فصل هشتم
اسپکتروسکوپی فلوئورسانس[1]

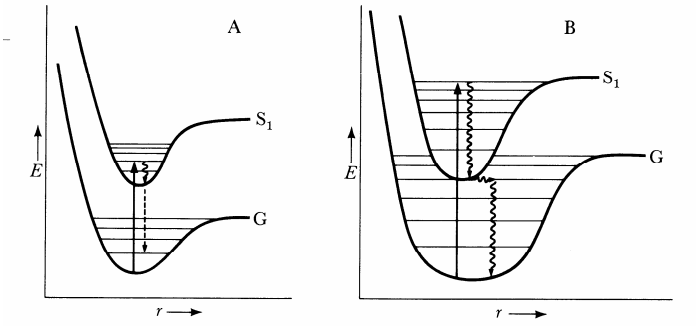
در برخی مولکول‌ها جذب فوتون همراه با نشر نور در طول موج‌های بالاتر (انرژی کمتر) می‌باشد. این نشر، فلوئورسانس نامیده می‌شود. در این نوع اسپکتروسکوپی نیز فاکتورهای محیطی زیادی بر طیف فلوئورسانس اثر می گذارند. اگر چه اسپکتروسکوپی جذبی ساده تر انجام می شود ولی اسپکتروسکوپی نشری (فلوئورسانس) به دلیل حساسیت بسیار زیاد نسبت به شرایط محیطی و همچنین نیاز به مقدار کم ماده، ارزش بسیار زیادی در مطالعات سیستم‌های بیولوژیک دارد. مطالعه بر روی طیف فلوئورسانس ماکرومولکول‌ها می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در مورد بنای فضایی ماکرومولکول، جایگاه‌های اتصال، میان‌کنش با حلال، درجه انعطاف‌پذیری و فواصل درون‌مولکولی بدست دهد.

۸-۱ . تئوری ساده فلوئورسانس:

می دانید که یک مولکول می‌تواند تنها مقادیر منفصل انرژی را داشته باشد. همان‌طور که در اسپکتروسکوپی جذبی دیدید، انرژی تابیده شده به یک مولکول می‌تواند تنها وقتی جذب شود که مولکول بتواند با جذب آن از سطح انرژی پایه به سطح انرژی برانگیخته انتقال یابد. اگر مولکول در حالت پایه (الکترونی) قرار داشته باشد (در تراز G) و انرژی جذب‌شده بیشتر از مقدار انرژی مورد نیاز برای رسیدن به اولین تراز الکترونی برانگیخته (S_1) باشد، انرژی اضافی به صورت انرژی ارتعاشی جذب مولکول شده و مولکول در یکی از ترازهای ارتعاشی تراز الکترونی برانگیخته قرار خواهد گرفت. این انرژی ارتعاشی به زودی در اثر برخورد با مولکول‌های حلال به صورت گرما هدر خواهد رفت و مولکول به پایین‌ترین تراز ارتعاشی تراز برانگیخته الکترونی (S_1) سقوط خواهد کرد. حال مولکول برانگیخته می‌تواند از طریق نشر نور (فلوئورسانس) و یا به وسیله انتقال غیرتابشی به حالت پایه (G) بازگردد. دیاگرام سطوح انرژی الکترونی و ارتعاشی دو کروموفور مختلف را در شکل (۸-۱) می‌بینید. در بخش (A)، مولکول کروموفور به وسیله نشر نور از تراز الکترونی برانگیخته به تراز الکترونی پایه باز می‌گردد در حالی که در بخش (B)، مولکول کروموفور به وسیله یک انتقال غیرتابشی از تراز الکترونی برانگیخته به تراز الکترونی پایه باز می‌گردد:

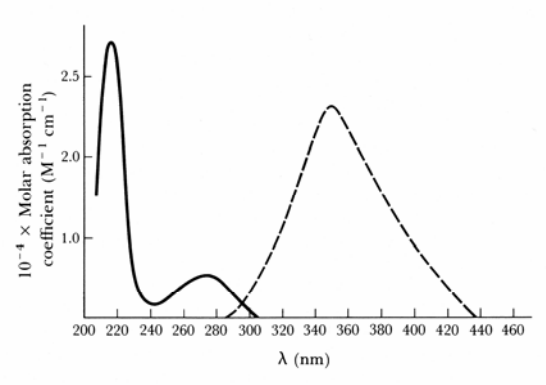
---

[1] Fluorescence Spectroscopy



شکل (۸-۱): دیاگرام سطوح انرژی دو کروموفور. G و S_1 به ترتیب نشان دهنده حالات پایه و برانگیخته (خطوط ضخیم) می‌باشند. ترازهای ارتعاشی با خطوط نازک نشان داده شده‌اند. (A) این مولکول به وسیله انتقال نشان داده‌شده در دیاگرام (خط باریک ممتد) قادر به فلوئورسانس می‌باشد. پس از برانگیخته‌شدن، مولکول با پایین آمدن از ترازهای ارتعاشی (فلش موج‌دار) به پایین‌ترین تراز ارتعاشی حالت برانگیخته سقوط می کند و سپس با نشر نور (فلش منقطع) به حالت پایه باز می‌گردد. (B) این مولکول قادر به فلوئورسانس نمی‌باشد زیرا ترازهای ارتعاشی G بالاتر از پایین ترین سطح S است. از اینرو، یک انتقال غیرتابشی (فلش موج دار افقی) از S_1 به تراز ارتعاشی G و بازگشت غیرتابشی متعاقب آن به پایین حالت G (فلش موج‌دار عمودی) روی می‌دهد.

چون انرژی در تراز برانگیخته به صورت انرژی گرمایی به‌هدر رفته است، در نتیجه نور نشر شده دارای انرژی کمتر (طول موج بلندتر) از نور تابیده‌شده خواهد بود. از اینرو فلوئورسانس همیشه دارای طول موج بالاتری از طول موج نور تهییج کننده است. به عنوان مثال، طیف جذبی و فلوئورسانس تریپتوفان در شکل (۸-۲) نشان داده شده است:



شکل (۸-۲): طیف‌های جذبی و فلوئورسانس تریپتوفان. خط ممتد نشان‌دهنده ضریب جذب مولی به عنوان تابعی از طول موج و خط منقطع نشان‌دهنده طیف نشری تریپتوفان می‌باشد.

در برگشت به تراز پایه (G) ممکن است مولکول به ترازهای ارتعاشی مختلف تراز الکترونی پایه بازگردد. در نتیجه، نور نشرشده دارای طول موج‌های به هم نزدیکی خواهد بود و این پدیده موجب پهن‌شدن طیف فلوئورسانس می‌گردد. همان طور که گفته شد، مولکول برانگیخته ممکن است به طرق غیرتابشی نیز به تراز پایه بازگردد.

احتمال وقوع فلوئورسانس توسط بازده کوانتایی[۲] (Q) نشان داده می‌شود و عبارت است از نسبت تعداد فوتون‌های نشرشده به تعداد فوتون‌های جذب شده. فاکتورهای بسیاری تعیین‌کننده مقدار Q می‌باشند. برخی از این فاکتورها، مربوط به خواص خود مولکول هستند که فاکتورهای درونی نامیده می‌شوند و برخی دیگر فاکتورهای محیطی محسوب می‌گردند. فاکتورهای درونی عمدتا از چگونگی توزیع سطوح ارتعاشی بین ترازهای الکترونی G و S ناشی می‌شوند. به عنوان مثال، اگر یک تراز ارتعاشی حالت پایه الکترونی (V_G) انرژی مشابهی با تراز ارتعاشی اولین حالت برانگیخته الکترونی (V_S) داشته باشد، در این صورت یک انتقال غیرتابشی از V_S به V_G می‌تواند صورت گیرد. این اتفاقی است که معمولا در مولکول های انعطاف پذیر به علت بالا بودن ترازهای ارتعاشی حالت پایه الکترونی‌شان روی می‌دهد. در حقیقت به همین علت است که مولکول‌های فلوئورسنت فراوان نیستند و همگی دارای سیستم‌های حلقوی و یا حلقه‌های آروماتیک صلب می‌باشند.

[۲] Quantum Yield

پس اساسا، فاکتورهای درونی تعیین‌کننده وجود پدیده فلوئورسانس هستند در حالی که فاکتورهای محیطی در صورت وجود این پدیده بر آن و مقدار Q اثر می‌گذارند. اثرات محیطی معمولا موجب فرآیندهای غیرتابشی می‌شوند که این فرآیندها با فلوئورسانس رقابت می‌کنند و در نتیجه Q را کاهش می‌دهند. کاهش بازده کوانتایی، خاموش‌شدن[۳] نامیده می‌شود و موادی که موجب کاهش بازده کوانتایی می‌شوند، خاموش‌گر[۴] فلوئورسانس نامیده می‌شوند. مولکول و یا دسته مولکول‌هایی که موجب ایجاد فلوئورسانس می‌شوند، فلوئور[۵] نام دارند. دو نوع فلوئور در مولکول‌ها مورد مطالعه قرار می‌گیرد:

۱- فلوئورهای ذاتی که در ساختمان خود مولکول‌ها وجود دارند.

۲- فلوئورهای خارجی که به ماکرومولکول‌ها اضافه شده و به آنها متصل می‌شوند.

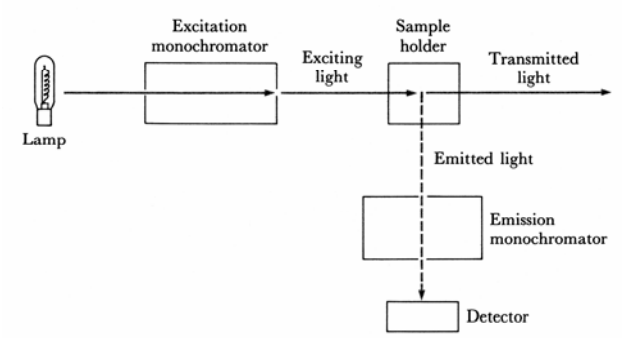
در پروتئین‌ها تنها سه فلوئور ذاتی یا درونی وجود دارد که به ترتیب کاهش بازده کوانتایی عبارتند از: تریپتوفان، تایروزین و فنیل‌آلانین. در عمل فلوئورسانس تریپتوفان بیشتر مورد مطالعه قرار می‌گیرد زیرا فنیل‌آلانین بازده کوانتایی کمی دارد و فلوئورسانس تایروزین نیز غالبا به واسطه خاموش‌شدن بسیار ضعیف است. فلوئورسانس تایروزین تقریبا همیشه به علت یونیزاسیون زنجیر جانبی فنلی‌اش، نزدیک بودن به یک گروه آمینو، نزدیک بودن به یک گروه کربوکسیل و یا یک تریپتوفان خاموش می‌شود. دلیل اصلی مطالعه فلوئورسانس ذاتی پروتئین‌ها بدست آوردن اطلاعاتی در مورد بنای‌فضایی آنان است زیرا فلوئورسانس تریپتوفان و تایروزین شدیدا بستگی به محیط اطراف آنان (نوع و ترکیب حلال، pH، حضور یک خاموش‌گر، وجود یک مولکول کوچک و یا یک گروه همسایه در ساختمان پروتئین) دارد.

۸-۲ . دستگاه اندازه‌گیری فلوئورسانس:

قسمت‌های اصلی یک دستگاه اسپکتروفلوئوریمتردر شکل (۸-۳) نشان داده شده است:

---

[۳] Quenching
[۴] Quencher
[۵] Fluor



شکل (۸-۳): بخش‌های اصلی یک دستگاه اسپکتروفلوئوریمتر. نمونه تهییج‌شده در تمام جهات نشر می‌کند ولی نور نشرشده فقط در زاویه $^{\circ}$۹۰ نسبت به نور تهییج‌کننده اندازه‌گیری می‌شود و بدین طریق نور عبورکرده از نمونه حذف شده و مورد سنجش قرار نمی‌گیرد.

در این دستگاه، تابشی با شدت بالا (که توسط لامپ زینون تولید می‌شود) وارد یک تکفام‌ساز می‌گردد. در تکفام‌ساز تهییجی، طول موج تهییج انتخاب می‌شود. این طول موج، طول موجی است که توسط فلوئور جذب می‌گردد. تابش تهییجی سپس وارد سلی می‌شود که حاوی نمونه است. به منظور اجتناب از ورود تابش تهییجی به آشکارساز، نور نشر شده در زاویه راست نسبت به تابش تهییجی ورودی اندازه‌گیری می‌شود زیرا تابش فلوئورسانس در تمامی جهات روی می‌دهد. تابش نشرشده سپس از یک تکفام‌ساز نشری عبور کرده و سرانجام به یک آشکارساز حساس به نور می‌رسد. این آشکارساز معمولا یک لوله فوتومالتی‌پلایر[۶] است. دستگاه‌های مدرن فلوئورسانس دارای سیستم‌های اسکن‌کننده و ثبت‌کننده می‌باشند که به طور اتوماتیک طول موج نور رسیده به آشکارساز را تغییر می‌دهند و شدت نور نشر شده را به صورت تابعی از طول موج نور نشر شده رسم می‌کنند.

[۶] Photomultiplier Tube

۸-۳. فلوئورسانس ذاتی[۷]:

استفاده از اندازه‌گیری‌های فلوئورسانس ذاتی در مطالعه پروتئین‌ها بر پایه قواعد تجربی است که با استفاده از مطالعه ترکیبات مدلی که ساختمان و بنای‌فضایی شناخته شده‌ای دارند بدست آمده است. برخی قواعد تجربی اندازه‌گیری‌های فلوئورسانس پروتئین‌ها در زیر آمده است:

۱- تمام فلوئورسانس یک پروتئین به واسطه وجود تریپتوفان، تایروزین و فنیل آلانین موجود در ساختمان آنان است مگر آنکه پروتئین حاوی فلوئور دیگری باشد.

۲- λ_{max} طیف فلوئورسانس تریپتوفان با کاهش قطبیت حلال به سمت طول موج‌های کوتاهتر جابجا شده و شدت فلوئورسانس آن نیز افزایش می‌یابد.

الف) اگر وقتی پروتئین در یک حلال قطبی است، λ_{max} نشر آن به سمت طول موج‌های کوتاهتر جابجا شود، تریپتوفان بایستی داخلی بوده و در یک محیط غیرقطبی واقع شده باشد.

ب) اگر وقتی پروتئین در یک حلال غیرقطبی است، λ_{max} نشر آن به سمت طول موج‌های کوتاهتر جابجا شود، یا تریپتوفان بر روی سطح پروتئین واقع شده و یا حلال چنان تغییرات بنای‌فضایی را در ساختمان پروتئین القاء نموده که تریپتوفان درونی را به سطح پروتئین آورده است.

۳- اگر یک ماده شناخته شده (که نقش خاموش‌گر دارد و فلوئورسانس اسید آمینه آزاد را خاموش می‌کند از قبیل یون‌های یدید، نیترات و یا سزیوم) فلوئورسانس تریپتوفان و تایروزین را خاموش کند، این اسیدهای آمینه بایستی بر روی سطح پروتئین قرار داشته باشند. اگر چنین نباشد چندین دلیل ممکن است وجود داشته باشد:

الف) ممکن است اسید آمینه داخلی باشد.

ب) ممکن است اسید آمینه در شکافی واقع شده باشد که ابعاد آن برای داخل شدن خاموش‌گر خیلی کوچک باشد.

ج) ممکن است اسید آمینه در یک ناحیه شدیدا باردار واقع شده باشد و بار الکتریکی محیط اطراف اسید آمینه، موجب دفع خاموش‌گر شود.

به عنوان مثال، اگر تریپتوفان در یک ناحیه باردار منفی واقع شده باشد، یون یدید قادر به خاموش کردن فلوئورسانس آن نیست. یون Cs^+ نیز در خاموش کردن فلوئورسانس ناموفق خواهد بود اگر

---

[۷] Intrinsic Fluorescence

فلوئور در یک ناحیه باردار مثبت واقع شده باشد. در ایـن موارد یک خاموش‌گر خنثی مثل آکریل‌آمید نسبت به بار بی‌توجه است و به طور موثری فلوئورسانس تریپتوفان را خاموش می‌کند.

۴- اگر ماده‌ای که بر بازده کوانتایی تریپتوفان آزاد اثر نمی‌گذارد بر فلوئورسانس پروتئین اثرگذار باشد، این ماده باید یک تغییر بنای فضایی عمده را در پروتئین القاء کرده باشد.

۵- اگر تریپتوفان یا تایروزین در یک محیط قطبی باشند، بازده کوانتایی آنان با افزایش حرارت کاهش می‌یابد در حالی که در یک محیط غیرقطبی، افزایش حرارت تاثیر کمی بر روی بازده کوانتایی آنان دارد. بنابراین انحراف از کاهش یکنواخت Q با افزایش T نشان می‌دهد که گرم کردن پروتئین موجب القاء تغییر بنای‌فضایی در آن شده است زیرا بایستی قطبیت ناحیه‌هایی که تریپتوفان‌ها حس کرده‌اند، تغییر کرده باشد.

۶- بازده کوانتایی هر دو اسید آمینه تریپتوفان و تایروزین با پروتونه شدن گروه کربوکسیل آلفای آنان کاهش می‌یابد.

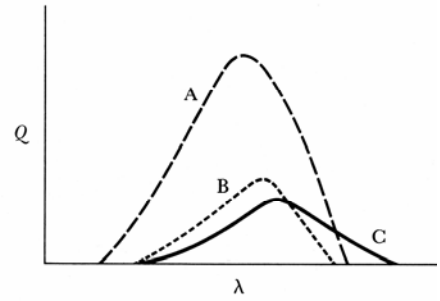
۷- فلوئورسانس تریپتوفان با پروتونه شدن گروه‌های اسیدی مجاور خاموش می‌گردد. بنابراین اگر pK اندازه گیری شده توسط تعقیب تغییرات فلوئورسانس تریپتوفان مشابه pK گروه یونیزه شونده شناخته‌شده‌ای مثل ایمیدازول هیستیدین یا تیول سیستئین باشد، آن گروه بایستی بسیار نزدیک به یک تریپتوفان باشد. این قانون وقتی کاربرد دارد که به طور مستقل نشان داده شده باشد تغییر pH موجب تغییر بنای‌فضایی در پروتئین نمی‌شود.

۸- اگر یک ماده به پروتئین متصل شود و فلوئورسانس تریپتوفان خاموش شود، یا در اثر اتصال لیگاند یک تغییر بنای‌فضایی عمده در ساختمان پروتئین روی داده است و یا برخی تریپتوفان‌ها بسیار نزدیک به جایگاه اتصال لیگاند هستند. به علاوه، چون کاهش قطبیت حلال موجب جابجایی λ_{max} نشر به سمت طول موج‌های کوتاهتر می‌شود، چنین جابجایی که حاصل اتصال لیگاند باشد نشان می‌دهد آب از کمپلکس پروتئین- لیگاند اخراج شده است (قطبیت محیط اطراف تریپتوفان کاهش یافته است).

۹- اگر طیف جذبی یک مولکول کوچک با طیف نشری تریپتوفان همپوشانی داشته باشد و فاصله کم باشد، خاموش شدن روی می‌دهد. بنابراین اتصال چنین مولکولی به پروتئین اگر فلوئورسانس تریپتوفان را خاموش کند، نشان‌دهنده این است که تریپتوفان بایستی در جایگاه اتصال و یا در نزدیکی آن باشد.

۸-۳-۱. مثال: تغییر بنای‌فضایی در یک آنزیم فرضی که در اثر اتصال یک کوفکتور القاء شده است:

سه تریپتوفان موجود در یک آنزیم فرضی دارای شدت فلوئورسانس بیشتر و λ_{max} کوتاهتری از تریپتوفان‌های آزاد هستند. شکل (۸-۴) طیف فلوئورسانس این پروتئین را در محلول نشان می‌دهد:



شکل (۸-۴): طیف فلوئورسانس یک پروتئین فرضی در محلول. منحنی (A) طیف فلوئورسانس پروتئین در غیاب کوفکتور، منحنی (B) طیف فلوئورسانس پروتئین را در حضور کوفکتور و منحنی (C) طیف فلوئورسانس تریپتوفان‌های آزاد را در آب نشان می‌دهد.

مقایسه منحنی‌های A و C پیشنهاد می‌کند این تریپتوفان‌ها بایستی در یک محیط قویا غیرقطبی واقع شده باشند. وقتی کوفکتور به محلول حاوی آنزیم اضافه می‌شود، شدت فلوئورسانس کاهش می‌یابد و λ_{max} نشر به سمت طول موج‌های بلندتر جابجا می‌شود. بنابراین بنای‌فضایی آنزیم باید تغییر کرده باشد. این تغییر یا موجب دسترس‌پذیری حلال قطبی (آب) به یک یا چند تریپتوفان موجود در ساختمان آنزیم شده است و یا آنها را به گروه‌های باردار درونی نزدیک کرده است. افزایش I^- و یا Cs^+ هیچ اثری بر طیف فلوئورسانس آنزیم قبل و بعد از اتصال کوفکتور ندارد. بنابراین هیچیک از این سه تریپتوفان قبل از افزودن کوفکتور در سطح آنزیم قرار نداشته (در جایگاه فعال واقع نشده) و همچنین پس از افزودن کوفکتور نیز به سطح آنزیم آورده نشده‌اند. پس این تریپتوفان‌ها احتمالا در اثر تغییر بنای‌فضایی حاصل از اتصال کوفکتور به یک محیط قطبی درونی پروتئین جابجا شده‌اند. توجه داشته باشید که به واسطه تغییرات ایجاد شده در فلوئورسانس می‌توان با تعقیب تغییرات یکی از پارامترها (مثلا شدت فلوئورسانس در یک طول موج خاص یا مقدار λ_{max} و یا مقدار Q) به عنوان روشی برای سنجش اتصال کوفکتور به آنزیم استفاده کرد. بنابراین از نمودار فلوئورسانس در مقابل

غلظت کوفکتور می‌توان برای تعیین استویکیومتری اتصال و همچنین تعیین ثابت تفکیک با استفاده از روش‌های استاندارد آنالیز اتصال لیگاند سود جست.

۸-۴. فلوئورسانس خارجی[۸]:

تمامی ماکرومولکول‌ها دارای گروه‌های فلوئورسنت در ساختمانشان نیستند ولی در بسیاری موارد می‌توان یک فلوئور را به یک ماکرومولکول متصل نمود. فرآیند اتصال را می‌توان به طریق تزویج شیمیایی[۹] و یا اتصال فیزیکی انجام داد. استفاده از چنین مولکول‌هایی در اندازه‌گیری‌های فلوئورسانس، فلوئورسانس خارجی نامیده می‌شود. یک فلوئور خارجی باید دارای شرایط زیر باشد:

۱- باید به طور محکم به یک جایگاه منحصربفرد متصل شود (اتصال به صورت ویژه باشد).

۲- فلوئورسانس آن نسبت به شرایط محیطی حساس باشد.

۳- اتصال آن به ماکرومولکول مورد مطالعه نبایستی بر بنای فضایی و خواص ماکرومولکول تاثیر بگذارد.

برای پروتئین‌ها، فلوئورهای خارجی که معمولا مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارتند از:

۱-آنیلینو-۸- نفتالن سولفونات[۱۰] (ANS)، ۱- دی‌متیل‌آمینونفتالن-۵- سولفونات[۱۱] (DNS)، ۲- پارا-تولوئیدیل نفتالن-۶- سولفونات[۱۲](TNS)، رودآمین[۱۳]، فلوئورسین[۱۴] و ایزوتیوسیانات های رودآمین و فلوئورسین.

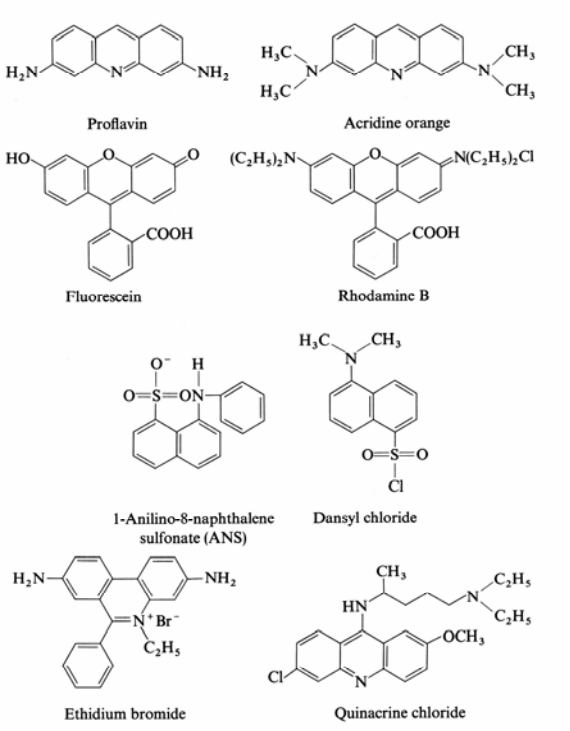
و برای اسیدهای نوکلئیک، فلوئورهای خارجی معمول عبارتند از:

آکریدین آرنج[۱۵]، پروفلاوین[۱۶]، آکریدین و اتیدیوم بروماید[۱۷].

---

[۸] Extrinsic Fluorescence
[۹] Chemical Coupling
[۱۰] ۱-Anilino-۸-naphthalene sulfonate
[۱۱] ۱-Dimethylaminonaphthalene-۵-sulfonate
[۱۲] ۲-*p*-Toluidylnaphthalene-۶-sulfonate
[۱۳] Rhodamine
[۱۴] Fluorescein
[۱۵] Acridine Orange
[۱۶] Proflavine
[۱۷] Ethidium bromide

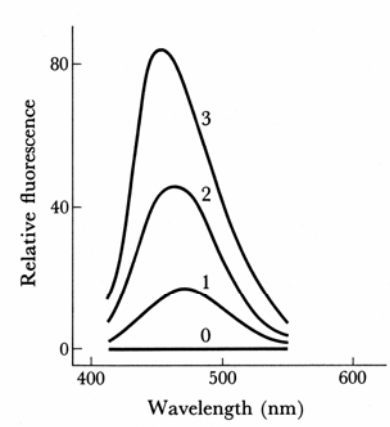
تمامی فلوئورهای فوق در ساختمانشان دارای سیستم های حلقوی آروماتیک می باشند. ساختمان شیمیایی مولکول هایی که به طور معمول در فلوئورسانس خارجی ماکرومولکول ها مورد استفاده قرار می‌گیرد در شکل(۸-۵) نشان داده شده است:



شکل (۸-۵): ساختمان شیمیایی فلوئورهای خارجی مرسوم.

ANS، DNS، TNS و اتیدیوم بروماید ویژگی جالبی دارند. این ترکیبات در محلول آبی فلوئورسانس خیلی ضعیفی دارند ولی در محیط‌های غیرقطبی بازده کوانتایی آنان شدیدا افزایش می‌یابد و طیف نشر آنان نیز به سمت طول موج‌های کوتاهتر جابجا می‌شود.

در شکل (۸-۶) طیف فلوئورسانس ANS و تغییرات ناشی از اتصال این رنگ فلوئورسنت به آلبومین سرم گاوی[۱۸] (BSA) را مشاهده می‌نمایید. به افزایش شدت فلوئورسانس ANS در اثر اتصال به BSA و جابجایی در λ_{max} نشر آن توجه نمایید.



شکل (۸-۶): اثر افزایش آلبومین سرم گاوی بر طیف فلوئورسانس ANS. منحنی o مربوط به طیف فلوئورسانس ANS و منحنی های ۱، ۲ و ۳ مربوط به فلوئورسانس ANS در حضور غلظت های افزایش یابنده BSA است.

دانسیل کلراید[۱۹] و ایزوتیوسیانات‌هایی که در فلوئورسانس خارجی پروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند دارای خاصیت منحصربفردی می‌باشند و با زنجیر جانبی اسیدهای آمینه ویژه‌ای در ساختمان پروتئین ها واکنش می دهند. از این ترکیبات جهت شناسایی نواحی غیرقطبی موجود در ساختمان پروتئین‌ها استفاده می‌شود زیرا با اتصال آنان به این نواحی، فلوئورسانس‌شان افزایش می‌یابد و از اینرو تاییدکننده حضور سطوح آب‌گریز در ساختمان پروتئین‌ها محسوب می‌شوند.

[۱۸] Bovine Serum Albumin
[۱۹] Dansyl Chloride

۸-۴-۱ . مثال: تعیین خواص جایگاه اتصال هم در هموگلوبین:

هموگلوبین، کمپلکس یک گروه پروستتیک کوچک با آپوهموگلوبین است. وقتی فلوئور خارجی ANS به محلول آپوهموگلوبین اضافه شود، ANS شروع به نشر فلوئورسانس می کند ولی در اثر افزودن ANS به محلول هموگلوبین، هیچ فلوئورسانسی از ANS مشاهده نمی‌شود. همچنین افزایش هم به کمپلکس ANS-آپوهموگلوبین با بیرون راندن ANS همراه است و موجب حذف فلوئورسانس این کمپلکس می گردد. بنابراین، ANS و هم بایستی به جایگاه مشترکی در ساختمان آپوهموگلوبین متصل شوند و این جایگاه نیز غیرقطبی باشد. ازتعیین دقیق مقدار Q و جابجایی طیفی می‌توان میزان غیرقطبی بودن این جایگاه را تخمین زد.

۸-۴-۲ . مثال: حضور اسیدهای چرب متصل شده به BSA :

اگر نمونه‌های مختلفی از BSA تهیه شود و به محلول آنان ANS اضافه گردد، ANS فلوئورسانس خواهد کرد ولی مقادیر Q و λ_{max} فلوئورسانس از یک نمونه به نمونه دیگر متفاوت خواهد بود. تفاوت در مقادیر Q خیلی بزرگتر از آن است که به واسطه تغییر در قطبیت جایگاه اتصال ANS باشد و بنابراین باید به واسطه تفاوت در تعداد جایگاه‌های اتصال باشد. به عبارت دیگر، در نمونه هایی که فلوئورسانس ضعیفتری دارند، باید تعداد ANS کمتری متصل شده باشد. اگر نمونه‌های BSA با یک حلال لیپیدی (غیرقطبی) تیمار شوند، مقادیر Q و جابجایی‌های طیفی برای تمام نمونه‌ها یکسان خواهد بود. به نظر می رسد که استخراج با حلال لیپیدی موجب می‌شود که برخی جایگاه‌های غیرقطبی در دسترس ANS قرار بگیرند و آنالیز حلال نشان می دهد که حلال توانسته است از نمونه هایی که فلوئورسانس ضعیفی دارند اسیدچرب استخراج کند. از اینرو، نمونه های به ظاهر خالص و کریستالی BSA ممکن است حاوی تعدادی اسید چرب متصل شده باشد. بنابراین، با استفاده از فلوئورسانس می‌توان هم خلوص چنین نمونه‌هایی را سنجید و هم اتصال اسیدهای چرب به BSA را مورد مطالعه قرار داد و ثابت‌های اتصال را تعیین نمود.