

Fotometria

A mai értelemben vett fotometria meglepően fiatal eljárás. Az első fotoelektromos koloriméterek a harmincas évek derekán jelentek meg, az első valódi spektrofotométer, a Beckman DU 1940-ben. A ma klasszikusnak számító Jendrassik-Gróf-féle bilirubin meghatározás, a különböző, p-nitrofenolát felszabadulással járó foszfatáz meghatározások mérése nem mai értelemben vett fotométerekkel történt, hanem emberi szem megítélése alapján, különböző komparátorok segítségével. Nem túlzás azt mondani, hogy a mai klinikai kémiát a fotometriás módszerek fejlődése hozta létre.

Az első, szélesebb körben használt fotométer a jénai Zeiss Művek Pulfrich-féle Stufenphotometere ("stufó") volt, amelyet ugyan még vizuálisan, szemmel értékeltünk, de mérési elve már a mai fotométerekéire emlékeztetett. A stufónak viszonylag szűk áteresztési sávú üveg színszűrői és szabatos úthosszú küvettái voltak (az üvegszűrő sorozat a maga idejében hi-tech vívmánynak számított, innen származott a készülék neve: Stufen-, vagyis lépcsős). Az egyik küvettába a vak, a másikba a mérendő oldat került, egy lámpa világította meg mind a két oldalt, a fény pedig egy olyan, okulárral megfigyelhető mezőre vetült, amelynek egyik oldala a vak, a másik a mérendő küvettán áteső fénynek felelt meg. Mindkét fényutat egy-egy, pontosan szabályozható felületű fényrekeszsel lehetett beszűkíteni. A mérés során a vak próbának megfelelő fényrekeszt addig szűkítettük, amíg világosság a mérendő oldallal azonos nem lett, vagyis az okulárban a két oldalt azonos tónusúnak láttuk. Ekkor a fényrekesz tárcsájáról extinkcióegységben, vagy transzparencia százalékban le lehetett olvasni, mennyi fény nyelődött el a mérendő oldalon, ahol a fényrekesz teljesen nyitva - 0 extinkció, illetve 100% transzparencián - állott. A stufó a mai fotométerektől nem annyira a "detektorban" különbözött (a későbbi fényelemek sem voltak sokkal jobbak...), hanem abban, hogy küvettái a mai szemmel túl nagyok voltak, az üvegszűrők elfogadhatatlanul széles sávúak, ultraibolya tartományról pedig szó sem lehetett: ott az emberi szem már felmondja a szolgálatot.

Klinikai kémiai analitikai célra még a hatvanas-hetvenes években is ugyanazokat a műszereket használtuk, mint az analitikai kémia más területein, azóta a klinikai fotométerek - különösen a kémiai automaták fotometriás mérőberendezései - építési elvei valamelyest különváltak.

Régi, mindennapi tapasztalat, hogy a színes oldatok színintenzitása arányos a benne oldott anyag mennyiségével, vagyis az oldat koncentrációjával. Az ezt leíró matematikai összefüggés pusztán logikai alapon született. Ha egy d rétegben az I_0 fényintenzitás I -re csökken, a csökkenés mértéke I/I_0 lesz. Ha e mögé másik, hasonló réteget helyezünk el, az abba belépő fény intenzitása megfelel az első rétegből kilépő I -nek, az intenzitáscsökkenés mértéke pedig azonos lesz az első rétegben kialakult csökkenéssel.

$$I_1 \times \frac{I_1}{I_0} = I_2, \text{ tehát } I_2 = \frac{I_1^2}{I_0}$$

Következik ebből, hogy fényintenzitás alakulása mértani sorral írható le. A fotometria megalapítójának Pierre Bouguernek, ezen 1728-ból származó spekulatív megközelítését 30 évvel később Lambert bizonyította, és öntötte korrekt formába.

$$I = I_0 e^{-kd}$$

ahol a k arányossági tényező, d a fényelnyelő réteg vastagsága. Az I/I_0 hányadost fényáteresztésnek, *transzmittenciának* (T) nevezzük.

Korábban szokás volt a transzmisszió helyett a fényelnyelő rétegen áthaladás utáni fényintenzitást a beeső fény intenzitásának százalékában kifejezni, régebbi fotométerek skáláján még látható ilyen beosztás (transzparencia, t).

Az egynél kisebb értékből következik, hogy logaritmus negatív szám lesz. A gyakorlati számításokban transzmisszió helyett általában annak tízes alapú logaritmusát használjuk a *negatív előjel elhagyásával* (dekadikus abszorbanca, A). A negatív előjel elhagyása több technikai könnyítésnél, hiszen megváltozik annak értelme: a magasabb számértékű transzparencia nagyobb fényáteresztést jelent, a magasabb számértékű abszorbanca alacsonyabbat.

A gyakorlat számára fontos felismerés volt, hogy a fényelnyelés ugyanakkora lesz egy kétszeres, $2d$ vastagságú fényelnyelő rétegben, és akkor, ha a d rétegvastagság nem változik, de az abban fényt elnyelő anyag koncentrációja kétszer akkora:

$$2d \times c = d \times 2c$$

ami általánosítható:

$$nd \times c = d \times nc.$$

Az n értéke elméletileg bármekkora lehet. A gyakorlatban ez nem igaz, oldatok esetében csak híg oldatokra lehet korlátozás nélkül alkalmazni. Ilyen esetekben érvényes az

$$\frac{I}{I_0} = T = k \times e^{-\epsilon cd} \quad \text{összefüggés}$$

Az abszorbanca (A) alkalmazásával az oldat fényelnyelése egy igen elegáns, jól kezelhető képlettel írható le (a k arányossági tényezőt egységnyinek véve):

$$A = \epsilon \times c \times d$$

Állandó, d rétegvastagság mellett az ismert fajlagos fényelnyelésű (ϵ) oldott anyag koncentrációja határozza meg az A értéket. Mivel az ϵ empirikusan meghatározható, a d ismert (a kivetta rétegvastagsága), az A-t pedig mérjük, a koncentráció:

$$c = \frac{A}{\epsilon \times d}$$

lesz.

A fotometriás mérés során *nem* a d rétegbe belépő és az onnan kilépő fényintenzitást hasonlítjuk össze, hanem ugyanazon d folyadékrétegből kilépő fény intenzitását egy olyan minta esetén, amelyben található a mérendő oldott anyag (I) és egy olyan minta esetén, amelyben *nem* (ez lesz a kvázi I_0 érték, ami eredetileg a belépő fény intenzitását jelöli). E mintát nevezzük referencia- (vonatkoztatási), vagy "vak" mintának.

Az ilyen mérés előnye, hogy az valóban csak és kizárólag a keresett anyag fényelnyelését jellemzi, a kivetta, az oldószer stb. fényelnyelését nem vesszük így figyelembe, vagyis nem okoz zavart a k arányossági tényező elhagyása, mint azt az előzőekben tettük.

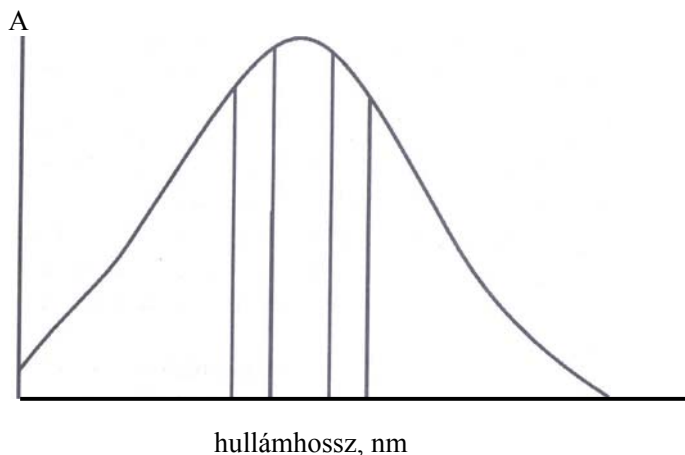
A fotometriás mérések érzékenysége jelentősen fokozható, ha a vizsgálatot nem fehér fényben végezzük, hanem a fényelnyelés spektrális maximumánál, monokromatikus fényben.

Ilyen esetben lesz az oldatból kilépő fény intenzitása a legalacsonyabb a belépő fény intenzitásához képest, ami egyúttal azt is jelenti, hogy a mérés érzékenysége itt lesz a legnagyobb.

Teljesen homogén fényt elő lehet állítani (lézer, vonalas színeképet szolgáltató fényforrások), de ennek az az ára, hogy nem állítható elő bármilyen hullámhosszú fény. Folyamatos színeképet szolgáltató fényforrások, pl. izzó lámpák fényének egy szűkebb, vagy szélesebb sávja a fotometriás mérésekhez elegendően homogén hullámhosszú fénynek tekinthető.

Ha például a 4.1. ábrán látható elnyelési spektrumú p-nitrofenolátot (az alkálikus foszfátáz reakció indikátora) a

teljes hullámhossztartománynak megfelelő, fehér fényben fotométerlünk, kb. 0,01 abszorbancia egység fényelnyelést mérhetünk. Ha ugyanezt a mérést a maximális fényelnyelésnek megfelelő, 398-402 nm-es sávban végezzük, a mért abszorbancia ennek kb. az ötvenszerese lesz, vagyis ennyivel lesz nagyobb a mérés érzékenysége.



4.1. ábra. A p-nitrofenolát fényelnyelése a hullámhossz függvényében (A-abszorbancia)

Nem szabad elfeledkezni arról sem, hogy az izzólámpák fényenergiája nem egyenletesen oszlik meg minden hullámhossztartomány között, még a magas izzási hőmérsékletűek is jóval nagyobb fényenergiát bocsátanak ki a hosszabb hullámhosszakon, mint az analitikai célokra releváns UV-kék-zöld sávokban. Ha a detektor érzékenysége nagyjából minden hullámhosszon azonos, érthető módon inkább azt a hullámhossztartományt érzékeli, ahol sok a fény.

A fotometriás mérések alapvető dilemmája, hogy minél szűkebb a méréshez használt hullámhossztartomány, abszolút értékben annál kisebb lesz a mérendő fény mennyiség: annál érzékenyebb fényérzékelő, annál nagyobb erősítés szükséges. Mivel a fotometriásan mért színes anyagok elnyelési maximumai többnyire szélesek (ezt mutatja a kémiailag homogén p-nitrofenolát elnyelési spektruma is), nem érdemes egy határon túl javítani a monokromátorok jószágát. Gyakorlati célokra $\pm 6-8$ nm sáv szélesség bőven elegendő. Ilyen sáv szélességűek az egyszerű interferencia szűrők, az egy optikai rácst tartalmazó rác- és az egy holografikus tükröt tartalmazó holografikus monokromátorok.

A dilemma klinikai kémiában főleg a kisebb teljesítményű fényforrással épített fotométerek 340 nm-en mérendő enzimreakciói (LDH, GOT, GPT, CK) esetében okoz gondot.

Ha a szűrő kellően szűk sávú, a fotométer az alacsony fény mennyiséget nem képes kezelni, ha széles sávú, csak az egyes enzimreakciókra megadott faktorértékeknél magasabb faktorokkal lehet reális eredményt kapni.

Szerves vegyületek elnyelési spektruma gyakran olyan finom részleteket tartalmaznak, hogy azok kimutatására igen finom spektrális felbontású fotométerek szükségesek. Ilyen feladatokhoz ma akár 0,1 nm-es sáv szélességű spektrofotométert használnak, amelyek monokromátorai két, esetleg több optikai rácst tartalmaznak. Ezek alkalmazására klinikai laboratóriumi célra nincs szükség.

A fotométerek hullámhossztartománya 190 és 850 nm, vagy 320 és 800 nm között van (a látható fény hullámhossza: 400-800 nm), vagyis a különbség az, hogy a műszer alkalmas-e rövidhullámú ultraibolyában történő mérésre.

Gyártási költségben igen nagy különbségről van szó, ugyanis a közönséges üveg 360 nm alatt, az emelt kvarctartalmú üveg 320 nm alatt nem fényáteresztő, az optikai elemeket optikai kvarcból kell készíteni, ehhez társul a drágább fényforrás és detektor költsége is.

Másfelől, rövidhullámú ultraibolyába esik a nukleinsavak és nukleotidok (260 nm körül), az aromás aminosavak (280 nm körül) fényelnyelése, így kutatási célokra az ilyen fotométer nélkülözhetetlen.

A második dilemma a monokromátor szerkezete. A fehér fény felbontása korábban prizmával, újabban optikai tükrökre karcolt ráccsal, majd a spektrumból a hullámhossz kiválasztása rés segítségével bármilyen hullámhosszú

fény beállítását lehetővé teszi, de az ilyen monokromátor mindenképpen drága, és mozgó alkatrészei miatt hajlamos elállítódásra.

Szűrősorozattal csak meghatározott, diszkrét hullámhosszak állíthatók be, de még az igen jó szűrősorozatok is jóval olcsóbbak az állítható monokromátoroknál, és nem kell számolni elállítódással.

Klinikai kémiai célokra nincs szükség sokféle hullámhosszra. A nagynyomású higanygőzlámpával szerelt régebbi Eppendorf fotométerekkel, amelyekben a lámpa vonalas spektruma folytán maximum 8-10 hullámhossz volt beállítható, nem fordult elő, hogy a kevés hullámhossz miatt nem lehetett valamely rutinanalízist elvégezni.

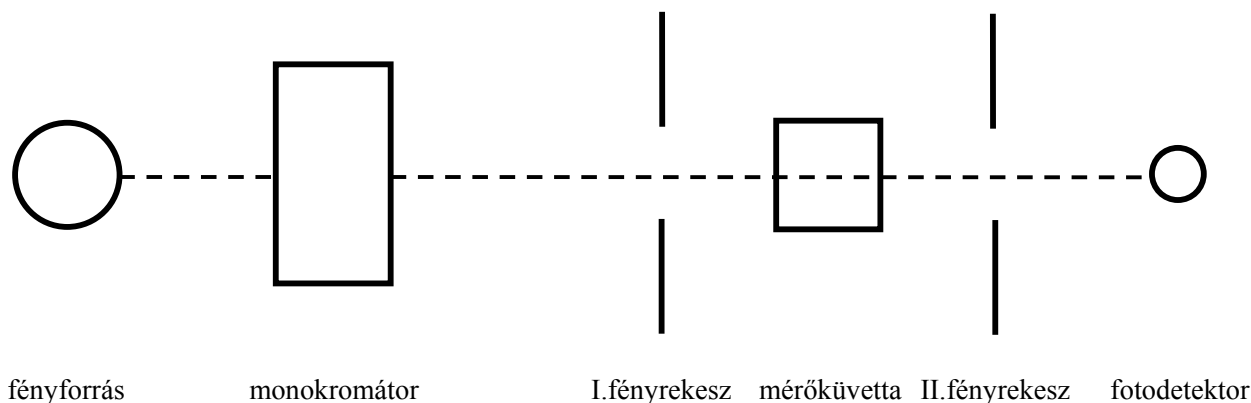
A folyamatosan állítható monokromátort ma inkább azokba az igényes, nagy fotométerekbe szokás építeni, amelyek alkalmasak oldatok elnyelési spektrumainak regisztrálására is.

4.3.1. Abszorpciós fotométerek

A fotométerekkel valamilyen oldat, vagy fényeszőrő felület által elnyelt fény mennyiségét mérjük meg. Szükség van ehhez egy fényforrásra, a fényt többé-kevésbé monokromatikussá tevő monokromátorra, oldat vizsgálata esetén egy szabatos úthosszú küvetára és egy fényérzékelőre. A fotométer főbb elemeit a 4.2. ábra mutatja.

A fentiekén kívül természetesen sok egyéb optikai elemet is építenek a fotométerekbe, ezek jelentősége elsősorban az, hogy a fényforrás fényét erős, vékony, koherens fénysugárba gyűjtsék.

A rövidhullámú ultraibolya tartományban használható spektrofotométerek magas ára jórészt abból származik, hogy az összes, ehhez szükséges lencsét UV-áteresztő, hibátlan optikai kvarcból kell kicsiszolni.



4.2. ábra. A fotométer fő elemei

A fotométerek fényforrásaként használt lámpák mindegyikének vannak jó és rossz tulajdonságai, amelyeket a 4.1. táblázatban foglalunk össze.

Az *üvegballonos izzó lámpák* a korábbi olcsó fotométerek (Zeiss Spekol 10, Linson stb.) és a spektrofotométerek hosszuhullámú fényforrása volt. Viszonylag nagy áramfelvétel mellett már 400 nm körül sem volt elég fénytjeljesítményük, és a legalacsonyabb, még használható hullámhossz 365 nm volt.

4.J. táblázat. A fotométer fényforrásainak tulajdonságai

<i>Fényforrás</i>	<i>Spektrum</i>	<i>UV teljesítmény</i>	<i>Mono-kromátor</i>	<i>Polikromátor</i>	<i>Pontszerűség</i>	<i>Költség</i>
Volfrám izzó	folyamatos	igen alacsony	bármilyen	nem szokásos	kis izzónál jó	alacsony
Halogén izzó	folyamatos	340 nm-nél jó	bármilyen	bármilyen	jó	igen magas *
Higanygőzlámpa	vonalas	334 nm-nél jó	csak szűrő	nem szokásos	viszonylag jó	magas
Villanófény (xenon)	folyamatos	jó	bármilyen	bármilyen	rossz	alacsony **
Deutériumlámpa	folyamatos	igen jó	bármilyen	nem szokásos	viszonylag jó	magas
Xenonlámpa	folyamatos	igen jó	bármilyen	nem szokásos	viszonylag jó	igen magas ***
Fotodióda (LED)	csak sáv	nincs	nem szokásos	nem szokásos	viszonylag jó	alacsony

* maga a halogén izzó olcsó, de optikailag pontosan centrált foglalatban igen drága

** a villanófény ugyan drága, de élettartama általában meghaladja magáét a műszerét

*** a xenon lámpa magas üzemköltségét csekély élettartama okozza

A nagy áramfelvétel miatt ezek a lámpák sok hőt disszipáltak, általában külön lámpaházban kellett elhelyezni őket.

Az alacsony feszültségű *halogéntöltésű izzók* ballonja optikai kvarcból készül, az izzószál hőmérséklete magas, ez pedig viszonylag magas ultraibolya fénykibocsátást biztosít, legalábbis a klinikai célra igen fontos 340 nm körüli tartományban.

Maga az izzó olcsó és tartós (> 1000 üzemóra), de optikailag megfelelően pontos foglalatozását csak nagyobb számú lámpa közül lehet kiválasztani, így ezek rendkívül drágák. A halogénizzók apró izzószála éles, pontszerű fényforrás, így egészen kis teljesítményű (10-25 W) izzókkal is megfelelő fényt lehet kapni. A kis teljesítmény kevés hő termelésével jár, az ilyen izzókat nem is szükséges külön, jól szellőző lámpaházban elhelyezni, használatukkal igen kompakt építésű fotométerek tervezhetők.

A *nagynyomású higanygőzlámpa* vonalas szinképet szolgáltat, így csak arról lehet szó, hogy megfelelően szűk sávú interferenciaszűrőkkel e spektrumvonalak fényét használjuk.

Szerencsére a klinikai laboratórium számára fontos hullámhosszak mindegyikére található Hg-vonal (334, 405, 492, 546, 578, 625 stb. nm), a vonalas szinkép nem köti meg az analitikus kezét.

A szinképvonalak a gyakorlat számára teljesen monokromatikusnak tekinthetők, így monokromátor hibával sem kell számolni. Az előnyök ellenére sem volt soha általános a higany lámpák használata fotométer fényforrásként, főleg a hamburgi Eppendorf gyár alkalmazta őket.

Hasonlóképpen a *xenon villanófény* sem gyakori megoldás, főleg, a Roche Diagnostica Cobas (Bio, Fara, majd

Mira) készülékeire jellemző. Nagy előnye, hogy gyakorlatilag nem kell soha fényforrást cserélni, hátránya, hogy a villanások fényereje jelentősen különbözik egymástól, ez pedig költséges elektronikai felépítéssel védhető csak ki.

A deutériumlámpa az ultraibolya spektrofotométerek jellemző fényforrása, előnye, hogy már 200 nm-nél is igen intenzív fényt ad. Rutin klinikai kémiai reakció szempontjából a rövidhullámú ultraibolya tartománynak nincs különösebb jelentősége (egyedül a húgysav urikázos bontása, ami közvetlenül, indikátorreakció nélkül követhető 292 nm-en), ezért a költséges, nagy energiafogyasztású deutériumlámpákat a klinikai kémiában nem szokták használni.

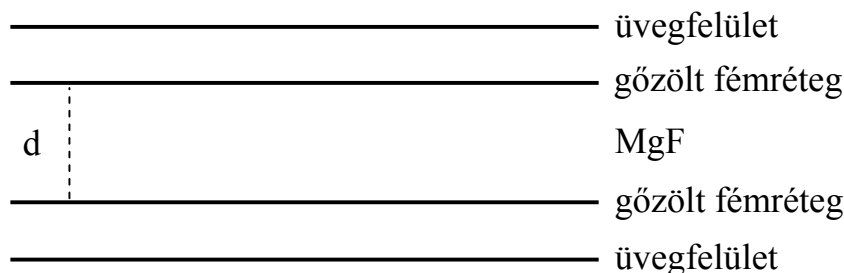
A nagy fényenergiát szolgáltató *xenon lámpákat* elsősorban, mint fluoriméterek fényforrásait alkalmazzuk. Fő hibájuk, hogy élettartamuk rövid, 500-600 üzemóra, drágák, így a fluoriméterek magas üzemköltsége jórészt a xenon lámpa cseréből származik.

Kis cél fotométerek fényforrásaként használható erősfényű fénykibocsátó dióda (*LED*) is. A LED-ek fő előnye igen kis teljesítményfelvételük és hőkibocsátásuk, így akár elemes készülékek is készíthetők. Az ilyen kis fotométerek optikai tulajdonságai természetesen rendkívül szerények.

Kezdetben a fotométereket egyszerű szűrőkkel építették: vagy fémsókkal anyagukban színezett *üvegszűrőket*, vagy *festékszűrőket* használtak. A festékszűrőkben két üvegréteg közé, zselatinban oldott szerves színezéket szárítottak be. A festékszűrőket már nem használjuk.

Az üvegszűrőket ma inkább vágó szűrőnek alkalmazzák, egy-egy zavaró hullámhossztartomány kiiktatására (pl. 650 nm felett a teljes vörös- és infravörös spektrum kiszűrésével a hőszugárzás távoltartására). Mivel a legjobb üvegszűrők félértékisélessége (l. alább) is csak 55-60 nm körül van, színszűrőnek legfeljebb csak kisebb célfotométerekbe építik őket.

Színszűrőnek ma szinte kizárólag több, vékony fémréteg üvegfelületre gőzölésével készített *interferenciaszűrőket* használunk. Az interferenciaszűrő elve az, hogy két, vékonyan fémmel (pl. ezüst, neodimium) gőzölt sík üvegfelület közé vékony, fényáteresztő dielektrikum (pl. MgF_2) réteget visznek fel.



Az üvegfelületre közel merőlegesen beeső fénysugár csak azt a fényt engedi át, amelynek hullámhossza megegyezik a két tükröző felület közti dielektrikum réteg vastagságával, vagy annak valamilyen egészszámu többszörösével.

Ez azt jelenti, hogy pl. egy 340 nm-es interferenciaszűrőben a dielektrikum réteg vastagsága kb. 1/3 mikrométer, és a szűrő átereszt a $2 \times 340 = 680$ nm-es hullámhosszú vörös fényt is. A gyakorlatban ennél rövidebb hullámhosszú interferenciaszűrőt nem készítenek, legalábbis klinikai célra nem, tehát a szóba jöhető felharmonikus hullámhosszak 680 nm-nél nagyobbak. A zavaró vörös és infravörös fényt egy, az interferenciaszűrővel közös foglalatban lévő üveg vágószűrővel szokás kiiktatni. Jó gyártástechnológia esetén az így kapott színszűrők maximális fényáteresztése a névleges értéket legalább 1-2 nm-re megközelíti, a sávszélességet jellemző félértékisélesség nem több $\pm 8-10$ nm-nél.

A félértékisélesség meghatározása spektrofotoméren történik. Az interferenciaszűrőt a mérendő küvetta helyében elhelyezve, transzmittancia %-ban vesszük fel annak áteresztési spektrumát. A kapott haranggörbe áteresztési maximumának a szűrő névleges hullámhosszára kell esnie, A maximális fényáteresztés felének megfelelően a hullámhossztengellyel párhuzamosan húzott egyenesnek a fényáteresztési görbével alkotott két metszéspontját a hullámhossztengelyre vetítjük, így a maximum előtt és mögött kapunk egy-egy hullámhosszértéket, amelyek különbsége nm-ben adja a szűrő félértékisélességét.

Az első spektrofotométerekeket kvarc-, vagy üvegprizmával építették. A prizmára bocsátott vékony fénysugarat prizma felbontotta és egy optikai tükörrre vetítette. A mozgatható tükörről a spektrum egy állítható szélességű részre vetült. A tükör mozgatásával lehetett a spektrum megfelelő hullámhossztartományát a részre vetíteni.

A fotométereke hullámhossztartománya vagy 190 és 850 nm közé esik, vagy 320 és 800 nm közé (a látható fény hullámhossza: 400-800 nm), vagyis a különbség az, hogy a műszer alkalmas-e rövidhullámú ultraibolyában történő mérésre. Gyártási költségben igen nagy különbségről van szó, ugyanis a közönséges üveg 360 nm alatt, a boroszilikát (Pyrex üveg) 320 nm alatt nem fényáteresztő, az optikai elemeket optikai kvarcból kell készíteni, ehhez társul a drágább fényforrás és detektor költsége is. Másfelől, rövidhullámú ultraibolyába esik a nukleinsavak és nukleotidok (260 nm körül), az aromás aminosavak (280 nm körül) fényelnyelése, így kutatási célokra az ilyen fotométer nélkülözhetetlen. A régi fotométerekehez igen sokféle úthosszú küvetta tartozott, jellemzően 5-től 50 mm-ig. A nagy úthosszú küvetta jelentősége abban volt, hogy a széles sávú üveg- vagy festékszűrők nem tették lehetővé, hogy kevésbé színes oldatokat megfelelő pontossággal fotometráljunk, így legegyszerűbb a rétegvastagság emelése volt. Napjainkra a spektrofotométerekehez szinte kizárólag az 1 cm szabad úthosszú küvetta használatosak.

4.2. táblázat. A küvetta anyagi minősége és a mérési tartomány

Jelzés	A küvetta anyaga	Minimális mérési hullámhossz
G (glass)	optikai üveg	350 nm
S (silicon)	emelt szilikáttartalmú üveg	320 nm
Q (quartz)	optikai kvarc	200 nm
műanyag	polimetilmetakrilát	300 nm

Az egyszerű optikai Üvegből készült (G) küvetta ultraibolya fényáteresztése rossz, 400 nm alatt alig használhatók. Az - igen drága - kvarcküvetta rutin klinikai célra feleslegesek, mert 340 nm-nél rövidebb hullámhosszú mérésre nincs szükség. A boroszilikát (Pyrex, S) küvetta fényáteresztése 340 nm-en még elfogadható és viszonylag olcsók.

A műanyag küvetta mindig *polimetilmetakrilát* (plexi) küvetta jelenti, az üvegtiszta polisztirol nem engedi át az ultraibolya fényt. Ma ezek a küvetta kevesebbe kerülnek, mint a beljük töltött reakcióelegy, pontosságuk pedig megközelíti az üvegeküvettaét (4.2. táblázat).

A műanyag küvetta használatának kérdése elsősorban kis laboratóriumokban végzett enzimaktivitás meghatározások esetében merül fel. A félautomata klinikai fotométereke (76. o.) fél mikro leszívóküvettaíhoz, a szokásos, 30 µl körüli átfolyóküvettaíhoz is szükség van 0,5 ml-es reakcióelegyekre, de számos - gyakran nehezen követhető - technikai probléma veszélyét is vállalni kell (pl. az átfolyó küvettaíban könnyen keletkeznek buborékok). Kreatinkináz mérésekor a félmikro műanyag küvetta egyszeri használata esetén is csak a vegyszerköltség negyedével kell számolni, ha pedig a küvettaí folyó vízben elmosás, kiöblít desztillált vízzel, az legalább 6-7 alkalommal használható, így a küvettaí költség valóban elhanyagolható.

1 cm úthossz mellett általában az alábbi küvetta méreteket és típusokat használjuk klinikai laboratóriumi célokra:

Standard
Félmikro
Mikro
Félmikro leszívó

A szabványos külméret betartásának két oka van. Először is, a klinikai fotométereke az enzimaktivitás mérések

kedvéért termosztáljuk, és a termosztált küvettafészket a jó hőátadás kedvéért a küvetának ki kell töltenie. Másrészt a vegyszerkészletek kísérőirataiban megadott faktorok és tájékoztató abszorbanciaértékek 1 cm-es úthosszú küvetákra érvényesek, így korábban még az automaták is 1 cm-es küvetákkal épültek.

A polikromátorral (112. o.) szerelt szelektív automatákat mindenképpen naponta kalibráló savókkal kell hitelesíteni, így az 1 cm-es úthosszú küvetta használatának már nincs különösebb jelentősége, ezek küvetái általában jóval kisebbek.

Automatákban a kisebb küveták alkalmazásának számos oka van. Előnyös a műszert minél nagyobb küvetkoszorúval vagy -szegmensekkel építeni, azonos helyre több kisebb küvetta fér el, és a mozgatandó tömeg is kisebb. A ma jellemző küvetatöltés automaták esetében 180-250 μ l, ilyen térfogat mellett az 1 cm-es úthosszú küvetta nehezen tisztítható, vékony rést jelentene. Végül, korszerű fényérzékelők és analóg erősítők használatával a rövidebb küvetta alkalmazása nem jár számottevő érzékenysévesztéssel. Mindazonáltal, a rövidebb küvetákkal szembeni gyártástechnikai igények magasabbak. 2 μ m úthosszhiba 1 cm-nél 0,2%, 4 mm-nél 0,5% hibát jelent. Műanyag küveták esetében a hőtágulásból is származik ennyi eltérés, az automatákat akkor is igen pontosan termosztálni kellene, ha történetesen enzimérésre nem is kerülne sor.

Ma a fotométerekben alapjában már csak kétféle fényérzékelőt használunk. Az olcsóbb fotométerekbe félvezető érzékelőt építenek, az igényes spektrofotométerekbe és automatákba fényelektron-sokszorozót, a korábban használt alacsony érzékenyséű, rossz linearitású detektorok (szelén fényelem, fotocella) ma már nem használatosak.

A detektor nagy érzékenysége nem öncél. A nagy érzékenyséű detektor spektrofotométerekben rendkívül szűk sávú (0,1-0,5 nm) mérést tesz lehetővé, HPLC mérőfejekben és automatákban pedig igen vékony mérő fénynyaláb használatát, vagyis igen apró küvetta alkalmazását.

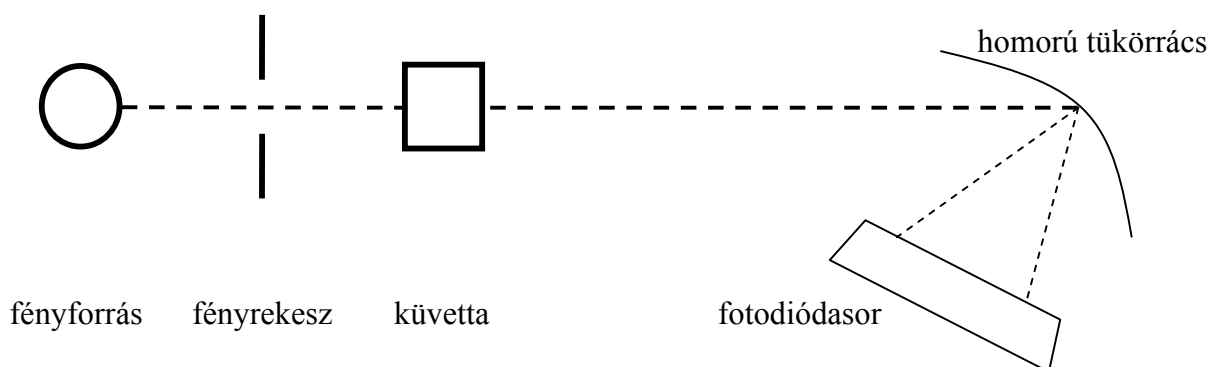
Még lényegesebb szempont, hogy a mérések egy részében a vak minta fényelnyelése igen magas (pl. brómkrezolzölddel végzett albumin meghatározás mérése 590 nm körül), és ehhez képest kell néha igen kis abszorbanciaértékeket pontosan meghatározni.

Az újabb kémiai automatákba épített fotométerek elrendezése nem felel meg a spektrofotométereknek. A mintát fehér fény világítja meg, és a fénybontás a küvetta *után* történik (4.3. ábra).

A küvetából kilépő fénynyaláb egy rácsmonokromátorra vetül, az innen jövő, színeire bontott fény pedig egy, legtöbbször 256 szegmenses, fotodióda sorra (diode array). Ha a fénybontás az elektromágneses spektrum 330-tól 780 nm-ig terjedő hullámhosszú szakaszán történik, ez azt jelenti, hogy egy-egy szegmensre $450:256 = 1,76$, vagyis 2 nm-nél kisebb sáv szélesség jut.

Az egyes mérőprogramokban kijelölt hullámhosszértékeket a fotodiódasor mezőinek be-kikapcsolása állítja be, vagyis a szerkezet eközben fizikailag mozgást nem végez.

E polikromátornak nevezett elrendezés hátránya, hogy a fehérfényű megvilágítás hatására nem-specifikus fluoreszcencia jöhet létre, ami a mérést zavarja.



4.3. ábra. A mai kémiai automatákba épített fotométerek fő részei

Ezzel a - gyakorlatban nem túl fontos - hátránnyal szemben az elrendezésnek igen sok előnye van.

Először is, mivel a diódasor maga is kicsi, néhány mm-es, az egész szerkezet igen kompakt formában építhető meg. A használt lámpa, az alacsonyfeszültségű halogénizzó teljesítménye nem kell, hogy nagy legyen. Nagyobb gondot jelent, hogy a halogénizzót foglalatában különleges pontossággal kell centrálni, így ára a jóval bonyolultabb higanygőz-, vagy xenon-lámpákéit is meghaladja.

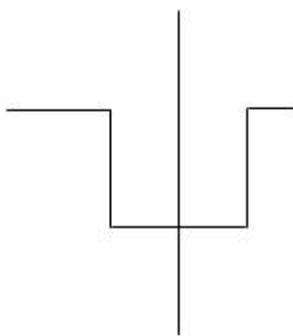
A hullámhossz változtatásakor a szerkezet nem mozog, nem kell annak elállítódásával számolni.

A legfontosabb előny, hogy a diódasor folyamatosan "látja" az egész spektrumot, így a mérendő savómintától származó három leggyakoribb zavaró tényező, az esetleges hemolízis, a magas bilirubin koncentráció (icterus) és a zavarosság (lipaemia stb., 230. o.) akkor is jelezhető, ha az a kezelő figyelmét elkerülte.

Főleg a hemolízist kell, mint hibalehetőséget számításba venni. A vérminta alvadása, az alvadék retrakciója, a vérlepleny lecentrifugálása mindenképpen okoz valamennyi hemolízist ($< 1 \text{ g/l}$), és szemre igen nehéz megítélni, mekkora az a hemolízis, amely az eredményeket már bizonytalanná teszi.

Polikromátorral a fotometriás méréseket érdemes mindig két hullámhosszon ("bikromatikusan") végezni: a színreakció maximális fényelnyelésénél vagy izobesztikus pontjánál (79. o.), illetve egy, a színreakció szempontjából közömbös hullámhosszon. Mivel a mérések a diódasor minden szegmensén azonos időpillanatban történnek, a véletlen műszerhiba (műszerzaj) az összes mérést azonos értelemben befolyásolja, a különböző hullámhosszakon végzett mérések különbsége állandó marad, és egyúttal kiküszöbölődnek a minta esetleges zavarosságából, a küvetta megkarcolódásából, szennyezettségéből származó kisebb hibák. A *polikromátor* elnevezés kissé megtévesztő. Nincs szó valamiféle "sokféle-fényű" fotometriás mérésről, csupán egy speciális *monokromátorról*. Fotometria mindig összehasonlító mérést jelent, a fényelnyelést valamilyen vonatkoztatási oldathoz képest mérjük. A fotométer stabilitásától függően a műszert időnként a vonatkoztatási oldatot (pl. vak mintát) tartalmazó küvetta kell nullázni. Igényes fotométereket készítenek úgy, hogy a fényforrás fényét fényosztón keresztül mindkét, tehát a vak és a mérendő oldatot tartalmazó küvetta bocsátják át, és a küvettaiból kilépő fényt alternálisan irányítják a fotodetektorra. Ez az építési mód ma csak azoknál a fotométereknél szokásos, amelyekkel folyamatosan változtatott hullámhossz mellett elnyelési spektrumot regisztrálunk, ilyenkor ugyanis minden hullámhosszértékhez más és más vakérték tartozik. Korábban, amikor a fotométerek áramköreinek stabilitása olyan volt, hogy néhány percnél tovább nem lehetett dolgozni, mert a műszert újra kellett állítani, a két fényutas fotométerek igen hasznosak voltak sorozatmérésekhez, ugyanis ilyenkor nem volt szükség minden harmadik-negyedik mérés után újabb nullázásra. A mai fényérzékelők, erősítők és kompenzációs áramkörök mellett a fotométerek elállítódása ("drift") minimális, legfeljebb 0,001 A/óra, emiatt a költséges kétutas szerkesztésre egyszerű fotométerekben nincsen szükség.

Elsősorban mikrotitráló lemezekben végzett EIA vizsgálatok fotometriálására használt "ELISA-fotométerekben" történik az abszorbancia mérése a folyadéktükörre merőleges sugármenettel (4.4. ábra).



4.4. ábra. A folyadéktükörre merőleges sugármenet ELISA fotométerben

Ezekben a műszerekben a fő hibalehetőség a lemez pontatlan pozicionálása, ugyanis a folyadéktükör homorú, a középponttól való akár 1 mm-nyi elcsúszás is megváltoztathatja a rétegvastagságot.

A vertikális sugármenet használatának előnye, hogy amennyiben a mérendő vizes oldat párolog, és ezáltal csökken a rétegvastagság, ugyanennyivel nő abban a színes anyag koncentrációja is, így az abszorbancia nem, vagy alig változik.