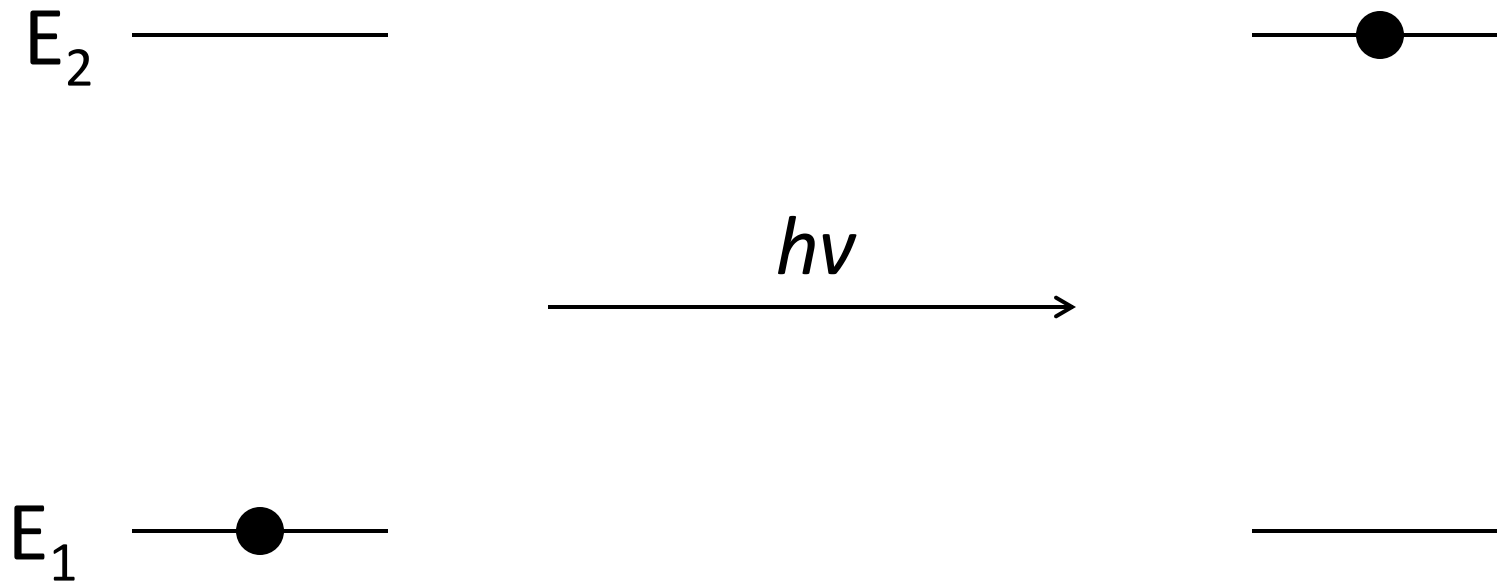


Φωταύγεια

Θεόδωρος Λαζαρίδης

Φωτόνια και άτομα-μόρια: Απορρόφηση

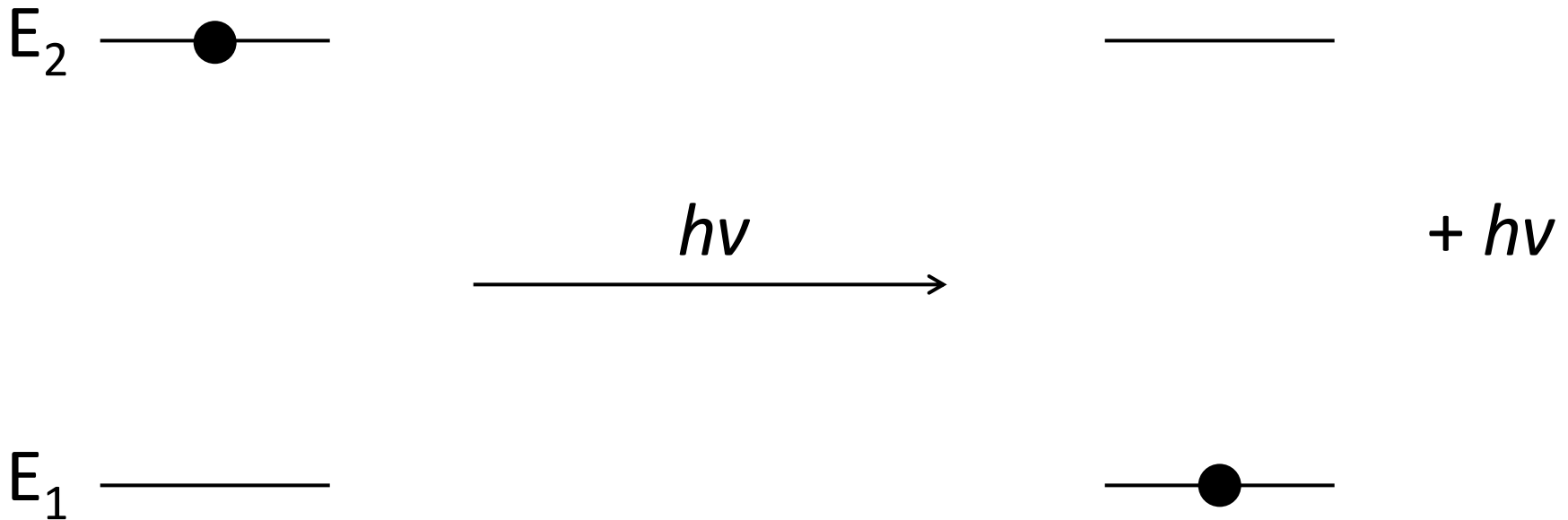
Ένα φωτόνιο μπορεί να απορροφηθεί από ένα άτομο ή μόριο. Αν συμβεί αυτό τότε το άτομο ή μόριο λαμβάνει την ενέργεια του φωτονίου και μεταβαίνει σε μία υψηλότερη ενεργειακή στάθμη (διεγερμένη κατάσταση).



Ισχύει: $|E_1 - E_2| = h\nu$
(διατήρηση της ενέργειας)

Φωτόνια και άτομα-μόρια: Εξαναγκασμένη εκπομπή

Αν ένα άτομο ή μόριο βρίσκεται σε μία υψηλή ενεργειακή στάθμη, μπορεί να αλληλεπιδράσει με ένα φωτόνιο και να μεταβεί σε μία στάθμη χαμηλότερης ενέργειας εκπέμποντας ταυτόχρονα ένα φωτόνιο.

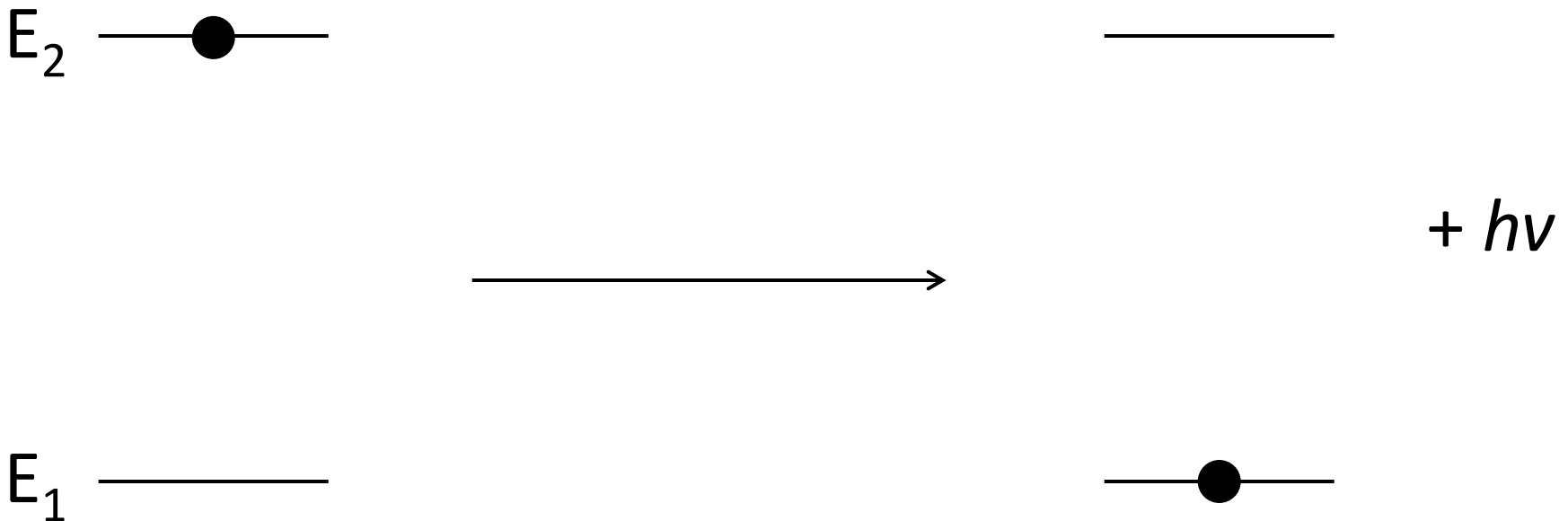


Με το μηχανισμό αυτό ένα φωτόνιο προκαλεί την εκπομπή ενός ακόμη φωτονίου **ίσης ενέργειας**. Στο φαινόμενο αυτό βασίζεται η λειτουργία των **laser**.

$$\text{Ισχύει: } |E_1 - E_2| = h\nu$$

Φωτόνια και άτομα-μόρια: Αυθόρμητη εκπομπή

Αν ένα άτομο ή μόριο βρίσκεται σε μία υψηλή ενεργειακή στάθμη (διεγερμένη κατάσταση), μπορεί να μεταβεί **αυθόρμητα** σε μία χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη εκπέμποντας ένα φωτόνιο. Ο μηχανισμός αυτός είναι γνωστός και ως **ακτινοβόλος αποδιέγερση (radiative deactivation)**.



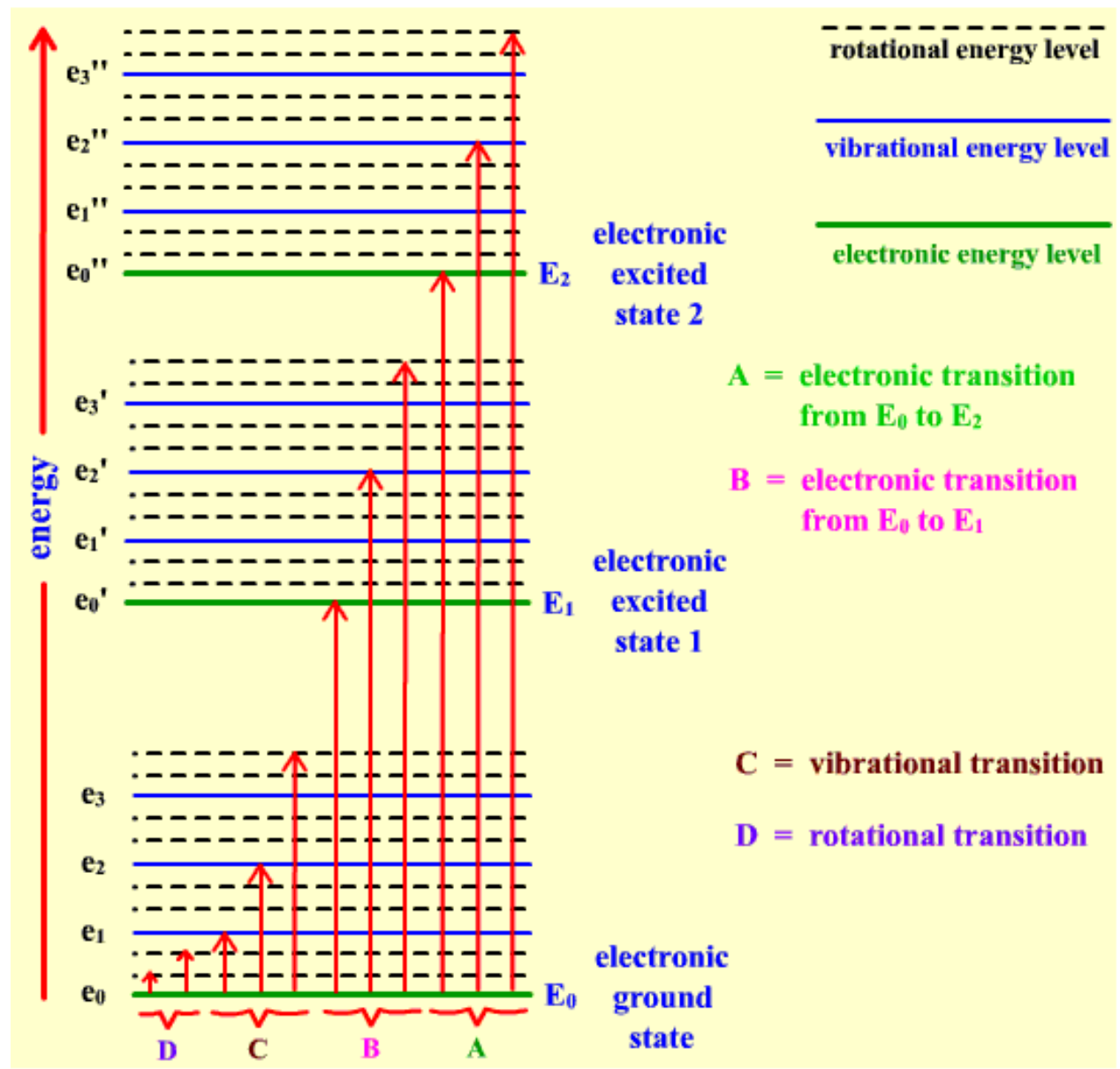
$$\text{Ισχύει: } |E_1 - E_2| = h\nu$$

Είδη μεταπτώσεων και ενέργεια φωτονίου

Ένα φωτόνιο, ανάλογα με την ενέργειά του, σχετίζεται με διαφορετικά είδη διέγερσης ή/και αποδιέγερσης (μετάπτωσης):

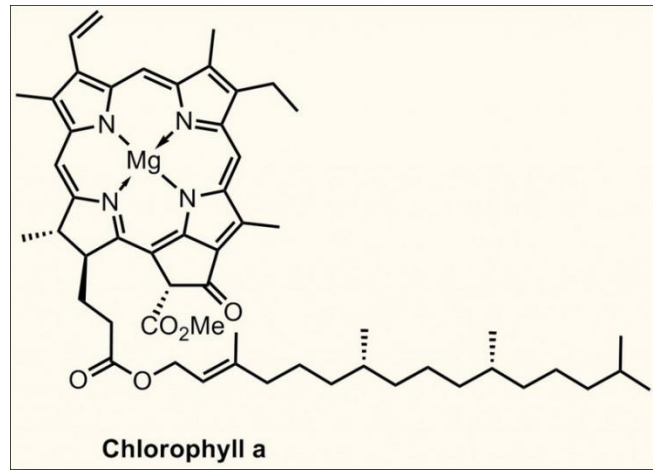
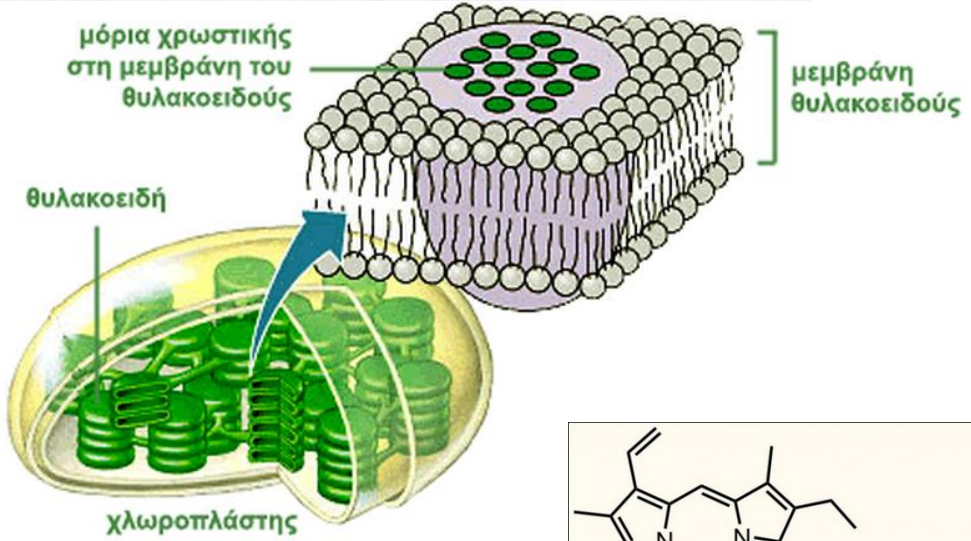
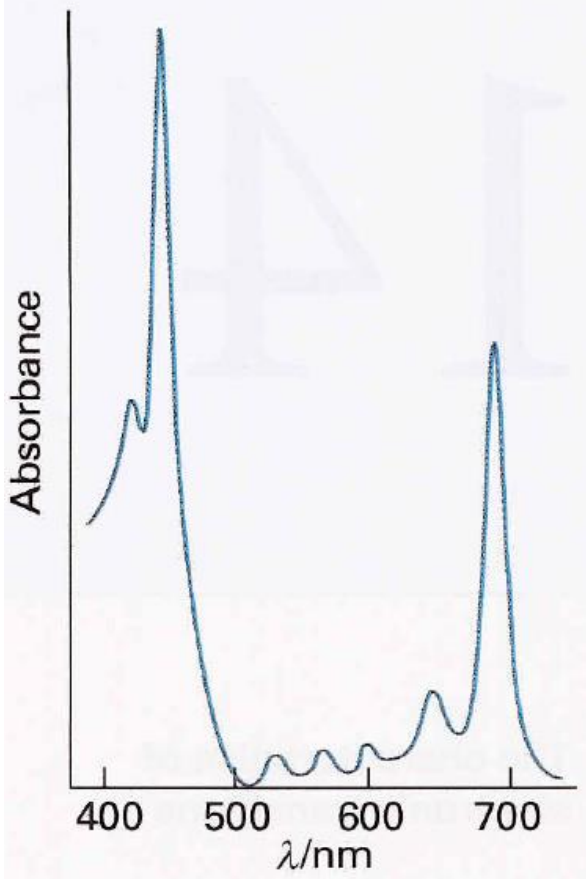
- 1. Περιοχή μικροκυμάτων ($1 \text{ m} > \lambda > 1 \text{ mm}$).** Το φωτόνιο προκαλεί μεταπτώσεις ανάμεσα στις ενεργειακές στάθμες περιστροφής των μορίων. Γι αυτό και η φασματοσκοπία μικροκυμάτων ονομάζεται φασματοσκοπία περιστροφής.
- 2. Περιοχή υπέρυθρου ($0,3 \text{ mm} > \lambda > 0,74 \mu\text{m}$).** Το φωτόνιο προκαλεί μεταπτώσεις ανάμεσα στις ενεργειακές στάθμες δόνησης των μορίων. Γι αυτό και η φασματοσκοπία υπέρυθρου (IR) ονομάζεται φασματοσκοπία δόνησης.
- 3. Περιοχή υπεριώδους/ορατού ($400 \text{ nm} > \lambda > 10 \text{ nm UV}, 800 \text{ nm} > \lambda > 400 \text{ nm}$).** Το φωτόνιο προκαλεί μεταπτώσεις ανάμεσα στις ηλεκτρονικές ενεργειακές στάθμες των μορίων και των ατόμων. Γι αυτό και η φασματοσκοπία υπεριώδους/ορατού (UV-vis) ονομάζεται ηλεκτρονική φασματοσκοπία. Η περιοχή που ενδιαφέρει περισσότερο στο UV είναι από τα 200 έως τα 400 nm

Είδη μεταπτώσεων και ενέργεια φωτονίου



Synoptic table 14.1* Colour, frequency, and energy of light

Colour	λ/nm	$\nu/(10^{14} \text{ Hz})$	$E/(\text{kJ mol}^{-1})$
Infrared	>1000	<3.0	<120
Red	700	4.3	170
Yellow	580	5.2	210
Blue	470	6.4	250
Ultraviolet	<300	>10	>400



Πότε μπορεί να έχουμε μετάπτωση;

Ας θεωρήσουμε ότι ένα φωτόνιο ενέργειας $h\nu$ προσπίπτει σε ένα μόριο το οποίο βρίσκεται σε μία στάθμη με ενέργεια E_1 και κυματοσυνάρτηση Ψ_1 . Ποιες είναι οι προϋποθέσεις ώστε το φωτόνιο αυτό να απορροφηθεί από το μόριο;

1. Το μόριο πρέπει να έχει μία υψηλότερη ενεργειακή στάθμη (E_2, Ψ_2) τέτοια ώστε $|E_1 - E_2| = h\nu$.
2. Το μόριο πρέπει να έχει (έστω και στιγμιαία) ένα ηλεκτρικό δίπολο το οποίο να μπορεί να ταλαντωθεί σε διεύθυνση ίδια με αυτή του ηλεκτρικού πεδίου του φωτονίου και με συχνότητα ίση με ν . Κβαντομηχανικά, το δίπολο αυτό εκφράζεται με την διπολική ροπή μετάπτωσης από την κατάσταση Ψ_1 στην Ψ_2 μ_{21} (στη φασματοσκοπία συνηθίζουμε να γράφουμε πρώτα την τελική κατάσταση)

$$\mu_{21} = \int \Psi_2^* \hat{\mu} \Psi_1 d\tau = \langle 2 | \mu | 1 \rangle$$

Όπου μ ο τελεστής της διπολικής ροπής. Προσοχή: Ο μ_{21} είναι διανυσματικό μέγεθος.

Κανόνες επιλογής

Η **διπολική ροπή μετάπτωσης** από μία αρχική κατάσταση **1** σε μία τελική κατάσταση **2** μ_{21} παίζει κεντρικό ρόλο στην φασματοσκοπία. Η *χρονοεξαρτημένη θεωρία διαταραχών* μας λέει ότι η πιθανότητα (επομένως και η ένταση) μετάπτωσης είναι ανάλογη του $|\mu_{21}|^2$.

Αυτό σημαίνει ότι μόνο οι μεταπτώσεις για τις οποίες ισχύει $\mu_{21} \neq 0$ μπορεί να συμβούν. Επομένως όλες οι κορυφές που βλέπουμε σε ένα φάσμα αντιστοιχούν σε μεταπτώσεις για τις οποίες $\mu_{21} \neq 0$.

Ο αναλυτικός υπολογισμός του ολοκληρώματος μ_{21} είναι επίπονος. Όμως σχετικά εύκολα μπορούμε να εκτιμήσουμε πότε το μ_{21} είναι μηδέν και πότε όχι. Αυτό γίνεται εξετάζοντας τη **συμμετρία** των τροχιακών (ή κυματοσυναρτήσεων) που μας ενδιαφέρουν.

Οι **κανόνες επιλογής** στη φασματοσκοπία μας λένε πότε το μ_{21} είναι μηδέν και πότε όχι. Για παράδειγμα, στην **ηλεκτρονική φασματοσκοπία των ατόμων** το μ_{21} είναι **μη μηδενικό** μόνο όταν για τον κβαντικό αριθμό της στροφορμής ισχύει $\Delta l = \pm 1$. Επομένως, μόνο οι μεταπτώσεις μεταξύ τροχιακών που διαφέρουν κατά ± 1 στον κβαντικό αριθμό l είναι πιθανό να συμβούν. Όταν για μία μετάπτωση ισχύει $\mu_{21} \neq 0$ τότε λέμε ότι αυτή είναι **επιτρεπτή** ενώ όταν $\mu_{21} = 0$ λέμε ότι είναι **απαγορευμένη**. Παρακάτω θα δούμε διάφορα παραδείγματα κανόνων επιλογής.

Εξήγηση του κανόνα Laporte

Για επιτρεπτή μετάπτωση

Πρέπει $\mu_{21} = \int \Psi_2 \hat{\mu} \Psi_1 d\tau = \langle 2 | \mu | 1 \rangle \neq 0$

Το μ είναι u επομένως αν Ψ_1 u και Ψ_2 g τότε το γινόμενο τους θα είναι $g \times u \times u = g$. Όταν μία συνάρτηση είναι g το ολοκλήρωμα της είναι μη μηδενικό. Ομοίως όταν Ψ_1 και Ψ_2 είναι $u \Rightarrow u \times u \times u = u$ όποτε το ολοκλήρωμα είναι μηδέν όπως και η πιθανότητα της μετάπτωσης.

Γενικά ισχύει:

$$u \times u = g$$

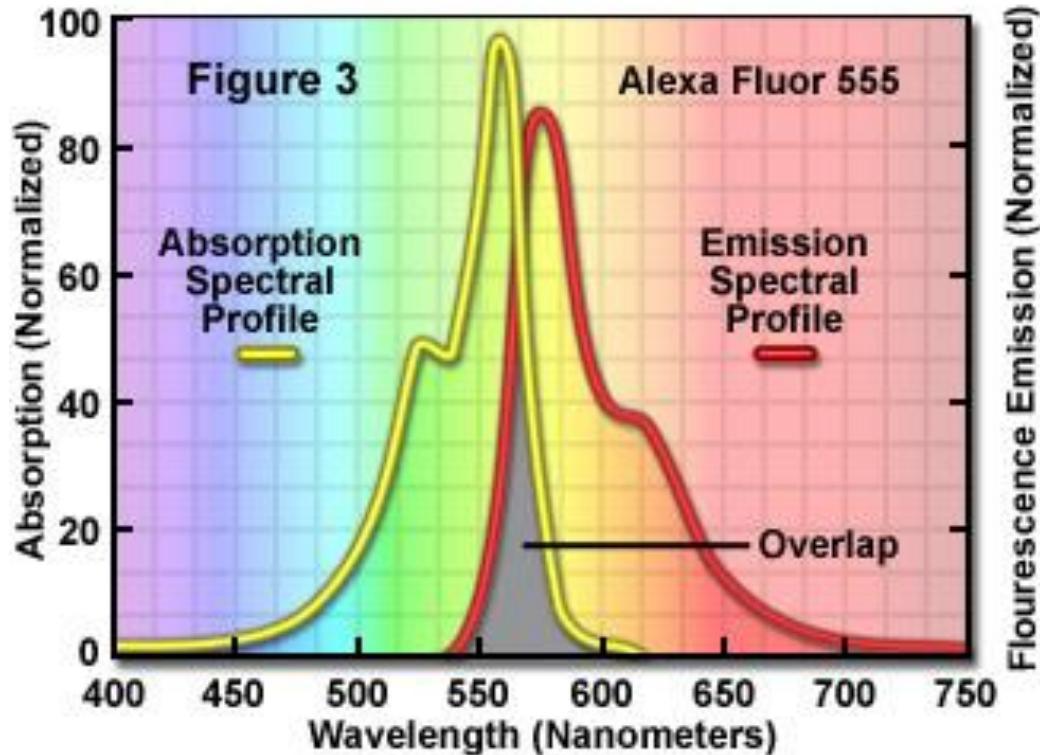
$$g \times u = u$$

$$g \times g = g$$

Τονίζουμε ότι μία κυματοσυνάρτηση μπορεί να έχει συμμετρία g ή u μόνο όταν το μόριο έχει κέντρο συμμετρίας.

Φωταύγεια – Χαρακτηριστικά

Fluorophore Absorption and Emission Profiles



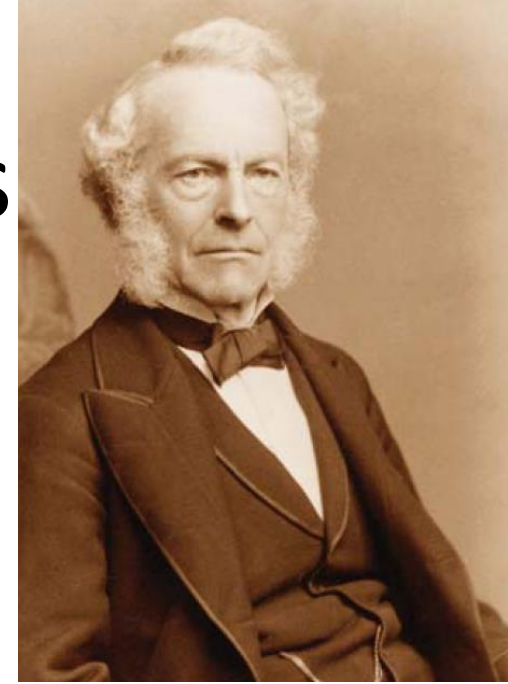
Μήκος κύματος μεγίστου (λ_{em})

Μετατόπιση Stokes

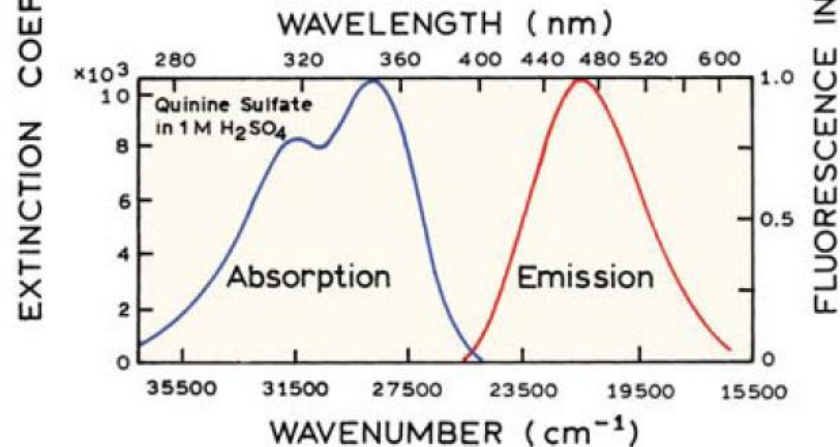
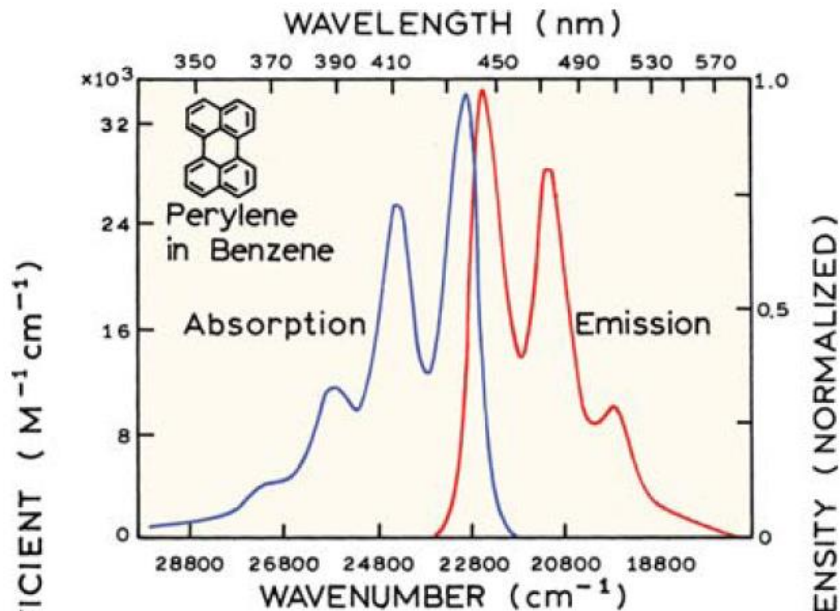
Χρόνος ζωής (lifetime, τ)

Κβαντική απόδοση, Φ

Μετατόπιση Stokes

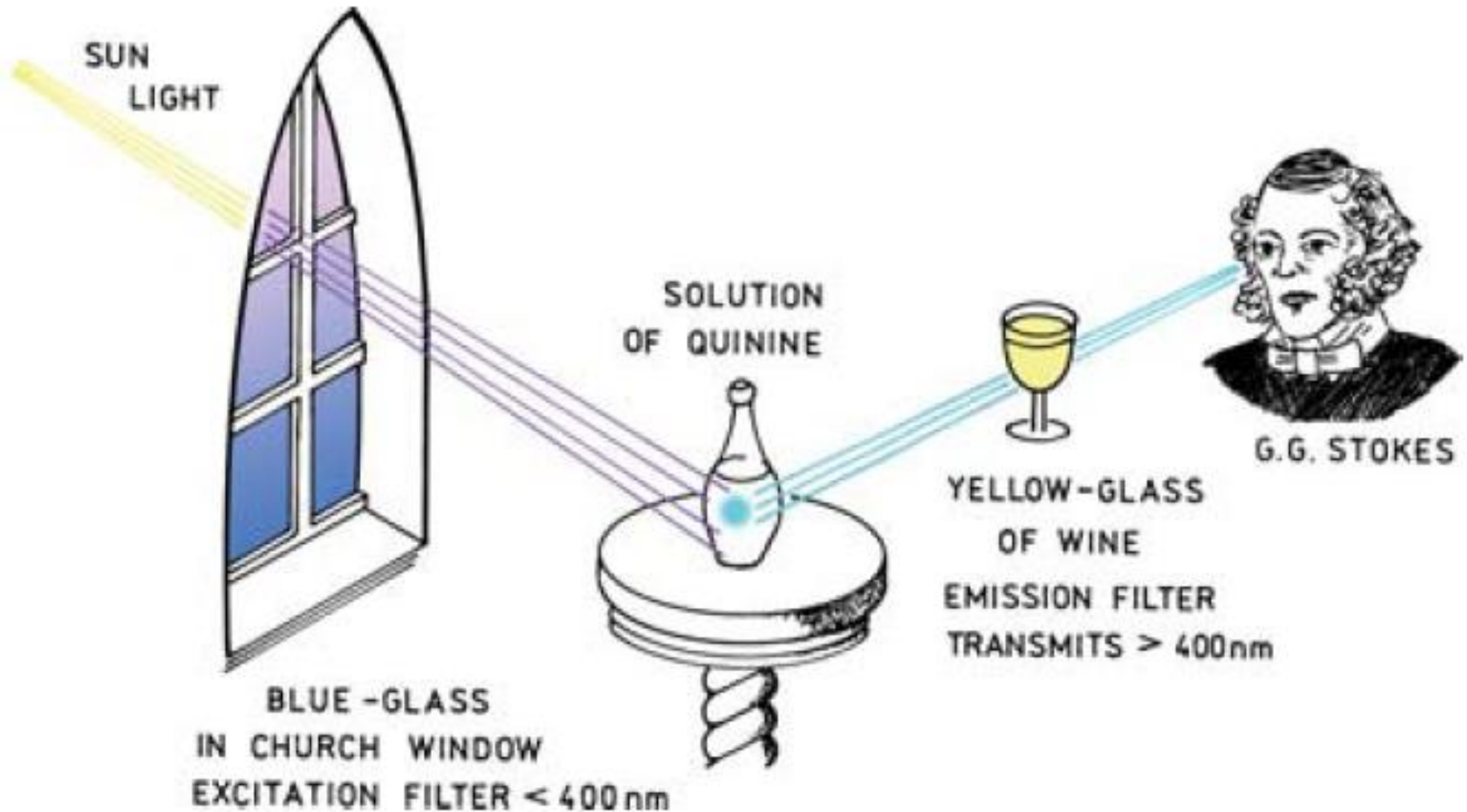


Sir George Gabriel Stokes,
1819–1903

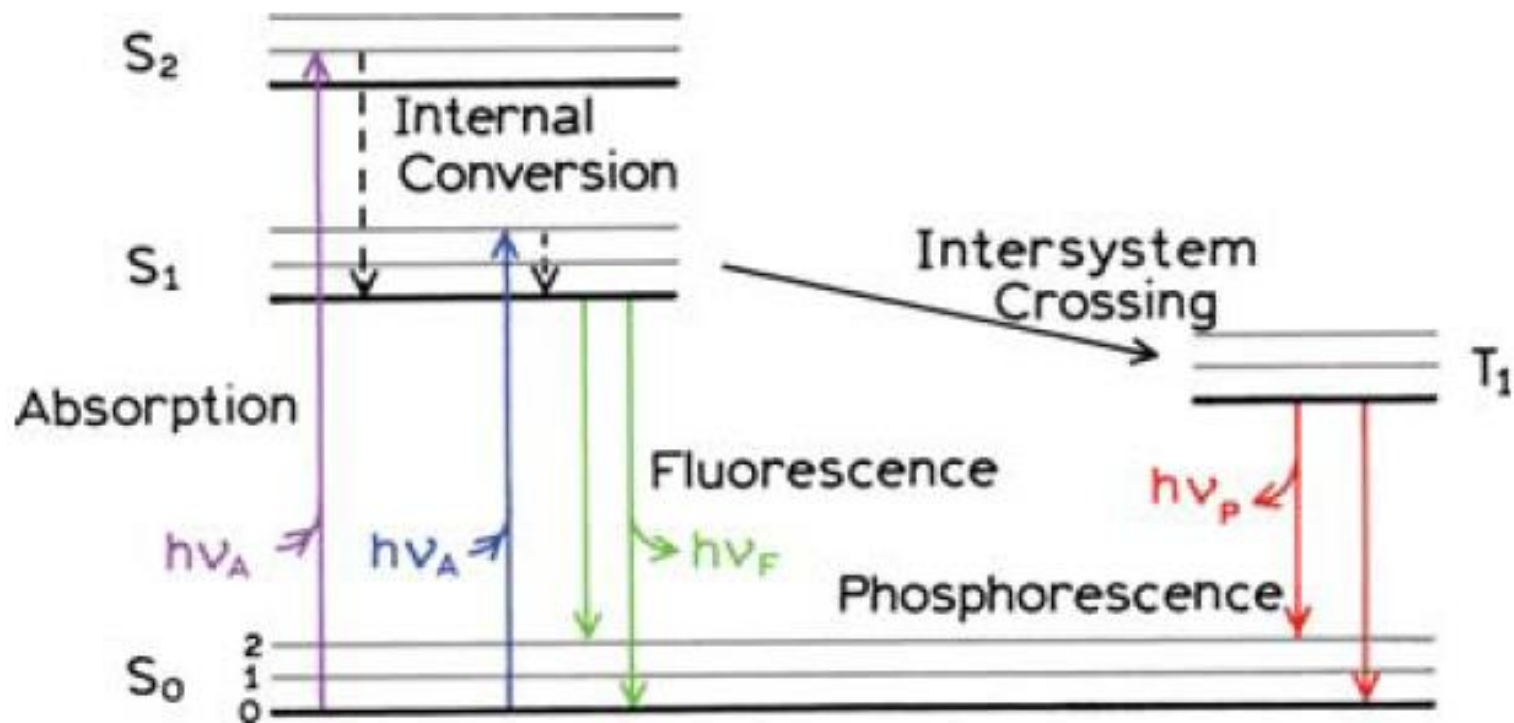


Τυπικά η εκπομπή είναι μικρότερης ενέργειας από την απορρόφηση.
Η μετατόπιση αυτή προς το ερυθρό ονομάζεται μετατόπιση Stokes

Το πείραμα του Stokes



Που οφείλεται η μετατόπιση Stokes;



Πάντοτε ένα τμήμα της ενέργειας που αρχικά δόθηκε στο μόριο (**απορρόφηση**) «χάνεται» κατά την **εσωτερική μετατροπή** του μορίου.

Η ενέργεια αυτή κατανέμεται στις **δονητικές στάθμες** του μορίου και τελικά αποδίδεται στο περιβάλλον ως **θερμότητα**.

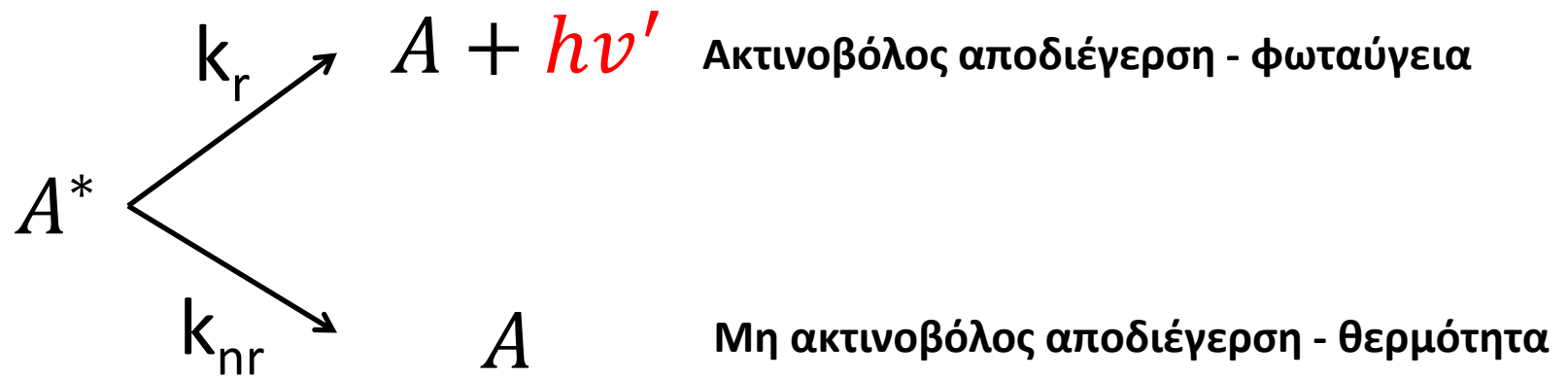
Περαιτέρω απώλειες ενέργειας είναι δυνατό να έχουμε λόγω **αλληλεπιδράσεων με το διαλύτη**, λόγω σχηματισμού συμπλόκου στη διεγερμένη κατάσταση (excimer, exciplex) κ.α.

Χρόνος ζωής



Φωτοδιέγερση με απορρόφηση φωτονίου UV-vis και παραγωγή ηλεκτρονικά διεγερμένου μορίου

Αποδιέγερση με παράλληλες αντιδράσεις πρώτης τάξης



$$[A^*]_t = [A^*]_0 e^{-(k_r + k_{nr})t}$$

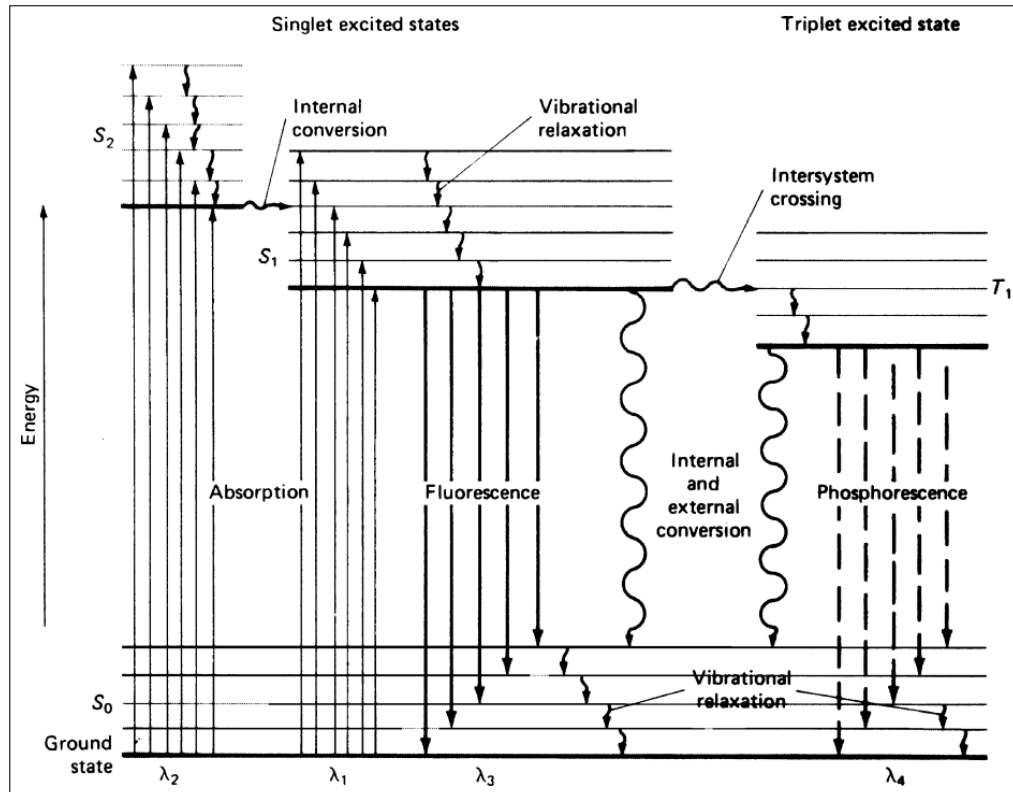
Επομένως, $k_{obs} = k_r + k_{nr}$

$$\tau_{obs} = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

Επειδή για αντιδράσεις 1ης τάξης $\tau = \frac{1}{k}$

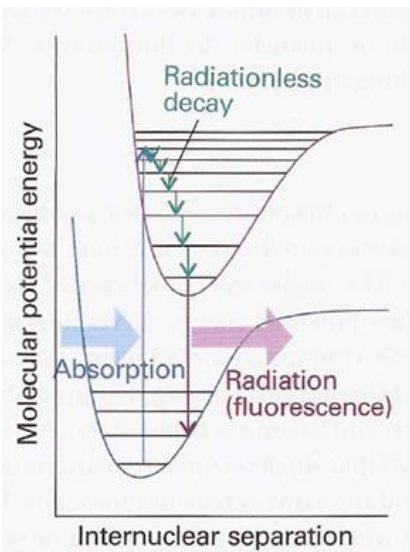
Κανόνας Kasha-Vavilov

- Η κβαντική απόδοση της φωταύγειας είναι ανεξάρτητη του μήκους κύματος διέγερσης



Η φωταύγεια σχεδόν πάντα οφείλεται στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση μιας δεδομένης πολλαπλότητας ανεξάρτητα από το ποια κατάσταση παράγεται πρώτη.

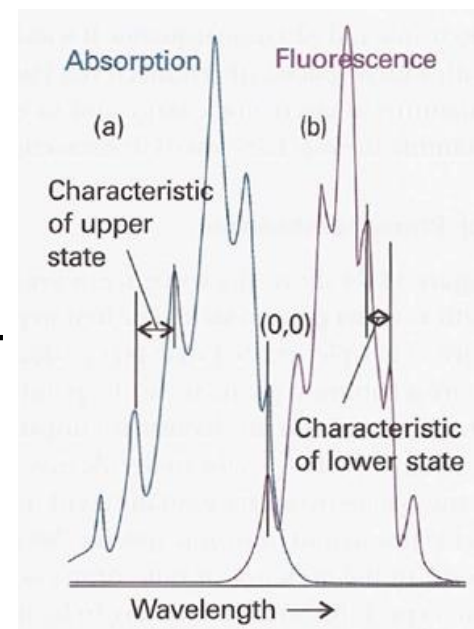
Φθορισμός



A

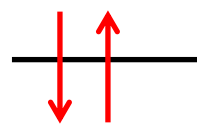
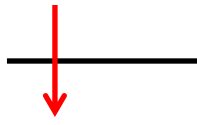
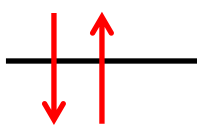
${}^1A^*$

A



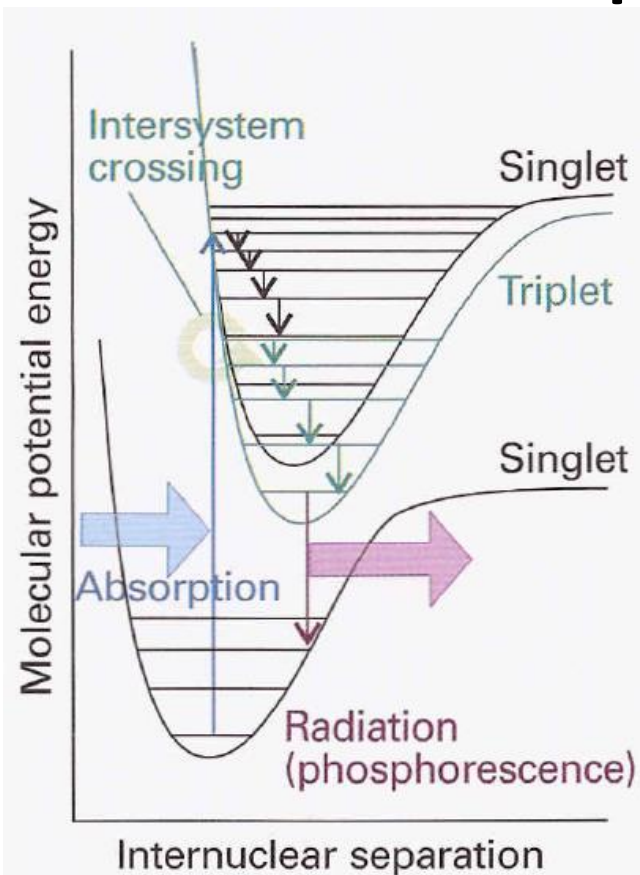
$+h\nu$

$+h\nu'$



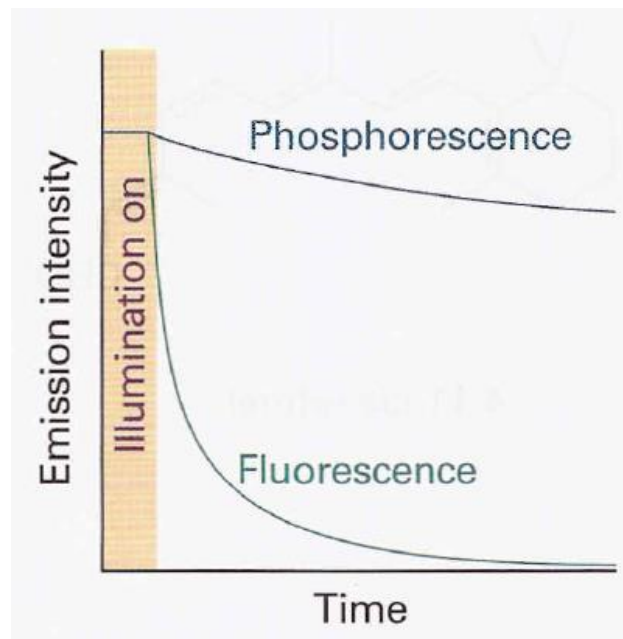
Διατήρηση του spin κατά την αποδιέγερση => **Επιτρεπτή διεργασία**
Η μετατόπιση Stokes είναι συνήθως μικρή
Ο χρόνος ζωής σύντομος (συνήθως 0,5 – 5 ns το πολύ ~ 10 ns)

Φωσφορισμός



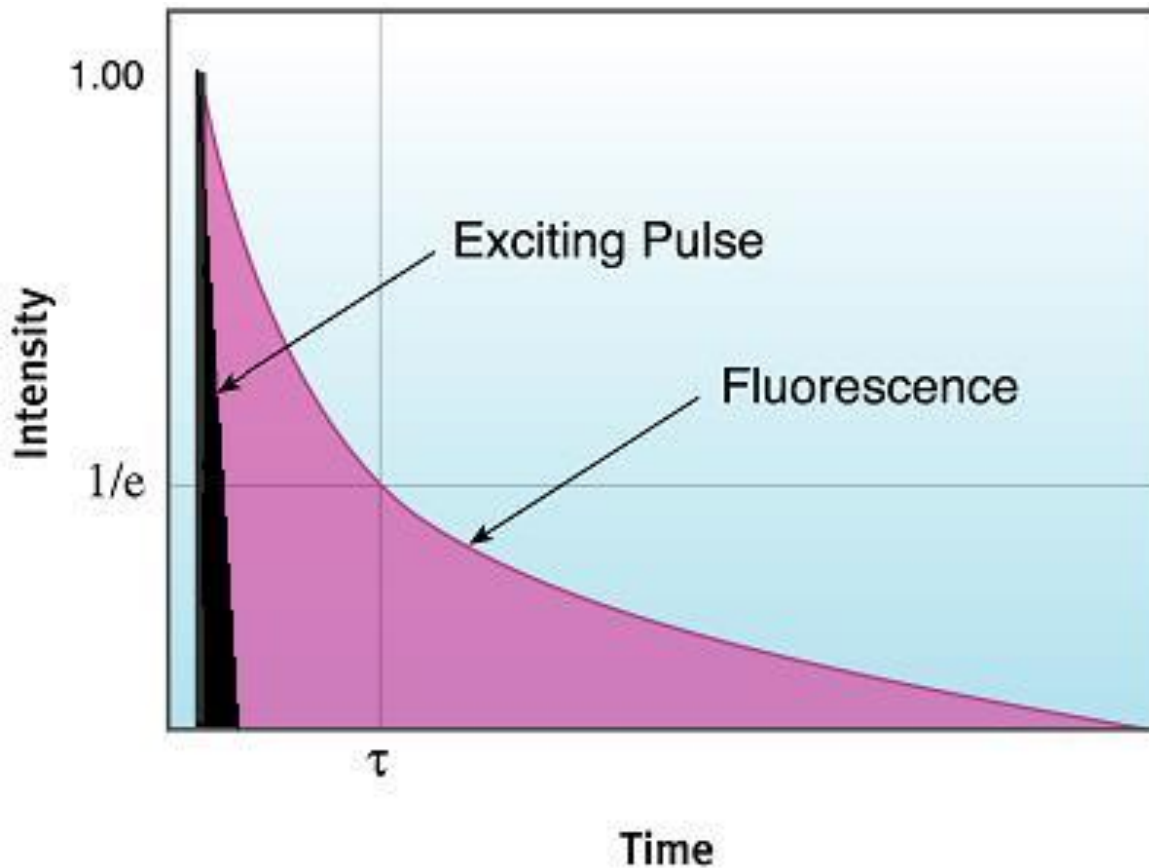
Πολλές φορές ένα μόριο που αρχικά διεγείρεται σε μία **απλή** διεγερμένη κατάσταση μπορεί να μεταβεί στην αντίστοιχη **τριπλή**. Αυτό γίνεται με μία διεργασία που ονομάζεται **διασυστημική μετάβαση**. Η διεργασία αυτή ευνοείται όταν στο μόριο υπάρχει κάποιο βαρύ άτομο (βαρύτερο του S).

Η μετάβαση στην βασική κατάσταση είναι απαγορευμένη κατά spin. Γι αυτό το λόγο ο φωσφορισμός έχει μεγάλη χρονική διάρκεια (μέχρι και μερικά s).



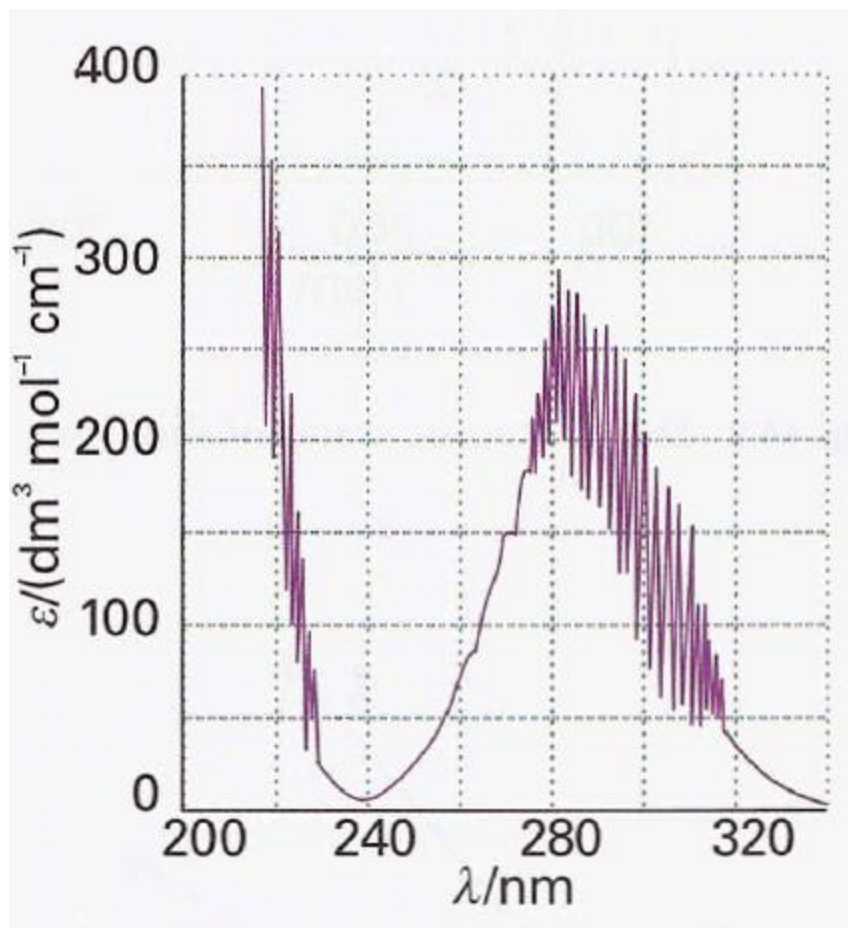
Χρόνος ζωής – Μέτρηση

$$I_{em} = I_0 e^{-\frac{t}{\tau_{obs}}}$$

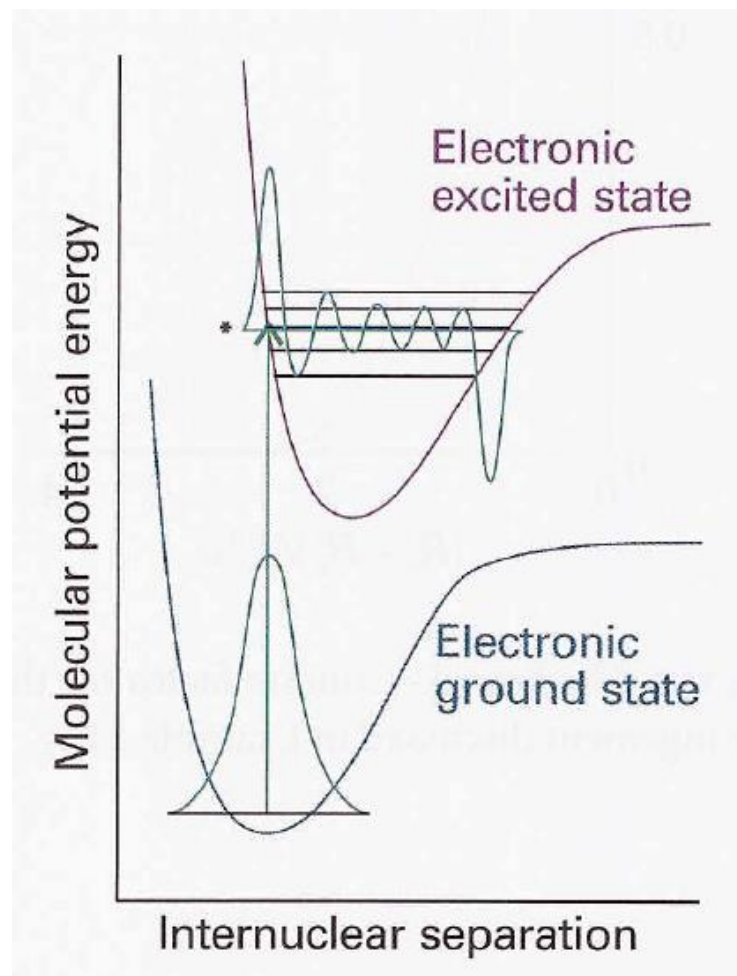


Το τ βρίσκεται με προσαρμογή (fitting) των δεδομένων σε εκθετικό

Δονητική δομή στα ηλεκτρονικά φάσματα

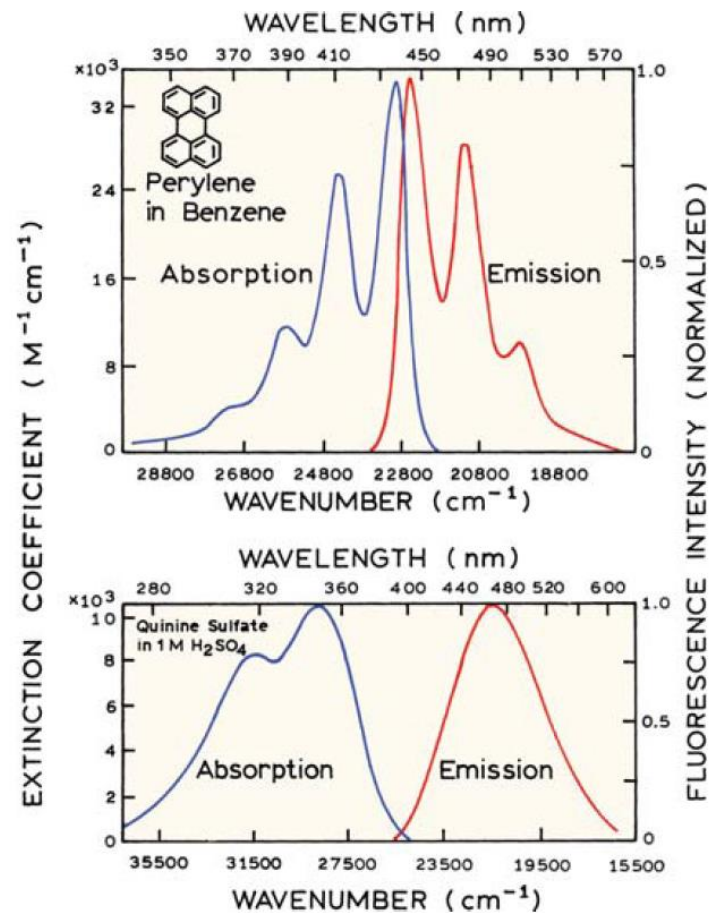
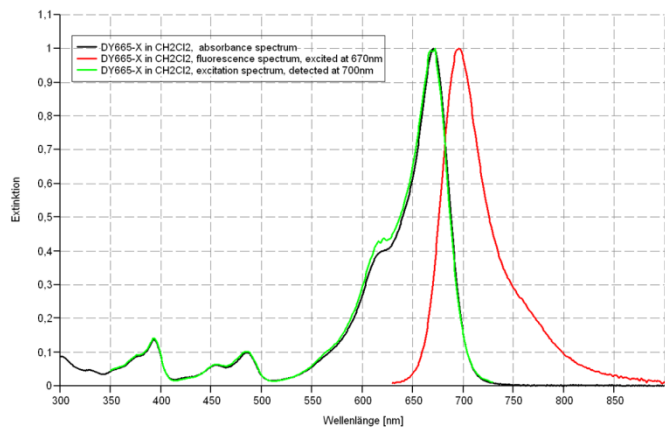
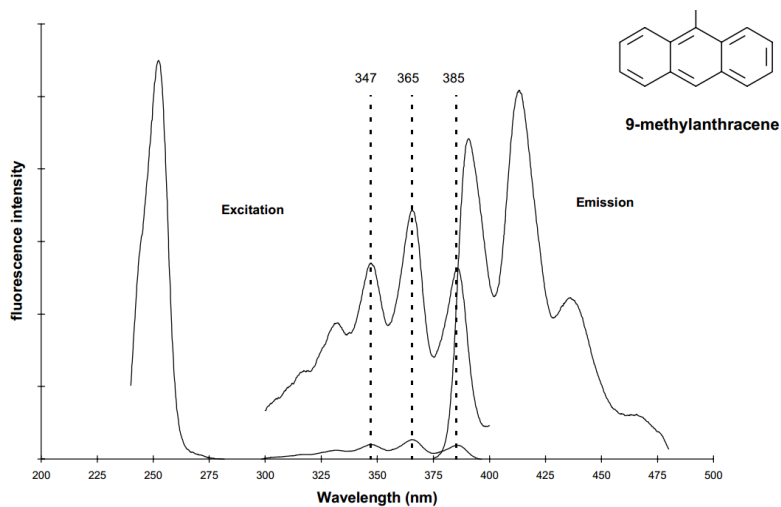


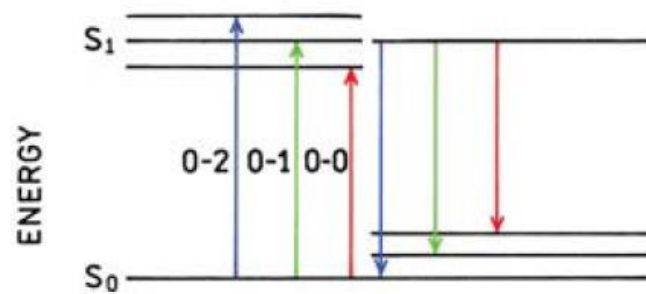
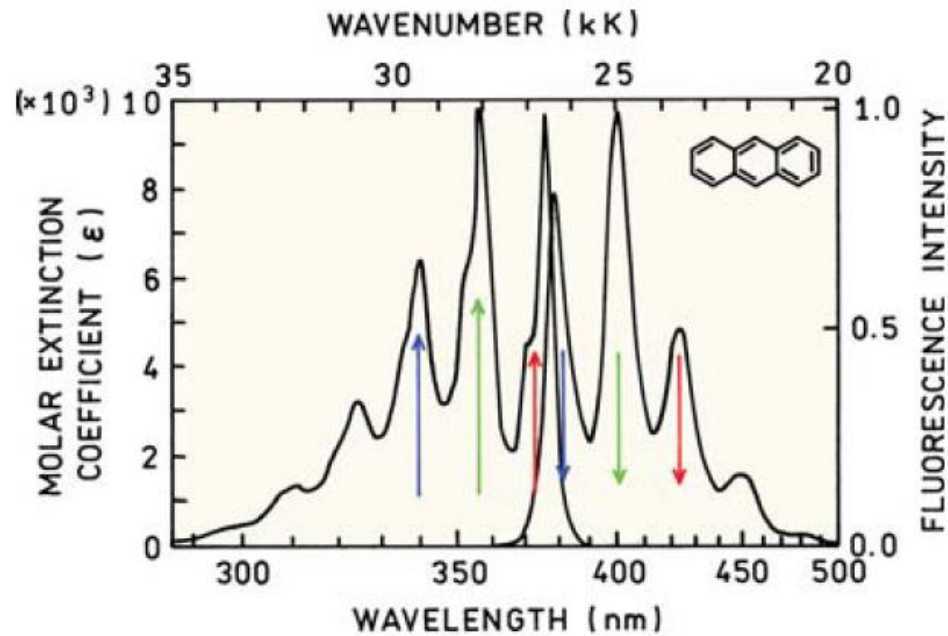
Φάσμα αερίου SO_2



Ο κανόνας ειδώλου-αντικειμένου

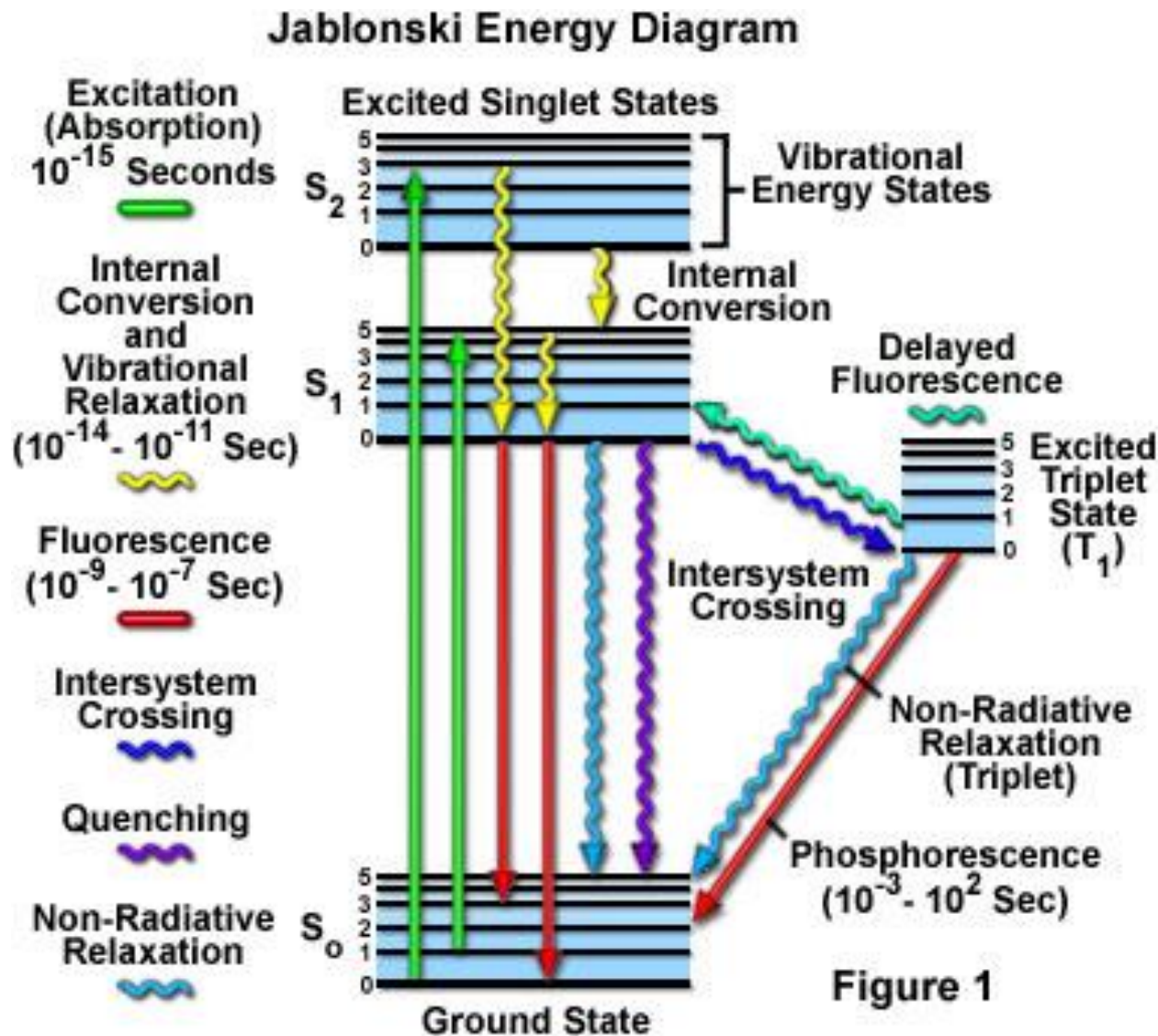
Σε πολλές περιπτώσει παρατηρείται ότι το φάσμα φθορισμού έχει σχέση ειδώλου – αντικειμένου με αυτό της απορρόφησης.





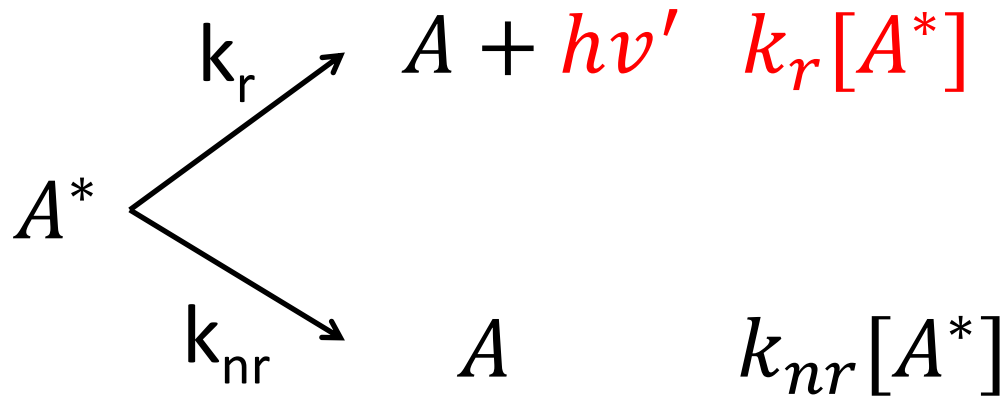
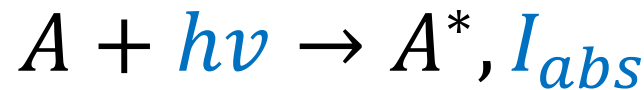
Η ομοιότητα μεταξύ των δονητικών επιπέδων των S_0 και S_1 οδηγεί σε φάσματα με σχέση ειδώλου-αντικειμένου

Διάγραμμα Jablonski των κυριότερων διεργασιών σε ένα ηλεκτρονικά διεγερμένο μόριο



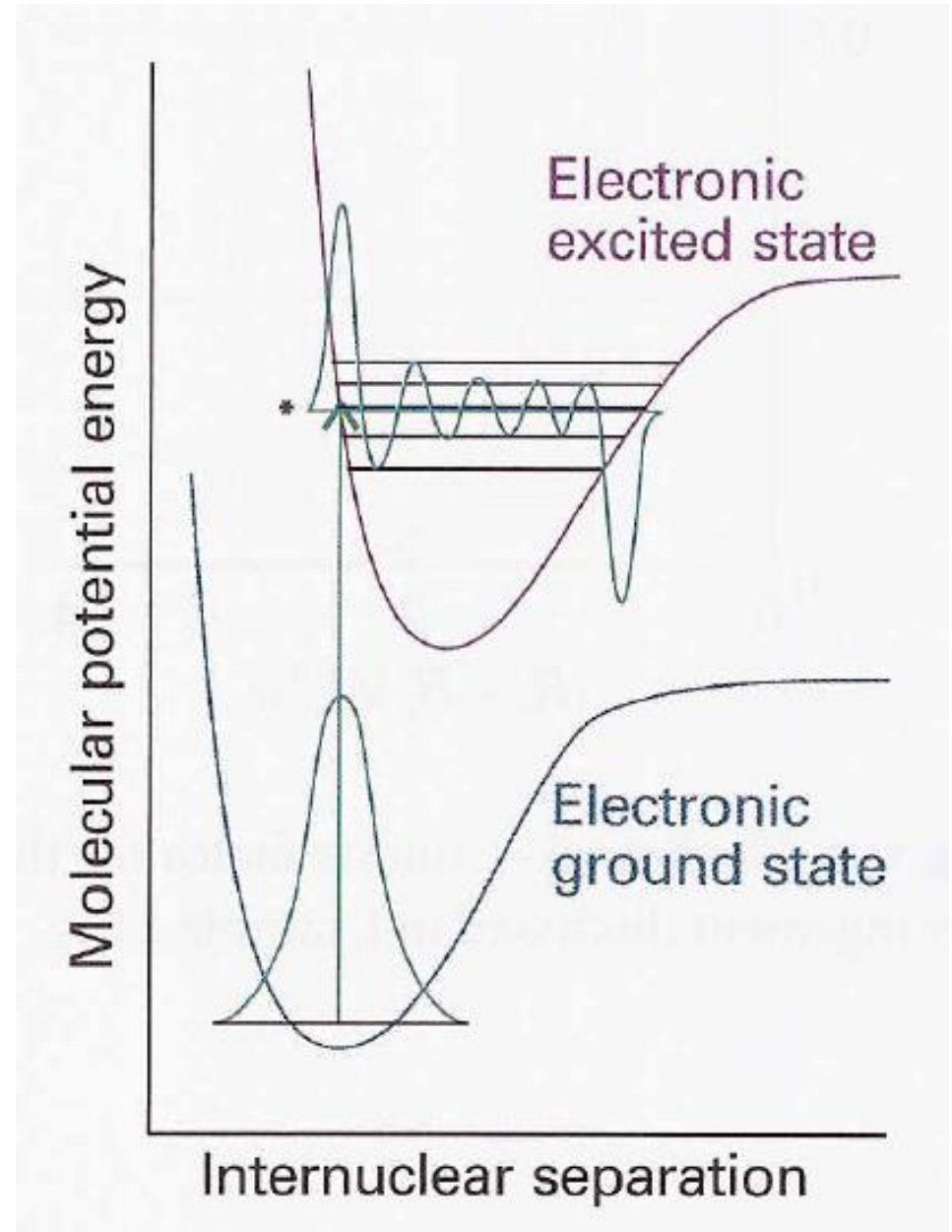
Κβαντική Απόδοση

$$\Phi = \frac{\text{μορια που εκπεμπουν ανα μοναδα χρονου ανα μοναδα ογκου}}{\text{μορια που απορροφουν ανα μοναδα χρονου ανα μοναδα ογκου}}$$



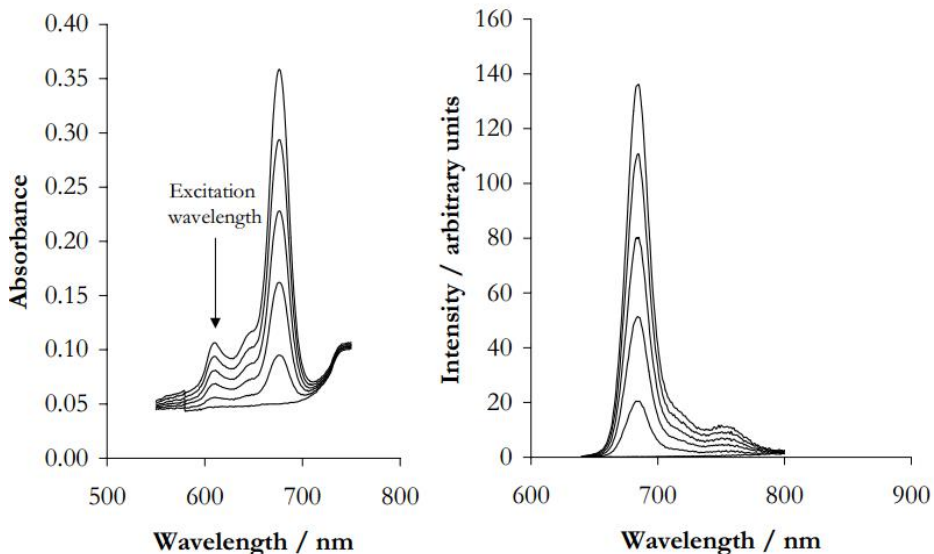
$$\Phi = \frac{k_r[A^*]}{I_{abs}} = \frac{k_r[A^*]}{(k_r + k_{nr})[A^*]} \Rightarrow \Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = \frac{\tau_{obs}}{\tau_r}$$

Σύμφωνα με την **αρχή Frank – Condon** κατά τη διάρκεια μιας ηλεκτρονικής μετάπτωσης οι πυρήνες παραμένουν ακίνητοι. Αυτό σημαίνει ότι όταν ένα μόριο διεγείρεται ηλεκτρονικά, αρχικά θα βρεθεί σε μία **δονητικά διεγερμένη στάθμη** της ηλεκτρονικά διεγερμένης κατάστασης.



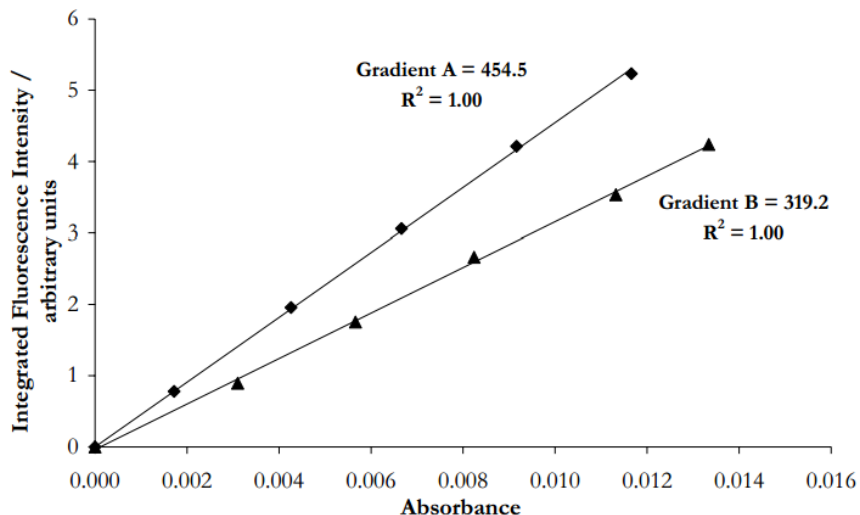
Κβαντική Απόδοση – Μέτρηση

Χρησιμοποιούμε πρότυπη ουσία με γνωστή Φ



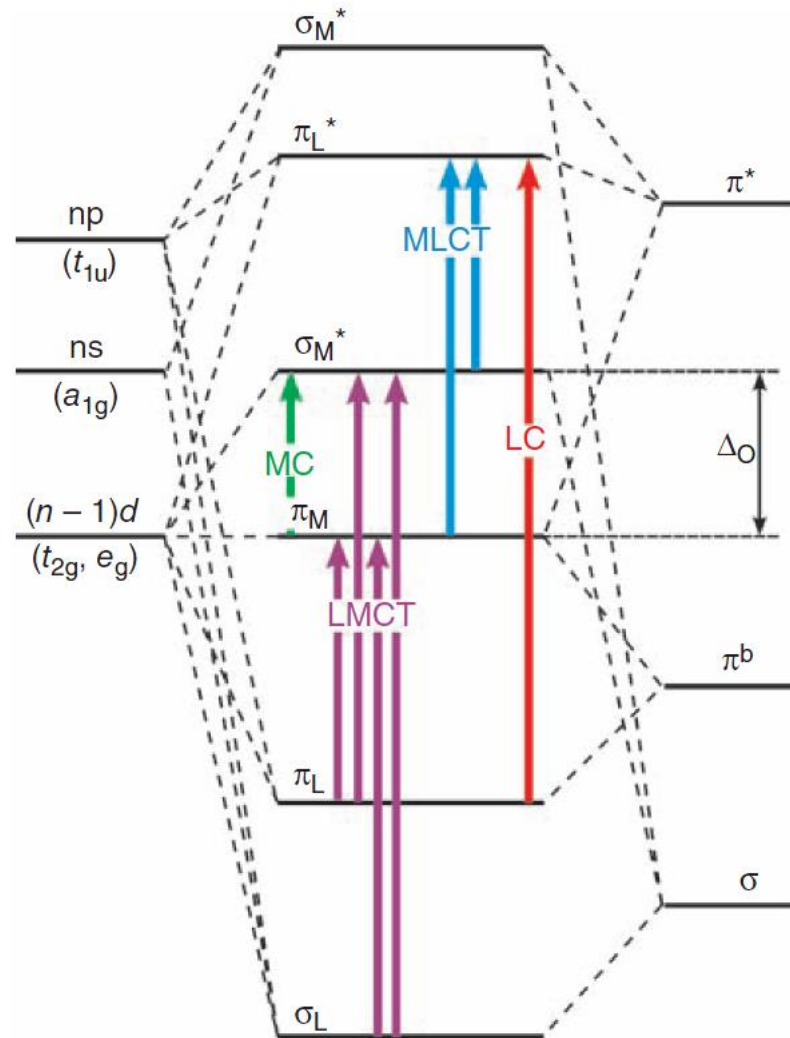
$$\Phi_x = \Phi_{st} \frac{K\lambda_{\text{κλιση}_x}}{K\lambda_{\text{κλιση}_{st}}} \left(\frac{\eta_x}{\eta_{st}} \right)^2$$

$$\tau_r = \frac{\tau_{obs}}{\Phi}$$

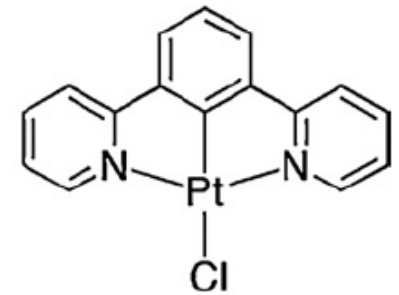
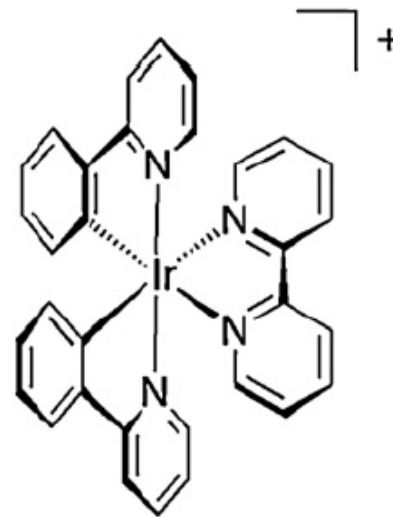
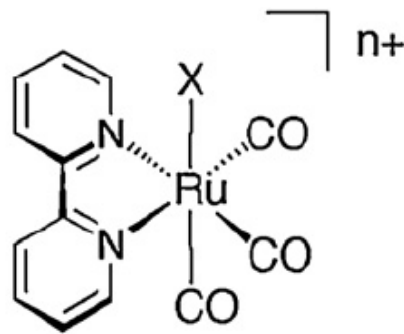
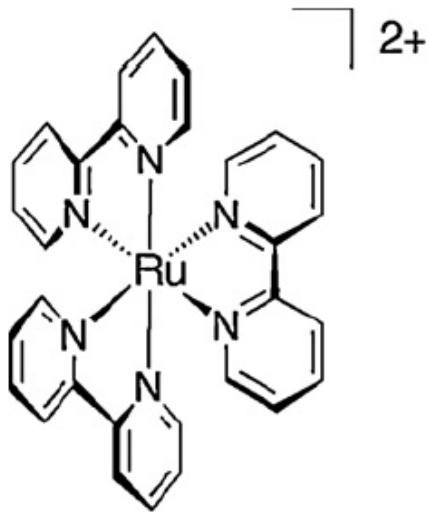


Μετρώντας το τ_{obs}
και την Φ μπορούμε
να βρούμε το τ_r

Ηλεκτρονικές μεταπτώσεις σε ένα οκταεδρικό σύμπλοκο

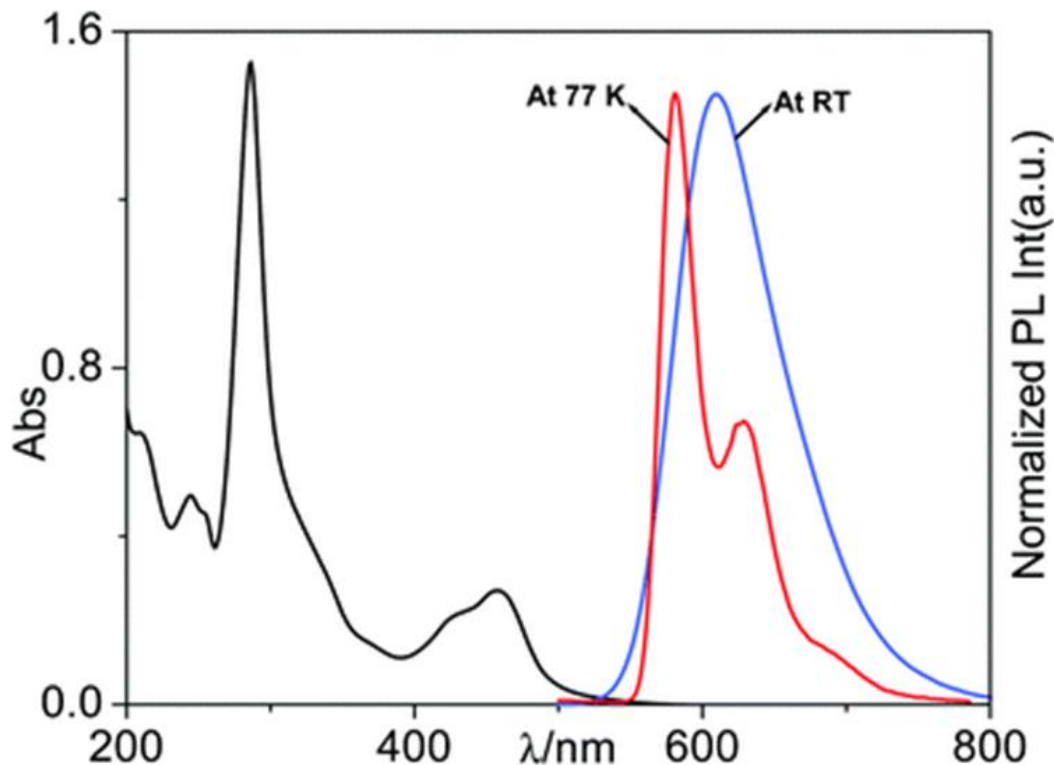


Παράδειγμα: Το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$



Σύμπλοκα πολύτιμων μετάλλων που παρουσιάζουν φωσφορισμό

Φωσφορισμός του $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$



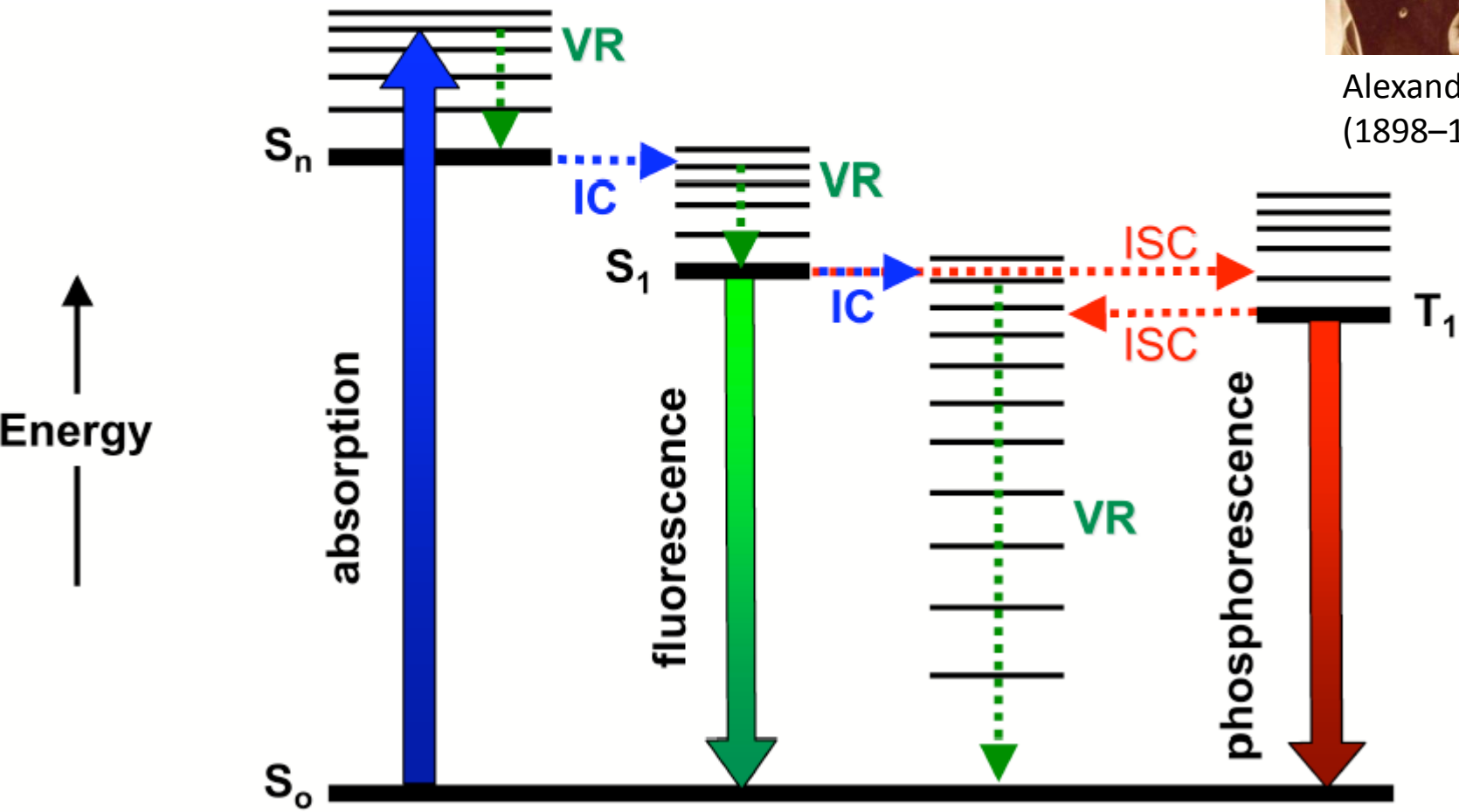
Οφείλεται σε κατάσταση 3MLCT, το $\Phi_{\text{ISC}} \approx 1$ λόγω του βαρέως μετάλλου (Ru)

Παρατηρούμε ότι σε χαμηλή T το φάσμα εκπομπής μετατοπίζεται προς υψηλότερες ενέργειες και αποκτά λεπτή υφή. (γιατί ;)

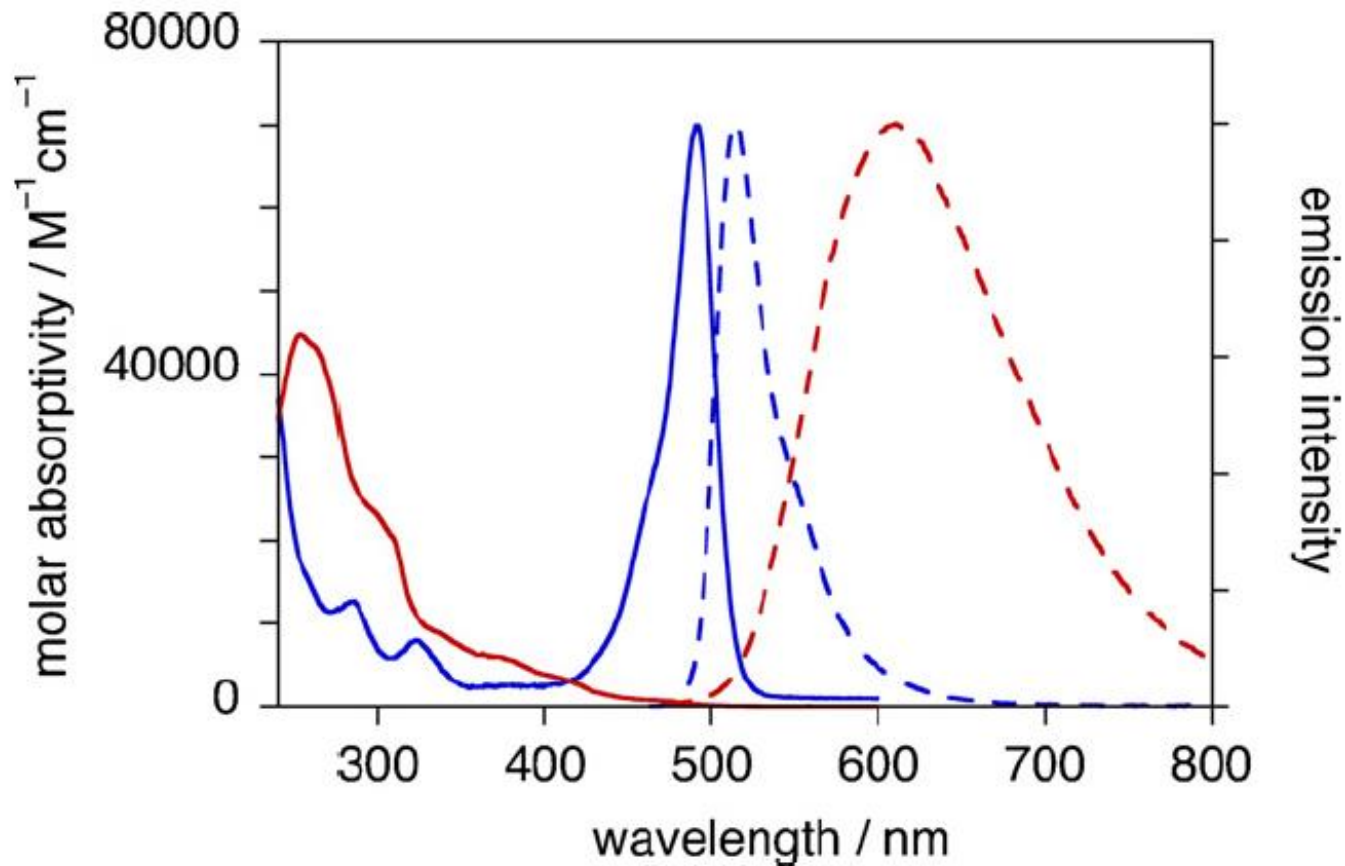
Jablonski diagram



Alexander Jablonski
(1898–1980)



Σύγκριση – Μετατόπιση Stokes

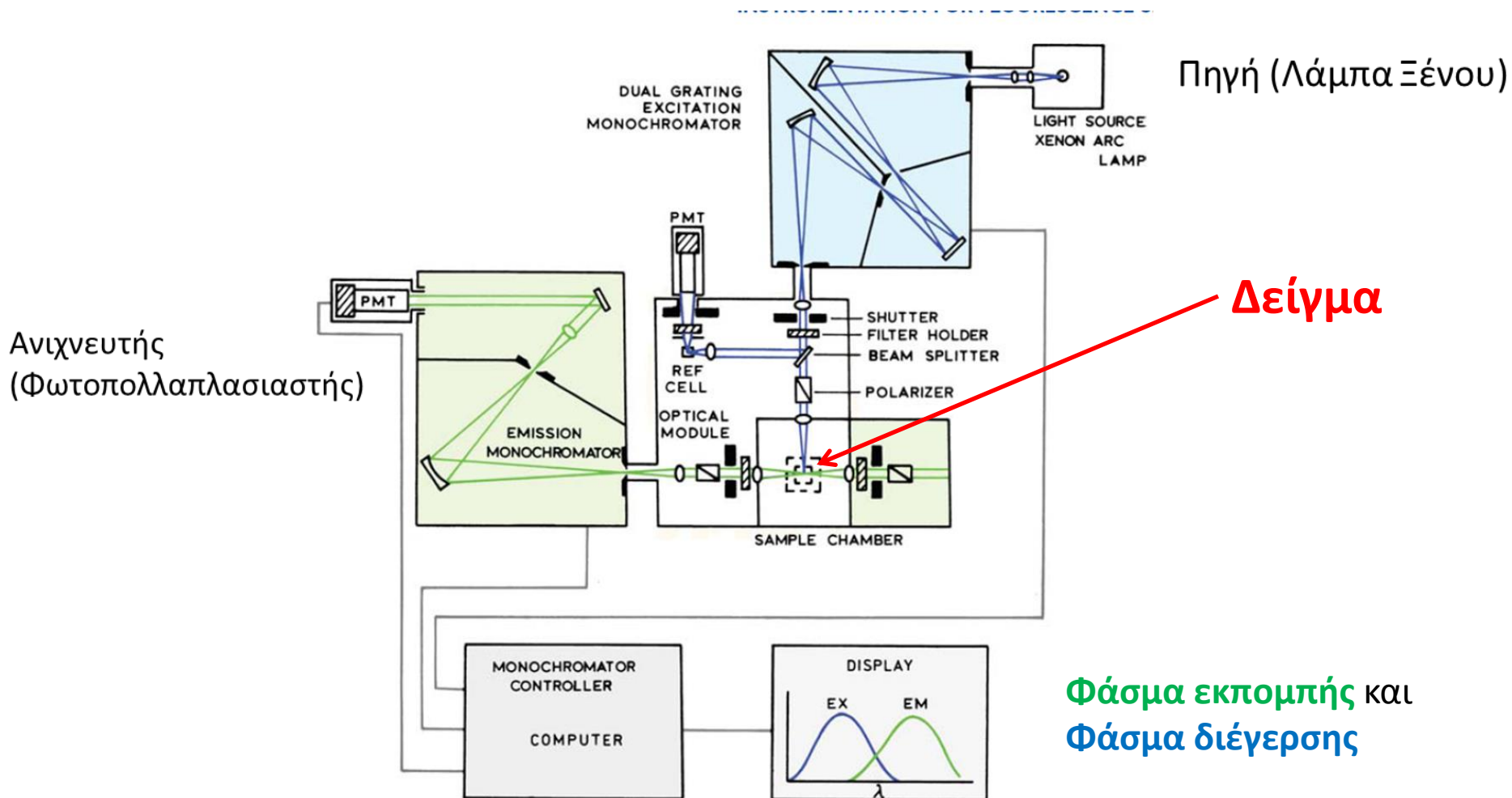


Φθορισμός

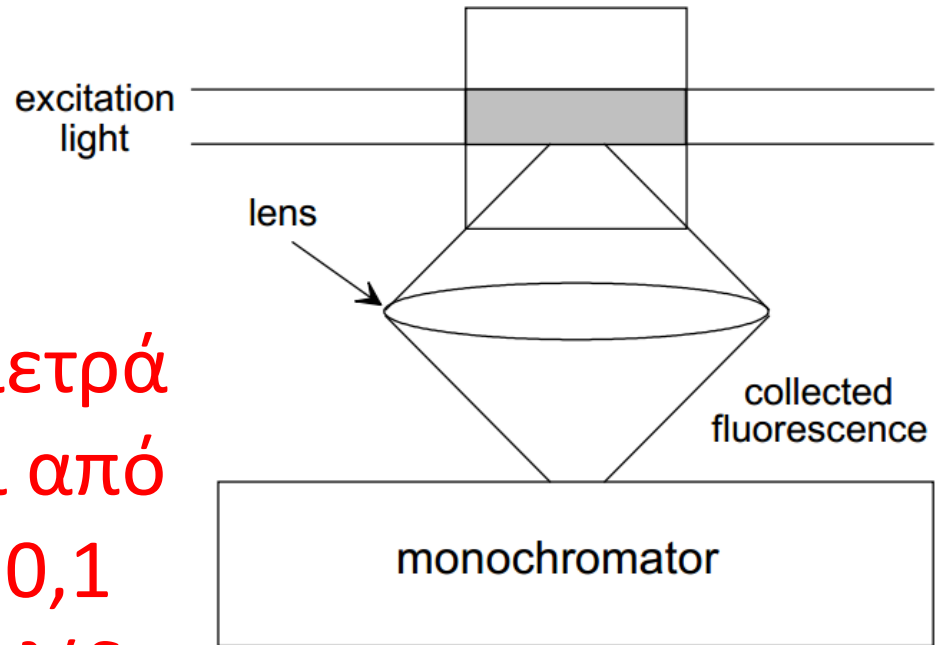
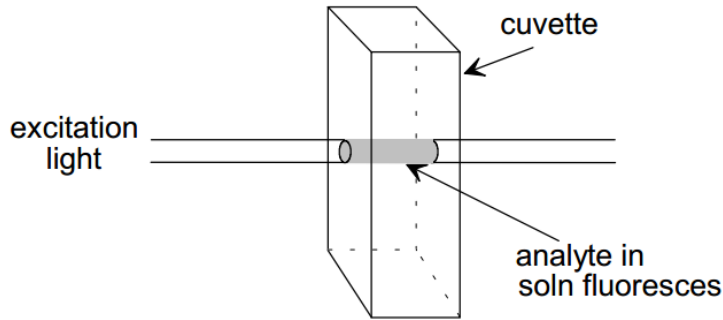
Φωσφορισμός

Οργανολογία Φασματοσκοπίας Φωταύγειας

Φασματοφωτόμετρα Εκπομπής (Φθορισμόμετρα, Φασματοφωτόμετρα Φωταύγειας)

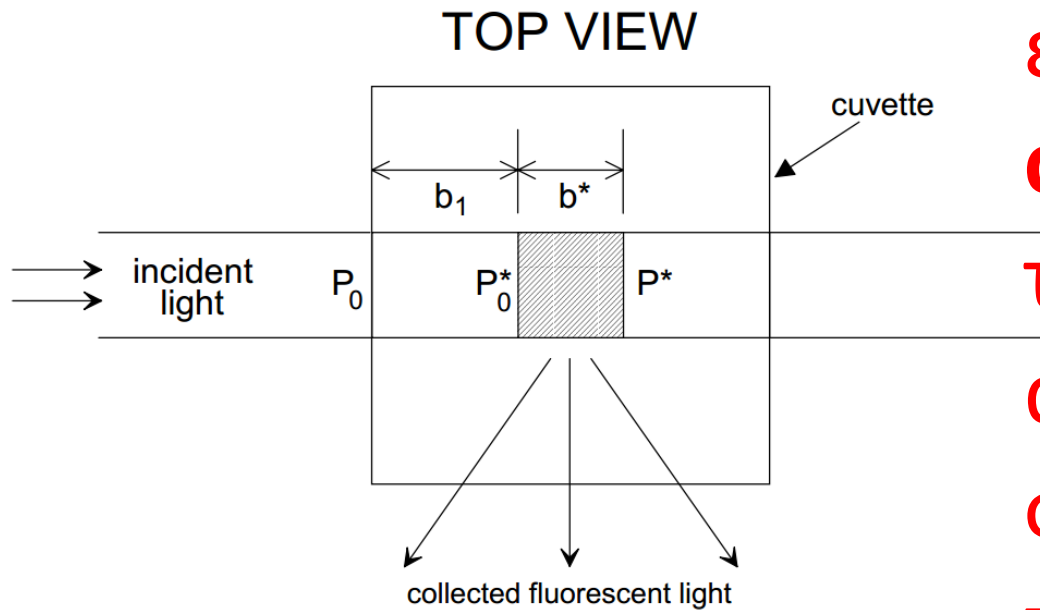


Το δείγμα



Το οπτικό σύστημα του οργάνου συλλέγει και μετρά το φως που εκπέμπεται από μία μικρή περιοχή $d^* \approx 0,1$ cm στο κέντρο της κυψελίδας (οι κυψελίδες είναι συνήθως του 1 cm)

Το δείγμα (2)

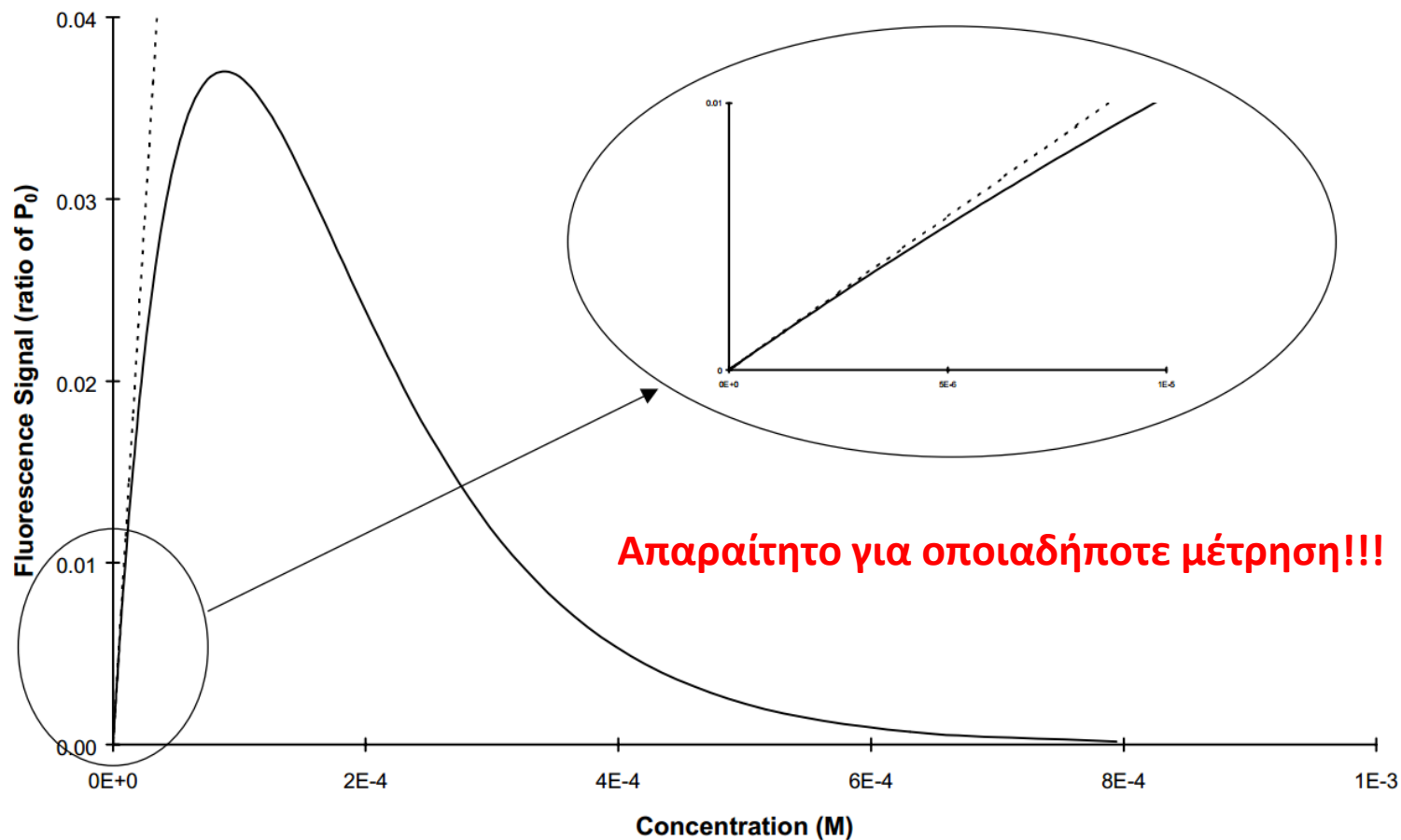


Το δείγμα πρέπει να είναι αρκετά **οπτικά αραιό** ώστε το φως της πηγής να μην απορροφάται πριν φτάσει στην κεντρική περιοχή

$$A_{\max} = 0,1$$

Οπτικά αραιό δείγμα εξασφαλίζει ότι έχουμε γραμμική σχέση απορρόφησης – έντασης φθορισμού

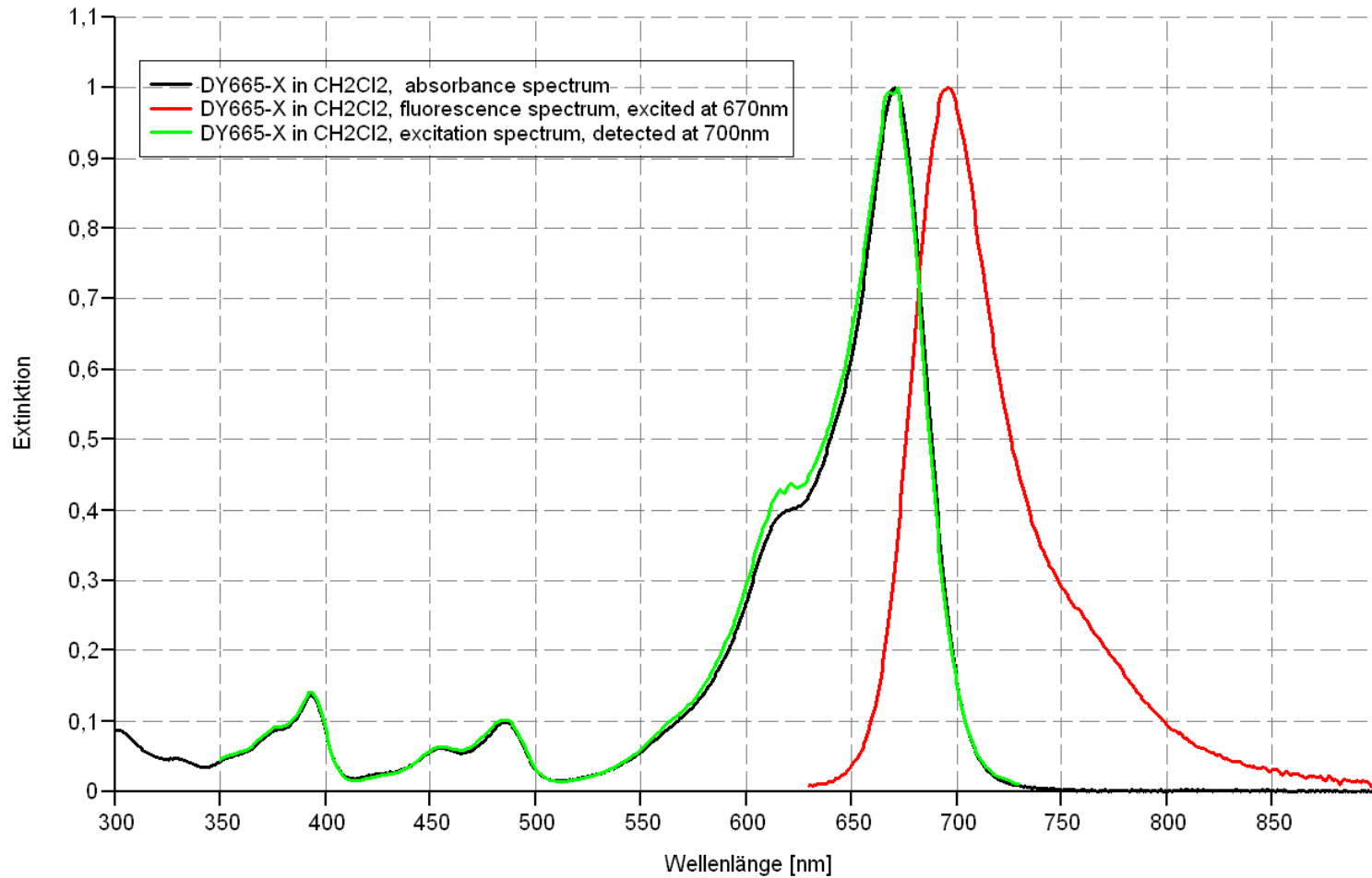
Fluorescence Calibration Curve



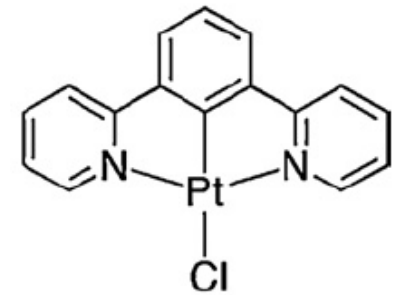
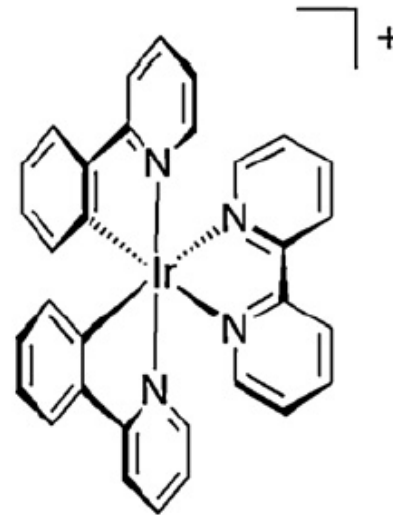
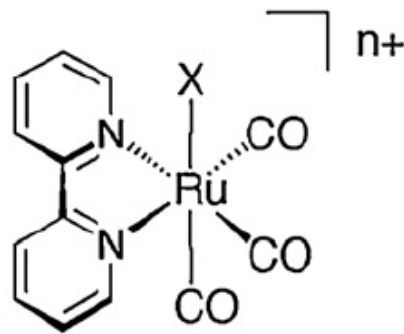
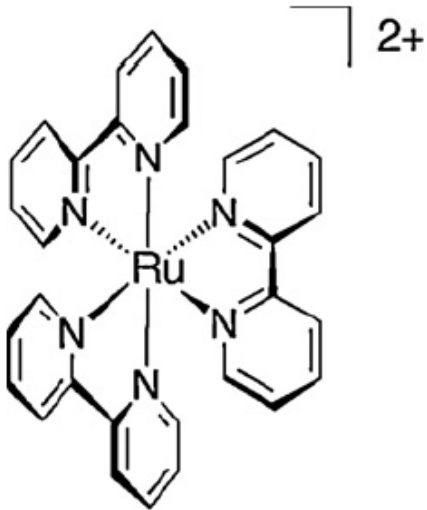
Φάσματα Εκπομπής και Διέγερσης

- **Εκπομπής:** Σταθερό μήκος κύματος διέγερσης και σάρρωση του μονοχρωμάτορα εκπομπής
- **Διέγερσης:** Σταθερό μήκος κύματος εκπομπής και σάρρωση του μονοχρωμάτορα διέγερσης. *Το φάσμα διέγερσης πολλές φορές είναι όμοιο με το UV-Vis.*

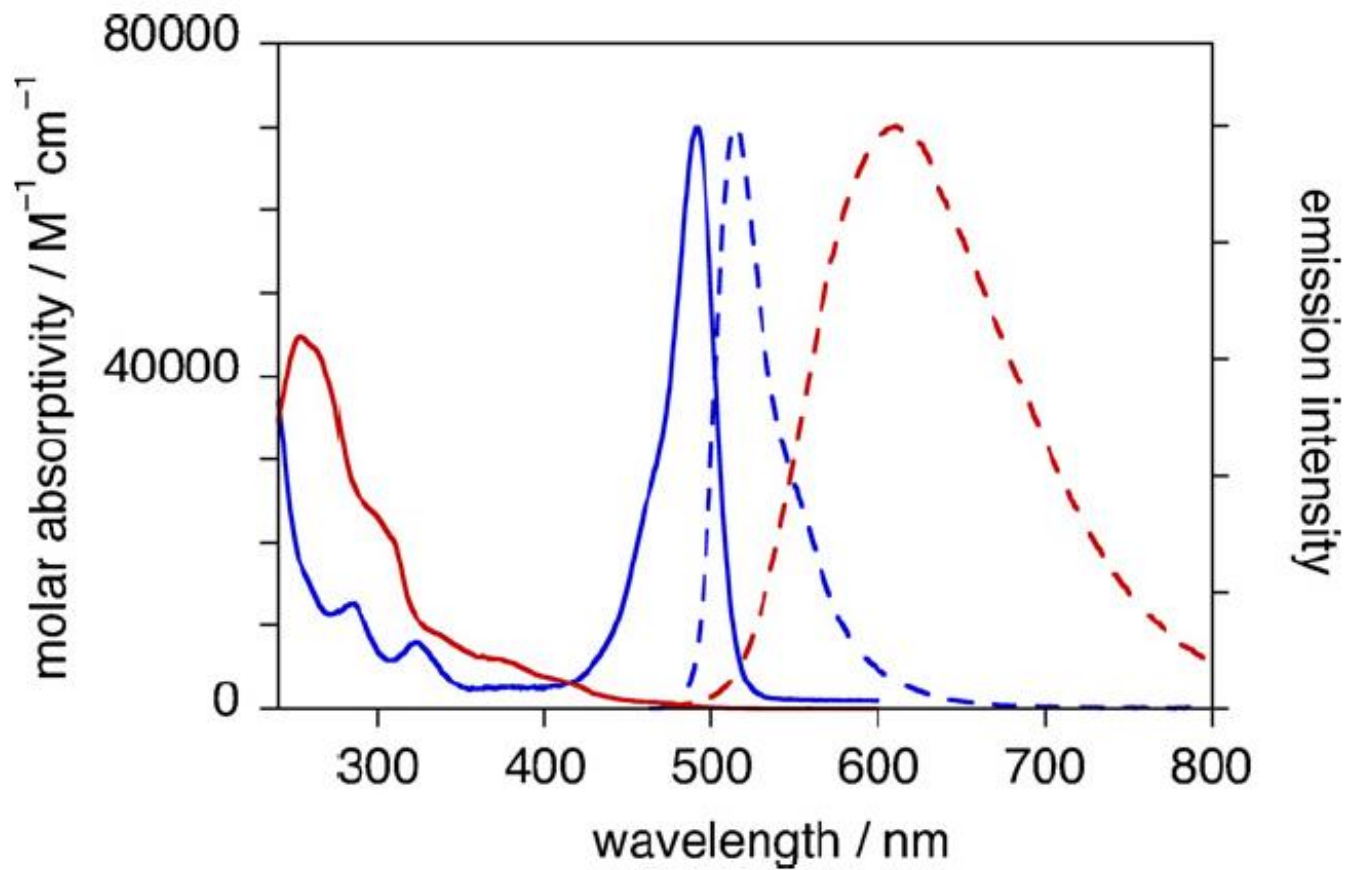
Παράδειγμα η χρωστική DY665



Παράδειγμα: Το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$



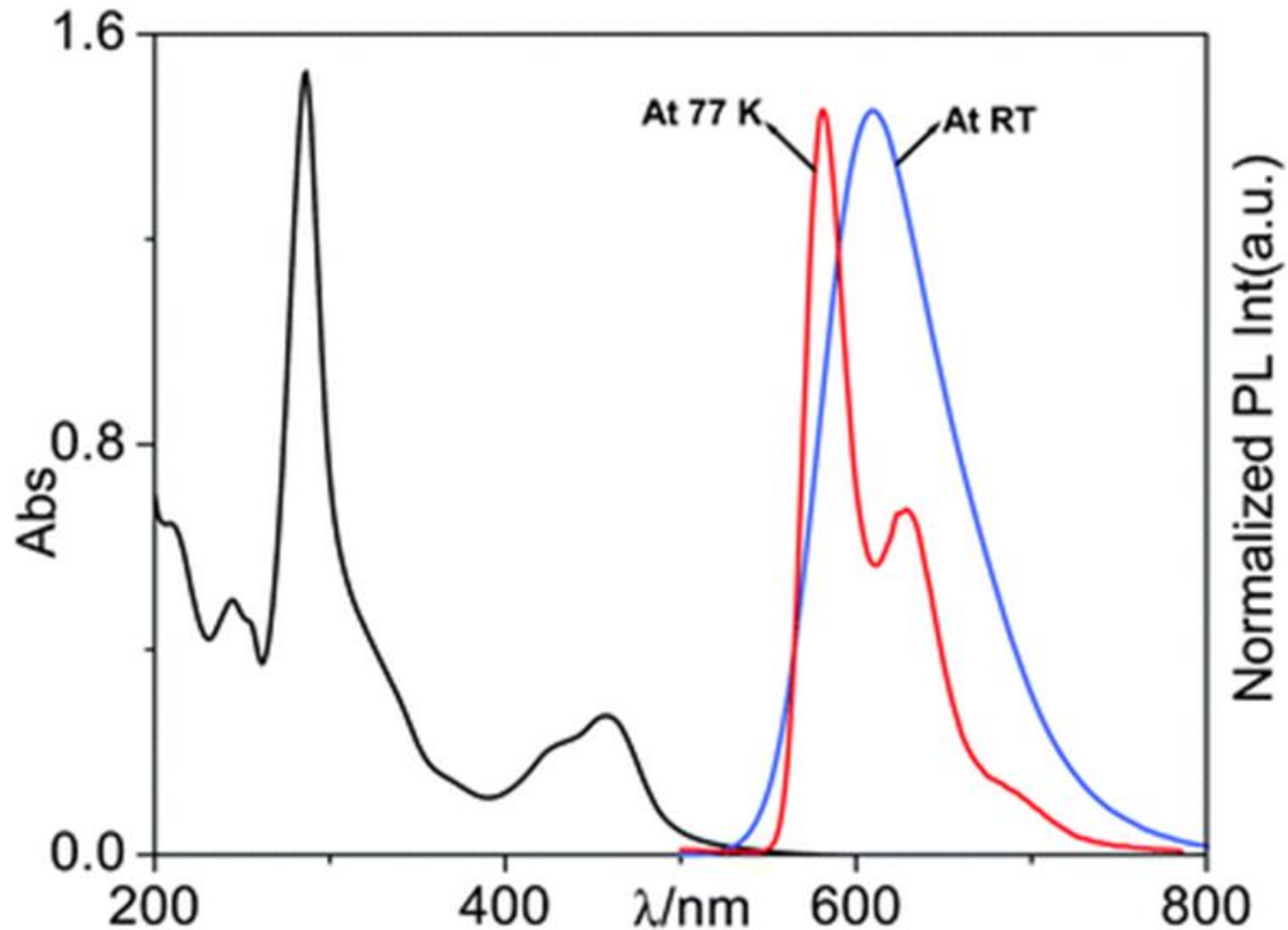
Σύμπλοκα πολύτιμων μετάλλων που παρουσιάζουν φωσφορισμό



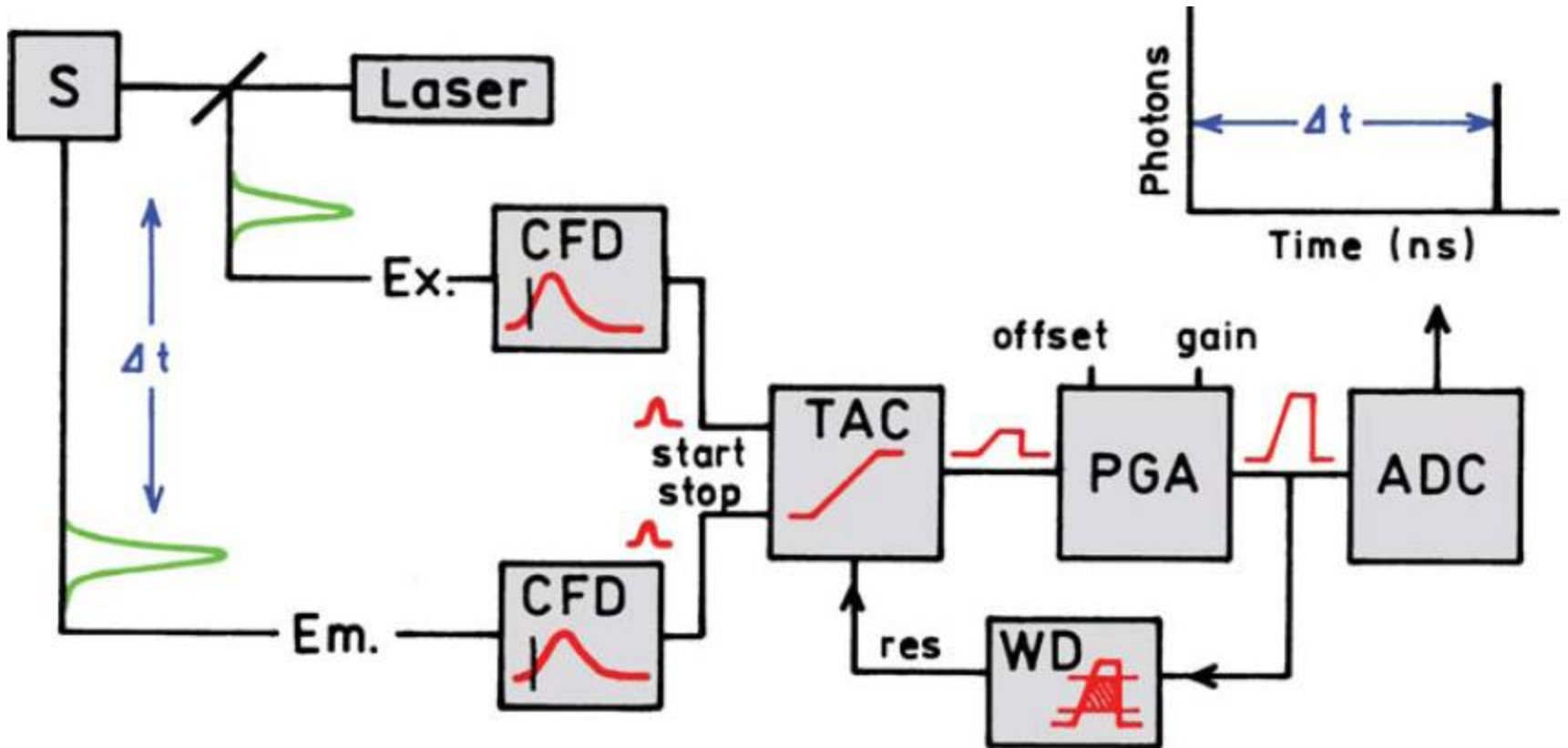
Φθορισμός

Φωσφορισμός

Φωσφορισμός του $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$



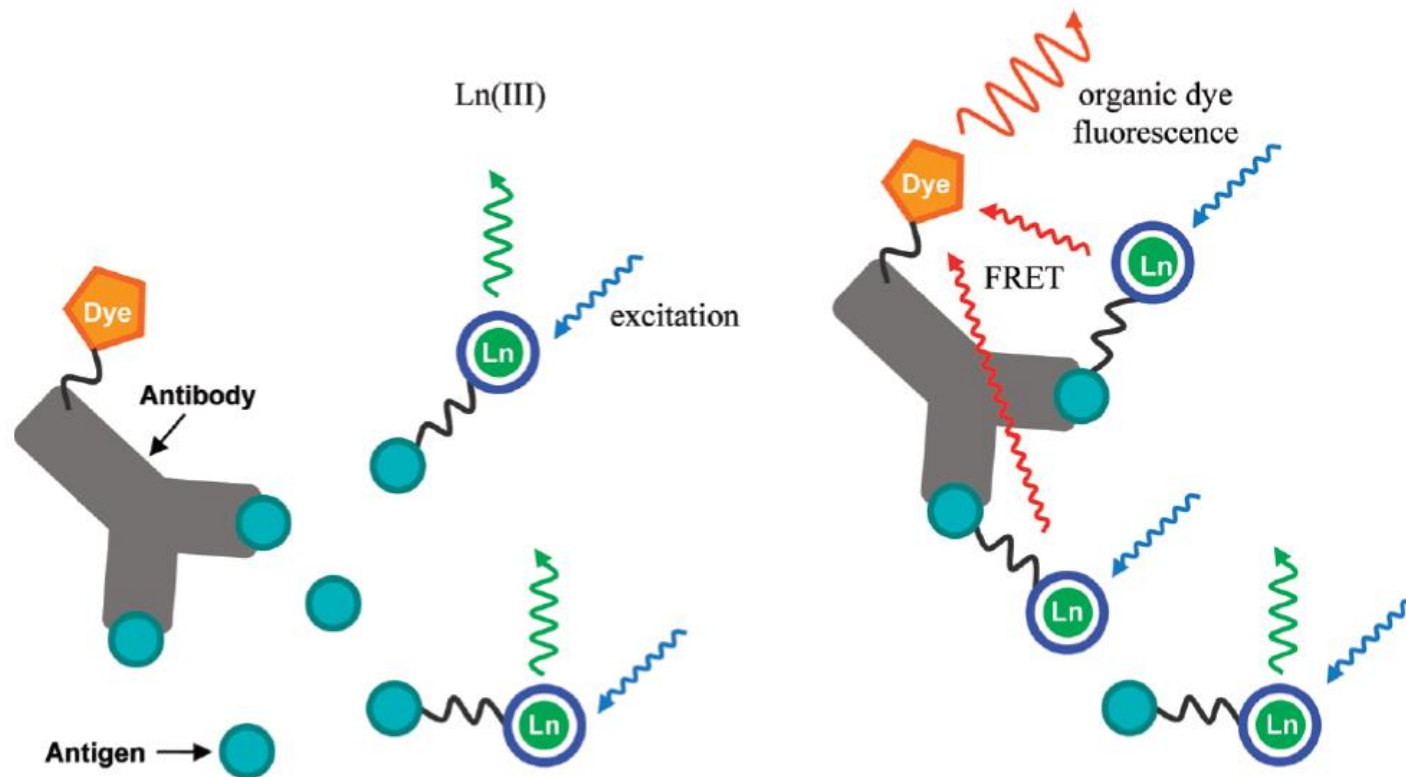
TCSPC Αρχή λειτουργίας



ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Βιολογικοί Ιχνηλάτες και Κυτταρική
Απεικόνιση

Αρχή λειτουργίας ενός φωταυγούς ιχνηλάτη FRET



Εφαρμογές στην (βιο)αναλυτική χημεία

Professor A Prasanna de Silva



Professor A Prasanna de Silva
BSc (University of Colombo), 1976
PhD (Queen's University of Belfast), 1980

Chair of Organic Chemistry

Tel: + 44 (0) 28 9097 4422

Fax: + 44 (0) 28 9097 6524

E-mail: a.desilva@qub.ac.uk

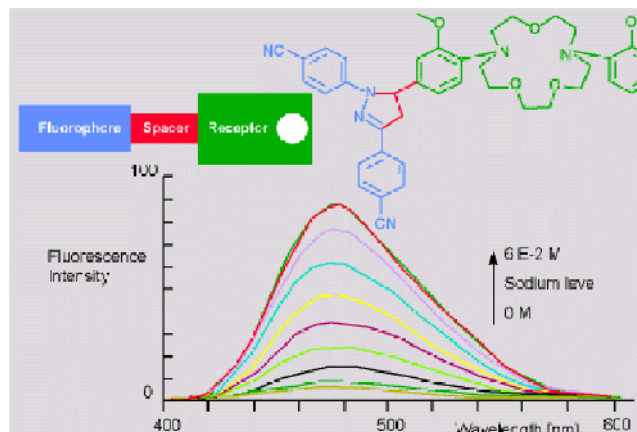
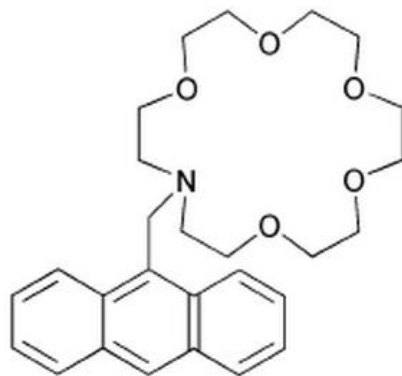


Figure 1: Fluorescent sensor for sodium: the design, the molecule and the result.

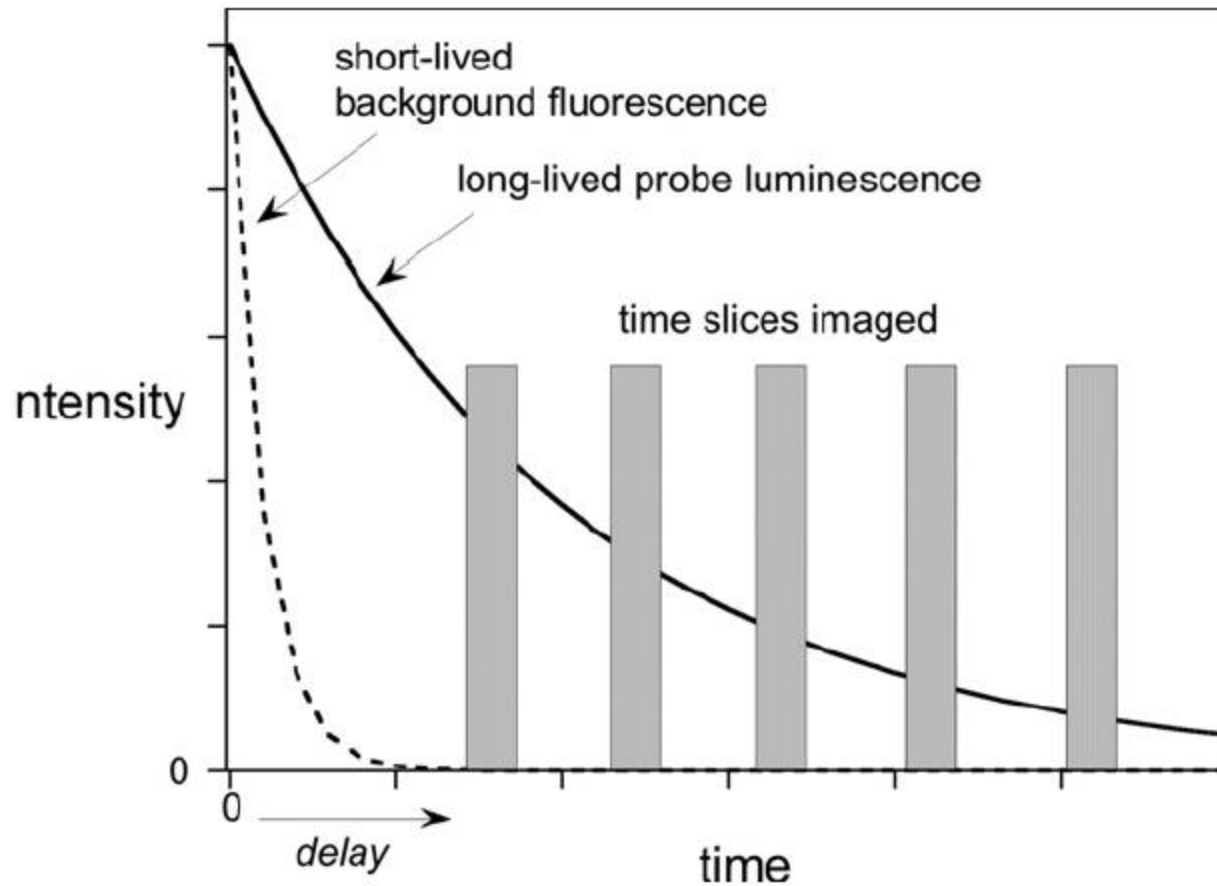
Βιοισθητήρας Na^+ – Εμπορικά διαθέσιμος από το 1997



Αισθητήρας για K^+ λειτουργεί με ανάλογο τρόπο

Αισθητήρες PET

Εφαρμογές φωσφορισμού στην απεικόνιση

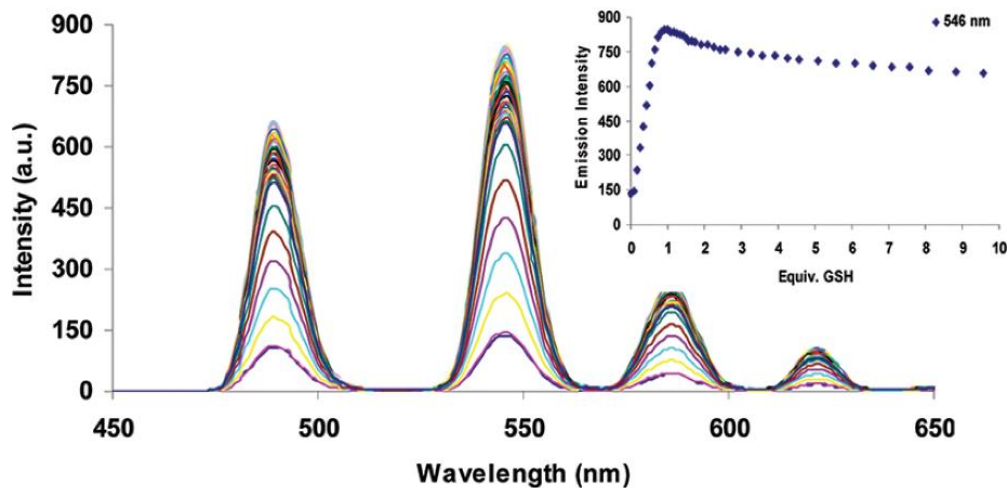
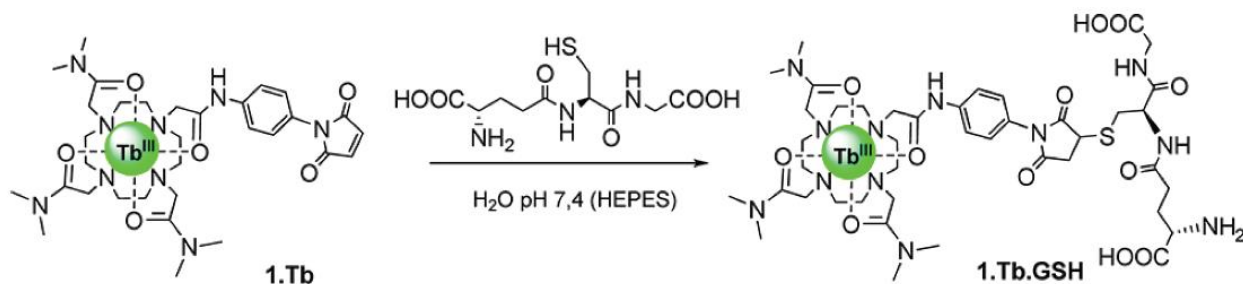


Αφαιρείται εύκολα ο φθορισμός υποβάθρου του βιολογικού δείγματος

Αισθητήρας για Γλουταθειόνη

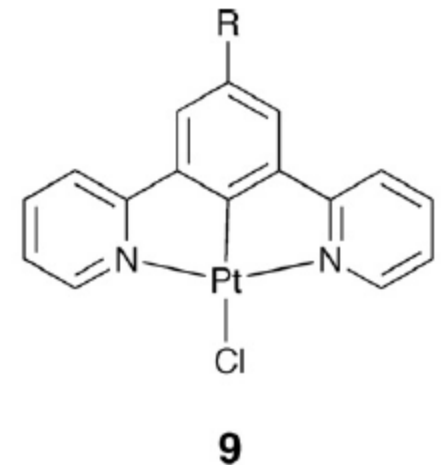
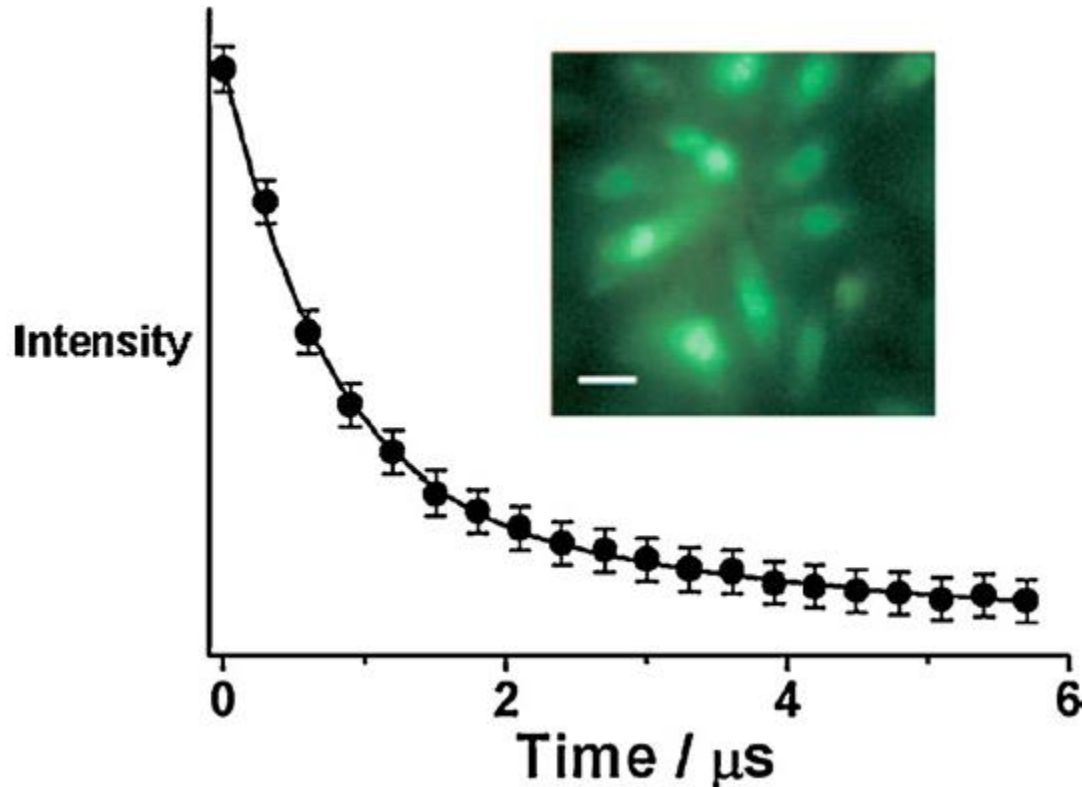
Selective Detection of the Reduced Form of Glutathione (GSH) over the Oxidized (GSSG) Form Using a Combination of Glutathione Reductase and a Tb(III)-Cyclen Maleimide Based Lanthanide Luminescent 'Switch On' Assay

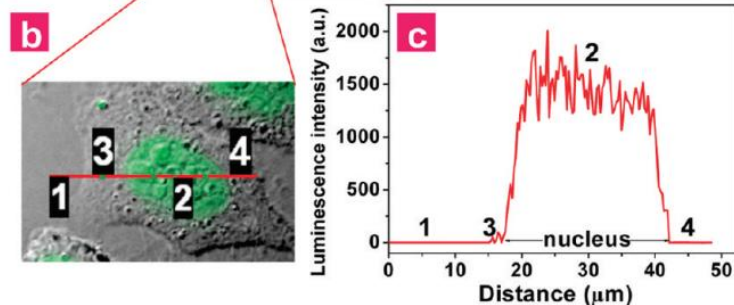
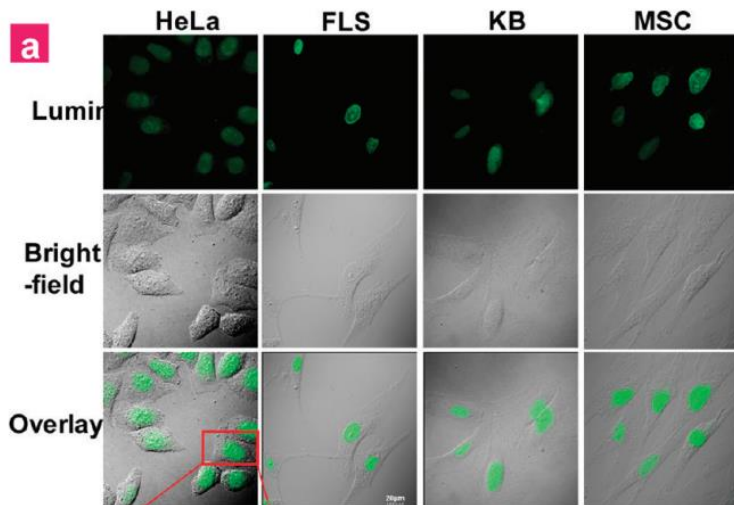
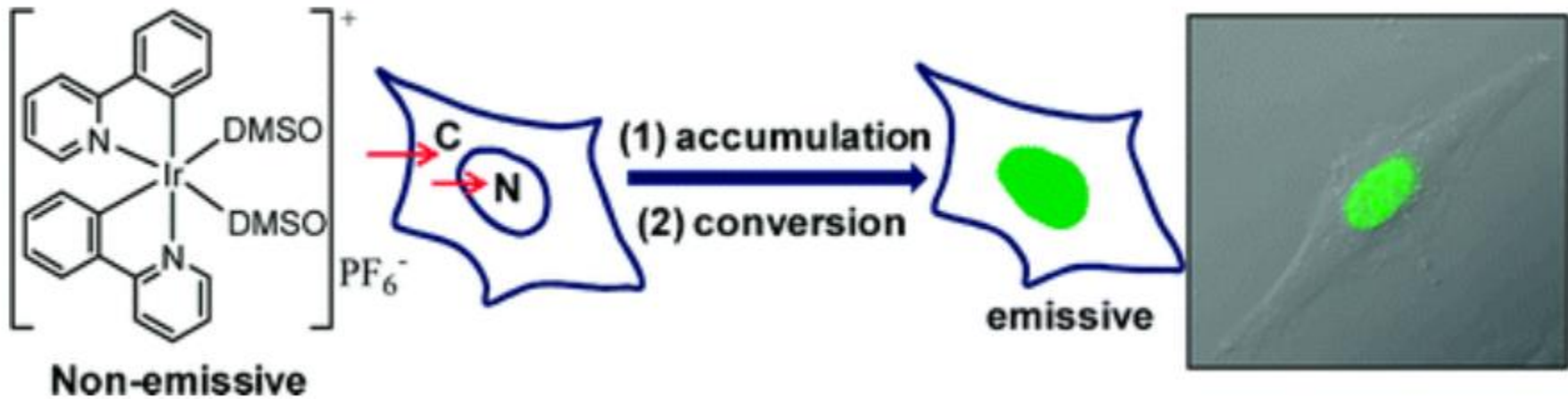
Brian K. McMahon and Thorfinnur Gunnlaugsson*



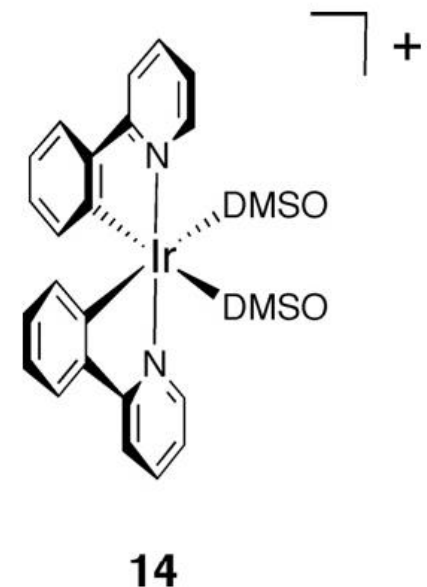
J. Am. Chem. Soc., **2012**, *134* (26), pp 10725–10728

Καρκινικά κύτταρα επισημασμένα με τη χρωστική 9

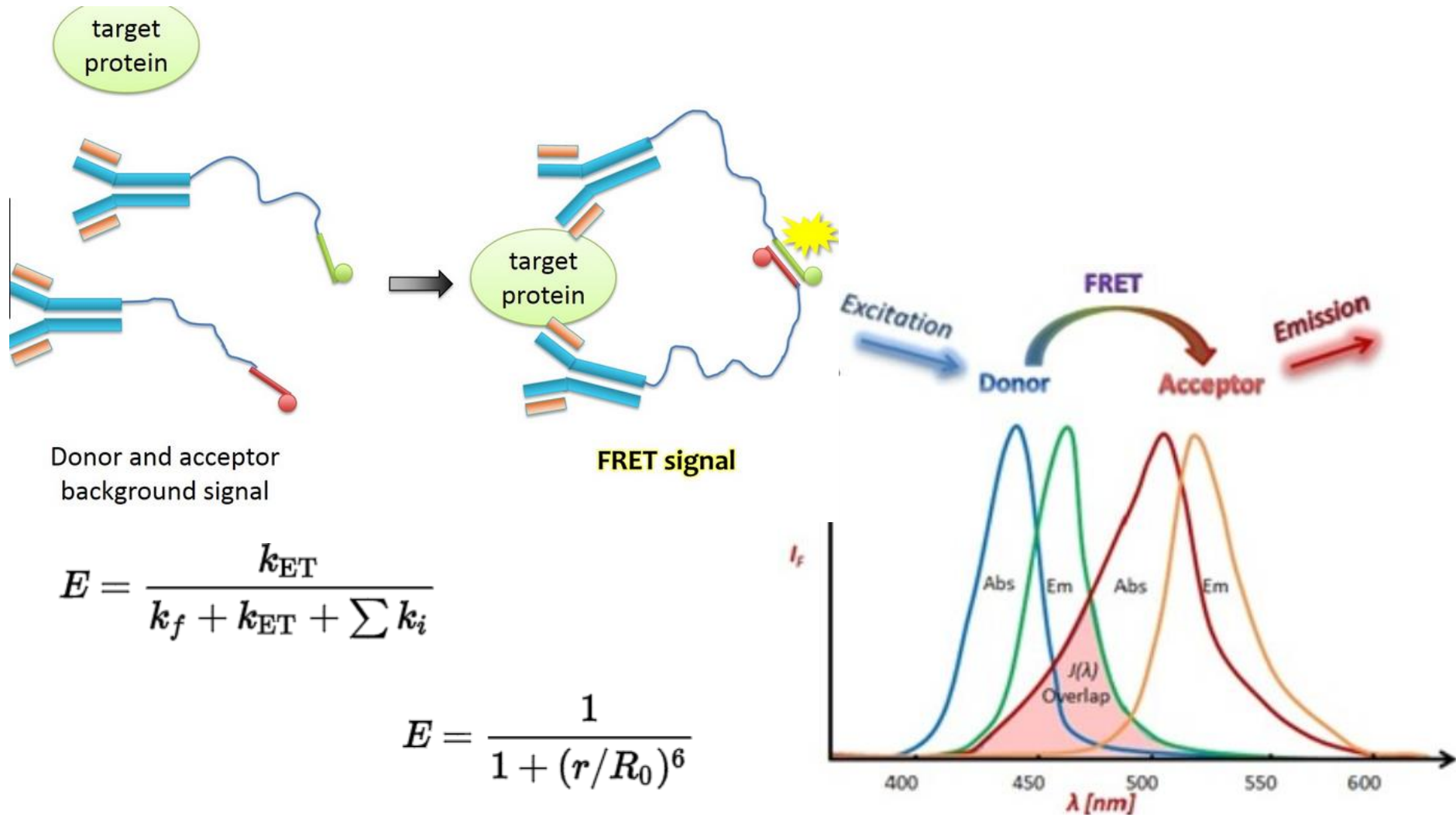




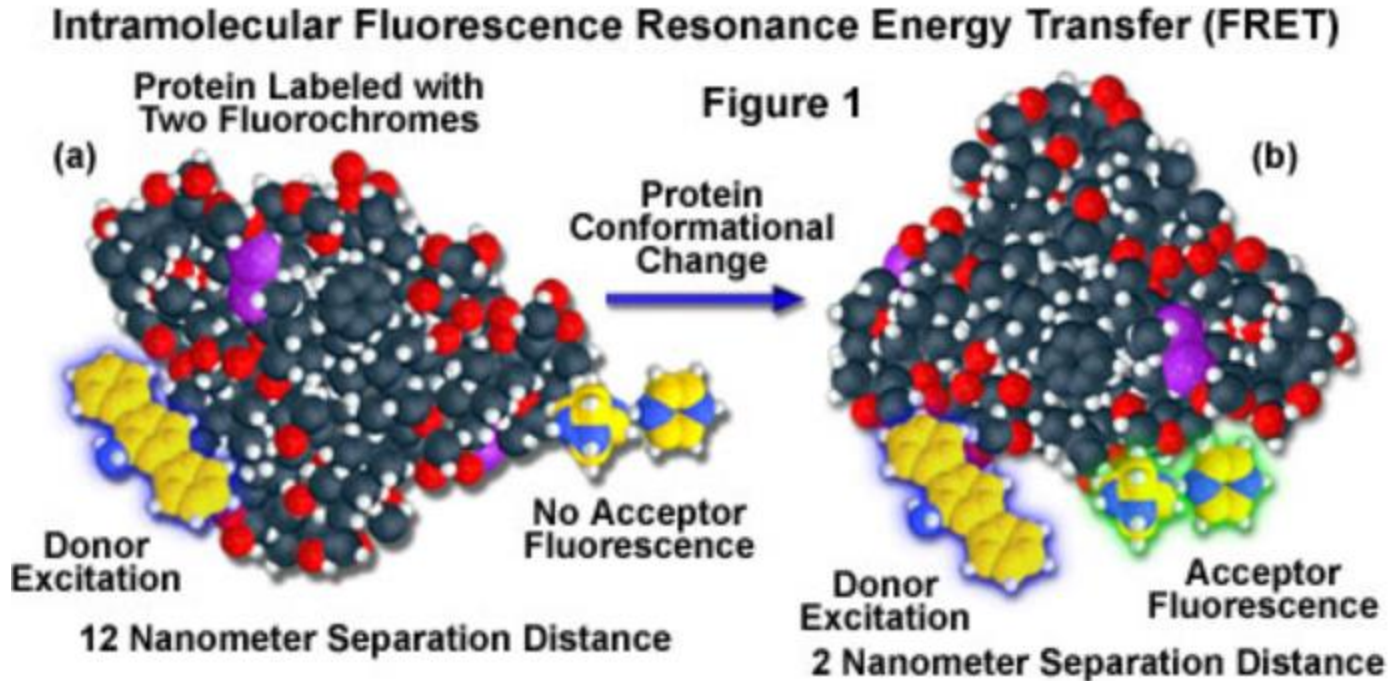
Γίνεται φωταυγές σε περιβάλλοντα πλούσια σε ιστιδίνη η οποία υποκαθιστά το συναρμοσμένο DMSO



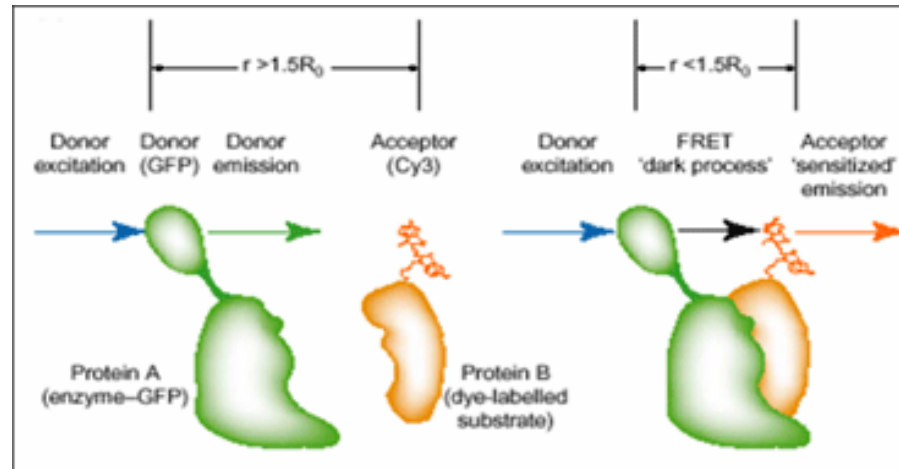
Μεταφορά ενέργειας και FRET (Förster Resonance Energy Transfer)



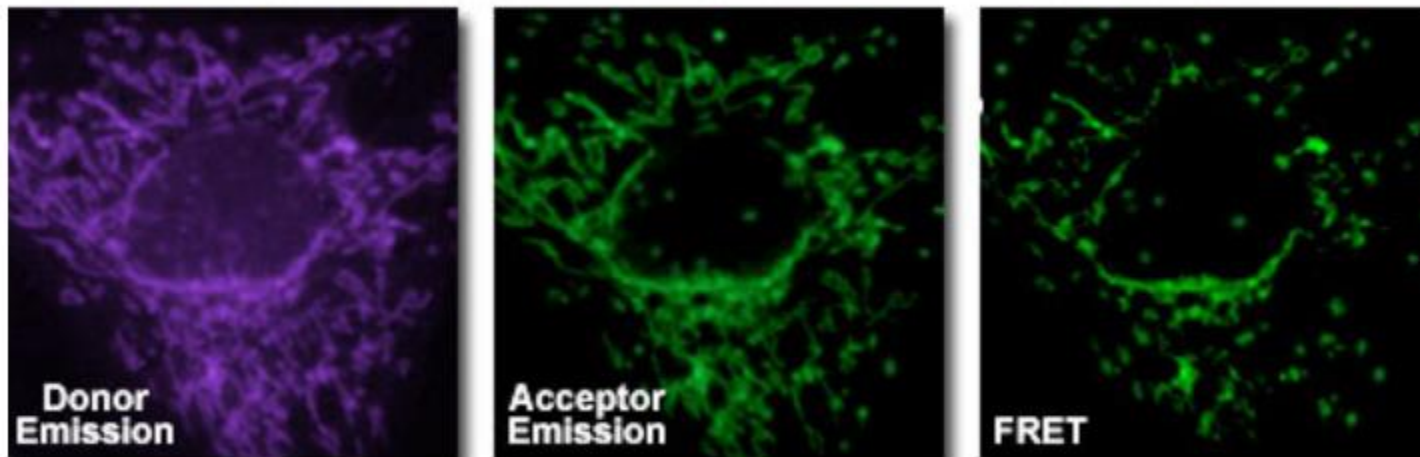
Επιτρέπει την παρακολούθηση της αλλαγής διαμόρφωσης πρωτεϊνών



Ανίχνευση σχηματισμού συμπλόκου μεταξύ πρωτεϊνών



Mitochondrial Protein-Protein Association with FRET



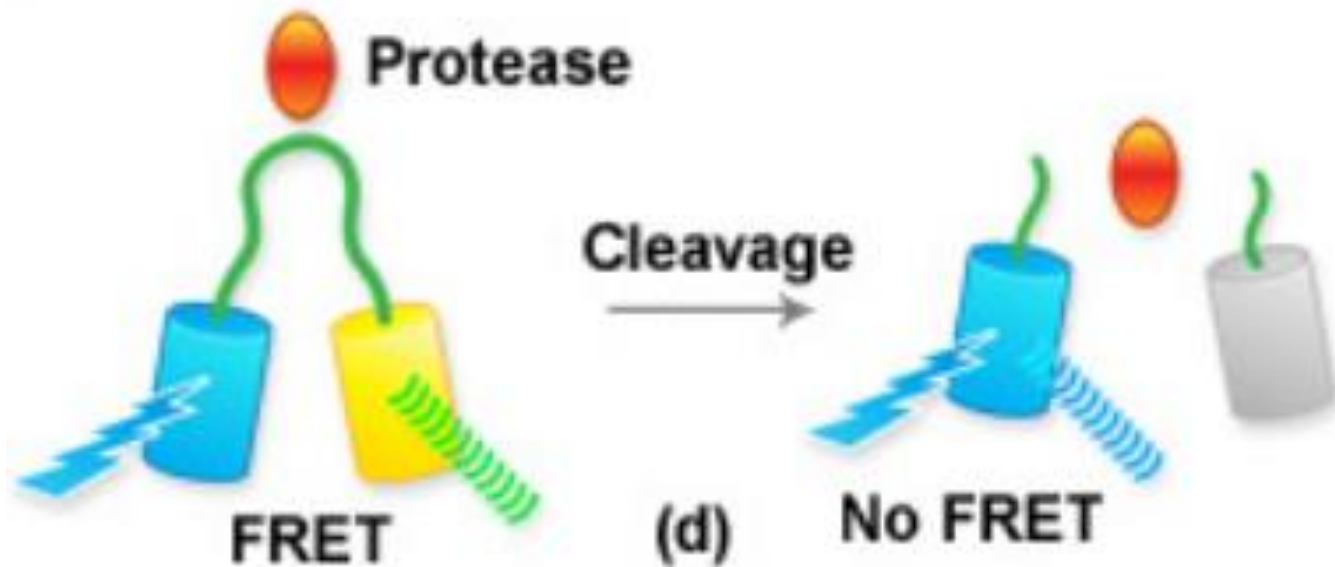
(a)

(b)

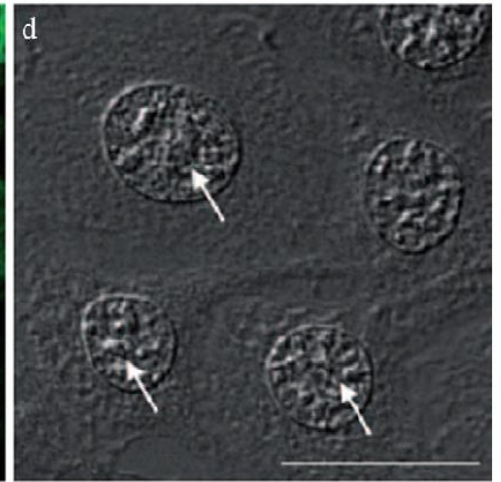
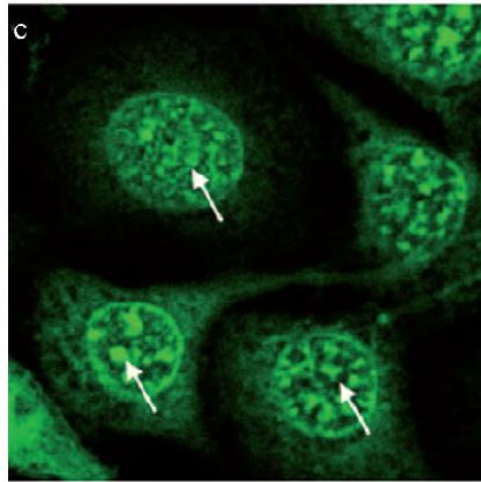
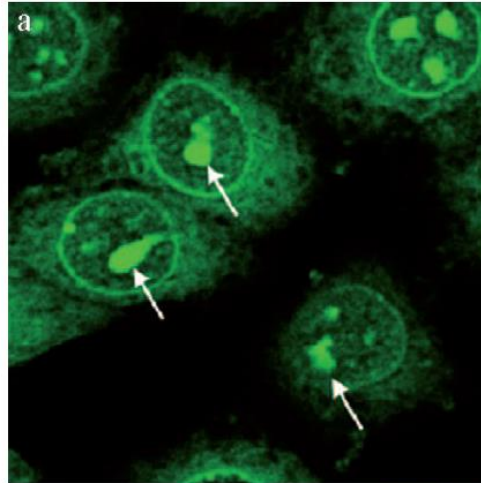
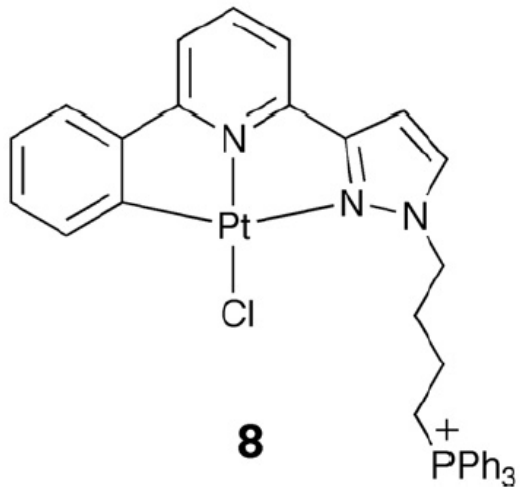
Figure 8

(c)

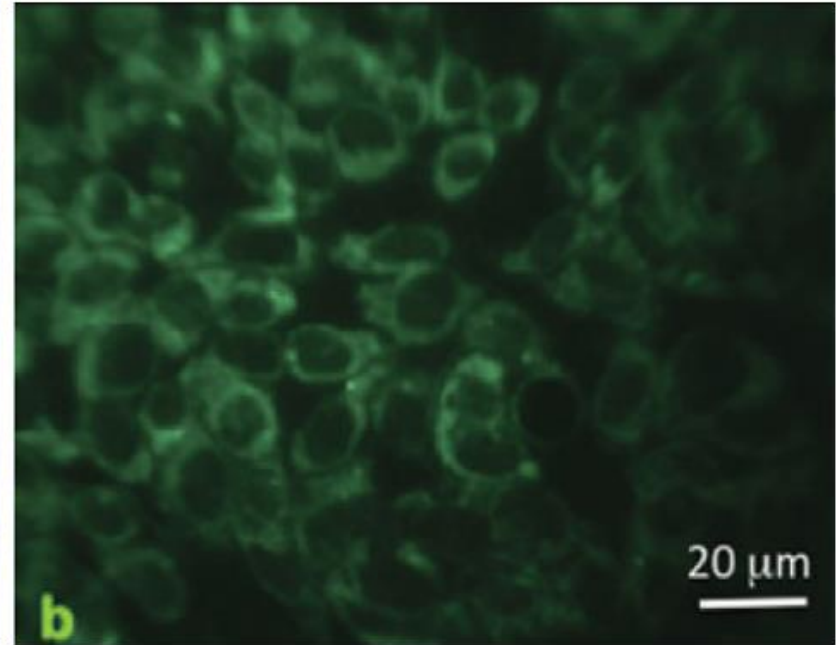
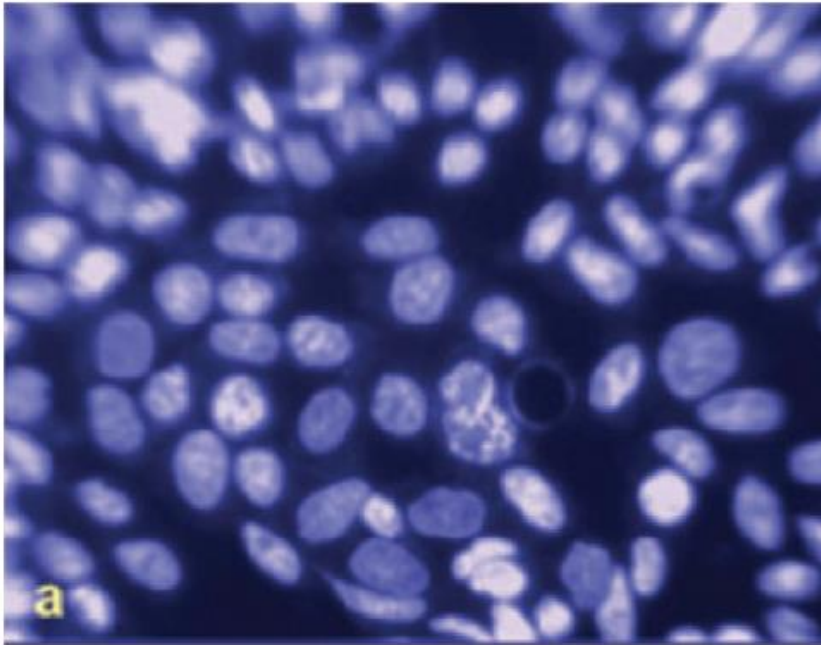
Ανίχνευση πρωτεασών



Καρκινικά κύτταρα HeLa που απεικονίζονται με το σύμπλοκο 8

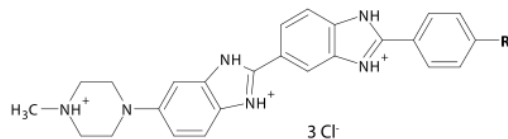


Παράδειγμα Χρήσης του Φωσφορισμού



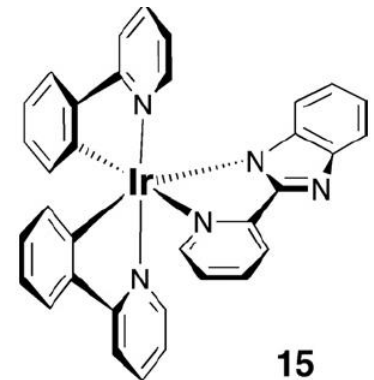
No delay

Οργανική χρωστική
Hoechst stain

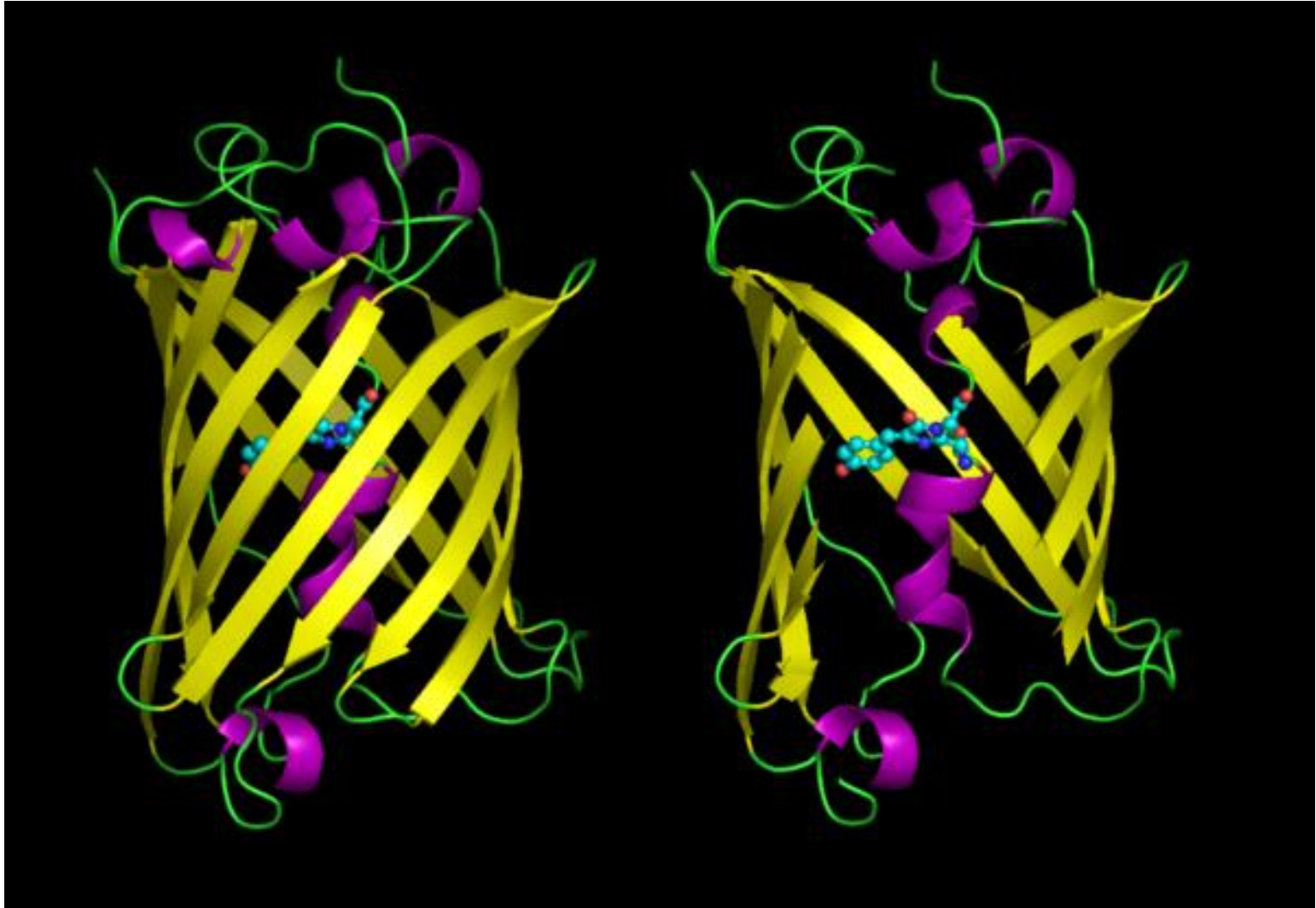


Delay of 10 ns

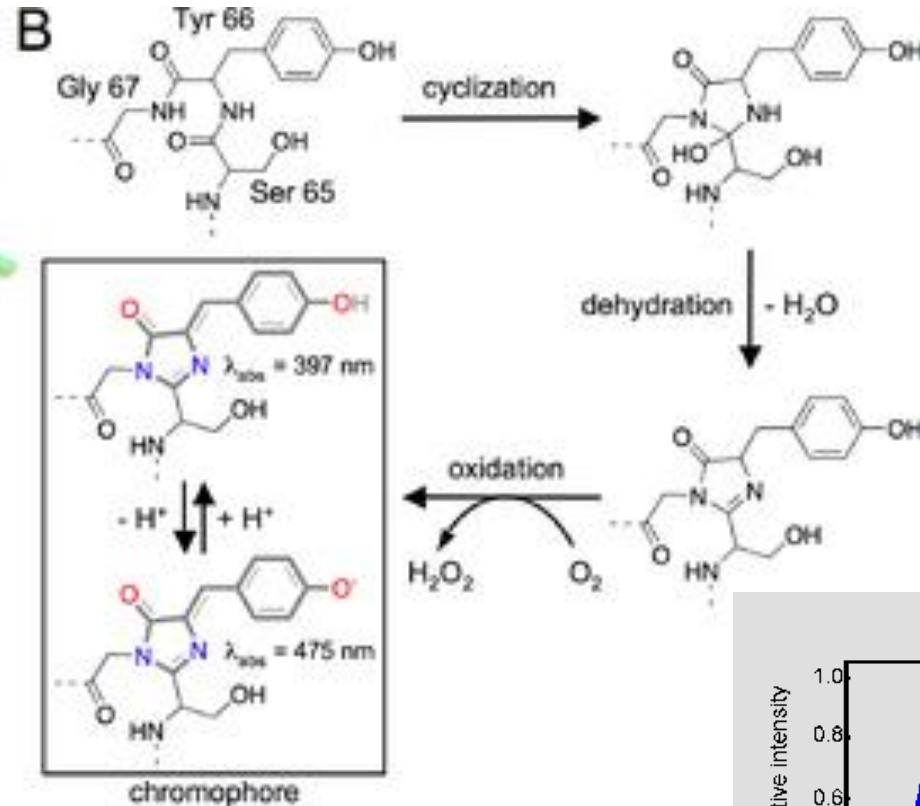
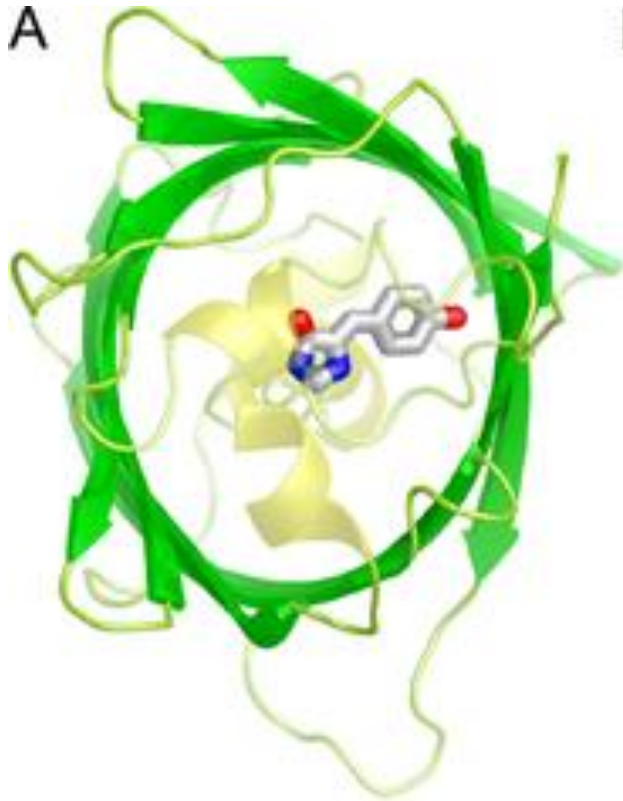
Σύμπλοκο Ir



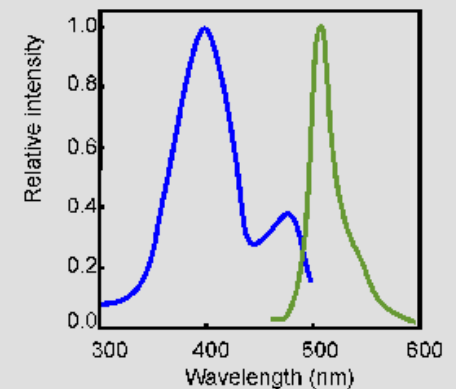
Green Fluorescent Protein

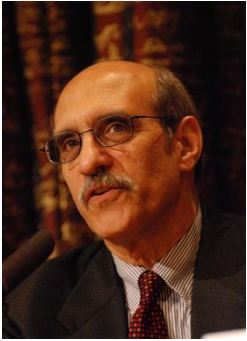


GFP chromophore consists of a modified peptide residue

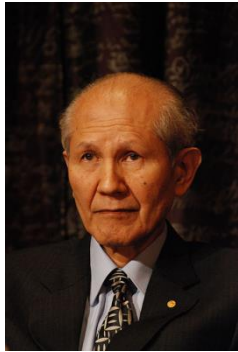


Excitation and
emission spectra
of GFP



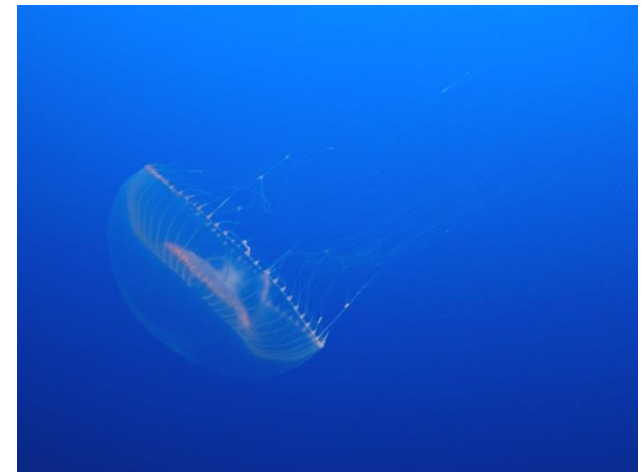


Martin Chalfie



Osamu Shimomura

GFP occurs naturally in this species of jellyfish



Aequorea victoria



Roger Y. Tsien

GFP gene can be expressed in other animals



Nobel Prize in Chemistry 2008