

Н.Л. Лаврик, Ю.Я. Ефимов, Н.У. Муллоев

Зависимость эффекта внутреннего фильтра от диаметра возбуждающего луча в спектрах испускания флуоресценции

Институт химической кинетики и горения СО РАН, г. Новосибирск

Поступила в редакцию 5.02.2008 г.

Получена формула, позволяющая вычислять зависимость интенсивности флуоресценции в поглощающей среде от диаметра лазерного луча, от расстояния центра лазерного луча до выходной стенки кюветы и от величины оптической плотности на единицу длины. С ее помощью вычислены поправки, позволяющие учесть эффект вторичного внутреннего фильтра (ЭВФ) в условиях конкретного эксперимента. Проведено сравнение и показано различие между этими результатами и результатами расчетов ЭВФ, сделанных в предположении бесконечно узкого возбуждающего луча, когда учет ЭВФ можно проводить строго, используя закон Бугера–Ламберта–Бэра. С помощью метода вариации расстояния между лазерным лучом и стенкой рабочей кюветы продемонстрирована возможность определения величин оптических плотностей на спектрометре, на котором проводится детектирование спектров флуоресценции.

Введение

Флуоресцентная спектроскопия является чувствительным и экспрессным методом анализа малых концентраций веществ в окружающей среде. Она может применяться в режиме разовых измерений, в режиме регулярных мониторинговых измерений, при заборе проб и их анализе в стационарной или мобильной лабораториях [1, 2].

При определении истинных спектров флуоресценции в поглощающих и, в частности, водных средах имеет место проблема учета эффекта внутреннего фильтра (ЭВФ). Этот эффект возникает из-за прохождения возбуждающего и испускаемого света флуоресценции через невозбужденный объем исследуемого образца (первичный и вторичный ЭВФ соответственно. В настоящей работе обсуждается только вторичный ЭВФ). Таким образом, если исследуемая проба имеет отличную от нуля оптическую плотность в спектральном диапазоне испускания флуоресценции, то испускаемый свет будет поглощаться средой, причем для разных длин волн спектра флуоресценции величина этого эффекта будет разной. В результате из-за наличия ЭВФ происходит искажение истинных интенсивностей и формы контуров спектров флуоресценции. Не случайно этому важному практическому вопросу уделено специальное внимание в обобщающих монографиях [3–5].

Игнорирование возможности ЭВФ приводит к тому, что полученные, например в [6], экспериментальные данные по зависимости изменения формы контура спектра флуоресценции образцов воды от глубины не поддаются однозначной интерпретации. Это обстоятельство связано с тем, что

наблюдаемое автором «покраснение» спектра флуоресценции с увеличением глубины забора образцов воды можно объяснить не природными процессами, идущими в фотической зоне моря, как это интерпретируется автором [6], а наличием ЭВФ.

Следует заметить, что при наличии жидкокапельного аэрозоля ЭВФ имеет место также при мониторинге наземных объектов с воздуха. Этот эффект может достигать значительных величин благодаря большой величине оптического пути зондирующего луча. В связи с этим в данные, получаемые с помощью флуоресцентного лидарного мониторинга, вводится поправка на влияние спектра поглощения атмосферы на ослабление амплитуды и искажение спектрального состава сигнала флуоресценции (см., например [7]).

Стандартные рекомендации по точному учету ЭВФ для конденсированной фазы в литературе отсутствуют [3, 5]. Как правило, достаточно грубую коррекцию на величину ЭВФ при лазерном возбуждении проводят с помощью корректирующего множителя 10^{OD} [3–5]. Этот множитель учитывает величину оптической плотности образца OD на определенной длине волны λ ($OD = \epsilon_{\lambda}Ca$, где ϵ_{λ} — коэффициент поглощения на длине волны λ ; C — концентрация поглощающих центров; a — расстояние от центра лазерного луча до стенки кюветы). Однако для точного учета ЭВФ, что зачастую необходимо, например, при количественном определении квантовых выходов или первых моментов спектров флуоресценции, такой подход не достаточен. Это связано с тем, что при реальной геометрии возбуждения, которая заведомо отлична от формы бесконечно тонкого луча, конкретную величину оптического пути a точно определить затруднительно.

Данное обстоятельство является основной причиной того, что для корректного учета ЭВФ априори пользоваться множителем 10^{OD} нельзя. В литературе имеются сведения о влиянии диаметра возбуждающего луча на величину первичного ЭВФ [8]. Сообщения об учете влияния величины диаметра лазерного луча на величину вторичного ЭВФ отсутствуют.

В данной статье определена зависимость величины поправочного коэффициента на ЭВФ в испускании флуоресценции от диаметра возбуждающего лазерного луча и проведено сравнение полученных зависимостей с величинами поправочных коэффициентов, вычисленных с помощью использования общепринятого множителя 10^{OD} .

Расчетная схема и эксперимент

На рис. 1 показана схема расчета. Луч лазера радиуса R , направление которого параллельно входной щели спектрометра, возбуждает флуоресценцию в поглощающей среде на расстоянии a между центром лазерного луча и стенкой кюветы. Направление наблюдения света флуоресценции параллельно оси X .

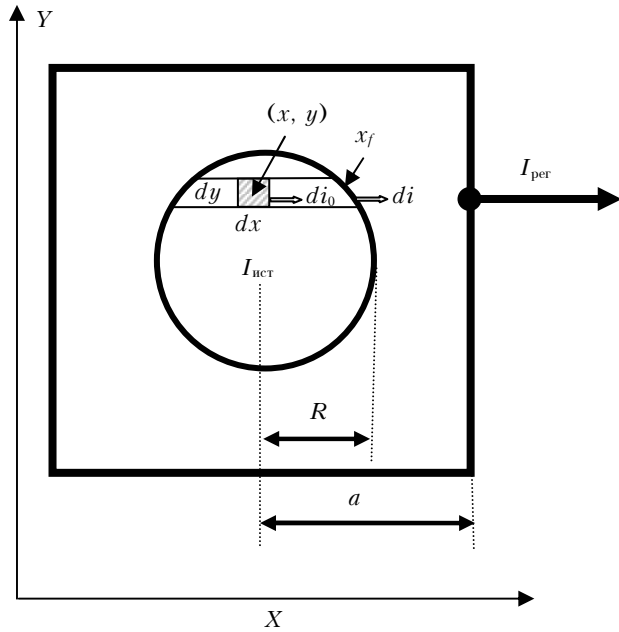


Рис. 1. Схема расчетной модели: вид на рабочую кювету сверху

Внутри зоны генерации света каждый дифференциальный объем $dV = dx dy$, расположенный в точке (x, y) , излучает свет интенсивностью $di_0 = \rho I_0 dV$, где ρ – плотность интенсивности излучающих центров, а I_0 – их излучательная способность. Рассмотрим дифференциальный слой, находящийся на высоте y от центра активной зоны. Излученный в точке (x, y) свет на выходе из светлого пятна (при $x = x_f(R, y) = \sqrt{R^2 - y^2}$) в соответствии с законом Бугера–Ламберта–Бэра (БЛБ)

ослабится до $di(x, y) = di_0 \cdot 10^{-\varepsilon C(x_f - x)}$. Все центры с данным значением y дадут в точке $x_f(R, y)$ суммарную интенсивность

$$i(y) = \int_{-x_f}^{x_f} di(x, y) dx = \frac{(1 - 10^{(-\varepsilon C 2x_f)}) \rho I_0}{\varepsilon C \ln 10}. \quad (1)$$

Далее, при прохождении светом невозбужденной среды (пассивная зона) длиной $(a - x_f)$ его интенсивность $i(y)$ дополнительно ослабится до

$$I(y) = i(y) \cdot 10^{-\varepsilon C(a - x_f)}. \quad (2)$$

Вставив в (2) значения $i(y)$ из (1) и $x_f = \sqrt{R^2 - y^2}$, получим окончательное выражение для интенсивности света, вышедшего из кюветы на высоте y от центра лазерного луча:

$$I(y) = \frac{\rho I_0 (10^{[-\varepsilon C(a - \sqrt{R^2 - y^2})]} - 10^{[-\varepsilon C(a + \sqrt{R^2 - y^2})]})}{\varepsilon C \ln 10}. \quad (3)$$

Наконец, с учетом всех «слоев» dy от $y = -R$ до $y = R$ найдем полную интенсивность регистрируемого света I_{per} на выходе из кюветы как определенный интеграл выражения (3) по y :

$$I_{\text{per}} = \frac{2\rho I_0}{\varepsilon C \ln 10} \int_0^R (10^{[-\varepsilon C(a - \sqrt{R^2 - y^2})]} - 10^{[-\varepsilon C(a + \sqrt{R^2 - y^2})]}) dy. \quad (4)$$

Из (4) легко получаем множитель α – отношение интенсивности регистрируемого света I_{per} к интенсивности излученного света $I_{\text{ист}}$:

$$\alpha = I_{\text{per}} / I_{\text{ист}} = \frac{2\rho I_0}{\varepsilon C \ln 10} \times \int_0^R (10^{[-\varepsilon C(a - \sqrt{R^2 - y^2})]} - 10^{[-\varepsilon C(a + \sqrt{R^2 - y^2})]}) dy / (\pi R^2 \rho I_0). \quad (5)$$

Как видно из (5), общие для излученного и зарегистрированного света величины ρ и I_0 сокращаются, а величина α зависит от значений εC , a и R . Входящие в формулы (4), (5) интегралы аналитически не вычисляются и должны находиться численно.

Рассмотренная выше модель содержит три явных предположения: 1) распределение плотности интенсивности в поперечном сечении лазерного луча принимается равномерным; 2) не учитывается попадание в спектрометр «косых» лучей; 3) не учитывается переизлучение света флуоресценции в результате его перепоглощения. Переизлучением в результате перепоглощения света флуоресценции можно пренебречь в случае малых квантовых выходов флуоресценции либо малых величин поглощения [9], что, зачастую, имеет место для природных объектов. Именно к такому классу объектов относятся изучаемые в природном мониторинге об-

разцы (водные растворы гуминовых кислот, органических веществ, хлорофилла, планктона и т.д.), величина квантовых выходов флуоресценции для которых меньше 1% [10]. Экспериментальная выполнимость первого и второго предположений будет рассмотрена ниже.

Спектры были получены на N₂ лазерном строб-флуориметре, созданном на базе спектрометра ДФС-12 ($\lambda_{\text{возб}} = 337,1$ нм) [11]. Диаметр луча лазера ЛГИ-21 составлял 0,3 см. Распределение интенсивности по сечению лазерного луча было однородным. Это достигалось с помощью юстировки лазерного резонатора, диафрагмированием лазерного луча и наблюдалось визуально. Таким образом, выполнимость первого предположения при расчете ЭВФ реальна.

Направление возбуждающего луча было параллельно линии, условно проходящей через середину входной щели спектрометра. Центр лазерного луча совпадал с центром рабочей кюветы сечением 1 × 1 см (см. рис. 1). Достоинством предложенной геометрической схемы (возбуждающий луч параллелен входной щели спектрометра, «вертикальное возбуждение») является то, что после юстировки положение максимально освещаемого объема, «видимого» спектрометром, при изменении величины оптической плотности относительно щели не меняется [3]. В связи с этим в процессе эксперимента при варьировании величины OD изменения положения кюветы не требуется, как это, например, проводилось в экспериментах при наблюдении флуоресценции в поглощающих средах для геометрии «с правым (левым) углом» [12].

Кювета заполнялась раствором таким образом, что мениск отсутствовал. В качестве флуорофора использовался образец водного раствора гуминовой кислоты (ГК), приготовленного по процедуре, описанной ранее [13]. Концентрация раствора составляла 165 мг/л. В экспериментах по изучению интенсивности флуоресценции от расстояния между центром лазерного луча и передней стенкой кюветы величина расстояния контролировалась с помощью микрометра. Расчеты проводились с помощью программы, написанной в пространстве Maple.

Результаты расчетов, экспериментов и обсуждение

Расчеты

На рис. 2 показаны рассчитанные зависимости отношения интенсивности покинувшего кювету света $I_{\text{рег}}$ к интенсивности излученного света $I_{\text{ист}}$ от величины оптической плотности для разных величин отношения R/a . Видно, что при уменьшении этой величины (см. кривые сверху вниз) отношение R/a стремится к величине $10^{-\epsilon C a}$, а при $R \rightarrow a$ (увеличение диаметра лазерного луча или уменьшение расстояния до выходной стенки кюветы) все больше отклоняется от него. Отклонения тем значительнее, чем больше величина поглощения ϵC .

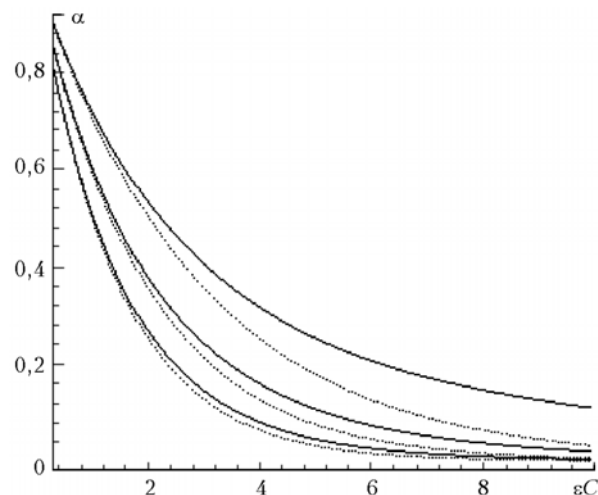


Рис. 2. Зависимость величины α от коэффициента поглощения ϵC , рассчитанной по формуле (5) (сплошные кривые) и вычисленной по закону Бугера–Ламберта–Бэра, $\alpha = 10^{-\epsilon C a}$ (пунктирные). $R = 0,15$ см, кривые (сверху вниз) соответствуют $a = R; 1,5R; 2R$

Эксперимент

Вклад «косых» лучей в общую интенсивность флуоресценции можно свести к минимуму, диафрагмируя диаметр конденсорной линзы, поскольку этот вклад зависит от отношения диаметра конденсорной линзы D к ее расстоянию до освещаемого объема L . Критерием отсутствия вклада «косых» лучей должна быть независимость формы контура от диаметра конденсорной линзы. Эксперименты с диафрагмированием диаметра конденсорной линзы в пределах от 0,5 до 3,5 см с точностью $\pm 3\%$ показали отсутствие изменений спектральных параметров флуоресценции растворов ГК. Этот результат означает, что вклад «косых» лучей в общую наблюдаемую интенсивность флуоресценции в конкретных геометрических условиях мал даже при недиафрагмированной линзе, т.е. второе предположение о применимости использованной модели для расчета ЭВФ также экспериментально выполнимо. Заметим, что другим способом устранения попадания «косых» лучей в спектрометр является формирование коллиматором параллельного пучка света, падающего на входную щель.

На рис. 3 представлены спектры флуоресценции водного раствора ГК с учетом ЭВФ по формуле (5) (рис. 3, 1) и с учетом ЭВФ по закону БЛБ (рис. 3, 2). (Спектр поглощения молекулы ГК представляет собой функцию, значения которой монотонно уменьшаются с увеличением длины волны. Для данного образца величина оптической плотности OD при $a = 0,5$ см менялась от 3 до 0,12 в спектральном диапазоне 360–630 нм). Как видно из сравнения представленных спектров флуоресценции, точный учет поправки на ЭВФ приводит к заметному уменьшению интенсивности спектра флуоресценции, относительно такового, вычисленного с помощью закона БЛБ. Это объясняется тем, что положение центра активной зоны при наличии

поглощения находится не на расстоянии a , а на расстоянии $a_{\text{эф}} = a - \gamma$ ($\gamma > 0$), т.е. флуоресцирующий объем для наблюдателя эффективно оказывается на меньшем расстоянии и поэтому величина корректирующей поправки, учитывающей ЭВФ, должна быть меньше, чем вычисленная с помощью закона БЛБ.

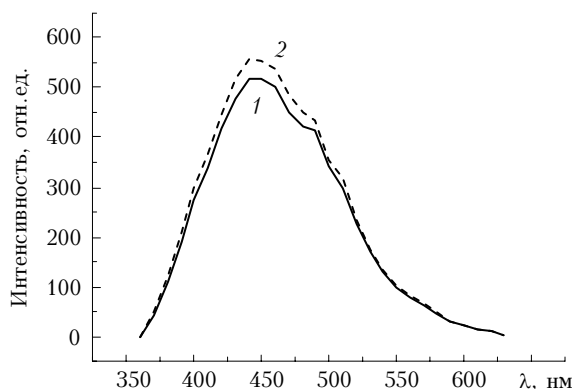


Рис. 3. Спектры флуоресценции водного раствора гуминовой кислоты, выделенной из чернозема, с учетом ЭВФ: 1 – спектр с поправкой по формуле (5); 2 – спектр с поправкой по закону Бугера–Ламберта–Бэра

Таким образом, учет ЭВФ с помощью закона БЛБ для данного образца и в данных экспериментальных условиях приводит к завышению величины интегральной интенсивности (6,7%). Неучет корректирующей поправки на ЭВФ приводит, соответственно, к некорректным значениям и другим параметрам спектра флуоресценции. В частности, для изученного образца ГК различие в величинах первого момента (центра тяжести) экспериментально измеренного спектра флуоресценции и спектра флуоресценции с учетом поправки на ЭВФ по формуле (5) составляет 7 нм.

Следствие из результатов проведенных расчетов позволяет предложить способ определения величин ϵC , используя метод флуоресценции. Такая задача может возникнуть для подтверждения (уточнения) данных, полученных спектрофотометрически, либо для оценки величины ϵC в отсутствие спектрофотометра. Оказалось, что величина отношения β регистрируемых интенсивностей флуоресценции, при возбуждении светом лазера на расстояниях $a_i = R + \Delta_i$ и $a_j = R + \Delta_j$ соответственно, не зависит от R . Эта величина хорошо совпадает (с точностью $\sim 10^{-9}$) со значением β , вычисленным с помощью соотношения

$$\beta = I(a_j)/I(a_i) = 10^{-\epsilon C (\Delta_j - \Delta_i)}, \quad (6)$$

т.е. эффекты внутреннего фильтра не влияют на величину β . (Следует заметить, что выражение (6) получается аналитически, если гипотетически представить, что возбуждающий луч в сечении имеет форму квадрата).

Из (6) легко получить

$$\lg \beta = \lg(I(a_j)/I(a_i)) = -\epsilon C \Delta a. \quad (7)$$

Отсюда, экспериментально измеряя зависимость $\lg \beta$ от $\Delta a = \Delta_j - \Delta_i$, из тангенса угла наклона этой зависимости получаем значения ϵC . При необходимости, зная величину C , можно определить значения коэффициентов поглощения ϵ .

Возможность применения формулы (7) для получения сведений о величинах поглощения, используя экспериментальные данные по флуоресценции, была проверена на образце гуминовой кислоты. Изучалась зависимость величины $\lg \beta$ от Δa для длин волн флуоресценции 440 и 490 нм. Полученные величины ϵC составили $(0,084 \pm 0,002)$ и $(0,06 \pm 0,002) \text{ см}^{-1}$ для 440 и 490 нм соответственно. Эти значения практически совпали с данными, полученными на спектрофотометре «Хьюлетт Паркард» – $(0,082 \pm 0,001)$ и $(0,056 \pm 0,001) \text{ см}^{-1}$. Близость полученных величин ϵC с помощью различных методов свидетельствует о возможности применения флуоресцентного метода для оценки величины $\epsilon C(\epsilon)$.

Заключение

Для учета эффектов внутреннего фильтра в испускании флуоресценции получена формула, позволяющая вычислять зависимость интенсивности флуоресценции в поглощающей среде от диаметра лазерного луча, расстояния центра лазерного луча до выходной стенки кюветы и величины оптической плотности на единицу длины. С ее помощью вычислены поправки, позволяющие учесть эффект внутреннего фильтра для испускания флуоресценции в условиях конкретного эксперимента. Проведено сравнение этих результатов с расчетами, полученными в предположении бесконечно узкого возбуждающего луча, когда учет ЭВФ можно строго проводить, используя закон Бугера–Ламберта–Бэра. Сравнение полученных данных показало, что в условиях высокой оптической плотности образца размер возбуждающего луча может вносить заметные искажения в наблюдаемый контур флуоресценции.

Вычисленные поправки на ЭВФ были получены в условиях «вертикального возбуждения» с использованием лазера. Представляется, что достаточно простое вычисление поправок возможно провести только при таком способе возбуждения, поскольку при стандартном ламповом способе возбуждения и наблюдения («правый угол») из-за наличия каустики (как правило, очень значительной даже в современных спектрометрах типа LS-50, LS-55 или более старых типа MPF-31, MPF-2A) такое вычисление представляет значительно более сложную физико-математическую задачу. Однако если свет от лампы сфокусировать в максимально параллельный луч света и для возбуждения флуоресценции направить его параллельно входной щели спектрометра, то применение предложенной формулы вполне правомочно.

1. Майор А.Ю., Букин О.А., Крикун В.А., Бауло Е.Н., Ластовская И.А. Компактный судово-вой про-

- точный флуориметр // Оптика атмосф. и океана. 2007. Т. 20. № 3. С. 283–285.
2. *Babin N., Morel A., Gentile B.* Remote sensing of sea surface sun-induced chlorophyll fluorescence // *J. Remote Sens.* 1996. V. 17. N 1. P. 2417–2448.
 3. *Паркер П.* Введение в фотолюминесценцию растворов. М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1972. 216 с.
 4. *Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980. 327 с.
 5. *Лакович А.Ж.* Люминесценция органических молекул. М.: Наука, 1986. 284 с.
 6. *Лактионов А.И.* Исследование флуоресценции растворенного органического вещества фотической зоны вод Черного моря // Оптика атмосф. и океана. 2007. Т. 20. № 4. С. 349–352.
 7. *Гришин А.И., Креков Г.М., Крекова М.М., Матвиенко Г.Г., Суханов А.Я., Тимофеев В.И., Фатеева Н.Л., Лисенко А.А.* Исследование органического аэрозоля растительного происхождения с помощью флуоресцентного лидара // Оптика атмосф. и океана. 2007. Т. 20. № 4. С. 328–337.
 8. *Kubista M., Sjoback R., Eriksson S., Albisson B.* Experimental correction for the inner-filter effect in fluorescence spectra // *Analyst.* 1994. V. 119. P. 417–419.
 9. *Reynolds J., Thompson C., Webb K., LaPlant F., Ben-Amotz D.* Frequency domain modeling of reradiation in highly scattering media // *Appl. Opt.* 1997. V. 36. P. 2252–2259.
 10. *Matthews B.J., Jones A.C., Theodorou N.K., Tudhope A.W.* Excitation – emission – matrix fluorescence spectroscopy applied to humic acid bonds in coral reefs // *Mar. Chem.* 1996. V. 55. P. 317–332.
 11. *Лаврик Н.Л., Августиневич И.А.* Простой наносекундный флуориметр на базе спектрометра ДФС-12 // *Ж. физ. химии.* 1986. Т. 60. С. 1083–1084.
 12. *Eisinger J., Flores J.* Front – face fluorometry of liquid samples // *Analyt. Biochem.* 1979. V. 94. P. 15–21.
 13. *Лаврик Н.Л., Сагдиев А.М., Дергачева М.И.* Изучение особенностей структуры гуминовых кислот, выделенных из почв в пределах горизонта А, методом флуоресценции // *Химия в интересах устойчивого развития.* 2004. Т. 12. С. 451–457.

N.L. Lavric, Yu.Ja. Efimov, N.U. Mulloev. **The dependence of inner filter effect on the diameter of exciting ray in fluorescence emitting spectra.**

The formula is derived, with the help of which it is possible to calculate the fluorescence intensity dependence in absorption media on the laser beam diameter, distance between the centre of the laser beam and the face wall of the sample cell, and the value of optical density. With the help of this formula the corrections for «secondary» inner filter effect (IFE) in conditions of real experiment was calculate. The comparison was made of these results with those obtained in the supposition of the infinitely narrow exciting beam, when the IFE calculations are possible to be made accurately using the Buger–Lambert–Beer law. Using the fluorescence method, the possibility was demonstrated of determination of optical density values with the help of laser beam distance alteration.