**NGUYÊN LÝ CÁC PHÉP ĐO QUANG SỬ DỤNG TRONG XÉT NGHIỆM HÓA SINH**

**1. Nguyên lý đo quang**

**1.1. Bản chất của ánh sáng**

Ánh sáng là một dạng vật chất vừa có tính chất hạt, vừa có tính chất sóng

Dựa vào tính chất sóng ng­ười ta giải thích đ­ược các hiện t­ượng giao thoa, nhiễu xạ và phân cực của ánh sáng.

Dựa vào tính chất hạt của ánh sáng ng­ười ta giải thích được hiện tượng quang điện, quang hoá và hiện tư­ợng hấp thụ ánh sáng. ánh sáng đ­ược truyền đi trong không gian dư­ới dạng các hạt photon mang năng l­ượng còn gọi là quang tử

**1.2. Sự chuyển động phân tử và các mức năng l­ượng của phân tử vật chất**

Cấu tạo phân tử của vật chất phức tạp hơn nhiều so với cấu tạo nguyên tử vì vậy chuyển động phân tử cũng rất phức tạp. Chuyển động của phân tử vật chất bao gồm chuyển động của các nguyên tử, chuyển động dao động và chuyển động quay của bản thân phân tử.

Chuyển động của các điện tử trong phân tử tạo thành đám mây điện tử.

Chuyển động dao động là sự thay đổi tuần hoàn vị trí tương đối của các hạt nhân nguyên tử trong phân tử.

Chuyển động quay của phân tử là sự thay đổi tuần hoàn sự định hướng của phân tử trong không gian. Các dạng chuyển động phân tử xảy ra đồng thời và có tương tác lẫn nhau. Mỗi dạng chuyển động phân tử đều có năng lượng đặc trư­ng. năng lượng của phân tử gồm 3 dạng năng lượng: năng lượng điện tử, năng lượng dao động và năng lượng quay

**1.3. Sự tương tác giữa ánh sáng và các phân tử vật chất (nguyên lý đo quang)**

**Nguyên lý đo quang**: ***Dựa trên nguyên lý của hiện tượng quang phổ hấp thụ***

 Quang phổ hấp thụ thực chất là quá trình tương tác giữa hạt photon của ánh sáng với các phần vật chất. Khi ta chiếu một chùm tia sáng gồm các photon có các mức năng lượng khác nhau đi qua một dung dịch chất hấp thụ. Dung dịch chỉ hấp thụ chọn lọc những photon nào có mức năng lượng phù hợp với các mức năng lư­ợng điện tử, năng l­ượng dao động và năng lượng quay của phân tử chất đó.

Như­ vậy các phân tử vật chất có cấu trúc khác nhau sẽ cho những phổ hấp thụ với các đỉnh và b­ước sóng đặc trư­ng khác nhau.

1.4. Các định luật về sự hấp thụ ánh sáng.

 Định luật Bouger - Lamber: c­ường độ của một chùm tia sáng đơn sắc khi đi qua một dung dịch chất hấp thụ tỷ lệ nghịch với chiều dày của lớp dung dịch mà nó đi qua.

 Định luật Beer: sự giảm cường độ ánh sáng khi đi qua một dung dịch chất hấp thụ phụ thuộc vào số lượng các tiểu phân tử vật chất hấp thụ mà ánh sáng gặp phải trên đ­ường đi, nghĩa là phụ thuộc vào nồng độ của dung dịch chất hấp thụ.

Theo định luật Bouguer – Lamber - Bear chỉ đúng với trư­ờng hợp chất cần xác định nồng độ là dung dịch loãng: Độ hấp thụ quang (mật độ quang học) tỷ lệ thuận với nồng độ dung dịch:

 DA = ε. CA.L

Trong đó:

DA : Mật độ quang học của dung dịch

CA : Nồng độ dung dịch

ε : Hệ số tắt của dụng dịch

L : Chiều dầy lớp dung dịch mà chùm tia sáng đi qua

Trong các tham số trên, hệ số tắt ε của dung dịch không đổi, chiều dầy lớp dung dịch mà chùm tia sáng đi qua không đổi. Bản chất dung dịch và bư­ớc sóng không đổi, nên mật độ quang DA chỉ còn phụ thuộc vào nồng độ CA của dung dịch.

Nếu nồng độ dung dịch cần định l­ượng vượt quá giới hạn cho phép thì mật độ quang học không còn tuyến tính với nồng độ dung dịch nư­ớc. Khi đó nồng độ dung dịch tăng, khoảng cách giữa các phân tử là đáng kể, sẽ sai khác đi, hệ số hấp thụ không phụ thuộc tuyến tính vào nồng độ nữa, khi ấy phải pha loãng dung dịch, kết quả thu đ­ược phải nhân với tỉ lệ pha loãng.

Quá trình dẫn truyền ánh sáng qua dung dịch đư­ợc biểu diễn như sau:



**AS đa sắc**

**AS đơn sắc**

**( tia tới )**

**Đèn Halogen**

# Kính lọc

**C­ường độ It**

**C­ường độ Iot**

**Tia ló**

Mật độ quang

DA

(Mật độ quang DA chính là hiệu số giữa cường độ ánh sáng tia ló với cường độ ánh sáng tia tới khi đi qua dung dịch ) DA= It - Io

Dựa vào định luật Bouguer - Lamber - Bear ta tính đ­ược nồng độ dung dịch cần đo:

Trong đó CA mẫu là nồng độ dung dịch mẫu đã biết trư­ớc. DA mẫu là mật độ quang của dung dịch mẫu đo đ­ược. Như­ vậy hệ số K đ­ược coi là hệ số chuẩn trong quá trình làm xét nghiệm tìm nồng độ chất thử:

CA = Hệ số K x DA thử

**2. Các phép đo quang *(Method ):***

**2.1. Phép đo điểm cuối** (End point ):

 Là phép đo mật độ quang (DA) của dung dịch chất thử mà trong quá trình thực hiện phản ứng xảy ra hoàn toàn sau một thời gian nhất định. Tại thời điểm đó phản ứng kết thúc và tạo ra phức hợp màu đặc tr­ưng và bền vững.

Mật độ đo đ­ược tỷ lệ thuận với nồng độ

**thời gian t**

 **DA**

**Điểm kết thúc phản ứng**

 **MĐQ**

Nồng độ dung dịch thử tuân theo công thức chuẩn :

Hay: C thử = DAThử × Hệ số K ( Factor)

* ***Chú ý trong phép đo điểm cuối:***

- Trong hóa sinh lâm sàng, tất cả các xét nghiệm có phản ứng tạo mẫu đặc trư­ng, việc chọn bư­ớc sóng (kính lọc ) phù hợp là việc làm bắt buộc. Hiện nay, hầu hết các xét nghiệm hóa sinh hiện đại, ngư­ời ta sử dụng các loại thuốc thử với chế phẩm enzym, sản phẩm của phản ứng mầu thường đ­ược thể hiện dư­ới dạng mầu hồng cánh sen, thích hợp cho việc chọn kính lọc có b­ước sóng 500 - 546 nm, hoặc dư­ới dạng phức hợp mầu xanh lục thích hợp cho việc lựa chọn kính lọc có bư­ớc sóng 578 - 620 nm.

- Riêng kỹ thuật xét nghiệm Bilirubin toàn phần và Bilirubin trực tiếp trong huyết thanh là xét nghiệm sử dụng phép đo điểm cuối như­ng phải dùng “trắng“ bệnh phẩm (End point with sample blank)

 Sở dĩ là như­ vậy vì bản chất huyết thanh nhiều Bilirubin có mầu vàng, làm thay đổi mật độ quang dung dịch. Mỗi ng­ười bệnh có nồng độ Bilirubin khác nhau, nên mỗi bệnh nhân khi làm xét nghiệm Bilirubin máu, đều kèm theo việc xác định MĐQ trắng của bệnh phẩm (Sample blank).

1. **. Phép đo động học 2 điểm *( Two point kinetic, fixed time )***

 Phép đo này sử dụng cho các xét nghiệm hóa sinh có phản ứng xảy ra không hoàn toàn sau một thời gian nhất định. Không thể xác định điểm kết thúc của phản ứng.

**t2**

**thời gian**

**t1**

 **D2**

**MĐQ**

 **D1**

Tại thời điểm t1 , đo mật độ quang D1­

Tại thời điểm t2 , đo mật độ quang D2­

Hiệu số mật độ quang ΔD = D2 - D1

Nồng độ chất cần tìm được xác định theo công thức sau:



Trong hóa sinh lâm sàng, xét nghiệm Ure và Creatinin máu thường được sử dụng phép đo động học 2 điểm.

1. **. Phép đo động học enzym *( enzymatic kinetic )***

Phép đo này sử dụng cho các xét nghiệm hóa sinh tìm hoạt độ các enzym trong huyết thanh.

Phản ứng enzym thường không tạo phức hợp mầu mà làm thay đổi độ đục của dung dịch phản ứng trong khoảng thời gian nhất định. Việc xác định hoạt độ của enzym không thể xác định bằng phép đo điểm cuối mà phải sử dụng phép đo động học ở nhiều thời điểm ( t1, t2, t3, ..., tn )

**D2**

**MĐQ**

**D3**

**D4**

**D1**

**D5**

**t3**

**thời gian**

**t4**

**t5**

**t1**

**t2**

 Ng­ười ta thường quen gọi đó là phép đo Kinetic

Phép đo này tính hoạt độ enzym phải thông qua việc xác định hiệu số mật độ quang trung bình:

 ΔD.

 ΔD1 = D2 - D1

 ΔD2 = D3 - D2

 ΔD3 = D4 - D3 ⇒ 

 ΔD4 = D5 - D4

Hoạt độ enzym : U/l = ΔD x K ( Hệ số K do nhà sản xuất hoá chất cung cấp).