

вое распространение зондирующего сигнала из-за отражения от Земли или скользящего падения на неоднородности сред распространения. Возможность учета таких ситуаций требует особого рассмотрения.

Выводы

Неоднородная структура сред распространения сигнала может оказывать значительное, иногда определяющее влияние на точность восстановления вертикальных профилей метеопараметров в эксперименте с использованием GPS. Возможно «затенение» атмосферных неоднородностей ионосферными или возникновение ложных возмущений на профиле. Характерные атмосферные возмущения ($1 \div 5\%$ относительно регулярных значений) могут компенсироваться влиянием спорадических структур, лежащих на одном зондирующем луче.

Коррекция влияния ионосферы с использованием (4) в случае неоднородностей может приводить к ошибкам восстановления профилей не меньше 0,5%, что в диапазоне высот 10–35 км для профиля температуры составляет не меньше 1 К. Низкое горизонтальное разрешение является источником дополнительных ошибок. С высотой ошибки растут из-за относительного роста влияния ионосферы и процессов стратификации в атмосфере.

Итак, увеличение точности определения метеопараметров атмосферы Земли для экологических приложений возможно в случае комплексной диагностики сред распространения зондирующего излучения при получении информации разными методами спутникового и наземного мониторинга.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 96-05-65875 и 98-05-64952).

Литература

1. *Phinney R.A., Anderson D.L.* // J. Geophys. Res. 1968. **73**, No. 5. P. 1819.
2. *Татарский В.И.* // Изв. АН СССР, ФАО. 1968. **4**, № 8. С. 811.
3. *Яковлев О.И.* Распространение радиоволн в космосе. М., 1985.
4. *Волков А.А., Гурвич А.С., Соколовский С.В.* // Изв. АН СССР, ФАО. 1987. **23**, № 11. С. 1228.
5. *Яковлев О.И., Гришмановский В.А., Елисеев С.Д.* и др. // ДАН. 1990. **315**, № 1. С. 101.
6. *Гурвич А.С., Соколовский С.В.* // Изв. АН СССР, ФАО. 1985. **21**, № 1. С. 12.
7. *Воробьев В.В., Красильникова Т.Г.* // Изв. РАН, ФАО. 1993. **29**, № 5. С. 626.
8. *Hoeg P., Syndergaard S., Hauchecorne A.* et al. Derivation of Atmospheric Properties Using a Radio Occultation Technique: ESA Rep. ESTEC/11024/94/NL/CN. Copenhagen, Denmark, 1995.
9. *Горбунов М.Е.* // Изв. РАН, ФАО. 1994. **30**, № 6. С. 776.
10. *Козаков Л.Я., Ломакин А.Н.* Неоднородности коэффициента преломления воздуха в тропосфере. М., 1976.
11. *Klobuchar J.A., Doherty P.H., Davies K.* // Proc. Int. Beacon Sattel. Symp. Aberystwyth, 1994. P. 1.
12. *Куницын В.Е., Усачев А.В.* // Геомагнетизм и аэрономия. 1988. **28**, № 5. С. 855.

УДК 535.372.2

НЕЛИНЕЙНАЯ ФЛУОРИМЕТРИЯ КАК МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ПРИРОДНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ

В. В. Фадеев

Обобщаются результаты исследований по насыщению флуоресценции природных органических комплексов. Анализируются проблемы, которые необходимо решить для становления нелинейной флуориметрии (флуориметрии насыщения) как принципиально нового метода спектроскопии, позволяющего определять молекулярные фотофизические параметры сложных органических соединений и комплексов *in vivo* и *in situ*. Сообщается о двух подходах к решению обратных задач флуориметрии насыщения. Приводятся результаты компьютерных и реальных экспериментов, иллюстрирующие возможности нелинейной лазерной флуориметрии в диагностике природных органических комплексов.

Введение

Центральной проблемой в дистанционной лазерной диагностике природных органических комплексов (ПОК) в воде и на суше является проблема идентификации и определения состояния этих комплек-

сов. Идентификация объекта важна не только сама по себе, она необходима и для его количественного определения оптическими методами, в частности методом флуориметрии, который широко используется в диагностике ПОК.

По крайней мере три препятствия возникают на пути решения указанной задачи:

а) большая ширина полос флуоресценции ПОК и их перекрытие в природных средах, в частности в природных водах; даже при возбуждении на длине волны $\lambda_{\text{exc}} = 266$ нм (4-я гармоника Nd³⁺:YAG-лазера), когда ситуация наиболее благоприятна, это препятствие не устраняется полностью [1];

б) идентичность или близость полос флуоресценции представителей одного класса ПОК, поскольку, как правило, флуоресцирующие центры в них одни и те же: хлорофилл «а» в большинстве водорослей [2]; по-видимому, один флуорофор в водном гумусовом веществе (ВГВ) [3]; две-три флуоресцирующих аминокислоты в белковых соединениях [1]; с большой вероятностью, один флуорофор в данном классе нефтей и нефтепродуктов [4];

в) изменение состояния ПОК, как правило, не отражается на форме и положении полосы флуоресценции, но влияет на ее интенсивность; особенно ярко это проявляется для фитопланктона [2].

Двадцатилетний опыт работы в области флуориметрии ПОК убеждает нас, что преодолеть указанные препятствия и решить проблему идентификации ПОК невозможно в рамках только феноменологического подхода, т.е. оперируя лишь спектрами (излучения, возбуждения флуоресценции, полными спектрами люминесценции и др.), хотя, конечно, эти спектры дают большой объем информации. Необходимо выходить на молекулярный уровень и в дополнение к спектрам использовать молекулярные фотофизические параметры — сечения поглощения, флуоресценции, возбуждения флуоресцирующих молекул, константы скоростей внутримолекулярных переходов и межмолекулярного переноса энергии возбуждения. При этом указанные параметры необходимо измерять *in vivo* и *in situ*.

В настоящее время единственный способ измерения указанных фотофизических параметров — нелинейная лазерная флуориметрия (флуориметрия насыщения). Важно подчеркнуть, что на этом пути решаются не только прикладные задачи диагностики ПОК, но и фундаментальные проблемы: установление механизмов фотофизических процессов (на молекулярном уровне) при взаимодействии лазерного излучения с ПОК; выявление природы полос флуоресценции; изучение генезиса и трансформации ПОК в воде, например изучение происхождения водного гумусового вещества (в частности, путем измерения параметров для органических соединений типа меланоидинов, участвующих в реакции Майяра) или изучение процессов трансформации нефтей и нефтепродуктов в воде — процесса «старения».

Таким образом, нелинейная флуориметрия — это принципиально новый подход во флуориметрии, и значение его разработки выходит далеко за рамки диагностики ПОК.

В статье обобщаются результаты исследований, которые выполняются в Московском государственном

университете автором и его группой в области флуориметрии насыщения ПОК.

Насыщение флуоресценции: основные понятия, первые применения в диагностике ПОК

Уже в первых наших экспериментах по лазерной флуориметрии водных сред в 1975–1977 гг. мы обратили внимание на насыщение флуоресценции фитопланктона.

Рисунок 1, впервые опубликованный в работе [5], наглядно иллюстрирует это явление: с ростом плотности потока фотонов возбуждающего излучения F параметр $\Phi = I_{\text{fl}}/I_{\text{RS}}$ уменьшается (I_{fl} , I_{RS} — интенсивности полос флуоресценции фитопланктона и комбинационного (рамановского) рассеяния воды соответственно). Этот факт свидетельствует о насыщении флуоресценции фитопланктона, ибо интенсивность спонтанного комбинационного рассеяния линейно растет с ростом интенсивности возбуждающего излучения.

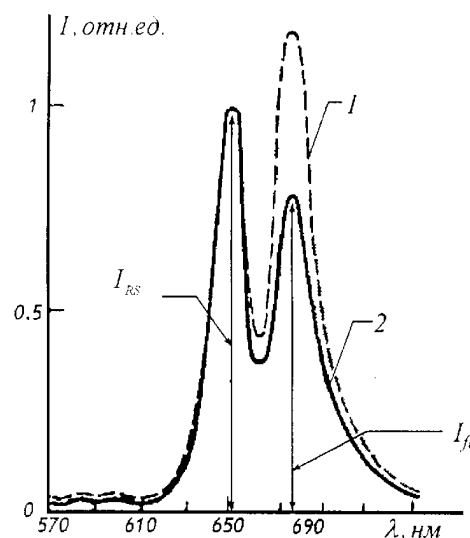


Рис. 1. Спектры отклика водной среды с фитопланктоном, снятые при двух значениях плотности потока фотонов возбуждающего излучения F : F_1 (спектр 1) и F_2 (спектр 2); $F_2/F_1 = 3$. Полосы с максимумами на $\lambda = 651$ нм — комбинационное (рамановское) рассеяние воды; с максимумом на $\lambda = 685$ нм — флуоресценция фитопланктона; длина волны возбуждения $\lambda_{\text{exc}} = 532$ нм. Спектры нормированы на интенсивность I_{RS} в максимуме рамановской полосы

Важно отметить, что заметное насыщение флуоресценции фитопланктона наблюдается уже при очень низких (для импульсных лазеров) плотностях потока фотонов: $F \approx 10^{22}$ см⁻²·с⁻¹, чему соответствует плотность мощности ~ 1 кВт/см² [6]. При типичных для сложных органических соединений (типа красителей или пигментов фотосинтезирующих организмов) значениях сечения поглощения $\sigma_{\text{abs}} \cong 10^{-16}$ см² и времени жизни возбужденного синглетного состояния $\tau_3 \cong 10^{-9} \div 10^{-8}$ с квазистационарная населенность возбужденного состоя-

ния при $F \cong 10^{22} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ составляет $n_3 \approx (0,01 \div \div 0,001)n_0$, где n_0 — концентрация флуоресцирующих молекул. Поэтому тривиальный механизм насыщения — динамическое обеднение основного состояния при $F \approx 10^{22} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ еще не проявляется [7]. Теперь мы знаем причину столь сильного насыщения флуоресценции органических комплексов типа фитопланктона при таких низких уровнях F — это синглет-синглетная ($S-S$)-аннигиляция, которая заметно проявляется при высоких локальных концентрациях флуоресцирующих молекул (при $C \geq 10^{-3} \text{ М}$); в пигмент-белковых комплексах фотосинтезирующих организмов концентрация флуоресцирующих молекул (хлорофилла «а») намного превышает эту границу: $C_{chl^a}^{loc} \approx 0,1 \div 1 \text{ М}$. Есть основания полагать, что и в других ПОК она может быть достаточно высокой (см. [3, 4]). Таким образом, возникла необходимость корректировать полученные значения параметра $\Phi = I_H/I_{RS}$ (интенсивность полосы комбинационного рассеяния воды используется в качестве внутреннего репера для непрерывной калибровки интенсивностей полос флуоресценции ПОК [8]) на эффект насыщения, чтобы восстановить параметр $\Phi_0 = I_H^0/I_{RS} = \lim I_H/I_{RS}$ при $F \rightarrow 0$, ибо именно он используется для определения концентрации флуоресцирующих молекул. Методика такой коррекции была создана [7] и постоянно совершенствовалась [2, 6].

В то же время эффект насыщения флуоресценции можно использовать для определения фотофизических характеристик сложных органических соединений и комплексов, поскольку параметры кривой насыщения зависят от этих характеристик. Впервые постановка такой задачи была сформулирована в 1979 г. [9], а затем развита в работах [7, 10, 11]. На этом этапе исследований, итог которого подведен в работе [12], был использован простейший подход, основанный на аналитических выражениях для фактора насыщения флуоресценции, получаемых в результате решения системы скоростных уравнений для населенностей уровней молекул в мономолекулярном приближении, т. е. без учета влияния межмолекулярных взаимодействий на кривые насыщения флуоресценции. Было показано, что для слабоконцентрированных растворов красителей такой подход позволяет определять сечение поглощения в отсутствие информации о концентрации и измерять время жизни возбужденного синглетного уровня с использованием возбуждающих импульсов, длительность которых значительно превышает это время. Такие определения невозможны в классической абсорбционной и кинетической спектроскопии.

В работе [12] этот подход был применен к одному из наиболее распространенных и интересных природных органических комплексов — водному гумусовому веществу, несмотря на возможную некорректность такого обобщения, поскольку в ВГВ можно было ожидать проявления межмолекулярных взаимо-

действий. Оценка сечения поглощения (в общем случае — сечения возбуждения флуоресцирующих центров) и сравнение его значения для различных размерных фракций ВГВ дало возможность сформулировать первый вариант гипотезы о природе полосы флуоресценции ВГВ (в работах [3,13] гипотеза получила свое дальнейшее развитие).

Очевидно, что аналитические выражения, полученные в мономолекулярном приближении при очень жестких предположениях, не отражают в полной мере сложных фотофизических процессов, происходящих в ПОК, и в 1992 г. [14, 15] началась разработка строгого метода нелинейной флуориметрии, основанного на канонической процедуре решения обратных задач, которая включает в себя построение достаточно адекватной физико-математической модели, решение на ее основе прямой задачи (в общем случае — численными методами) и поиске оптимального алгоритма решения обратной задачи, который бы обеспечил устойчивость решения и минимально возможные ошибки восстановления искомого параметра при данных ошибках эксперимента.

Физико-математические модели фотофизических процессов в ПОК и общая процедура расчета и представления кривых насыщения флуоресценции (прямая задача)

Кривая насыщения (в наиболее общем представлении — зависимость интенсивности I_H или числа фотонов N_H флуоресценции от плотности потока фотонов возбуждающего излучения F) может быть получена путем решения (аналитического или численного) системы кинетических уравнений для населенностей энергетических состояний флуоресцирующих молекул.

Узловым моментом этой процедуры является рациональный выбор физической модели, описывающей взаимодействие лазерного излучения (с его характерными параметрами) с ансамблем флуоресцирующих органических молекул или комплексов. В математической формулировке это фиксирует число параметров, подлежащих определению при решении обратной задачи. Исходя из особенностей кривых насыщения ПОК (см. [16]), можно предположить, что число таких параметров не должно превышать пяти.

В случае мономолекулярного раствора невзаимодействующих органических соединений (типа красителей) основными параметрами, влияющими на кривую насыщения, являются [17] (см. рис. 2):

сечение поглощения $\sigma_{abs} \equiv \sigma_{13}$, определяющее вероятность перехода молекул из основного синглетного состояния S_0 (с уровня «1») в первое возбужденное синглетное состояние S_1 (уровень «3») под действием потока фотонов с плотностью F ($\text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$);

время жизни τ_3 молекулы в состоянии S_1 , т. е. на уровне «3»;

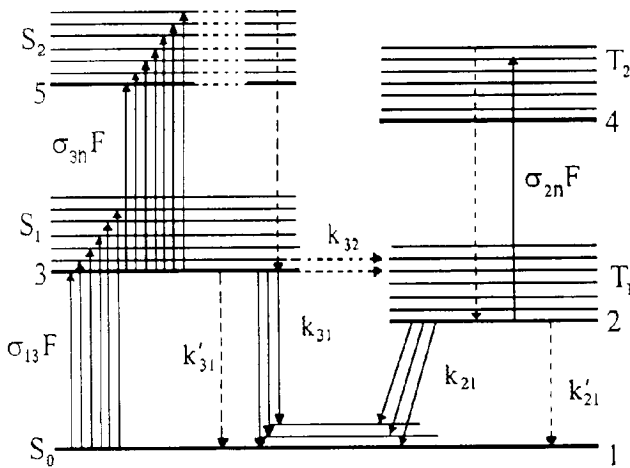


Рис. 2. Модель фотофизических процессов в сложных органических молекулах без учета межмолекулярных взаимодействий

квантовый выход молекул в нижнее триплетное состояние T_1 (на уровень «2») в результате интеркомбинационной конверсии $S_1 \rightarrow T_1$ ($\eta_T = k_{32}/k_3$, где $k_3 = k_{31} + k_{31}' + k_{32}$; k_{31} и k_{31}' — скорости излучательных и безызлучательных переходов из S_1 в S_0 ; k_{32} — скорость перехода $S_1 \rightarrow T_1$; $k_3^{-1} = \tau_3$).

К этим параметрам в ряде случаев могут быть добавлены сечения поглощения возбуждающего излучения молекулами в возбужденных состояниях S_1 и T_1 , причем этот эффект по-разному проявляется в оптически тонких и оптически толстых слоях; его влияние на кривую насыщения будет существенно разным для молекул, которые после перехода $S_1 \rightarrow S_n$ быстро возвращаются в S_1 , и молекул с большой вероятностью перехода из S_n непосредственно в S_0 .

Для расчета кривых насыщения флуоресценции красителей мы пока ограничились моделью с первыми тремя параметрами, которой соответствует система кинетических уравнений:

$$\begin{cases} \frac{\partial n_1(t, \mathbf{r}, z)}{\partial t} = (k_3 - k_{32})n_3(t, \mathbf{r}, z) - F(t, \mathbf{r}, z)\sigma_{13}n_1(t, \mathbf{r}, z), \\ \frac{\partial n_2(t, \mathbf{r}, z)}{\partial t} = k_{32}n_3(t, \mathbf{r}, z), \\ \frac{\partial n_3(t, \mathbf{r}, z)}{\partial t} = F(t, \mathbf{r}, z)\sigma_{13}n_1(t, \mathbf{r}, z) - k_3n_3(t, \mathbf{r}, z), \\ n_1 + n_2 + n_3 = n_0, \end{cases} \quad (1)$$

где z — координата вдоль направления распространения лазерного излучения, $\mathbf{r} = \{x, y\}$ — поперек пучка. Здесь не учтены переходы $T_1 \rightarrow S_0$ (и соответственно отсутствует параметр k_{21}), что правомерно, если длительность лазерного импульса $\tau_p \ll k_{21}^{-1}$, $k_{21}^{-1} = \tau_2$ — время жизни триплетного уровня. Для обычно используемых в нелинейной лазерной флуориметрии импульсных лазеров с $\tau_p = 10$ нс это условие заведомо выполняется.

Для рассматриваемых нами ПОК — фитопланктона, ВГВ, белковых соединений, нефтяных пленок —

в которых велики ($\gtrsim 10^{-3}$ М) локальные концентрации флуоресцирующих молекул, участвующих в формировании флуоресцентного отклика, необходимо ввести параметры, описывающие процессы переноса энергии между молекулами. Эти молекулы мы разобьем на три группы: флуорофоры — собственно флуоресцирующие молекулы; молекулы, которые поглощают возбуждающее излучение и переносят энергию на флуорофоры (назовем их «вспомогательными» по аналогии со вспомогательными пигментами в фотосинтезирующих организмах [2]), и молекулы, на которые флуорофоры могут переносить энергию возбуждения (распространяя терминологию с фотосинтезирующих организмов на все виды ПОК, назовем их «реакционными центрами»). Перенос энергии может происходить и между синглетно возбужденными молекулами одной группы (например, между молекулами флуорофоров); в каждом таком акте взаимодействия «уничтожается» одно из двух возбужденных состояний молекул — экситонов, вследствие чего этот процесс получил название синглет-синглетной ($S-S$) аннигиляции [17]. Таким образом, для ПОК к вышеперечисленным необходимо добавить еще несколько параметров:

константу скорости синглет-синглетной аннигиляции $k_{SS} \equiv \gamma$;

константу скорости переноса энергии со «вспомогательных молекул» («АМ») на флуоресцирующие $k_{AM, \Phi}$;

константу скорости переноса энергии с флуоресцирующих молекул на «реакционные центры» («RC») $k_{\Phi, RC}$.

В этом случае система кинетических (скоростных) уравнений для населенностей уровней энергии молекул флуорофоров заметно усложняется:

$$\begin{cases} \frac{\partial n_1}{\partial t} = -\sigma_{13}F n_1 + (k_3 - k_{32})n_3 + \frac{\gamma}{2}n_3^2 + k_{\Phi, RC} n_3 n_1^{RC}, \\ \frac{\partial n_2}{\partial t} = k_{32}n_3, \\ \frac{\partial n_3}{\partial t} = \sigma_{13}F n_1 - k_3 n_3 - \frac{\gamma}{2}n_3^2 + k_{AM, \Phi} n_3^{AM} n_1 - k_{\Phi, RC} n_3 n_1^{RC}. \end{cases} \quad (2)$$

К этой системе должны быть добавлены уравнения для населенностей уровней энергии «вспомогательных молекул» (n_i^{AM}) и «реакционных центров» (n_i^{RC}).

Для пигмент-белковых комплексов водорослей (фотосинтетических единиц) все три механизма установлены достаточно определенно и параметры γ , $k_{AM, \Phi}$ и $k_{\Phi, RC}$ конкретизированы (см. [2, 17]). Для остальных ПОК это еще предстоит сделать.

При определенных предположениях можно проинтегрировать «свертку» параметров, в частности, ввести эффективное сечение σ^* возбуждения флуоресцирующих молекул, которое определяется как поглоще-

нием возбуждающего излучения самими флуоресцирующими молекулами (сечением σ_{13}), так и переносом энергии на них со «вспомогательных молекул» (в случае фитопланктона — со вспомогательных пигментов). Введя сечение σ^* и включив перенос энергии с флуоресцирующих молекул на «реакционные центры» в константу k_3 (обозначим ее k_3^*), можно упростить систему (2):

$$\begin{cases} \frac{\partial n_1}{\partial t} = -\sigma^* F n_1 + (k_3^* - k_{32}) n_3 + \frac{\gamma}{2} n_3^2, \\ \frac{\partial n_2}{\partial t} = k_{32} n_3, \\ \frac{\partial n_3}{\partial t} = \sigma^* F n_1 - k_3^* n_3 - \frac{\gamma}{2} n_3^2. \end{cases} \quad (3)$$

Найдя путем решения системы кинетических уравнений величину населенности первого возбужденного уровня n_3 , вычисляем число фотонов флуоресценции, излучаемых объемом V :

$$N_{\Phi} = k_{13} \int_0^{\infty} dt \int_V dV n_3(t, \mathbf{r}, z), \quad (4)$$

где $dV = drdz$. В большинстве расчетов мы использовали приближение оптически тонкого слоя, когда $F(z) \approx \text{const}$, что соответствовало ситуациям в лабораторных экспериментах, но может не выполняться при дистанционном зондировании всей водной толщи (к этому вопросу мы вернемся в конце статьи).

Разные фотофизические параметры по-разному влияют на кривую насыщения флуоресценции, что иллюстрирует рис. 3, где кривые насыщения представлены в двух системах координат: (N_{Φ}, F) и (Γ, F) , $\Gamma = \Phi_0/\Phi$ — фактор насыщения флуоресценции. Как видно из рисунка, S-S-аннигиляция при больших локальных концентрациях флуоресцирующих молекул начинает проявляться при существенно более низких уровнях F , чем просветление оптически тонкого слоя. Сравнение с кривыми рис. 3 экспериментальных кривых насыщения, снятых для фитопланктона и слабоконцентрированного раствора хлорофилла «а» — основного пигмента фотосинтезирующих организмов (рис. 4), указывает на то, что в фитопланктоне велик вклад S-S-аннигиляции в протекание фотофизических процессов, а в растворе хлорофилла «а» (так же, как и вообще в низкоконцентрированных растворах красителей и родственных им органических соединений) он отсутствует.

Отметим, что разделение механизмов насыщения является в определенной степени условным. Например, S-S-аннигиляция не только приводит к «уничтожению» одного из двух возбужденных состояний (экситонов), но и к сокращению времени возврата молекулы из состояния S_1 в S_0 , т. е. противодействует механизму обеднения основного состояния.

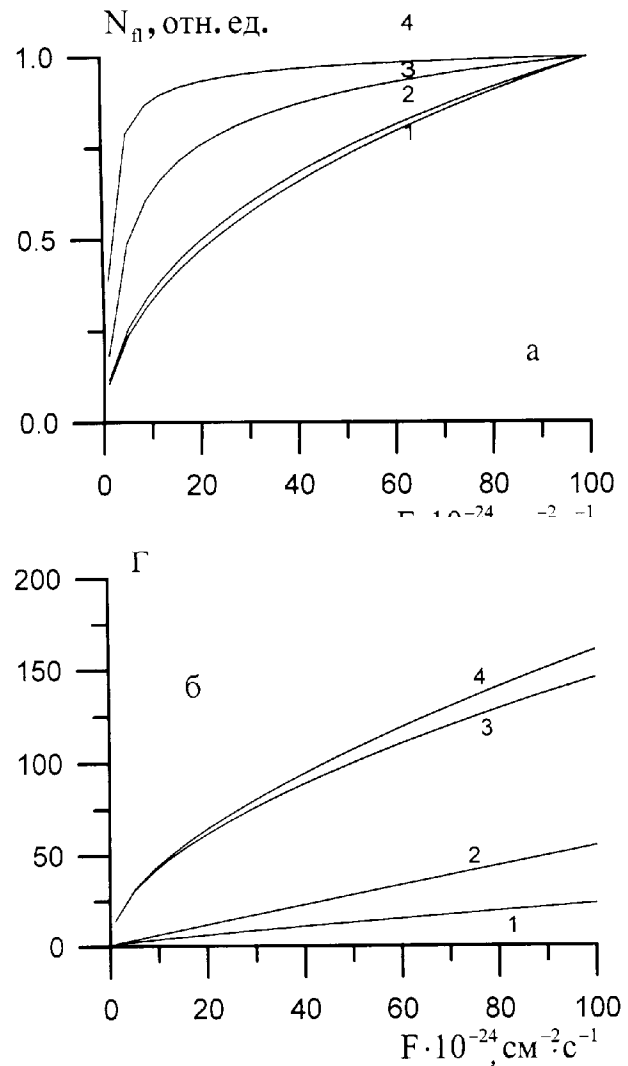


Рис. 3. Влияние различных фотофизических параметров на форму кривой насыщения флуоресценции. Кривые рассчитаны по системе (3): $\sigma^* = 10^{-16} \text{ см}^2$, $\tau_3 = (k_3^*)^{-1} = 6 \text{ нс}$ (для всех кривых); $\eta_T = 0$, $\gamma_{n_0} = 0$ (кривая 1); $\eta_T = 0,5$, $\gamma_{n_0} = 0$ (2); $\eta_T = 0$, $\gamma_{n_0} = 10^{11} \text{ с}^{-1}$ (3); $\eta_T = 0,5$, $\gamma_{n_0} = 10^{11} \text{ с}^{-1}$ (4)

Во всех алгоритмах решения обратных задач флуориметрии насыщения очень важно рационально выбрать форму представления кривой насыщения. Наиболее информативной является кривая насыщения в координатах (N_{Φ}, F) , где N_{Φ} — число фотонов флуоресценции, F — плотность фотонов возбуждающего лазерного излучения. Однако измерять величину N_{Φ} в абсолютных единицах чрезвычайно сложно, в реальных условиях эксперимента — практически безнадежное дело. Эта трудность в большой степени преодолевается (при диагностике ПОК в водной среде) путем использования внутреннего репера — сигнала комбинационного рассеяния воды, т. е. при представлении кривой насыщения в координатах $(\Phi = N_{\Phi}/N_{RS}; F)$ или в координатах (Φ^{-1}, F) . Можно представлять кривую насыщения в координатах (Γ, F) , где $\Gamma = N_{\Phi}^0/N_{\Phi} = \Phi_0/\Phi$ — фактор насыщения; $\Phi_0 = \lim_{F \rightarrow 0} \Phi(F)$ при $F \rightarrow 0$; это

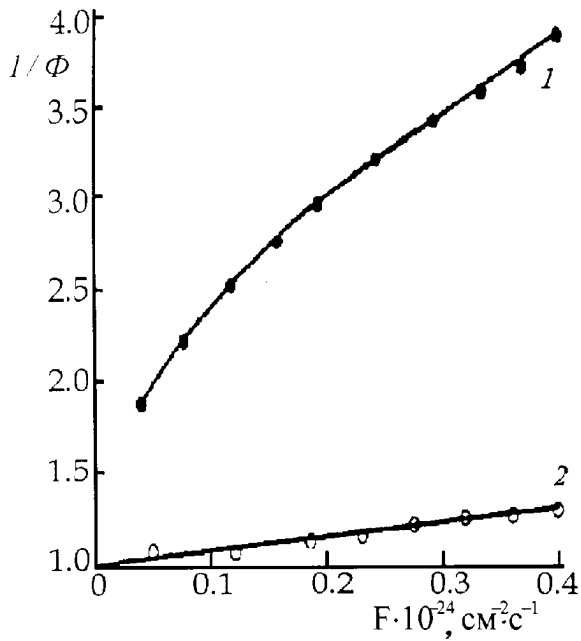


Рис. 4. Экспериментальные кривые насыщения флуоресценции фитопланктона (1) и слабоконцентрированного раствора хлорофилла «а» в ацетоне (2)

представление передает форму кривой насыщения, но не содержит информации об абсолютном значении числа фотонов флуоресценции. Для определения Γ в эксперименте необходимо найти величину Φ_0 , что можно сделать путем экстраполяции измеренного участка кривой $\Phi^{-1}(F)$ в точку $F = 0$. Если в случае слабых растворов красителей эта процедура достаточно проста, то для ПОК задача значительно сложнее (см. рис. 3) из-за проявления S - S -аннигиляции. Для фитопланктона, в котором S - S -аннигиляция проявляется сильно (а возможно, и для других ПОК), параметр Φ_0 может быть найден из экспериментальной кривой насыщения, построенной в несколько неожиданных координатах (Φ^{-1} , N_{fl}), в которых экспериментальные кривые насыщения достаточно хорошо аппроксимируются полиномами [2]:

$$\begin{aligned} \Phi^{-1} &= \Phi_0^{-1} + AN_{\text{fl}} && \text{для } F \leq 5 \cdot 10^{23} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}, \\ \Phi^{-1} &= \Phi_0^{-1} + C_1 N_{\text{fl}} + C_2 N_{\text{fl}}^2 && \text{для } F \leq 5 \cdot 10^{25} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}. \end{aligned} \quad (5)$$

Однако использование кривой насыщения в координатах (Γ , F) не всегда продуктивно. В частности, для слабых растворов красителей зависимость $\Gamma(F)$ близка к линейной: $\Gamma \cong 1 + \beta F$ вплоть до $F = 10^{25} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Следовательно, может быть решена лишь однопараметрическая обратная задача — определен коэффициент β . В каждом конкретном случае для каждого конкретного алгоритма решения обратной задачи следует использовать свою оптимальную форму представления кривой насыщения. В ряде случаев можно одновременно пользоваться несколькими представлениями.

Таблица 1

Параметры красителей, определенные из кривых насыщения флуоресценции с применением метода наименьших квадратов (МНК) и искусственных нейронных сетей (ИНС) (результаты численного эксперимента)

Уровень шума, %	МНК		ИНС	
	$\langle \sigma_{13} \rangle \cdot 10^{16}$, см ²	$\langle \tau_3 \rangle$, нс	$\langle \sigma_{13} \rangle \cdot 10^{16}$, см ²	$\langle \tau_3 \rangle$, нс
Родамин 6Ж				
	(2,50)	(4,0)	(2,50)	(4,0)
0	2,50	4,0	2,50	4,0
1	2,50	4,0	2,49	4,0
3	2,50	4,0	2,51	4,0
5	2,50	4,0	2,51	4,0
10	2,54	4,0	2,51	4,0
Эозин				
	(1,10)	(1,4)	(1,10)	(1,4)
0	1,10	1,4	1,10	1,4
1	1,10	1,4	1,10	1,4
3	1,10	1,4	1,10	1,3
5	1,10	1,4	1,10	1,3
10	1,10	1,4	1,10	1,4
Бенгальский розовый				
	(1,20)	(0,10)	(1,20)	(0,10)
0	1,20	0,10	1,20	0,10
1	1,20	0,10	1,20	0,11
3	1,21	0,11	1,21	0,06
5	1,21	0,12	1,21	0,09
10	1,22	0,14	1,22	0,16
В скобках приведены истинные значения параметров.				

Устойчивость и единственность обратных задач флуориметрии насыщения

В общем случае обратная задача флуориметрии насыщения является некорректно поставленной по Адамару [18]. Однако, используя априорную информацию о фотофизических процессах, формирующих флуоресценцию сложных органических соединений и ПОК, можно ограничить число параметров модели и пределы их изменения, так что задача перейдет в класс условно-корректных или просто корректных, по Тихонову [19]. В работе [20], выполненной нами совместно с сотрудниками Научно-исследовательского вычислительного центра МГУ А. В. Тихонравовым и К. В. Поповым, показано, что решение трехпараметрической обратной задачи для мономерного раствора невзаимодействующих молекул (раствора красителей) единственно и устойчиво, т. е. задача является корректно поставленной по Тихонову. Есть основания полагать, что добавление синглет-синглет-

ной аннигиляции не приведет к утрате этого свойства, хотя здесь требуется отдельное доказательство.

Мы провели апробацию двух методов решения обратной задачи флуориметрии насыщения. Подробно это сделано для кривых насыщения, рассчитанных для низкоконцентрированных растворов трех красителей с известными фотофизическими параметрами $\sigma_{abs} \equiv \sigma_{13}$, τ_3 и η_T ; значения этих параметров для красителей, использованные при решении обратных задач флуориметрии насыщения, приведены в скобках в табл. 1 и 2. Одним из этих методов задача решена для экспериментальных кривых насыщения флуоресценции представителей трех классов ПОК — фитопланктона, ВГВ и нефтяных пленок.

Т а б л и ц а 2

Одновременное определение трех фотофизических параметров красителей с использованием ИНС (численный эксперимент)

Уровень шума, %	$\langle \sigma_{13} \rangle \cdot 10^{16}$, см ²	$\langle \tau_3 \rangle$, нс	$\langle \eta_T \rangle$
Родамин 6Ж			
	(2,50)	(4,0)	(0,002)
0	2,49	3,9	0,004
1	2,56	3,8	0,0039
3	2,85	3,5	0,0036
5	3,02	3,5	0,0038
10	3,10	3,8	0,0053
Эозин			
	(1,10)	(1,4)	(0,68)
0	1,14	1,4	0,94
1	1,20	1,3	0,89
3	1,42	1,2	0,78
5	1,52	1,1	0,75
10	1,56	1,1	0,67
Бенгальский розовый			
	(1,20)	(0,095)	(0,95)
0	1,85	0,083	0,53
1	1,83	0,086	0,54
3	1,67	0,098	0,66
5	1,53	0,109	0,77
10	1,17	0,137	1,17
В скобках приведены истинные значения параметров.			

Решение обратных задач флуориметрии насыщения вариационным методом с применением квазиньютоновского метода минимизации функционала невязки

Первый из выбранных нами методов решения обратных задач флуориметрии насыщения относится к

классу вариационных методов [20], в основе которых лежит минимизация невязки между экспериментальными и теоретическими данными. При использовании вариационных методов приходится сталкиваться с техническими трудностями, связанными с многоэкстремальностью функционала невязки, а также с его сложной «овражной» структурой. Одним из эффективных методов преодоления этих трудностей является квазиньютоновский метод [21]. Именно он и был применен для расчета параметров σ_{13} и τ_3 в рамках двухпараметрической задачи без учета межмолекулярных взаимодействий. С использованием системы уравнений (1) был выполнен численный эксперимент, в котором определялись параметры σ_{13} и τ_3 для трех красителей, обладающих существенно различными величинами параметра η_T (см. табл. 2). Моделировались экспериментальные кривые насыщения, которые искусственно зашумлялись с помощью генератора случайных чисел (амплитуда шумов варьировалась от 0 до 10%). Определялись средние значения и дисперсии параметров [20]. Оказалось, что средние значения параметров, полученные в результате решения обратной задачи, отклоняются от истинных не более чем на 2–3% (за исключением величины $\langle \tau_3 \rangle$ для красителя бенгальского розового, отклонение которой от истинного значения τ_3 составило от 10 до 40% при уровне шума 3–10%, см. табл. 1), а дисперсия восстановленных параметров не превышала уровень шумов в «экспериментальных» кривых насыщения.

Решение обратных задач флуориметрии насыщения методом искусственных нейронных сетей

Искусственные нейронные сети (ИНС) являются мощным средством, позволяющим эффективно решать разнообразные задачи распознавания образов, классификации и прогнозирования. Уникальным свойством нейросетей является их способность обучаться на примерах и не просто запоминать, а обобщать представленную информацию, выявлять скрытые закономерности и классифицировать предъявляемые данные [22]. Есть единичные публикации о применении нейронных сетей для распознавания спектральных образов органических комплексов в воде [23] и в задачах дистанционного зондирования [24].

Способность нейросетей извлекать важные характеристики из вводимых данных и восстанавливать параметры даже в тех случаях, когда влияние этих параметров на сигнал неизвестно или искажено шумом, позволяет использовать технику нейросетей для решения некорректных обратных задач.

Ниже кратко излагаются первые результаты применения ИНС для решения обратных задач флуориметрии насыщения. Более подробно они изложены в докладах [25–28].

Решались двух- (определение σ_{13} и τ_3) и трехпараметрические (определение σ_{13} , τ_3 и η_T) обратные задачи для кривых насыщения, рассчитанных по системе уравнений (1) для параметров трех красителей, приведенных в табл. 1, 2. За небольшими исключениями (параметры τ_3 для бенгальского розового и η_T для родамина 6Ж) дисперсии восстановленных параметров и их отклонения от истинных как в двух-, так и в трехпараметрической задаче не превысили ошибок «экспериментальных» кривых насыщения (см. табл. 1, 2).

Метод ИНС был применен для определения параметров σ^* и γ по экспериментальным кривым насыщения трех видов водорослей, оптически тонких пленок нефти и дизельного топлива, ВГВ в природных водах разных типов. Кривые насыщения приведены на рис. 4–6, а результаты решения обратной задачи — в табл. 3 (n_0 — локальная концентрация флуоресцирующих молекул в ПОК, поэтому γn_0 — максимальная при данном значении γ величина скорости S–S-аннигиляции). В расчете распределение плотности потока фотонов возбуждающего излучения $F(t, \mathbf{r})$ было взято прямоугольным по пространству и гауссовым по времени, что весьма грубо аппроксимировало реальные распределения $F(t, \mathbf{r})$ в использованных в экспериментах лазерных пучках.

Т а б л и ц а 3

Фотофизические параметры природных органических комплексов, определенные из экспериментальных кривых насыщения методом ИНС

Образцы	λ_{exc} , нм	$\sigma \cdot 10^{17}$, см ²	$\gamma n_0 \cdot 10^{-8}$, с ⁻¹
Водоросли <i>Nitzschia</i>	532	230	1200
Водоросли <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	532	420	2400
Водоросли <i>Platimonas viridis</i>	532	220	11800
Дизельное топливо	355	10	8,8
Сырая шанская нефть	532	8,0	5,3
ВГВ из Балтийского моря	308	2,9	3,0
ВГВ из р. Москвы	308	6,0	2,6
ВГВ из Мексиканского залива	308	5,7	6,5

Полученные значения σ^* и γn_0 мы рассматриваем как предварительные, они будут уточняться по мере совершенствования метода и апробации других моделей. Сопоставление величин σ^* и γn_0 для разных классов ПОК и разных представителей в одном классе позволяет сделать ряд выводов. Первый из них состоит в том, что величины σ^* и γn_0 для фитопланктона находятся в хорошем качественном согласии с ожидаемыми значениями σ^* (значения этого параметра *in situ* получены впервые) и с известными значениями γ , полученными методом пикосекундной лазерной спектроскопии [29]. Эти значения

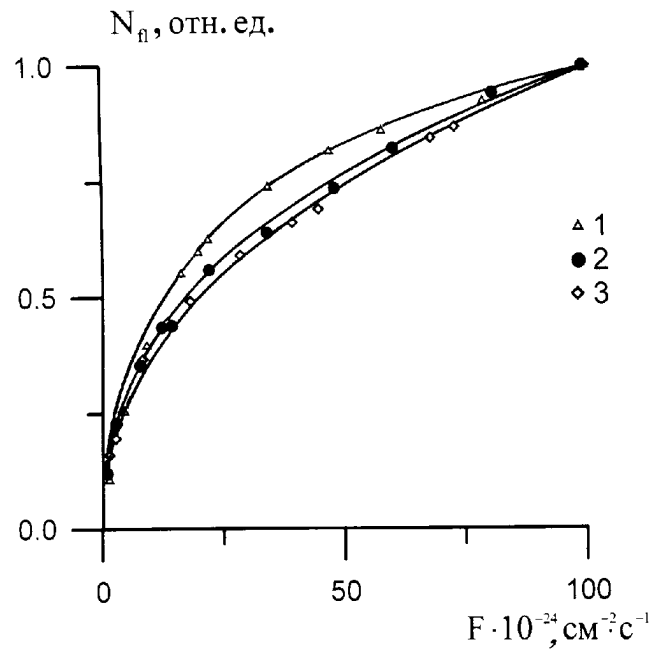


Рис. 5. Экспериментальные кривые насыщения различных образцов ВГВ из Балтийского моря (1), Мексиканского залива (2), р. Москвы (3); длина волны возбуждения 308 нм. Кривые нормированы на величины N_n при максимальном значении F

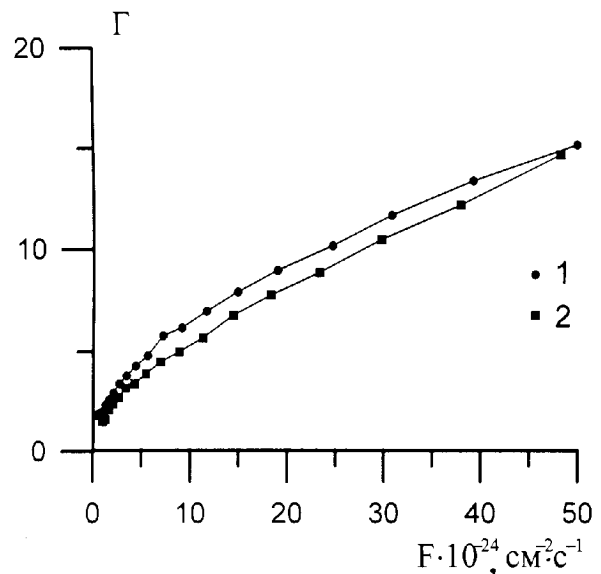


Рис. 6. Экспериментальные кривые насыщения флуоресценции: 1 — пленки дизельного топлива ($\lambda_{\text{exc}} = 355$ нм), 2 — пленки Шанской нефти ($\lambda_{\text{exc}} = 532$ нм)

подтверждают большую роль миграции энергии в формировании флуоресцентного отклика фитопланктона на оптическое возбуждение.

Что касается двух других классов ПОК, то полученные для них значения σ^* и γn_0 сравнить не с чем, а их величины свидетельствуют о существенно более низкой локальной концентрации n_0 флуоресцирующих молекул в комплексах, чем это имеет место в фитопланктоне, и, как следствие, меньшем вкладе процесса переноса энергии. Впрочем, этот вывод сле-

дует рассматривать как предварительный, ибо он получен для модели, не учитывающей синглет-триплетную конверсию ($\eta_T = 0$) и, возможно, ряд других процессов, могущих дать вклад в насыщение флуоресценции.

Возможности реализации флуориметрии насыщения ПОК в дистанционном режиме

На пути применения метода флуориметрии насыщения в дистанционном режиме для исследования и диагностики ПОК в водных средах и на суше стоит ряд препятствий, которые необходимо преодолеть.

Первое из них связано с необходимостью располагать точными абсолютными значениями плотности потока фотонов лазерного излучения F_i , при которых измеряются числа фотонов флуоресценции N_{Fi} или параметры $\Phi_i(F_i) = N_{Fi}/N_{RSi}$. И в лабораторных измерениях (на пробах) это непростая задача. В дистанционном варианте она многократно усложняется, особенно если сигнал флуоресценции принимается не от поверхности (как в случае зондирования нефтяной пленки), а из всей толщи воды или из заглубленного слоя. Наиболее кардинальный способ определения F_i — использование «эталонного» органического соединения, что было предложено в работе [12]. При анализе проб таким соединением может быть любой краситель с известными значениями σ_{abs} , τ_3 и η_T (лучше, если $\eta_T = 0$). При дистанционном зондировании водных сред единственный кандидат на роль эталонного соединения — ВГВ. Возможность использования ВГВ в указанной роли зависит от степени изученности фотофизических параметров ВГВ и их постоянства, хотя бы в данной акватории.

Вторая проблема — нарушение условия оптически тонкого слоя в случае, если длительность лазерного импульса τ_p и длительность строба τ_g не удовлетворяют условиям: $c\tau_p \leq \varepsilon^{-1}$, $c\tau_g \leq \varepsilon^{-1}$, где ε — показатель полного ослабления для воды на длине волны лазерного излучения. В случае зондирования слоя с произвольной оптической толщиной необходимо не только интегрирование отклика по всей толщине (такая процедура уже выполнялась в работе [30]), но и необходимость учета других механизмов насыщения, о которых упоминалось выше (в частности, поглощения накачки на возбужденных состояниях). Здесь еще предстоит теоретические и экспериментальные исследования с целью выбора оптимального режима зондирования.

Заключение

Проведенный в данной работе анализ результатов исследований насыщения флуоресценции ПОК, выполнявшихся нашей группой начиная с 1975 г., и исследование подходов к решению обратных задач флуориметрии насыщения ПОК показали, что 1) этот эффект необходимо учитывать при интерпретации результатов лазерного зондирования водных

сред и 2) возможно измерение фотофизических параметров ПОК с приемлемой точностью методом флуориметрии насыщения с использованием по крайней мере двух алгоритмов решения обратных задач.

Впервые измерены фотофизические параметры фитопланктона, ВГВ и нефтяных пленок *in vivo* и *in situ*.

Выполненные исследования мы рассматриваем пока лишь как демонстрацию возможностей лазерной флуориметрии насыщения, стимулирующую более широкомасштабные и глубокие исследования и применение в диагностике ПОК. На этом пути необходимо будет преодолеть ряд серьезных трудностей, на которые указано в работе. Однако усилия здесь оправданы перспективами использования этого принципиально нового подхода, значение которого выходит за рамки только лазерной диагностики ПОК.

Автор благодарит сотрудников его группы Т. А. Доленко, Е. М. Филиппову, С. М. Глушкова и В. В. Чубарова за помощь в подготовке материалов статьи и полезные обсуждения.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 96-02-18175) и программы «Фундаментальная спектроскопия» Госкомитета РФ по науке и технологиям.

Литература

1. *Filippova E.M., Chubarov V.V., Fadeev V.V.* // Canadian J. Appl. Spectr. 1993. **38**, No. 5. P. 139.
2. *Фадеев В.В., Бушин Д.К., Венедиктов П.С.* // Квант. электроника. 1996. **23**, № 11. С. 963.
3. *Filippova E.M., Fadeev V.V., Chubarov V.V.* // Proc. SPIE. 1994. **2370**. P. 651.
4. *Таер Абд Дейдан, Пацаева С.В., Фадеев В.В., Южасков В.И.* // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 1994. № 2. С. 51 (Moscow University Phys. Bull. 1994. No. 2. P. 48).
5. *Фадеев В.В.* // Квант. электроника. 1978. **5**, № 10. С. 2221.
6. *Иванов И.Г., Фадеев В.В.* // Там же. 1988. **15**, № 1. С. 191.
7. *Фадеев В.В., Чекалюк А.М., Чубаров В.В.* // ДАН СССР. 1982. **262**, № 2. С. 338.
8. *Клышко Д.Н., Фадеев В.В.* // ДАН СССР. 1978. **238**, № 2. С. 320.
9. *Фадеев В.В., Чекалюк А.М., Демидов А.А.* и др. // Тр. 3-й конф. по люминесценции. Сегед, Венгрия, 1979. С. 149.
10. *Маслюкова Л.Л., Демидов А.А., Фадеев В.В.* и др. // Тр. X конф. по когерентной и нелинейной оптике. Киев, 1980. Ч. 2. С. 97.
11. *Chekalyuk A.M., Fadeev V.V., Georgiev G.M., Nickolov Zh.S.* // Opt. Commun. 1981. **38**, No. 3. P. 177.
12. *Фадеев В.В.* Дис... докт. физ.-мат. наук. М. (физ. ф-т МГУ), 1983.
13. *Филиппова Е.М.* Дис... канд. физ.-мат. наук. М. (физ. ф-т МГУ), 1994.
14. *Джасим С.Я., Серов Н.Я., Фадеев В.В., Чекалюк А.М.* // Журн. прикл. спектр. 1992. **56**, № 2. С. 252.

15. Серов Н.Я., Фадеев В.В., Чекалюк А.М. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 1992. № 5. С. 48 (Moscow University Phys. Bull. 1992. No. 5. P. 44).
16. Фадеев В.В., Доленко С.А., Доленко Т.А. и др. // Квант. электроника. 1997. 24, №6. С. 571.
17. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М., 1986.
18. Тихонов А.Н., Дмитриев В.И., Гласко В.Б. Математические методы в разведке полезных ископаемых. М., 1983.
19. Тихонов А.Н., Арсенин В.Я. Методы решения некорректных задач. М., 1980.
20. Доленко Т.А., Козырева О.В., Попов К.Д. и др. // Тез. докл. Всерос. конф. «Физические проблемы экологии (Физическая экология)». М., 1997. Т. 2. С. 29.
21. Компьютеры в лаборатории / Под ред. А.В. Тихонравова. М., 1992.
22. Lippman R.P. // IEEE ASSP Mag. 1987. 3, No. 2. P. 4.
23. Orlov Yu.V., Rebrik S.P., Persiantsev I.G., Babichenko S.M. // Proc. SPIE. 1995. 2503. P. 150.
24. Tzeng Y.C., Chen K.S., Kao W.-L., Fung A.K. // IEEE Trans. Geosci. Remote Sensing. 1994. 32. P. 1096.
25. Dolenko S.A., Dolenko T.A., Fadeev V.V. et al. // Proc. Conf. on Adaptive Computing in Design and Manufacture. Plymouth, UK, Apr. 1998. P. 54.
26. Filippova E.M., Boichuk I.V., Dolenko T.A., Fadeev V.V. // Proc. 3-rd EARSeL Workshop on Lidar Remote Sensing of Land and Sea. Tallinn, Estonia, 1997. P. 51.
27. Fadeev V.V., Rubin G.L., Uvenkov Ya.V. // Ibid. P. 133.
28. Chubarov V.V., Fadeev V.V., Glushkov S.M. // Ibid. P. 163.
29. Брагинская О.В. // Дис... канд. физ.-мат. наук. М. (МГУ, физ. ф-т), 1984.
30. Баулин Е.В., Фадеев В.В. // Изв. АН СССР, ФАО. 1985. №1. С. 105.