

О единственности решения обратных задач флуориметрии насыщения сложных органических соединений

О.В.Козырева*, К.В.Попов**

Рассмотрена теоретическая и практическая единственность результатов метода нелинейной лазерной флуориметрии. Математически строго доказана теоретическая единственность определения трех основных фотофизических параметров (сечения поглощения, времени жизни возбужденного состояния и квантового выхода интеркомбинационной конверсии) по кривым насыщения флуоресценции. Для доказательства практической единственности результатов метода проведено одновременное определение двух фотофизических параметров (сечения поглощения и времени жизни возбужденного состояния) по расчетным кривым насыщения флуоресценции, моделирующим кривые насыщения флуоресценции водных растворов красителей родамина 6G, эозина и бенгальского розового.

Ключевые слова: флуоресценция, спектроскопия, флуориметрия, сложные органические соединения, решение обратных задач.

Введение

Одним из методов лазерной спектроскопии, используемых для диагностики органических соединений и комплексов, является метод лазерной флуориметрии. Центральная проблема такой диагностики состоит в идентификации и выявлении состояния этих комплексов – необходимого условия определения их концентраций. Для решения этих задач в [1, 2] был предложен метод лазерной флуориметрии насыщения, который основан на том, что форма кривых насыщения флуоресценции различных органических соединений зависит от их фотофизических параметров (таких как сечение возбуждения флуоресцирующих центров, вероятность интеркомбинационной конверсии, вероятность синглет-синглетной аннигиляции, время жизни молекул в возбужденных состояниях и др.). Анализ кривых насыщения флуоресценции позволяет, в принципе, определять эти параметры, т. е. решать обратную задачу лазерной флуориметрии насыщения.

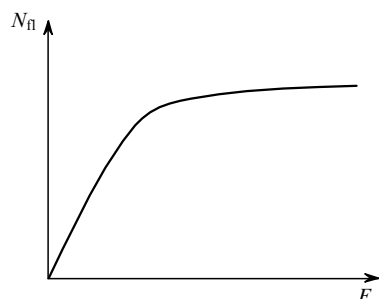


Рис.1. Типичная кривая насыщения красителей.

*Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, физический факультет, Россия, 119899 Москва, Воробьевы горы

**Научно-исследовательский вычислительный центр МГУ им. М.В.Ломоносова, Россия, 119899 Москва, Воробьевы горы

Таким образом, рассматриваемая обратная задача заключается в определении указанных параметров (и/или их комбинаций) по измеренной кривой насыщения флуоресценции – зависимости регистрируемого числа фотонов флуоресценции $N_{\text{п}}$ от плотности потока фотонов возбуждающего излучения F (рис.1). Это относится не только к органическим красителям (и родственным им соединениям), но и к сложным природным органическим комплексам, таким как клетки фотосинтезирующих организмов, гумусовое вещество, белковые соединения, комплексы нефтяных углеводородов и т. д.

1. Постановка обратной задачи флуориметрии насыщения

В качестве объекта исследования были выбраны слабоконцентрированные ($C < 10^{-5}$ моль/л) водные растворы красителей. При таких концентрациях красителей в воде можно пренебречь межмолекулярными взаимодействиями и в физической модели ограничиться параметрами, отражающими только внутримолекулярные процессы. В этом случае фотофизические процессы, происходящие в растворах красителей при лазерном возбуждении, могут быть описаны простой трехуровневой моделью (рис.2), которая включает в рассмотрение следующие процессы: поглощение света, излучательную и безызлучательную релаксацию первого возбужденного син-

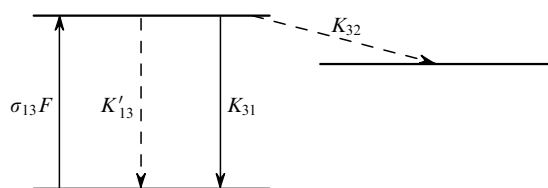


Рис.2. Трехуровневая схема энергетических состояний в сложных органических молекулах без учета межмолекулярных взаимодействий.

глетного состояния S_1 , интеркомбинационную конверсию. Переходы из триплетного состояния T_1 в основное состояние S_0 не учитывались, т. к. длительность импульса возбуждающего лазерного излучения ($\sim 10^{-8}$ с) значительно меньше времени жизни триплетного состояния. При этом математическая модель представляет собой систему кинетических уравнений с тремя параметрами: сечением поглощения σ_{13} , временем жизни возбужденного состояния $t_3 = K_3^{-1}$, квантовым выходом молекул в триплетное состояние $\eta_T = K_{32}/K_3$:

$$\begin{aligned} \frac{\partial n_1(t, \mathbf{r})}{\partial t} &= (K_{31} + K'_{31})n_3(t, \mathbf{r}) - F(t, \mathbf{r})\sigma_{13}n_1(t, \mathbf{r}), \\ \frac{\partial n_2(t, \mathbf{r})}{\partial t} &= K_{32}n_3(t, \mathbf{r}), \\ \frac{\partial n_3(t, \mathbf{r})}{\partial t} &= F(t, \mathbf{r})\sigma_{13}n_1(t, \mathbf{r}) - K_3n_3(t, \mathbf{r}), \\ n_1 + n_2 + n_3 &= n_0, \end{aligned} \quad (1)$$

где $F(t, \mathbf{r})$ – плотность потока фотонов возбуждающего излучения как функция времени t и координаты $\mathbf{r} = \{x, y\}$ в плоскости поперечного сечения пучка; n_1, n_2, n_3 – населенности уровней S_0, T_1 и S_1 соответственно; $K_3 = K_{31} + K'_{31} + K_{32}$; K_{31} и K'_{31} – скорости излучательных и безызлучательных переходов $S_1 \rightarrow S_0$; K_{32} – скорость перехода $S_1 \rightarrow T_1$. Слой раствора красителя (толщиной l) предполагается оптически тонким ($\sigma_{13}n_0l \ll 1$), поэтому зависимость от координаты z вдоль луча отсутствует. Расчеты выполнялись для прямоугольного по \mathbf{r} и t распределения плотности потока фотонов F .

Число фотонов флуоресценции N_{Π} , излучаемых из возбуждаемого лазерным импульсом объема раствора $V = Sl$ (S – площадь сечения пучка, l – толщина слоя), определяется равенством

$$N_{\Pi} = K_{31}l \int_0^{\infty} dt \int_S dm_3(t, \mathbf{r}). \quad (2)$$

2. Анализ устойчивости и единственности решения обратной задачи

Важнейшим аспектом решения обратной задачи являются исследования единственности ее решения, а также устойчивости решения по отношению к погрешностям входных данных (корректность постановки задачи). Теоретическая устойчивость решения рассматриваемой обратной задачи гарантирована тем, что число искоемых параметров конечно, а область их изменения ограничена [3].

Исследование единственности решения для указанного распределения плотности потока фотонов по пространству и времени проводилось следующим образом. Представим систему уравнений (1) в виде

$$\begin{aligned} \frac{dn_3}{dt} &= \sigma F n_1 - a_1 n_3, \\ \frac{dn_1}{dt} &= -\sigma F n_1 + a_2 n_3, \end{aligned} \quad (3)$$

где $n_3(0) = 0$; $n_1(0) = n_0$; $F(t) \equiv F$ при $0 \leq t \leq \tau_p$; $F(t) \equiv 0$

при $t \geq \tau_p$; τ_p – длительность лазерного импульса; $a_1 = K_3$; $a_2 = K_{31} + K'_{31}$; $\sigma = \sigma_{13}$. Решая систему уравнений (3), получаем

$$\begin{aligned} n_3(t) &= C_0 \exp(-m_1 t) - C_0 \exp(-m_2 t) \\ &+ C_0 [\exp(-m_2 \tau_p) - \exp(-m_1 \tau_p)] \exp(a_1 \tau_p) \exp(-a_1 t), \end{aligned} \quad (4)$$

где

$$m_{1,2} = -k_{1,2} = \frac{1}{2} \left\{ \sigma F + a_1 \mp [(\sigma F - a_1)^2 + 4\sigma F a_2]^{1/2} \right\}. \quad (5)$$

Интегрируя (4), получаем выражение для $N_{\Pi}(F)$:

$$\begin{aligned} N_{\Pi} &= K_{31} \int_0^{\tau_p} n_3(t) dt = \frac{K_{31} C_0}{m_1} [1 - \exp(-m_1 \tau_p)] \\ &- \frac{K_{31} C_0}{m_2} [1 - \exp(-m_2 \tau_p)] \\ &+ \frac{K_{31} C_0}{a_1} [\exp(-m_1 \tau_p) - \exp(-m_2 \tau_p)], \end{aligned} \quad (6)$$

где

$$C_0 = \frac{\sigma F n_0}{[(\sigma F - a_1)^2 + 4\sigma F a_2]^{1/2}}.$$

Функция $N_{\Pi}(F)$, заданная на таком отрезке $[F_1, F_2]$, что $0 \leq F_1 \leq F_2$, является однозначной в окрестностях точек $F = 0, F = \pm\infty$.

Для доказательства единственности были взяты асимптотики функции $N_{\Pi}(F)$ при $F \rightarrow \pm\infty$, а также асимптотика предела

$$\lim_{F \rightarrow 0} \frac{dN_{\Pi}(F)}{dF}.$$

Покажем, что асимптотика $N_{\Pi}(F)$ при $F \rightarrow -\infty$ единственным образом определяет параметр σ . Как следует из выражения (6),

$$\lim_{F \rightarrow -\infty} N_{\Pi} = \lim_{F \rightarrow -\infty} [\beta_1(F) \exp(\sigma|F|) + \beta_2(F)], \quad (7)$$

где функции β_1, β_2 имеют конечные пределы при $F \rightarrow -\infty$, причем

$$\lim_{F \rightarrow -\infty} \beta_1(F) = -\frac{K_{31} n_0}{a_1} \exp \tau_p \neq 0. \quad (8)$$

Докажем, что скорость роста экспоненты на бесконечности единственным образом определяет параметр σ . Для этого предположим, что одному и тому же N_{Π} при $F \rightarrow \infty$ соответствуют два различных параметра – σ_1 и σ_2 . При этом из выражения (7) получим

$$\begin{aligned} \lim_{F \rightarrow -\infty} (N_{\Pi}^{(\sigma_1)} - N_{\Pi}^{(\sigma_2)}) &= \lim_{F \rightarrow -\infty} [\beta_2^{(\sigma_1)} - \beta_2^{(\sigma_2)} \\ &+ \beta_1^{(\sigma_1)} \exp(\sigma_1|F|) - \beta_1^{(\sigma_2)} \exp(\sigma_2|F|)] \equiv 0. \end{aligned} \quad (9)$$

Предположим, что $\sigma_2 < \sigma_1$. В этом случае имеем

$$\lim_{F \rightarrow -\infty} [N_{\text{fl}}^{(\sigma_1)} - N_{\text{fl}}^{(\sigma_2)}] = \lim_{F \rightarrow -\infty} \exp(\sigma_1 |F|) \times \left\{ \beta_2^{(\sigma_1)} \exp(-\sigma_1 |F|) - \beta_2^{(\sigma_2)} \exp(-\sigma_1 |F|) + \beta_1^{(\sigma_1)} - \beta_1^{(\sigma_2)} \exp[-(\sigma_1 - \sigma_2) |F|] \right\} = \infty.$$

Таким образом, параметр σ однозначно определяется скоростью роста экспоненты. Далее, зная σ , из

$$\frac{dN_{\text{fl}}}{dF} \Big|_{F=0} = K_{31} \frac{\sigma n_0 \tau_p}{a_1} \tag{11}$$

определяем $a_1 = 1/t_3$.

Для нахождения $K_{32} = a_1 - a_2$ рассмотрим асимптотику $N_{\text{fl}}(\infty)$:

$$\lim_{F \rightarrow \infty} N_{\text{fl}} = N_{\text{fl}}^\infty = \frac{K_{31} n_0}{a_1 - a_2} \{1 - \exp[-(a_1 - a_2) \tau_p]\} + \frac{K_{31} C_0}{a_1} \exp[-(a_1 - a_2) \tau_p]. \tag{12}$$

Покажем, что функция $a_1 = f(a_1 - a_2)$, заданная выражением (12), является монотонной. Как следует из (12),

$$a_1 = \frac{K_{31} n_0}{N_{\text{fl}}^\infty \exp x + K_{31} n_0 \tau_p x^{-1} (1 - \exp x)}, \tag{13}$$

где $x = (a_1 - a_2) \tau_p$. Из выражения (13) следует, что

$$a_1'(x) = - \frac{K_{31} n_0 [N_{\text{fl}}^\infty \exp x + K_{31} n_0 \tau_p x^{-2} (\exp x - 1)]}{[N_{\text{fl}}^\infty \exp x + K_{31} n_0 \tau_p x^{-1} (1 - \exp x)]^2} < 0. \tag{14}$$

Таким образом, функция $a_1(x)$ монотонно убывает везде на $x \in [0, \infty)$, и зависимость $\tau_p(a_1 - a_2) = \tau_p K_{32} = \varphi(a_1)$ является однозначной. Следовательно, зная a_1 , можно однозначно определить $a_1 - a_2 \equiv K_{32}$.

Итак, для выбранной модели флуоресценции из кривой насыщения флуоресценции можно единственным образом определить параметры σ_{13} , t_3 и η_T . Усложнение модели (рассмотрение «непрямоугольных» распределений F в поперечном сечении и во времени, учет межмолекулярных взаимодействий и т. п.) потребует отдельного доказательства единственности. Однако анализ кривой насыщения указывает на ее монотонную зависимость от всех реальных фотофизических параметров, что позволяет ожидать сохранения свойства единственности в указанных более сложных случаях.

3. Решение обратной задачи флуориметрии насыщения

Решение обратной задачи осуществлялось путем минимизации функции, оценивающей среднеквадратичное отклонение вычисляемых в рамках физической модели данных от измеряемых. Было установлено, что указанная функция многих переменных имеет несколько ло-

кальных минимумов, а также сложную «овражную» структуру, что сильно затрудняет процесс минимизации. В связи с этим минимизация проводилась с помощью квазиньютоновского метода, использующего аналитически вычисляемый градиент и специфику минимизируемой функции, а именно то, что она определяется суммой квадратов [4]. Метод заключается в следующем: на каждом шаге алгоритма вместо функции невязки минимизируется аппроксимирующая ее функция

$$f(\mathbf{X} + \Delta\mathbf{X}) = f(\mathbf{X}) + 2(\mathbf{J}^T \varphi, \Delta\mathbf{X}) + (\mathbf{H} \Delta\mathbf{X}, \Delta\mathbf{X}). \tag{15}$$

Здесь \mathbf{X} – вектор параметров; $\Delta\mathbf{X}$ – вектор их приращений; φ – функция решения прямой задачи (в нашем случае это аналитическое выражение для $N_{\text{fl}}(F)$ при «прямоугольном» распределении F по времени и пространству); \mathbf{J}^T – транспонированная матрица Якоби прямой задачи; \mathbf{H} – симметричная квадратная матрица с элементами

$$H_{ij} = (\mathbf{J}^T \mathbf{J})_{ij} + \sum_k \frac{\varphi_k \delta^2 \varphi_k}{\partial x_i \partial x_j}, \tag{16}$$

где φ_k – решение прямой задачи в k -й точке; x_i, x_j – i -й и j -й параметры (в нашем случае σ_{13} и t_3).

Возможности вариационного подхода были апробированы на примере слабоконцентрированных растворов трех красителей в воде с разными значениями фотофизических параметров. Указанный выше алгоритм использовался для решения двухпараметрической обратной задачи (определялись сечение поглощения σ_{13} и время жизни возбужденного состояния t_3 для случая прямоугольного распределения лазерного импульса по пространству и времени) по модельным кривым насыщения флуоресценции водных растворов красителей родамина 6G, эозина и бенгальского розового. Исходные значения фотофизических параметров, использованные в табл. 1–4, были взяты из литературных данных работы [5]. При расчетах модельные кривые насыщения «зашумлялись» с разными шумами (от 1 до 10 %).

Полученные результаты представлены в табл. 1. Из нее видно, что погрешности восстановленных параметров оказались даже меньше погрешностей исходных данных. Такой неожиданный на первый взгляд результат явился следствием того, что в рассмотренном простейшем случае удалось получить аналитическое выражение для кривой насыщения и, следовательно, исключить погрешности, которые могли бы возникнуть при численном решении системы (1). В определенном смысле результаты, представленные в табл. 1, отражают предельные возможности метода.

Следующим шагом было применение метода для поиска при известном третьем параметре двух других параметров прямоугольного распределения импульса по пространству и времени. Решались задачи восстановления параметров σ_{13} и t_3 (при этом η_T считалось известной константой), t_3 и η_T (был задан параметр σ_{13}) и σ_{13} и η_T (заданным t_3).

Результаты определения параметров в численном эксперименте для тех же трех красителей представлены в табл. 2–4. Параметры двух из трех красителей – родамина 6G и эозина – восстанавливались с хорошей точностью. При определении же параметров бенгальского розового появлялась практическая неустойчивость: возникали локальные минимумы с параметрами t_3 , далекими

Табл.1. Восстановление параметров σ_{13} и t_3 из модельных кривых вариационным методом.

Краситель	Шумы (%)	$\langle\sigma_{13}\rangle$ (10^{-16} см ²)	Дисперсия (%)	$\langle t_3 \rangle$ (нс)	Дисперсия (%)
Родамин 6G	Истинные	2.50	–	4.00	–
	0	2.50	–	4.00	–
	1	2.50	0.1	4.00	0.1
	3	2.50	0.5	3.98	0.5
	5	2.50	0.7	3.97	0.7
	10	2.54	1.2	4.03	1.0
Эозин	Истинные	1.10	–	1.40	–
	0	1.10	–	1.40	–
	1	1.10	0.1	1.40	0.3
	3	1.10	0.3	1.39	1.0
	5	1.10	0.4	1.41	1.4
	10	1.10	1.0	1.37	3.5
Бенгальский розовый	Истинные	1.20	–	0.10	–
	0	1.20	–	0.10	–
	1	1.20	0.1	0.10	2.0
	3	1.21	0.2	0.11	5.0
	5	1.21	0.3	0.12	7.0
	10	1.22	0.5	0.14	8.0

Табл.2. Восстановление параметров σ_{13} и t_3 трех красителей при заданном η_T методом наименьших квадратов.

Краситель	Шумы (%)	$\langle\sigma_{13}\rangle$ (10^{-16} см ²)	Дисперсия (%)	$\langle t_3 \rangle$ (нс)	Дисперсия (%)
Родамин 6G	Истинные	2.50	–	4.00	–
	0	2.50	–	4.00	–
	1	2.50	0.01	3.93	0.1
	3	2.50	0.01	3.92	0.3
	5	2.50	0.01	3.92	0.7
	10	2.50	0.2	3.94	0.8
Эозин	Истинные	1.10	–	1.40	–
	0	1.09	–	1.40	–
	1	1.10	0.2	1.41	1.5
	3	1.10	1.0	1.33	7.4
	5	1.10	1.3	1.27	11.0
	10	1.09	2.6	1.21	18.8
Бенгальский розовый	Истинные	1.20	–	0.10	–
	0	1.20	–	0.10	–
	1	1.20	0.1	0.10	0.01
	3	1.22	0.5	0.10	0.01
	5	1.19	0.7	0.10	0.01
	10	1.17	1.0	0.10	0.01

Табл.3. Восстановление параметров σ_{13} и η_T трех красителей при заданном t_3 методом наименьших квадратов.

Краситель	Шумы (%)	$\langle\sigma_{13}\rangle$ (10^{-16} см ²)	Дисперсия (%)	$\langle\eta_T\rangle$	Дисперсия (%)
Родамин 6G	Истинные	2.50	–	0.002	–
	0	2.50	–	0.002	–
	1	2.50	0.2	0.002	0.1
	3	2.54	1.1	0.002	0.2
	5	2.59	1.9	0.002	0.3
	10	2.59	1.9	0.002	0.6
Эозин	Истинные	1.10	–	0.68	–
	0	1.10	–	0.68	–
	1	1.10	0.6	0.68	0.4
	3	1.06	2.5	0.70	2.1
	5	0.97	5.6	0.78	4.8
	10	1.02	11.5	0.78	7.7
Бенгальский розовый	Истинные	1.20	–	0.95	–
	0	1.70	–	0.66	–
	1	1.70	10.3	0.74	10.1
	3	1.65	13.3	0.79	11.3
	5	1.96	9.8	0.65	12.2
	10	2.15	8.7	0.57	12.5

Табл.4. Восстановление параметров t_3 и η_T трех красителей при заданном σ_{13} методом наименьших квадратов.

Краситель	Шумы (%)	$\langle t_3 \rangle$ (нс)	Дисперсия (%)	$\langle \eta_t \rangle$	Дисперсия (%)
Родамин 6G	Истинные	4.00	–	0.002	–
	0	4.00	–	0.002	–
	1	4.03	0.3	0.002	0.2
	3	4.03	0.9	0.002	0.6
	5	3.93	1.9	0.002	1.0
	10	4.08	4.7	0.002	2.7
Эозин	Истинные	1.40	–	0.68	–
	0	1.40	–	0.68	–
	1	1.38	2.4	0.68	0.2
	3	1.14	10.2	0.67	0.7
	5	1.05	14.0	0.67	1.5
	10	1.05	32.4	0.69	2.2
Бенгальский розовый	Истинные	0.10	–	0.95	–
	0	0.10	–	0.95	–
	1	0.10	0.01	0.96	0.2
	3	0.10	0.01	0.96	0.5
	5	0.10	0.01	0.96	1.1
	10	0.10	0.01	0.94	1.7

от истинных, хотя и лежащими в области поиска решений. Это происходило, очевидно, из-за того, что квантовый выход в триплет для бенгальского розового очень высок (близок к единице), а t_3 , напротив, очень мало. Тем не менее практическую неустойчивость удалось преодолеть при восстановлении параметров σ_{13} и t_3 и заданном η_T и при восстановлении параметров t_3 и η_T и заданном σ_{13} , используя априорную информацию, полученную при исследовании прямой задачи: абсолютные значения N_{Π} на плато сильно различаются для разных t_3 , поэтому легко сделать предположения о порядке t_3 .

Однако для задачи определения η_T и σ_{13} (при заданном t_3) практическая неустойчивость (как видно из табл.3) осталась, что является предметом дальнейших исследований.

Наши предварительные расчеты показывают, что усложнение задачи (учет «непрямоугольных» F , расчет не двух, а трех параметров) резко увеличивает дисперсию, особенно в трехпараметрической задаче, и делает ее заметно выше шумов в исходных данных (а в некоторых случаях приводит к практической неустойчивости [4]).

Исследования алгоритмов решения таких более сложных задач нами продолжаются. В данной же статье мы ограничились установлением возможности решения обратных задач нелинейной лазерной флуориметрии. И, как это обычно делается, на первом этапе рассмотрели простейший случай.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 99-02-17946), программы «Фундаментальная спектроскопия» ГКНТ РФ (проект № 1.6) и Федеральной целевой программы «Интеграция» (УНЦ «Фундаментальная оптика и спектроскопия»).

1. Фадеев В.В., Чекалюк А.М., Демидов А.А., Аброскин А.Г., Малинина Е.Л., Маслюкова Л.Л., Шанта И. *Труды III конф. по люминесценции* (Сегед, Венгрия, 1979, с.149).
2. Фадеев В.В., Чекалюк А.М., Чубаров В.В. *ДАН СССР*, **262**, 338 (1982).
3. Тихонов А.Н., Арсенин В.Я. *Методы решения некорректных задач* (М., Наука, 1979).
4. Тихонравов А.В., Трубецков М.К. В сб. *Компьютеры в лаборатории* (М., изд-во МГУ, 1992, с.32).
5. Коробов В.Е., Чибисов А.К. *Успехи химии*, **52**, 43 (1983).

О.В.Козырева, К.В.Попов. On the uniqueness of the solution of inverse problems in saturation fluorimetry of organic compounds.

The theoretical and practical uniqueness of the results obtained by the method of nonlinear laser fluorimetry is considered. The theoretical uniqueness of measuring three basic photophysical parameters (the absorption cross section, the excited-state lifetime, and the quantum yield of intersystem crossing) from fluorescence saturation curves is proved rigorously mathematically. The practical uniqueness of the results obtained by this method is proved by the measurements of the absorption cross section and the excited-state lifetime from the calculated curves of fluorescence saturation simulating fluorescence saturation of aqueous solutions of dyes rhodamine 6G, eosin, and Bengal blue.