

## 8. Měření kinetiky dohasínání fluorescence v časové doméně

# Kinetika dohasínání fluorescence

Po excitaci vzorku  $\delta$ -pulem se hladina  $S_1$  depopuluje podle

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(k_F + k_N)n(t)$$

Prointegrováním a uvážením, že měřená intenzita je úměrná počtu částic, dostaneme

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau}$$

kde **doba života**  $\tau = (k_F + k_N)^{-1}$

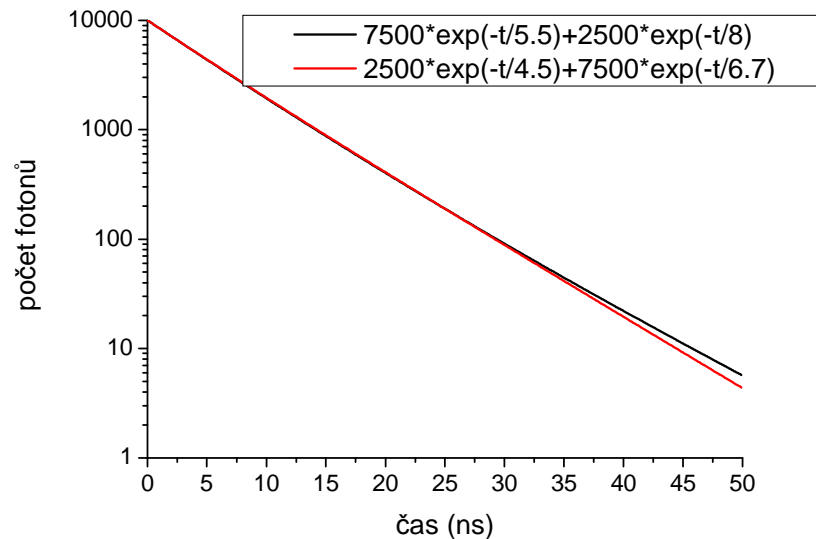
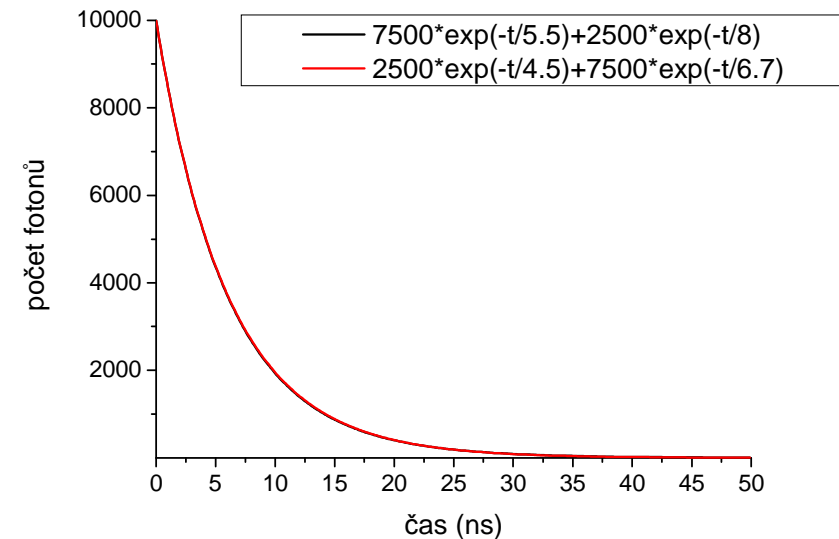
Střední doba života je rovna (pro jednoexponenciální dohasínání)

$$\langle t \rangle = \frac{\int_0^{\infty} tI(t)dt}{\int_0^{\infty} I(t)dt} = \frac{\int_0^{\infty} t \cdot \exp(-t/\tau)dt}{\int_0^{\infty} \exp(-t/\tau)dt} = \frac{\tau^2}{\tau} = \tau$$

**Střední doba života**  **na koncentraci**, proto bývají informace o mikrookolí fluoroforu spolehlivější než pouhé měření intenzity.

Problémem je analýza složitějších systémů

$$I(t) = I_0 \sum_i \alpha_i \exp\left(-t/\tau_i\right)$$



# Střední doba života

Více-exponenciální kinetika dohasínání fluorescence

$$D = \sum \alpha_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}$$

Střední doba života - vážená

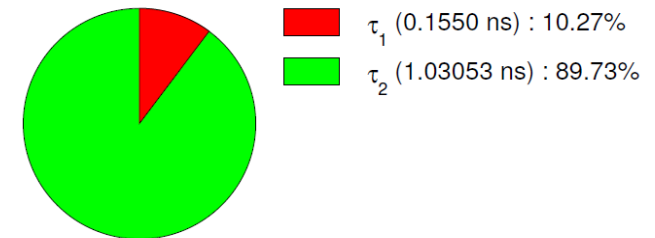
$$\tau_m = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i}{\sum_i \alpha_i}$$

Střední doba života - vážená  
steady-state

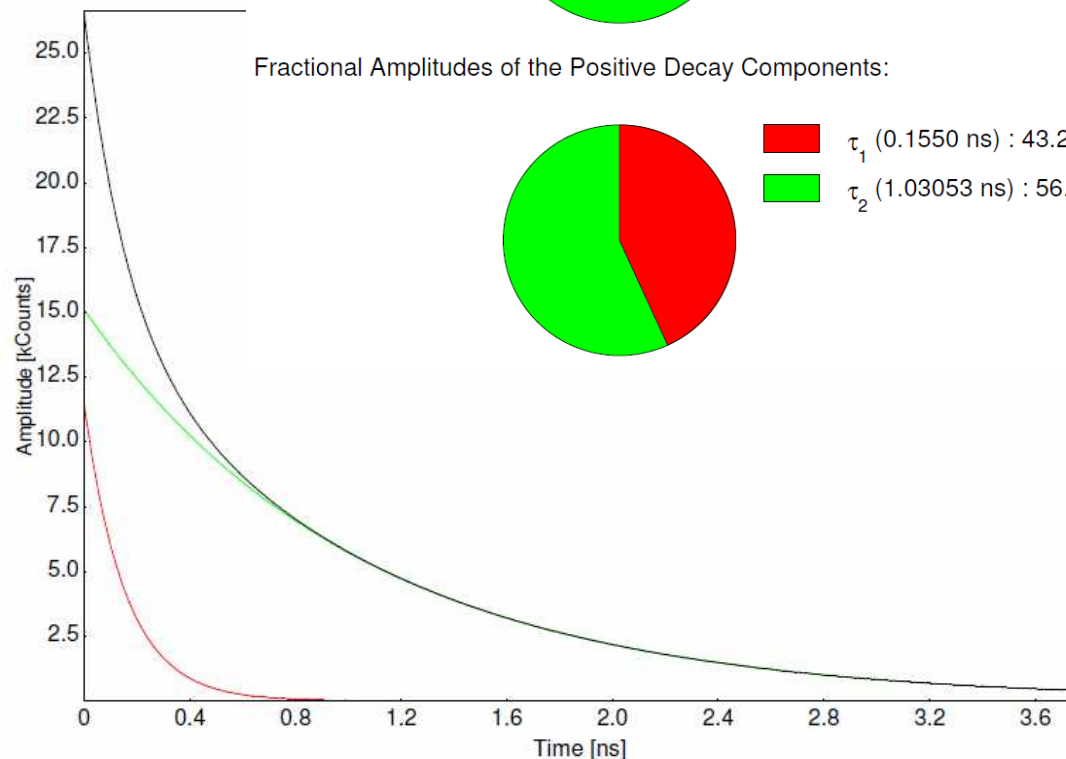
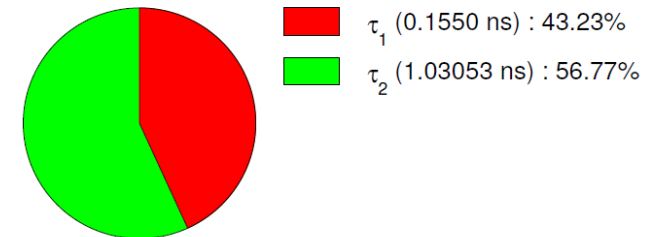
$$\tau_m = \frac{\sum_i f_i \tau_i}{\sum_i f_i} = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i^2}{\sum_i \alpha_i \tau_i}$$

Příklad 8.1: Spočítejte střední dobu života váženou (a) amplitudami, (b) intenzitami pro znázorněný příklad.

Fractional Intensities of the Positive Decay Components:



Fractional Amplitudes of the Positive Decay Components:



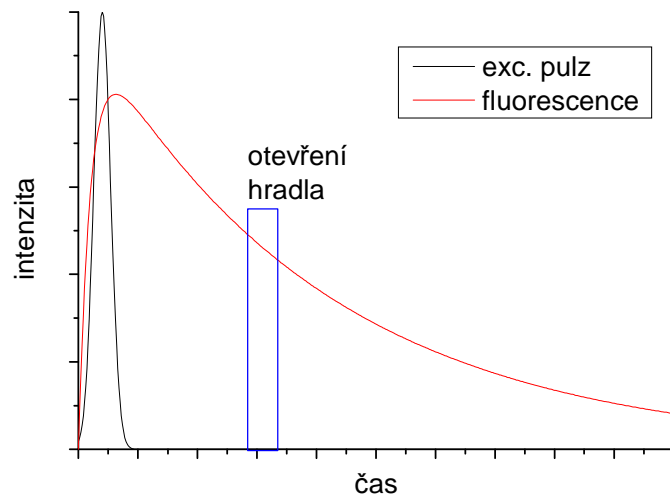
# detekce (gated detection)

Pulsní (časová) doména – excitace  $\delta$ -pulesem

$$n^*(t) = n^*(0)e^{-\frac{t}{\tau}}$$

$$I(t) = I(0)e^{-\frac{t}{\tau}}$$

Hradlovaná (gated) detekce



Historicky nejstarší metoda pro měření kinetiky dohasínání fluorescence v časové doméně  
Hradlování může být zajištěno buď tím, že je detektor zapnut jen na velmi krátkou dobu, nebo tím, že detektor je zapnut po celou dobu měření, ale elektrický signál je snímán stroboskopicky.

Intenzita je proměřena pro časové intervaly s různě dlouhou prodlevou po excitačním pulzu  
Díky horšímu rozlišení (IRF~3 ns) a systematickým artefaktům prakticky opuštěna, nyní se v některých aplikacích začíná vracet

Výhody:

- relativně levná
- možnost rychlého načtení celé dohasínací křivky
- s výhodou využívána např. v mikroskopii nebo pro měření pomalejších kinetik

# Metoda časově-korelovaného čítání fotonů (time-correlated single-photon counting, TCSPC)

Intenzita ~ Pravděpodobnost emise

Vzorek ozařujeme sérií pulzů

Po každém pulzu detekujeme nejvýše jeden emitovaný foton, pro nějž přesně změříme čas, ve kterém přiletěl na detektor

Údaje o časech příletu shromažďujeme v histogramu

Pro velký počet zaznamenaných fotonů histogram rekonstruuje dohasínací křivku

Výhody:

- vysoké rozlišení (běžné přístroje  $\tau > 50$  ps)
- analýza více-exponenciálního dohasínání
- malá náchylnost k systematickým artefaktům
- směrodatná odchylka počtu detekovaných fotonů v každém kanálu ( $N_i$ ) je dána Poissonovskou statistikou  $(N_i)^{1/2}$
- možnost porovnání fitovaného modelu s teoretickou předpovědí

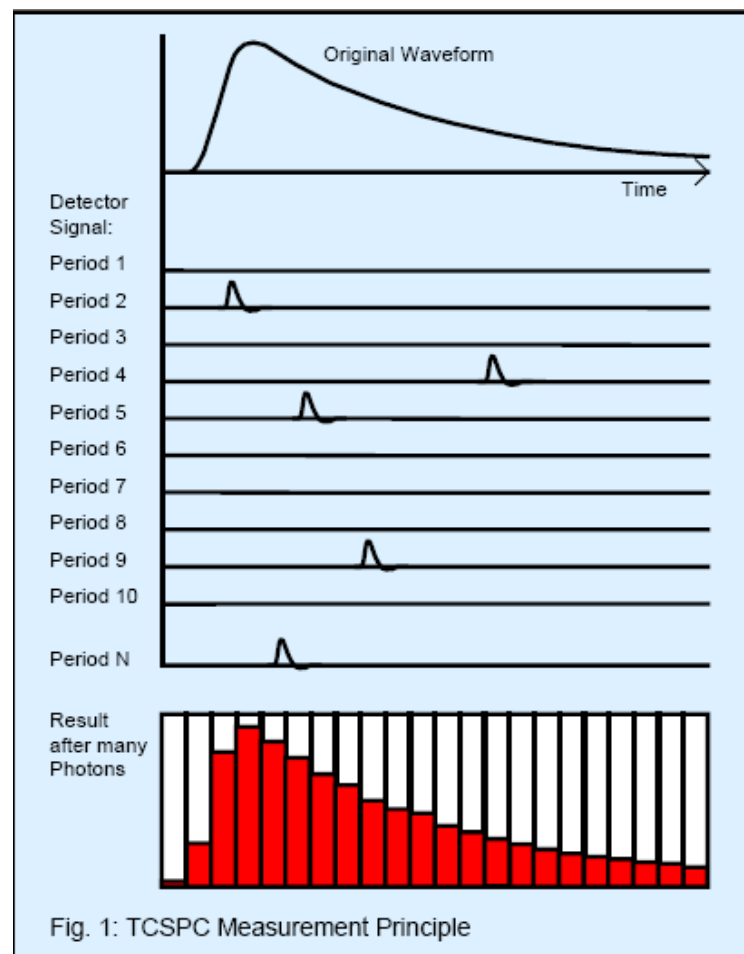
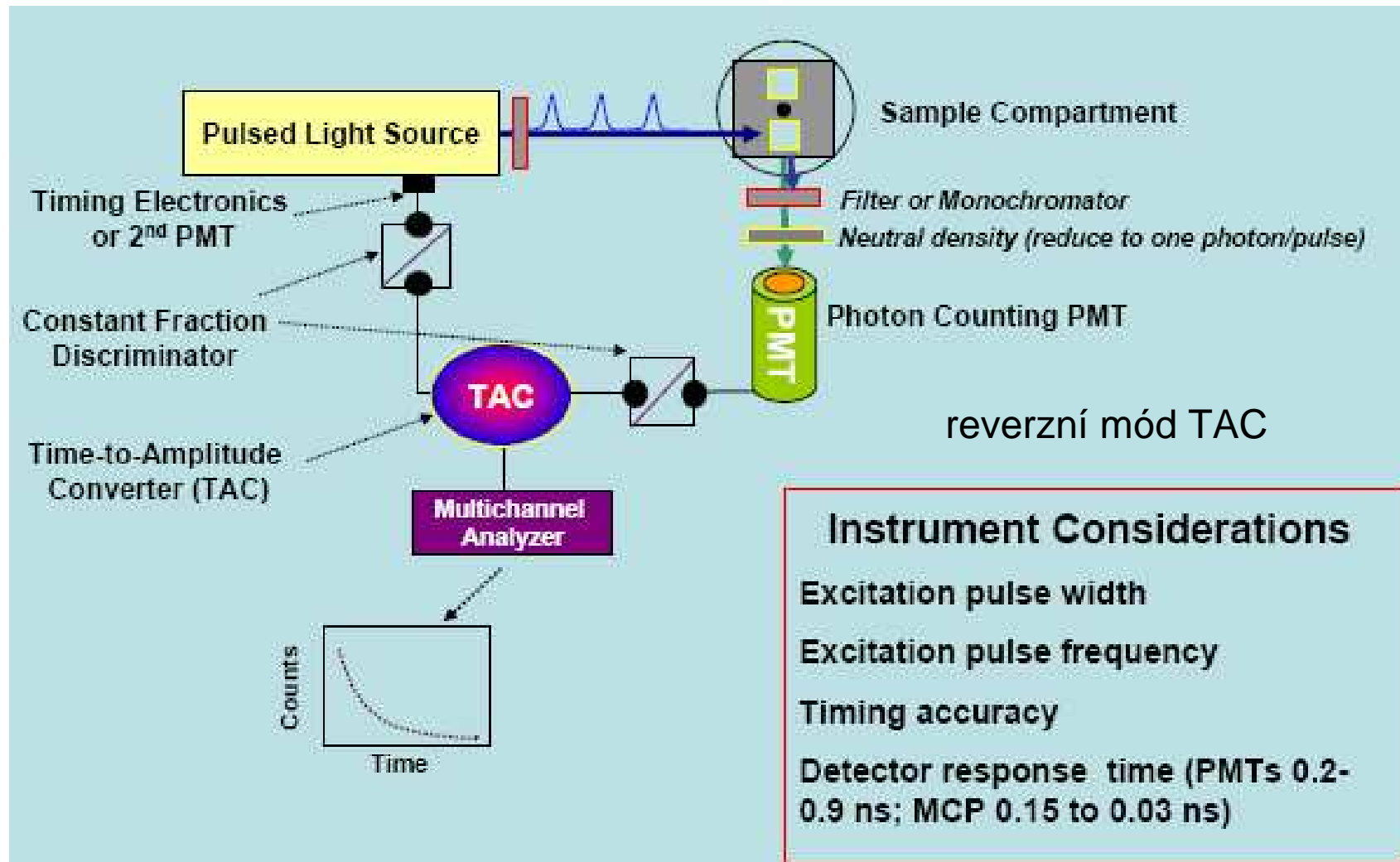
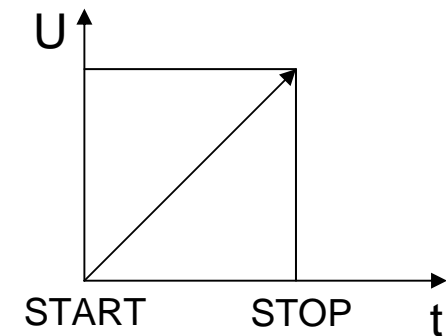


Fig. 1: TCSPC Measurement Principle

Becker&Hickel, The bh TCSPC handbook

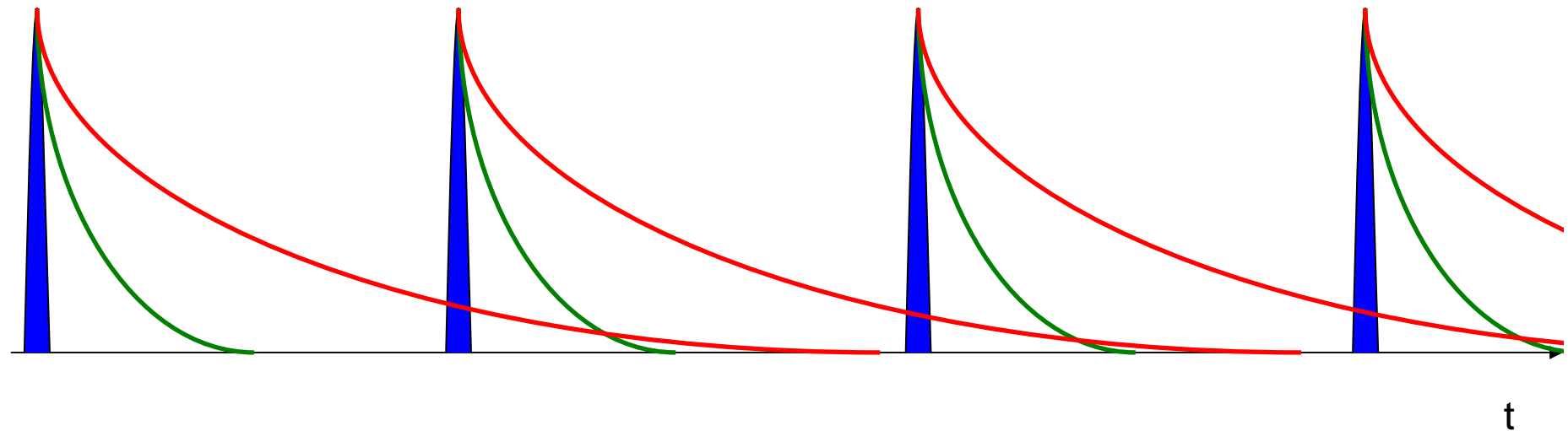
# Princip měření TCSPC



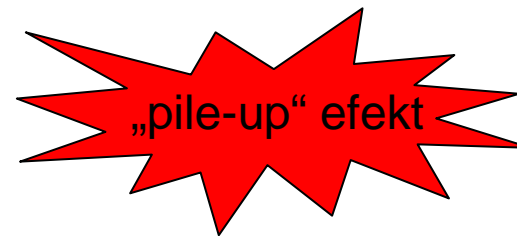
# Rychlost měření

chceme načíst co nejvíce fotonů (alespoň  $5 \cdot 10^6$ )

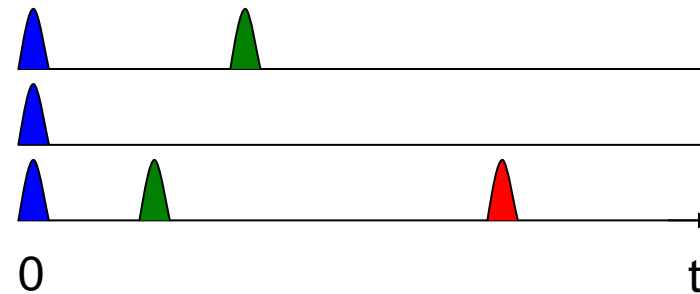
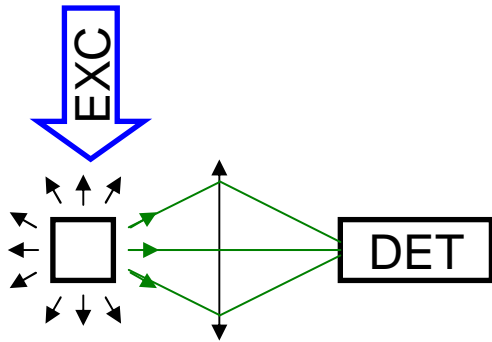
opakovací frekvence je limitována hardwarově  
kinetikou dohasínání



účinnost detekce - čím větší, tím lepší ...  
... ale jen do určité míry



# Statistika musí být úplná !

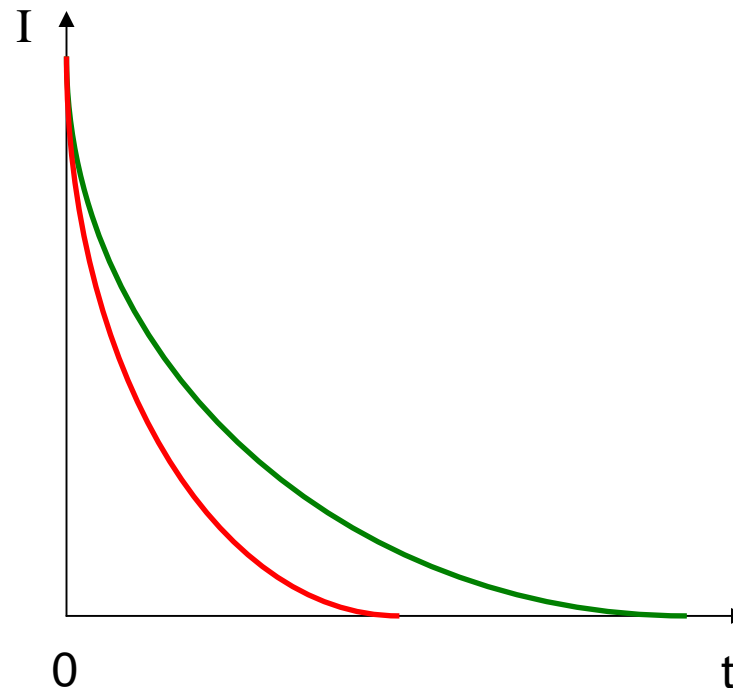


OK  
OK  
NE

Eliminace „pile-up“ efektu:  
„Count-rate“ musí být  $< 1\%$ .

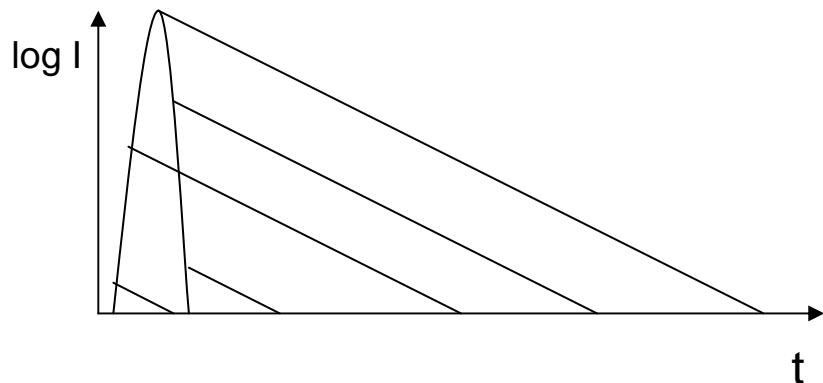
Tzn. při opakovací frekvenci 10 MHz  
můžeme detekovat max.  $10^5$  fotonů  
za 1s.

Příklad 8.2: Za jak dlouho jsme schopni za  
optimálních podmínek nasbírat histogram  
z  $5 \cdot 10^6$  fotonů ?

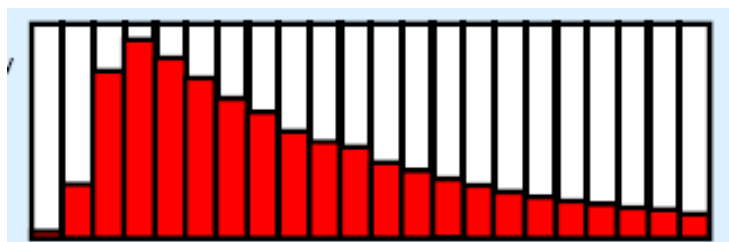
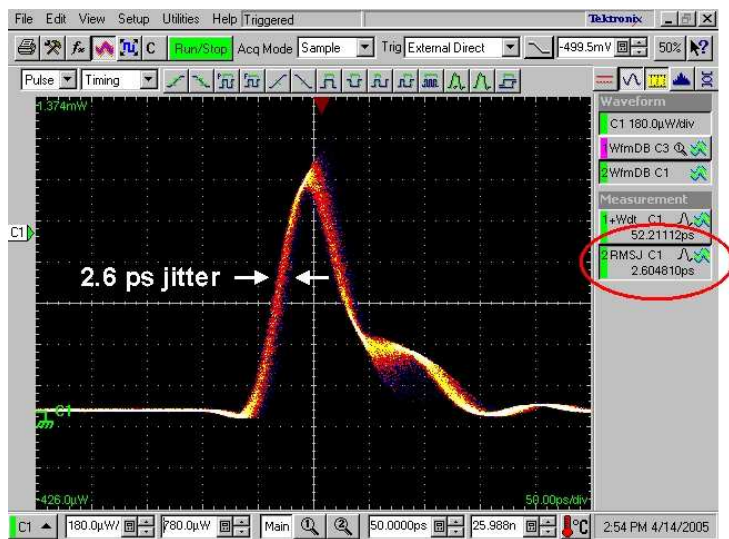




# Přesnost měření



- tvár excitačního pulsu
- nestabilita elektroniky (time-jitter)
- časový interval pro 1 kanál při ukládání dat
- transit-time spread
- počet detekovaných fotonů
- stabilita vzorku



Becker&Hickel, The bh TCSPC handbook

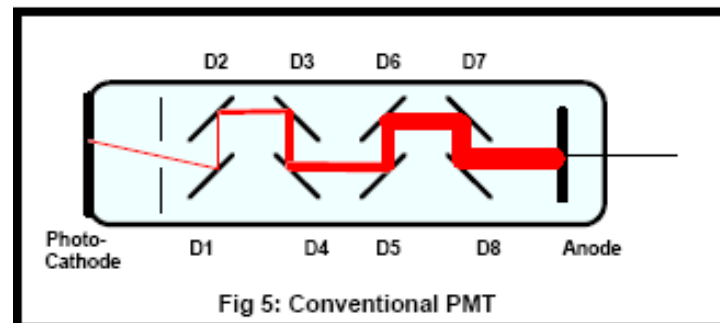
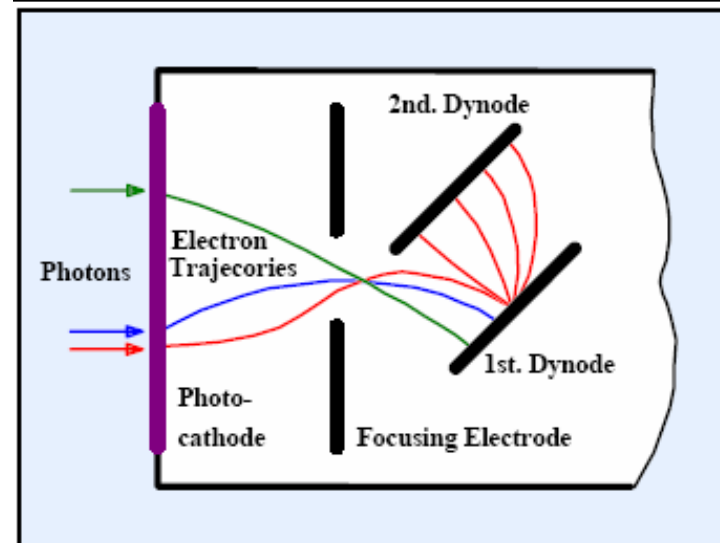


Fig 5: Conventional PMT



# Analýza dat

Funkce přístrojové odezvy není  $\delta$ -funkce

$$M = IRF \otimes D$$

Časový posun (shift) mezi detekcí IRF a M

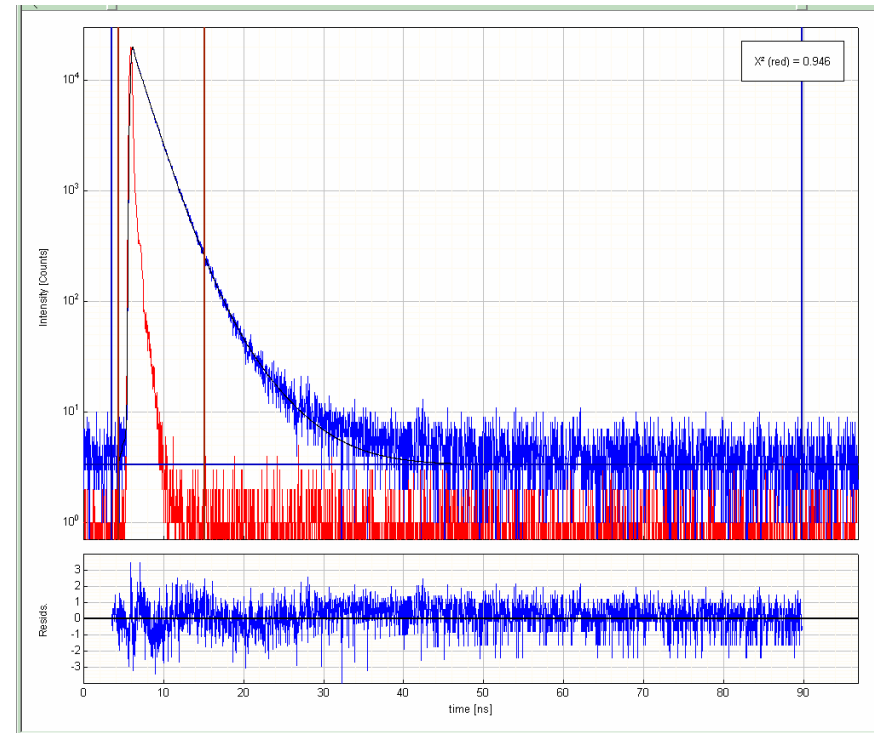
Dohasínání nemusí být monoexponenciální

$$D = \sum \alpha_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad \text{více komponent}$$

$$D = \int_{\tau=0}^{\infty} \alpha(\tau) e^{-\frac{t}{\tau}} \quad \text{distribuce}$$

$$D = e^{-\left(\frac{t}{\tau}\right)^\beta} \quad \text{„natažená“ exponenciála}$$

$$D = e^{-\frac{t}{\tau} - 2b\sqrt{t}} \quad \text{přechodové jevy}$$



Je velmi užitečné, mít představu o tom, jak má vypadat dohasínání

# Metody vyhodnocování

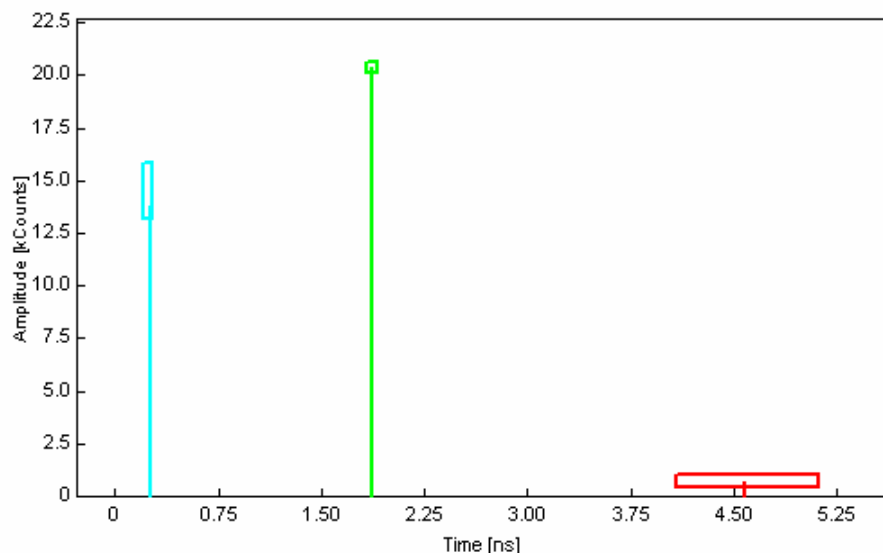
## Metoda (LSA)

zadáme model dohasínání

zadáme parametry, které chceme najít

hledáme minimum funkce

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(X_i^{EXP} - X_i^{FIT})^2}{\sigma_i^2} = \sum_{i=1}^N \frac{(X_i^{EXP} - X_i^{FIT})^2}{X_i^{EXP}}$$



## Použitelnost LSA

1. Neurčitost v experimentálních datech se týká pouze závislé proměnné (y-osa)
2. Neurčitosti v závislé proměnné mají Gaussovskou distribuci
3. Závislá (y) ani nezávislá (x) proměnná není zatížena systematickou chybou
4. Funkce použitá pro fitování je správným matematickým popisem systému. Nesprávné modely dávají nesmyslné parametry.
5. Všechny body v souboru jsou navzájem nezávislé.
6. Máme dostatečné množství dat, takže hledané parametry jsou přeuročené.

Tyto podmínky bývají  
v TCSPC splněné

# Metody vyhodnocování

## Metoda (MEM)

vybereme interval, ve kterém očekáváme, že se doby života budou nacházet  
rozdělíme tento interval na  $n$  částí  
fitujeme podle modelu

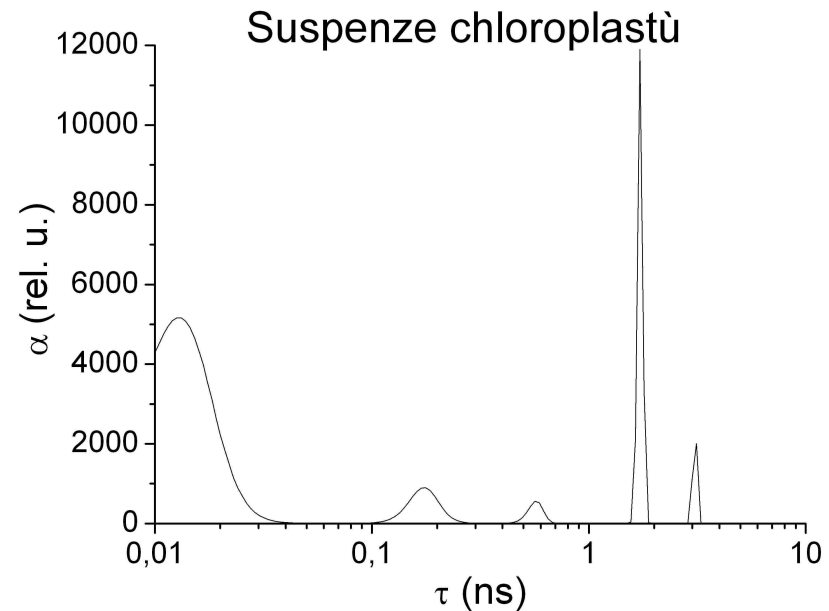
$$\sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}}$$

přičemž  $\tau_i$  jsou dána rozdělením intervalu  
a hledáme pouze  $\alpha_i$ , přičemž hledáme maximum funkce

$$\int_0^{\infty} dt \left( X_{fit}(t) - X_{exp}(t) - X_{fit}(t) \log \left( \frac{X_{fit}(t)}{X_{exp}(t)} \right) \right)$$

Výhodné při analýze složitých systémů

Nepředpokládáme *a priori* počet komponent ani jejich distribuce



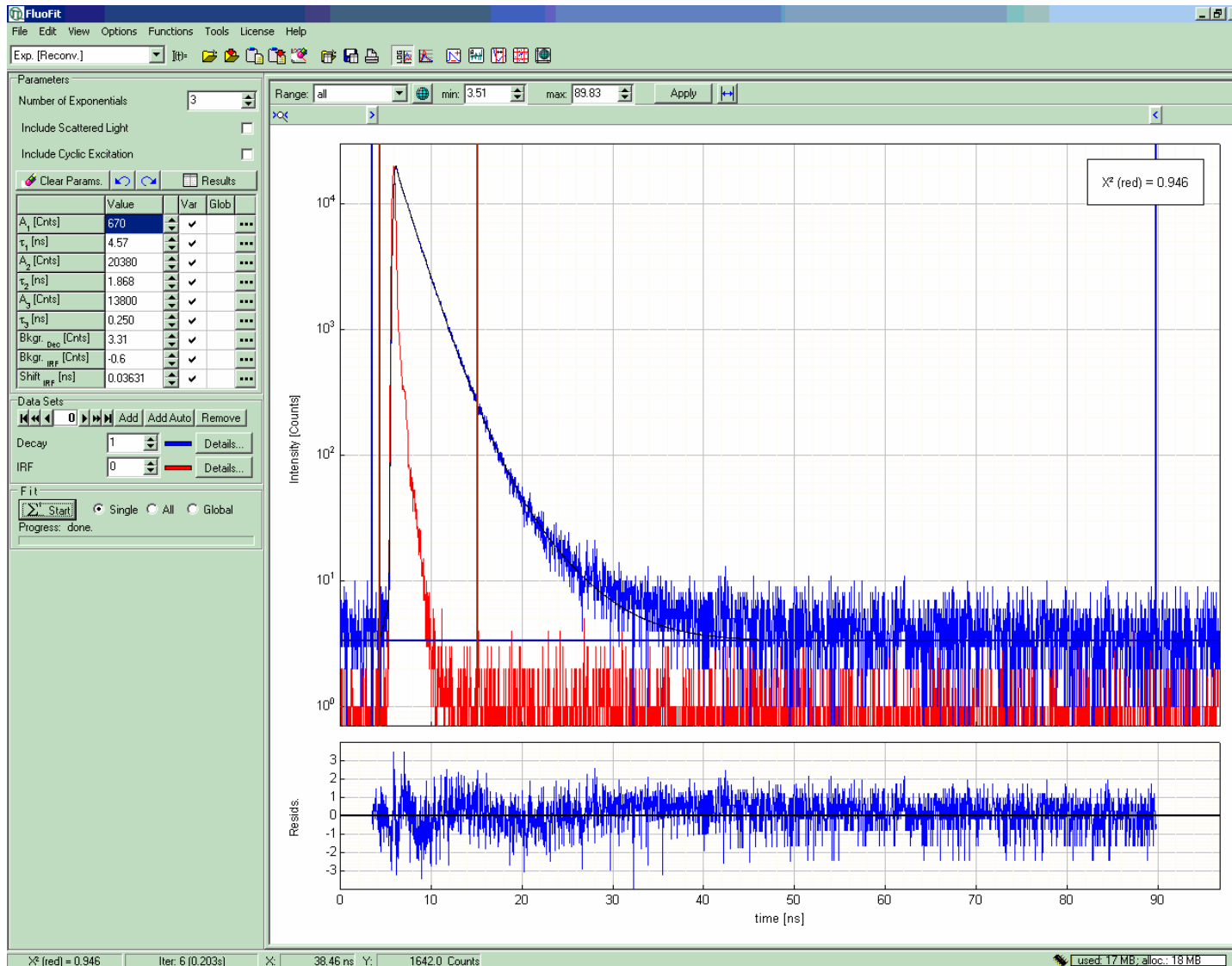
# Kvalita fitu

nej důležitějšími kritérii jsou:

$\chi_R^2$

náhodnost rozložení residuů

$$\chi_R^2 = \frac{1}{N-p} \sum_{i=1}^N \frac{(X_i^{EXP} - X_i^{FIT})^2}{\sigma_i^2} = \frac{1}{N-p} \sum_{i=1}^N \frac{(X_i^{EXP} - X_i^{FIT})^2}{X_i^{EXP}}$$



# Autokorelační funkce

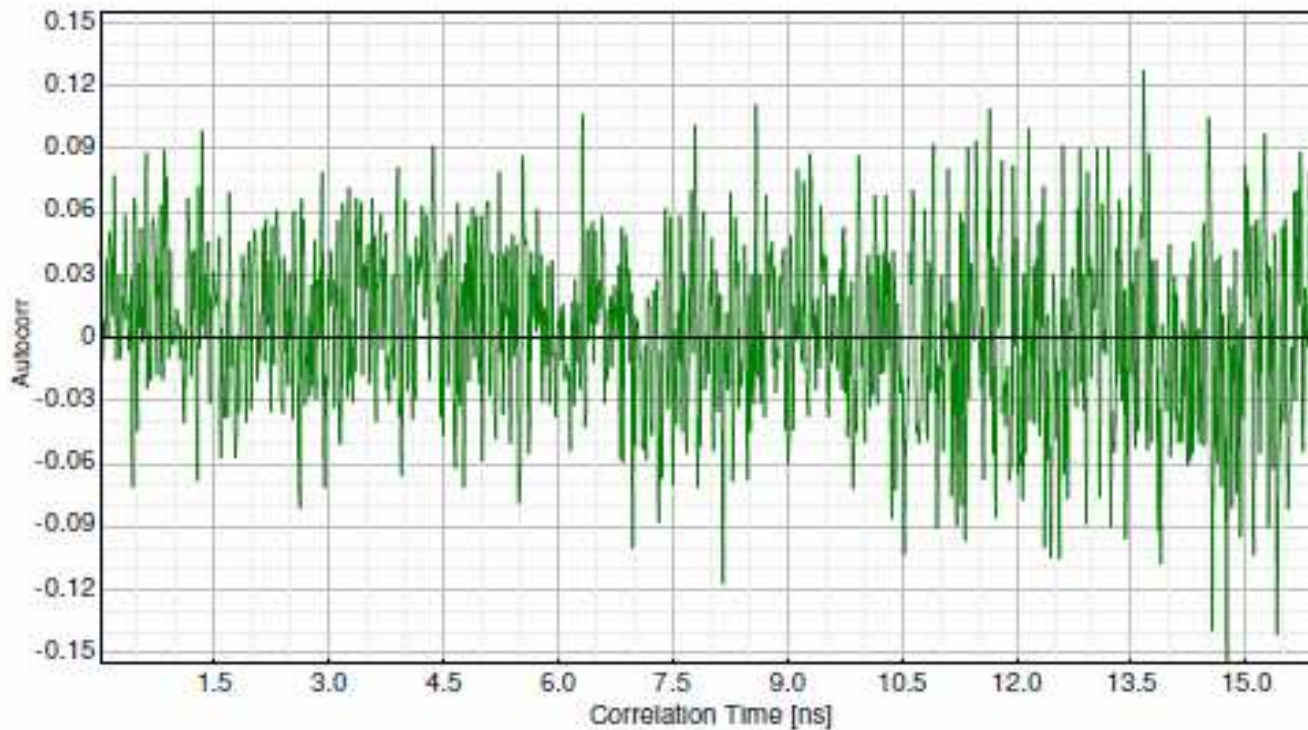
udává, nakolik koreluje odchylka v k-tém bodě s odchylkou v (k+j)-tém bodě

$$C(t_j) = \frac{\frac{1}{m} \sum_{k=1}^m D_k D_{k+j}}{\frac{1}{n} \sum_{k=1}^n D_k^2}$$

$D_k$  ... odchylka v k-tém bodě

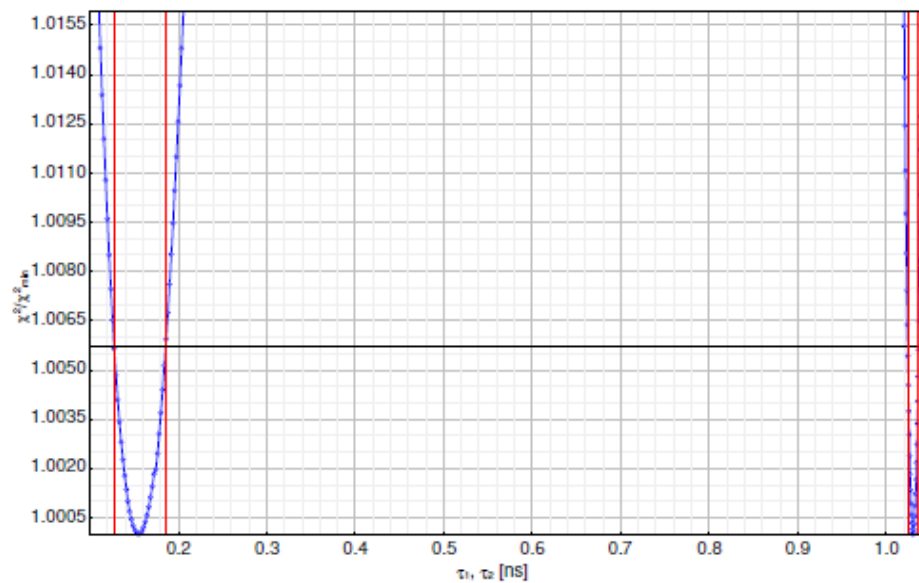
$n$  ... celkový počet kanálů

$m$  ... počet kanálů přes který se počítá autokorelace

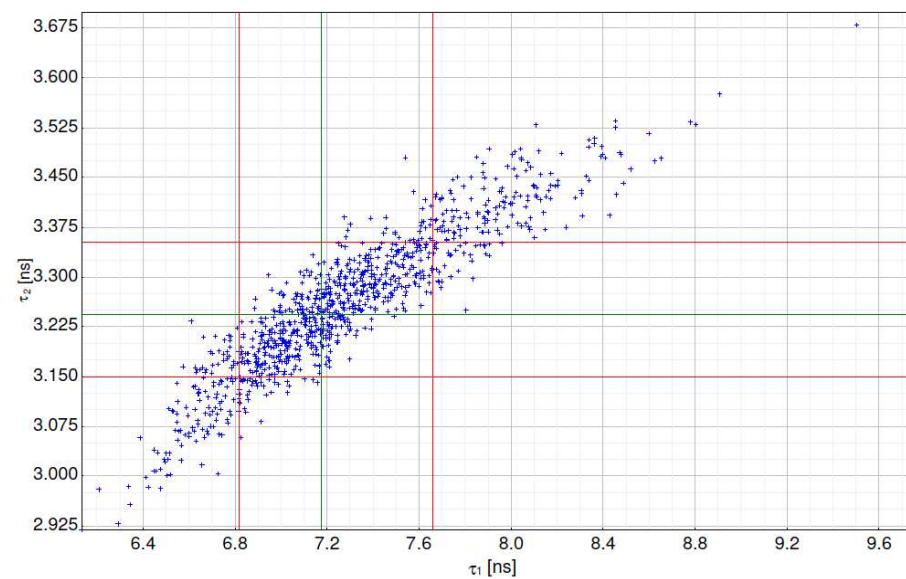


# Provázanost parametrů

Support Plane Analysis

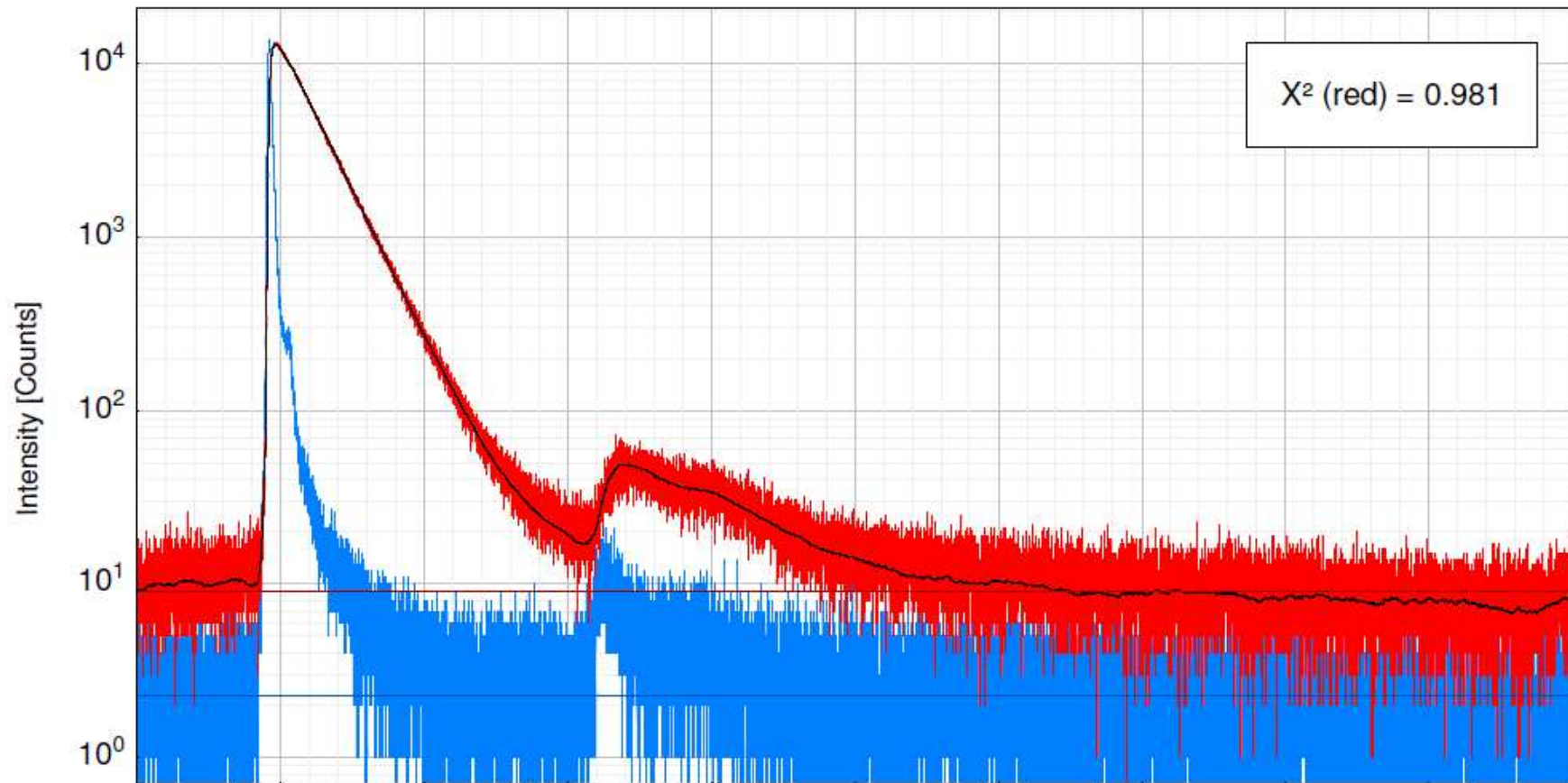


Bootstrap Analysis



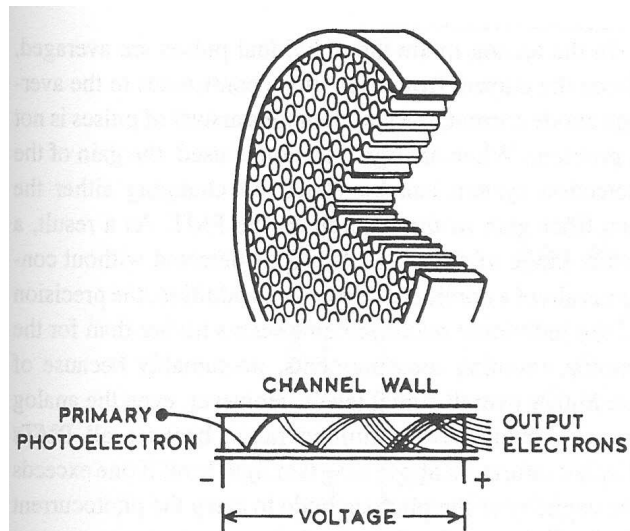
# Detektory

Fotonásobiče (PMT) - levné, transit-time-spread > 100 ps, after-puls





## destičky (MCP PMT)



Lakowicz – Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2.ed., Kluwer/Plenum, 1999

transit-time-spread ~ 30 ps  
menší intenzita afterpulsů  
dražší

## (PD)

velmi levné, ale nemají potřebné zesílení

## fotodiody (APD)

rostoucí popularita, pro některé aplikace nejpoužívanější detektor  
problémem velmi malá aktivní plocha (typicky  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ )  
FWHM pulsu od 20 ps

# kamera (streak camera)

současně zaznamenaná informace o časových charakteristikách a o vlnové délce  
výhodné pro současné zaznamenání celého spektra

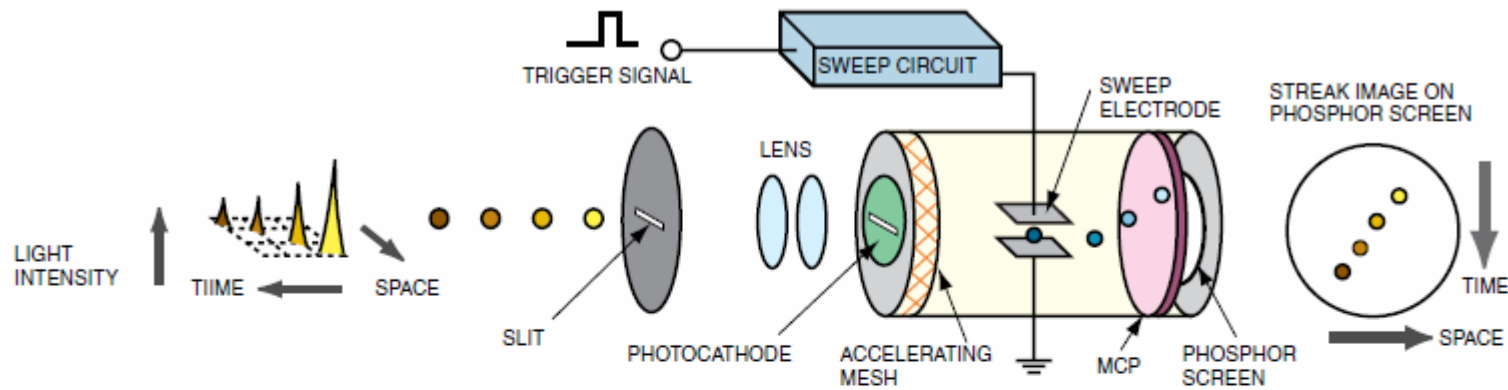


Fig.1 Operating Principle of the Streak Tube

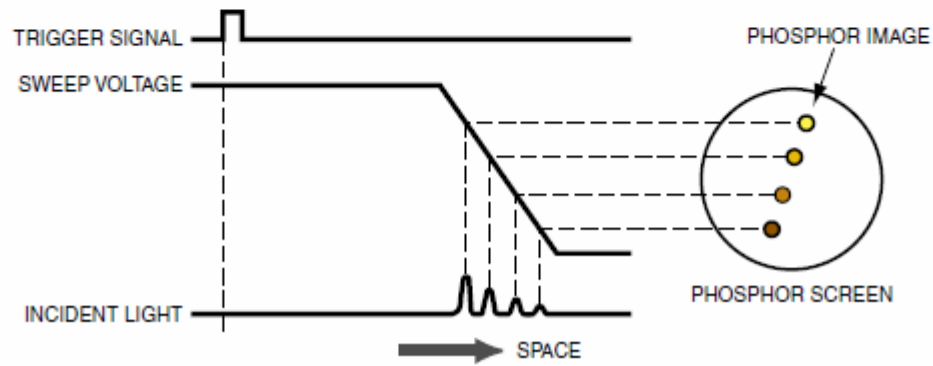
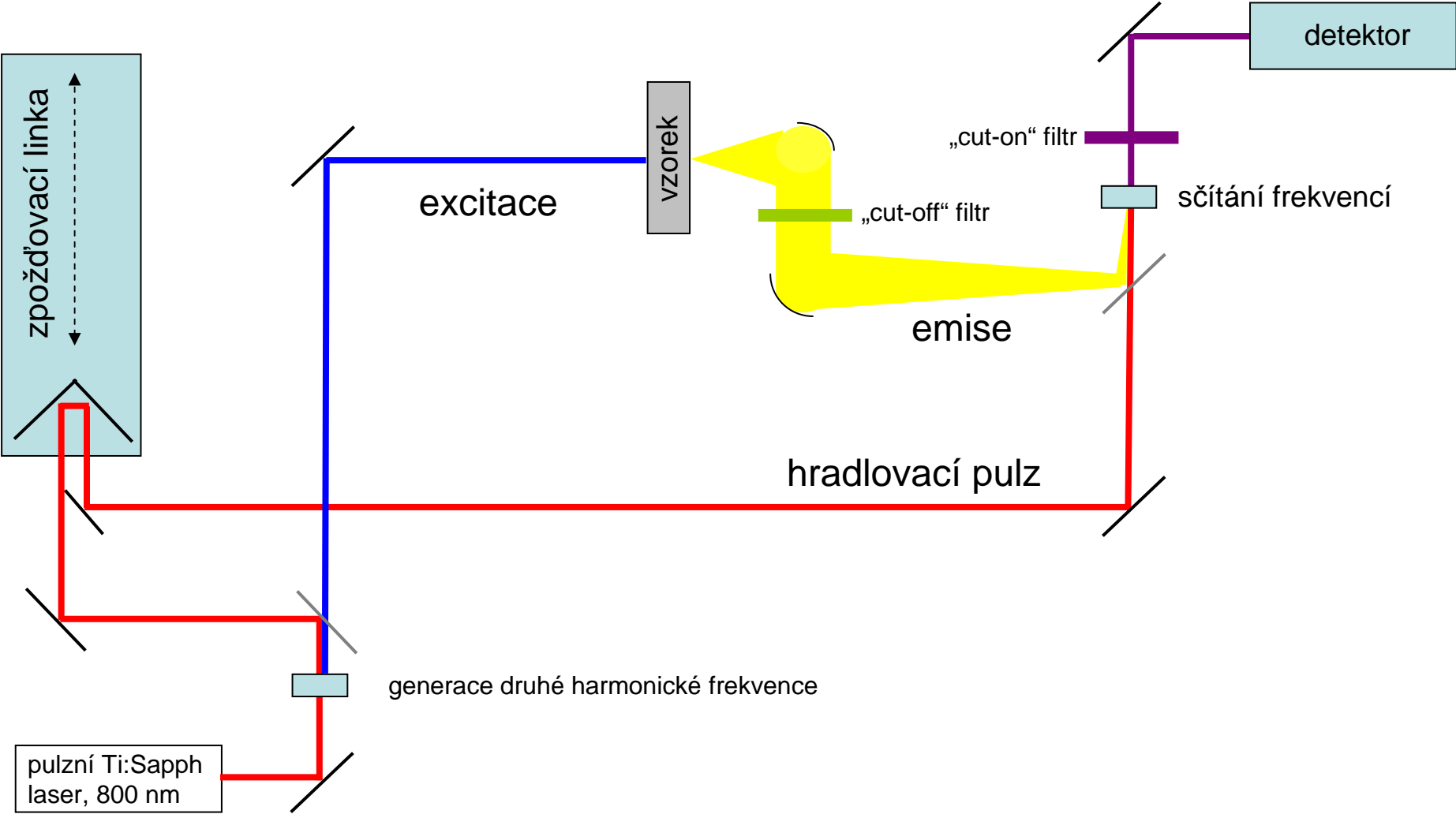


Fig.2 Operation Timing (at time of sweep)



Umožňuje detekci velmi krátkých časů  $< 2 \text{ ns}$   
Rozlišení je dáno šířkou laserového pulsu ( $> 10 \text{ fs}$ )

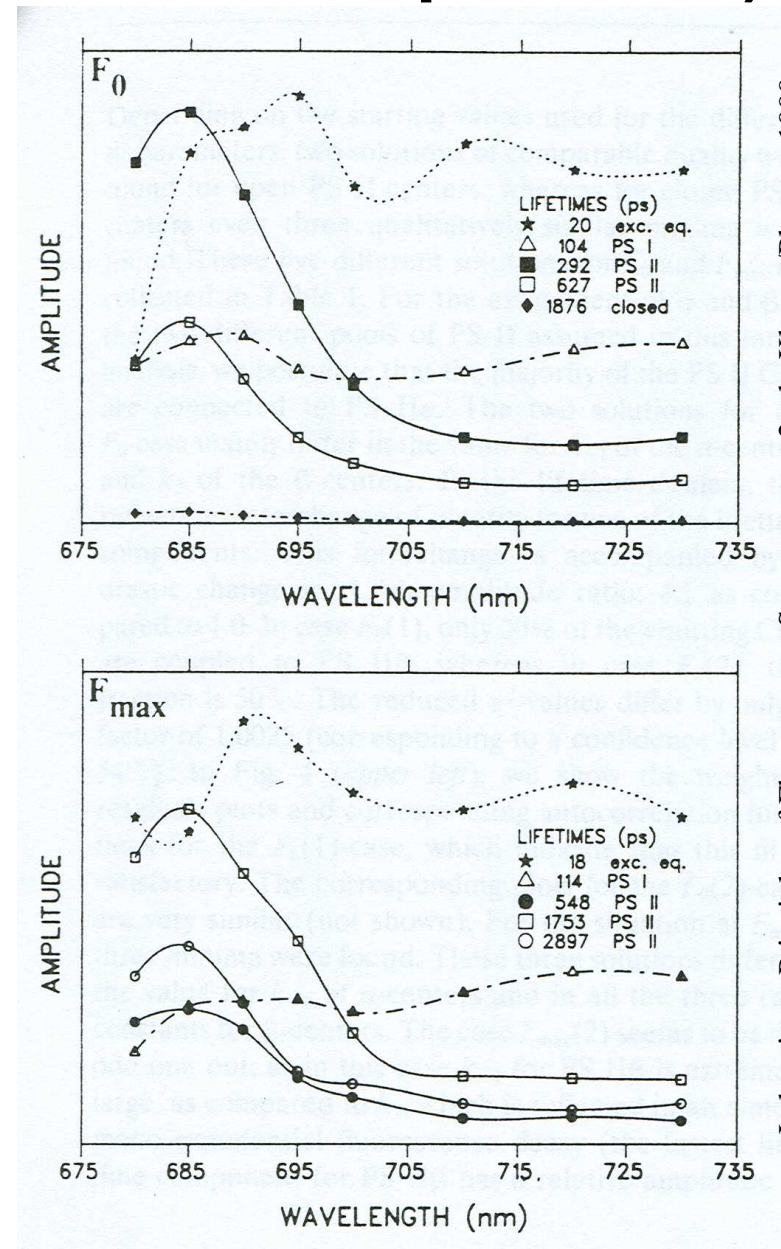
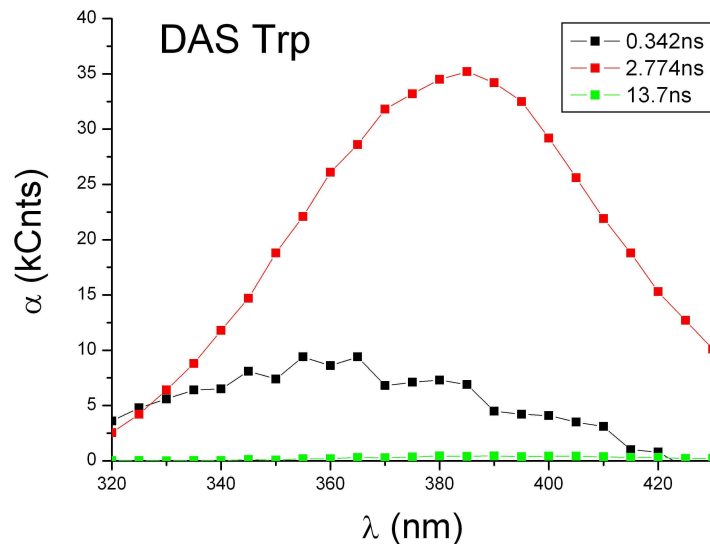


# □ (decay-associated spectra)

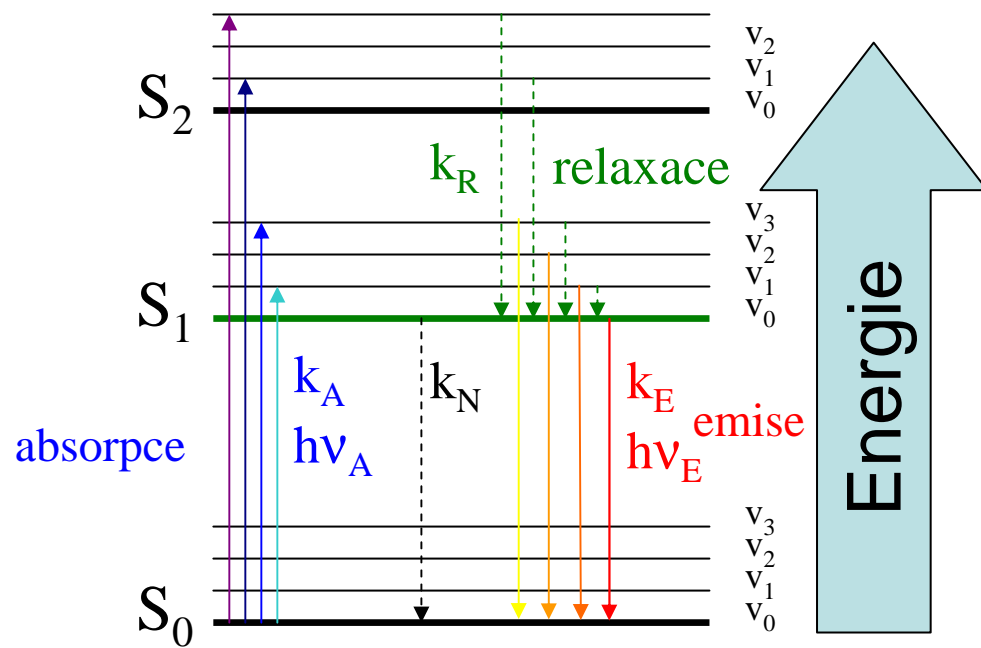
$$I(t, \lambda) = I_0 \sum \alpha_i(\lambda) \exp(-t/\tau_i)$$

Globální analýza

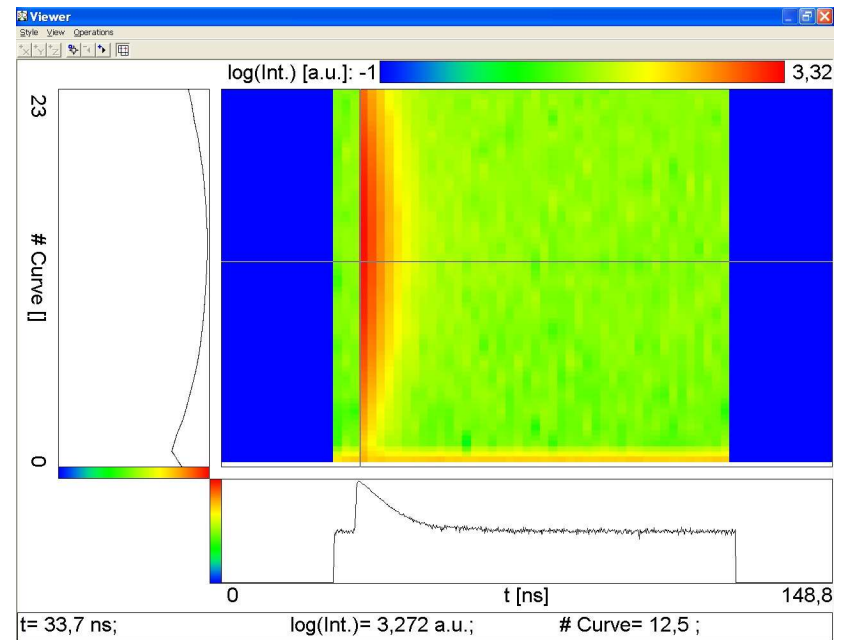
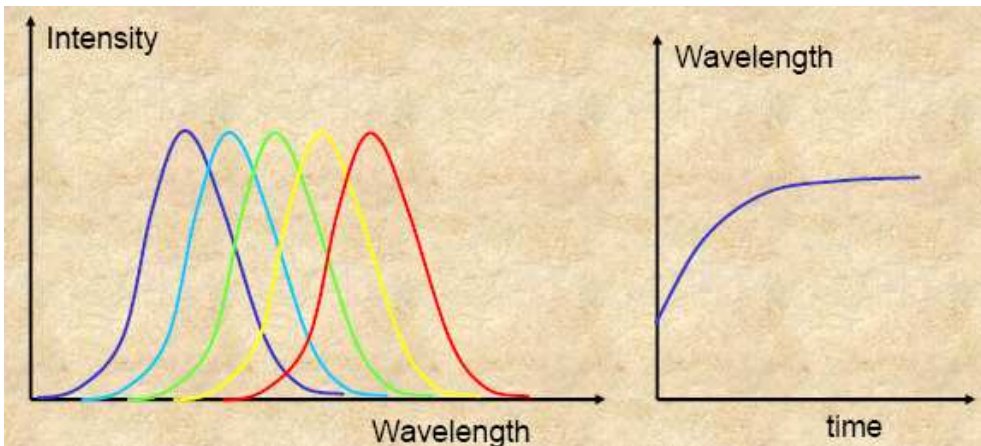
Možnost rozlišení komponent, jejichž emisní spektra se překrývají, ale lifetimes jsou různé.



# (time-resolved emission spectra)



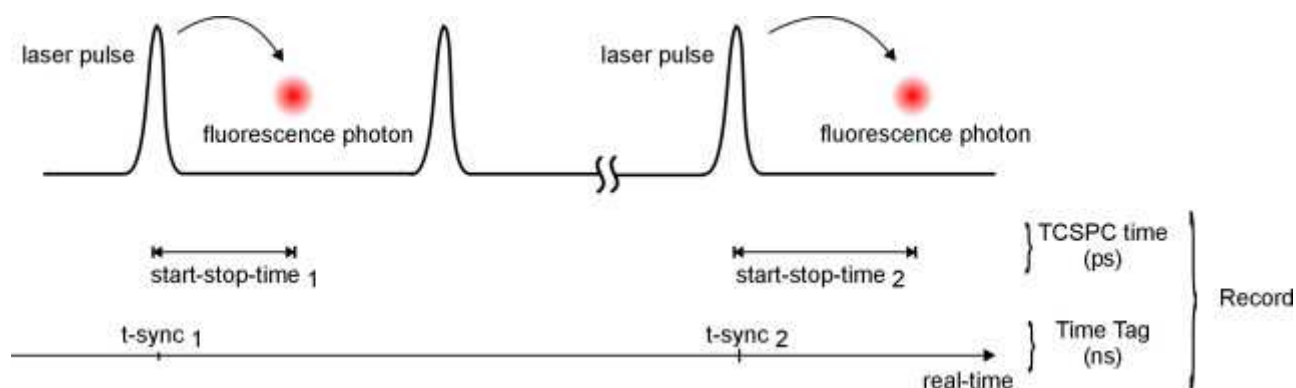
- Excited state protonation-deprotonation
- Electron-transfer ionizations
- Dipolar relaxations
- Twisting-rotations isomerizations
- Solvent cage relaxation
- Quenching
- Dark-states
- Bleaching
- FRET energy transfer
- Monomer-Excimer formation



# (time-tagged-time-resolved)

Je zaznamenáno zpoždění emitovaného fotonu vůči excitačnímu pulzu, ale také doba příletu v absolutní časové škále

To umožňuje sledovat kompletní časový vývoj systému - intenzity i kinetiky dohasínání



Becker&Hickel, The bh TCSPC handbook

# FluoTime 200 (PicoQuant)

Zdroje: pulsní LED 298 nm (10 MHz, 1,8  $\mu$ W)  
pulsní LED 308 nm (10 MHz, 0,9  $\mu$ W)  
pulsní laserová LED 445 nm (40 MHz, 1,8 mW)

Excitační a emisní polarizátor

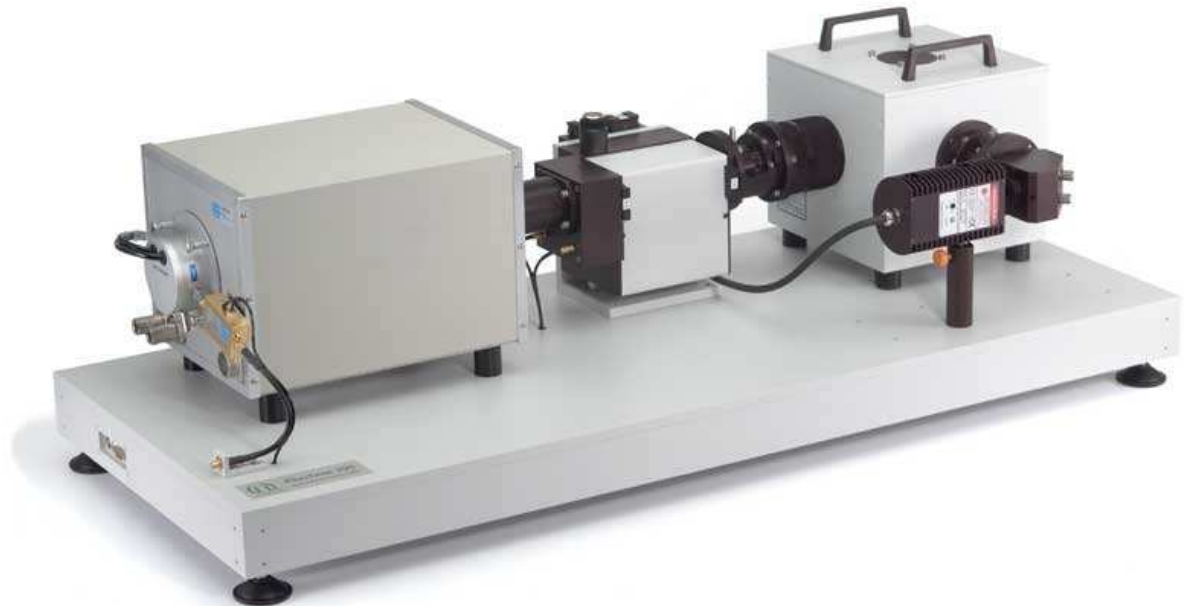
Motorizovaný monochromátor ( $\lambda_{\text{blaze}}=450$  nm)

Fotonásobič PMA-182-P-M (185-820 nm)

PicoHarp 300 (rozlišení 4 ps)

Software: FluoFit Pro 4.2.1 (LSA)

Flame5 (MEM)



# SHRNUTÍ

Měření doby života excitovaného stavu v časové doméně

Excitace **pulzním** zdrojem světla (ideálně  $\delta$ -pulz)

Způsob záznamu kinetiky dohasínání - hradlovaná detekce, **korelované čítání jednotlivých fotonů** (TCSPC), záznam TTTR (time-tagged-time-resolved)

**Analýza dat** - dekonvoluce přístrojové funkce, použití správného modelu, problémy při analýze složitějších systémů, metoda nejmenších čtverců (LSA), metoda maximální entropie

Identifikace správného fitu -  $\chi_R^2$ , **rozložení reziduí, autokorelační funkce**

Detektory - fotonásobiče, MCP, fotodiody, lavinové fotodiody, rozmítací kamery, metoda „up-conversion“

Metody se spektrálním rozlišením - **TRES, DAS**