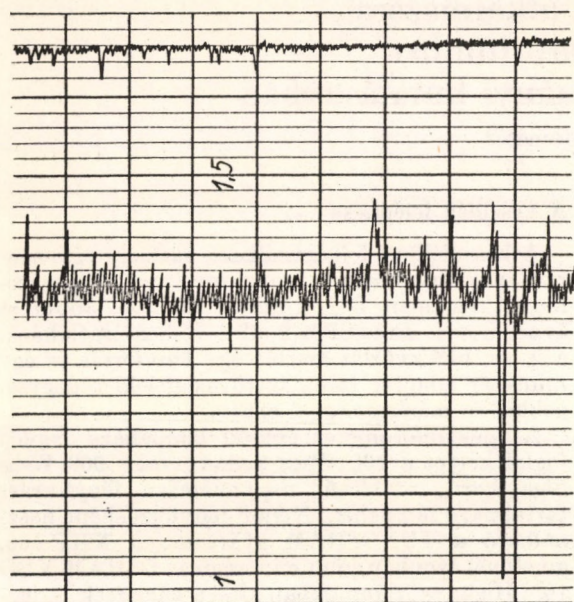


2. ábra. A gerjesztési spektrofotométer optikai vázlatja

A fényforrások táplálására kifejlesztettünk egy univerzális tápegységet (1. ábra), amely egyaránt alkalmas 160 W-os xenonlámpa és 200 W-os higanygőzlámpa üzemeltetésére. Ez a feladat azért nehéz, mert a xenonlámpa esetében 20 V, 8 A a higanylámpa esetén 63 V, 3.3 A egyenáramra van szükség. A tápegység specialitása a 2. ábrán látható a fényintenzitás-szabályozó rendszer: A monokromátor kilépő rése után elhelyezett  $T_1$  kvarclemes a gerjesztő fény kis hányadát egy Rhodamin G fénykonverteren keresztül [3] RCA 931 A típusú multipliere vetíti és egy elektronikus szabályozórendszer a fotoáramot a fényforrás tápfeszültségének változtatásával konstans értéken tartja. A fényintenzitás-szabályozó csak a xenonlámpa üzemeltetéséhez szükséges, mivel a higanylámpa az egyenáram áramstabilizálásával 1%-on belül konstans fényáramot biztosít. Az áramszabályozó rendszer stabilitása  $\pm 10\%$  hálózati ingadozás esetén nem rosszabb  $10^{-4}$ -nél, ami fényintenzitásban néhány tized százalék ingadozást jelent. A fényinten-

zítás-szabályzó rendszer hatékonyságát a 3. ábra illusztrálja.

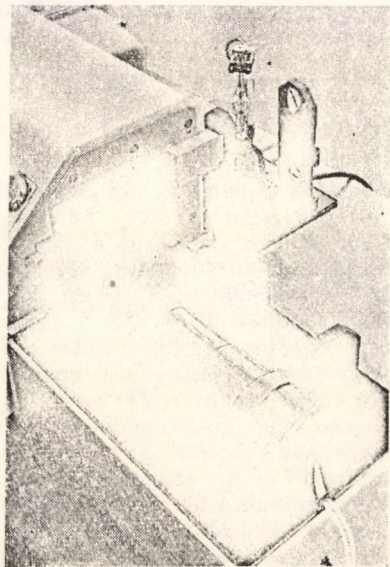
Az ábra alsó részén látható a  $10^{-4}$  stabilitású tápegységgel üzemeltetett xenonlámpa fényintenzitás-változása. A felső ábra mutatja a fényintenzitás-változást a fény szabályzó rendszer működése esetén.



3. ábra. A xenonlámpa fényintenzitásának stabilitása. A precíziós áramstabilizátorral üzemeltetett készülék stabilitását az alsó ábra szemlélteti, míg a fényáram-stabilitás hatását a felső ábra mutatja. Mindkét ábrán a kiugrás  $2,5\%$  feszültségességek jelel meg

zítás-változása. A felső ábra mutatja a fényintenzitás-változást a fény szabályzó rendszer működése esetén.

A lámpaházat (4. ábra) alulról egy jól kiegyensúlyozott (rázásmentes) ventilátor hűti, s így a hőmérséklet a lámpa környezetében nem emelkedik olyan magasra, hogy veszélyeztesse a lámpa működését.



4. ábra. A gerjesztési spektrofotométer adaptereinek fényképe burkolat nélkül

dését. Az  $L$  lámpa fénye egy blende szerepét is betöltő nyíláson (lásd a 2. ábrát) keresztül jut a  $T_1$  síktükörre, amely kivilágítja a  $T_2$  tükör hasznos felületét. (Azt a részét, amely a monokromátor kollimátor tükrének kivilágítására szolgál. Az ezen kívül eső tükörfelületet le kell takarni, mert a monokromátorban ez képezi a szórt sugárzás legfőbb forrását. Emiatt minden monokromátor típusnál a  $T_2$  tükör blendéjét külön meg kell méretezni!) A lámpa ívét a  $T_2$  homorú tükör a monokromátor belépő részére képezi, majd a monokromátoron keresztülhaladva a kilépő részen nyerjük a monokromatizált gerjesztő sugárnyalábát.

A spektrofotométer eredeti mintatartójának helyébe van felszerelve a gerjesztési spektrométer mintatér és detektor egysége (1. ábra). A résen kilépő sugárnyaláb (2. ábra) áthalad a fényintenzitás-szabályzó rendszer féligáteresztő  $T_4$  kvarclemezen és kivilágítja a  $T_5$  homorú tükört, mely a  $T_6$  síktükörön keresztül az  $M$  mintatartótárcsa  $M_1$  mérőhelyének (küvetének) a közepére képezi le a kilépő rész képét. A gerjesztő fény a mintatartóból kilépve a  $T_7$  homorú tükörre esik, amely a gerjesztő sugarat visszavetíti és leképezi ismét az  $M_1$  mérőhely közepére. (Ez a tükör lényegében megfordítja a fény útját. Az  $M_1$  mintatérbe visszaterve jelentős része ismét felhasználódik gerjesztésre, mivel azonban kis koncentrációjú oldatokkal dolgozunk, a fényelnyelés távolról sem teljes, ezért a sugárzás az ismertett fényúton keresztül visszajut ismét a lámpaházba, s annak  $T_8$ -as homorú tükörre ismét megfordul. Ennek az optikai rendszernek az az előnye, hogy a fénynek csak nagyon kis hányada szóródik a mintatér és detektor egységben. A zöme új gerjesztésre használódik fel. Mérési tapasztalataink szerint ez a megoldás csak nem kétszeresére emeli a gerjesztési intenzitást.)

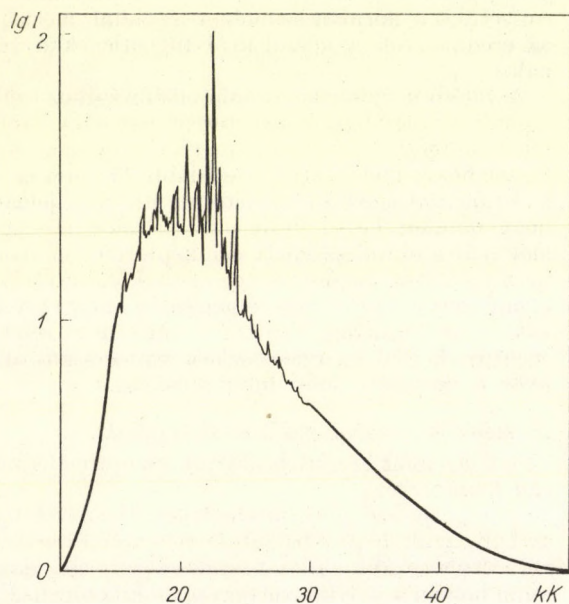
A mintatérben keltett lumineszcencia a tér minden irányába sugárzódik, s hatása csak a gerjesztett mintatérből a detektor érzékelő felülete irányában haladó sugárzásnak van. Ez a teljes emittált sugárzásnak nem teszi ki az  $1/5$ -ét. A mintatartónak a detektorral szemben levő oldalán elhelyezett  $T_9$  homorú tükör gondoskodik az ez irányban haladó sugárzásnak a detektor felületére való vetítéséről. Ez az elrendezés kb.  $30\%$ -kal növeli a rendszer fénykihasználását.

A mintatartóból a detektor felé haladó fény a cserélhető SZ szűrőn keresztül jut a D detektor felületére. Az SZ szűrők az 1. és 2. közleményben [1, 2] ismertetett szekunder sugárzás vágószűrői (SCHOTT, ILFORD vagy CORNING típusú üveg-szűrők). A szűrőcsere, amelynek gyakori váltására csak egy módszer beállítása esetén van szükség, a mintatér és detektorház fedőlapjának eltávolításával történik, amely csavarok nélkül patent-módon rögzíthető a műszer alapjához. A minták a dobozfedél oldalán elhelyezett toloajtó elmozdításával válnak hozzáférhetőkké, ily módon könnyen cserélhetők is.

A detektor fotoárama a MULTIPLIER FOTO-MÉTER-be jut (1. ábra), ahol a 2. közleményben [2] vázolt módon kompenzációs méréstechnikával meghatározhatjuk az emittált, relatív fényintenzitásokat.

### A készülék alkalmazási területe

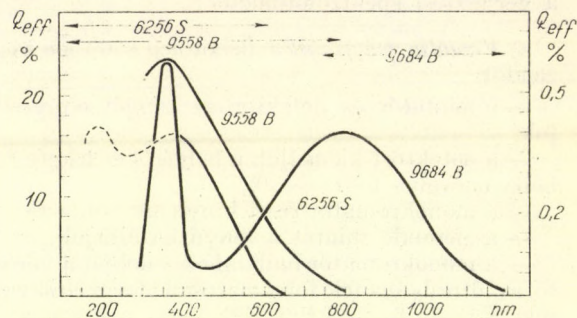
A gerjesztési spektrofotométer alkalmas arra, hogy a gerjesztési frekvencia függvényében az emittált fény intenzitását, azaz a gerjesztési színképet előállítsa. Ahhoz azonban, hogy valódi gerjesztési színképhez jussunk, a gerjesztő fényt konstans értéken kell tartanunk. Ez két okból nem járható: egyrészt a fényforrásnak — bár folytonos a színképe — számos vonala (5. ábra) van, amely szűk tartományban is lényegesen megváltoztathatja az emittált fény intenzitását,



5. ábra. A xenonlámpa emissziós színképe. Az ordináta logaritmikus léptékű (100-ra normálva)

másrészt a detektor karakterisztika (6. ábra) jelentős mértékben deformálja a mérési eredményt (gerjesztést és emissziót egyaránt).

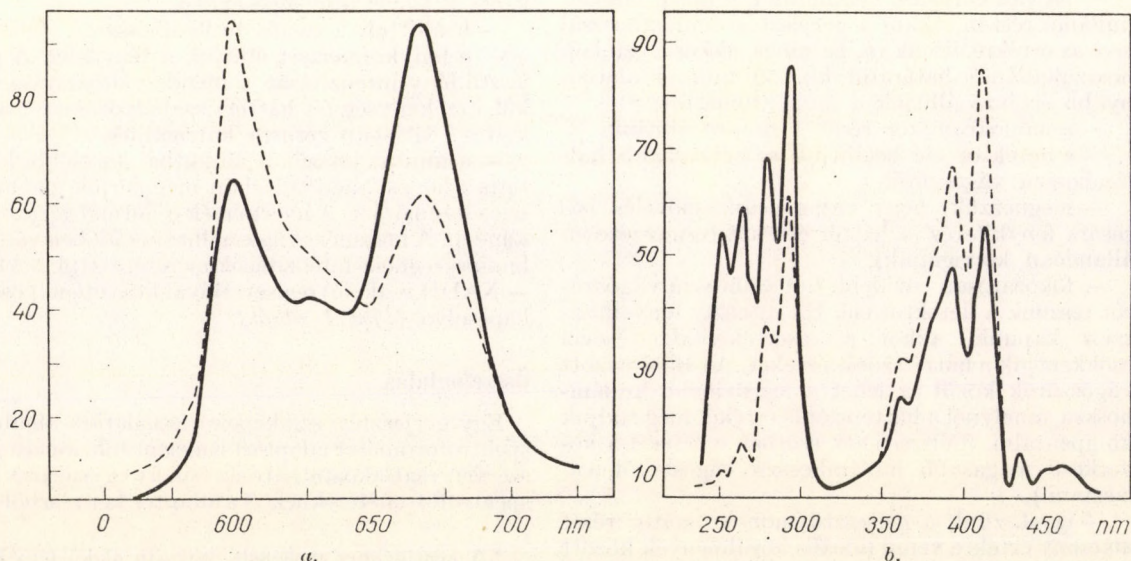
A gerjesztési színképek vizsgálatánál tehát nagyon bonyolult abszorpciós és emissziós folyama-



6. ábra. A készülékhez ajánlott detektorok hullámhossz-érzékenységi görbéje és célszerű alkalmazási területük. A baloldali ordináta a 6256S és a 9558B típusú EMI multiplierekre érvényes, míg a jobboldali csak a 9684B (infravörös érzékeny) detektorhoz tartozik

tok eredményeként jelenik meg a mérési eredmény. A mérésnél uralkodó viszonyokat a 7. ábra szemlélteti, amely koproporfirinre és benzpirenre vonatkozó vizsgálataink eredményét tünteti fel. Szerepet játszik itt a meglehetősen karakterisztikus, sok vonallal tarkított gerjesztő fényforrás emissziós színképe, a mérendő minta elnyelési színképe, a közvetlenül mért látszólagos gerjesztési színkép, a normál gerjesztési feltételek mellett nyerhető valódi gerjesztési színkép, a mért (látszólagos) és korrigált (valódi) lumineszcencia színkép, továbbá a monokromátoron kilépő sugárzás félértékszélessége.

Az analitikai felhasználó szempontjából elsőrendű fontosságú, hogy a készülékkel meghatároz-



7. ábra. a) A benzpiren gerjesztési színképe; b) A koproporfirin lumineszcencia színképe. (Spektroluminométeren készült felvétel.) Mindkét ábrán a kihúzott vonal a korrigált (valódi) színképet ábrázolja, míg a szaggatott vonal a mért (látszólagos) színképet jelzi

hassa az optimális mérési paramétereket. Lényeges ez egyrészt azért, hogy a felhasználó érezze azt, hogy a műszeren leolvasott értékek valóban mérési eredmények, másrészt a felhasználó igyekszik optimális feltételek mellett a legmegbízhatóbb mérési információk birtokába jutni. Nézzük meg most, hogyan biztosítja mindezt a felhasználó részére a gerjesztési spektrofotométer:

a) *Vizuális megfigyelés* (lehetőleg sötétben végzendő):

— a mintatér és detektorház tetejét eltávolítjuk,

— a detektort kiemeljük a helyéről és fekete ruhába burkolva félretesszük,

— a monokromátor rését kinyitjuk 1 mm-re,

— a mérendő mintát a fényútba állítjuk,

— a monokromátor hullámhossz-dobját a vöröstől az ultrabolya felé folyamatosan lassan elcsavarjuk. Közben felülről figyeljük, hogy a küvettaból felfelé kiinduló és a küvettaán áthaladó sugárzás színe azonos-e. Ha különbség mutatkozik, pl. kék színű gerjesztés esetén a szórt sugárzás sárgászöld, vagy láthatatlan gerjesztés esetén kék színű szórtfény jelentkezik, az biztosan lumineszcencia jelenlétére utal. Egyértelműen bizonyítja fluorezcencia jelenlétét a tömény(ebb) oldatokban a küvetta belépő oldalán megjelenő színes fénykép, amely a küvetta belseje felé gyorsan elenyészik.

A vizuális megfigyelés csak gyors tájékozódásra használható. Kis lumineszcenciaképesség vagy UV lumineszcencia ezzel nem deríthető fel. Mégis a minták viselkedésének megismerése céljából hasznos a néhány perces igénylő vizsgálat elvégzése.

b) *Az optimális mérési feltételek megválasztása*

A feladat lényegében a látszólagos gerjesztési színek meghatározása, amely a következő eljárásal nyerhető:

— spektrofotométerrel megmérjük a vizsgálandó minta elnyelési színeképét,

— ha van elnyelési maximum a színekép hullámhullámú részén, akkor a gerjesztési hullámhosszal erre az értékre állunk rá, ha nincs, akkor a színekép hullámhullámú határától kb. 50 mm-rel alacsonyabb értékre állítjuk a monokromátort,

— a monokromátor rését 1 mm-re állítjuk,

— a detektor elé beállítjuk a leghosszabb hullámhosszú vágósűrőt,

— megnézzük, hogy van-e erősítésnövelés hatására fénykitérés (a háttér értékét természetesen állandóan korrigáljuk),

— fokozatosan rövidebb hullámhosszú vágósűrőt teszünk a detektor elé. Ha intenzív fényemissziót kapunk, akkor a résértékesökkentésével csökkentjük a háttérszórás értékét. Az alkalmazott vágósűrők közül az lehet a legrövidebb hullámhosszú, amelynél a háttérszórás értékét még tudjuk kompenzálni. (Célszerű sok esetben e helyett a következő magasabb hullámhosszú vágósűrőt választani.),

— igyekszünk a gerjesztő monokromátor rését alacsony értékre venni (ideális körülmények között ez 0,1 mm-nél nem nagyobb), majd hitelesítés ál-

lásban kb. 5-ös MUNKAELLENÁLLÁS helyzetben kikompenzáljuk a mérőműszert zéróra,

— a monokromátor hullámhosszát a kívánalmaknak megfelelő mértékben változtatva az abszorpciós maximum mindkét oldalát végigmérjük. A rövid hullámhosszak felé lehetőleg az egész méréstartományt átfogjuk. Az így nyert mérési eredményeket hullámhossz-függvényben ábrázoljuk, amit látszólagos gerjesztési színeképnek nevezünk.

c) *Normál gerjesztési színekép előállítása*

Spektroszkópiai igényű munkákhoz célszerű a gerjesztési színeképet normált alakban előállítani. (Megjegyezzük, hogy analitikai közleményekben is célszerűbb a normált színeképet megadni, mert így az eredmények a készüléktől függetlenekké válnak.)

A valódi gerjesztési színekép előállításához szükségünk van egy fény-konverterre\*, egy nagy hatásfokú fluoorezkáló ernyőre, amelynek egy megadott hullámhosszérték alatt — legalább 200 mm-ig — a kvantumhatásfoka konstans. Ez azt jelenti, hogy minden beeső foton azonos valószínűséggel alakul át a lumineszcencia színeképterület emittált fotonjává. Ha fénykonverter anyagkoncentrációja olyan nagy, hogy az összes gerjesztő fényt elnyeli, akkor az emittált színekép (amelynek relatív spektroszkópiai energiaeloszlása változatlan) arányos a gerjesztő fény intenzitásával.

*A mérés az alábbi módszerrel történik:*

— a b) pont szerint beállítjuk az optimális mérési feltételeket,

— a gerjesztő fény intenzitását blendével úgy szabályozzuk, hogy a beállított mérési érzékenységnél a leghosszabb hullámhosszú abszorpciós maximum helyén a fénykonverter éppen kikompenzálja a műszert nullára.

Ezután hasonlóan, mint ahogy a látszólagos gerjesztési színekép mérésénél tettük, megmérjük az abszorpciós sáv mindkét oldalán a gerjesztési színeképet a következő lépésekben:

— beállítjuk a mérés hullámhosszát,

— a fénykonvertert állítjuk a fényútba. A gerjesztő fény intenzitását, a blende változtatása nélkül, érzékenység (és háttér) szabályozással „Hitelesítés” állásban zérusra korrigáljuk,

— a mintát tesszük a fényútba. Az előbbi helyzethez képest mérésállásban megmérjük az emissziós intenzitást. A nyert érték a normál gerjesztési színekép. A készüléket használhatjuk időben változó lumineszcencia-intenzitások mérésére is (pl. NAD<sup>(+)</sup> → NADH reakció) regisztrálással közvetlenül összekapcsolva (lásd I. ábrát).

## Összefoglalás

Egy gerjesztési színeképek vizsgálatára alkalmas spektrofotométer adaptert ismertetünk, amely egyszerűen csatlakoztatható az ismert egysugaras UV spektrofotométerekhez. Az adapter két részből áll:

\* A készülékhez mellékelt, küvetta alakú fénykonverter az egyik minta helyére kerül a berendezésben.

fényforrásból, amelyben egy 160 W-os xenonlámpa foglal helyet a leképező optikával és egy mintatérből, melyben 8 küvetta befogadására alkalmas forgótárcsa, valamint egy kis-zajú, nagyérzékenyséű fotomultiplier található a szükséges optikai elemekkel.

A gerjesztő fény frekvenciája folyamatosan változtatható, az emittált fény pedig üveg-vágószűrőkkel izolálható. Megfelelő fénykonverter alkalmazásával az adapter gerjesztési spektrumok mérésére is alkalmas. Laboratóriumi (főleg klinikai laboratóriumi) analitikában előnyösen használható keverékek szétválasztás nélküli elemzésére (a gerjesztési differenciálás révén).

#### Irodalom

1. Szőke J., Kovács S. és László Z.: Orvos és Technika 5. 136. 1970. — 2. Szőke J., Kovács S. és László Z.: Orvos és Technika 6., 175. 1971. — 3. W. Kaye, D. West and G. G. Guilbault: Fluorescence M. Decker N. Y. c. könyv 259. old. (1967).

Д-р Йожеф Сёке, Золтан Ласло: Применение люминометрии в клинических лабораториях и научно-медицинских исследованиях. Ш. Возбудительный спектрофотометр

Статья знакомит читателя со спектрофотометрическим адаптером, пригодным для проведения исследования спектров возбуждения. Адаптер может подключаться к известным однолучевым спектрофотометрам УВ. Он состоит из двух частей: из источника света, в

котором установлена ксеноновая лампа мощностью 160 ватт с копировальной оптикой, и из камеры для образцов, где расположен поворотный диск, вмещающий 8 кюветок, и высокочувствительный фотомультиплиер бесшумного действия с необходимыми оптическими элементами. Частота света, вызывающего возбуждение, может плавно меняться, при этом излучаемый свет может изолироваться стеклянными режущими фильтрами. При применении соответствующего светового конвертера, адаптер пригоден и для замера спектров возбуждения. Может весьма успешно применяться в лабораторной аналитике (особенно в клинической лабораторной аналитике) для анализа смесей без их разделения (благодаря дифференцированию возбуждения).

J. Szőke, Z. László: *The use of luminometry in the clinical laboratories and in medical research. Part III. Energizing spectrophotometer*

It concerns an adapter to the spectrophotometer which allows the examination of energizing spectrum colours and can be simply attached to a common single-beam UV spectrophotometer. The adapter consists of two parts: the light source comprising a 160 W Xenon lamp as well as the image forming optics and the sample space in which a rotation disc housing altogether 8 test-tubes, a noiseless and high sensitive photo-multiplier and the necessary components are arranged. Frequency of the energizing light can be varied continuously and the emitted light can be isolated by cut-glass filter. By application of an appropriate light-converter the adapter suits also to the measurement of energizing spectra. Its use is advantageous in laboratories (primarily in clinical laboratories) in the analytics as mixtures without separation can be analysed (through energizing differentiation).

Faint, illegible text in the upper left quadrant of the page.

Faint, illegible text in the upper right quadrant of the page.

Faint, illegible text in the lower left quadrant of the page.

Faint, illegible text in the lower right quadrant of the page.



61.980

Kiadja a Központi Fizikai Kutató Intézet  
Felelős kiadó: Kroó Norbert, a KFKI Fizikai-  
Optikai Tudományos Tanácsának elnöke  
Példányszám: 235                      Törzsszám: 72-7230  
Készült a KFKI sokszorosító üzemében  
Budapest, 1972. szeptember hó

