ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО МЕТРОЛОГИИ

**Р 50.2.099—
2015**

Государственная система обеспечения единства измерений

СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРЫ

Методы коррекции спектров возбуждения и эмиссии и калибровки в единицах квантового выхода

(ASTM E 2719:2009, NEQ)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАНЫ Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений» (ФГУП «ВНИИОФИ»)

2 ВНЕСЕНЫ Техническим комитетом по стандартизации ТК 206 «Эталоны и поверочные схемы»

3 Настоящие рекомендации разработаны с учетом основных нормативных положений стандарта АСТМ Е 2719:2009 «Стандартное руководство по калибровке и аттестации флуоресцентных приборов» (ASTM E 2719:2009 «Standard Guide for Fluorescence — Instrument Calibration and Qualification», NEQ)

4 УТВЕРЖДЕНЫ И ВВЕДЕНЫ В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 октября 2015 г. № 1555-ст

5 ВВЕДЕНЫ ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящих рекомендаций установлены в ГОСТ Р 1.0—2012 (раздел 8). *Информация об изменениях к настоящим рекомендациям публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменения и поправок— в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящих рекомендаций соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, 2016

Настоящие рекомендации не могут быть полностью или частично воспроизведены, тиражированы и распространены в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины, определения и обозначения 1
4 Общие рекомендации по измерению спектров флуоресценции 2
5 Коррекция спектров эмиссии 4
6 Коррекция спектров возбуждения 6
7 Измерение квантового выхода флуоресценции 8
8 Калибровка спектрофлуориметров в единицах квантового выхода 8
Библиография 10

Р Е К О М Е Н Д А Ц И И П О М Е Т Р О Л О Г И И

Государственная система обеспечения единства измерений

СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРЫ

Методы коррекции спектров возбуждения и эмиссии и калибровки в единицах квантового выхода

State system for ensuring the uniformity of measurements. Spectofluorimeters. Methods of correction of excitation and emission spectra and calibration in quantum yield units

Дата введения — 2016—06—01

1 Область применения

Настоящие рекомендации распространяются на спектрофлуориметры и устанавливают способы их калибровки, определения метрологических характеристик и коррекции спектров флуоресценции.

2 Нормативные ссылки

В настоящих рекомендациях использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 8.315 Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения

ГОСТ 7601 Физическая оптика. Термины, буквенные обозначения и определения основных величин

Примечание — При пользовании настоящими рекомендациями целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящих рекомендаций в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения и обозначения

3.1 Термины и определения

В настоящих рекомендациях применены термины по ГОСТ 7601, а также следующие термины с соответствующими определениями.

3.1.1 **калиброванный фотоприемник:** Оптический приемник излучения, чувствительность которого в функции от длины волны была определена с соответствующей неопределенностью.

Издание официальное

3.1.2 **калиброванный диффузный отражатель:** Отражатель Ламберта, коэффициент отражения которого в качестве функции длины волны был определен с соответствующей неопределенностью.

3.1.3 **калиброванный излучатель:** Оптический источник излучения, для которого поток излучения в функции от длины волны определен с соответствующей неопределенностью.

3.1.4 **полоса флуоресценции:** Область спектра флуоресценции, в котором интенсивность проходит через максимум, обычно соответствующий дискретному электронному переходу.

3.1.5 **квантовый выход флуоресценции:** Отношение числа флуоресцентных фотонов, покидающих исследуемый образец, к числу фотонов поглощенных этим образцом.

3.1.6 **спектральная чувствительность фотоприемной системы:** Отношение фототока на выходе фотоприемника к мощности излучения, собираемого оптической системой, на единицу длины волны, обычно выражается в мА/Вт · нм.

3.1.7 **спектральная плотность потока излучения:** Поток излучения на единицу длины волны, обычно выражается в В/нм.

3.2 Обозначения

В настоящих рекомендациях использованы следующие обозначения:

λ — длина волны;

$\Phi(\lambda)$ — спектральная плотность потока (мощности) излучения;

$S(\lambda)$ — выходной сигнал фотоприемника;

$L_e(\lambda)$ — спектральная плотность энергетической яркости;

$\varepsilon(\lambda)$ — спектральная чувствительность;

$C(\lambda)$ — коэффициент спектральной коррекции;

$R(\lambda)$ — коэффициент отражения;

$E(\lambda)$ — спектральная плотность интенсивности эмиссии флуоресценции;

$Q(\lambda)$ — спектральная плотность интенсивности рассеяния;

$A(\lambda)$ — оптическая плотность.

4 Общие рекомендации по измерению спектров флуоресценции

4.1 Выбор и подготовка кювет

Имеются различные типы кювет, которые различаются по размеру и составу материала.

4.1.1 Выбор размера кювет

Стандартные кюветы имеют внутренние размеры $10 \times 10 \times 45$ мм. Если в наличие имеется малое количество образца, то можно использовать микрокюветы. В этом случае рекомендуется использовать черные самомаскирующиеся кварцевые кюветы, так как они не требуют маскировки оптического пучка. При работе с легколетучими или агрессивными веществами кюветы следует закрывать колпачками.

4.1.2 Выбор материала кювет

Состав материала определяет эффективный спектральный диапазон кюветы (см. таблицу 1).

Таблица 1 — Характеристики спектров пропускания материалов кювет

Материал	Область пропускания, нм
Стекло	350—2500
Стекло кварцевое КИ	220—3800
Стекло КУ-1	170—2700
Полистирол	400—1000
Акрил	280—1000

Для определения допустимого для данной кюветы спектрального диапазона следует измерить на спектрофотометре УФ-видимого диапазона спектра пропускания кюветы после заполнения анализируемым раствором. Многие органические жидкости растворяют пластик, так что при работе с ними не следует использовать пластиковые кюветы.

4.1.3 Очистка и хранение кювет

С целью обеспечения высокого качества измерений не следует прикасаться к стенкам кюветы руками без перчаток. Рекомендуется использовать одноразовые перчатки, при этом не допускается наносить на руки тальк или другие порошки. Кюветы после использования промывают несколько раз раствором и хранят в том же растворе. Для длительного хранения кюветы хранят завернутыми в ткань, в герметичной упаковке. Для более тщательной очистки кюветы заполняют кислотой, например 50 %-ной азотной кислотой, и выдерживают в течение нескольких часов. Затем кювету несколько раз промывают деионизированной водой для удаления остатков кислоты.

4.2 Выбор растворителя

4.2.1 Растворитель может изменить форму спектра, расширив пик либо сместив положение спектральных линий. В этой связи следует убедиться в том, что выбранный растворитель не имеет линий или полос поглощения либо флуоресценции в предполагаемом для исследований спектральном диапазоне. Для этого рекомендуется провести измерение спектров поглощения и флуоресценции растворителя в этом диапазоне. При этом выявится также положение полос комбинационного (рамановского) рассеяния и паразитных линий, обусловленных дифракционными эффектами второго порядка на решетке монохроматора.

Важно периодически проверять качество растворителя, так как даже малых следов загрязнения может быть достаточно для получения высокого сигнала фонового раствора.

4.2.2 Необходимо использовать деионизированную дистиллированную воду. Все другие реагенты, используемые в ходе анализа, тщательно контролируют. Рекомендуется использование растворителя высокого качества или специальных растворителей для спектрофотометрии.

4.2.3 Растворители не подлежат хранению в пластиковых контейнерах, так как возможно выщелачивание органических добавок и пластификаторов, что приводит к высокому сигналу фонового раствора.

4.2.4 Фоновые растворы реагентов измеряют в процессе проведения анализа и фактическое значение фонового раствора определяют перед обнулением прибора.

4.3 Источники загрязнения растворов

4.3.1 Моющие средства

Для очистки посуды, как правило, в ней выдерживают растворы различных моющих средств, некоторые из которых могут сильно флуоресцировать. Перед использованием моющего средства необходимо измерить спектры флуоресценции его разбавленных растворов для того, чтобы выявить возможность искажения исследуемых спектров флуоресценцией остатков моющего средства.

4.3.2 Смазочные материалы

Возможным загрязнителем являются смазочные материалы, используемые для смазки кранов, и переносимые жидкостью, на пути которой эти краны установлены.

4.3.3 Фильтровальная бумага и лабораторные салфетки

Фильтровальная бумага и лабораторные салфетки могут быть источниками загрязнений из-за остатков флуоресцирующих веществ. Подлежат проверке перед использованием.

4.4 Работа с разбавленными растворами

Как правило, растворы (основные растворы) для построения градуировочного графика хранят концентрированными, а непосредственно перед использованием их разбавляют до требуемой концентрации.

Перед разбавлением основного раствора рекомендуется определить его концентрацию, измерив на спектрофотометре значение его оптической плотности на одной или нескольких характерных длинах волн. Градуировочные растворы для флуоресцентного анализа не подлежат хранению в течение длительного периода времени. Для обеспечения точности измерений оптической плотности рекомендуется для каждого градуировочного раствора проводить не менее двух или трех параллельных измерений.

При работе с разбавленными растворами необходимо также учитывать следующие эффекты:

- адсорбцию, потерю флуоресцирующего вещества за счет адсорбции на стенках кюветы, которая может происходить при низких уровнях концентрации. Стеклянные поверхности должны быть тщательно очищены кислотой перед использованием;

- фотодеградацию и окисление. Интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна интенсивности падающего света, флуоресцентные приборы используют высокоинтенсивные источники света для получения высокой чувствительности. В некоторых случаях уровень возбуждающего света может

быть достаточным для разложения образца в ходе исследования в этой связи измерения следует проводить как можно быстрее;

- наличие следов окисляющих веществ, например растворенного кислорода или пероксидов, могут уменьшить интенсивность флуоресценции.

4.5 Выбор оптимальной длины волны

Для выбора подходящей полосы возбуждения флуоресценции измеряют спектр поглощения образца спектрофотометром УФ-видимого диапазона для определения максимума оптической плотности и установления возможных помех, обусловленных поглощением или рассеянием на аналитической длине волны. Оптимальной является, как правило, та длина волны, на которой происходит самое сильное поглощение и которая свободна от вмешательства других компонентов, включая растворитель. В обоснованных случаях выбирают длину волны, на которой имеет место меньшее поглощение, чтобы устранить помехи от других соединений, которые поглощают вблизи максимума, или чтобы избежать фотообесцвечивания.

4.6 Выбор спектральной ширины щели

В идеале, для получения наилучшего отношения сигнал — шум выбирают как можно более широкую щель, позволяющую селективно выделить выбранную аналитическую линию (полосу).

5 Коррекция спектров эмиссии

5.1 Общие рекомендации

Спектральная коррекция эмиссии необходима для получения аппаратно-независимых спектров в тех случаях, когда необходима истинная форма спектров или спектральных линий, включая отношение интенсивностей эмиссии на разных длинах волн. Для осуществления такой коррекции необходима калибровка эмиссионного канала спектрофлуориметра, т. е. установление функции его спектральной чувствительности. Основные методы калибровки приведены в таблице 2.

Таблица 2 — Методы калибровки эмиссионных каналов спектрофлуориметров

Средство калибровки	Возможность установки в виде стандартной флуорометрической кюветы	Точность	Ограничение	Источник информации
Калиброванный излучатель	Нет	< ±5 %	Трудность установки	[1]—[3]
Калиброванный фотоприемник + + калиброванный отражатель	Нет	±10 %	Трудность установки	[1]—[3]
Стандартные образцы	Да	±5 %		[4]—[6]

Перед калибровкой эмиссионного канала рекомендуется проверить линейный диапазон фотоприемной системы. Проверка может быть проведена, например, на основе рекомендаций [7] — это гарантирует, что все измеренные во время этой калибровки интенсивности находятся в пределах линейного диапазона. Следует также иметь в виду, что результаты калибровки эмиссионного канала зависят от наличия или отсутствия поляризатора в его оптической системе.

5.2 Спектральная калибровка эмиссионного канала с использованием калиброванного излучателя

В качестве калиброванного излучателя (КИ) может быть использована светоизмерительная лампа накаливания. Предпочтительной для видимого диапазона является вольфрамовая, благодаря широкой спектральной характеристике, не имеющей каких-либо особенностей и высокой интенсивности излучения.

Оптическое излучение КИ при помещении его на место образца направляется в эмиссионный канал. Если габариты КИ не позволяют это сделать, на место образца помещают калиброванный диффузный отражатель (КДО), который отражает падающее на него излучение и направляет его в эмиссионный канал. Затем проводят сканирование выбранного спектрального интервала монохроматором эмиссионного канала, с теми же настройками прибора, которые используют при работе с образцами.

При этом измеряют выходной сигнал эмиссионного канала $S_{КИ}(\lambda)$. Зная спектральную плотность энергетической яркости излучения КИ $L_{е.\ КИ}(\lambda)$, рассчитывают коэффициент спектральной коррекции

$$C_{ЭМ}(\lambda) = L_{КИ}(\lambda)/S_{КИ}(\lambda). \quad (1)$$

Скорректированный спектр эмиссии равен произведению этого коэффициента на выходной сигнал, полученный от образца $S_{эм.\ обр}(\lambda)$.

Определенный таким образом коэффициент коррекции пропорционален относительной спектральной чувствительности эмиссионного канала $\varepsilon_{эм}(\lambda)$ и она зависит прежде всего от свойств дифракционной решетки и ФЭУ. Пример зависимости $\varepsilon_{эм}(\lambda)$ приведен на рисунке 1.

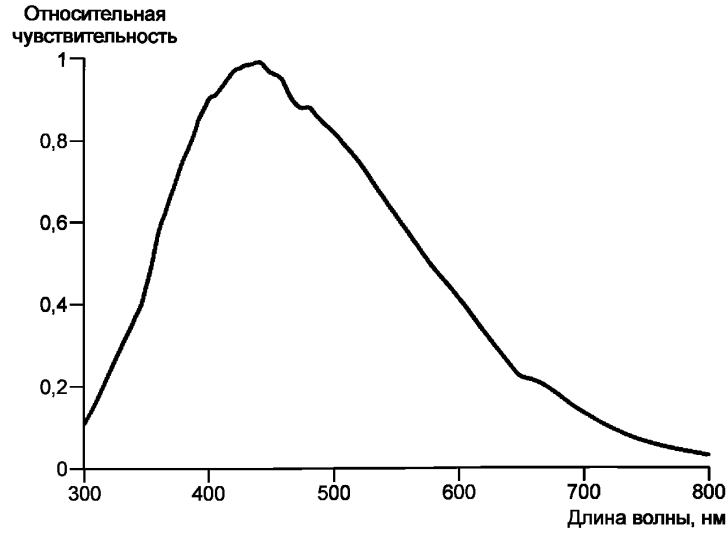


Рисунок 1 — Пример функции относительной спектральной чувствительности эмиссионного канала спектрофлуориметра

5.3 Спектральная калибровка эмиссионного канала с использованием калиброванного фотоприемника и калиброванного отражателя

Метод спектральной калибровки эмиссионного канала с использованием калиброванного фотоприемника и калиброванного отражателя состоит из операций, приведенных ниже.

5.3.1 Измерение потока излучения, падающего на образец (возбуждающего излучения) $\Phi_{возб}(\lambda)$, с использованием калиброванного фотоприемника, или фотоприемника опорного канала, для которого предварительно была определена спектральная чувствительность $\varepsilon_{опорн}(\lambda)$ (раздел 6)

5.3.2 Определение спектральной чувствительности эмиссионного канала с использованием калиброванного отражателя.

На место образца под углом 45° к возбуждающему пучку устанавливают отражатель с известной зависимостью коэффициента отражения от длины волны $R_{отр}(\lambda)$ (калиброванный отражатель), при этом отраженное излучение попадает в эмиссионный канал спектрофлуориметра. Проводят синхронное сканирование в выбранном спектральном интервале при равенстве длин волн возбуждения и эмиссии и измеряют сигнал в измерительном канале $S_{изм}(\lambda)$. Если спектральная чувствительность фотоприемника опорного канала $\varepsilon_{опорн}(\lambda)$ была определена по 5.3.1, то измеряют также сигнал в опорном канале $S_{опорн}(\lambda)$. Если поток излучения, падающего на образец $\Phi_{возб}(\lambda)$, был определен с использованием калиброванного фотоприемника (см. 6.2.1—6.2.2), то относительную спектральную чувствительность эмиссионного канала вычисляют по формуле

$$\varepsilon_{эм}(\lambda) = \Phi_{возб}((\lambda)\ R_{отр}\ (\lambda)])/S_{изм}(\lambda). \quad (2)$$

Если предварительно была определена спектральная чувствительность фотоприемника опорного канала $\varepsilon_{опорн}$ по 6.3.2, то относительную спектральную чувствительность эмиссионного канала вычисляют по формуле

$$\varepsilon_{эм}(\lambda) = [\ \varepsilon_{опорн}(\lambda) \cdot S_{опорн}(\lambda)\ R_{отр}\ (\lambda)]]/S_{изм}(\lambda). \quad (3)$$

5.4 Спектральная калибровка эмиссионного канала с использованием стандартных образцов

5.4.1 В настоящее время для калибровки спектрофлуориметров доступны стандартные образцы (меры) флуоресценции либо в виде растворов органических красителей, либо в виде имитаторов кювет из твердых неорганических стекол. Такие образцы выпускают национальные метрологические институты, их аттестованными характеристиками являются спектры эмиссии в определенном спектральном интервале — $E_{атт}(\lambda)$. В документации на эти стандартные образцы с шагом по шкале длин волн в 1 или 5 нм приводят значения относительной интенсивности и соответствующие им неопределенности. В 2015 году для тех же целей утвержден ГСО 10560, аттестуемой характеристикой которого является относительная спектральная эффективность рассеяния света наносферами двуокиси кремния $Q_{атт}(\lambda)$ в диапазоне длин волн от 350 нм до 700 нм.

5.4.2 Калибровку эмиссионного канала с помощью стандартных образцов или мер флуоресценции проводят в следующем порядке:

- помещают стандартный образец на место кюветы в калибруемый спектрофлуориметр и измеряют его спектр эмиссии $E_{эксп}(\lambda)$, при этом диапазон длин волн эмиссии, длина волны возбуждения и спектральная ширина щелей должны совпадать с указанным в документации на стандартный образец;
- вычисляют коэффициент спектральной коррекции по формуле

$$C_{CO} = E_{эксп}(\lambda)/E_{атт}(\lambda). \quad (4)$$

5.4.3 Калибровку эмиссионного канала с помощью стандартного образца относительной спектральной эффективности рассеяния света наносферами двуокиси кремния (ГСО 10560) проводят в следующем порядке:

- измеряют одним из способов, приведенным в 6.2, поток излучения падающего на образец $\Phi_{возб}(\lambda)$, в требуемом спектральном интервале;
- измеряют спектр рассеяния стандартного образца $Q_{эксп}(\lambda)$ в том же спектральном интервале в режиме синхронного сканирования;
- вычисляют относительную спектральную чувствительность по формуле

$$\varepsilon(\lambda) = Q_{атт}\ (\lambda)/[(Q_{эксп}(\lambda) \cdot \Phi_{е.\ возб}(\lambda). \quad (5)$$

6 Коррекция спектров возбуждения

6.1 Общие рекомендации

Коррекция спектров возбуждения необходима для успешного качественного и количественного анализа, когда существенны отношения интенсивностей на различных длинах волн возбуждения, истинная форма спектральных линий или положения максимумов пиков в спектрах возбуждения.

Для осуществления коррекции необходима калибровка канала возбуждения спектрофлуориметра, т. е. определение потока возбуждающего излучения в функции от длины волны $\Phi_{е.\ возб}(\lambda)$. Этот поток может быть определен в абсолютных или относительных единицах, соответственно различают абсолютную или относительную калибровку канала возбуждения. Основные методы калибровки приведены в таблице 3.

Таблица 3 — Методы калибровки каналов возбуждения спектрофлуориметров

Средство калибровки	Возможность установки в виде стандартной флуорометрической кюветы	Точность	Ограничение
Калиброванный кремниевый фотодиод	Есть только у специальной модели	±2 %	Трудность установки
Квантовый счетчик	Да	±5 %	Ограниченный диапазон
Некалиброванный кремниевый фотодиод	Нет	≤ ±50 %	—

Результаты калибровки канала возбуждения зависят от наличия или отсутствия поляризатора в его оптической системе.

Пренебрежение коррекцией спектров возбуждения приводит, как правило, к большим ошибкам, чем пренебрежение коррекцией спектров эмиссии.

6.2 Калибровка канала возбуждения с помощью калиброванного кремниевого фотодиода

6.2.1 Калиброванный кремниевый фотодиод устанавливают на место образца в кюветное отделение. Проводят сканирование спектра возбуждения и измеряют в требуемом спектральном интервале выходные сигналы $S_{калиб}(\lambda)$ — от фотодиода.

6.2.2 Вычисляют поток возбуждающего излучения $\Phi_{е\ возб.}$ по формуле

$$\Phi_{е.\ возб.}(\lambda) = S_{калиб}(\lambda)/\varepsilon_{калиб}(\lambda), \quad (6)$$

где $\varepsilon_{калиб}(\lambda)$ — спектральная чувствительность калиброванного фотоприемника.

6.2.3 Для измерения интенсивности возбуждающего излучения может быть использован также предварительно откалиброванный опорный фотоприемник спектрофлуориметра. Для калибровки этого фотоприемника на место образца устанавливают калиброванный фотоприемник с известной спектральной чувствительностью $\varepsilon_{калиб}(\lambda)$ и измеряют в требуемом спектральном интервале выходные сигналы $S_{калиб}(\lambda)$ — от калиброванного фотоприемника и $S_{опорн}(\lambda)$ — от фотоприемника опорного канала. Функцию спектральной чувствительности фотоприемника опорного канала рассчитывают как

$$\varepsilon_{опорн}(\lambda) = \varepsilon_{калиб}(\lambda) \cdot S_{калиб}(\lambda)/S_{опорн}(\lambda). \quad (7)$$

6.3 Калибровка канала возбуждения с помощью квантового счетчика

6.3.1 Квантовые счетчики представляют собой раствор концентрированного красителя, который поглощает все фотоны, падающие на него, и имеет спектр эмиссии, форма и интенсивность которого не меняются с длиной волны возбуждения в достаточно широком спектральном интервале. Этот раствор в кварцевой кювете помещают на место образца.

6.3.2 Если в калибруемом приборе имеется возможность фронтального возбуждения и наблюдения флуоресценции, то может быть использована стандартная флуорометрическая кювета и нормальное падение возбуждающего излучения. Если наблюдение флуоресценции возможно только под углом 90°, используют кювету в форме прямоугольного треугольника, при этом возбуждающий луч направляют на гипотенузу при угле падения 45°, а один из катетов обращен к фотоприемнику.

6.3.3 Для калибровки канала возбуждения с помощью квантового счетчика проводят сканирование длины волны возбуждения в интересующей области спектра при длине волны эмиссии, зафиксированной на длинноволновой границе полосы эмиссии используемого красителя. Измеряют интенсивность сигнала флуоресценции квантового счетчика $S_{КС}(\lambda)$. Из названных выше свойств квантового счетчика следует, что

$$\Phi_{е.\ возб}(\lambda) = K \cdot S_{КС}(\lambda), \quad (8)$$

где K — коэффициент пропорциональности, не зависящий от длины волны.

Таким образом, квантовые счетчики позволяют проводить относительную калибровку каналов возбуждения.

6.3.4 Измерение спектров возбуждающего излучения может быть также проведено с использованием фотоприемника опорного канала спектрофлуориметра. Для этого необходимо измерять интенсивность сигнала этого фотоприемника $S_{опорн}(\lambda)$ одновременно с интенсивностью сигнала флуоресценции квантового счетчика $S_{КС}$. По результатам этих измерений вычисляют коэффициент спектральной коррекции для опорного канала

$$C_{опорн}(\lambda) = S_{КС}(\lambda)/S_{опорн}(\lambda). \quad (9)$$

6.3.5 Каждый квантовый счетчик имеет ограниченный спектральный диапазон, например родамин *B* позволяет достичь приемлемой неопределенности в диапазоне от 250 до 600 нм. Вне этого диапазона, интенсивность падает и неопределенность увеличивается. Интенсивность сигнала флуоресценции квантового счетчика $S_{КС}$ будет пропорционален потоку через образец числа фотонов, а не потоку в единицах мощности. Кроме того, квантовый счетчик подвержен поляризации и геометрическим эффектам, зависящим от концентрации. Спектральный диапазон и соответствующая неопределенность квантового счетчика должны быть заранее установлены.

7 Измерение квантового выхода флуоресценции

7.1 Общие замечания

7.1.1 Квантовый выход флуоресценции (КВФ) определяется как отношение количества испускаемых фотонов к числу поглощенных фотонов. Эта величина является неотъемлемым свойством конкретного вещества в конкретной среде (растворителе).

7.1.2 КВФ флуорофора может существенно зависеть от свойств растворителя, таких, как полярность, температура, вязкость, pH, присутствие потенциальных гасителей флуоресценции (например, ионов тяжелых металлов)

7.1.3 Известны абсолютные методы измерения КВФ, требующие использования, наряду со спектрофлуориметром, достаточно сложного дополнительного оборудования — интегрирующей сферы или гониометра. В настоящих рекомендациях эти методы не рассматриваются.

7.2 Измерение квантового выхода флуоресценции относительными методами

7.2.1 Для реализации относительного метода измерения КВФ используют стандартный образец или образец сравнения, содержащий разбавленный флуорофор. Значение КВФ для этого образца должно быть известно с точностью не хуже 3 %—5 %. Необходимо также знать показатели преломления анализируемого образца и стандартного образца (образца сравнения) при длинах волн, соответствующих максимумам спектров эмиссии — $n_{анал}$ и $n_{станд}$. Часто в качестве стандартных образцов или образцов сравнения для измерения КВФ относительным методом используют растворы сульфата хинина в серной или хлористоводородной кислоте.

7.2.2 Для реализации относительного метода необходимо:

- измерить на спектрофотометре оптическую плотность на длинах волны возбуждения для анализируемого образца $A_{анал}(\lambda_{возб.\,A})$ и стандартного образца (образца сравнения) $A_{станд}(\lambda_{возб.\,C})$;

- измерить на спектрофлуориметре спектры эмиссии для анализируемого образца и стандартного образца (образца сравнения) и провести их спектральную коррекцию в соответствии с разделом 5. Для скорректированных спектров эмиссии вычислить интегральные значения эмиссии анализируемого и стандартного образцов $\int_{\lambda_{1A}}^{\lambda_{2A}} E_{анал}(\lambda)d\lambda$ и $\int_{\lambda_{1C}}^{\lambda_{2C}} E_{станд.}(\lambda)d\lambda$,

где λ_1 и λ_2 — спектральные границы полосы флуоресценции, для которой вычисляется квантовый выход;

- измерить с помощью калиброванного фотоприемника потоки возбуждающего излучения на длинах возбуждения стандартного и анализируемого образцов — $\Phi_e(\lambda_{возб.\,A})$ и $\Phi_e(\lambda_{возб.\,C})$;

- вычислить значение КВФ для анализируемого образца по формуле

$$F_{анал} = F_{станд} \cdot \frac{A_{станд}(\lambda_{возб.C})}{A_{анал}(\lambda_{возб.A})} \cdot \frac{\Phi_e(\lambda_{возб.C})}{\Phi_e(\lambda_{возб.A})} \cdot \left(\frac{n_{анал}(\lambda)}{n_{станд}(\lambda)}\right)^2 \cdot \frac{\int_{\lambda_{1A}}^{\lambda_{2A}} E_{анал}(\lambda)d\lambda}{\int_{\lambda_{1C}}^{\lambda_{2C}} E_{станд}(\lambda)d\lambda}. \quad (10)$$

8 Калибровка спектрофлуориметров в единицах квантового выхода

8.1 Настоящий метод является альтернативой рассмотренным в разделе 7 методам измерения КВФ.

8.2 Для калибровки требуется один стандартный образец (образец сравнения) с известным значением квантового выхода $F_{станд}$. При заданной длине волны возбуждения $\lambda_{возб.\,C}$ и с известной зависимостью показателя преломления от длины волны $n_{станд}(\lambda)$ в том же спектральном диапазоне, в котором был определен квантовый выход.

8.3 Для калибровки в единицах квантового выхода необходимо:

- измерить в соответствии с 6.2 поток возбуждающего излучения, падающего на образец $\Phi_{е.\,возб}(\lambda)$;

- определить функцию спектральной коррекции эмиссионного канала $C_{эм}(\lambda)$ в соответствии с 5.4;

- измерить спектр эмиссии стандартного образца $E_{станд}(\lambda)$ в том же спектральном диапазоне и при той же длине волны возбуждения, при которой было определено аттестованное значение его квантового выхода;

- измерить на спектрофотометре оптическую плотность стандартного образца на длине волны возбуждения $A(\lambda_{возб.\,0})$;
- вычислить постоянную прибора по формуле

$$K = F_0 \frac{\lambda_{возб}}{\lambda_э} \cdot [n(\lambda_{эт.})]^2 \cdot \frac{[1-10^{-A(\lambda_{возб})}]\Phi_{ex}(\lambda_{ex})}{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \frac{E(\lambda)}{C_{эм}(\lambda)} d\lambda}. \quad (11)$$

Через эту постоянную можно выразить квантовый выход неизвестного образца, для которого определены:
- поток излучения, падающего на образец $\Phi_x(\lambda)$;
- скорректированный спектр эмиссии $E_x(\lambda)$;
- оптическая плотность на длине волны возбуждения, A_x;
- зависимость показателя преломления от длины волны $n_x(\lambda)$.

Вычисление квантового выхода производят по формуле

$$F = \frac{K}{[n(\lambda)]^2} \cdot \frac{\lambda_{возб}}{\lambda_{эм}} \cdot \frac{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \frac{E(\lambda)}{C(\lambda)} d\lambda}{[1-10^{-A(\lambda_{возб})}] \cdot \Phi_{е.возб}(\lambda_{возб})}. \quad (12)$$

Библиография

[1] Калибровка спектрофлуориметра для измерения истинных спектров (Fluorescence DeRose, P.C, Early, E.A., and Kramer, G.W., «Qualification of a Fluorescence Spectrometer for Measuring True Fluorescence Spectra, *Review of Scientific Instruments*, Vol 78, Article 033107, 2007)

[2] Прослеживаемость в флуориметрии — Часть II: Стандарты спектров флуориметрии (Hollandt, J., Taubert, R.D., Seidel, J., Resch-Genger, U., Gugg-Helminger, A., et al., «Traceability in Fluorometry — Part I: Physical Standards,» *J. Fluoresc.*, Vol 15, 2005, p. 301; (b) Resch-Genger, U., Pfeifer, D., Monte, C., Pilz,W., Hoffmann, A., et al., «Traceability in Fluorometry — Part II: Spectral Fluorescence Standards,» *J. Fluoresc.*, Vol 15, 2005, p. 315)

[3] Основы спектроскопии флуориметрии (Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999, pp. 51—52), перевод Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии, М, изд-во «Мир», 1986

[4] Сертификат анализа стандартных образцов (Certificate of Analysis, Certified Reference Materials BAM-F001-BAM-F005, Calibration Kit, Spectral Fluorescence Standards, Federal Institute for Materials Research and Testing (BAM), 2006. These are available from BAM or from Sigma-Aldrich)

[5] Сертификат анализа стандартных образцов (Certificate of Analysis, Standard Reference Material® 2940: Relative Intensity Correction Standard for Fluorescence Spectroscopy: Orange Emission, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, 2007)

[6] Свидетельство об утверждении типа стандартных образцов «СО относительной спектральной эффективности рассеяния света наносферами двуокиси кремния», ГСО 10560—2015

[7] ASTM E 578—2007 Стандартный метод испытаний для линейности измерительных систем флуориметрии (ASTM E 578-07 Fluorescence Standard Test Method for Linearity of Fluorescence Measurement Systems)

УДК 681.7.08:006.354 ОКС 17.180.30

Ключевые слова: аппаратно-независимые спектры, интенсивность флуоресценции, калиброванный фотоприемник, квантовый выход флуоресценции, квантовый счетчик, опорный канал, оптическая плотность, спектральная коррекция, спектры возбуждения и эмиссии, спектрофлуориметр

Редактор *Л.Б. Чернышева*
Технический редактор *В.Ю. Фотиева*
Корректор *М.В. Бучная*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 21.01.2016. Подписано в печать 10.03.2016. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,40. Тираж 50 экз. Зак. 719.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru