

3. *Paragios N., Tziritas G.* Detection and Location of Moving Objects Using Deterministic Relaxation Algorithms // Proceeding of ICPR, Vienna, 1996.
4. *Iketani A.* Real-Time Moving Object Detection System for Visual Surveillance // from research list of Shirai Laboratory, University of Osaka, 1997.
5. *Aisbett J.* Optical Flow with an Intensity-Weighted Smoothing // IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 11, 5, 1989. С. 512–522.
6. *Verri A., Poggio T.* Motion Field and Optical Flow: Qualitative Properties // IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 11, 5, 1989. С. 490–498.
7. *Абламейко С. В., Лагуновский Д. М.* Обработка изображений: технология, методы, применение. Учебное пособие. Мн.: Амалфея, 2000.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПАРАМЕТРОВ ИЗМЕРЕНИЯ КРИВЫХ ЗАТУХАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ НА КАЧЕСТВО ИХ АНАЛИЗА

Н. В. Лутковская

Для развития современного естествознания (биологии, медицины, химии) важное значение имеет изучение структуры веществ и процессов, происходящих в них, в частности, при создании новых молекул, исследовании чистоты вещества и др. Флуоресцентные методы анализа структуры вещества, которым присуща высокая чувствительность, часто используются для этих целей.

В данной работе на основе статистического анализа экспериментальных данных проводилось исследование зависимости качества восстановления времени затухания флуоресценции от параметров измерения кривых затухания флуоресценции. Из анализа можно сделать вывод о том, какие методики лучше использовать для качественного восстановления параметров кривых затухания и какая длительность измерений является наиболее оптимальной. Актуальность таких исследований объясняется тем, что, во-первых, избыточное время измерений приводит к дополнительному накоплению ошибок, во-вторых, к увеличению суммарного времени проведения эксперимента и анализа.

Флуоресценция, одна из разновидностей люминесценции, – это испускание фотонов из электронно-возбужденных состояний. Временем затухания флуоресценции считают среднее время, за которое число молекул в возбужденном состоянии уменьшилось в e раз [1]. Кривые затухания измеряются методом счета единичных фотонов и представляют собой гистограмму времен прихода первых фотонов от каждого возбуждающего импульса лазера. Кривые можно представить в виде суммы экспонент:

$$F(t) = \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i},$$

где α_i – предэкспоненциальный коэффициент, определяющий относительный вклад в кривую затухания компоненты с временем затухания τ_i .

Известно, что экспериментально измеряется не кривая затухания, а ее свертка с импульсной функцией отклика оборудования $L(t)$:

$$R(t) = \int_0^t L(t')F(t-t')dt'.$$

$L(t)$ измеряют на возбуждающей длине волны, используя раствор, рассеивающий свет, и называют также рассеивателем. Для уменьшения погрешностей вычислений переходят к измерению эталонного образца – функции отклика оборудования, измеренной на длине волны испускания флуоресценции.

Для восстановления параметров необходимо произвести операцию обратной свертки. Для решения этой сложной задачи обычно используют численные методы. Для восстановления параметров была использована программа KUL TRFA Global Analysis Program, в которой реализован градиентный оптимизационный метод Марквардта-Ливенберга.

В программе используется два метода нахождения параметра τ : метод наименьших квадратов (МНК) и метод максимального правдоподобия (ММП) для биномиальной и пуассоновской статистики. Метод выбирается с позиций вида распределения шума кривой затухания [2–5]. По определению распределение шума в канале анализатора подчиняется биномиальному закону, но при достаточно большом количестве накопленных фотонов может аппроксимироваться пуассоновским и гауссовским распределениями.

В работе проводится анализ на основе экспериментально полученных данных в университете Вагенингена, Голландия. В качестве образца использовался паратерфенил в циклогексане, флуоресценцию которого наблюдали на длине волны 350 нм. Для определения функции отклика оборудования в качестве рассеивателя использовался гликоген в воде. Эксперименты проводились группами в зависимости от времени измерения образца. Измеряли эталонный образец 60 с, после чего 12 раз измеряли образец. Таких групп экспериментов было 5.

Для каждой группы были построены зависимости среднего значения τ и стандартного отклонения от времени измерения образца (рис. 1). Значение $\tau = 0,122$ нс для одноэкспоненциальной модели хорошо восстанавливается методом максимального правдоподобия при длительности из-

мерения образца всего 1 с, но для достижения хорошей точности необходимо 4 с. ММП для биномиального и пуассоновского распределений дает одинаково хороший результат, т. к. при числе фотонов в каждом канале уже более 30 пуассоновское распределение хорошо аппроксимирует биномиальное распределение.

Однако нельзя и слишком долго измерять образец. Это приводит к тому, что значения начинают «плыть». При времени измерения образца 240 с помимо информации об измеряемом веществе накапливается информация о примесях, нестабильностях системы. При восстановлении параметров программа начинает это воспринимать, как появление второй экспоненты с малым временем затухания и малым предэкспоненциальным фактором ($\tau_2 = 0,047$ нс, $\alpha_2 = 0,04$), хотя известно, что исследуемое вещество одноэкспоненциальное.

Как видно из рис. 1 б стандартное отклонение уменьшается при увеличении времени измерения и не зависит существенно от метода.

Из проведенных исследований можно сделать вывод, что для восстановления параметров лучше всего использовать метод максимального правдоподобия, поскольку он дает несмещенные оценки для любого времени измерения. Для одноэкспоненциального затухания достаточно измерять образец всего 4 с. Вообще в литературе показано, что для восстановления времени затухания флуоресценции с погрешностью 10 % достаточно всего 185 фотонов, что соответствует времени измерения порядка 0,1 с [6].

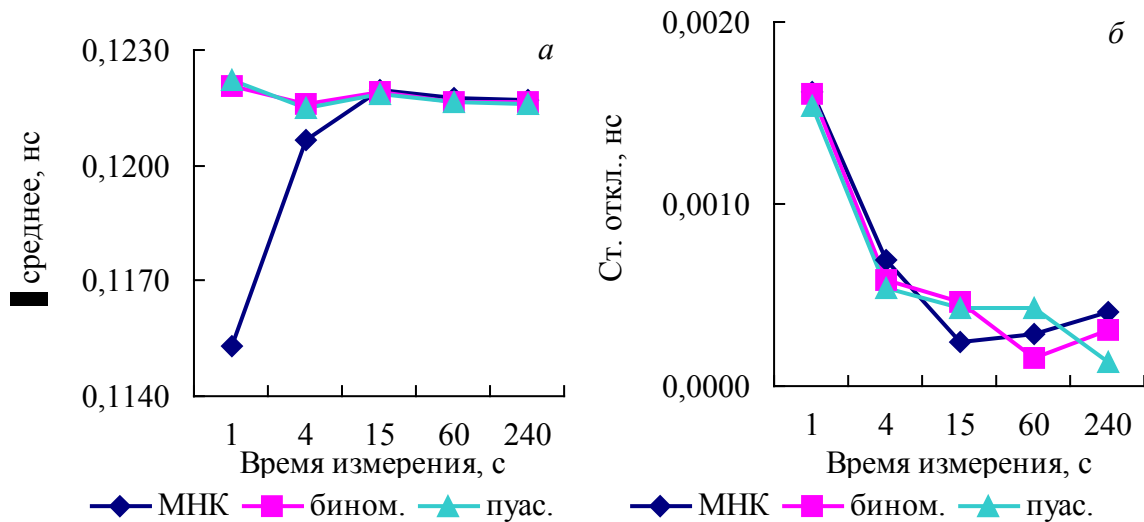


Рис. 1. Влияние времени измерения образца:
a – на значения τ среднего, *б* – на стандартные отклонения

Как было сказано выше, рассеиватель переизмерялся. Встал вопрос о его стабильности. Для этого были сформированы новые данные для анализа, причем для деконволюции использовался только первый рассеиватель. Из графиков рис. 2. видно, что значения τ существенно не изменились.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что в течение всего времени проведения экспериментов (1–1,5 часа) рассеиватель был стабилен, т. е. аппаратная погрешность была невысокой.

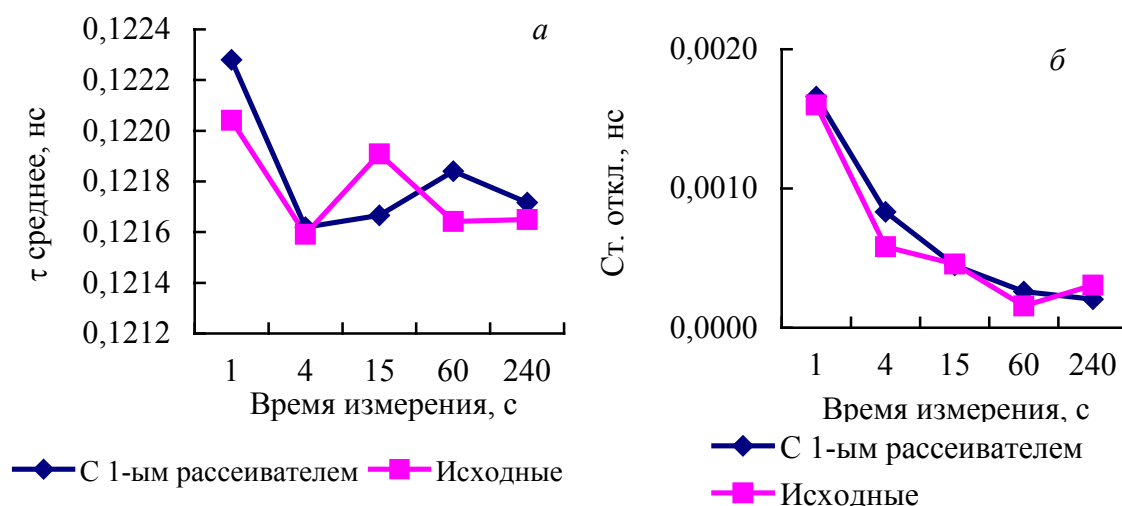


Рис. 2. Влияние эталонного образца на качество восстановления параметров:
a – на среднее τ , *б* – на стандартное отклонение

Литература

1. Лакович Д. Основы флуоресцентной спектроскопии. М., 1986.
2. Grinvald A. Steinberg I. Z. On the analysis of fluorescence decay kinetics by the method of least-squares. //Analytical Biochemistry V.59, №2, 1974.
3. O'Connor D. V. Time-correlated single photon counting. N.Y., 1984.
4. Demas J.N. Excited state lifetime measurements. N.Y., 1983.
5. Straume M., Frasier-Cadoret S., Johnson M.L. Least-squares analysis of fluorescence data. // Statistics in fluorescence spectroscopy. N.Y., 1991. V. 2. P. 115–136.
6. Koellner M., Wolfrum J. How many photons are necessary for fluorescence-lifetime measurements? // Statistics in fluorescence spectroscopy. N.Y., 1994. V. 4. P. 45–50.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ОПТИЧЕСКОЙ ТЕРМОГРАФИИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ЛЮДЕЙ ПОД ЗАВАЛАМИ

О. Л. Маевская

Природные и техногенные чрезвычайные ситуации зачастую приводят к обрушениям зданий и сооружений, под завалами которых могут ока-