"ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ LASERS ΣΤΗ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ"

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ

Φασματοσκοπία του laser επαγόμενου φθορισμού (Laser Induced Fluorescence, LIF)

1. Σκοπός

Ο σκοπός της προτεινόμενης άσκησης είναι η εξοικείωση των φοιτητών με μια διαγνωστική εφαρμογή των laser και συγκεκριμένα τη φασματοσκοπία του laser επαγόμενου φθορισμού (Laser Induced Fluorescence, LIF). Η φασματοσκοπική αυτή μέθοδος προϋποθέτει επίδραση ακτινοβολίας laser σε υλικά - στόχους, διέγερση λόγω απορρόφησης και εκπομπή ακτινοβολίας φθορισμού διαφόρων χρωμοφόρων ουσιών, λήψη και επεξεργασία των φασμάτων.

Η μέθοδος LIF χρησιμοποιείται σε διάφορους τομείς, όπως για παράδειγμα: (α) στη βιοϊατρική έρευνα και κλινική πράξη για να ανιχνεύσει παθολογικές δομές σε *in vivo* διάγνωση καρκίνου ή αθηροσκληρωτικής πλάκας, αλλά και στη δοσιμετρία σε φωτοδυναμική θεραπεία,

(β) στην ανίχνευση ρυπαντών στο υδάτινο περιβάλλον,

(γ) στην έρευνα σε θέματα πολιτιστικής κληρονομιάς.

Η πειραματική διάταξη περιλαμβάνει μια πηγή εκπεμπόμενου φωτός (λυχνία ή συνηθέστερα ένα laser διέγερσης), φακούς ή/και οπτικές ίνες για τη μετάδοση, εστίαση και συλλογή του φωτός laser πάνω στο δείγμα, τη θέση του δείγματος, έναν ευαίσθητο ανιχνευτή (ένα φασματογράφο με συστοιχία φωτοδιόδων ή φασματόμετρο) και ηλεκτρονικό υπολογιστή για την καταγραφή, εμφάνιση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τη χρήση κατάλληλου προγράμματος. Η ένταση του σήματος φθορισμού καταγράφεται σε μια σειρά μηκών κύματος, από τα όρια του υπεριώδους έως τα 900 nm συνήθως, και δίνεται με τη μορφή φάσματος, σε συνθήκες πραγματικού χρόνου.

Η επεξεργασία των φασμάτων οδηγεί στη διάκριση του κανονικού από τον παθολογικό ιστό ή στην ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης κάποιου συστατικού. Έτσι, για παράδειγμα, για τον εντοπισμό τυχόν μόλυνσης σε νερά θαλασσών και λιμνών, γίνονται μετρήσεις και καταγραφή των φασμάτων φθορισμού γνωστών ρυπαντών, όπως: παράγωγα της διύλισης του πετρελαίου, άλλα έλαια (μαγειρικό λάδι, ορυκτέλαια κ.λ.π.), λιπάσματα, οργανική ύλη σε αποσύνθεση και χλωροφύλλη (κύριο συστατικό στο φυτοπλαγκτό), καθώς και άλλες ουσίες που διαλύονται στο νερό, επιπλέουν ή κατακάθονται στον πυθμένα και προέρχονται κυρίως από ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Η σύγκρισή τους με το φάσμα φθορισμού δείγματος νερού σε επιτόπια μέτρηση θα δώσει στοιχεία για τυχόν περιεκτικότητα του δείγματος σε κάποιον ή κάποιους από τους παραπάνω ρυπαντές, χωρίς να χρειάζεται να μεταφερθεί το δείγμα σε εργαστήριο.

Η ανίχνευση ορισμένων μορίων με τη φασματοσκοπία του laser επαγόμενου φθορισμού μπορεί να επεκταθεί και σε άλλες περιβαλλοντικές εφαρμογές, όπως π.χ. οπουδήποτε υπάρχει χλωροφύλλη (ελαιόλαδο, φύλλα, φυτοπλαγκτόν κ.α.), αυτή μπορεί να μετρηθεί από τον εκπεμπόμενο φθορισμό της ενώ με βάση τον φθορισμό της χλωροφύλλης είναι εφικτή η μέτρηση της φωτοσύνθεσης στα φυτά.



Σχήμα 1. Φάσμα απορρόφησης και φθορισμού της χλωροφύλλης-α.

2. Πειραματική διάταξη

2.1. Συνοπτικά

Η πειραματική διάταξη για μετρήσεις φασματοσκοπίας φθορισμού, επαγόμενου από ακτινοβολία laser (Laser Induced Fluorescence - LIF), αποτελείται από: α) μία λυχνία Xenon, η οποία λειτουργεί ως πηγή φωτός διέγερσης, β) από ένα σύστημα ανίχνευσης που περιλαμβάνει το φασματόμετρο USB4000 της Ocean Optics και έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή για τη λήψη και εμφάνιση των αποτελεσμάτων με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού (SpectraSuite της Ocean Optics), γ) μια βάση για την τοποθέτηση του δείγματος και δ) δύο οπτικές ίνες για τη μετάδοση και εστίαση του φωτός διέγερσης πάνω στο δείγμα, καθώς και τη συλλογή του εκπεμπόμενου φθορισμού από το δείγμα. Εναλλακτικά, για λήψη του εκπεμπόμενου φθορισμού σε δείγματα με μικρές συγκεντρώσεις φθοροφόρων συστατικών, η λυχνία Xenon αντικαθίσταται από πηγή laser για την ακτινοβολία διέγερσης. Σε κάθε μέτρηση συλλέγεται το φάσμα φθορισμού, το οποίο εμφανίζεται στην οθόνη και αποθηκεύεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος στη συνέχεια χρησιμοποιείται για την επεξεργασία του σήματος που καταγράφεται.



Σχήμα 2. Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταζης (Σχέδιο: Μ. Χριστοφάκη, Διπλωματική εργασία, ΣΕΜΦΕ, 2011).

2.2. Τα μέρη της διάταξης

Τα επί μέρους όργανα που αποτελούν την πειραματική διάταξη, όσον αφορά τον laser - επαγόμενο φθορισμό, είναι τα εξής:

2.2α) Πηγή Φωτός

1. Ως πηγή φωτός διέγερσης θα χρησιμοποιηθεί η παλμική πηγή φωτός PX-2 (λυχνία xenon), που δίνει φως και στο UV τμήμα του φάσματος (220-750 nm).

Η λυχνία PX -2 έχει τη δυνατότητα να συνδεθεί με το φασματόμετρο μέσω μιας οπτικής ίνας (ίνα διάδοσης, με κατάλληλη διάμετρο, η οποία «φωτίζει» το δείγμα). Στη συνέχεια μία άλλη οπτική ίνα (ίνα συλλογής) σε πολύ μικρή γωνία από την πρώτη συλλέγει το εκπεμπόμενο φως φθορισμού από το δείγμα και το μεταφέρει στη σχισμή του φασματόμετρου.

Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθούν δύο θετικοί φακοί για την καθοδήγηση της δέσμης laser προς το δείγμα αλλά και για τη συλλογή του φθορισμού από αυτό και την εστίαση του στην είσοδο του φασματογράφου. Η επιλογή της λυχνίας για διέγερση εξασφαλίζει τη φορητότητα της όλης διάταξης, σε συνδυασμό με το επιλεγμένο φασματόμετρο.



Σχήμα 3. Παλμική πηγή φωτός PX-2 (λυχνία xenon) και χαρακτηριστικό φάσμα εκπομπής της λυχνίας.

2. Σε ορισμένα πειράματα, ως πηγή φωτός διέγερσης θα χρησιμοποιηθεί η 4^η αρμονική ενός παλμικού Nd:YAG laser (λ=266 nm).

2.2β) Φασματόμετρο



Σχήμα 4. Το φασματόμετρο USB4000 της Ocean Optics.

Το φασματόμετρο δέχεται ένα οπτικό σήμα και στην έξοδο δίνει μία φασματική περιοχή ορισμένου εύρους, σε αντίθεση με τη στενή φασματική γραμμή που δίνει ένας μονοχρωμάτορας. Εδώ χρησιμοποιούμε ένα φασματόμετρο οπτικών ινών και μικρών διαστάσεων, το οποίο έχει ευρεία φασματική περιοχή λειτουργίας (UV-IR) και συγκεκριμένα ένα εύρος 200-1100 nm (USB4000 της Ocean Optics). Αποτελείται από μια γραμμική συστοιχία CCD (charge-coupled device) Toshiba, 3648 στοιχείων, που σκοπό έχουν την αύξηση του σήματος σε σχέση με το θόρυβο. Επιπλέον, έχει ενισχυμένη ηλεκτρονική δομή για τον έλεγχο του φασματόμετρου και των εξαρτημάτων του και συνδέεται με έναν υπολογιστή μέσω 2.0 USB 480Mbps (υψηλή ταχύτητα) και 12Mbps (πλήρης ταχύτητα) ή RS-232 USB.

2.2γ) Οπτικές ίνες

Οι οπτικές ίνες χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση του συντελεστή διάχυτης ανάκλασης από μια επιφάνεια, καθώς και του σκεδαζόμενου φωτός ή του εκπεμπόμενου φθορισμού από τα δείγματα. Ο εφαρμογέας οπτικών ινών που χρησιμοποιείται εδώ είναι τύπου διχάλας.

Οι οπτικές ίνες UV -UV-VIS ή οι VIS-VIS-NIR χρησιμοποιούνται για τα αντίστοιχα μήκη κύματος: UV/ VIS (250-800 nm) και VIS/ NIR (400-2100 nm), ή έναν συνδυασμό και των δύο. Και οι δύο κατηγορίες έχουν πολλές επιλογές, οι οποίες περιλαμβάνουν την επιλογή υλικού (ανοξείδωτος χάλυβας ή πλαστικό) και σχεδίου παραθύρων ελέγχων (τυποποιημένο ή μη στους 30° C).

Οι οπτικές ίνες R400-7, R200-7 και οι R600-7 αποτελούνται από μια δεσμίδα 7 οπτικών ινών με περίβλημα ανοξείδωτου χάλυβα, όπου οι 6 ίνες βρίσκονται γύρω από την έβδομη ίνα. Η μια δέσμη από αυτές χρησιμοποιείται για τον φωτισμό του δείγματος, αφού το άλλο άκρο της συνδέεται με τη φωτεινή πηγή. Οι υπόλοιπες έξι ανιγνεύουν το ανακλώμενο φως από το δείγμα και το επιστρέφουν στο φασματόμετρο με το οποίο είναι συνδεδεμένες. Οι ίνες R200-7 έχουν διάμετρο 200 μm, οι ίνες R400-7 έχουν διάμετρο 400 μm και οι ίνες R600-7 έχουν διάμετρο 600 μm.





Σχήμα 5. Χαρακτηριστική εικόνα των οπτικών ινών R-600-7-UV-125F. Οι 6 οπτικές ίνες βρίσκονται γύρω από την έβδομη ίνα.

<u>2.2.δ) Λογισμικό</u>

Ο έλεγχος του φασματομέτρου και του ανιχνευτή, η αποθήκευση και η επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων γίνονται μέσω του λογισμικού (software). Είναι απαραίτητο το λογισμικό να είναι κατανοητό και εύχρηστο και να υπάρχει δυνατότητα παρέμβασης, έτσι ώστε να ανταποκρίνεται απόλυτα στις απαιτήσεις του χρήστη.

Για τη συλλογή, την ανάλυση και την καταγραφή του σήματος χρησιμοποιείται επομένως προσωπικός υπολογιστής σε συνδυασμό με το κατάλληλο λογισμικό, στη συγκεκριμένη εφαρμογή το Spectra Suite της Ocean Optics.

0ι κυριότερες λειτουργίες του λογισμικού είναι ο έλεγχος της συλλογής δεδομένων, η βαθμονόμηση του μήκους κύματος, η αφαίρεση του θορύβου και ο έλεγχος της εξωτερικής πυροδότησης του laser (triggering/σκανδαλισμός).



Σχήμα 6. Μια οθόνη με προσομοίωση του φάσματος με βάση το λογισμικό SpectraSuite.

Η βαθμονόμηση του μήκους κύματος για ένα νέο φάσμα, επιτυγχάνεται έχοντας αποθηκεύσει ένα χαρακτηριστικό φάσμα μίας συγκεκριμένης πηγής αναφοράς. Η πηγή θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από στενό φασματικό εύρος εκπομπής, κατά προτίμηση, κατά μήκος μεγάλου τμήματος του φάσματος (220-750 nm), όπως η λυχνία ξένου (Xenon lamp) της οποίας οι "γραμμές" εκπομπής δίνονται με ακρίβεια από τον κατασκευαστή. Τέλος, χρησιμοποιώντας ένα υπολογιστικό υποπρόγραμμα, αντιστοιχίζεται το μήκος κύματος για κάθε κανάλι του CCD ανιχνευτή.

Βασική προϋπόθεση και σε αυτή την πειραματική διάταξη για τη σωστή εκτέλεση του πειράματος είναι η απουσία της διάχυτης ηλιακής ακτινοβολίας λόγω της μεγάλης ευαισθησίας του φασματομέτρου. Για αυτόν το λόγο οι μετρήσεις γίνονται σε ένα σχεδόν σκοτεινό δωμάτιο. Η όλη πειραματική διάταξη είναι τοποθετημένη πάνω σε ένα ειδικό τραπέζι, στο οποίο μπορούν να τοποθετηθούν οι συσκευές κατά τη διάρκεια των μετρήσεων.

2.2.δ) Βάση για την τοποθέτηση του δείγματος

Στα δείγματα υγρών διαλυμάτων η διάταξη περιλαμβάνει ένα στατώ στήριξης της κυββέτας με το υγρό δείγμα.



Σχήμα 7. Προδιαγραφές των κυψελίδων – διαπερατότητα

3. Εκτέλεση του πειράματος

ΠΡΟΣΟΧΗ! Η ακτινοβολία laser είναι επικίνδυνη κυρίως για την όραση. Για αυτό εργάζεσθε πολύ προσεκτικά, ακολουθώντας πιστά τις οδηγίες των επιβλεπόντων. Χρησιμοποιείτε τα ειδικά προστατευτικά γυαλιά όταν αυτό σας ζητείται. **Μην παρατηρείτε απευθείας τη δέσμη laser**

Αφού εξοικειωθείτε μαζί με τους υπεύθυνους της εργαστηριακής άσκησης με τη λειτουργία των συσκευών laser και <u>τηρώντας όλους τους κανόνες ασφαλείας</u> (προστατευτικά γυαλιά, έλεγχος ανακλάσεων) προβείτε στις κάτωθι ενέργειες:

Βήματα

- 1. Ενεργοποιήστε το σχετικό πρόγραμμα ελέγχου της διάταξης.
- Συνδέστε τη λυχνία ξένου (Xenon lamp) και λάβετε το φάσμα εκπομπής της μετά από κατάλληλες ρυθμίσεις της διάταξης, σύζευξης στη οπτική ίνα και του λογισμικού.
- 3. Αναγνωρίστε και ταυτοποιήστε τις καταγραφόμενες κορυφές εκπομπής προς τις αντίστοιχες του φάσματος της λάμπας που σας έχει δοθεί.
- 4. Βαθμονομήστε τη διάταξη με βάση αυτές τις κορυφές βαθμονόμησης.
- 5. Συζεύξτε με προσοχή τη δέσμη του laser στην οπτική ίνα και επαληθεύστε τη βαθμονόμηση με βάση το μήκος κύματος εκπομπής του laser στα 266 nm.
- 6. Προσοχή! Μεταξύ της δέσμης laser και του δείγματος παρεμβάλλεται διάτρητος γυάλινος φακός, ο οποίος επιτρέπει την διέλευση της δέσμης προς το δείγμα εμποδίζοντας ταυτόχρονα την είσοδο οπισθοσκεδαζόμενου τμήματος αυτής στην έξοδο του laser, γεγονός που θα επέφερε επικίνδυνη ενίσχυση της δέσμης και καταστροφή του κρυστάλλου του laser. Πέτασμα από μη ανακλαστική επιφάνεια τοποθετείται και στην ευθεία της δέσμης πίσω από το στατώ, προς αποφυγή επαφής της δέσμης με το προσωπικό κατά την διεξαγωγή του πειράματος.
- Προετοιμάστε κατάλληλα τα βιολογικά ή λοιπά δείγματα που θα χρησιμοποιήσετε στις μετρήσεις.
- 8. Τοποθετήστε τα δείγματα και λάβετε τα φάσματα φθορισμού καταγράφοντας απαραίτητα όλες τις παραμέτρους laser που χρησιμοποιήσατε σε κάθε μέτρηση.
- 9. Υπολογίστε το λόγο σήματος προς θόρυβο για φάσματα του ίδιου δείγματος με και χωρίς αφαίρεση του υποβάθρου.
- Καταγράψτε και παρατηρήστε αν υπάρχουν διαφορές στα φάσματα που λαμβάνετε στο μίγμα των χρωστικών σε σχέση με αυτά με τις χρωστικές μόνες τους, σχολιάστε.
- 11. Παρατηρήστε και σχολιάστε τη μορφή των φασμάτων από δείγματα βιολογικών ιστών εάν έγιναν τέτοιου είδους μετρήσεις.

ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- "Ιατρικά lasers: Επιστήμη και κλινική εφαρμογή", G. Carruth and A. McKenzie, μετάφραση, σύγχρονη ενημέρωση και επιμέλεια Α.Α. Σεραφετινίδης και Μ.Ι. Μακροπούλου, Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα, 1994.
- "Fluorescence spectroscopy of tissue: recovery of intrinsic fluorescence from measured fluorescence", Cardner S.L. Jacques, A.J. Welch, *Applied Optics*, V.35, No 10, p. 1780, 1996.
- 3. B.W. Pogue and G. Burke, *Fiber-optic bundle design for quantitative fluorescence measurement from tissue*, Applied Optics, Vol. 37, No. 31, pp. 7429-7436, 1998.

4. Lakowicz, J.R., Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. USA: Springer, 2006.

- 5. APXONTAKH EIPHNH, XOYXOYMH KATEPINA, «Πειραματική μελέτη πάνω στην ανίχνευση της χλωροφύλλης και άλλων δεικτών ποιότητας διαφορετικών τύπων ελαιολάδου και σπορέλαιων για γρήγορο έλεγχο της υποβάθμισης της ποιότητας. Εφαρμογή του Φθορισμού σαν μία εναλλακτική μέθοδο, ελέγχου της ποιότητας του ελαιολάδου», Πτυχιακή εργασία, ΑΤΕΙ Κρήτης, Σητεία 2007.
- 6. Τα στοιχεία για τη λειτουργία του φασματόμετρου USB4000, τη λυχνία xenon καθώς και για τις οπτικές ίνες που χρησιμοποιήθηκαν, είναι από την επίσημη ιστοσελίδα της εταιρείας (www.oceanoptics.com) καθώς και από τα εγχειρίδια (manual) που συνόδευαν το φασματόμετρο.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Spectral range:	220-750 nm
Approximate dimensions:	14 cm x 10.5 cm x 4 cm (LWH) 5.5" x 4.1" x 1.5" (LWH)
Power input:	1.3 A @ 11V @ 220 Hz 100 mA @ 12V @ 10Hz
Trigger input:	external TTL positive pulse via 15-pin connector
Output:	45 microjoules per pulse maximum 9.9 watts average power from bulb (not the same as power coming out of fiber; see graph above) 220 Hz pulse rate maximum
Pulse duration:	5 microseconds (at 1/3 height of pulse)
Lifetime:	10 ⁹ pulses (estimated 230 days continuous operation at 50 Hz pulse rate)
Aperture:	3 mm
Connector:	SMA 905
Timing signals available from S2000:	Multiple mode: up to 220 Hz (varies with A/D sampling frequency); Single mode: varies with scan rate

1. Προδιαγραφές της λυχνίας ξένου (PX-2 Specifications)

2. Προδιαγραφές του φασματοφωτόμετρου (USB4000 Miniature Fiber Optic Spectrometer Specifications)

Physical		
Dimensions:	89.1 mm x 63.3 mm x 34.4 mm	
Weight:	190 grams	
Detector Specifications		
Detector:	Toshiba TCD1304AP Linear CCD array	
Detector range:	200-1100 nm	
Pixels:	3648 pixels	
Pixel size:	8 μm x 200 μm	
Pixel well depth:	100,000 electrons	
Signal-to-noise ratio:	300:1 (at full signal)	
A/D resolution:	16 bit	
Dark noise:	50 RMS counts	
Corrected linearity:	>99.8%	
Sensitivity:	130 photons/count at 400 nm; 60 photons/count at 600 nm	