

УДК 535.37

ЭТАЛОННЫЕ ОБРАЗЦЫ ДЛЯ СПЕКТРАЛЬНО-КИНЕТИЧЕСКОГО ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

Лабода Н. В.^{1,2}, Тарасов Д. С.^{1,2}, Самцов М. П.¹, Воропай Е. С.²

¹НИУ «Институт прикладных физических проблем имени А. Н. Севченко» БГУ

²Белорусский государственный университет
Минск, Республика Беларусь

Аннотация. В работе выполнен подбор эталонных образцов для контроля работы аппаратуры для измерения длительности затухания флуоресценции. Для наносекундного временного диапазона предложено использовать набор растворов органических красителей в органических растворителях. В него вошли растворы в этаноле красителей оксазин 17, DCM, родамин 6Ж и индотрикарбодиазанинового красителя HITC, а также раствор нового индотрикарбодиазанинового красителя в о-дихлорбензоле. Показано, что в таких средах растворы представляют собой систему из одного поглощающего и флуоресцирующего центра, высокая стабильность при хранении красителей в виде порошка и достаточная для проведения измерений в соответствующих растворах. Для микросекундного диапазона предложено использовать сапфир с титаном. **Ключевые слова:** длительность затухания флуоресценции, время-коррелированный счет одиночных фотонов, органические красители.

REFERENCE SAMPLES FOR SPECTRAL-KINETIC LUMINESCENT ANALYSIS

Laboda N.^{1,2}, Tarasov D.^{1,2}, Samtsov M.¹, Voropay E.²

¹A. N. Sevchenko Institute of Applied Physical Problems of Belarusian State University

²Belarusian State University
Minsk, Republic of Belarus

Abstract. The paper is devoted to the selection of reference samples for monitoring the operation of equipment for measuring the fluorescence decay time. For the nanosecond time range, it is proposed to use a set of solutions of organic dyes in organic solvents. It includes solutions of oxazine 17, DCM, rhodamine 6G and indotricarbocyanine dye HITC in ethanol, as well as a solution of a new indotricarbocyanine dye in o-dichlorobenzene. It is shown that in such media, the solutions represent a system of one absorbing and fluorescent center, which is necessary for using them as a standard. High stability during storage of the dyes in powder form and sufficient for measurements in the corresponding solutions are established. For the microsecond range, it is proposed to use sapphire with titanium.

Key words: fluorescence decay time, time-correlated single photon counting, organic dyes.

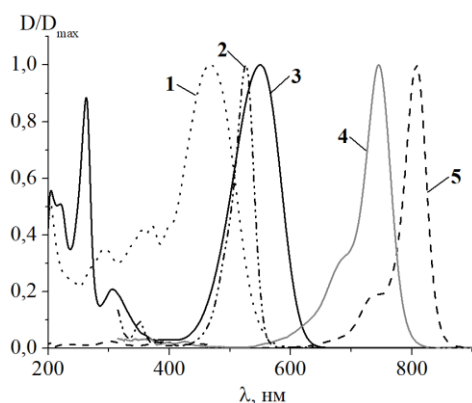
Адрес для переписки: Тарасов Д. С., ул. Курчатова 7, г. Минск 220045, Республика Беларусь
e-mail: dmitrij-tarasov@list.ru

Длительность затухания флуоресценции одна из ключевых характеристик, которая используется во флуоресцентной спектроскопии, в особенности при исследовании различных биобъектов [1, 2]. Исследование кинетики затухания флуоресценции дает дополнительную информацию, которая обычно не доступна из данных стационарной спектроскопии. Существует ряд методов регистрации кинетики затухания флуоресценции: стробоскопический, фазово-модуляционные и импульсные методы, а также методы с использованием стрик-камеры. Сегодня наибольшее распространение получил метод время-коррелированного счета одиночных фотонов (Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC). Этот метод лежит в основе ряда доступных коммерческих импульсных спектрофлуориметров, а также систем флуоресцентной микроскопии с временным разрешением (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM).

Качество регистрируемых по методу TCSPC кинетик затухания флуоресценции зависит от длительности и временного профиля импульсных

источников, времени отклика фотодетектора, характеристик контроллера для анализа времен прилета одиночных фотонов, а также программного обеспечения для анализа кинетики затухания флуоресценции. Для контроля стабильности работы подобного рода аппаратуры, в том числе для сравнения результатов, полученных на приборах разных производителей разумно использовать эталонные образцы с известной длительностью затухания флуоресценции. Актуальность данной проблемы обусловлена тем, что в НИИПФП им. А. Н. Севченко ведутся работы по разработке отечественного лазерного импульсного спектрофлуориметра. В данной работе предложен набор эталонных образцов с длительностью затухания флуоресценции в нано- и микросекундном диапазоне. Основные требования к эталонному образцу – независимость длительность затухания флуоресценции от длины волны возбуждения и регистрации, высокая временная стабильность образцов. Первое условие выполняется для системы состоящей из одного поглощающего и флуоресцирующего центра. В связи с этим подобран набор эталонных растворов флуоресци-

рующих красителей. В него вошли красители оксазин 17, DCM, родамин 6Ж и индотрикарбоцианиновый краситель НТС (ПК1) в этаноле, а также раствор нового индотрикарбоцианинового красителя ПК2 в о-дихлорбензоле. Их полосы поглощения (рисунок 1) в совокупности лежат в диапазоне 270-830 нм, который покрывает нужды для большинства флуоресцирующих молекулярных систем. Исследования спектрально-люминесцентных свойств данных красителей в соответствующих средах показали, что представленные образцы представляют собой систему, состоящую из одного поглощающего и флуоресцирующего центра. Так для всех эталонных образцов наблюдается постоянство спектра поглощения при изменении концентрации красителя. Максимум полосы поглощения оксазина 17 в этаноле располагается вблизи 550 нм, DCM в этаноле – 468 нм, родамина 6Ж в этаноле – 526 нм, ПК1 в этаноле – 745 нм, ПК2 в о-дихлорбензоле – 807 нм.

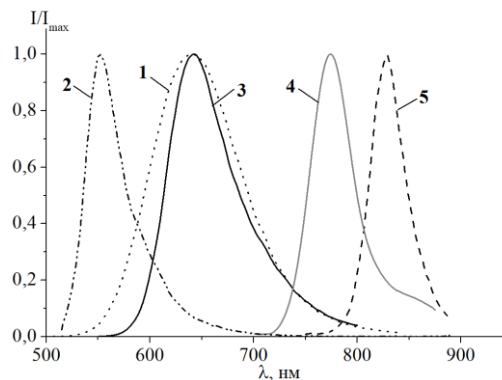


1 – DCM в этаноле; 2 – родамин 6Ж в этаноле;
3 – оксазин 17 в этаноле; 4 – ПК1 в этаноле;
5 – ПК2 в о-дихлорбензоле

Рисунок 1 – Нормированные спектры поглощения растворов красителей

Исследования люминесцентных свойств эталонных образцов проводились с помощью спектрофлуориметра Fluorolog. Концентрация красителей в растворах подбиралась такой, чтобы оптическая плотность в максимуме полосы поглощения не превышала 0,1. Установлено, что форма спектра (рисунок 2), квантовый выход и длительность затухания флуоресценции у всех образцов не зависят от длины волны возбуждения. Максимум флуоресценции наблюдается на следующих длинах волн: оксазин 17 в этаноле – 641 нм; DCM в этаноле – 640 нм; родамин 6Ж в этаноле – 552 нм; ПК1 в этаноле – 773 нм; ПК2 в о-дихлорбензоле – 827 нм. Кинетика затухания флуоресценции наилучшим образом аппроксимируется одной экспонентой. Получены следующие времена затухания флуоресценции при температуре 17 °: оксазин 17 в этаноле – 3,3 нс; DCM в этаноле – 1,5 нс, родамин 6Ж в этаноле – 4,09,

ПК1 в этаноле – 1,2 нс, ПК2 в о-дихлорбензоле – 1,3 нс. Все предложенные красители продемонстрировали достаточную временную стабильность при хранении в виде порошка (месяцы и годы), и стабильность в соответствующих растворах в затемненных условиях не менее 14 суток.



1 – DCM в этаноле; 2 – родамин 6Ж в этаноле;
3 – оксазин 17 в этаноле; 4 – ПК1 в этаноле;
5 – ПК2 в о-дихлорбензоле

Рисунок 2 – Нормированные спектры флуоресценции растворов красителей

Для микросекундного диапазона предложено использовать сапфир с титаном, для которого длительность затухания флуоресценции при регистрации на длине волны 740 нм при возбуждении лазерами с длиной волны излучения 405 нм, 450 нм или 510 нм составила 3,11 мкс (рисунок 3).

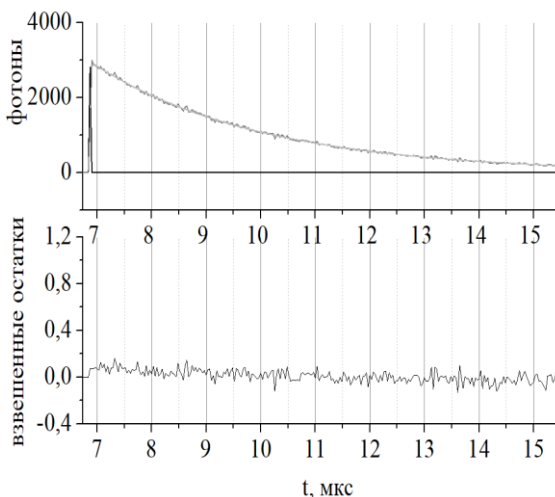


Рисунок 3 – Кинетика затухания флуоресценции сапфира с титаном при возбуждении лазером 510 нм и регистрации на длине волны 740 нм

Литература

1. Jameson, D. M. Fluorescence: Basic concepts, practical aspects, and some anecdotes / D. M. Jameson, J. C. Croney, P. D.J. Moens // *Methods in Enzymology*. – 2003. – V. 360. – P. 1–43.
2. Lakowicz, J.R. Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy / J. R. Lakowicz // *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. – 3rd ed. – New York, 2006. – Ch. 1. – P. 27–61.