

IŖIĖIN YAYILMASI (EMİSYONU) VE SAÇILMASINA DAYALI ANALİZ TEKNİKLERİ

Dr. Öğr. Üyesi Akar Karakoç

IŞIĞIN YAYILMASINA (EMİSYONUNA) DAYALI ANALİZ TEKNİKLERİ

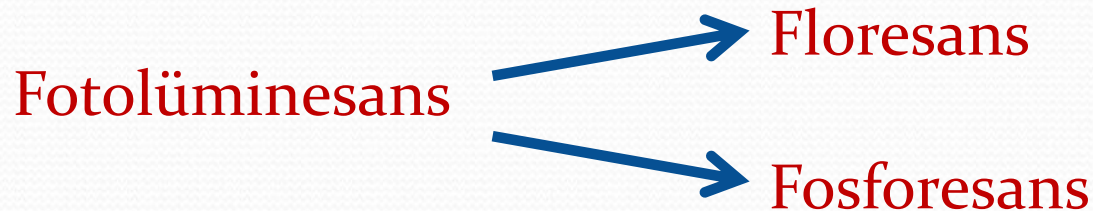
- Bir atomun temel enerji seviyesindeki (kararlı bir haldeki) bir elektronunun enerji alarak bir üst enerji seviyesine çıkarılmasına **uyarılma(eksitasyon)** denir.
- Uyarılan atom veya moleküller, kararsız olup tekrar kararlı hal olan temel enerji düzeyine dönmek ister ve kararlı hale dönerken ortama bir ışın yayar.
- Uyarılmış bir atomun yüksek enerji düzeyinden temel enerji düzeyine dönerken ortama ışın yayması olayına **ışığın emisyonu** veya **lüminesans (ışılma)** denir.

- Uyarma işleminde uyarılan elektrona enerji aktarımı söz konusudur. Uyarma kaynağına göre lüminesans farklı adlar alır:

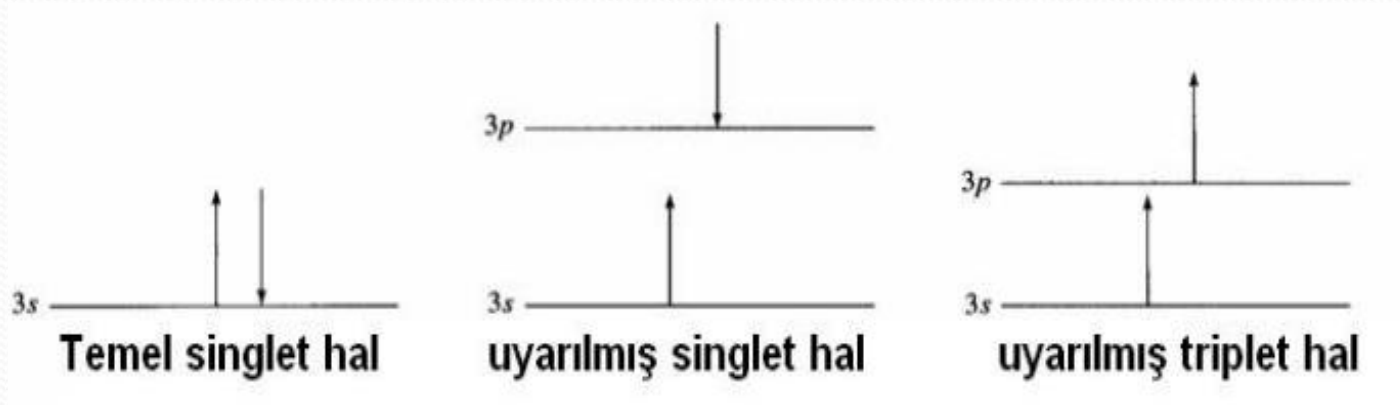
Lüminesans	Uyarıcı kaynak
Fotolüminesans	Elektromanyetik dalga (foton, ışın)
Kemilüminesans	Kimyasal reaksiyon
Elektrokemilüminesans	Elektrokimyasal reaksiyon
Termolüminesans	Isı

Fotolüminesans

- Fotolüminesans, foton(ışık) etkisiyle uyarılan elektronun kararlı duruma (temel hale) geçmesi sırasında oluşan ışımadır (emisyonundur).
- Fotolüminesans ikiye ayrılır:



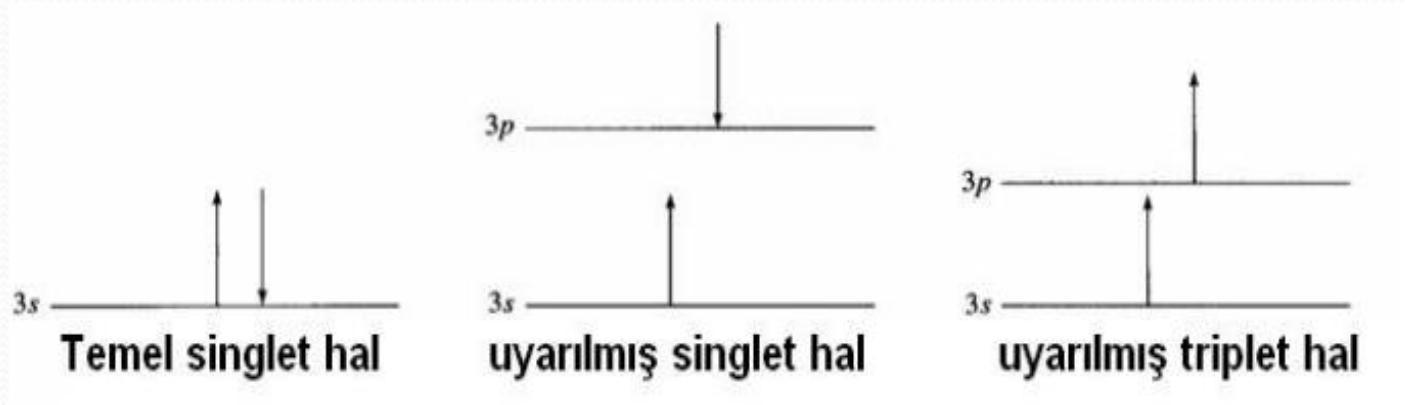
- Temel halde bütün elektron spinlerinin eşleşmiş (zıt yönlü) olduğu hal **temel singlet hal** olarak tanımlanır.
- Bir molekülün bir çift elektronundan biri daha yüksek enerji seviyesine uyarılırsa ya bir singlet ya da bir triplet hal meydana gelir:
 - **Uyarılmış singlet** halde uyarılmış elektronun spini hala temel haldeki elektronla eşleşmiş durumdadır (zıt yönlüdür).
 - **Triplet** halde ise iki elektronun (temel halde ve uyarılmış olan elektronların) spinleri eşleşmemiş haldedir (aynı yönlüdür).



- Uyarılmış bir singlet sistemden temel singlet sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa (ışımaya veya emisyona) **floresans**,
- Uyarılmış bir triplet sistemden temel singlet sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa ise **fosforesans** denir.

Floresans ve fosforesans farkları

1. Floresans olayında kararlı durumda bulunan bir elektron üst enerji seviyesine geçişi sırasında spininde bir değişiklik olmaz buna rağmen fosforesans olayında elektronun spininde değişiklik olur.
2. Floresans hemen yok olan ($<10^{-5}$) bir lüminesans olup, kısa ömürlüdür. Buna karşılık fosforesans emisyonları birkaç saniye veya daha uzun ışımanın sürmesine sebep olur.



Kemilüminesans

Kemilüminesans oluşturan kimyasal reaksiyonların sayısı oldukça azdır ve bu yüzden işlem bağıl olarak az sayıdaki bileşiklerde gözlenir. Bu nedenle, yüksek seçicilik, basitlik ve yöntemin aşırı duyarlılığı onun kullanımının son yıllarda artmasına yol açmıştır.

Kemilüminesans kimyasal reaksiyon sonucu açığa çıkan ışımadır.

Kemilüminesans Çalışma Prensipleri

Bir kimyasal reaksiyon, kararlı hale gelirken **kemilüminesans** meydana gelir. Örneğin bir A ve B molekülü reaksiyona girip kararlı olmayan bir molekül olan C* ve D gibi başka bir molekül açığa çıkmış olsun;



Kararlı hale dönmeye çalışan C* ortama bir ışın yayarak kararlı hale dönüşür;



Işık, üründen yayılır.

Kemilüminesans reaksiyonlarına çok sayıda biyolojik sistemde rastlanır ve bu olaya genellikle biyolüminesans adı verilir. Biyolüminesans özellikle; ateşböceği, deniz menekşesi ve bazı deniz anası bakteriler, tek hücreli hayvanlar ve kabuklu hayvanlarda gözlenir. Çeşitli doğal biyolüminesans olaylarının kimyası tam olarak anlaşılamamıştır.

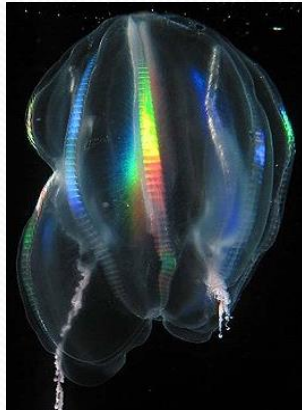
Biyolüminesans

Biyolüminesans canlı organizmalarda gözlenen kemilüminesans etkisidir.

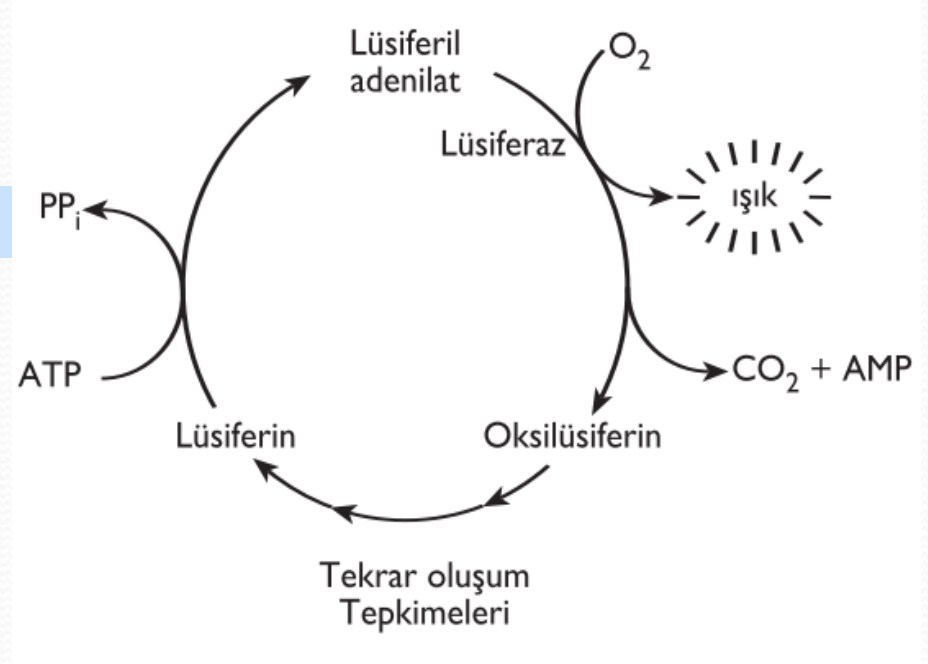
Amaç: Çekicilik, iletişim, kamuflaj, uzaklaştırma



Ateş böceği



Deniz anası



Ateş böceğinin biyolojik ışıma döngüsü

Ateş böceği

Işımanın olması için lusiferin molekülünün aktifleşmesi gerekir. Bu tepkimede ATP eşliğinde enzimatik tepkimeyle lusiferil adenilat oluşur. Bu molekülde O₂ ve lusiferaz varlığında, oksidatif dekarboksilasyonla oksilusiferine dönüşür. Bu esnada ortama ışık yayılır.



Basınçla aktiveşen
mavi ışıltılar milyonlarca "**Dinoflagellate**" adı
verilen tek hücreli su fitoplanktonlarına ait



Aequorea Victoria türü olan
denizaneleri, karanlıkta ışık saçan
bir savunma özelliğine
sahiptir. Osamu Shimomura isimli
Japon bilim adamı Green fluorescent
proteini keşfederek 2008 yılında
Nobel Kimya ödülünü almıştır.



Genellikle yanlış olarak bilindiği gibi "**Yakamoz**" ay ışığının suya, denize vuran yansıması değildir.

Yakamoz biyolojik olarak ışırma (biyolüminesans) yapan canlının adıdır.

- *Kemilüminesans ve biyolüminesansın saptama sınırı **attomol**(10^{-18}), **zeptomol**(10^{-21}) olması nedeniyle immunölçümler ve nükleik asit ölçümünde kullanılmaktadır.*

Elektrokemilüminesans

- Elektrokemilüminesans, elektrot yüzeyinde meydana gelen kemilüminesansdır.
- En düşük saptama sınırı 200 femto (10^{-15}) mol/L dir.

Elektrokemilüminesans

- Nükleik asit yöntemlerinde
- Homojen immün ölçümlerde kullanılır.

- Floresans yayan bir atom veya moleküle **florofo** denir.
- Bir floroforun floresans şiddeti, *floroforun konsantrasyonu, ışık yolunun uzunluğuna ve ışık kaynağının şiddetine* bağlıdır($F = \phi [I_0 (2.3 \text{ abc})]$).
- Bu nedenle daha şiddetli ışık kaynakları kullanılarak, **floresans** ölçümleri **absorbans** ölçümlerine göre 100-1000 kez daha duyarlı hale getirilir.

$\Phi \rightarrow$ kuantum verimi

$\Phi = (\text{lüminesans yapan molekül sayısı}) / (\text{toplam uyarılmış molekül sayısı})$

Floresans yayan (florofor) ve yaymayan maddeler

Madde	Çözücü	Φ
9-Amino akridin	Etanol	0,99
Antrasen	Hekzan	0,33
9,10-Dikloroantrasen	Hekzan	0,54
Floren	Etanol	0,54
Floresein	0,1 N NaOH	0,92
Naftalen	Hekzan	0,10
1-Dimetilaminonaftalen-4-sulfonat	Su	0,48
Fenol	Su	0,22
Rodamin B	Etanol	0,97
Sodyum salisilat	Su	0,28
Sodyum sulfonilat	Su	0,07
Uranil asetat	Su	0,04

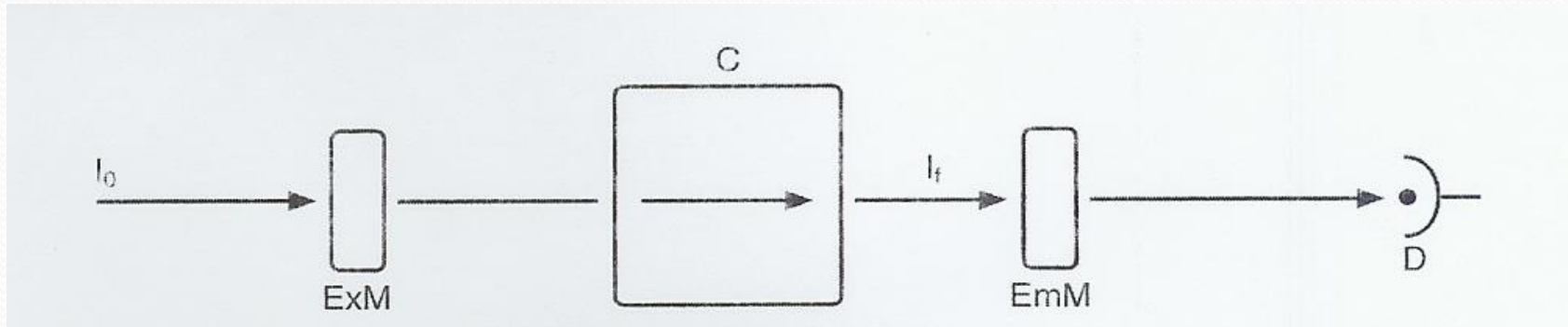
- Floresans metotlarla; steroidler, lipidler, proteinler, amino asitler, enzimler, ilaçlar, vitaminler, klorofiller, doğal ve sentetik pigmentler ve birçok başka maddelerin analizleri yapılabilmektedir.
- Metal iyonlarının analizi, bunların oluşturdukları bazı floresan kompleksleri yardımıyla yapılabilir.
- Bazı floresans özelliği olmayan maddelerin florometrik tayini, bunların bir florofor ile tepkimeye sokulup yeni bir floresan ürün veya işaretlenmiş ürün oluşturulması ile yapılır

Floresans Ölçümünde Kullanılan Cihazlar

***Florometre**

***Spektrofluorometre**

Spektrofluorometrenin Temel Bileşenleri



- I_0 : Uyarma kaynağı
ExM : Uyarma(eksitasyon)monokromatörü
c : Örnek hücresi
EmM : Emisyon monokromatörü
D : Dedektör

Uyarma kaynağı

- Ksenon lambalar
- Kuartz-halojen lambalar
- Civa lambalar
- Lazerler
 - Argon iyon lazeri (öz. Akış sitometrisinde)
 - He-Ne, He-Cd lazerleri (tercih edilir)

Eksitasyon ve emisyon monokromatörü

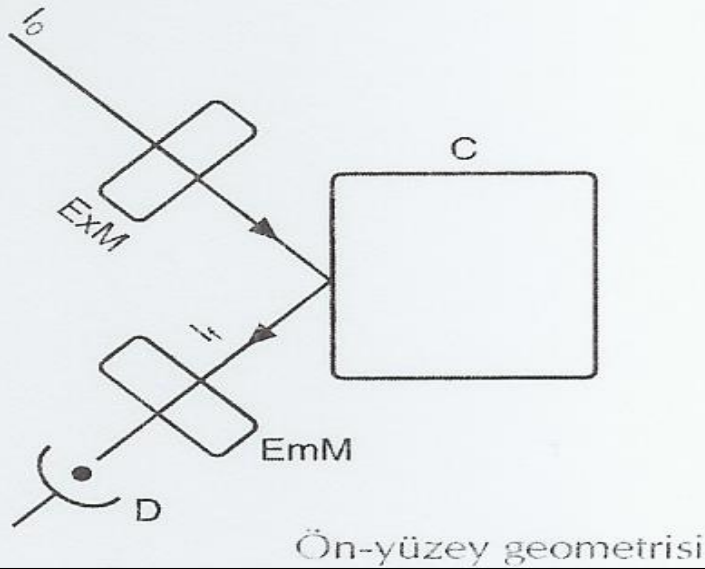
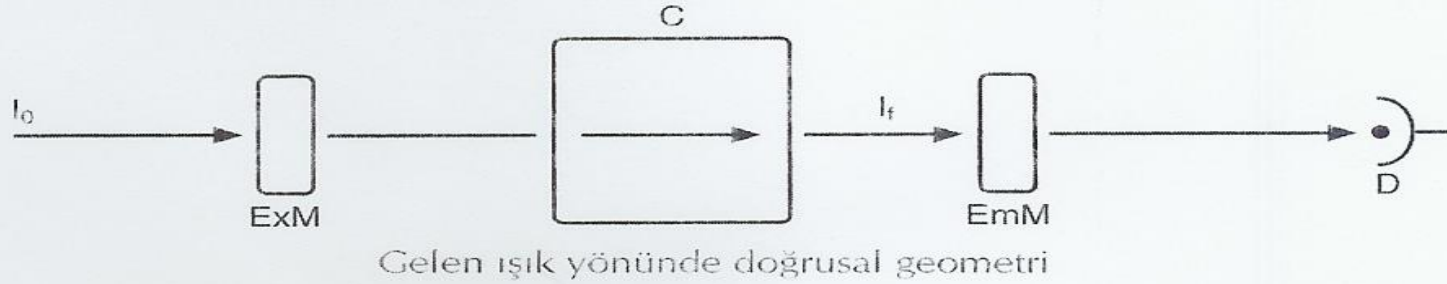
Spektrumun *dar bir bölümünü izole* etmek için kullanılır.

- girişim/interferans filtreleri
- renkli cam filtreleri
- ızgaralı/kafesli monokromatörler
- prizmatik monokromatörler

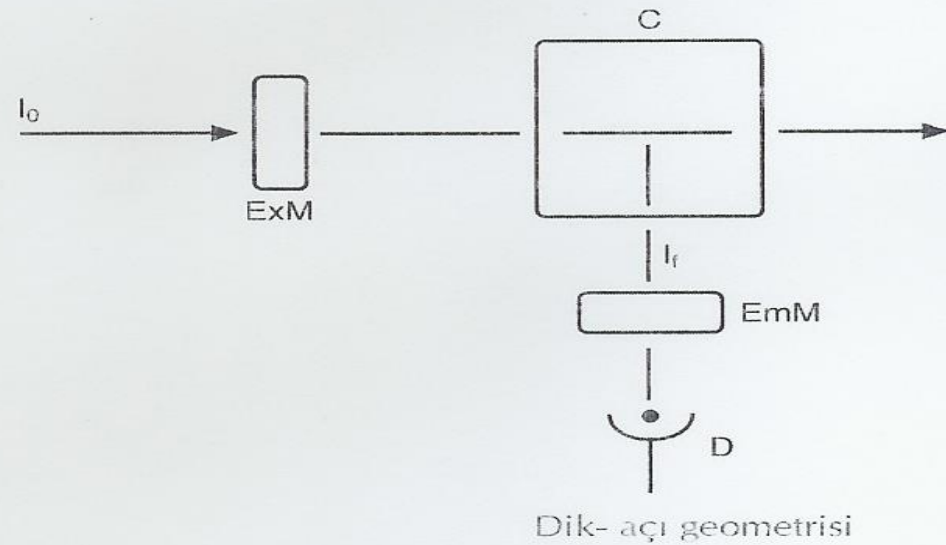
Modern analitik cihazlarda:

İnterferans filtreleri tek filtre paketi oluşturmak için uygun keskin ayırimlı *cam filtre* ile birleştirilmiştir.

Örnek hücresi; Uyarma kaynağına ve detektöre bağlı olarak:



Heterojen katı faz floresans immün ölçüm sistemi



Ticari tercih edilir.

- **Örnek hücresi küvetide** silica (cam), kuvars tercih edilir. Plastik istenmez çünkü istenmeyen arkaplan (background) sinyallerini artırır.

Dedektör

- En çok kullanılan detektör: *Foton çoğaltıcı (photomultiplier-PM) tüptür.*

Floresans Ölçümünde Kullanılan Cihazlar:

Spektrofluorometre

- Oran referans spektrofluorometresi
- Eş zamanlı tarayıcıli spektrofluorometreler

Fluorometre

- **Manuel fluorometreler**
 - Basit tek-ışın fluorometresi
 - Oran-referans fluorometresi
- **Zaman ve faz ayırıcı fluorometreler**
- **Özel uygulamalarda kullanılan fluorometreler**
 - Hematofluorometre
 - Lazer indüklü fluorometreler
- **Floresans Mikroskobu**
- **Konfokal floresans mikroskobu**
- **Floresans kan gazı analizörleri**

Oran Referans Spektroflorometresi

- *Sabit uyarım ve dalga boylarında* bir bileşiğin uyarım ve yayım spektrumunu ölçmede kullanılır.

Avantajları:

- Analiz boyunca cihazın kalibrasyon sıklığını azaltır.
- Dalga boyuna bağlı enerji dalgalanmalarını azaltarak, düzeltilmiş uyarım spektrumunu sağlar.

Eş zamanlı tarayıcılı spektrofloremler

- *Uyarım ve yayım monokromatörlerinin her ikisinde eş zamanlı tarar.
- *Özellikle adli kimyada *ilaçlar ve metabolitleri gibi florofofor karışımlarının* ölçülmesinde kullanılır

Manuel florometreler

Basit tek-ışın florometresi

- Önce örnek körü ile sıfır ayarı, sonra kalibrasyon çözeltisi ile kalibrasyon ayarı yapılır ve bilinmeyen çözeltiler okunur.
- Yüksek konsantrasyonların ölçümünü gerçekleştirir.

Oran-referans florometresi

- Spektroflorometreden farkı *kesikli uyarma ve yayılma* dalga boyları bulunur.
- Belirli uyarma ve yayım dalga boylarında konsantrasyon ölçümleri için en çok yararlanılan cihazdır.

Zaman ve Faz ayırıcı florometreler

Zaman ayırıcı florometreler

- Uzun ömürlü veya eser metal iyonları şeklindeki floroforlarla *nükleik asitler homojen* olarak saptanabilir.
- Saptama sınırı yaklaşık 10^{-13} mol/L'dir

Faz ayırıcı florometreler:

- Flaş lamba veya lazer kaynaklarla oluşan floresans yanıtın sıklığı ve floresans bozunma süresi saptanmaktadır.
- Özellikle *homojen floroimmün* ölçümlerinde kullanılır.

Özel uygulamalarda kullanılan florometreler

Hematoflorometre

- Tek kanatlı ön yüzey fotolorometresidir.
- Tam kan **protoporfirin Zn** düzeyini ölçer.

Lazer indüklü florometreler

- Uyarma enerjisi argon iyon lazeri kullanır.
- **Ayırıcı çoğaltıcı** ile arka zemin girişimini azaltmak için sinyal sayısı ayarlanır.
- Akış yolundaki küçük moleküllerin saptanması tekniği:
 - akış sitometrisi
 - akış injeksiyon analizi
 - yüksek performanslı sıvı kromatografisi
 - kapiller zon elektroforezinde kullanılır.

Akış sitometresi

- *Lazer indüklü florometre* ile tanecik *ışık saçılımı* analizinin kombinasyonudur. Genelde tek argon iyon lazeri kullanılır
- Floresans işaretleyiciler kullanılarak moleküller, hücreler ve tanecikler; floresans, ışık saçılım özelliklerine göre büyüklük, biçim ve tiplerine göre sınıflandırılabilir.

Akış sitometreleriyle ölçülebilen parametreler:

- Hücre büyüklüğü, granül derecesi
- DNA, RNA içeriği, DNA nükleotid oranları, kromatin yapısı
- Antijenler,
- Total protein içeriği,
- Hücre reseptörleri, membran potansiyeli
- pH'a bağlı Ca iyon konsantrasyonu

Floresans Mikroskopu

- Hücresel bileşenler ve özellikleri görülerek incelenir.
- **Antinükleer antikor** (ANA) ve **idrar mikrobisi** incelenmelerinde kullanılır.
- Yüksek özgüllüğe sahip floresans işaretli monoklonal antikorlar varlığında **viral izolatlarının ayırımı** sağlar.
- HIV antikorlarının **immunfloresans** yöntemi ile doğrulanmasında yararlıdır.
- Hücreler genetikteki **Floresans İn situ Hibridizasyon (FISH)** tekniğinde kullanılır.

Konfokal floresans mikroskobu

- Bu mikroskopta dar slitler veya iğne delikler kullanılarak nokta kaynak ve nokta dedektör sağlanmaktadır. Bu şekilde daha keskin görüntüler elde edilir.
- Floresans işaretli örneklerin üç boyutlu ve yüksek çözünürlüklü görüntüsünü sağlar.
- Canlı hücrelerde *redoks potansiyeli* ölçülür ve *optik endoskoplarda* kullanılabilir.

Floresans kan gazı analizörleri

- Arteryal kan pH , P_{O_2} ve P_{CO_2} ölçümünde kullanılır.
- Arterden küçük miktarda alınan kan örneğinin sensör kısmına enjekte edilmesi ve hastaya tekrar geri dönmesi şeklinde yapılır.

Floresans Ölçümlerini Kısıtlayan Faktörler

- Konsantrasyon
- Arka plan etkileri
- Çözgen ve küvet etkileri
- Örnek etkileri
- Sıcaklık etkileri
- Örneğin fotodekompozisyonu

Konsantrasyon

İç filtre etkisi

- Floroforun uyarı ışığını soğururken (tutarken), küvet yolu boyunca *uyarı şiddetinin azalmasıdır*.
- Seyreltik çözeltilerin kullanılması veya ön yüzey floresans cihazları bu etkiyi azaltır.

Konsantrasyon azaltılması (quenching)

- Bir makromolekül florofor ile kuvvetli biçimde işaretlendiğinde *ışımatsız enerji transferi* gerçekleşir.
- Bundan dolayı sonuç beklenenden daha düşük ölçülür.

Arka plan etkileri

1. Rayleigh saçılımı
2. Raman saçılımı

- Her ikiside floresans ölçümlerini kısıtlar.
- İyi tanımlanmış yayma ve uyarma interferans filtreleri veya uygun monokromatör yerleştirilmesi ve polarize ediciler kullanılarak rayleigh saçılımı kontrol edilir.
- Raman saçılımı ise slit genişliği azaltılarak kontrol edilir.

Çözücü ve küvet etkileri

- *Çözücü konsantrasyonu azaldıkça* floroforun çözücü içindeki çözünmüş maddelerle etkileşimi artar. *Floresans kaybıyla* sonuçlanır.
- Ticari olarak arka plan etkisini azaltan hazır çözücüler kullanılabilir.
- Ticari olarak arka plan etkisini azaltan özel küvetler de kullanılabilir.

Örnek Matriks (çevre, ortam) Etkileri

- Serum yada idrar örneği floresans ışıma yapan birçok bileşik (*öz. proteinler, billuribinler 260-290 nm de*) içermektedir.
- Lipemik örneklerde istenmeyen ışık saçılımları olur.

Sıcaklık Etkileri

- Reaksiyon sıcaklığı $\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ düzenlenmelidir.
- Genel olarak floresans şiddeti her $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ artışında $\sim\%1-5$ oranında azalır.
- Örnek ve çözeltiler buzdolabında ise *oda ısısına* geldikten sonra çalışılmalıdır.

Örneğin Fotodekompozisyonu

- Zayıf floresans veren seyreltik çözeltiler kuvvetli ışık kaynaklarıyla uyarıldığında **fotokimyasal bozulmaya** neden olur (fotodekompozisyon).
- Fotodekompozisyonu azaltmak için:
 - Olabilecek **en uzun dalga boyu ile** uyarılır.
 - Uyarım **süresi kısaltılır**.
 - Kararsız çözeltiler **koyu renk şişelerde** saklanır.
 - **Çözünmüş oksijen** çözeltiden uzaklaştırılır.