

IŞIĞIN SAÇILMASINA DAYALI ANALİZ TEKNİKLERİ

Işık Saçılım Teknikleri

- Işık saçılımı, ışığın çözelti içindeki taneciklerle etkileşimi sonucu oluşan *fiziksel bir olaydır.*
- Saçılan ışık, gelen ışık ile *aynı frekanstadır.*
- *Saçılan ışığı ölçme yöntemleri:*
 1. Türbidimetri
 2. Nefelometri
- Bu yöntemler en iyi özgün proteinlerin ve haptenlerin **immünölçüm** yöntemlerinde uygulanır.

Işık saçılımı ile ilgili temel kavramlar

- Tanecik büyüklüğü (küçük taneciklerden saçılan ışık dalgaları aynı fazdadır ve birbirini destekler. Tanecik boyutu $< \lambda/10$)
- Dalga boyuna bağımlılık (saçılan ışığın şiddeti dalga boyuna bağlıdır)
- Gözlem (dedektör) uzaklığı (Dedektör analitik küvete yakın yerleştirildiği zaman daha büyük sinyal elde edilir)
- Gelen ışığın polarizasyonu (arka-plan sinyali azaltır.)
- Taneciklerin konsantrasyonu

$$I_s/I_o = [4\pi^2 (dn/dc)^2 M C \sin^2 \theta] / (N_a \lambda^4 r^2)$$

I_s : saçılan ışık şiddeti

- Taneciklerin moleküler ağırlığı

Türbidimetri

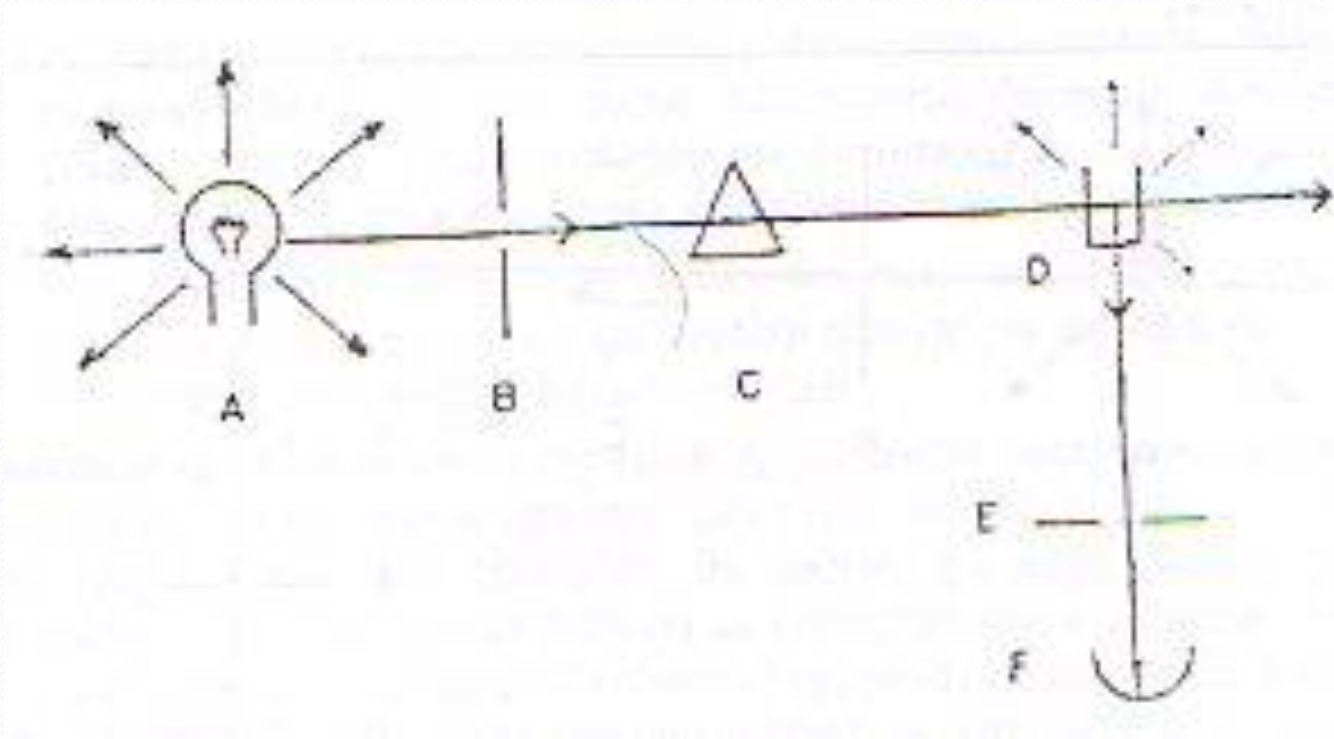
- Türbidimetride, çözeltiye gelen ışık şiddetinde çözeltideki partiküllerin neden olduğu saçılmadan dolayı ortaya çıkan ışık kaybı ölçülür. Bunun için, absorpsiyonun olmadığı dalga boyundaki ışık kullanılır.
- ❖ *Bulanıklık (türbidite)* gelen ışık şiddetinin çözeltiden geçerken düşmesine neden olur.
- ❖ Bu düşüş türbidimetri ile ölçülür.

Türbidimetrik ölçümler

- ❖ Fotometre ve spektrofotometrelerde
- ❖ Otomatize klinik kimya analizörlerde yapılır.

Nefelometri

- ❖ *Geçen ışık ile aynı yönde olmayan*, dedektöre yönlendirilen saçılan veya yansıyan ışık enerjisinin ölçülmesidir.
- ❖ Genelde gelen ışığa dik(90°) saçılan ışık ölçülür.



türbidimetre

nefelometre

- ❖ Özellikle *düşük konsantrasyondaki antijen-antikor reaksiyonlarının* ölçümünde kullanılır.
- ❖ İdeal nefelometrik cihaz, başıboş ışıktan arınmış olmalı; dedektörün önündeki çözeltide hiç tanecik bulunmadığı zaman, ne ışık saçılımı ne de başka sinyal alınmamalıdır.
- ❖ Nefelometrelerde PM detektörü uyarıcı ışık demeti ile uygun açı yapacak şekilde yerleştirilir.
- ❖ *Nefelometrenin florometreden farkı*, uyarma ve saptama dalga boylarının aynı değere ayarlanmış olmasıdır.

Türbidimetre ve Nefelometre Bileşenleri:

1. Işık kaynağı
2. Uyarım optikleri
3. Örnek hücresi
4. Işık saçıcı optik
5. Detektör filtresi
6. Detektör

- Işıık kaynakları olarak; kuartz-halojen lambaları, ksenon lambaları ve lazerler kullanılır.
- Lazer ışını, yüksek şiddeti nedeniyle bazı nefelometrelerde tercih edilir.

Işık Saçılım Ölçümlerini Kısıtlayan Faktörler

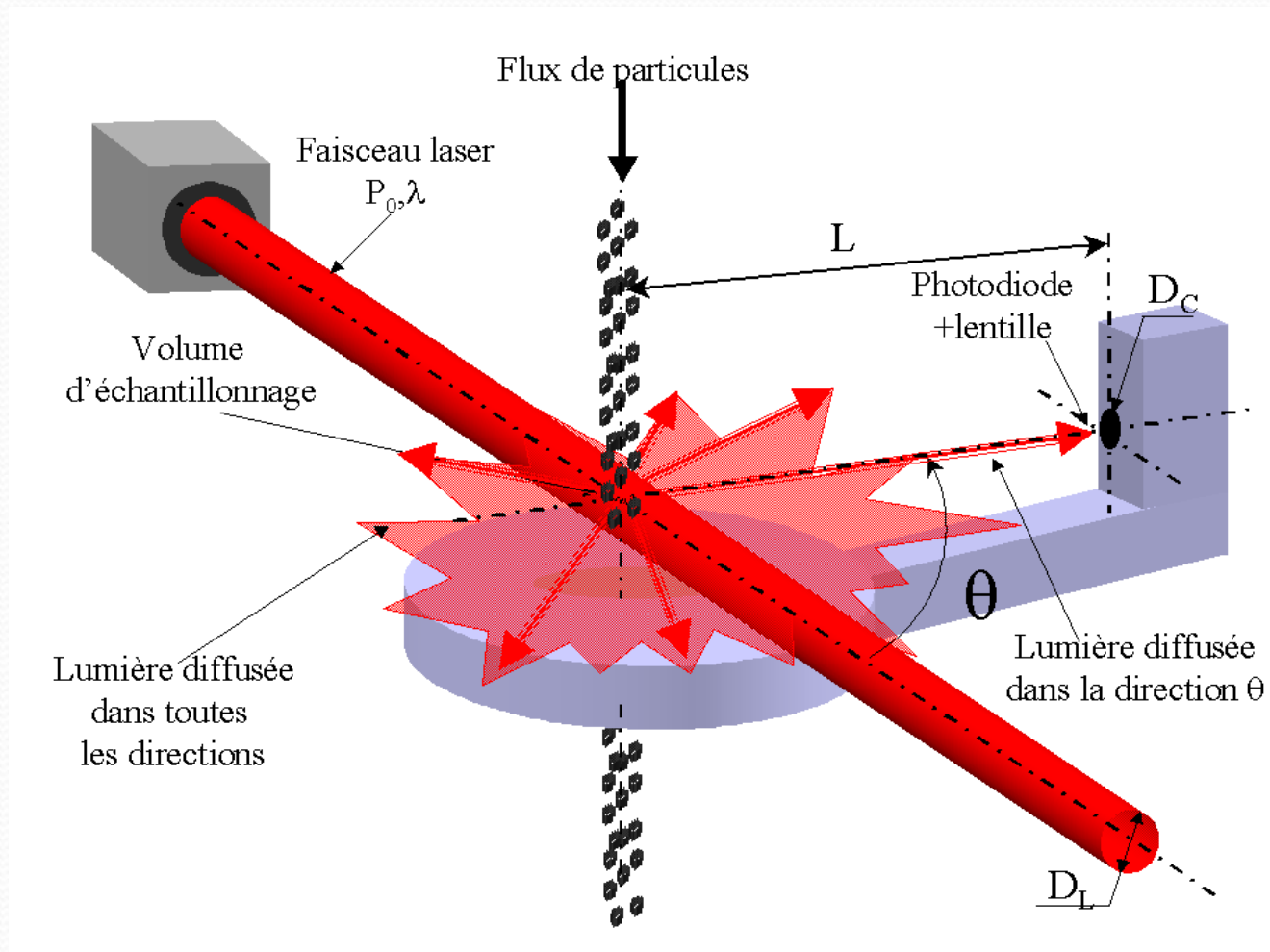
- ✓ **Antijen fazlalığı**
- ✓ **Matriks etkileri**

Antijen fazlalığı

- ✓ Antikora antijen eklenirken türbidite artar, sinyal maksimum olur ve sonra düşer.
- ✓ Modern cihazların çoğu antijen fazlalığını *otomatik* olarak gösterir.

Matriks etkileri

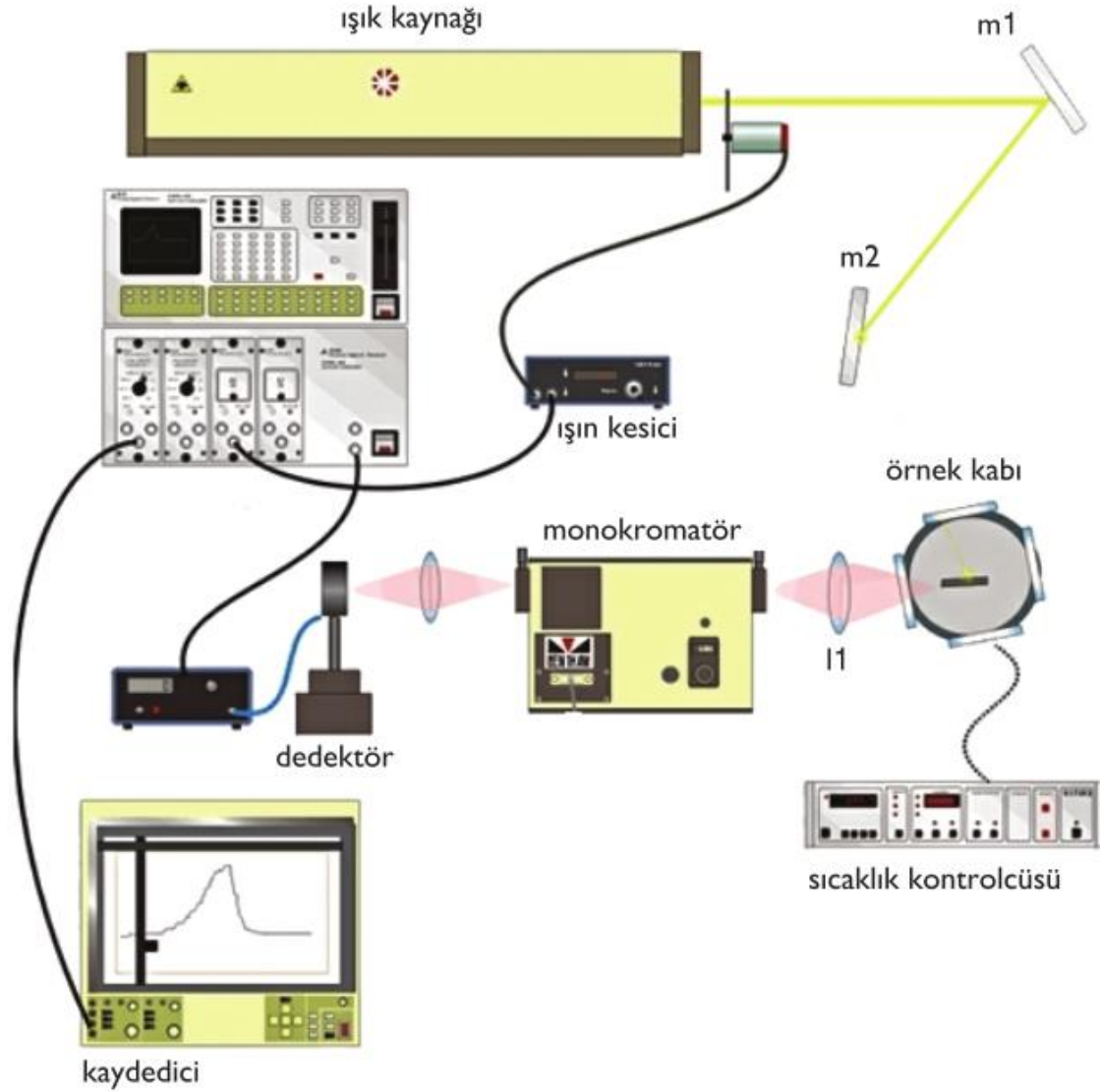
- ✓ Tanecikler, çözenler ve tüm serum makromolekülleri ışık saçarlar.
- ✓ Lipemik serum (lipoprotein, şilomikron), toz gibi büyük tanecikler arka plan girişimlerine neden olurlar.



Fotolüminesans Ölçüm Sistemi

Fotolüminesans ölçülmesi için kullanılan cihazların çeşitli bileşenleri, ultraviyole görünür bölge fotometreleri veya spektrofotometrelerinde bulunanlarla benzerdir. Şekil 6.8'de bu bileşenlerin tipik bir dizilişi görülmektedir. Hemen hemen bütün floresans cihazlarında güç kaynağındaki dalgalanmaların etkisini gidermek için çift-ışınlı optik sistem kullanılır. Numuneden gelen *ışın*, önce floresans uyaracak ışınları geçiren fakat floresans emisyonunun dalga boyundaki ışınları dışarıda tutan veya sınırlayan bir uyarılma filtresinden veya bir monokromatörden geçer. Floresans numuneden bütün yönlerle doğru olur, fakat en uygun şekilde floresans uyarma ışınına dik açıdan gözlenir; diğer açılarda çözeltiden ve hücre duvarlarından oluşan saçılma, şiddet ölçümünde büyük hatalara sebep olabilir. Yayılan ışın, ölçme için floresansı ayıran ikinci bir filtreden veya monokromatörden geçtikten sonra bir dedektöre ulaşır. Referans ışın demeti ise, ışığın gücünü yaklaşık olarak floresans ışınlarına azaltan bir azaltıcıdan geçer (güç azaltılması ekseriya 100 kat veya daha fazladır). Referans ve numune fotoçoğaltıcı tüplerden gelen sinyaller, sonra çıktıyı bir metreye veya kaydedici ile gösteren bir fark yükselticisine gönderilir.

*Fotolüminesans
ölçüm düzeneği.*



Kemilüminesans Ölçüm Sistemi

Kemilüminesans ölçüm sistemi için kullanılan aygıtlar oldukça basittir. Uygun bir reaksiyon kabı ve bir fotoçoğaltıcı tüpten ibarettir. Fotoçoğaltıcı tüp kimyasal reaksiyon sonucu açığa çıkan ışının şiddetini arttırmak için kullanılır. Reaksiyon sonucu açığa çıkan ışın tek dalgaboylu olduğundan dalgaboyu seçici aygıt (monokromatör) gerek yoktur. Zamanın bir fonksiyonu olarak, bir kemilüminesans deneyinden elde edilen tipik sinyal, reaktif ve analitin karıştırılması tamamlandığında, hızla en yüksek değere ulaşır; ardından sinyalin daha az veya daha çok üstel bozunması takip eder. Kantitatif analiz için genellikle sinyal belirli bir zaman içindeki ortalaması alınır ve aynı yolla işlem görmüş standartlar ile karşılaştırılır. Ölçümde şiddetlerde kullanılır.

Kemilüminesans yöntemleri genellikle yüksek duyarlılığa sahiptir, çünkü bir filtre veya dalgaboyu seçici kullanılmadığından gürültü oldukça düşüktür ve zayıf ışık seviyeleri bile kolayca izlenebilir. Dolayısıyla ışının zayıflaması söz konusu değildir.

Ozon, azot oksitler ve kükürt bileşikler gibi atmosferik kirleticilerin tayini için yüksek duyarlılık ihtiyacı sonucu, gaz bileşenlerinin tayini için kemilüminesans yöntemleri kullanılır. Bu yöntemlerin en yaygın kullanılanlarından biri, azot monoksit tayini için olandır.

- **Türbidimetrinin ve nefelometrinin temeli nedir? Türbidimetrik ve nefelometrik ölçüm nasıl olur?**
- Kolloidal bir çözelti ile etkileşen ışığın şiddetinde, ışık saçılması nedeniyle, absorpsiyon olayında olduğu gibi bir azalma olur ve saçılmadan dolayı ortaya çıkan ışık kaybı, Beer-Lambert eşitliğine benzer bir eşitlikle verilir.
- Türbidimetride, kolloidal çözelti ile etkileşen ışık için, spektrofotometride olduğu gibi absorpsiyon ölçülür.
- Nefelometride, koloidal çözelti ile etkileşen ışık için, ışık saçılması ölçülür. Nefelometride saçılan ışık, gelen ışığa göre 90°'lik bir açıdan toplanarak dedektöre ulaşır.
-
- **104) Floresans ve fosforesansın temeli nedir? Fluorometrik ölçüm nasıl olur?**
- Uyarılmış bir atom veya molekül kararsızdır; fazla enerjisini atarak temel hale dönmek ister. Uyarılmış atom veya molekül, temel enerji düzeyine dönerken fazla enerjisinin tümünü veya bir kısmını ışık şeklinde atabilir ki bu olaya genel olarak luminesans denir.
- Uyarılma enerjisi bir kimyasal tepkimeden sağlanıyorsa, kemilüminesans
- Uyarılma enerjisi elektrot tepkimesinden sağlanıyorsa, elektrokemilüminesans
- Uyarılma enerjisi ısıtma ile sağlanıyorsa, termolüminesans
- Uyarılma enerjisi atom veya molekülün fotonları absorplaması ile sağlanıyorsa, fotolüminesans (floresans). Fosforesans, floresansa göre daha uzun sürelidir.
- Lüminesans spektrofotometrilere örnekten kaynaklanan luminesans, genellikle uyaran ışığa göre 90°'lik bir açıdan toplanarak dedektöre ulaşır.