

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Fizika Doktori Iskola

Optikai spektroszkópiai módszerek továbbfejlesztése

Tézisfüzet

Makkai Géza

Témavezető:

Dr. Erostyák János

egyetemi docens



PÉCS, 2013.

Optikai spektroszkópai módszerek továbbfejlesztése

Bevezetés és célkitűzés

A fluoreszcencia spektroszkópia módszereit, eljárásait egyre szélesedő körben használják az orvosi, biokémiai és biofizikai kutatásokban. Az elterjedt módszerek nemcsak a tisztán kémiai, vagy fizikai méréseket segítik, határaik egyre jobban összeolvadnak. A tudományterületek együttese alkalmas arra, hogy minél érzékenyebb, hatásosabb módszerekkel lehessen kimutatni egyes elemeket egy keverékoldatban egy drogteszt esetén, vagy bizonyos folyamatok hatását egy biológiai minta esetén. Ezen spektroszkópai eljárások vitathatatlan előnyei közé tartozik rendkívüli érzékenységük és időbeli felbontóképességük.

Azonban a technika fejlődésével az elméletnek is fejlődést kell tartania, hiszen minél kisebb időtartományban mérünk, annál nagyobb az esélye a szisztematikus hiba fellépésének, illetve az érzékenység növelésével a mérés zaja is növekszik. Kellően nagy energiájú megvilágításnál egyéb nem várt hatások is felléphetnek, mint például a komplexképződés, mellékreakciók, vagy egyéb energiatranszferrel járó belső konverziók.

A modern eszközökkel a mérések során kapott, kellően nagy felbontású adathalmaz feldolgozásakor a legnagyobb hangsúly az alkalmazott algoritmusokon van. Minél pontosabb az alkalmazott simító, illesztő és kereső algoritmus, annál jobb az eljárás érzékenysége és reprodukálhatósága.

Kutatási tevékenységem fő célja az eddig ismert optikai spektroszkópai kiértékelő technikák tesztelése és összehasonlítása volt, valamint olyan új numerikus módszerek kifejlesztése, melyekkel tovább növelhető a kiértékelések megbízhatósága és pontossága. Munkám első

felében hasonló kvantumhatásfokú komponensekből álló keverékoldatokból történő kimutatás módszereit vizsgáltam és fejlesztettem tovább. A második részben számunkra ismeretlen biológiai és kémiai folyamatok eredményeként megjelenő tulajdonságok alapján történő szétválogatás lehetőségeivel foglalkoztam.

Kutatási eredmények

1. Derivatív mátrix izopotenciális szinkronfluorimetria és a legkisebb négyzeteken alapuló illesztés módszerei

Munkám során olyan technikákat kerestem, amelyek kellően jó felbontóképességgel rendelkeznek és kellően ellenállóak a mérési hibákkal szemben. Két, a témakörben elterjedten használt spektrális felbontásra alkalmas módszert hasonlítottam össze. Elsőként az egyre nagyobb népszerűségnek örvendő derivatív mátrix izopotenciális szinkronfluorimetriát (angolul Derivative Matrix Isopotential Synchronous Fluorescence, röviden DMISF) [1-5]. Ez egy derivatív módszert alkalmazó spektroszkópai módszer, amelynek segítségével az ismeretlen háttérkomponensek hatása kiküszöbölhető a mérés során. Másodszor egy régóta alkalmazott, klasszikusnak mondható módszert, a legkisebb négyzeteken alapuló illesztést (angolul Least Squares Fitting, röviden LSF) teszteltem [6-7]. Mindkét eljárásnak megvannak a maga előnyei és hátrányai. Előnyeik közé felbontásbeli érzékenységük, míg hátrányaik közé a felhasznált módszerek miatti zajfüggésük sorolható. Habár mindkét eljárás kiválóan alkalmas a háttérben megbújó komponensek kimutatására, a mögöttük lévő matematikai apparátus még nem került összehasonlításra spektroszkópai szempontból. Mint az köztudott a mért színekpek mindig tartalmaznak szisztematikus és véletlen zajokat, melyek megnehezítik ezen eljárások precíz összehasonlítását, ezért szükségesnek tartottam modell adatok előállítását, melyek az eredetit nagyon jól közelítő, de kontrollált zajjal rendelkező adathalmazok voltak.

T 1. A két módszer detektálási és zajtűrési határainak meghatározása mért és szimulált adatok felhasználásával

1.1, Programokat fejlesztettem ki a mért adatokkal jól egyező szimulált adatok előállításához és azok zajjal való ellátásához.

Az egyes módszerek teszteléséhez a valódi, általam mért színekpeken kívül szimulált, mesterséges spektrumokat állítottam elő. Segítségükkel kikerülhető a szisztematikus mérési hiba lehetősége, valamint a jel-zaj viszony a megfelelő algoritmusokkal pontosan beállítható. A spektrumok alakját lognormált formával közelítettem, hiszen számos irodalmi hivatkozás bizonyítja, hogy segítségükkel a szerves molekulák valódi, mért színekpe jól közelíthető [8-10]. Steady-state mérések során fotonszámláló módban a mért zajt legjobban a Poisson típusú eloszlással lehet közelíteni. Ezért ilyen típusú zajt adtam hozzá a lognormált alakot leíró szimulált mátrixokhoz. Az addendumot Poisson-eltérések visszautasításos módszerével generáltam.

1.2, Programot fejlesztettem ki a MISF spektrumok előállításához két és három komponensű keverékek esetén.

Programot fejlesztettem Origin C nyelven, amellyel megállapítottam a keresett komponens fluoreszcencia intenzitásának maximumát, majd meghatároztam az ezen intenzitásértékhez tartozó izopotenciális trajektóriát az interferáló háttérkomponens mátrixában. Egy adott intenzitásértékhez vagy konkrét gerjesztési és emissziós hullámhossz társítható, vagy az egyik értékét két adott egész mérési pont közé kell elhelyezni. Ezen számításhoz Lagrange, majd Bezier-interpoláció használatával kiszámítottam a pontos hullámhossz értékét. 3, 5 és 7 pontos Bezier interpolációval is futtatásokat végezve, az 5 pontos illesztésnél a hiba mértéke 1%-on belül maradt. Az így megtalált, nem ekvidisztans pontok sorozata alkotja azon izopotenciális útvonal pontjait, amelyeken mérve a keverék fluoreszcencia intenzitásait kaphatjuk meg annak MISF spektrumát. A program által inverz Bezier-interpolációval kigyűjtött MISF spektrumokat Savitzky-Golay algoritmus segítségével simítottam, majd előállítottam azok deriváltját.

1.3, Programcsomagot fejlesztettem ki az LSF módszer használatához két és három komponensű keverékek analizálásához.

A módszer használatához egy általam továbbfejlesztett programot futtattam MathCad® 14 környezetben. A program egy lineáris mátrixegyenletet old meg, melynek eredményéül a keresett komponens bemeneti mátrixához viszonyított szorzószámát kapjuk meg. Az algoritmus minél több adatpontot használ, annál pontosabb illesztést tesz lehetővé, azonban a kiugró értékek könnyen leronthatják hatékonyságát. Ezért a számolások során korlátozott területű kiértékelést használtam, elkerülve a mért minták mátrixainak Rayleigh- és Raman-szórás tartományait, hogy javítsam a kimutatás pontosságát. A program segítségével lehetőség nyílik keverékoldatok egyes komponenseinek mennyiségi meghatározására. A módszer alkalmazása során az illesztést követően különbségi mátrixot számoltam, amely az illesztett és az eredeti keverék különbségét adja. Ezt ábrázolva a pozitív és negatív különbségek kis értékű és véletlenszerű eloszlást mutatnak. Ettől eltérő esetben az illesztési modell nem jó. Vagy spektrális csúszás történt a mérések során (monokromátorok pontatlan beállítása), vagy az illesztés során további spektrális komponenseket kell alkalmazni.

1.4, Meghatároztam a DMISF és LSF módszer detektálási határait két és három komponensből álló keverékek esetén, valamint a két módszer zajtól való függését.

Megállapítható, hogy mind a derivatív technikával segített MISF, mind az LSF módszer egyaránt alkalmas erősen átfedő komponensek esetén azok szimultán kimutatására. A DMISF módszer jó érzékenységgel és szelektivitással rendelkezik, de magasabb mérési zajok esetén érzékenysége rohamosan csökken. Alacsony zajszint mellett, azonos kvantumhatásfokú és hasonló koncentrációban jelen lévő interferáló komponensek esetén alkalmas 1%-os keverékarányú komponens kimutatására. Meghatároztam a keresett komponens megtalálásának határait MISF módszer esetén:

- 0% relatív zaj mellett 1%-os keresett/háttér komponensarány
- 0.5% relatív zaj mellett 10%-os keresett/háttér komponensarány

- 2% relatív zaj mellett 50% keresett/háttér komponensarány

Gyakorlatilag zajmentes esetben a módszer alkalmas (különböző koncentrációban jelen lévő komponensek keveréke esetén) két nagyságrenddel kisebb komponens kimutatására.

Az LSF módszer zajérzékenysége jóval kisebb. 0,1%-os koncentrációarány esetén is képes a megfelelő szelekcióra. A keresett komponens megtalálásának határai:

- 0% relatív zaj mellett 0,1%-os keresett/háttér komponensarány
- 5% relatív zaj mellett 1%-os keresett/háttér komponensarány
- 10% relatív zaj mellett 10% keresett/háttér komponensarány

T 2. Derivatív Mátrix Izopotenciális Szinkronfluorimetria továbbfejlesztése

2.1, Továbbfejlesztettem a DMISF módszert. Szimulációkkal igazoltam a fejlesztés hatékonyságát két és háromkomponensű keverékek esetén.

Azt találtam, hogy elég két adatpont egy három komponensből álló keverék emissziós-gerjesztési mátrixából ahhoz, hogy meghatározhassuk a keresett komponens koncentrációját. A megfelelő izopotenciális útvonalak kiválasztásával lehetőségünk van a keresett komponens koncentrációjának meghatározására egy, vagy akár két ismeretlen koncentrációjú háttérkomponens mellett. Ehhez elegendő a megfelelő spektrális pontokban mért fluoreszcencia intenzitások különbségének előállítása: $[I(\lambda_{exc1}, \lambda_{emi1}) - I(\lambda_{exc2}, \lambda_{emi2})]$. Az új, QMISF (Quick Matrix Isopotential Synchronous Fluorescence) módszerrel méréseket végeztem két és három komponensből álló valódi és modell keverékek esetén is.

2.2, Meghatároztam az új módszer zajtól való érzékenységét.

A QMISF módszer alkalmas a többihez képest kevesebb, mint 1:200 intenzitásarányú fluorofór koncentrációjának kimutatására még viszonylag magasabb (a háttér komponens maximum intenzitásnak 1-2%-a) zaj megléte esetén is. Az új módszer jelentős, kb. két nagyságrenddel jobb kimutatási faktoral rendelkezik a klasszikus DMISF módszerhez képest. Eredményeként egy keverék oldat mérése során elég két spektrális pontot kiválasztani ahhoz, hogy mennyiségi elemzést

végezhessünk. Ez egy érzékeny, rendkívül gyors, szinte valós idejű kimutatást tesz lehetővé. A QMISF legfontosabb jellemzői:

- a háttér komponensek koncentrációja gyakorlatilag indifferens
- az érzékenység sokkal jobb a klasszikus DMISF-hez képest
- elég két pontban mérni

A méréseim során a QMISF módszerrel rövid időn belül a háttérhez viszonyítva relatíve nagy, 3-4 nagyságrendű koncentrációkülönbség mérhető, hasonló kvantumhatásfokú összetevők esetén. Ezen eredmények alapján nagyon gyors rutinmérések dolgozhatóak ki.

2. Normalizált relatív reflexiós- és ISSI spektrumok analízise

T 3. Fusarium Graminearum által feltöltött búzaszemek szennyezettségének megállapítása digitális spektroszkópai módszerekkel

3.1, Megvizsgáltam a búzaszemek fertőzöttségének fluoreszcencia spektroszkópai módszerekkel történő kimutatásának lehetséges módszereit.

Különböző mértékben fertőzött búzaszemek gerjesztési-emissziós mátrixát mértem. A fertőzés jelének tulajdonítható emissziós maximum spektrális pozíciója: $\lambda_{ger}=365$ nm és $\lambda_{em}=445$ nm. A spektrális alak és annak pozíciója kis mértékben a fertőzéssel együtt változik. Mindezek ellenére megállapítható, hogy fluoreszcenciás mérésekkel nem lehet megbízható kimutatási módszert alkotni a fertőzött szemek szelekciójára. A továbbiak során mért reflexiós spektrumok már szignifikánsabb összefüggést mutatnak a spektrumalak és a fertőzöttség mértéke között. A kimutatáshoz referencia spektrumok felvétele szükséges az adott búzafajta különböző mértékben fertőzött szemeinek csoportjairól. Ezen spektrumok felhasználásával jó közelítésű becslést lehet adni az újonnan mért minta fertőzöttségi szintjéről. Számolásaim alapján 2-5 százalék-pontos hibaszint érhető el.

3.2, Új módszert dolgoztam ki a búzaszemek fertőzöttségi szintjeinek gyors megállapításához.

Megállapítható, hogy a fertőzés mértéke inkább a rövidebb hullámhossz régiókban okoz látható változást. A reflexiós spektrum és alakja nagymértékben változhat az egyes szemek pozíciójának változásakor, így e spektrumok összehasonlításához szükséges egy normalizációs módszer bevezetése. Az így megalkotott Normalizált relatív reflexiós spektrumok esetén megállapítható, hogy az egészséges szemek reflexiója 25-30%-kal kevesebb a rövidebb hullámhossz tartományokban. Felhasználva ezen megállapításokat a fertőzöttség megállapításához egy háromszínű karakterizációs eljárást dolgoztam ki, amely a búzaszemekről felvett képek vörös, zöld és kék (RGB) koordinátáit felhasználó spektrális analízisen alapul. A színek jellemzésére az alábbi függvényt vezettem be:

$$ISSI(\lambda_1, \lambda_2) = \frac{I_{\lambda_1} - I_{\lambda_2}}{I_{\lambda_1} + I_{\lambda_2}}$$

A fenti egyenlet esetén λ_1 és λ_2 az egyenként 8 bites R, G vagy B intenzitások egyikét kapják értékül. Ezen fertőzöttségtől függő spektrális (Infection Sensitive Spectral Index, röviden ISSI) függvények segítségével új spektrális paramétereket társíthatunk a felvett képek minden egyes képpontjához. Használva az ISSI(RG), ISSI(RB) és ISSI(GB) függvényeket minden egyes pixelen, hisztogramokat állíthatunk elő, melyek két fontos paraméterrel szolgálnak: a maximum helyét megadó X_{\max} és a félértékszélességet megadó FWHM paramétereket. Az ISSI képek előállításához és az RGB értékek kinyeréséhez programcsomagot fejlesztettem ki.

3.3, Meghatároztam az ISSI módszer vizsgálathoz szükséges paramétereit.

A búzaszemek digitális fényképeinek ISSI analízise egy megbízható és gyors módszer azok szennyezettségének megállapításához. Legjobban az ISSI(RG) képekhez tartozó paraméterek jelzik a fertőzés mértékét. Ez minél magasabb, annál alacsonyabb az X_{\max} és FWHM értéke. A legnagyobb különbség természetesen a teljesen egészséges és teljesen fertőzött szemek között található, viszont a fertőzöttség emelkedésével az X_{\max} értéke kevésbé kifejező paraméter. Megállapítható, hogy e módszer az egészségbiológiai szempontból fontos egészséges és fertőzött szemek szeparációjára jól

használható. Ehhez mindösszesen egy gyors digitális kamerára van szükség, majd a kapott kép ISSI(RG) hisztogramjának előállítására és annak X_{\max} paraméterének meghatározására. Ezen paraméterek felhasználásával becslést adtam a fertőzött búzaszemek infekciósintjére. Megállapítottam, hogy a fertőzés szintjének kvantitatív megállapítására nem, viszont elsődleges céljára, az egészséges szemektől való elválasztására alkalmas az új módszer.

Publikációk

A témában megjelent publikációk:

1. **G. Makkai**, A. Buzády, J. Erostyák:
Sensitivity Test of Derivative Matrix Isopotential Synchronous Fluorimetry and Least Squares Fitting Methods
J. Fluor. 20 (1) January (2010) 87-94.
2. **G. Makkai**, J. Erostyák: *Quick Multicomponent Analysis Based on Matrix Isopotential Synchronous Fluorimetry*
ISRN Spectroscopy (2012)
<http://www.hindawi.com/isrn/spectroscopy/aip/917879/>

Előkészületben:

1. **G. Makkai**, Á. Mesterházy, J. Erostyák:
Spectroscopy Study of Fusarium graminearum infection of wheat seeds by image histograms
Optical Engineering (Under Review)

Poszterek:

1. **G. Makkai**, Á. Mesterházy, J. Erostyák: *Spectroscopy Study of Fusarium graminearum infection of wheat seeds by image histograms*; XV International Symposium on Luminescence Spectrometry (ISLS 2012), June 19-22, (2012), Barcelona; Spain PP43.

2. **G. Makkai**, A. Buzády, J. Erostyák: *Improved sensitivity of matrix isopotential synchronous fluorimetry*; XIV International Symposium on Luminescence Spectrometry (ISLS 2010), July 13-16, (2010), Prague; Czech Republic P082.
3. **G. Makkai**, A. Buzády, J. Erostyák: *Fluorescence Spectroscopy Study of Fusarium graminearum infection of wheat seeds*; 11th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence (MAF11), September 6-9, (2009), Budapest; Hungary PO 172.
4. **G. Makkai**, A. Buzády, J. Erostyák: *Matrix Isopotential Synchronous Fluorometry vs. Least Square Fitting. Comparative study of mixture analyzing methods*; XIII International Symposium on Luminescence Spectrometry (ISLS 2008), September 7-11, (2008), Bologna; Italy PO123.
5. **G. Makkai**, A. Buzády, J. Erostyák: *Sensitivity Limits of Matrix Isopotential Synchronous Fluorimetry*; 9th Symposium on Instrumental Analysis (9th SIA), June 29-July 2, (2008), Pécs; Hungary P-41.

Témán kívüli publikációk:

1. J. Erostyák, **G. Makkai**, A. Buzády, P. Molnár, S. V. Kukhlevsky: *Relation between fluorescence decays and temporal evolution of excited states* J. Fluor. 16 (3) May (2006) 301-307.

Hivatkozások:

1. Yao-Qun L, Wei S, Chun W, Li-Jun Y: *Derivative Matrix Isopotential Synchronous Fluorescence Spectroscopy for the Direct Determination of 1-Hydroxypyrene as a Urinary Biomarker of Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Anal. Sci. 17:167-170 (2001)
2. Pulgarin JAM, Molina AA, López PF: *Simultaneous Direct Determination of Amiloride and Triamterene in Urine Using Isopotential Fluorimetry*. Anal. Biochem 292:59-68 (2001)
3. Pulgarin JAM, Molina AA: *Matrix isopotential synchronous fluorescence Direct determination of gentisic acid in urine*. Anal. Chim. Acta 296:87-97 (1994)
4. Pulgarin JAM, Molina AA, López PF: *Direct determination of closely overlapping drug mixtures of diflunisal and salicylic acid in serum by means of derivative matrix isopotential synchronous fluorescence spectrometry*. Anal. Chim. Acta 583:55-62 (2007)
5. Dan-Li L, Li-Fang H, Yao-Qun L: *Rapid and Simultaneous Determination of Coproporphyrin and Protoporphyrin in Feces by Derivative Matrix Isopotential Synchronous Fluorescence Spectrometry*. Clinical Chemistry 50:1797-1803 (2004)

6. Maeder M, Zuberbuhler AD: Nonlinear Least-Squares Fitting of Multivariate Absorption Data. *Anal. Chem.* 62:2220-2224 (1990)
7. Mood AM, Graybill FA: *Introduction to the Theory of Statistics*, second ed, (McGraw-Hill, New York 1963)
8. Siano DB, Metzler DE: Band shapes of the electronic spectra of complex molecules. *J Chem. Phys.* 51:1856–1861 (1969)
9. Burstein EA, Emelyanenko V: Log-normal description of fluorescence spectra of organic fluorophores. *Photochem Photobiol* 64(2):316–320 (1996)
10. Balakrishnan N, Chen WWS: *Handbook of tables for order statistics from lognormal distributions with applications*. Kluwer Amsterdam, Netherlands (1999)

