

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΝΙΑΙΟΣ ΔΙΟΙΚΗΤΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΠΟΡΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ Ε.Π. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ

Εφαρμογή Σύγχρονων Αναλυτικών Τεχνικών
στην Ανάλυση Χημικών Ουσιών και Υλικών

Βασικές Αρχές Φασματοσκοπίας Φθορισμού

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2015



Βασικές Αρχές Φασματοσκοπίας Φθορισμού

Η διαδικασία φθορισμού

Φθορισμός είναι το αποτέλεσμα μιας διαδικασίας τριών σταδίων η οποία λαμβάνει χώρα σε ορισμένα μόρια (γενικά πολυαρωματικούς ή ετεροκυκλικούς υδρογονάνθρακες) που ονομάζονται χρωμοφόρα ή φθορίζουσες χρωστικές.

Ένας **δείκτης φθορισμού** είναι ένα χρωμοφόρο σχεδιασμένο για να ανταποκρίνεται σε ένα συγκεκριμένο ερέθισμα ή να εντοπίζεται σε μια συγκεκριμένη περιοχή ενός βιολογικού δείγματος. Η διαδικασία που είναι υπεύθυνη για τον φθορισμό του φθορίζοντος δείκτη ή άλλων χρωμοφόρων απεικονίζεται με το διάγραμμα ηλεκτρονικών καταστάσεων (διάγραμμα **Jablonski**) που φαίνεται στο Σχήμα 1.

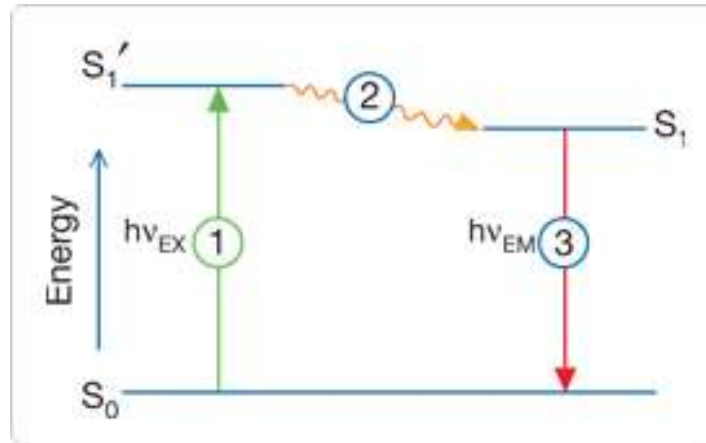


Figure 1. Jablonski diagram illustrating the processes involved in the creation of an excited electronic singlet state by optical absorption and subsequent emission of fluorescence.

R. P. Haugland *The Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Ninth ed., Molecular Probes, Eugene, **2002**

Βασικές Αρχές Φασματοσκοπίας Φθορισμού

Η διαδικασία φθορισμού

Φθορισμός είναι το αποτέλεσμα μιας διαδικασίας τριών σταδίων η οποία λαμβάνει χώρα σε ορισμένα μόρια (γενικά πολυαρωματικούς ή ετεροκυκλικούς υδρογονάνθρακες) που ονομάζονται χρωμοφόρα ή φθορίζουσες χρωστικές.

Ένας **δείκτης φθορισμού** είναι ένα χρωμοφόρο σχεδιασμένο για να ανταποκρίνεται σε ένα συγκεκριμένο ερέθισμα ή να εντοπίζεται σε μια συγκεκριμένη περιοχή ενός βιολογικού δείγματος. Η διαδικασία που είναι υπεύθυνη για τον φθορισμό του φθορίζοντος δείκτη ή άλλων χρωμοφόρων απεικονίζεται με το διάγραμμα ηλεκτρονικών καταστάσεων (διάγραμμα **Jablonski**) που φαίνεται στο Σχήμα 1.

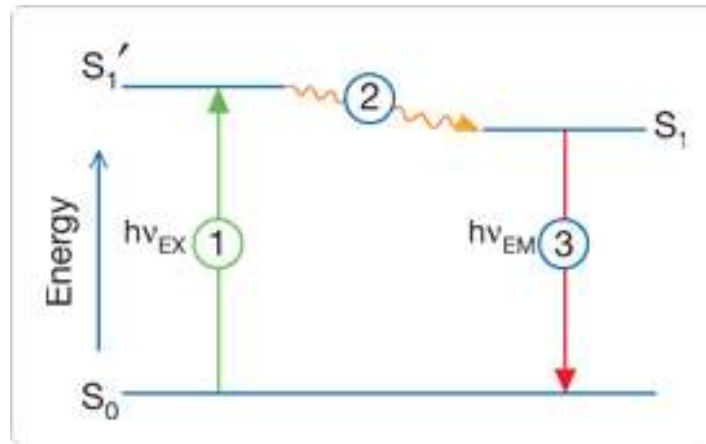


Figure 1. Jablonski diagram illustrating the processes involved in the creation of an excited electronic singlet state by optical absorption and subsequent emission of fluorescence.

R. P. Haugland *The Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Ninth ed., Molecular Probes, Eugene, **2002**

Βασικές Αρχές Φασματοσκοπίας Φθορισμού

Η διαδικασία φθορισμού

Φθορισμός είναι το αποτέλεσμα μιας διαδικασίας τριών σταδίων η οποία λαμβάνει χώρα σε ορισμένα μόρια (γενικά πολυαρωματικούς ή ετεροκυκλικούς υδρογονάνθρακες) που ονομάζονται χρωμοφόρα ή φθορίζουσες χρωστικές.

Ένας **δείκτης φθορισμού** είναι ένα χρωμοφόρο σχεδιασμένο για να ανταποκρίνεται σε ένα συγκεκριμένο ερέθισμα ή να εντοπίζεται σε μια συγκεκριμένη περιοχή ενός βιολογικού δείγματος. Η διαδικασία που είναι υπεύθυνη για τον φθορισμό του φθορίζοντος δείκτη ή άλλων χρωμοφόρων απεικονίζεται με το διάγραμμα ηλεκτρονικών καταστάσεων (διάγραμμα **Jablonski**) που φαίνεται στο Σχήμα 1.

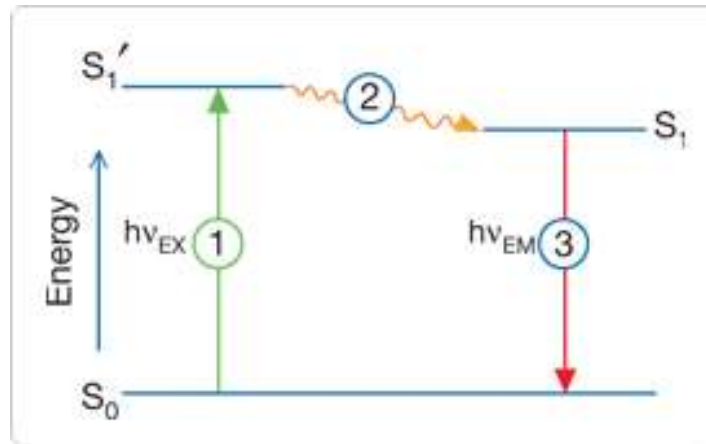
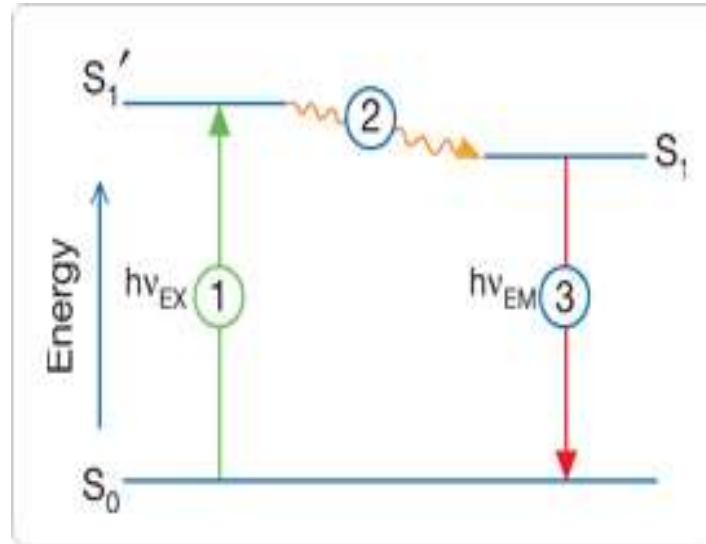


Figure 1. Jablonski diagram illustrating the processes involved in the creation of an excited electronic singlet state by optical absorption and subsequent emission of fluorescence.

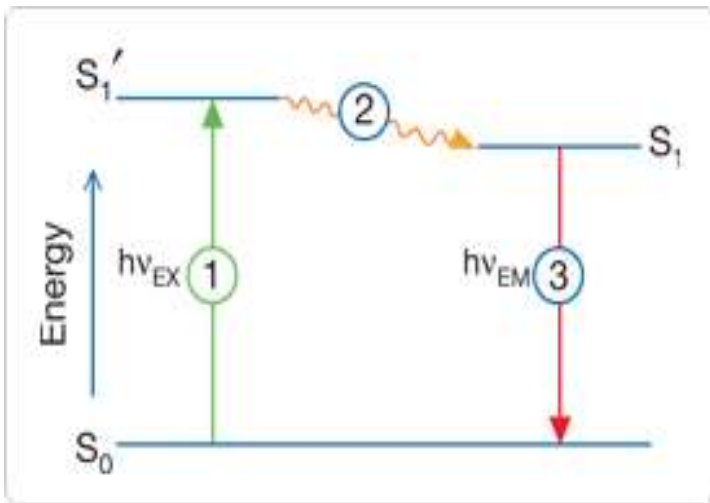
R. P. Haugland *The Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Ninth ed., Molecular Probes, Eugene, **2002**

Το διάγραμμα Jablonski



Στάδιο 1: Διέγερση

Ένα φωτόνιο ενέργειας $h\nu_{EX}$ παρέχεται από μια εξωτερική πηγή όπως μια λάμπα πυρακτώσεως ή ένα λέιζερ και απορροφάται από το χρωμόφορο δημιουργώντας μια διεγερμένη ηλεκτρονικά απλή κατάσταση (S_1'). Αυτή η μέθοδος διακρίνει φθορισμό από χημειοφωταύγεια, όπου η διέγερση στην S_1' είναι αποτέλεσμα μιας χημικής αντίδρασης.

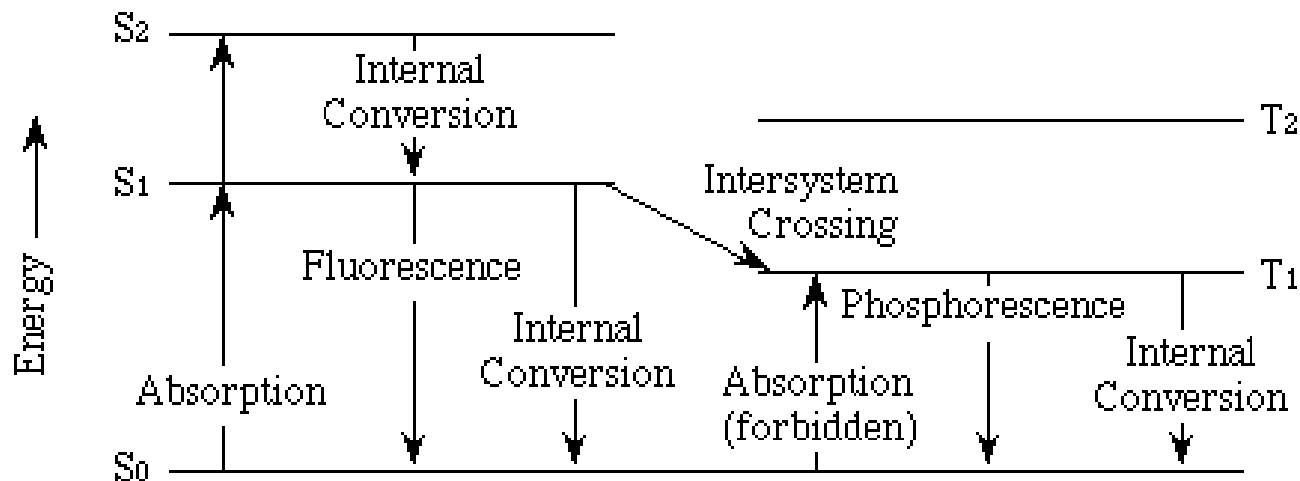


Το διάγραμμα Jablonski

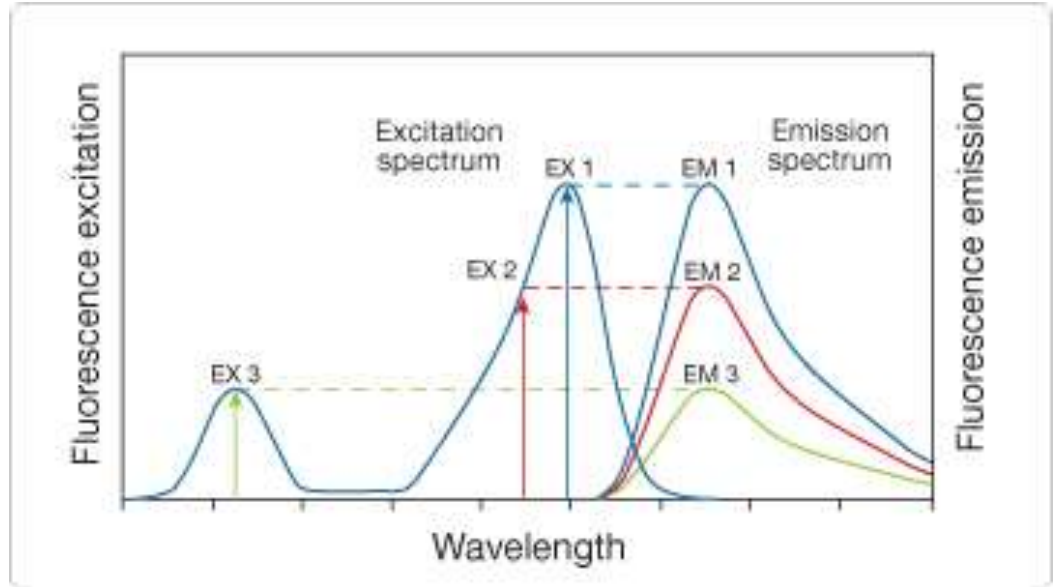
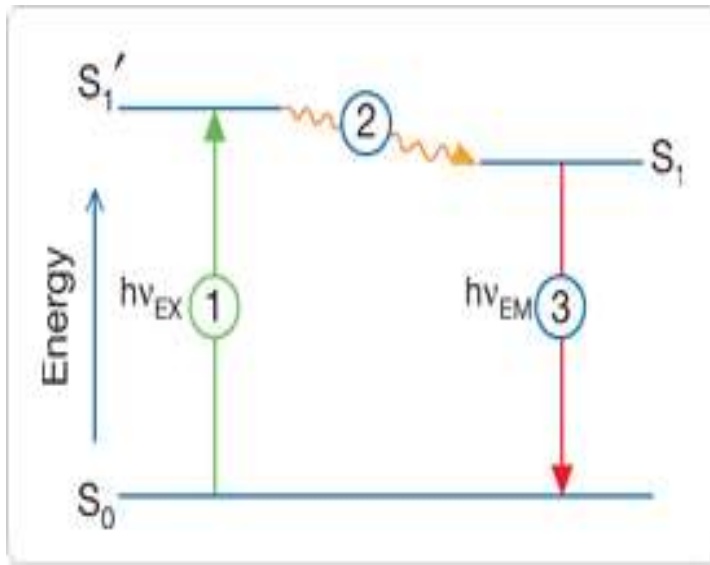
Στάδιο 2: διάρκεια ζωής διεγερμένης κατάστασης

Η διεγερμένη κατάσταση υφίσταται για ένα πεπερασμένο χρονικό διάστημα (συνήθως 1-10 νανοδευτερόλεπτα). Κατά τη διάρκεια του χρόνου αυτού, το χρωμοφόρο υφίσταται αλλαγές διαμόρφωσης και υπόκειται επίσης σε ένα πλήθος πιθανών αλληλεπιδράσεων με το μοριακό του περιβάλλον. Οι διαδικασίες αυτές έχουν δύο σημαντικές συνέπειες. Πρώτον, η ενέργεια του $S1'$ εν μέρει αποδιεγείρεται προς μία χαμηλότερης ενέργειας απλή διεγερμένη κατάσταση ($S1$), από την οποία προέρχεται η εκπομπή φθορισμού μέσω αποδιέγερσης στην βασική κατάσταση ($S0$). Άλλες διαδικασίες αποδιέγερσης της $S1$ είναι η Κρουστική Απόσβεση, η Μεταφορά Ενέργειας Συντονισμού Φθορισμού (FRET) και η Διασυστηματική Διασταύρωση. Η κβαντική απόδοση φθορισμού, είναι ο λόγος του αριθμού των φωτονίων φθορισμού που εκπέμπονται (Στάδιο 3) προς τον αριθμό των φωτονίων που απορροφώνται (Στάδιο 1), και είναι ένα μέτρο του βαθμού με τον οποίο συμβαίνουν αυτές οι διεργασίες.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΕΝΟΣ ΜΟΡΙΟΥ



Το διάγραμμα Jablonski

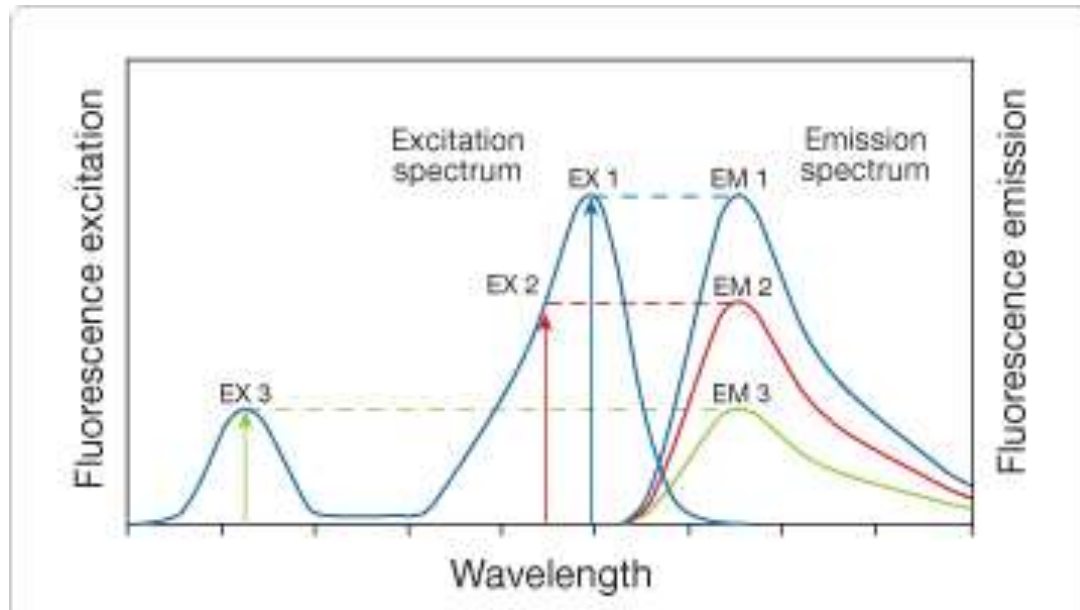


Στάδιο 3: η εκπομπή φθορισμού

Ένα φωτόνιο ενέργειας $h\nu_{EM}$ εκπέμπεται, επιστρέφοντας στη βασική του κατάσταση S_0 . Λόγω της αποδιέγερσης, η ενέργεια αυτού του φωτονίου τώρα είναι χαμηλότερη, και συνεπώς αντιστοιχεί σε ένα μεγαλύτερο μήκος κύματος, από αυτό της διέγερσης των φωτονίων $h\nu_{EX}$. Η διαφορά αυτή της ενέργειας ή του μήκους κύματος που αντιπροσωπεύεται από $(h\nu_{EX} - h\nu_{EM})$ ονομάζεται η μετατόπιση Stokes και μεταφράζεται σε εμφάνιση του φάσματος εκπομπής σε μεγαλύτερα μήκη κύματος από αυτά του φάσματος διέγερσης. Η μετατόπιση Stokes είναι θεμελιώδους σημασίας για την ευαισθησία των τεχνικών φθορισμού επειδή επιτρέπει τη μέτρηση της έντασης εκπομπής χωρίς παρεμβολή από τα φωτόνια διέγερσης.

Το φάσμα φθορισμού

Η όλη διαδικασία φθορισμού είναι κυκλική. Εκτός και αν το χρωμοφόρο καταστραφεί στη διεγερμένη κατάσταση (ένα σημαντικό φαινόμενο που είναι γνωστό ως φωτοαποχρωματισμός, (photobleaching), το ίδιο χρωμοφόρο μπορεί να διεγερθεί και να δώσει φθορισμό επανειλημμένα. Το γεγονός ότι ένα συγκεκριμένο μόριο μπορεί να δημιουργήσει πολλές χιλιάδες ανιχνεύσιμων φωτονίων είναι θεμελιώδες για την υψηλή ευαισθησία των τεχνικών ανίχνευσης φθορισμού. Για πολυατομικά μόρια σε διάλυμα, οι διακριτές ηλεκτρονικές μεταπτώσεις που αντιπροσωπεύεται από $h\nu_{EX}$ και $h\nu_{EM}$ στο Σχήμα 1 μεταφράζονται σε ευρέα φάσματα ενέργειας που ονομάζονται αντίστοιχα φάσμα διέγερσης και φάσμα φθορισμού. Τα εύρη ζώνης σε αυτά τα φάσματα είναι παράμετροι με ιδιαίτερη σημασία για εφαρμογές στις οποίες δύο ή περισσότερα διαφορετικά χρωμοφόρα διεγείρονται ταυτόχρονα.



Το φάσμα φθορισμού

Το φάσμα διέγερσης ενός συγκεκριμένου χρωμοφόρου σε αραιό διάλυμα είναι συνήθως ταυτόσημο με το φάσμα απορρόφησής του. Το φάσμα απορρόφησης μπορεί επομένως να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο των δεδομένων ενός φάσματος διέγερσης (σχήμα, μήκος κύματος μεγίστου). Υπό τις ίδιες συνθήκες, το φάσμα εκπομπής είναι ανεξάρτητο από το μήκος κύματος διέγερσης, λόγω της μερικής αποδιέγερσης της ενέργειας της S_1' διέγερσης κατά το χρόνο ζωής της διεγερμένης κατάστασης, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 1. Η ένταση εκπομπής είναι ανάλογη με την ένταση του φάσματος διέγερσης στο μήκος κύματος διέγερσης του μορίου (Εικόνα 2).

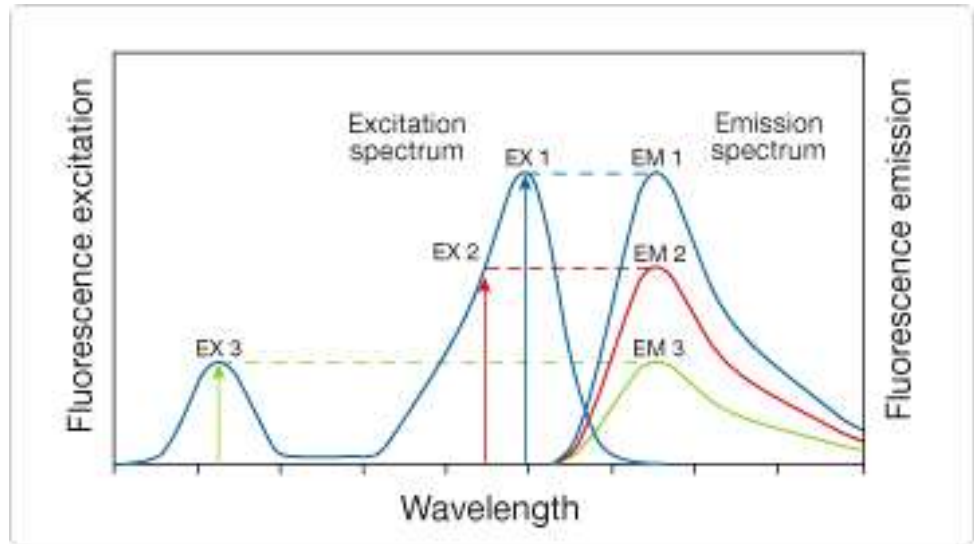
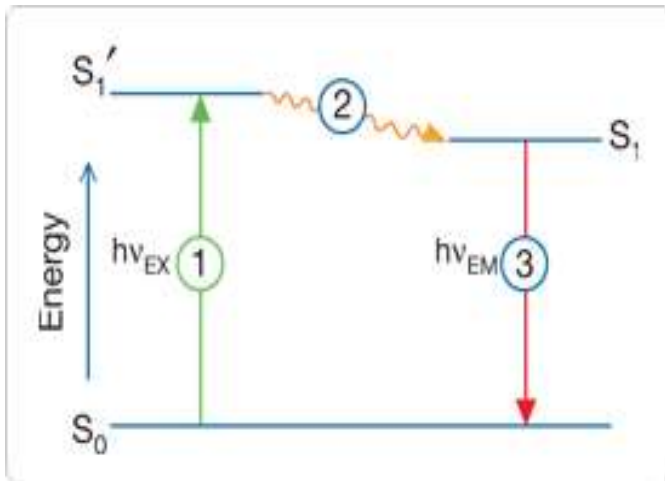
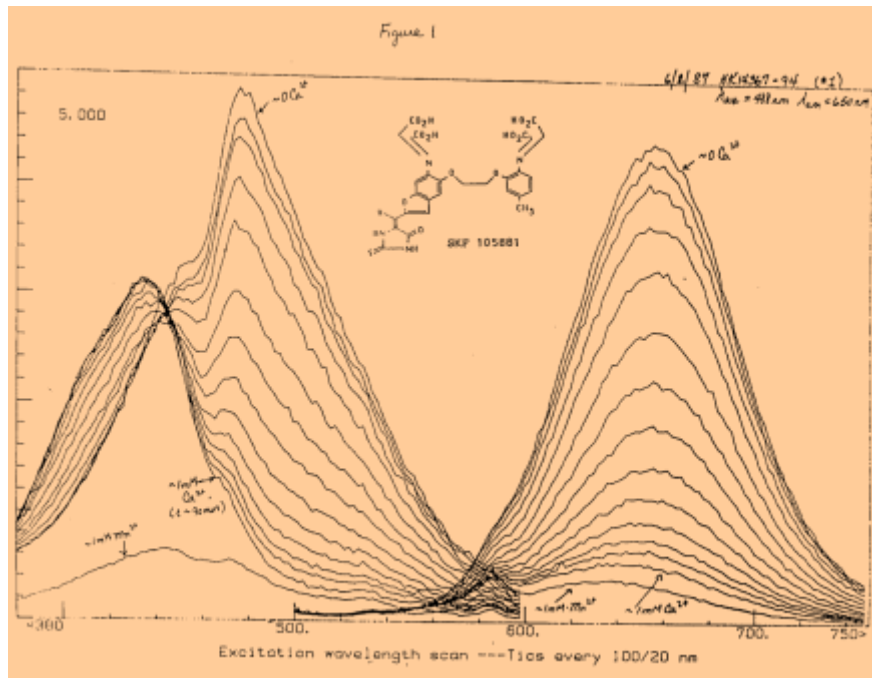


Figure 2. Excitation of a fluorophore at three different wavelengths (EX 1, EX 2, EX 3) does not change the emission profile but does produce variations in fluorescence emission intensity (EM 1, EM 2, EM 3) that correspond to the amplitude of the excitation spectrum.

Μετρήσεις Λόγων Φθορισμού (Ratiometric Measurements)

Σε ορισμένες περιπτώσεις, για παράδειγμα, στο φθορίζοντα δείκτη ιόντων Ca^{2+} FuraRed (Εικόνα 3), οι ελεύθερη μορφή και η δεσμευμένη με το ιόν μορφή έχουν διαφορετικά φάσματα διέγερσης (ή εκπομπής). Με αυτόν τον τύπο του δείκτη, ο λόγος των εντάσεων φθορισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της ισορροπίας δέσμευσης-αποδέσμευσης των ιόντων και για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των ιόντων $[\text{Ca}^{2+}]$. Πλεονεκτήματα της μεθόδου: η επαναληψιμότητα των μετρήσεων δεν επηρεάζεται την φωτοχημική καταστροφή μιας χρωστικής (Photobleaching), το μήκος της οπτικής διαδρομής, την ένταση ακτινοβολίας και τον τύπο του οργάνου.



$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \left(\frac{S_{f(\lambda_1)}}{S_{b(\lambda_1)}} \right)$$

Calculation of Ca^{2+} ion concentration in an unknown sample based on the dissociation constant K_d , and the ratios (R) of fluorescence

Photobleaching

Υπό συνθήκες υψηλής έντασης ακτινοβολίας, η αμετάκλητη καταστροφή ή photobleaching του διεγερμένου χρωμοφόρου γίνεται ο κύριος παράγοντας περιορισμού της ανιχνευσιμότητας του φθορισμού. Σε όλες τις περιπτώσεις, η καταστροφή αυτή προέρχεται από την τριπλή διεγερμένη κατάσταση, που δημιουργείται από μία απλή διεγερμένη κατάσταση μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται Διασυστηματική Διασταύρωση.

Στο Σχήμα 4 φαίνεται ότι ο φθορισμός που προέρχεται από ένα χρωμοφόρο όταν αυτό διεγερθεί στα 340 ή στα 380 nm μειώνεται διαχρονικά λόγω της φωτοκαταστροφής του μορίου, αλλά ο λόγος των τιμών φθορισμού παραμένει σταθερός.

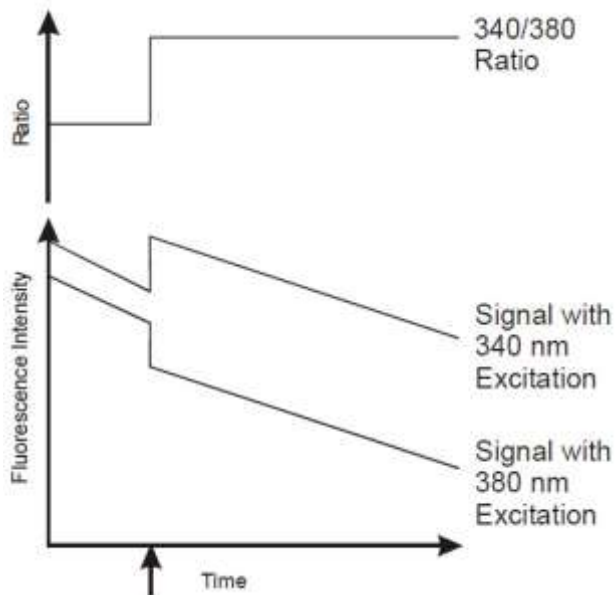


Figure 4. Hypothetical Experiment Demonstrating the Value of Ratiometric Fluorescence Calculations. The scheme demonstrates the hypothetical changes over time with the fluorescent emission at 505 nm when excited with 340 nm and 380 nm light.

Κβαντική Απόδοση φθορισμού (Φ_F)

Η κβαντική απόδοση φθορισμού (Φ_F) είναι ο λόγος των φωτονίων που απορροφώνται προς τα φωτόνια που εκπέμπονται μέσω φθορισμού.

$$(\Phi_F) = \# \text{ των φωτονίων που εκπέμπονται} / \# \text{ φωτονίων που απορροφώνται}$$

Η πιο αξιόπιστη μέθοδος για την καταγραφή της (Φ_F) είναι η συγκριτική μέθοδος η οποία περιλαμβάνει τη χρήση καλά χαρακτηρισμένων πρότυπων δειγμάτων με γνωστές τιμές (Φ_F). **Ουσιαστικά, διαλύματα των πρότυπων και των εξεταζόμενων δειγμάτων με πανομοιότυπη απορρόφηση στο ίδιο μήκος κύματος διέγερσης μπορεί να θεωρηθεί ότι απορροφούν τον ίδιο αριθμό φωτονίων.** Ως εκ τούτου, μια απλή αναλογία των ολοκληρωμένων εντάσεων φθορισμού των δύο διαλυμάτων (που καταγράφονται υπό ταυτόσημες συνθήκες), θα δώσει την αναλογία των κβαντικών τιμών απόδοσης. Αφού η (Φ_F) για το πρότυπο δείγμα είναι γνωστή, είναι εύκολο να υπολογισθεί η (Φ_F) για το υπό μελέτη δείγμα.

Τι χρειαζόμαστε για τον υπολογισμό του (Φ_F) μιας νέας φθορίζουσας ένωσης;

Τα πρότυπα δείγματα. Τα τυποποιημένα δείγματα πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε να διασφαλίζεται ότι απορροφούν το μήκος κύματος διέγερσης που επιλέχθηκε για το υπό μελέτη δείγμα και, αν είναι δυνατόν, να εκπέμπουν σε παρόμοια περιοχή με αυτή του δείγματος. Τα τυποποιημένα δείγματα πρέπει να είναι καλά χαρακτηρισμένα και κατάλληλα για τη χρήση αυτή.

Η Φ_F ενός χρωμοφόρου προσδιορίζεται σε σχέση με την ένωση αναφοράς γνωστής Φ_F . Αν το ίδιο μήκος κύματος διέγερσης, είναι το ίδιο, όπως και και σχισμή εύρος ζώνης που εφαρμόζονται για τα δύο δείγματα τότε ο Φ_F υπολογίζεται ως:

$$\Phi_F = \Phi_{Fref} \frac{n^2}{n_{ref}^2} \frac{I}{A} \frac{A_{ref}}{I_{ref}}$$

όπου Φ_{Fref} είναι η **κβαντική απόδοση της ένωσης αναφοράς**, n είναι ο **δείκτης διάθλασης του διαλύτη**, I είναι η **ολοκληρωμένη ένταση φθορισμού** και το A είναι η **απορρόφηση στο μήκος κύματος διέγερσης**. Είναι πρωταρχικής σημασίας η μηδενική τιμή του φάσματος απορρόφησης (*baseline*) να είναι σχεδόν τέλεια κατά τον υπολογισμό της κβαντικής απόδοσης φθορισμού.

Excimers

Μερικές ενώσεις, όταν διεγερθούν, αλληλεπιδρούν για να σχηματίσουν τα ονομαζόμενα *excimers*, που είναι διμερή διεγερμένης κατάστασης και που εμφανίζουν αλλοιωμένα φάσματα εκπομπής.

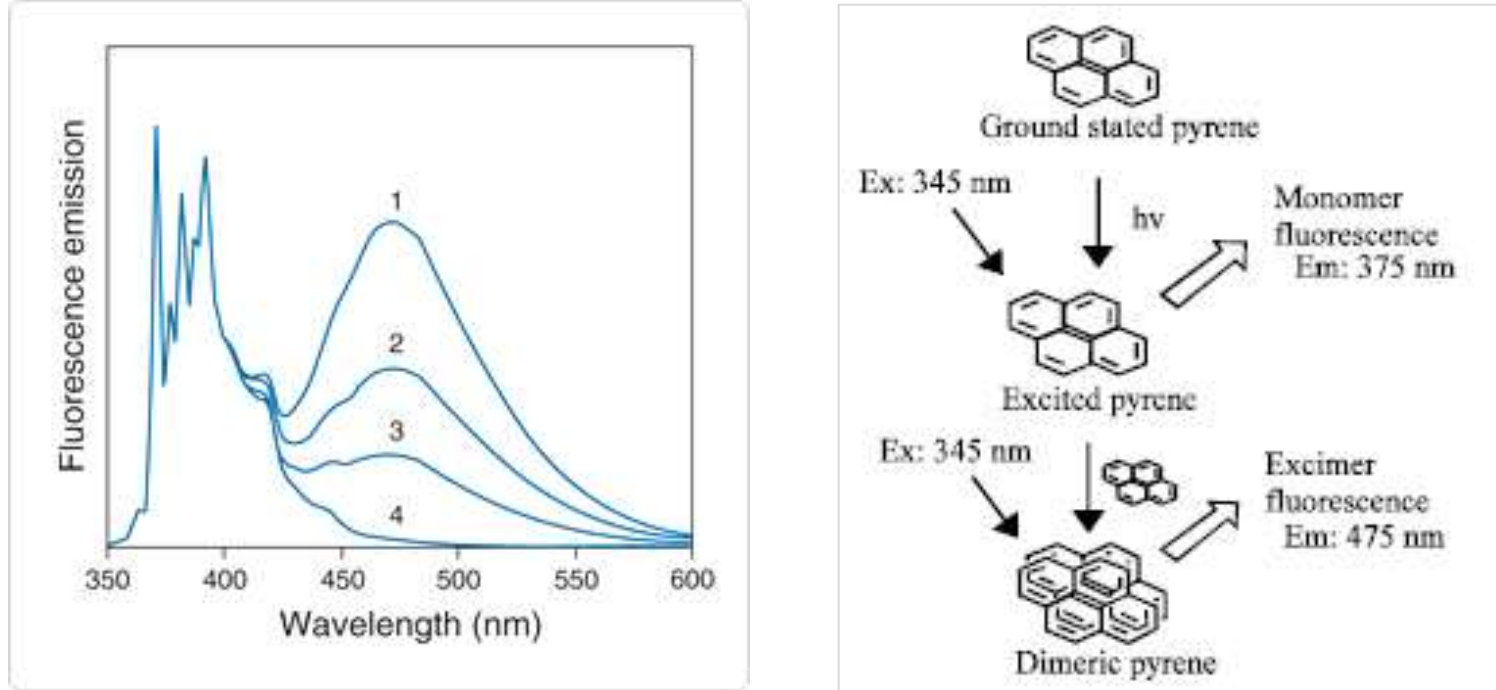
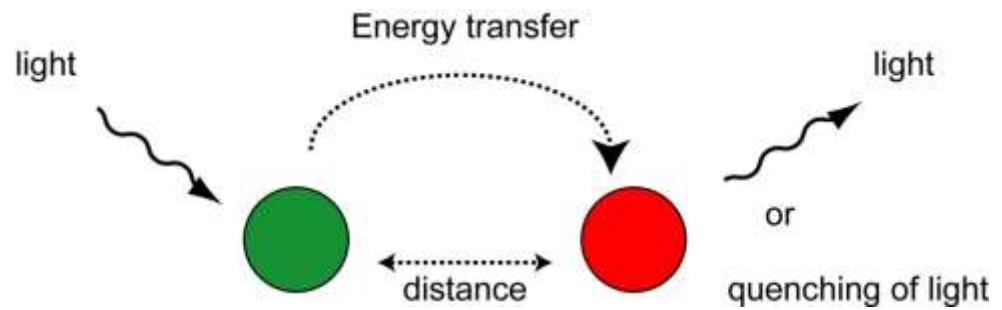


Figure 5. Excimer formation by pyrene in ethanol. Spectra are normalized to the 371.5 nm peak of the monomer. All spectra are essentially identical below 400 nm after normalization. Spectra are as follows: **1) 2 mM** pyrene, purged with argon to remove oxygen; **2) 2 mM** pyrene, air-equilibrated; **3) 0.5 mM** pyrene (argon-purged); and **4) 2 μ M** pyrene (argon-purged). The monomer-to-excimer ratio (371.5/470 nm) is dependent on both pyrene concentration and the excited-state lifetime, which is variable because of quenching by oxygen.

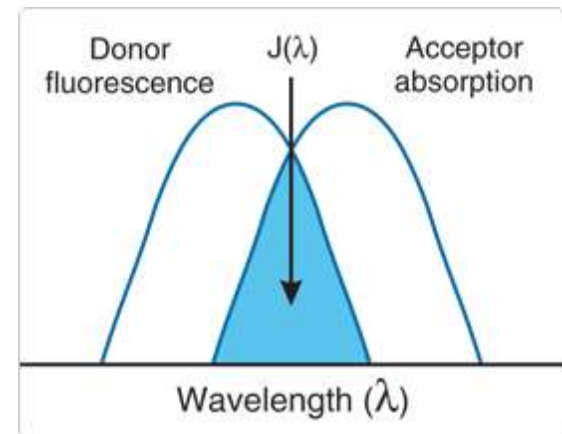
Fluorescence resonance energy transfer (FRET)

Η μεταφορά ενέργειας συντονισμού φθορισμού (FRET) είναι μια εξαρτώμενη από την απόσταση αλληλεπίδραση μεταξύ των διεγερμένων ηλεκτρονικών καταστάσεων δύο μορίων στην οποία ενέργεια διέγερσης μεταφέρεται από ένα μόριο δότη σε ένα μόριο δέκτη χωρίς εκπομπή ενός φωτονίου. Η αποδοτικότητα της FRET εξαρτάται από την αντίστροφη έκκτη δύναμη της διαμοριακής απόστασης καθιστώντας τη χρήσιμη σε αποστάσεις συγκρίσιμες με τις διαστάσεις των βιολογικών μακρομορίων.

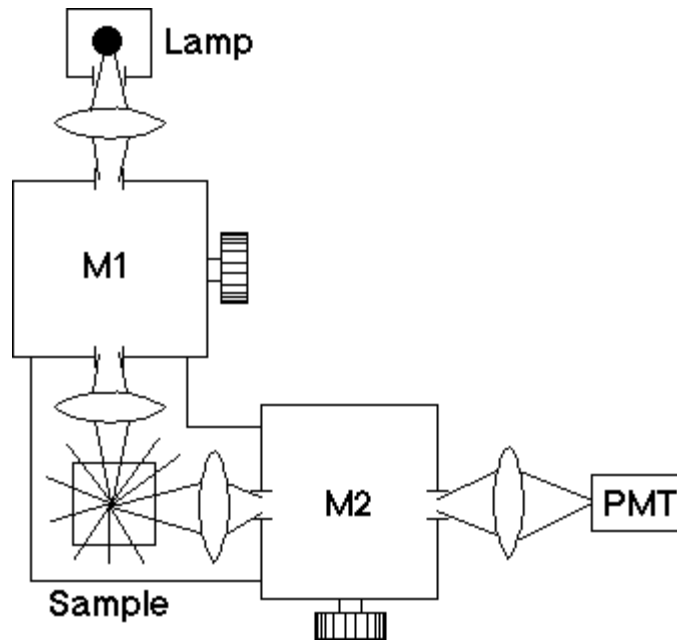


Βασικές προϋποθέσεις για FRET

Τα μόρια του δότη και του δέκτη πρέπει να είναι σε στενή γειτνίαση (τυπικά 10-100 Å) και το φάσμα απορρόφησης του δέκτη πρέπει να επικαλύπτει το φάσμα εκπομπής φθορισμού του δότη.



ΤΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΟ



Τα **φάσματα εκπομπής** λαμβάνονται όταν ο μονοχρωμάτορας διέγερσης M1 είναι σταθερός σε ένα μήκος κύματος και ο μονοχρωμάτορας εκπομπής M2 σαρώνεται.

Εάν το M2 είναι σταθερό και το M1 σαρώνεται το αποτέλεσμα είναι ένα **φάσμα διέγερσης**.

Τα φάσματα διέγερσης και της απορρόφησης θα πρέπει να είναι ταυτόσημα.