ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ РАСТВОРОВ ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ

УДК 543.426
ВАК 02.00.02

Гудилин Д.Ю., к.т.н., ООО "ЛабПро Медиа"

Анализ растворов высокой концентрации методом флуоресцентной спектроскопии является сложной практической проблемой вследствие эффекта внутреннего фильтра – поглощения возбуждающего излучения и излучения флуоресценции внутри образца. При этом разбавление образцов до низких концентраций далеко не всегда отвечает условиям проведения исследований. Решить указанную проблему позволяет спектральный флуориметр Duetta, в котором реализована функция автоматической компенсации эффекта внутреннего фильтра.

Спектроскопические методы, основанные на измерении флуоресценции, широко применяются в науках о жизни, материаловедении и других областях. В частности, метод флуоресцентной спектроскопии используется для обнаружения, определения концентрации, изучения структуры, стабильности и взаимодействия биологических объектов – от молекул и их комплексов до клеток и тканей. В этих исследованиях могут быть задействованы разные типы флуорофоров – элементы внутренней структуры изучаемых объектов, флуоресцентные зонды, которые специфически связываются с исследуемыми объектами, флуоресцентные красители и т.п.

К достоинствам флуоресцентной спектроскопии относятся очень высокая чувствительность, возможность исследования биологических объектов в естественных условиях без их повреждения, высокая скорость измерений и хорошее пространственное разрешение. Однако флуоресцентному методу свойственны и существенные ограничения, в частности, обусловленные значительными ошибками при измерении жидких образцов с высокой концентрацией флуоресцирующего вещества.

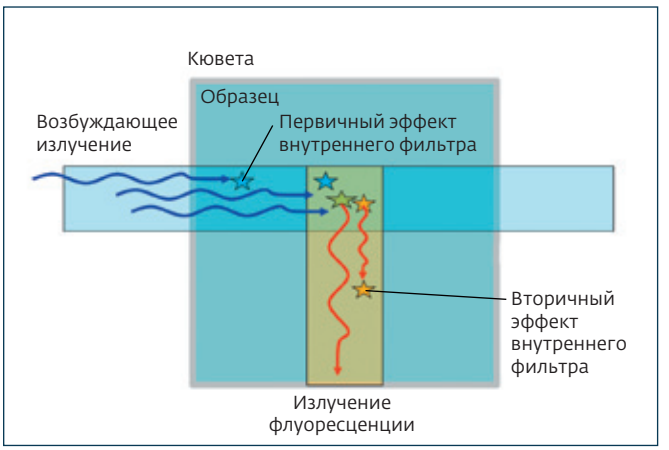

Рис.1. *Прохождение излучения через кювету с образцом (вид сверху) и эффект внутреннего фильтра при флуоресцентной спектроскопии*

ЭФФЕКТ ВНУТРЕННЕГО ФИЛЬТРА

Концентрация флуоресцирующего вещества в растворе прямо связана с его оптической плотностью. При оптической плотности исследуемого образца на длине волны возбуждающего излучения менее 0,1 ед. зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации флуоресцирующего вещества близка к линейной. Однако с повышением концентрации эта связь становится все более сложной вплоть до появления неконтролируемых искажений формы регистрируемого детектором спектра. Причина этих явлений – так называемый эффект внутреннего фильтра (Inner Filter Effect), который в англоязычной литературе принято делить на первичный и вторичный (рис.1) [1].

Первичный эффект внутреннего фильтра – концентрационное тушение флуоресценции вследствие неравномерного поглощения возбуждающего излучения в объеме образца. С ростом концентрации образец все сильнее поглощает возбуждающее излучение, причем, начиная с определенных значений оптической плотности, этот процесс становится неравномерным. Когда большая часть излучения поглощается сразу при входе в образец, его передние относительно хода луча области начинают работать как оптический фильтр. В результате освещенность образца становится неравномерной, а интенсивность флуоресценции снижается. При очень высоких концентрациях/оптических плотностях флуоресценция наблюдается только в приповерхностном слое и практически не достигает детектора. Первичный эффект внутреннего фильтра проявляется тем сильнее, чем выше поглощающая способность компонентов образца на длине волны возбуждающего излучения.

Вторичный эффект внутреннего фильтра – реабсорбция, или вторичное поглощение излучения флуоресценции внутри образца, искажающее регистрируемый детектором спектр. Реабсорбция наблюдается в случаях, когда спектры поглощения и флуоресценции исследуемого вещества перекрываются (рис.2), т.е. молекулы флуорофора имеют небольшой стоксов сдвиг. Искажения регистрируемого спектра тем выше, чем больше оптическая плотность веще-

DOI: 10.32757/2619-0923.2020.6.15.54.58

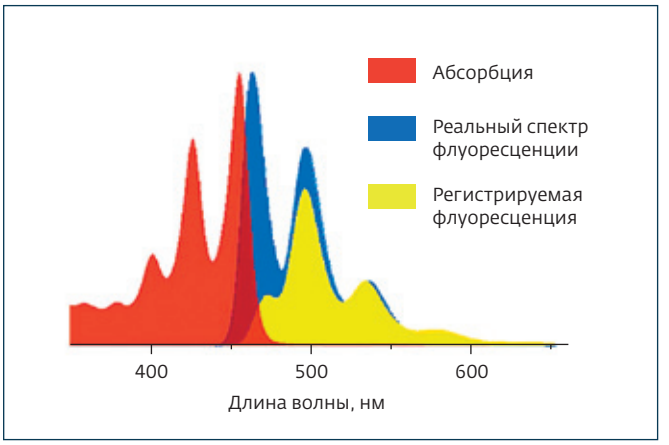

Рис.2. *Вторичный эффект внутреннего фильтра искажает регистрируемый детектором спектр*

Рис.3. *Спектральный флуориметр Duetta*

ства в области перекрывания спектров. Таким образом, вторичный эффект внутреннего фильтра также пропорционален концентрации образца. Хотя молекулы флуорофора, поглощая флуоресцентное излучение, могут вновь излучать свечение, интенсивность последнего вследствие безызлучательного расхода части энергии будет неизбежно уменьшаться.

Проблема компенсации эффекта внутреннего фильтра и линеаризации зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации флуоресцирующего вещества рассматривалась во многих научных работах и до настоящего времени остается актуальной. В основном исследователи старались компенсировать первичный эффект путем введения в расчетную формулу поправочного коэффициента [2]. Поскольку такой коэффициент должен учитывать параметры, которые при практической работе точно определить невозможно, обычно пользуются упрощенными соотношениями [3, 4].

Для повышения точности измерений флуоресценции рекомендуется предварительно получать спектр поглощения образца и использовать концентрации, оптическая плотность которых на длине волны возбуждающего излучения не превышает 0,1 ед. [5]. Если указанных мер недостаточно, то предлагается использовать длину волны возбуждения на 10–50 нм ниже максимума поглощения, чтобы снизить влияние вторичного эффекта внутреннего фильтра. Также рекомендуется минимизировать длину оптического пути в толще образца, применяя кювету возможно меньшего объема.

К сожалению, проведение измерений при низких концентрациях флуоресцирующих веществ во многих случаях нежелательно или даже невозможно, например, при изучении взаимодействия биологических макромолекул в условиях, близких к in vivo. Также с высококонцентрированными растворами приходится работать при изучении свойств флуоресцентных красителей, процессов самотушения флуоресценции, образования димеров и эксимеров. Поэтому измерение флуоресценции растворов, обладающих высокой оптической плотностью, – задача чрезвычайно актуальная.

АНАЛИЗ ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННЫХ РАСТВОРОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ СПЕКТРАЛЬНОГО ФЛУОРИМЕТРА DUETTA

В 2018 году корпорация HORIBA представила спектральный флуориметр Duetta – первый в мире серийный прибор, который может выполнять анализ с одновременным использованием методов абсорбционной и флуоресцентной оптической спектроскопии (рис.3). В Duetta применен детектор на базе матрицы ПЗС, что позволило на порядок повысить скорость измерения по сравнению с флуориметрами, оборудованными фотоэлектронным умножителем, а также расширить рабочую область в ближнем ИК-диапазоне до 1100 нм. Важное преимущество реализации двух дополняющих друг друга методов в одном приборе состоит в исключении ошибок, которые возникают при перемещении образца между разными спектрометрами.

Основные режимы работы спектрального флуориметра Duetta:

- анализ спектров излучения флуоресценции;
- анализ спектров возбуждения флуоресценции;
- построение трехмерной матрицы зависимости спектров флуоресценции от длины волны возбуждения – так называемого "отпечатка пальцев" исследуемых молекул;
- исследование кинетики флуоресценции;
- получение спектров или исследование кинетики поглощения и пропускания.

В первых трех режимах одновременно с регистрацией флуоресценции проводится измерение поглощения/про-

Рис.4. *Интерфейс программного обеспечения EzSpec*

пускания. Поэтому технология построения молекулярного "отпечатка пальцев" получила название A-TEEM (Absorbance-Transmittance Excitation Emission Matrix – матрица спектров флуоресценции с учетом поглощения/пропускания). На основе измерения спектров пропускания выполняется автоматическая компенсация эффекта внутреннего фильтра. Результаты измерений обрабатываются программным обеспечением EzSpec (рис.4). Для компенсации эффекта внутреннего фильтра в расчетах используется следующая формула [6]:

$$F_c = F_o \cdot 10^{\frac{A_{ex}+A_{em}}{2}},$$

где F_c – скорректированная величина флуоресценции; F_o – измеренная или наблюдаемая интенсивность флуоресценции; A_{ex} – оптическая плотность на длине волны возбуждения; A_{em} – оптическая плотность образца на длине волны излучения.

На основе матриц A-TEEM может выполняться идентификация компонентов хемометрическими методами, например, с применением параллельного факторного анализа. Важнейшее требование в этом случае – независимость результатов измерений от концентрации образца, для чего необходима компенсация эффекта внутреннего фильтра.

Как показала практика использования Duetta, прибор позволяет с хорошей точностью анализировать растворы высокой концентрации. Рассмотрим несколько примеров таких исследований.

Анализ сульфата хинина

Сульфат хинина – сернокислая соль хинина, получаемого из коры хинного дерева. Это вещество применяется в лекарственных препаратах для лечения малярии, а также входит в состав тоников. Сульфат хинина обладает флуоресценцией и может исследоваться методом флуоресцентной спектроскопии. С другой стороны, для него свойственно перекрытие спектров поглощения и флуоресценции, что обуславливает необходимость компенсации эффекта внутреннего фильтра при анализе.

На рис.5 и 6 показаны результаты измерения на спектральном флуориметре Duetta шести образцов растворов сульфата хинина в хлорной кислоте с концентрациями 5, 14, 20, 38, 63 и 86 мкМ [6]. На длине волны 349 нм их оптическая плотность составляла соответственно 0,03, 0,08, 0,12, 0,22, 0,36 и 0,49 ед. В качестве холостой пробы использовалась вода.

Спектры возбуждения флуоресценции (рис.5) и матрицы A-TEEM были получены в режимах с компенсацией эффекта внутреннего фильтра и без таковой. При построении матриц A-TEEM излучение возбуждения изменялось в диапазоне от 270 до 450 нм с шагом 2 нм, а спектры флуоресценции регистрировались в диапазоне от 300 до 700 нм при времени интегрирования 0,1 с. Все спектры были скорректированы с учетом темнового шума детектора и характеристик излучения лампы.

На рис.5 хорошо видно, что без компенсации эффекта внутреннего фильтра форма спектра искажается тем силь-

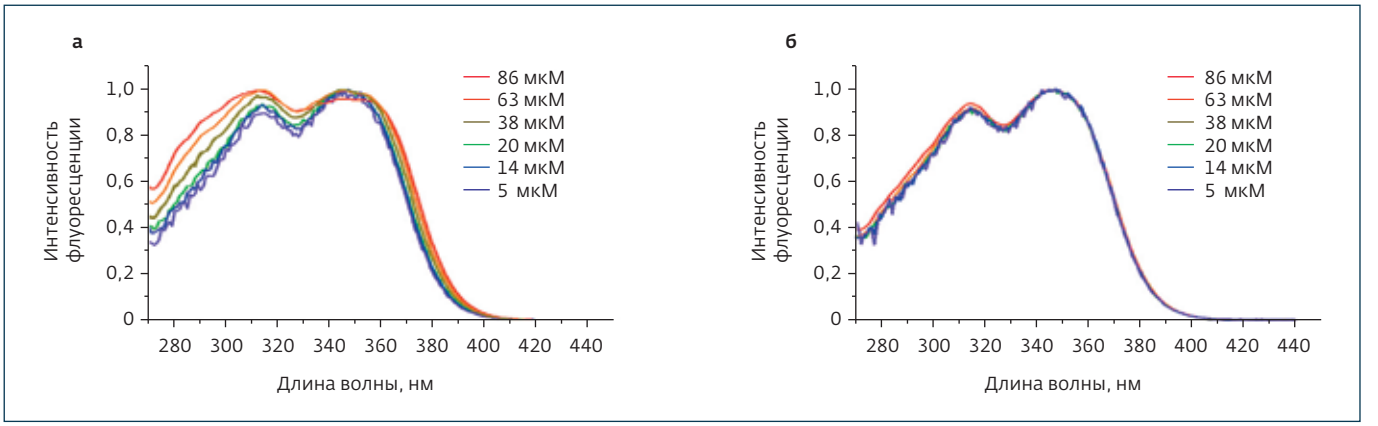

Рис.5. *Нормализованные спектры возбуждения флуоресценции: а – без компенсации эффекта внутреннего фильтра; б – с компенсацией эффекта внутреннего фильтра*

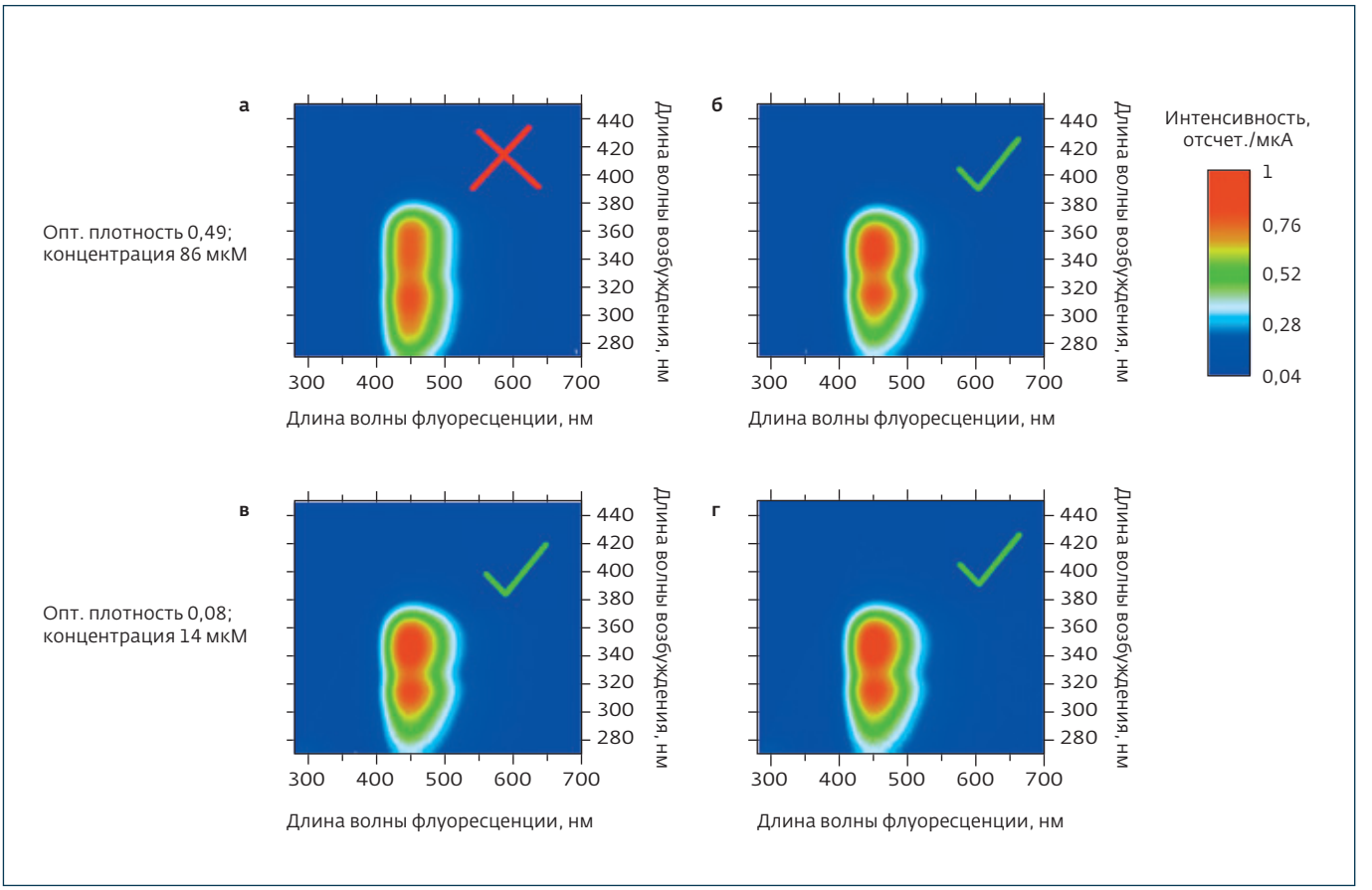

Рис.6. *Матрицы A-TEEM: а, в – без компенсации эффекта внутреннего фильтра; б, г – с компенсацией эффекта внутреннего фильтра*

нее, чем выше концентрация образца. Причем максимальные искажения свойственны диапазону возбуждающего излучения до 330 нм, где значительно влияние спектрального перекрытия. Рис.6 подтверждает факт существенной зависимости результатов измерения от концентрации при действии эффекта внутреннего фильтра. Вместе с тем обе диаграммы свидетельствуют о высокой эффективности применяемой в Duetta системы компенсации данного эффекта, позволяющей успешно анализировать образцы высокой концентрации.

Измерение коллоидных квантовых точек фосфида индия

Флуоресцентная спектроскопия является одним из основных методов исследования коллоидных квантовых точек – нанокристаллов, пассивированных слоем стабилизатора. Такие квантовые точки (КТ) могут создаваться на основе соединений A3B5. В частности, большой интерес представляют КТ на фосфиде индия (InP), которые обладают высокой стабильностью и свойством люминесценции в видимом и ближнем ИК-диапазонах [7]. Среди возможных областей их применения – создание светоизлучающих устройств, систем получения изображений, фотодетекторов и преобразователей солнечной энергии.

На рис.7 и 8 показаны результаты исследования на спектральном флуориметре Duetta образцов КТ с ядром из InP и оболочкой из ZnS, предоставленных французским Институтом химии Клермон-Ферран [8]. Концентрация исходного раствора составляла около 65 г/л. Помимо этого, были подготовлены еще два образца путем разбавления исходного раствора хлороформом в 10 и 100 раз. Образцы исследовались в кварцевых кюветах диаметром 1 см.

На первом этапе была получена A-TEEM-матрица неразбавленного образца, чтобы определить оптимальные спектральные диапазоны возбуждения и флуоресценции. Излучение возбуждения изменялось в диапазоне 300–700 нм с шагом 5 нм, спектры флуоресценции регистрировались в диапазоне 300–750 нм при времени интегрирования 0,05 с. Одновременно проводилось измерение оптической плотности. В качестве холостой пробы использовался раствор хлороформа.

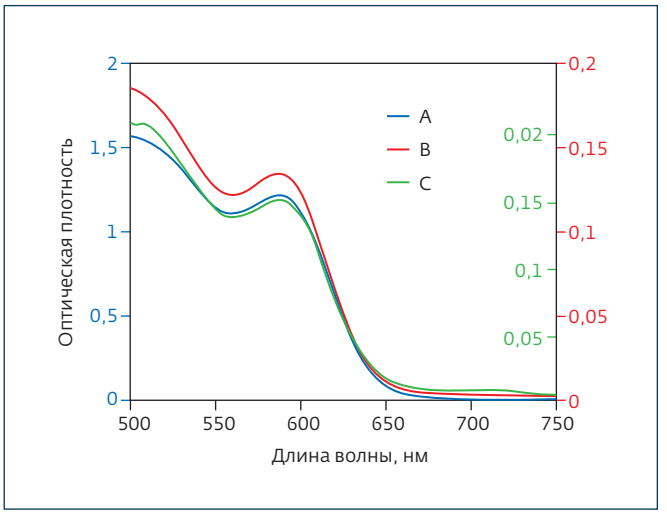

Рис.7. *Спектры поглощения: A – исходный раствор; B – образец, разбавленный в 10 раз; C – образец, разбавленный в 100 раз*

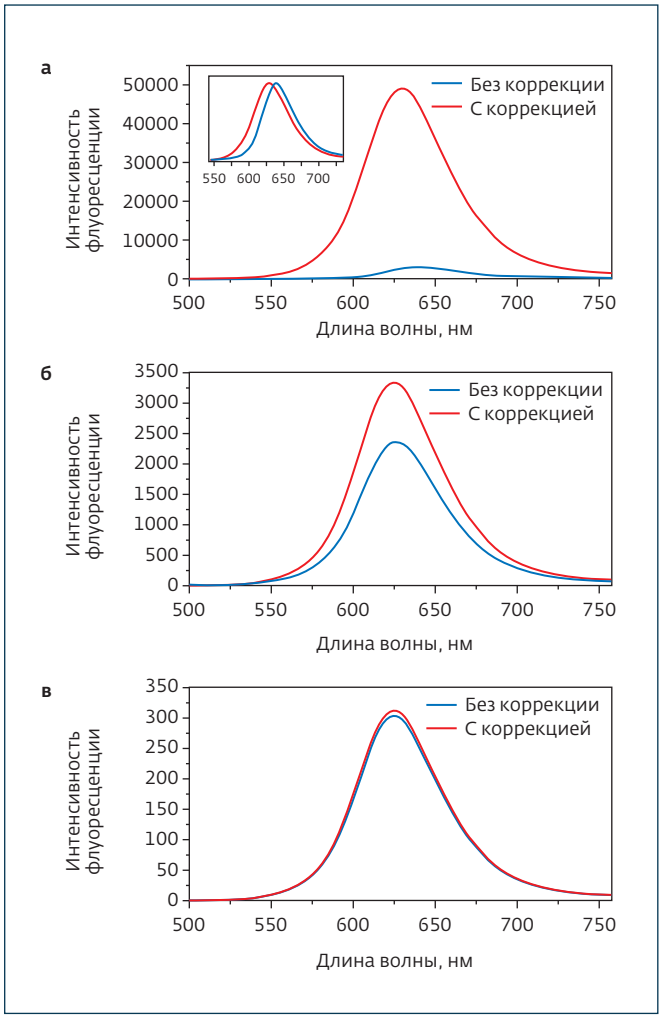

Рис.8. *Спектры излучения флуоресценции: а – исходный раствор; б – образец, разбавленный в 10 раз; в – образец, разбавленный в 100 раз*

На рис.7 приведены спектры поглощения для трех образцов разных концентраций. При длине волны возбуждающего излучения 586 нм значения оптической плотности составляют 1,22, 0,13 и 0,015 ед.

На рис.8 представлены спектры излучения флуоресценции с компенсацией эффекта внутреннего фильтра и без таковой. Графики показывают, что этот эффект сильно влияет на результаты измерения высококонцентрированных образцов, однако применяемая в Duetta система компенсации позволяет получить корректные спектральные данные.

* * * *

Эффект внутреннего фильтра оказывает значительное влияние на результаты флуоресцентного анализа образцов с высокой концентрацией флуорофоров, уменьшая интенсивность регистрируемого излучения и сдвигая пики в сторону от их истинных положений. При использовании обычных флуориметров для решения этой проблемы необходимо разбавлять образцы, что приемлемо далеко не во всех случаях, или же требуется дополнительное оборудование. Спектральный флуориметр Duetta одновременно измеряет спектры флуоресценции и поглощения, что позволяет компенсировать эффект внутреннего фильтра даже при анализе образцов высокой концентрации.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Kubista M.**, **Sjöback R.**, **Eriksson S.**, **Albinsson B.** Experimental correction for the inner-filter effect in fluorescence spectra // Analyst. 1994. Vol. 119. P. 417–419.
2. **Yappert M.C.**, **Ingle J.D.** Correction of polychromatic luminescence signals for inner-filter effects // Appl. Spectrosc. 1989. Vol. 43. P. 759–767.
3. **Fonin A.V.**, **Sulatskaya A.I.**, **Kuznetsova I.M.**, **Turoverov K.K.** Fluorescence of Dyes in Solutions with High Absorbance. Inner Filter Effect Correction // PLoS ONE. 2014. Vol. 9(7). e103878.
4. **Lakowicz J.R.** Principles of fluorescence spectroscopy. New York: Springer, 2006. 954 p.
5. What is the Inner Filter Effect? URL: https://www.edinst.com/us/blog/inner-filter-effect.
6. HORIBA Scientific. Automatic correction of fluorescence spectra for primary and secondary inner-filter effects (IFE) with Duetta // Application note. URL: http://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Products/Scientific/Molecular_and_Microanalysis/Duetta/Duetta_Automatic_Correction_of_Fluorescence_Spectra_for_Primary_and_Secondary_Inner-filter_Effects-Final.pdf.
7. **Janke E.M.**, **Williams N.**, et al. The origin of broad emission spectra in InP quantum dots: contributions from structural and electronic disorder // J. Am. Chem. Soc. 2018. Vol. 140(46). P. 15791–15803.
8. HORIBA Scientific. How Inner-Filter Effects (IFE) can affect your fluorescence measurements: a case study – colloidal InP quantum dots // Application note. URL: https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Application/Materials/Material_Research/Quantum_Dots/How_IFE_Can_Affect_Fluorescence_Measurements.pdf.

HORIBA
Scientific

Winner of the 2018 Pittcon Today
GOLD Excellence Award

Two in One!

Duetta™

Новое решение HORIBA Scientific: абсорбционный спектрометр и флуориметр в одном приборе

- Измерение поглощения и флуоресценции в УФ-ВИД-БИК диапазоне 250 – 1000 нм со сверхбыстрым построением матриц возбуждения – излучения
- Получение спектров флуоресценции в мгновение ока < 300 миллисекунд
- Скоростная идентификация веществ < 1 минуты
- Новое программное обеспечение EzSpec™ для сенсорных экранов

ООО "Хориба" I info@horiba.ru I +7 495 221 8771 I Алтуфьевское шоссе, д. 13, к. 5 I horiba.ru