

09

Статистический анализ матриц возбуждения-эмиссии для метода лазерно-индуцированной флуоресценции

© Н.А. Маслов^{1,2}, Е.О. Папаева^{1,2}

¹ Институт теоретической и прикладной механики им. С.А. Христиановича СО РАН, Новосибирск

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет
E-mail: nmaslov@itam.nsc.ru

Поступило в Редакцию 24 ноября 2015 г.

Предложен алгоритм статистического анализа совокупности многокомпонентных матриц возбуждения-эмиссии, основанный на методе главных компонент. Для оптически тонких образцов впервые показана возможность расчета спектров флуоресценции и возбуждения входящих в их состав неизвестных флуорофоров. На примере смесей трех флуоресцентных красок показано, что данный алгоритм позволяет перейти от знакопеременных главных компонент к положительным, соответствующим спектрам реальных веществ. При этом спектры главных компонент хорошо повторяют спектры исходных красителей.

В конденсированных средах из-за перекрытия энергетических уровней спектры флуоресценции становятся сплошными, т.е. в них теряется возможность различать отдельные спектральные линии, соответствующие определенным веществам. Поэтому часто для диагностики многих органических и неорганических объектов используют непосредственно форму спектра флуоресценции. Для определения состава образца его спектр представляют в виде суммы спектров известных флуорофоров, используя различные модели [1]. Учитывая сплошной характер спектров, это представляет определенную сложность. Кроме того, данный метод невозможно использовать, если в спектр вносят вклад априори неизвестные флуорофоры. Единственным способом остается физическое или химическое разделение образцов на составляющие с целью определить спектр неизвестной компоненты [2].

Для описания различия спектров образцов с неизвестным составом можно использовать статистический подход, например, метод главных компонент (МГК, principal component analysis, PCA) — аппроксимацию полученных данных линейными многообразиями меньшей размерности. Так, МГК используется для диагностики заболеваний, основанной на сравнении здоровых тканей с тканями, имеющими патологические изменения [3]. При этом спектры главных компонент имеют знакопеременную форму, что не позволяет сравнивать их с реальными веществами и устанавливать состав образца. Измерение матриц возбуждения-эмиссии — зависимости спектра флуоресценции от длины волны возбуждающего излучения, позволяет получить дополнительную размерность для анализа. МГК применяется и в этом случае [4], однако по-прежнему обладает описанными выше недостатками. Поскольку, как правило, формы спектров отдельных флуорофоров не зависят от длины волны возбуждающего излучения, можно использовать МГК в тензорном варианте. Однако для анализа состава образцов по неизвестным компонентам данный метод не применялся, а имеющиеся работы в основном предназначены для решения специфических задач, таких как распознавание лиц [5], походки [6], и не могут быть просто адаптированы для анализа спектров.

В данной работе предложен модифицированный алгоритм МГК для вычисления спектров возбуждения и флуоресценции флуорофоров из матриц возбуждения-эмиссии в образцах с неизвестным составом. При идентификации спектров флуоресцирующих компонент использовали модель, предложенную в работе [1]. Образец предполагали однородным, с равномерным распределением флуорофоров

$$f(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = \sum_i^N a_i E_i(\lambda_{ex}) F_i(\lambda_{em}). \quad (1)$$

Здесь $f(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$ — интенсивность флуоресценции на длине волны λ_{em} при возбуждении на λ_{ex} , $E(\lambda_{ex})$ — спектр возбуждения, $F(\lambda_{em})$ — спектр флуоресценции, i — номер флуорофора, N — общее число флуорофоров.

Для вычисления главных компонент применяли алгоритм NIPALS (non-linear iterative partial least squares) в тензорном виде со следующими модификациями. Общее количество главных компонент задавали изначально, следуя первоначальному предположению об их числе в

каждом конкретном типе образцов. После вычисления последней главной компоненты первую компоненту уточняли, формируя разностный тензор с учетом остальных вычисленных компонент. Затем таким же образом поочередно уточняли последующие компоненты. Эту процедуру повторяли до стабилизации среднеквадратичного отклонения. Если выяснялось, что заданное общее количество главных компонент плохо описывает анализируемые матрицы, это значение меняли на более подходящее.

Данный алгоритм был опробован на модельных матрицах возбуждения-эмиссии, составленных по формуле (1) из четырех произвольно задаваемых пар спектров возбуждения и флуоресценции. При вычислении первого приближения главные компоненты оказываются знакопеременными, что соответствует наилучшему описанию статистических различий спектров. По мере итераций расчеты сдвигаются в область положительных значений, и нескольких сотен итераций хватает для совпадения расчетных функций с исходными в пределах расчетов одинарной точности.

Для того чтобы показать возможность применения МГК для анализа матриц возбуждения-эмиссии, в качестве объекта исследования были выбраны художественные флуоресцентные красители Decola. В качестве источника возбуждающего излучения использовали лазерную систему Vibrant (HE) 355 II + UV (Opotek Ink) с оптопараметрической перестройкой длины волны. Регистрацию спектров лазерно-индуцированной флуоресценции осуществляли спектрометром Acton SpectraPro SP2300 (Princeton Instruments). Длины волн возбуждения сканировали в диапазоне от 210 до 330 nm с шагом в 10 nm, для каждой из них записывали спектр флуоресценции (260–830 nm с шагом в 0.5 nm). Полученные матрицы возбуждения-эмиссии анализировали с помощью МГК, в результате рассчитывались спектры возбуждения и флуоресценции компонент в образце.

На рис. 1, *a* представлены спектры флуоресценции красной, синей и зеленой флуоресцентных красок, для удобства сравнения нормированные на максимум интенсивности. Спектры возбуждения всех красок похожи по форме в диапазоне от 210 до 280 nm, отличия появляются только при возбуждении длинами волн более 290 nm. Затем краски смешивались в различных соотношениях концентраций и наносились тонким слоем на подложку из нержавеющей стали. После смешивания

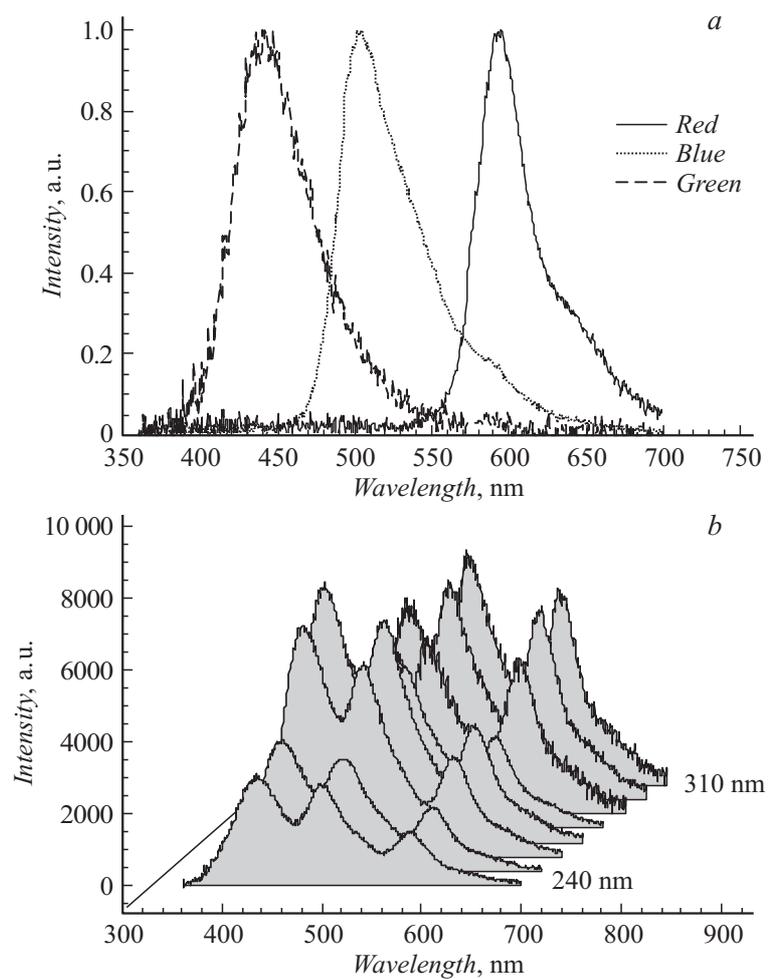


Рис. 1. Нормированные на максимум спектры флуоресценции красной, синей и зеленой флуоресцентной красок (а). Матрица возбуждения-эмиссии для смеси из трех флуоресцентных красок (красной, синей, зеленой). Возбуждение в диапазоне длин волн от 240 до 310 nm (b).

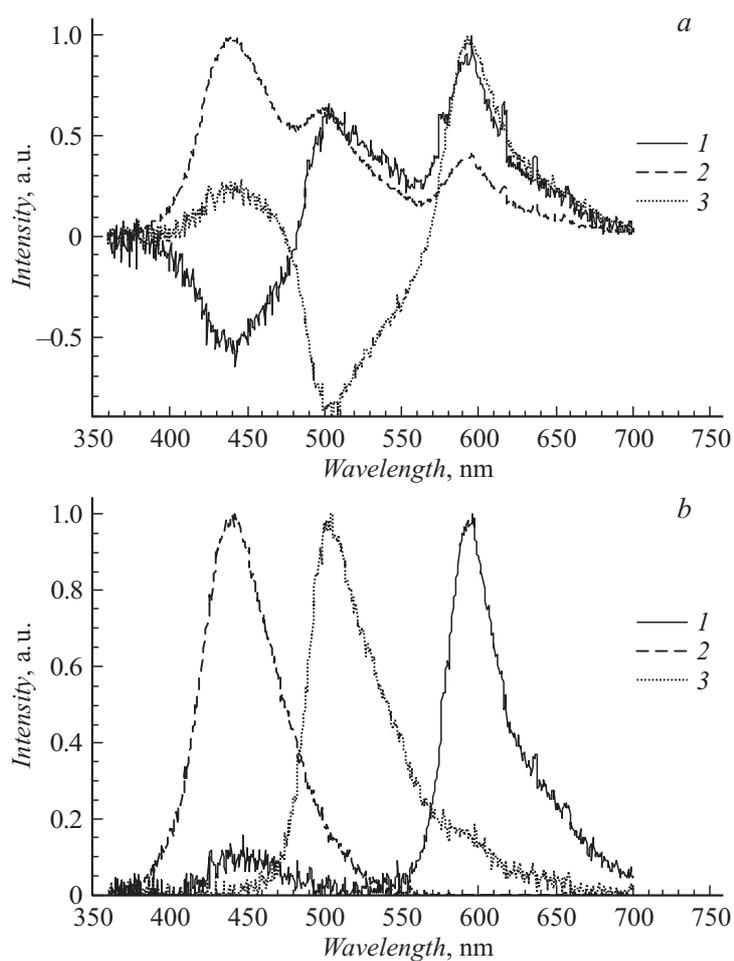


Рис. 2. Спектры флуоресценции первой, второй и третьей главных компонент для матриц возбуждения-эмиссии смесей красок, полученные после первой итерации расчета МГК (а), после 300 итераций расчета МГК (б).

красок спектры флуоресценции каждой смеси представляли собой графики сложной формы с двумя или тремя максимумами флуоресценции. Характерная матрица возбуждения-эмиссии для одной из смесей красок представлена на рис. 1, *b*. Спектры, соответствующие длинам волн возбуждения 210–230 nm, не показаны из-за низкой интенсивности флуоресценции и не использовались в анализе МГК.

На рис. 2, *a* представлены спектры флуоресценции главных компонент, полученные после первой итерации расчета, что соответствует результату при применении обычного алгоритма. Видно, что при первоначальном расчете спектры флуоресценции двух компонент выходят в отрицательную область, кроме того, нет однозначно выделенных максимумов.

После 50 итераций расчета начинают проявляться максимумы, соответствующие отдельным веществам. А после 300 итераций спектры флуоресценции представляют собой хорошо разделившиеся максимумы, ответственные за свечение отдельных компонент (рис. 2, *b*). Если сравнивать полученные методом главных компонент спектры флуоресценции с исходными спектрами красок, то можно отметить, что они совпадают с хорошей точностью (рис. 1, *a* и 2, *b*). Следовательно, алгоритм позволил рассчитать спектры флуоресценции основных компонент в смеси красок и идентифицировать их. Важно отметить, что, несмотря на похожие в диапазоне 240–280 nm спектры возбуждения, с помощью МГК удалось различить отдельные компоненты смеси.

Таким образом, с помощью модифицированного алгоритма NIPALS, пересчитывающего и уточняющего спектры, используя статистические различия матриц возбуждения-эмиссии, можно вычислять спектры основных флуоресцирующих компонент в смесях. При увеличении числа итераций расчета спектры меняют свою форму со знакопеременной на положительную. Это позволяет сравнивать их со спектрами реальных флуорофоров и идентифицировать компоненты смесей. Данный способ пригоден для оптически тонких образцов. В дальнейшем для совершенствования методики в модель для полной флуоресценции (1) может быть включено влияние реабсорбции флуоресценции и спектральной зависимости поглощения возбуждающего излучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-01-04788) и гранта правительства РФ для поддержки исследований под руководством ведущих ученых (договор № 14Z50.31.0019).

Список литературы

- [1] *Richards-Kortum R., Rava R.P., Cothren R.* et al. // *Spectrochim. Acta. Part A: Mol. Spectrosc.* 1989. V. 45. N 1. P. 87–93.
- [2] *Larionov P.M., Malov A.N., Maslov N.A.* et al. // *Appl. Opt.* 2000. V. 39. N 22. P. 4031–4036.
- [3] *Chowdary M.V.P., Mahato K.K., Kumar K.K.* et al. // *Photomedic. Laser Surgery.* 2009. V. 27. N 2. P. 241–252.
- [4] *Liu L., Nie Y., Lin L.* et al. // *Photodiagn. Photodynam. Therapy.* 2013. V. 10. N 2. P. 111–119.
- [5] *Kim K.I., Jung K., Kim H.J.* // *Signal Proc. Lett. IEEE.* 2002. V. 9. N 2. P. 40–42.
- [6] *Lu H., Plataniotis K.N., Venetsanopoulos A.N.* // *Neural Networks. IEEE Transactions on.* 2008. V. 19. N 1. P. 18–39.
- [7] *Liu C.-H., Wang W.B., Kartazaev V.* et al. // *Proc. SPIE. Opt. Biopsy VII.* 2010. V. 7561. P. 756 115 (8 p.)