

2. BIOLOGINIŲ OBJEKTŲ LIUMINESCENCIJA.

2.1. Įvadas. Liuminescencijos reiškinys

Šviesos sąveikos su bioobjektu pasekmėje vyksta daugelis fotofizikinių ir fotocheminių procesų. 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 apjungia 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 sąlygoja fotono energijos dydis, arba, tiksliau, šviesos bangos ilgis. Sužadinta molekulė yra nepusiausvyrinėje būsenoje, 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, kurį aptarsime kitame skyrelyje. Remiantis 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 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 sužadintos būsenos gyvavimo trukme. Tai gana būdingas liuminescencijos požymis, skiriantis ją nuo šviesos sklaidos, atspindžio ir kitų reiškinų. Vėliau buvo įvestas dar vienas liuminescencijos apibrėžimas, apibūdinant ją kaip nepusiausvyrinį sužadintų dalelių, arba iš jų sudarytų medžiagų spinduliavimą. Nepusiausvyrinis švytėjimo pobūdis atskiria liuminescenciją nuo šiluminio spinduliavimo, kuris vyksta esant pusiausvyriniam elektronų pasiskirstymui dalelių energijos lygmenyse. Deja, visa apimančio liuminescencijos apibrėžimo taip ir nepavyko suformuluoti, tad, priklausomai nuo objekto tyrimo sąlygų ir liuminescenciją palydinčių reiškinų, pabrėžiamos vienos ar kitos būdingosios liuminescencijos savybės. 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 žymiai ilgesnė.

Gamtoje stebima liuminescencija taip pat yra skirstoma pagal jos sužadinimo pobūdį:

- fotoluminescencija* – švytėjimui naudojama sugertos šviesos energija,
- (bio-)chemiliuminescencija* – švytėjimas sąlygotas perteklinės energijos virsmų, susidarantių (biologiniuose objektuose vykstančių) cheminių reakcijų metu,
- termoluminescencija* – medžiagų švytėjimas jas pašildžius (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 greitomis dalelėmis.

2.2. Absoliučiai juodo kūno spinduliavimas ir liuminescencija

Absoliučiai juodo kūno spinduliavimas. Iš visų žinomų spinduliavimo rūšių šiluminis spinduliavimas išsiskiria viena išskirtine savybe. Patalpinkime tam tikroje ertmėje, kurios sienelės visiškai atspindi šviesą, įkaitintą kūną. Jei per laiko vienetą šis kūnas išspinduliuos daugiau energijos nei sugers, tai jo temperatūra turės mažėti (ir atvirkščiai). Tokiu būdu spinduliuotės intensyvumas didės ar mažės, kol pagaliau nusistovės pusiausvyroji būseną. Šitokia pusiausvyroji būseną yra stabili. Bet kaip ją sutrikdžius, po tam tikro laiko sistema vėl sugrįš į stabilią būseną. Tokiu būdu galima teigti, kad šiluminis spinduliavimas yra pusiausvyrinis.

Priešingai šiluminiam, bet koks kitos rūšies spinduliavimas yra nepusiausvyrinis. Išnagrinękime, pavyzdžiui, fotoluminescencijos atvejį. Tarkime, kad šviesa sužadintas kūnas yra patalpintas spinduliuotės nesugeriančioje ertmėje, kurios sienelės visiškai atspindi šviesą.

Šio kūno spinduliuotė laikui bėgant slops. Nežiūrint į tai, kad šis kūnas sugers dalį atspindėtos nuo sienelių šviesos (kurios gali įšilti), jis niekuomet nebesugrįš į savo pradinį būvį. Juk tam, kad grąžinti kūną į pradinį būvį, jį reikia žadinti trumpesnio bangos ilgio šviesa, nei jis spinduliuoja (Stokso (Stokes) dėsnis). Taigi, šis pavyzdys rodo, kad fotoluminescencija – tai nepusiausvyrinis spinduliavimas. Analogiškai išnagrinėję ir kitas spinduliavimo rūšis gausime tą pačią išvadą: visos nešiluminio spinduliavimo rūšys yra nepusiausvyrojo pobūdžio.

Šiluminis spinduliavimas kartais vadinamas temperatūriniu. Pagrindinis dydis, apibūdinantis kūno šiluminį spinduliavimą, yra jo temperatūra. Keliant kokio nors kūno (pvz., anglies, metalų ar jų oksidų) temperatūrą, spinduliuotė tampa vis ryškesnė, o jos spektras pasipildo vis trumpesnėmis bangomis. Be to, pastebėta, kad skaidrūs kūnai (kvarcas, stiklas ir kt.) ir sugeriantys kūnai (anglis, metalai ir kt.) toje pačioje temperatūroje spinduliuoja skirtingo ryškio šviesą. Šį dėsningumą 1809 m. pirmasis suformulavo Pnevė: jei du kūnai per laiko vienetą sugeria skirtingą energijos kiekį, tai ir jų spinduliuotė turi būti skirtinga. Kiekybinę šio dėsnio išraišką 1859 m. pateikė Kirchofas (Kirchhoff). Kūno šiluminiam spinduliavimui kiekybiškai aprašyti įvedamos spinduliavimo ir sugerties stiprių sąvokos. Šiluminio spinduliavimo stipris I - tai energijos srautas, spinduliuojamas kūno vienetinio paviršiaus visomis kryptimis. Tuomet, remiantis aukščiau išdėstytomis mintimis, akivaizdu, kad įkaitinto kūno spinduliavimo stipris I priklauso nuo jo temperatūros T bei spektrinio dažnio ν , kuriame matuojamas energijos srautas

$$I = d\Phi = E_{\nu,T} \cdot d\nu; \quad (2.2.1)$$

čia $E_{\nu,T}$ - koeficientas, nusakantis kūno, kurio temperatūra yra T , spinduliavimo spektriniame dažnyje ν stiprį.

Jei į kūno ploto vienetą krenta šviesos srautas $d\Phi$, tai tam tikrą jo dalį $d\Phi'$ šis kūnas sugers. Kūno sugertos šviesos srauto $d\Phi'$ santykis su kritusiu į kūną srautu $d\Phi$ yra vadinamas kūno sugerties stipriu A , t.y.,

$$A = d\Phi' / d\Phi \quad (2.2.2)$$

Akivaizdu, kad A taip pat priklauso nuo dažnio ir temperatūros. Maksimali galima A vertė yra 1. Kūnus, kurių sugerties stipris visų temperatūrų ir dažnių intervale $A_{\nu,T}=1$, Kirchoff'as pavadino absoliučiai juodais kūnais.

Absoliučiai juodo kūno spektrinį spinduliavimo stiprį pažymėjus $\epsilon_{\nu,T}$, o sugerties $\alpha_{\nu,T}$, galima užrašyti Kirchofo dėsnį:

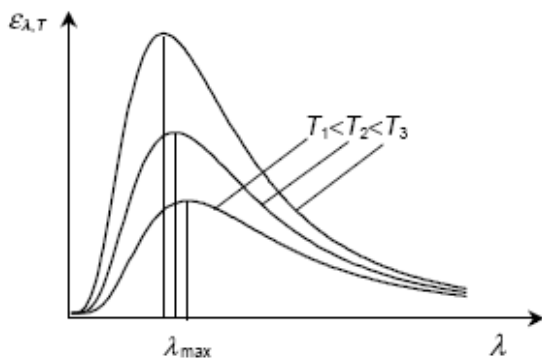
$$\frac{E_{\nu,T}}{A_{\nu,T}} = \frac{\epsilon_{\nu,T}}{\alpha_{\nu,T}} = \epsilon_{\nu,T}, \quad (2.2.3)$$

kadangi $\alpha_{\nu,T} = 1$.

Praktikoje paprastai sutinkame kūnus, kurie negali būti priskirti absoliučiai juodiems. Jų $A_{\nu,T} \neq 1$. Tokie kūnai vadinami nejuodais kūnais.

Iš Kirchofo dėsnio (2.2.3) seka, kad $E_{\nu,T} = \epsilon_{\nu,T} \cdot A_{\nu,T}$. Vadinasi, nejuodiems kūnams (kurių $A_{\nu,T} < 1$) spinduliavimo stipris $E_{\nu,T} < \epsilon_{\nu,T}$. Tai reiškia, kad nejuodo kūno spinduliavimo stipris bet kokiam dažniui negali būti didesnis už absoliučiai juodo kūno, esančio toje pačioje temperatūroje, spinduliavimo stiprį.

Kirchofo dėsnis iš esmės nusako, kad absoliučiai juodo kūno spinduliavimo pajėgumas yra dažnio ir jo temperatūros funkcija, t.y., $\epsilon_{\nu,T} = f(\nu, T)$ (2.1 pav.). Tiriant šios funkcijos išraišką pirmiausia buvo suformuluotas Stefano (Stefan) ir Bolcmano (Boltzmann) dėsnis, nusakantis suminį absoliučiai juodo kūno spinduliavimo pajėgumą ϵ_T :



2.1 pav. Juodojo kūno spinduliavimo stiprio pasiskirstymas skirtingose temperatūrose

$$\epsilon_T = \int_0^{\infty} \epsilon_{\nu,T} d\nu = \sigma \cdot T^4, \quad (2.2.4)$$

čia σ - Bolcmano konstanta.

Vėliau 1893 m. Vilhelmas Vynas (Vinn) teoriškai suformulavo antrąjį absoliučiai juodo kūno spinduliavimo dėsnį:

$$\epsilon_{\nu,T} = \frac{c^5}{\lambda^5} \cdot f\left(\frac{c}{\lambda T}\right); \quad (2.2.5)$$

čia c – šviesos greitis terpėje (vakuume), o f – funkcija, kurios Vynas neįstengė nustatyti. Nors šiame Vyno dėsnyje funkcija $f(c / \lambda \cdot T) = f(\nu / T)$ nėra užrašyta, tačiau iš jo gaunama viena svarbi išvada. Panagrinėkime, kaip elgiasi šiluminio spinduliavimo maksimumas ϵ_{max} . Šiuo tikslu išdiferencijavę (2.2.5) ir prilyginę nuliui, gauname šitokią išraišką:

$$\lambda \cdot \epsilon_{max} \cdot T = const. \quad (2.2.6)$$

Ši lygtis išreiškia taip vadinamą Vyno poslinkio dėsnį, kuris teigia, kad absoliučiai juodo kūno spinduliuotės spektrinio intensyvumo smailė, keliant temperatūrą, slenka į trumpųjų bangų pusę. Šiuo dėsniu pagrįsta pirometrija.

Vėliau buvo bandoma gauti tikslią funkcijos $f(\nu/T)$ išraišką. Lordas Relėjus (Rayleigh) ir seras Džeimsas Džinsas (Jeanes) pateikė šitokią minėtos funkcijos išraišką:

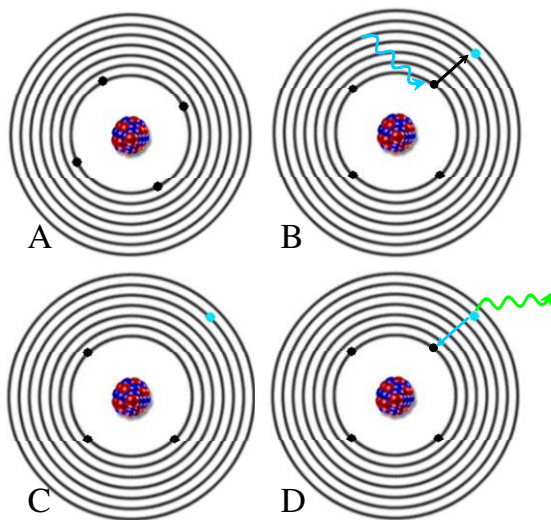
$$\epsilon_{\nu,T} = \frac{2\pi\nu^2}{c^2} \cdot kT \quad (2.2.7)$$

Ši Relėjaus ir Džinso formulė neblogai aprašo šiluminės spinduliuotės energijos pasiskirstymą ilgabangiam krašte, tuo tarpu trumpabangiam krašte ji griežtai prieštarauja eksperimentui. Šis prieštaravimas į fizikos istoriją įėjo “ultravioletinės katastrofos” pavadinimu: dažniui didėjant, $\epsilon_{\nu,T}$ nebeturi maksimumo ir monotoniškai auga iki begalybės. Šio prieštaravimo, aprašant Kirchofo funkcijos $\epsilon_{\nu,T}$ išraišką, priežastis glūdi klasikinės fizikos pagrindiniuose postulatuose, pagal kuriuos bet kokios sistemos energija gali kisti tolydžiai, t.y., ji gali įgauti bet kokias artimas vertes.

Minėtą prieštaravimą panaikino Maksas Plankas, įvedęs sistemos energijos kvantavimo principą (žr. (1.3.5)). Šį principą pritaikęs absoliučiai juodo kūno spinduliavimui aprašyti, jis pateikė šitokią absoliučiai juodo kūno spinduliavimo stiprio formulę:

$$\epsilon_{\nu,T} = \frac{2\pi\nu^2}{c^2} \cdot \frac{h\nu}{e^{kT} - 1}, \quad (2.2.8)$$

arba



2.2 pav. Elektrono sužadinimas šviesos kvantu bei jo relaksacija išspinduliuojant mažesnės energijos šviesos kvantą.

$$\epsilon_{\lambda,T} = \frac{2\pi c^2}{\lambda^5} \cdot \frac{h}{e^{\frac{hc}{\lambda kT}} - 1} \quad (2.2.8a)$$

Šios formulės, gerai aprašančios absoliučiai juodo kūno spinduliuotės energinį pasiskirstymą spektre, pavadintos Planko formulėmis (palyginimui žr. 1.4.6).

Gamtoje paprastai mes stebime kūnus, kurie nėra absoliučiai juodi. Realių kūnų šiluminio spinduliavimo spektras skiriasi nuo absoliučiai juodo kūno spektro. Spektrai sutampa, kai vietoj tikros kūno temperatūros į (2.2.8) arba (2.2.8a) formulę įrašoma

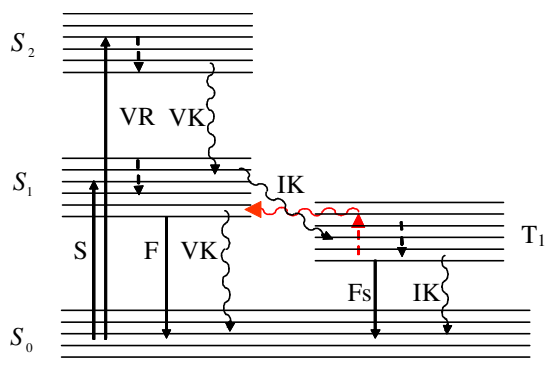
skaistinės temperatūros T_R vertė. Skaistinė temperatūra - tai tokia temperatūros vertė, kuriai esant realaus ir absoliučiai juodo kūnų spinduliuočių intensyvumų pasiskirstymai sutampa. Todėl T_R vertė yra mažesnė už tikrąją kūno temperatūrą. Skaistinė temperatūra praktiškai nustatoma specialiu prietaisu – optiniu pirometru.

Liuminescencija. Atomui ar molekulei sugėrus šviesos kvantą, išorinės orbitalės elektronas peršoka į vieną iš laisvų molekulės elektroninių lygmenų ir molekulė tampa energiška sužadinta (2.2 pav., A,B). Sužadinta molekulė yra nepusiausvyroje būsenoje, todėl visada stengiasi užimti energiška žemiausią padėtį. Ji relaksuoja į pagrindinę būseną, perteklinę energiją atiduodama aplinkinėms molekulėms, transformuodama ją į savo atomų virpesinę ir/arba rotacinę energiją, arba išspinduliuodama energiją šviesos kvanto pavidalu, t.y., liuminescuodama (2.2 pav., C, D; žr. 1.15 pav.).

Profesorius A. Jablonskis pasiūlė daugiaatomės molekulės energijos lygmenų ir energetinių virsmų diagramą (žr. 1.27 pav.). Kuo energijos tarpas ΔE tarp singuletinių lygmenų S_0 ir S_1 didesnis, tuo vidinės konversijos $S_1 \rightarrow S_0$ tikimybė mažesnė, o fluorescencijos tikimybė didesnė. Taigi fluorescencijos tikimybė (tuo pačiu ir kvantinis našumas) priklauso nuo konkuruojančių vyksmų, kurie mažina sužadintojo S_1 lygmens užpildą.

2.3. Biomolekulių tripletinės būsenos. Uždelstoji fluorescencija.

Pastebėta, kad registruojant užšaldytų bandinių liuminescencijos spektrus, juose atsiranda nauja juosta ilgabangėje srityje. Tai – fosforescencijos spektras. Fosforescencija trunka nuo 10^{-4} s iki 10 s. Fosforescencija vyksta iš T_1 lygmens į S_0 (2.3 pav.). Į T_1 lygmenį elektronas patenka iš S_1 , nes šio lygmens energija yra šiek tiek didesnė. Tokio perėjimo (interkombinacinės konversijos) metu keičiasi elektrono sukinytis ir sužadinta molekulė pereina į tripletinę būseną. Fosforescencijos, arba spindulinio perėjimo $T_1 \rightarrow S_0$ tikimybė nedidelė dėl ilgos tripletinio lygmens T_1 gyvavimo trukmės τ . Fosforescencija beveik neregistruojama kambario temperatūros sąlygomis, nes ją gerai gesina vidiniai ir tarpmolekuliniai procesai (dažniausias gesiklis terpėje – deguonies molekulės). Nukleotidų,



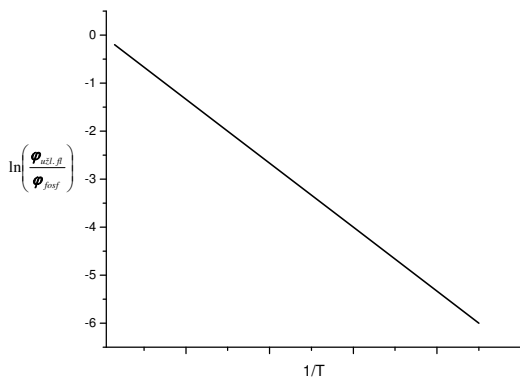
2.3 pav. Molekulės energijos lygmenų diagrama (S – sugertis, F – fluorescencija, VR – virpesinė relaksacija, VK – vidinė konversija, IK – interkombinacinė konversija, F_s – fosforescencija).

baltymų, amino rūgščių fosforescencija išryškėja tik stikluose žemoje temperatūroje. Tiesioginės sugerties $S_0 \rightarrow T_1$ tikimybė taip pat maža, nes ekstinkcijos koeficientas ϵ atvirkščiai proporcingas τ . Fluorescencijos atveju, jos spartos konstantai galioja sąryšis:

$$k_{fl} = \frac{1}{\tau_{fl}} = \frac{v_m^{*2}}{3,5 \cdot 10^8} \int_{v^*=0}^{\infty} \epsilon dv^* \quad (2.3.1)$$

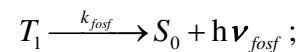
čia ν_m^* – banginis skaičius ties sugerties juostos maksimumu. Tad, pvz., triptofanui, kurio $\tau = 4$ s, vyksmo $S_0 \rightarrow T_1$ tikimybė 10^9 kartų mažesnė, nei $S_0 \rightarrow S_1$.

Uždelstoji fluorescencija. Registruojant liuminescencijos spektrus pastebėta, kad kartais švytėjimas, registruojamas fluorescencijos spektrinėje srityje, “vėlinasi” net iki 10 s, t.y., uždelsimas prilygsta fosforescencijos trukmei. Šis reiškinys yra uždelstoji fluorescencija. Jis stebimas tuomet, kai elektronas iš sužadinto singletinio lygmens S_1 pereina į sužadintą tripletinį lygmenį T_1 , iš kurio dėl temperatūrinės aktyvacijos vėl gali sugrįžti į S_1 lygmenį, o iš ten nurelaksuoti į S_0 , išspinduliuodamas fluorescencijos fotoną (2.3 pav.). Taigi, uždelstajai fluorescencijai įvykti yra būtina tripletinio lygmens temperatūrinė aktyvacija. Tripletinės būsenos sužadinto lygmens ištuštinimo mechanizmai:

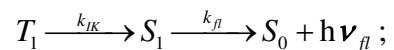


2.4 pav. Eksperimentinis energijos tarpo tarp singuletinio ir tripletinio lygmenų vertinimas.

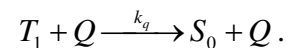
1) fosforescencija



2) uždelstoji fluorescencija



3) fosforescencijos gesinimas



Kadangi 1) ir 2) vyksmai konkuruoja

tarpusavyje, jų intensyvumai proporcingi vyksmų spartoms, arba:

$$\frac{I_{uzd.fl}}{I_{fosf}} = \frac{k_{IK}}{k_{fosf}} \quad (2.3.1)$$

Taigi, intensyvumų santykis nepriklauso nuo gesiklio koncentracijos. Didėjant temperatūrai, $T_1 \rightarrow S_1$ vyksmo tikimybė didėja, tad įskaitant terminio sužadavimo sąlygą, interkombinacinės konversijos tikimybės išraiška galėtų būti užrašoma:

$$k_{IK} = Ae^{\frac{\Delta E}{kT}}, \quad (2.3.2)$$

čia A yra konstanta, ΔE – tarpas tarp energijos lygmenų.

Atsižvelgiant, kad $k_{fosf} = \frac{1}{\tau_{0fosf}}$, kur τ_{0fosf} – tripletinės būsenos gyvavimo trukmė, kai

terpėje nėra gesiklio, (pvz.: kietame būvyje skysto azoto temperatūroje), (2.3.1) sąryšį galima perrašyti tokiu būdu:

$$\frac{\phi_{uzd.fl}}{\phi_{fosf}} = \tau_{0fosf} \phi_{fl} Ae^{\frac{\Delta E}{kT}}; \quad (2.3.3)$$

čia φ žymi atitinkamų procesų kvantinius našumus (žr. 2.5 skyrių).

Grafiškai atvaizdavus eksperimentinius rezultatus, dydis $\ln(\varphi_{užd.fl}/\varphi_{fosf})$ tiesiškai priklauso nuo atvirkštinės temperatūros. Gautos kreivės polinkis leidžia įvertinti energijos tarpą ΔE tarp singuletinio ir tripletinio lygmenų, kuris spektre atitinka intervalą tarp fluorescencijos ir fosforescencijos smailių.

2.4. 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 vienetė – $\sigma \cdot n \cdot I/h\nu$. 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 (2.4.2) 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 $\epsilon(\nu)$.

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.

2.5. 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:

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

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 (Vollmeier) 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:

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

2.6. 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 $A = \epsilon c l$ 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:

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

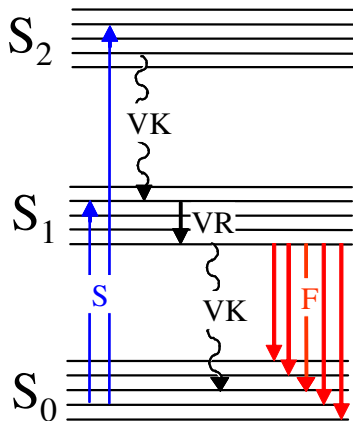
Taigi, kai tiriama bandinio optinis tankis nedidelis, liuminescencijos intensyvumas proporcingas molekulių bandinyje koncentracijai. Tiesa, aparatūrinės konstantos κ dydis nėra lengvai nustatomas, tad dažniausiai tiriama bandinio molekulių koncentracija nustatoma lyginat išmatuotą fluorescencijos intensyvumą (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.

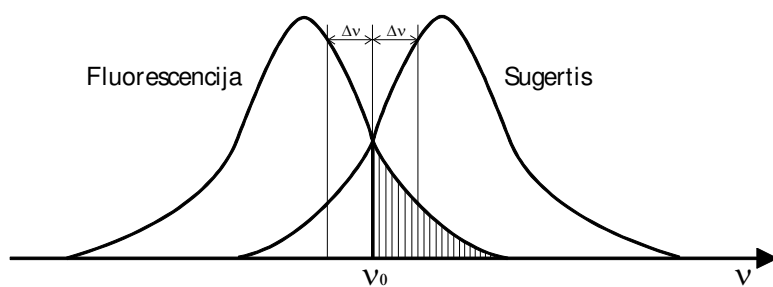
2.7. Fluorescencijos spektro nepriklausomumas nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio. Stokso dėsnis

Fluorescencijos spektras paprastai nepriklauso nuo žadinančios šviesos bangos ilgio. Tai rodo, kad susidaro tam tikra konkreti, nepriklausanti nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio, sužadintosios molekulės būseną, iš kurios ir vyksta fluorescencija. Ši būseną - tai žemiausias virpesinis pirmosios sužadintos elektroninės S_1 būsenos polygmenis. Iš šio



2.5 pav. Molekulės sužadavimo ir relaksacijos schema.

dėsnio seka, kad fluorescencija galima tik iš žemiausio sužadinto S_1 elektroninio lygmens. Jei molekulė sužadinama į aukštesnįjį S_2 elektroninį lygmenį, tai ji greitai nespinduliniu būdu (vidinė konversija) relaksuos į S_1 elektroninį lygmenį, o vėliau virpesinės relaksacijos keliu atsiders žemiausiame virpesiniame elektroninės būsenos polygmenyje (2.5 pav., 1.26 pav.). Gilesnė fizikinė priežastis to fakto, kad nestebima molekulių fluorescencija iš aukštesnių sužadintų elektroninių lygmenų (egzistuoja labai retos išimtys) yra ta, kad spindulinio šuolio tikimybė priklauso nuo energinio tarpo tarp lygmenų (žr. 2.3.1 išraišką). Kadangi energinis tarpas tarp aukštesniųjų sužadintų elektroninių lygmenų mažėja, tai nespindulinio šuolio tikimybė smarkiai didėja spindulinio šuolio tikimybės sąskaita. Taigi, tarp aukštesniųjų elektroninių lygmenų galimi tik nespinduliniai šuoliai.

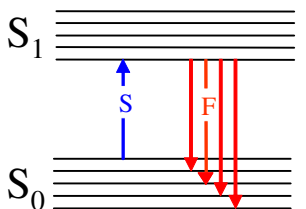


2.6 pav. Fluorescencijos ir sugerties spektrai.

Stokso (Stokes) dėsnis. 1852 m. Stoksas pastebėjo, kad medžiagų fluorescencijos bangos ilgis λ_{fl} yra visuomet didesnis už sugertos šviesos bangos ilgį λ_s . Fluorescuojančių

molekulių tirpaluose ir kristaluose tarp sužadavimo ir spinduliavimo susidaro neišvengiami energijos nuostoliai (išimti sudaro atomai dujinėje fazėje). Pagrindinė priežastis yra ta, kad sužadintos molekulės į žemiausią virpesinį S_1 lygmens polygmenį, iš kurio ir vyksta spindulinis šuolis (fluorescencija), relaksuoja itin sparčiai. Tad fluorescencijos metu išspinduliuojama tik dalis sugertos energijos. Likusi energijos dalis $h\nu_s - h\nu_{fl}$ sukaupiama

molekulėse kaip perteklinė šiluminė energija, kuri atiduodama aplinkai. 2.6 pav. pateiktos modelinės daugiaatomių molekulių sugerties ir liuminescencijos spektrų juostos, normuotos į maksimalias intensyvumo vertes. Fluorescencijos juosta dalinai persikloja su sugerties juosta. Juostų persiklojimo srityje, kur $\nu_{fl} > \nu_s$ (užbrūkšniuota sritis), Stokso dėsnis negalioja. Tai antistoksinė sritis, kurioje molekulės išspinduliuoto kvanto energija būtų didesnė, nei sugertojo (2.7 pav.).



2.7 pav. Molekulės sužadavimo ir relaksacijos schema.

Pagal energijos tvermės dėsnį tai gali įvykti tik tuomet, kai molekulė trūkstantą energijos dalį kompensuoja virpesinės energijos sąskaita.

Liomelis (Lommel) pašalino šį Stokso dėsnio prieštaravimą jį pakoregavęs tokiu būdu: liuminescencijos spektras visumoje ir jo maksimumas visuomet pasislinkęs sugerties spektro ir jo maksimumo atžvilgiu į ilgabangę pusę. Šis dėsnis vadinamas apibendrintu Stokso arba kartais Stokso ir Liomelio dėsniumi, kurį galima užrašyti taip:

$$h\nu_{fl}^{\max} < h\nu_s^{\max} \quad (2.7.1)$$

2.8. Veidrodinio atspindžio dėsnis

Šis dėsnis yra išvestinis iš aukščiau pateiktų. Jį galima suformuluoti šitaip: normuoti sugerties $k(\nu)$ ir fluorescencijos $I_{fl}(\nu)/\nu$ spektrai yra veidrodiskai simetriniai tiesės, einančios per spektrų persikirtimo tašką ir statmenos abscisių (dažnių) ašiai, atžvilgiu.

Taigi, remiantis šiuo dėsniumi sugerties ir fluorescencijos spektrų taškai yra nutolę nuo simetrijos taško ν_0 vienodu atstumu $\Delta\nu$ (2.6 pav.). Matematiškai tai galima užrašyti taip:

$$\begin{aligned} \nu_s - \Delta\nu &= \nu_0, \\ \nu_{fl} + \Delta\nu &= \nu_0. \end{aligned} \quad (2.8.1)$$

Sudėjus šias lygybes, gauname matematinę veidrodinio atspindžio dėsnio išraišką:

$$\nu_s + \nu_{fl} = 2\nu_0. \quad (2.8.2)$$

Šią lygybę galima perrašyti šitaip:

$$\nu_s - \nu_{fl} = 2(\nu_s - \nu_0). \quad (2.8.3)$$

Pastaroji išraiška yra patogi veidrodinio atspindžio dėsniumi tikrinti. Šiuo tikslu braižoma funkcija $f(\nu_s) = \nu_s - \nu_{fl}$. Pagal (2.8.3) lygtį, galiojant veidrodinio atspindžio dėsniumi, gaunama tiesė, kurios kampinis koeficientas lygus 2.

Griežtai kalbant, veidrodinio atspindžio dėsnis galios, kai bus patenkinta atitinkamų sugerties ir fluorescencijos juostų dažnių ir intensyvumų simetrija. Pagal veidrodinio

atspindžio dėsnį sugerties ir fluorescencijos dažnių verčių, simetrinių ν_0 atžvilgiu, intensyvumai turi būti lygūs:

$$b \cdot B(\nu_s) = A(\nu_{fl}), \quad (2.8.4)$$

čia $B(\nu_s)$ ir $A(\nu_{fl})$ – Einšteino koeficientai sugerčiai ir savaiminiam spinduliavimui (žr. (1.4.5) ir (1.4.8)), b – tam tikras normavimo koeficientas, įvestas dėl to, kad fluorescencijos intensyvumas matuojamas santykiniais vienetais. Pasinaudojus (2.8.1) sąryšiu, pastarąją lygybę galima perrašyti taip:

$$b \cdot B(\nu_0 + \Delta\nu) = A(\nu_0 - \Delta\nu). \quad (2.8.5)$$

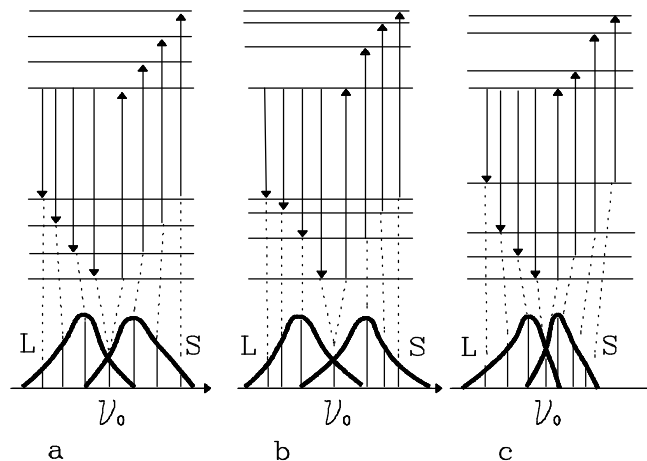
Pabandykime aprašyti intensyvumų pasiskirstymą sugerties ir dažnių juostose. Tegul $\rho(E_\nu)$ yra virpesinių lygmenų E_ν užpildos tankio funkcija pagrindinėje S_0 elektroninėje būsenoje, o $\alpha(E_\nu, \nu_s)$ – šuolio, kurio metu molekulė sugers šviesos kvantą $h\nu_s$, tikimybė. Tuomet galime užrašyti sugerties intensyvumo pasiskirstymo lygtį:

$$I_s(\nu) = nh\nu \int_{E_\nu=0}^{\infty} \rho(E_\nu) \cdot \alpha(E_\nu, \nu_s) dE_\nu. \quad (2.8.6)$$

Analogiškai užrašome ir spinduliniam šuoliui iš sužadintojo lygmens:

$$I_{fl}(\nu) = nh\nu \int_{E_\nu^*=0}^{\infty} \rho(E_\nu^*) f(E_\nu^*, \nu_{fl}) dE_\nu^*, \quad (2.8.7)$$

čia $\rho(E_\nu^*)$ – virpesinių lygmenų užpildos tankio funkcija sužadintoje S_1 elektroninėje būsenoje, $f(E_\nu^*, \nu_{fl})$ – spindulinio šuolio, kurio metu molekulė išspinduliuoja šviesos kvantą $h\nu_{fl}$, tikimybė.



2.8 pav. Elektroninių-virpesinių lygmenų ir šuolių tarp jų diagrama: a) simetriniai liuminescencijos (L) ir sugerties (S) spektrai (harmoninio osciliatoriaus modelis); b) simetriniai liuminescencijos ir sugerties spektrai (anharmoninio osciliatoriaus modelis); c) nesimetriniai liuminescencijos ir sugerties spektrai (anharmoninio osciliatoriaus modelis).

Tuo atveju, kai ν_0 atžvilgiu simetrinėms sugerties ir fluorescencijos dažnių vertėms atitinkantys intensyvumai yra lygūs, pasinaudojus (2.8.5)-(2.8.7) išraiškomis galime užrašyti

$$b \int_{E_v=0}^{\infty} \rho(E_v) B(E_v, \nu_0 + \Delta\nu) dE_v = \int_{E_v^*=0}^{\infty} \rho(E_v^*) A(E_v^*, \nu_0 - \Delta\nu) dE_v^*. \quad (2.8.8)$$

Iš šios formulės seka, kad veidrodinio atspindžio dėsnis visiškai galioja, kai yra tenkinamos šios sąlygos:

$$\rho(E_v) = \rho(E_v^*), \quad (2.8.9)$$

$$bB(E_v, \nu_0 + \Delta\nu) = A(E_v^*, \nu_0 - \Delta\nu). \quad (2.8.10)$$

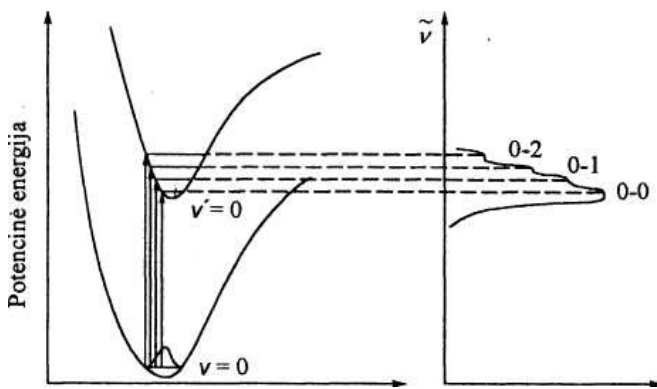
(2.8.9) sąlyga reikalauja, kad molekulių virpesinių lygmenų struktūra pagrindinėje ir sužadintoje būsenose išliktų vienoda. Tai iliustruoja 2.8 pav., a, kuriame pavaizduotas molekulės harmoninio osciliatoriaus modelis (pagrindinėje ir sužadintoje elektroninėse būsenose virpesiniai poligmenys išsidėstę vienodai ir ekvidistanciškai). Šiuo atveju dažnių simetrija galios. Veidrodinio atspindžio simetrija galios ir anharmoninio osciliatoriaus atveju (2.8 pav., b), kai virpesiniai poligmenys išsidėstę neekvidistanciškai, bet jų išsidėstymas pagrindinėje ir sužadintoje būsenose vienodas. Jei pagrindinėje ir sužadintoje elektroninėse būsenose virpesinių poligmenų išsidėstymas nevienodas, tuomet sugerties ir fluorescencijos dažnių simetrija nebus stebima. Toks atvejis pavaizduotas 2.8 pav., c.

Dabar panagrinėkime (2.8.10) lygybę. Joje ν_0 yra elektroninio šuolio dažnis, o $h\Delta\nu$ nusako virpesinės energijos pokytį elektroninio virpesinio šuolio metu. Konstanta b yra

būdinga duotai medžiagai ir išlieka pastovi visų dažnių vertėms. Tuomet lygybė reiškia, kad elektrono šuolių iš pagrindinės būsenos virpesinių polygmenių, kurių metu molekulės virpesinė energija pakinta dydžiu ΔE_v , tikimybės yra proporcingos elektrono šuolių iš sužadintos būsenos virpesinių polygmenių, kurių metu virpesinė energija pakinta tuo pačiu dydžiu, tikimybės.

2.9. Franko-Kondono principas

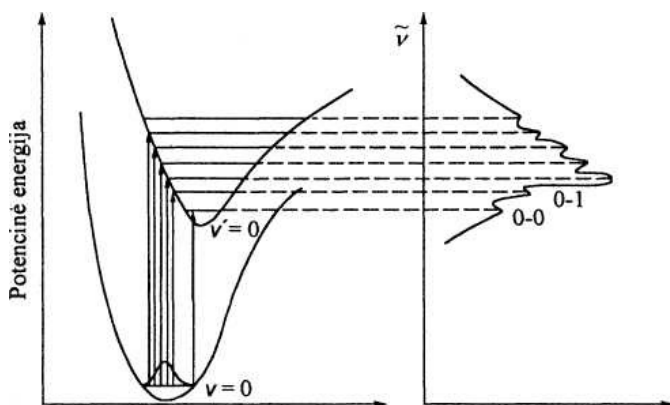
Sugerties juostos forma, plotis ir sandara labai priklauso nuo perteklinės virpesinės



2.9 pav. Franko-Kondono principas. Sugerties juostos forma esant vienodiems tarpbranduoliniams atstumams pagrindinėje ir sužadintoje būsenose.

energijos, kurią molekulė įgauna elektroninio sužadinimo metu. Šis dydis yra tiesiogiai susietas su pagrindinės ir sužadintosios būsenų potencinės energijos kreivių skirtumais (kreivių forma ir pusiausvirojo atstumo tarp atomų branduolių r_e padėtimi). Elektroninių-vibracinių šuolių intensyvumą molekulėse kontroliuoja labai svarbus

Franko - Kondono principas. Jis teigia, kad dėl didelio masių skirtumo tarp branduolio ir sužadinamo elektrono elektroninis šuolis vyksta taip greitai, kad branduoliai nespėja pajudėti iš vietos. Elektrono šuolis įvyksta per šimtus atosekundžių ($1 \text{ as} = 10^{-18} \text{ s}$), tuo tarpu branduolių virpėjimo periodas yra keliomis eilėmis ilgesnis ir sudaro $10^{-12} - 10^{-13} \text{ s}$. Franko - Kondono principą sugerties atveju iliustruoja 2.9 ir 2.10 paveikslai. Abscisių ašis paveikslėliuose žymi



2.10 pav. Franko-Kondono principas. Sugerties juostos forma esant skirtingiems tarpbranduoliniams atstumams pagrindinėje ir sužadintojoje būsenose.

atstumą tarp branduolių. Sužadinimo procesai vaizduojami kaip tiesios linijos iš viena potencinės energijos būseną (normalioji būseną) vaizduojančios kreivės į kitą (sužadintąją būseną).

Franko - Kondono principą galima nusakyti trejomis taisyklėmis:

1. elektroniniai-vibraciniai šuoliai tarp potencinės energijos būsenų vyksta „vertikaliai“, išliekant nepakitusiems tarpbranduoliniams atstumams molekulėje. Tai reiškia, kad sužadintosios elektroninės būsenos branduolių konfigūracija išlieka tokia pati kaip ir nesužadintosios būsenos. Kadangi potencinės energijos kreivės (mažiausią energiją atitinkančio tarpbranduolinio atstumo vertės) gali būti pasislinkusios viena kitos atžvilgiu (2.10 pav.), tokia branduolių konfigūracija sužadintoje būsenoje atitinka smarkiai suspaustą arba ištemptą molekulės geometriją, todėl sužadintos molekulės atomai tuoj pat pradeda virpėti. Taigi, elektroninio šuolio metu dažniausiai sužadinami ir molekulės atomų virpesiniai judesiai;
2. labiausiai tikėtini arba intensyviausi yra tokie šuoliai iš elektroninės būsenos virpesinio lygmens, kurie prasideda iš srities, turinčios didžiausią branduolių buvimo tikimybės tankį. Žemiausiuose virpesiniuose lygmenyse labiausiai tikėtina branduolius aptikti arti pusiausvyrojo r_e , aukštesniuose virpesiniuose lygmenyse – atstumais, atitinkančiais potencinės energijos kreivės vertes. Kambario temperatūroje praktiškai visos organinės molekulės yra žemiausiame nuliniame ($v = 0$) virpesiniame lygmenyje;
3. labiausiai tikėtini ir intensyviausi yra tokie sugerties šuoliai, kurie baigiasi srityse, kuriose sužadintosios elektroninės būsenos branduolių tikimybės tankis yra didžiausias. Dažniausiai šuoliai baigiasi netoli sužadintosios būsenos potencinės energijos kreivės.

Jei pusiausvyrieji tarpbranduoliniai atstumai pagrindinėje ir sužadintojoje molekulės būsenose yra vienodi, t.y., viršutinės kreivės minimumas yra tiesiai virš apatinės kreivės minimumo, tai sugerties juosta siaura, asimetrinė, pasižymi būdinga virpesinių smailių struktūra (2.9 pav.). Žemose temperatūrose intensyviausias 0-0 šuoliukas $S_0(0) \rightarrow S_1(0)$ kuris yra labiausiai ilgabangis iš visų virpesinių maksimumų.

Tačiau dažniausiai sužadinus molekules tarpatominiai ryšiai susilpnėja, tad tikėtiniausias atstumas r_e^* tarp atomų padidėja, ir sužadintosios būsenos potencinės energijos kreivė paslenka į ilgesnių r_e pusę (į dešinę). Tokiu atveju sugerties spektre stebima plati simetrinė juosta. Intensyviausias virpesinis šuoliukas jau nėra perėjimas 0-0, bet šuolis į aukštesnius virpesinius lygmenis (2.10 pav.). Todėl sugerties juostos plotį galima sieti su tarpbranduolinių atstumų padidėjimu molekulės sužadintojoje būsenoje.

Kvantmechaninis Franko - Kondono principo aiškinimas siejamas su pagrindinės ir sužadintosios būsenų virpesinių banginių funkcijų sanklota. Intensyviausi šuoliai vyksta tarp tokių virpesinių būsenų, kurios persikloja stipriausiai, nes tokios būsenos pasižymi artimais parametrais. Sanklodos laipsnį apibūdina Franko-Kondono integralas $\int \chi_i \chi_f d\tau_N$. Šio

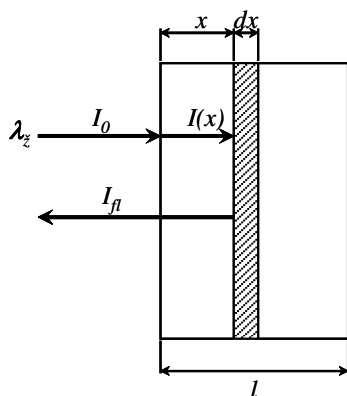
integralo kvadratas vadinamas Franko - Kondono faktoriumi. Žemiausio virpesinio lygmens banginė funkcija yra varpo pavidalo, kurio maksimumas sutampa su pusiausvirąja branduolių konfigūracija. Su tokia bazine funkcija persikloja daug sužadintosios molekulės virpesinių funkcijų, tačiau stipriausia sankloda bus su tokiomis funkcijomis, kurių maksimumas yra toje pačioje erdvės dalyje. Jei potencinės energijos kreivės yra pasislinkusios viena kitos atžvilgiu, tai geriausia sankloda pasiekama su tais sužadintą vibracinę būseną aprašančios banginės funkcijos maksimumais, kurie yra arčiausiai potencinės energijos kreivės verčių. Sugerties spektruose registruojamas įvairus virpesinių judesių intensyvumas atspindi skirtingo lygio sanklodą tarp nesužadintosios ir sužadintosios molekulės virpesines būsenas aprašančių banginių funkcijų.

Panašiai galima traktuoti ir molekulių emisijos spektrus. Kondensuotoje medžiagos būsenoje (tirpalas arba kieta fazė) kambario temperatūroje sužadintoji būsena visiškai termalizuojasi ir pasiekia šiluminę pusiausvirą iki išspinduliavimo akto. Todėl emisija praktiškai vyksta iš nulinio sužadintosios būsenos virpesinio lygmens į aukštesnius pagrindinės būsenos virpesinius lygmenis.

2.10. Liuminescencijos ekranavimo ir reabsorbcijos efektai

Matuojant sudėtingų daugiakomponenčių sistemų, pvz., audinių, ląstelių suspensijos liuminescenciją, galimos liuminescencijos intensyvumo matavimo paklaidos, sąlygojamos vadinamojo vidinio filtro. Jas gali sukelti ekranavimo arba reabsorbcijos efektai.

Ekranavimo efekto atveju krintančios šviesos dalį sugeria daugiakomponenčiame tirpale esančios pašalinės medžiagos. Galima įvertinti bandinio fluorescencijos intensyvumą, atsižvelgiant į ekranavimo efektą.



2.11 pav. Liuminescencijos ekranavimo ir reabsorbcijos skaičiavimo schema.

Tegu į bandinį, kurio storis l (2.11 pav.), statmenai krenta intensyvumo I_0 šviesa. Atstumu x nuo paviršiaus krintančios šviesos intensyvumas pagal Bugerio- Lambertro-Bero dėsnį:

$$I(x) = I_0 \cdot 10^{-\left(\varepsilon \cdot c + \sum_i \varepsilon_i \cdot c_i\right) \cdot x} \quad (2.10.1)$$

čia ε ir c – fluorescuojančios medžiagos, o ε_i ir c_i – ekranuojančių medžiagų ekstinkcijos koeficientai ties žadinimo bangos ilgiu ir jų koncentracijos.

Elementariame sluoksnyje dx , kai ekranavimo poveikis nykstamai mažas, per laiko vienetą sugertos

šviesos intensyvumas:

$$dI(x) = \ln 10 \cdot I(x) \cdot \epsilon \cdot c \cdot dx \quad (2.10.2)$$

Atsižvelgus į (2.10.1) išraišką:

$$dI(x) = \ln 10 \cdot I_0 \cdot \epsilon \cdot c \cdot 10^{-\left(\epsilon \cdot c + \sum_i \epsilon_i \cdot c_i\right) \cdot x} dx \quad (2.10.3)$$

Visa per laiko vieneta bandinyje sugerta šviesa surandama integruojant pastarąją išraišką bandinio storio l atžvilgiu:

$$I_{sug} = \ln 10 \cdot I_0 \cdot \epsilon \cdot c \cdot \int_0^l 10^{-\left(\epsilon \cdot c + \sum_i \epsilon_i \cdot c_i\right) \cdot x} dx \quad (2.10.4)$$

Suintegravus gauname:

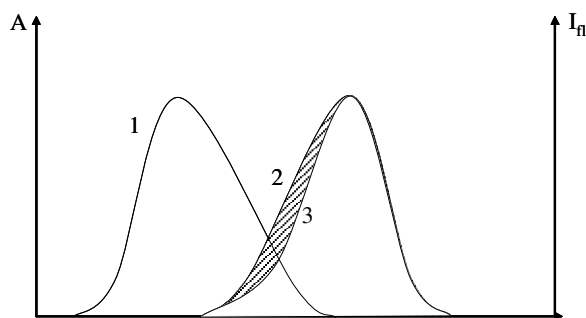
$$I_{sug} = \frac{I_0 \cdot \epsilon \cdot c}{\epsilon \cdot c + \sum_i \epsilon_i \cdot c_i} \cdot \left[1 - 10^{-\left(\epsilon \cdot c + \sum_i \epsilon_i \cdot c_i\right) \cdot l} \right] \quad (2.10.5)$$

Jei $A_B = (\epsilon \cdot c + \sum_i \epsilon_i \cdot c_i) \cdot l$ – pilnas bandinio optinis tankis, o $A = \epsilon \cdot c \cdot l$ – tiriamos fluorescuojančios medžiagos optinis tankis, tuomet I_{sug} išraiška:

$$I_{sug} = I_0 \cdot \left[1 - 10^{-\left(\epsilon \cdot c + \sum_i \epsilon_i \cdot c_i\right) \cdot l} \right] \cdot \frac{A}{A_B} \quad (2.10.6)$$

Pagal (2.6.2) sąryšį, $I_{fl} = \kappa \cdot \varphi \cdot (1-T) \cdot I_0 = \kappa \cdot \varphi \cdot I_{sug}$, tad tiriamosios medžiagos fluorescencijos intensyvumas, esant ekranavimo efektui, lygus:

$$I_{fl} = \kappa \cdot \varphi \cdot I_0 \cdot \left[1 - 10^{-\left(\epsilon \cdot c + \sum_i \epsilon_i \cdot c_i\right) \cdot l} \right] \cdot \frac{A}{A_B} = \kappa \cdot \varphi \cdot I_0 \cdot (1-T) \cdot \frac{A}{A_B} \quad (2.10.7)$$



2.12 pav. Sugerties spektras (1), fluorescencijos spektras be reabsorbcijos (2) ir fluorescencijos spektras esant reabsorbcijai (3).

Santykis A / A_B nurodo, kurią bandinio sugertos šviesos dalį sugėrė fluorescuojanti medžiaga.

Reabsorbcijos efektas

pasireiškia tuomet, kai liuminescencija sugerama paties bandinio tūryje. Įvertinimui pasinaudosime ta pačia 2.11 pav. pateikta schema. Fluorescencijos intensyvumas elementaraus pločio sluoksnyje dx atstumu x nuo paviršiaus:

$$dI_{fl}(x) = \ln 10 \kappa \cdot \varphi \cdot I(x) \cdot \epsilon_B \cdot c \cdot dx \quad (2.10.8)$$

kur $I(x)$ - žadinančios šviesos intensyvumas,

$$I(x) = I_0 \cdot 10^{-\epsilon_B \cdot c \cdot x}, \quad (2.10.9)$$

ϵ_B – ekstinkcijos koeficientas žadinimo bangos ilgio šviesai.

Dėl reabsorbcijos (tuo atveju, kai ją sąlygoja pati tiriamoji medžiaga) fluorescencijos intensyvumas bandinio paviršiuje sumažės:

$$dI_{fl}(0) = dI_{fl}(x) \cdot 10^{-\epsilon_{fl} \cdot c \cdot x}, \quad (2.10.10)$$

čia ϵ_{fl} – ekstinkcijos koeficientas fluorescencijos bangos ilgio šviesai.

Apjungę (2.10.8 – 2.10.10) sąryšius, gauname:

$$dI_{fl}(0) = \ln 10 \cdot \kappa \cdot \varphi \cdot I_0 \cdot \epsilon_B \cdot c \cdot 10^{-(\epsilon_B + \epsilon_{fl}) \cdot c \cdot x} dx \quad (2.10.11)$$

Suintegravus, kaip ir ekranavimo atveju (kai $l_B = l_{fl}$), gauname:

$$I_{fl}(0) = \kappa \cdot \varphi \cdot I_0 \cdot \left[1 - 10^{-(A_B + A_{fl})} \right] \cdot \frac{A_B}{A_B + A_{fl}} \quad (2.10.12)$$

Praktiškai, norint sumažinti reabsorbcijos efektą, reikia tirti mažo optinio tankio bandinius, žadinti liuminescenciją ties sugerties juostos maksimumu, bei ją matuoti ties priekine bandinio sienele. 4.12 pavyzdyje pateikti sugerties bei fluorescencijos spektrai, esant reabsorbcijai ir be jos. Bandinyje esant reabsorbcijai stebimas fluorescencijos spektro iškraipymas persiklojimo su sugerties spektru srityje.

2.11. Statinis ir dinaminis fluorescencijos gesinimas. Šterno-Folmerio lygtis

Bet koks fluorescencijos kvantinio našumo mažėjimas gali būti vertinamas kaip fluorescencijos gesinimo vyksmas. Pagrindinė fluorescencijos intensyvumo mažėjimo priežastis – tai fluorescuojančių molekulių sąveika su kitomis tirpale esančiomis molekulėmis. Gesiklio ir fluorescuojančios molekulės sąveika gali pakeisti atstumą tarp jos energinių lygmenų, padidinti bespindulinės sužadinimo energijos relaksacijos tikimybę, kartais padidinti interkombinacinės konversijos $S_1 \Rightarrow T_1$ tikimybę.

Labai aktyvūs fluorescencijos gesikliai:

1. Sunkiųjų metalų katijonai ir anijonai Γ , Br^- , Cs^+ , Cu^{2+} (šie gesikliai padidina interkombinacinės konversijos tikimybę);
2. Paramagnetiniai jonai ir molekulės O_2 , Mn^{2+} , nitroksilo radikalai;
3. Tirpiklio molekulės. Labiausiai gesina fluorescenciją poliniai tirpikliai, pvz., vanduo, kurie, manoma, padidina interkombinacinės konversijos tikimybę fluorescuojančioje molekulėje.
4. Elektroninio sužadinimo energijos akceptorai.

Tenka pažymėti, kad fluorescencijos gesinimą tirpiklio molekulėmis tyrinėti sunku, kadangi biologiškai aktyvių molekulių fluorescencija visuomet matuojama viename ar kitame tirpiklyje, – todėl praktiškai galime tik palyginti fluorescencijos kvantinį našumą viename ar kitame tirpiklyje.

Anksčiau aptartais gesinimo atvejais tirpiklio koncentracija buvo laikoma pastovia, ir tirpiklio gesinimas buvo įskaitomas į konstantą k_2 (vidinė konversija). Praktikoje gesikliais vadinamos papildomai į tirpiklį įdedamos medžiagos, kurių sąlygojamą gesinimo vyksmą aprašo konstanta k_g , o jų koncentracija tirpale žymima $[Q]$.

Pagal Vavilovą, fluorescencijos gesinimas gali būti statinis (I tipas) ir dinaminis (II tipas). Dinaminio fluorescencijos gesinimu vadinamas gesinimas tarpusavyje susidūrus molekulėms, ir vykstant energijos pernašai (žr. 4.2, 4.3 skyrius).

Dinaminio gesinimo atveju stebimas viena laikis φ ir τ mažėjimas didinant gesiklio koncentraciją (žr. (2.4.4), (2.5.5) ir (2.5.8) išraiškas):

$$\begin{cases} \frac{I}{I_g} = 1 + K[Q] \\ \frac{\tau}{\tau_g} = 1 + k_g \tau [Q] = 1 + K[Q] \\ \frac{\tau_g}{\tau_{fl}} = \varphi_g \end{cases} \quad (2.11.1)$$

čia I ir τ – fluorescencijos intensyvumas ir sužadintos būsenos gyvavimo trukmė terpėje be gesiklio, $\tau = 1 / k = 1 / (k_{fl} + k_{IK} + k_V)$, o $\tau_{fl} = 1 / k_{fl}$.

Statinis gesinimas sąlygotas nefluorescuojančių kompleksų (NK) susidarymo reaguojant medžiagos ir gesiklio molekulėms: $\Phi + Q \xrightleftharpoons{K_D} NK$. Iš pusiausvyros lygties gali būti surastas laisvos ir surištos fluorescuojančios medžiagos santykis. Komplexo disociacijos konstanta K_D lygi:

$$K_D = \frac{[\Phi][Q]}{[NK]} \quad (2.11.2)$$

Lyginant fluorescuojančios medžiagos ir jos nefluorescuojančio kompleksų sugerties spektrus, skiriami du atvejai:

1. Fluorescuojančios medžiagos ir jos nefluorescuojančio kompleksų sugerties spektrai nesiskiria. Tuomet gesinimo laipsnis:

$$\frac{\varphi}{\varphi_g} = \frac{[NK] + [\Phi]}{[\Phi]} = 1 + \frac{[NK]}{[\Phi]} \quad (2.11.3)$$

arba, įsistačius K_D , gauname išraišką, analogišką Šterno-Folmerio sąryšiui:

$$\frac{\varphi}{\varphi_g} = 1 + \frac{1}{K_D}[Q]. \quad (2.11.4)$$

2. Fluorescuojančios medžiagos ir jos nefluorescuojančio komplekso sugerties spektrai skiriasi. Tuomet (2.11.4) išraiška negalioja, tačiau esant mažam tirpalo optiniam tankiui, galioja sąryšis:

$$\frac{I}{I_g} = \frac{[NK] + [\Phi]}{[\Phi]}, \quad (2.11.5)$$

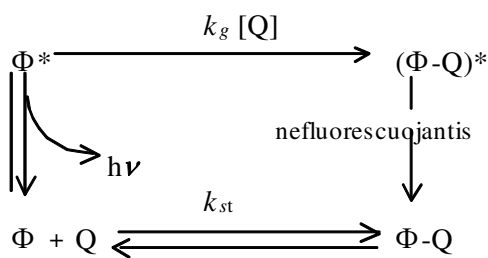
kur I – fluorescencijos intensyvumas be gesintojo, I_g – fluorescencijos intensyvumas esant gesintojui. Įsistatę disociacijos konstantos vertę, gauname analogišką išraišką:

$$\frac{I}{I_g} = 1 + \frac{1}{K_D}[Q]. \quad (2.11.6)$$

Ši lygtis labai panaši į pagrindinę Šterno-Folmerio lygtį (žr. (2.5.7) ir (2.5.9)):

$$\frac{I}{I_g} = 1 + K[Q]; \quad (2.11.7)$$

Tokiu būdu, pagal fluorescencijos intensyvumo priklausomybę nuo gesiklio koncentracijos, statinio ir dinaminio fluorescencijos gesinimo mechanizmai neatskiriami. Tačiau statinio gesinimo atveju fluorescencijos gyvavimo trukmė nesikeičia, keičiasi tik fluorescuojančių molekulių fluorescencijos kvantinis našumas tirpale. Jei galimybės pamatuoti fluorescencijos gyvavimo trukmės nėra, tai matuojama priklausomybė nuo temperatūros. Padidėjus temperatūrai, dinaminio gesinimo sparta didėja, o statinio gesinimo – mažėja.



2.13 pav. Mišraus fluorescencijos gesinimo schema.

Mišraus gesinimo atveju (2.13 pav.) fluorescencijos intensyvumų santykis:

$$I / I_g = (1 + K_{din}[Q]) \cdot (1 + K_{st}[Q]) \quad (2.11.8)$$

yra antro laipsnio priklausomybė nuo $[Q]$.

Dinaminio gesinimo dalis gali būti nustatyta iš fluorescencijos gyvavimo trukmių matavimo (2.11.1).

Išskleidus (2.11.8) išraišką:

$$I / I_g = 1 + (K_{din} + K_{st})[Q] + K_{din}K_{st}[Q]^2 = 1 + K_{ef}[Q] \quad (2.11.9)$$

$$\text{kur } K_{ef} = (K_{din} + K_{st}) + K_{din} K_{st} [Q] = \frac{I/I_g - 1}{[Q]} \quad (2.11.10)$$

Tada atvaizduojant K_{ef} [M^{-1}] priklausomybę nuo $[Q]$, gauname tiesę, kurios susikirtimo taškas su K_{ef} ašimi yra $J = K_{din} + K_{st}$, o posviris į $[Q]$ ašį yra $S = K_{din} \cdot K_{st}$. Išsprendus kvadratinę lygtį $K_{st}^2 - K_{st}I + S = 0$, galima rasti gesinimo konstantas K_{din} ir K_{st} .

Atskiro statinio fluorescencijos gesinimo atvejo pavyzdžiu gali būti fluorescencijos gesinimas sąlygotas nefluorescuojančių dimerų ar agregatų susidarymo, esant didelei molekulių koncentracijai: $[\Phi] + [\Phi] \leftrightarrow \text{dimeras (nefluorescuojantis)}$. Pavyzdžiui, į ląstelių kultūros maitinamąją terpę pridėjus 9-aminoakridino tirpalo, 9-aminoakridinas kaupiasi ląstelėse, lokalizuodamasis chloroplastuose ir mitochondrijose. Organelėse susidaro didelė dažiklio lokali koncentracija, ko pasekoje ir susiformuoja nefluorescuojantys agregatai. Kadangi 9-aminoakridino kaupimasis organelėse išauga mažėjant vidiniam ląstelės terpės pH, tai pagal fluorescencijos gesinimo laipsnį galima įvertinti pH pokyčius ląstelėse.

Cianino dažai gali būti sėkmingai naudojami ląstelių, mitochondrijų, chloroplastų suspensijose matuojant transmembraninį potencialą. Pvz., teigiamai įelektrintos fluorescuojančio zondo dis-C₃(5) molekulės kaupiasi mitochondrijose joms energizuojantis, kai ant mitochondrijų membranos sukuriama potencialų skirtumas su neigiamu krūviu vidinėje membranos pusėje. Kuo didesnis neigiamas krūvis susikaupia vidiniame membranos paviršiuje, tuo daugiau kaupiasi zondo molekulių kaupiasi mitochondrijose, taigi, tuo stipriau pasireiškia zondo molekulių fluorescencijos koncentracinis gesinimas.

2.12. Dimerų ir eksimerų fluorescencija

Tiek statinė, tiek dinaminė molekulių sąveika gali sąlygoti tarpmolekulinių kompleksų susidarymą, kurių fluorescencija pasireiškia visiškai kitoje spektro srityje negu monomerinių molekulių. Pvz., akridino oranžinio monomerinė forma fluorescuoja ties 530 nm. O agregatai – ties 640nm. Tuo būdu, dažiklio kaupimąsi ląstelėse galima stebėti registruojant fluorescencijos juostos spektrinį poslinkį.

Ypatingai įdomus yra sužadintų dimerų susidarymas susidūrus molekulėms (eksimerai), kai viena iš jų pagrindinėje būsenoje, o kita sužadintoje.

1. $\Phi + h\nu \rightarrow \Phi^* \xrightarrow{k_m} \Phi + h\nu_{mono}$ – monomero fluorescencija
2. $\Phi + h\nu \rightarrow \Phi^* \rightarrow (\Phi\Phi)_{eksi}^* \xrightarrow{k_d} \Phi + \Phi + h\nu_{eksi}$, – eksimero fluorescencija

čia k_m ir k_d – šių procesų greičio konstantos.

Tokios molekulės pavyzdžiu gali būti pirenas. Mažos koncentracijos arba klampiuose tirpaluose fluorescuoja monomerinė pireno forma su dviem smailėmis ties 372 nm ir 394 nm. Didesnės koncentracijos tirpaluose atsiranda eksimerų juosta ties 470 nm.

Eksimero ir monomero fluorescencijos juostų intensyvumų santykis $K_{ex} = I_{470} / I_{400}$ vadinamas eksimerizacijos koeficientu, kuris auga didėjant pireno koncentracijai ir mažėjant tirpiklio klampumui.

Stacionariose sąlygose 1 ir 2 procesai gali būti užrašomi kinetinėmis lygtimis:

$$\frac{dn}{dt} = v_m = k_m [\Phi^*], \quad (2.12.1)$$

$$v_d = k_d [\Phi\Phi^*]; \quad (2.12.2)$$

Eksimerizacijos koeficientas proporcingas šių procesų spartoms:

$$K_{ex} = A \frac{v_d}{v_m} = A \frac{k_d}{k_m} [\Phi], \quad (2.12.3)$$

kur A – proporcingumo koeficientas, priklausantis nuo molekulių spektrų formos, ir santykinų monomero ir eksimero fluorescencijos kvantinių našumų. Spartos konstanta k_m nuo aplinkos klampumo nepriklauso. Spartos konstanta k_d atvirkščiai proporcinga aplinkos klampumui (augant klampumui, mažėja molekulių judėjimo greičiai, tuo pačiu ir kelias, kurį gali nueiti sužadinta molekulė per laiką τ – t.y., sužadintos molekulės gyvavimo trukmę). Todėl galima užrašyti:

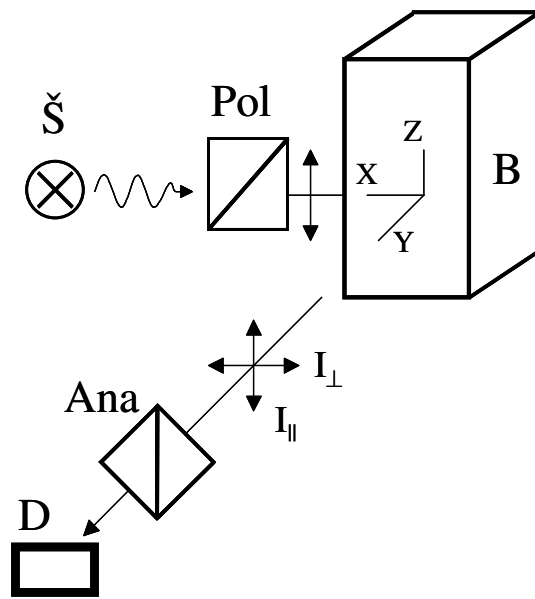
$$k_d = \frac{B}{\eta}, \quad (2.12.4)$$

kur η – klamos koeficientas, B – proporcingumo koeficientas, į kurio išraišką įeina molekulės šiluminė energija (kT). Įstačius (2.12.4) išraišką į (2.12.3) išraišką, gauname:

$$K_{ex} = C [\Phi] \frac{\tau_m}{\eta}, \quad (4.12.5)$$

kur $C = A \cdot B$ – apibendrinta konstanta, $\tau_m = \frac{1}{k_m}$ – pireno monomero sužadintos būsenos gyvavimo trukmė nevykstant eksimerizacijai.

Iš šios išraiškos seka, kad eksimerizacijos konstanta yra atvirkščiai proporcinga terpės klampai η ir tiesiogiai proporcinga fluorescuojančių molekulių koncentracijai.



2.14 pav. Fluorescencijos poliarizacijos registravimo schema. Š – šviesos šaltinis, Pol – poliarizatorius, B – bandinys, Ana – analizatorius, D – detektorius.

Ši eksimerizacijos konstantos priklausomybė nuo terpės klampumo naudojama lipidinio biologinių membranų sluoksnio mikroklampumo matavimuose. Kaip žymeklis dažniausiai naudojamas pirenas. Pvz., palyginamieji pirenų eksimerizacijos tyrimai mažo tankio lipoproteinų, išskirtų iš sveikų ir sergančių išemine širdies liga pacientų kraujo plazmos, terpėje leidžia diagnozuoti ligą. Esant vienodai pirenų – žymeklio koncentracijai, eksimerizacijos koeficientas yra žemesnis ligonio, sergančio išemine liga, kraujo plazmos lipoproteinų terpėje, kadangi joje yra daugiau cholesterolio, o tai sąlygoja didesnę lipoproteinų lipidinės fazės klampumą.

2.13. Liuminescencijos poliarizacija ir jos taikymas molekulių tyrimui

Molekulės sugeria tą spinduliuotę, kurios elektrinis vektorius nukreiptas lygiagrečiai elektrono šuolio dipolio vektoriui molekulėje. Tirpaluose molekulės išsidėsto chaotiškai – tuo pačiu ir jų elektroninių šuolių vektoriai. Tad žadinant tirpalą poliarizuota šviesa, selektyviai žadina tik dalį molekulių. Tad ir tirpalo fluorescencija turėtų būti dalinai poliarizuota. Fluorescencijos poliarizacija bus didžiausia, kai:

- 1) Tirpalas apšviečiamas tiesiškai poliarizuota šviesa.
- 2) Molekulės sugerties ir emisijos vektoriai lygiagretūs.
- 3) Molekulė per sužadintos būsenos gyvavimo trukmę nespėja pakeisti savo orientacijos.

Kiekybiniam fluorescencijos poliarizacijos aprašymui naudojamos dvi tarpusavyje susijusios charakteristikos – emisijos poliarizacijos koeficientas P ir emisijos anizotropija A . Principinė matavimo schema labai paprasta (2.14 pav.).

Iš šaltinio šviesa patenka į poliarizatorių, iš kurio sklinda toliau, o jos elektrinis vektorius orientuotas z kryptimi. Bandinio fluorescencija Y kryptimi registruojama pro analizatorių. Vienu atveju analizatorius orientuojamas ir praleidžia šviesą z kryptimi, kitu atveju – x kryptimi. Taip užregistruojami fluorescencijos intensyvumai I_{\parallel} ir I_{\perp} . Bandinio fluorescencijos

intensyvumas gali būti nagrinėjamas, kaip plokščiai poliarizuotos bangos I_p ir nepoliarizuotos I_n mišinys. Poliarizacijos laipsnis, arba kiekybinė poliarizacijos charakteristika, šiuo atveju gali būti išreikštas kaip:

$$P = \frac{I_p}{I_p + I_n}. \quad (2.13.1)$$

Poliarizaciją galima išreikšti ir eksperimente gaunamais dydžiais I_{\parallel} ir I_{\perp} . Iš optikos žinoma, kad idealus poliarizatorius sumažina nepoliarizuotos šviesos intensyvumą 2 kartus, o taip pat praleidžia visą tiesišką poliarizuotą šviesą, jeigu poliarizuotos šviesos vektorius sutampa su poliarizatoriaus vektoriumi, ir visiškai nepraleidžia šviesos, jeigu poliarizatoriaus ir šviesos vektoriai statmeni. Tada aišku, kad:

$$\begin{aligned} I_{\parallel} &= I_p + \frac{I_n}{2}; \\ I_{\perp} &= \frac{I_n}{2}; \end{aligned} \quad (2.13.2)$$

Įsistatę I_{\parallel} ir I_{\perp} reikšmes į (2.13.1), gauname:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}. \quad (2.13.3)$$

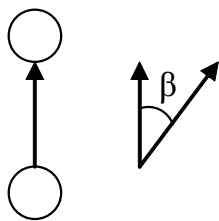
Vektoriaus, sklindančio y kryptimi, indėlis lygus 0, kadangi šviesos bangos judančios y kryptimi neturi poliarizacijos vektoriaus. Tačiau paties bandinio fluorescencija turi šį vektorių. Todėl kartais liuminescencijos charakteristikoms nusakyti naudojama anizotropija A, kur įskaitomi visi elektrinio lauko vektoriai.

$$I_z + I_x + I_y = I_{\parallel} + I_{\perp} \quad (2.13.4)$$

Tada fluorescencijos anizotropija yra lygi:

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}; \quad (2.13.5)$$

Iš šių sąryšių galima surasti ryšį tarp P ir A.



2.15 pav. Elektroniniai sugerties ir fluorescencijos vektoriai bei kampas tarp jų.

Fluorescencijos poliarizacijos dydis priklauso nuo kampo β tarp sugerties ir fluorescencijos elektroninių šuolių vektorių bei nuo aplinkos klampumo η . Jei klampa labai didelė ($\eta = \infty$), tai reiškia, kad per sužadintos būsenos gyvavimo trukmę elektrinių šuolių vektoriai nepasikeičia.

Įvertinkime kampo β įtaką fluorescencijos signalui (2.15 pav.) labai klampiuose tirpaluose. Poliarizaciją

pažymime P_0 . Pagal Pereno (Perren) formulę tiesiškai poliarizuotai šviesai:

$$P_0 = \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{\cos^2 \beta + 3}; \quad (2.13.6)$$

Žinant P_0 , galima apskaičiuoti β . Įdomu tai, kad netgi žadinant bandinį nepoliarizuota šviesa, o fluorescenciją matuojant 90° kampu, kaip ir aptartu atveju, fluorescencija bus dalinai poliarizuota. Tai susiję su tuo, kad skersinių šviesos bangos svyravimų dėka susižadina molekulės, kurių sugerties oscilatoriaus vektorius guli plokštumoje xOy , ir nesusižadina tos, kuriose šio vektoriaus kryptis sutampa su ašimi X . Tad poliarizacija P_0 , esant nepoliarizuotam žadinimui, lygi:

$$P_0 = \frac{(3 \cos^2 \beta - 1)}{(7 - \cos^2 \beta)}; \quad (2.13.7)$$

Kampui β kintant nuo 0 iki 90° , ribinė poliarizacija P_0 keičiasi nuo $+1/2$ iki $-1/3$; jei bandinys žadintas poliarizuota šviesa, ir nuo $1/3$ iki $-1/7$ – jei žadintas nepoliarizuota šviesa.

Šie poliarizacijos koeficientų vertinimai atlikti pasirinkus tam tikrus žadinimo ir fluorescencijos bangos ilgius. Šviesos sklidimo kelyje pastačius monochromatorius, galima matuoti du poliarizacijos spektrus; žadinimo poliarizaciją $P_0 = f(\lambda_{\text{žad}})$ ir fluorescencijos poliarizaciją $P_0 = f(\lambda_{fl})$. Kadangi fluorescencija visada vyksta iš to paties lygmens S_1 nepriklausomai nuo sužadavimo kampo β , tai ir P_0 nepriklauso nuo bangos ilgio λ_{fl} . Tuomet vienos medžiagos homogeninio tirpalo poliarizacijos spektras būtų tiesi linija, lygiagreči bangos ilgių ašiai. Tačiau visiškai kitaip yra su poliarizacijos žadinimo spektru, kadangi molekulės galime sužadinti į skirtingus elektroninius lygmenis, o jie gali turėti skirtingą kampo β orientaciją su fluorescencijos poliarizacija. Užregistravus tokius spektrus, galima gauti informaciją apie molekulės vidinių elektroninių šuolių kiekį sugerties spektre ir jų orientaciją fluorescencijos šuolio atžvilgiu.

Visi šie išvedimai yra teisingi, jeigu molekulės nejuda. Tačiau realiose sąlygose fluorescencijos poliarizacija paprastai stipriai sumažinta dėl difuzijos ir rotacijos (sukamoji difuzija). Sukamoji (arba rotacinė difuzija) aprašoma rotaciniu difuzijos koeficientu D_s arba sukamosios relaksacijos laiku ρ :

$$D_s = \frac{RT}{\xi}; \quad \rho = \frac{1}{2} D_s \quad (2.13.8)$$

ξ - trinties koeficientas aplinkoje, R – dujų konstanta; T – absoliutinė temperatūra. Pagal Stokso dėsnį ξ priklauso nuo aplinkos klampos η ir molekulės spindulio r . Sferinėms molekulėms:

$$\xi = 8\pi r^3 \eta = 6\eta V; \quad D_s = \frac{RT}{6\eta V}, \quad (2.13.9)$$

kur V – vieno molio molekulių užimamas tūris.

Vietoje ρ dažnai naudojamas rotacinis koreliacijos laikas $\sigma = \frac{\rho}{3}$.

Natūralu, kad rotacinės difuzijos dėka vyksta papildoma fluorescencijos depoliarizacija, t.y., P yra mažesnis negu P_0 (vertinant pagal modulį). Fluorescencijos depoliarizacija taip pat priklauso nuo sužadintos molekulės vidutinės gyvavimo trukmės τ ir relaksacijos laiko ρ (arba terpės klampos η).

Bendru pavidalu fluorescencijos poliarizacijos laipsnis P aprašomas Pereno – Jablonskio formule:

$$\frac{1}{P} \pm \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} \pm \frac{1}{3} \right) \left(1 + \frac{3\tau}{\rho} \right) = \left(\frac{1}{P_0} \pm \frac{1}{3} \right) \left(1 + \frac{RT}{V\eta} \tau \right). \quad (2.13.10)$$

Žadinant poliarizuota šviesa, formulėje naudojamas minuso ženklas, o nepoliarizuota – pliusas.

Anizotropija A esant poliarizuotam žadinimui užrašoma formule:

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} \left(1 + \frac{RT}{V\eta} \tau \right); \quad \text{čia } \eta = \frac{A\tau RT}{(A_0 - A)V}; \quad (2.13.11)$$

Nesferinėms molekulėms gaunamos sudėtingesnės išraiškos.

Tokiu būdu iš fluorescencijos poliarizacijos arba anizotropijos matavimų, žinant sužadinto lygmens gyvavimo trukmę, galima išmatuoti aplinkos mikroklampą. Tačiau reikia atsiminti, kad šio metodo naudojimas yra sąlygotas:

1. fluorescuojančio zondo (molekulės) matmenų;
2. sužadintos būsenos gyvavimo laiko τ ;
3. zondo geometrijos nukrypimų nuo sferinės molekulės modelio.

Daugumos dažų fluorescencija vandeniniuose tirpaluose pilnai depoliarizuota. Tačiau poliarizacija atsiranda, kai dažo molekulę patalpiname klampioje aplinkoje (pvz. lipidų sluoksnyje). Taip pat poliarizacija stebima vandeniniuose baltymų ir dažų molekulių kompleksų tirpaluose. Iš poliarizacijos matavimų galima nustatyti:

- baltymo molekulių dydį;
- vienų baltymų kompleksaciją su kitais (susidarant kompleksui, fluorescuojančios dalelės dydis išauga, ir poliarizacija didėja);
- fluorescuojančių molekulių kompleksaciją (agregaciją).

Poliarizaciniai procesai yra neinertiški, todėl galima atlikti kinetinius matavimus. Šiuo metodu nustatyta, kad membranų lipidinio bisluoksnio klampumas lygus augalinio aliejaus klampumui.

Poliarizaciniai matavimai taip pat gali būti taikomi medicininėje diagnostikoje – padidėjęs cholesterolio kiekis limfoidinėse ląstelėse padidina fluorescencinio zondo, esančio ląstelės membranoje, mikroaplinkos klampumą, o tuo pat metu signalizuoja apie aterosklerozės vystymąsi. Toks procesas gali būti nustatytas iš padidėjusios poliarizacijos. Atitinkamai poliarizacijos sumažėjimas, sąlygotas sumažėjusios mikroaplinkos klampos dėl mažesnio nei norma cholesterolio kiekio, gali būti patogeninių vėžinių ląstelės pokyčių rodiklis.