

# Lecturas erróneas en espectrofluorimetría \*

por

JOSÉ M.<sup>a</sup> MIRALLES FERNANDEZ \*\*

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de espectrofluorómetros utilizan monocromadores de red de difracción, ya que tienen un poder de resolución mucho mayor que los monocromadores construidos a base de prismas. Sin embargo, presentan un inconveniente: la luz monocromática incidente es desviada, no en una sola dirección como en los prismas, sino en distintas direcciones con ángulos perfectamente determinados.

Consecuencia de ello es que si la luz incidente es blanca, obtendremos en una dirección determinada una gama de radiaciones de longitudes de onda  $\lambda$ ,  $\lambda/2$ ,  $\lambda/3$ , etc.

Ello puede dar lugar a falsas interpretaciones en las lecturas, y ya ha ocurrido de hecho con el mal llamado «scattering de 2.º orden»: UDENFRIEND (1962) y BALLESTER (1973). En este trabajo se estudiarán las más importantes y el modo de evitarlas.

### 1. ECUACIÓN DE LA RED DE DIFRACCIÓN

Supongamos una luz monocromática de longitud de onda  $\lambda$  que incide sobre la superficie de la red bajo un cierto ángulo  $i$ . STOKES (1966) demuestra la existencia de un conjunto discreto de ondas planas di-

\* Recibido el 7 de octubre de 1975.

\*\* Instituto de Investigaciones Pesqueras. Becario de Educación y Ciencia.

fractadas, de la misma longitud de onda que la incidente, y formando ángulos  $i'_m$  con la superficie de la red. Se cumple la ecuación

$$\text{sen } i + \text{sen } i'_m = m \frac{\lambda}{a} \quad (1)$$

donde  $a$  es la constante espacial de la red, y  $m$  un número entero. El valor de  $m$  es lo que se llama orden o modo de la onda difractada (ver figura 1).

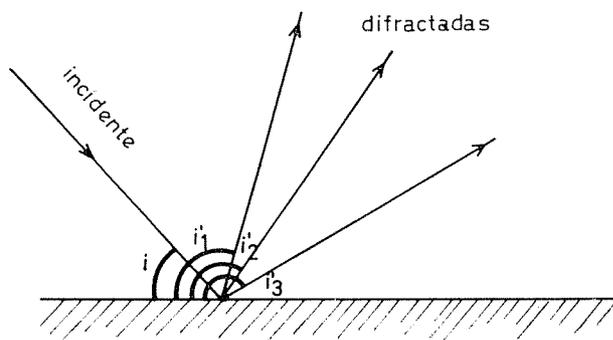


FIG. 1. Distintos órdenes de difracción de una radiación monocromática.

La distribución de energía según los distintos modos puede encontrarse en HANDBUCH DER PHYSIK (1967), e indiquemos solamente que decrece con valores de  $m$  crecientes.

## 2. CONSECUENCIAS IMPORTANTES

Supongamos ahora que la luz incidente sea blanca. Fijados  $i$  e  $i'$  la ecuación (1) se cumplirá para las siguientes longitudes de onda:

$$\begin{array}{ll} m = 1 & \lambda = x \\ m = 2 & \lambda = x/2 \\ m = 3 & \lambda = x/3 \end{array}$$

siendo  $x = a (\text{sen } i + \text{sen } i')$ .

Es decir, que fijada una posición del monocromador de excitación, por ejemplo, 600 nm, se envía hacia la muestra la siguiente radiación:

El primer modo de la luz de 600 nm.

El segundo modo de la luz de 300 nm.

El tercer modo de la luz de 200 nm.

Etc.

Análogamente, fijado el monocromador de emisión en 600 nm, llegarán al fotomultiplicador las mismas radiaciones anteriores, en el caso de que sean emitidas por las muestra.

Igualmente, la luz de excitación de  $\lambda$  nm llegará hasta la muestra, no solamente con el monocromador de excitación en la posición de  $\lambda$  nm, sino también en las posiciones  $2\lambda$ ,  $3\lambda$ , etc.; y la luz de  $\lambda$  nm emitida por la muestra llegará al fotomultiplicador en las posiciones  $\lambda$ ,  $2\lambda$ ,  $3\lambda$ , etcétera.

### 3. FALSAS LECTURAS

Supongamos que en el espectrofluorómetro colocamos en el lugar de la muestra un espejo. Fijemos el monocromador de excitación en la posición  $\lambda$  nm. Como hemos visto, en este caso llegarán al espejo las radiaciones de longitud de onda  $\lambda$ ,  $\lambda/2$  y  $\lambda/3$ . (Despreciaremos, para simplificar, los valores de  $m$  mayores que 3.)

Al hacer el espectro de emisión, cada una de estas radiaciones nos dará una señal en las siguientes posiciones del monocromador de emisión:

<i>Radiación</i>	<i>Detectada en las posiciones</i>
$\lambda$	$\lambda$ , $2\lambda$ , $3\lambda$
$\lambda/2$	$\lambda/2$ , $\lambda$ , $3\lambda/2$
$\lambda/3$	$\lambda/3$ , $2\lambda/3$ , $\lambda$

con lo cual, el espectro de emisión presentará los siguientes máximos:

$$3\lambda, 2\lambda, 3/2\lambda, \lambda, 2/3\lambda, \lambda/2, \lambda/3$$

cuando lo esperado era un único máximo en  $\lambda$ , ya que lo único que hace el espejo es reflejar la luz incidente.

Análogamente, fijando el monocromador de emisión en la posición  $\lambda$  nm, podrán penetrar en el fotomultiplicador las luces de longitudes de onda  $\lambda$ ,  $\lambda/2$  y  $\lambda/3$  que podrán llegar al espejo en las siguientes posiciones del monocromador de excitación:

<i>Radiación detectada</i>	<i>Emitida en las posiciones</i>
$\lambda$	$\lambda$ , $2\lambda$ , $3\lambda$
$\lambda/2$	$\lambda/2$ , $\lambda$ , $3\lambda/2$
$\lambda/3$	$\lambda/3$ , $2\lambda/3$ , $\lambda$

con lo cual, el espectro de excitación presentará los máximos:

$$3\lambda, 2\lambda, 3/2\lambda, \lambda, 2/3\lambda, \lambda/2, \lambda/3$$

en lugar de un único máximo en  $\lambda$ .

#### 4. ANÁLISIS MATEMÁTICO

Continuando con un espejo en lugar de la muestra, analizaremos solamente el espectro de emisión, y limitándonos a  $m = 1, 2, 3$ .

$I(\lambda)$ : lectura del espectrofluorómetro

$E(\lambda)$ : espectro de emisión de la lámpara

$\varphi(\lambda)$ : respuesta del fotomultiplicador

$\theta(\lambda, m)$ : transmitancia del monocromador de excitación en posición  $\lambda$  para la luz de  $\lambda/m$  nm

$\theta'(\lambda, m)$ : id. id emisión.

Considerando que la transmitancia del espejo es del 100 %, la lectura será proporcional a la intensidad de la luz emitida por la lámpara, a la respuesta del fotomultiplicador, y a las transmitancias de ambos monocromadores.

Según esto, colocando el monocromador de excitación en  $\lambda$  nm, y aparte una constante propia del aparato, obtendríamos las siguientes lecturas del espectro de emisión:

$$I(3\lambda) = E(\lambda) \varphi(\lambda) \theta(\lambda, 1) \theta'(3\lambda, 3)$$

$$I(2\lambda) = E(\lambda) \varphi(\lambda) \theta(\lambda, 1) \theta'(3\lambda, 2)$$

$$I(3/2\lambda) = E(\lambda/2) \varphi(\lambda/2) \theta(\lambda, 2) \theta'(3/2\lambda, 3)$$

$$I(2/3\lambda) = E(\lambda/3) \varphi(\lambda/3) \theta(\lambda, 3) \theta'(2/3\lambda, 2)$$

$$I(\lambda/2) = E(\lambda/2) \varphi(\lambda/2) \theta(\lambda, 2) \theta'(\lambda/2, 1)$$

$$I(\lambda/3) = E(\lambda/3) \varphi(\lambda/3) \theta(\lambda, 3) \theta'(\lambda/3, 1)$$

Para la señal en  $\lambda$ , puesto que proviene de la reflexión de tres tipos distintos de luz ( $\lambda, \lambda/2$  y  $\lambda/3$ ), tendremos

$$\begin{aligned} I(\lambda) &= E(\lambda) \varphi(\lambda) \theta(\lambda, 1) \theta'(\lambda, 1) \\ &+ E(\lambda/2) \varphi(\lambda/2) \theta(\lambda, 2) \theta'(\lambda, 2) \\ &+ E(\lambda/3) \varphi(\lambda/3) \theta(\lambda, 3) \theta'(\lambda, 3) \end{aligned}$$

## NOTAS:

1) Se ha supuesto que los distintos modos de las ondas difractadas son radiaciones perfectamente monocromáticas. Ello no es exactamente cierto, pues cada modo es un haz de luz casi-monocromático, dependiendo, la anchura de banda, de la red de difracción y de la geometría de cada aparato. Por ejemplo, en el espectrofluorómetro TURNER 430, los espectros teóricos del primer modo de la luz difractada son del tipo de la figura 2.

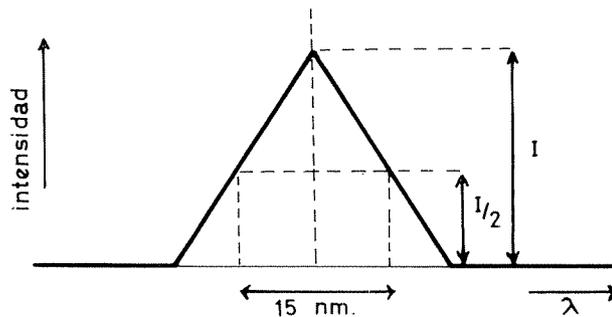


FIG. 2

El tener esto en cuenta, complicaría algo las fórmulas anteriores, pero cualitativamente no tiene ninguna trascendencia.

2) PRICE (1962) hace mención del segundo modo de difracción y de su detección en el espectrofluorómetro Aminco-Bowman, aunque no hace mención de los modos de tercer o cuarto orden que también pueden ser importantes en ciertos casos.

3) Debido a impurezas en la red de difracción, pueden existir también los llamados «ghosts» (fantasmas) y que corresponden a modos de difracción con  $m$  cualquiera (no necesariamente entero). Estos «fantasmas» pueden tener más importancia aún que los modos de tercer y cuarto orden, y de hecho, así lo hemos observado. Puesto que son debidos a impurezas, no pueden tratarse de una manera teórica, y debe investigarse su existencia o no, en cada aparato en particular.

## 5. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y CONCLUSIONES

En un espectrofluorómetro TURNER 430, se han realizado tres tipos de lecturas:

a) Una serie de espectros de emisión excitando a 200, 3000, ..., 700 nm y utilizando papel de aluminio (a modo de espejo) como mues-

tra. Se ha comprobado la existencia de algunos de los máximos teóricos antes indicados (fig. 3) dependiendo de la luz de excitación la aparición de unos u otros. Algunos de ellos están bastante desplazados respecto al valor teórico, lo cual es lógico, ya que el error del aparato en la lectura de la longitud de onda, es mucho mayor para los modos segundo y tercero que para el primero. Además pueden aparecer otros máximos no previstos teóricamente, y que son debidos a los antes mencionados «ghosts» o «fantasmas». Por otra parte, hemos tenido en cuenta solamente valores de  $m$  no superiores a 3, pero para  $m = 4, 5$ , etc. aparecen otros máximos, cada vez de menor importancia.

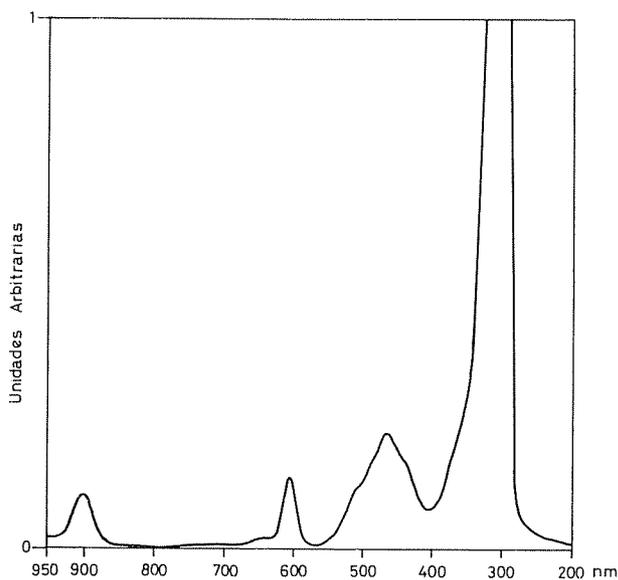


FIG. 3. Espectro de emisión excitando a 300 nm. Como muestra se ha colocado un espejo. Obsérvense los máximos debidos a los distintos órdenes de difracción.

La eliminación de señales no deseables, puede hacerse utilizando diversos filtros ópticos, de modo que nos eliminen las radiaciones que no correspondan al primer modo, ya sea en excitación, ya en emisión, según convenga. La eliminación de señales en la serie «espejo» se ha comprobado utilizando distintos filtros en la ventana de excitación (figs. 4a-b y 5a-b).

*b)* Otra serie de lecturas (espectros de emisión) con suspensiones de arena en agua de mar como muestra, comprobándose la existencia de

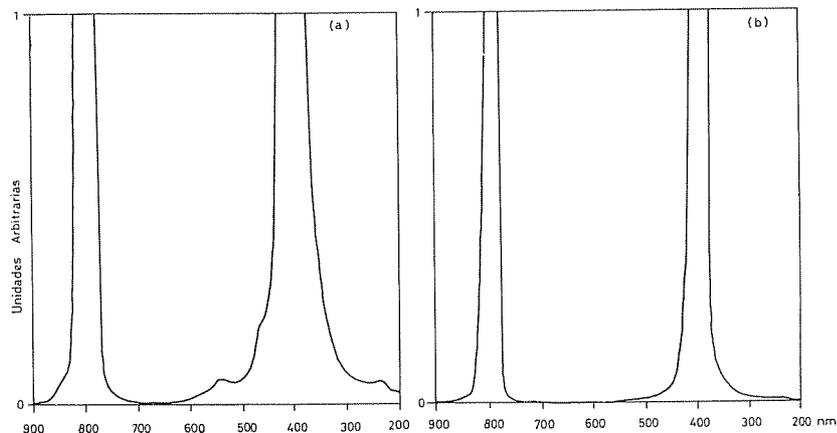


FIG. 4. Espectros de emisión (la muestra es un espejo) excitando a 400 nm: *a*) sin filtro óptico; *b*) se ha colocado en excitación un filtro de paso estrecho con el máximo de transmitancia aproximadamente en 400 nm. Obsérvese la desaparición de algunos máximos secundarios debidos a señales «fantasmas».

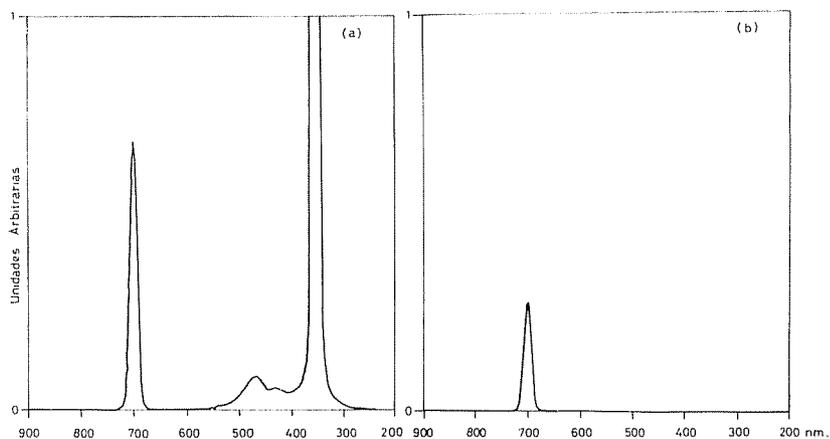


FIG. 5. Espectros de emisión (la muestra es un espejo) excitando a 700 nm: *a*) sin filtro; *b*) colocando en excitación el filtro rojo 2-64. Obsérvese la desaparición de todas las señales excepto la existente en 700 nm (única real).

la señal en  $2\lambda$ , el llamado scattering de segundo orden (fig. 6a), y a sensibilidades muy grandes aparece también la señal en  $3/2\lambda$ . Con la utilización de filtros en emisión, se eliminan los «scattering de segundo orden» (fig. 6b), y con filtros en excitación, la señal en  $3/2\lambda$  (que es debida a la excitación con luz de  $\lambda/2$  nm).

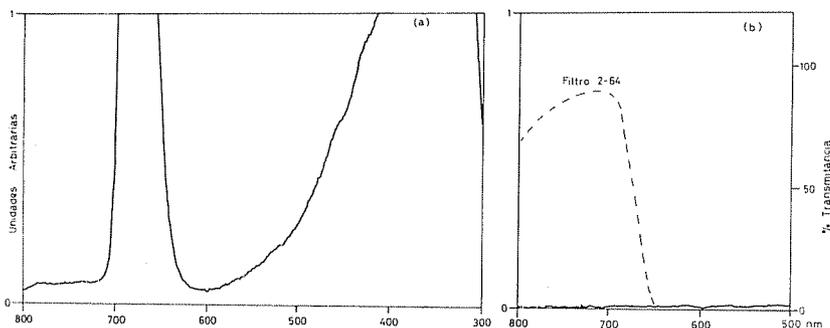


FIG. 6. Espectros de emisión de una suspensión de arena en agua de mar, excitando a 340 nm: a) sin utilizar filtros; observar el llamado «scattering de segundo orden»; b) utilizando en la ventana de emisión el filtro 2-64 (cuya transmitancia se indica en la figura). El scattering de segundo orden desaparece a pesar de que el filtro tiene una transmitancia del 70 % en esta zona del espectro. El scattering Rayleigh tampoco se observa debido a la transmitancia nula del filtro para longitudes de onda menores que 600 nm.

Es difícil observar los otros máximos, ya que con arena lo que estamos midiendo es el scattering Rayleigh-Tyndall (y a un ángulo de  $90^\circ$  de la luz incidente), que es de mucha menor intensidad que la luz reflejada por el espejo. En una suspensión (o en una disolución), prácticamente sólo tiene importancia el «scattering de segundo orden», y a veces se observan las señales en  $\lambda/2$  y  $3/2\lambda$ .

Téngase presente además, que utilizando cubetas Pyrex, no transparentes al UV, y excitando con radiaciones de longitud de onda inferior a los 450 nm se eliminan totalmente los modos segundo y tercero de la luz de excitación. (Con cubetas de cuarzo no ocurre así.) Finalmente, señalemos que en la lectura del scattering de primer orden, si no se utilizan filtros, se leen también los scattering debidos a  $\lambda/2$  y  $\lambda/3$ . (Obsérvese en la serie «espejo» cómo el máximo desciende más de lo que prevé la absorción del filtro en dicha longitud de onda.)

c) Una serie de lecturas con suspensiones de arena y otra con *Tetraselmis* «in vivo». Excitando a 470 nm, aparecían en ambas series (arena y *Tetraselmis*) lecturas a 680 nm. Utilizando un filtro rojo de corte en emisión, se ha comprobado que con la arena desaparecía totalmente la señal (señal en  $3/2\lambda$ ), mientras que con *Tetraselmis* no desaparecía debido a la existencia de la fluorescencia (figs. 7a-b).

Finalmente, un espectro de excitación (emisión a 680 nm y con un filtro rojo de corte) de *Tetraselmis* «in vivo», muestra un máximo de excitación a 465 nm, pero no aparece el máximo de segundo orden en 340 nm: si bien hay excitación de la fluorescencia en dicha longitud de onda, no aparece ningún máximo local (fig. 8).

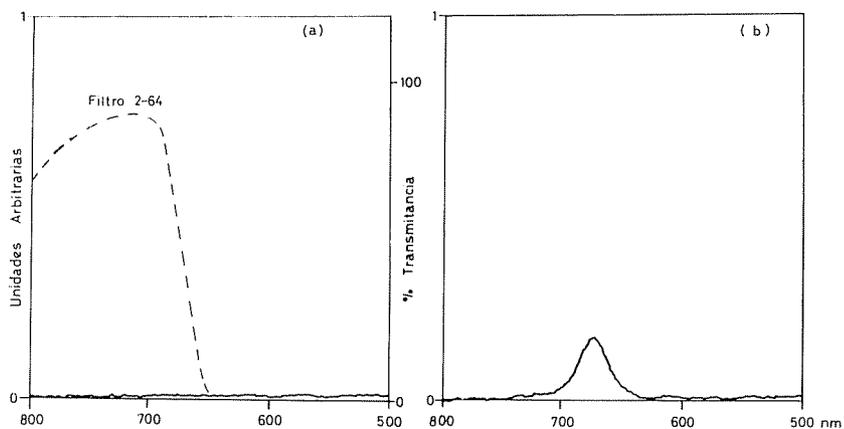


FIG. 7. Espectros de emisión de: a) suspensión de arena, y b) *Tetraselmis* «in vivo». La excitación se ha hecho a 470 nm. En la ventana de emisión se ha colocado el filtro 2-64 en ambos espectros.

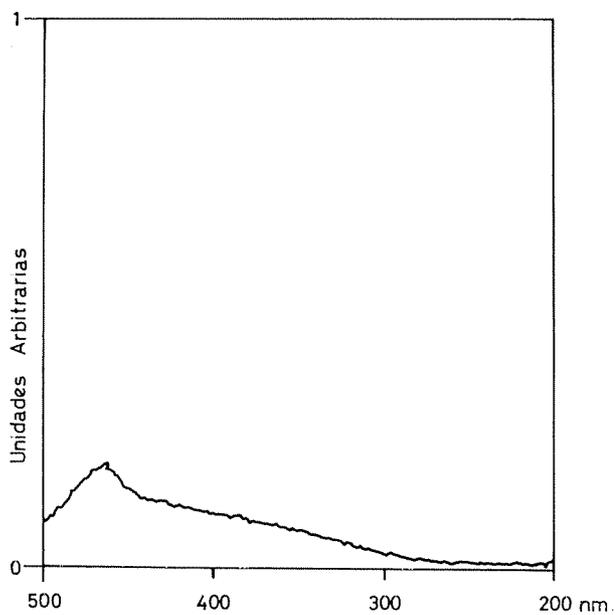


FIG. 8. Espectro de excitación de *Tetraselmis* «in vivo». Se ha leído la emisión 680 nm, colocando el filtro 2-64 en la ventana de emisión.

Indiquemos que un modo de disminuir estos desagradables efectos de los monocromadores, es utilizar una doble red de difracción, y un modo de evitarlos totalmente (sin necesidad de utilizar filtros) es utilizar, posteriormente a la red de difracción, una difracción por prisma.

En el empleo de filtros hay que ir con precaución, pues algunos filtros azules de paso estrecho, tienen algo de transmisión en la zona del rojo. En los filtros de corte no hemos observado ningún inconveniente.

#### SUMMARY

WRONG READINGS IN SPECTROFLUORIMETRY. — Some optical properties of a monochromator—as the different diffraction orders from a monochromatic wave—are studied, specially in its application to spectrofluorimetry.

Usual errors committed in spectra analysis are presented, and the use of optical filters in order to avoid them has been shown.

#### BIBLIOGRAFÍA

- BALLESTER, A. y A. PLANA. — 1973. Análisis fluorimétrico continuo de las clorofilas fitoplanctónicas. *Revista «Afinidad»*, tomo XXX, núm. 309-319, 787-794.
- HANDBUCH DER PHYSIK. — 1967. Cap. 29: Optische Instrumente, págs. 426-754. Berlín.
- PRICE, J., M. KAIHARA y H. HOWERTON. — 1962. *Appl. Optics*, 1, pág. 521.
- STOKE, G. W. — 1966. An introduction to coherent optics and holography. Capítulos 1 y 2. *Academic Press*.
- UDENFRIEND, S. — 1962. Fluorescence Assay in Biology and Medicine, 110-111. *Academic Press*.