اندازه‌گیری ناهمسانگردی تابش فلورسانس متیلن‌بلو

زینب ملازهی[۱]، محمد شجاعی[۲]

[۱] دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، ماهان، کرمان

[۲] دانشکده فیزیک، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان

چکیده – ناهمسانگردی فلورسانس بیانگر قطبش گسیل فلورسانس در فضاست. این کمیت حاوی اطلاعات مفیدی در رابطه با ساختار و دینامیک مولکول و برهمکنش آن با مولکول‌های محیط جانبی است. در کار تجربی حاضر مقدار این کمیت برای ترکیب شیمیایی متیلن‌بلو اندازه‌گیری شده است. دو مورد از کاربردهای مهم این دارو یعنی استفاده از آن به عنوان حساسگر نوری در درمان‌های فوتودینامیکی و دیگری رنگ‌آمیزی تشخیصی سلول و بافت به برهمکنش آن با نور مرتبط است که باعث می‌شود ویژگی‌های نوری متیلن‌بلو اهمیت نظری و عملی پیدا کند. با طراحی و ساخت یک چیدمان اپتیکی، مقدار ناهمسانگردی متیلن‌بلو در دو حلال مختلف با چسبندگی متفاوت بدست آمد. علاوه بر این وابستگی ناهمسانگردی متیلن بلو به طول‌موج تحریک نیز اندازه‌گیری شد.

کلید واژه- حساسگر نوری، قطبش نور، متیلن‌بلو، ناهمسانگردی فلورسانس

Fluorescence anisotropy of Methylene blue

Zeinab Mollazehi 1 and Mohammad Shojaei 2

[1] Graduate university of advanced technology, Mahan, Kerman

[2] Shahid Bahonar university of Kerman, Kerman

Abstract- Fluorescence anisotropy is a measure of the polarization of fluorescence radiation of the molecule. This quantity provides valuable information on the structure and dynamics of the molecule and the effect of its surrounding environment. In this work, fluorescence anisotropy of methylene blue has been measured. Methylene blue is considered as a drug, as a photosensitizer and as a dye for staining cells and tissues. Two latter applications involve the interaction with light, so optical properties of the methylene blue including its emission anisotropy find theoretical and experimental significance. An optical setup was designed and implemented. The anisotropy of methylene blue in two different solvents with different viscosities was measured. The excitation wavelength dependency was investigated, too.

Keywords: Fluorescence anisotropy, Light polarization, Methylene blue, Photosensitizer

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-01]

۱- مقدمه

ناهمسانگردی فلورسانس بیانگر جهت‌مندیِ میدان الکتریکی تابش فلورسانس است که بصورت قطبش آن ظاهر می‌شود. این ویژگی ممکن است از قطبش نور تحریک به ارث رسیده باشد و یا از ویژگی‌های جهتی مولکول گسیلندهٔ تابش ناشی شود. بررسی این کمیت اطلاعات مفیدی در رابطه با ساختار و دینامیک مولکول به‌دست خواهد داد. قطبش تابش فلورسانس معمولاً بصورت اختلاف نسبی مؤلفه‌های عمود و موازی میدان الکتریکی بیان می‌شود که میزان قطبش را درصفحهٔ عمود بر جهت انتشار بیان می‌کند. اما کمیت ناهمسانگردی، قطبش آن را در کل فضا نشان می‌دهد و بصورت

$$r = \frac{I_{II} - I_{\perp}}{I_{II} + 2I_{\perp}} \qquad (۱)$$

تعریف می‌شود. در این رابطه I_{II} شدت نور خروجی در حالتی است که قطبشگر و تحلیلگر هر دو در حالت عمودی باشند و $I_{\perp}$ شدت نور خروجی مربوط به حالت قطبشگر عمودی و تحلیلگر افقی است [1]. ناهمسانگردی فلورسانسی درعدم حضور عوامل واقطبشی، ناهمسانگردی فلورسانسی پایه (r_0) نام دارد که ناشی از گزینش نوری و زاویهٔ ذاتی بین ممان دوقطبی‌های جذب و گسیل است [2]. بازتاب، پراکندگی، پخش چرخشی و انتقالات انرژی غیرتابشی از جمله عوامل مؤثر بر ناهمسانگردی هستند. زمانی که آهنگ چرخش مولکول، آهسته‌تر از آهنگ گسیل فلورسانس باشد پخش چرخشی باعث واقطبش ناچیزی می‌شود. برای کم‌کردن اثر پخش چرخشی در اندازه‌گیری ناهمسانگردی از منجمد کردن محلول یا افزایش چسبندگی حلال استفاده می‌شود [1 و 2].

از سویی در مواد نوردستگونه، جفت ایزومرهای دستگونه با وجود خواص فیزیکی و شیمیایی مشابه تنها در برهمکنش با نور قطبیده خواص متفاوتی را نشان می‌دهند [3]. بنا بر این مطالعهٔ ناهمسانگردی فلورسانس این مواد می‌تواند کاربردهای نظری و عملی بسیاری داشته باشد. بعلاوه بررسی ناهمسانگردی فلورسانسی می‌تواند در تعیین اندازه و شکل پروتئین‌ها یا اندازه‌گیری حجم ظاهری، صلبیت محیط‌های مولکولی مختلف، ارتباط بین پروتئینی، تعیین چسبندگی غشاها و سنجش ایمنی بسیاری از مواد مفید واقع شود [2 و 4].

متیلن بلو یا متیل تیوتینیوم کلراید ترکیبی شیمیایی است که عمدتاً به عنوان دارو در درمان بیماری‌هایی چون مت‌هموگلوبینمی و به عنوان پادزهر مسمومیت‌های سیانیدی استفاده می‌شود[6,5]. این ترکیب در درمان‌های فوتودینامیکی یکی از حساسگرهای نوری متداول است [8,7]. علاوه بر این در رنگ‌آمیزی تشخیصی سلول و بافت نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد[8]. نحوهٔ رفتار نوری متیلن بلو بخصوص در دو حوزهٔ اخیر مهم است. به همین دلیل بررسی ویژگی‌های جذب و گسیل این ماده مورد توجه است. اثر دما، حلال، مواد فعال سطحی و پیوند با ماکرومولکول‌ها بر طیف جذب وگسیل و نیز تأثیر آنها بر ناهمسانگردی فلورسانس از آن جمله است [9].

بر این اساس چیدمانی اپتیکی به منظور اندازه‌گیری ناهمسانگردی فلورسانس متیلن بلو طراحی و پیاده‌سازی شد. در این چیدمان سعی شد از ساختاری ساده و قابل دسترس استفاده شود.

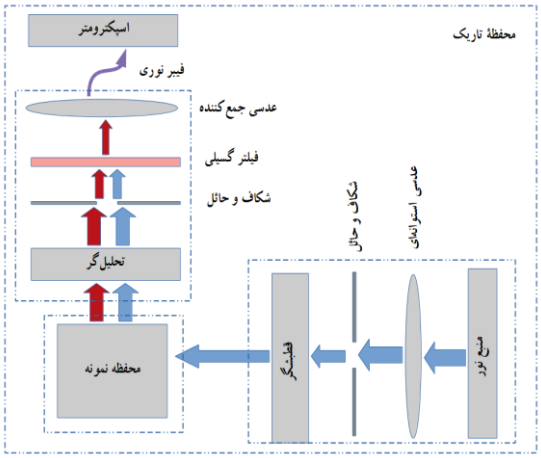
۲- چیدمان

طرحوارهٔ چیدمان اندازه‌گیری ناهمسانگردی فلورسانس در شکل ۱ نشان داده شده است. از لیزرهای دیودی و دیودهای گسیلندهٔ نور (LED) به عنوان منبع استفاده شد که با توجه به تکفامی نسبی و مزیت‌هایLED از ترکیب دیودهای گسیلندهٔ نور (رنگ‌های بنفش، آبی، سبز، کهربایی و قرمز) در طرح نهایی استفاده شد که تقریباً کل طیف مرئی را پوشش می‌دهند و امکان بررسی وابستگی طول‌موجی را فراهم می‌کرد. بدلیل پهنای باند طیفی کوچک LEDها نیازی به تکفام‌کننده نبود. عدسی استوانه‌ای و شکاف و حائل‌ها، توزیع نور مناسب را برای تابش تحریک بر کووت محتوی محلول تولید می‌کرد.

حالت قطبش نور تحریک توسط قطبشگر دورنگی تعیین می‌شد. این قطبشگر درست قبل از ورود به محفظه قرار داده شده بود تا اثر واقطبش نور توسط قطعات دیگر حذف شود. بدلیل تغییر قطبش نور در عبور از دیواره‌های کووت‌های پلاستیکی، از نمونه‌های شیشه‌ای و کوارتز بی‌شکل استفاده شد که اندازه‌گیری‌ها نشان می‌داد در

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-01]



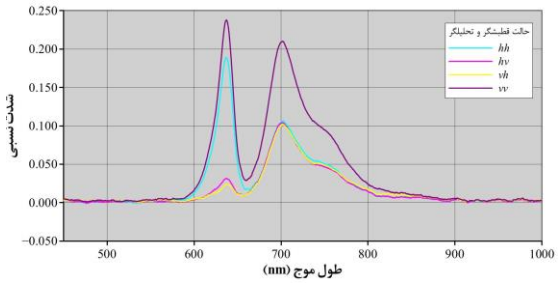
شکل ۱: طرحوارهٔ چیدمان اندازه‌گیری ناهمسانگردی فلورسانس

حالت قطبش تغییری ایجاد نمی‌کنند. تابش فلورسانس در بازوی عمود بر جهت تابش (چیدمان موسوم به چارچوب L) اندازه‌گیری شد. نور تابشی بلافاصله پس از خروج از محفظه از تحلیل‌گر در حالت قطبش معین عبور و سپس از فیلتر نوری که طیف تحریک را حذف می‌کرد رد می‌شد. یک جمع‌کننده نور را بر روی آشکار ساز که فوتودیود و یا ورودی فیبر نوری برای اتصال به طیف‌نگار بود، متمرکز می‌کرد. بدلیل تکفامی منابع و فاصلهٔ مناسب بین طیف تحریک و تابش متیلن بلو، غالباً طیف گسیل براحتی ازطیف تحریک قابل تفکیک بود.

از نظر اپتومکانیکی، برای حذف نورهای سرگردان و بخصوص بازتابی که می‌توانست اندازه‌گیری‌های قطبش را مختل کند هر عنصر در داخل جعبه‌های کوچک سیاه‌رنگی قرار گرفت. شکاف‌ها و حایل‌های روی این محفظه‌ها ورود نورهای سرگردان و بازتابی را محدود می‌کرد. محفظه‌ای برای نگه‌داری نمونه طراحی و ساخته شد. نگه‌دارنده‌های قطبشگر و تحلیلگر قابلیت تنظیم زاویه را نسبت به خط عمود بر محور چیدمان فراهم می‌کردند. با توجه به لزوم تعویض منابع، فیلترها، قطبشگرها و محفظهٔ نمونه قالب‌هایی تعبیه شد که ایجاد پایداری مکانیکی عناصر و قابلیت تکرار وضعیت فضایی آن‌ها را فراهم می‌کرد. کل سیستم در یک محفظهٔ ثانویه قرار داده شد تا اثرات نور محیط حذف گردد. برای کاهش خطا، سیستم بصورت فشرده با حداقل فاصله بین اجزا ساخته شد بنحوی که ابعاد هر یک از بازوها از چند سانتی‌متر تجاوز نمی‌کرد.

۳- نتایج

محلول متیلن‌بلو در دو حلال اتانول و گلیسیرین در طول‌موج‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که ناهمسانگردی تنها به نسبت شدت‌ها ربط دارد و مستقل از شدت کلی نور و متعاقباً غلظت است، غلظتی انتخاب شد که در آن بهینهٔ تابش فلورسانس بدست آید. در شکل ۲ طیف تحریک و فلورسانس متیلن‌بلو در گلیسیرین نشان داده شده است. این طیف دو باند گسیلی اصلی در 700nm و 740nm را نشان می‌دهد.



شکل ۲: طیف تحریک و گسیل متیلن‌بلو در گلیسیرین (طول‌موج تحریک ۶۳۰nm) بازای زوایای افقی و عمودی قطبشگر و تحلیلگر

برای اندازه‌گیری ناهمسانگردی، شدت باند گسیلی در چهار حالت قطبشی در نظر گرفته شد: I_{HH} شدت بازای قطبشگر و تحلیل‌گر افقی، I_{HV} شدت بازای قطبشگر افقی و تحلیل‌گر عمودی، I_{VH} شدت بازای قطبشگر عمودی و تحلیل‌گر افقی و I_{VV} شدت بازای تحلیل‌گر و قطبشگر عمودی (شکل ۲). مقدار ناهمسانگردی از رابطهٔ

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \qquad (۲)$$

بدست می‌آید که در آن $G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$ میزان عدم یکنواختی حساسیت آشکارساز به قطبش را نشان می‌دهد. مقادیر فوق بازای طول‌موج‌های مختلف تحریک در دو حلال اندازه‌گیری شده و مقدار ناهمسانگردی محاسبه گردید. نتایج در جدول ۱ درج شده است. مقادیر ناهمسانگردی در حلال گلیسیرین بدلیل چسبندگی بالا و کاهش پخش چرخشی به مقدار ناهمسانگردی پایه (r_0) نزدیکتر هستند.

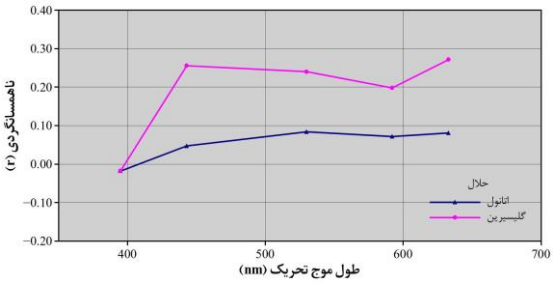
این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-01]

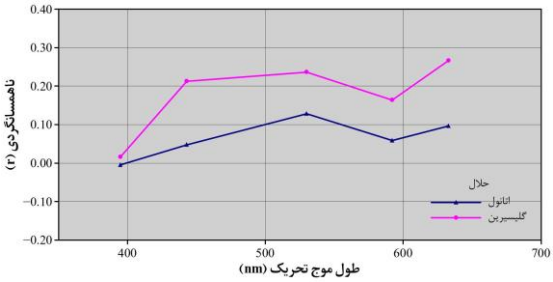
جدول۱: مقادیر اندازه‌گیری شدهٔ ناهمسانگردی فلورسانس متیلن‌بلو

طول موج (nm)	در حلال اتانول		در حلال گلیسیرین	
	باند ۱	باند ۲	باند ۱	باند ۲
۳۹۵	-۰,۰۱۸	-۰,۰۰۵	-۰,۰۱۸	۰,۰۱۶
۴۵۰	۰,۰۴۷	۰,۰۴۷	۰,۲۵۶	۰,۲۱۳
۵۳۰	۰,۰۸۴	۰,۱۲۸	۰,۲۴۰	۰,۲۳۶
۵۹۲	۰,۰۷۲	۰,۰۵۸	۰,۱۹۷	۰,۱۶۴
۶۳۳	۰,۰۸۱	۰,۰۹۷	۰,۲۱۵	۰,۲۶۷

نحوهٔ تغییر مقدار ناهمسانگردی با طول موج تحریک بازای دو باند مختلف تابش فلورسانس بترتیب در شکل‌های ۳ و ۴ دیده می شود.



شکل ۳: ناهمسانگردی متیلن‌بلو بر حسب طول‌موج تحریک در باند فلورسانس ۷۰۰nm



شکل ۴: ناهمسانگردی متیلن‌بلو بر حسب طول‌موج تحریک در باند فلورسانس ۷۴۰nm

۴- نتیجه‌گیری

ناهمسانگردی فلورسانسی متیلن‌بلو در دو حلال با چسبندگی متفاوت برای دو باند گسیلی ۷۰۰ و ۷۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. وابستگی مقدار ناهمسانگردی به طول‌موج تحریک بدست آمد.

ممان دوقطبی گذار جذب با تغییر طول‌موج تحریک تغییر می‌کند. بنابراین زاویهٔ بین ممان دوقطبی‌های جذب و گسیل تغییر می‌کند. اگر طول‌موج‌های تحریک و گسیل به هم نزدیکتر باشند، ممان دوقطبی‌های گذار جذب و گسیل هم‌جهت‌تر خواهند بود و در نتیجه مقدار r_0 بزرگتر می‌شود. با افزایش فاصلهٔ طول‌موج تحریک و طول‌موج گسیل، ناهمسانگردی کاهش می‌یابد، بطوری که در ۳۹۵nm کمترین مقدار خود را پیدا می کند.

ناهمسانگردی فلورسانسی متیلن بلو با افزایش چسبندگی حلال، افزایش یافته است. دلیل این امر را می‌توان در آن دید که ممان‌دوقطبی گذار گسیل با وجود عوامل واقطبشی از جمله پخش چرخشی قبل از فلورسانس جابه‌جا می‌شود و هر چه میزان چرخش بیشتر باشد زاویه بزرگتر و ناهمسانگردی (r) کمتر خواهد شد. با افزایش چسبندگی حلال، میزان چرخش مولکول در طی زمان گذار کمتر و در نتیجه ناهمسانگردی بزرگتر می‌شود. این مقدار به ناهمسانگردی پایه نزدیکتر است.

مراجع

[1] JR. Lakowicz, *"Principles of fluorescence spectroscopy"*, p. 954, Springer, New York, 2006.

[2] D. M. Jameson, J. A. Ross, "*Fluorescence polarization/anisotropy in diagnostics and imaging*," vol. 110, no. 5, pp. 2685–2708, *Chemical reviews*, 2010.

[3] M. Dierksen, S. Grimme, *"A theoretical study of the chiroptical properties of molecules with isotopically engendered chirality"*, vol. 124, no. 17, p. 174301, *Journal of chemical physics*, 2006.

[4] D. Lidke, P. Nagy, B. Barisas, R. Heintzmann, J. Post, K. Lidke, A. Clayton, D. Arndt-Jovin, and T. Jovin, "*Imaging molecular interactions in cells by dynamic and static fluorescence anisotropy (rflim and emfret)*", vol. 31, no. 5, pp. 1020–1027, *Biochemical society transactions*, 2003.

[5] "Methylene blue Uses, Side Effects & Warnings," *Drugs.com*. [Online]. Available: https://www.drugs.com /mtm/methylene-blue-oral-and-injection.html. [Accessed: 27-Nov-2017].

[6] P. R. Ginimuge and S. D. Jyothi, "Methylene Blue: Revisited," *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, vol. 26, no. 4, pp. 517–520, 2010.

[7] J. P. Tardivo *et al.*, "Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 2, no. 3, pp. 175–191, 2005.

[8] M. Wainwright, *Photosensitisers in biomedicine*. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009.

[9] S. E. Jayaraj, M. Umadevi, and V. Rama krishnan, "Environmental Effect on the Laser-Excited Fluorescence Spectra of Methylene Blue and Methylene Green Dyes," *Journal of Inclusion Phenomena*, vol. 40, no. 3, pp. 203–206, 2001.

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-01]