

Spektrofotometrijske metode u laboratorijskoj medicini

Hadžić, Tea

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Applied Health Sciences / Zdravstveno veleučilište**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:139:211127>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-18**



Repository / Repozitorij:

[Sveznalica](#)





ZDRAVSTVENO VELEUČILIŠTE
STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE

TEA HADŽIĆ

SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE U LABORATORIJSKOJ MEDICINI

ZAVRŠNI RAD

ZAGREB, travanj 2024.



ZDRAVSTVENO VELEUČILIŠTE
STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE

SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE U LABORATORIJSKOJ MEDICINI

ZAVRŠNI RAD

KANDIDAT

TEA HADŽIĆ

MENTOR

dr.sc. MIRJANA FUČEK, spec.med.biokemije

ZAGREB, travanj 2024.

Sadržaj

1. Sažetak.....	1
2. Uvod	2
3. Spektrometrija.....	3
4. Spektrofotometrija	4
5. UV/VIS spektrofotometrija	8
5.1. Atomska apsorpcijska spektrometrija.....	8
5.1.1. Analitička primjena AAS	10
5.1.2. Prednosti AAS	10
5.1.3. Interferencije kod AAS	11
5.2. Atomska emisijska spektrometrija	12
5.2.1. Analitička primjena plamene fotometrije.....	15
5.2.2. Prednosti plamene fotometrije.....	15
5.3. Atomska fluorescencija	16
5.3.1. Analitička primjena AFS	18
5.3.2. Prednosti i nedostaci AFS.....	18
6. Primjena spektrofotometrijskih metoda u medicinsko-biokemijskom laboratoriju	19
6.1. Kvantifikacija koncentracije	19
6.1.1. Određivanje hemoglobina SLS metodom	19
6.2. Identifikacija tvari	20
6.2.1. Određivanje hematogenih pigmenata u likvoru	20
6.3. Praćenje reakcija	22
6.3.1. Aspartat-aminotransferaza	22
6.3.2. Alanin-aminotransferaza.....	23
7. Zaključak.....	24
8. Literatura	25

1. Sažetak

Spektrofotometrija, kao dio spektrometrije, temelji na apsorpciji, transmisiji, disperziji, refleksiji ili emisiji svjetlosti u točno određenom rasponu valnih duljina, a jedna je od najčešće korištenih tehnika za identifikaciju i određivanje koncentracije spojeva u medicinsko-biokemijskim laboratorijima.

Cilj ovog rada jest pobliže objasniti metode spektrometrije i spektrofotometrije, definirati spektar elektromagnetskog zračenja, opisati spektrofotometar (od čega se sastoji, kako funkcionira) i najčešće korištene spektrofotometrijske metode, njihove primjene i mnogobrojne prednosti.

U ovom završnom radu korišteni su podaci o spektrofotometrijskim metodama implementiranim na analizatore koji se koriste u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku (KZLD) Kliničkog bolničkog centra Zagreb (KBC Zagreb).

Ključne riječi

spektar, zračenje, spektrofotometrija, spektrofotometar, metoda, interferencija

2. Uvod

Elektromagnetsko zračenje fizikalna je pojava širenja električnih i magnetskih valova, odnosno ultrasitnih čestica zvanih fotoni. Fotoni su zapravo čestice bez mase koje se gibaju brzinom svjetlosti i sadrže određenu količinu energije. Elektromagnetski valovi svrstani su u elektromagnetski spektar koji se proteže od valova najmanje frekvencije i najveće valne duljine do valova najveće frekvencije i najmanje valne duljine, a dijeli se na dva dijela: neionizirajuće zračenje i ionizirajuće zračenje. Zrake manje energije, odnosno radiovalovi, mikrovalovi, vidljiva svjetlost te infracrvene i ultraljubičaste zrake, nazivamo neionizirajuće zrake. Njihovo djelovanje na organska tkiva može jedino biti štetno pri drugom izlaganju, ali opet puno manje nego djelovanje ionizirajućih zračenja. Razumijevanje elektromagnetskog zračenja nam je bitno kako bismo mogli razumjeti što je zapravo spektrofotometrija.

Kao i kolorimetrijske, spektrofotometrijske metode temelje se na Beer-Lambertovom zakonu koji, najgrublje rečeno, kaže kako su svjetlosna jakost koju propušta otopina neke tvari i koncentracija te otopine eksponencijalno povezani.

Pojmovi koji su također bitni za razumijevanje spektrofotometrije jesu apsorpcija, transmisija, disperzija, refleksija i emisija. Apsorpcija se u spektrofotometriji odnosi na apsorpciju zračenja koja označava upijanje različitih vrsta elektromagnetskog zračenja koje se pritom pretvara u toplinu ili druge oblike energije, a iznos apsorpcije ovisi o tvari koja upija i njezinoj debljini. Transmisija je pojam koji se odnosi na prolaženje svjetlosnih zraka kroz poluprozirno tijelo pri čemu se te zrake raspršuju u svim pravcima, dok je disperzija raspršenje čestica jedne tvari u drugoj. Refleksija predstavlja potpuno ili djelomično odbijanje valova ili snopa čestica od neke površine, i na kraju imamo emisiju koja je zapravo odašiljanje elektromagnetskih valova ili čestica iz nekog sustava.

3. Spektrometrija

Spektrometrijske metode dio su instrumentalnih metoda i postupaka kojima dobivamo informacije o kemijskom sastavu i strukturi tvari na temelju separacije, detekcije i mjerenja energetske promjene koje se događaju u atomskim jezgrama, atomskom elektronskom omotaču ili u molekulama kao posljedica interakcije s energijom. Ta energija može biti energija zračenja (elektrona, iona ili elektromagnetskog zračenja), toplinska, električna ili kemijska, a mi pratimo posljedicu te interakcije. Naziv spektrometrija može nositi svaki postupak mjerenja intenziteta zračenja ovisno o energiji, valnoj duljini ili frekvenciji zračenja.

Podjela spektrometrija može se temeljiti na raznim postavkama, ali najčešće se spektrometrije grupiraju ovisno o posljedici interakcije energije i zračenja u grupama po vrsti zračenja koje se nakon interakcije mjeri (1).

Bitno je razlikovati spektrometriju, kao granu analitičke kemije, od spektroskopije koja je grana fizike i bavi se promatranjem, mjerenjem i tumačenjem spektara, odnosno studijem spektara pomoću spektroskopa (Slika 1), dok se u spektrometriji primjenjuju uređaji zvani spektrometar (Slika 2) (2).



Slika 1. Spektroskop

Izvor: <https://agssci.com/product/spectroscopes/>



Slika 2. Spektrometar

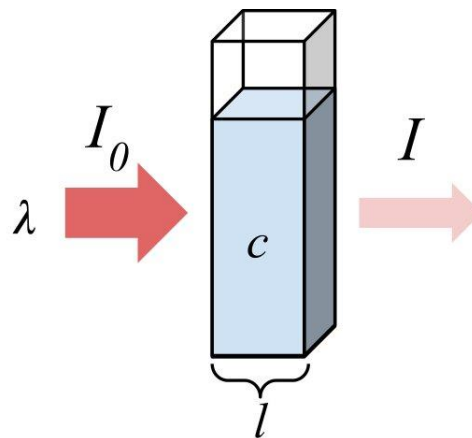
Izvor: <https://www.vernier.com/product/vernier-spectrometer/>

4. Spektrofotometrija

Spektrofotometrija dio je spektrometrije, a definira se kao fotoelektrično mjerenje količine elektromagnetskog zračenja određene valne duljine što ga neka stvar apsorbira (2). Priroda interakcije ispitivanog uzorka s tim elektromagnetskom zračenjem, odnosno svjetlošću, ovisi o fizikalnim svojstvima materijala, kao što su prozirnost, oblik površine, čistoća i debljina. Kemijski spojevi apsorbiraju, transmitiraju, disperziraju ili reflektiraju svjetlost u točno određenom rasponu valnih duljina, a mogu i emitirati svjetlost pri čemu dolazi do emisije svjetlosti. Praćenjem količine apsorbirane svjetlosti omogućava se identifikacija, kao i određivanje koncentracije spojeva (3).

Spektrofotometrijske metode temelje se na Beer-Lambertovom zakonu, koji je zapravo zakon o apsorpciji monokromatske svjetlosti u obojenim otopinama, a kaže da količina svjetlosti koja se apsorbira u obojenom sloju otopine ovisi o debljini tog sloja i o množinskoj koncentraciji otopljene obojene tvari (Slika 3).

Od niza spektrofotometrijskih tehnika, u primjeni je najčešće apsorpcijska spektrofotometrija koja se temelji na mjerenju apsorpcije u uzorku kroz koji se propušta svjetlost različitih valnih duljina, a može se pratiti u ultraljubičastom (UV), vidljivom (VIS), infracrvenom (IR), mikrovalnom te radiovalnom dijelu spektra elektromagnetskog zračenja. U laboratorijskom radu radi se isključivo sa ultraljubičastom i vidljivim spektrom.



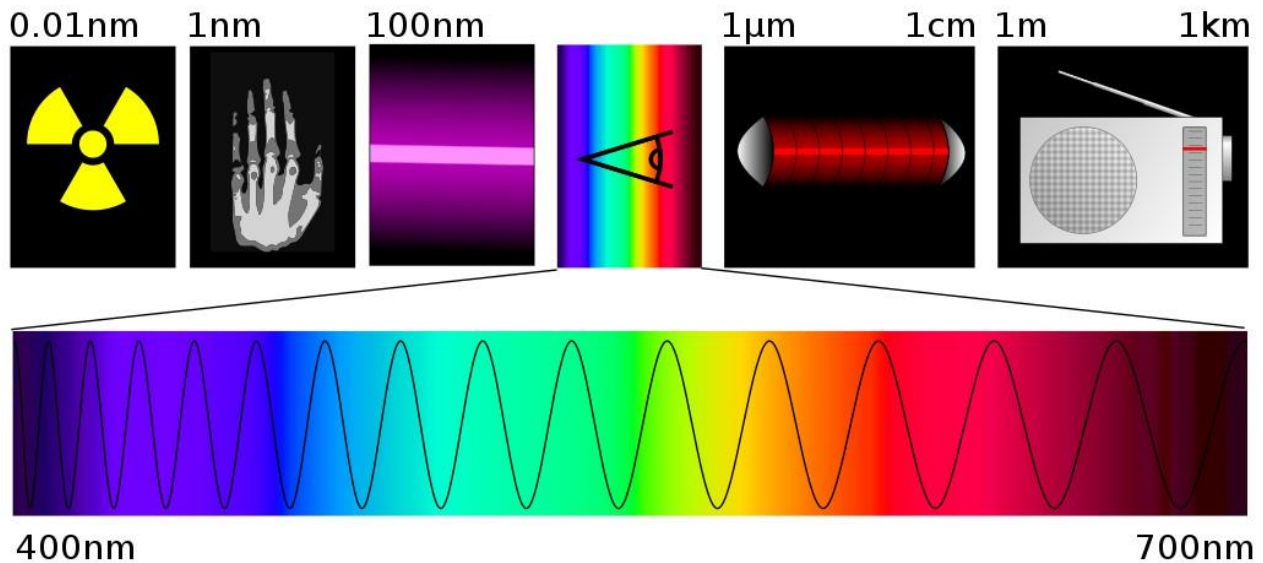
Slika 3. Beer-Lambertov zakon

Izvor: <https://imamagnets.com/en/blog/the-beer-lambert-law/>

4.1. Spektar

Spektar je uređena raspodjela intenziteta mjerene veličine prikazanih ovisno o nekoj fizikalnoj veličini – energiji, frekvenciji, brzini, masi i drugo. Elektromagnetski spektar obuhvaća sve vrste elektromagnetskih valova, od niskofrekventnih radiovalova (valne duljine od nekoliko kilometara) preko mikrovalova (30cm do 1mm) i područja optičkih spektara (infracrvenog zračenja, vidljive svjetlosti, ultraljubičastog zračenja – 1mm do 1nm) do visokofrekventijskog rendgenskog zračenja (valne duljine do približno 1pm) i gama-zračenja (Slika 4).

Kod UV zračenja elektromagnetski su valovi valnih duljina od približno 10 do 400nm, tj. između rendgenskoga zračenja i ljubičastog dijela vidljive svjetlosti, dok vidljivi spektar, odnosno onaj kojeg zamjećuje ljudsko oko, odgovara nizu boja što nastaju rasapom bijele Sunčeve svjetlosti, od ljubičaste (valne duljine 380nm), preko plave, zelene, žute i narančaste do crvene (780nm) (4,5).

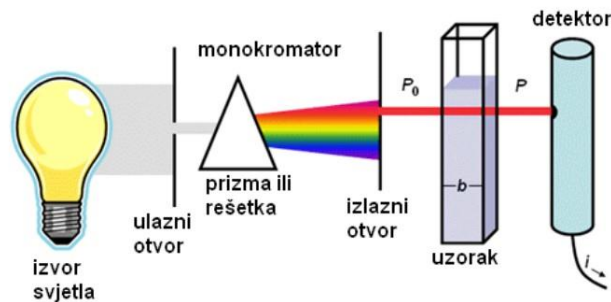


Slika 4. Elektromagnetski spektar

Izvor: https://hr.wikipedia.org/wiki/Spektar_%28fizika%29#/media/Datoteka:Spectre.svg

4.2. Spektrofotometar

Spektrofotometar je uređaj koji se koristi u spektrofotometriji, a funkcionira tako da u intervalima mjeri promjene u apsorpciji ili transmisiji elektromagnetskog zračenja u uzorku kroz koji se propušta svjetlost u odgovarajućem rasponu valnih duljina. Osnovni dijelovi spektrofotometra su izvor svjetlosti, monokromator – sustav koji rasipa zračenje, i detektor – uređaj za mjerenje intenziteta propuštene svjetlosti (Slika 5) (6).



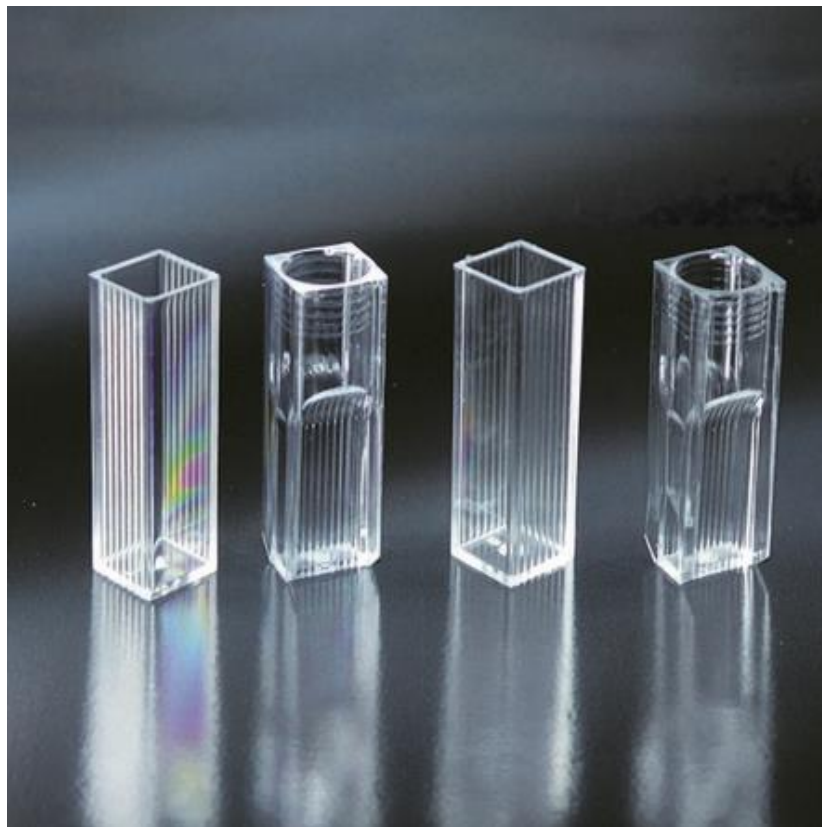
Slika 5. Shematski prikaz spektrofotometra

Izvor: https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Odredjivanje_struktura_organ_skih_spojeva_nastavni_tekst.pdf

Većina spektrofotometara pokriva raspon valnih duljina reda veličine od 190 do 1100 nm. Kao što sam naziv tog dijela spektrofotometra sugerira, monokromator propušta svjetlost samo jedne valne duljine (monokromatska svjetlost), a najčešće se sastoji od optičke rešetke ili optičke prizme koje razdvajaju svjetlost na manje dijelove, odnosno skupine susjednih valnih duljina koje se nazivaju vrpce. Detektor definira osjetljivost uređaja, a najčešće se koriste fotomultiplikator, fotoosjetljive diode ili nabojima spojene naprave (engl. *Charge Coupled Device*, CCD), odnosno CCD čipovi. Obzirom da stvara odgovarajući električni signal koji se pojačava i pretvara u apsoranciju, detektor ima ulogu u kvantifikaciji intenziteta propuštene, odnosno neapsorbirane svjetlosti. Uzorak je u spektrofotometru smješten između monokromatora i detektora u kiveti, odnosno plastičnoj, staklenoj ili kvarcnoj posudici kružnog ili kvadratnog presjeka (Slika 6). Tip kivete ovisi o uređaju i metodi koja se koristi. Kada je uzorak osvjetljen određenim rasponom valnih duljina, intenzitet svjetlosti koju molekule u uzorku propuštaju kvantificira se pomoću detektora, a mjereni električni signal dalje pojačava procesor signala, odnosno zaslon računala s

kojim je spektrofotometar povezan. Rezultat mjerenja u pojedinim valnim intervalima nazivamo spektrofotometrijskom krivuljom (6,7).

Spektrofotometri se najčešće dijele na jednozračne (jednosnopne) i dvozračne (dvosnopne) te prijenosne i neprenosive. Jednozračni spektrofotometri mogu trenutno mjeriti apsorbanciju samo jednog uzorka, stoga se apsorbancija referentnog uzorka (otapala) mora izmjeriti zasebno, a dobiveni spektri naknadno obraditi. Dvozračni spektrofotometri mogu biti izvedeni u prostornoj ili vremenskoj domeni, a princip rada podrazumijeva dvije zrake svjetlosti koje istovremeno prolaze i kroz referentni i ispitivani uzorak te se u tom slučaju izmjerene apsorbancije automatski oduzimaju jedna od druge pa dodatna obrada spektra nije potrebna (8).



Slika 6. Kivete za spektrofotometre

Izvor: <https://www.intermed.be/en/cuvette/laboratory-disposables/professional-products/cuvettes-for-spectrophotometer-0-5-2-ml.html>

5. UV/VIS spektrofotometrija

Apsorpcijska spektrofotometrija koja se provodi u UV i VIS dijelu spektru najučestalija je tehnika u kvantitativnoj i kvalitativnoj analizi zbog svoje široke primjenjivosti, velike točnosti, osjetljivosti i selektivnosti, kao i jednostavnosti i velike brzine izvođenja. Metoda se temelji na interakciji UV i VIS zračenja s atomima i molekulama koja potiče elektronske prijelaze između osnovnog i pobuđenog stanja pri čemu se stvaraju karakteristični profili apsorpcije ili emisije (9,10).

Najčešće UV/VIS korištene tehnike u laboratorijskoj medicini jesu: atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS), atomska emisijska spektrometrija (AES), atomska fluorescencija (AFS) i molekularna apsorpcijska spektrometrija (MAS).

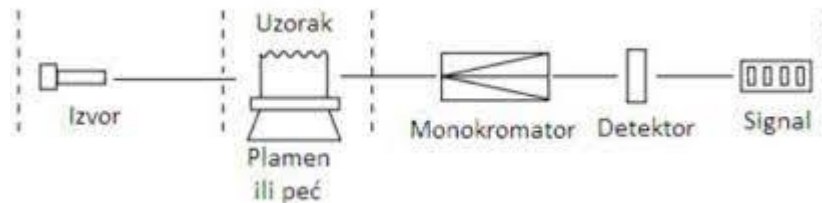
5.1. Atomska apsorpcijska spektrometrija

AAS se temelji na dovođenju elementa u disocirano plinovito, nepobuđeno, neionizirano osnovno stanje. U takvom stanju element je sposoban apsorbirati zračenje vrlo oštro određene valne duljine. Kako je odnos između apsorpcije i koncentracije definiran Beer-Lambertovim zakonom, znači da je apsorpcija izravno razmjerna koncentraciji određivanog elementa, odnosno ona je mjera količine svjetlosti koju atomi tog elementa apsorbiraju pod zadanim uvjetima.

Toplinska disocijacija metalnih elemenata (atomizacija) može se postići sagorijevanjem u plamenu smjese plinova kao što su acetilen-zrak kojom se postiže temperatura od 2300°C ili acetilen-dušik(I)-oksid kojim se postiže temperatura od 3000°C. Upravo zbog toga je kod AAS instrumentacije, kada je riječ o plamenoj atomizaciji, konstrukcija plamenika jedan od najvažnijih čimbenika.

Plamenici se mogu zamijeniti grafitnom kivetom gdje se visoka temperatura, potrebna za atomizaciju metalnog elementa, postiže dovođenjem električne struje na krajeve grafitne cijevi, pri čemu se grafitna kiveta užari do temperature od 3000°C, i u tom slučaju govorimo o elektrotermalnoj atomizaciji (11).

Spektrofotometar koji se koristi u AAS sastoji se od izvora zračenja, prostora za atomizaciju gdje se smješta uzorak, monokromatora, detektora i računala za očitavanje signala (Slika 7).



Slika 6. Shema atomskog apsorpcijskog spektrofotometra
Izvor: <https://hrcak.srce.hr/file/381921>

Izvor zračenja, koji je najčešće žarulja sa šupljom katodom, emitira zračenje koje je karakteristično za analit koji se određuje. Svjetlo koje nastaje iz izvora zračenja prolazi kroz prostor za atomizaciju gdje se nalaze atomi analiziranog uzorka koji apsorbiraju dio energije. Idealni atomizator će cijeli uzorak pretvoriti u atomsku paru, stoga je prema učinku stvaranja atomske pare određena osjetljivost analize. Ukoliko uzorka imamo više, koristi se plamena atomizacija i tada se uzorak kontinuirano usisava u plamen te je signal proporcionalan koncentraciji analita. Ako uzorka imamo malo, koristimo elektrotermalni atomizator i analiziramo mikrolitarske alikvote uzorka te je tada signal proporcionalan apsolutnoj množini/masi analita u uzorku. Prvi sustav je precizniji, ali manje osjetljiv. Nakon prostora za atomizaciju slijede monokromator koji propušta samo određeni dio nastalog zračenja te detektor koji bilježi signal (12).

5.1.1. Analitička primjena AAS

AAS se koristi za analize niza metalnih iona u najrazličitijim tipovima uzoraka i u različitim područjima. U biološkim uzorcima granica detekcije obično je viša nego u čistim otopinama. Uzorci se preobrađuju razrjeđivanjem, puferiranjem, ekstrakcijom, deproteinizacijom, suhim ili mokrim spaljivanjem te dodavanjem kelatirajućih ili otpuštajućih agenasa. U krvi i njezinim derivatima, urinu i tkivima, AAS-om se određuju metali kao što su aluminij, željezo, olovo, selen, bakar, cink i drugi, dok se u cerebrospinalnoj tekućini određuju cink i bakar (13).

5.1.2. Prednosti AAS

Osnovne prednosti AAS uključuju:

1. specifičnost
2. niska granica detekcije za niz elemenata
3. brzina
4. široko koncentracijsko područje u kojem se AAS može primijeniti
5. određivanje niza elemenata jednim instrumentom
6. određivanje nekoliko elemenata iz iste otopine.

Plamenom AAS mogu se određivati samo oni elementi čije su glavne rezonantne linije u dalekom UV području pa apsorbancija u atmosferi postaje značajan čimbenik. Za ovakve elemente bolji se rezultati postižu primjenom besplamene tehnike, odnosno primjenom grafitne kivete (11).

5.1.3. Interferencije kod AAS

Interferencije se mogu pojaviti jer se u AAS kvantitativno mjerenje može izvesti samo usporedbom uzorka s referentnim supstancijama, a ovisno o uzorku razlikujemo kemijske, fizikalne, apsorpcija pozadine (background) i spektralne interferencije.

Kemijske interferencije nastaju uglavnom zbog nepotpune atomizacije elementa, a drugi uzrok je spontana reakcija slobodnih atoma s drugim atomima ili radikalima. Mnoge kemijske interferencije mogu se ukliniti povećanjem temperature plamena ili zamjenom kemijskog okruženja. Moguće je i kemijsko uklanjanje interferencija dodavanjem interferirajućih iona uzorku i standardnu, vezanjem interferirajućeg iona kationom ili zaštitom kationa prevođenjem u odgovarajući kompleks.

Fizikalne interferencije posljedica su fizikalnih svojstava uzorka kao što su viskoznost, hlapljivost, površinska napetost itd. Jedna od najčešćih fizikalnih interferencija jest povećanje apsorpcije zračenja zbog prisutnosti organskih otapala. Visokoznost i visoka koncentracija utječu na smanjenje brzine prolaska uzorka kroz plamen pa je i apsorpcija manja.

Apsorpcija pozadine nastaje zbog rasipanja svjetlosti na molekulama ili česticama koje se nalaze u plamenu, a javlja se i kod elektrotermalne atomizacije prilikom pirolize nekih organskih materijala. Metodom dviju linija može se isključiti pozadinsko zračenje – mjeri se apsorpcija kod različitih valnih duljina pri čemu prvo mjerenje uključuje vrijednost apsorpcije za neatomske čestice i za atome, a drugo mjerenje samo za atomske čestice. Na temelju razlike tih dvaju mjerenja dobiva se apsorpcija određivanog elementa. U metodi kontinuiranog spektra postoje dva izvora svjetlosti pri čemu element koji se određuje apsorbira specifičnu zraku, a čestice koje uzrokuju raspršenje apsorbiraju svjetlost iz obaju izvora. Slična se korekcija može postići i razdvajanjem jedne zrake na tri ili više komponenata u magnetnom polju.

Spektralne interferencije mogu se dogoditi ako se spektralna linija nekog drugog elementa poklapa s linijom elementa koji određujemo. Zahvaljujući vrlo kvalitetnim monokromatorima danas u AAS više nema spektralnih interferencija (11).

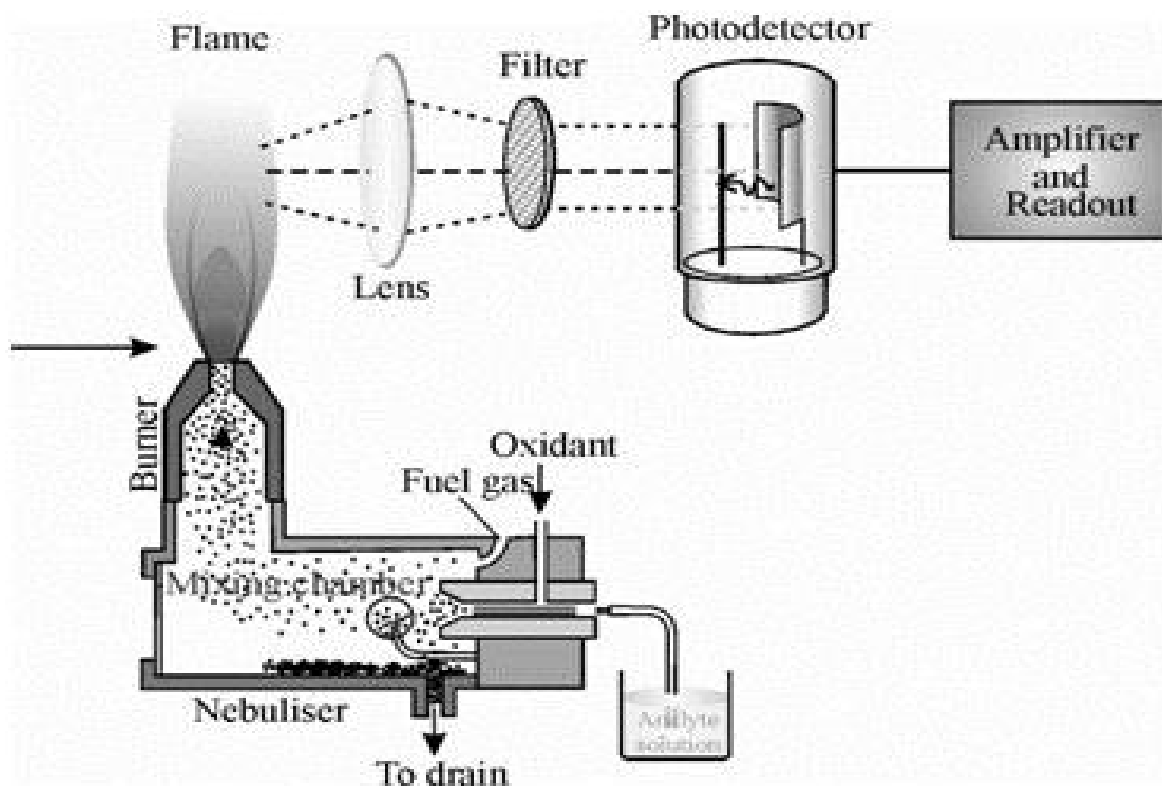
5.2. Atomska emisijska spektrometrija

AES je metoda koja koristi intenzitet svjetlosti emitirane plamenom, plazmom, električnim lukom ili iskrom na određenoj valnoj duljini za određivanje količine nekog elementa u uzorku. Valna duljina atomske spektralne linije omogućuje nam identifikaciju samog elementa, dok je intenzitet emitirane svjetlosti proporcionalan broju atoma tog elementa. U kliničkoj dijagnostici, najčešće korišteno sredstvo pobude atoma je plamen i tada govorimo o plameno-emisijskoj spektrofotometriji ili plamenoj fotometriji.

Plamena fotometrija karakterizirana je time da se pri izvedbi postupka uzorak analize nalazi u izvoru svjetla, odnosno plamenu, a fotometrijski se mjeri jakost emitiranog svjetla u tom plamenu. Svjetlo emitiraju termički pobuđeni atomi uzorka analize, a između jakosti emisije i koncentracije tvari koja se određuje, postoji jednostavni funkcionalni odnos. Tako je dana mogućnost da se na temelju baždarnih krivulja dobivenih mjerenjima sa standardnim otopinama poznatih koncentracija vrše fotometrijska kvantitativna određivanja.

U plinski plamen se jednostavno unašaju razmjerno lako hlapljive tvari, a termički se mogu pri temperaturi plamena eksitirati atomi onih elemenata čija je ekscitacijska energija dovoljno malena. Ove uvjete naročito dobro daju alkalijski i zemnoalkalijski metali, ali i neke druge lake kovine. U kliničkoj dijagnostici plamenom fotometrijom najčešće se određuju natrij, kalij i kalcij u serumu ili plazmi, urinu i drugim biološkim materijalima. Također se koristi za određivanje radioaktivnog stroncija, ali i talija, cinka, bakra i nekih drugih otrovnih kovina, a specijalnim postupcima plamene fotometrije omogućeno je kvantitativno određivanje gotovo svih elemenata.

Standardna aparatura za plamenu fotometriju sastavljena je od boce s komprimiranim plinovima i uređaja za mijenjanje i mjerenje plinskog tlaka, plamenika s raspršivačem te spektralnog fotometra za određivanje jakosti svjetla plamena (Slika 8). Kao gorivi plinovi u obzir dolaze acetilen, rasvjetni plin, butanplin, benzinski plin i vodik, koji se kombiniraju u plameniku s komprimiranim zrakom ili kisikom, a ovisno o kombinaciji tih plinova dobije se u plamenu viša ili niža temperatura.



Slika 8. Shema plamenog fotometra

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-showing-flame-photometer_fig6_314502828

Dakle, za plamenu fotometriju potrebno je imati jednu bocu s gorivim plinom i jednu s komprimiranim zrakom ili kisikom. Kada se radi s komprimiranim zrakom, čeličnu bocu za zrak može zamijeniti odgovarajući motorni kompresor. Na čelične boce treba postaviti odgovarajući redukcijski ventil koji se sastoji od manometra za mjerenje tlaka plina u boci, zatim od uređaja za redukciju tlaka na željenu vrijednost, manometra za mjerenje tlaka pod kojim plin izlazi preko ventila iz boce te pipca koji zatvara ventil. Tlak jednog i drugog plina utječe na intenzitet emitiranog svjetla u plamenu, stoga mora postojati mogućnost da se ovi tlakovi precizno mijenjaju po potrebi.

Plamenik fotometra s raspršivačem sastoji se od raspršivača otopine za analizu, komorice za sedimentaciju kapi tekućine, posudice za miješanje plinova te plamenika. Najčešće korišteni raspršivači rade na principu utjecaja struje zraka. U tekućini koja se rasprši nalazi se uspravna kapilarna cijev s uskim gornjim otvorom preko kojeg prelazi zrak ili kisik pod određenim pretlakom. Struja zraka otkida sitne kapi sa uskog otvora kapilarne cijevi, a te kapi lebde u obliku magle u struji zraka. Struja zraka ulazi iz raspršivača u komoricu za sedimentaciju, koja je zapravo nešto veća staklena posudica u kojoj će se sedimentirati veće kapi tekućine pa će samo sitne kapi ostati u obliku fine magle u struji zraka. Struja zraka ulazi zatim u posudicu za miješanje plinova u koju se kroz drugi otvor uvodi jo i gorivi plin. U toj posudici se plinovi miješaju i zajedno ulaze kroz izlazni otvor u plamenik.

Zadnji dio plamenog fotometra je optički i fotoelektrični uređaj za mjerenje intenziteta emitiranog svjetla u plamenu, čija optika služi za izolaciju emitiranih spektralnih linija te za njihovu projekciju na receptor zračenja, dok je njegov elektronski dio zapravo mjerni uređaj za određivanje jakosti svjetla plamena. Najvažniji dio optičkog uređaja plamenog fotometra je optički filter, odnosno monokromator s prizmom ili rešetkom, iako veći broj suvremenih konstrukcija plamenih fotometara upotrebljava interferencijske filtre. Kada se plameni fotometar gradi s monokromatorom potrebno je uzimati za receptor svjetla fotostanice s odgovarajućim elektronskim uređajima za pojačavanje ili fotomultiplikatore s njihovom elektronikom. Takvi fotoelektrični mjerni uređaji se također mogu upotrebljavati uz metode otklona, ali veoma često su građeni za metodu električne kompenzacije. To izričito vrijedi za aparate koji su konstruirani kao spektralni fotometri za mjerenje apsorpcije svjetlosti, a raspršivač i plamenik predstavljaju samo aparativnu i funkcionalnu nadopunu tih fotometara (14).

5.2.1. Analitička primjena plamene fotometrije

Kod izvedbe analiza u kliničkoj dijagnostici primjenom plamene fotometrije najviše u obzir dolaze određivanje natrija, kalija i kalcija u serumu ili plazmi i urinu. Biološki materijal se za plamenu fotometriju obrađuje metodom razrjeđivanja, koja je ujedno i najjednostavnija metoda, metodom taloženja bjelančevina, koja se upotrebljava prilikom analize uzoraka s velikim količinama otopljenih bjelančevina u serumu ili plazmi, razrjeđivanjem s organskim otapalima, suhom mineralizacijom ili mokrom mineralizacijom (14).

5.2.2. Prednosti plamene fotometrije

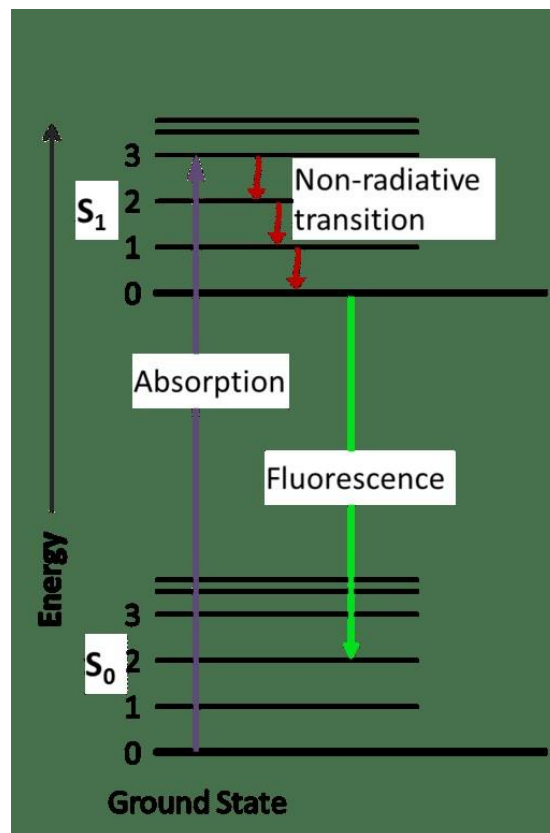
Plamena fotometrija veoma se uspješno upotrebljava kao analitička metoda iz više razloga:

1. jednostavan i brz postupak – kada je aparatura postavljena i baždarena, mjerni postupak za jedan analizirani uzorak traje svega nekoliko minuta
2. mjerenja se često mogu vršiti izravno na uzorcima analize, naravno nakon jednostavne kemijske ili fizikalne obrade uzorka
3. selektivan postupak – rijetko smeta prisutnost drugih tvari u uzorku
4. velika osjetljivost dokazivanja i određivanja (14).

5.3. Atomska fluorescencija

Fluorescencija je oblik fotoluminiscencije, odnosno posljedica obasjavanja tvari svjetlošću svih valnih duljina te važan analitički emisijski proces u kojem se pobuđene vrste u osnovno stanje vraćaju otpuštanjem jednog dijela energije u obliku fotona (15).

Nakon početne apsorpcije, molekula prelazi iz osnovnog u pobuđeno elektronsko stanje i tada može gubiti energiju neradijativnim prijelazom, što znači da unutrašnjom konverzijom u sudarima s drugim molekulama u gornjim vibracijskim razinama predaje energiju susjednim molekulama te prelazi u najnižu vibracijsku razinu pobuđenog stanja. Fluorescencija se javlja pri nižim frekvencijama, odnosno pri višim valnim duljinama od induciranog zračenja jer se prijelaz emisije odvija nakon što se dio vibracijske energije otpustio u okolinu (Slika 9) (16).



Slika 9. Shema atomske fluorescencije

Izvor: <https://www.quora.com/What-are-the-factors-and-properties-responsible-for-Fluorescence>

Fluorescenciju mjerimo fluorimetrima i spektrofluorimetrima, a dijelovi tih instrumenata ekvivalentni su dijelovima uređaja za spektrofotometriju. Najčešće se koriste spektrofluorimetri s dva monokromatora koji snimaju fluorescencijske pobude i emisijske spektre. Najprije se propušta zračenje koje će uzrokovati fluorescenciju kroz primarni monokromator te ograničiti zračenje valnih duljina koje odgovaraju valnim duljinama fluorescencije, a na kraju emitirano zračenje prolazi kroz drugi monokromator i dolazi do detektora gdje se očitava signal (15).

Budući da je osnovni uvjet emisije zračenja molekula sposobna za pobuđivanje, razumljivo je da te vrlo reaktivne molekule mogu brzo reagirati s okolnim medijem i tako uzrokovati promjenu fluorescentnih svojstava. Promjena pH otopine može uzrokovati promjenu ionskog stanja supstituiranih skupina na nekoj molekuli, a time i promjenu fluorescentnih svojstava, a pažljivim odabirom pH vrijednosti može se povisiti specifičnost i/ili osjetljivost fluorescentnih analiza. Promjene otapala također mogu uzrokovati znatne promjene fluorescentnih svojstava, stoga iako se utjecaj otapala ne može potpuno predvidjeti. Pri odabiru treba obratiti pažnju da otapalo ne apsorbira i fluorescira svjetlost u istom dijelu spektra kao i tvar koja se ispituje. Valna duljina fluorescencije skraćuje se smanjenjem polarosti otopine, a fluorescentna će se svojstva također promijeniti vezanjem fluorofora na biološki važne makromolekule. Intenzitet fluorescencije ovisi i o temperaturi, stoga ona mora biti regulirana unutar $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Porastom temperature intenzitet fluorescencije smanjuje se za otprilike 1-5% po stupnju Celzijevu. Posljednje što može utjecati na fluorescentna svojstva jest gašenje, pri čemu mislimo da neka tvar smanjuje fluorescenciju druge tvari, odnosno gasi njenu fluorescenciju. To se gašenje može zbivati na dva načina. Prvi je utjecaj unutrašnjeg filtra koji nastaje zbog prisutnosti drugih molekula u okružju fluorescentne molekule. U tom slučaju može doći do propuštanja samo dijela pobuđenog zračenja pa se smanjuje intenzitet zračenja koji pada na fluorofor, ili do propuštanja dijela ponovno emitiranog zračenja zbog čega će doći do smanjenja količine fluorescencije koja dolazi do fotodetektora. Drugi način jest „pravo“ gašenje koje nastaje interakcijom reaktanta gašenja s fluorescentnom molekulom bilo u temeljnom ili pobuđenom stanju, a kako je pobuđeno stanje molekule reaktivnije, te su interakcije češće. Razgradnja energije pobuđenog stanja može se odvijati konverzijom pobuđenog singlet.stanja u triplet-stanje ili prijenosom energije elektrona ili protona (11).

5.3.1. Analitička primjena AFS

Fluorescentne analize obuhvaćaju metode koje se temelje na mjerenju prirodne fluorescencije, metode koje se temelje na mjerenju kemijski uzrokovane fluorescencije, metode na principu mjerenja fluorescentnog gašenja te metode koje uključuju enzimске reakcije.

Fluorescencijom se mogu mjeriti metaboliti kao što su bilirubin, željezo, kalcij i magnezij, zatim u koagulaciji antitrombin III, heparin i plazminogen, od enzima CK-MB, glukozidaze, hidrolaze i proteaze, od lijekova recimo amikacin, digoksin, lindokain i teofilin, te hormoni kao što su FSH, HCG, LH, TSH i estrogeni.

5.3.2. Prednosti i nedostaci AFS

AFS ima prednosti jednostavne opreme, niske spektralne interferencije, širokog linearnog raspona radnih krivulja te se može koristiti za određivanje više elemenata (17), a uz to je i osjetljivija metoda od onih temeljenih na absorpciji jer joj se osjetljivost može povećati pojačanjem signala detektora ili povećanjem snage snopa zračenja koje pobuđuju molekulu (15).

Izvori pogrešaka u fluorescentnim mjerenjima, koje je moguće izbjeći čestom kontrolom sustava s pomoću standarda, a koji dovode do nelinearnosti odnosa jačine fluorescencije i koncentracije ispitivanog supstrata mogu se uglavnom svrstati u tri kategorije:

1. nespecifična emisija zračenja koja nastaje zbog fluorescentnih kontaminanata reakcijske smjese
2. nelinearnost u području visokih koncentracija zbog sudaranja fotona zračenja s molekulama u otopini
3. neadekvatna reproducibilnost i stabilnost instrumenata (11).

6. Primjena spektrofotometrijskih metoda u medicinsko-biokemijskom laboratoriju

Spektrofotometrijske metode u medicinsko-biokemijskim laboratorijima najvažniju ulogu imaju u kvantifikaciji koncentracije određenih poznatih tvari u nekoj otopini, zatim u samoj identifikaciji tvari obzirom da svaka tvar ima jedinstveni spektar apsorpcije ili emisije, te u praćenju brzine kemijskih reakcija mjerenjem promjena u apsorpcijskom ili emisijskom spektru tijekom vremena.

6.1. Kvantifikacija koncentracije

Kao što je spomenuto, spektrofotometrijskim metodama kvantificiraju se koncentracije poznatih tvari u otopini, kao što je primjerice određivanje hemoglobina SLS-hemoglobinskom metodom, odnosno metodom s natrij dodecil-sulfatom (engl. *Sodium Lauryl Sulfat*, SLS).

6.1.1. Određivanje hemoglobina SLS metodom

SLS metoda koristi prednosti oksihemoglobinske i cijanmethemoglobinske metode mjerenja hemoglobina, a smatra se prikladnom za automatizaciju jer je pretvorba hemoglobina u oskihemoglobin brza, koriste se netoksične supstance te je u mjerenje uključen i methemoglobin. U SLS metodi, nakon brojenja eritrocita i trombocita, surfaktani liziraju membranu eritrocita i oslobađaju hemoglobin. Globinski dio hemoglobina se mijenja pomoću hidrofilne alkalne grupe natrij dodecil-sulfata što potiče pretvoru hemoglobina iz fero (Fe^{2+}) u feri (Fe^{3+}) oblik, tj. nastanak methemoglobina koji se spaja sa SLS-om pri čemu nastaje SLS-hemoglobin. Apsorpcija SLS-hemoglobina mjeri se spektrofotometrijski pri 555 nm.

Na Sysmex hematološkim analizatorima, koji se koriste u KZLD-u KBC-a Zagreb, interferencije koje uzrokuju lažno povišene vrijednosti hemoglobina mjenog ovom metodom jesu lipemija, leukociti veći od $200 \times 10^9/\text{L}$, hiperbilirubinemija, hipergamaglobulinemija i kriglobulini (18).

Brzo određivanje hemoglobina automatiziranim analizatorima, što nam SLS metoda omogućava, bitno je jer se u svakodnevnom rutinskom laboratorijskom radu analizira jako velik broj kompletnih krvnih slika, čega je hemoglobin sastavni dio, dok se u hitnoj laboratorijskoj dijagnostici najčešće određuje zbog sumnje na unutarnja krvarenja koja je vrlo bitno što prije sanirati kako pacijent ne bi iskrvario.

6.2. Identifikacija tvari

Usporedbom spektara možemo npr. određivati hematogene pigmente u likvoru koji su nam važni u slučajevima kada je prisutna sumnja na subarahnoidno krvarenje, a nalaz kompjuterizirane tomografije negativan. Oksihemoglobin prisutan je u likvoru kod svježih krvarenja s prodorom u likvorske prostore, a njegovom pregradnjom nastane bilirubin koji uzrokuje ksantokromiju likvora, dok methemoglobin nastaje postupnom oksidacijom hemoglobina. Ova metoda dovoljno je osjetljiva da se pigmenti mogu dokazati i u bistrim i bezbojnim uzorcima likvora.

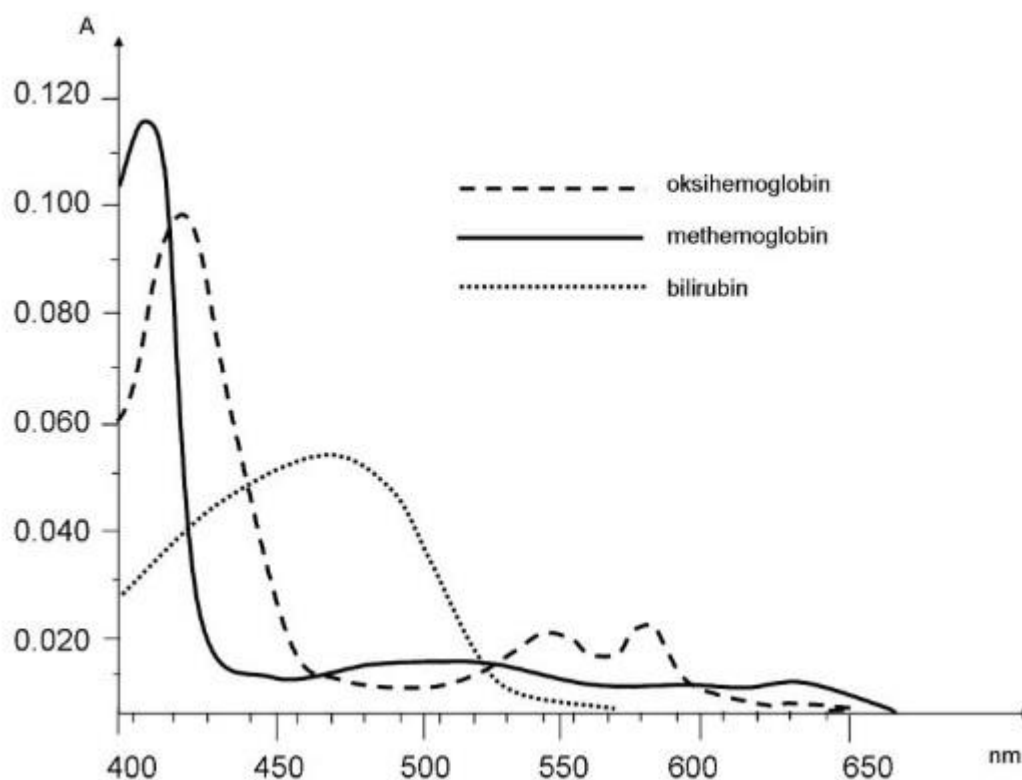
6.2.1. Određivanje hematogenih pigmenata u likvoru

Hem derivati apsorbiraju različite valne duljine unutar vidljivog dijela spektra što rezultira specifičnim spektrometrijskim krivuljama (Slika 10), a čiji su apsorpcijski maksimumi navedeni u Tablici 1. Prisutnost methemoglobina u smjesi sa oksihemoglobinom dokazuje se dodatkom kalij-cijanida (KCN) u uzorku likvora, pri čemu nastaje cijanmethemoglobin čiji je apsorpcijski maksimum drugačiji pa dolazi do pomaka pika.

U normalnom likvoru odrasle osobe hematogeni pigmenti nisu prisutni. U interpretaciji nalaza treba biti oprezan, posebice u ranoj dječjoj dobi kada ksantokromija može biti posljedica visoke koncentracije proteina u likvoru na koje je vezan bilirubin iz krvi ili ulaska slobodnog bilirubina iz krvi uslijed hiperbilirubinemija, a to može zamaskirati starije intrakranijsko krvarenje. Također, ponovljena punkcija nakon traumatske punkcije može rezultirati lažno pozitivnim nalazom hematogenih pigmenata (19).

Tablica 1. Apsorpcijski maksimumi hematogenih pigmenata u likvoru

Pigmenti	Apsorpcijski maksimumi (nm)
Oksihemoglobin	412-415; 575
Methemoglobin	406-408; 630
Bilirubin	430-470
Cijanmethemoglobin	419



Slika 10. Apsorpcijski maksimumi hematogenih pigmenata u likvoru

Izvor: Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M i sur. Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. 249

6.3. Praćenje reakcija

Spektrofotometrijski moguće je odrediti i aktivnost nekog enzima, kao primjerice aspartat-aminotransferaze (AST) i alanin-aminotransferaze (ALT). Najveća aktivnost AST-a pronađena je u jetri, a mjerenje je indicirano u dijagnozi, razlikovanju i nadzoru hepatobilirajne bolesti, infarkta miokarda i oštećenja skeletnog mišića. ALT se nalazi u citosolu hepatocita, a povišene razine u serumu ukazuju na slabljenje plazmatske membrane hepatocita te ALT pokazuje veću dijagnostičku osjetljivost za hepatobilirajnu bolest od AST-a.

6.3.1. Aspartat-aminotransferaza

AST katalizira prijenos amino grupe između L-aspartata i 2-oksoglutarata da bi nastao oksalacetat i L-glutamat. Nastali oksalacetat reagira s NADH u reakciji kataliziranoj s malat dehidrogenazom (MDH) pri čemu nastaj L-malat i NAD⁺. Piridoksal fosfat služi kao koenzim u reakciji prijenosa aminogrupe, a osigurava potpunu enzimatsku aktivaciju. Brzina oksidacije NADH direktno je proporcionalna aktivnosti AST u serumu i mjeri se UV fotometrijom kao smanjenje apsorbancije na 340 nm.

Na Alinity biokemijskim analizatorima (Slika 11) koji se koriste u KZLD-u KBC-a Zagreb, nisu dokazane interferencije u serumu kod koncentracija:

- 1) hemoglobina <0,62 g/L (indeks hemolize do 62)
- 2) bilirubina <1026 μ mol/L (indeks ikterije do 60)
- 3) lipemije <5,5 g/L (indeks lipemije do 500) – lipemične uzorke ponoviti u razrjeđenju (20).

6.3.2. Alanin-aminotransferaza

ALT katalizira reakciju između L-alanina i 2-oksoglutarata. Nastali piruvat reducira se s NADH u reakciji kataliziranoj s laktat dehidrogenazom (LDH) pri čemu nastaje L-laktat i NAD⁺. Piridoksal fosfat služi kao koenzim u reakciji prijenosa aminogrupe, on osigurava potpunu enzimatsku aktivaciju. Brzina oksidacije NADH direktno je proporcionalna aktivnosti ALT u serumu i mjeri se fotometrijski kao smanjenje apsorbancije na 340 nm.

Na Alinity biokemijskim analizatorima, nisu dokazane interferencije u serumu kod koncentracija:

- 1) hemoglobina <10 g/L (indeks hemolize do 1000)
- 2) bilirubina <1026 μmol/L (indeks ikterije do 60)
- 3) lipemije <7,5 g/L (indeks lipemije do 750) – lipemične uzorke ponoviti u razrjeđenju (21).



Slika 11. Alinity biokemijski analizatori

Izvor: <https://www.corelaboratory.abbott/int/en/offerings/brands/alinity/alinity-ci-series.html>

7. Zaključak

Razvojem analitičke kemije omogućeno nam je korištenje velikog broja različitih metoda zahvaljujući čemu se danas ne mora birati između primjerice velike točnosti ili velike osjetljivosti, već je moguće birati između metoda koje obuhvaćaju veći broj prednosti pri određivanju određenog analita.

Spektrofotometrijske metode u medicinsko-biokemijskim laboratorijima danas su jedne od najzastupljenijih zahvaljujući širokoj primjenjivosti, velikoj brzini i jednostavnosti izvođenja, velikoj točnosti, osjetljivosti i selektivnosti. Najčešće se primjenjuju u kvantifikaciji koncentracije poznatih tvari, identifikaciji određenih nepoznatih tvari te praćenju brzine kemijskih reakcija npr. određivanjem aktivnosti nekih enzima.

Spektrofotometrijskih tehnika je mnogo, međutim u laboratorijskom radu u primjeni je najčešće apsorpcijska spektrofotometrija u UV i VIS spektru, iako se mjerenje apsorbancije u uzorku može pratiti u različitim dijelovima spektra elektromagnetskog zračenja. Najzastupljenija od tih tehnika jest atomska apsorpcijska spektrometrija jer se može koristiti za analize niza metalnih iona u najrazličitijim tipovima uzoraka i u različitim područjima.

8. Literatura

1. Maljković D; Spektrometrija. U: Tehnička enciklopedija. Zagreb: Leksikografski zavod "Miroslav Krleža"; 1992. 150-178.
2. <https://tehnika.lzmk.hr/tehnickaenciklopedija/spektrometrija.pdf>
3. Germer TA, Zwinkels JC, Tsai BK: Theoretical Concepts in Spectrophotometric Measurements. *Experimental Methods in the Physical Sciences*. 2014;46:11-66.
4. <https://enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=57368>
5. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=63114>
6. Lema A, Aljinovic EM, Lozano ME; Using a Homemade Spectrophotometer in Teaching Biosciences. *Biochemistry and Molecular Biology Education*; 2002;30:106-110.
7. Mihoci M; Osvrti: Spektrofotometrijsko određivanje boje. U: *Kemija u industriji: Časopis keramičara i kemijskih inženjera Hrvatske*; 2015;64:683-685
8. Pitinac N, Pecikozić Đ; Priručnik za instrumentalne metode ispitivanja sastavnica okoliša u strukovnim školama; Osijek: Tehnička škola i prirodoslovna gimnazija Ruđera Boškovića; 2016.
9. Trumbo TA, Schultz E, Borland MG, Pugh ME; Applied spectrophotometry: Analysis of a biochemical mixture. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2013;38:814-841.
10. Burgess C; The Basis for Good Spectrophotometric UV-Visible Measurements. *UV-Visible Spectrophotometry of Water and Wastewater*; 2017. 1-35.
11. Štraus B, Stavljenić-Rukavina A, Plavšić F, i sur: *Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju*. Zagreb: Medicinska naklada; 1997. 17-67
12. Luterotti S, Bicanci D: *Odrabrane teme iz bioanalitike*. Zagreb, 2013.
13. Lewen N: The use of atomic spectroscopy in the pharmaceutical industry for the determination of trace elements in pharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal*. 2011;55:653-661
14. Weber K: Plamena fotometrija u službi medicinske kemije. U: *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*; 1963;14: 119-126
15. Skoog DA, West DM, Holler FJ: *Osnove analitičke kemije*. Zagreb: Školska knjiga: 1999. 585-593

16. Atkins P, de Paula J: Physical Chemistry. Oxford University Press. 2006;8:492-494
17. <https://antiteck.com/hr/atomska-fluorescentna-spektrometrija-2/>
18. LP-7.3-000-21/1 KOMPLETNA KRVNA SLIKA; KBC Zagreb, KZLD
19. LP-7.3-050-6/1 HEMATOGENI PIGMENTI U LIKVORU; KBC Zagreb, KZLD
20. LP-5.5-000-2/4 ASPARTAT-AMINOTRANSFERAZA; KBC Zagreb, KZLD
21. LP-5.5-000-1/4 ALANIN-AMINOTRANSFERAZA; KBC Zagreb, KZLD