

09;14;15

## Анализатор спектра флуоресценции на основе оптоволоконного Y-циркулятора

© Э.К. Алгазинов, В.А. Шульгин<sup>¶</sup>, И.А. Лавриненко, А.А. Сирота

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

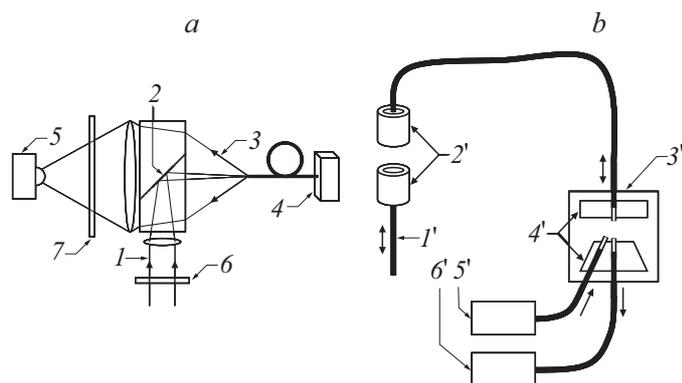
<sup>¶</sup> E-mail: shulgin@cs.vsu.ru

Поступило в Редакцию 5 февраля 2018 г.

Рассмотрен способ зондового анализа на основе оптоволоконной составной конструкции Y-циркулятора для реализации аппаратных средств лазерной флуоресцентной диагностики. В основе предложенного принципа построения анализатора лежит пространственное разделение направленных оптических пучков возбуждающего и флуоресцентного излучений. Проведен анализ условий применения Y-циркулятора в качестве пассивного оптоволоконного коммутатора. Выполнены экспериментальные исследования потерь коммутируемых излучений. Представлен пример использования анализатора для флуоресцентной диагностики биологических сред.

DOI: 10.21883/PJTF.2018.14.46344.17238

В настоящее время лазерные технологии активно используются для решения широкого класса задач, в том числе и в различных областях биологии и медицины. Проводимое с их помощью комплексное изучение характеристик поглощения, светорассеяния, люминесценции в сочетании с использованием математических моделей сложноструктурированных биологических сред [1,2] позволяет быстро интактно обнаруживать физиологические и морфологические изменения. Во многих приложениях актуальна задача создания системы диагностики непосредственно *in vivo*. Повышенный интерес в исследованиях *in vivo* проявляется к флуоресцентному спектральному анализу (ФСА), так как возбуждение клеточных структур и флуоресцентный отклик относятся к видимому и ближнему инфракрасному диапазонам спектра, в которых минимально нарушение жизнедеятельности биообъекта [3]. В задачах, не требующих получения изображений с высоким разрешением, используются методы ФСА с помощью оптоволоконных систем, которые обеспечивают передачу излучения между объектом, лазерным источником и анализатором. Известны два варианта их построения: с разделением



**Рис. 1.** Направляющая система пространственного разделения оптических пучков возбуждающего лазерного излучения и флуоресцентного отклика (*a*) и схема оптоволоконного коммутатора оптических пучков возбуждающего лазерного излучения и флуоресцентного отклика (*b*). Пояснения приведены в тексте.

оптических волокон по функциональному признаку на излучающие и приемные [4,5] и с одним волокном [6], передающим излучение лазерного источника в область контакта с объектом, собирающим флуоресцентный отклик и направляющим его с помощью дихроичного зеркала на вход спектрометра. В последнем случае реализуется принцип „независимой коммутации“ [7], базирующийся на спектральной селекции.

Целесообразным подходом, по нашему мнению, является использование схем ФСА, в которых спектральная селекция заменена на селекцию (независимую коммутацию) встречных пространственных пучков возбуждающего излучения и флуоресцентного отклика [8,9]. Задачей настоящей работы являются анализ и исследование инвариантных к длине волны возбуждающего источника контактных средств ФСА с использованием оптоволоконного зонда, представляющего собой элемент трехпортового  $Y$ -циркулятора.

В рамках предлагаемого подхода в реализованной системе ФСА, показанной на рис. 1, *a*, отсутствуют частотно-зависимые элементы разделения излучения. Ширина диапазона длин волн здесь ограничена только параметрами линзовой и призмной оптики. Выбор частотного диапазона исследований определяется источником лазерного излуче-

ния 1 и соответствующими фильтрами 6, 7. Минимизация потерь флуоресцентного излучения объекта 4 в схеме на рис. 1, а достигается за счет разницы между апертурным углом пучка 3 оптического волновода и пространственным углом вводимого в волновод лазерного пучка 1. Апертюра металлического зеркального покрытия 2 минимальна, что позволяет лишь незначительной части энергии пучка флуоресценции 3, направляемого в спектрометр 5, отразиться от зеркальной поверхности 2.

Дальнейшее развитие предлагаемого подхода реализовано в системе, представленной на рис. 1, б. Здесь используются возможности волоконной оптики, позволяющие создать схему невязимной коммутации оптических пучков малой апертюры по принципу Y-циркулятора. Преимущество данной системы состоит в том, что она не содержит делительных зеркал, линзовой оптики, элементов оптической юстировки. Предложенный принцип коммутации оптических пучков решает задачу их разделения независимо от спектрального и модового состава излучения, а также поляризации. В рассматриваемом Y-разветвителе невязимость обусловлена топологией коммутации оптических пучков. Излучение торца оптического волновода (первый порт разветвителя), сопряженного с лазерным источником 5', возбуждающего флуоресценцию, направляется в торец волновода (второй порт разветвителя) под некоторым углом, задаваемым направляющей системой 3' и 4'. Волновод второго порта оптическим разъемом 2' связан с „зондом“ 1' необходимой длины, выходной торец которого контактирует с исследуемым объектом. Диффузное излучение флуоресцентного отклика поступает во второй порт в пределах апертурного угла волновода, излучается из противоположного торца в осевом направлении и вводится в волновод (третий порт разветвителя), ось которого является продолжением оси волновода „зонда“. Далее излучение направляется в спектрометр 6'. При этом внешнее освещение не будет добавлено к сигналу флуоресценции, что важно при практическом использовании устройства.

При обосновании схемы, показанной на рис. 1, б, проводились выбор параметров оптических волокон и анализ влияния топологии с точки зрения минимизации потерь мощности при передаче излучения флуоресценции объекта на вход спектрометра и преобразования спекловой структуры излучения волновода, а также возможностей применения анализатора для безопасной зондовой регистрации спектров флуоресценции биологических объектов.

Выбор используемого типа волокон и их параметров для зонда при сборке Y-разветвителя осуществлялся исходя из условия минимизации потерь мощности при коммутации направляемых оптических пучков в торцы сопряженных волноводов, имеющих ограниченную апертуру сечения захвата излучения. При этом отношение диаметра волновода к диаметру волокна желательно обеспечить максимально близким к единице [9]. Используемые нами кварц-полимерные многомодовые волокна характеризуются стандартным рядом диаметров волновода  $d = 200, 400 \mu\text{m}$  и т.д. и отражающей полимерной оболочки толщиной  $h \sim 10\text{--}20 \mu\text{m}$ . Диаметр волновода близок в них к диаметру волокна, что позволяет минимизировать потери при коммутации оптических пучков составного Y-разветвителя [9], выполняющего в данном случае функцию трехпортового циркулятора. Остальные типы волокон общего применения по этому критерию имеют худшие характеристики.

Положительным эффектом при использовании косо́го ввода лучей в волновод является возможность подавления спеклового шума в области низких пространственных частот. Известно, что распределение поля кварц-полимерного многомодового волновода в дальней зоне торца в пределах апертурного угла аппроксимируется функцией Гаусса, на которую накладывается тонкая структура оптического пучка. Это позволяет анализировать коммутационные потери по значениям числовой апертуры волноводов. Расстояние  $\Delta z$  между торцами полимер-кварцевых волокон и апертурный угол  $\theta_1$  определяются радиусом  $a$  волновода:

$$\Delta z = a / \sin \theta_1. \quad (1)$$

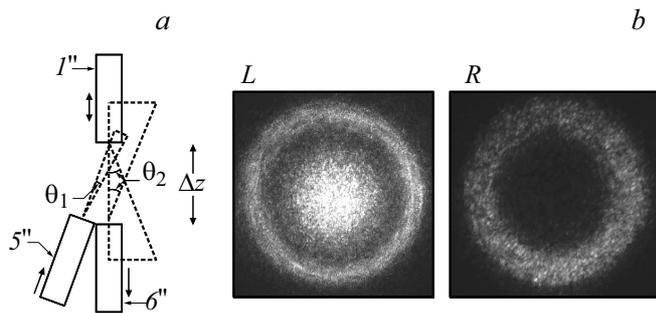
Из геометрических соображений следует, что для меридиональных лучей минимальные потери возможны при соотношении

$$\theta_1 \leq \theta_2/3. \quad (2)$$

Косое падение лучей из волновода  $5''$  (рис. 2, *a*) приводит к возбуждению немеридиональных направляющих мод волновода  $1''$ , локализованных в цилиндрической области в интервале радиусов  $r$

$$r_t < r < a, \quad (3)$$

где  $r_t$  — радиус внутренней цилиндрической области, свободной от лучей [10]. Окружность числовой апертуры NA по углу при приеме



**Рис. 2.** Геометрия апертурных углов волноводов (*a*) и интерференционная картина излучения торца оптического многомодового кварц-полимерного волокна в дальней зоне при возбуждении диодным лазером с  $\lambda = 650 \text{ nm}$  (*b*).

меридиональных лучей преобразуется в эллипс с переменным эксцентриситетом при приеме немеридиональных лучей:

$$\text{NA} = \sin \theta_{0c} / [1 - (r/a)^2 \sin^2 \varphi], \quad (4)$$

где  $\theta_{0c}$  — критический угол при возбуждении меридиональных лучей,  $\varphi$  — азимутальный угол падения луча. Из (4) следует, что в предложенной схеме создание свободной от аксиальных мод центральной области волновода эквивалентно выполнению функции заграждающего фильтра. Это позволяет исключить медленные вариации спекловой структуры освещения объекта, возникающие вследствие температурных изменений и деформаций оптических волноводов. На схеме (рис. 2, *a*) представлены соотношения апертурных углов  $\theta_1$ ,  $\theta_2$  для передающего лазерное излучение волновода  $5''$ , принимающего флуоресцентный отклик волновода  $6''$  и волновода зонда  $I''$ . На рис. 2, *b* представлены типичные изображения спекловой структуры излучения волновода при возбуждении аксиальных мод (*L*) и циркулярных мод при косом падении пучка (*R*).

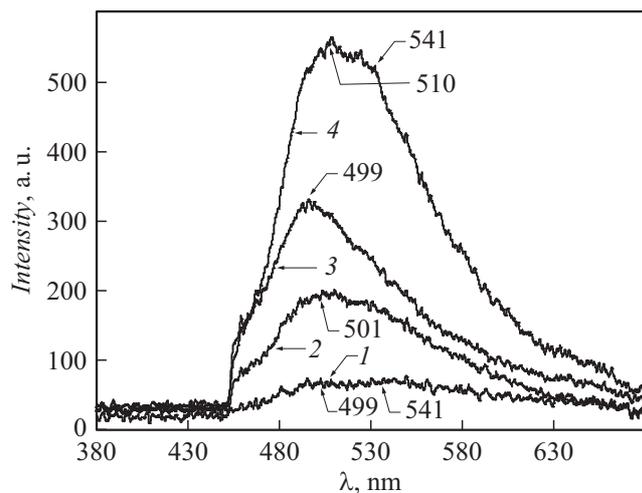
Выбор числовой апертуры волокон влияет, в частности, на расстояние между сопряженными волокнами зонда и спектрометра. Очевидно, что минимальное расстояние между этими волокнами и соответственно максимальный коэффициент ввода мощности флуоресцентного излучения в спектрометр реализуются при максимальной числовой апертуре

волокон. Увеличение регистрируемой мощности сигнала флуоресценции является более предпочтительным по сравнению с потерями при использовании избыточной мощности сигнала возбуждения. Этим определяется выбор одинаковой числовой апертуры для всех волокон, так как в соответствии с (1) при таком выборе можно уменьшить  $\Delta z$ .

При создании анализатора для ФСА биологических сред в ультрафиолетовом диапазоне нами были применены разные по спектрам пропускания кварц-полимерные волокна SPCH200-0.39NA (210–1200 nm) для работы волноводов в ультрафиолетовом диапазоне спектра. Коэффициент передачи мощности из волновода 5'' в волновод 1'' составил 0.3 на длине волны 650 nm. Волновод 6'', принимающий флуоресцентное излучение через волновод 1'', в данном случае выполняет функцию заграждающего фильтра, что обусловило необходимость применения волокна FT200EMT-0.39NA (400–2200 nm). При этом получен коэффициент передачи мощности из волновода 1'' в волновод 6'' на длине волны 650 nm, равный 0.6.

Предложенная система неразрушающего ФСА была апробирована в задаче лабораторных зондовых исследований элементов зерновых смесей (ЭЗС) с целью выявления объектов, зараженных грибковыми заболеваниями (на примере арахиса). Такие ЭЗС подвержены заражению плесневыми грибами *Aspergillus flavus* и являются источником отравления человека афлатоксином В<sub>1</sub>. В экспериментах излучение сопряженного с волокном диодного лазера (405 nm) проходило через полосовой светофильтр FB405-10 и пассивным оптоволоконным коммутатором направлялось в оптоволоконный зонд. По этому зонду флуоресцентное излучение вместе с отраженным лазерным излучением возвращалось назад, фильтровалось на выходе коммутатора заграждающим фильтром NF405-13 и поступало на вход оптоволоконного спектрометра USB4000. Существенно, что оптоволоконный зонд позволил выполнить безопасное зондовое картирование поверхности ЭЗС, размещенных в защищенной среде (ламинарный шкаф) в режиме удаленного доступа. Другие типы волоконно-оптических зондов [4,5], решающих аналогичную задачу, могут быть использованы как физические волокна, но не как элементы невязанного коммутатора малоапертурных оптических пучков.

Исследования спектров флуоресценции показали, что у зараженных грибами *Aspergillus flavus* бобов арахиса есть участки, флуоресценция которых не отличается от полученной для контрольных (незараженных) бобов. Поэтому далее оценивались участки флуоресценции



**Рис. 3.** Спектры флуоресценции бобов арахиса с колонией *Aspergillus flavus*, содержащей афлатоксин В<sub>1</sub>: флуоресценция неповрежденных ЭЗС (1) и поврежденных плесневыми грибами ЭЗС на 4 (2), 12 (3) и 24 сутки (4) развития колонии.

поверхности, интенсивность которых наиболее высока, что позволило оценивать динамику флуоресценции объектов исследования в различных временных интервалах развития колонии. Типичные результаты экспериментов представлены на рис. 3. Из них следует, что интенсивность флуоресценции увеличивается с ростом колонии плесневых грибов. Полученные результаты позволили установить связь накопления биомассы колонии *Aspergillus flavus* с интенсивностью и формой спектра флуоресценции и свидетельствуют о перспективности применения разработанных средств ФСА для диагностики биологических сред и объектов.

Результаты работы получены в рамках выполнения государственного задания Министерства образования и науки РФ по проекту № 8.3844.2017/4.6 „Разработка средств экспресс-анализа и классификации элементов неоднородного потока зерновых смесей с патологиями на основе интеграции методов спектрального анализа и машинного обучения“.

## Список литературы

- [1] Куликов К.Г. // ЖТФ. 2014. Т. 84. В. 4. С. 109–119.
- [2] Куликов К.Г. // ЖТФ. 2014. Т. 84. В. 5. С. 154–158.
- [3] Тучин В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. М.: Физматлит, 2010. 478 с.
- [4] Heckenberger H. Device for the recognition of caries, plaque or bacterial infection of teeth. Patent US6053731. 25.04.2000.
- [5] Кульчин Ю.Н., Вознесенский С.С., Гамаюнов Е.Л., Коротенко А.А., Попик А.Ю., Майор А.Ю. // Оптика атмосферы и океана. 2013. Т. 26. В. 1. С. 40–45.
- [6] Hack A. Device for identifying caries, plaque, bacterial infection, concretions, tartar and other fluorescent substances on teeth. Patent US6561802. 13.05.2003.
- [7] Трифонов А.С., Урих К.И. // Письма в ЖТФ. 1994. Т. 20. В. 16. С. 55–58.
- [8] Сарычева И.Н., Янушевич О.О., Шульгин В.А., Минаков Д.А., Кашкаров В.М. Оптоволоконное устройство для регистрации флуоресценции. Патент № 2464549. Оpubл.: 20.10.2012.
- [9] Сарычева И.Н., Янушевич О.О., Шульгин В.А. Оптоволоконный коммутатор лазерного спектроанализатора. Патент № 2632993. Оpubл.: 11.10.2017.
- [10] Unger H.G. Planar optical waveguides and fibres. Oxford University Press, 1977. 770 p.