Федеральное государственное унитарное предприятие «Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений»

На правах рукописи

Садагов Антон Юрьевич

ДИАГНОСТИКА КОЛЛОИДНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ СОВМЕСТНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕКТРОВ АБСОРБЦИИ, ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ, СТАТИЧЕСКОГО И ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА

01.04.05 - Оптика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук

Научный руководитель

д. т. н., А.Д. Левин

Оглавление

Введение
Глава 1. Аналитический обзор литературы 13
1.1 Спектральные методы измерения концентрации наночастиц в
коллоидных растворах13
1.2 Идентификация и классификация пищевых продуктов, представляющих
собой сложные коллоидные системы 20
1.2.1 Методы молекулярной абсорбционной спектрофотометрии 21
1.2.2 Методы флуоресцентной спектроскопии
1.2.3 Обработка спектральных данных для задач классификации образцов 31
1.3 Обеспечение аппаратной независимости спектров флуоресценции с
помощью стандартных образцов 33
1.3.1 Стандартные образцы на основе флуоресцентных красителей 35
1.3.2 Стандартные образцы на основе полимеров
1.3.3 Стандартные образцы на основе неорганических стёкол 40
Выводы к главе 1
Глава 2. Разработка метода иизмерений концентраций наночастиц в жидких
средах на ДРС анализаторах 47
2.1 Связь интенсивности упругого рассеяния света с концентрацией,
размерными параметрами и оптическими постоянными наночастиц
2.2 Совершенствование и экспериментальная отработка метода измерения
счетной концентрации наночастиц в жидких средах (сферические частицы) 51
2.3 Экспериментальная отработка метода измерения счётной концентрации
наночастиц в жидких средах (несферические частицы) 60
2.4 Последовательность операций, необходимых для реализации метода 63
2.5 Аппаратная реализация метода
Выводы к главе 2
Глава 3. Разработка и реализация подходов, основанных на совместном
использовании спектров абсорбции, флуоресценции и статического
рассеяния

3.1 Концепция спектрального портрета и ее приложение к исследованию
винодельческой продукции 69
3.2 Измеряемые спектры и особенности измерений 70
3.2.1 Объекты и результаты исследования 72
3.2.2 Разные сорта одного производителя
3.2.3 Различия по годам (урожаям) 77
3.3 Спектральный портрет винодельческой продукции
3.4 Применение анализа главных компонент для классификации спектров
белых полусухих вин
3.5 Использование полученых результатов для идентефикации вин по
спектральному портрету
Выводы к главе 3
Глава 4. Исследование флуоресцентных свойств оптических материалов и
разработка мер флуоресценции
4.1 Выбор материала мер флуоресценции
4.2 Исследование параметров флуоресценции предполагаемых материалов
мер флуоресценции, их стабильности и воспроизводимости 100
4.3 Экспериментальные исследования оптических свойств неорганических
стекол, выбранных для изготовления мер флуоресценции 103
4.3.1 Оптические свойства неорганических стекол и их влияние на
метрологические характеристики мер флуоресценции 103
4.3.2 Возможность оптимизации мер флуоресценции 114
4.4 Разработка мер флуоресценции 117
4.4.1 Мера в форме имитатора кюветы из фосфатного стекла,
активированного ионами одновалентной меди 117
4.4.2 Мера в виде плоской пластины из фосфатного стекла, активированного
ионами меди119
4.4.3 Мера в форме имитатора кюветы из цветного оптического стекла СЗС-
17

4.4.4 Мера в форме плоской пластины из цветного оптического стекла СЗС-
17
4.5 Установление метрологических и технических характеристик мер
флуоресценции
4.5.1 Подготовка мер к испытаниям в целях утверждения типа 126
4.5.2 Проведение испытаний в целях утверждения типа 137
4.6 Способы применения меры флуоресценции на основе неорганического
стекла139
4.7 Прототип мер флуоресценции с несколькими узкими пиками 142
4.8 Использование мер флуоресценции для проведения измерений
квантового выхода относительным методом 146
Выводы к главе 4148
Заключение 151
Список сокращений и условных обозначений154
Словарь терминов 155
Список литературы 157
Список основных работ по теме диссертации 157
Публикации из перечня ВАК и в изданиях, включённых в базы цитирования
Scopus и Web of Science157
Публикации в других изданиях 158
Патенты и свидетельства о регистрации 160
Список использованных источников 160
Приложение А 169
Приложение Б 177

Введение

Актуальность работы

Методы и средства оптической спектроскопии находят все более широкое применения при изучения состава и свойств веществ и материалов, исследований, как проведении научных так при решении при И разнообразных прикладных задач. К таким задачам относятся экологический мониторинг, контроль пищевых продуктов, продовольственного сырья и лекарственных препаратов, клиническая лабораторная диагностика, контроль некоторых видов промышленной продукции.

Для изучения состава и свойств веществ используются различные методы оптической спектроскопии, в том числе – абсорбционная спектроскопия в различных диапазонах, флуоресцентная спектроскопия, спектроскопия неупругого рассеяния упругого И света, фотонная корреляционная спектроскопия, чаще ее называют динамическим рассеянием света (ДРС). Каждый из этих методов имеет свои сильные и слабые стороны, позволяя извлекать определенную информацию о свойствах изучаемых объектов. По мере возрастания требований к объему и достоверности получаемой информации, данных, получаемых одним методом, становится недостаточно. В связи с этим в последние годы начали развиваться подходы, основанные на совместном использовании разных методов оптической Появились работы, повышение спектроскопии. показывающие эффективности объектов анализа различных при одновременном использовании нескольких типов оптических спектров, по сравнению с использованием спектров одного типа. Особенно эффективным такой подход качественном анализе многокомпонентных смесей, оказывается при например при контроле подлинности различных пищевых продуктов. Одновременно с этим растут и возможности для реализации таких подходов, что связанно с совершенствованием и развитием, как измерительных устройств, так и с развитием методов обработки полученных данных. Однако, развитие мультиспектральных подходов в настоящее время находится на начальной стадии. Существующие методы совместной обработки спектральных данных различной физической природы требуют использования достаточно сложных математических алгоритмов, основанных на методах хемометрики. Не существует систематического подхода к решению таких задач, мало средств измерений, позволяющих получать спектры различной физической природы и совместно их обрабатывать.

Во многих случаях, когда требуется быстрое проведение анализа, необходимо использовать более простые и наглядные методы, позволяющие анализировать различные объекты с последующим их отображением в многомерной системе координат.

Исходя из аналитических возможностей современных приборов можно целесообразно использовать комбинации сделать вывод, ЧТО таких оптических спектров, как спектры абсорбции, флуоресценции и рассеяния. Однако, вид спектров флуоресценции и рассеяния, измеряемых на спектрофлуориметрах, зависит OT параметров прибора. Аппаратная зависимость является серьезной проблемой, которая приводит к тому, что спектры, измеренные на разных приборах, могут различаться между собой как по форме, так и по интенсивности. Это затрудняет проведение качественного анализа, так как спектры одного и того же образца, измеренные на разных приборах, могут существенно различаться между собой. Поэтому разработка методов И средств, обеспечивающих возможности измерения аппаратно независимых спектров флуоресценции и рассеяния, на спектрофлуориметрах является важной задачей.

В связи с развитием нанотехнологий становятся актуальными задачи комплексной характеризациии наночастиц в коллоидных системах, в частности совместного измерения их размерных параметров и счетной концентрации. При этом важно контролировать параметры частиц

непосредственно в жидкости, так как, например, при синтезе наночастиц, или их биомедицинских приложениях, частицы находятся в коллоидных системах. Для этого целесообразно исследовать возможности совместного использования динамического рассеяния света и абсорбционной спектрофотометрии.

Таким образом, разработка методов и средств, позволяющих осуществлять комплексный анализ коллоидных систем с использованием оптических спектров различной физической природы, является актуальной задачей.

Цель работы

Целью данной работы является разработка методов и средств исследования химического и дисперсного состава жидких сред, прежде всего, коллоидных систем, основанных на совместном использовании абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии, статического и динамического рассеяния света.

Основные задачи исследования

1. Расширение возможностей метода ДРС путем разработки способа совместного измерения размеров и счетной концентрации наночастиц в коллоидных системах.

2. Создание усовершенствованных анализаторов ДРС, совместно измеряющих размерные параметры и счетную концентрацию наночастиц.

3. Разработка и реализация методов качественного анализа, основанных на совместном использовании спектров абсорбции, флуоресценции и статического рассеяния света (на примере винодельческой продукции).

4. Разработка методов и средств обеспечения аппаратной независимости спектров флуоресценции и статического рассеяния света.

Научная новизна

1. Впервые разработана концепция спектрального портрета, представляющего собой совокупность спектров (или их фрагментов) абсорбции, флуоресценции и рассеяния, однозначно характеризующих объект в составе достаточно широкой выборки и показана её применимость на примере качественного анализа винодельческой продукции.

2. Впервые изучены флуоресцентные свойства цветного оптического стекла СЗС-17 и разработана мера флуоресценции на его основе, выполненная в виде тонкой плоскопараллельной пластины, установленной под углом к возбуждающему излучению, для минимизации эффекта внутреннего фильтра. Mepa воспроизводит аппаратно-независимое распределение интенсивности флуоресценции, позволяет проводить процедуру спектральной коррекции эмиссионного канала спектрофлуориметра и систематический контроль чувствительности прибора.

3. Впервые на основе фосфатного стекла, активированного ионами европия и тербия, разработана мера флуоресценции, позволяющая контролировать относительную спектральную чувствительность и оценивать погрешность эмиссионных каналов спектрофлуориметров по шкале длин волн в диапазоне от 400 до 750 нм. Мера разработана на основе образцов синтезированных в Университете ИТМО.

4. Впервые предложен и реализован метод, позволяющий при измерениях размеров частиц на анализаторе динамического рассеяния света определять их счётную концентрацию в коллоидном растворе. Метод позволяет вычислять счётную концентрацию с помощью теории рассеяния света по их размерным параметрам и оптической плотности экстинкции (патент РФ на изобретение № 2610942).

5. Впервые создан анализатор ДРС, позволяющий измерять как размерные параметры, так и счетную концентрацию наночастиц в коллоидных системах.

Практическая ценность и использование результатов работы

Разработанная концепция спектрального портрета была применена при анализе винодельческой продукции с целью установления её подлинности и идентификации марок вин и виноматериалов. Результаты этой работы легли основу «Методических рекомендаций по идентификации образцов В винодельческой продукции с помощью спектров абсорбции, флуоресценции и рассеяния». Кроме того, была разработана «Методика измерения спектров абсорбции, флуоресценции и рассеяния света в образцах винодельческой продукции» ФР.1.37.2014.18875. Данные методические рекомендации и методика применяются при измерениях, проводимых на спектрофотометрахфлуориметрах СФФ-2 «ФЛУОРАН», поставленных на заводы производителей винодельческой продукции в России.

Разработанные флуоресценции меры могут применяться на предприятиях и в лабораториях, использующих спектрофлуориметры для качественного анализа. Кроме того, использование таких мер желательно при реализации концепции спектрального портрета, особенно если необходимо проводить сравнение результатов, полученных на разных приборах. Такие интерес высокоточных меры будут представлять для производств, флуоресцентные методы, таких как фармацевтические использующих производства или изготовление сверхчистых растворителей.

Разработанный метод измерения счетной концентрации наночастиц на анализаторах ДРС представляет большой интерес при синтезе наночастиц. Совместное измерение размерных параметров и счётной концентрации очень полезно также в оптических наносенсорных системах, принцип действия которых основан на агрегации наночастиц в результате их взаимодействия с молекулами аналита. Применение данного метода подтверждается актом внедрения в ФГУП «ВНИИОФИ» изобретения «Способ оптического измерения счетной концентрации дисперсных частиц в жидких средах и устройство для осуществления».

ДРС анализатор, способный измерять счетную концентрацию наночастиц может найти применение в компаниях, занимающихся изготовлением и использованием различных наночастиц. Планируется серийный выпуск таких приборов.

Вклад автора

Все экспериментальные результаты, приведенные в диссертации, получены лично автором.

При непосредственном участии автора разработана концепция спектрального портрета и осуществлен выбор фрагментов оптических спектров, использованных для его построения в целях идентификации винодельческой продукции.

При непосредственном участии автора разработаны:

физические основы и алгоритмы обработки данных метода измерения счетных концентраций наночастиц на ананлизаторах ДРС;

анализаторы ДРС, измеряющие, наряду с размерными парамметрами наночастиц также их счетную концентрацию

меры флуоресценции на основе неорганических стекол.

Апробация работы

Основные материалы, представленные в диссертации, были доложены и обсуждены на следующих научно-технических конференциях: Первая конференция всероссийская научно-техническая «Метрология В нанотехнологиях» (г. Москва, 2014 г.), «Всероссийская научно-техническая конференция Метрологическое обеспечение фотоники» (г. Москва, 2015 г.), XII Международная конференция «Прикладная оптика-2016» (г. Санкт-Петербург, 2016), «Научная сессия НИЯУ МИФИ» (г. Москва, 2015 г.), «Первая конференции молодых специалистов национальных метрологических институтов» (г. Москва, 2015 г.), «Bremen Workshop on Light Scattering» (г. Бремен, 2016 г.), Научно-практическая конференция «Научное приборостроение – современное состояние и перспективы развития (г. Москва, 2016 г.), Третий международный молодежный научный форум с международным участием «Новые материалы» (г. Москва 2017 г.), «Третий съезд аналитиков России» (г. Москва, 2017 г.), «Третья научно-техническая конференция Московского технологического университета» (г. Москва, 2018 г.).

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 22 научных работы, в том числе статьи 5 статей в российских рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК [1-5]; 2 статьи в журналах, индексируемых в базе данных SCOPUS [6, 7]; 10 тезисов докладов на научно-технических конференциях [8-18]; 2 патента [19, 20]; 2 свидетельства о регистрации [21, 22].

Структура и объем работы

Полный объём диссертации составляет 181 страницу, в том числе 79 рисунков, 18 таблиц, 2 приложения. Список литературы содержит 105 источников.

Работа включает введение, четыре главы, заключение, список используемой литературы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Совмещение абсорбционной спектрофотометрии методов И динамического рассеяния света (ДРС) позволяет при измерении размеров частиц определять их счетную концентрацию. Для коллоидных систем с известной счётной концентрацией возможно решение обратной задачи определение оптических постоянных по измеренным значениям гидродинамического диаметра и оптической плотности экстинкции.

2. Введение в схему анализатора ДРС приёмника излучения, прошедшего через образец, с диаметром приемной площадки не менее 5 мм,

расположенного на расстоянии не более 100 мм от кюветы с образцом, позволяет измерять оптическую плотность экстинкции A_{ext} коллоидного раствора наночастиц относительно фона, что дает возможность определить счетную концентрацию наночастиц.

3. Совокупность информативных фрагментов или параметров спектров абсорбции, флуоресценции и статического рассеяния может быть интерпретирована как «спектральный портрет» некоторых объектов искусственного и естественного происхождения, позволяющий однозначно идентифицировать объект по его уникальным признакам.

4. Разработанные меры флуоресценции на основе неорганических стекол позволяют воспроизводить спектральные распределения интенсивности флуоресценции, необходимые для определения функций спектральной коррекции, определения изменений чувствительности спектрофлуориметров при заданных значениях длин волн возбуждения и эмиссии, калибровку эмиссионных каналов спектрофлуориметров по шкале длин волн.

Глава 1. Аналитический обзор литературы

Исходя из задач, сформулированных во Введении, в данной главе проанализировано современное состояние исследований по двум актуальным в настоящее время направлениям, связанных с диагностикой коллоидных систем методами оптической спектроскопии. Первое из направлений связано с измерением параметров наночастиц в коллоидных растворах, важнейшими из этих параметров являются размер наночастиц и их концентрация. Второе направление идентификацией связано С пищевых продуктов, представляющих собой сложные коллоидные системы, для него особенно эффективным оказывается совместное использование, наряду с другими спектральными методами, флуоресцентной спектроскопии. Наряду с этим, в связи с особенностями измерения флуоресцентных спектров и важностью учета аппаратной зависимости результатов флуоресцентных измерений, в проанализированы данной главе возможности создания стандартных образцов, предназначенных для проведения спектральной коррекции и контроля стабильности выходного сигнала спектрофлуориметров.

1.1 Спектральные методы измерения концентрации наночастиц в коллоидных растворах

Знание концентрации частиц необходимо либо для контроля эффективности их синтеза, либо для подбора оптимального дисперсного состава жидкой среды для конкретной технологии. Причем во многих случаях наибольший интерес представляет счётная концентрация частиц, т.е. число частиц в единице объема, единицей измерения счетной концентрации может быть например см⁻³. Наряду со счетной, измеряют также массовую концентрацию материала частиц в образце. Счётная концентрация п и массовая концентрация *C* связаны между собой простым соотношением

$$n = C V/(v \rho)$$
 (1.1)

Здесь V- единичный объем жидкости (например, 1 см³), v – объем одной частицы, ρ - плотность материала частицы. Для сферических частиц диаметром *d* формула (1.1) принимает вид

$$N=6*C*V/(\pi^*d^{3*}\rho)$$
(1.2)

Известны методы измерения массовой концентрации дисперсных частиц в жидких средах, основанные на измерении объема исследуемого жидкого образца, его высушивании (выпаривании), взвешивании сухого остатка и вычислении массовой концентрации по полученным данным. Недостатком такого подхода является необходимость относительно большого объема жидкости для выпаривания (не менее 100 – 200 мл), определенная трудоемкость и длительность всей процедуры, невозможность отслеживать изменение концентрации в реальном времени.

Измерение массовой концентрации отдельных химических элементов, входящих в состав дисперсных частиц, взвешенных в жидкости, может быть атомно-абсорбционных произведено атомно-эмиссионных на или спектрометрах. Такие измерения также требуют разрушения образца, и, исключают отслеживание изменений концентрации соответственно В реальном времени. Кроме того, оба названных выше метода позволяют измерять только массовую концентрацию вещества- материала наночастицы. Для вычисления счетной концентрации, как видно из формул (1.1-1.2), необходимы значения геометрических параметров частиц, которые требуют дополнительных, часто трудоемких измерений, например, на электронном или атомно-силовом микроскопе.

Известны также оптические способы измерения массовой или счетной абсорбционной концентрации наночастиц С помощью оптической спектрофотометрии. Эти способы предусматривают построение градуировочного графика (зависимости оптической плотности образца на выбранной длине волны от концентрации частиц) с помощью серии образцов с известными значениями концентрации частиц (образцов сравнения). Затем измеряют оптическую плотность анализируемого образца на той же длине

волны и с помощью градуировочного графика определяют соответствующее ему значение концентрации. Для реализации любого из этих способов необходима серия образцов сравнения с заранее известными значениями концентрации.

Кроме того, существует способ определения размеров и концентрации наночастиц по спектрам экстинкции (оптической плотности). Этот способ описан в работах [23-24] для золотых и [25] для серебряных наночастиц. Он предполагает следующую последовательность операций.

- Измерение на спектрофотометре спектра экстинкции (оптической плотности) анализируемого образца в спектральном диапазоне 450 -600 нм для золота и 350 – 500 нм для серебра.
- Определение среднего диаметра частиц по положению максимума, на спектре экстинкции, соответствующего плазмонному резонансу в наночастицах золота, серебра или их сплавов.
- 3) По найденному значению диаметра наночастиц вычисляют с помощью теории рассеяния Ми, эффективность рассеяния на одной из характерных длин волн, находящейся в пределах диапазона, в котором был измерен спектр экстинкции.
- По вычисленному значению сечения рассеяния и измеренному значению оптической плотности на характерной длине волны определяют концентрацию наночастиц.

Изложенному способу измерения массовой концентрации наночастиц в жидких средах присущи следующие ограничения:

 Способ может быть реализован лишь для частиц, имеющих пик плазмонного резонанса при длине волны, превышающей 190 нм (граница вакуумного ультрафиолета), т.е. только для частиц из золота и серебра или их сплавов. Для частиц из любых других материалов способ неприменим. Положение пика плазмонного резонанса зависит не только от размеров частиц, но и от свойств жидкости, в которой они взвешены, и состояния поверхности частицы. Влияние этих факторов ограничивает точность определения размера частицы и, соответственно, концентрации частиц, причем относительная погрешность определения концентрации, обусловленная этим фактором, может значительно превышать погрешность измерения размера частицы. Согласно данным работы [26], эта погрешность может превышать 30 %.

Однако особо интересным представляется определения концентрации наночастиц при помощи анализа рассеянного излучения, так как на этом базируется метод динамического рассеяния света, призванный быстро и эффективно определять размерные параметры наночастиц. Упругим называется рассеяние света, проходящее без изменения энергии светового кванта, т.е. без изменения длины волны. Наноразмерные частицы, как сферической, так и несферической формы, рассеивают свет по упругому механизму. Закономерности упругого рассеяния непроводящих (диэлектрических) сферических частиц в широком диапазоне диаметров (от долей нанометра до десятков микрон) хорошо описываются теорией рассеяния Ми [27-28]. Частным случаем теории Ми является более простая теория Релея, справедливая для частиц, размеры которых значительно (в 10 и более раз) меньше длины волны рассеиваемого ими света.

В последнее десятилетие теория Ми была дополнена возможностью вычисления характеристик рассеянного излучения для несферических частиц различной формы, в т.ч. цилиндров и эллипсоидов, результаты этих исследований обобщены в монографии [29]. Для расчетов по теории Ми и более поздним теориям для несферических наночастиц нужны оптические постоянные как самих наночастиц, так и жидкости, в которой они взвешены. Точнее, необходим комплексный показатель преломления наночастиц в $n'=n+i^*k$, где n — обычный показатель преломления, фигурирующий в

законах геометрической оптики, *k* – безразмерный коэффициент экстинкции, иногда называемый коэффициентом поглощения.

Для сферических частиц, согласно теории Ми, интенсивность рассеянного излучения может быть выражена формулой

$$I = \frac{I_0 \cdot F(\varphi, \theta, m, r) \cdot N}{kr^2}$$
(1.3)

Здесь I_0 – интенсивность возбуждающего излучения, N – счетная концентрация наночастиц (число наночастиц в единице объема), k- волновое число, определяемое соотношением k= 2π / λ , где λ -длина волны света в среде, где находятся частицы, r – расстояние от частицы до точки наблюдения, F (φ , θ , m, a) – так называемая *безразмерная функция* направления, которая рассчитывается по теории Ми. Аргументами этой функции являются угол между направлением поляризации падающей волны и плоскостью рассеяния φ , угол рассеяния θ (см.рисунок 1.1), радиус частицы

а, относительный комплексный показатель преломления, $m = \frac{n_{частиц}}{n_{cpedbl}}$, где

n_{частиц} и <i>n_{среды} комплексные показатели преломления частиц и окружающей среды.

Комплексный показатель преломления $n'=n + i \cdot k$ -,где n – «обычный» показатель преломления, входящий в формулы геометрический оптики, k - безразмерный показатель поглощения (иногда его называют безразмерным коэффициентом экстинкции).



Рисунок 1.1– Разложение векторов электрического поля в падающей и рассеянной световых волнах

Вид безразмерной функции направления зависит от поляризации излучения, падающего на частицы. Для линейно-поляризованного света

$$F(\varphi,\theta,m,r) = \left|S_1(\theta,m,r)\right|^2 \cdot \sin^2(\varphi) + \left|S_2(\theta,m,r)\right|^2 \cdot \cos^2(\varphi)$$
(1.4)

где *S*₁ и *S*₂ амплитудные функции рассеяния.

Если падающее излучение поляризовано перпендикулярно плоскости рассеяния, то φ=π/2 и из формулы (1.5) следует

$$F(\theta) = \left| S_1(\theta) \right|^2 \tag{1.5}$$

Для амплитудной функции рассеяния S₁ в случае сферических частиц справедливо выражение

$$S_1 = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} (a_n \pi_n + b_n \tau_n)$$
(1.6)

Здесь a_n и b_n - коэффициенты ряда рассеяния, которые вычисляются через функции Бесселя, $\pi_{n,,\tau_n}$ - функции, зависящие от угла рассеяния θ ,

выражаемые через полиномы Лежандра. Коэффициенты ряда рассеяния зависят от так называемого параметра дифракции

$$x = k \cdot r = 2 \cdot \pi \cdot n_{cpedbl} \cdot r / \lambda_0 \tag{1.7}$$

где λ_0 - длина волны света в вакууме. Коэффициенты ряда рассеяния и функции $\pi_{n,,}\tau_n$ могут быть вычислены по формулам, имеющимся в различных источниках, например в монографии [28] приведены формулы (4.46 – 4.48) для вычисления функций $\pi_{n,,}$ и τ_n и формулы (4.53) для вычисления коэффициентов ряда рассеяния. При практических вычислениях суммирование ряда производится вплоть до значений $n=x+4x^{1/3}+2$, в соответствии с рекомендациями, приведенными в [28].

Формула (1.1) справедлива при небольших концентрациях частиц в коллоидном растворе, критерием ее применимости можно считать значение оптической плотности на длине волны λ_0 , не превышающее 0,01. В этом случае можно пренебречь как многократным рассеянием, так и эффектом внутреннего фильтра, т.е поглощением возбуждающего и рассеянного излучения при прохождении через кювету. Для расчетов по формулам (1.1-1.4) необходимо знание действительной и мнимой части комплексного показателя преломления, как для частиц, так и для жидкости, в которой они взвешены. Для диэлектрических частиц значения этих параметров (их называют оптическими постоянными) близки к соответствующим значениям для объемного материала. Для металлических частиц, особенно вблизи длины волны плазмонного резонанса, проявляются различные размерные эффекты, и оптические постоянные существенно зависят от размера частицы. Для золотых и серебряных наночастиц существуют модели, позволяющие вычислять оптические постоянные для частиц различных размеров, одна из последних и достаточно точных моделей рассмотрена в работе [30]. Обобщая приведенные выше зависимости на случай несферических частиц, можно считать формулы (1.1-1.2) справедливыми и для этого случая, однако компоненты матрицы рассеяния будут существенно зависеть от формы частицы. Для цилиндров, эллипсоидов и некоторых других несферических частиц такие функции вычислены в ряде работ (см. главу 9 монографии [29], а также [31-32]).

1.2 Идентификация и классификация пищевых продуктов, представляющих собой сложные коллоидные системы

В работах последнего времени, посвященным проблемам контроля пищевой, а в частности винодельческой продукции были сформулированы требования к методам установления подлинности. Согласно работе [33], метод контроля должен

- давать ответы на вопросы по идентичности, подобию или не идентичности (фальсификации) исследуемого образца по отношению к контрольному;
- быть достаточно экономичным, чтобы вносить минимальный вклад в себестоимость контролируемой продукции.
- быть свободным от субъективного влияния оператора на обработку данных и конечные результаты.

Во всем мире проявляется значительный интерес к разработке достоверных физико-химических методов идентификации виноградных вин с целью определения их подлинности, выявления фальсификатов, определения и классификации вин, произведенных в различных географических регионах.

В состав вина входят сахара, органические кислоты, различные летучие вещества, фенольные соединения, макро и микроэлементы. В результате взаимодействия этих составляющих между собой и образуется специфический вкус и аромат (букет) вина. Идентификация предусматривает выявление различий между винами по химическому составу, физическим и физико-химическим свойствам. Для этих целей используются различные методы инструментальной химии - высокоэффективная жидкостная хроматография, газовая хроматография, масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой [33-36]. Эти методы дают подробную информацию о

составе и биохимии пищевых продуктов, в том числе вина, при этом подготовка проб и анализы занимают много времени, требуют весьма дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала, непригодны для работы в экспрессном режиме.

В последнее время к методам анализа все чаще предъявляется требование fitness for purpose (пригодность для конкретной цели), который требует нахождения оптимального соотношения между точностью и информативностью результатов с одной стороны, стоимостью анализа и временем, затраченным на получение результатов, с другой. В соответствии с требованием для анализа пищевых продуктов ЭТИМ представляют значительный интерес спектроскопические методы, такие как абсорбционная и флуоресцентная спектроскопия. Эти методы позволяют достаточно быстро при относительно невысокой стоимости получать И существенную информацию о составе анализируемых продуктов. Кроме того, они требуют минимальной пробоподготовки, обладают высокой чувствительностью и могут быть адаптированы для работы в режиме реального времени (on line). Ниже рассматриваются литературные данные о применении этих методов для идентификации и классификации вин.

1.2.1 Методы молекулярной абсорбционной спектрофотометрии

Для контроля и идентификации вин используются методы молекулярной абсорбционной спектрофотометрии различных спектральных диапазонов.

УФ-видимого Широко применяется спектроскопия диапазона. Поглощение света в диапазоне 190-700 нм обусловлено главным образом электронными спектрами молекул. В винах спектры поглощения в этом диапазоне формируются, в частности, за счет вклада соединений фенола, летучих веществ, Попытки различных аминокислот. использовать абсорбционные спектры этого диапазона для классификации вин, выявления фальсификатов и подделок были предприняты в ряде работ, начиная с 2006 г.

В работе [37], выполненной специалистами из университета Кордоба (Испания), исследовались спектры 120 различных образцов белых и красных различной выдержки и крепости, изготовленных из винограда ВИН. различных сортов, разного географического происхождения. Абсорбционные спектры всех образцов регистрировались в спектральном диапазоне от 300 до 800 нм (т.е. был захвачен край ближнего ИК диапазона). Для того, чтобы избежать регистрации высоких значений оптической плотности, измерения проводились в кюветах с очень малой длиной оптического пути (0,1 см). Для классификации вин производилась математическая обработка спектральных данных с использованием методов хемометрики, в том числе анализа главных компонент (principle component analysis – PCA). Данные по белым и обрабатывались В красным винам отдельно. результате удалось классифицировать каждой географическому вина ИЗ групп ПО происхождению винограда, сорту винограда и возрасту вина. После построения модели для каждого образца эти параметры определялись по оптическим спектрам, при этом доля ошибочных распознаваний не превышала 25%.

Другой метод классификации вин по спектрам поглощения УФвидимого диапазона был реализован в работе [38] для классификации белых и красных вин, произведенных в разных регионах Испании. Для обработки спектральных данных был использован так называемый метод опорных векторов (support vector machine). Этот метод представляет собой один из вариантов машинного обучения; в данном случае программе на стадии обучения предъявляется определенное количество спектров вин с указанием их географического происхождения и она анализирует их особенности по определенному алгоритму. Обученная таким образом программа может в дальнейшем распознавать географическое происхождение новых образцов по их спектрам. Авторы [38] утверждают, что им удалось таким образом достичь правильности распознавания в 96%.

В работе [39], выполненной в Мексике и посвященной анализу напитков типа текила (tequila), отмечаются возможности спектроскопии УФвидимого диапазона как для классификации напитков, так и для выявления введенных в них несанкционированных добавок, например, красителей. Цель работы заключалась в создании методов контроля подлинности напитков определенного сорта (бренда), путем сравнения его спектра со спектрами, имеющимися в базе данных. Для создания этой базы данных использовались 8 сортов (брендов) напитка, спектры абсорбции которых были измерены в диапазоне от 250 до 500 нм в кюветах с оптической длинной пути в 1 см. Для каждого сорта были измерены спектры нескольких подлинных образцов, по усредненным результатам которых и создавалась базы данных отдельно для двух разновидностей текилы (white и rested), по 4 сорта для каждой из разновидностей. Для каждого из усредненных спектров вычислялись две главные компоненты (PC1 и PC2), наиболее полно характеризующие различие между спектрами различных сортов. Результаты представлялись в виде графика в осях PC1-PC2, спектру каждого из образцов на таком графике соответствует точка; вокруг точек, принадлежащих образцам текил одного сорта, можно провести так называемый «доверительный эллипс» (Рисунок 1.2).



Рисунок 1.2 – Представление в плоскости главных компонент спектральных данных по 41 образцу текил. Данные сгруппированы по четырем сортам напитка, вокруг точек каждой группы построен доверительный эллипс.

Заимствовано из работы [39].

При идентификации текил по предлагаемой методике измеряется спектр анализируемого образца, абсорбционный по ЭТОМУ спектру вычисляются главные компоненты РС1 и РС2 и соответствующая точка наносится на график. Если эта точка попадает в доверительный эллипс одного из сортов, именно этот сорт приписывается контролируемому образцу, В противном случае образец идентифицируется либо как фальсификат, либо как подозрительный. Подозрительные образцы подлежат контролю более информативными методами, но требующими больших затрат времени, дорогого оборудования и высококвалифицированного персонала, например, высокоэффективной жидкостной хроматографией.

В работе [40] приводятся результаты использования спектроскопии УФ-видимого диапазона для классификации белых аргентинских вин типа «Совиньон Блан» (Sauvignon blanc). Для обработки спектральных данных также использовались методы хемометрики, включая анализ главных компонент. Отмечается очень хорошее совпадение результатов классификации по спектральным данным с географическим происхождением вин.

Абсорбционная спектроскопия УФ-видимого диапазона используется также для установления цвета вин [41-42]. При этом определяют следующие показатели:

- интенсивность цвета, показывает, насколько темным является вино, этот показатель рассчитывается, как A₄₂₀ + A₅₂₀ + A₆₂₀ (A_λ оптическая плотность на длине волны λ, выраженной в нанометрах), и представляет собой сумму оптических плотностей в фиолетовой, зеленой и красной частях видимого спектра;
- оттенок цвета (wine hue) или тон цвета (wine tone), рассчитывается как отношение A₄₂₀/A₅₂₀, для одного и того же вина этот показатель возрастает с увеличением его возраста;
- показатели цветности по международной шкале CIE L^{*}, a^{*}, b^{*}.

В то же время, ближний ИК диапазон (800-2500 нм) эффективно используется для идентификации и контроля качества пищевых продуктов, в том числе вин и винограда, используемого для их производства [43-46]. В выполненной австралийскими исследователями, спектры работе [45], поглощения в видимой и ближней ИК областях использовались для классификации вин типа «Ристлинг» по географическому происхождению. Для 50 сортов вин этого типа, произведенных в Австралии, Новой Зеландии, Франции и Германии, были измерены спектры пропускания в диапазоне 400-2500 нм. Для обработки спектральных данных использовались методы хемометрики, включая упоминавшийся выше анализ главных компонент. Применение этих методов позволило обеспечить правильность классификации по географическому происхождению 97,5%, 80% и 70,5 % соответственно для вин из Австралии, Новой Зеландии, и Европы (Франции и Германии). Авторы [45] делают вывод, что абсорбционные спектры видимой и ближней ИК области содержат информацию, которая, при ее извлечении методами хемометрики, позволяет достаточно точно определять географическое происхождение вин.

Наряду с другими, молекулярные спектры средней ИК области (от 2,5 до 25 мкм или от 4000 до 400 см⁻¹) содержат достаточно узкие пики, каждый из которых соответствует определенной химической связи. Такие спектры эффективно используются в качественном химическом анализе, особенно при определении органических соединений. Поэтому среднюю ИК область часто называют областью «отпечатков пальцев». Эта область используется и для классификации вин. В качестве примера можно привести работу [47], также выполненную в Австралии, в которой спектры средней ИК области используются для классификации белых и красных столовых вин по сортам.

Спектры образцов регистрировались в диапазоне от 926 до 5012 см⁻¹, т.е., наряду со средней была затронута и ближняя ИК область. Были проанализированы образцы трех сортов красных и четырех сортов белых вин из различных районов Австралии. Применение методов хемометрики для обработки спектральных данных обеспечило правильную идентификацию сортов вин в 95 % случаев. К настоящему времени спектроскопия среднего ИК диапазона получила меньшее распространение при классификации и идентификации вин по сравнению со спектроскопией УФ-видимого и ближнего ИК диапазона из-за меньшей чувствительности метода.

1.2.2 Методы флуоресцентной спектроскопии

Особый интерес представляют методы флуоресцентной спектроскопии. Работы, посвященные применению флуоресцентной спектроскопии для классификации и идентификации вин, стали появляться примерно с 2007 года, см. [48-57]. Рассмотрим кратко излагаемые в них подходы, которые различаются по геометрии регистрации флуоресценции, видам измеряемых спектров и способам обработки полученных данных.

Одним из важнейших подходов является геометрия измерения флуоресценции. При исследованиях вин и других напитков в ряде случаев применяется традиционная схема измерения, когда угол между направлениями возбуждения и регистрации флуоресценции составляет 90⁰ (см.рисунок 1.3). Такая схема для исследования вин применялась, например, в работах [50-51, 53, 56-57], ее достоинством является возможность реализации на стандартном спектрофлуориметре.



Рисунок 1.3 – Традиционная схема регистрации флуоресценции.

Такая схема позволяет измерять флуоресценцию, исходящую из объема образца. В то же время, многие флуорофоры, присутствующие в винах, различные соединения фенола, склонны образованию например. К упорядоченных структур на поверхности жидкого образца, особенно существенным этот эффект становится для смеси вина с водой. В связи с ЭТИМ становится существенной регистрация флуоресценции именно поверхностного слоя, поэтому при исследовании вин, по мнению ряда исследователей. предпочтительным использование является наряду с традиционной, также фронтальной (front-face) схемы регистрация И флуоресценции [48-49, 52, 54-55]. Фронтальная схема показана на рисунке 1.4. Обычно при реализации такой схемы угол между направлением возбуждающего излучения и направлением сбора излучения флуоресценции составляет $52^{0} - 56^{0}$ [49].



Рисунок 1.4 – Фронтальная схема регистрации флуоресценции (заимствовано из работы [48]).

Фронтальная схема позволяет также исключить влияние эффекта внутреннего фильтра, который проявляется в традиционной схеме и заключается в поглощении в кювете возбуждающего излучения и излучения флуоресценции. Наиболее распространенными видами флуоресцентных спектров являются спектры возбуждения и эмиссии. Для получения подробной информации о флуоресцентных свойствах исследуемого образца измеряют трехмерные (3D) спектры флуоресценции, длина волны возбуждения $\lambda_{возб}$. сканируется с заданным шагом и при каждом значении $\lambda_{возб}$ измеряется спектр эмиссии $F(\lambda_{3M})$. Результаты измерения флуоресценции в этом случае представляются в виде матрицы, каждая строка которой соответствует определенной длине волны возбуждения, а столбец - определенной длине волны эмиссии. В англоязычной литературе для таких матриц используется термин «excitation -emission (EEM) matrix».

При анализе пищевых продуктов чаще всего используются спектры эмиссии при фиксированном значении длины волны возбуждения. Они удобны для задач количественного анализа, когда требуется определить концентрацию какого-либо флуоресцирующего вещества, присутствующего в пробе. Применительно к задаче идентификации вин недостатком таких спектров являются широкие спектральные линии и перекрытие спектров Для возбуждения И ЭМИССИИ. преодоления ЭТИХ недостатков при исследовании вин часто используют так называемые спектры синхронного сканирования, когда сканируются одновременно как длина волны возбуждения λ_{возб.}, так и длина волны эмиссии λ_{эм.}, при фиксированном значении разности $\Delta \lambda = \lambda_{3M} - \lambda_{BO36}$. При правильно подобранном значении $\Delta \lambda$ спектральные линии сужаются и спектр становится более информативным. Иногда при исследовании вин измеряют несколько спектров синхронного сканирования образца с различными значениями Δλ. Полученную совокупность данных называют total synchronous fluorescence (TSF) спектром.

При исследовании вин используются либо спектры синхронного сканирования и TSF [48, 50, 52-53 и 56], либо спектры трехмерной (3D) флуоресценции [54, 56, 57].

В работе [51] использовались трехмерные спектры флуоресценции для классификации вин, произведенных в регионе Чангли (Китай). Эти спектры регистрировались в диапазонах длин волн от 200 до 600 нм как для возбуждения, так и для эмиссии. На трехмерных спектрах флуоресценции наблюдалось до трех пиков. Пример таких спектров приведен на рисунке 1.5



Рисунок 1.5 - Примеры трехмерных спектров флуоресценции образцов вин, произведенных в регионе Чангли (Китай) Заимствовано из работы [51]

Было проанализировано 42 сорта вина, для обработки трехмерных спектров флуоресценции использовался анализ главных компонент. Это позволило в основном правильно классифицировать исследованные образцы по сортам, предприятию-изготовителю и году изготовления (см. пример, приведенный на рисунке 1.6).



Рисунок 1.6 – Представление в плоскости главных компонент результатов обработки трехмерных спектров флуоресценции вин, произведенных в регионе Чангли; а) классификация вин, произведенных в 2004 году по сорту б) классификация по году выпуска (заимствовано из работы [51]).

В работах [52-53,56] продемонстрированы возможности флуоресцентной спектроскопии для выявления различий между коньяками (brandy) и коньячными напитками, приготовленными с использованием спиртов не виноградного происхождения. Такие напитки в ряде случаев используются в качестве контрафактных коньяков. В подтверждение необходимости установления указанных различий авторы [52] ссылаются на Директиву Евросоюза [58], регламентирующую вопросы контроля подлинности алкогольных напитков, включая защиту их географического происхождения. Использовалась фронтального наблюдения схема флуоресценции. Показано, что для достоверного установления различий между указанными напитками могут быть использованы спектры эмиссии в диапазоне от 360 до 650 нм при возбуждении на длине волы 350 нм и спектры синхронного сканирования в диапазоне от 200 до 700 нм при разности длин волн возбуждения и эмиссии 90 нм. Хотя даже визуальное рассмотрение спектров позволяет установить различие между двумя видами напитков, более убедительным доказательством этих отличий являются результаты обработки спектральных данных методами хемометрики, в частности с помощью анализа главных компонент.

В работах [54, 57] показаны возможности спектров трехмерной (3D) флуоресценции для классификации алкогольных напитков и выявления подделок. Авторами работы [54], выполненной в Норвегии, были измерены 3D спектры 57 красных вин различного происхождения. Использовалась схема фронтальной регистрации флуоресценции (см. выше), не производилось ни предварительного разбавления образцов, никакой-либо другой пробоподготовки. Для измерения трехмерных спектров были выбраны диапазоны 245-340 нм для возбуждения и 300-500 нм для эмиссии. Данные, полученные в виде ЕЕМ матрицы, обрабатывались с помощью одного из методов хемометрики – параллельного факторного анализа (PARAFAC). В результате такой обработки удалось не только различить вина, произведенные в разных географических регионов и из разных сортов

винограда, но и определить концентрации некоторых веществ в составе вина. Правильность определения концентрации ЭТИХ веществ (катехина и контролировалась с помощью ВЭЖХ. В работе [57] эпикатехина) аналогичный подход использовался ДЛЯ выявления фальсификатов коньячных напитков (brandy). Трехмерные спектры измерялись в диапазоне длин волн возбуждения 393 - 497 нм и 510-600 нм для длин волн эмиссии. В результате обработки спектров удалось определить содержание воды, этилового и метилового спирта в контролируемых напитках с высокой чувствительностью и достоверностью (доверительная вероятность > 0,99).

1.2.3 Обработка спектральных данных для задач классификации образцов

Для наиболее полного извлечения информации из результатов спектральных измерений, полученных при анализе пищевых продуктов, в том числе алкогольных напитков, в последнее время все чаще применяют методы анализа многомерных данных. Следуя обзору [59], изложим кратко принципиальные основы такого подхода, применительно к задачам классификации и идентификации образцов по спектральным данным.

Для выделения полезной информации в хемометрике используются методы сжатия данных, в отличие от традиционного подхода, когда из данных выделялись только особые значимые измерения. Например, анализируется целый фрагмент спектра абсорбции, вместо того, чтобы использовать значения оптической плотности только на одной или нескольких длинах волн. Идея сжатия данных состоит в том, чтобы представить исходные данные используя новые, более информативные переменные. При переходе к новым переменным размерность задачи понижается. Сжатие данных позволяет представить полезную информацию в более компактном виде, удобном для визуализации и интерпретации.

Наиболее популярным методом сжатия данных при качественном анализе является анализ главных компонент – principle component analysis (PCA). Он дает основу многих методов классификации. Главные компоненты

– это и есть новые, более информативные переменные, причем они ранжируются (нумеруются) по доле, содержащейся в них информации – наиболее информативной является первая главная компонента. Обычно число главных компонент существенно меньше, чем число исходных переменных. Графическое представление метода главных компонент дано на рисунке 1.7, а его подробное изложение приведено в книгах и обзорах по хемометрике (см., например [59]).



Рисунок 1.7 – Графическая иллюстрация метода главных компонент (график приведен в [59]). а) данные в исходных координатах, б) данные в координатах главных компонент.

Метод главных компонент применяется для анализа двумерных массивов данных, когда есть всего два набора переменных – один набор независимых (например, длины волны) и второй набор зависимых (например, оптические плотности или интенсивности флуоресценции). Он непригоден 3D ДЛЯ анализа более сложных массивов, например, спектров флуоресценции, когда есть три набора переменных – два независимых (длины волн возбуждения и эмиссии) и один зависимых – интенсивности флуоресценции. В этом случае используются более сложные методы, представляющие собой развитие метода главных компонент на трехмерные модели. Одним из них методов является параллельный факторный анализ, он кратко описан в обзоре [59] и более подробно в цитируемой там литературе.

Упомянутые выше и некоторые другие методы хемометрики применяются для классификации и идентификации пищевых продуктов и алкогольных напитков. Вопросы их использования для этих целей рассматриваются в работах [60-64].

К настоящему времени существует целый ряд программных продуктов, поддерживающих обработку данных различными методами хемометрики. Одним из наиболее продвинутых подобных продуктов является PLS Toolbox, который представляет собой пакет расширения к среде Matlab. В этом пакете реализованы все основные алгоритмы качественного и количественного анализа методами хемометрики, включая упомянутые выше метод главных компонент и параллельный факторный анализ.

1.3 Обеспечение аппаратной независимости спектров флуоресценции с помощью стандартных образцов

За последние годы флуоресцентная спектроскопия превратилась из качественного аналитического метода с ограниченной областью применения в широко используемую технологию качественного и количественного анализа веществ и материалов. Флуоресцентные методы анализа являются высокочувствительными, минимально инвазивными, сравнительно недорогими и доступными для практического использования. Особенно активно развиваются приложения флуоресцентных методов в биологии, медицине, а также в фармацевтике и химической промышленности. Флуоресцентные образцов методы используются для исследования наноматериалов, например квантовых точек или наночастиц благородных металлов. При этом используются как универсальные средства измерений (спектрофлуориметры), так и специализированные (микропланшетные и ПЦР анализаторы, флуоресцентные микроскопы И т.п.). Разнообразие флуоресцентных красителей, в том числе меток и зондов, применяемых в

биомедицинских научных исследованиях и лабораторной диагностике, обуславливает необходимость надежных и аппаратно-независимых измерений их свойств, прежде всего спектров и значений интенсивности флуоресценции.

Приборы, реализующие спектральный флуоресцентный анализ называются спектрофлуориметрами. Принцип их действия основан на выделении узких спектральных интервалов и спектральном сканировании возбуждающего И испускаемого (флуоресцентного ИЛИ рассеянного) излучения посредством монохроматоров. Прозрачная кювета, заполненная жидким анализируемым образцом (или твердый образец) помещается в кюветное отделение прибора В предметный пучок, И облучается возбуждающем излучением, длина волны которого задается пользователем, после чего излучение флуоресценции собирается под углом 90° в заданном интервале.

Для корректного проведения качественного анализа необходим контроль аппаратной независимости, так как в этом случае какие-либо выводы делаются из формы спектра, характерного расположения пиков или соотношения между ними. Однако, так как каждый спектр измеряемый на приборе зависит не только от параметров образца, но и от параметров прибора, становится необходимым устранить или минимизировать влияние приборных факторов на результат измерений. Такая ситуация вносит дополнительную неопределенность и мешает объективной оценке результата измерений.

Вместе с этим, необходимо контролировать не только форму спектра, но и минимизировать зависимость результата измерения интенсивности от приборных флуктуаций. Иными словами, необходимо обеспечить решение задачи систематического контроля стабильности интенсивности флуоресценции рабочего средства измерения. Это нужно для проведения количественного анализа, ведь ДЛЯ него значения интенсивности флуоресценции при заданных значения длин волн возбуждения и эмиссии является ключевым параметром, и изменение интенсивности может приводить к получению неточных результатов, построению некорректных калибровочных кривых.

Для обеспечения аппаратной независимости измерений необходима калибровка спектрофлуориметров, называемая процедурой спектральной коррекции, которая может быть выполнена либо с помощью так называемых «физических стандартов» (излучателей и фотоприемников, передающих размеры единиц от радиометрических эталонов), либо с помощью мер и стандартных образцов флуоресценции (СОФ).

Существует несколько вариантов материалов, пригодных для изготовления на их основе мер флуоресценции. Ниже будут подробно рассмотрены их достоинства и недостатки, которые и обусловили выбор конкретного материала – неорганического стекла.

Одним из вариантов материала меры являются образцы, воспроизводящие спектры эмиссии конкретных красителей.

1.3.1 Стандартные образцы на основе флуоресцентных красителей

Эти образцы используются для коррекции спектров флуоресценции и для калибровки каналов возбуждения и эмиссии спектрофлуориметров [65-70]. Наиболее известным среди таких образцов является набор ВАМ F001 – ВАМ F005, выпускаемый Федеральным институтом исследований и испытаний материалов Германии (ВАМ) [70-71]. Этот набор предназначен для калибровки эмиссионных каналов спектрофлуориметров и проверки их стабильности. Спектры эмиссии флуоресценции входящих в него красителей покрывают интервал от 300 до 770 нм (см. таблицу 1.1 и рисунок 1.8). В сертификате на эти образцы приводится спектр эмиссии при определенной для каждого из образцов длине волны возбуждения. Данные о спектрах возбуждения не приводятся. В состав набора входит пакет программного обеспечения LINKCORR, осуществляющий расчет функций для коррекции спектральной чувствительности спектрофлуориметров с целью получения аппаратно-независимых спектров эмиссии флуоресценции. Разработанный в 2005 г. набор ВАМ вплоть до настоящего времени используется как для калибровки спектрофлуориметров, так и для проведения межлабораторных сличений, в том числе международных.

Таблица 1.1 - Спектральные характеристики красителей, входящих в состав набора стандартных образцов ВАМ (по данным [71])

Краситель	Длина волны возбуждения, нм	Интервал длин волн эмиссии, нм
F 001	280	300 - 450
F 002	315	330-530
F 003	380	390 -600
F 004	420	450 - 700
F 005	550	570 - 770



Рисунок. 1.8 - спектры эмиссии флуоресценции, стандартных образцов, входящих в набор ВАМ F001-ВАМ F005. Сплошными линиями показаны скорректированные (аппаратно-независимые) спектры, пунктиром – спектры до коррекции. Рисунок взят из статьи [71].

В пределах предназначенного для него интервала длин волн, свойства стандартных образцов для спектров эмиссии слабо зависят от концентрации флуорофора.
Наряду со стандартными образцами для спектров эмиссии, разрабатываются также стандартные образцы спектров возбуждения флуоресценции. При разработке таких образцов приходится учитывать следующее:

Форма спектра возбуждения зависит от концентрации флуорофора, причем эта зависимость может быть разной при разной геометрии регистрации флуоресценции. (Спектры эмиссии флуоресценции зависят от этих факторов в гораздо меньшей степени). Поэтому для стандартных образцов спектров возбуждения необходимо использовать очень разбавленные растворы. Это затрудняет создание образцов на основе соединений с низкими значениями квантового выхода.

Сильная зависимость формы спектра возбуждения от концентрации флуорофора обусловлена пропорциональностью интенсивности флуоресценции коэффициенту поглощения образца на длине волны возбуждения.

Меры на основе жидкостей имеют следующие недостатки:

 Недостаточная стабильность из-за возможности химических и фотохимических реакций в растворе.

2) Необходимость хранения при пониженных температурах.

3) В большинстве случаев жидкие стандартные образцы не рассчитаны на непосредственное использование, а требуют приготовления рабочих растворов с очень ограниченным сроком годности. Например, для стандартных образцов из набора ВАМ F001 – ВАМ F005 приготовленные рабочие растворы должны быть использованы в течение одной недели.

4) Вследствие пункта 3, а так же малого объема красителя – невозможность использования их для систематического контроля чувствительности прибора.

1.3.2 Стандартные образцы на основе полимеров

В связи с отмеченными выше недостатками жидких стандартных образцов предпринимались попытки создания СОФ на основе твердых

материалов. Наиболее простым способом обеспечения требуемых спектров флуоресценции является введение соответствующих добавок в прозрачные полимеры. Наиболее подходящим для этих целей полимерных материалов является полиметилметакрилат (ПММА, органическое стекло), который прозрачен в широкой области спектра и имеет высокую оптическую однородность. На основе ПММА фирма «Starna» (Великобритания) выпускает набор СОФ 6 BF Fluorescence Reference Set [72]. Этот набор образцов, имеющих включает 6 форму размеры стандартной И флуориметрической кюветы (12,5*12,5*45 мм). Диапазон ДЛИН ВОЛН возбуждения для этих образцов находится в интервале 290 – 562 нм, длин волн эмиссии – в диапазоне 330 – 573 нм. Флуоресцентные свойства образцов обеспечиваются за счет введения добавок, сведения о которых приведены в таблице 1.2. В этой же таблице приведены длины волн, соответствующие максимумам возбуждения и эмиссии образцов, входящих в состав набора. Для набора 6BF приводятся, в отличие от наборов на основе жидкостей, спектры как эмиссии, так и возбуждения. Образец № 1 содержит две добавки, (антрацен и нафталин), и может быть использован для демонстрации высокой специфичности флуоресцентного метода. При возбуждении на длине волны 360 нм может быть зарегистрирован спектр флуоресценция антрацена, а 290 нм – нафталина.

Таблица 1.2 - Флуоресцирующие вещества, используемые в качестве добавок для СОФ набора 6 BF

Номер	Соединение	Молярная	Длина волны	Длина волны
образца		концентрация, М	возбуждения, нм	эмиссии, нм
1	Anthracene	$1 \ge 10^{-5}$	360	402
	Napthalene	6 x 10 ⁻⁵	290	330
2	Ovalene	2×10^{-7}	342	482
3	p -Terphenyl	$5 \ge 10^{-7}$	295	338
4	Tetraphenylbutadiene	3×10^{-7}	348	422
5	Compound 601	1 x 10 ⁻⁶	440	475
6	Rhodamine B	2×10^{-7}	562	573

38

Спектры возбуждения и эмиссии полностью перекрывают указанные выше диапазоны, поэтому данный набор стандартных образцов может быть использован для калибровки каналов возбуждения и эмиссии спектрофлуориметров. Анализ различных составляющих погрешности, которые возникают при такой калибровке, требует специального изучения.

Флуоресцентные красители, входящие в состав СОФ на основе полимеров, подвержены фотохимической деградации, хотя и в меньшей степени, чем в образцах на основе жидкостей. Особенно существенной становится такая деградация под воздействием УФ излучения, ЧТО иллюстрируется, например, данными, приведенными на рисунке 1.9, где сопоставляется стабильность флуоресцентных свойств образцов ПММА с добавками радомина и флуоресцеина с одной стороны и флуоресцеирующего органического стекла – с другой. На нем видно снижение интенсивности флуоресценции под влиянием длительного воздействия возбуждающего УФ излучения у флуоресцентных образцов на основе неорганического стекла и ПММА, при длине волны возбуждения – 254 нм и -365 нм [73]. Еще один существенные недостаток СОФ на основе полимеров заключается в высокой анизотропии флуоресценции. Это иллюстрируется графиком, приведенным на рисунке 1.10.



Длина волны возбуждения – слева 254 нм, справа -365 нм Рис. 1.9 – Снижение интенсивности флуоресценции под воздействием УФ излучения



Рисунок 1.10 – Сравнение анизотропии флуоресценции неорганических стекол, легированных ионами Mn b Re с радомином, растворенным в спирте и находящемся в полимерном образце (РММА)

Набор 6 BF, в отличие от упомянутого выше набора BAM F 001 – BAM F 005 не имеет статус государственного стандартного образца, однако фирмаизготовитель декларирует для него прослеживаемость характеристик к стандартным образцам NIST, т.е. данный набор имеет статус NIST traceable.

1.3.3 Стандартные образцы на основе неорганических стёкол

Создание твердых СОФ возможно как на основе полимерных материалов, так и на основе неорганических стекол. Такие стекла в качестве матрицы для СОФ привлекали внимание достаточно давно, первые работы в этом направлении были опубликованы специалистами Национального бюро стандартов США в 1972 году (см. [73-74]). Однако стандартные образцы на основе неорганических стекол появились значительно позже. В середине 90-х годов начали выпускаться образцы фирмы Matech (США) [75], не имеющие официального метрологического статуса, а с 2007 года NIST начал выпускать сертифицированные стандартные образцы флуоресценции на основе стекол – SRM 2940-2943 [76-83]. Спектры флуоресценции стандартных образцов NIST приведены на рисунке 1.11. По-видимому, основная причина такой задержки заключалась в сложности получения неорганических стекол с требуемыми

флуоресцентными свойствами (прежде всего, с достаточно высоким квантовым выходом флуоресценции).



Рисунок 1.11 – Спектры эмиссии флуоресценции стандартных образцов NIST SRM 2940-2943

Если при создании образцов на основе полимеров получение требуемых флуоресцентных свойств достигалось путем введения соответствующих красителей в полимерную матрицу, то для неорганических стекол такой подход неприемлем, поскольку молекулы любого красителя не выдерживают высоких температур, при которых осуществляется варка Флуоресценция обусловлена стекла. оптических стекол точечными дефектами (центрами окраски). Такими центрами часто являются ионы редкоземельных элементов и некоторых других элементов, например, магния, урана меди, железа, цинка или ванадия.

В течение 2008-2011 года NIST были разработаны 4 типа СОФ на основе неорганических стекол, легированных ионами металлов. Все они предназначены для коррекции спектров эмиссии флуоресценции или интенсивности флуоресценции, выраженной в относительных единицах. Именно эти характеристики с соответствующими неопределенностями приводятся для каждого из образцов в качестве аттестованных значений. Основные сведения об этих образцах систематизированы нами в таблице 1.3.

Наименование	Сведения о стекле	Длина волны	Диапазон длин	Источники
		возбуждения,	волн эмиссии,	информации
		HM	HM	
SRM 2940	0,11 % МпО ₂ в	412	500 - 800	[76-77]
	боратном стекле			
SRM 2941	0,03 % U ₃ O ₈ в	427	450 - 650	[78-79]
(зеленый)	боратном стекле			
SRM 2942	0,00025 % СеО ₂ в	310,1	320-430	[80-81]
(УФ)	фосфатном стекле			
SRM 2943	0,01 % Си ₂ О в	330,3	350 - 640	[82-83]
(голубой)	фосфатном стекле			

Таблица 1.3 Основные свойства флуоресцентных стандартных образцов NIST на основе неорганических стекол.

Из приведенных данных видно, что разработанные в NIST образцы перекрывают достаточно широкий диапазон спектров эмиссии (от 320 до 800 нм). В нескольких участках этого широкого диапазоны спектральные интервалы, по которым имеются аттестованные значения, перекрываются, что дает возможность повысить надежность при использовании образцов для коррекции спектров флуоресценции и калибровки спектрофлуориметров.

Преимуществами СОФ на основе неорганических стекол, в частности, рассмотренных выше стандартных образцов NIST, перед твердыми образцами на основе полимеров являются:

- малая анизотропия флуоресценции (такая же, как у растворов);

- практически отсутствует зависимость флуоресцентных свойств от температуры;

- хорошая устойчивость к тепловым, химическим и фотохимическим воздействиям.

Специальные оптические стекла, в том числе боратные и фосфатные, легированные ионами металлов, которые могли бы быть использованы для создания СОФ, серийно не выпускаются, а изготавливаются соответствующими предприятиями по специальному заказу. Одним из наиболее известных производителей специального оптического стекла на мировом рынке является концерн Schott (Германия), научные подразделения которого занимаются исследованием флуоресцентных свойств стекол [84]. Этот концерн предлагает услуги по изготовлению стекол с заданными флуоресцентными свойствами; он имеет представительство в России (г. Москва).

В целом, неорганические стекла показывают себя наиболее пригодным материалом, для создания мер флуоресценции.

Выводы к главе 1

абсорбционной спектрофотометрии, Методы флуоресцентной спектроскопии, статического и динамического рассеяния света успешно применяются при изучении химического и дисперсного состава коллоидных систем. В настоящее время, существуют актуальные направления оптической спектроскопии, развиваемые для диагностики таких объектов. Одно из них связано с измерением параметров наночастиц в коллоидных растворах, таких как размер и концентрация. Другое направление связано с исследованием объектов (например, пищевых продуктов), представляющих собой сложные коллоидные системы, для чего широко применяются оптико-спектральные методы, особенно флуоресцентная спектроскопия. Кроме того, в связи с особенностями измерения флуоресцентных спектров и важностью учета аппаратной зависимости результатов флуоресцентных измерений, актуальной задача создания стандартных образцов, является предназначенных для проведения спектральной коррекции и контроля стабильности выходного сигнала спектрофлуориметров.

Так как коллоидная система представляет собой жидкость, содержащую в себе наночастицы, всестороннее исследование дисперсного состава такой системы представляет большой интерес. Знание счётной концентрации частиц необходимо либо для контроля эффективности их синтеза, либо для подбора оптимального дисперсного состава жидкой среды для конкретной технологии. Причем во многих случаях наибольший интерес представляет счетная концентрация частиц, т.е. число частиц в единице объема. Существуют различные способы определения счётной концентрации *in situ*. Кроме традиционных методов, предполагающих построение градуировочного графика, существует способ определения размеров и концентрации наночастиц по спектрам экстинкции. Этот способ описан в работах [23-24] для золотых и [25] серебряных наночастиц. Однако данный метод имеет высокую погрешность [26] и может быть применён лишь для ограниченного круга наночастиц.

Особый интерес представляет определение концентрации наночастиц при помощи анализа рассеянного излучения, так как на этом базируется метод динамического рассеяния света, призванный быстро и эффективно определять размер наночастиц. Таким образом, одновременно решается задача определения и размерных параметров, и концентрации наночастиц. Закономерности упругого рассеяния непроводящих (диэлектрических) сферических частиц в широком диапазоне диаметров (от долей нанометра до десятков микрон) хорошо описываются теорией рассеяния Ми [27-28] для сферических частиц и расширенной теорией Ми для несферических частиц различной формы [29].

Говоря об исследовании сложных коллоидных систем методами, основанными на использовании спектров абсорбции, флуоресценции и рассеяния, нельзя не упомянуть исследование пищевых продуктов. Так, во всем мире проявляется значительный интерес к разработке достоверных физико-химических методов идентификации виноградных вин (являющихся яркими представителями сложных коллоидных систем) [33]. Различные методы дают подробную информацию о составе и биохимии пищевых продуктов, в том числе вина, при этом подготовка проб и анализы занимают требуют дорогостоящего оборудования много времени, весьма И высококвалифицированного персонала, непригодны для работы в режиме «on line» (например, для контроля напитков в процессе их разлива) [33-36]. Поэтому всё большую популярность приобретаю методы, основанные

44

абсорбционной [37-42] и флуоресцентной [48-57] спектроскопии. При этом, особое внимание уделяется обработке полученных данных [60-64].

Для эффективного использования результатов, получаемых на спектрофлуориметрах, необходимо уделить особое внимание методам и средствам, используемым для обеспечения аппаратной независимости спектров, т.е. уменьшения влияния на итоговый спектр параметров прибора.

Существуют различные стандартные образцы флуоресценции, позволяющие решить эту задачу. Например, образцы на основе жидких красителей ВАМ F001 – ВАМ F005, выпускаемые Федеральным институтом исследований и испытаний материалов Германии (ВАМ) [70-71]. При этом, у такого варианта исполнения существует ряд серьезных недостатков, таких как ограниченное количество применений, невысокая стабильность и т.д.

В связи с отмеченными выше недостатками жидких стандартных образцов предпринимались попытки создания СОФ на основе твердых материалов. Так, на основе органических стёкол фирма «Starna» (Великобритания) выпускает набор СОФ 6 BF Fluorescence Reference Set [72]. Но хоть такие образцы и можно применять неограниченное количество раз, флуоресцентные красители, входящие в состав СОФ на основе полимеров, подвержены фотохимической деградации, хотя и в меньшей степени, чем в образцах на основе жидкостей [73].

Именно поэтому особый интерес представляют образцы на основе неорганических стёкол. Такие стекла в качестве матрицы для СОФ привлекали внимание достаточно давно, первые работы в этом направлении были опубликованы специалистами Национального бюро стандартов США в 1972 году [73-74]. Однако стандартные образцы на основе неорганических стекол появились значительно позже. С 2007 года NIST начал выпускать сертифицированные стандартные образцы флуоресценции на основе стекол – SRM 2940-2943 [76-83].

Образцы на основе неорганических стёкол имеют низкую анизотропию флуоресценции, малую зависимость флуоресцентных свойств от температуры, устойчивы к фотодеградации.

Специальные оптические стекла, которые могли бы быть использованы для создания СОФ, серийно не выпускаются. Одним из наиболее известных производителей специального оптического стекла на мировом рынке является концерн Schott (Германия) [84].

В целом, неорганические стекла показывают себя наиболее пригодным материалом, для создания мер флуоресценции.

Таким образом, в данной главе представлен подробный обзор различных методов и средств оптической спектроскопии, используемых для исследования коллоидных систем, их особенностей, их возможности и применимости для качественного и количественного анализа.

Глава 2. Разработка метода иизмерений концентраций наночастиц в жидких средах на ДРС анализаторах

2.1 Связь интенсивности упругого рассеяния света с концентрацией, размерными параметрами и оптическими постоянными наночастиц

Проведенное в главе 1 рассмотрение позволяет предложить новый концентраций сферических несферических подход к измерению И наночастиц в жидких средах. Основные результаты, полученные в данной главе, изложены в работах [7, 8, 11, 20]. Известен метод измерения концентрации ПО интенсивности излучения, рассеянного частицами, основанный на построении градуировочного графика по взвесям частиц с известными концентрациями, из такого же материала и таких же размеров, что и частицы, концентрацию которых предстоит определять. В общем случае приготовление таких взвесей является сложной и не всегда решаемой задачей. Предлагается использовать для измерения концентраций анализатор размера частиц, работающий на принципе динамического рассеяния света (ДРС). При каждом измерении размеров частиц на таком анализаторе определяется значение скорости счета, пропорциональное интенсивности рассеянного излучения. В известных анализаторах, например, в анализаторе типа Malvern, это значение используется только как вспомогательная величина, помогающая определить требуемое ослабление мощности лазера, направляемой на образец. Однако в работе [85] скорость счета используется для определения относительных значений концентрации.

Была исследована возможность использовать скорость счета для определения абсолютных значений концентраций наночастиц в исследуемых образцах, не используя градуировочных образцов с идентичными частицами (того же материала и размера). Вместо таких образцов предполагается использовать всего один коллоидный раствор диэлектрических наносфер (далее, единый образец сравнения). Приведем обоснование предлагаемого метода.

Из формулы теории Ми (см. главу 1, формула (1.3)) следует, что скорость счета импульсов в приборе ДРС может быть оценена как

$$P = \frac{I_0 A}{k a^2} \cdot F(\theta, \varphi, a, m) \cdot \varepsilon \cdot N$$
(2.1)

Здесь *А* – площадь диафрагмы в системе сбора рассеянного излучения, ε – чувствительность фотоприемной системы, а –радиус сферы.

Предлагается измерение на приборе ДРС средних гидродинамических диаметров частиц и скоростей счета для анализируемого образца и единого образца сравнения – $P_{анал.}$ и $P_{oбp.cpaвh}$. Оба измерения проводятся при одних и тех же настройках прибора. В этом случае входящие в формулу (2.1) для скорости счета параметры I_0 (интенсивность падающего излучения), k (волновое число падающего излучения), r (расстояние от области рассеяния до фотоприемника), А (площадь диафрагмы в системе сбора рассеянного излучения) и ε (чувствительность фотоприемной системы) в этих измерениях одинаковы. Поэтому для отношения скоростей счета можно написать

$$\frac{P_{a_{Han.}}}{P_{o\delta p.cpa6H.}} = \frac{F(a_{a_{Han.}}, m_{a_{Han.}})}{F(a_{o\delta p.cpa6H...}, m_{o\delta p.cpa6H...})} \cdot \frac{n_{a_{Han.}}}{n_{o\delta p.cpa6H.}}$$
(2.2)

Безразмерные функции направления $F(a_{ahan}, m_{ahan})$ $F(a_{o\delta n})$ И _{сравн.}, *т*обр. сравн.) могут быть вычислены из размеренных параметров частиц для сферических частиц по формулам (1.4-1.6), а для несферических – с помощью методов и алгоритмов, подробно изложенных в [31-32]. Значения размерных параметров, необходимые для этих вычислений получаются из измерений на анализаторе ДРС, значения относительного комплексного показателя преломления т – для диэлектрических наночастиц следует брать ИЗ литературных данных ДЛЯ соответствующего вещества, а ДЛЯ металлических – вычислять с помощью упомянутых выше моделей. В этом случае в формуле (2.2) остается единственный неизвестный параметр –

концентрация наночастиц в анализируемом образце, которая может быть найдена путем решения соответствующего уравнения.

Для подготовки к этой апробации метода были разработаны, совместно с ФГБУН «Институт физики твердого тела Российской академии наук», образцы сравнения в виде водных дисперсий наносфер двуокиси кремния.

Были проведены измерения размеров частиц для образца коллоидного раствора двуокиси кремния, синтезированного в Институтом физики твердого тела РАН.

Измерения проводились на анализаторе размеров частиц «Zetasizer Nano ZS» (фирма Malvern, Великобритания, Госреестр № 45771-10).

Полученные результаты измерений гидродинамического диаметра (D), показателя полидисперсности, а также характеристики исследуемого образца представлены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 Результаты измерений размеров наночастиц двуокиси кремния, предполагаемых для использования в качестве образцов сравнения

	Результаты измерений размера частиц					
Наименование образца	18 марта 2015 г.		31 марта 2015 г.		20 мая 2015 г.	
	D, нм	PdI	D, нм	PdI	D, нм	PdI
5-VF	24,91	0,033	24,81	0,031	25,35	0,023

Характеристики исследуемого образца:

- концентрация частиц двуокиси кремния в коллоидном растворе 1,5% вес.;
- рН коллоидного раствора 11,09;
- стабилизатор КОН;
- дата синтеза 17 марта 2015 г.;
- дата стабилизации 17 марта 2015 г.

Результаты распределений частиц для образца 5-VF по интенсивности и объему в зависимости от размера приведены на рисунках 2.1 и 2.2.

Из приведенных результатов видно, что распределение частиц имеет мономодальный характер, размер частиц и показатель полидисперсности стабильны за прошедший период времени.



Рисунок 2.1 – Распределение в координатах размер частиц – интенсивность



Рисунок 2.2 – Распределение в координатах размер частиц – объем

Описанный определению концентраций подход К наночастиц предусматривает использование анализатора динамического рассеяния света, качестве аналитического сигнала используется скорость а В счета фотоприемника, одноэлектронных импульсов ОТ регистрирующего Точнее, рассеянного излучения. предложено измерять интенсивность скорости счета для исследуемого образца Ранал. и образца сравнения Робр. сравню, представляющего собой суспензию монодисперсных наночастиц двуокиси

кремния с известной концентрацией. Отношение скоростей счета этих образцов удовлетворяет уравнению (2.2)

В этом уравнении N_{анал.} и N_{обр. сравн} – счетные концентрации наночастиц в анализируемом образце и образце сравнения, а_{анал.} и а_{обр. сравн} – радиусы частиц, m_{анал.} и m_{обр. сравн} – комплексные показатели преломления частиц в анализируемом образце и образце сравнения относительно фона (жидкости, в которой взвешены частицы). Они вычисляются по формуле

$$m = \frac{n_{\text{vacm.}} + i \cdot k_{\text{vacm.}}}{n_{\text{doh.}} + i \cdot k_{\text{doh.}}}$$
(2.3)

где n и k соответствуют действительной и мнимой частям показателя преломления.

С помощью формулы (2.2) можно, измерив на приборе ДРС диаметры частиц и скорости счета для анализируемого образца и образца сравнения, и зная счетную концентрацию частиц в образце сравнения N_{обр. сравн}, вычислить счетную концентрацию частиц в исследуемом образце.

Была проведена экспериментальная апробация способа. она проводилась на анализаторах АРН-2 (был упомянут выше) и Malvern Zetasizer Nano ZS (в Центре коллективного пользования ФГУП "ВНИИОФИ") на образцах наносфер из двуокиси кремния и серебра. Результаты апробации показали, что таким образом можно очень приближенно оценивать концентрацию наночастиц, при этом погрешность может достигать 50 и более процентов.

Невысокую точность можно объяснить очень сильной зависимостью интенсивности рассеяния (то есть скорости счета) от диаметра частиц, при диаметрах до 50-60 нм I~a⁶.

2.2 Совершенствование и экспериментальная отработка метода измерения счетной концентрации наночастиц в жидких средах (сферические частицы)

С учетом полученных результатов метод был модифицирован: вместо измерения интенсивности рассеяния предусматривается измерение

оптической плотности (ОП) на длине волны лазера, возбуждающего рассеяние. ОП следует измерять относительно фона (то есть жидкости, в которой взвешены частицы). Для этого можно использовать фотоприемник, измеряющий интенсивность излучения, прошедшего через кювету. Такой фотоприемник должен быть предусмотрен в ДРС анализаторах, которые планируется использовать для вычисления счетной концентрации наночастиц. В большинстве выпускаемых в настоящее время ДРС анализаторов, например, в анализаторе Malvern Zerasiaer Nano ZS, таких фотоприемников нет. С помощью закона Бугера-Ламберта-Бера несложно показать, что для взвеси сферических частиц радиуса а, находящихся в кювете с длиной оптического пути l, оптическая плотность A_{ext}, относительно фона определяется выражением

$$A_{ext} = \frac{C_{ext.} \cdot l \cdot N}{\ln 10} \tag{2.4}$$

Здесь N – счетная концентрация наночастиц; C_{ext} – сечение экстинкции. В частном случае сферических частиц $C_{ext} = Q_{ext} \pi a^2$ – где Q_{ext} эффективность экстинкции (отношение истинного сечения экстинкции частицы к ее геометрическому сечению), a – радиус частицы. Для сферических частиц согласно теории рассеяния Ми [28]

$$Q_{ext} = \frac{2}{x^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) * \operatorname{Re}(a_n + b_n) . \qquad (2.5)$$

Здесь х, так называемый параметр дифракции, x = k a,

где $k = \frac{2 \cdot \pi \cdot n_{\phi o \mu}}{\lambda_0}$ – волновой вектор (λ_0 – длина волны лазерного излучения в вакууме); a_n и b_n – коэффициенты ряда рассеяния, зависящие от параметра дифракции х и относительного показателя преломления m (см. формулу (2.3)).

Таким образом, второе отличие модифицированного метода от предложенного в разделе 2.1, состоит в том, что вместо функций направления F вычисляется эффективность экстинкции Q(x,m). Как и

функция направления, эффективность экстинкции для сферических частиц вычисляется с помощью формул теории рассеяния Ми.

Формулы для вычисления эффективности экстинкции Q_{экст.} при заданных значениях m и x приведены в различных источниках, например, [28]. Имеются также коды компьютерных программ, приведенные в [86-87].

Для проверки предложенного способа с его помощью были проведены измерения счетной концентрации сферических наночастиц в трех образцах жидких дисперсий – двух дисперсиях на основе наночастиц двуокиси кремния и одной на основе наночастиц серебра.

Расчеты Q_{экст} по формулам теории Ми производились в среде Matlab с использованием функций, приведенных в [86]. При расчетах использовались значения для действительной и мнимой части показателя преломления, приведенные в таблице 2.2.

Таблица 2.2 Оптические постоянные материалов частиц на длине волны гелий-неонового лазера, использованные при расчетах по формулам теории рассеяния Ми

Материал	п _{объемн.}	k _{объемн.}
Двуокись кремния (SiO ₂)	1,4570	0
Серебро	0,1568	3,806
Вода	1,3317	$1,47*10^{-8}$

Использованы данные, приведенные в базе данных для показателей преломления [88].

В таблице 2.2 приведены значения n и k для объемных образцов. Для наночастиц SiO₂ вводилась поправка на зависимость показателя преломления от диаметра частиц. Для этой зависимости использовалась аппроксимация

$$n(d) = n_{obbemh} - C_1 + C_2/d$$
 (2.6)

Коэффициенты C₁ и C₂ подбирались по экспериментально измеренным значениям оптической плотности для образцов с известными значениями

массовой концентрации наночастиц, таким образом получено $C_1 = 0,1117, C_2 = 4,9625.$

Комплексный показатель преломления для наночастиц может быть получен из показателя преломления для объемного вещества, с поправкой на размерные эффекты. Такая коррекция зависит от материала наночастиц. Например, согласно аппроксимации по Хлебцову [23], в случае серебряных и золотых наночастиц, коррекция необходима только для мнимой части показателя преломления и должна учитывать длину свободного пробега электронов и плазменную частоту.

$$\varepsilon_{H^{4}}(\lambda, d) = \varepsilon_{ue_{Tb} + bit}(\lambda) + \varepsilon \Delta(\lambda, d)$$
(2.7)

Для золотых наночастиц справедливо выражение:

$$\Delta \varepsilon(\lambda) = i \frac{10}{d} \cdot \left(\frac{\lambda}{520}\right)^3 \tag{2.8}$$

Для наночастиц двуокиси кремния диаметром более 20 нм необходимо учитывать внутреннюю структуру, которая представляет собой плотно упакованные частицы диаметром 5-7 нм. Исходя из этого, а также из экспериментальных данных, использовалось следующее соотношение, описанное выше (формула 2.6).

Уравнение (2.8) было получено из экспериментальных данных для наночастиц SiO₂.

Для установления сферичности частиц использовался фактор деполяризации $\Delta = I_{VH}/I_{VV}$ (здесь I_{VV} – ко-поляризационная, а I_{VH} – кроссполяризационная компоненты в рассеянном на наночастицах излучении). Фактор деполяризации для сферических частиц составляет меньше 1%, а для дальнейшем наностержней, использованных нами В качестве В несферических частиц, он составил 23%.

По значениям счетной концентрации, определенным предлагаемым способом, вычислялась массовая концентрация с использованием формулы 1.1, значения которой сравнивались с исходными данными. В качестве

исходных данных для частиц двуокиси кремния принимались значения концентрации в весовых процентах, сообщенные производителем, а для частиц серебра – значения массовой концентрации, определенные по спектрам плазмонного резонанса в соответствии с методикой, изложенной в работе [89].

Значения гидродинамического диаметра измерялись на анализаторе размеров частиц АРН-2, а оптической плотности – спектрофотометрефлуориметре СФФ-2 «Флуоран».

Характеристики ДРС анализатора АРН-2 (Госреестр № 48292-11) приведены в таблице 2.3, параметры спектрофотометра-флуориметра СФФ-2 «Флуоран» приводятся в таблице 2.4 АРН-2, и СФФ-2 «Флуорна» разработаны во ФГУП «ВНИИОФИ», в лаборатории аналитической спектроскопии и метрологии наночастиц.

Длина волны лазерного излучения, нм	633
Выходная мощность лазера, мВт, не менее	12
Поляризация лазера	Линейная > 500:1
Диапазон углов рассеяния	$15^\circ < \alpha < 165^\circ$
Диапазон температур термостатирования °С	от +5 до +50
Нестабильность термостатирования, °С не более	0,1
Погрешность термостатирования, °С, не более	0,3
Диапазон измерений размеров частиц, нм	2 - 5000
Питание осуществляется от сети переменного тока напряжением (220±22) В, частотой (50±1) Гц	
Потребляемая мощность, ВА, не более	100
Габаритные размеры, мм, не более	750x250x560
Масса, кг, не более	25

Таблица 2.3 Характеристики ДРС анализатора АРН-2

Внешний вид анализатора АРН-2 приведен на рисунке 2.3, а СФФ-2 «ФЛУОРАН» на рисунке 2.4.



Рисунок 2.3 – Анализатор геометрических параметров наночастиц АРН-2

Таблица 2.4 Характеристики спектрофотометра-флуориметра СФФ-2 «ФЛУОРАН»

Спектральный диапазон, нм для режима абсорбции для режима флуоресценции и рассеяния	190 ÷ 1100 200 ÷ 900
Спектральная ширина щелей входного монохроматора, нм для режима абсорбции для режима флуоресценции и рассеяния	1, 2, 5, 10, 15 2, 5, 10, 15
Спектральное разрешение монохроматора для режима абсорбции, нм	не более 1,0
Диапазон измерения оптической плотности, Б	0 ÷4
Шаг сканирования, нм	0,1, 0,5, 1,0
Предел доверительной границы случайной погрешности установки длины волны, при P = 0,95 нм, не более	
в режиме абсорбции	0,2
в режиме флуоресценции и рассеяния	0,2
Предел систематической составляющей погрешности погрешности установки длины волны, нм, не более	
в режиме абсорбции	0,3
в режиме флуоресценции и рассеяния	0,7

Диапазон измерения спектрального коэффициента направленного пропускания (СКНП), %	0 – 100
Предел доверительной границы случайной погрешности измерения СКНП, %, не более	0,2
Пределы систематической составляющей погрешности измерения СКНП, в диапазоне от 340 нм до 850 нм, %, не более	0,5
Отклонения линии 100% пропускания в режиме абсорбции в диапазоне 200 – 900 нм, при спектральной ширине щели 2 нм скорости сканирования 240 нм/мин, %, не более	0,3
Уровень шумов базовой линии на длине волны 500 нм, Б, не более	0,0002
Дрейф базовой линии за 1 час на длине волны 500 нм, Б, не более	±0, 0002
Уровень рассеянного излучения на длине волны 340 нм (NaNO ₂), %, не более	0,05
Отношение сигнал/шум для полосы комбинационного (рамановского) рассеяния дистиллированной воды при длине волны возбуждающего излучения 361 нм, и спектральной ширине щели 5 нм, времени регистрации 2 секунды, не менее	400
Габаритные размеры мм, не более	420×200×700
Масса, кг, не более	35
Потребляемая мощность, ВА, не более	75
Время установления рабочего режима, мин, не более	20



Рисунок 2.4 – Спектрофотометр-флуориметр СФФ-2 «ФЛУОРАН»

Полученные данные приведены в таблице 2.5.

Образец	Исходны о концен массов	ие данные трации счетная, см ⁻³	d _H , нм	А при λ=632,8 нм	Расчетное значение счетной концентрации, см ⁻³
$SiO_2N_2 + H_2O$	5%	4,31*10 ¹ 5	22	0,1	4,07*10 ¹⁵
$SiO_2N_216 + H_2O$	2%	6,61*10 ¹	34	0,09	6,07*10 ¹⁴
$SiO_2N_217 + H_2O$	1,5%	1,99*10 ¹ 4	40,5	0,065	1,96*10 ¹⁴
$SiO_2 N_2 19 + H_2O$	2,75%	$7,67*10^{1}$	27	0,062	8,81*10 ¹⁴
$Ag + H_2O$	78,0 мг/л	1,24*10 ¹	48,6	0,062	$1,12*10^{11}$

Таблица 2.5 Результаты экспериментального опробования способа

Приведенные в таблице 2.5 результаты дают основание предположить, что изложенный выше метод позволит определять счетную концентрацию сферических наночастиц с погрешностью, не превышающей 15%.

Кроме того, данный метод был опробован на золотых наночастицах (наносферах) с неизвестными параметрами. Диаметр наночастиц был установлен при помощи методов ДРС и ПЭМ, а счетная концентрация определялась при помощи нескольких методов: атомно-абсорбционная спектрометрия (используемая для измерения массовой концентрации), определение концентрации по плазмонному резонансу (смотри Главу 1) и при помощи предлагаемого метода. Измерения ААС проводились на атомно-абсорбционном спектрометре с электротермической атомизацией КВАНТ.Z.

Измерения спектров плазмонного резонанса проводились на спектрофотометре-флуориметре СФФ-2 «Флуоран».

Результаты этих измерений можно видеть в таблице 2.6, а также на рисунках 2.5 и 2.6.



Таблица 2.6 Экспериментальные результаты для золотых наносфер

Рисунок 2.5 – Спектр плазмонного резонанса для золотых наночастиц, $d_h = 20.3 \text{ nm}$



Рисунок 2.6 – Спектр плазмонного резонанса для золотых наночастиц, $d_h = 42.2 \text{ nm}$

2.3 Экспериментальная отработка метода измерения счётной концентрации наночастиц в жидких средах (несферические частицы)

Данный метод может быть применен к несферическим частицам. Для подхода к несферическим применения разработанного наночастицам, необходимо определить их геометрические параметры и сечение экстинкции. Геометрические параметры, такие как длина и диаметр, могут быть определены при помощи ДРС для двух типов несферических наночастиц цилиндров И вытянутых эллипсоидов. Такие измерения могут быть проведены [90] при деполяризованного помощи или мультиполяризационного ДРС [91]. Есть несколько подходов к вычислению сечения экстинкции для несферических наночастиц [29]. Первым грубым приближением замена несферической наночастицы сферой. является эквивалентной либо по площади поверхности, либо по объему. Такое приближение работает достаточно хорошо для прозрачных диэлектрических частиц, однако при поглощающих частицах такое приближение часто не работает, особенно если имеют место резонансы, например поверхностный плазмонный резонанс. Точные аналитические подходы для вычисления сечения экстинкции были получены для сфероидов в [92]. Для произвольных несферических частиц нужно применять методы, использующие дискретную дипольную аппроксимацию (ДДА) или метод Т-матриц. Метод Т-матриц подробно описан в [93] и по этой причине является более предпочтительным. Программы Matlab реализующие метод Т-матриц для сфероидов, эллипсоидов, цилиндров и кубов представлен в пакете "Optical tweezers computation toolbox".

Для обработки результатов, приведенных в данной работе, использовался SMARTIES -Spheroid Modeled Accurately with a Robost T-matrix Implementation for Electromagnetic Scattering [94]. Это код В среде программирования MATLAB и его отличительной чертой является полная свобода использования в исследовательских целях. В качестве входных параметров задаются радиус, половину длины волны, волновое число $(k=2\pi/\lambda)$, действительную И мнимую часть комплексного показателя преломления наночастицы. Сечение экстинкции C_{ext} вычисляется для некого среднего, которое берется для множества частиц, ориентированных случайным образом. Этот код предназначен ДЛЯ сфероидов И его использование для наностержней приводит к росту неточности измерений.

Для измерения размерных параметров несферических наночастиц используется метод мультиполяризационного ДРС. Кроме того, в качестве референтного метода, использовалась просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ).

В качестве несферических наночастиц были использованы золотые наностержни фирмы Alfa Aesar.

Результаты измерения размеров наностерженей обоими методами, упомянутыми выше можно видеть в таблице 2.7.

	<i>L</i> , нм	<i>d</i> , нм
ДРС	35,7	18,5
ПЭМ	40,7±1,5	16,1±1,0

Таблица 2.7 Размерные параметры несферических наночастиц

Диэлектрическая функция (ε_2) для золота была взята из работы Р. В. Johnson и R. W. Christy [95] для вычисления сечения экстинкции.

По этим данным с помощью кода SMARTIES были вычислены значения сечения экстинкции C_{ext} , которые приведены в таблице 2.8. Для вычисления счетной концентрации наностержней использовалась формула (2.4).куда подставлялись вычисленные значения C_{ext} , измеренное значение оптической плотности A_{ext} и длина кюветы *l*.

Независимо счетные концентрации золотых наностержней были оценены путем пересчета значений массовой концентрации золота в соответствующих суспензиях, измеренных методом атомно-абсорбционной спектрометрии с электротермической атомизацией. При этом использовалась формула 1.1 связывающая между собой значения счетной и массовой концентраций. Измерения проводились на атомно-абсорбционном спектрометре «КВАНТ.Z-ЭТА».

С_{Au}=27,5 мг/л – массовая концентрация, измеренная при помощи ААС-ЭТА. Результаты измерения счетной концентрации предложенным методом и сопоставления с данными ААС можно видеть в таблице 2.8.

Таблица 2.8 Результаты измерения счетной концентрации несферических наночастиц

λ, нм	Α	C _{ext} .	N _{ДPC}	N _{AAC}
		●10 ¹² , см ²	•10 ¹¹ , см ⁻³	•10 ¹¹ , см ⁻³
633	0,1358	1,80	1,74	1,48
550	0,4309	4,61	2,15	

Здесь результат, полученный для длины волны 633 нм, можно считать более достоверным, так как эта длина волны находится вне пиков плазмонного резонанса, что хорошо видно на рисунке 2.7.

При использовании данных, полученных для длины волны 633 нм, расхождение между разработанным методом и ААС составляет менее 20%.



Рисунок 2.7 – Пики плазмонного резонанса золотых наностержней

Измерения спектров плазмонного резонанса золотых наностержней проводились на спектрофотометре-флуориметре СФФ-2 «Флуоран».

2.4 Последовательность операций, необходимых для реализации метода

Таким образом, для реализации предлагаемого способа может быть рекомендована следующая последовательность операций

 Кювету с коллоидным раствором, содержащим исследуемые наночастицы, просвечивают лазерным излучением и измеряют интенсивность как проходящего через кювету света I₁, так и зависимость от времени интенсивности излучения, рассеянного под определенным углом θ- I_{pacc.}(t).

- Просвечивают лазерным излучением кювету с фоном, т.е. с жидкостью, в которой взвешены частицы, и измеряют интенсивность прошедшего через кювету света I_{0..}
- 3. Вычисляют оптическую плотность частиц относительно фона по формуле

$$A = \lg \frac{I_0}{I_1} \tag{2.9}$$

- По измеренной зависимости от времени интенсивности рассеянного излучения I_{pacc}(t). Вычисляют средний гидродинамический диаметр частиц d_H. Такое вычисление производится в соответствии с известными алгоритмами динамического рассеяния света.
- 5. По справочным или литературным данным определяют значения действительной и мнимой части комплексного показателя преломления взвешенных частиц и фоновой жидкости, соответственно <u>n_{част.}</u> и k_{част.}, n_{фон.} и k_{фон.} Вычисляют относительный комплексный показатель преломления частиц
- По формулам теории рассеяния вычисляют сечение экстинкции С_{ext.} Для сферических частиц по теории Ми С_{ext.}=πа²_{*}Q_{ext}(m,x)
- По вычисленному значению Q_{экст.}и измеренным значениям d_h и A_{частиц} вычисляют счетную концентрацию наночастиц N по формуле

$$N = \frac{4A\ln 10}{\pi d_H^2 \cdot Q_{\text{\tiny 3KCM.}} \cdot h}$$
(2.10)

где h- длина оптического пути в кювете.

Кроме того, для коллоидных систем с известной счётной концентрацией возможно решение обратной задачи - определение оптических постоянных по измеренным значениям гидродинамического диаметра и оптической плотности экстинкции.

2.5 Аппаратная реализация метода

Для реализации предложенного метода предлагается устройство, представляющее собой усовершенствованный анализатор частиц, реализующий метод динамического рассеяния света. Схема устройства приведена на рисунке 2.8.



Рисунок 2.8 – Схема модифицированного ДРС анализатора

Она включает:

Основной источник излучения – лазер 1, поворотное зеркало 2, дополнительный источник излучения – светодиод 3, направление излучения которого совпадает с направлением излучения лазера 1, диафрагму 4, фокусирующую линзу 5, кювету с образцом 6, фотоприемник 7, измеряющий интенсивность излучения, прошедшего через кювету, систему сбора рассеянного излучения, состоящую из диафрагмы 8, собирающей линзы 9 и фотоприемника 10 (обычно его роль выполняет модуль счета фотонов).

При этом, фотоприёмник проходящего излучения должен иметь приёмную площадку не менее 5 мм и находится на расстоянии не более 100 мм от кюветы. Это необходимо для компенсации возможной неточности (разнотолщинности), возникающей при изготовлении одноразовых акриловых кювет, используемых при измерениях. Такая неточность может достигать 0,2 мм, что при длине кюветы 12,5 мм приводит к отклонению луча на несколько миллиметров при большем плече. Кроме того, это необходимо для компенсации смещения, возникающего в результате неоднозначной установки кюветы. Возможное смещение луча, даже небольшое, может приводить к возникновению ошибки при измерении оптической плотности. Её причиной является неоднозначность хода луча при измерениях кюветы с фоном и образцом.

Для осуществления предложенного способа необходимо последовательно реализовать два режима работы устройства.

Режим измерения оптической плотности: В зависимости от того, на какой длине волны необходимо измерить оптическую плотность, включается один из двух источников света – либо лазер 1, либо светодиод 3. В держатель кювет последовательно устанавливаются кюветы с образцом и с фоном С помощью фотоприемника 7 измеряются значения интенсивности излучения, прошедшего через каждую из этих кювет. По этим значениям компьютерная программа с помощью формулы (2.9) вычисляет оптическую плотность.

Режим измерения гидродинамического диаметра частиц: С помощью фотоприемника 10 измеряется зависимость от времени интенсивности рассеянного излучения I_{pacc.}(t). По этой зависимости компьютерной программой по алгоритму динамического рассеяния света определяется гидродинамический диаметр частиц d_H.

Далее по результатам проведённых измерений вычисляется счётная концентрация наночастиц.

Данная схема была реализована в экспериментальном образце анализатора геометрических параметров наночастиц и дзета-потенциала, а также в малогабаритном анализаторе размеров наночастиц. Данные приборы разработаны в лаборатории аналитической спектроскопии и метрологии наночастиц ФГУП «ВНИИОФИ». Планируется серийное производство малогабаритного анализатора. Данные приборы представлены на рисунках 2.9 и 2.10 соответственно.



Рисунок 2.9 – Экспериментальный образец анализатора геометрических параметров наночастиц и дзета-потенциала



Рисунок 2.10 – Малогабаритный анализатор геометрических параметров

наночастиц

Выводы к главе 2

Предложенный метод производить экспрессное позволяет неинвазивное измерение счетной концентрации наночастиц непосредственно в жидкой пробе. Для коллоидных систем с известной счётной концентрацией возможно решение обратной задачи - определение оптических постоянных по измеренным значениям гидродинамического диаметра и оптической плотности экстинкции. При этом сочетание методов абсорбционной спектрофотометрии и динамического рассеяния света позволяет производить эти измерения на одном приборе - усовершенствованном ДРС анализаторе, что существенно сокращает время проведения измерений и количество используемой при исследовании аппаратуры. Данный метод базируется на вычислении счетной концентрации из оптической плотности экстинкции A_{ext}, измеренной при помощи абсорбционной спектрофотометрии и среднего гидродинамического диаметра наночатиц d_h, измеряемого при помощи динамического рассеяния света. Другими входными параметрами при измерениях этим методом являются значения действительной и мнимой части показателя преломления наночастиц, которые необходимо либо брать из литературных данных, либо оценивать по результатам специальных измерений. При этом сечение экстинкции Q_{ext} вычисляется при помощи теории Ми для сферических частиц, в случае несферических частиц возможно использовать метод Т-матриц. При этом для определения размерных параметров несферических наночастиц самым логичным является использование метода мультипорязационнго ДРС, что позволит продолжать проводить измерения на одном лишь ДРС анализаторе, не используя других приборов. Данный метод может широко применяться при любых работах с различными нанообъектами, однако особую актуальность он представляет при контроле синтезеа наночастиц, так как позволяет оперативно оценивать счетную концентрацию одновременно с размером, а эти два параметра являются одними из важнейших для понимания эффективности синтеза.

Глава 3. Разработка и реализация подходов, основанных на совместном использовании спектров абсорбции, флуоресценции и статического рассеяния

3.1 Концепция спектрального портрета и ее приложение к исследованию винодельческой продукции

В данной главе излагается и обосновывается концепция спектрального портрета и рассматривается ее применение на примере исследования винодельческой продукции. Основные результаты, полученные в данной главе, изложены в работах [6, 10, 17, 22]. При этом упор делается на совместное использование нескольких типов оптических спектров, создание своеобразного спектрального портрета исследуемого образца. В данном случае спектральный портрет – это набор определенных оптических спектров, характеризующих образец по набору характерных для него признаков.

С учетом результатов обобщения мирового опыта по классификации и идентификации вин, изложенных в главе 1, была выработана программа апробации концепции спектрального портрета на примере винодельческой продукции. Эта программа предусматривала измерение спектров абсорбции (оптической плотности), флуоресценции И рассеяния. Построение спектрального портрета заключается в выборе типов измеряемых спектров, а также подборе тех фрагментов спектров, которые в совокупности позволяют однозначно идентифицировать данный образец в составе определенной выборки. Выбранные фрагменты обладают, как правило, разной степенью информативности, поэтому необходимо их ранжировать. Спектр можно считать тем более информативным, чем более значимы различия между различными образцами выборки. Хотя спектры рассеяния ранее не использовались при анализе винодельческой продукции, опыт исследования сложных коллоидных систем, включая биологические жидкости и некоторые лекарственные препараты, позволил предположить, что эти спектры могут содержать ценную информацию и при анализе вин.

При этом, в спектральный портрет включены спектры синхронного сканирования, но не включены спектры 3D-флуоресценции. Это обусловлено тем, что несмотря на крайнюю информативность трехмерных спектров, их использование несовместимо с эксперсс-анализом, так как их запись продолжительное время (вплоть занимает до нескольких часов. В зависимости от спектрального диапазона записи, шага и особенностей монохроматоров). В свою очередь, спектры механики синхронного сканирования, при правильно подобранном спектральном интервале записи и разности между монохроматорами, позволяют успешно заменить трехмерные спектры флуоресценции в спектральном портрете.

Для измерения спектров использовался спектрофотометр – флуориметр СФФ-2 «Флуоран», разработанный ФГУП «ВНИИОФИ» (№ Госреестра 51314-12). Отличительной особенностью прибора ЭТОГО является возможность измерять все указанные выше виды спектров С метрологическими характеристиками не уступающими специализированным приборам. Общий вид прибора и его метрологические характеристики приведены в главе 2.

3.2 Измеряемые спектры и особенности измерений

Спектры абсорбции измерялись в диапазоне от 190 до 500 нм при спектральной ширине щели 2 нм, спектры рассеяния в диапазоне от 200 до 700 нм при спектральной ширине щели 5 нм.

Для флуоресценции режима предварительно был произведен экспериментальный подбор таких видов спектров И спектральных интервалов, которые лучше всего соответствуют сформулированным выше критериям. В частности, для выбора оптимальной разности длин волн возбуждения и эмиссии $\Delta\lambda$ в спектрах синхронного сканирования такие спектры были измерены при значениях $\Delta \lambda = 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70$ и 80 нм.

В результате было установлено, что наиболее узкие и интенсивные пики получаются при $\Delta \lambda = 50$ нм.

Таким образом, были отобраны следующие виды спектров флуоресценции:

- Спектры возбуждения в диапазоне от 200 до 380 нм при длине волны эмиссии 389 нм.
- Спектры эмиссии в спектральном интервале от 300 до 500 нм при возбуждении на длинах волн, соответствующих максимумам, (одному или двум), зарегистрированным на спектрах возбуждения.
- Спектры синхронного сканирования при $\Delta \lambda = 50$ нм.

При измерении спектров абсорбции образцы вина, помимо разбавления в 10 раз, разбавлялись дистиллированной водой в соотношении 1:50 для того, чтобы избежать необходимости измерения значений оптической плотности, превышающих 2,0 единицы оптической плотности (е.о.п.). При измерении спектров флуоресценции и рассеяния разбавление дистиллированной водой в соотношении 1:10 производилось для минимизации эффекта внутреннего фильтра.

Была также проанализирована целесообразность использования спектров рассеяния для идентификации вин. При этом было обнаружено, что для ряда образцов белых вин эти спектры могут существенно изменяться даже в течение нескольких дней. Это иллюстрируется графиками, приведенными на рисунке 3.1, которые также демонстрируют высокую стабильность спектров синхронного сканирования.





Рисунок 3.1 Спектры рассеяния (а) и синхронного сканирования флуоресценции (б) образца № 14 (вино столовое полусладкое белое), зарегистрированные с интервалом в 5 дней.

3.2.1 Объекты и результаты исследования

В качестве объектов исследования были выбраны образцы сухих и полусладких белых вин. Информация об исследованных образцах приведена в таблицах 1 и 2 в Приложении А. Там же приведены данные о длинах волн и интенсивностях, соответствующих наиболее информативным пикам в спектрах синхронного сканирования, возбуждения и эмиссии. Спектры
абсорбции для белых вин оказались менее информативными, поэтому данные по ним в таблицах не приводятся.

Полученные результаты показали, что наиболее подходящими для классификации и идентификации белых вин, как сухих, так и полусладких, оказались спектры флуоресценции – синхронного сканирования и эмиссии. Именно эти спектры, сохраняя стабильность со временем для одного образца, больше всего различаются между собой для вин одной категории (т.е. белых сухих или полусладких), произведенных даже на одном предприятии, но разных сортов. Это иллюстрируется как данными таблиц 1 и 2 в Приложении А, так и приводимыми ниже графиками.

3.2.2 Разные сорта одного производителя

На рисунке 3.2 приведены спектры синхронного сканирования и эмиссии двух сортов столовых белых сухих виноматериалов (Мускат и Цитроний) и одного образца столового сухого белого вина (Шардоне Тамани), произведенных ООО «АПК Мильстрим – Черноморские вина». Видно существенное различие между этими спектрами, особенно это касается спектров эмиссии.



a)



Рисунок 3.2 - Спектры флуоресценции трех сортов белых сухих вин, произведенных ООО «АПК Мильстрим – Черноморские вина»: а) спектры синхронного сканирования б) спектры эмиссии

На рисунке 3.3 показаны спектры белого столового полусладкого виноматериала и белого столового полусладкого вина «Изумрудная лоза» (из бумажного пакета) того же производителя. Между этими спектрами также видны существенные различия.





Рисунок 3.3 - Спектры флуоресценции и синхронного сканирования двух сортов белых сухих вин, произведенных ООО «АПК Мильстрим – Черноморские вина»: а) спектры синхронного сканирования б) спектры

эмиссии

Еще большие различия видны между аналогичными спектрами двух винных напитков, произведенных ООО «Кубань-вино», показанных на рисунке 3.4. Там приведены спектры «Мадеры кубанской выдержанной. Шато Тамань резерв» и «Траминера десертного. Шато Тамань». Скорее всего, такие различия спектров обусловлены разным содержанием сахара в этих напитках (41,5 г/дм³ и 160,7 г/дм³ соответственно).





Рисунок 3.4 - Спектры флуоресценции двух сортов белых вин,

произведенных ООО «Кубань- вино»: а) спектры синхронного сканирования б) спектры эмиссии

Однако возможны случаи, когда различия в спектрах флуоресценции разных сортов вин одного производителя не очень значительны, хотя и ясно различимы на уровне шумов. Это иллюстрируется приведенными на рисунке 3.5 спектрами белых полусладких вин, изготовленных ООО «Кубанская винная компания» - «Мускат PLAISANCE» и «Райская лагуна». Видно, что розлив обоих вин произведен в 2013 г., содержания сахара и алкоголя у них очень близки.





Рисунок 3.5 - Спектры флуоресценции двух сортов белых полусладких вин, произведенных ООО «Кубанская винная компания»: а) спектры синхронного сканирования б) спектры эмиссии

3.2.3 Различия по годам (урожаям)

На рисунке 3.6 представлены спектры синхронного сканирования и эмиссии трех виноматериалов, произведенных Южной винной компанией (филиал ЗАО МПБК «Очаково). Обращает на себя внимание различие между спектрами образцов № 80 и 81, которым соответствует одни и тот же сорт виноматериала (столовый сухой белый «Траминер»), но разных урожаев – соответственно 2012 и 2013 годов. Для того, чтобы выяснить стабильность этих различий, спектры образцов № 80 и 81 были проанализированы повторно с интервалом в 8 дней. Новые графики приведены на рисунке 3.7, видно, что отличия обоих спектров сохранились.



Рисунок 3.6 - Спектры флуоресценции трех сортов белых сухих виноматериалов, произведенных Южной винной компанией (филиал ЗАО МПБК «Очаково» :а) спектры синхронного сканирования б) спектры эмиссии





б)

Рисунок 3.7 - Результаты повторного измерения (через 8 дней) спектров синхронного сканирования (а) и эмиссии (б) образцов сухого белого материала «Траминенр» урожаев 2012 и 2013 г.г. Различия между спектрами, имевшие место при первом измерении (Рисунок 3.6) сохранились.

3.3 Спектральный портрет винодельческой продукции

На основании изложенных выше критериев по полученному набору спектральных данных были выбраны наиболее информативные типы спектров, спектральные диапазоны и кратность разбавления исходных образцов, оптимальная для получения качественных спектров каждого из типов.

Фрагменты спектров, включаемых в состав спектрального портрета, ранжируются в порядке убывания информативности. Эти данные приводятся в таблице 3.1. Таблица 3.1 Фрагменты спектров, составляющих спектральный портрет образца винодельческой продукции.

N⁰	Вид спектра	Кратность разбавления	Спектральный диапазон, нм
1	Спектр эмиссии, возбуждение 272 нм	10 для белых	300-500 для белых
2	Спектр синхронного сканирования, Δλ=50 нм	10	235-500 для белых
3	Спектр рассеяния	10	200-800 для белых
4	Спектр абсорбции	10 и 50 для белых	230-500 для белых
5	Спектр эмиссии, возбуждение 229 нм	10	250-500

На рисунке 3.8 приведены спектры синхронного сканирования белых вин Шардоне (оригинальных и фальсификатов), разбавленных в 10 раз. Из рисунка видно, что подлинные вина имеют ярко выраженный пик при длине волны 281 нм, в то время как у фальсификатов он смещен примерно на 10 нм вправо и имеет значительно меньшую интенсивность. В то же время как в подлинных виноматериалах (винах), так и в фальсификатах зафиксирован второй максимум при длине волны, примерно 350 нм. Показатели интенсивности в максимумах и их соотношение могут быть использованы для составления «портретов» вин и их идентификации.



Рисунок 3.8 - Спектры синхронного сканирования

На рисунке 3.9 приведены спектры эмиссии белых вин Шардоне (оригинальных и фальсификатов), разбавленных в 10 раз, в интервале от 300 500 нм при возбуждении на 272 нм. Спектры, записанные с ЛО использованием данных параметров, очень сильно различаются между собой интенсивности В пике. При ЭТОМ вина-фальсификаты по имеют интенсивность, которая примерно на два порядка ниже, чем средняя интенсивность оригинальных вин. Положение пика так же зависит от сорта винограда, из которого произведено вино, что в паре со значением интенсивности спектра может войти в спектральный «портрет» вина.



Рисунок 3.9 - Спектры эмиссии при возбуждении на 272 нм

На рисунке 3.10 приведены спектры рассеяния белых вин Шардоне (оригинальных и фальсификатов), разбавленных в 10 раз. Из рисунка видно, что натуральные вина и виноматериалы имеют ярко выраженный коротковолновый пик на 285 нм, в то время как у фальсификатов он отсутствует. Второй максимум на 375 нм присутствует как в подлинных винах, так и в фальсификатах. Интенсивности в максимумах и их соотношение могут быть использованы для составления «портретов» виноматериалов и вин с целью их идентификации.



Рисунок 3.10 - Спектры рассеяния

На рисунке 3.11 представлены спектры абсорбции белых сухих вин Шардоне (оригинальных и фальсификатов), разбавленных в 10 раз, а для фальсификатов - в 10 и 50 раз. Спектры абсорбции в данном интервале длин волн позволили обнаружить характерную для всех исследованных фальсификатов особенность. А именно: при стандартном разбавлении в 10 раз, фальсификаты имели большую, чем у подлинных вин, оптическую плотность в диапазоне от 230 до 300 нм. На начальном участке спектра видно, что его форма отличается от спектров оригинальных вин. При разбавлении фальсификатов в 50 раз разница в форме спектров подлинных вин и фальсификатов становится очевидна. Таким образом, важными параметрами являются как форма спектра, так и его значение в максимуме.

Разница в форме спектров абсорбции подлинных вин в паре с интенсивностью в диапазоне 230-350 нм дает возможность отличать одно подлинное вино от другого.

83



Рисунок 3.11 - Спектры абсорбции

На рисунке 3.12 приведены эмиссии сканирования белых вин Шардоне (оригинальных и фальсификатов), разбавленных в 10 раз, в интервале от 250 до 500 нм при возбуждении на 229 нм. Из рисунка видно, что, хотя четкого пика не наблюдается ни у фальсификатов, ни у подлинных вин, интенсивность флуоресценции подлинных вин превосходит интенсивность флуоресценции фальсификатов в несколько раз. Таким образом, данный тип спектров позволяет уверенно различать подлинные вина (виноматериалы) и фальсификаты.



Рисунок 3.12 - Спектры эмиссии при возбуждении на 229 нм

Таким образом, оптические спектры изученных белых виноматериалов и вина позволяют уверенно отличать оригинальные виноматериалы и вино от фальсифицированных и различать различные сорта вина между собой. Наиболее информативными оказались спектры эмиссии (Возбуждение на 272 нм) и синхронного сканирования ($\Delta\lambda = 50$ нм). Для эмиссии показательна интенсивность в максимуме и положение пика. Причем интенсивность фальсификатов на порядок меньше. Для идентификации по спектрам синхронного сканирования удобно использовать либо интенсивность коротковолнового пика, либо отношение двух пиков.

Чуть менее полезны спектры рассеяния и эмиссии при возбуждении на 229 нм. В случае рассеяния полезно соотношение двух пиков рассеяния и сама форма спектра. Причем у фальсификатов коротковолновый пик (на 285 нм) отсутствует в принципе, а форма спектра совершенно иная, отличная от оригинальных вин. Для спектров эмиссии полезна как форма спектров, так и интенсивность в максимуме.

Отдельно стоит сказать о спектрах абсорции белых виноматериалов и вина. Оптическая плотность всех белых фальсификатов, независимо от того, полусладкие они или сухие, оказалась значительно большей, чем у оригинальных образцов, что потребовало дополнительного разбавления в 50 раз. При этом после дополнительного разбавления выяснилось, что форма спектра радикально отличается от спектров оригинальных образцов. Большое значение оптической плотности при разбавлении в 10 раз можно считать причиной большинства отличий между оригинальными виноматериалами и вином и фальсификатами. Она сама по себе может служить различающим критерием. При этом, оригинальные образцы четко разбились на две группы по сортам (Алиготе – Рислинг и Шардоне), форма спектров у них похожа, но ее назвать одинаковой.

Возможны два подхода к использованию спектральных портретов для классификации исследованных образцов. Первый способ заключается в визуальном сравнении характерных фрагментов спектров.

Ha приведённых хорошо спектрах видны различия между оригинальными образцами и фальсификатами, так, например, хорошо видно полное отсутствие флуоресценции данных образцов при возбуждении на 272 очень слабый сигнал на спектрах синхронного сканирования и HM, отсутствие коротковолнового пика на спектрах рассеяния. Это показывает эксперессность И эффективность предлагаемого подхода для задачи определения качества продукции. Однако для нахождения различий между оригинальными образцами необходима дополнительная обработка данных.

Второй подход предполагает отображение образцов в виде точек в многомерной системе координат. В этом случае от каждого из фрагментов спектров, входящих в состав спектрального портрета, используется один характерный параметр (чаще всего, амплитуда пика), значение которого откладывается по соответствующей оси. Если отбирать параметры из наиболее информативных спектров (первые строчки таблицы 3.1) может оказаться достаточным число осей системы координат, меньшее, чем число фрагментов спектрального портрета. Такой В составе подход проиллюстрирован примере 7 оригинальных образцов на вин И виноматериалов, для которых ранее были измерены спектры флуоресценции и синхронного сканирования в диапазонах, установленных методикой проведения измерений.

Этим образцам были присвоены шифры, после чего зашифрованные образцы были переданы аналитику, который провел для них измерения спектров синхронного сканирования и эмиссии. Для уточнения длин волн, на которых следует производить возбуждение, предварительно регистрировался возбуждения, выбиралась спектр И длина волны, соответствующая длинноволновому пику в спектре возбуждения. Перед измерением спектра эмиссии производилось измерение спектра возбуждения. По этим спектрам образца каждого зашифрованного были определены для значения контролируемых параметров - интенсивностей коротковолнового пика в спектре синхронного сканирования Ісинх. и длинноволнового пика в спектре

86

эмиссии I_{эм.} В качестве исходных данных для идентификации были использованы значения этих же параметров, определенные по ранее измеренным спектрам для всех образцов, отобранных для эксперимента.

Затем все данные наносились на график, в координатах I_{синх} - I_{эм} (см. рисунок 3.13). На этом графике каждой паре значений интенсивностей пиков соответствует точка. Для идентификации для каждой точки, соответствующей зашифрованному образцу, выбиралась ближайшая к ней точка, нанесенная по исходным данным. Результаты идентификации и их сопоставление с исходными данными приведены в таблице 3.2. Видно, что для всех семи образцов идентификация оказалась правильной. Однако, как можно видеть из рисунка, достоверность идентификации у разных образцов не является одинаковой. Например, для образца 14 она ниже, чем для остальных образцов.



a)



б)

Рисунок 3.13 - К идентификации зашифрованных образцов белых сухих вин. На график нанесены интенсивности пиков синхронного сканирования и эмиссии по исходным данным и результатов измерений на зашифрованных образцах: а) для всех образцов б) для группы образцов, со значениями интенсивности в пиках, не превышающими 1,1 отн.ед.

Таблица 3.2 Результаты идентификации зашифрованных образцов белых сухих вин.

Номер шифра	Номер образца	Результат идентификации	Вывод
1	15	15	Соответствует
2	14	14	Соответствует
3	10	10	Соответствует
4	91	91	Соответствует
5	29	29	Соответствует
6	94	94	Соответствует
7	38	38	Соответствует

3.4 Применение анализа главных компонент для классификации спектров

белых полусухих вин

В разделе 3.3 идентификация образцов производилась только по двум параметрам - интенсивностям пиков синхронного сканирования и эмиссии. При этом, как следует из изложенного выше, для каждого образца требовалось измерение трех спектров – синхронного сканирования, возбуждения и эмиссии. Альтернативный подход к задачам классификации и идентификации вин заключается, как было отмечено в литературном обзоре главы 1, в использовании методов хемометрики, в частности, анализа главных компонент. В этом случае вместо интенсивности одного пика используется целый спектр или его фрагмент, и для решения задач классификации и идентификации вин во многих случаях оказывается достаточным всего одного спектра.

В рамках данного исследования было апробировано использование анализа главных компонент (principle components analysis-PCA) для классификации белых вин. Классификация производилась раздельно для групп образцов белого сухого (13 образцов) и белого полусладкого вина (10 образцов). Опробовалось применение PCA ко всем видам спектров, которые были измерены, т.е. к спектрам абсорбции, возбуждения и эмиссии флуоресценции и синхронного сканирования. Наиболее информативными оказались спектры синхронного сканирования и эмиссии. На рисунках 3.14-16 приведены результаты их представления на плоскостях главных компонент для полусухих вин. Для применения метода PCA использовался программный пакет PLS Toolbox (см. главу 1).



Рисунок 3.14 - Представление спектров сихронного сканирования полусладких вин и виноматериалов в координатах главных компонент PC1 b

PC2



Рисунок 3.15 - Представление спектров эмиссии полусладких вин и виноматериалов в координатах главных компонент PC1 b PC2



Рисунок 3.16 - Представление спектров эмиссии полусладких вин и виноматериалов в координатах главных компонент PC1 b PC3

Из этих результатов видно, в частности, что положение образца №94 резко отличается от положения остальных образцов полусладких вин, как по спектрам синхронного сканирования, так и по спектрами эмиссии. Это может быть обусловлено либо отличием географического происхождениия данного вина, либо особенностями технологии его производства («Молоко любимой женщины», Карл Дирих, Германия, все отальные вина из Крыма или Кубани). На некоторых проекциях выделяются точки, соответствующие образцам № 29 и 38. На некоторых проекциях выделяются точки, соответствующие образцам № 29 и 38.

3.5 Использование полученых результатов для идентефикации вин по спектральному портрету

Используя спектральный портрет, состоящий из нескольких спектров, возможно выявление винодельческой продукции подлинность, которой вызывает сомнения. Такое выявление может быть осуществлено обработкой спектров анализируемых образцов одним из трех методов:

визуальное сравнение между собой измеренных спектров проб с образцами спектров образцов-аналогов;

сравнение по признакам, характерным для данного вида спектров. Для такого сравнения может быть использовано отображение образцов в идее точек в многомерной системе координат;

применение метода главных компонент (PCA) при сравнении спектров проб с образцами спектров образцов-аналогов или со спектрами спектральных портретов вин и виноматериалов.

Так, в методических рекомендациях, которые были разработаны с учетом результатов, описанных выше, был разработан спектральный портрет, включающий в себя семь оптических спектров различной физической природы.

Информативность каждого типа спектров, получаемого в ходе проведения измерений проб винодельческой продукции, приведена ниже в порядке убывания информативной значимости вида спектра:

спектр эмиссии, измеренный для разбавленной в 10 пробы анализируемого образца, при длине волны возбуждения 272 нм;

спектр синхронного сканирования, измеренный для разбавленной в 10 раз пробы анализируемого образца;

спектр рассеяния, измеренный для разбавленной в 10 раз пробы анализируемого образца;

спектр абсорбции, измеренный для разбавленной в 10 или 50 раз пробы анализируемого образца, в диапазоне длин волн возбуждения от 230 до 500 нм;

спектр эмиссии, измеренный для разбавленной в 10 раз пробы анализируемого образца, длина волны возбуждения 229 нм.

Наглядный пример, по которому можно провести визуальное сравнение, приведен на рисунке 3.9 для спектров эмиссии образцов белых вин, а также фальсификатов, измеренных на длине волны возбуждения 272 нм. Из рисунка 3.9 видно, что интенсивность флуоресценции подлинных образцов проб винодельческой продукции значительно отличается от интенсивности флуоресценции образцов фальсификатов, для которых флуоресценция практически отсутствует.

Кроме того, была разработана «Методика измерений спектров абсорбции, флуоресценции и рассеяния света в образцах винодельческой продукции» ФР.1.37.2014.18875.

Выводы к главе 3

Приведенные в главе 3 результаты показывают эффективность применения концепции спектрального портрета и рассматривается ее применение примере исследования винодельческой на продукции, демонстрируют возможности методов оптической спектроскопии ПО классификации и идентификации вин и виноматериалов. Для белых сухих и полусладких вин, исследованных в рамках данной работы, наиболее подходящими для этих целей оказались спектры синхронного сканирования и эмиссии флуоресценции. Они позволили устанавливать воспроизводимые различия между разными сортами вин одной категории, даже выпущенными на одном предприятии, и между винами одного сорта, но изготовленными из винограда разного урожая. Используя эти спектры, оказалось возможным провести правильную идентификацию семи зашифрованных образцов сухих полусладких вин.

Использование спектров синхронного сканирования в спектральном портрете позволяет избежать записи трехмерных спектров флуоресценции, что повышает экспрессность анализа, без ущерба для результата измерений.

На основании полученных результатов можно оценить возможности методов оптической спектроскопии для выявления фальсификатов и подделок и установления географического происхождения винодельческой продукции. Для решения этих задач необходимо наличие нескольких заведомо подлинных контрольных образцов с надежно установленным географическим происхождением. Образцы должны храниться в надлежащих условиях, обеспечивающих сохранение их свойств. В этом случае путем

сопоставления заранее измеренных оптических спектров контрольных образцов со спектрами проверяемого образца можно будет сделать вывод о подлинности и географическом происхождении последнего. При этом виды и диапазоны длин волн оптических спектров, оптимальных для этих целей могут различаться для разных категорий винодельческой продукции (например, для белых и красных вин, сухих и полусладких) вин и виноматериалов.

Четко видно, что наилучших результатов можно достигнуть совместно используя несколько оптических спектров различной физической природы. Максимальных результатов можно достичь, обрабатывая их, например, методами хемометрики, однако наглядный результат можно получить используя лишь данные о позициях и значениях максимумов на различных оптических спектров.

Таким образом, становится возможным создавать спектральные портреты отдельных образцов винодельческой продукции, подобные тем, которые описываются в Методических рекомендациях, разработанных на основе результатов данной работы.

Глава 4. Исследование флуоресцентных свойств оптических материалов и разработка мер флуоресценции

Данная глава посвящена флуоресцентным измерениям. Основные результаты, полученные в данной главе, изложены в работах [1, 9, 10, 96]. Спектры флуоресценции, измеренные на двух разных приборах, могут весьма существенно различаться между собой как по форме, так и по интенсивности, что видно на рисунке 4.1. Причиной этого являются приборные параметры, которые влияют на спектр образца, что естественно, является нежелательным эффектом. Спектры, форма которых зависит от параметров прибора называются аппаратно-зависимыми, а те спектры форма которых не зависит от параметров прибора – аппаратно-независимыми.







Для выходного сигнала *I*, регистрируемого спектрофлуориметром, справедливо соотношение (4.1) [98].

$$I(\lambda_{ex.},\lambda_{em}) = f(\lambda_{ex.}) * F_{\lambda}(\lambda_{ex.},\lambda_{em}) * \Phi_{e\lambda}(\lambda_{ex.}) * s(\lambda_{em.}) * \frac{G_0 O_0}{n(\lambda_{_{\mathcal{M}.}})^2} * \Delta \lambda_{ex.} * \Delta \lambda_{em.}$$
(4.1)

Здесь $\lambda_{ex.}$ – длина волны возбуждения, λ_{em} длина волны эмиссии.

Параметры, входящие в формулу (4.1), определяются либо свойствами образца, либо характеристиками прибора.

Параметры, определяемые свойствами образца

- коэффициент поглощения $f(\lambda_{ex}) = 1 10^{-A(\lambda_{ex})}$ ($A(\lambda_{ex})$ оптическая плотность)
- спектральная плотность энергетического выхода флуоресценции $F_{\lambda}(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$
- показатель преломления $n(\lambda_{em})$

Параметры, определяемые характеристиками прибора

Φ_{eλ}(λ_{ex})- спектральная плотность потока излучения перед образцом; она зависит от спектральной характеристики источника излучения, аппаратной функции монохроматора канала возбуждения, коэффициентов отражения или пропускания оптических элементов (зеркал и линз), через которые проходит возбуждающее излучение перед попаданием на образец;

s(λ_{em})- спектральная чувствительность эмиссионного канала, определяется коэффициентами отражения и пропускания оптических элементов, через которые проходит излучение флуоресценции, аппаратной функцией монохроматора этого канала, спектральной чувствительностью фотоприемника (ФЭУ);

• *о*₀ –телесный угол, в который осуществляется сбор излучения флуоресценции в отсутствии преломления света в образце;

• *G*₀ – приборный фактор, зависящий от оптической и электронной систем прибора;

• Δλ_{ex} - спектральная ширина щели монохроматора канала возбуждения;

• *Δλ_{em}* - спектральная ширина щели монохроматора эмиссионного канала.

Приборный фактор *G_o* и телесный угол *o₀* не зависят от длины волны, все остальные параметры, определяемые характеристиками прибора, являются функциями длины волны.

Формула (4.1) не учитывает эффект внутреннего фильтра, т.е. поглощение излучения флуоресценции при прохождении света в кювете. Этим эффектом можно пренебречь, если оптическая плотность образца на длине волны эмиссии A(λ_{em})<0,05.

Для определения $\Phi_{e\lambda}(\lambda_{ex})$, $S(\lambda_{em.})$ и G_0 необходимы специальные процедуры калибровки каналов возбуждения и эмиссии спектрофлуориметра.

определяемых характеристиками Влияние параметров, прибора, приводит к аппаратной зависимости спектров, а это, в свою очередь, затрудняет проведение качественного анализа, так как форма спектров, одного и того же образца в одних и тех же условиях может меняться между приборами различных моделей И производителей. Становится затруднительным сравнение с литературными данными или, например, измерение квантового выхода флуоресценции относительными методами, необходимо провести интегрирование полученного когда спектра, И численное значение интеграла будет зависеть от его формы, то есть значение квантового выхода флуоресценции, посчитанного относительным методом, начинает зависеть от приборных параметров. Особенно сильно данные проблемы мешают проведению сличения образцов по принципу «отпечатков пальцев», когда малейшие различия в спектральном портрете могут серьезно увеличить вероятность ошибочного отнесения образца к неправильному классу.

Наряду с этой проблемой существует проблема систематического контроля чувствительности спектрофлуориметров, которая может изменяться в результате незначительных изменений параметров некоторых элементов прибора. Такие изменения иллюстрируются спектрами комбинационного рассеяния (КР) воды приведенными на рисунке 4.2, измеренными на СФФ-2 «Флуоран» (см. главу 2). Спектры КР воды используются в качестве внутреннего стандарта для контроля чувствительности флуориметров [99]. Эти изменения могут привести к «плаванию» регистрируемых значений интенсивности, что уменьшает точность количественного анализа флуоресцентным методом.





При изменении интенсивности затрудняется построение градуировочных графиков при количественном анализе, так как если в первый сеанс измерений определенной концентрации соответствовала одна интенсивность флуоресценции, то после ухода параметров прибора, эта интенсивность может измениться.

Еще одной проблемой является то, что спектрофлуориметры показывают результат в импульсах в секунду (или в неких относительных единицах, когда результат в измерительном канале нормируется на опорный), и у каждого прибора значения по шкале интенсивности может отличаться, так как оно будет зависеть от чувствительности приемника и оптической системы. Как правило, в таких случаях калибровку осуществляют в О.Е.Ф (относительные единицы флуоресценции).

О.Е.Ф. обычно используются для сравнения значений интенсивности флуоресценции, полученных на разных приборах, особенно в медицинских и биологических измерениях, таких как анализ ДНК. 1 О.Е.Ф. эквивалентна флуоресценции водного раствора флуоресцеина натрия концентрацией 1 мг/дм³, измеренного на том же приборе, при определенных значениях длин волн возбуждения и эмиссии. Спектральный диапазон эмиссии О.Е.Ф. 470-669 нм.

Таким образом, необходимо обеспечить возможность измерения спектров флуоресценции, аппаратно-независимых по форме и по интенсивности. В качестве средства измерений, позволяющего достигнуть этого результата, предлагается использовать меры флуоресценции.

4.1 Выбор материала мер флуоресценции

В данном разделе описывается обеспечение возможности измерения спектров флуоресценции, аппаратно-независимых по форме и по интенсивности.

С учетом результатов обобщения мирового опыта создания стандартных образцов (reference materials), изложенного в главе 1, был сделан вывод о целесообразности разработки стандартных образцов или мер флуоресценции на основе неорганических стекол. При этом целесообразно изготовление двух вариантов мер – на коротковолновый диапазон (350 – 550 нм), и на длинноволновый (500 – 800 нм). Для изготовления образца на длинноволновый диапазон может быть использовано боратное стекло (основная матрица B_2O_3 , добавки CaO и Al_2O_3) активированное ионами марганца. Для образца на коротковолновый диапазон целесообразно использование фосфатного стекла (основная матрица P₂O₅, добавки те же, что в случае боратного стекла), активированного ионами меди. Был

размещен заказ на изготовление таких стекол в НИТИ оптического материаловедения, входящем в Научный центр ГОИ (Санкт-Петербург).

Стекло выплавлялось в восстановительной атмосфере, которая реализуется вдуванием в тигель газовой смеси, состоящей из 95% N₂ и 5 % H_2 . Восстановительная атмосфера необходима для предотвращения образования центров окраски Cu²⁺, которые могли бы образовываться, если бы медная добавка вводилась в присутствии кислорода. Эти центры придают стеклу синий цвет. При выплавке в восстановительной атмосфере образуется бесцветное стекло, имеющее сильную флуоресценцию в синей области за счет ионов Cu⁺. В ходе отработки технологии изготовления стекла с целью повышения оптической однородности подобраны оптимальные концентрации P_2O_5 , CaO, и Cu₂O.

Из указанных стекол были изготовлены имитаторы кювет размером 12,5 мм*12,5мм*45 мм. Кроме того, был изготовлен «холостой» образец, содержащий все составляющие матрицы фосфатного стекла, но не содержащий добавки Cu₂O.

4.2 Исследование параметров флуоресценции предполагаемых материалов мер флуоресценции, их стабильности и воспроизводимости

Исследование флуоресцентных свойств образцов стекол проводилось на разработанном во ФГУП «ВНИИОФИ» спектрофотометре-флуориметре СФФ-2 «Флуоран».

Для образца боратного стекла, активированного марганцем, были исследованы спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции, результаты были сопоставлены с приведенными в работе [100] данными для стандартных образцов NIST из стекла аналогичного состава.

Для исследованного образца флуоресценция была обнаружена при возбуждении в коротковолновой области (287-310 нм). Соответствующие спектры эмиссии приведены на рисунке 4.3. Однако интенсивность этой флуоресценция относительно слаба, что подтверждается сравнением спектров эмиссии образцов боратного стекла, активированного марганцем и фосфатного стекла, активированного медью, согласно рисунку 4.4.



Рисунок 4.3 - Спектры флуоресценции боратного стекла, активированного марганцем, при длинах волн возбуждения 287 нм, 297 нм и 310 нм.



Рисунок 4.4 - Сопоставление спектров эмиссии боратного стекла, активированного марганцем (синий), и фосфатного стекла, активированного медью (красный) при длине волны возбуждения 287 нм

Таким образом, для создания мер флуоресценции в диапазоне 500-800 нм, как это предполагалось по результатам анализа литературных данных, боратное стекло с ионами марганца использовано быть не может.

Дополнительно была исследована возможность использовать серийно выпускаемые неорганические стекла как материал для меры флуоресценции. Это было сделано для того, чтобы упростить процедуру изготовления меры и уйти от уникальной рецептуры, с воспроизведением которой могут возникать сложности. Среди серийно выпускающихся стекол было выбрано цветное оптическое стекло марки C3C-17, которое относится к группе сине-зеленых стекол. Стекло марки C3C-17 – несиликатное стекло, окрашенное молекулярно-растворенными красителями, которое обычно используется в качестве светофильтра дневного света (в комбинации с ПС5 и ПС 14).

Согласно рисунку 4.5 можно видеть некоторые оптические спектры оптического стекла СЗС-17.



Рисунок 4.5 - Спектры пропускания некоторых сине-зеленых оптических стекол (из ГОСТ 9411-91 [101])

Флуоресцентные свойства такого стекла обычно не являются целью при производстве и ранее не исследовались. В ходе исследований, проведенных автором, была обнаружена сильная флуоресценция в интересующем диапазоне, которую хорошо видно на рисунке 4.6, что сделало это стекло перспективным для изучения в качестве материала меры, особенно учитывая его распространенность, дешевизну и устоявшуюся за годы промышленного производства рецептуру.



Рисунок 4.6 - Спектр флуоресценции образца стекла СЗС-17 при возбуждении 240 нм

- 4.3 Экспериментальные исследования оптических свойств неорганических стекол, выбранных для изготовления мер флуоресценции
 - 4.3.1 Оптические свойства неорганических стекол и их влияние на метрологические характеристики мер флуоресценции

Для нескольких образцов фосфатного стекла, активированного ионами одновалентной меди и стекла C3C-17 были исследованы – спектры абсорбции, возбуждения и эмиссии флуоресценции, зависимость спектров эмиссии от длины волны возбуждения и температуры, однородность и

стабильность флуоресцентных свойств образцов. Отдельно исследовалась эффекты внутреннего фильтра для возбуждающего излучения и излучения флуоресценции. Согласно рисунку 4.7 можно видеть спектры абсорбции фосфатных стекол.





Разрабатываемые меры флуоресценции должны воспроизводить спектры эмиссии, точнее – отношение интенсивности эмиссии $I(\lambda)$ при заданной длине волны λ к интенсивности в максимуме $I(\lambda_{\text{макс.}})$. Рассмотрим основные составляющие неопределенности при воспроизведении этого параметра:

а). Зависимость формы спектра от длины волны возбуждения

Как указывалось выше спектры флуоресценции ионов металлов в стеклах зависят от длины волны возбуждения. Рассмотрим влияние этой зависимости на погрешность воспроизведения спектра эмиссии. Пусть монохроматор канала возбуждения спектрофлуориметра, на котором производится аттестация меры, имеет погрешность установки длины волны Δλ_{возб.}. Это приведет к погрешности воспроизведения спектра эмиссии, которая выражается формулой (4.2)

$$\Delta I_{1.} = \frac{dI_{_{\mathfrak{I}M.}}}{d\lambda} * \Delta \lambda_{_{\mathfrak{I}M.}}$$
(4.2)

Здесь $\Delta\lambda_{_{3M}}$ - смещение спектра эмиссии по шкале длин волн из-за смещения длины волны возбуждения. Для экспериментального выяснения этого смещения, были проанализированы спектры двух образцов фосфатного стекла, активированного медью (образцы А и В). Спектры эмиссии регистрировались при длинах волн возбуждения: 280, 295, 310, 325, 340, 355 нм. Нормированные на единицу спектры эмиссии представлены на рисунке 4.8. По этим данным были построены графики зависимости максимумов эмиссии от длины волны возбуждения, приведенные на рисунке 4.9, на том же рисунке приведены полиномы третьей степени, аппроксимирующие эти зависимости и достоверность аппроксимации \mathbb{R}^2 . Приведенные на рисунке

4.9 графики позволяют оценить максимальное значение производной $\frac{dI_{_{3M.}}}{d\lambda}$ Оно составляет ~ 8,5*10⁻³ нм⁻¹. Учитывая, что погрешность установки длины волны монохроматора канала возбуждения спектрофлуориметра СФФ-2 «Флуоран» составляет $\Delta\lambda_{возб.}$ =0,3 нм, с помощью формулы (4.2) и зависимостей, приведенных на рисунке 4.9, можно показать, что погрешность воспроизведения спектра эмиссии, обусловленная неточностью установки длины волны монохроматора возбуждения $\Delta I_1 \sim 0.7\%$.





б)

Рисунок 4.8 - Спектры эмиссии фосфатного стекла, активированного медью при различных длинах волн возбуждения, а)- для образца A, б) – для образца

B.



a)



б)

Рисунок 4.9 - Зависимость максимума эмиссии от длины волны возбуждения а)-образец А, б) – образец В.

Для сине-зеленого оптического стекла C3C-17 характерно практически полное отсутствие зависимости формы спектра от длины волны возбуждения эмиссии. На рисунке 4.10 приведены три спектра эмиссии образца на основе стекла C3C-17 в форме пластинки, каждый из которых был отнормирован на свой максимум. Флуоресценция при этом возбуждалась на длинах волн 237 нм, 239 и 241 нм. Полученные результаты показывают, что изменение длины волны возбуждения в пределах ±2 нм не приводит к сколько-нибудь заметным изменениям формы спектра. Эта особенность стекла C3C-17 полезна с точки зрения его использования в качестве материала мер флуоресценции, поскольку позволяет свести к минимуму неточность воспроизведения спектра эмиссии из-за ошибки в установке длины волны возбуждения.



Рисунок 4.10 - Отнормированные на максимум спектры эмиссии образца на основе стекла C3C-17

б) Зависимость спектров флуоресценции от температуры

Зависимость интенсивности флуоресценции от температуры для образцов фосфатного стекла, активированного медью исследовалась в
интервале 18-26 °С. Данные, полученные для одного из образцов, приведены согласно рисунку 4.11. Там же представлена линейная аппроксимация полученной зависимости, которой соответствует значение температурного коэффициента порядка -0,02 %/град, что совпадает со значением этого коэффициента, определенного для материала стандартного образца NIST 2943 (см.[83]).



Рисунок 4.11 - Зависимость от температуры интенсивности в максимуме флуоресценции фосфатного стекла, активированного медью, при возбуждении на длине волны 297 нм

Следует предусматривать возможность использования мер флуоресценции в спектрофлуориметрах без тремостатируемого кюветного отделения в диапазоне температур $25^{0}\pm5^{0}$. При этом аттестация мер должна производиться в термостатируемом отделении при температуре $25^{0}\pm0,5^{0}$. В этом случае вклад температурного фактора в неопределенность не будет превышать 0,1 %. в) Эффекты внутреннего фильтра. Различают первичный эффект внутреннего фильтра, заключающийся в поглощении внутри образца возбуждающего излучения и вторичный эффект, заключающийся в поглощении излучения флуоресценции. Совокупное влияние этих эффектов на интенсивность флуоресценции может быть описано формулой (4.3) (см.[102-103])

$$\frac{F_0}{F} = (\ln 10)^2 * \frac{A(\lambda_{003\tilde{0}.}) * (x_2 - x_1)}{10^{-A(\lambda_{003\tilde{0}.})x_1} - 10^{-A(\lambda_{003\tilde{0}.})x_2}} * \frac{A(\lambda_{3M.}) * (x_2 - x_1)}{10^{-A(\lambda_{3M.})x_1} - 10^{-A(\lambda_{3M.})x_2}}$$
(4.3)

Здесь F – измеренная интенсивность флуоресценции, F_0 – интенсивность флуоресценции в отсутствии эффекта внутреннего фильтра, $A(\lambda_{B036.})$ и $A(\lambda_{3M.})$ – значения оптической плотности на единицу длины оптического пути на длинах волн возбуждения и эмиссии соответственно, x_1 , x_2 y₁ и y₂ показывают положение в кювете возбуждающего пучка и области сбора излучения флуоресценции, согласно рисунку 4.12. Первая дробь в правой части формулы (4.3) описывает первичный, а вторая –вторичный эффект внутреннего фильтра.



Рисунок 4.12 - оптические пути возбуждающего излучения и излучения флуоресценции в образце

Использовать формулу (4.3) для введения поправок на эффект внутреннего фильтра было бы некорректно, поскольку траектории лучей внутри образца и, следовательно, параметры x_1 и x_2 и y_1 и y_2 зависят от оптической схемы прибора. Однако с помощью этой формулы можно оценить допустимые значения оптической плотности на длинах волн возбуждения и эмиссии. Такие оценки показывают, ЧТО для мер флуоресценции, выполненных в форме имитатора стандартной кюветы (сечение 12,5*12,5) при A(λ_{B035}) и A(λ_{3M}) меньших 0,04 что соответствует коэффициентам пропускания 91 %, эффектами внутреннего фильтра можно пренебречь. Из результатов измерения оптической плотности образцов фосфатного стекла, активированного медью, следует, что это условие выполняется только при $\lambda > 350$ нм. Таким образом, эффекты внутреннего фильтра ограничивают диапазон использования меры флуоресценции со стороны коротких длин волн. Отметим, что эффект внутреннего фильтра в возбуждения канале вносит вклад только В неопределенность воспроизведения интенсивности флуоресценции, но не формы спектра эмиссии.

г) Анизотропия флуоресценции

При определении метрологических характеристик мер флуоресценции необходимо учитывать анизотропию флуоресценции стекла. Степень анизотропии *r* выражается формулой (4.4)

$$r = \frac{I_{II} - I_{\perp}}{I_{II} + I_{\perp}}$$
(4.4)

где I_{II} и I_{\perp} составляющие поляризованной флуоресценции соответственно параллельные и перпендикулярные электрическому вектору поляризации возбуждающего излучения [102]. При воспроизведении спектров и

интенсивности флуоресценции с помощью разработанных мер анизотропия флуоресценции проявляется в следующих эффектах:

- Зависимость интенсивности флуоресценции от поляризации возбуждающего излучения. Его состояние поляризации описывается с помощью так называемого F фактора, представляющего собой отношение интенсивностей вертикально (V) и горизонтально (H) поляризованных компонент в интенсивности возбуждающего излучения, согласно формуле (4.5)

$$F = \frac{I^{V}_{_{\theta O 3 \overline{O}.}}}{I^{H}_{_{\theta O 3 \overline{O}.}}}$$
(4.5)

- Зависимость чувствительности эмиссионного канала спектрофлуориметра от поляризации регистрируемого излучения. Эта зависимость обусловлена главным образом свойствами дифракционной решетки монохроматора и выражается с помощью так называемого G фактора, равного отношению чувствительностей канала к вертикально и горизонтально поляризованному свету согласно формуле (4.6)

$$G = \frac{S_{\substack{6036.\\ 8036.}}^V}{S_{\substack{6036.}}^H}$$
(4.6)

Влияние поляризационных эффектов на точность воспроизведения параметров флуоресценции зависит от свойств стекла (степени анизотропии *r*) и от особенностей прибора (факторы G и F). Это влияние может быть оценено с помощью формулы (4.7)

$$\frac{S-S_0}{S_0} = \frac{r(2FG-F-G-1)}{(F+1)(G+1)}$$
(4.7)

Здесь S₀ – флуоресцентный сигнал от образца, у которого отсутствует анизотропия флуоресценции, S – сигнал от образца, имеющего степень анизотропии *r*.

Значения факторов F и G зависят от длины волны. Для типичных монохроматоров, используемых в спектрофлуориметрах, при λ =330 нм F~0,8, а значение G при этой длине волны может меняться, в зависимости от оптической схемы прибора, в достаточно широких пределах – от 0,3 до 2,7.

Степень анизотропии флуоресценции *r* также зависит от длины волны, на рисунке 4.13 приведен вид этой зависимости для фосфатных стекол, активированных медью, согласно данным работы [82].



Рисунок 4.13 - Зависимость показателя анизотропии фосфатного стекла, активированного медью, от длины волны [82]

Из приведенных выше данных с помощью формулы (4.7) можно показать, что погрешность воспроизведения спектра флуоресценции, обусловленная поляризационными эффектами, порядка 3% в максимуме флуоресценции и не превышает 12 % на краях спектрального диапазона меры.

д) Неоднородность флуоресцентных свойств стекла.

Положение луча относительно основания кюветы может различаться в разных моделях спектрофлуориметров. Поэтому одним из источников неопределенности воспроизведения параметров флуоресценции может быть неоднородность флуоресцентных свойств материала, из которого изготовлена мера флуоресценции. Для исследования этой неоднородности было проведено измерение спектров флуоресценции для одного из образцов. Согласно рисунку 4.14 видно, что при смещении положения образца на 6 мм интенсивность флуоресценции в максимуме меняется не более чем на 4%. Это отклонение может быть взято за оценку сверху для погрешности от неоднородности материала образца.



Рисунок 4.14 - Спектры флуоресценции фосфатного стекла, активированного медью, при различных положениях образца относительно возбуждающего излучения

4.3.2 Возможность оптимизации мер флуоресценции

Из сказанного об эффекте внутреннего фильтра в литературе и разделе 4.3.1 следует, что существенный вклад в неопределенность воспроизведения относительной спектральной плотности флуоресценции вносят различия в траекториях прохождения излучения через меру при ее аттестации на эталонной установке и использовании на калибруемом приборе. Это касается как возбуждающего излучения, так и излучения флуоресценции. Отличия в траекториях становятся существенными благодаря эффектам внутреннего фильтра. Поэтому уменьшение этих эффектов улучшает метрологические характеристики меры.

В связи с этим можно изменить геометрию мер флуоресценции, примеры такого изменения приведены на рисунке 4.15, где: а) мера флуоресценции в виде столбика с размерами поперечного сечения 10*10 мм; б) представлена мера в виде плоскопараллельной пластины, расположенной под углом α к направлению возбуждающего излучения. Оптимальное значение этого угла зависит от соотношения между коэффициентами поглощения стекла на длинах волн возбуждения и эмиссии. Длина оптического ПУТИ для возбуждающего излучения И излучения флуоресценции $l_{возб}$ и $l_{изм}$ не превышают 2-3 мм, что существенно снижает действие эффекта внутреннего фильтра и, соответственно, позволяет расширить спектральный диапазон, в котором мера флуоресценции может работать.



Рисунок 4.15- Альтернативная и традиционная геометрия мер флуоресценции

Меру в виде плоской пластины, в виду ее нечувствительности к эффектам внутреннего фильтра можно рассматривать в качестве одного из прототипов меры флуоресценции, наряду с образцами – имитаторами кювет. В виду большой оптической плотности на предполагаемой длине волны возбуждения у стекол C3C-17 предполагается использовать для мер на их основе только геометрии плоской пластины.

Другим вариантом оптимизации использования мер флуоресценции является использование зеркального усилителя флуоресценции.

Зеркальный усилитель предназначен для измерения флуоресценции слабопоглощающих растворов. Он может быть использованы при физикохимических и медико-биологических исследованиях, чтобы регистрировать спектры возбуждения и излучения в видимой и УФ области, а так же для ряда других задач, требующих регистрации слабых сигналов флуоресценции. Зеркальный усилитель обеспечивает многократное усиление интенсивности флуоресценции благодаря увеличению длины оптического ПУТИ возбуждающего света и добавочному светосбору излучения. Вид спектра флуоресценции, воспроизводимый образцом с зеркальным усилителем зависит не только от свойств стекла, но и от спектральных зависимостей коэффициентов отражения зеркал. Поэтому появляется возможность, варьируя эти зеркала, расширять диапазон спектров флуоресценции, воспроизводимых разрабатываемой мерой.

Согласно рисунку 4.16 видно влияние зеркального усилителя флуоресценции на зависимость максимума эмиссии от длины волны возбуждения. Эти результаты показывают, что используя в усилителе зеркала с разными спектрами отражения, можно сдвигать спектры флуоресценции, воспроизводимые мерой флуоресценции по шкале длин волн. Таким образом, появляется возможность расширять спектральный диапазон, в котором может использоваться мера флуоресценции.

116



Риунок 4.16 - Влияние зеркального усилителя флуоресценции на зависимость положения спектра эмиссии от длины волны возбуждения

4.4 Разработка мер флуоресценции

Основная цель исследований, описанных в данном разделе – разработка мер флуоресценции. С учетом изложенного в разделе 4.2, были разработаны флуоресценции – четыре экземпляра мер имеющих габариты два, стандартной флуориметрической кюветы, лва других, В виле И плоскопараллельной пластины толщиной 2,5 мм, устанавливаемая под углом 135° к возбуждающему излучению, изготовленные из фосфатного стекла активированного ионами одновалентной меди и из оптического стекла СЗС-17. Для каждой из этих мер были подобраны- своя длина волны возбуждения и свой диапазон для спектра эмиссии.

4.4.1 Мера в форме имитатора кюветы из фосфатного стекла, активированного ионами одновалентной меди

На рисунке 4.17 приведен спектр возбуждения флуоресценции, измеренный для одного из образцов фосфатного стекла, имеющего форму стандартной кюветы. Видно, что максимальной флуоресценции такого стекла



соответствует возбуждение при длинах волн 296-297 нм.

Рисунок 4.17 - Спектр возбуждения при длине волны эмиссии 446 нм.

Как указывалось выше, при данной геометрии образца необходимо минимизировать влияние эффекта внутреннего фильтра. Для оптимальной выбора длины волны возбуждения был измерен спектр пропускания фосфатного стекла активированного ионами меди (образец в форме стандартной кюветы 12,5*12,5*45 мм), который приведен на рисунке 4.18.



Рисунок 4.18 - Спектр пропускания образца фосфатного стекла в форме стандартной кюветы.

Данные, приведенные на этом графике, включают так называемые френелевские потери, т.е. простой расчет показывает, что коэффициенту пропускания без учета потерь Т=90% с учетом потерь соответствует T*0,92 = 82,8%

По спектру на рисунке 4.18 такому значению Т соответствует длина волны возбуждения λ_{возб.}~350 нм. Спектр эмиссии, измеренный при таком возбуждении, приведен на рисунке 4.19.



Рисунок 4.19 - Спектр эмиссии меры из фосфатного стекла при возбуждении на длине волны 350 нм, образец в виде стандартной кюветы.

Границы диапазона для спектра эмиссии определяем из условия, чтобы в пределах всего выбранного диапазона значения интенсивности эмиссии были бы не менее 0,1 от максимального. Исходя из этого условия находим, что 400< $\lambda_{\text{эм.}}$ <680 нм.

4.4.2 Мера в виде плоской пластины из фосфатного стекла, активированного ионами меди

Из-за малой толщины пластины для нее устраняется зависимость эффекта внутреннего фильтра от оптической схемы прибора, поэтому

появляется возможность возбуждать флуоресценцию на более коротких длинах волн, близких к максимуму спектра возбуждения. С учетом спектра возбуждения стекла, для пластин была выбрана длина волны возбуждения $\lambda_{возб.}$ =297 нм. Спектр эмиссии, измеренный при таком возбуждении, приведен на рисунке 4.20.



Рисунок 4.20 - Спектр эмиссии для меры из фосфатного стекла в виде пластины, возбуждение при λ=297 нм.

Границы диапазона определяем из того же условия, что и в случае меры в габаритах кюветы, т.е. уровень интенсивности эмиссии в пределах диапазона должен быть не менее 0,1 от максимального. Исходя из этого условия определяем диапазон длин волн от 330 до 600 нм.

Видно, что диапазоны спектров эмиссии для мер двух типов перекрываются в достаточно широкой области – от 400 до 600 нм. Исходя из требования максимальной интенсивности флуоресценции, границу между областями применимости этих мер целесообразно провести при λ= 460 нм.

Таким образом, совместное использование мер двух рассмотренных выше типов позволяет корректировать спектры эмиссии в достаточно широком диапазоне – от 330 до 680 нм в этом диапазоне уровень эмиссии сохраняется на уровне не менее 0,1 от максимума. При этом оба типа мер изготовлены из одного и того же материала – фосфатного стекла, активированного ионами одновалентной меди.

4.4.3 Мера в форме имитатора кюветы из цветного оптического стекла СЗС-

17

Наряду с мерами флуоресценции из фосфатного стекла, активированного ионами меди, были исследованы образцы цветного оптического стекла C3C-17, как в форме имитатора кюветы, так и в форме пластинки. Обнаружено, что спектры эмиссии этих образцов находится в диапазоне 350 – 650 нм, и их форма мало зависит от длины волны возбуждения. Больший интерес представляет образец в форме пластинки, так как при работе с образцом в виде столбика сильно сказывается эффект внутреннего фильтра.

Установлено, что наибольшая флуоресценция для имитатора кюветы (столбика) из стекла C3C-17 наблюдается при возбуждении на длине волны около 340 нм, при смещении возбуждения в более длинноволновую или более коротковолновую область наблюдается ослабление флуоресценции, согласно рисунку 4.21. Более точные измерения показали, что оптимальная флуоресценция достигается при возбуждении эмиссии на 337 нм, данная длина волны была обнаружена при записи спектра возбуждения при длинах волн эмиссии 480 нм и 500 нм, что видно на рисунке 4.22.



Рисунок 4.21 - Зависимость интенсивности эмиссии от длины волны возбуждения для образца на основе стекла СЗС-17 в форме имитатора кюветы



Рисунок 4.22 - Спектры возбуждения образца на основе стекла СЗС-17 в форме имитатора кюветы

4.4.4 Мера в форме плоской пластины из цветного оптического стекла СЗС-

17

При измерении спектра эмиссии для образца в форме пластины изначально была использована длина волны возбуждения 297 нм, по аналогии с фосфатным стеклом, активированным ионами одновалентной меди. Согласно рисунку 4.23 видно, что флуоресценция находится в той же области, несмотря на значительный сдвиг длины волны возбуждения (40 нм), а ее интенсивность сопоставима с флуоресценцией столбика при тех же приборных параметрах.



Рисунок 4.23 - сравнение спектров эмиссии для образцов из стекла C3C-17 в форме столбика (имитатора кюветы) и в форме пластинки (приборные параметры одинаковы).

Однако, учитывая то, что для пластины практически нивелирован эффект внутреннего фильтра, а так же то, что для стекла C3C-17 нет ограничения по диапазонам измерений, был проведен поиск дополнительных длин волн возбуждения эмиссии в более коротковолновом диапазоне. Для этого был записан спектр возбуждения пластины при длине волны эмиссии 488 нм (положения максимума на спектре эмиссии пластины), который представлен на рисунке 4.24.



Рисунок 4.24 - Спектр возбуждения образца на основе стекла СЗС-17 в форме пластинки на 488 нм

Согласно рисунку 4.24 есть 3 характерных пика: 240 нм, 257 нм, 268 нм. При возбуждении эмиссии на данных длинах волн получена картина, представленная на рисунке 4.25.



Рисунок 4.25 - Спектры эмиссии образца на основе стекла СЗС-17 в форме пластинки

Согласно рисунку 4.25 видно, что эмиссия при коротковолновом возбуждении находится в том же спектральном диапазон, что и при возбуждении на длинах волн диапазона 310-350 нм, но ее интенсивность значительно больше, при том, что усиление пришлось уменьшить с 460 В до 350 В.

На рисунке 4.26 приведены спектры эмиссии флуоресценции образца на основе стекла C3C-17 в форме пластинки и образца фосфатного стекла в виде имитатора кюветы. Эмиссия возбуждалась на 240 нм для C3C-17 и на 330 нм у образца ГОИ, для того, что бы спектры лежали в одном интервале и было возможно их сравнение. Параметры прибора были одинаковы для обоих образцов.



Рисунок 4.26 - Сравнение флуоресценции образца из стекла СЗС-17 и образца фосфатного стекла

Видно, что флуоресценции образца из стекла C3C-17 нисколько не уступает и даже превосходит флуоресценцию специально сваренного фосфатного стекла, однако лежит в несколько более узком диапазоне.

4.5 Установление метрологических и технических характеристик мер флуоресценции

4.5.1 Подготовка мер к испытаниям в целях утверждения типа

Основными метрологическими характеристиками разработанных мер являются значения относительной интенсивности эмиссии В соответствующих Значения спектральных диапазонах. волн длин возбуждения И спектральные диапазоны эмиссии мер для двух рассмотренных выше типов приведены в таблице 4.1.

Наименование меры	Длина волны	Спектральный диапазон эмиссии,
флуоресценции	возбуждения, нм	НМ
ФС МФ-С	350	400 - 680
ΦС ΜΦ-Π	297	320 - 580
C3C-17	240	370 - 660

Таблица 4.1 Спектральные диапазоны мер флуоресценции.

Спектры эмиссии в указанных выше диапазонах измерялись на спектрофотометре-флуориметре СФФ-2 «Флуоран». С измеренными спектрами производилась процедура спектральной коррекции, для чего использовалась функция, полученная с помощью стандартных образцов относительной спектральной эффективности рассеяния света наночастицами двуокиси кремния. График этой функции приведен на рисунке 4.27.



Рисунок 4.27 - функция коррекции, использованная для получения аппаратно-независимых спектров эмиссии мер флуоресценции

На рисунках 4.28-4.30 приведены скорректированные спектры эмиссии мер.



Рисунок 4.28 - Скорректированные спектр эмиссии фосфатного стекла активированного ионами меди (столбик)



Рисунок 4.29 - Скорректированные спектр эмиссии фосфатного стекла активированного ионами меди (пластина)



Рисунок 4.30 - Скорректированные спектр эмиссии цветного оптического стекла СЗС-17

Прототип меры флуоресценции на основе фосфатного стекла, активированного иона меди показан на рисунке 4.31



Рисунок 4.31 - Прототип меры флуоресценции на основе фосфатного стекла, активированного иона меди

В процессе испытаний контролировалась также стабильность флуоресцентных свойств неорганических стекол с течением времени. Результаты такого контроля для двух образцов этого стекла приведены на рисунке 4.32. Для исключения колебаний чувствительности прибора использовалось отношение измеренной интенсивности эмиссии стекла к интенсивности пика рамановского рассеяния дистиллированной воды.



Рисунок 4.32 - Результаты контроля стабильности эмиссии флуоресценции образцов из фосфатного стекла, активированного ионами

меди (Е – интенсивность эмиссии в относительных единицах).

Такой прием часто используется для исключения влияния приборных факторов при измерении интенсивности флуоресценции, сама интенсивность при этом выражается в рамановских единицах [99].

Согласно рисунку 4.32, можно заключить, что интенсивность эмиссии образцов в виде «столбика» из фосфатного стекла, активированного ионами меди, остается стабильной по крайней мере, в пределах ± 3%.

Для стекла C3C-17 данные показали стабильность в пределах ± 2,2% (См. таблицу 4.2).

Дата	Значение интенсивности в максимуме в рамановских	
	единицах	
21.11.14	15,402	
24.11.14	15,649	
05.12.14	15,161	
09.12.14	15,928	
15.01.14	15,355	

Таблица 4.2 Стабильность оптического стекла СЗС-17

К сожалению, пока не удалось устойчиво воспроизводить необходимую рецептуру при производстве фосфатного стекла, активированного ионами одновалентной меди.

Результатом всего этого стало сильное падение флуоресценции, что было неприемлемо, так как мера предназначена в первую очередь для устойчивого воспроизведения спектров эмиссии флуоресценции, а падающая к партии интенсивность делала использование подобных партии ОТ материалов неприемлемым. Тем более становится невозможным откалибровать подобные меры в относительных единицах флуоресценции по растворам сульфата хинина, что было одной из целей при создании мер. флуоресцентных свойств Результаты ухудшения образцов на основе фосфатного стекла, активированного ионами одновалентной меди представлены на рисунках 4.33-4.37.



Рисунок 4.33 - Ухудшение интенсивности эмиссии при возбуждении на 297 нм.



Рисунок 4.34 - Ухудшение интенсивности эмиссии при возбуждении на 330 нм.



Рисунок 4.35 - Ухудшение интенсивности эмиссии при возбуждении на 350 нм.



Рисунок 4.36 - Изменение пропускания стекол



Рисунок 4.37 - Изменение оптической плотности стекол

По этой причине к аттестации бала подготовлена только мера флуоресценции на основе цветного оптического стекла C3C-17. Мера изготовлена в форме плоскопараллельной пластины, толщиной 2,5 мм, которая помещается в оправу, имитирующую форму стандартной флуориметрической кюветы. Внешний вид меры флуоресценции из цветного оптического стекла C3C-17 представлен на рис 4.38 а. На рисунке 4.38 б представлен внешний вид меры, помещенной в измерительный отсек спектрофлуориметра.







б)

Рисунок 4.38 - Внешний вид меры флуоресценции из стекла СЗС-17

Мера флуоресценции в форме плоскопараллельной пластина на основе цветного оптического стекла СЗС-17, помещенная в имитатор стандартной флуориметрической кюветы получила название МФП.

Изготовлено две таких меры, которые были представлены на испытания.

Метрологические характеристики мер флуоресценции представленных на испытания, приведены в таблице 4.3.

Таблица 4.3 Метрологические характеристики меры флуоресценции

Наименование характеристики	Значение характеристики
Диапазон спектрального распределения интенсивности флуоресценции при длине волны возбуждения 240 нм, нм	от 370 до 660
Спектральное распределение интенсивности флуоресценции при длине волны возбуждения 240 нм, нм	Индивидуально для каждой меры, приводится в паспорте
Длина волны возбуждения эмиссии, нм	240, 320
Относительная случайная погрешность спектрального распределения интенсивности флуоресценции, %	10%
Интенсивность флуоресценции на длине волны эмиссии 490 нм в относительных единицах флуоресценции (о.е.ф.) при длине волны возбуждения 240 нм. <u>Примечание</u> За 1 о.е.ф. принимается - флуоресценция раствора . флуоресцеина натрия концентрацией 1 мг/дм ³ .	4,54
Доверительные границы погрешности оценки интенсивности на длине волны эмиссии 490 нм в относительных единицах флуоресценции при длине волны возбуждения 320 нм, %	10%
Габаритные размеры меры, мм, не более	12,6×12,6×50
Масса меры, г, не более	10
Условия эксплуатации:	
температура окружающей среды, °С	от 18 до25
относительная влажность воздуха, %, не более	80
атмосферное давление, кПа	от 94 до106

4.5.2 Проведение испытаний в целях утверждения типа

В рамках испытаний в целях утверждения типа были проведены измерения спектрального распределения интенсивности флуоресценции при длине волны возбуждения 240 нм, измерения интенсивности флуоресценции на длине волны эмиссии 490 нм при длине волны возбуждения 320 нм в о.е.ф, а так же измерения, позволяющие подтвердить диапазон спектрального распределения интенсивности флуоресценции при длине волны возбуждения 240 нм. Все спектральные измерения в рамках испытаний в целях утверждения типа проводились на люминесцентном комплексе, входящем в государственный первичный эталон единиц массовой (молярной) доли и массовой (молярной) концентрации компонентов в жидких и твердых веществах и материалах на основе спектральных методов ГЭТ 196-2011. Для измерения интенсивности флуоресценции в о.е.ф. использовался комплект мер флуоресценции КМФ, госреестр средств измерений № 56936-14. Люминесцентный комплекс эталона ГЭТ 196-2011 включает в себя спектрофлуориметр Флуоролог 3, производства Horiba-Jobin Yvon, Франция.

Данный прибор обладает калиброванным источником и приемниками, что позволило измерить аппаратно-независимый спектр флуоресценции меры. Обеспечивается прослеживаемость к первичному радиометрическому эталону ГЭТ 86-2010.

На рисунке 4.39 представлены отнормированные на максимум аппаратно-независимые распределения интенсивности флуоресценции мер МФП №1 и №2 при длине волны возбуждения 240 нм, полученные на спектрофлуориметре Флуоролог 3. Спектры получены в процессе измерения мер в рамках испытания в целях утверждения типа средств измерений.



Рисунок 4.39 – Спектральное распределение интенсивности флуоресценции мер МФП

Меры флуоресценции КМФ использовались для передачи о.е.ф. испытуемой мере флуоресценции.

КМФ состоит из четырех мер флуоресценции, которые представляют собой водные растворы флуоресцеина натрия различной концентрации, помещенные в герметичные ампулы. КМФ применяются для поверки флуоресцентных анализаторов, спектрофлуориметров, люминометров, ПЦРанализаторов и других люминесцентных приборов.

Из этого набора была использована мера №2, водный раствор флуоресцеина натрия, 0,1 мг/дм³.

Ее спектральные характеристики: Спектральный диапазон эмиссии – 470-669 нм; Спектральный диапазон возбуждения – 300-500 нм. Для передачи значений интенсивности флуоресценции в о.е.ф. на люминесцентном комплексе эталона ГЭТ 196-2011 были поочередно промерены значения интенсивности флуоресценции испытуемой меры и раствора № 2 из КМФ.

В результате проведенных испытаний метрологические характеристики мер, приведенные в таблице 4.3, были подтверждены.

4.6 Способы применения меры флуоресценции на основе неорганического стекла

Разработанная флуоресценции мера МΦП предназначены ДЛЯ воспроизведения спектрального распределения И интенсивности флуоресценции с целью спектральной градуировки эмиссионных каналов спектрофлуориметров изменений чувствительности И определения спектрофлуориметров при заданных значениях длин волн возбуждения и эмиссии.

Мера флуоресценции представляет собой пластину из сине-зеленого стекла (C3C-17), вставленную в оправу, выполненную в форме имитатора стандартной флуоресцентной кюветы. Мера размещена в футляре, который предохраняет ее от механических повреждений и загрязнения.

Для предотвращения загрязнений и повреждений мера помещается в специальный футляр. В него вкладывается лист со спектральными характеристиками меры.

Мера флуоресценции применяется для спектральной градуировки и контроля стабильности спектрофлуориметров.

Для выполнения процедуры спектральной коррекции необходимо:

1). Измерить спектр флуоресценции меры, используя следующие параметры:

Спектральный диапазон эмиссии, нм: 370÷660 Длина волны возбуждения эмиссии, нм: 240 Остальные параметры подбираются индивидуально и зависят от прибора. Следует подобрать параметры таким образом, что бы сигнал в измерительном канала, полученный в результате регистрации спектра флуоресценции меры, находился в пределах 30-75% от верхней границы диапазона измерений. Например, на приборе, на котором проводились исследования стекол, приборные параметры были следующие:

Усиление ФЭУ – 350 В

Спектральная ширина щели входного монохроматора – 5 нм

Спектральная ширина щели выходного монохроматора – 5 нм

Напряжение на ксеноновой лампе – 1000 В

Число вспышек лампы на 1 шаг сканирования – 100

Желательно провести серию из пяти измерений. Затем сохранить спектры в памяти компьютера, усреднив их по формуле (4.8).

$$E(\lambda) = \frac{\sum_{i=1}^{n=5} E_i(\lambda)}{n}$$
(4.8)

2). Провести нормировку полученного спектра на его значение в максимуме по формуле (4.9):

$$E_n(\lambda) = \frac{E(\lambda)}{E_{\max}}$$
(4.9)

3). Получить функцию спектральной коррекции спектрофлуориметра. Для этого необходимо разделить спектр флуоресценции меры, полученный на приборе, на поставляемый в комплекте с мерой. Это делается по формуле (4.10).

$$F_{corr}(\lambda) = \frac{E_n(\lambda)}{E_{s \tan dard}(\lambda)}$$
(4.10)

Затем разделить спектр, который нуждается в корректировке, на функцию спектральной коррекции F_{corr}

В результате будет получен аппаратно-независимый спектр флуоресценции.

Для проведения контроля чувствительности спектрофлуориметра необходимо:

1). Измерить флуоресценцию на интересующей паре длин волн возбуждение-эмиссия. По умолчанию рекомендуется использовать следующие длины волн: возбуждение 320 ни, эмиссия 490 нм. Эти длины волны выбраны так как при такой комбинации достигаются наибольшие флуоресценции. Остальные подбираются значения параметры индивидуально и зависят от прибора. Следует подобрать параметры таким образом, чтобы сигнал в измерительном канале, полученный в результате снятия спектра флуоресценции меры, находился в пределах 30-75% от верхней границы диапазона измерений. Желательно провести 10 измерений, после чего усреднить их по формуле (4.8). При проведении измерений необходимо тщательно контролировать однозначность установки меры в кюветном отделении, так как ее смещение может сказаться на результате.

2). При необходимости можно повторить операцию на других парах длин волн, которые необходимо проконтролировать.

3). Значения, полученные таким образом, сохраняются в памяти компьютера и при дальнейших измерениях используются как референтные. Спектр флуоресценции меры измеряется каждый раз, когда нужно понять, не изменились ли приборные параметры, результат сравнивается с референтным и по необходимости вводится поправочный коэффициент.

4). Если необходимо контролировать интенсивность в некотором интервале длин волн, при одной длине волны возбуждения эмиссии –

необходимо записывать и хранить не пару значений длин волн, а спектр, в указанном интервале.

Важно помнить, что при контроле стабильности необходимо следить за тем, чтобы референтные данные и данные сравнения получались при одних приборных параметрах.

4.7 Прототип мер флуоресценции с несколькими узкими пиками

На основе изучения экспериментальных данных, полученных при работе с прототипами мер на основе фосфатного стекла, активированных ионами меди и серийного стекла СЗС-17, а также по результатам изучения приведённого 1. имеющегося опыта, В главе была определена целесообразность разработки в мер флуоресценции, с несколькими узкими определения функции спектральной линиями для коррекции, систематического контроля чувствительности (такие меры особенно удобны, так как несколько узких линий позволяют контролировать стабильность в волн) нескольких лиапазонах длин И проверки погрешности спектрофлуориметра по шкале длин волн.

Согласно работе [104], стекла, активированные тербием и европием имеют спектр флуоресценции, состоящий из нескольких узких линий.

Образцы стекол должны иметь форму прямоугольного параллелепипеда, размеры которого соответствуют стандартной флуорометрической кювете 12,5*12,5*45 мм, все боковые грани должны быть прозрачными, иметь низкую оптическую плотность (не более 0,4) на длине волны возбуждения, иметь не менее 5 линий шириной не менее 4 нм и не более 20 нм в диапазоне от 350 до 800 нм. Технические характеристики мер приведены в таблице 4.4.

Таблица 4.4 Технические характеристики мер с несколькими узкими линиями флуоресценции

Техническая характеристика	Единица измерения	Значения
Материал образца		Стекло на основе фосфатной матрицы, активированное ионами металлов (европий, тербий)
Длины волн возбуждения	НМ	365 и 381
Оптическая плотность на длинах волн, выбранных для возбуждения флуоресценции	единицы оптической плотности	0,24 на 365 нм 0,33 на 381 нм
Длины волн эмиссии	НМ	6 линий шириной 4 нм в диапазоне от 350 до 800 нм
Интегральный квантовый выход флуоресценции		79% на 365 нм 83% на 381 нм
Изменение положения пиков по шкале длин при изменении температуры в диапазоне от $+10$ до $+40$ 0 C,	НМ	1
Неоднородность оптической плотности и интенсивности флуоресценции по различным участкам образца	%	3

В соответствии с приведенными выше техническими требованиями в НИЦ ОМ ИТМО были подобран состав матрицы для мер, определены оптимальные концентрации активирующих примесей и отработаны режимы варки стекол (температурная программа и состав газовой среды). В результате проведенных работ были изготовлены три образца мер флуоресценции на основе фосфатного стекла, активированного ионами европия и тербия. Фотография изготовленной меры приведена на рисунке 4.40.



Рисунок 4.40 - Фотографии мер спектральной интенсивности флуоресценции. Слева – мера на основе стекла, активированного ионами меди. Справа – мера на основе фосфатного стекла, активированного ионами европия и тербия.

На рисунке 4.41 приведен спектр одного из образцов второго тип с пятью узкими спектральными линиями. Мера воспроизводит распределение интенсивности флуоресценции в диапазоне 400-750 нм, при длине волны возбуждения 365 нм.



Рисунок 4.41 - Спектр одного из образцов мер флуоресценции с узкими спектральными линиями.
Для определения спектральной ширины были измерены спектры эмиссии в окрестностях каждого из пиков при спектральной ширине щелей спектрофлуориметра 2 нм. Определенные по результатам этих измерений значения спектральной ширины пиков приведены в таблице 4.5.

Таблица 4.5 Спектральная ширина пиков для мер с узкими спектральными линиями.

Длина волны	Спектральная
в максимуме пика, нм	ширина пика, нм
418	10
440	9
492	15
549	13
590	13
619	15

Для образов мер с несколькими узкими спектральными линиями, характерна, высокая изотропия флуоресценции. Это иллюстрируется рисунком 4.42, где спектры образца, измеренные при различных его ориентировках, практически совпадают.



Рисунок 4.42 - Спектры эмиссии одного из образцов с узкими спектральными линиями при различных его ориентировках в кюветном отделении

Разработанные меры позволяют реализовывать функционал мер недавно разработанных институтом ВАМ и содержащих несколько узких спектральных линий [105].

4.8 Использование мер флуоресценции для проведения измерений квантового выхода относительным методом

Разработанные меры могут быть применены для измерения квантового выхода флуоресценции (КВФ). Для этого можно использовать известный метод, основанный на сравнении интенсивностей флуоресценции у анализируемого образца и стандарта с известным значением КВФ [102].

При использовании этого метода с помощью спектрофлуориметра измеряют интегральные интенсивности флуоресценции анализируемого образца (флуорофора) $E_X(\lambda)$ и стандартного образца $E_{cmahd}(\lambda)$ в заданных спектральных интервалах. Кроме того, с помощью спектрофотометра измеряют оптические плотности образцов на тех длинах волн, на которых возбуждается флуоресценция – $A_{ahan}(\lambda_{возб..ahan})$ и $A_{cmahd}(\lambda_{возб..cmahd})$.

КВФ анализируемого образца $Q_{X_{\cdot}}$ находится по формуле

$$Q_{X.} = Q_{cmah\partial.} \frac{a_{cmah\partial.} (\lambda_{603\delta..cmah\partial.}) * \int_{\Delta\lambda} E_X(\lambda_{3M.}) * n_{X.}^2 (\lambda_{3M.})}{a_{X.} (\lambda_{603\delta..o\delta pa3ya.}) * \int_{\Delta\lambda} E_{cmah\partial.} (\lambda_{3M.}) * n_{cmah\partial.}^2 (\lambda_{3M.})}$$
(4.11)

Здесь *а_{станд.}* и *а_X* – коэффициенты поглощения соответственно стандартного и анализируемого образцов, *n_{станд.}* и *n_{X.}* – их показатели преломления. Интегрирование в (3) производится по спектральному интервалу, соответствующему полосе флуоресценции, для которой измеряется квантовый выход.

Необходимо учитывать, что в случае использования твердого образца невозможно найти оптическую плотность флуорофора, так как мы не имеем чистого растворителя. По этой причине мы не можем рассчитать Q_{станд}, однако используя один или несколько растворов флуорофоров с известным квантовым выходом мы можем найти эффективный или условный квантовый выход:

$$Q_{cm}^{*}(\lambda_{BO36.cmahd.}) = Q_{cmahd.}^{*} a_{cmahd.}(\lambda_{BO36.cmahd.})$$
(4.12)

Тогда формула (3) приобретает следующий вид:

$$Q_{X.} = \frac{Q_{cm.}^{*} * \int_{\Delta\lambda} E_{X}(\lambda_{_{\mathfrak{M}.}}) * n_{X.}^{2}(\lambda_{_{\mathfrak{M}.}})}{a_{X.}(\lambda_{_{\mathfrak{go}\mathfrak{S}}\ldots\mathfrak{O}\mathfrak{o}\mathfrak{p}\mathfrak{a}\mathfrak{s}\mathfrak{g}\mathfrak{a}\mathfrak{a}\mathfrak{g}\mathfrak{a}\mathfrak{a}\mathfrak{g}\mathfrak{a}}) * \int_{\Delta\lambda} E_{cm\mathfrak{a}\mathfrak{h}\mathfrak{d}.}(\lambda_{_{\mathfrak{M}.}}) * n_{cm\mathfrak{a}\mathfrak{h}\mathfrak{d}.}^{2}(\lambda_{_{\mathfrak{M}.}})}$$
(4.13)

Используя раствор, для которого известно значение квантового выхода Q_X , можно, проведя измерение остальных величин, входящих в формулу (5), вычислить значение $Q^*_{cm.}(\lambda_{возб.cmahd.})$ для меры флуоресценции. Необходимо также измерить зависимость показателя преломления от длины волны $n_{cmahd.}(\lambda)$ для материала меры. Зная эти параметры можно, проведя измерения

спектров эмиссии для меры флуоресценции и исследуемого образца, вычислить для него значение КВФ Q_X .

Выводы к главе 4

В данной главе описывается разработка меры флуоресценции на основе неорганического стекла, предназначенная для воспроизведения аппаратнонезависимого спектрального распределения и интенсивности флуоресценции с спектральной градуировки эмиссионных целью каналов спектрофлуориметров определения И изменений чувствительности спектрофлуориметров при заданных значениях длин волн возбуждения и эмиссии. Мера получила название МФП.

Мера представляет собой плоскопараллельную пластину толщиной 2,5 мм из цветного оптическяого стекла C3C-17, устанавливаемую под углом 135° к возбуждающему излучению. Стеклянная пластина размещается в оправе, которая является имитатором стандартной флуориметрической кюветы, с габаритами 12,5x12,5x45 мм. Форма пластины выбрана для того, чтобы минимизировать эффект внутреннего фильтра, угол 135° выбран для увода отраженного излучения от эмиссионного канала спектрофлуориметра. Таким образом, мера может устанавливаться в кюветный отсек любого флуоресцентного прибора, который поддерживает применение стандартных кювет. Стекло, из которого изготовлена мера, является широкодоступным, процедура его изготовления является устоявшейся, отработанной за долгие годы производства. Его оптические свойства стабильны, форма получаемого спектра, мало меняется с изменением длины волны, оно способно надежно воспроизводить спектры флуоресценции.

Мера воспроизводит аппаратно-независимое распределение интенсивности флуоресценции в диапазоне 370-660 нм при длине волны возбуждения 240 нм. Так же мера откалибрована в относительных единицах флуоресценции, ей приписано значение 1,18 о.е.ф. на длине волны эмиссии 490 нм при длине волны возбуждения 320 нм.

испытаний Также В рамках в целях утверждения типа на спектрофлуориметре Флуоролог-3, входящем в состав государственного первичного эталона ГЭТ 196-11 были определены границы спектрального распределения интенсивности флуоресценции при длине волны возбуждения 240 а так же само спектральное распределение интенсивности HM, флуоресценции. Спектральные распределения, полученные в ходе этих измерений, являются аппаратно-независимыми Наряду с этим, на данном люминесцентном комплексе, при помощи комплекта мер флуоресценции KMΦ, госреестр средств измерений N⁰ 56936-14, была получена интенсивность флуоресценции меры МФП на длине волны 490 нм при длине возбуждения 320 нм, выраженная в относительных единицах волны флуоресценции. Для применения мер в целях спектральной коррекции и систематического контроля чувствительности спектрофлуориметров разработаны и приведены рекомендации.

Был разработан прототип меры флуоресценции на основе фосфатного стекла, активированного ионами одновалентной меди. Стекло было изготовлено НИТИ ГОИ. Прототип не был доведен до испытаний в целях утверждения типа, так как новые партии получаемых стекол стали демонстрировать ухудшение флуоресцентных свойств, вероятно в следствии нарушения условий его приготовления. Работа с этим материалом была временно приостановлена.

При участии НИЦ ОМ ИТМО разработаны и изготовлены меры флуоресценции на основе фосфатных стекол, активированных тербием и европием. Эти меры воспроизводят распределение флуоресценции, содержащие множество узких пиков. Это позволяет использовать их не только для контроля стабильности прибора и спектральной коррекции, но и для проверки погрешности спектрофлуориметра по шкале длин волн. Мера воспроизводит распределение интенсивности флуоресценции в диапазоне 400-750 нм, при длине волны возбуждения 365 нм

Полученные меры и прототипы мер необходимы для обеспечения единства измерений И упрощения проведения качественного И количественного анализа флуоресцентными методами. Многоразовость, длительный срок службы, устойчивость к фотодеградации и температурным воздействиям делают их подходящим средством для спектральной коррекции и контроля чувствительности спектрофлуориметров. Разработанные меры вызывают большой интерес у фармацевтических кампаний, которым для контроля лекарственных препаратов требуются спектры флуоресценции, которые не зависят от параметров прибора, а также у компаний, которые различные сверхчистые вещества и которым необходимо производят любые контролировать уходы чувствительности своих приборов. Планируется использовать эти меры для работ по определению квантового выхода относительными методами.

В дальнейшем планируется продолжить работу в данном направлении, и довести до испытаний в целях утверждения типа средств измерений меры на основе фосфатного стекла, активированного ионами одновалентной меди, что позволит расширить спектральный диапазон как в коротковолной, так и в длинноволновой области. Возможен дальнейший поиск других неорганических стекол, с целью создания комплекта мер флуоресценции, который сможет охватить еще больший диапазон длин волн.

Заключение

1. Предложен и экспериментально апробирован метод, позволяющий при измерениях размеров частиц на анализаторе динамического рассеяния света определять их счётную концентрацию в суспензии. Предложенный метод позволяет вычислять счётную концентрацию с помощью теории рассеяния света по их размерным параметрам, оптической плотности (экстинкции) (патент РФ на изобретение № 2610942).

2. Создан анализатор ДРС, позволяющий измерять как размерные параметры, так и счетную концентрацию наночастиц в сложных коллоидных системах. Анализатор существует как в варианте экспериментального образца, позволяющего измерять размерные параметры и счетную концентрацию, так и в варианте малогабаритного ДРС анализатора, который готовится к серийному производству.

3. Разработана концепция спектрального портрета, представляющая собой совокупность фрагментов спектров абсорбции, флуоресценции и рассеяния, однозначно характеризующий объект и показана её применимость на примере качественного анализа винодельческой продукции. Показано, что при правильном ранжировании выбранных признаков, становится возможным проводить идентификацию, отображая исследуемые образцы точками в многомерной системе координат, где по осям отложены значения выбранных признаков.

4. Разработана «Методика измерений спектров абсорбции, флуоресценции и рассеяния света в образцах винодельческой продукции» ФР.1.37.2014.18875. Кроме того, разработаны методические рекомендации по совместному использованию этих спектров в качестве спектрального портрета.

5. Поведены исследования различных неорганических стёкол с целью установления возможности изготовления на их основе мер флуоресценции. Исследованы температурная стабильность, стабильность воспроизведения флуоресцентного сигнала, анизотропия флуоресценции, влияние эффекта внутреннего фильтра. Исследовались такие стекла, как фосфатные стёкла, активированные ионами меди, фосфатные стекла активированные ионами редкоземельных металлов, цветное оптическое стекло СЗС-17

6. Исследованы флуоресцентные свойства цветного оптического стекла СЗС-17 и его пригодность для использования в качестве материала для изготовления мер флуоресценции.

7. Разработана мера флуоресценции на основе стекла СЗС-17, выполненная в виде тонкой плоскопараллельной пластины, установленной под углом 135° к возбуждающему излучению, для минимизации эффекта внутреннего фильтра. Mepa воспроизводит аппаратно-независимое спектральное распределение интенсивности флуоресценции, что позволяет процедуру спектральной коррекции проводить эмиссионного канала спектрофлуориметра и систематический контроль стабильности работы прибора.

8. Разработана мера флуоресценции на основе стекла, легированного ионами тербия и европия, которая имеет распределение, содержащее несколько узких пиков, что позволяет использовать её для проверки точности настройки выходного монохроматора спектрофлуориметра. Мера позволяет проводить процедуру спектральной коррекции эмиссионного канала спектрофлуориметра и систематический контроль стабильности работы прибора.

Результаты работы опубликованы в статьях [1-7]; доложены на научнотехнических конференциях [8-18]; защищены патентами на изобретения [19, 20] и свидетельствами о государственной регистрации программ для ЭВМ [21, 22].

Таким образом, в диссертационной работе решена актуальная научнотехническая задача разработки эффективных и производительных методов диагностики коллоидных систем на основе совместного использования

152

спектров абсорбции, флуоресценции, статического и динамического рассеяния света.

В диссертации использованы результаты работ по проекту Минобрнауки России в рамках прикладного научного исследования (уникальный идентификатор RFMEFI62417X0045). Соглашение о предоставлении субсидии от 26.09.2017 г. № 14.624.21.0045.

ААС-ЭТА	_	атомно-абсорбционная спектрометрия с
		электротермической атомизацией;
ДРС	_	динамическое рассеяние света;
ДДА	_	дискретная дипольная аппроксимация
ИК	_	инфракрасный;
КВΦ	_	квантовый выход флуоресценции;
КР	_	комбинационное (рамановкое) рассеяние;
О.Е.Ф	_	относительные единицы флуоресценции;
ОП	_	оптическая плотность;
PCA	_	метод главных компонент;
ПР	_	плазмонный резонанс;
ПЭМ	_	просвечивающая электронная микроскопия;
УΦ	_	ультрафиолет;
СОФ	_	стандартные образцы флуоресценции;
BAM	_	Federal Institute for Materials Research and Testing;
NIST	_	National Institute of Standards and Technology;
a	_	радиус нанообъекта;
A _{ext}	_	оптическая плотность;
d	_	диаметр нанообъекта;
С	_	массовая концентрация;
C_{ext}	_	сечение экстинкции;
Ν	_	счётная концентрация;
n	_	показатель преломления;
Q_{ext}	_	эффективность экстинкции

Список сокращений и условных обозначений

Словарь терминов

Анизотропия флуоресценции – физическое явление, заключающееся в различной интенсивности света, испускаемого флуорофором, вдоль различных осей поляризации.

Аппаратная зависимость – зависимость выходного сигнала от параметров прибора

Гидродинамический диаметр – диаметр сферической частицы, которая имела бы в данной жидкости тот же коэффициент диффузии, что и измеряемая частица.

Квантовый выход флуоресценции - отношение количества испускаемых и поглощаемых фотонов.

Ко-поляризационная компонента рассеянного излучения (VV) – компонента, для которой направление линейной поляризации рассеянного излучения совпадает с направлением линейной поляризации падающего излучения.

Коллоидная система - дисперсные системы, в которых распределены дискретные частицы (наноразмерного диапазона).

Кросс-поляризационная компонента рассеянного излучения (VH) – компонента, для которой направление поляризации рассеянного излучения перпендикулярно направлению поляризации падающего излучения.

Поверхностный плазмонный резонанс (ПР) — возбуждение поверхностного плазмона на его резонансной частоте внешней электромагнитной волной (в случае наноразмерных металлических структур называется локализованным плазмонным резонансом).

Счётная концентрация – число частиц в единице объема.

Фактор деполяризации (ФД) – отношение кросс-поляризационной и кополяризационной компонент к интенсивности рассеянного излучения.

Хемометрика – это химическая, применяющая математические, статистические и другие методы, основанные на формальной логике, для

построения или отбора оптимальных методов измерения и планов эксперимента, а также для извлечения наиболее важной информации при анализе экспериментальных данных.

Экстинкция – ослабление пучка света при его распространении в веществе за счёт действия поглощения света и рассеяния света.

Эффективность экстинкции – отношение истинного сечения экстинкции частицы к ее геометрическому сечению.

Эффект внутреннего фильтра – поглощении внутри образца возбуждающего излучении (первичный) и излучения флуоресценции (вторичный).

В разделе «Словарь терминов» использовались следующие источники: Перлин Е.Ю., Вартанян Т. А., Федоров А. В. Физика твердого тела. Оптика полупроводников, диэлектриков, металлов: Учебное пособие.. — СПб.: СПбГУ ИТМО, 2008. — 216 с; D.L. Massart: Chemometrics: a textbook, Elsevier, NY, 1988

Список литературы

Список основных работ по теме диссертации

Публикации из перечня ВАК и в изданиях, включённых в базы цитирования Scopus и Web of Science

- Levin A.D., Pribytkov V.A., Nagaev A.I., Sadagov A.Yu. Reference Materials for Fluorescence Based on Inorganic Glass. 2015. Physics Procedia. 72. 213-217.
- Левин А.Д., Прибытков В.А., Нагаев А.И., Садагов А.Ю., Шмыткова Е.А.. Развитие оптико-спектральных методов измерений параметров наночастиц в жидких средах. Измерительная техника. №11. 2015.
- И.В. Кубракова, О.А. Тютюнник, И.Я. Кощеева, С.Н. Набиуллина, А.Ю. Садагов. Миграционное поведение платиновых металлов в природно-техногенных системах. ГЕОХИМИЯ. 2017. № 1. с. 68–85
- Ремпель С.В., Левин А.Д., Садагов А.Ю., Ремпель А.А. Оптические свойства квантовых точек сульфида кадмия в водных растворах. Физика твердого тела. 2015. том 57.вып. 6
- 5. Левин А.Д., Садагов А.Ю., Щелконогов В.А., Синебрюхова А.М.. Оценка размеров наночастиц в многокомпонентных коллоидных системах методом динамического рассеяния света. Измерительная техника. №11. 2017.
- Левин А.Д., Нагаев А.И., Садагов А.Ю., Карахотин С.Н.. Качественный анализ вин на основе совместного использования их оптических спектров различной физической природы. Аналитика и контроль. 2018. Т. 22, No 2. C. 147-156

7. Левин А.Д., Нагаев А.И., Садагов А.Ю.. Определение счётной концентрации и размеров наночастиц при измерениях методом динамического рассеяния света. Измерительная техника. №8. 2018.

Публикации в других изданиях

- Levin A.D., Sadagov A.Yu. Extinction spectroscopy combined with dynamic light scattering for nanoparticles diagnostics. Proceedings of the Bremen Workshop on Light Scattering. Bremen, Germany 2016
- Левин А.Д., Нагаев А.И., Садагов А.Ю. Современные тенденции развития аналитических спектральных приборов и их использования в научных исследованиях. Тезисы докладов. Научно-практическая конференция «Научное приборостроение – современное состояние и перспективы развития» г. Москва, 2016
- 10. Левин А.Д., Нагаев А.И., Садагов А.Ю., Кац Н.Д. Спектрофотометрфлуориметр СФФ-2 «ФЛУОРАН». Тезисы докладов. Научнопрактическая конференция «Научное приборостроение – современное состояние и перспективы развития» г. Москва, 2016
- 11.Левин А.Д., Нагаев А.И., Садагов А.Ю., Фурманский Е.А., Стольников Г.А., Кац Н.Д. Лазерный корреляционный спектрометр для характеризации наночастиц в жидких средах. Сборник трудов. Том 2. XII Международная конференция «Прикладная оптика-2016». Санкт-Петербург, 2016
- 12.Левин А.Д., Прибытков В.А., Нагаев А.И., Садагов А.Ю. Меры флуоресценции на основе неорганических стёкол. Аннотации докладов. Том 1. Научная сессия НИЯУ МИФИ. Москва, 2015
- 13.Садагов А.Ю. Меры флуоресценции на основе неорганических стёкол. Тезисы докладов. Первая конференции молодых специалистов

национальных метрологических институтов. ФГУП «ВНИИОФИ». Москва, 2015

- 14.Левин А.Д., Прибытков В.А., Нагаев А.И., Садагов А.Ю. Разработка стандартных образцов для коррекции спектров флуоресценции на основе коллоидных растворов наночастиц. Тезисы докладов. Первая всероссийская научно-техническая конференция Метрология в нанотехнологиях. ФГУП «ВНИИОФИ». Москва, 2014
- 15.Ремпель С.В., Кузнецова Ю.В., Левин А.Д., Садагов А.Ю. Измерение квантового выхода флуоресценции полупроводниковых наночастиц. Тезисы докладов. Всероссийская научно-техническая конференция Метрологическое обеспечение фотоники. ФГУП «ВНИИОФИ». Москва, 2015
- 16.Садагов А.Ю. Развитие метода динамического рассеяния света для измерения геометрических параметров и счётной концентрации наночастиц. Тезисы докладов. Третий международный молодежный научный форум с международным участием «Новые материалы». Буки-Веди. Москва, 2017
- 17.Левин А.Д., Садагов А.Ю. Совместное использование методов оптической спектроскопии для идентификации веществ и их смесей. Тезисы докладов. Третий съезд аналитиков России. ГЕОХИ РАН. Москва, 2017
- 18.Садагов А.Ю. Определение счётной концентрации наночастиц в жидких средах при измерении их размеров методом динамического рассеяния света. Материалы конференции. Третья научно-техническая конференция Московского технологического университета. Москва, 2018

Патенты и свидетельства о регистрации

- 19.Патент РФ на изобретение «Способ определения размеров наночастиц, добавленных в исходный коллоидный раствор» № 2630447 07.09.2017
- 20.Патент РФ на изобретение «Способ оптического измерения счетной концентрации дисперсных частиц в жидких средах и устройство для его осуществления» № 2610942 17.02 2017
- 21.Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ «Программа обработки распределений размеров наночастиц и автокорреляционных функций для лазерного анализатора геометрических параметров наночастиц» № 2016610001 11.01.2016
- 22.Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ «Программа управления и обработки данных для спектрофотометра – флуориметра СФФ-2 «ФЛУОРАН» № 2015662353 20.11.2015

Список использованных источников

- 23.W. Haiss et al Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra , Analytical Chemistry, 2007, V.79, P.P.4215-4221
- 24.N.G. Khlebtsov Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from Extinction Spectra, Analytical Chemistry, 2008, V.80, P.P.6620 – 6625
- 25.D. Parmelle et al A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visable light spectra, Analyst, 2014, V.139, P.P. 4855-4861
- 26.3. T. Hendel et al In Situ Determination of Colloidal Gold Concentrations with UV–Vis Spectroscopy: Limitations and Perspectives, Analytical Chemistry, 2014 V.86, P.P.11114 – 11124

- 27.Ван дер Хлюст Г. Рассеяние света малыми частицами, пер.с англ. М, 1961., раздел 9.3
- 28.Борен К., Хафмен Д. Поглощение и рассеяние света малыми частицами, пер. с англ., М, «Мир», 1986
- 29.M. Quinten Optical properties of nanoparticles systems, Mie and beyond, Wiley, 2011
- 30.Riox D. *et al* An analytical model for dielectric function of Au, Ag and their alloys// Advanced Optical Materials, 2013, p.p. 1-7
- 31.Mishchenko, M.I., Travis, L.D., and Lacis, A.A., Scattering, Absorption, and Emission of Light by Small Particles, London: Cambridge Univ. Press, 2002.
- 32.Mishchenko, M.I., Hovineir J.W and Travis, L.D.,, Light Scattering by Nonspherical Particles: Theory, Measurements and Applications, London: Cambridge Univ. Press, 2000.
- 33.Гаврилина В.А. Методология контроля вина распознаванием, Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора технических наук, Орел, 2013.
- 34.Савчук С.А. Новые методические подходы к контролю качества алкогольной продукции, Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора технических наук, Санкт-Петербург, 2012
- 35.Ornelas-Soto N. *et al* Procedures of food quality control :Analysis methods, samples and sample pretreatment// в книге Quality control for herbal medicine and related areas, 2011, P.P. 63-90.
- 36.Reid L.M. *et al* Recent technological advances for determination of food authentity//Trends in food science and technology, 2006, V.17, P.P. 344-353.
- 37.Urbano M. *et al.* Ultraviolet-visible spectroscopy and pattern-recognition models for differentiation and classification of wines// Food Chemistry, 2006, V.97, iss.1, P.P. 167-175

- 38. Acevedo F.J. *et al* Classification of Wines Produced in Specific Regions by UV–Visible Spectroscopy Combined with Support Vector Machines // Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, V. 55, № 17, № 6842-6849.
- 39.Conteras U. *et al.* Screening method for identification of adulterate and fake tequila by using UV- VIS spectroscopy and chemometrics // Food Research International, 2010, V.43, P.P. 2356-2362
- 40. Azcarate S.M. *et al* Classification of Argentinean Sauvignon Blank Wines by UV Spectroscopy and Chemometrics Methods// Journal of Food Science, 2013, V.78, P.P. 432-436
- 41.Brain G. Wine color analysis using the evolution array UV-Visible spectrophotometer// Thermo Scientific, 2009, Application Note 51852.
- 42. Determination of wine color by UV-VIS spectroscopy following Surdaud Method.// Shimadzu, SCA_100_002.
- 43. Herrera J. *et al.* Shortwave–near infrared spectroscopy for non-destructive determination of maturity of wine grapes// Measurement science and technology, 2003, V.14, №5, P.689
- 44. Cozzolino D. *et al* Near infrared spectroscopy in the Australian grape and wine industry // CRCV technology application note, 2007, P.P.
- 45. Liu L *et al.*, Preliminary study on the application of visible-near infrared spectroscopy and chemometrics to classify Riesling wines from different countries , Food Chemistry, 2008, V. 106, No. 2, pp. 781-786
- 46.Fernandes-Novales J. *et al.* Shortwave-near infra-red spectroscopy for determination of regular sugar content during grape ripening, winemaking, and aging of wine and red wines// Food research international, 2009, V.42, P.P. 285-291.
- 47. Bevin C.J. *et al.* Varietal discrimination of Australian wines by means of mid-infrared spectroscopy and mid-infrared analysis// Analytica Chimica Acta, 2008, V.621, P.P. 19-23.

- 48.Gebala S. *et al* Possibilities of using fluorescence in wine research// Polosh Journal of food and nutrition science, 2007, vol.57, No.3, P.P. 363-366
- 49.Sadeca J. *et al* Fluorescence spectroscopy and chemometrics in the Food Classification – a Review// Chez Journal of food science, 2007, V.25, No.4, P.P. 159- 173.
- 50. Tothova J *et al* Characterization and classification of distilled drinks using total luminescence and Synchronous Fluorescence Spectroscopy// Acta chimica slovaca, 2008, V.1, No1, P.P. 265-275.
- 51.Yin C. *et al.* Preliminary Investigation on Variety, Brewery and Vintage using Three-demensional Fluorescence Spectroscopy// Food Science and Technology Research, 2009, vol.15, №1, P.P.27-38
- 52.Sadeca J. *et al* Classification of brandy and wine distillates using front face fluorescence spectroscopy// Food Chemistry, 2009, V.117, P.P. 491-498.
- 53.Tothova J *et al* Total luminescence spectroscopy for differentiating between brandy and wine distillate//Chez Journal of food science, 2009, V.27, No.6, P.P. 425-432
- 54.Airado-Rodríguez D. *et al.* Usefulness of fluorescence excitation–emission Matrices in Combination with PARAFAC, as fingerprints of red wines // Journal of agricultural and food *chemistry*, 2009, V. 57, №5, P.P. 1711– 1720
- 55.Gebla S. Measurements of solution fluorescence a new concept//Optica aplicata, 2009, V.34, No.2, P.P. 391-399.
- 56.Pis L. *et al* Synchronous fluorescence spectroscopy for differentiating between brandies and wine distillates // Acta Chimica Slovaca, 2011, V.4, №1, P.P.47-58.
- 57. Markechova D.*et al* Determination of the adulterants in adulterant-brandy blends using fluorescence spectroscopy and multivariate methods//Analytical methods, 2013.

- 58.Regulation (EC) no 110/2008 of European Parliament and of the Council of 15 January 2008 on the definition, presentation, labeling and the protection of geographical indication of spirit drinks
- 59.Родионова О.Е., Померанцев А.Л. Хемометрика: достижения и перспективы // Успехи химии, 2006, Т. 75, №4, С.С. 302-321
- 60.Saurina J. Characterization of wines using compositional profiles and chemometrics // Trends Analytical Chemistry, 2010, V.29, P.P. 234-245.
- 61.Morawski R.J. Measurement data processing in spectrophotometric analysis of food // Metrology and measurement systems, 2012, V.19, №4, P.P. 623-652.
- 62.Ascarate S.M. *et al* Evaluation of geographic origin of torrontes wines by chemometrics// Journal of Food Research, 2013, V.2, No.5, P.P. 48-56.
- 63.Cozzolino D. *et al* Can spectroscopy geographically classify Sauvignon Blanc wines from Australia and New Zealand? // Food Chemistry, 2011, V. 126, №2, P.P. 673-678.
- 64.Reid L.M. *et al* Recent technological advances for determination of food authentity//Trends in food science and technology, 2006, V.17, P.P. 344-353.
- 65. U. Resch-Genger et al. Traceability in Fluorometry: Part II. Spectral Fluorescence Standards // Journal of fluorescence, 2005, vol.15, № 3, P.P. 315-336
- 66..U. Resch-Genger and P. C. DeRose Fluorescence standards: Classification, terminology, and recommendations on their selection, use, and production (IUPAC Technical Report) Pure Appl. Chem. 2010, Vol. 82, No. 12, P. P. 2315–2335.
- 67. U. Resch-Genger, K. Hoffmann, and D. Pfeifer Simple calibration and validation standards for fluorometry // Reviews in fluorescence, 2007, P.P.1-31
- 68. D. Pfeifer, K. Hoffmann, A. Hoffmann, C. Monte and U. Resch-Genger The calibration kit spectral fluorescence standards A Simple and Certified

Tool for the Standardization of the Spectral Characteristics of Fluorescence Instruments // Journal of fluorescence, 2006, Vol.16, № 4, P.P. 581-587

- 69. BAM Federal Institute for Materials Research and Testing Standard Operation Procedure (SOP) for Use of CERTIFIED REFERENCE MATERIALS BAM-F001, BAM-F002a, BAM-F003, BAM-F004 and BAM-F005
- 70. U. Resch-Genger *et al* State-of-the Art Comparability of Corrected Emission Spectra. 2. Field Laboratory Assessment of Calibration Performance Using Spectral Fluorescence Standards // Analytical Chemistry, 2012, Vol. 84, № 9, P.P. 3899-3907
- 71. C. Monte.; U. Resch-Genger *et al* Linking Fluorescence Measurements to Radiometric Units, // Metrologia, 2006, vol.43, №2, , S89
- 72. Reference materials for fluorescence spectrophotometry // Starna Ltd
- 73. R. A. Velapoldi Considerations on Organic Compounds in Solution and Inorganic Ions in Glasses as Fluorescent Standard Reference Materials JOURNAL OF RESEARCH of the Notionol Bureou of Stondords- A. Physics and Chemistry, 1972, Vol. 76A, No. 6, P.P. 641-654
- 74. R. Reisfeld Inorganic Ions in Glasses and Polycrystalline Pellets as Fluorescence Standard Reference Materials, JOURNAL OF RESEARCH of the Notionol Bureou of Stondords- A. Physics and Chemistry, 1972, Vol. 76A, No. 6, P.P. 613-635
- 75.E. J. A. Pope Fluorescence Seminar D: Fluorescent Reference Standards. MATECH
- 76. P. C. DeRose *et al* Characterization of Standard Reference Material 2940, Mn-ion-doped glass, spectral correction standard for fluorescence // Journal of luminescence, 2009, Vol. 129, № 4, P.P. 349 – 355
- 77. NIST Certificate of analysis // Standard Reference Material 2940 Relative Intensity Correction Standard for Fluorescence Spectroscopy: Orange Emission

- 78. P. C. DeRose *et al* Characterization of Standard Reference Material 2941, uranyl-ion-doped glass, spectral correction standard for fluorescence // Journal of luminescence, 2008, Vol. 128, № 2, P.P. 257 – 266
- 79. NIST Certificate of analysis// Standard Reference Material 2941 Relative Intensity Correction Standard for Fluorescence Spectroscopy: Green Emission
- 80. P. C. DeRose *et al* Characterization of Standard Reference Material 2942, Ce-ion-doped glass, spectral correction standard for UV fluorescence // Journal of luminescence, 2011, Vol. 131, № 7, P.P. 1294 – 1299
- 81. NIST Certificate of analysis// Standard Reference Material 2942 Relative Intensity Correction Standard for Fluorescence Spectroscopy: Ultraviolet Emission
- 82. P. C. DeRose *et al* Characterization of Standard Reference Material 2943, Cu-ion-doped glass, spectral correction standard for blue fluorescence // Journal of luminescence, 2011, Vol. 131, № 12, P.P. 2509 – 2514
- 83. NIST Certificate of analysis // Standard Reference Material 2943 Relative Intensity Correction Standard for Fluorescence Spectroscopy: Blue Emission
- 84. P.C. DeRose, E.A. Early, and G.. Kramer // Qualification of a fluorescence spectrometer for measuring true fluorescence spectra// Review of scientific instruments, 2007, vol. 78, № 3, P.P. 033107 – 033118
- 85. В.В. Высоцкий, О.Я. Урюпина, А.В. Гусельникова, В.И. Ролдугин // О возможности определения концентрации наночастиц методом динамического светорассеяния // Коллоидный журнал, 2009, том 71, № 6, с. 728-733
- 86. C. Matzler Matlab codes for Mie scattering and absorption, 2002
- 87. S.Prahl Mie Scattering (Version 2-3-3); интернет ресурс <u>http://omlc.org/software/mie/mie_src.pdf</u>
- 88. Интернет-ресурс <u>www.refractiveindex.info</u> (база данных по показателям преломления)

- 89. B.N. Khlebtsov, V.A. Khanadeev, N.G. Khlebtsov. Extinction and extrahigh depolarized light scattering spectra of gold nanorods with improved purity and dimension tunability: direct and inverse problems // Phys. Chem. Chem. Phys., 2014, 16, P. 5710–5722
- 90. M. Glidden, M. Martin. Characterizing Gold Nanorods in Solution Using Depolarized Dynamic Light Scattering // J. Phys. Chem. C, V. 116, P.P. 8128–8137 (2012)
- 91. A.D. Levin, E.A. Shmytkova // Nonspherical nanoparticles characterization using partially depolarized dynamic light scattering //Proceedings of SPIE , Vol. 9526, P.P. 95260-1 – 95260-8
- 92. S. Asano, S., and G. Yamamoto // Light scattering by a spheroidal particle. Applied Optics, V 14, P.P. 29 – 49, (1975)
- 93. N.G. Khlebtsov // T-matrix method in plasmonics –An overview.// Journal of Quantitive Spectroscopy and Radiation Transfer, V.123, P.P. 184-217
- 94. W.R.C. Somerville, B. Auguié, E.C. Le Ru // User-friendly codes for fast and accurate calculations of light scattering by spheroids // Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer, 174 (2016) 39–55
- 95. Optical constants of noble metals, Phys. Rev. B, vol. 6, no. 12, pp. 4370– 4379, 1972
- 96. А.Ю. Садагов. Меры флуоресценции на основе неорганических стёкол. Магистерская диссертация, МИРЭА, институт кибернетики, кафедра ИС, 2015
- 97. Joanne C Zwinkels // Metrology of photoluminescent materials// Metrologia, 47, 2010, S182–S193
- 98. U. Resch-Genger1, D. Pfeifer1, K. Hoffmann1, G. Flachenecker1, A. Hoffmann1, C. Monte// Linking Fluorometry to Radiometry with Physical and Chemical Transfer Standards: Instrument Characterization and Traceable Fluorescence Measurements// Springer Ser Fluoresc, 2008, 5: 65–99

- 99.A.J Lawaetz and C.A. Stedmon // Fluorescence Intensity Calibration Using the Raman Scatter Peak of Water // Applied Spectroscopy, V.63, No.8, 2009
- 100. NIST Standard Reference Material 936a, Quinine sulfate dyhydrate, Certificate of Analysis, 1980
- 101. ГОСТ 9411-91 Стекло оптическое цветное. Технические условия
- 102. Л.В. Левшин, А.М. Салецкий. Оптические методы исследования молекулярных систем, изд.-во МГУ, М, 1994
- J.R. Lacowitz. Principles of Fluorescence spectroscopy. Third edition Springer 2006

104. J. Pisarska, M. Sołtys, L. Zur, W. A. Pisarski, C. K. Jayasankar// Excitation and luminescence of rare earth-doped lead phosphate glasses// Appl. Phys. B (2014) 116:837–845

105. Katrin Hoffmann, Monika Spieles, Wolfram Bremser, and Ute Resch-Genger// Narrow-Band Emitting Solid Fluorescence Reference Standard with Certified Intensity Pattern// Anal. Chem. 2015, 87, 7204–7210

Приложение А

Таблица 1 Данные о проанализированных образцах белых сухих вин

N⁰	Производитель	Название	Год	Дополнительные данные	Пики		
					синхронного сканирования	возбуждения	эмиссии
3	ООО «Кубанские вина»	Виноматериал столовый сухой белый обработан- ный Мускат	2011	Спирт 11,4% Титрируемая кислотность 6,0	276 нм 1,147 о.е.	275 нм 1,3 о.е.	367 нм 2,350.е.
9	ООО «АПК Мильстрим – Черноморские вина»	Виноматериал столовый сухой белый Цитронный	2013	Спирт 12,1% об Сахар 3,0 г/дм ³ Титрируемые кислоты 6,4 г/дм ³ Общий диоксид серы 77 г/дм ³ Летучие кислоты 0,42 г/дм ³	276 нм 0,72 о.е.	277 нм 0,883 0.е.	368 нм 1,435 0.е.
10	ООО «АПК Мильстрим – Черноморские	Вино геогр. наименования сухое белое «Шардоне Тамани»	2009	Спирт 11,4% об Сахар 2,0 г/дм ³	279 нм 2,348	277 нм 1,808	363 нм 3,518

	вина»			Титрируемые кислоты 4,8 г/дм ³	0.e.	0.e.	o.e.
				Общий диоксид серы 170 г/дм ³			
				Летучие кислоты 0,7 г/дм ³			
37	ООО «Коньячный	Виноматериал столовый	2012	Спирт 9-11% об	289 нм	289 нм	347 нм
	завод» Темрюк	сухой белый		Титрируемые кислоты 6,0±1,0 г/дм ³	2,403o.e.	1,0730.e.	2,525o.e.
44	ООО «Крымский	Виноматериал столовый		Спирт 10,6% об	279 нм	278 нм	351 нм
	винный завод»	сухой белый «Шардоне»			3,194o.e.	1,876 o.e.	3,78 o.e.
45	ООО «Крымский	Виноматериал столовый	-	Спирт 10,6% об	281 нм	277 нм	356 нм
	винный завод»	сухой белый			3,276 o.e.	2,032o.e.	4,027 o.e.
		«Пино Блан»					
46	ООО «Крымский	Виноматериал столовый	-	Спирт 10,8% об	281 нм	279 нм	358 нм
	винный завод»	сухой белый					
		«Пино Блан»			2,89 o.e.	1,982	3,850.e.
						0.0.	

53	ООО «Олимп»	Виноматериал столовый	2013	-	279 нм	281 нм	339 нм
		сухой белый			2,604 o.e.	1,127 o.e.	2,605 o.e.
54	ООО «Олимп»	Виноматериал столовый	2013	-	275 нм	275 нм	363 нм
		сухой белый Рислинг			1,524 o.e.	1,06 o.e.	1,976 o.e.
73	ЗАО «Славпром»	Виноматериал столовый	2012	Спирт 11,3% об	278 нм	275 нм	343 нм
		сухой белый		Сахар 3,8 г/дм ³			
				Титрируемые кислоты 5,2 г/дм ³	2,912o.e.	1,541o.e.	3,226 o.e.
				Общий диоксид серы 10/164 г/дм ³			
				Летучие кислоты 0,43 г/дм 3			
76	ЗАО «Славпром»	Виноматериал столовый	2013	Спирт 11,9% об	278 нм	279 нм	365 нм
		сухой белый		Титрируемые кислоты 5,9 г/дм ³			
				Общий диоксид серы 20/116 г/дм ³	2,3330.e.	2,050.e.	3,553 o.e.
				Летучие кислоты 0,36 г/дм ³			

80	Филиал ЗАО	Виноматериал столовый	2012	-	280 нм	277 нм	356 нм
	МПБК «ОЧАКОВО» «Южная винная компания»	сухой белый «Траминер»			3,02 o.e.	2,203 o.e.	4,51 o.e.
81	Филиал ЗАО МПБК «ОЧАКОВО» «Южная винная компания»	Виноматериал столовый сухой белый «Траминер»	2013		284 нм 2,144 о.е.	280 нм 1,516	357 нм 2,915 о.е.
83	Филиал ЗАО МПБК «ОЧАКОВО» «Южная винная компания»	С Виноматериал столовый сухой белый «Виорика»	2012		281 нм 1,679 о.е.	272 нм 1,88 о.е.	363 нм 3,479 о.е.

173

Таблица 2 Данные о проанализированных образцах белых полусладких вин

№	Производитель	Название	Год	Дополнительные данные	Пики		
					синхронного	возбуждения	эмиссии
					сканирования		
8	ООО «АПК	Виноматериал столовый	2012	Спирт 10,5%	291 нм	292 нм	347 нм
	Мильстрим – Черноморские	полусладкий белый		Сахар 36,0 г/дм ³	0,707o.e.	0,363 o.e.	0,707o.e.
	вина»			Титрируемые кислоты 6,0 г/дм ³			
				Общий диоксид серы 180 г/дм ³			
				Летучие кислоты 0,6 г/дм ³			
14	ООО «Кубанская	Вино столовое	2013	Спирт 10,0-12,0 %	291 нм	291 нм	345 нм
	винная компания»	полусладкое белое «Мускат»PLAISANCE		Сахар 40 г/дм ³	0,656 o.e.	0,259 o.e.	0,65o.e.
15	ООО «Кубанская	Вино столовое	2013	Спирт	294 нм	296 нм	343 нм
	винная компания»	полусладкое белое «Райская лагуна»		9,0-11,0%	0,61o.e.	0,257o.e.	0,597o.e.
				Сахар 35 г/дм'			

29	ООО «Кубань -	Напиток винный	2007	Спирт 18,8% об	275 нм	322 нм	423 нм
	Вино»	«Мадера Кубанская		Caxap			
		выдержанная. Шато		Curup			
		Тамань Резерв»		41,5 г/дм ³	0,357o.e.	0,629o.e.	1,017 o.e.
				Титрируемые кислоты			
				5,9 г/дм ³			
30	ООО «Кубань -	Винный напиток	2011	Спирт 15,9% об	281 нм	277 нм	353 нм
	Вино»	«Траминер десертныйю.		Cayap 160.7 r/Im^3			
		Шато Тамань»		Сахар 100,717дм			
				Титрируемые кислоты 4,6 г/дм ³	4,251 o.e.	2,972o.e.	5,925 o.e.
38	ООО «Коньячный	Виноматериал столовый	2012	Спирт 9-11% об	276 нм	274 нм	342 нм
	завод» Темрюк	полусладкий белый		Сахар 30-40 г/дм ³	1,901 o.e.	0,805 o.e.	1,973o.e.
				Титрируемые кислоты			
				6,0±1,0 г/дм ³			

72	ЗАО «Славпром»	Виноматериал столовый	2012	Спирт 10,6%	279 нм	290 нм	353 нм
		полусладкий белый «Мускатное»		Сахар 37,9 г/дм ³	0,669 o.e.	0,344 o.e.	0,677o.e.
				Титрируемые кислоты 5,2 г/дм ³			
				Общий диоксид серы 20/164 г/дм ³			
				Летучие кислоты 0,59 г/дм ³			
79	ЗАО «Славпром»	Виноматериал столовый	2010	Спирт 10,8%	291 нм	291 нм	354 нм
		полусладкий белый		Сахар 38,8 г/дм ³	0,801 o.e.	0,421 o.e.	0,85 o.e.
				Титрируемые кислоты 5,2 г/дм ³			
				Общий диоксид серы			
				20/167 г/дм ³			
				Летучие кислоты 0,50 г/дм ³			
90	ООО «Торговый	Вино столовое	2013	Спирт 10-12% об	289 нм	295 нм	366 нм
	Дом «Виктория»	полусладкое белое «Мускатное»		Сахар 40 г/дм ³	0,314o.e.	0,24o.e.	0,341o.e.

91	ООО «АПК	Вино столовое	2013	Спирт 9-11% об	289 нм	290 нм	351 нм
	Мильстрим – Черноморские	полусладкое белое «Изумрудная лоза»		Сахар 30-40 г/дм ³	0,988o.e.	0,503o.e.	1,012o.e.
	вина»						
94	«Ст. Катаринен	Вино белое полусдакое	2013	Спирт	278 нм	278 нм	341 нм
	Вайнкеллерей ГмБХ» Германия	географического наименования – регион Рейнхессен категория QbA «КАРЛ ДИТРИХ		8,5% об Сахар	3,768 o.e.	1,668 o.e.	4,021o.e.
		Молоко любимой женщины»		18-44 г/дм°			

Приложение Б

УТВЕЖДАЮ Первый заместитель директора УП «ВНИИОФИ» В.С. Иванов 2016 г.

AKT

внедрения в Федеральном государственном унитарном предприятии «Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений» (ФГУП «ВНИИОФИ») программы для ЭВМ «Программа управления и обработки данных для спектрофотометра - флуориметра СФФ-2 ФЛУОРАН»

Авторы: А.Н. Шушунов, А.Е. Егоров, А.Д. Левин, А.Ю. Садагов.

Настоящим актом составлен о том, что во ФГУП «ВНИИОФИ» внедрена разработанная авторами программа для ЭВМ по управлению и обработке данных для спектрофотометра-флуориметра СФФ-2 «ФЛУОРАН». Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2015662353 от 20 ноября 2015 года, дата поступления 25 августа 2015 года.

Разработанная программа реализована в спектрофотометре-флуориметре СФФ-2 «ФЛУОРАН», разработанном в лаборатории аналитической спектроскопии и метрологии наночастиц ФГУП «ВНИИОФИ» (Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений № 51314-12).

Зам. начальника лаборатории, канд. физ-мат. наук

J А.И. Нагаев

УТВЕЖДАЮ Первый заместитель директора ФІ УП «ВНИИОФИ» В.С. Иванов 02. 2016 г.

AKT

внедрения в Федеральном государственном унитарном предприятии «Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений» (ФГУП «ВНИИОФИ») программы для ЭВМ «Программа обработки размеров наночастиц и автокорреляционных функций для лазерного анализатора геометрических параметров наночастиц»

Авторы: А.Н. Шушунов, А.Е. Егоров, А.Д. Левин, А.Ю. Садагов.

Настоящим акт составлен о том, что во ФГУП «ВНИИОФИ» внедрена разработанная авторами программа для ЭВМ по обработке размеров наночастиц и автокорреляционных функций для лазерного анализатора геометрических параметров наночастиц. Свидетельство о государственной регистрации программ для ЭВМ № 2016610001 от 11 января 2016 года, дата поступления 25 августа 2015 года.

Программа для ЭВМ использована для прикладных научных исследований «Разработка оптических методов диагностики и технологии создания оптических анализаторов для определения геометрических и электрокинетических параметров несферических наноразмерных объектов в жидких средах» в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (соглашение о предоставлении субсидии от 21.10.2014 г. № 14.624.21.0009).

УТВЕЖДАЮ Директор ФГУП «ВНИИОФИ» т.н. В.И. Крутиков 032017 r.

AKT

внедрения в Федеральном государственном унитарном предприятии «Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений» (ФГУП «ВНИИОФИ») изобретения «Способ оптического измерения счетной концентрации дисперсных частиц в жидких средах и устройство для осуществления»

Авторы: А.Д. Левин, А.Ю. Садагов.

Настоящим актом подтверждается следующее. Во ФГУП «ВНИИОФИ» внедрено разработанное авторами изобретение, представляющее собой способ оптического измерения счетной концентрации дисперсных частиц в жидких средах и устройство для осуществления. Патент на изобретение №2610942 от 17 февраля 2017 года, приоритет изобретения от 02 декабря 2015 года.

Данное изобретение использовано в прикладных научных исследований «Разработка оптических методов диагностики и технологии создания оптических анализаторов для определения геометрических и электрокинетических параметров несферических наноразмерных объектов в жидких средах» в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (соглашение о предоставлении субсидии от 21.10.2014 г. № 14.624.21.0009).

Предложенный способ реализован в анализаторе размеров и электрокинетического потенциала наночастиц, создаваемом в рамках указанных научных исследований.

Начальник лаборатории аналитической спектроскопии и метрологии наночастиц канд. физ-мат, наук

di la

А.И. Нагаев

УТВЕЖДАЮ Заместитель директора по инновациям ФГУП «ВНИИОФИ» С. Филимонов 2017 г.

AKT

внедрения в Федеральном государственном унитарном предприятии «Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений» (ФГУП «ВНИИОФИ») изобретения «Способ определения размеров наночастиц, добавленных в исходный коллоидный раствор»

Авторы: А.Д. Левин, Е.А. Шмыткова, А.Ю. Садагов.

Настоящим актом подтверждается следующее. Во ФГУП «ВНИИОФИ» внедрено разработанное авторами изобретение, представляющее собой способ определения размеров наночастиц, добавленных в исходный коллоидный раствор. Патент на изобретение №2630447 от 07 сентября 2017 года, приоритет изобретения от 16 ноября 2016 года.

Данное изобретение использовано в прикладных научных исследований «Разработка оптических методов диагностики и технологии создания оптических анализаторов для определения геометрических и электрокинетических параметров несферических наноразмерных объектов в жидких средах» в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (соглашение о предоставлении субсидии от 21.10.2014 г. № 14.624.21.0009).

Предложенный способ реализован в анализаторе размеров и электрокинетического потенциала наночастиц, разработанном в рамках указанных научных исследований.

Начальник лаборатории Р-3, А.И. Нагаев канд. физ-мат. наук Научный руководитель работы А.Д. Левин Доктор техн. наук

180


Общество с ограниченной ответственностью

«КОРТЭК»

119602, г.Москва, ул.Никулинская, д.27, корп.2, ИНН/КПП 7713011865/772901001, p/c 4070281043818 01 00952 в Московском Банке ПАО Сбербанк, г. Москва, БИК 044525225, к/с 30101 810 400000000 225 ОГРН 1037739255510, ОКВЭД 33.20 33.40 73.10 74.30 72.20 52.61, ОКПО 29903757 Тел./факс: (495) 212-93-71 многоканальный Эл. почта: office@cortec.ru (приемная), sale@cortec.ru (отдел маркетинга); <u>www.cortec.ru</u>

На № от « » 20 г.

Исх. № _____ от « _____ 2017 г.

AKT

внедрения в ООО «КОРТЭК»

Экспериментального образца лазерного анализатора размеров и электрокинетического потенциала наночастиц в жидких средах

Разработанный ФГУП «ВНИИОФИ» по Соглашению о предоставлении субсидии МИНОБРНАУКИ от 21.10.2014 г. № 14.624.21.0009 «Экспериментальный образец лазерного анализатора размеров и электрокинетического потенциала наночастиц в жидких средах» передан для внедрения в ООО «КОРТЭК» одновременно с технической документацией и проектом ТЗ на ОКР. ООО «КОРТЭК» планирует проведение ОКР с изготовлением 2 опытных образцов и передачи их для проведения испытаний с целью утверждения типа средств измерений до конца 2017 года.

Разработка прибора проводилась сотрудниками ФГУП «ВНИИОФИ» А.Д. Левиным, А.И. Нагаевым и А.Ю. Садаговым при участии ООО «КОРТЭК» как индустриального партнера.

Директор ООО «КОРТЭК», доктор технических наук

