

Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest zapoznanie z właściwościami optycznymi tkanek i wybranych chromoforów.

1. Wprowadzenie teoretyczne**1.1. Spektroskopia absorpcyjna****1.1.1. Wprowadzenie**

Spektroskopia opisuje zjawiska oddziaływania fali elektromagnetycznej z materią. Do podstawowych zjawisk spektroskopowych należą absorpcja, luminescencja i odbicie. Wyróżnia się jeszcze wiele innych metod pomiarowych, takich jak wzbudzenie luminescencji, rozpraszanie Ramana i Brillouina, fotoodbicie i inne, które służą do bardzo subtelnych badań materiałowych. Zależność wielkości absorpcji, intensywności luminescencji i innych wielkości od długości fali lub energii nazywamy widmem. Widma spektroskopowe są charakterystyczne dla danego atomu, cząsteczki lub ciała stałego.

Spektroskopia zajmuje się badaniem struktury energetycznej cząsteczki. Badaniom podlegają widma elektronowe, oscylacyjne i rotacyjne. Na ich podstawie określone są podstawowe parametry cząsteczki. Widma elektronowe, oscylacyjne i rotacyjne leżą w różnych obszarach długości fal (energii). Widma elektronowe leżą zazwyczaj w obszarze widzialnym, bliskiego nadfioletu i bliskiej podczerwieni. Widma oscylacyjne i rotacyjne leżą w obszarze dalekiej podczerwieni i mikrofal. Spektroskopia ma również zastosowanie w badaniach fizykochemicznych (na przykład przy określaniu siły wiązań chemicznych) i kinetyki reakcji chemicznych. Zjawiska spektroskopowe można badać zarówno ilościowo, jak i jakościowo [1].

1.1.2. Absorpcja i transmisja. Prawo Lamberta-Beera

Metodą badania spektroskopowego jest m.in. pomiar transmisji promieniowania elektromagnetycznego przez substancję. Jeśli do próbki wnika fala świetlna o natężeniu I_0 , to po wyjściu z próbki natężenie wynosi

$$I = I_0 e^{-\alpha x}$$

gdzie α oznacza współczynnik absorpcji, a x grubość badanej próbki. Jest to tzw. prawo Lamberta-Beera.

Jak już wspomniano, podstawowymi zjawiskami opisującymi oddziaływanie światła z materią są transmisja, absorpcja, rozpraszanie i odbicie. Odpowiednie wielkości fizyczne opisane następująco:

1. Transmitancja (opisuje transmisję) równa:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

iloraz intensywności promieniowania wychodzącego do wnikającego do próbki.

2. Absorbancja (opisuje absorpcję)

$$A = 1 - T = 1 - \frac{I}{I_0} = \frac{I_0 - I}{I_0}$$

iloraz intensywności światła zaabsorbowanego do światła wnikającego do próbki. Absorbancja może być opisana również następującym wzorem:

$$A = \ln \frac{I_0}{I} = \ln \frac{1}{T} = \alpha x$$

tj. jako iloczyn współczynnika absorpcji α i grubości x badanej próbki.

Na ogół wielkości te podawane są w jednostkach względnych. Jednostek względnych używamy, gdy interesują nas jedynie charakterystyczne energie przejść optycznych, a pomiar w jednostkach bezwzględnych jest trudny w realizacji eksperymentalnej.

1.2. Spektroskopia luminescencyjna

1.2.1. Wprowadzenie

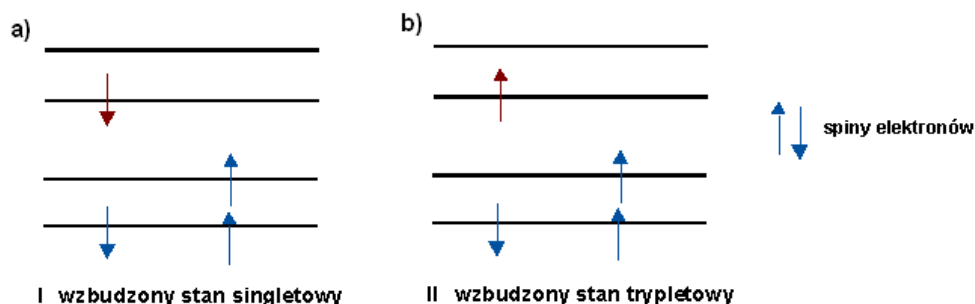
Luminescencja jest to emisja kwantu promieniowania elektromagnetycznego przy przechodzeniu elektronu ze stanu wzbudzonego do stanu o niższej energii. Luminescencja to emisja promieniowania elektromagnetycznego o natężeniu większym od natężenia promieniowania cieplnego w danej temperaturze i o skończonym czasie trwania świecenia, niezanikającym natychmiast po przerwaniu wzbudzenia. Ze względu na sposób wzbudzenia możemy wyróżnić kilka rodzajów luminescencji:

- a) *fotoluminescencja* – wywołana promieniowaniem elektromagnetycznym, np. laserem lub za pomocą lampy halogenowej, ksenonowej, deuterowej lub innej;
- b) *elektroluminescencja* – wywołana polem elektrycznym, np. przy przepływie elektronów w złączu p-n;
- c) *chemiluminescencja* – świecenie następuje w wyniku wzbudzenia reakcjami chemicznymi;
- d) *bioluminescencja* – wywołana procesami biologicznymi;
- e) *radioluminescencja* – wywołana promieniowaniem jonizującym;
- f) *rentgenoluminescencja* – świecenie następuje w wyniku wzbudzenia promieniami X;
- g) *tryboluminescencja* – występuje w wyniku wzbudzenia siłami tarcia i elektrostatycznymi;
- h) *sonoluminescencja* – wywołana promieniowaniem ultradźwiękowym;
- i) *katodoluminescencja* – wzbudzenie strumieniem elektronów;
- j) *elektrochemiluminescencja* – wywołana procesami chemicznymi i polem elektrycznym [2].

1.2.2. Diagram Jabłońskiego

Diagram Jabłońskiego przedstawia przejścia energetyczne w cząsteczce. Struktura energetyczna cząsteczki jest opisana za pomocą stanów singletowych i stanów tripletowych. W wyniku absorpcji energii określonymi porcjami, zwanymi kwantami, atom może przejść do

stanu wzbudzonego. Spin elektronów w stanie wzbudzonym może być skierowany antyrównolegle (Rys. 1a - stan singletowy) lub może być ustawiony równolegle (Rys. 1b - stan trypletowy).



Rys. 1 Ustawienia spinów elektronów w stanie wzbudzonym a) singletowym b) trypletowym [3].

Jeżeli cząsteczka zaabsorbuje dostatecznie dużą ilość energii, wtedy może przejść ze stanu podstawowego do wzbudzonego stanu oscylacyjnego. Każda cząsteczka posiada energię elektronową, oscylacyjną i rotacyjną. Wartość energii elektronowej informuje o położeniu elektronów oraz mówi o rodzajach utworzonych wiązań i odległościach między jądrami atomów. Energia oscylacyjna związana jest z poruszaniem molekuł, czyli ich zbliżaniem i oddalaniem się od siebie. Energia rotacyjna cząsteczki odpowiada ruchom obrotowym molekuł. Cząsteczka przebywając we wzbudzonym stanie oscylacyjnym, pozbywa się nadmiaru energii i powraca do stanu podstawowego, co może odbywać się na kilka sposobów [3].

W wyniku absorpcji promieniowaniem cząsteczki materii przechodzą na wyższe stany singletowe S_n (na Rys. 2 proces oznaczony jako A od ang. *absorption*). Stany te są jednak niestabilne i w krótkim czasie cząsteczka relaksuje na najniższy wzbudzony stan singletowy S_1 wolny od drgania. Jest to **konwersja wewnętrzna** (na Rys. 2 jako IC od ang. *internal conversion*), która to zachodzi bez emisji energii promienistej. Stąd następuje powrót elektronów na poziomy oscylacyjne stanu podstawowego S_0 . Powrót ten może odbywać się przez **fluorescencję** (F na Rys. 2), czyli emisję fotonu o energii równej różnicy energetycznej między odpowiednimi stanami oscylacyjnymi poziomów S_1 a S_0 . Natężenie fluorescencji jest proporcjonalne do natężenia światła wzbudzającego a jej zanik następuje niemal natychmiast po zaniku czynnika wzbudzającego.

Zauważyć należy, że energie fotonów zaabsorbowanego i emitowanego są sobie równe tylko dla przejść między wolnymi od drgań stanami S_1 i S_0 . Zwykle jednak energia pochłonięta przez elektrony cząsteczek fotouczulacza jest wyższa, niż energia potrzebna do emisji fotonu. Dlatego też promieniowanie emitowane w wyniku fluorescencji ma zwiększoną długość fali względem światła wzbudzającego.

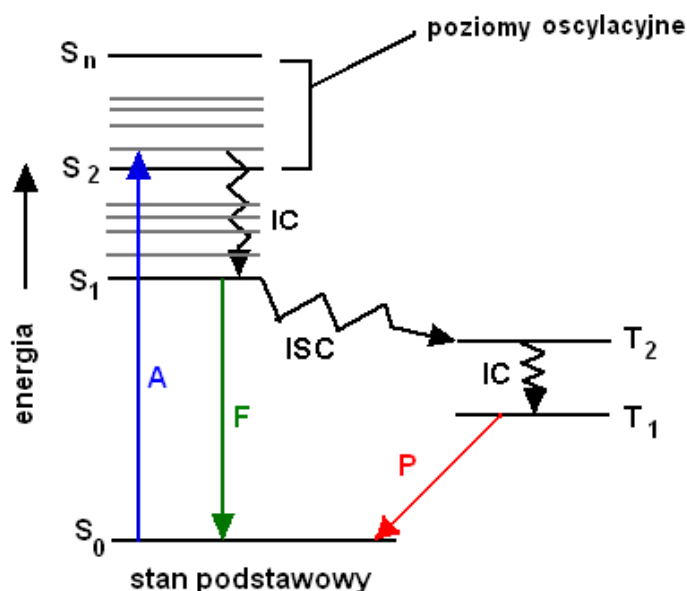
Powrót elektronów z najniższego singletowego stanu wzbudzonego S_1 na poziomy oscylacyjne stanu podstawowego S_0 może również nastąpić bezpromieniście - na zasadzie **konwersji wewnętrznej**. Wiąże się to z wydzieleniem pewnych ilości ciepła. Konwersja wewnętrzna zachodzi bez zmiany multipletowości (np. $S_1 \rightarrow S_0$ lub $T_2 \rightarrow T_1$)

Przejścia interkombinacyjne (na Rys. 2 jako ISC od ang. *intersystem crossing*) polegają na bezpromienistej transferze energii między stanami o różnej multipletowości (np. $S_1 \rightarrow T_1$ lub $T_1 \rightarrow S_0$). Zatem towarzyszy im zmiana spinu elektronów. Przejścia takie są zabronione, a więc mało prawdopodobne. Oznacza to, że wydajność tego procesu w porównaniu z np. fluorescencją będzie znacznie niższa.

Cząsteczka ze stanu T_1 może też spontanicznie powrócić do singletowego stanu podstawowego S_0 . Proces ten jest jednak bardzo mało prawdopodobny, ponieważ wymaga ponownej zmiany spinu elektronów. Przejście tryplet-singlet może zachodzić bezpromieniście

lub też z emisją fotonu. Emisja kwantu energii towarzysząca przejściu elektronu ze wzbudzonego stanu trypletowego na singletowy stan podstawowy nazywana jest **fosforescencją** (jako P na Rys. 2). Proces ten charakteryzuje się powolnym zanikiem intensywności świecenia po zakończeniu naświetlania.

Na poniższym rysunku zostały pokazane procesy, jakie mogą zajść w badanej molekułe (Rys. 2).



Rys. 2. Diagram Jabłońskiego (zaadaptowane z [4]).

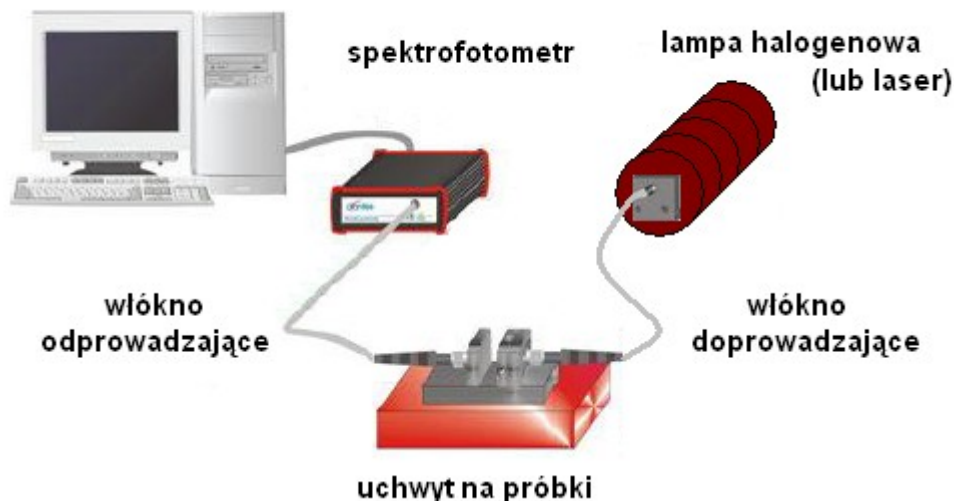
2. Układy pomiarowe

Pomiary wykonuje się przy użyciu spektrofotometru firmy Avantes. Źródłem światła λ jest lampa halogenowa produkcji firmy Top Sensors z wbudowanym sprzęgaczem światłowodowym. Badane próbki umieszcza się w uchwycie do standardowej kuwety. Światło doprowadzane jest od źródła do próbki za pomocą włókna doprowadzającego, a za próbką zbierane przy pomocy włókna odprowadzającego i doprowadzane do spektrofotometru.

Do rejestracji wyników pomiarów wykorzystuje się oprogramowanie AvaSoft, dostarczone przez producenta spektrofotometru.

2.1. Pomiary absorpcji i transmisji

Układ pomiarowy do rejestracji widm absorpcyjnych i transmisyjnych charakteryzuje się tym, że włókno odprowadzające jest skierowane pod kątem 180° do włókna doprowadzającego. Schemat układu pomiarowego do rejestracji tych widm przedstawia Rys. 3.



Rys. 3. Układ do pomiaru widm absorpcyjnych, transmisyjnych i luminescencyjnych.

Absorbancja jest wyliczana na podstawie następującego wzoru:

$$A_{\lambda} = -\log_{10} [(S_{\lambda} - D_{\lambda}) / (R_{\lambda} - D_{\lambda})]$$

gdzie symbole oznaczają: A_{λ} - absorbancja, S_{λ} - natężenie światła za próbką, D_{λ} - natężenie przy szczelinie zamkniętej, R_{λ} - natężenie światła przed próbką, λ - długość fali.

Natomiast transmitancja próbki liczona jest według wzoru:

$$T_{\lambda} = [(S_{\lambda} - D_{\lambda}) / (R_{\lambda} - D_{\lambda})] 100\%$$

gdzie T_{λ} - transmitancja w procentach, S_{λ} - natężenie światła za próbką, D_{λ} - natężenie przy szczelinie zamkniętej, R_{λ} - natężenie światła przed próbką, λ - długość fali.

Pomiary absorbancji wykonujemy w trybie ABSORBANCE a pomiary transmitancji w trybie TRANSMISION programu OOIBase

2.2. Pomiary luminescencji

Źródłem światła jest laser półprzewodnikowy emitujący promieniowanie o długości fali 415 nm (niebieski) lub 532 nm (zielony). Pomiarów luminescencji dokonujemy w trybie SCOPE.

3. Przebieg ćwiczenia

- 3.1. Przygotować zestaw preparatów tkankowych według wskazówek prowadzącego.
- 3.2. Wykonać pomiary absorpcji i transmisji preparatów tkankowych.

Pomiary absorpcji / transmisji

1. Zmontować układ do transmisji.
2. Wyłączyć źródło światła.
3. Wstawić kuwetę z odniesieniem (np. powietrzem, rozpuszczalnikiem).
4. Ustalić czas integracji i średnią.

5. Z menu wybrać Setup -> Smoothing and Spline (włączony Spline, wygładzanie na ok. 5-10 punktów).
6. Wcisnąć START.
7. Wcisnąć DARK (czarny kwadrat na pasku).
8. Z menu wybrać Setup -> Subtract Saved Dark.
9. Włączyć źródło światła.
10. Wcisnąć REFERENCE (biały kwadrat na pasku).
11. Włożyć kuwetę z próbką (np. PP z rozpuszczalnikiem, F z zol-żelem, itp. itd.).
12. Wybrać na pasku tryb pomiaru A lub T.

Zapamiętanie danych

1. Wcisnąć STOP.
 2. Z menu wybrać Save -> Experiment -> wprowadzić komentarz do pliku.
 3. Z menu wybrać File -> Convert Graph -> To Excel.
 4. Wybrać swój folder z danymi.
 5. Zaznaczyć ostatni na liście plik. W tle pojawią się dane w postaci wykresu w komentarzem. Sprawdzić, czy to jest właściwy plik!!!
 6. Kliknąć polecenie Otwórz.
 7. Otwiera się arkusz Excela ze wszystkimi parametrami. Trzeba go zapamiętać pod inną znaczącą nazwą.
- 3.3. Wykonać pomiary absorpcji i transmisji roztworów wskazanych przez prowadzącego.
- Rejestracji widm należy dokonać analogicznie do podpunktu 3.2. Obiektem odniesienia będzie w tym przypadku pusta kuweta.
- 3.4. Wykonać pomiary luminescencji roztworów wskazanych przez prowadzącego.

Pomiary luminescencji

1. Zmontować układ pod kątem 90° .
2. Wyłączyć laser niebieski (lub inne źródło).
3. Wstawić kuwetę z odniesieniem (np. rozpuszczalnikiem).
4. Ustalić czas integracji i średnią.
5. Z menu wybrać Setup -> Smoothing and Spline (włączony Spline, wygładzanie na ok. 5-10 punktów).
6. Wcisnąć START.
7. Wcisnąć DARK (czarny kwadrat na pasku).
8. Z menu wybrać Setup -> Subtract Saved Dark.

9. Włożyć kuwetę z próbką (np. PP z rozpuszczalnikiem, F z zol-żelem, itp. itd.).
10. Włączyć laser.
11. Pozostać w trybie SCOPE.

Zapamiętanie danych:

1. Wcisnąć STOP.
2. Z menu wybrać Save -> Experiment -> wprowadzić komentarz do pliku.
3. Z menu wybrać File -> Convert Graph -> To Excel.
4. Wybrać swój folder z danymi.
5. Zaznaczyć ostatni na liście plik. W tle pojawią się dane w postaci wykresu w komentarzem. Sprawdzić, czy to jest właściwy plik!!!
6. Kliknąć polecenie Otwórz.
7. Otwiera się arkusz Excela ze wszystkimi parametrami. Trzeba go zapamiętać pod inną znaczącą nazwą.

4. Opracowanie wyników

Widma absorpcji wszystkich roztworów należy umieścić na jednym wykresie i opatrzyć go odpowiednią legendą. Podobnie z widmami absorpcji preparatów tkankowych. Analogicznie postąpić z widmami transmisji. Uzyskane wyniki porównać i omówić.

Opracowała: dr inż. Agnieszka Ulatowska-Jarża

Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej Wydziału PPT Politechniki Wrocławskiej

5. Literatura

- [1] P. Borowski: Wybrane zagadnienia spektroskopii molekularnej, Wydawnictwo UMCS, Lublin 2005.
- [2] A. Bolewski, J. Kubisz, W. Babiński: Mineralogia ogólna. Rozdział "Fizyczne własności minerałów, luminescencja". Wydawnictwa Geologiczne, Warszawa 1981.
- [3] Strona internetowa Akademii Pedagogicznej im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie: <http://www.wsp.krakow.pl/biofiz/prezentacja/tresc/czastecz.htm>
- [4] Strona internetowa Sam Houston State University: <http://www.shsu.edu/~chemistry/chemiluminescence/JABLONSKI.html>