

# Spektrofluoromeetri Jobin-Yvon Fluoromax-4P juhend

Valter Kiisk

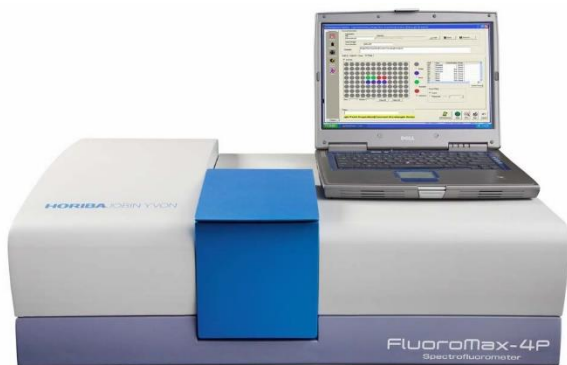
Viimati redigeeritud: 1. veebruar 2019. a.

1. Sissejuhatus .....	1
2. Ehitus ja tööpõhimõte .....	1
3. Juhtprogrammi kasutamine .....	3

## 1. Sissejuhatus

Spektrofluoromeeter on fotoluminesentsi (sh fluorestsentsi) spektraalkarakteristikute registreerimiseks ette nähtud mõõtekompleks. Kuna fotoluminesentsil on kaks spektraalkoordinaati (ergastava kiirguse lainepikkus  $\lambda_{\text{erg}}$  ja detekteeritava kiirguse lainepikkus  $\lambda_{\text{det}}$ ), siis spektrofluorimeeter vajab, erinevalt spektrofotomeetrist, kahte monokromaatorit ja suudab vastavalt mõõta vähemalt kahte põhilist spektraalkarakteristikut. Kiirgusspekter kirjeldab luminesentskiirguse spektraalkoostist (seejuures ergastamine toimub teatud kindlal lainepikkusel  $\lambda_{\text{erg}} = \text{const}$ ). Seevastu ergastusspekter kirjeldab luminesentsi tugevuse sõltuvust ergastava kiirguse lainepikkusest (seejuures luminesentsi detekteeritakse teatud kindlal lainepikkusel  $\lambda_{\text{det}} = \text{const}$ ). Kui skaneerida süstemaatiliselt mõlemat monokromaatorit, saab registreerida ergastuskiirgusmaatriksi ehk totaalspektri, mis sisaldab endas kõiki kiirgus- ja ergastusspektreid antud proovi jaoks. Mitmed spektrofluorimeetrid kasutavad impulss- või moduleeritud ergastusallikat, mis lubab spektraalmõõtmistele lisada täiendava dimensioonina aeglahutuse.

Tavalised spektrofluorimeetrid kasutavad peaaegu eranditult ristuvat geometriat proovi ergastamisel ja fluorestsentsi detekteerimisel. Vähemalt lahuste mõõtmisel selline skeem minimeerib hajumise ja on ühtlasi sobilik ka kvantitatiivseteks mõõtmisteks. Spektrofluorimeetrite korral üldiselt võrdlusemõõtmise kontseptsiooni ei saa kasutada, vähemalt mitte sellises ulatuses nagu spektrofotomeetris. Näiteks korrektsete spektraalsõltuvuste saamine spektrofluorimeetriga eeldab tõepoolest detektorite tundlikkuste arvessevõtmist ning lisaks on mõõdetava signaali tugevus alati suhteline, st erinevate spektrofluorimeetrite signaale ei saa üksteisega võrrelda ilma spetsiaalse kalibratsioonita.



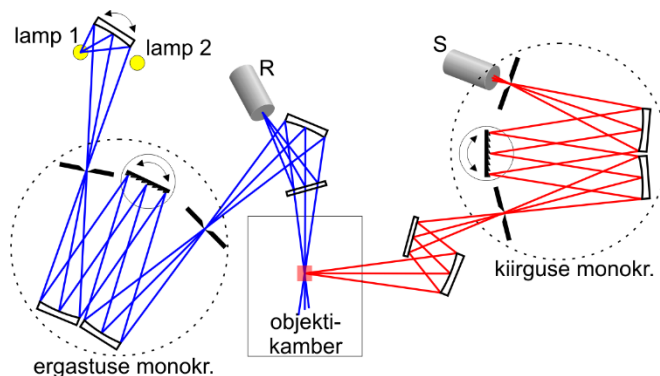
Meie praktikumides kasutatav seade Jobin-Yvon Fluoromax-4P on täisautomaatne kompaktnen spektrofluorimeeter, mis suudab teostada spektraalmõõtmisi 240–850 nm diapsoonis, maksimaalse spektraallahutusega umbes 1 nm. Samuti saab

teostada aeglahutusega mõõtmisi kuni mikrosekund-lahutusega. Viimane on paraku liiga tagasihoidlik paljude (eriti orgaaniliste) luminofooride puhul, mille fluorestsentsi eluead on nanosekundites.

Kallimad seadmed on harilikult modulaarsed, lubavad muuta optilise skeemi geometriat ning kasutavad mitmekordseid monokromaatoreid hajuskiirguse allasurumiseks.

## 2. Ehitus ja tööpõhimõte

Spektrofluorimeetri optiline skeem on kujutatud järgneval joonisel. Enamuse seda tüüpi seadmete põhikomponentideks on intensiivset valget kiirgust andev ksenoonlamp, kaks monokromaatorit ning kaks detektorit. Valguskimpe suunavate ja koondavate optiliste elementidena kasutatakse nõguspeegleid vältimaks kromaatilist aberratsiooni, mis sedavõrd avara spektraaldiapasooni juures oleks läätsede puhul paratamatu. Kõigepealt koondatakse ksenoonlambi kiirgus esimesse monokromaatorisse (ergastusmonokromaatorisse), mis valib välja ergastava kiire lainepikkuse. Enamus saadud kiirgusest fokuseeritakse uurimisobjekti peale, kuid väike osa eraldatakse välja kiirejagajaga ning suunatakse fotodiodile (detektor R, sõnast *reference*). Viimane registreerib jooksvalt ergastava kiirguse intensiivsust. Katseobjektis indutseeritud luminesentskiirgus koondatakse teise monokromaatorisse (kiirgusmonokromaatorisse), mille väljundis on tundlik fotoelektronkordisti (detektor S, sõnast *signal*). Viimane töötab antud seadmes footonloenduse režiimis ning lineaarse koste piirkonnas suudab registreerida signaale tugevusega kuni mõni miljon footonit sekundis. Nii seadme spektraallahutust kui ka signaali tugevust tuleb reguleerida ergastuse või kiirguse monokromaatori spektraalriba laiuse muutmise teel (ksenoonlamp töötab optimaalses režiimis ja selle heledust muuta ei saa, kahjulik on isegi selle sagedane sisse-väljalülitamine). Seejuures tuleb arvestada, et monokromaatori läbilaskvus kasvab proportsioonis pilu laiuse ruuduga, sest pilusid on kaks tükki. Kui muuta korraka mõlema monokromaatori pilusid (nt totaalspektri mõõtmisel), on sõltuvus lausa neljandas astmes.



Nagu skeemilt näha, on antud seadmes kaks ergastusallikat. Kõik tavalised spektraalmõõtmised teostatakse pidevas re-

žiimis töötava ksenoonlambiga. Seevastu impulssrežiimis töötav lamp (välklamp) teeb võimalikuks ka aeglahutusega mõõtmised. Viimase realiseerimiseks kasutatakse siinjuures nn stroboskoopilist meetodit, mille puhul pärast iga ergastavat valgusimpulssi detektor aktiveeritakse vaid võrdlemise lühikeseks ajaks kindla viivise ja ajaaknaga ergastava impulsi suhtes. Fotoelektronkordisti puhul on seda võimalik saavutada võimenduse kontrollimise teel. Kui nüüd digitaalselt juhitava viivisgeneraatori abiga ajaakna viivist järkjärgult suurendada, saab niiviisi luminesentsi kustumiskõvera samm-sammult ära mõõta. Kui aga hoida ajaaken paigas ja skaneerida monokromaatorit, on võimalik üles võtta aeglahutusega spekter. Viimane on kasulik näiteks erinevate kustumisaegadega luminofooride eristamiseks proovis. Antud seadme võimalusi kvaliteetse signaali saamisel lühikeste viiviste ja kiirete ajaakendega piirab paraku lambi piiratud välkesagedus (maksimaalselt 24 Hz). Ühe välkega registreeritavate footonite arvu ei saa samuti meelevaldselt suurendada, sest nagu öeldud, on see footonloendusrežiimis piiratud umbes paari miljoniga sekundis, seega näiteks 10  $\mu$ s ajaaknaga saab registreerida kõige rohkem vaid paarkümmend footonit. Sel juhul vähegi talutava signaal-müra suhte saavutamiseks tuleks ühe katsepunkti registreerimiseks kasutada sadu välkeid.

Selle konkreetse seadme puhul monokromaatorid ei liigu spektri skaneerimisel mitte pidevalt, vaid samm-haaval, oodates pärast sammu tegemist kuni signaal sellel lainepikkusel on registreeritud. Lihtsate kiirus- või ergastusspektrite mõõtmisel peab skaneerima vaid ühte monokromaatorit, ergastuskiirusmaatriksi registreerimisel liiguvad aga mõlemad monokromaatorid, nii et kui emissiooni spektralvahemik sisaldab  $M$  positsiooni ja ergastusevahemik  $N$  positsiooni, siis kokku käiakse süstemaatiliselt läbi  $M \times N$  spektralpositsiooni.

Tähistame proovi ergastus-kiirusmaatriksi  $\Phi(\lambda_{\text{det}}, \lambda_{\text{erg}})$ , st  $\Phi(\lambda_{\text{det}}, \lambda_{\text{erg}})$  on luminesentsi intensiivsus lainepikkuse  $\lambda_{\text{det}}$  ümbruses (teatud kindla spektraalpiluga) kui proovi kiiritatakse ühikulise intensiivsusega lainepikkusel  $\lambda_{\text{erg}}$ . Kui nüüd proovile langeb ergastuse monokromaatorist kiirus lainepikkusega  $\lambda_{\text{erg}}$  ja intensiivsusega  $R(\lambda_{\text{erg}})$ , siis luminesentsi intensiivsus lainepikkuse  $\lambda_{\text{det}}$  ümbruses on ilmselt võrdeline korutisega  $S(\lambda_{\text{det}}) = R(\lambda_{\text{erg}})\Phi(\lambda_{\text{det}}, \lambda_{\text{erg}})$ , kus me eeldame, et aine reageerib lineaarselt ergutamisele (st  $2 \times$  intensiivsem kiiritamine indutseerib ka  $2 \times$  tugevama luminesentsi). Seega sõltuvuse  $\Phi(\lambda_{\text{det}}, \lambda_{\text{erg}})$  saab taastada jagades vastavate detektorite signaalid:

$$\Phi(\lambda_{\text{det}}, \lambda_{\text{erg}}) = \frac{S(\lambda_{\text{det}})}{R(\lambda_{\text{erg}})}$$

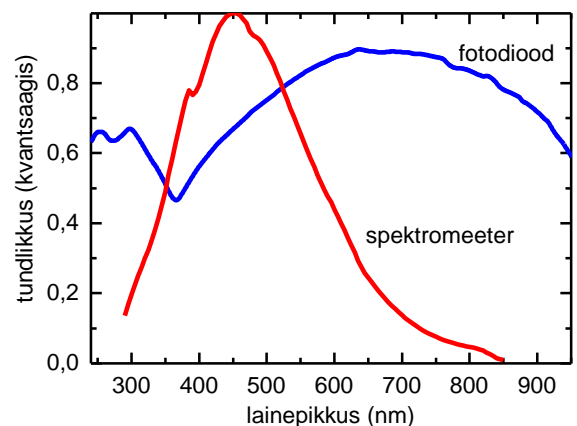
Üksiku kiirgusspektri mõõtmisel pole harilikult põhjust ergastava kiirguse intensiivsust jälgida, sest  $\lambda_{\text{erg}} = \text{const}$ . Kuid see osutub vajalikuks niipea kui on tarvis võrrelda fluorestsentsi tugevusi erinevate ergastustega saadud kiirgusspektrites. Põhimõtteliselt võib ergastuse jälgimine vajalik olla ka väga pika mõõtmise kestel, kui on alust karta, et ksenoonlambi intensiivsus märgatavalt muutub selle aja jooksul.

Footonloendusrežiimis töötava fotoelektronkordisti signaali väljendatakse loendatud impulsside arvuga sekundi kohta (*counts per second* ehk CPS), fotodiodi korral (mis on vä-

hemtundlik detektor) mõõdetakse lihtsalt voolutugevust mikroamprites. Seega suhte  $S/R$  kaudu arvatud signaali ühikuks on CPS/ $\mu$ A. Rõhutame siiski, et tegemist ei ole kuidagi absoluutse väärtusega, vaid see sõltub seadme kõigi komponentide efektiivsustest, pilude laiustest ja isegi seadme justearingust. Mõne muu spektrofluorimeetri korral on vastavad väärtused hoopis erinevad (kuigi spektri kuju peaks korrekse mõõtmise korral jääma samaks).

Nagu juba mainitud, on tõepäraste spektraalsõltuvuste saami- sel üheks tehniliseks probleemiks süsteemi spektraalse koste arvestamine. Kõigepealt kiirusmonokromaator tervikuna koos fotoelektronkordistiga (nimetagem seda kombinatsiooni spektromeetriks) omab teatud tundlikkust proovist lähtuva fluorestsentskiirguse registreerimisel. See sõltub fotoelektronkordisti kvantsaagisest ning difraktsioonvõre ja peeglite efektiivsustest. Kõik need näitajad sõltuvad omakorda lainepikkusest. Fotodiodi kvantsaagis sõltub samuti lainepikkusest. Ilmselt tõepärase spektroskoopilise signaali saamiseks tuleb detektorit signaal läbi jagada tema tundlikkusega vastaval lainepikkusel (sest kui näiteks teatud lainepikkusega valguse mõõtmisel on tundlikkus väike, väljastab detektor vastavalt nõrgemat signaali). Spektrofluorimeetri juhtprogrammil saab lasta detektorite spektraaltundlikkused automaatselt arvesse võtta. Kui ainsaks eesmärgiks on keemilise analüüsi teostamine võrdlusmeetodil (st proovi võrdlemine mingite standardproovidega), siis spektraaltundlikkuse arvestamine ei ole otsest vajalik, sest sisuliselt on oluline vaid süsteemi lineaarsus fluorestsentsi ergastamisel ja kõikide optiliste signaalide mõõtmisel.

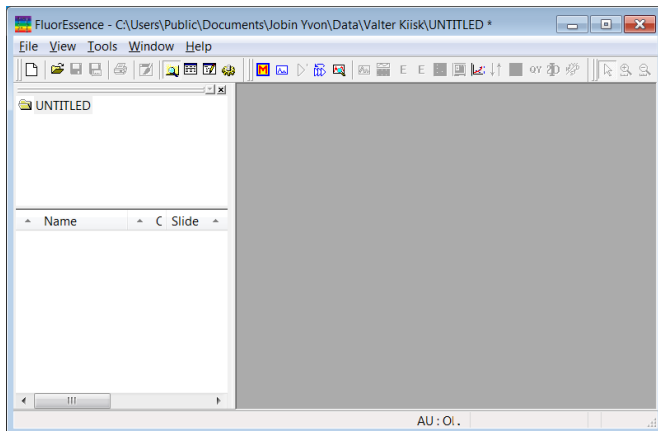
Mainitud spektraalsed tundlikkused antud aparadi jaoks on näidatud järgneval graafikul. Mõlema detektorit jaoks on tundlikkus väljendatud kvantsaagisena (spektromeetri tundlikkuskõver on meelevaldselt normeeritud maksimumis ühele). Kui spektraaltundlikkus on väljendatud kvantsaagisena, siis ilmselt tundlikkusele parandatud spektrite intensiivsuse telg hakkab kirjeldama kvantide arvu (mitte aga kiirguse võimsust).



Kuigi kõnealune instrument, nii nagu enamuse spektrofluorimeetreid, on optimeeritud fluorestsentseeruvate lahuste mõõtmiseks standardses 10 mm-ses küvetis, saab spetsiaalse objektihoidiku abil asetada ergastava kiire teele ka tahkeid materjale (kristallid, kiled, pulbrid spetsiaalses küvetis jms). Seejuures tuleks võimaluse piires vältida ergastava kiire otsest peegeldamist kiirguse monokromaatorisse, sest mõlemad monokromaatorid on ühekordsed ja seega võrdlemise ebaefektiivsed hajunud kiirguse allasurumisel. Nõrgalt fluorestsentseeruvate ma-

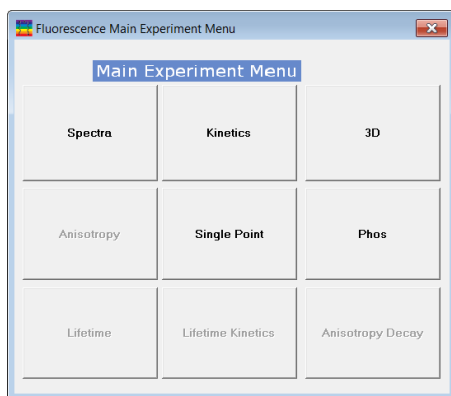
terjalide mõõtmisel võib osutada tarvilikuks täiendavate kiirgust puhastavate filtrite asetamine mõlemasse õlga, kusjuures nende filtrite läbilaskeribad ei tohiks kattuda.

### 3. Juhtprogrammi kasutamine



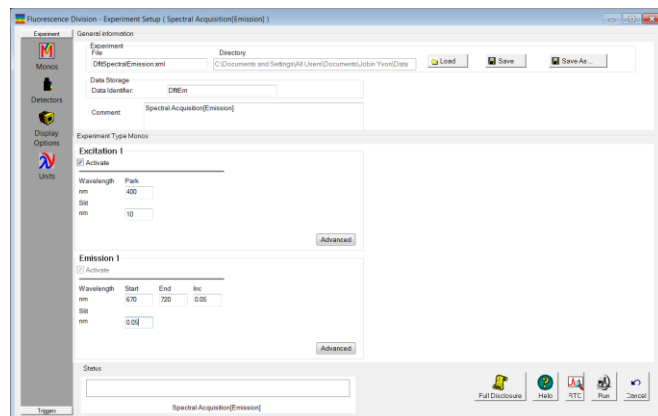
Spektrofluorimeetrit juhitakse läbi PC arvuti Windowsi rakendusega **FluorEssence**, mis baseerub tuntud programmpaketil **Origin**. **Origin** võimaldab töödelda andmeid ja vormistada graafikuid, **FluorEssence** lisab vahendid spektrofluorimeetri juhtimiseks ja mõõtmisandmete kogumiseks. Pärast rakenduse käivitamist on kohe avatud uus projekt, kuhu mõõtmiste teostamisel tekivad uued töövihikud (*workbook*). Töövihiku mitmetel erinevatel lehtedel on tabelites mõõtmistulemused (spektrid), lisaks märkmed mõõteparameetritega ning esialgsed graafikud. Iga mõõdetud spektrit ei pea salvestama eraldi, vaid need kõik salvestuvad projekti koosseisus (faili laiendiga OPJ).

Uue mõõtmise loomiseks tuleb vajutada tööriistaribal nupule **M** (**Experiment Menu**), viimati seadistatud mõõtmise modifitseerimiseks aga nupule **A** (**Previous Experiment Setup**). Esimesel juhul avaneb menüü (järgmine joonis), mis esitab erinevate mõõterežiimide valiku. Põhilised valikud on **Spectra** (kiirgus- või ergastusspektri mõõtmine), **3D** (totaalspektri mõõtmine) ja **Phos** (aeglahutusega mõõtmised impulsslambiga).



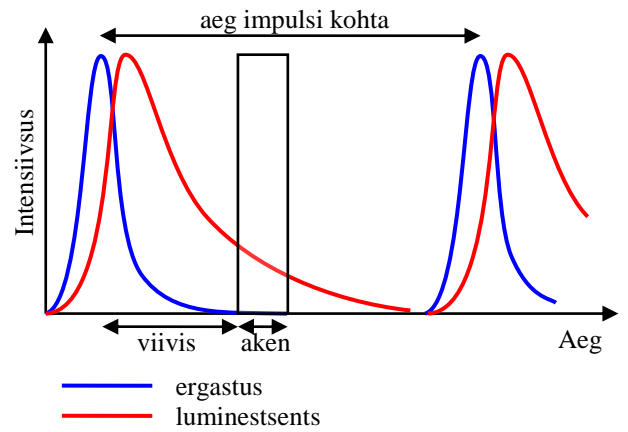
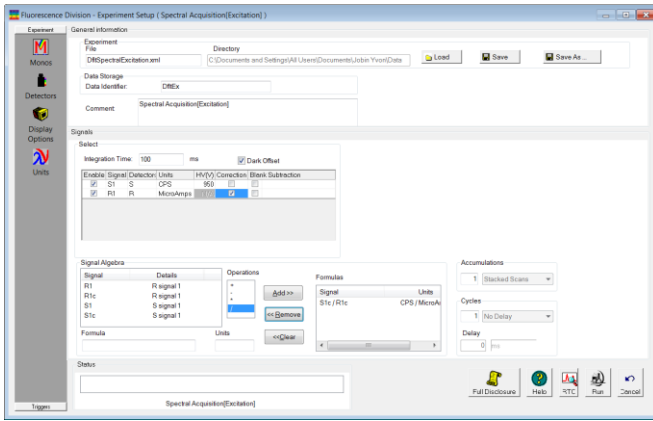
**Ilma aeglahutuseta spektraalmõõtmised.** Vajutus nupul **Spectra** avab esmalt lihtsa vahedialoogi, kust saab määrata kas mõõta kiirgus- (**Emission**) või ergastusspektrit (**Excitation**). Nii kiirgus-, ergastus- kui ka totaalspektri jaoks on mõõteparameetrite seadistamine sarnane ja teostatakse järgmistel joonistel kujutatud mitmeosalises dialoogiaknas. Lehel **Monos** seadistatakse monokromaatorite parameetrid. Näiteks kiirgus-

spektri mõõtmisel on nendeks ergastuse lainepikkus ja spektraalpilu (**Wavelength**, **Slit**) ning kiirgusmonokromaatori skaneerimise alg- ja lõpplainepikkus (**Start**, **End**), samm (**Inc**) ja spektraalpilu. Spektraalpilu näitamise määratakse sisuliselt monokromaatori sisend- ja väljundpilu füüsilised laiused spektraalühikutes, ehk teiste sõnadega, spektraalne ribalaius, mida monokromaator läbi laseb (kui pilusid aina kitsamaks teha, siis muidugi mingist hetkest tegelik ribalaius enam ei vähene). Skaneerimise samm võiks olla vähemalt  $2\times$  väiksem kui on ribalaius, vastasel korral tekib märgatav kaotus spektraallahutuses tingituna suurest skaneerimissammust. Sammu võib suurendada ainult juhul kui ribalaiust on vähendatud vaid signaali tugevuse vähendamise eesmärgil (sel juhul samm määrabki efektiivse spektraallahutuse).

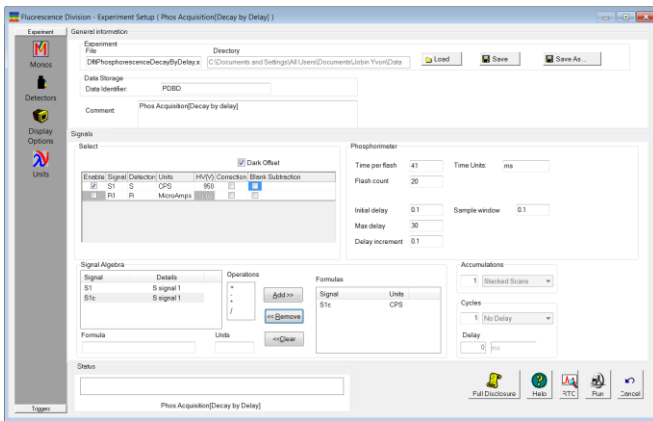


Lehel **Detectors** määratakse detektorite parameetrid. Skaneeritava monokromaatori iga positsiooni juures *akumuleeritakse* fotokordisti signaali (st loendatakse fotoimpulsse) ajavahe-**Integration Time** ulatuses. Nõrgemate signaalide mõõtmisel on soovitatav sisse lülitada ka **Dark Offset**, mis automaatselt mõõdab ja lahutab maha detektorite pimesignaalid. Vajalikud detektorid tuleb aktiveerida pannes linnukese vastavasse kastikesse tähisega **Enable**. Kiirgusspektri mõõtmisel piisab vaid fotokordistist (detektor S), ergastusspektri puhul läheb tarvis ka võrdlusdetektorit (detektor R), sest fotokordisti signaal tuleb korrigeerida vastavalt lambi intensiivsuse spektraalsõltuvusele. Võimalik on automaatselt arvesse võtta ka spektraalseid kosteid kui märgistada kastike **Correction**. Detektorite originaalsed signaalid on tähistatud S1 ja R1 (ühikutes CPS ja  $\mu A$ ), vastavad korrigeeritud signaalid aga S1c ja R1c (need võtavad siis arvesse nii spektraaltundlikkust kui ka pimesignaali, olenevalt sellest millised valikud on aktiivsed). Niisiis ergastusspektri registreerimisel tuleks jaotises **Signal Algebra** väljundsignaalina näidata suhe S1c / R1c. Soovitatav on üldiselt registreerida paralleelselt ka originaalset fotokordisti signaali S1, veendumaks et detektor ei ole küllastuses. Fotokordisti signaali soovituslik ülempiir on  $2\times 10^6$  CPS. Sellise tugevusega signaali korral, kogudes signaali vaid 0,1 s, saame haavelmüra arvestades juba päris hea signaal-müra suhte  $\sqrt{2\times 10^6} \times 0,1 \approx 450$ .

Mõõtmise käivitab vajutus nupul **Run**. Mõõtmise saab alati katkestada (**Abort**), kui selgub et on tarvis muuta mõõtmise seadeid.



**Aeglahutusega mõõtmised.** Vajutus nupul **Phos** avab jällegi ühe vahedialoogi, kust saab valida **Decay by Delay** (kustumiskineetika mõõtmine) ning **Emission** või **Excitation** (vastavate aeglahutusega spektrite mõõtmine). Edasi avaneb eelpoolkirjeldatuga analoogne mitmeosaline dialoog, kus seekord on detektori seadistamise lehele koondatud täiendavalt hulk aeglahutusega seotud parameetreid (järgmine joonis).



**Time per flash** on välklambi kahe järjestikuse välke vaheline aeg ehk vilkumissageduse pöördväärtus. See tuleks üldjuhul valida piisavalt pikk võimaldamaks luminescentsignaali languse jälgimist vähemalt paar suurusjärku. Lambi sagedus on muudetav vahemikus 0.05–25 Hz. **Flash count** määrab välgete arvu, mis kulutatakse iga katsepunkti registreerimiseks. Suurem väärtus annab parema signaal-müra suhte, ent pikendab mõõtmisprotsessi. **Initial delay** on registratsiooniakna algviivis, **Max delay** on lõppviivis ja **Sample window** on akna laius. Algviivise sättemisel tuleb arvestada, et välklambi impulsi järelhelendus kestab kümneid mikrosekundeid (kuigi peamise piigi laius on mõne mikrosekundi suurusjärgus). **Delay increment** määrab ajasammu, mille võrra akent nihutatakse edasi iga järgneva katsepunkti mõõtmisel. Üldiselt registratsiooniakna algviivis, laius ja viivise muutmise samm võiksid kõik olla võrdsed. Mõningaid kirjeldatud parameetreid on illustreeritud järgmisel joonisel.