



6 المذيبات والأثار البيئية

6 Solvent and Environment Effects

المذيبات القطبية والبيئية المحلية لها تأثيرات قوية على خواص الطيف الانبعاث للملونات أو فلوروفور (fluorophores). التأثيرات على المذيب القطبي هو واحدة من أساسيات إزاحة ستوكس (Stokes shifts)، والتي تعتبر واحدة من أول المشاهدات في تقنية الفلوريسنت. طيف الانبعاث يقاس بسهولة، ونتج عنه الكثير من البحوث والنشرات العلمية على طيف الانبعاث للمواد الملونة في مختلف المذيبات، وعندما يرتبط بالبروتينات والأغشية والأحماض النووية. واحد من الاستخدامات الشائعة لتأثيرات المذيبات هو تحدد قطبية موقع الربط على الجزيء الميكروي. يمكن ان يتم هذا عمليا بالمقارنة بين طيف الانبعاث و/أو الإنتاج الكوانتي عندما يكون الملون مرتبط مع الجزيء الميكروي أو متحلل في محاليل مختلفة القطبية. على كل حال، هناك العديد من الحالات الإضافية حيث تستخدم فيها تأثيرات المذيب. افتراض ربيطة (ligend) فلوريسنت مرتبط مع بورتين أو غشاء. يتم الربط عادة بالانزياح الطيفي أو تغير في الإنتاج الكوانتي بسبب البيئة المختلفة للربطة المرتبط. طريقة بديلة، من الممكن ان تستحث الربطة انزياح طيفي في فلوريسنت البروتين الداخلي أو الخارجي. في كلتا الحالتين يمكن استخدام التغيرات الطيفية لقياس مدى الرابطة.

تأثيرات المذيب والبيئة على طيف الفلوريسنت معقد، وبسبب عوامل كثيرة بالإضافة لقطبية المحلول. العوامل التي تؤثر على طيف انبعاث الفلوريسنت والإنتاج الكوانتي تشمل على ما يلي:

- قطبية المذيب ولزوجته
- معدل استرخاء المذيب
- تغيرات المجس التشكيلية



- صلابة البيئة المحلية
- انتقال الشحنة الداخلية
- انتقال البروتون وتفاعلات الحالة المثارة
- تفاعلات المجس – مجس
- تغيرات في معدلات الاضمحلال المشعة والغير مشعة

هذه التأثيرات المتعددة توفر الكثير من الفرص لاستشعار البيئة المحلية المحيطة بالملون الفلوروفور (fluorophore). على كل حال، قد يكون من الصعب التعرف على أي من التأثيرات هو المسيطر في تجربة محددة، وعادة أكثر من تأثير سوف يعمل بشكل متزامن ليؤثر على الملون الفلوروفور.

عند اعتبار التأثيرات البيئية، فإن قطبية المذيب عادة ما تكون هي الموضوع الأول. على كل حال، التأثيرات البيئية معقدة وحتى قطبية المذيب لا يمكن ان توصف باستخدام نظرية بمفردها. معادلة Lippert تشرح تأثير قطبية المذيب، ولكن لا تأخذ في الحسبان التأثيرات الأخرى مثل الرابطة الهيدروجينية للملون الفلوروفور أو انتقال الشحنة الداخلي الذي يعتمد على قطبية المذيب. في هذا الجزء من الكتاب سوف نبدأ بوصف تأثيرات المذيب بصفة عامة، ومن ثم وصف الآليات الأخرى التي تؤثر على اقصى انبعاث والإنتاج الكوانتي.

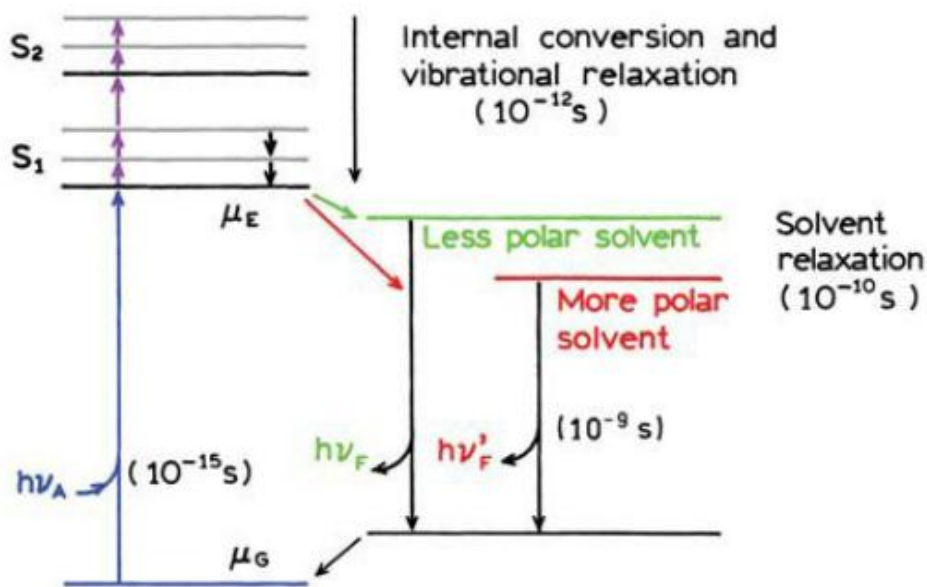
1.6 نظرة شاملة حول تأثيرات قطبية المذيب

1.1.6 تأثيرات قطبية المذيب

يحدث الانبعاث من الملونات (الفلوروفور) بصفة عامة عند أطوال موجية أطول من تلك التي حدث عندها الامتصاص. يعود هذا الفقد في الطاقة إلى العديد من العمليات الديناميكية التي تحدث مباشرة بعد امتصاص الضوء (الشكل 1.6). يثار الفلوروفور إلى أول مستوى طاقة مفرد (S_1)، وعادة إلى مستوى الطاقة الاهتزازي داخل S_1 . الطاقة الاهتزازية الإضافية تفقد بسرعة في المذيب. إذا أثير الفلوروفور لمستوى الطاقة المفرد الثاني (S_2)، فإنه يضمحل بسرعة إلى المستوى S_1 في خلال زمن قدره 10^{-12} s بسبب التحول الداخلي. تعمل تأثيرات المذيب على إزاحة الانبعاث حتى عند الطاقة المنخفضة بسبب الاستقرار لمستوى الإثارة بواسطة جزيئات المذيب القطبي. بشكل قياسي، يمتلك الفلوروفور عزم قطبي كبير في مستوى الإثارة



(μ_E) أكبر من العزم القطبي للمستوى الأرضي (μ_G). بعد الإثارة يمكن لعزوم قطبية المذيب ان تعيد اتجاهها أو ان تسترخي حول μ_E ، وهذا يعمل على تقليل الطاقة للمستوى المثارة. مع ازدياد قطبية المذيب، يصبح التأثير أكبر، مما ينتج عنه انبعاث عند طاقات اقل أو أطوال موجية أطول. بصفة عامة، فقط الملونات (الفلوروفورات) التي تكون قطبية بنفسها تعرض حساسية كبيرة لقطبية المذيب.



الشكل 1.6 مخطط Jabonski للفلوريسنت مع استرخاء المذيب

الجزينات الغير قطبية مثل الهيدروكربونات الأروماتية الغير مستبدلة، تكون اقل حساسية لقطبية المذيب.

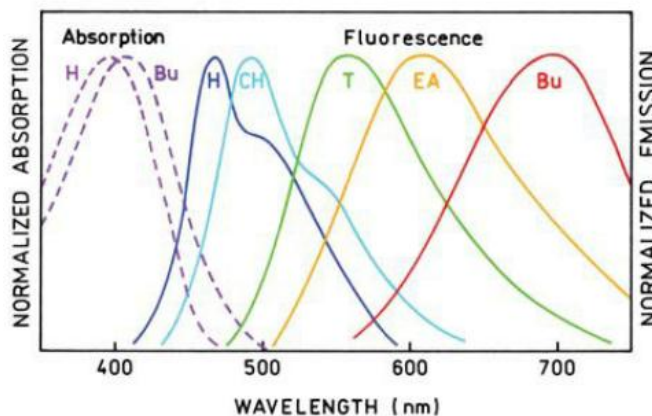
فترة زمن الفلوريسنت (1 – 10 ns) وهي عادة أكبر من الزمن اللازم لاسترخاء المذيب. للمحاليل المائية عند درجة حرارة الغرفة، يحدث استرخاء المذيب في فترة زمنية 100 – 10 ps. ولهذا السبب، فان طيف الانبعاث للفلوروفورات تعتبر ممثلة لمستوى استرخاء المذيب. بفحص الشكل 1.6 نكتشف لماذا طيف الامتصاص اقل حساسية لقطبية المذيب من طيف الانبعاث. يحدث امتصاص الضوء في حوالي 10^{-15} s، وهذا زمن قصير جدا لحركة الفلوروفور أو المذيب. طيف الامتصاص اقل حساسية لقطبية المذيب بسبب ان الجزيء يتعرض لنفس البيئية المحلية في المستوى الأرضي الطاقة الأرضية ومستويات الإثارة. بالمقابل، الفلوروفور الباعث للضوء يتعرض لبيئية استرخاء والتي تحتوي على جزينات المذيب الموجهة حول عزم ثنائي القطب للمستوى المثارة.



يمكن ان يكون لقطبية المذيب تأثيرات قوية على طيف الانبعاث. يوضح الشكل 2.6 صورة للانبعاث من 4- يمكن ان يكون لقطبية المذيب تأثيرات قوية على طيف الانبعاث. يوضح الشكل 2.6 صورة للانبعاث من 4- يمكن ان يكون لقطبية المذيب تأثيرات قوية على طيف الانبعاث. يوضح الشكل 2.6 صورة للانبعاث من 4-

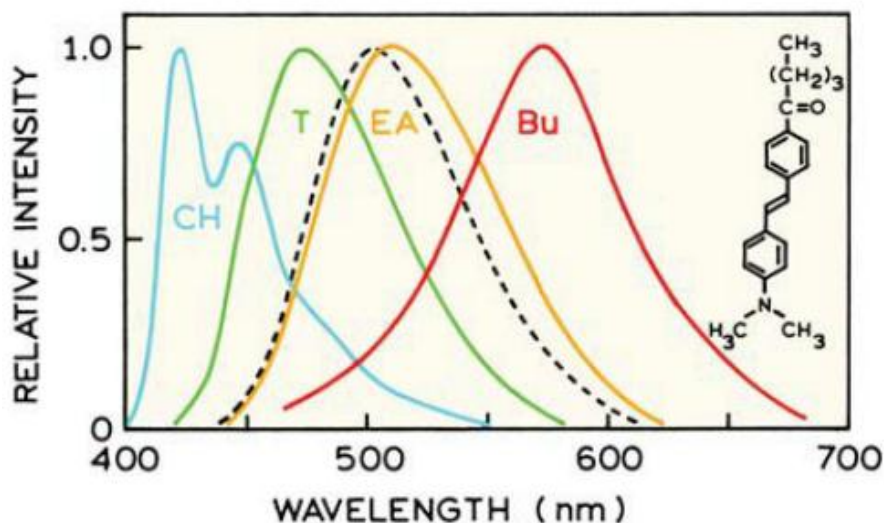
2.1.6 قطبية المحيط بغشاء مرتبط بفلوروفور

قبل الشروع في وصف نظرية تأثيرات المذيب فانه من المفيد ان ننظر لمثال. طيف الانبعاث لـ trans-4- قبل الشروع في وصف نظرية تأثيرات المذيب فانه من المفيد ان ننظر لمثال. طيف الانبعاث لـ trans-4- قبل الشروع في وصف نظرية تأثيرات المذيب فانه من المفيد ان ننظر لمثال. طيف الانبعاث لـ trans-4-



الشكل 2.6 صورة لطيف الانبعاث لـ DNS في محاليل بقطبية متزايدة. H، hexane و CH، cyclohexane و T، toluene و EA، ethyl acetate و Bu، n-butanol

الحساسية لقطبية المذيب مشابهة لـ DNS بسبب نفس مجموعات الاستقبال والمنح الإلكترونية الموجودة على الفلوروفور. مجموعة dimethyl amino هي مانحة للإلكترونات. مجموعة nitro ومجموعات carbonyl كلاهما مستقبلي للإلكترونات. الحساسية العالية للمذيب هي بسبب انزياح الشحنة بعيدا عن مجموعات amino في المستوى المثار، باتجاه مستقبل الإلكترونات. هذه النتائج تؤدي إلى عزم قطبي كبير في مستوى الإثارة. يتفاعل عزم ثنائي القطب مع جزيئات المذيب القطبية لتقليل طاقة مستوى الإثارة.



الشكل 3.6 طيف انبعاث فلوريسنت مصحح لـ DOS في cyclohexane (CH) وtoluene (T) وethyl acetate (EA) وbutanol (Bu). الخطوط المقطعة توضح انبعاث DOS من حويصلات DPPC [1].

الاستخدام النموذجي لانزياح الطيف هو تقدير قطبية ما يحيط بالفلوروفور. في الشكل 3.6 الهدف كان تحديد قطبية موقع ربط DOS على نموذج الغشاء الذي تكون من dipalmitoyl-L- α -phosphatidylcholine (DPPC). طيف الانبعاث لـ DOS المرتبط بحويصلات DPPC (الخط المقطع) وجدت بانها مشابهة لتلك في DOS ethyl acetate، والتي لها ثابت عزل (ϵ) قريب من 5.8. من الواضح ان قطبية موقع ربط DOS على حويصلات DCCP اكبر من hexane ($\epsilon = 1.9$) واقل من butanol ($\epsilon = 17.8$) عند درجة حرارة 20°C). عليه يشير طيف انبعاث DOS على انه وسط محيط بقطبية متوسطة عندما يرتبط مع حويصلات DPPC.



3.1.6 آليات أخرى لانزياح الطيف

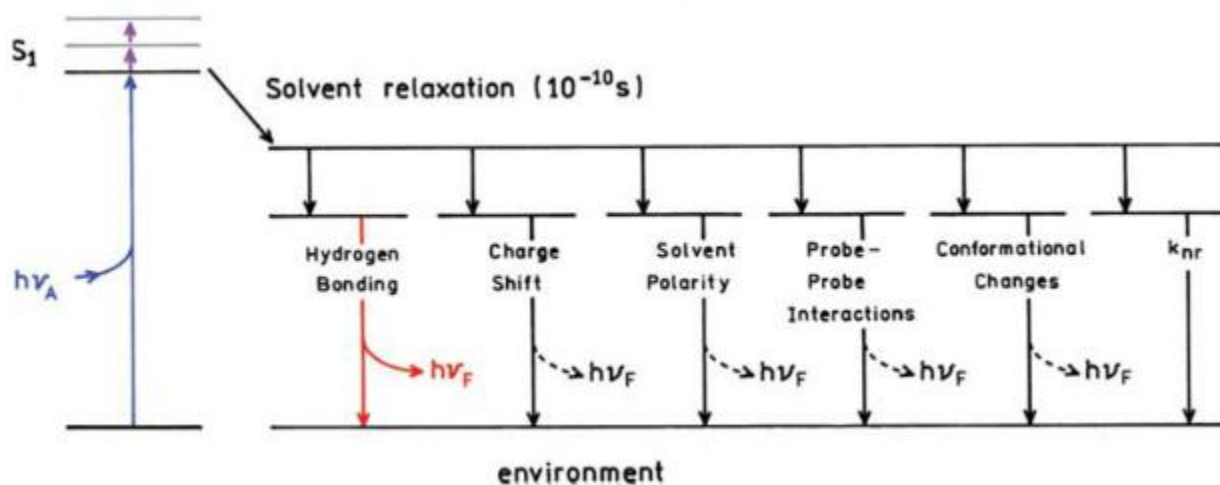
في حين ان تفسير اعتماد طيف الانبعاث على المذيب يبدو بسيطا، إلا ان هذا موضوع معقد. هذا التعقيد ناتج عن تنوع التفاعلات المؤدية لانزياح الطيف. على ابسط مستوى، اعتماد طيف الانبعاث على المذيب يفسر بدلالة معادلة Lippert (المعادلة 1.6 أدناه)، والتي تصف إزاحة ستوكس بدلال التغيرات في عزم ثنائي القطب الذي يحدث عند الإثارة، وطاقة ثنائي القطب في المذيبات التي لها ثابت عزل مختلف (ϵ) أو معامل انكسار (n) [2, 3].

النظرية لتأثيرات المذيب العامة غالبا ما تكون غير كافية لشرح تفاصيل سلوك الفلوروفورات في العديد من البيئات. هذا بسبب ان الفلوروفورات في الأغلب تعرض تفاعلات متعددة مع البيئة المحلية، والتي يمكن ان تعمل على إزاحة الطيب بمقدار متوافق مع تأثيرات المذيب العامة. على سبيل المثال يعرض indole تركيب انبعاث في مذيب cyclohexane غير قطبي (انظر الشكل 5.16). هذا الطيف عبارة عن صورة مرآة لطيف امتصاصه، إضافة مقدار صغير من الإيثانول (ethanol) (1 إلى 5%) ينتج فقد في الانبعاث. هذا المقدار من الإيثانول قليل جدا ليغير بشكل ملحوظ قطبية المذيب ويتسبب في انزياح طيفي بسبب تأثيرات المذيب العامة. يرى الانزياح الطيفي في وجود مقادير صغيرة من الإيثانول هو بسبب الرابطة الهيدروجينية للإيثانول مع امينو نيتروجين على حلقة indole. مثل تأثيرات المذيب تحدث للعديد من الفلوروفورات، ويجب ان تؤخذ في الحسبان عند تفسير طيف الانبعاث. عليه فان مخطط Jablonski لتأثيرات المذيب يجب أيضا ان تعكس إمكانية حدوث تفاعلات محددة بين الفلوروفور ومذيب يمكن ان تقلل طاقة مستوى الإثارة (الشكل 4.6).

بالإضافة إلى تفاعلات محددة بين الفلوروفور ومذيب فان العديد من الفلوروفورات يمكن ان تشكل مستوى انتقال شحنة داخلي ((internal charge transfer (ICT))، أو مستوى انتقال شحنة داخلي ملتوي ((twisted internal charge transfer (TICT)) [4]. على سبيل المثال افترض فلوروفور يحتوي على كلا من مجموعة منح الكترول ومجموعة استقبال الكترول. مثل هذه المجموعتين يمكن ان تكون مجموعات amino و carbonyl على التوالي، لكن هناك مجموعات أخرى كثيرة معروفة. بعد عملية الإثارة يمكن ان يكون هناك زيادة في تباعد الشحنة في داخل الفلوروفور. اذا المذيب كان قطبي، فان الجسيمات مع تباعد الشحنة (حالة ICT) يمكن ان تصبح ادنى مستوى طاقة (الشكل 4.6). في المذيب الغير قطبي فان الجسيمات بدون تباعد شحنة، وهو ما يعرف باسم مستوى الإثارة المحلي ((locally excited (LE))، يمكن ان يمتلك



ادنى مستوى طاقة. عليه فان دور المذيب القطبي ليس فقط تقليل طاقة مستوى الإثارة بسبب تأثيرات المذيب العامة، ولكن أيضا للتحكم في أي مستوى يمتلك ادنى طاقة. في بعض الحالات يكون تشكل مستوى ICT يتطلب دوران المجموعات على الفلوروفور ليشكل مستوى TICT. تشكل مستويات ICT ليس محصورا داخل نظرية تأثيرات المذيب العامة. بالإضافة إلى ان الفلوروفور يمكن ان يعرض انزياح طيفي كبير بسبب تشكل الاكسيمر أو الايكسيليكس. الفلوروفورات يمكن ان فلوريسنت أو غير فلوريسنت في هذه المستويات المختلفة.



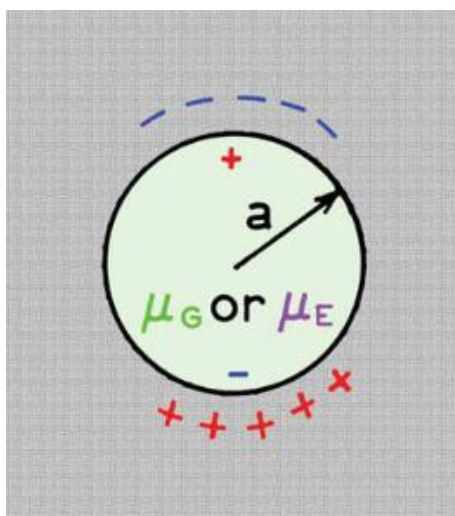
الشكل 4.6 تأثيرات البيئة على الطاقة لمستوى الإثارة. تشير الأسهم المقطعة إلى ان الفلوروفور يمكن ان يكون فلوريسنت أو غير فلوريسنت في المستويات المختلفة.

الإنتاج الكوانتي يمكن ان يتغير بسبب تغير معدل الاضمحلال الغير مشع (k_{nr}) أو بسبب تغير التشكيلات في الفلوروفور.

خلاصة القول، لا توجد نظرية منفردة يكن ان تستخدم لتفسير كمي لتأثيرات البيئة على الفلوروفور. تفسير هذه التأثيرات لا يعتمد فقط على القطبية، ولكن أيضا على تركيب الفلوروفور وأنواع التفاعلات الكيميائية التي تحدث مع الجزيئات المجاورة الأخرى. النهج الملاحظ مع قطبية المذيب تتبع نظرية تأثيرات المذيب العامة، والتي من الممكن ان تعطي انطباع ان قطبية المذيب هي العامل الوحيد الذي عليك ان تعتبره. في الحقيقة عوامل عدة تؤثر على الانبعاث لأي فلوروفور معطى.

2.6 تأثيرات المذيب العامة: معادلة Lippert-Mataga

تزود النظرية لتأثيرات المذيب العامة باطار عمل مفيد لاعتبارات انزياحات الطيف المعتمدة على المذيب. في وصف تأثيرات المذيب العامة اعتبر الفلوروفور على انه ثنائي قطب في وسط متصل بثابت عزل منتظم (الشكل 5.6). هذا النموذج لا يحتوي على التفاعلات الكيميائية، وبالتالي لا يمكن ان يستخدم لشرح التفاعلات الأخرى مثل الرابطة الهيدروجينية أو تشكل مستويات انتقال الشحنة، والتي تكتشف في بعض الأحيان كانهات عن النظرية العامة.



الشكل 5.6 ثنائي قطب في وسط عازل

التفاعلات بين المذيب والفلوروفور تؤثر على فرق الطاقة بين مستويات الطاقة الأرضية والمثارة. التقريب الأول هو ان فرق الطاقة هذا (بوحد cm^{-1}) هو خاصية لمعامل الانكسار (n) وثابت العزل (ϵ) للمذيب، ويوصف بمعادلة Lippert-Mataga [2, 3]:

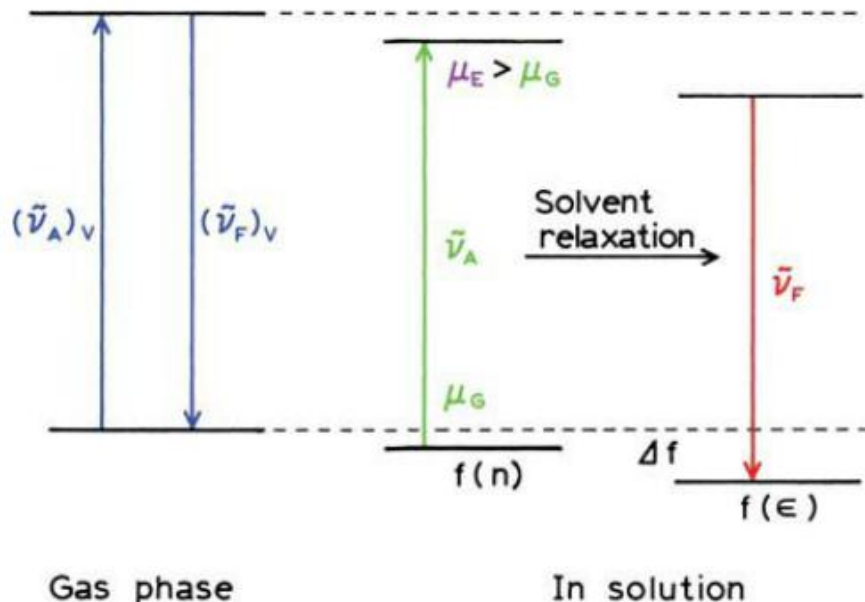


$$\bar{v}_A - \bar{v}_F = \frac{2}{hc} \left(\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} \quad (6.1)$$

+ constant

في هذه المعادلة $h = 6.6256 \times 10^{-27}$ ergs وهي ثابت بلانك، $c = 2.9979 \times 10^{10}$ cm/s هي سرعة الضوء/ α هي نصف قطر التجويف حيث يكون الفلوروفور موجودا، و \bar{v}_A و \bar{v}_F هي الأرقام الموجية (cm^{-1})¹ للامتصاص والانبعث على التوالي. المعادلة 1.6 هي فقط تقريب، ولكنها تعطي ترابط مناسب بين فقد الطاقة المحسوبة والمقاسة عمليا في مذيبات غير protic (تعني كلمة protic ان مذيب يحتوي على ذرة هيدروجين مرتبطة بذرة أكسجين لتكون مجموعة هيدروكسيل أو هيدروجين لتكون مجموعة امينيو من الوكيبديا). نعي بمذيب غير protic هي تلك المذيبات التي لا تحتوي على مجموعات هيدروكسي لآو مجموعات أخرى قادرة على الارتباط مع هيدروجين. معادلة Lippert هي تقريب بحيث ان استقطاب الفلوروفور والحدود ذات الرتب العالية تكون مهملة. هذه الحدود تحتسب للتأثيرات من الرتبة الثانية، بحيث ان عزوم ثنائي القطب الموجودة في جزيئات المذيب تنتج من خلال إثارة الفلوروفور والعكس صحيح.

من المفيد ان نحص التأثيرات المضادة لـ ε و n على إزاحة ستوكس. زيادة في n سوف تعمل على تقليل فقد الطاقة، في حين ان زيادة ε سوف يؤدي إلى فرق كبير بين \bar{v}_A و \bar{v}_F . معامل الانكسار n هو استجابة عالية للتردد ويعتمد على حركة الإلكترونات داخل جزيئات المذيب، والتي تكون لحظية وتحدث خلال امتصاص الضوء. في المقابل، ثابت العزل ε هو خاصية استاتيكية تعتمد على كلا من الحركات الجزيئية والإلكترونية، والحركة الجزيئية هي عبارة عن إعادة تنظيم المذيب حول المستوى المثار. التأثيرات المختلفة لـ ε و n على إزاحة ستوكس سوف تشرح بالتفصيل في الجزء 1.2.6. باختصار، زيادة في معامل الانكسار سوف تسمح لكلا من المستويات الأرضية والمثارة لان تستقر لحظيا بحركة الإلكترونات داخل جزيئات المذيب. ينتج عن إعادة توزيع الإلكترون هذا نقصان في فرق الطاقة بين المستويات الأرضية والمثارة (الشكل 6.6). لهذا السبب فان معظم الكروموفورس تعطي إزاحة ناحية الأحمر لطيف الامتصاص في المذيبات بالنسبة لطور البخار [7 – 5]. زيادة في ε سوف تؤدي أيضا إلى الاستقرار حول المستويات الأرضية والمثارة. على كل حال نقصان الطاقة لمستوى الإثارة بسبب ثابت العزل يحدث فقط بعد إعادة التوجيه لثنائيات قطب المذيب.



الشكل 6.6 تأثيرات معامل الانكسار n وثابت العزل ϵ على طاقات الامتصاص والانبعاث.

هذه العملية تتطلب حركة كامل جزيئات المذيب وليس فقط إلكتروناته. كنتيجة لذلك، استقرار المستويات الأرضية والمثارة للفلوروفور تعتمد على ثابت العزل ϵ وهي تعتمد على الزمن. معدل استرخاء المذيب تعتمد على درجة الحرارة واللزوجة للمذيب (الجزء 7). انزياحات مستوى الإثارة إلى طاقة أقل على المقياس الزمني تقارن بزمن إعادة توجيه المذيب. في اشتقاق معادلة Lippert (الجزء 1.2.6)، وخلال هذا الجزء تفترض على ان استرخاء المذيب يكتمل قبل الانبعاث.

الحد داخل القوسين الكبيرين في المعادلة 1.6 يعرف باتجاه قابلية الاستقطاب (orientation polarizability) (Δf) . الحد الأول $(\epsilon - 1)/(2\epsilon + 1)$ هو للانزياحات الطيفية بسبب كلا من إعادة الاتجاه لثنائيات قطب المذيب وإعادة توزيع الإلكترونات في جزيئات المذيب (الشكل 6.6، المركز). الحد الثاني $(n^2 - 1)/(2n^2 + 1)$ هو لإعادة توزيع الإلكترونات. الفرق بين هذين الحدين هو للانزياحات الطيفية الناتجة عن إعادة توجيه جزيئات المذيب (الشكل 6.6، اليمين)، وبالتالي حد اتجاه قابلية الاستقطاب. طبقاً لهذه النموذج البسيط، فقط إعادة توجيه المذيب المتوقعة ينتج عنها انزياحات ستوكس. تحدث إعادة توجيه الإلكترونات لحظياً، وكلا من المستويات الأرضية والمثارة تستقر بشكل متساوي تقريباً من خلال هذه



العملية. ونتيجة لذلك فان معامل الانكسار وإعادة التوزيع الإلكتروني يكون له تأثير صغير نسبيا على انزياح ستوكس.

من المفيد ان نقوم بحساب مقدار الانزياحات الطيفية المتوقعة لتأثيرات المذيب العامة. معظم الفلوروفورات تمتلك عزوم ثنائية قطب لا تساوي صفر في المستويات الأرضية والمثارة. وكمثال لذلك سوف نفترض ان عزم ثنائي قطب المستوى الأرضي هو $\mu_G = 6D$ ، وعزم ثنائي قطب المستوى المثار هو $\mu_E = 20D$ ، وبالتالي فان $\mu_E - \mu_G = 14D$. كما إننا سنفترض ان نصف قطر التجويف هو 4Å ، وهذا يتوافق مع نصف قطر فلوروفور الاروماتي النموذجي. وحدة ديبياي واحدة (1D) هي 1.0×10^{-18} esu cm. عزم ثنائي قطب بمقدار $4.8D$ الناتجة عن انفصال الشحنة بمقدار وحدة شحنة واحدة (4.8×10^{-10} esu) بمقدار 1Å . عزم ثنائي قطب المستوى المثار بمقدار $20D$ هو متوافق مع انفصال وحدة الشحنة بمقدار 4.2Å ، وهي المسافة المساوية لحجم الفلوروفور. هذه القيم المفترضة لـ μ_G و μ_E مشابهة لتلك التي لوحظت للفلوروفورات المستخدمة بكثرة كمجسات قطبية في البحوث البيوكيميائية.

لنموذج حساب الفقد في ستوكس قمنا بمقارنة مذيب hexane الغير قطبي مع مذيبات قطبية عديدة. مذيبات غير قطبية مثل hexane لا تمتلك عزم ثنائي قطب. وعليه فانه لا يوجد ثنائيات قطب لتعويض التوجيه حول المستوى المثار للفلوروفور. هذه الخاصية الفيزيائية للـ hexane تعطى بـ $\epsilon \approx 2$ (الجدول 1.6). من المعادلة 1.6 يمكن حساب قيم صغيرة لاتجاه قابلية الاستقطاب (Δf)، و $\bar{\nu}_A$ و $\bar{\nu}_F$ ويتوقع ان تكون صغيرة جدا او تساوي صفر. على سبيل المثال، اذا افترضنا ان من خلال نموذجنا ان الفلوروفور يمتص عند 350 nm (الجدول 2.6). على كل حال، حتى في المذيبات الغير قطبية فان اعلى قيم للامتصاص والانبعث لا تتوافق. تحدث الاثارة بصفة عامة عند مستويات اهتزازية عالية، وهذه الطاقة تتسرب بسرعة في المذيب المائع (10^{-12} s). يحدث الانبعث بصفة عامة لمستوى الاهتزاز المثار للمستوى الأرضي. ونتيجة لذلك فان الامتصاص والانبعث ينزاح بمقدار يساوي على الأقل طاقة الاهتزاز أو حوالي 1500 cm^{-1} . هذا الفقد في الطاقة يعود للحد الثابت في المعادلة 1.6، ويعمل على إزاحة الانبعث لنموذج الفلوروفور إلى 370 nm .

في المذيبات القطبية مثل الميثانول فانه من المتوقع الحصول على مقدار كبير من فقد ستوكس. على سبيل المثال في نموذجنا للفلوروفور يتوقع ان يحدث انبعث عند 526 nm في هذا المذيب القطبي (الجدول 2.6). هذا الانزياح يعود إلى التوجيه الكبير لاستقطاب الميثانول، والذي ينتج عن عزم ثنائي القطب له. هذه



الحساسية لانزياح ستوكس لتقطبية المذيب هي السبب في ان طيف انبعاث الفلوروفور تستخدم عادة لتقدير قطبية البيئة المحيطة بالفلوروفور.

الجدول 1.6 خواص استقطاب بعض المذيبات الشائعة

	Water	Ethanol	Ether	Hexane
ϵ	78.3	24.3	4.35	1.89
n	1.33	1.35	1.35	1.37
Δf	0.32	0.30	0.17	0.001

الجدول 2.6 انزياحات ستوكس المتوقعة من تأثيرات المذيب العامة

Solvent	ϵ	n	Δf^a	$\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F$ (cm^{-1}) ^b	λ_{max}^c (nm)
Hexane	1.874	1.372	-0.0011 ^d	35	350 ^d
Chloroform	4.98	1.447	0.1523	4697	418.9
Ethyl Acetate	6.09	1.372	0.201	6200	447.0
1-Octanol	10.3	1.427	0.2263	6979	463.1
1-Butanol	17.85	1.399	0.2644	8154	489.8
n-Propanol	21.65	1.385	0.2763	8522	498.8
Methanol	33.1	1.326	0.3098	9554	525.8



1.2.6 اشتقاق معادلة Lippert

يمكن فهم التفاعلات المسؤولة عن تأثيرات المذيب العامة من خلال اشتقاق معادلة Lippert. يمكن كتابة هذه المعادلة على النحو التالي:

$$hc \Delta \bar{\nu} = hc(\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F) = \frac{2\Delta f}{a^3} (\mu_E - \mu_G)^2 + \text{const} \quad (6.2)$$

حيث $\Delta \bar{\nu}$ هي انزياح التردد (بوحد cm^{-1}) بين الامتصاص والانبعاث، Δf هي اتجاه الاستقطاب، و μ_E و μ_G هي عزوم ثنائي القطب للمستوى المثار والمستوى الأرضي، على التوالي. تشتق معادلة Lippert من خلال اعتبار تفاعل الفلوروفور مع المذيب، والمقياس الزمني لهذه التفاعلات. نحتاج إلى ان نسترجع مبدأ Franck-Condon، الذي ينص على ان النواة لا تتحرك أثناء الانتقال الإلكتروني (10^{-15} s). بالمقابل، إلكترونات جزيئات المذيب يمكنها ان تعيد التوزيع حول ثنائي قطب مستوى مثار جديد خلال هذه الفترة الزمنية. بالإضافة إلى انه بسبب فترة الزمن الطويلة نسبياً لمستوى الإثارة ($\sim 10^{-8}$ s) فان جزيئات المذيب يمكنها ان تتوجه في موقع اتزانها حول مستوى الأثارة للفلوروفور قبل حدوث الانبعاث.

$$E_{\text{dipole}} = -\mu R \quad (6.3)$$

حيث R هي المجال الكهربائي [8]. في حالتنا هذه يكون المجال الكهربائي هو مجال تفاعلي نسبي في المادة العازلة الناتج بسبب ثنائي القطب. المجال التفاعلي موزاي ومعاكس لاتجاه عزم ثنائي القطب،

$$R = \frac{2\mu}{a^3} f \quad (6.4)$$

في هذه المعادلة f هي قابلية الاستقطاب للمذيب و a هي نصف قطر التجويف. قابلية استقطاب المذيب هي نتيجة لكلا من حركية الإلكترونات في المذيب وعزم ثنائي قطب جزيئات المذيب. كل هذه المركبات تعتمد على الزمن بشكل مختلف عن بعضها البعض. إعادة توجيه الإلكترونات في المذيب يحدث بشكل لحظي. التردد العالي لقابلية الاستقطاب $f(n)$ هو دالة في معامل الانكسار:



$$f(n) = \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad (6.5)$$

قابلية استقطاب المذيب تعتمد أيضا على ثابت العزل، والذي يشمل تأثير الاتجاه الجزيئي لجزيئات المذيب. لأن مقياس زمن إعادة التوجيه الجزيئي بطيء فإن هذه المركبة تعرف باسم التردد المنخفض لقابلية الاستقطاب للمذيب وتعطى بالعلاقة التالية

$$f(\varepsilon) = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} \quad (6.6)$$

الفرق بين هذين المصطلحين هو

$$\Delta f = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad (6.7)$$

ويعرف باسم اتجاه قابلية الاستقطاب (orientation polarizability). إذا المذيب لا يمتلك عزم ثنائي قطب دائم، $\varepsilon \sim n^2$ و $\Delta f \sim 0$. يدرج الجدول 1.6 قيم تمثيل كلا من ε و n و Δf . من مقادير Δf يمكن الحكم على الانزياح الطيفي $\Delta \bar{\nu}$ وسوف تكون أكبر كثيرا في الماء من hexane.

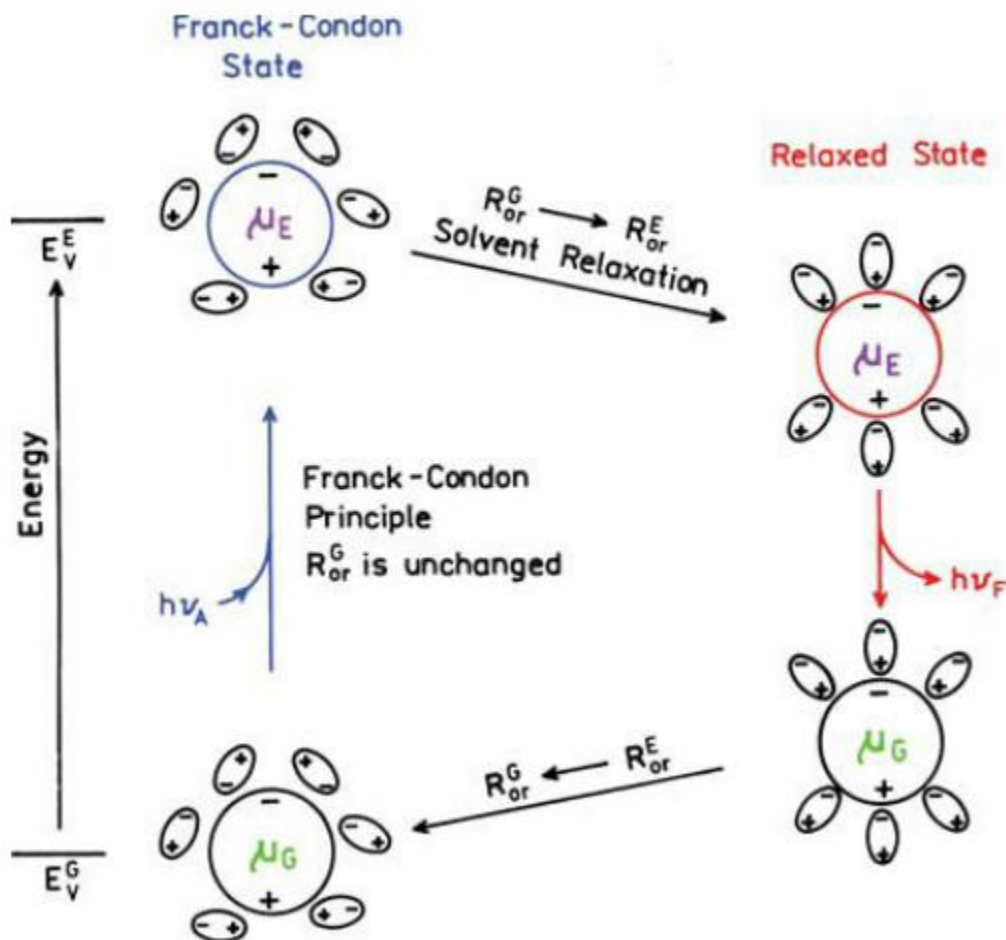
التفاعلات للفوروفور مع المذيب يمكن وصفها بدلالة عزوم ثنائي القطب لمستواها الأرضي (μ_G) ومستواها المثار (μ_E)، والمجالات التفاعلية حول ثنائيات القطب هذه. يمكن ان تقسم هذه المجالات إلى تلك التي تنتج عن الحركات الإلكترونية (R_{el}^G & R_{el}^E) وتلك التي تنتج عن إعادة توجيه المذيب (R_{or}^G & R_{or}^E). افترض الاتزان حول عزوم ثنائي القطب للمستويات الأرضية والمثارة، هذه المجالات التفاعلية هي

$$R_{el}^G = \frac{2\mu_G}{a^3} f(n) \quad R_{el}^E = \frac{2\mu_E}{a^3} f(n)$$

$$R_{or}^G = \frac{2\mu_G}{a^3} \Delta f \quad R_{or}^E = \frac{2\mu_E}{a^3} \Delta f \quad (6.8)$$



اعتبر الشكل 7.6، الذي يصف هذه المجالات خلال عملية الإثارة والانبعاث. لامتصاص الضوء تكون طاقات المستويات الأرضية (E^G) ومستويات الإثارة الغير متوازنة (E^E) هي



الشكل 7.6 تأثيرات المجالات التفاعلية الإلكترونية والاتجاه على طاقة ثنائي القطب في الوسط العازل $\mu_E > \mu_G$. الدوائر الصغيرة تمثل جزيئات المذيب وعزوم ثنائيات القطب لها.

$$\text{Energy}^E(\text{absorption}) = E_V^E - \mu_E R_{or}^G - \mu_E R_{el}^E \quad (6.9)$$

$$\text{Energy}^G(\text{absorption}) = E_V^G - \mu_G R_{or}^G - \mu_G R_{el}^G \quad (6.10)$$

حيث E_V تمثل مستويات الطاقة للفلوروفور في حالة البخار، بدون تأثير من المذيب. تتناقص طاقة الامتصاص بواسطة مجال التفاعل الإلكتروني بمستوى ثنائي القطب المثار. يحدث هذا بسبب ان الإلكترونات



في المذيب يمكن ان تتبع تغير سريع في التوزيع الإلكتروني داخل الفلوروفور. بالمقابل، اتجاه جزيئات المذيب لا تتغير خلال عملية امتصاص الضوء. لهذا فان تأثير اتجاه الاستقطاب يعطى بـ $\mu_G R_{or}^G$ و $\mu_E R_{or}^G$ ، وتحتوي فقط مجال التوجيه التفاعلي للمستوى الأرضي. هذا الانفصال للتأثيرات هو بسبب مبدأ Franck-Condon. ترتبط الطاقة مع الطول الموجي بالعلاقة $\bar{\nu} = \Delta E/hc$ ، بطرح المعادلة 10.6 من المعادلة 9.6 تنتج طاقة الامتصاص:

$$hc\bar{\nu}_A = hc(\bar{\nu}_A)_V - (\mu_E - \mu_G)(R_{or}^G) - \mu_E R_{cl}^E + \mu_G R_{cl}^G \quad (6.11)$$

حيث ان $hc(\bar{\nu}_A)_V$ هي فرق الطاقة في البخار تكون تأثيرات المذيب غير موجودة. بنفس الاعتبارات يمكننا الحصول على الطاقة لمستويين إلكترونين للانبعاش. هما على النحو التالي

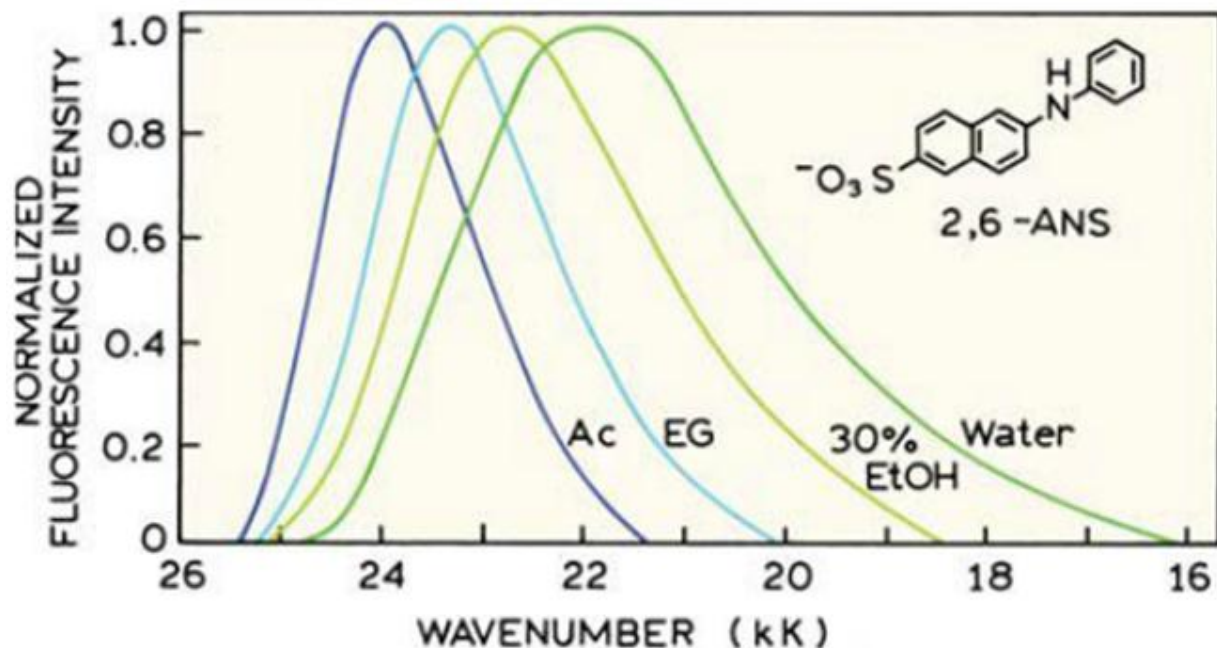
$$\text{Energy}^E(\text{emission}) = E_V^E - \mu_E R_{or}^E - \mu_E R_{cl}^E \quad (6.12)$$

$$\text{Energy}^G(\text{emission}) = E_V^G - \mu_G R_{or}^E - \mu_G R_{cl}^G \quad (6.13)$$

لاشتقاق هذه الصيغ سوف نفترض ان المذيب يسترخي بسرعة بالمقارنة مع فترة الزمن للمستوى المثار، وبذلك فان مجال الاتجاه الأصلي (R_{or}^G) تتغير إلى R_{or}^E قبل عملية الانبعاش. يتغير المجال الإلكتروني خلال الانبعاش ولكن اتجاه المجال يبقى بدون تغير. طاقة الانبعاش تعطى بـ

$$hc\bar{\nu}_F = hc(\bar{\nu}_F)_V - (\mu_E - \mu_G)R_{or}^E - \mu_E R_{cl}^E + \mu_G R_{cl}^G \quad (6.14)$$

في غياب التأثيرات البيئية نتوقع ان تكون $\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F$ ثابتة لجزيئات المركبة التي تتعرض لاسترخاء اهتزازي. وعليه فان طرح المعادلة 14.6 من المعادلة 11.6 ينتج



الشكل 8.6 طيف الانبعاث الـ normalized لحمض 6-anilino-2-naphthalene sulfonic (ANS). المذيب هو (Ac) acetonitrile، و (EG) ethylene glycol، و 30% ethanol/70% water، و (EtOH) ماء. $1\text{kK} = 1000\text{ cm}^{-1}$. من [19].

$$\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F = -\frac{1}{hc}(\mu_E - \mu_G)(R_{\text{or}}^G - R_{\text{or}}^E) + \text{const} \quad (6.15)$$

بالطرح من معادلة 8.6 تنتج معادلة Lippert:

$$\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F = \frac{-2}{hca^3}(\mu_E - \mu_G)(\mu_G \Delta f - \mu_E \Delta f) + \text{const} \quad (6.16)$$

من المهم ان نتذكر ان معادلة Lippert هي تقريب فقط، وتحتوي على الكثير من الافتراضات. افترض ان الفلوروفور عبارة عن كرة، ولا يوجد أي اعتبار لتفاعلات محددة مع المذيب. وضعت معادلات أخرى اكثر تعقيدا، ويمكن للقارئ المهتم ان يرجع لها في النشرات العلمية الموسعة على الموضوع [9-14]. في كل المعالجات فان المذيب يعتبر متصل. تتجاهل معادلة Lippert قابلية الاستقطاب للفلوروفور وتفترض ان



المستويات الأرضية والمثارة لعزوم ثنائي القطب تتوجه كلها في نفس الاتجاه. اذا قمنا بافتراض ان إمكانية الاستقطاب للفلوروفور هو نفسه للمذيب، فان كلا من μ_E و μ_G تأخذ اتجاهات مختلفة، ومن ثم اذا كانت هذه الاتجاهات المختلفة فان معادلة Lippert تصبح [13-14].

$$hc\Delta\bar{\nu} = \Delta b \left[\frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} - \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right] \frac{(2n^2 + 1)}{(n^2 + 2)} + \text{const} \quad (6.18)$$

حيث

$$\Delta b = \frac{2}{hca^3} (\mu_G^2 - \mu_E^2 - \mu_G\mu_E \cos\alpha) \quad (6.19)$$

α هي الزاوية بين μ_E و μ_G . يبدو من المناسب ان تأثيرات المذيب العامة سوف تعتمد على الزاوية بين μ_E و μ_G . على كل حال فانه يبدو ان هذه الاتجاهات لعزوم ثنائي القطب متشابهة للعديد من الفلوروفورات في المستوى الأرضي والمثار. من ما هو معروف ان انزياحات الطيف ناتجة عن تأثيرات خاصة للمذيب وتشكل مستويات ICT تكون في العادة كبيرة جدا، فانه من المفضل ان نستخدم الشكل المبسط لمعادلة Lippert لتفسير البيانات الطيفية. الانحرافات عن السلوك المتوقع يمكن ان يستخدم للإشارة إلى وجود تفاعلات إضافية.

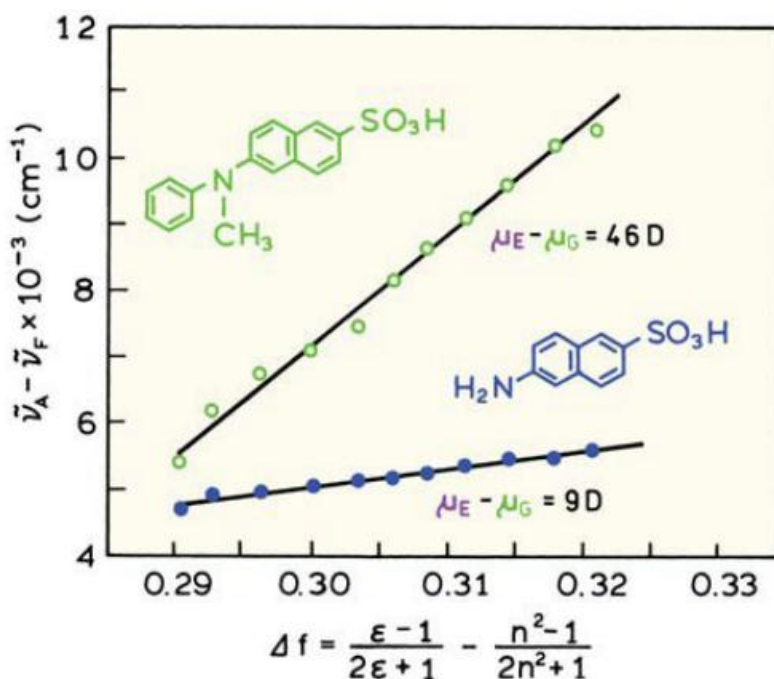
لتجنب أي تضاربات تجدر بالإشارة إلى ان المعادلة 18.6 غير صحيحة في الطبعة الثانية من هذا الكتاب، كما هو موضح في [15]. هذه المعادلة كانت أيضا غير صحيحة في التقارير الأصلية [13-14].

2.2.6 تطبيق على معادلة Lippert

استخدم طيف الانبعاث للعديد من الفلوروفورات لعنونة الجزيئات الميكروية حيث انه من المعروف عنها إنها حساسة لقطبية المذيب. واحد من افضل الأمثلة المعروفة هو مستشعر ANS. هذه الفئة من المستشعرات أصبحت منتشرة منذ العام 1954 [16]. ANS وجزيئات مشابهة هي في الأساس غير فلوريسنت عندما تكون في مذيب مائي، ولكنها تصبح فلوريسنت في مذيبات غير قطبية او عندما ترتبط مع بروتين او اغشية. هذه المستشعرات حساسة جدا لقطبية المذيب ويمكنها ان تكشف قطبية الوسط المحيط [17 – 19]. على سبيل المثال اقصى انبعاث لـ 2,6-ANS يزاح من 416 nm في acetonitrile إلى حوالي 400 nm في الماء

(الشكل 8.6)، واقصى انبعاث يمكن ان يستخدم لتقدير قطبية موقع الربط لـ ANS على الجزيئات الميكروبية [20]. سبب اخر لانتشار استخدام هذه المستشعرات هو مستوى الفلوريسنت المنخفض لها في الماء. على سبيل المثال الإنتاج الكوانتي لـ 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate (1,8-ANS) هو حوالي 0.002 في الوسط المائي، ولكن بجوار 0.4 عندما يرتبط مع serum albumin. الـ 200 ثنية او لفة تعزز الإنتاج الكوانتي وهو مفيد لان الفلوريسنت لخليط الصبغة مع البروتين (dye-protein) أو الصبغة مع الغشاء (dye-membrane) تنتج بشكل حصري من الصبغة المرتبطة مع البوليمرات البيولوجية (biopolymers)، بدون مشاركة من المستشعر الغير مرتبط. ونتيجة لذلك فان الخواص الطيفية للجزء المرتبط يمكن دراستها بدون تدخل من الصبغة الغير مرتبطة (الحررة).

يمكن تقدير حساسية المذيب للفلوروفور بواسطة مخطط Lippert. هذا المخطط ($\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F$) مقابل اتجاه قابلية الاستقطاب (Δf). الفلوروفورات الأكثر حساسية هي تلك التي تمتلك اكبر تغير في عزم ثنائي القطب عند تعرضها للإثارة. مخططات Lippert لمشتقتين من naphthylamine موضحة في الشكل 9.6.

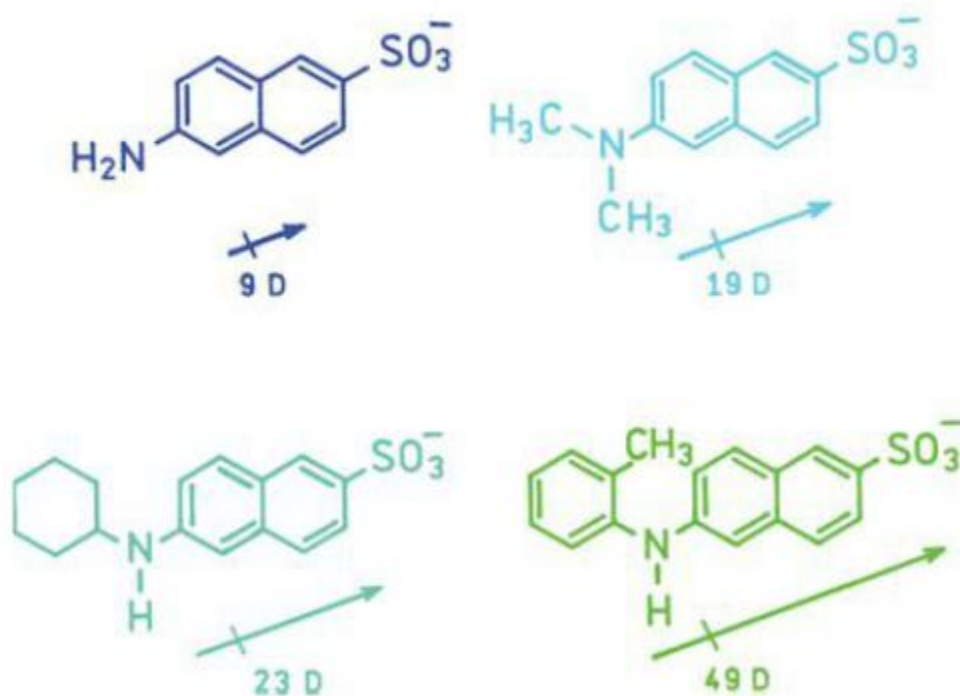


الشكل 9.6 مخططات Lippert لمشتقتين من naphthylamine في خليط من الايثانول والماء. البيانات الموضحة لـ N-phenyl-N-methyl-6-aminonaphthalene-2-sulfonate (o) و-6-aminonaphthalene-2-sulfonate (●) [10].



حساسية هذه الفلوروفورات لقطبية المذيب هي من المحتمل بسبب انزياح الحنة من مجموعة الامينو في اتجاه الالكترونات السالبة لمجموعة حمض السلفونيك. مشتقات N-phenyl-N-methyl لحمض 6-aminonaphthalene-2-sulfonate هي اكثر حساسية لقطبية المذيب من مشتقات الامينو الغير مستبدلة [10]. هذه الحساسية الأعلى لقطبية المذيب هي بسبب ان حلقة الفينيل تسمح لفصل اكبر للشحنة من مجموعة امينو الغير مستبدلة.

خطية هذه المنحنيات غالبا ما تعتبر كدليل لأهمية سيطرة تأثيرات المذيب العامة في انزياحات الطيف. تؤدي تأثيرات المذيب الخاصة إلى مخططات Lippert الغير خطية (الجزء 3.6).



الشكل 10.6 التركيب الكيميائي والتغير في عزم ثنائي القطب $\Delta\mu = \mu_E - \mu_G$ لمشتقات naphthylamine.

البيانات في الشكل 9.6 هي لمدى محدود من مذيبات متشابهة. هي عبارة عن خليط م الماء والايثانول، بذلك فيها نفس التأثيرات الخاصة بسبب الرابطة الهيدروجينية الموجودة على كل الخليط. بصفة عامة التصاق سلسلة جانبية في مجموعة الامينو مثل مجموعات اروماتية (aromatic) تعزز الحساسية لقطبية المذيب. هذا

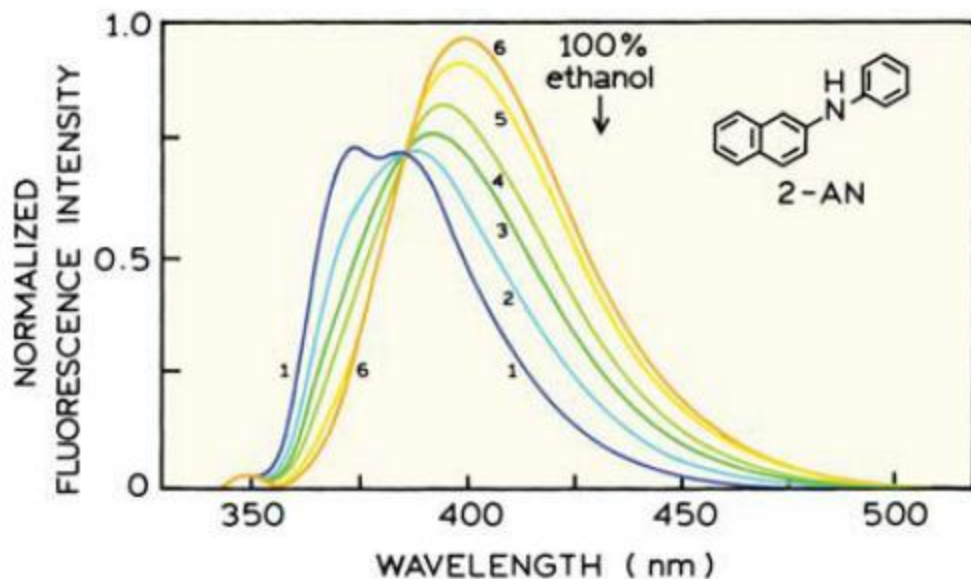


التوجه العام يمكن ان نراه من الشكل 10.6، بحيث اننا وضحنا قيم ($\mu_E-\mu_G$) للعديد من مشتقات naphthylamine كما تم الحصول عليها من مخططات Lippert. التغير في عزم ثنائي القطب يكون كبيرا عندما يكون إلكترون المانح لمجموعات alkyl مرتبطة بالنيتروجين. ارتباط مجموعة toluyl تعمل على زيادة فصل الشحنة في مستوى الإثارة.

3.6 تأثيرات المذيب الخاصة

في الأجزاء التالية سوف نقوم بوصف التفاعلات العامة بين الفلوروفورات والمذيبات، كنموذج بواسطة معادلة Lippert. يمكن تحديد التأثيرات العامة بواسطة قابلية الاستقطاب الإلكتروني للمذيب (والذي يوصف بواسطة معامل الانكسار n) وقابلية الاستقطاب الجزيئي (والتي تنتج من إعادة توجيه ثنائيات قطب المذيب). الخاصية الأخيرة هي دالة في ثابت العزل الاستاتيكي ϵ . بالمقابل تنتج تفاعلات محددة بواسطة جزيئا و بضعة جزيئات متجاورة، وتحدد من خلال الخواص الكيميائية الخاصة لكلا من الفلوروفور والمذيب [21-22]. التأثيرات الخاصة قد تكون بسبب رابطة هيدروجينية أو ذوبان مفضل أو كيمياء القاعدة والحمد أو تفاعلات انتقال الشحنة [23-30]. الانزياحات الطيفية الناتجة عن هذه التفاعلات الخاصة يمكن ان تكون كبيرة واذا لم تعرف فإنها تقيد تفاصيل تفسير طيف انبعاث الفلوروفور.

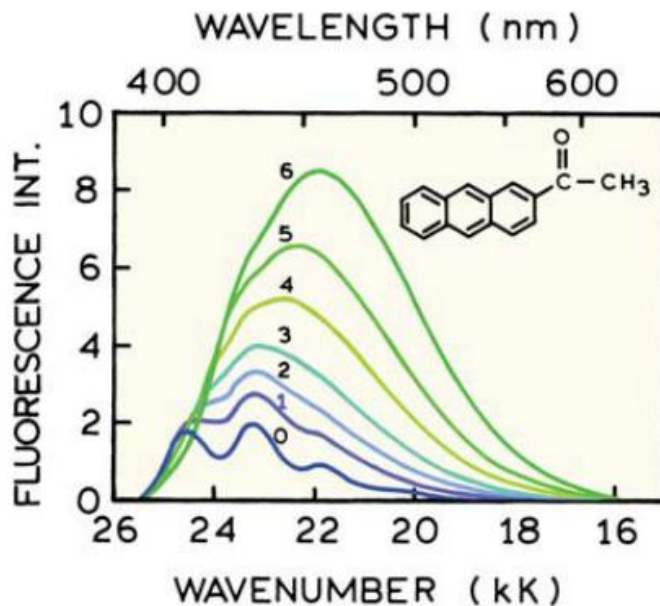
تفاعلات الفلوروفور والمذيب الخاصة يمكن ان تعرف بفحص طيف الانبعاث في العديد من المذيبات. بيانات نموذجية لـ 2-anilinonaphthalene (2-AN) في cyclohexane موضحة في الشكل 11.6. إضافة تركيز منخفض من الإيثانول بمقدار قليل لا يؤثر في الخواص العامة للمذيب، ينتج انزياحات طيفية كبيرة [19]. أقل من 3% إيثانول يسبب انزياح في أقصى انبعاث من 372 إلى 400 nm. زيادة تركيز الإيثانول من 3 إلى 100% يسبب انزياحات إضافية حتى 430 nm فقط. نسبة قليلة من الإيثانول (3%) تسبب 50% من انزياح الطيف الكلي. مع إضافة القليل من الإيثانول نلاحظ تناقص في شدة الطيف الأصلي، ويظهر طيف مزاح ناحية الأحمر. ظهور مركبة طيف جديدة هي خاصية لتأثيرات المذيب الخاصة. من المهم ان نتعرف على المذيب الحساس للفلوروفور حيث انه قد تعطي معلومات مضللة عن قطبية البيئة المحيطة اذا حدثت تفاعلات، أو اذا كان استرخاء المذيب غير مكتمل.



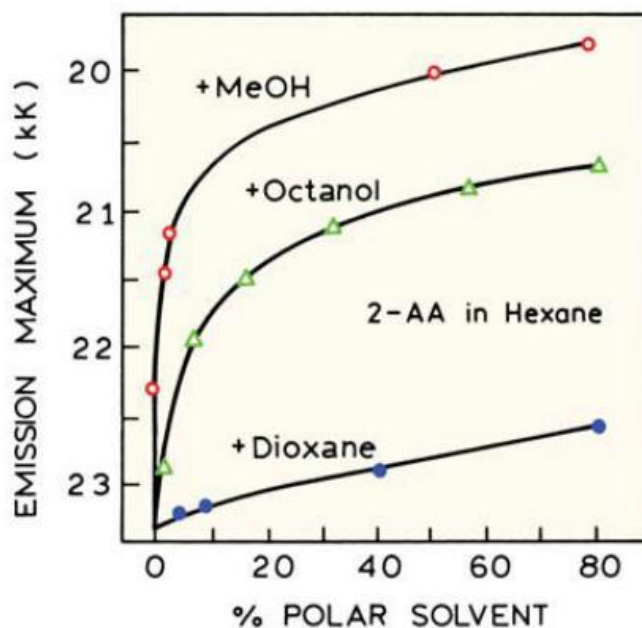
الشكل 11.6 طيف انبعاث فلوريسنت لـ 2-anilinonaphthalene في cyclohexane حيث تم إضافة الإيثانول. هذه الكميات المضافة هي (1) 0% (2) 0.2% (3) 0.4% (4) 0.7% (5) 1.7% (6) 2.7%. تشير الأسهم إلى أعلى قيمة للانبعاث في ميثانول 100%. [19].

بسبب حدوث انزياح طيفي عند تراكيز إيثانول منخفضة فإن هذا التأثير من المحتمل ان يكون بسبب الرابطة الهيدروجينية للإيثانول مع مجموعات الامينوا بدلا من تأثيرات المذيب الخاصة.

مثال اخر لتأثيرات المذيب الخاصة هو من 2-anilinonaphthalene (2-AA) ومشتقاته [31-33]. طيف الانبعاث لـ 2-AA في hexane يحتوي على مقادير صغيرة من الميثانول كما هو موضح في الشكل 12.6. هذه التراكيز المنخفضة للإيثانول تنتج فقد في الانبعاث المركب والذي يستبدل بأطوال موجية اكبر للانبعاث الغير مركب.



الشكل 12.6 طيف الفلوريسنت لـ 2-acetylanthracene في خليط من methanol و hexane عند درجة حرارة 20°C. تراكيز methanol بوحدة m-3 (0) و (1) و (2) و (3) و (4) و (5) و (6) 0.12 و 0.2 و 0.34 [32].



الشكل 13.6 تأثير تركيب المذيب على اقصى انبعاث لـ 2-acetylanthracene.

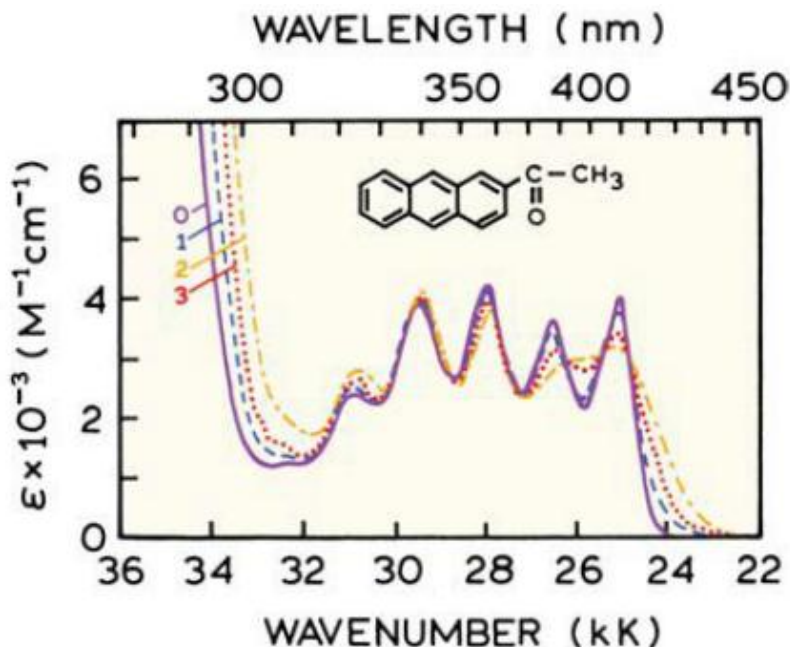
$$[32] 1\text{kK} = 1000 \text{ cm}^{-1}$$



مع ازدياد قطبية المذيب اكثر فان طيف الانبعاث يستمر في الانزياح المتدرج ناحية الأطوال الموجية الأكبر. هذه الأطياف تشير إلى ان انبعاث 2-AA حساس لكلا من تأثيرات المذيب الخاصة والتأثيرات العامة للمذيب في المذيبات القطبية.

يمكن ان ننظر لوجود تأثيرات المذيب الخاصة على إنها اعتماد اقصى انبعاث على نسبة قطبية المذيب (الشكل 13.6). في hexane يكون اقصى انبعاث لـ 2-AA مزاح تدريجيا كلما زادت نسبة dioxane إلى 100%. هذه الانزياحات تحدث بسبب ان dioxane قد نتج عن تأثيرات المذيب العامة. في المقابل معظم الانزياح المتوقع للميثانول نتج بحوالي 1-2% ميثانول تقريبا. هذا المقدار من الكحول قليل جدا ليؤثر على معامل الانكسار أو ثابت العزل وبالتالي تكون هذه الإزاحة نتيجة لتأثيرات المذيب الخاصة.

تحدث تفاعلات الفلوروفور المذيب الخاصة في الحالة الأرضية أو الحالة المثارة. اذا حدث التفاعل في الحالة المثارة فان الإضافة القطبية سوفلن تؤثر على طيف الامتصاص. اما اذا حدث التفاعل في المستوى الأرضي فان من المتوقع ان يحدث تغير في طيف الامتصاص. في حالة 2-AA يبين طيف الامتصاص فقد في التركيب الاهتزازي وانزياح ناحية الأحمر عند إضافة ميثانول (الشكل 14.6). هذا يقترح ان 2-AA والكحول يكونا مرتبطين برابطة هيدروجينية في المستوى الأرضي. في غياب تغيرات في طيف الامتصاص فان هذا يشير إلى عدم حدوث تفاعل في المستوى الأرضي. في حالة رابطة هيدروجينية ضعيفة فانه من المحتمل ان يحدث تفاعل في المستوى الأرضي وتزداد شدة التفاعل بعد الإثارة. اذا وجدت التأثيرات الخاصة للفلوروفور المرتبط مع الجزيئي الميكروي فان تفسير الانبعاث يكون معقدا.



الشكل 14.6 طيف الامتصاص لـ 2-acetylanthracene في hecane نقي (0) وخليط من methanol و hexane. تراكيز الـ methanol بوحدة mol dm^{-3} هي 0.2 (1) methanol نقي (2) طيف 3 (المقطع) يشير إلى معقدات H-bonded

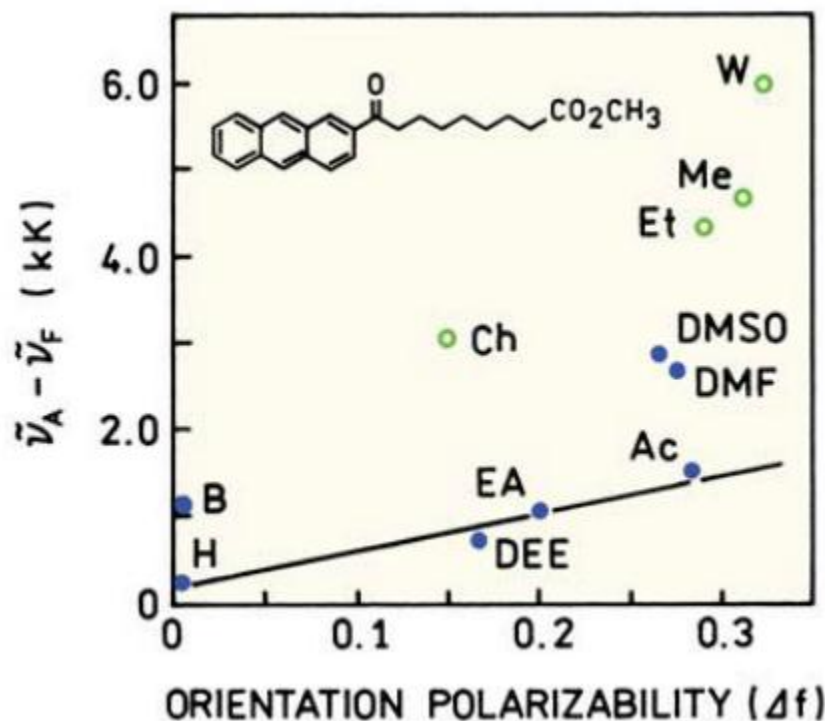
على سبيل المثال جزيء مثل 2-acetylanthracene عندما يكون مرتبط في الموقع الـ hydrophobic (الكاره للماء) على البروتين فإنه من الممكن ان يعرض طيف امتصاص مماثل لما شوهد في الماء اذا وجدت جزيء ماء واحد بجوار مجموعة الكربونيل.

وجود تفاعلات خاصة في المستوى الأرضي أو في المستوى المثار تحدد مقياس زمن هذه التفاعلات. اذا الفلوروفور والمذيب القطبي مرتبطين بالفعل مع المستوى الأرضي فان من المتوقع ان يحدث انزياح طيفي فورا بعد الإثارة. اذا الفلوروفور والمذيب القطبي مرتبطين فقط في المستوى المثار فان ظهور تأثير المذيب سوف يعتمد على معدل انتشار الفلوروفور والمذيب القطبي. في حالة الاعتماد على تركيز المذيب القطبي فإنه سيكون مثل تفاعلات الإخماد (quenching reactions).

1.3.6 تأثيرات المذيب الخاصة ومخططات Lippert

دليل على تفاعلات الفلوروفور مع المذيب الخاصة يمكن ان ترى في مخططات Lippert. مثال على ذلك هو مشتقة سلسلة الحمض الدهني الطويلة لـ 1-AA. تم توليف المركب للاستخدام كمستشعر غشائي [34-35]. لوحظت ان انزياح ستوكس كبيرة بصفة عامة المذيبات ذات الروابط الهيدروجينية (الماء والميثانول والإيثانول) (الشكل 15.6). مثل هذا السلوك لانزياحات ستوكس الكبيرة في المذيبات من النوع protic هي تفاعلات خاصة نموذجية للفلوروفور والمذيب وقد لوحظت في فلوروفورات أخرى [36-38].

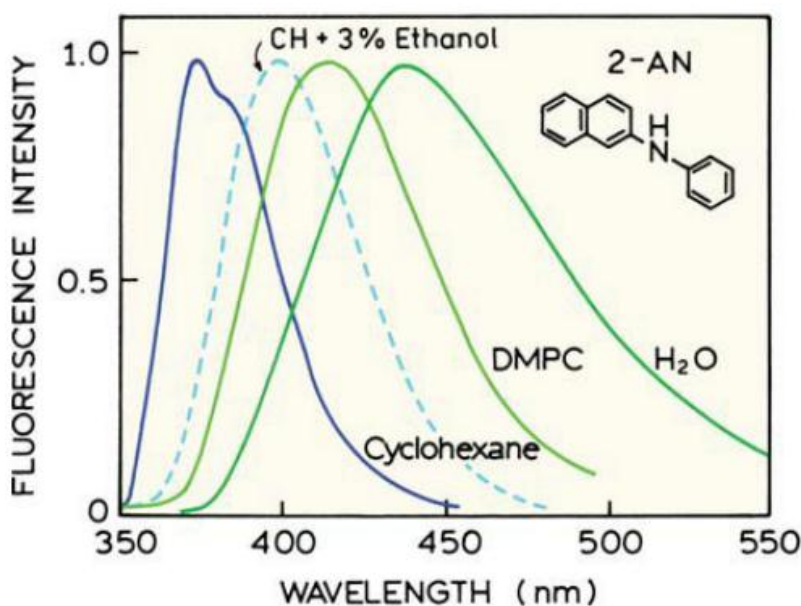
حساسية الفلوروفورات لتفاعلات خاصة مع المذيبات يمكن اعتبارها كمشكلة أو حالة مفضلة.



الشكل 15.6 انزياحات ستوكس لـ methyl 8-(2-anthroyl) octanoate في مذيبات عضوية وماء. المذيبات هي بنزين (B)، و (H) n-hexane و (DDE) diethyl ether و (EA) ethyl acetate و (Ac) acetone و (Ch) chloroform و (DMF) n,n-dimethylformamide و (Me) methanol و (DMSO) sulfoxide و (W) ماء [35]

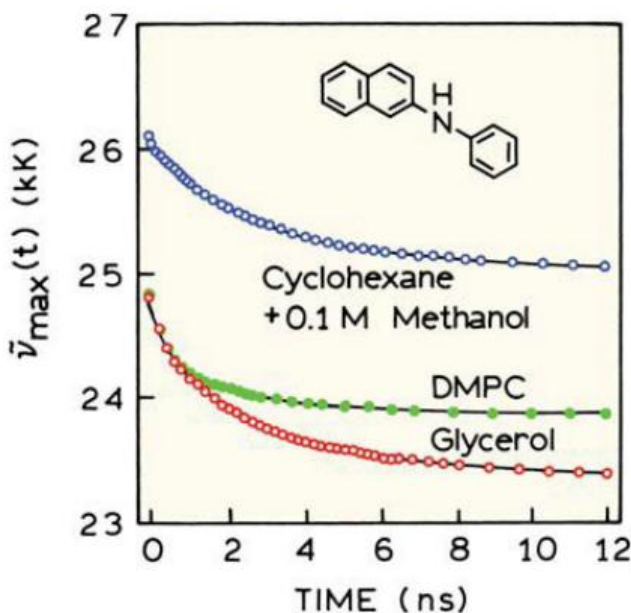
انه موضوع صعب البت به لان هذه التأثيرات تمنع من تفسير كمي لطيف الانبعاث بدلالة قابلية الاستقطاب الموجه للجزيئات الميكروية. هذه الحالة مفضلة لان التأثيرات الخاصة للمذيبات protic قد تكشف إمكانية وصول الجزيئات الميكروية للطور المائي.

في ضوء مقدار تأثيرات المذيب الخاصة، كيف يمكن لاحد ان يستخدم بيانات طيف الفلوريسنت ليعرف القطبية لمواقع الربط؟ في الوقت الحالي لا توجد طريقة معتمدة ومكتملة. على كل حال بالفحص الدقيق لحساسية المذيب للفلوروفور يمكن الحصول على تقديرات معقولة. اعتبر التجربة الافتراضية التالية. افترض 2-AA مرتبط بشدة مع طبقات دهنية ثنائية بحيث ان كل 2-AA مرتبط مع الغشاء. يبدو انه بغض النظر عن موقع 2-AA في الطبقة الثنائية فان كمية كافية من الماء ستكون موجودة اما في المستوى الارضي او خلال الفترة الزمنية للمستوى المثار، لينتج تشبع للتفاعلات الخاصة الموضحة في الشكل 12.6 والشكل 14.6. تحت هذه الظروف حساسية المذيب لهذا الفلوروفور تمثل بالمدى في الشكل 13.6 حيث ان تركيز المذيب protic اكبر من 10-20%. لاحظ ان الميل للمنحنيات متكافئ داخل هذا المدى للميثانول والاوكتان والدياوكسان. يشير ميل المنحنيات المتشابه إلى الية مشابهة والتي هي تأثير المذيب العام.



الشكل 16.6 طيف انبعاث فلوريسنت normalized لـ 2-anilinonaphthalene في مذيب مرتبط مع حويصلات من dimyristoyl-L- α -phosphatidylcholine (DMPC). الخطوط المقطعة تشير إلى الطيف في cyclohexane (CH) الذي يحتوي على 3% كحول [39].

فهم تأثيرات المذيب الخاصة والعامّة تعطي تفسير أساسي لطيف انبعاث الفلوروفور المرتبط بالجزيئات الميكروبية. اعتبر طيف انبعاث 2-anilino-naphthalene مرتبط مع الأغشية المكونة من dimyristoyl-L- α -phosphatidylcholine (DMPC) [39]. طيف الانبعاث لـ 2-AN في DMPC يعتبر انزياح احمر بالنسبة لانبعاث cyclohexane، لكنه انزياح للأزرق بالنسبة للماء (الشكل 16.6). ما هي قطبية البيئة لـ 2-AN في الأغشية؟ تفسير اقصى انبعاث لهذه الأغشية المعنونة أيضا معقد بسبب الانزياحات الطيفية المعتمدة على الزمن، هذا التعقد سوف نهمله في هذه المرحلة.



الشكل 17.6 علاقة اقصى انبعاث مع الزمن لـ 2-anilino-naphthalene في حويصلات DMPC ومذيبات [39].

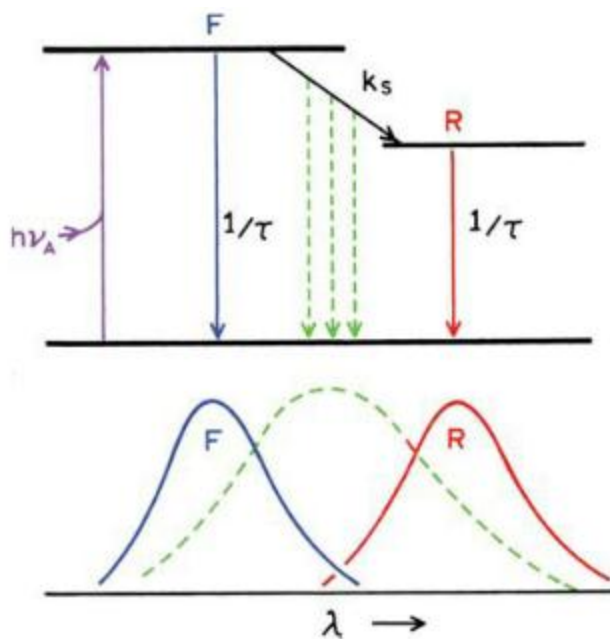
لاحظنا من قبل (الشكل 11.6) ان 2-AN حساس جدا لتراكيز قليلة من الإيثانول. يبدو ان cyclohexane المحتوي على 3% من الإيثانول يعمل كمرجع مفضل للبيئة ذات الاستقطاب المنخفض. هذا الطيف موضح بالخطوط المقطعة في الشكل 16.6. في هذا المذيب تكون التأثيرات الخاصة مشبعة. يمكن لاحد الآن ان يستنتج ان البيئة التي يكون فيها 2-AN غير مستقطب في موضعه ولكن هذا الموقع يصله الماء. بدون اعتبار تأثيرات المذيب الخاصة يمكن ان نستنتج ان 2-AN في بيئة مستقطبة.



الحقيقة ان تفاعلات الرابطة الهيدروجينية لـ 2-AN مشبعة في الأغشية مؤكدة أيضا من خلال البيانات الزمنية. القياسات والتفسير لهذه البيانات موضح في الجزء 7. يوضح الشكل 17.6 الاعتماد على الزمن لأقصى انبعاث لـ 2-AN المرتبط مع حويصلات DMPC ومع glycerol و cyclohexane. حتى في اقصر الفترات الزمنية للقياس والتي بلغت 1 ns فان اقصى انبعاث للأغشية المعنونة بـ 2-AN مشابهة لتلك التي وجدت في مذيب glycerol الـ protic. هذه القيمة الابتدائية لأقصى انبعاث أيضا مماثلة لقيمة الاسترخاء الكلي الذي وجد لـ 2-AN في cyclohexane والذي يحتوي على 0.1 M من الميثانول. هذه القيمة النهائية يمكن ان تعتبر كما توقع عندما كانت تأثيرات المذيب الخاصة مشبعة. هذه النتيجة تشير إلى انه في الأغشية تكون التفاعلات الخاصة مع الماء أو أي مجموعات ذات روابط هيدروجينية قطبية تكون مشبعة. هذه التفاعلات يمكن ان تحدث في المستوى الأرضي أو في فترات زمنية تقدر بأجزاء من النانوثانية أي إنها سريعة جدا ليتمكن رصدها بهذه التجربة. في أي من الحدين فانه يبدو واضحا ان طيف انبعاث 2-AN المرتبط مع الأغشية يمكن ان يفسر بشكل اكثر منطقية عندما يقارن مع مذيب مرجعي بحيث تكون تأثيرات المذيب الخاصة مشبعة.

4.6 تأثيرات درجة الحرارة

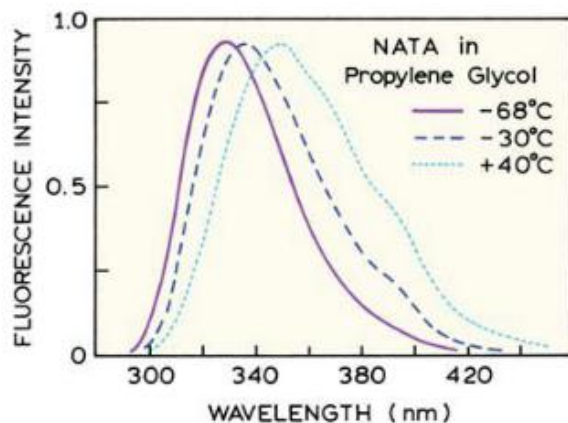
في الأجزاء التالية سوف نفترض ان استرخاء المذيب غير مكتمل قبل الانبعاث، وهذا صحيح في المذيبات السائلة. عند درجات الحرارة المنخفضة يصبح المذيب اكثر لزوجة، ويزداد زمن استرجاع الاتجاه له. هذا موضح في الشكل 18.6، الذي يوضح وصف مبسط لاسترخاء المذيب. بعد إثارة الفلوروفور يفترض ان يكون في البداية في مستوى (F) Franck-Condon. يبدأ المذيب بالاسترخاء بمعدل k_s . اذا كان المعدل اقل كثيرا من معدل الاضمحلال ($\gamma=1/\tau$)، نتوقع عندها ان نلاحظ طيف الانبعاث لمستويات F الغير مسترخية. اذا كان استرخاء المذيب اسرع من معدل الانبعاث ($k_s \gg \gamma$)، عندها سوف نلاحظ استرخاء المستوى (R).



الشكل 18.6 مخطط Jablonski لاسترخاء المذيب.

عند درجات حرارة متوسطة حيث تكون $k_s \approx \gamma$ ، فإن كلا من الانبعاث والاسترخاء يحدثان في نفس اللحظة. تحت هذه الظروف سوف نلاحظ طيف انبعاث متوسط. طيف الانبعاث المتوسط في (---) يكون أكثر اتساعاً على مقياس الطول الموجي بسبب مساهمات كلا من المستويات F و R. تفاصيل اعتماد طيف الاسترخاء على الزمن موضح في الجزء 7 من هذا الكتاب.

أمثلة على اعتماد طيف الانبعاث على درجة الحرارة موضح في الشكل 19.6 لـ (NATA) في propylene glycol. مذيبيات مثل ethylene glycol و glycerol تستخدم باستمرار لدراسة الفلوريسنت عند درجات حرارة منخفضة. اختيرت هذه المذيبيات لان لزوجتها تزداد بالتدرج مع تناقص درجة الحرارة، ولا تتبلور. بدلاً من ذلك فإنها تشكل زجاج عالي اللزوجة بحيث ان الفلوروفورات تتجمد. وجود مجموعات الهيدروكسيل وسلاسل alkyl تجعل هذه المركبات مذيبيات جيدة لمعظم الفلوروفورات.



الشكل 19.6 طيف الانبعاث لـ NATA [40].

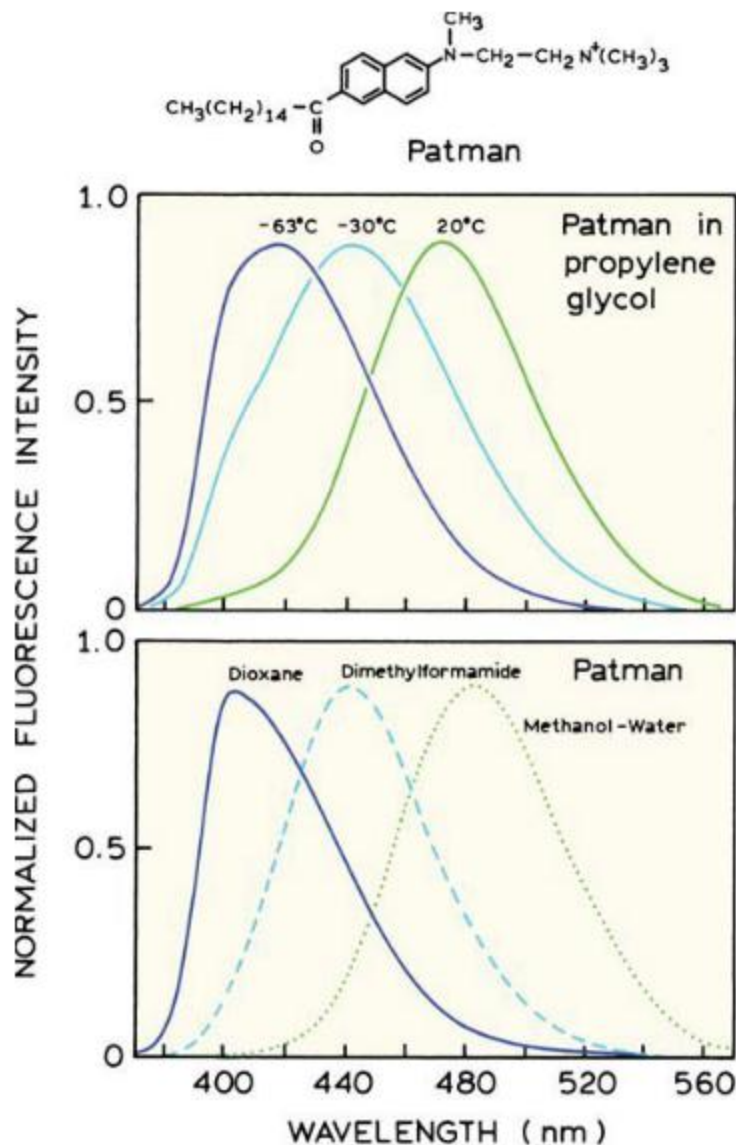
مع تناقص درجة حرارة NATA في propylene glycol ينزاح طيف الانبعاث إلى الأطوال الموجية الأقصر [40] (الشكل 19.6). يحدث هذا الانزياح بسبب ان معدل اضمحلال الفلوروفورات لا يعتمد كثيرا على درجة الحرارة، ولكن معدل الاسترخاء يعتمد بشدة على درجة الحرارة. وعليه فان عند درجة حرارة منخفضة لوحظ الانبعاث من المستوى F الغير مسترخي. من المهم ان نلاحظ ان انبعاث تركيب L_b^1 (الجزء 16 من الكتاب) لـ NATA لا يرى حتى في ادنى درجات الحرارة انخفاضا (-68°C). هذا بسبب خواص رابطة الهيدروجين لـ propylene glycol تبقى عند درجات الحرارة المنخفضة. انه من الواضح ان اعتماد انزياح الطيف لـ NATA على درجة الحرارة يعود الى اعتماد قابلية استقطاب التوجيه Δf على درجة الحرارة.

مثال اخر على اعتماد الطيف على درجة الحرارة قدمه Patman (الشكل 20.6) [42]. هذا الفلوروفور هو مناظر لـ lipid الـ Prodan، والذي تم تطويره ليكون مستشعر حساس جدا لقطبية المذيب [42]. الفكرة الأساسية هو مجموعات امينو ومجموعات كاربونيل تخدم كمانح ومستقبل للالكترونات على التوالي. في المستوى المثار يتوقع ان يكون هناك عزم ثنائي قطب كبير بسبب انتقال الشحنة (الشكل 21.6)، وعليه يكون حساس جدا لقطبية المذيب. مع تناقص درجة حرارة propylene glycol ينزاح طيف الانبعاث لـ Patman بشكل كبير إلى الأطوال الموجية الأقصر (الشكل 20.6). هذه التأثيرات لدرجة الحرارة المنخفضة مشابهة لتلك التي في المذيبات ذات القطبية المنخفضة. بسبب تناقص معدل حركة المذيب، يحدث الانبعاث من مستوى غير مسترخي عند درجة حرارة منخفضة.



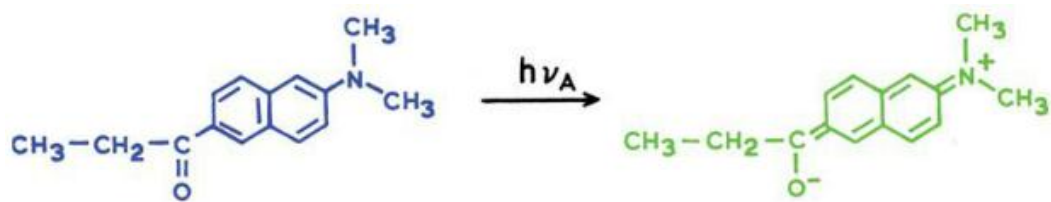
5.6 تحولات الطور في الأغشية

منذ بداياتها كمستشعر مذيّب حساس فان Prodan ومشتقاته اصبح يستخدم بشكل واسع في عنونة الجزيئات البيولوجية [43-46]. تم إضافة سلسلة الحمض alkyl أو الدهني الى Prodan وبالتالي استقرت في الأغشية (الشكل 22.6). يعتبر acrylodan احد مشتقات prodan المستخدم في عنونة مجموعات sulfhydryl في البروتينات. الـ prodan حساس جدا لقطبية المذيب. ينزاح اقصى انبعاث له من 410nm في cyclohexane إلى 520nm في المذيبات القطبية (الشكل 23.6) [47]. الـ prodan ومشتقاته لها فائدة في دراسة اغشيه الخلية ونمذجة الأغشية لحساسيتها العالية لحالة الطور للأغشية [48-52]. تمتلك حويصلات DPPC تحول في الطور عند درجة حرارة 37° . عندما يكون prodan مرتبط مع حويصلات DPPC ينزاح اقصى انبعاث من 425 إلى 485 nm (الشكل 24.6).

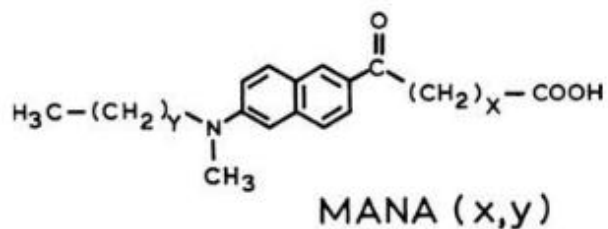
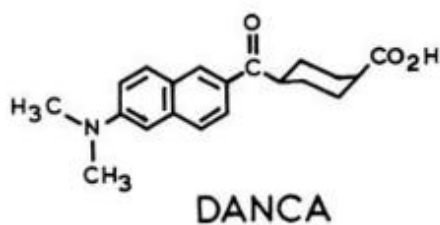
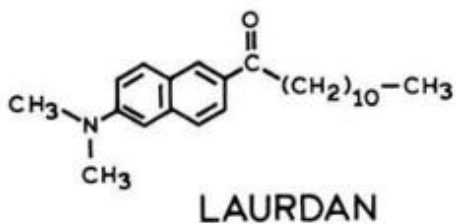


الشكل 20.6 طيف الانبعاث لمشتقات prodan المشابهة للـ lipid عند درجات حرارة مختلفة في propylene glycol (في الأعلى) وفي مذيبات بقطبيات مختلفة (في الأسفل) [41].

الانزياح الكبير في الطيف بواسطة prodan يسمح باستخدامه في تصوير حالة طور الأغشية [53-54]. عند استخدام ميكروسكوب الفلوريسنت فانه من الصعب تسجيل كامل طيف الانبعاث لكل نقطة في الصورة. تم تجنب الحاجة لطيف الانبعاث بتعريف طول معامل طول موجة ratiometric تمثل طيف الانبعاث. هذا المعامل يعرف مناظر لاستقطاب الفلوريسنت.



الشكل 21.6 انفصال الشحنة في مستوى prodan مثار.



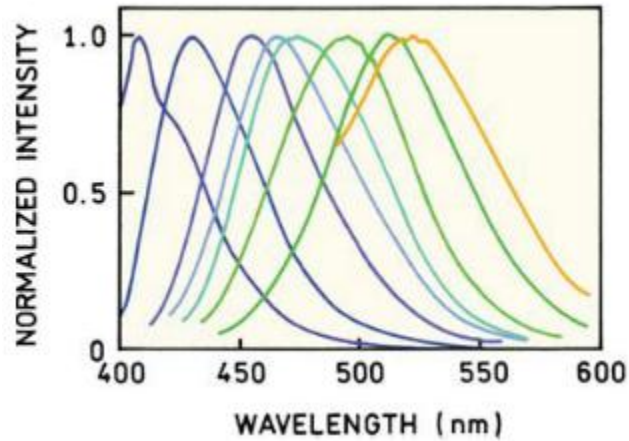
الشكل 22.6 مشتقات prodan



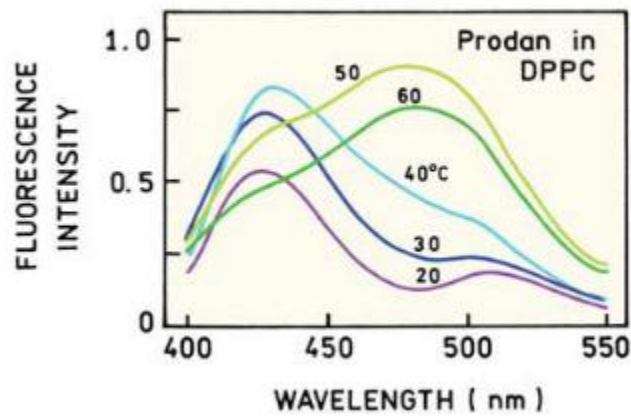
هذا المعامل عرف باسم الاستقطاب العام GP ويعطى على النحو التالي

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R} \quad (6.20)$$

حيث I_B و I_R هي الشدة المستقرة عند الطول الموجي الأقصر (B) الأزرق والطول الموجي الأطول R على التوالي.



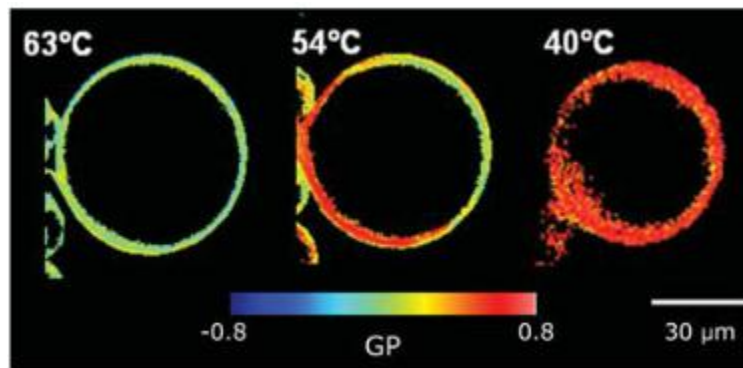
الشكل 23.6 طيف الانبعاث لـ prodan في مذيبات مختلفة. من اليسار إلى اليمين المذيبات هي methanol و isopropanol و DMSO و CH_3CN و CH_2Cl_2 و toluene و cyclohexane و CF_3CH_2COOH [47].



الشكل 24.6 طيف الانبعاث لـ prodan في حوصلات DPPC كدالة في درجة الحرارة [50].

تشكلت حويصلات giant unlamellar (GUVs) من خليط من DPPE و DPPC متصلة باسلاك من Pt لتثبيتهم في مكانهم. تم عنونة الحويصلات بمستشعر Laurdan. تمت عملية الإثارة باستخدام بواسطة فوتونين، والتي تم فيها التخلص من الفلوريسنت البعيد عن البؤرة. الشكل 25.6 يوضح صور لـ GP للحويصلات عن درجات حرارة مختلفة. عند درجة حرارة 40°C قيم GP مرتفعة (تقريبا 0.5) لان الأغشية في الحالة الصلبة مع انبعاث بشدة عالية عند الأطوال الموجية القصيرة. مع زيادة درجة الحرارة تناقص GP واصبح قيمة سالبة بسبب زيادة الشدة عند الأطوال الموجية الطويلة.

في الشكل 25.6 حالة الطور وقيم GP هي قيم ثابتة في كل GUV. على كل حال يتوقع في الأغشية الحقيقية ان تكون اقل تجانسا لتعطي نطاقات اما في الحالة السائلة أو الحالة الصلبة. حساسية Laurdan لطور الأغشية يسمح باستخدامه لتصوير النطاقات للخلايا الحية.



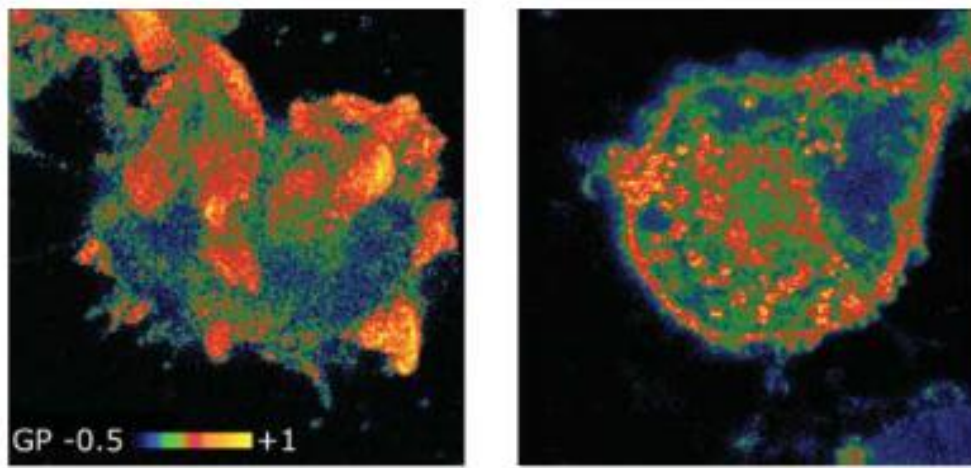
الشكل 25.6 الاستقطاب العام لـ Laurdan في GUV من DPPE و DPPC بنسبة 7:3 موجة بواسطة إثارة بفوتونين عند طول موجي 780nm. تم قياس الشدة عند الأزرق والأحمر لحساب GP وتمت القياسات باستخدام فلتر باتساع 46nm مركز عند 446 و 499 nm على التوالي [53].

يوضح الشكل 26.6 صور لـ GP لـ fibroblasts أخذت من اعلى الخلية (اليسار) ومن منطقة الخلية المتصلة مع شريحة الزجاج (اليمين). هذه الصور توضح مناطق الـ GP المرتفعة. توضح هذه النتائج كيف يمكن استخدام تأثير القطبية في التصوير الخلية.

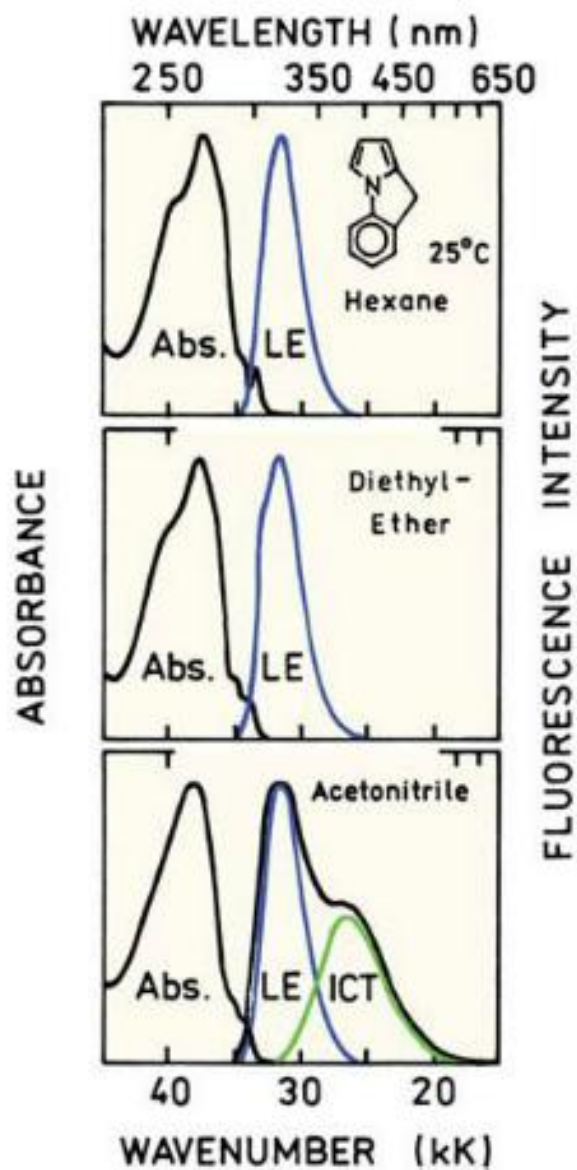
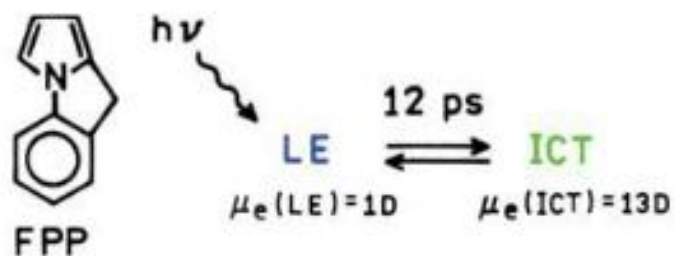
6.6 عوامل إضافية تؤثر على طيف الانبعاث

1.6.6 الإثارة الموضعية وحالات الانتقال الداخلي للشحنة

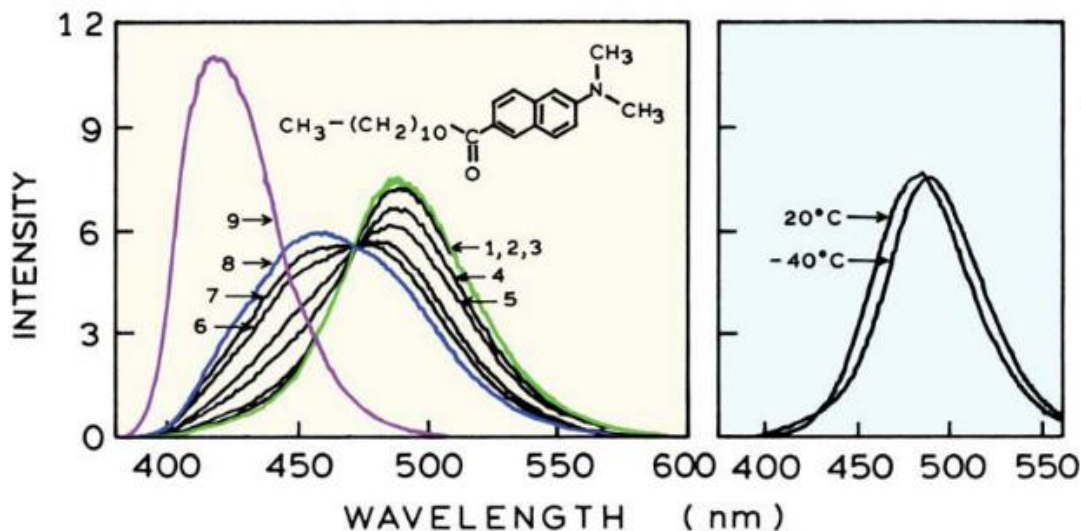
بالاعتماد على قطبية المذيب فان بعض الفلوروفورات يمكن ان تعطي انبعاث قبل أو بعد انفصال الشحنة. الشكل 27.6 يوضح مثال عن ذلك. المستوى المثار الابتدائي يعرف باسم مستوى الإثارة الموضعية. في المذيبات ذات القطبية المنخفضة FPP يكون الانبعاث عند أطوال موجية قصيرة من مستوى LE.



الشكل 26.6 الاستقطاب العام لـ Laurdan في fibroblasts. أخذت الصور من اعلى (اليسار) ومن الأسفل (اليمن) لشرح الزجاج [54].



الشكل 27.6 طيف الانبعاث لـ FPP في العديد من المذيبات [55].



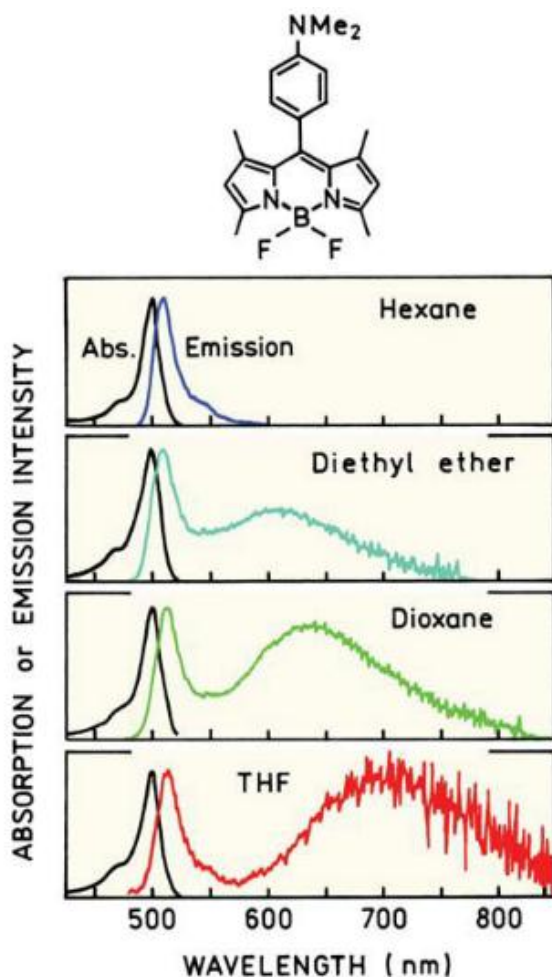
الشكل 28.6 طيف الانبعاث لـ Laurdan في ethanol عند 50°C (1) و 60°C (2) و 70°C (3) و 80°C (4) و 85°C (5) و 90°C (6) و 100°C (7) و 110°C (8) و 190°C (9) [56].

مع زيادة قطبية المذيب تظهر أطوال موجية أطول للانبعاث. هذه الانبعاثات عند أطوال موجية أطول (اللوحة السفلي) هي بسبب حالة الانتقال الداخلي للشحنة، والذي يتشكل بسرعة بعد الإثارة. في هذه الحالة النهائيين للفلوروفور مثبت بواسطة جسر من الميثيلين، بذلك فان تشكل حالة الانتقال الداخلي للشحنة (ICT) لا يعتمد على الالتواء. هناك عدد كبير من البحوث العلمية على التغيرات في مستوى الإثارة للفلوروفورات لتشكل حالة انتقال داخلي للشحنة ملتوية (TICT) في العديد من الجزيئات. يبدو ان هناك عدم اتفاق على الحاجة للالتواء. لتجنب ذكر رأي حول هذا الموضوع، فإننا نرجع إلى حالات مثل حالة ICT.

مثال اخر لانبعاث LE و ICT معطى بواسطة Laurdan [56]. جزء من انزياح الطيف الكبير موضح بواسطة Laurdan وهو بسبب الانبعاث من مستويات الإثارة الموضعية L، والتي تحدث بالقرب من 400nm ، كذلك من ICT عند طول موجي اكبر. إشارة إلى هذا السلوك موضحة في الشكل 20.6 (العلوي) عند درجة حرارة 30°C يظهر كتف عند جانب الطول الموجي الأقصر لانبعاث Patman. مثل هذه التغيرات في شكل الطيف غالبا ما تشير إلى وجود مستوى اخر. هذا الانبعاث الأزرق الجديد لوحظ بسهولة في الإيثانول عند درجات حرارة منخفضة (الشكل 28.6). مع تناقص درجة الحرارة ينزاح أقصى انبعاث

من 480 إلى 455nm. ومع تناقص درجة الحرارة لـ -190°C يظهر انبعاث جديد مع قمة بالقرب من 420nm.

بالرغم من ان استرخاء المذيب يحدث بشكل اسرع عند درجات الحرارة العالية الا ان درجة الحرارة العالية قد تمنع ترتيب اتجاه ثنائيات قطب المذيب.



الشكل 29.6 طيف الانبعاث لـ THF [67].

هذا التأثير لوحظ في Laurdan في الإيثانول عند درجة حرارة 20°C (الشكل 28.6 اليمين). طيف الانبعاث هذا مزاح ناحية الأزرق بالنسبة لطيف الانبعاث في الإيثانول عند درجة حرارة -40°C . بصفة عامة، فان



اكثر انزياح نحو الأحمر يحدث عند درجة حرارة يكون عندها المذيب في الحالة السائلة ليعمل على إعادة توجيه قبل انبعاث الفلوريسنت ولكن الطاقة الحرارية ليست كبيرة لتقوم بتشويه هذه الاتجاهات.

تم شرح وتوضيحي الطيف المعتمد على درجة الحرارة الموضح بـ Laurdan بوجود انبعاث من المستويات المثارة محليا (LE) ومن حالة الانتقال الداخلي للشحنة (ICT). في حالة LE تكون الإثارة محلية على حلقة naphthalene، وبالتالي يكون الجزيء غير قطبي. في حالة LE لا تكون مجموعات الامينو والكاربونيل جزء نظام الالكترونات الغير محلي. عند درجات حرارة اعلى تتشكل حالة ICT، بانتقال شحنة كامل من مجموعة الامينو إلى مجموعة الكاربونيل. بعض الباحثين افترض ان الالتواء لمجموعة dimethyl amino مطلوباً ليسمح لإلكترونات النيتروجين بان تقترب من حلقة naphthalene [57-58]. وعليه فان الانزياح الطيفي الكبير الذي يحدث بواسطة جزيئات تشبه prodan هو مفضل بعض الشيء. جزء من الانزياح من 420 إلى 455nm يكون بسبب تشكل حالة TICT. الانزياح المتبقي من 455 إلى 490 nm هو بسبب قابلية الاستقطاب Δf للمذيب. الـ prodan هو فقط مثال لعدد كبير من الجزيئات التي تعطي انبعاث ICT [59-66].

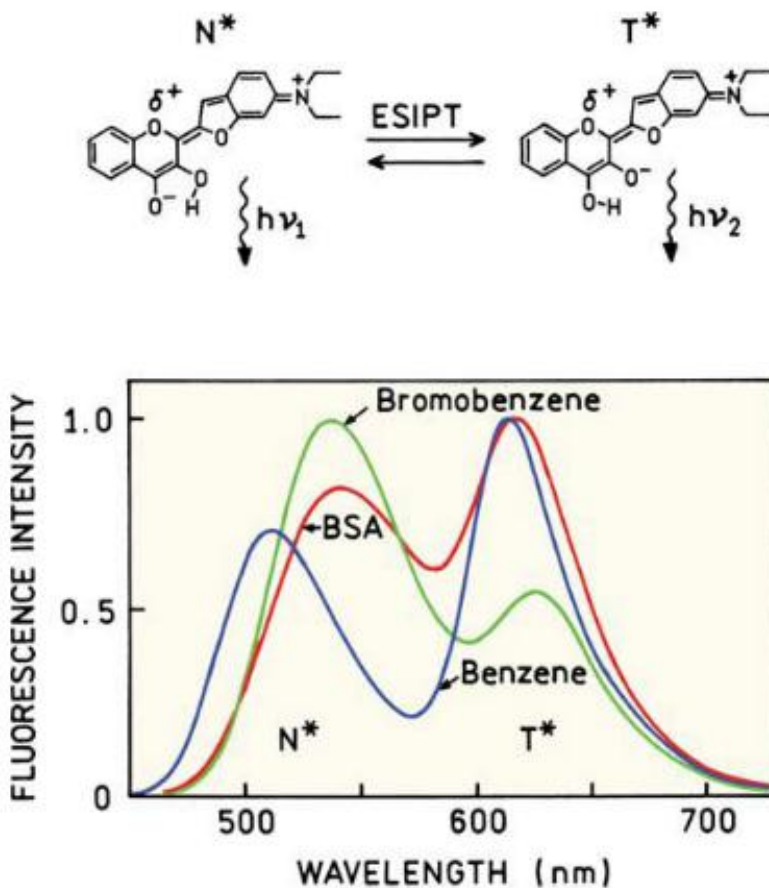
يمكن ان يحدث تشكل حالات ICT مع بعض تطورات حديثة للفلوروفورات. يوضح الشكل 29.6 طيف الانبعاث لفلوروفور Bodipy الذي استبدل بمجموعة dimethylamino [67]. في مذيب بقطبية منخفضة لوحظت فيه انبعاث Bodipy ضيق مع انزياح ستوكس صغير. في مذيبات بقطبية اكثر قليلاً لوحظ انبعاث جديد عند طول موجي أطول وهذا يعود الى حالة ICT. النقطة الهامة من هذه الأمثلة هو ان انزياح الطيف الناتج بسبب تشكل حالات ICT غير مشروح بمعادل Lippert. بدلا من القطبية فان ظهور انبعاث ICT يعتمد على خواص منح واستقبال الكترونات للمجموعات داخل او ملتصقة مع الفلوروفور.

2.6.6 انتقال بروتون بين الجزيئات في المستوى المثار (ESIPT)

يشير تشكل حالات ICT إلى ان توزيع الالكترونات يكون مختلف للفلوروفور في المستويات الأرضية أو المستويات المثارة. هذا ينتج عنه تغيرات في تأين مستوى الإثارة. مثال واحد على انتقال بروتون بين الجزيئات في المستوى المثار، والذي نشير له بـ ESIPT. هذا موضح في اعلى الشكل 30.6، للمستشعر

FA [70]. يوجد هذا المستشعر في الحالة العادية (N) أو كتمازمر (T) tautomer. تحدث عملية ESIPT بسرعة بسبب انتقال بروتون لبروتون مستقبل في لحظة الإثارة.

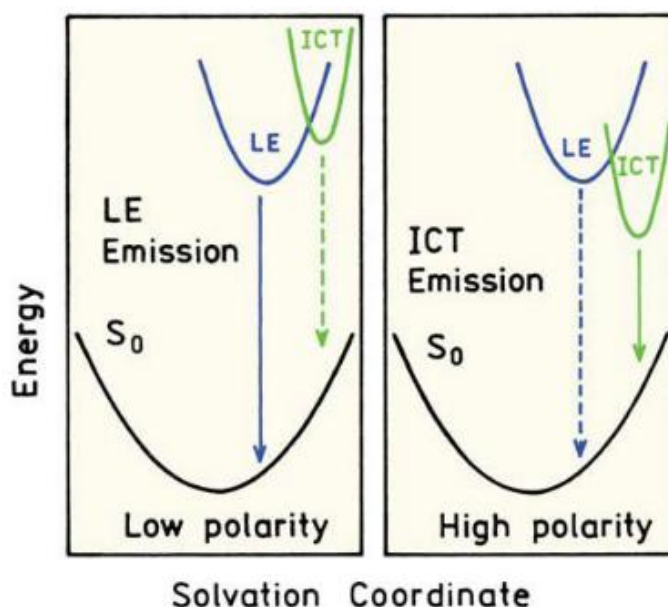
يوضح الشكل 30.6 طيف الانبعاث لـ FA عندما يتحلل الى مذيبين غير قطبيين وعندما يكون في محلول مائي ولكن مرتبط مع BSA. الانبعاث بالقرب من 525nm يكون بشكل N*، والانبعاث بالقرب من 625nm يكون في شكل T*. تعطي FA فلوريسنت ضعيف في الماء، ولكن يكون الفلوريسنت عالي عندما يرتبط مع BSA. يتوقع ان الشدة العالية وشدة مشابهة لانبعاث N* و T* تعتمد على الشحنة القطبية المحيطة بالفلوروفور، كذلك التعرض للطور المائي. يحدث ESIPT في الكثير من الفلوروفورات الأخرى [68-77].



الشكل 30.6 طيف الانبعاث لـ FA الذي يتعرض لـ ESIPT [70]

7.6 تأثيرات اللزوجة

يمكن للزوجة ان يكون لها تأثير كبير على شدة الانبعاث للفلوروفورات. ربما من افضل الأمثلة المعروفة هو trans-stilbene. تضمحل الشدة لـ *stibene* (الشكل 35.6) وتعتمد بشدة على درجة الحرارة [80]. فسر هذا التأثير على انه ناتج عن الدوران حول مركز ethylene ذو الرابطة المزدوجة في المستوى المثار (الشكل 36.6) [81-82]. في المستوى الأرضي يوجد حاجز طاقة كبير للدوران حول هذه الرابطة. حاجز الطاقة يكون اصغر كثيرا في المستوى المثار. يحدث الدوران حول الرابطة في خلال 70ns، مع وجود مسار عودة إلى المستوى الأرضي.

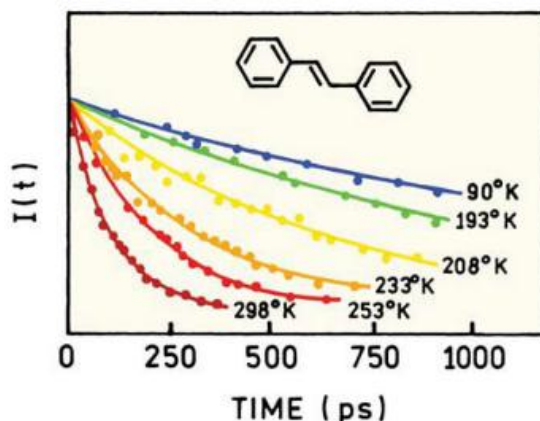


الشكل 34.6 تأثير قطبية المذيب على طاقات مستويات LE و ICT [79].

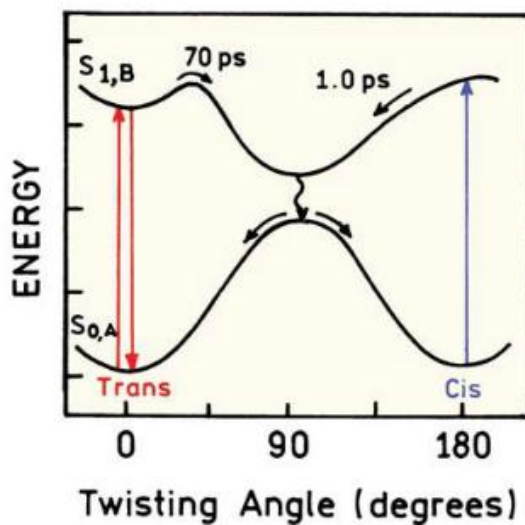
دوران cis-stilbene يكون اكثر سرعة مما ينتج عنه زمن فلوريسنت قصير جدا. يعتقد ان مثل هذا الدوران في مستوى الإثارة يؤثر على الانبعاث لعدد من الفلوروفورات الأخرى [83].

الزيادة في اللزوجة الموضوعية يساهم في زيادة الشدة بواسطة العديد من الفلوروفورات عندما ترتبط مع جزيئات بيولوجية. في الجزء الأول من هذا الكتاب ذكرنا ان مستشعر اللزوجة CCVJ، والذي يعطي زيادة

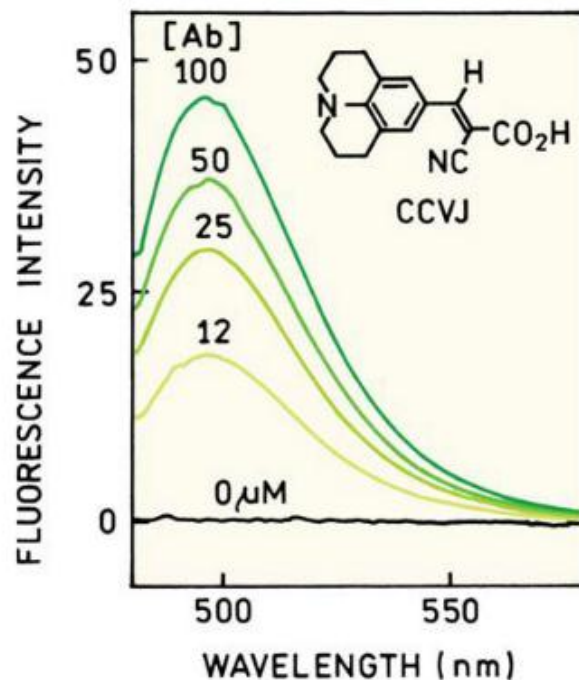
في الإنتاج الكوانتي مع زيادة اللزوجة. الشكل 37.6 يوضح شدة الانبعاث لهذا المستشعر عندما يرتبط مع مضاد حيوي مباشرة مقابل هذا المستشعر [84]. ارتباط CCVJ مع المضاد الحيوي يمنع الدوران حول رابطة ethylene ويعمل على زيادة الإنتاج الكوانتي.



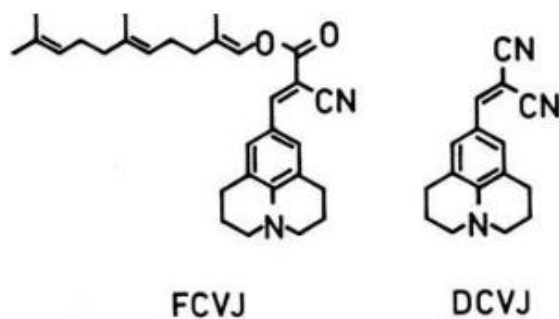
الشكل 35.6 اضمحلال الشدة لـ trans-stilbene في methylcyclohexane:isohectane (3:2) [80].



الشكل 36.6 مستوى مثار لتزامر stilbene [81].



الشكل 37.6 تأثير المضاد الحيوي CCVJ على انبعاث CCVJ. تركيز المضاد الحيوي موضح بوحدة μM . [84].



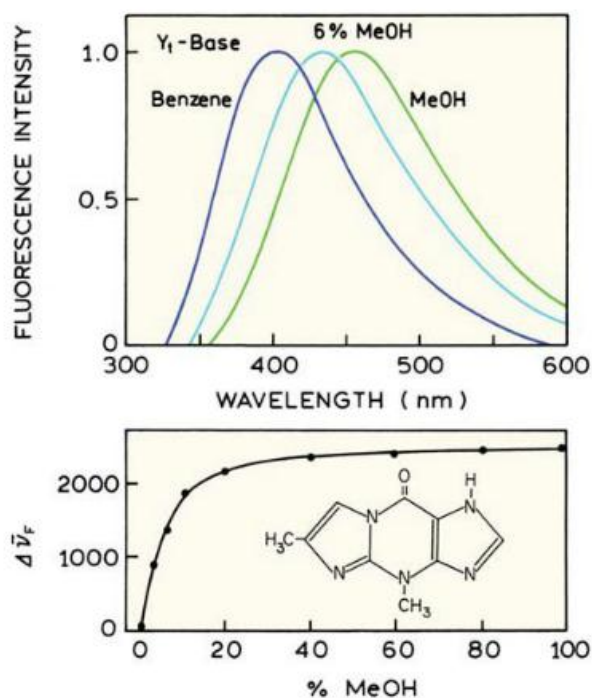
الشكل 38.6 التركيب الكيميائي لفلوروفورات حساسة للزوجة. سلسلة الكربون على اليسار هي مجموعة farnesol [86].

11.6 تأثيرات خلط المذيبات (موضوع متقدم)

في الجزء 3.6 قمنا بوصف ظاهرة تأثيرات المذيب الخاصة، بحيث ان كميات صغيرة من المذيب القطبي تنتج انزياحات كبيرة لطيف الانبعاث. وجود مثل هذه التأثيرات يقترح وجود توزيع للفلوروفورات كل واحدة مع مذيب مختلف

الجدول 3.6 الخواص الطيفية لمستشعرات مذيب حساسة

Probe ^a	λ_{abs} (nm) (ϵ , M ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_F (nm) in MeOH	λ_F (nm) in CHCl ₃	$\Delta\lambda_F$ (nm)
Dapoxyl SEDA	373 (28 000)	584	509	75 ^b
Dansyl EDA	335 (4600)	526	499	27
ADMAN	360 (15 000)	499	440	59
Prodan	361 (16 000)	498	440	58
1,8-ANS	372 (7800)	480	490	-10
2,6-ANS	319 (27 000)	422	410	12
7-Ethoxycoumarin	324 (11 000)	399	385	14 ^b



الشكل 50.6 طيف الانبعاث لـ Yt في البنزين والبنزين مع 6% ميثانول وميثانول. يوضح الشكل السفلي اعتماد انزياح الطيف على نسبة الميثانول في البنزين [105].



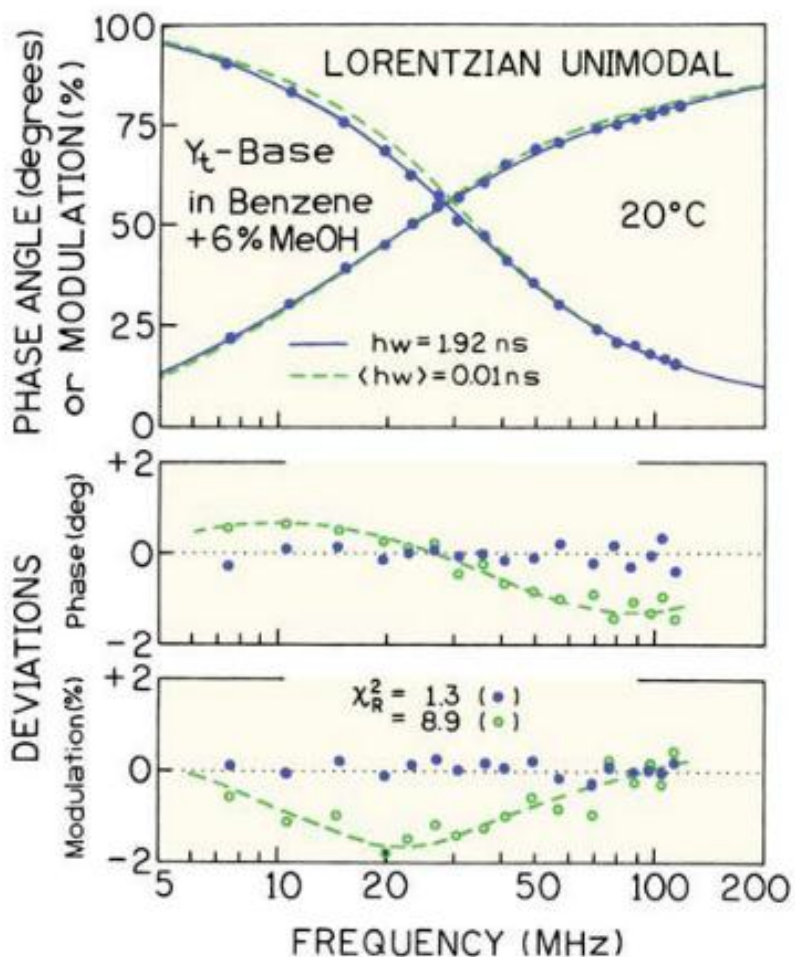
مثل هذه التوزيعات للبيئات يمكن ان يتسبب في اضمحلال مركب للشدة.

تأثير خليط المذيب على اضمحلال الشدة موضح بـ Y_t وهو حساس جدا لقطبية المذيب [103-105]. اقصى انبعاث لـ Y_t يزاح من 405nm في البنزين إلى 455nm في الميثانول (الشكل 50.6). إضافة 6% فقط من الميثانول والتي لا تغير كثيرا قابلية الاستقطاب Δf ينتج عنها إزاحة كبيرة لأقصى انبعاث إلى 430 nm. انزياح طيفي كبير لتغيرات صغيرة في تركيب المذيب تشير إلى تأثيرات المذيب الخاصة.

تزداد مخاليط المذيبات حالة طبيعية حيث يتوقع ان يكون اضمحلال الشدة معقد، او توزيع لفترة الزمن. اضمحلال الشدة لـ Y_t في البنزين النقي أو في الميثانول هو في الأغلب اضمحلال اسي أحادي (الجدول 4.6). على كل حال فترات الاضمحلال متخلفة في كل مذيب، وبذلك يمكن لاحد ان يتوقع اضمحلال اكثر تعقيدا في خليط البنزين والميثانول. في الحقيقة لوحظ اضمحلال شدة غير متجانس في البنزين مع 6% ميثانول اكثر من المذيب النقي. هذا يمكن رؤيته من خلال القيمة المتصاعدة لـ χ_R^2 لملائمة زمن الاضمحلال الأحادي لاضمحلال شدة Y_t مع 6% ميثانول (الجدول 4.6). استخدام النموذج الأسي المزدوج يقلل χ_R^2 من 8.9 إلى 1.2.

يمكن ملائمة اضمحلال الشدة لـ Y_t باستخدام نموذج زمن الاضمحلال المزدوج، ويبدو من غير المحتمل ان يكون هناك فقط زمنين للاضمحلال في خليط المذيب. لان خليط المذيب يعطي توزيع للبيئات للفلوروفورات، ويتوقع ان اضمحلال الشدة لها توزيع لفترة العمر. استجابة Y_t للتردد في خليط المذيب لا يمكن ملائمتها بزمن اضمحلال أحادي (الشكل 51.6). على كل حال البيانات أيضا يمكن ملائمتها لتوزيع فترة العمر (الشكل 52.6). في بنزين بنسبة 100% او ميثانول بنسبة 100% تضحل الشدة بتوزيع ضيق لفترة العمر، والتي هي في الأساس نفس زمن الاضمحلال الأحادي. في خليط البنزين والميثانول، يتطلب وجود توزيع واسع لفترة العمر لملائمة اضمحلال الشدة (الشكل 52.6). يتوقع ان تكون توزيعات فترة العمر لأي جزيئات ميكروية بحيث يوجد توزيع لبيئات الفلوروفورات.

من المهم ان نلام ظان قيم χ_R^2 هي نفسها للتغير الأسي المتعدد لملائمة توزيع فترة العمر لـ Y_t مع 6% ميثانول. هذا يشرح حالة التردد حيث ان نماذج مختلفة تنتج نفس الملائمة.



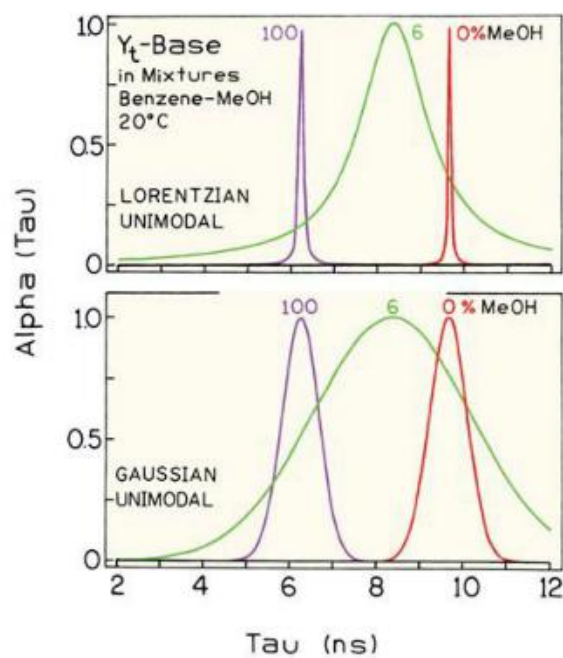
الشكل 51.6 علاقة التردد مع اضمحلال الشدة لـ Y_t في بنزين مع 6% ميثانول [103].

في مثل هذه الحالات يجب علينا ان نعتد على معلومات اخرى لاختيار النموذج الاكثر مناسبة. في مثل هذه الحالة نموذج توزيع فترة العمر يبدو انه المفضل لانه لا يوجد أي سبب لان نتوقع زمنين اضمحلال لا مثيل لهما في خليط المذيب.



الجدول 4.6 تحليل اسي متعدد لاضمحلال الشدة لـ Y_t في خليط من Benzene/Methanol

% Methanol	Number of decay times	τ_i (ns)	α_i	f_i	x_2^R
0		9.67	1.0	1.0	1.3
4	1	8.80	1.0	1.0	3.2
	2	3.67	0.061	0.026	1.2
6		9.10	0.939	0.974	
	1	8.36	1.0	1.0	8.9
	2	3.50	0.113	0.048	1.2
10		8.92	0.887	0.952	
	1	7.23	1.0	1.0	4.9
	2	2.99	0.082	0.034	1.0
100		7.56	0.918	0.966	
	1	6.25	1.0	1.0	1.9



الشكل 52.6 تحليل توزيع فترة الزمن لاضمحلال الشدة لـ Y_t في الميثانول النقي والبنزين النقي والبنزين مع 6% ميثانول [103].



12.6 خلاصة تأثيرات المذيب

وصف كمي لتأثيرات البيئة على طيف انبعاث الفلوريسنت هو من المحتمل ان يكون الموضوع الاكثر تحديا في مجال الطيف الفلوريسنت. لا توجد نظرية واحدة او نوع من التفاعلات يمكن ان يستخدم في كل الظروف. عدد من العوامل المؤثرة على الانبعاث تشمل:

1. تأثيرات المذيب العامة بسبب التفاعلات لثنائي القطب للفلوروفور مع البيئة المحيطة.
2. تأثيرات المذيب الخاصة بسبب تفاعلات الفلوروفور والمذيب.
3. يعتمد تشكل حالات ICT أو TICT على تركيب المستشعر والمذيب المحيط.
4. اللزوجة وتغيرات في معدل الاضمحلال المشع والغير مشع.
5. تفاعلات المستشعر والمستشعر.

حتى اذا وجد نوع واحد من التفاعلات فان التأثيرات لا تزال معقدة وتكون حدود معظم النماذج. على سبيل المثال معادلة Lippert هي مجرد تقريب وتهمل الحدود ذات الرتب العالية. كذلك هذه المعادلة تنطبق فقط على ثنائي القطب الكروي في التجويف الكروي. مطلوب صيغ اكثر تعقيدا لجزيئات الغير كروية، ولكن لا يمكن بصفة عامة وصف شكل الفلوروفور بتفاصيل كافية. فيما يتعلق بالتأثيرات الخاصة لا يوجد هناك نظرية عامة لتوقع الإزاحة في طيف الانبعاث بسبب تشكل الرابطة الهيدروجينية. وفي النهاية للفلوروفورات المرتبطة مع الجزيئات الميكروية أو المذيبات اللزجة فان استرخاء الطيف يحدث خلال الانبعاث، وبالتالي فان طيف الانبعاث يمثل نسبة لمتوسط الانبعاثات المسترخية والغير مسترخية.

مع كل هذه التعقيدات كيف يمكن ان نأمل ان نستخدم البيانات من مستشعرات المذيب الحساسة؟ في رأينا فان افضل وسيلة هو اعتبار تركيب الفلوروفور بدلا من الاعتماد بالكامل على نظرية. التأثيرات الملحوظة يجب ان تؤخذ بالاعتبار داخل اطار عمل التفاعلات المدرجة اعلاه. السلوك الغير عادي من الممكن ان يكون بسبب وجود اكثر من نوع من التفاعلات. استخدام النظرية كمساعد لتفسير التفاعلات الجزيئية المعقدة، وليست بديلا عن اعتبار دقيق لتركيب المستشعر وتفاعلاته الكيميائية المحتملة.



تمت الترجمة في المركز العلمي للترجمة

15-2-2012

www.trgma.com