

Molekulová luminiscence: Základy instrumentace I

Jan Preisler
312A14, UKB PfF MU
tel. 54949 6629

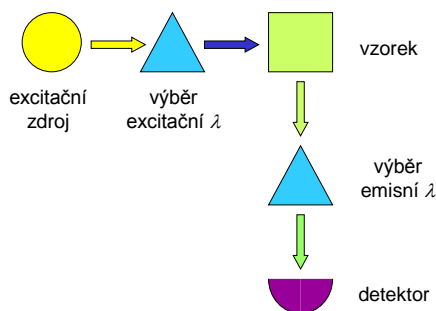


Molekulová luminiscence: instrumentace I

- **Fluorimetr a spektrofluorimetr: základní uspořádání přístrojů**
- **Součásti (spektr)fluorimetru**
 - excitační zdroje
 - monochromátory
 - polarizační filtry
 - cely
 - detektory

2

Schema měření fluorescence



3

Schema měření fluorescence (pokr.)

• Fluorimetr vs. spektrofluorimetr

Fluorimetr - neslouží k záznamu spekter
- filtry pro výběr vlnové délky

Spektrfluorimetr - záznam spektra (emisního nebo excitačního)
- využit(y) monochromátor(y)

• Polarizační fluorescence

mezi monochromátory a vzorkem mohou být začleněny polarizační filtry

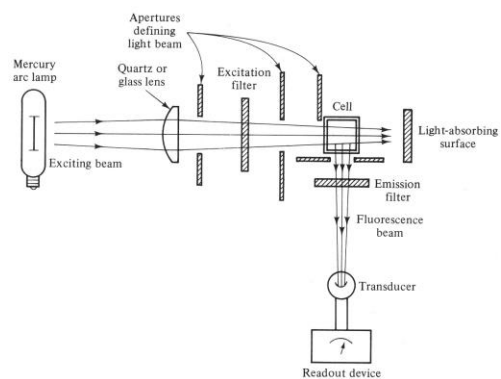
4

Součásti (spektr)fluorometru

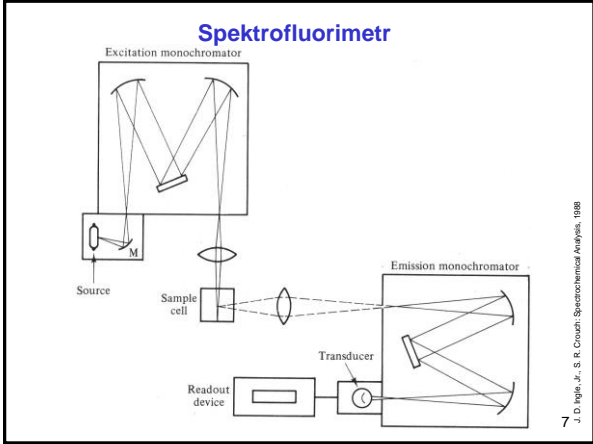
- **Excitační zdroje**
výbojky, LED, lasery
- **Monochromátory**
filtry, hranoly, mřížky
- **Polarizační filtry**
- **Cely**
- **Detektory**
fotonásobiče, lavinové fotodiody, CCD

5

Fluorimetr



J. D. Ingh, Jr., S. R. Crouch: Spectrochemical Analysis, 1998



Excitační zdroje: výbojky

- **Nízkotlaká rtuťová výbojka**
 - nejintenzivnější vlnové délky 254, 312, 365 nm
 - vrstva fosforu pro posun k delším λ , $p \sim 10^2$ Pa
 - použití zejm. v jednoduchých fluorimetrech (v kombinaci s filtry)
- **Xenonová výbojka**
 - ve většině komerčních přístrojů, široké rozmezí λ
 - 75 – 500 W i více, teplota záření $\sim 6\ 000$ K
- **Vysokotlaká rtuťová výbojka**
 - vysoká intenzita koncentrována do několika λ
 - $p > 10^7$ Pa
- **Hg-Xe výbojka a deuteriová výbojka**
 - vyšší intenzity v UV, resp při $\lambda < 300$ nm

<http://www.sciencetech-inc.com>

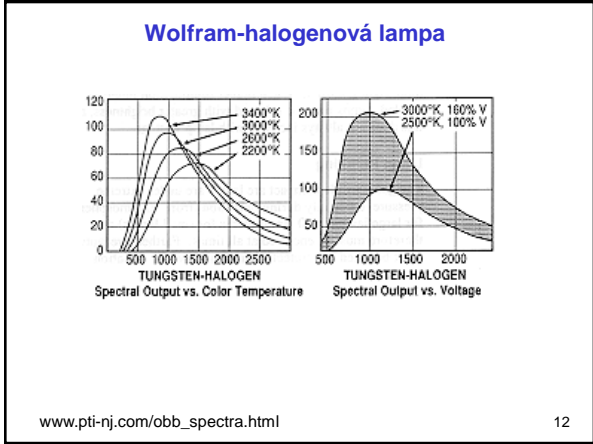
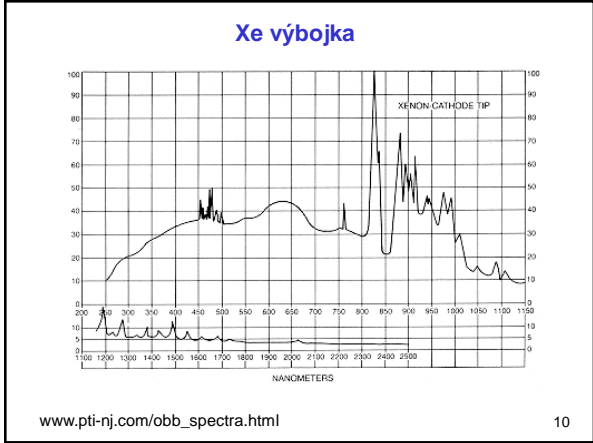
Excitační zdroje: lampy

- **Wolfram-halogenová lampa**
 - W vlákno + Ar nebo Kr + stopa X_2 (nejčastěji Br_2)
 - SiO_2 baňka
 - tvorba halogenidu wolframu zabraňuje usazování wolframu na baňce; wolfram se ukládá zpátky na vlákno
 - prodloužená životnost lampy
 - 10 – 250 W, teplota záření $\sim 3\ 000$ K

Pozn: teplota záření (color temperature)

- barva záření černého tělesa
- slunce ve dne: $\sim 5\ 000$ K

en.wikipedia.org/wiki/Color_temperature



LED

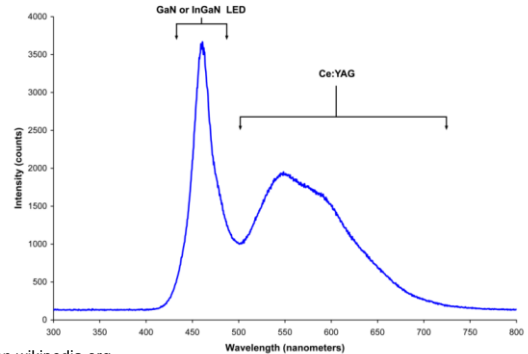
- LED: light emitting diode
- polovodičová p-n součástka emitující světlo v relativně úzkém rozmezí λ , kombinované LED i v širokém rozmezí λ
- nejprve LED emitující v IR a červené oblasti, nyní i UV LED (nutné pro excitaci)
- v současnosti $\lambda = 250 \text{ nm} - 7 \mu\text{m}$



www.roithner-laser.com, en.wikipedia.org

13

Emisní spektrum „bílé“ LED



en.wikipedia.org

Lasery

• Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

- 1916 A. Einstein: teoretická předpověď
- 1958 C. H. Towns: teoretické výpočty nutné pro realizaci
- 1960 T. Maiman: rubínový laser

• Typy laserů

- pevnolátkové (rubín, Nd:YAG, Er:YAG, Yb:YAG, Ti:safír)
- plynové (HeNe, Ar⁺, CO₂, N₂, HeAg, NeCu)
- excimerové (ArF, KrCl, KrF, XeCl, XeF)
- polovodičové
- barvivové
- chemické (HF, DF)
- elektronový laser

15

Některé emisní vlnové délky běžných laserů

- ArF excimer: 193 nm
- KrCl excimer: 222 nm
- KrF excimer: 248 nm
- XeCl excimer: 308 nm
- N₂: 337 nm
- XeF excimer: 351 nm
- HeCd: 442 nm
- Ar⁺: 364, 457.9, 476.5, **488.0**, 496.5, 501.7, **514.5**, 1090 nm
- HeNe: **543**, 594, 612, **633**, 1152 nm
- Kr⁺: 530.9 nm
- rubín: 628, 694 nm
- InGaAlP polovodič: 635-660 nm
- GaAs/GaAlAs polovodič: 780-905 nm
- InGaAs polovodič: 980 nm
- Ti:safír: 700-1000 nm
- Nd:YAG: 1064 nm

16

Některé emisní vlnové délky běžných laserů

- Vývoj laserových diod, $\lambda = 370 \text{ nm} - 1,9 \mu\text{m}$
 - CD: $\lambda = 780 \text{ nm}$
 - DVD: $\lambda = 650 \text{ nm}$
 - blue ray/ HD DVD: $\lambda = 405 \text{ nm}$



www.lasermate.com/diodies.htm

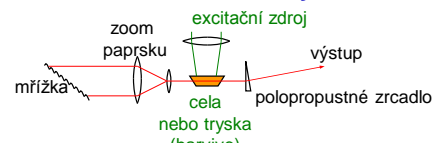
- Navíc možnost násobení frekvence
 - běžně 2x, 3x, 4x
 - např. diodou pumpovaný ND:YAG: 532, 355 a 266 nm



Další info např. na www.lexellaser.com/techinfo_wavelengths.htm

17

Barvivové lasery



- **Excitační záření: laser, výbojka**
- **Médium: roztok barviva nejlépe v průtokové cele či trysce**
- **Laditelný v omezeném rozsahu vlnových délek**
- **Typický příklad**
 - excitační záření: 532 nm (Nd:YAG, 2x), N₂
 - roztok rhodaminu 6G
 - výstup: 540-600 nm

18

Monochromátory

- **Monochromátor**

- filtr
- hranol
- mřížka
- laditelný filtr (optoakustický, kapalné krystaly)
- monochromatický zdroj (laser)
- kvazimonochromatický zdroj (LED)

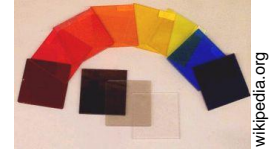
19

Filtry

- **Zpravidla v levných přístrojích, ve fluorimetrech**

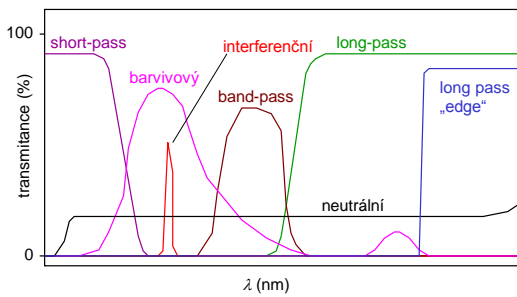
- **Běžné typy filtrů**

- interferenční
- barvivové
- band pass
- long pass
- short pass
- neutrální
- speciální (edge, notch, laser line aj.)



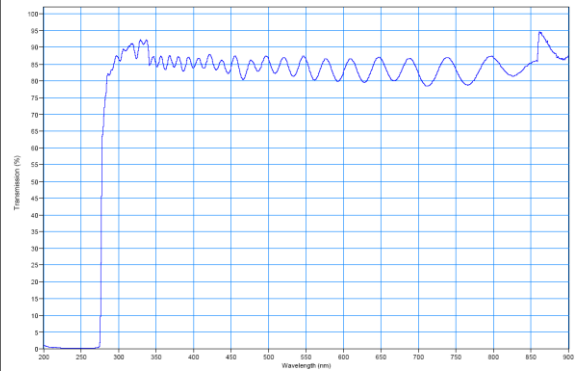
20

Typy filtrů



21

Příklad: „Raman edge long-pass“ filtr



Hranol

- nejběžnější trojhranný, 3 x 60°
- materiál: sklo, křemen aj.
- úhlová disperze: $d\theta/d\lambda$
- disperze hranolu: $dn/d\lambda$

- $d\theta/d\lambda \sim ndn/d\lambda$
- $R = adn/d\lambda$

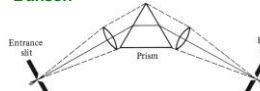
n ... index lomu
 θ ... úhel mezi prošlým
 a přicházejícím paprskem
 a ... základna hranolu
 R ... rozlišovací schopnost



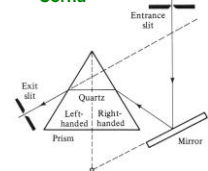
23

Uspořádání hranolových monochromátorů

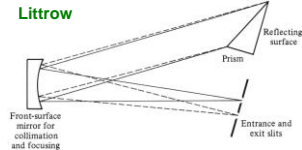
Bunsen



Cornu



Littrow



J. D. Ingh, Jr., S. R. Crouch, Spectrochemical Analysis, 1998

24

Mřížka

- skleněná deska s napařenou vrstvou Al a paralelními vrypů vzájemně vzdálenými stovky nm



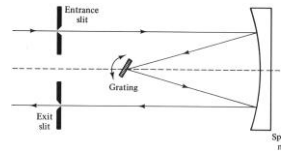
- tvárované (ešeletové) nebo holografické
- rovné nebo konkávně zakřivené
- reflexní nebo transmissní

- $R = \lambda/d\lambda = mN$
- m ... řád spektra
- N ... počet vrypů mřížky

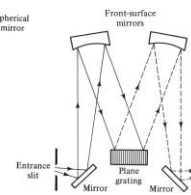
25

Uspořádání mřížkových monochromátorů

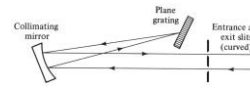
Fastie-Ebert



Czerny-Turner



Littrow



26
J. D. Boyd, Jr., S. R. Crouch, Spectrochemical Analysis, 1988

Parametry monochromátoru

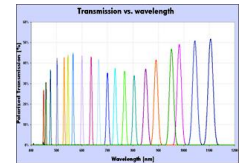
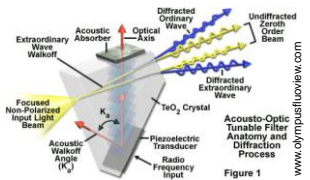
- Šířka štěrbin** (slit width)
 - šířka štěrbin vs. transmise
- Šířka pásma** (bandpass)
 - šířka pásu v polovině maxima (full width at half maximum, FWHM)
 - dána šířkou štěrbin a disperzí

27

Laditelné filtry

Akustooptické filtry

- index lomu n je funkcí tlaku
- při průchodu akustického signálu krystalem dochází k tvorbě periodické variace n (transparentní mřížka)
- laditelné změnou frekvence akustického signálu



28

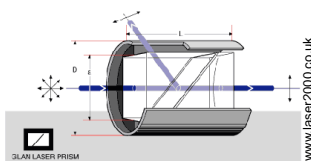
Filtry z kapalných krystalů

- laditelné změnou elektrického napětí
- propouští specifické vlnové délky

Polarizační filtry

Běžné typy

- Glan-Taylorův
- Glan-Thompsonův
- polarizační fólie



Glan-Taylorův polarizační filtr je složen ze dvou kalcitových hranolů, mezi kterými je vzduchová mezera

29

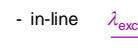
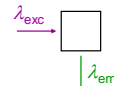
Cely pro vzorek

Pravouhlé kyvety nejběžnější

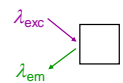
- 1 x 1 x 4,5 cm, nejlépe křemenné se všemi stěnami leštěnými

Uspořádání

- klasické (90°)



- pro koncentrované a opalescentní vzorky

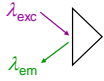


30

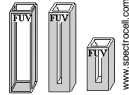
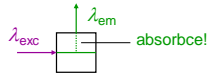
Cely pro vzorek (pokr.)

• Další typy kyvet

- trojúhelníkové pro koncentrované a opalescentní vzorky



- s kruhovým průřezem
- zúžené pro koncentrované vzorky



- mikrocely
- cely pro současné měření absorpance a fluorescence

31

Cely pro vzorek (pokr.)

• Uzávěrka, clona

- pro vzorky podléhající fotodekompozici

• Absorbér prošlého světla za kyvetou

• Chlazení

- např. N₂(l) pro fosforescenci

• Absorbující povrch prostoru pro vzorek

- např. elox
- pozor, černá barva může fluoreskovat!

32

Detektory

- Oko
- Fotonásobič
- Lavinová fotodioda
- CCD

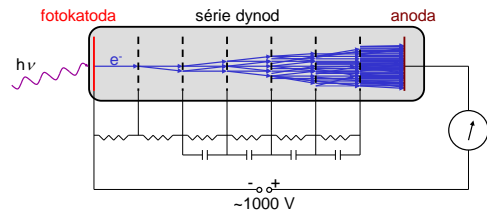


• Vlastnosti

- spektrální citlivost
- kvantový výtěžek
- zisk
- rychlost

33

Fotonásobič



- Evakuovaná trubice se sérií 10 – 16 elektrod
- Fotokatoda: oxidy alk. kovů, Ag, sloučeniny Ga, Sb, As, P, Te aj.
- Dynody: MgO, GaP
- Zisk: 10⁶ – 10⁷, rychlost: ~ ns a více
- Režimy: proporcionální a čítač fotonů
- Spínání fotonásobiče (PMT gating)

34

Příklady fotonásobičů

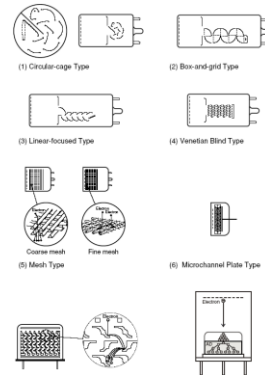


Fotonásobič
... photomultiplier tube, PMT

www.hamamatsu.com

35

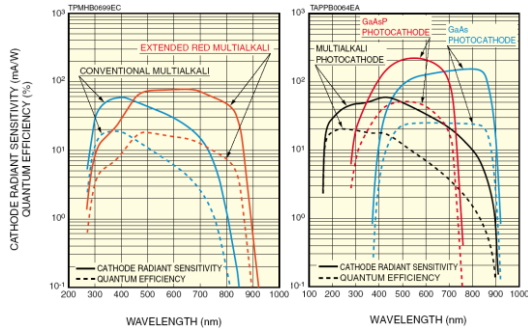
Příklady fotonásobičů



www.hamamatsu.com

36

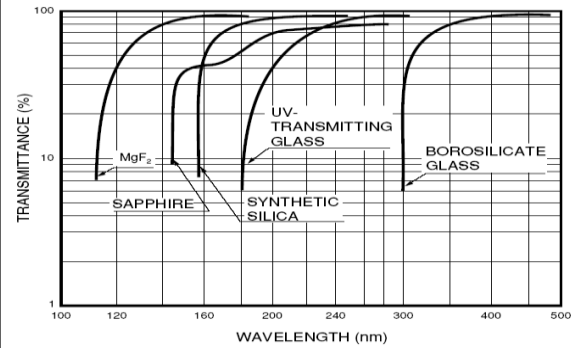
Kvantový výtěžek fotokatody PMT



www.hamamatsu.com

37

Charakteristika vstupního okénka PMT

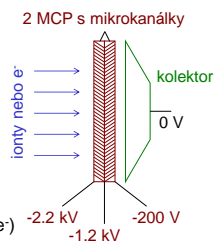


www.hamamatsu.com

38

Mikrokanálová destička

- **MCP (microchannel plate)**
 - tloušťka ~1 mm, průměr 1 - 10 cm.
- **Mikrokanálky**
 - orientovány šikmo
 - průměr ~ 3 - 20 μm
 - chevronová struktura (≥ 2 MCP)
 - pokryté polovodivou vrstvou PbO (gradient napětí podél mikrokanálku, kanálek = kontinuální dynoda, násobení e⁻)

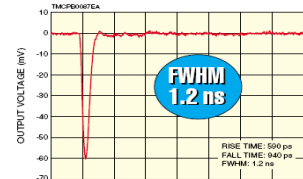


- **Zisk:** 1xMCP ~ 10^3 , 2x MCP ~ 10^6
- **Použití**
 - plošný detektor v TOFMS
 - **rychlý fotodetektor** (s předřazenou transparentní fotokatodou)

39

Fotonásobič s MCP

- vysoká rychlost, $t_r < 1$ ns, možnost rychlého zapnutí/vypnutí
- plošný fotodetektor se ziskem (image intensifier)

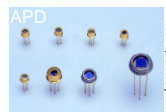


www.hamamatsu.com

40

Polovodičové detektory

- **Lavinová fotodioda, (avalanche photodiode, APD)**
 - p-n přechod s reverzibilním průrazem
 - vysoká rychlost: 50 – 80 GHz
 - vysoká citlivost: zisk ~ 10^3 , oblast $\lambda > 400$ nm
 - možnost měření v režimu *single-photon counting*
- **Fototranzistor**
 - zisk ~100 a více
 - omezený dynamický rozsah
- **Array detektory**
 - CCD, CID aj.
 - podrobně později



41

Molekulová luminiscence: Základy instrumentace II



Molekulová luminescence: instrumentace II

- **Měření, zpracování a prezentace dat**
 - převodníky
 - 3D spektra, synchronní sken
- **Srovnání absorpční a luminescenční spektroskopie v oblasti UV-Vis**
- **Časově rozlišená luminescence**
- **Fosforescence**
- **Chemiluminescence**
- **Polarizace a anizotropie fluorescence**

43

Záznamová zařízení

Foton → elektron → proud

Digitální převodníky

- **ADC**, A/D převodník (analog to digital converter)
- **čítač** (counter)
- **TDC**, T/D převodník (time to digital converter),
TAC (time to amplitude converter)

44

A/D převodník

Měření (digitalizace) napětí

Základní parametry

- **počet bitů** (rozlišení převodníku)
- **vzorkovací frekvence** ... počet vzorků za sekundu (vz/s, sample/s)
- „**interleaved sampling**“ (opakované vzorkování period. signálů)
- max. frekvence (cut-off frequency)
- polarita: **unipolární** (negativní), bipolární
- rozsah vstupního napětí
- max. vstupní napětí
- počet bodů (délka paměti, velikost pufru)
- stabilita aj.

45

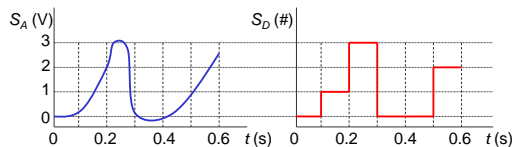
A/D převodník (analog/digital)

Příklad:

2-bitový převodník s rozsahem 0-3V a vz. frekvencí 10 vz/s
počet úrovní = 2^2 :

úroveň	high-bit	low-bit
0	0	0
1	0	1
2	1	0
3	1	1

perioda, $T = 1/10 = 0.1$ s



46

Přesnost záznamu

- Přesnost (a správnost) měření dána počtem bitů AD převodníku
- **Např.** pro 8-bitový převodník $2^8 = 256$ úrovní:
- nepřesnost odpovídá 1/2 úrovně
- min. rel. chyba $> (2 \times (\text{počet úrovní} - 1))^{-1} = (1/2 \times 255)^{-1} \sim 0.2 \%$

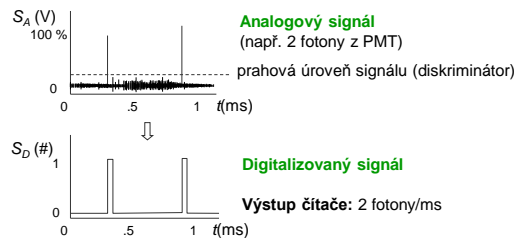
počet bitů	1	8	12	16	24
počet úrovní	2	256	4 096	65 536	16 777 216
min. rel. chyba (%)	50	0.2	0.01	8×10^{-4}	3×10^{-6}
dyn. rozsah (pro rel. chybu <10%)	-	50	800	13 000	3 000 000

47

Čítač

Čítač: počítání pulsů

Foton → puls → (zesilovač) → diskriminátor → čítač



48

Využití čítače

- **Počítání fotonů (photon counting)**
 - počet fotonů/čas
- **Mrtvá doba čítače**
 - po zaregistrování fotonu čítač nemůže jistý čas detekovat další foton
 - nedetekuje všechny fotony a vede k negativní chybě

49

Photon counting

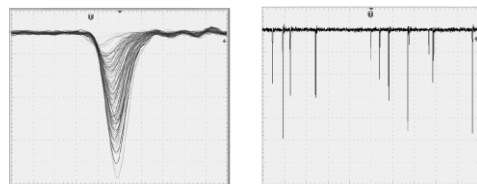


Fig. 20: Single-photon pulses delivered by a R5900 PMT (left, 1 ns / div) and output signal of the PMT at a photon detection rate of 10^3 s^{-1} (right, 100 ns / div). Operating voltage -900V, signal line terminated with 50 Ω .

W. Becker The bh TCSPC Handbook

50

T/D převodník

- **T/D převodník** (time to digital, T/D converter, TDC)
 - měření doby od spouštěcího signálu, např. od excitačního pulsu
 - 1-bitový A/D převodník se dvěma úrovněmi: 0 a 1
- **Parametry TDC:**
 - časové rozlišení, např. 10 ps
 - single/multi stop: registrace jednoho/více pulsů
 - počet kanálů aj.
- **Použití TDC:**

měření doby pulsu od spouštěcího signálu pro opakované děje
např. měření doby fotonu od excitačního pulsu při TCSPC (time-correlated single photon counting)

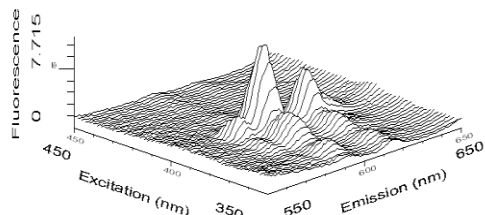
51

Měření a prezentace dat

- **Jednoduchý sken**
 - emisní spektrum ($\lambda_{\text{exc}} = \text{konst.}$, sken λ_{em})
 - excitační spektrum ($\lambda_{\text{em}} = \text{konst.}$, sken λ_{exc})
- **Synchronní sken**
 - současný sken λ_{em} a λ_{exc} , $\lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{exc}} = \text{konst.}$
- **3D spektra**
 - množina excitačních/emisních spekter
 - ze 3D spektra lze získat emisní, excitační spektrum nebo rozdílové spektrum odpovídající synchronnímu skenu

52

Příklad 3D spektra: Luminiscence lanthanoidů Tb^{3+} , Eu^{3+} , Dy^{3+} , Sm^{3+} a Gd^{3+}



53

Srovnání absorpční a luminiscenční spektroskopie v oblasti UV-Vis

Spektroskopie v oblasti UV-Vis $A = c \times \epsilon \times l = \log(I_0/I)$

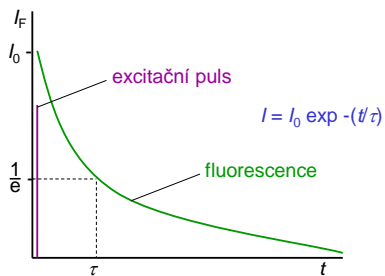
Absorpční spektroskopie: měření poměru dvou světelných toků + přesnost (odolnost vůči změnám abs. hodnoty světelného toku Φ_0)
- citlivost (nepatrný rozdíl mezi I_0/I při nízké koncentraci analytu)

Luminiscenční spektroskopie $F \sim k \phi I_0 \cdot 2.3 c \times \epsilon$

Luminiscenční spektroskopie: měření vyzářené energie + vysoká citlivost při použití citlivého detektoru (i jednotlivé fotony)
- přesnost (fluorescence je přímo úměrná excitačnímu světelnému toku (I_0); projevuje se u ní negativně kólsání excitačního zdroje aj.)

54

Časově rozlišená luminescence

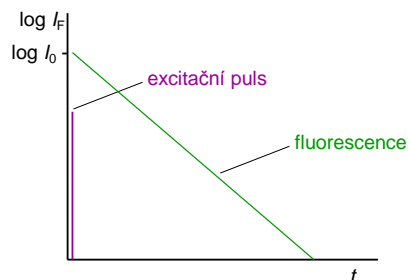


- **Doba života** (luminescence lifetime): $\tau = 1/k_F$
 - kvalitativní a strukturální analýza, studium polohy fluoroforu

55

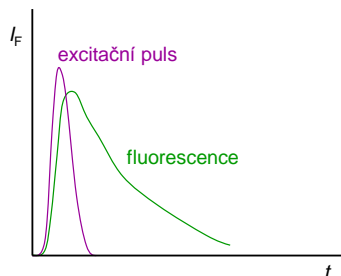
Časově rozlišená luminescence

- **Logaritmický diagram** $\log I_F = \log I_0 - \frac{t}{\tau}$



56

Časově rozlišená luminescence



- **Porovnatelná šířka excitačního pulsu a τ**
 - nutnost dekonvoluce
 - změna zdroje: ultrakrátký laserový excitační puls

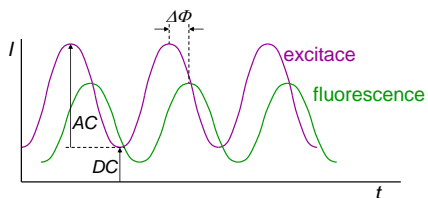
57

Měření časově rozlišené fluorescence

- **Měření v časové doméně**
 - klasický způsob měření I_F vs. t
 - pro opakované děje možnost použití interleaved sampling
- **Měření ve frekvenční doméně**
 - modulace excitačního záření
- **Time-correlated single photon counting**

58

Měření ve frekvenční doméně



- stanovení doby života z fázového posuvu $\Delta\phi$ a míry modulace
- míra modulace je dána poměrem amplitudy střídavé složky ku stejnoměrné složce excitačního záření
- možnost studia multiexponenciálních poklesů

59

TCSPC

- **Time-correlated single photon counting**
- **Instrumentace**
 - excitační zdroj: laser, délka pulsu fs – ns
LED, délka pulsu < ns
speciální lampy, délka pulsu ~ ns
 - vysoká opakovací frekvence pulsů, až ~ 100 MHz
 - detektor: PMT (fotonásobič), MCP-PMT
SPAPD (single photon avalanche photodiode)
 - záznamové zařízení: TDC
 - FLIM: fluorescence lifetime imaging (mikroskop + sken)

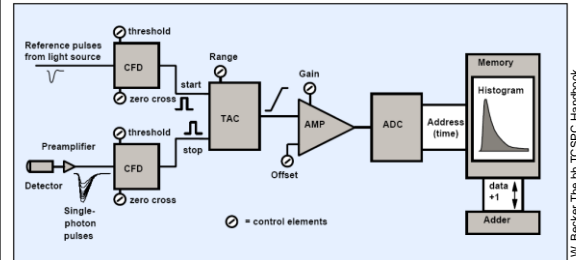
60

Pockelova cela

- elektro-optické zařízení s krystalem vápence; vložením napětí na krystalu mění index lomu
- Pockelovou celou vloženou do laserového rezonátoru lze modulovat intenzitu laseru
- Užití: generování velmi krátkých pulsů, např. „mode-locked“ Nd:YAG

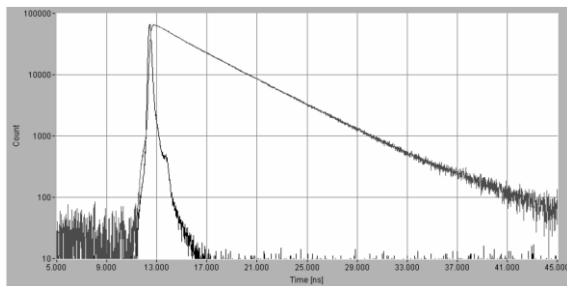
61

Schema klasického měření TCSPC



62

TCSPC



Fluorescence rhodaminu 110 v H₂O, excitace: 405nm

63

FLIM

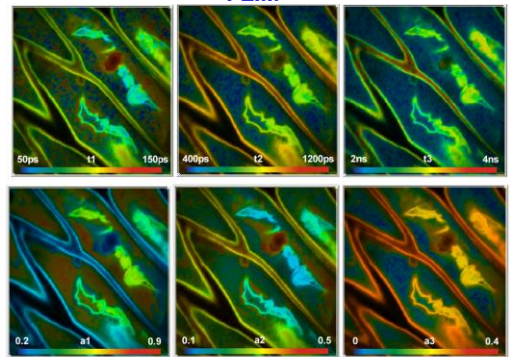


Fig. 189: Triple-exponential decay analysis. Upper row: Lifetimes of the fast, medium, and slow decay component. Lower row: Amplitudes of the decay components

Fosforescence

- **Základní experimentální sestava stejná jako u fluorescence**
- **Modulace excitačního záření** a měření fosforescence s fázovým posunem v době, kdy je exc. záření nulové
 - vede k eliminaci rozptýleného záření
- **Modulace**
 - mechanická („chopper“)
 - zábleskové výbojky
 - pulsní lasery atd.

65

Fosforescence

- **Ochrana vzorku v tripletovém stavu**
- **LTP (low temperature phosphorescence)**
 - vzorek rozpuštěn v organickém rozpouštědle a chlazen: 77 K, N₂, Dewarova nádoba
 - výběr rozpouštědel kritický (běžně EPA: ethanol + izopentan)
- **RTP (room temperature phosphorescence)**
 - fosforescence při pokojové teplotě
 - na pevném substrátu (filtrační papír, silikagel, octan sodný) s modifikátory (NaI, AgNO₃) pro podpoření intersystem crossing
 - v roztoku v přítomnosti micel (nad kritickou micelární koncentrací, CMC)
 - transfer tripletového stavu analytu do tripletového stavu fosforeskujícího akceptoru (např. bromonaftalen)

66

Chemiluminiscence

- **Možnost měření s velmi jednoduchou instrumentací**
 - není nutný žádný monochromátor
 - nutné součásti:
 - cela
 - zařízení pro vstup reagentu, např. septum pro injekčáz
 - fotonásobič
 - v případě nutnosti záznamu spektra exc. monochromátor

67

Polarizace a anizotropie fluorescence

- Excitace polarizovaným zářením vede k částečně polarizované fluorescenci
- **Fotoselekce**
 - Excitační záření absorbují molekuly s absorpčním přechodovým dipólem paralelním k elektrickému vektoru excitačního záření
- Rovina polarizace vyzářené fluorescence závisí na úhlu mezi absorpčním a emisním přechodovým dipólem
- **Depolarizace**
 - rotační difúze ... hlavní příčina
 - neradiační transfery energie mezi fluorofory

68

Polarizace a anizotropie fluorescence

- **Stupeň polarizace, p**

$$p = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$$

$$I_{\parallel} \text{ a } I_{\perp} \dots \text{ složky světelné intenzity rovnoběžné, resp. kolmé ke směru polarizace budícího záření}$$
- **Anizotropie fluorescence, r**

$$r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2 I_{\perp})$$
- **Depolarizační faktor, δ**

$$\delta = I_{\perp} / I_{\parallel}$$

Vzájemné převody:

$$r = 2 p / (3 - p) = (1 - \delta) / (1 + 2 \delta)$$

$$p = 3 r / (2 + r) = (1 - \delta) / (1 + \delta)$$

69

Anizotropie fluorescence

Anizotropie sferické molekuly:

$$r = r_0 e^{-t/\tau}$$

rotační relaxační doba, τ' :

$$\tau' = \eta V_m / (RT)$$

η ... viskozita

V_m ... parc. objem molekuly

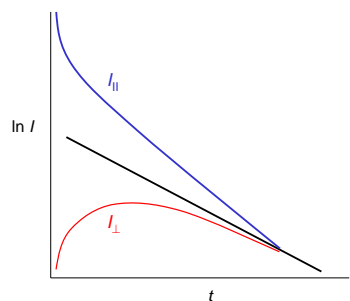
• **Dva způsoby měření anizotropie**

- měření anizotropie v časové doméně: *vyhasínání anizotropie*
- měření anizotropie ve frekvenční doméně: *dynamická polarizace*

70

Vyhasínání anizotropie

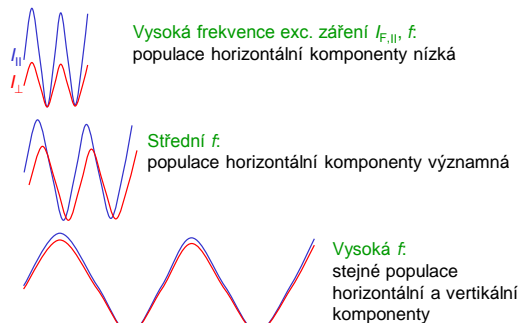
Přímé měření I_{\parallel} a I_{\perp} po excitaci vert. polarizovaným zářením, $I_{F,\parallel}$



71

Dynamická polarizace

Určení anizotropie z fázového posuvu mezi I_{\parallel} a I_{\perp}



72

Výsledná polarizace fluorescence

- **Rotační relaxační doba >> doba života fluorescence**
... fluorescence bude polarizována
- **Rotační relaxační doba << doba života fluorescence**
... anizotropie systému bude zanedbatelná
př.: malá molekula ($M = 333$, $\tau = 10$ ns): $\tau' = 0.1$ ns
- **Rotační relaxační doba ~ doba života fluorescence**
př.: velká molekula ($M = 33\ 300$, $\tau = 10$ ns): $\tau' = 10$ ns,
... lze využít pro studium biologických membrán, interakce ligandu s receptory, proteinu s DNA aj.

73

Polarizace a anizotropie fluorescence

Intenzita fluorescence polarizovaná ve směru otočeném o úhel α od směru rovnoběžné polarizace:

$$I_{\alpha}(t) = \cos^2\alpha I_{\parallel}(t) + \sin^2\alpha I_{\perp}(t)$$

Pro „magický úhel“ $\alpha = 54,74^{\circ}$ ($54^{\circ}44'8''$): $I_{54,7}(t) = I_{\parallel}(t) + 2 I_{\perp}(t)$

... při měření celkové intenzity fluorescence pomocí analyzátoru otočeného o magický úhel se v roztocích, ve kterých rotační relaxační doba ~ doba života fluorescence, získají hodnoty dohasínání fluorescence neovlivněné molekulárními rotacemi

Časová závislost anizotropie: $r(t) = (3 \cos^2\gamma(t) - 1)/5$

γ ... úhel dipólové reorientace za dobu t

74