

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 2

Μελέτη φθορισμού βιολογικών δειγμάτων

1. Εισαγωγή

Η εκπομπή φωτός από ένα σώμα, η οποία δεν οφείλεται στην υψηλή του θερμοκρασία καλείται φωταύγεια (luminescence). Ένα σύστημα που εκπέμπει φωταύγεια χάνει ενέργεια. Συνεπώς, κάποιο είδος ενέργειας πρέπει να εφαρμόζεται στο σώμα και για αυτό τα είδη της φωταύγειας διαχωρίζονται ανάλογα με την πηγή αυτής της ενέργειας. Έχουμε έτσι την ηλεκτροφωταύγεια (electroluminescence), τη ραδιοφωταύγεια (radioluminescence), τη χημειοφωταύγεια (chemiluminescence) και τη φωτοφωταύγεια (photoluminescence). Στην τελευταία μορφή φωταύγειας, η ενέργεια προέρχεται από την απορρόφηση υπεριώδους, ορατού ή υπέρυθρου φωτός. Στις επόμενες παραγράφους θα γίνει μια αναλυτική περιγραφή των διεργασιών που ακολουθούν την απορρόφηση αυτής της φωτεινής ενέργειας από ένα μόριο και το πως αυτή κατανέμεται στα διάφορα ενεργειακά επίπεδα του μορίου.

2. Απορρόφηση ενέργειας - Φθορισμός

Η απορρόφηση πραγματοποιείται για διακριτά ποσά ενέργειας, τα κβάντα. Η σχέση που δίνει την ενέργεια των κβάντων αυτών είναι:

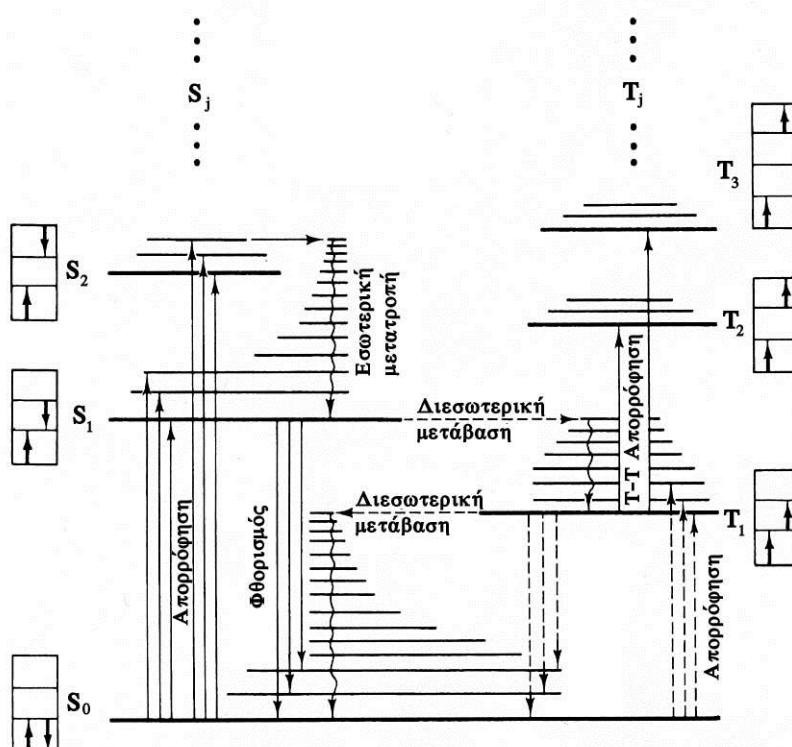
$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda}$$

όπου E είναι η ενέργεια και h η σταθερά του Planck (6.62×10^{-27} erg sec).

Κάθε μόριο κατέχει μια σειρά ενεργειακών σταθμών και μπορεί να μεταβεί από μία χαμηλότερη σε μία υψηλότερη στάθμη με την απορρόφηση ενός φωτονίου, ενέργειας ίσης με τη διαφορά των δύο ενεργειακών επιπέδων. Σε κάθε ηλεκτρονιακή στάθμη αντιστοιχεί και ένα πλήθος δονητικών επιπέδων του μορίου. Η βασική στάθμη συμβολίζεται με G , η πρώτη διεγερμένη μονήρης ηλεκτρονιακή στάθμη με S^* , και η πρώτη διεγερμένη τριπλή κατάσταση με T^* . Η διαφορά μεταξύ μονήρους και τριπλής διεγερμένης κατάστασης σχετίζεται με το συνολικό σπιν των ηλεκτρονίων της στάθμης. Σε ένα πολυατομικό μόριο, η βασική κατάσταση καταλαμβάνεται από άρτιο πλήθος ηλεκτρονίων που συνδυάζονται σε ζεύγη με αντιπαράλληλα σπιν. Η πολλαπλότητα (M) μιας στάθμης, που εκφράζει την τροχιακή στροφορμή, σχετίζεται με το συνολικό σπιν της στάθμης (S) μέσω της σχέσης

$$M = 2S + 1$$

Έτσι στην περίπτωση ζεύγων ηλεκτρονίων με αντιπαράλληλα σπιν, το συνολικό σπιν είναι ίσο με μηδέν ($S = 0$) και η πολλαπλότητα ισούται με τη μονάδα ($M = 1$). Μια τέτοια κατάσταση ονομάζεται μονήρης ηλεκτρονιακή στάθμη (singlet). Όταν το σπιν ενός ηλεκτρονίου αντιστραφεί, τότε στην κατάσταση αυτή υπάρχουν δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια με παράλληλα σπιν και ολικό σπιν $S = 1$ και πολλαπλότητα στάθμης $M = 3$. Μια τέτοια ηλεκτρονιακή στάθμη καλείται τριπλή (triplet).



Σχήμα 1: Σχηματικό διάγραμμα Jablonski των κατωτέρων ενεργειακών επιπέδων και ενδομοριακών διεργασιών ενός οργανικού μορίου με βάση την απορρόφηση φωτός.

Κατά τη διάρκεια της παραμονής του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση, η πλεονάζουσα ενέργεια σε σχέση με την ενέργεια του χαμηλότερου δονητικού επιπέδου της στάθμης διοχετεύεται μέσω συγκρούσεων σε άλλα μόρια. Με τη διαδικασία αυτή το μόριο καταλαμβάνει το χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της διεγερμένης μονήρους στάθμης. Το ηλεκτρόνιο θα επιστρέψει στη βασική κατάσταση με έναν από τους ακόλουθους μηχανισμούς (6-9):

Εσωτερική μετατροπή: το μόριο μπορεί από την διεγερμένη κατάσταση, να μεταπηδήσει σε ένα κοντινό, δονητικό επίπεδο της βασικής ενεργειακής κατάστασης. Η ενέργεια χάνεται χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας μέσω δονητικής αποδιέγερσης.

Εσωτερική μετάπτωση $S^* \rightarrow T^*$: το διεγερμένο ηλεκτρόνιο μπορεί να μεταβεί, εάν είναι ενεργειακά δυνατό, από τη μονήρη (S^*) στην πρώτη διεγερμένη τριπλή στάθμη (T^*). Η μετάβαση από τη βασική στην τριπλή διεγερμένη είναι απαγορευμένη (πολύ απίθανη). Σε αντιδιαστολή η μετάπτωση από τη μονήρη στην τριπλή διεγερμένη στάθμη είναι περισσότερο πιθανή, αφού η ενέργεια του χαμηλότερου δονητικού επιπέδου της T^* είναι μικρότερη αυτής της S^* . Στη συνέχεια, το μόριο μπορεί να επανέλθει άμεσα στη βασική κατάσταση (G), αφού η επιστροφή στη βασική μέσω της S^* προϋποθέτει την πρόσληψη ενέργειας από το περιβάλλον (περίπτωση καθυστερημένου φθορισμού). Η άμεση επιστροφή στην βασική κατάσταση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας ή με εκπομπή ακτινοβολίας, οπότε έχουμε το φαινόμενο του φωσφορισμού. Εφόσον η πιθανότητα αντίστροφης μετάβασης από τη διεγερμένη τριπλή στη διεγερμένη μονήρη στάθμη είναι μικρή, η διεγερμένη τριπλή στάθμη είναι συνήθως μεγάλης διάρκειας ζωής (από msec ως λεπτά). Επίσης η σχετικά μεγάλη παραμονή των μορίων σε αυτή την κατάσταση τα καθιστά πιο επιρρεπή σε διαδικασίες αποδιέγερσης χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας.

Μεταφορά ενέργειας μέσω κρούσεων: αν το διεγερμένο μόριο συγκρουστεί με άλλο μόριο, που βρίσκεται σε χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο, τότε η ενέργεια μπορεί να μεταφερθεί σε αυτό το μόριο χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως απόσβεση φθορισμού.

Μεταφορά ενέργειας μέσω συντονισμού: η ενέργεια αυτή μπορεί να μεταφερθεί σε άλλο μόριο χωρίς επαφή μέσω μιας σύζευξης διπόλου-διπόλου ανάμεσα στα μόρια. Αν και αυτή η σύζευξη μειώνεται ανάλογα με την έκτη δύναμη της απόστασης ανάμεσα στα μόρια, ικανοποιητική μεταφορά ενέργειας μπορεί να επιτευχθεί στα βιολογικά συστήματα, για αποστάσεις μέχρι και 5 nm. Το μόριο που δέχεται την ενέργεια, πρέπει να έχει και μια κατάλληλη ενεργειακή δομή. Το φαινόμενο αυτό είναι μια παραλλαγή της απόσβεσης φθορισμού.

Φωτοχημική αντίδραση: η ενέργεια μπορεί να επάγει μια χημική αντίδραση, δηλαδή τη δημιουργία ενός νέου είδους μορίου. Η ενέργεια καταναλώνεται κατά τη δημιουργία αυτών των ενώσεων, που έχουν διαφορετικές ιδιότητες φθορισμού από τις αρχικές.

Εκπομπή φθορισμού: το μόριο μπορεί να μεταβεί σε ένα διεγερμένο δονητικό επίπεδο στη βασική ηλεκτρονιακή κατάσταση, με εκπομπή ενός φωτονίου. Η ενέργεια του φωτονίου και άρα το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, καθορίζεται από την ενεργειακή διαφορά μεταξύ της διεγερμένης και του δονητικού επιπέδου της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Η διάρκεια ζωής του φθορισμού είναι της τάξης των nsec. Κατόπιν μέσω απόσβεσης και χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας, το μόριο

επιστρέφει στο χαμηλότερο δονητιό επίπεδο της βασικής κατάστασης. Εξαιτίας της απώλειας ενέργειας κατά την παραμονή του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση η εκπεμπόμενη ενέργεια (φθορισμός) είναι μεγαλύτερου μήκους κύματος σε σχέση με την απορροφηθείσα ενέργεια. Το φάσμα φθορισμού (η κατανομή της έντασης της ακτινοβολίας φθορισμού για κάθε μήκος κύματος), εκφράζει τις διαφορετικές πιθανές μεταβάσεις από την μονήρη διεγερμένη κατάσταση στα διάφορα δονητικά επίπεδα της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Η σχετική πιθανότητα να συμβεί κάποια από τις πιθανές διαδρομές διαφέρει από μόριο σε μόριο και εξαρτάται, όχι μόνο από τη δομή του, αλλά και από το τοπικό του περιβάλλον.

3. Φάσμα διέγερσης

Το φάσμα διέγερσης εκφράζει τη σχετική απόδοση των διαφόρων μηκών κύματος της διεγείρουσας ακτινοβολίας στην επαγωγή φθορισμού. Το φάσμα διέγερσης, που λαμβάνεται με ένα φασματοφωτόμετρο φθορισμού, πρέπει να συμπίπτει με το φάσμα απορρόφησης του μορίου, που λαμβάνεται με ένα φασματοφωτόμετρο. Αυτό συμβαίνει σπάνια και οι διαφορές οφείλονται σε κατασκευαστικούς λόγους. Τέτοιοι είναι α) οι αλλαγές στην απόκριση του φωτοπολλαπλασιαστή, β) αλλαγές στο εύρος ζώνης του μονοχρωμάτορα ή στην φωτεινή πηγή και γ) σταθερότητα των σχισμών του μετρητή φθορισμού. Για να ληφθεί το διορθωμένο φάσμα του συστατικού, που ενδιαφέρει η καμπύλη πρέπει να διορθώνεται με βάση αυτούς τους παράγοντες.

Εξέταση του φάσματος διέγερσης κάθε μορίου, δείχνει τις θέσεις του φάσματος απορρόφησης, οι οποίες μπορούν να επάγουν εκπομπή φθορισμού. Γενικά το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης στο φάσμα διέγερσης είναι αυτό, που επιλέγεται για την διέγερση του δείγματος.

Όταν ένα μόριο του χρωμοφόρου φθορισμού μεταπίπτει από τη διεγερμένη κατάσταση στη βασική, εκπέμπεται φως σε χαρακτηριστικό μήκος κύματος. Η ενέργεια του εκπεμπόμενου φωτονίου ($h\nu_{em}$) ισούται με τη διαφορά της ενέργειας ανάμεσα στις δύο ενεργειακές καταστάσεις και η διαφορά αυτή καθορίζει το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας (λ_{em})

$$\lambda_{em} = \frac{hc}{E_{em}}$$

όπου E_{em} η ενεργειακή διαφορά ανάμεσα στις δύο ενεργειακές καταστάσεις κατά την εκπομπή του φωτός, h η σταθερά του Planck και c η ταχύτητα του φωτός.

Συνεπώς επειδή υπάρχει απώλεια ενέργειας το μήκος κύματος του εκπεμπόμενου φθορισμού θα είναι πάντα μεγαλύτερο από το μήκος κύματος του φωτός που προκάλεσε τη διέγερση του μορίου. Η διαφορά αυτή ανάμεσα στο μήκος κύματος που αντιστοιχεί στη μέγιστη εκπομπή και σε αυτό που αντιστοιχεί στη μέγιστη απορρόφηση ονομάζεται μετατόπιση Stokes και δηλώνει την ενέργεια η οποία

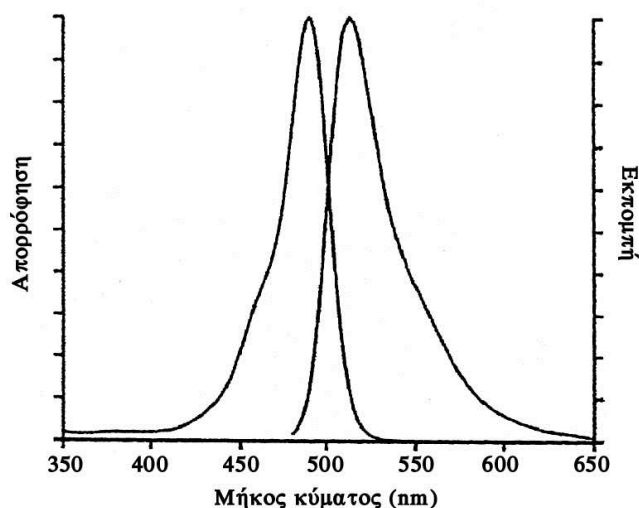
χάνεται κατά την παραμονή του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση, πριν επιστρέψει στη βασική. Δίνεται από τη σχέση:

$$\text{μετατ. όπισθ. Stokes} = 10^7 \cdot (1/\lambda_{\text{ex}} - 1/\lambda_{\text{em}})$$

4. Φάσμα εκπομπής

Το φάσμα εκπομπής εκφράζει την κατανομή της έντασης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας στα διάφορα μήκη κύματος, που επάγεται για ένα μήκος κύματος διέγερσης. Το φάσμα εκπομπής οφείλεται στην επανεκπομπή της ακτινοβολίας που απορροφήθηκε από το μόριο.

Το φάσμα φθορισμού, εκφράζει τις διαφορετικές πιθανές μεταβάσεις από τη μονήρη διεγερμένη κατάσταση στα διάφορα δονητικά επίπεδα της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Η σχετική πιθανότητα να συμβεί κάποια από τις πιθανές διαδρομές διαφέρει από μόριο σε μόριο και εξαρτάται όχι μόνο από τη δομή του, αλλά και από το τοπικό του περιβάλλον.

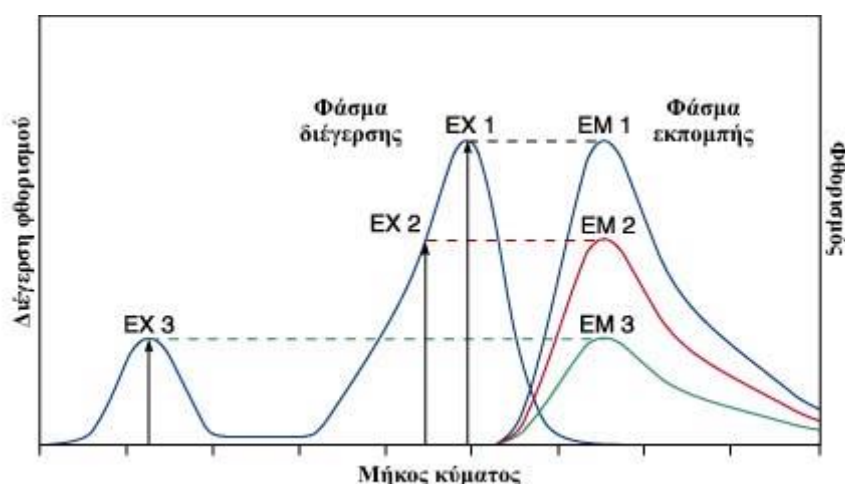


Σχήμα 2: Φάσμα απορρόφησης και εκπομπής *fluorescein* ως προς το μήκος κύματος.

Το φάσμα του φθορισμού της $S_1 \rightarrow S_0$ εκπομπής είναι περίπου κατοπτρικό του φάσματος απορρόφησης της μετάβασης $S_1 \leftarrow S_0$, και εκτείνεται σε χαμηλότερες ενέργειες όπως φαίνεται και στο Σχήμα όπου εμφανίζονται τα φάσματα εκπομπής και απορρόφησης της *Fluorescein*. Το σχήμα του φάσματος εκπομπής και η κβαντική απόδοση είναι ανεξάρτητα από το μήκος διέγερσης, εξαιτίας της εσωτερικής μετατροπής και κατά τον κανόνα Kasha. Πράγματι οι υψηλότερα υπάρχουσες μονήρεις διεγερμένες στάθμες μεταπίπτουν στην S_1 πάρα πολύ γρήγορα μέσω της εσωτερικής μετατροπής η οποία για τις στάθμες αυτές είναι σαφώς ταχύτερη από τον

φθορισμό. Έτσι φθορισμό έχουμε από την S_1 στην S_0 όπου ο ρυθμός εσωτερικής μετατροπής είναι μικρότερος και συγκρίσιμος με αυτόν του φθορισμού.

Η ένταση του φθορισμού αντίθετα εξαρτάται από το μήκος κύματος της διέγερσης. Αν για παράδειγμα το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης είναι διαφορετικό από αυτό που αντιστοιχεί στο μέγιστο απορρόφησης, λιγότερη ενέργεια θα απορροφηθεί από το μόριο και επομένως λιγότερη ενέργεια θα εκπεμφθεί. Συνεπώς όλα τα μήκη κύματος του φάσματος απορρόφησης μπορούν να διεγείρουν το μόριο και να επάγουν φθορισμό. Η κορυφή του φθορισμού θα είναι πάντα στο ίδιο μήκος κύματος αλλά η ένταση του θα διαφέρει ανάλογα με την ένταση της απορρόφησης.



Σχήμα 3: Η διέγερση του χρωμοφόρου με τρία διαφορετικά μήκη κύματος (EX 1, EX 2, EX 3) δεν μεταβάλλει το σχήμα του φάσματος εκπομπής αλλά προκαλεί διακυμάνσεις στην ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού (EM 1, EM 2, EM 3) το οποίο αντιστοιχεί στο μέγεθος του φάσματος διέγερσης.

5. Κβαντική απόδοση φθορισμού

Η κβαντική απόδοση φθορισμού ϕ εκφράζει το λόγο της ολικής ενέργειας που εκπέμπεται από ένα μόριο ανά κβάντο απορροφούμενης ενέργειας:

$$\phi = (\text{πλήθος κβάντων που εκπέμπονται}) / (\text{πλήθος κβάντων που απορροφούνται})$$

Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της ϕ , τόσο μεγαλύτερος είναι ο εκπεμπόμενος φθορισμός της ουσίας. Ένα μη φθορίζον μόριο έχει κβαντική απόδοση φθορισμού ίση με μηδέν, ή πάρα πολύ κοντά στο μηδέν ώστε να είναι μη μετρήσιμο το σήμα φθορισμού. Η ϕ εξαρτάται από το μήκος κύματος διέγερσης και τη θερμοκρασία.

6. Διάρκεια ζωής φθορισμού

Η διάρκεια ζωής φθορισμού τ , αναφέρεται στο μέσο χρόνο ζωής της διεγερμένης κατάστασης, δηλαδή την πιθανότητα να βρεθεί ένα συγκεκριμένο μόριο, το οποίο έχει διεγερθεί, ακόμα στη διεγερμένη κατάσταση μετά από χρόνο t , που είναι $e^{-t/\tau}$. Η σχέση ανάμεσα στην ένταση φθορισμού I και στη διάρκεια ζωής τ είναι:

$$I=I_0e^{-t/\tau}$$

όπου I είναι η ένταση φθορισμού τη στιγμή t , I_0 είναι η μέγιστη ένταση φθορισμού κατά τη διάρκεια της διέγερσης, t είναι ο χρόνος μετά τη διακοπή της ακτινοβολίας διέγερσης και τ είναι η μέση διάρκεια ζωής της διεγερμένης κατάστασης.

7. Παράγοντες που επηρεάζουν την ένταση του φθορισμού

Η σχέση ανάμεσα σε συγκέντρωση και φθορισμό είναι:

$$F=\phi I_0(1-e^{-\epsilon bc})$$

όπου ϕ είναι η κβαντική απόδοση, I_0 είναι η προσπίπτουσα φωτεινή ισχύς, ϵ είναι ο συντελεστής μοριακής εξασθένησης, b είναι το μήκος του οπτικού δρόμου και c είναι η μοριακή συγκέντρωση. Από την παραπάνω εξίσωση φαίνεται ότι η ένταση του φθορισμού επηρεάζεται από τρεις βασικούς παράγοντες (πέρα από τη συγκέντρωση):

Την κβαντική απόδοση ϕ . Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της ϕ τόσο μεγαλύτερος θα είναι ο εκπεμπόμενος φθορισμός.

Την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας I_0 . Θεωρητικά, όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση ακτινοβολίας τόσο μεγαλύτερος θα είναι ο φθορισμός. Στην πράξη, πολύ δυνατή ακτινοβολία διέγερσης μπορεί να προκαλέσει φωτολεύκανση του δείγματος. Για αυτό το λόγο ως πηγές ακτινοβολίας πολύ χρήσιμα είναι τα laser και ειδικότερα τα παλμικά. ενώ συχνά χρησιμοποιούνται και πηγές ακτινοβολίας χαμηλότερης έντασης όπως οι λάμπες υδραργύρου ή ξένου.

Το συντελεστή μοριακής απορρόφησης, ϵ . Απαραίτητη προϋπόθεση για την εκπομπή φθορισμού είναι η διαδικασία της απορρόφησης. Έτσι όσο μεγαλύτερος είναι ο συντελεστής μοριακής εξασθένησης τόσο μεγαλύτερη θα είναι η ένταση φθορισμού της ουσίας.

Για πολύ αραιά διαλύματα ($\epsilon bc < 0.05$) η προηγούμενη σχέση παίρνει τη μορφή, που ακολουθεί και είναι παρόμοια με το νόμο του Beer:

$$F=K\phi I_0\epsilon bc$$

Έτσι η καμπύλη του φθορισμού συναρτήσει της συγκέντρωσης, θα είναι γραμμική στις χαμηλές συγκεντρώσεις και θα φθάνει σε ένα μέγιστο για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις η απόσβεση γίνεται τόσο έντονη, με αποτέλεσμα η ένταση να μειώνεται. Η γραμμικότητα της έντασης ως προς τη συγκέντρωση ισχύει για μια ευρεία περιοχή τιμών συγκέντρωσης. Γενικότερα η γραμμικότητα θα διατηρείται μέχρι η συγκέντρωση των φθορίζουσών ουσιών να είναι αρκετά μεγάλη, ώστε να απορροφούν σημαντικές ποσότητες φωτός. Στις περιοχές που έχουμε γραμμικότητα, η απαραίτητη ενέργεια για φθορισμό θα είναι ομοιόμορφα κατανομημένη στο διάλυμα. Έτσι αν το ϵ παίρνει την τιμή 10^2 (που είναι αντιπροσωπευτική) και $b=1$ cm η μέγιστη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση πρέπει να

είναι $5 \cdot 10^{-4}$ M. Η συγκέντρωση αυτή μπορεί να αυξηθεί μειώνοντας το μέγεθος της κυψελίδας που περιέχει το δείγμα.

8. Περιορισμοί του φθορισμού

Το σημαντικότερο μειονέκτημα αναλυτικών τεχνικών φθορισμού είναι η μεγάλη εξάρτηση που έχει από περιβαλλοντικούς παράγοντες (όπως η θερμοκρασία, το pH κ.α.).

8.1. Φωτολεύκανση (Photobleaching)

Το υπεριώδες φως που συχνά χρησιμοποιείται για διέγερση μπορεί να προκαλέσει φωτοχημικές αλλαγές ή και καταστροφή της φθορίζουσας ουσίας, πράγμα που θα οδηγήσει σε βαθμιαία ελάττωση της εκπεμπόμενης έντασης. Πρακτικά υπάρχουν τρεις τρόποι για να αποφευχθεί η διεργασία αυτή: (α) να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερο μήκος κύματος ακτινοβολίας διέγερσης, (β) να μετράται ο φθορισμός αμέσως μετά τη διέγερση, να μην επιλέγονται μεγάλες χρονικές περίοδοι διέγερσης και (γ) να προστατεύονται τα φωτοχημικά ασταθή διαλύματα από ηλιακό φως και υπεριώδη ακτινοβολία.

8.2. Ιξώδες

Ο φθορισμός ενός συστατικού επηρεάζεται από το ιξώδες του μέσου. Η μεταφορά ενέργειας ελαττώνεται με τη μείωση του αριθμού των μοριακών συγκρούσεων. Έτσι ο φθορισμός των περισσότερων στοιχείων μπορεί να αυξηθεί χρησιμοποιώντας ένα διαλυτικό μέσο με μεγάλο ιξώδες, όπως η ζελατίνη.

8.3. Απόσβεση

Η μείωση του φθορισμού, ως αποτέλεσμα μιας ανταγωνιστικής διαδικασίας αποδιέγερσης μέσω αλληλεπιδράσεων ενός χρωμοφόρου και μιας άλλης ουσίας, είναι επίσης ένα σύνηθες πρόβλημα. Τέσσερις είναι οι συνηθέστεροι τύποι απόσβεσης, που παρατηρούνται σε μια διαδικασία φθορισμού. Απόσβεση λόγω: (α) θερμοκρασίας, (β) οξυγόνου, (γ) συγκέντρωσης και (δ) προσμίξεων.

Θερμοκρασιακή απόσβεση. Στην περίπτωση της θερμοκρασιακής απόσβεσης, παρατηρείται μείωση του φθορισμού με την αύξηση της θερμοκρασίας. Η εξάρτηση διαφέρει από ουσία σε ουσία και μπορεί να είναι από 1% (συνήθης τιμή) μέχρι και 5%, ανά 1 °C.

Απόσβεση λόγω οξυγόνου. Το οξυγόνο, που είναι παρόν σε διαλύματα, σε συγκεντρώσεις 10^{-3} M προκαλεί μείωση του εκπεμπόμενου φθορισμού μέχρι και 20%. Πρόκειται για διεργασία απόσβεσης της διεγερμένης κατάστασης. Μάλιστα σε διαδικασίες μέτρησης φωσφορισμού θα πρέπει να απομακρύνεται εντελώς.

Απόσβεση λόγω συγκέντρωσης. Η απορρόφηση δημιουργεί προβλήματα στη διαδικασία καταγραφής του φθορισμού όπως και ο φθορισμός σε περιπτώσεις που το ζητούμενο είναι η μέτρηση της απορρόφησης. Για να έχουμε φθορισμό πρέπει να έχουμε απορρόφηση, όμως όταν η απορρόφηση είναι μεγάλη τότε παρεμποδίζεται η διέλευση του φωτός που θα επάγει φθορισμό. Η απόσβεση λόγω συγκέντρωσης μπορεί να έχει και τη μορφή μεταφοράς ενέργειας μεταξύ μορίων του δείγματος. Η πιθανότητα για μια τέτοια διεργασία αυξάνει ανάλογα με την έκτη δύναμη της συγκέντρωσης και γίνεται σημαντική για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 10^{-3} M. Ένας άλλος σημαντικός τύπος απόσβεσης λόγω συγκέντρωσης περιλαμβάνει τη δημιουργία διμερών ή πολυμερών. Τα διεγερμένα διμερή παρουσιάζουν μεγαλύτερα μήκη κύματος εκπομπής σε σχέση με τα μονομερή. Έτσι για μέτρηση του φθορισμού σε ένα μήκος κύματος, εκπομπή σε μεγαλύτερα μήκη κύματος δεν θα καταγραφεί, και ο παρατηρούμενος φθορισμός θα μειωθεί με την αύξηση της συγκέντρωσης.

Απόσβεση λόγω προσμίξεων. Η παρουσία προσμίξεων, σε μη αμελητέες συγκεντρώσεις, έχει ως αποτέλεσμα απόσβεση του εκπεμπόμενου φθορισμού που μπορεί να οφείλεται είτε σε συγκρούσεις είτε σε μεταφορά ενέργειας ή φορτίων.

9. Τα πλεονεκτήματα του φθορισμού

Αναλυτικότερα υπάρχουν πέντε βασικά χαρακτηριστικά του φθορισμού σαν εργαλείο τόσο στη φασματοσκοπία όσο και στην μικροσκοπία:

Επιλεκτικότητα (specificity). Τα φθορίζοντα μόρια απορροφούν και εκπέμπουν φως σε χαρακτηριστικά μήκη κύματος. Συνεπώς, οι φθορίζοντες ιχνηθέτες μπορούν επιλεκτικά να διεγερθούν και να ανιχνευθούν ανάμεσα σε ένα μείγμα διαφόρων μορίων.

Ευαισθησία (sensitivity). Είναι δυνατό να ανιχνευθεί ένας μικρός αριθμός φθορίζοντων μορίων. Περίπου 50 μόρια μπορούν να ανιχνευθούν σε όγκο ενός κυβικού μικρομέτρου ενός κυττάρου με τη μικροσκοπία φθορισμού. Ο αριθμός αυτός συνέχεια μειώνεται με τις εξελίξεις στη χημεία των ιχνηθετών, στις πειραματικές μεθόδους και στους φωτοανιχνευτές.

Φασματοσκοπία (spectroscopy). Τα φθορίζοντα μόρια μπορούν να σχεδιαστούν ώστε να είναι ιδιαιτέρως ευαίσθητα σε απότομες αλλαγές του φυσικοχημικού τους περιβάλλοντος όπως το pH, το ελεύθερο ασβέστιο, το δυναμικό της μεμβράνης, η υδροφοβικότητα, η κατανομή των φορτίων, το μικροϊζώδες, οι μοριακές αποστάσεις και οι συντελεστές διάχυσης.

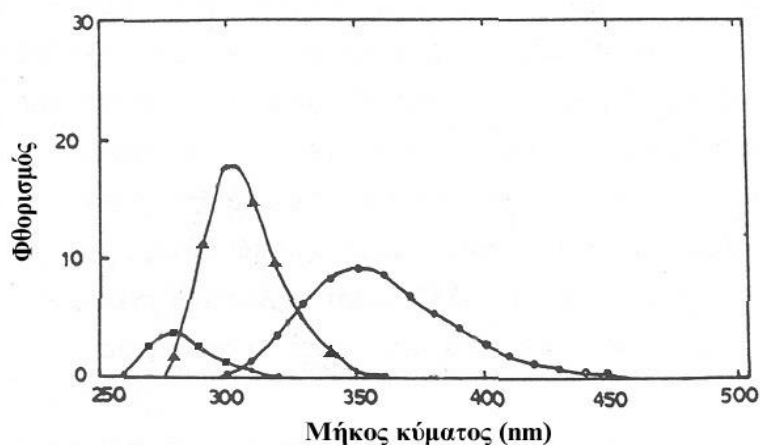
Χρονική διακριτική ικανότητα (temporal resolution). Οι μετρήσεις του φθορισμού περιορίζονται ως προς τη χρονική διακριτική τους ικανότητα από εκείνα τα γεγονότα τα οποία συμβαίνουν με συχνότητα ίση ή μεγαλύτερη από το αντίστροφο του χρόνου που μεσολαβεί ανάμεσα στην απορρόφηση και στην εκπομπή του φωτός.

Χωρική διακριτική ικανότητα (Spatial Resolution). Τα σήματα φθορισμού μπορούν να καταγραφούν από κυτταρικές δομές τόσο μικρές όσο ένα μόριο, εάν τα μόρια αυτά περιέχουν ικανοποιητικό αριθμό χρωμοφόρων. Η διακριτική ικανότητα των δομών περιορίζεται επιπλέον από τα οπτικά του μικροσκοπίου και πιο συγκεκριμένα από το αριθμητικό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού και το μήκος κύματος της εκπομπής. Ωστόσο, αν και υπάρχουν αυτοί οι περιορισμοί στη διακριτική ικανότητα, μπορούν να υπολογιστούν ακόμα και αποστάσεις μεταξύ μορίων, με τη μέθοδο συντονισμού μεταφοράς ενέργειας (resonance energy transfer).

10. Βασικά φθορίζοντα μόρια βιολογικών ιστών

10.1. Φθορισμός αμινοξέων

Τα αμινοξέα είναι οι βασικές δομικές μονάδες των πρωτεϊνών. Τρία αμινοξέα με αρωματικές πλευρικές αλυσίδες, η τρυπτοφάνη, η τυροσίνη και η φαινυλαλανίνη είναι φθορίζοντα.. Ο φθορισμός των αμινοξέων παρατηρείται κυρίως για διέγερση στην περιοχή από 275 έως 295 nm. Από 280 έως 295 nm, τόσο η τρυπτοφάνη όσο και η τυροσίνη παρουσιάζουν φθορισμό, παρατηρείται όμως συνήθως μεταφορά ενέργειας από την τρυπτοφάνη στην τυροσίνη. Για μήκη κύματος διέγερσης μεγαλύτερα από 295 nm μόνο η τρυπτοφάνη φθορίζει. Για διέγερση με μήκη κύματος μικρότερα από 280 nm και τα τρία αμινοξέα μπορούν να εκπέμψουν φθορισμό, εντούτοις η κβαντική απόδοση της φαινυλαλανίνης είναι σχετικά χαμηλή σε σύγκριση με αυτή της τρυπτοφάνης και της τυροσίνης.



Σχήμα 4.: Τα φάσματα εκπομπής φθορισμού της φαινυλαλανίνης (■), τυροσίνης (▲) και τρυπτοφάνης (●).

Ο φθορισμός των αρωματικών αμινοξέων είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στο περιβάλλον. Συχνά παρατηρούνται φασματικές μετατοπίσεις σε αυτόν, λόγω διαφόρων φαινομένων όπως: δεσμοί με ειδικά μόρια, ομάδες αντικατάστασης, καταστάσεις

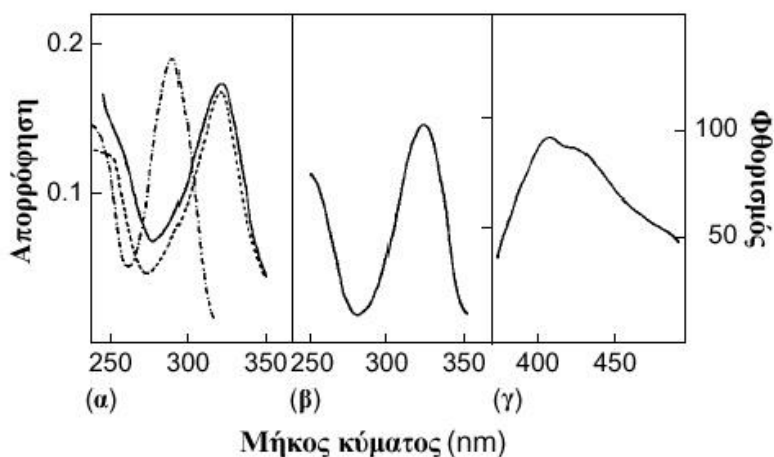
ιονισμού, αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών καθώς και αποδιαμόρφωση των πρωτεϊνών.

Η τρυπτοφάνη είναι το πιο ισχυρά φθορίζον αμινοξύ και γενικά συνεισφέρει κατά 90% στον συνολικό φθορισμό των πρωτεϊνών. Η κβαντική απόδοση σε φθορισμό της τρυπτοφάνης κυμαίνεται από 0.05 έως 0.48. Η τυροσίνη έχει μικρή κβαντική απόδοση στις περισσότερες πρωτεΐνες (0.01-0.03). Γενικά, οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης κοντά στα 280 nm, και το μέγιστο εκπομπής τους βρίσκεται ανάμεσα στα 320 με 350 nm.

10.2. Φθορισμός κολλαγόνου

Υπεύθυνο χρωμοφόρο για το φθορισμό του κολλαγόνου θεωρείται η πυριδινόλη.

Το μέγιστο της απορρόφησης της παρουσιάζεται στα 295 nm σε όξινο περιβάλλον και στα 325 nm σε ουδέτερο και βασικό διάλυμα. Το μέγιστο διέγερσης παρουσιάζεται στα 325 nm ενώ το μέγιστο φθορισμού γύρω στα 400 nm.



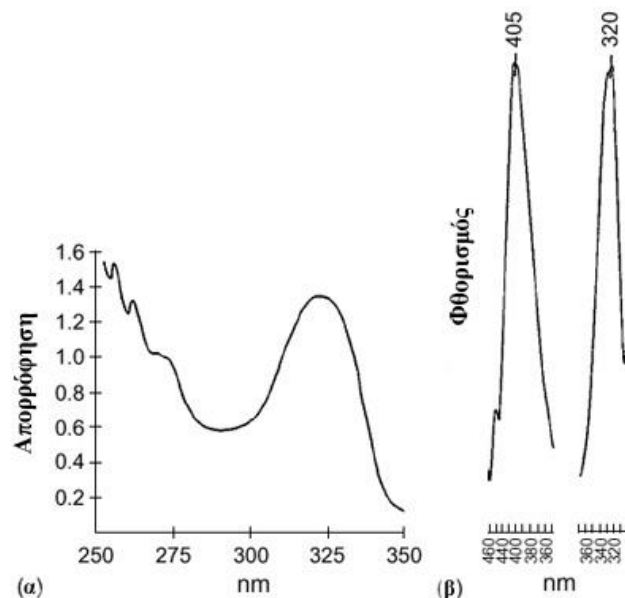
Σχήμα 5: (α) Φάσμα απορρόφησης κολλαγόνου σε 0.1 N HCl (-.-), σε 0.1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου pH 7.4 (---) και σε 0.1 N NaOH (—). (β) Φάσμα διέγερσης (εκπομπή στα 400 nm) σε διάλυμα 0.02 M φωσφορικού νατρίου pH 7.4, (γ) Φάσμα εκπομπής για το ίδιο διάλυμα και διέγερση στα 325 nm.

10.3. Φθορισμός συνενζύμων νουκλεοτιδίων

Τα νουκλεοτίδια και τα νουκλεϊκά οξέα των κυττάρων, εν γένει δεν παρουσιάζουν φθορισμό. Παρόλα αυτά διάφορα συνένζυμα των νουκλεοτιδίων όπως τα NADH, NADPH και FADH₂ φθορίζουν ισχυρά. Το NADH παρουσιάζει μέγιστη ένταση φθορισμού για διέγερση στα 340 nm ενώ τα NADPH και FADH₂ στα 460 nm.

10.4. Φθορισμός ελαστίνης

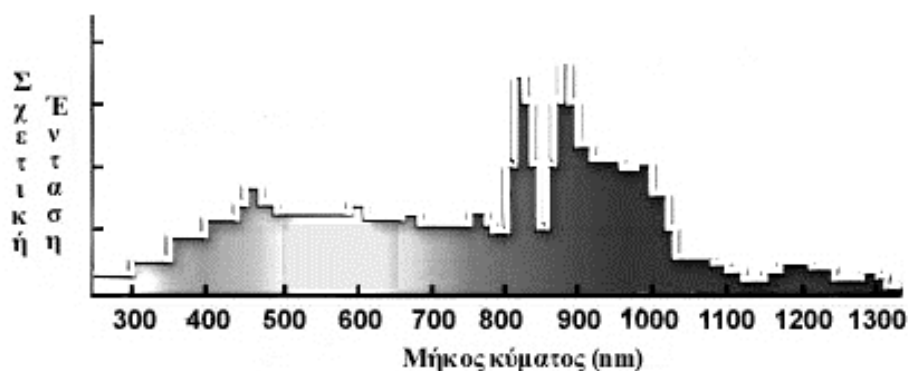
Το κυριότερο χρωμοφόρο της ελαστίνης είναι η πυριδινολίνη. Η σύγκριση της ελαστίνης από διαφορετικά είδη και με διαφορετικούς τρόπους απομόνωσης ανέδειξε ένα κοινό χρωμοφόρο με μέγιστο διέγερσης/εκπομπής στα 340/410 nm.



Σχήμα 6: (α) Φάσμα απορρόφησης, στην περιοχή του υπεριώδους, ελαστίνης σε 0.1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου. (β) Φάσματα εκπομπής και διέγερσης φθορισμού σε διάλυμα 0.1 M HCl.

11. Περιγραφή οπτικού συστήματος

Το όργανο που χρησιμοποιείται για την μελέτη του φθορισμού δειγμάτων ονομάζεται Φασματοφωτόμετρο Φθορισμού. Η πηγή φωτός διέγερσης είναι μια ειδική λυχνία ξένου αναλαμπής (Xenon flash tube), η οποία παράγει παλμούς μικρής χρονικής διάρκειας και μεγάλης έντασης. Η ενεργειακή φασματική κατανομή της πηγής φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.

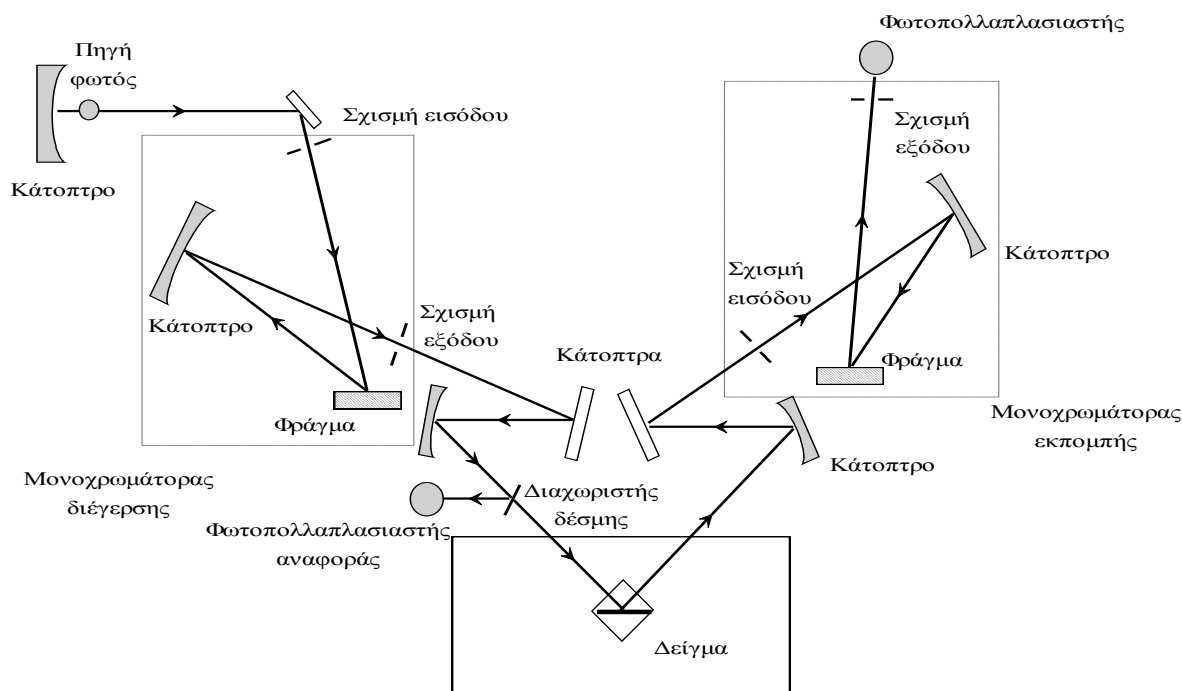


Σχήμα 7: Ενεργειακή φασματική κατανομή πηγής ξένου.

Στο σχήμα 8 που ακολουθεί, απεικονίζεται το οπτικό διάγραμμα για τη συλλογή των σημάτων φθορισμού. Η ακτινοβολία από τη λυχνία ξένου, με τη βοήθεια κατόπτρων εστιάζεται στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα διέγερσης, ο οποίος περιλαμβάνει φράγμα 1440 lines/mm και σφαιρικό κάτοπτρο για τη σωστή κάλυψη του φράγματος από τη φωτεινή δέσμη. Από τη σχισμή εξόδου εξέρχεται το μονοχρωματικό φως, σε συγκεκριμένη στενή φασματική περιοχή, με κεντρικό μήκος κύματος που καθορίζεται από τη γωνιακή θέση σάρωσης του φράγματος περίθλασης, που ελέγχεται από βηματικό κινητήρα. Η μονοχρωματική δέσμη διέγερσης προσπίπτει με τη βοήθεια κατόπτρων στο δείγμα (υπάρχει κατάλληλος υποδοχέας για κυψελίδα 10 mm) υπό γωνία 45° . Επίσης με ένα διαχωριστή δέσμης (beam splitter), ένα μικρό μέρος από τη δέσμη διέγερσης εστιάζεται σε φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς. Για τη διόρθωση της απόκρισης του φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς είναι αποθηκευμένη στο όργανο, καμπύλη αναφοράς ροδαμίνης B, η οποία διατηρεί σχεδόν σταθερή τη κβαντική απόδοση για απορρόφηση σε μήκη κύματος από 200 έως 600 nm και εκπομπή στα 630 nm.

Ο φθορισμός που εκπέμπεται από το δείγμα, σε γωνία 90° ως προς τη δέσμη διέγερσης, εστιάζεται από κάτοπτρα στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής, ο οποίος περιλαμβάνει οπτικό φράγμα περίθλασης 1200 lines/mm και σφαιρικό κάτοπτρο. Η στενή φασματική περιοχή που εξέρχεται από τη σχισμή εξόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής, η κίνηση του φράγματος του οποίου επίσης ελέγχεται από βηματικό κινητήρα, τελικά αναλύεται από φωτοπολλαπλασιαστή.

Οι μονοχρωμάτορες μπορούν να σαρώνουν ανεξάρτητα είτε συνδυαστικά και για εύρος πεδίου, το οποίο κυμαίνεται για μεν το μονοχρωμάτορα διέγερσης από 200 έως 800 nm, για δε το μονοχρωμάτορα εκπομπής από 200 έως 900 nm. Επίσης υπάρχει η δυνατότητα σύγχρονης σάρωσης, με σταθερή διαφορά μήκους κύματος διέγερσης και εκπομπής.



Σχήμα 8: Οπτικό διάγραμμα ενός Φασματοφωτόμετρου Φθορισμού.

Το εύρος της σχισμής αποτελεί σημαντική παράμετρο που καθορίζει τη διακριτική ικανότητα της διάταξης. Βελτίωση της διακριτικής ικανότητας επιτυγχάνεται με την ελάττωση του εύρους της σχισμής, παρουσιάζοντας όμως το μειονέκτημα μείωσης του φωτός που είτε διεγείρει το δείγμα είτε συλλέγεται για καταγραφή (υποδιπλασιασμός του εύρους της σχισμής συνεπάγεται μείωση κατά τέσσερις φορές του διερχόμενου φωτός).

Ως ανιχνευτές χρησιμοποιούνται φωτοπολλαπλασιαστές λόγω της ευαισθησίας και της γρήγορης απόκρισης τους.

12. Πειραματική διαδικασία

1. Η άσκηση θα πραγματοποιηθεί σε προσομοίωση H/Y και όχι σε πραγματικό οπτικό όργανο. Για την λήψη των μετρήσεων θα σας δοθεί ειδικό φυλλάδιο με αναλυτικές οδηγίες.
2. Εξοικειωθείτε με το πρόγραμμα προσομοίωσης του Φασματοφωτόμετρου Φθορισμού.
3. Επιλέξτε το διάλυμα Α και εντοπίστε τις κορυφές των φασμάτων απορρόφησης και εκπομπής του για δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις της φθορίζουσας ουσίας. Παρατηρείστε αν τα δύο φάσματα μεταβάλλονται με την αλλαγή της συγκέντρωσης.

4. Επιλέξτε την μέγιστη κορυφή του φάσματος εκπομπής (φθορισμού).
5. Σημειώστε την ένταση φθορισμού στο παραπάνω μήκος κύματος εκπομπής για τρία διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης, κρατώντας την συγκέντρωση σταθερή. Παρατηρείστε την συσχέτιση έντασης φθορισμού και μήκους κύματος διέγερσης.
6. Κρατώντας το μήκος κύματος διέγερσης σταθερό, σημειώστε την ένταση φθορισμού στο μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής για διάφορες συγκεντρώσεις της φθορίζουσας ουσίας. Παρατηρείστε την συσχέτιση έντασης φθορισμού και συγκέντρωσης.
7. Κάντε το γράφημα της έντασης φθορισμού συναρτήσει της συγκέντρωσης της φθορίζουσας ουσίας. Παρατηρείστε την μορφή της καμπύλης και συγκρίνετέ την με την θεωρητική.