

2. BIOLOGINIŲ OBJEKTŲ LIUMINESCENCIJA.

2.1 Įvadas. Liuminescencijos reiškinys

Daugelis fotofizikinių ir fotocheminių vyksmų yra šviesos sąveikos su bioobjektu pasekmės. Vienas iš pagrindinių – šviesos emisijos vyksmas, kuris, be abejonės, yra labai informatyvus tiriant ne tik bioobjektus ar biostruktūras, bet ir pačiame bioobjekte vykstančius procesus. Bendresniu pavadinimu šis reiškinys žinomas kaip liuminescencija, kuri jungia du optiškai sužadintos molekulės energijos relaksacijos kelius – fluorescenciją ir fosforescenciją. Kaip minėta ankstesniame skyriuje, molekulei sugėrus šviesos kvantą, išorinės orbitalės elektronas peršoka į vieną iš laisvų molekulės elektroninių lygmenų ir molekulė tampa energiška sužadinta. Molekulė turi rinkinį neužpildytų lygmenų ir elektrono šuolį į tuščią lygmenį lemia fotono energijos dydis, arba, tiksliau, šviesos bangos ilgis. Sužadinta molekulė yra nepusiausvyrosios būsenos, todėl visada stengiasi užimti energiška žemiausią padėtį, tai yra relaksuoja į pagrindinę nesužadintą būseną, perteklinę energiją atiduodama aplinkinėms molekulėms, transformuodama ją į savo atomų virpesinę ir / ar rotacinę energiją, arba išspinduliuodama energiją šviesos kvanto pavidalu, t. y., liuminescuodama.

Liuminescencijos reiškinio nereikėtų painioti su kūno šiluminiu spinduliavimu – jį aptarsime kitame skyrelyje. Remiantis S. Vavilovo apibrėžimu, liuminescencija vadiname tam tikros temperatūros kūno perteklinį (virš šiluminio spinduliavimo) švytėjimą tam tikroje spektro srityje, jeigu šis perteklinis švytėjimas iš karto neišnyksta pašalinus jį sukeliančią priežastį. Vėliau S. Vavilovas patikslino savo apibrėžimą pridėdamas trukmės kriterijų: liuminescencija yra švytėjimo perteklius virš šiluminio spinduliavimo, jeigu jis turi baigtinę trukmę – maždaug 10^{-10} s ir daugiau. Švytėjimo trukmė yra tiesiogiai susijusi su molekulių sužadintosios būsenos gyvavimo trukme. Tai gana būdingas liuminescencijos požymis, skiriantis ją nuo šviesos sklaidos, atspindžio ir kitų reiškinų. Vėliau buvo sukurtas dar vienas liuminescencijos apibrėžimas, apibūdinant ją kaip nepusiausvirąjį sužadintų dalelių arba iš jų sudarytų medžiagų spinduliavimą. Nepusiausvirasis švytėjimo pobūdis atskiria liuminescenciją nuo šiluminio spinduliavimo, kuris vyksta esant pusiausvirajam elektronų pasiskirstymui dalelių energijos lygmenyse. Deja, visa apimančio liuminescencijos apibrėžimo taip ir nepavyko

suformuluoti, tad atsižvelgiant į objekto tyrimo sąlygas ir liuminescencijos savybes, pabrėžiami vieni ar kiti liuminescencijos parametrai. Praktinio pritaikymo požiūriu svarbu tai, kad liuminescenciją galima stebėti arba registruoti jautriais prietaisais ar medžiagomis, ir iš liuminescencijos parametrų rinkinio ne tik identifikuoti konkrečią molekulę, bet ir atpažinti biologinius objektus bei sistemas.

Pagal švytėjimo trukmę liuminescencija skirstoma į fluorescenciją (10^{-11} – 10^{-8} s), fosforescenciją ($>10^{-6}$ s) ir uždelstą fluorescenciją. Uždelstoji fluorescencija būdinga medžiagoms, kurių energinis tarpas tarp S_1 ir T_1 lygmenų yra mažas (maždaug $k \cdot T$ eilės). Uždelstosios fluorescencijos dažnis lygus fluorescencijos dažniui, tačiau švytėjimo trukmė yra daug ilgesnė.

Gamtoje vykstanti liuminescencija taip pat yra skirstoma pagal jos sužadavimo pobūdį:

- fotoluminescencija* – švytėjimui naudojama sugertos šviesos energija,
- (bio-)chemiliuminescencija* – švytėjimas sąlygotas biologinėse sistemose vykstančių cheminių reakcijų metu susidariusios perteklinės energijos virsmų,
- termoluminescencija* – šildomų medžiagų švytėjimas (pasireiškia esant žemai tripletinio lygmens padėčiai energijos skalėje),
- elektroliuminescencija* – sužadinama stipriu elektriniu lauku,
- sonoluminescencija* – ultragarso poveikyje atsiradęs švytėjimas,
- triboluminescencija* – švytėjimas dėl trinties,
- katodoluminescencija* – sužadinama katodiniais spinduliais,
- rentgenoluminescencija* – sužadinama rentgeno spinduliais,
- radioluminescencija* – sužadinama greitosiomis dalelėmis.

2.2 Molekulių sugerties ir fluorescencijos charakteristikų ryšys

Tarkime, kad idealių molekulių, kurios visą sugertą energiją paverčia šviesos kvantais (fluorescencija), sistemą pasiekiančio šviesos pluošto intensyvumas yra I . Tokiame pluošte fotonų skaičius bus $I/h\nu$, o sugertų fotonų skaičius sistemos tūrio vienetu – $\sigma \cdot n \cdot I/h\nu$. Nuostovaus žadinimo sąlygomis sugertų fotonų skaičius per 1 s turi būti lygus išspinduliuotų fotonų skaičiui:

$$\sigma n \frac{I}{h\nu} = k_{fl} n^*; \quad (2.4.1)$$

čia k_{fl} - fluorescencijos spartos konstanta [s^{-1}], n^* - sužadintų molekulių koncentracija. Perrašome (2.4.1) išraišką:

$$\sigma(\nu) n \frac{I}{h\nu} = \frac{k_{fl}(\nu) n^* h\nu_{fl}}{h\nu_{fl}}; \quad (2.4.2)$$

čia ν_{fl} - fluorescencijos dažnis, h - Planko konstanta, o sugerties skerspjūvis $\sigma(\nu) \cdot n = k(\nu)$ (žr. (1.5.7) išraišką).

Kairėje lygybės pusėje esantis narys $I/h\nu$ nuostovaus žadinimo sąlygomis išlieka pastovus, t. y., $I/h\nu = const$. Dešinėje pusėje esantis narys $k_{fl}(\nu) \cdot n^* \cdot h\nu_{fl}$ išreiškia fluorescencijos intensyvumą I_{fl} . Tada (4.4.2) išraišką galima užrašyti šitaip:

$$k(\nu) \cdot const = \frac{I_{fl}}{h\nu_{fl}}. \quad (2.4.3)$$

Ši išraiška naudojama sugretinant sugerties ir fluorescencijos spektrus, o taip pat skaičiuojant grynai elektroninio šuolio dažnį. Ji yra išvesta idealioms molekulėms, kai kiekvieną sugerties aktą lydi fluorescencijos aktas. Praktikoje, kaip taisyklė, dalis sugertos energijos gali būti prarasta kitais būdais (žr. 1.27 pav.). Tačiau įvertinus energijos nuostolius (2.4.3) išraiška gali būti pritaikoma ir tuomet. Lyginant sugerties ir fluorescencijos spektrus, (2.4.3) išraiškoje vietoje sugerties koeficiento $k(\nu)$ galima naudoti ekstinkcijos koeficientą $\varepsilon(\nu)$.

Fluorescencija apibūdinama jos trukme $\tau_{fl} = 1/k_{fl}$. Eksperimentiškai išmatuojama jos gyvavimo trukmė τ_g visuomet mažesnė už teorinę τ_{fl} , nes lygmens S_1 užpildos mažėjimą beveik visuomet sąlygoja ne vienas, bet keli vyksmai: fluorescencija (k_{fl}), vidinė (k_v) ir interkombinacinė (k_{IK}) konversija bei gesinimas (k_g), jeigu tirpale yra gesiklis (pvz., deguonis). Taigi, tikroji fluorescencijos gyvavimo trukmė lygi:

$$\tau_g = \frac{1}{k_{fl} + k_v + k_{IK} + k_g [Q]}; \quad (2.4.4)$$

čia $[Q]$ – gesiklio koncentracija.

2.3 Fluorescencijos kvantinis našumas

Fluorescenciją galima charakterizuoti jos energiniu arba kvantiniu našumu. Energinis našumas - išspinduliuotos E_{fl} ir sugertos E_s energijų santykis:

$$\varphi_{en} = \frac{E_{fl}}{E_s}. \quad (2.5.1)$$

Kvantinis našumas - per tą patį laiką išspinduliuotų N_{fl} ir sugertų N_s fotonų skaičių santykis:

$$\varphi_{kv} = \frac{N_{fl}}{N_s}. \quad (2.5.2)$$

Nesunku įsitikinti, kad

$$\varphi_{en} = \varphi_{kv} \frac{\nu_{fl}}{\nu_s}, \quad (2.5.3)$$

čia ν_{fl} ir ν_s - vidutinės fluorescencijos ir sugerties dažnių vertės. Kadangi $\nu_s > \nu_{fl}$, tai $\varphi_{en} < \varphi_{kv}$.

Pagal Lomelio (Lommel) dėsnį sužadintos molekulės fluorescuoja visomis kryptimis, todėl, matuojant energinį fluorescencijos našumą, reikia tiksliai išmatuoti sugertos ir į visą erdvę išspinduliuotos energijos srautų absoliutines vertes.

Apskaičiuoti fluorescencijos energinį ir kvantinį našumą pagal (2.5.1 – 2.5.3) išraiškas, remiantis absoliutiniais sugertos ir išspinduliuotos energijos matavimais, yra sudėtinga. Dėl šios priežasties fluorescencijos kvantinis našumas praktikoje dažniausiai matuojamas palyginamuoju būdu. Jo esmę sudaro tai, kad vienodomis eksperimento sąlygomis yra išmatuojami etalono ir tiriamojo tirpalo fluorescencijos integraliniai intensyvumai. Tuomet tiriamosios medžiagos fluorescencijos kvantinis našumas:

$$\varphi_{kv} = const \cdot \varphi_{kv}^{et} \frac{\int F(\lambda) d\lambda \int c^{et} \varepsilon^{et}(\lambda) d\lambda}{\int F^{et}(\lambda) d\lambda \int c \varepsilon(\lambda) d\lambda}, \quad (2.5.4)$$

čia $F(\lambda)$ ir $F^{et}(\lambda)$ – tiriamojo bandinio ir etalono kvantinio intensyvumo funkcijos ($F(\lambda) = I_{fl}/h\nu_{fl}$), φ_{kv}^{et} – etalono fluorescencijos kvantinis našumas, $const$ – spektrų korekcijos koeficientas.

Fluorescencijos kvantinį našumą taip pat galima užrašyti naudojant fluorescencijos, vidinės ir interkombinacinės konversijų greičio konstantas:

$$\varphi_{kv} = \varphi = \frac{k_{fl}}{k_{fl} + k_v + k_{IK}}. \quad (2.5.5)$$

Jeigu tirpale yra gesiklis (pvz., deguonis), tai fluorescencijos kvantinis našumas bus mažesnis ir lygus

$$\varphi_g = \frac{k_{fl}}{k_{fl} + k_v + k_{IK} + k_g [Q]} \quad (2.5.6)$$

Fluorescencijos kvantinių našumų terpėje be gesiklio ir esant gesikliui santykį aprašo Šterno (Stern) ir Folmerio (Vollmeer) formulė:

$$\frac{\varphi}{\varphi_g} = 1 + K[Q], \quad (2.5.7)$$

kur fluorescencijos gesinimo konstanta

$$K = \frac{k_g}{k_{fl} + k_v + k_{IK}} \quad (2.5.8)$$

Atliekant eksperimentą matuojamas fluorescencijos intensyvumas, todėl kvantinį našumą patogiau užrašyti naudojant intensyvumus:

$$\frac{\varphi}{\varphi_g} = \frac{\kappa \varphi I_0}{\kappa \varphi_g I_0} = \frac{I}{I_g} \quad (2.5.9)$$

2.4 Liuminescencijos žadinimo spektrai. Liuminescencinė analizė

Nagrinėjant biosistemas ir bioobjektus, jų liuminescencinių savybių tyrimai yra vieni informatyviausių. Kokybinė liuminescencinė analizė naudojama atskirų molekulių bei jų charakteristikų kitimo tyrimuose. Molekulės pasižymi charakteringais fluorescencijos spektrais, be to, fluorescencijos spektrų charakteristikos yra jautrios aplinkos sąlygoms ir molekulių tarpusavio sąveikai. Nemažiau svarbi ir antroji liuminescencijos tyrimų pusė – jos kiekybinių parametru įvertinimas. Matuojant fluorescencijos spektro intensyvumą galima nustatyti ir molekulių koncentraciją.

Jeigu žadintume liuminescenciją monochromatine šviesa, atsiranda galimybė išmatuoti bandinio liuminescencijos intensyvumo priklausomybę nuo sugertų kvantų skaičiaus. Didesnis sugertų žadinančios spinduliuotės kvantų skaičius, aišku, lems ir didesnę fluorescencijos intensyvumą:

$$I_{fl} = \kappa \varphi I_0 (1 - T) = \kappa \varphi I_0 (1 - 10^{-\epsilon c l}) \quad (2.6.1)$$

čia I_0 – krintančios spinduliuotės intensyvumas, φ_{fl} – fluorescencijos kvantinis našumas, T – bandinio pralaidumas, κ – dydis, priklausantis nuo pasirinktos matavimo aparatūros charakteristikų: surenkamos šviesos erdvinio kampo, monochromatoriumi ar šviesos filtru apriboto spektro pločio ir šviesos imtuvo jautrio. Kadangi nei φ_{fl} , nei aparatūros konstanta κ nepriklauso nuo žadinančios šviesos bangos ilgio, tai matuojamo fluorescencijos intensyvumo pokyčiai (dažniausiai registruojami ties intensyviausios fluorescencijos juostos maksimumu), žadinant bandinį skirtingų bangos ilgių šviesa, atspindi bandinio (tiriamosios medžiagos) sugerties spektrą. Ši priklausomybė vadinama fluorescencijos žadinimo spektru. Bandiniams, kurių optinio tankio $D = \varepsilon cl$ vertė neviršija 0,1, išskleidus bandinio pralaidumo T išraišką eilute ir atsižvelgiant tik į jos tiesinį narį, fluorescencijos intensyvumą ir optinį tankį galima susieti tiesine priklausomybe, pasiekiant mažesnę nei 5 % paklaidą. Tuomet (2.6.1) sąryšis užrašomas taip:

$$I_{fl} / I_0 \cong \ln 10 \kappa \cdot \varphi_{fl} \cdot D \cong 2,3 \kappa \cdot \varphi_{fl} \cdot D \quad (2.6.2)$$

Taigi, kai tiriama bandinio optinis tankis nedidelis, liuminescencijos intensyvumas proporcingas molekulių bandinyje koncentracijai. Tiesa, aparatūrinės konstantos κ dydis nėra lengvai nustatomas, tad dažniausiai tiriama bandinio molekulių koncentracija nustatoma lyginat išmatuotą fluorescencijos intensyvumą (I) su žinomos koncentracijos (c_{st}) etaloninio tirpalo fluorescencijos intensyvumu (I_{st}). Šiuo atveju tiriama bandinio koncentracija yra lygi

$$c = c_{st} \cdot \frac{I}{I_{st}} \quad (2.6.3)$$

Tačiau, jei tiriamas kelių medžiagų mišinys, bei galimas energijos perdavimas iš vienos sužadintoje būsenoje esančios medžiagos kitai medžiagai, (2.6.2) sąryšis negalios.