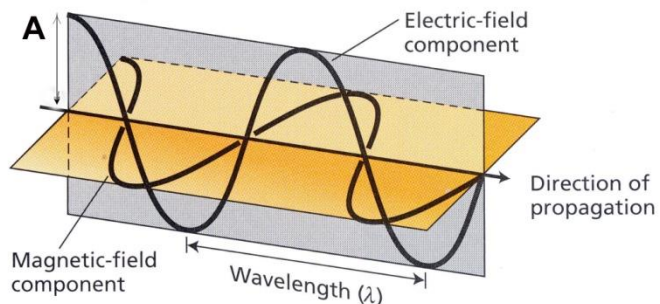


# **Spektrofotometria**

# A fény tulajdonságai

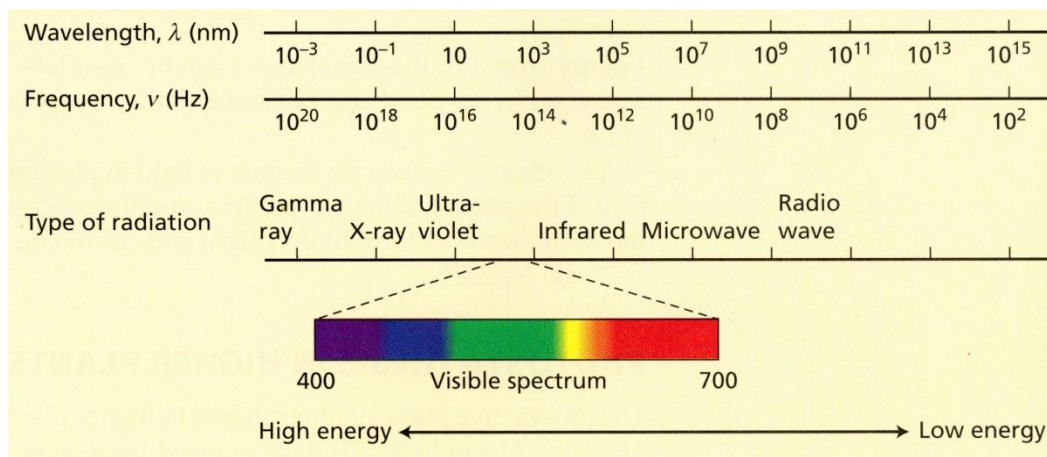
## A fény, mint hullámjelenség



$\lambda$  (lambda) (nm) – hullámhossz  
 $\nu$  (nű) (f) (Hz, 1/s) – frekvencia,  $\nu = c/\lambda$   
 $c$  (m/s) – fénysebesség ( $2,998 \cdot 10^8$  m/s)  
 $\bar{\nu}$  ( $\sigma$ ) ( $\text{cm}^{-1}$ ) – hullámszám,  $\bar{\nu} = 1/\lambda$   
 $A$  – amplitúdó

Intenzitás:  $A^2$  és  $\nu^2$ -tel arányos

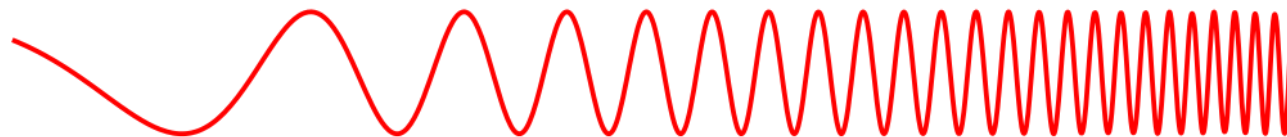
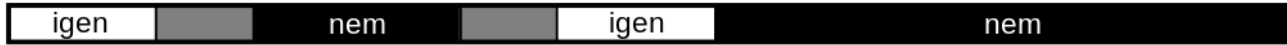
Összefüggésük:  $E = h\nu = h c/\lambda$   $h=6,626 \cdot 10^{-34}$  J s (Planck-állandó)  
**E foton energiája (J)**



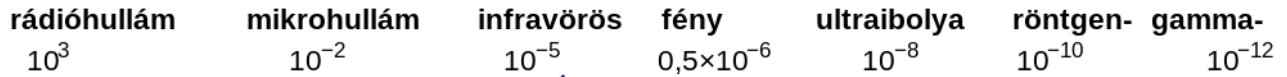
# A fény tulajdonságai

## Elektromágneses spektrum

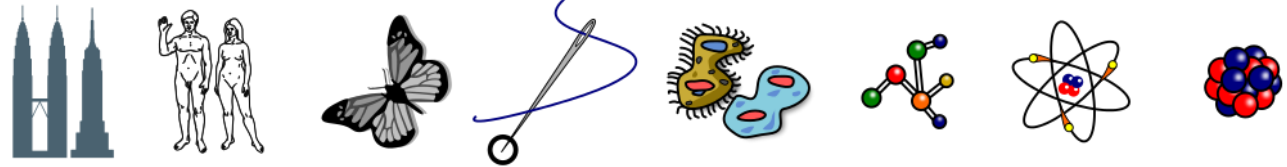
Átengedi a Föld légköre?



Hullámtartomány  
Hullámhossz (m)

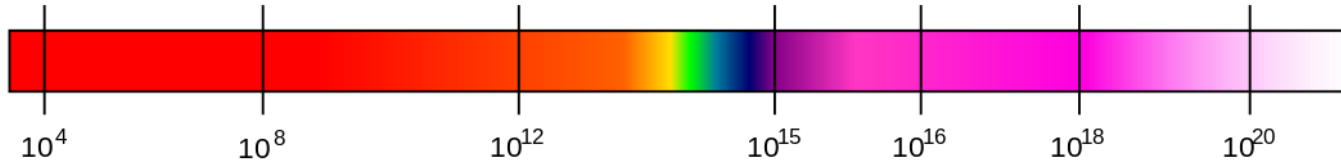


A hullámhossz nagyságrendje

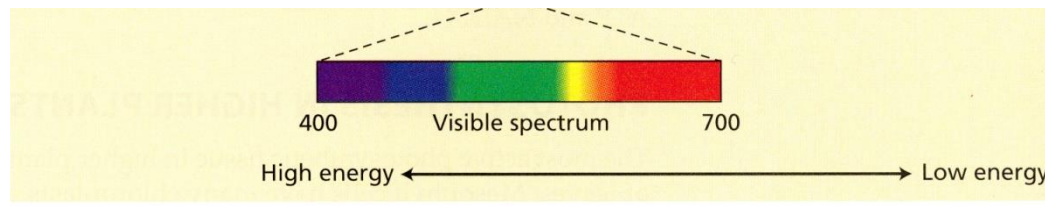
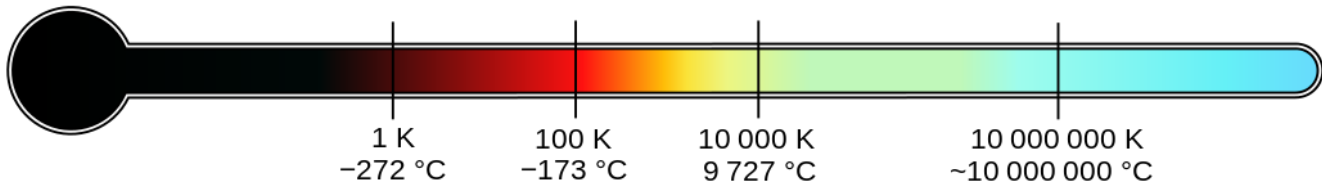


épületek ember pillangó tűhegy egysejtű molekula atom atommag

Frekvencia (Hz)



A tartományban maximális intenzitással sugárzó testek hőmérséklete



# Spektrofotometria

- Elektromágneses sugárzás két tartománya
  - UV: 190-340nm
  - VIS: 340-900nm
- **Transzmittancia** (Áteresztőképesség):  $T(\%) = I/I_0 \cdot 100 (\%)$  vagy  $T = I/I_0$



- **Abszorbancia** (Elnyelés):  
hullámhossz függése jellemző az elnyelő anyag kémiai jellegére

$$A = \log 1/T = -\log T = \log(I_0/I)$$

# Mit jelent $T\% = 10\%$ illetve $A = 0,1$ ?

- $T = 10\% = 0.1 = I/I_0$ 
  - Tehát  $I = 0.1 \times I_0$ , vagyis a beeső fény 10%-a jut át az anyagon, vagyis 90%-a elnyelődik.
  - Mekkora az abszorbancia?  
 $A = \log 1/T = \log (1 / 0,1) = \log 10 = 1$
- $A = 0,1 = \log 1/T$  akkor  
 $T = 10^{-A} = 10^{-0,1} = 0,79 = 79\%$

A	T %
0,01	98%
0,1	79%
0,5	32%
1	10%
2	1%
3	0,1%

Logaritmus: A hatványozás megfordítása.  **$\log_a b$  egy szám melyre igaz  $a^{\log_a b} = b$**

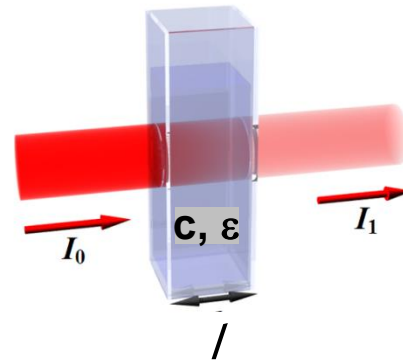
# Lambert-Beer törvény

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot l$$

**E (epszilon)** : moláris abszorpciós koefficiens –  
anyagi minőségtől és hullámhossztól függ  
(általában nem függ a hőmérséklettől)

**c** : az oldott anyag moláris koncentrációja

**l** : az elnyelő közeg hossza (a kuvetta  
„szélessége”)



# A fotométer vázlatja

A spektrofotométer főbb részei:

**Lámpa:** halogén (VIS), deutérium lámpa (UV), fotodióda (rögzített hullámhossz)

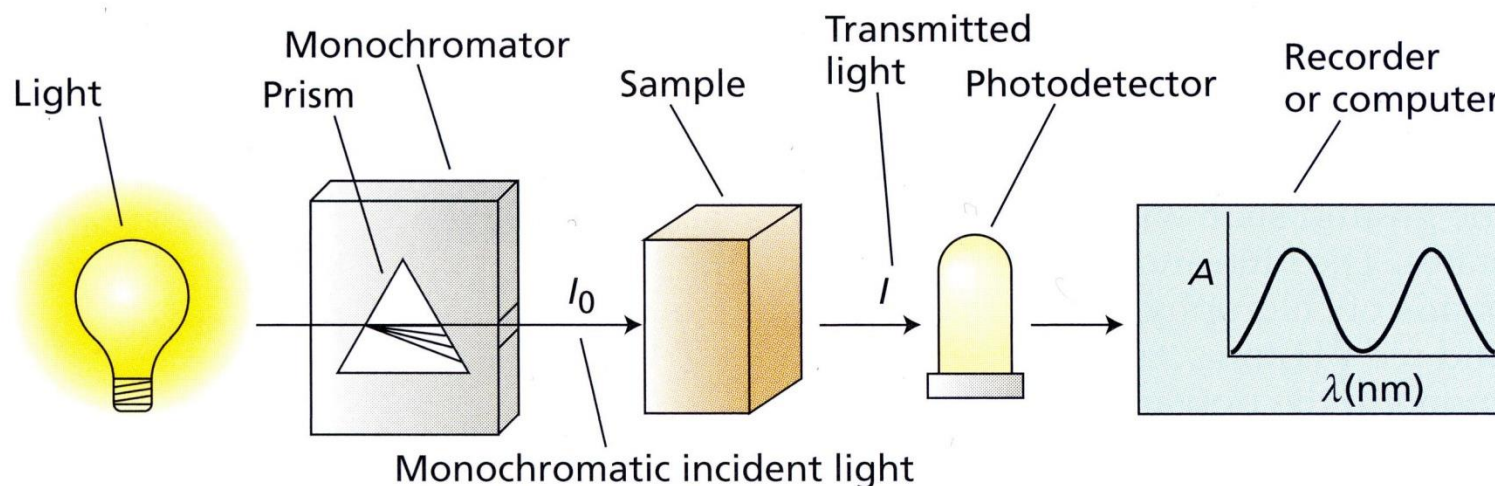
**Monokromátor vagy fényszűrő:** megfelelő hullámhossz „kiválasztása”

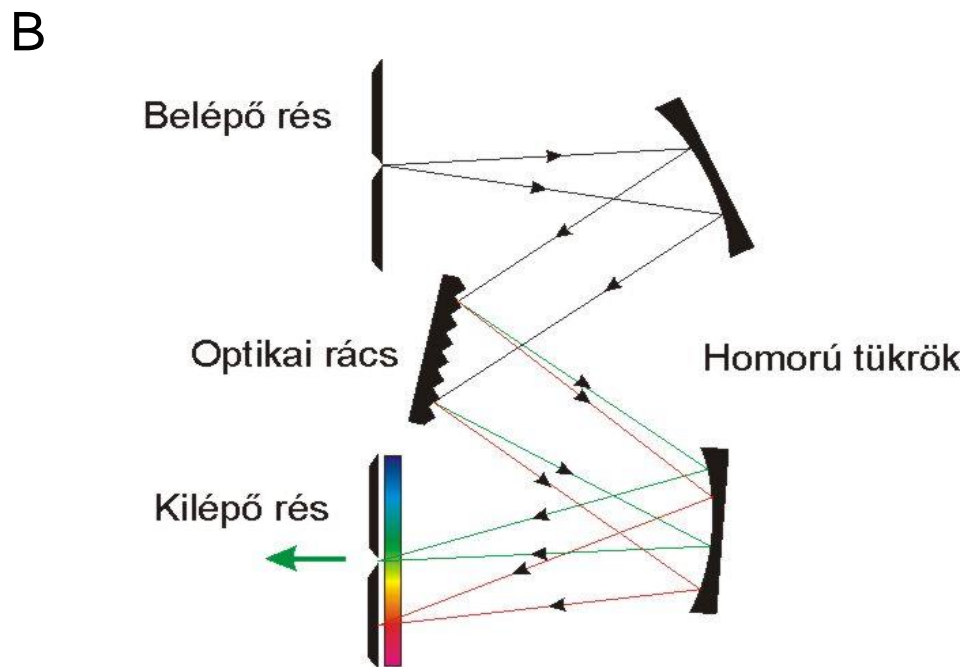
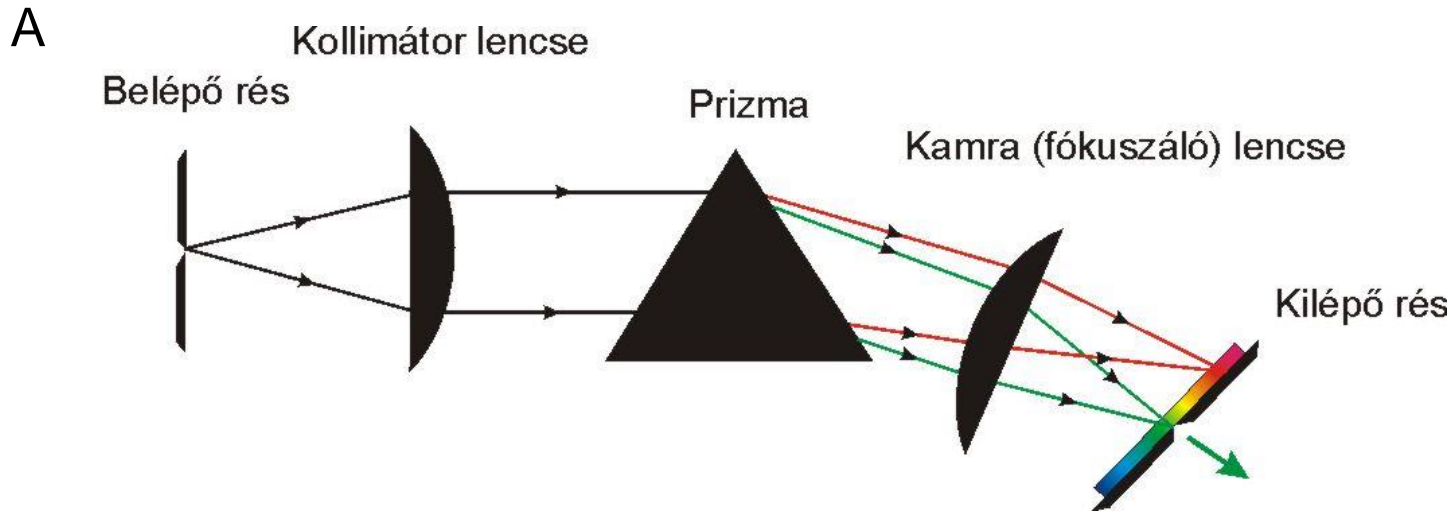
**Rés:** nagysága meghatározza a beeső fény erősségét, és a hullámhossz tartományt

**Mintatartó:** hőmérséklet szabályozás

**Küvetta:** üveg (340nm és felette), műanyag (300nm és felette), kvarc (190nm és felette)

**Detektor:** fotodiódák, photomultiplier, diódasoros detektor (spektrumfelvétel egyidőben)







# A spektrofotométer részei és kűvetták



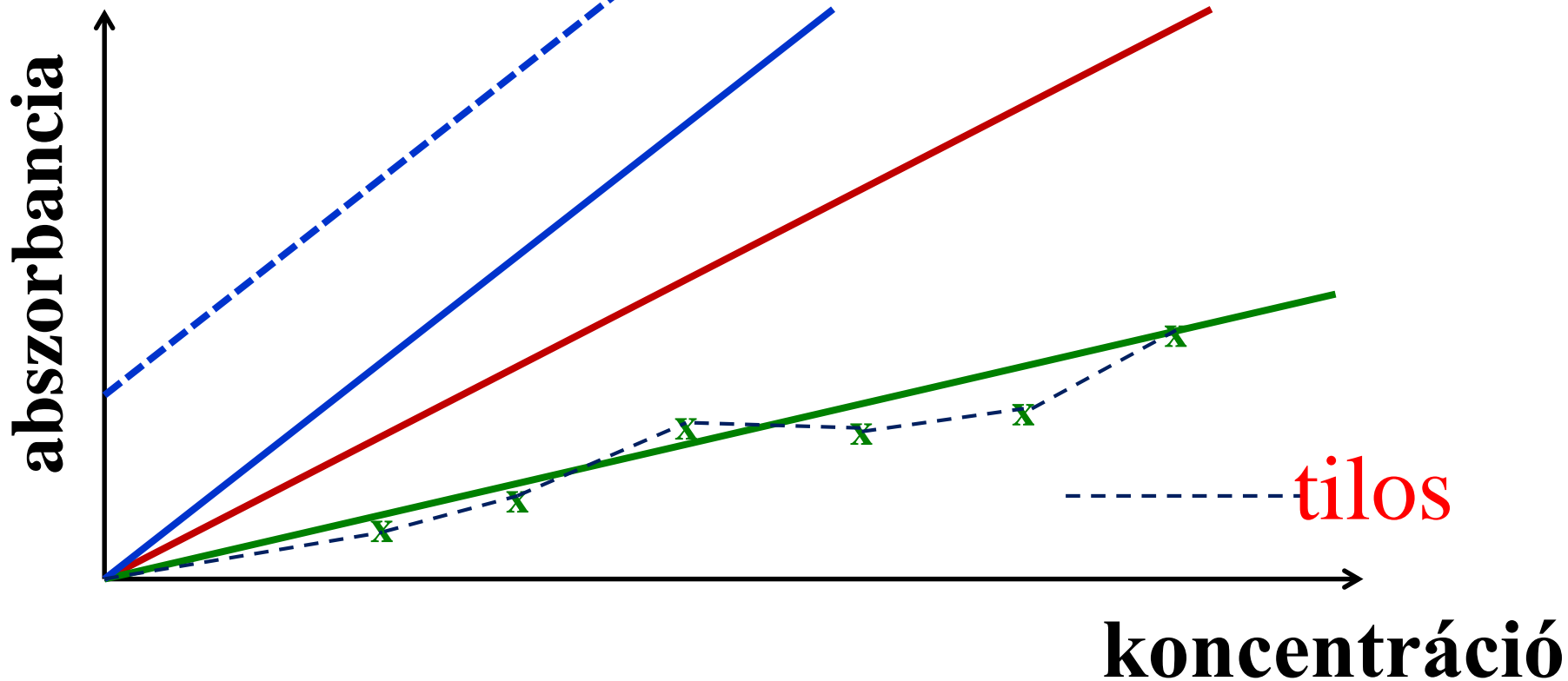
# A spektrofotometria főbb alkalmazásai a biokémiában és molekuláris biológiában

- Oldott anyag koncentrációjának meghatározása
- Oldott anyag elnyelési spektrumának meghatározása – anyagok azonosítása
- Oldott anyagok koncentrációjának időbeli változásának követése: kinetikai és egyensúlyi mérések

# A spektrofotometria főbb alkalmazásai a biokémiában és molekuláris biológiában

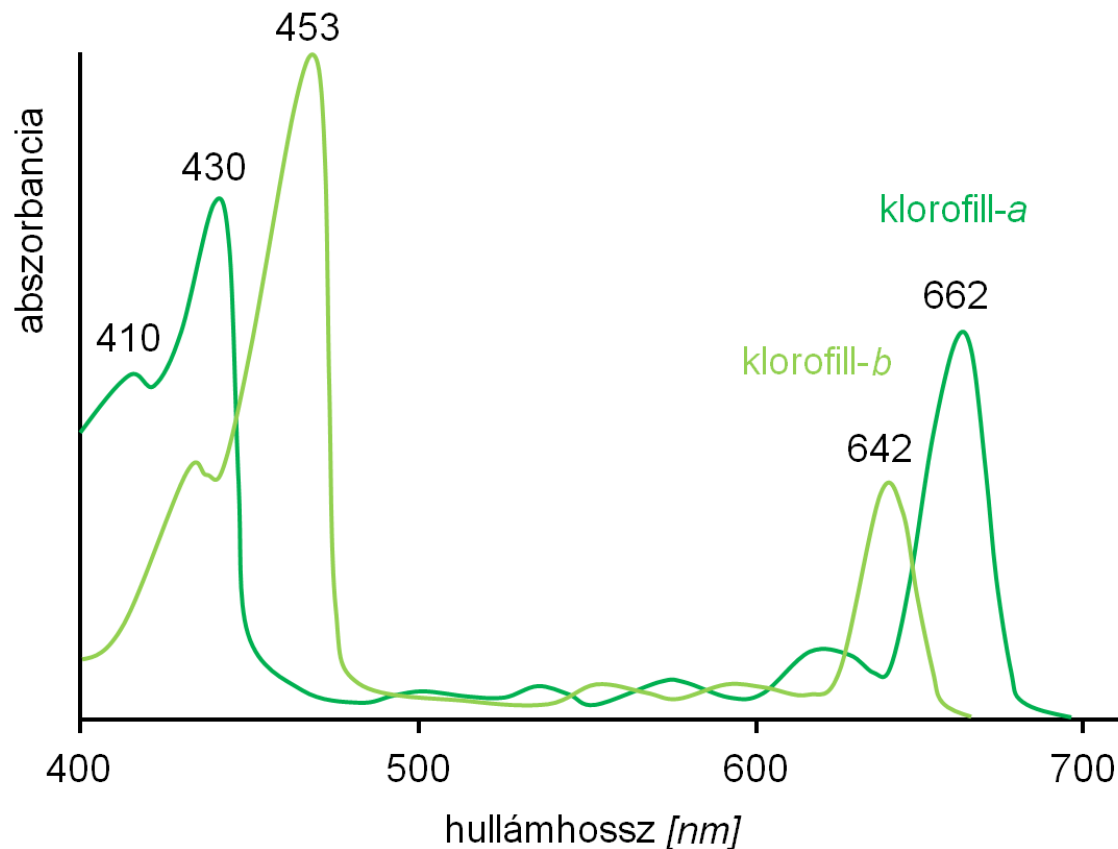
- Oldott anyag koncentrációjának meghatározása

- $A = \epsilon \cdot l \cdot C$



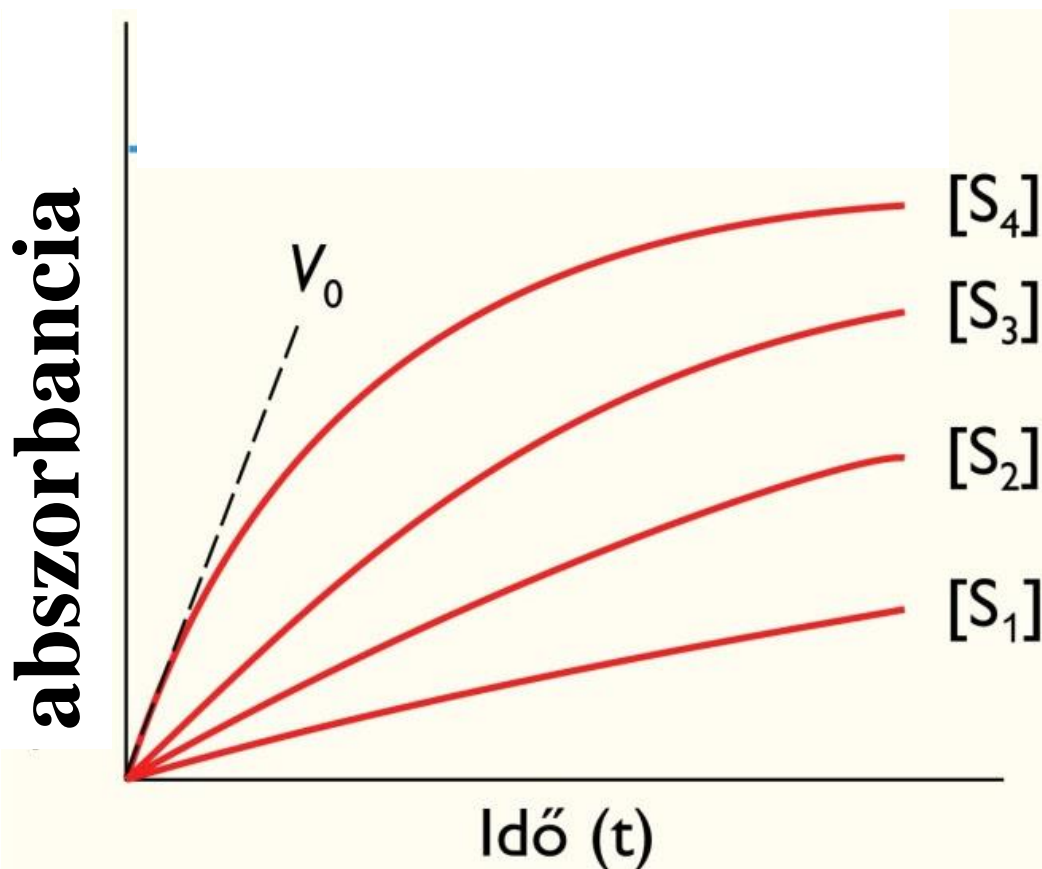
# A spektrofotometria főbb alkalmazásai a biokémiában és molekuláris biológiában

- Oldott anyag elnyelési spektrumának meghatározása – anyagok azonosítása



# A spektrofotometria főbb alkalmazásai a biokémiában és molekuláris biológiában

- Oldott anyagok koncentrációjának időbeli változásának követése: kinetikai mérések



# Mérési műtermékek lehetséges forrásai

- **Fényszórás:** a minta zavaros, a fény szóródik, és egy része nem jut a detektorba, tehát látszólag elnyelődik.
  - Megoldás: szűrés vagy centrifugálása
- **Buborék a küvettában:** az oldat melegítésével levegő válhat ki
  - Megoldás: légtelenített oldatok
- Ha egy molekula **asszociációra** képes, és az asszociált ill. disszociált formák fényelnyelése eltérő, akkor nem érvényesül a Lambert-Beer törvény, hiszen a disszociáció foka függ a koncentrációtól.
- A küvetta legyen **karcolásmentes és tiszta**. A küvetta fényútba eső oldalait nem szabad megfogni.