

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

Füüsika Instituut
Materjaliteaduse osakond

Dmitri Lanevski

**VEES POLÜTSÜKLILISTE AROMAATSETE
SÜSIVESINIKE SAASTE SELEKTIIVSE AVASTAMISE
METOODIKA VÄLJATÖÖTAMINE**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendaja(d): f-m knd. Koit Muring

Kaitsmisele lubatud

Programmijuht

allkiri, kuupäev

Tartu 2011

Sisukord

Sissejuhatus.....	3
Valdkonna ülevaade.....	5
Analüütilise keemia ja spektroskoopia aspektid.....	5
Laineoptika aspektid.....	7
Varasemad uuringud.....	8
Vees polütsükliliste aromaatsete süsivesinike saaste selektiivse avastamise fluorestsentsmetoodika põhimõtted.....	10
Teadaoleva neeldumis- ja ergastusspektritest saadud informatsiooni kasutamine.....	10
neeldumismaksimumide suhtes.....	12
Ergastusvalguse modulatsioon.....	13
Ergastava valguse intensiivsuse modulatsioon.....	13
Ergastava valguse lainepikkuse modulatsioon.....	17
Lock-in võimendi kasutamine.....	19
PAS-de detekteerimismetoodika kokkuvõte ja lühike rakendamise kirjeldus.....	21
Metoodika katseline kontroll.....	23
Ergastusvalguse intensiivsuse modulatsioon.....	23
Ergastusvalguse lainepikkuse modulatsioon.....	28
Katse ettevalmistamise detailid.....	30
Ergastava valguse intensiivsuse konstantsuse saavutamine.....	32
Lainepikkuse moduleerimise eksperimendi simulatsioon.....	39
Kokkuvõte.....	42
Kokkuvõte inglise keeles.....	43
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks....	46
Lisa 1. Topeltmoduleerimise teooria.....	47

Sissejuhatus

Üheks tänapäeva peamiseks keskkonnaprobleemiks on vee saastumine. Vaatamata sellele, et see probleem ja selle tagajärjed on juba ammu teada ning kogu maailmas tehakse kõik, et veekogude ja põhjavee saastumist vältida, võib ikka lugeda kurbi uudiseid sellest, et kusagil on loodus või inimesed veesaaste ohvriteks langenud [1,2]. See näitab, et eksisteerib vajadus olemasolevate veesaaste jälgimissüsteemide täiustamise ja uute meetodikate väljatöötamise järele. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks ongi uudse veesaaste avastamise meetodika väljatöötamine.

Kuna vee saasteained võivad olla väga mitmekesised, siis ühe meetodikaga ei ole võimalik avastada kõikvõimalikke veereostusi. Vastava kompleksmeetodika väljatöötamine on peaaegu võimatu ja võtaks liiga palju aega ja ressursse. Otsustasime kontsentreeruda kahjulike polütsükliliste aromaatsüsvesinike avastamisele. Sellisel valikul on mitu põhjust. Esiteks, polütsüklilised aromaatsüsvesinikud on ühed ohtlikumatest orgaanilistest ainetest, mis üldse vette sattuvad. Neil on kantserogeensed ja mutageensed omadused ning nad ei ole kergesti põletatavad ega lagune vees ja on võimelised seetõttu kaua püsima keskkonnas [3,4,5]. Teiseks, need ained on küllaltki laialt levinud. Neid leidub looduses, naftas, kütuses, põlemisproduktides, peestsüsiidides [5,6,7]. Kolmandaks, nad fluorestseeruvad, mis on väga oluline, sest just see omadus võimaldabki neid avastada optilise meetodika abil hästi tundlikult (väikeses kontsentratsioonis), kontaktivabalt ja energiasäästlikult. Viimane omadus on oluline autonoomtoitel töötavate sondide puhul.

Fluorestsentsi kasutamine analüütilisel eesmärgil ei ole aga midagi uut. Seda rakendatakse edukalt ainete tuvastamiseks juba aastakümneid. See on tavaline praktika, kui ainete tuvastamiseks vajalikku informatsiooni saadakse spektrofluoromeetriga fluorestsentsispektrite mõõtmiste käigus. See nõuab aga kalleid spetsiaalseid seadmeid, proovi valmistamist, laboratoorset keskkonda ja ei võimalda jälgida uuritava aine kontsentratsiooni muutust reaalselt. Käesolevas töös esitame meetodika, mis võimaldab fluorestseeruvat ainet *on-line* režiimis tuvastada ka selle spektrit mõõtmata.

See meetodika on meie poolt väljatöötatava automaatsondi aluseks ja põhineb sellel, et ükskord mõõdetud spektreid ei pea mitu korda üle mõõtma, vaid varem saadud andmeid võib ainete analüüsimisel kasutada. Võime näiteks ergastada ainet spetsiifilistes neeldumisspektri

punktides ja, kasutades keerulisemat signaalitöötlust, otsida tundmatus ainete segus meie poolt tuvastamiseks valitud ainet.

Järgnevas töös kirjeldame fluorestsentsil põhinevat meetodikat ja esitame katselise tõestuse uue meetodika realiseerimise kohta.

Valdkonna ülevaade

Käesolevat tööd on väga raske siduda ühe kindla valdkonnaga, sest tegelikult haarab see endasse nii analüütilist keemiat, spektroskoopiat kui ka optikat ja signaalitöötlust. See asjaolu teeb ülesande muidugi keerulisemaks, kuid võimaldab saavutada positiivse tulemuse ning tagab autori silmaringi laienemise.

Analüütilise keemia ja spektroskoopia aspektid

Analüütiline keemia on keemia valdkond, mis tegeleb ainete koostise, struktuuri ja koguse määramisega, kasutades seejuures mitmesuguseid teaduslikult tõestatud ja põhjendatud meetodeid. Selle üheks eesmärgiks on võimalikult täpselt määrata uuritava objekti kvalitatiivne ja kvantitatiivne koostis.

Erinevate ainete uurimisel ja karakteriseerimisel kasutatakse tänapäeval põhiliselt analüütilise keemia meetodeid. Sama kehtib ka vee koostise uurimisel ja selles polütsükliliste aromaatsüvivesinike sisalduse määramisel. Kõige levinumad meetodid siinjuures on kromatograafia, mass-spektroskoopia ja fluorestsentspektromeetria [6,7,8,9].

Gaaskromatograafia põhineb liikuva faasi ehk uuritava gaasi komponentide erinevatel liikuvustel statsionaarses faasis. Statsionaarseks faasiks on tavaliselt vedelik või tahke aine, mis on võimeline interakteeruma uuritava gaasi komponentidega sorptsiooni ja desorptsiooni kaudu, aga ei kutsu esile keemilist reaktsiooni. Tänu sellele liiguvad uuritava gaasi komponendid statsionaarses faasis erinevate kiirustega ja mõne aja pärast eralduvad üksteisest. Eraldatud ained lastakse läbi detektori, mis määrab, kui palju igat ainet gaasi segus oli. Saadud andmed annavad kvalitatiivse ja kvantitatiivse hinnangu aine koostisele [10,11].

Mass-spektroskoopia on analüütiline meetod/tehnika, mis võimaldab tuvastada uuritava aine (proovi) koostises olevate aatomite ja molekulide masside spektri. Saadud spektrist määratakse proovi koostis keemiliste elementide või isotoopide suhtes, saab määrata ka molekulide ja väiksemate osakeste hulka. Tüüpilises mass-spektroskoopilises protseduuris esialgu ioniseeritakse proov, milleks võib olla kas tahke aine, vedelik või gaas. Pärast eraldatakse ioonid üksteisest magnetväljas Lorentz'i jõu abil vastavalt nende massi ja laengu suhtele ja detekteeritakse laetud osakeste detektoriga. Signaali töötlemise tulemused esitatakse spektrina, kust selgub, kui palju leidub osakesi erineva massi ja laengu suhte korral. Erinevad aatomid ja molekulid identifitseeritakse, võrreldes tuntud osakeste masse ja katsest saadud

masse (mass/laengu suhtest saadud masse) või võrreldakse uusi ja varem saadud spektreid [12].

Fluorestsentsi spektromeetria ehk spektrofluoromeetria on üks levinumatest ja mugavamatest meetoditest fluorestseeruvate ainete uurimiseks, nende koostise määramiseks ja nende olemasolu tõestamiseks teiste ainete lahustes ja segudes. Spektrofluoromeetria põhineb aine võimel neelata teatud lainepikkusega footoneid ja kiirata kindla lainepikkusega valgust. Igale fluorestseeruvale ainele on omased unikaalsed lainepikkused, millel toimub maksimaalne footonite neeldumine ja kiirgamine. Nende lainepikkuste järgi saabki eristada fluorestseeruvaid aineid ja anda uuritavale proovile kvalitatiivse hinnangu. Kui määrata ka sõltuvus fluorestseeruva aine koguse ja neelatud valguse osakaalu või kiiratava valguse intensiivsuse vahel, siis saab proovi koostist hinnata ka kvantitatiivselt. Üldjuhul spektrofluoromeetrilise mõõtmise käigus ergastatakse uuritavat ainet erinevate lainepikkustega valgusega (tavaliselt on see spektri UV osas) ja mõõdetakse, kui palju aine nendel lainepikkustel valgust neelab ja pärast fluorestseerudes valgust kiirgab. Saadud andmetest koostatakse neeldumis- ja fluorestsentsispektrid, kust saab välja lugeda kogu vajalikku informatsiooni uuritud ainest. Fluorestsentspektroskoopias kasutatakse reeglina neeldumisspektrite mõõtmise asemel või sellega paralleelselt ergastusspektrite mõõtmist.

Ülaltoodud meetoditel on eelised ja puudused. Näiteks kõik nad vajavad suhteliselt väikest aineproovi kogust analüüsi jaoks, võimaldavad teha nii kvalitatiivset, kui ka kvantitatiivset analüüsi ja annavad usaldusväärseid tulemusi. Aga seejuures enamusest meetoditest nõuavad suhteliselt suuri ja kalleid seadmeid, laboratoorseid tingimusi ja tihti ka proovide ettevalmistamist, mis võib nõuda näiteks hinnaliste reagentide kasutamist. Ka nõuab analüüs ja proovide ettevalmistamine eeltoodud meetodite kasutamisel aega ja ei võimalda jälgida aine koostise muutumist reaalselt. Me saame määrata aine koostist vaid sel hetkel, millal proov võeti, ning tihti saab laboratooriumist vastuse mitme tunni pärast, rääkimata hilistumise suurusjärgust üks sekund.

Käesoleva töö raames püüdsime välja töötada uue meetodika, mis võimaldaks säilitada eeltoodud meetodite eeliseid (võimalust anda nii kvalitatiivset kui ka kvantitatiivset hinnangut), ning proovime vabaneda ülalkirjeldatud puudustest. Seejuures me ei ignoreeri ega eita tuntud ja äraproovitud meetodeid, vaid kasutame neid vajalike algandmete saamiseks ja kontrollime nende abil uue meetodi järgi saadud tulemusi. Näiteks mõõdame spektrofluoromeetri abil mingi kindla polütsükliilise aromaatsüivesiniku ergastus- ja

fluorestsentsispektreid, määrame nendest spektritest iseloomulikud punktid (maksimumid ja miinimumid) ja hindame uue meetodika abil selle aromaatsüivesiniku sisalduse tundmatus lahuses, ergastades viimast kindlakstehtud punktide ümbruses (järgmistes peatükkides kirjeldatakse väljatöötatud meetodikat põhjalikumalt).

Laineoptika aspektid

Uus meetodika põhineb fluorestsentsil ja spektrofluoromeetrial. Sellega kaasnevad aga teatud tingimused ja vajadused meetodika katsetamisel. Näiteks tekib vajadus ergastada proove kindla lainepikkusega valgusega. Sellist valgust võib saada, kasutades lasereid, aga iga vajaliku lainepikkuse jaoks me laserit suure tõenäosusega ei leia. Kusjuures isegi kui leiaks, siis oleks see suhteliselt kallis lahendus. Sellepärast on targem kasutada siinjuures teisi vahendeid ja laineoptika teadmisi.

Laineoptika on optika haru, mis käsitleb valgust elektromagnetlainena ja uurib sellest käsitlusest/lähemisest tulenevaid nähtusi. Näiteks kirjeldab ta polarisatsiooni, difraktsiooni ja interferentsi. Seejuures viimased kaks nähtust lubavad saada kindla lainepikkusega valgust. Laineoptika teooria järgi sõltuvad valguslaine interferentsi ja difraktsiooni nähtused selle lainepikkusest. Nende erinevate sõltuvuste teoreetiline kirjeldus ei mahu antud töö raamidesse, aga praktikas võimaldavad nendel nähtustel põhinevad optilised süsteemid suhteliselt kergesti eraldada valgusallika spektrist valgust, kui mitte kindla lainepikkusega, siis vähemalt kitsas lainepikkuste vahemikus. Nendeks süsteemideks võivad olla näiteks difraktsioonivõre ja interferentsfilter.

Kui me laseme difraktsioonivõrele pideva valgusspektriga valgust, siis tekib difraktsioonipilt, kus valgus on „järjestatud“ lainepikkuste järgi. Sellest järjestusest saab juba valida valgust kindlas lainepikkuste vahemikus, kasutades fiibrit või pilu. Seda me kasutamegi selle töö raames kirjeldatava detekteerimismetoodika praktilisel katsetusel.

Teine võimalus valgusspektrist kitsa lainepikkustevahemiku selekteerimiseks on valgusfiltrite kasutamine. Filtrid peatavad mittedesobiva valguse ja lasevad läbi ainult teatavate lainepikkustega valgust. Kõige sobivamad fluorestsentsi ergasusva valguse selekteerimiseks on kitsaribalised interferentsfiltrid. Erivalt tavalistest, neeldumisel põhinevatest filtritest, sõltub interferentsfiltri läbilaskeriba maksimum valguse langemispunkti. Seda sõltuvust kirjeldab järgmine seos:

$$\lambda_c = \lambda_0 \cdot \sqrt{1 - \frac{\sin^2 \theta}{K^2}},$$

kus

λ_0 on filtri läbilaskeriba maksimumile vastav lainepikkus perpendikulaarselt langeva valguse korral,

θ on filtrile suunatud valguse langemisnurk,

K on igale interferentsfiltrile omane koefitsient, mis arvutatakse interferentsfiltri kihtide murdumisnäitajatest.

Selliseid interferentsfiltreid me kasutasime selle töö raames kirjeldatava detekteerimismetoodika katselise kontrolli juures.

Varasemad uuringud

Erialakirjandusega tutvudes selgus, et ka varem on veereostuse avastamiseks kasutatud fluorestsentsmetoodikat ja seda ka Eestis. Nimelt tegutseb Tallinnas 1991. aastal loodud ettevõtte LDI, mis üsna hiljuti töötas välja ja hakkas tootma veereostuse *on-line* diagnostikasüsteemi *ROW* (*remote optical watcher*).

ROW on fluorestsents-meetodil põhinev mittekontaktne ja autonoomne sensor, mis suudab reaalsajas avastada õlikilesid veepinnal. *ROW* süsteemi paigaldatakse veepinnast 10 meetri kõrgusel, kust süsteem kiirgab veepinnale ultravioletset valgust, mis ergastab süsteemi töötamispiirkonnas asuvaid õlikelme molekule. Pärast ergastuskiirguse saatmist *ROW* kogub õlimest lähtuva fluorestsentsisignaali, hindab õlikelme paksust, analüüsib reostumiohtu ning vajadusel saadab häiresignaali juhtmega või juhtmevaba sidesüsteemide kaudu. Mitu *ROW* sensorit võib liita ühtsesse sensorvõrgustikku ja teha mastaapsemaid jälgimisi. Antud süsteem sobib väga hästi õlireostuse *on-line* jälgimiseks sadamates, laevatavatel jõgedel, kanalites, rannikuvetes, looduskaitsealades. *ROW* on võetud kasutusele Tallinna ja Riia sadamates [14,15].

Idee poolt on *ROW* süsteem ja selle tööpõhimõtte meie metoodikaga sarnane vaid algtasemel. Vaatamata sellele, et nii meie, kui ka LDI uurijad kasutame fluorestsentsi ainete tuvastamiseks, ei anna *ROW* süsteem peaaegu mitte mingit informatsiooni aine koostisest. Meie aga töötame välja metoodikat, mis võimaldaks peale ainete *on-line* detekteerimist anda uuritava aine koostisele kvalitatiivse ja jämeda kvantitatiivse hinnangu.

Veel üks Eesti firma, mis kasutab optilist meetodikat analüütilisel eesmärgil, on LDIAMON Tartu teaduspargis. Nemad pakuvad oma produktides *ROW* süsteemi sarnase tööpõhimõttega andurit vee puhtuse kontrollimiseks. Nend andur on märgatavalt väiksem *ROW* süsteemist, aga ka tema ei võimalda teha täpset kvalitatiivset ja kvantitatiivset analüüsi. LDIAMON toodab ka andureid veredialüüsi jälgimiseks ja kontrollimiseks. Need andurid kasutavad UV kiirguse neeldumist dialüüsivedelikus leiduvas ureas. Sõltuvalt sellest, kuidas tugevalt toimub UV valguse neeldumine, andur määrab veres olevate halbade lisandite kontsentratsiooni ja hindab sellisel viisil patsiendi vere puhtust[16,17]. See ei ole küll veesaaste probleemiga otseselt seotud, aga paneb mõtlema sellele, et ka meie poolt välja töötatud meetodika võiks meditsiinis kasulik olla.

Vees polütsükliliste aromaatsete süsivesinike saaste selektiivse avastamise fluorestsentsmetoodika põhimõtted

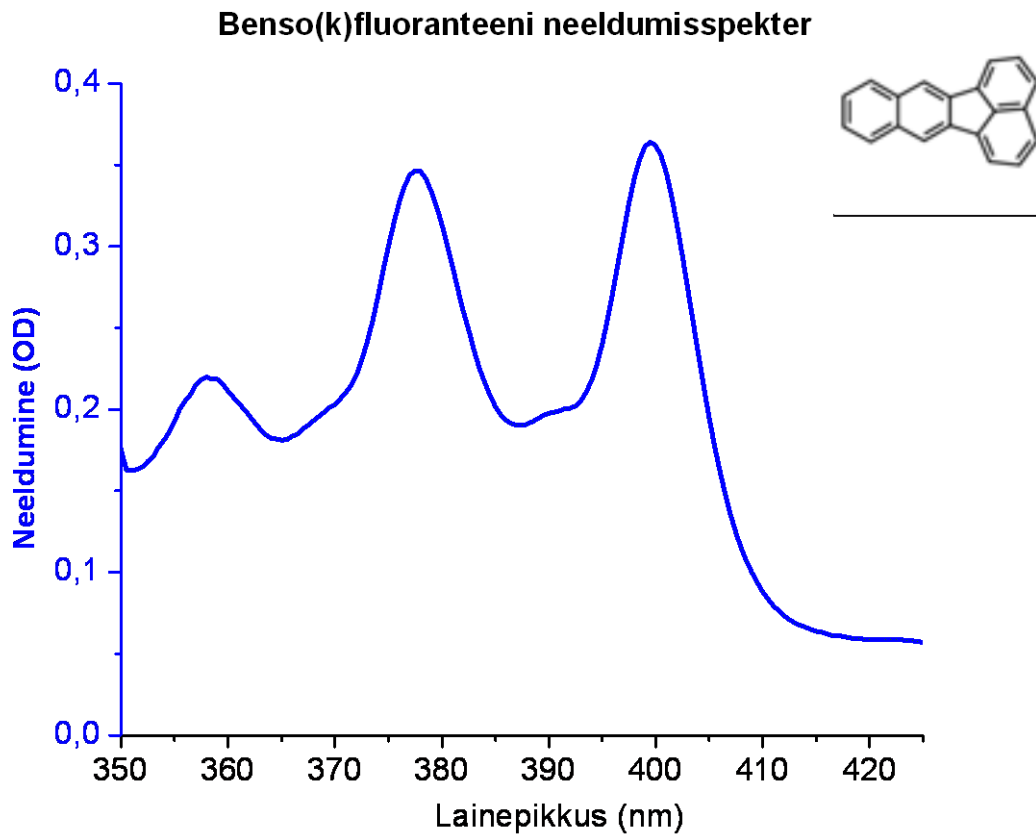
Käesoleva töö raames arendatava metoodika peamiseks eesmärgiks on tagada võimalikult parema selektiivsus ja tundlikkus kahjulike polütsükliliste aromaatsete süsivesinike (PAS-de) *on-line* detekteerimisel nii laboratoorses kui ka looduskeskkonna tingimustes. Teadaolevate probleemide tõttu, millisteks on näiteks looduslik fluorestsentsi foon, detekteeritava aine väike kontsentratsioon või lihtsalt signaali mürad, ei ole see triviaalne ülesanne ja nõuab keerulisemat lähenemist. Seepärast me otsustasime kasutada kompleksset meetodit, mis põhineb peamiselt kolmel põhimõttel.

Teadaoleva neeldumis- ja ergastusspektritest saadud informatsiooni kasutamine

Esimene põhimõte seisneb selles, et me kasutame juba teadaolevat informatsiooni detekteeritavate PAS-de kohta selleks, et optimeerida nende tuvastamist ja panna alus selektiivsele *on-line* detekteerimisele. (Võimaldada selektiivset *on-line* detekteerimist.) Nagu eelnevalt mainitud, me teeme seda analüüsides tuntud ja laialt kasutatavate meetodite abil saadud PAS-de neeldumis- ja ergastusspektreid.

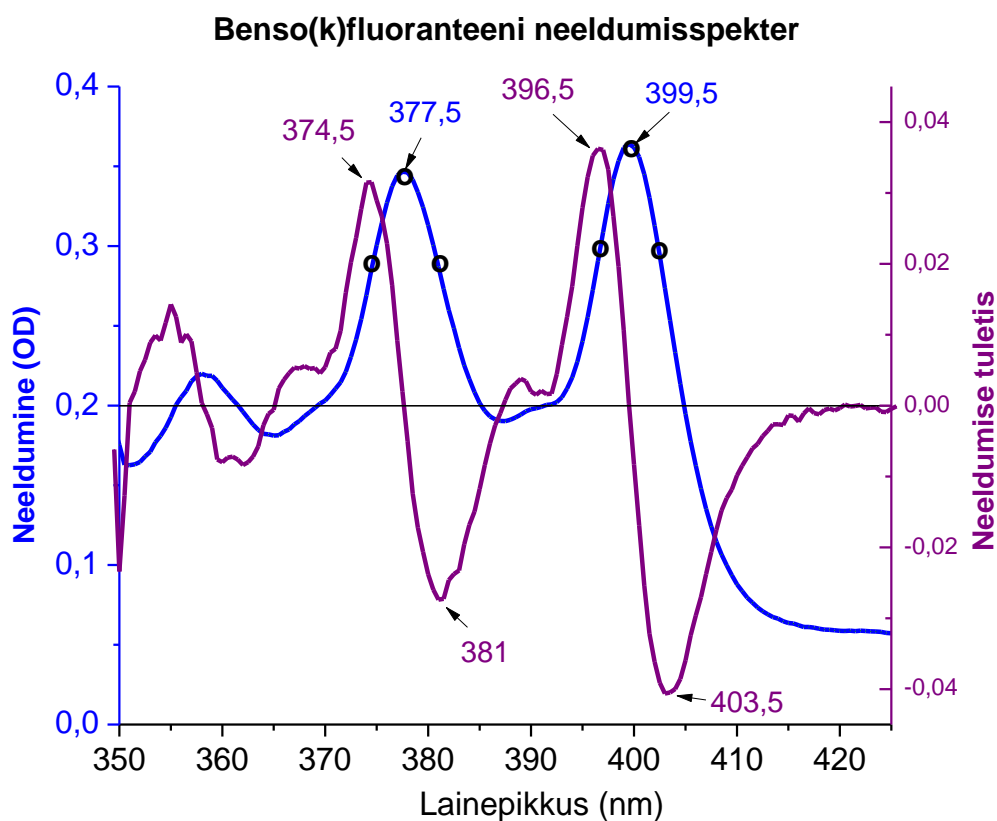
Analüüs ei ole midagi keerulist ja koosneb kahest etapist. Esimeses etapis me leiame otsitava PAS-i neeldumis- või ergastusspektrist karakteristikud neeldumis- või ergastusmaksimumid ja teeme kindlaks, millised ergastusvalguse lainepikkused nendele maksimumidele vastavad. Järgmise etapina, sõltuvalt edasistes lõikudes kirjeldatud valguse modulatsiooni meetodist, me leiame mõned spetsiifilised punktid või lainepikkuste vahemikud leitud neeldumis- või ergastusmaksimumide ümber. Selleks me võtame mõne sobiva arvutiprogrammiga, näiteks OriginLab-i ORIGIN 9.1, tuletise PAS-i neeldumis- või ergastusspektrist ja otsime saadud tuletisgraafikult karakteristikud maksimum- ja miinimumpunktid, millele omakorda määrame vastavad neeldumise või ergastuse lainepikkused. Tulemuseks me saame karakteristiklike lainepikkuste komplektid, mis võimaldavad nende lainepikkustega ergastusvalguse kasutamisel tuvastada neeldumis- või ergastusmaksimume ka ilma kogu spektrit uuesti mõõtmata. See on väga oluline just selektiivsel *on-line* detekteerimisel, kuna võimaldab säästa aega mõõtmistel ja selektiivselt detekteerida otsitavaid PAS-e.

Analüüsi protseduuri näitlikustamiseks ja punktide valiku selgitamiseks sobib väga hästi järgmine näide. Võtame näiteks benso(k)fluoranteeni neeldumisspektri, mis on toodud joonisel 1. (Benso(k)fluoranteenil on väga kõrge fluorestsentsi kvantsaagis (ca 100 %) ja seetõttu ta sobib meie meetodika kontrollimiseks ideaalselt.)



Joonis 1. Benso(k)fluoranteeni neeldumisspekter.

Nüüd võtame sellest neeldumisspektrist tuletise, kujutame samal graafikul ja märgime mõned iseloomulikud punktid (miinimumid ja maksimumid) ja leiame sobivad lainepikkused (joonis 2).



Joonis 2. Benso(k)fluoranteeni neeldumisspekter (sinine) ja selle tuletis (violetne). Nooltega on näidatud neeldumisspektri maksimumidele ja selle tuletisspektri maksimumidele ja miinimumidele vastavad lainepikkused, mis, nagu näha, asetsevad sümmeetriliselt neeldumismaksimumide suhtes.

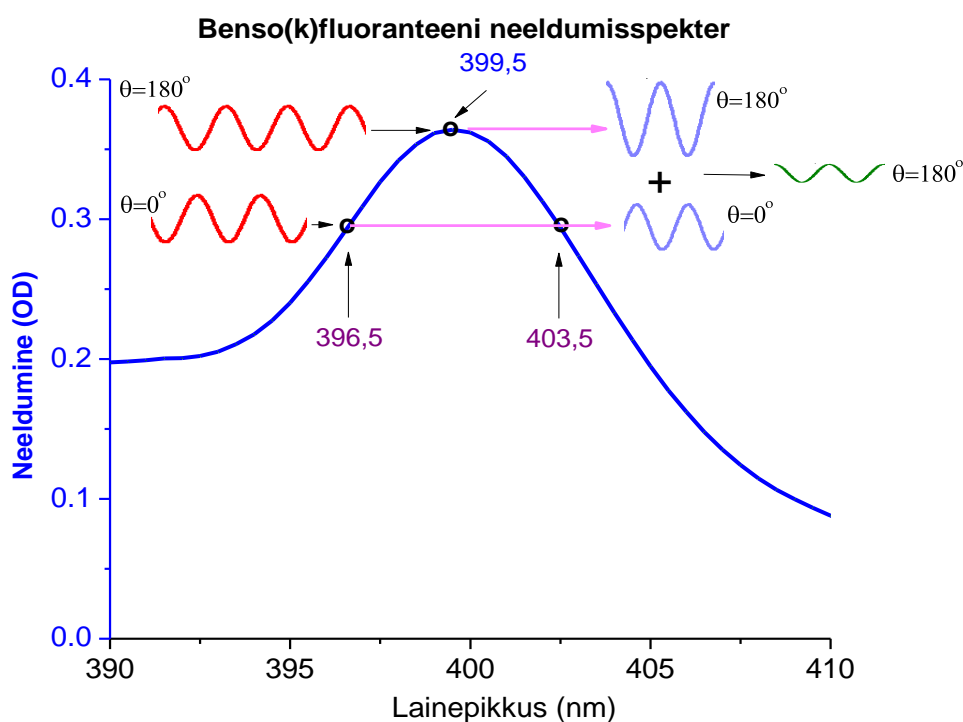
Sobivateks lainepikkusteks on neeldumisspektri tuletise maksimumid ja miinimumid, mis määravad vastavalt neeldumise kiireima kasvu ja languse punktid, ning ka neeldumisspektri maksimumid, mida me soovime tuvastada meie mõõtmiste käigus. Nende punktide valik on tingitud sellest, et esiteks, neeldumisspektri maksimumi lähedase joone sümmeetria tõttu on neeldumismaksimumi ja kiireima kasvu punktide vahe sama, mis neeldumismaksimumi ja kiireima kahanemise punktide vahe. Teiseks, neeldumisspektri tuletise miinimum ja maksimum asuvad neeldumismaksimumi suhtes kahel „poolel“ teineteise vastas, kusjuures tuletised nendes punktides on erimärgilised. See võimaldab võtta neeldumisspektri maksimumi n.ö. „kahvlisse“ ja kasutades järgmist meie poolt pakutud allpool kirjeldatud ideed, kuidas tuvastada otsitavaid PAS-e ilma nende kogu neeldumisspektrit mõõtmata, registreerides seejures hoopis nende fluorestsentsi.

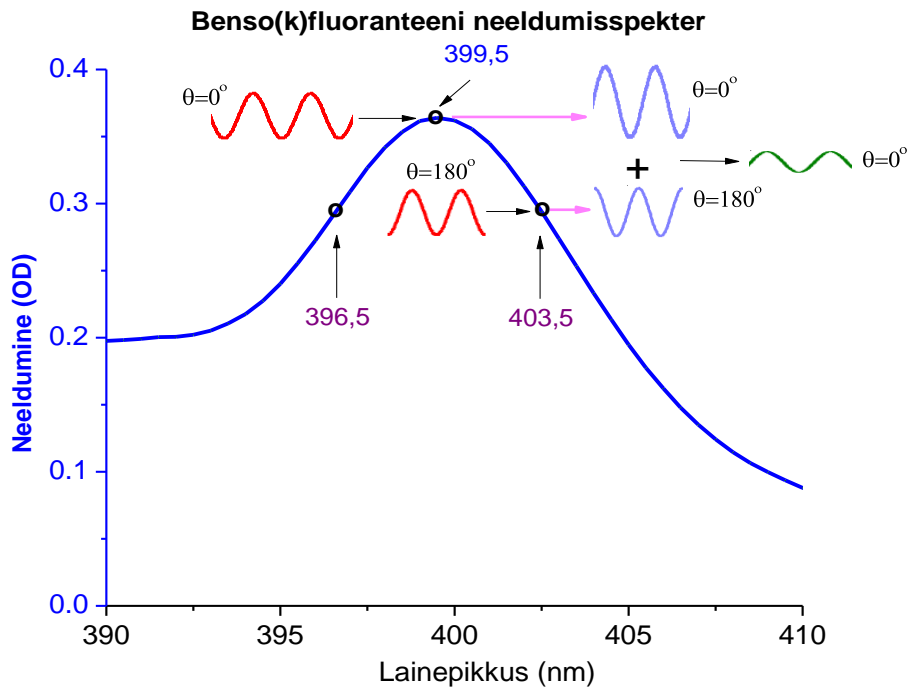
Ergastusvalguse modulatsioon

Teiseks peamiseks ideeks on moduleeritud ergastusvalguse kasutamine. Selline lähenemine võimaldab luua tingimusi, mille juures detekteeritava aine fluorestsentsi signaal muutub selgesti eristatavaks ümbritseva keskkonda fluorestsentsi fooni signaalist. See võimendab detekteerimise selektiivsust ja mitmekordselt parandab selle tundlikkust. Antud hetkeks oleme välja mõelnud ja katsetanud kahte ergastusvalguse modulatsiooni võimalust.

Ergastava valguse intensiivsuse modulatsioon

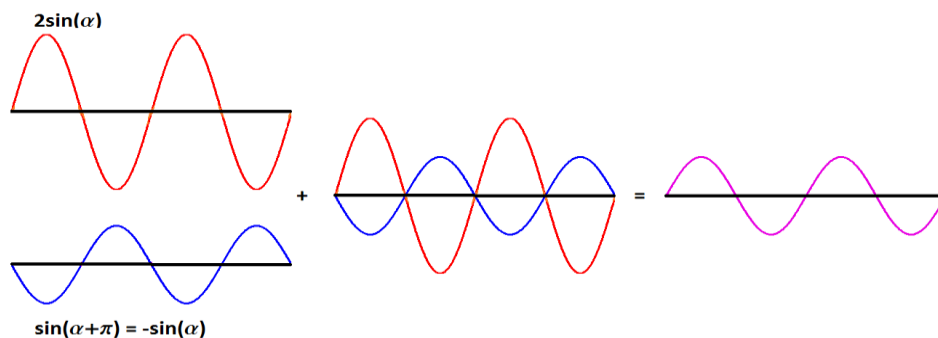
Esimene võimalus seisneb selles, et me ergastame vee proovi, kus otsime mingi konkreetse PAS-si, paarikaupa esialgu selle PAS-le vastava neeldumise kiireima kasvu ja maksimumi punktides ja seejärel maksimumi ja kiireima kahanemise punktides, kasutades nendele punktidele vastava lainepikkusega valgust. Seejuures me moduleerime kahe erineva punkti ergastuse valgussignaali intensiivsusi nii, et nad oleksid vastasfaasis. Üks lihtsamatest meetoditest seda teha on valgusallikate vaheldumisi sisse ja väljalülitamine. Kuid võib kasutada ka sinusoidaalselt moduleeritud intensiivsusega valgust, nagu see on näidatud joonisel 3, mis juba tuttava benso(k)fluoranteeni näitel seletab kahe ergastusetapi põhimõtet.





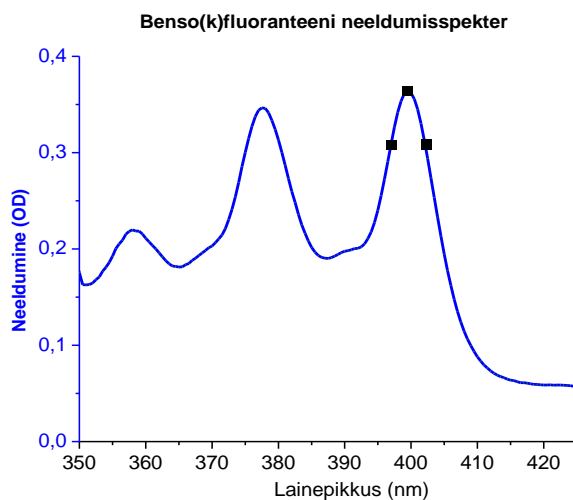
Joonis 3. Ülemisel pildil on punase sinusoidiga kujutatud kaks amplituud-moduleeritud erineva lainepikkusega ergastavat signaali, mis on vastasfaasis. Rohelisega on tähistatud meie poolt mõõdetav fluorestsentsi signaal, mis on kahe fluorestsentsisignaali (sinised sinusoidid) summa. Tugevamale neeldumisele riba maksimumis vastab tugevam fluorestsentsi signaal. Alumisel pildil on kujutatud sama joonis, aga nüüd pikemalainelise punktidepaari jaoks.

Kui me ergastame ainet kahel valitud lainepikkusel vastasfaasis moduleeritud intensiivsustega valgussignaalidega, siis loomulikult on ka mõõdetavad fluorestsentsi signaalid vastasfaasis. Ja kui me mõõdame kahte fluorestsentsisignaali korraga, siis mõõtmistulemuseks on juba signaalide vahe. Mõõtmisüsteem liidab kahte vastasfaasilist signaali ja järele jääb signaal, mille amplituud on võrdne kahe amplituudi vahega ja ta omab suurema amplituudiga signaali faasi.

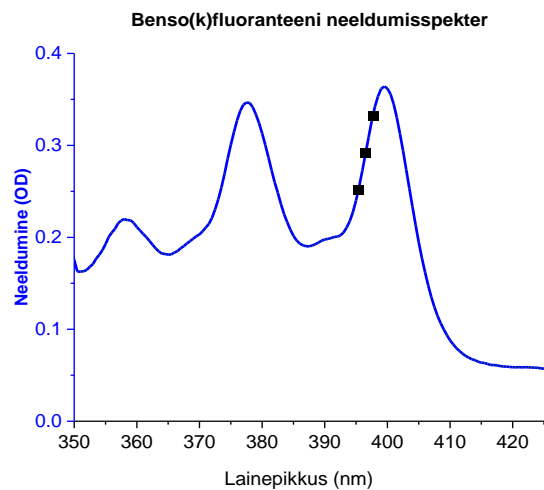
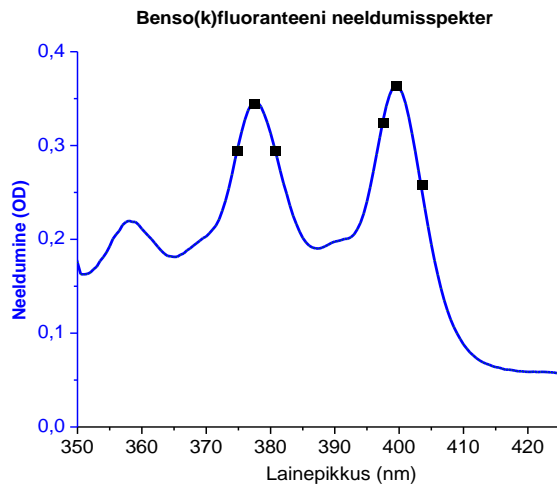


Joonis 4. Diagramm illustreerib, kuidas liituvad kaks erineva amplituudiga ja vastasfaasis signaali.

See, kui suur tuleb kahe fluorestsentsi signaali vahe, sõltub sellest, milliste lainepikkustega me parajasti ainet ergastame ja kui tugev on aine neeldumine nendel lainepikkustel (kas meil on tegemist neeldumismaksimumiga või mingi muu alaga). Kuna me ergastame ainet juba valitud lainepikkustel, siis me ootame, et kahest fluorestsentsi signaalist hakkab domineerima see, mille faas on sama mis signaalil, mida kasutati aine ergastamiseks selle neeldumisspektri maksimumis. Kui me mõõdame sellist fluorestsentsi signaali kahe meie poolt juba valitud spetsiifilise lainepikkuste paari jaoks ja mõõtmistulemuseks saame umbes samasugused signaali amplituudväärtused, ja kui osutub, et need signaalid on vastasfaasis, siis me võime päris kindlalt öelda, et meil on tegemist neeldumisspektri maksimumiga, mis on otsitava ainele iseloomulik. Kui meil fluorestsentsi signaalid on samas faasis, siis meil kindlasti ei ole tegemist neeldumismaksimumiga ja tõenäoliselt meil ei ole otsitavat ainet proovis, või on selle aine kontsentratsioon detekteerimiseks liiga väike. Kui meil on mõõtmistes kahtlusi, näiteks pärast mõõtmisi üks lainepikkuste paar annab palju suurema signaali kui teine paar, aga signaalid on vastasfaasis, siis me võime kontrollida mingi teise neeldumismaksimumi olemasolu, mis on sellele ainele omane (benso(k)fluoranteenil on neid kindlasti vähemalt kaks). Nii me tagame selektiivsuse meie mõõtmismetoodika kasutamisel (vt. Joonis 5).



Kui me ergastamise käigus satume punktidesse, mis neeldumisspektri peal asuvad nii, nagu on näidatud kõrvaloleval joonisel, on meil tegemist neeldumisspektri maksimumiga. Signaalid on peaaegu võrdsed ja vastasfaasis. Selline olukord tõestab otsitava aine olemasolu.



Kui me ergastamise käigus satume punktidesse, mis neeldumisspektri esimese maksimumi juures asetsevad juba ebasümmeetriliselt, siis me saame juba ebavõrdsed vastasfaasis signaalid ja otsitava aine olemasolu on juba kahtluse all. Et lõplikult aine olemasolu tõestada, saab minna teise maksimumi juurde ja teha analoogsed mõõtmised. Kui me jälle ei saa oodatud tulemust, siis otsitavat ainet juba kindlasti ei ole.

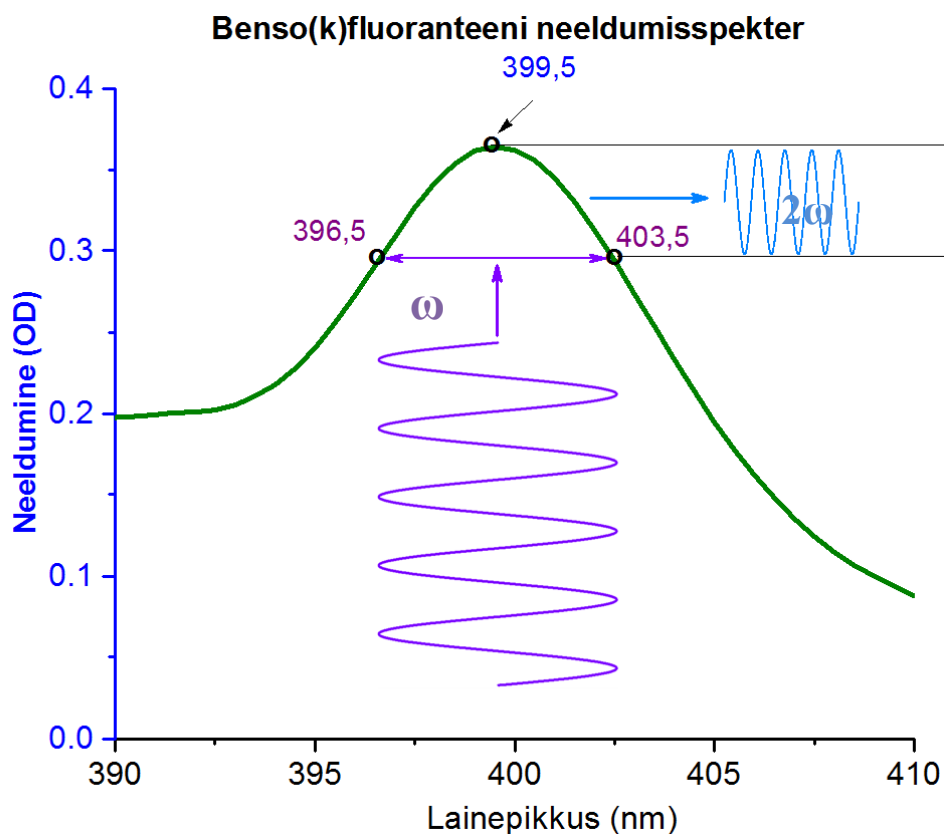
Olukorras, kui me ergastame ainet meie poolt valitud punktides aga tegelikult me ei ole neeldumisspektri maksimumi peal, siis me mõõdame kahte signaali, mille vahe on küll ühesugune, kuid nad on samas faasis. Sellisel juhul võib kindlalt öelda, et tegemist ei ole otsitava ainega

Joonis 5. Intensiivsuse moduleerimismetoodikas esinevad juhud.

Ergastava valguse lainepikkuse modulatsioon

Teine võimalus ergastava valguse moduleerimiseks on hoopis teise iseloomuga. Selle meetodi aluseks on erinevalt eelmisest näitest ergastava valguse lainepikkuse modulatsioon selle võimalikult konstantse intensiivsuse juures.

Selleks, et seda teostada, me valime otsitava PAS-i neeldumisspektrist juba mitte mõned konkreetsed punktid, vaid lainepikkuste vahemiku, mis tavaliselt asub neeldumisspektri kiireima kasvu ja kahanemise punktidele vastavate lainepikkuste vahel. Kuigi üldiselt võivad sobida kõik vahemikud, kus neeldumis- või ergastusspektri maksimumile vastav lainepikkus asub keskel ja vahemiku piire määravad lainepikkused, mis vastavad maksimumi suhtes sümmeetriliselt asetsevatele neeldumis- või ergastusspektri punktidele. Joonis 6. Illustreerib seda benso(k)fluoranteeni näitel.



Joonis 6. Benso(k)fluoranteeni neeldumisspektri osa, kus on näidatud neeldumismaksimum ja selle suhtes sümmeetriliselt asetsevad punktid. Violetse nooltega on näidatud lainepikkuste vahemik, mille vahel toimub ergastusvalguse lainepikkuse sinusoidaalne modulatsioon. Tulemusena saame kahekordse sagedusega fluorestsentsi signaali.

Järgmise etapina me valime leitud lainepikkuste vahemikus pideva kiirgusspektriga valgusallika ja optiliste vahendite abil (nagu difraktsioonvõre või kitsa läbilaskvuseribaga interferentsfilter) hakkame valima selle spektrist vajaliku lainepikkusega ergastusvalgust mingi lihtsa matemaatilise seaduse järgi, tagades ergastusvalguse lainepikkuse ajalise muutuse. Näiteks, interferentsfiltri teatud viisil pööramisel tekitame eelnevalt määratud lainepikkuste vahemikus ajas sinusoidaalselt muutuva lainepikkusega ergastusvalguse, mida kasutamegi proovi ergastamiseks.

Nagu ka eelmise meetodi puhul, on moduleeritud lainepikkusega ergastusvalguse kasutamisel kasulikke omapärasid, mis aitavad tagada kogu PAS-de detekteerimismetoodika selektiivsuse ja parandada selle tundlikkust. Fluorestsentsi intensiivsus on võrdeline neeldunud valguse kogusega, mis, nagu me näeme neeldumisspektritest, sõltub ergastava valguse lainepikkusest. Seepärast, kui me ergastame proovi moduleeritud lainepikkusega valgusega, siis tulemuseks saame muutuva intensiivsusega fluorestsentsignaali. See signaal ilmutab teatud seaduspärasusi kui me ergastame eelnevalt valitud lainepikkuste vahemikus otsitava PAS-i neeldumismaksimumi ümber. Nimelt, kui proovis on olemas otsitav PAS ja me kasutame ajas sinusoidaalselt muutuva lainepikkusega ergastusvalgust sagedusega ω , siis moduleeritud valguse poole perioodi jooksul ($T_e/2$) fluorestsentsi intensiivsus jõuab nii kasvada kui ka langeda algse intensiivsuse nivoole, moodustades fluorestsentsignaali ühe tsükli. See tähendab, et kui meil on tegemist neeldumismaksimumiga, siis ergastava valguse lainepikkuse muutuse ühe perioodi T_e jooksul, jõuab fluorestsentsi intensiivsus teha kaks tsüklit andes kahekordse sagedusega 2ω signaali. Samas, kui proovis ei ole otsitavat PAS-i ja seega ka neeldumismaksimumi valitud lainepikkuste vahemikus, siis samal viisil moduleeritud valguse kasutamisel, me tavaliselt saame ainult ühekordse sagedusega ω signaali, mis tähendab, et teisel harmoonikul saadav signaal on nulli lähedane. See on väga oluline, kuna võimaldab selektiivselt detekteerida otsitava PAS-i neeldumisspektri maksimumi, mõõtes fluorestsentsignaali moduleeritud ergastusvalguse sageduse teisel harmoonikul (näiteks *lock-in* võimendi abil).

Lock-in võimendi kasutamine

Meie meetodika kolmas põhimõte puudutab signaali detekteerimist ja seisneb selles, et fluorestsentsi signaali mõõtmisel ja töötlemisel me kasutame *lock-in* võimendit. Selles aga pole midagi vapustavat, sest *lock-in* võimendi väljapaistva funktsionaalsuse ja moduleeritud ergastusvalguse kasutamise juures parima lõpptulemuse saavutamiseks on sellise mõõtmismetoodika valik lihtsalt loomulik.

Lock-in võimendi peamine omadus, mis teeb seda meie rakendustes väga kasulikuks, on selle võime signaali mõõtmisel „lukustada“ ennast talle sissejuhitud võrdlussignaali sagedusele ja mõõta kogu saadavast mõõtmisignaali spektrist ainult täpselt seda sagedust, mis asub võrdlussignaaliga samal sagedusel. Moduleeritud valgusega ergastatud proovi fluorestsentssignaali mõõtmisel see tähendab, et tänu kitsaribalisele registreerimisele tekib meil võimalus väga efektiivselt ja kiiresti vabaneda väliskeskonna müradest ja ergastava valguse modulatsioonist sõltumatust fluorestsentsfoonist. Selleks me juhime *lock-in* võimendi tugisignaali sisendisse ergastusvalguse moduleerimissagedusega signaali. See tõstab meetodika tundlikkust väga suurel määral ja parandab PAS-de avastamispiiri.

Järgmine *lock-in* võimendi kasulik omadus seisneb selles, et see on faasitundlik mõõteriist, mis suudab määrata faasivahet võrdlussignaali ja võrdlussignaaliga samal sagedusel oleva mõõdetava signaali vahel. See on väga oluline käesolevas töös esimesena tutvustatava meetodika puhul (ergastusvalguse intensiivsuse modulatsioon), kus järeltõlki tehakse just mõõdetavate signaalide faaside erinevuste alusel.

Teise ergastusvalguse modulatsiooni võimaluse korral (lainepikkuse modulatsioon) on oluline pigem võimalus tuvastada signaali, mis võrreldes *lock-in* võimendisse juhitud võrdlussignaaliga omab kaks korda suuremat sagedust. Ja selline võimalus on kaasajal *lock-in* võimendil ka olemas, mis meie meetodika juures teeb väga mugavaks PAS-de neeldumismaksimumide otsimise, mõõtes fluorestsentssignaali teisel harmoonikul. Ideaalsetes tingimustes ergastusvalguse lainepikkuse modulatsiooni sageduse ω korral tekib fluorestsentssignaal teisel harmoonikul (sagedusel 2ω) ainult siis, kui meil toimub ergastamine maksimumi ümbruses. Teistel juhtudel teisel harmoonikul signaal puudub või on väga väike, sõltudes süsteemi mittelineaarsusest.

Veelgi olulisem on aga see, et *lock-in* võimendi lubab mõõta väga väikesi signaale tänu mürade efektiivsele mahasurumisele väljaspool kitsaribalist detekteerimisriba ja lubab teha

kiireid reaalajalisi mõõtmisi, võimaldades PAS-de tundlikku *on-line* detekteerimist, mis on meie meetodika puhul üks olulisemaid eesmärke.

Tegelikult, ergastava valguse modulatsioon ja selle eelnev ergastus- ja neeldumisspektrite analüüs muutuks mõttetuks, kui meil poleks võimalust detekteerida signaale moduleeritud valguse sagedustel. Me ei saaks tagada selektiivsust ega tundlikkust. Seepärast *lock-in* võimendi kasutamine PAS-de detekteerimismetoodika juures on olulisim põhimõte, sest just see viib kokku kõik eelmised põhimõtted ja muudab need töötavaks kompleksiks.

PAS-de detekteerimismetoodika kokkuvõte ja lühike rakendamise

kirjeldus

Ülalpool kirjeldatud põhimõtete rakendamine praktikas näeb välja järgmiselt.

Esimese sammuna me valime, millist kahjulikku polütsüklist aromaatsset süsivesinikku me soovime *on-line* mõõtmisega tuvastada ja analüüsime selle eelnevalt mõõdetud ergastus- või neeldumisspektreid. Analüüsi käigus teeme kindlaks ergastus- ja neeldumismaksimumid, mille ümber valime sümmeetriliselt asetsevad punktid, mis tavaliselt vastavad ergastus- või neeldumisspektri tuletise maksimumidele ja miinimumidele. Seejärel määrame nendele punktidele vastavad lainepikkused, mida kasutame järgneva ergastava valguse modulatsioonipiiride määramiseks, valides sõltuvalt modulatsioonimeetodist kas ainult määratud punktidele vastavaid lainepikkusi või kasutame lainepikkuste vahemikku, mille keskel on ergastus- või neeldumisspektri mingi maksimum ja äärtes selle maksimumi juures võetud tuletise maksimumid ja miinimumid (või lihtsalt maksimumi suhtes sümmeetriliselt asetsevad punktid).

Teise etapina me ergastame proovi moduleeritud valgusega ja mõõdame fluorestsentsi signaali *lock-in* võimendiga. Valguse moduleerimiseks on kaks võimalust. Esimene põhimõte seisneb ergastava valguse intensiivsuse sinusoidaalses või riskülikfunktsiooni kujulises modulatsioonis kahes erinevas eelmises etapis kindlaks tehtud lainepikkuse paaris ja detekteeritava fluorestsentssignaali amplituudi ja faasi jälgimises. Faas tehakse kindlaks *lock-in* võimendi abil juhitud võrdlussignaali suhtes, mille sagedus vastab moduleeritud ergastusvalguse sagedusele. Amplituudid saadakse kahes punktis vastasfaasis olevate fluorestsentssignaali intensiivsuste liitmisel ning mõõdetakse ka sama seadme abil. Kui kahe punktide komplekti juures faasid on erinevad ja amplituudid on võrdsed, siis meil on tegemist just otsitava PAS-i maksimumiga ja seega ka PAS-i proovis olemasoluga. Vastasel juhul me detekteerime kas maksimumi puudust ja seega ka PAS-i puudust kui saadavate signaalide faasid on ühesugused või mingi teise aine maksimumi, kui erinevate faaside juures signaalidel on ka erinevad amplituudid, mis ka signaliseerib pigem PAS-i puudumiset. Kuigi selle kontrollimiseks võib valida ka mingi teise PAS-le omase ergastus- või neeldumismaksimumi ja korrata protseduuri.

Teine modulatsiooni idee peitub ergastava lainepikkuse modulatsioonis. Me võtame esimeses etapis kindlaks tehtud lainepikkuste vahemikus pideva spektriga valgusallika ja hakkame selle spektrist järk-järguliselt valima sobiva lainepikkusega valgust nii, et tekkiks ajas

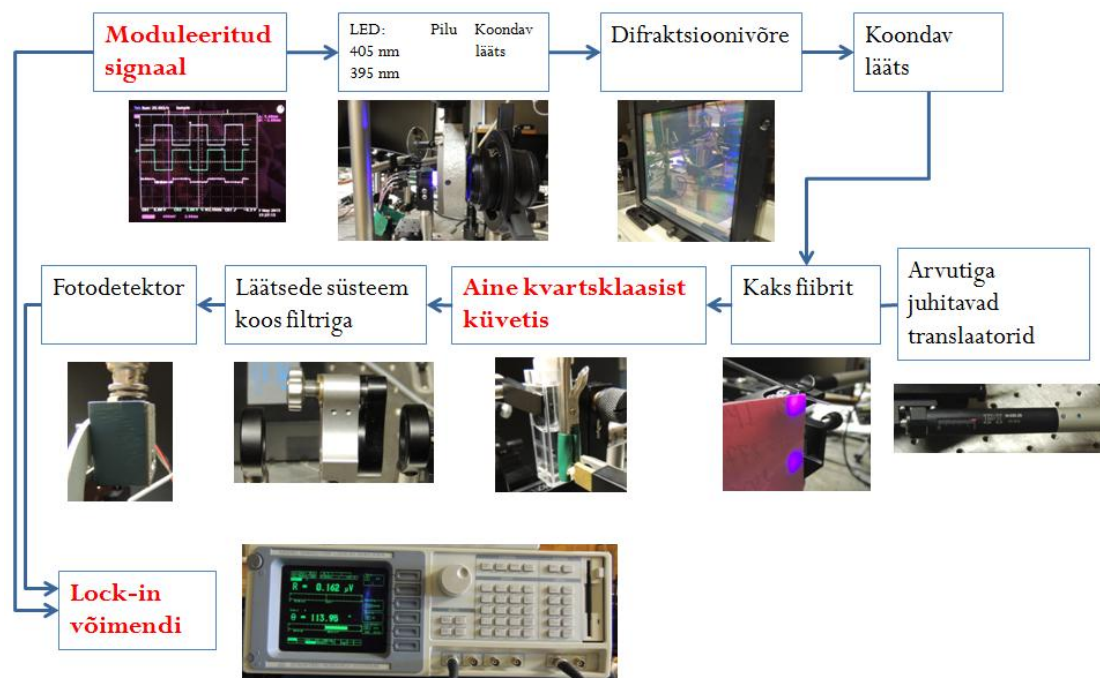
sinusoidaalselt muutuva lainepikkusega ergastav valgus. (Seda saab teha näiteks kitsaribalise interferentsfiltri edasi-tagasi pööramisega). Seejärel me ergastame selle valgusega proovi ja mõõdame fluorestsentsi signaali *lock-in* võimendiga moduleeritud valguse sageduse teisel harmoonikul. Kasutatav detekteerimisviis on tingitud sellest, et ergastus- või neeldumismaksimumi juures fluorestsentsi signaal muutub ergastava valguse lainepikkusest kaks korda kiiremini, kuna juba selle poole perioodi jooksul jõuab nii suurenda kui ka langeda algväärtuse juurde. Selline fluorestsentssignaali käitumine on märgatav ainult ergastus- või neeldumismaksimumi juures. Teistel juhtudel me sellist pilti ei näe ja teisel harmoonikul saame nulli-lähedase signaali. See tähendab, et kui proovis on PAS, siis me detekteerime teisel harmoonikul olevat signaali ja kui seda ei ole, siis teisel harmoonikul signaal puudub. Muidugi, ka siin võib olla mõningaid kahtlusi saadavas tulemuses, kui samasse kohta sattub mõne teise aine ergastus- või neeldumismaksimum. Seepärast teoreetiliselt saab kasutada sellistes olukordades veel selektivsemat meetodit, mille idee seisneb nii ergastava valguse kui ka detekteeritava fluorestsentssignaali lainepikkuse topeltmodulatsioonis. Aga antud töö raames seda ei vaadelda, kuigi mõned seletused saab leida lisa 1.

Kõik mõõtmised on teostatavad *on-line* režiimis ja seega prooviks võib olla ka süsteemist läbivoolav vesi, kus jälgitakse mingi konkreetse PAS-i sialdust.

Metoodika katseline kontroll

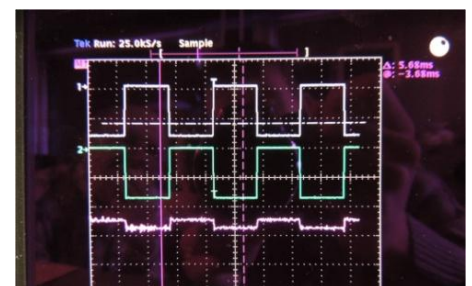
Ergastusvalguse intensiivsuse modulatsioon

Et kontrollida ülalkirjeldatud ergastava valguse intensiivsuse moduleerimise ideed praktikas, ehitasime katseseadme, mille skeem on toodud joonisel 7.



Joonis 7. Katse skeem.

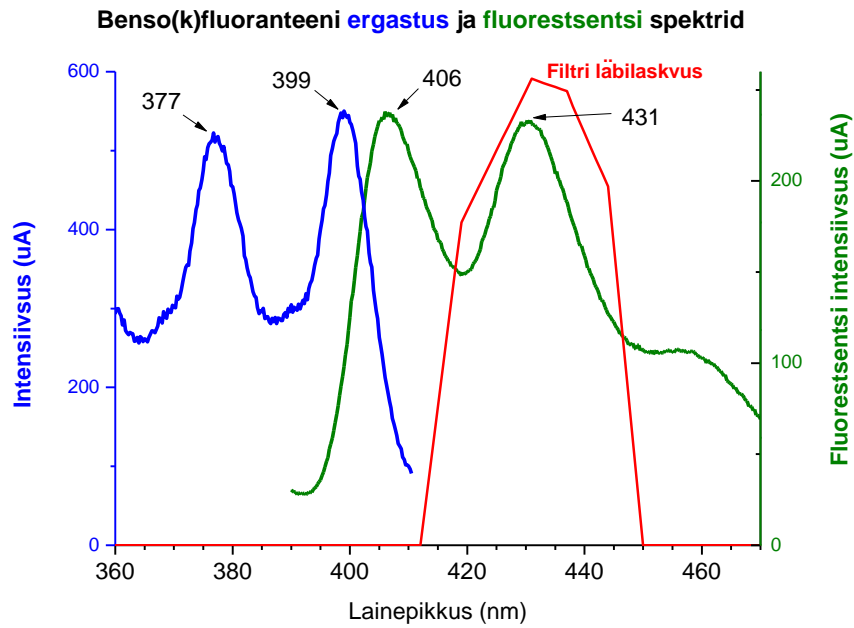
Sobivate lainepikkustega pooljuhtlaserite puudumise tõttu otsustasime kasutada suhteliselt kitsa spektriga LED-e, mis kiirgavad meid huvitavas spektriosas. Meie meetodika kohaselt pidime ergastama ainet valitud lainepikkustel ja detekteerima signaali *lock-in* võimendi SR850 DSP abil. Selleks me moduleerisime toitevolu nii, et LED-d lülitusid vaheldumisi sisse ja välja (joonis 8).



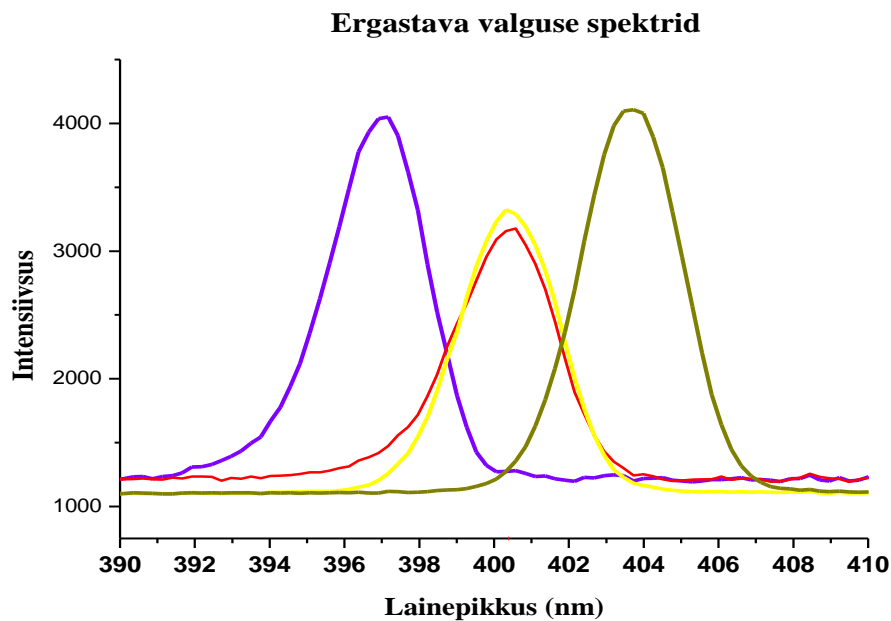
Joonis 8. LED-de toitevolu modulatsioon.

Siis lahutasime LED-idest tuleva valguse spektri difraktsioonivõre abil ja suunasime saadud valguse 1mm fiibritesse.

Fiibrid olid kinnitatud arvutijuhitud translaatorite külge, mis liigutasid neid piki spektrit ja võimaldasid LED-ide spektritest välja selekteerida sobiva lainepikkusega ergastused. Sellisel spektraalselt selekteeritud valguse abil ergastasime kvartsküvetis olevat ainet ja mõõtsime fluorestsentsi läbi filtri (joonis 9) fotodiodiga ODA-6WB-500M (Optodiode) ja *lock-in* võimendiga. Testaineks võtsime benso(k)fluoranteeni lahuse.

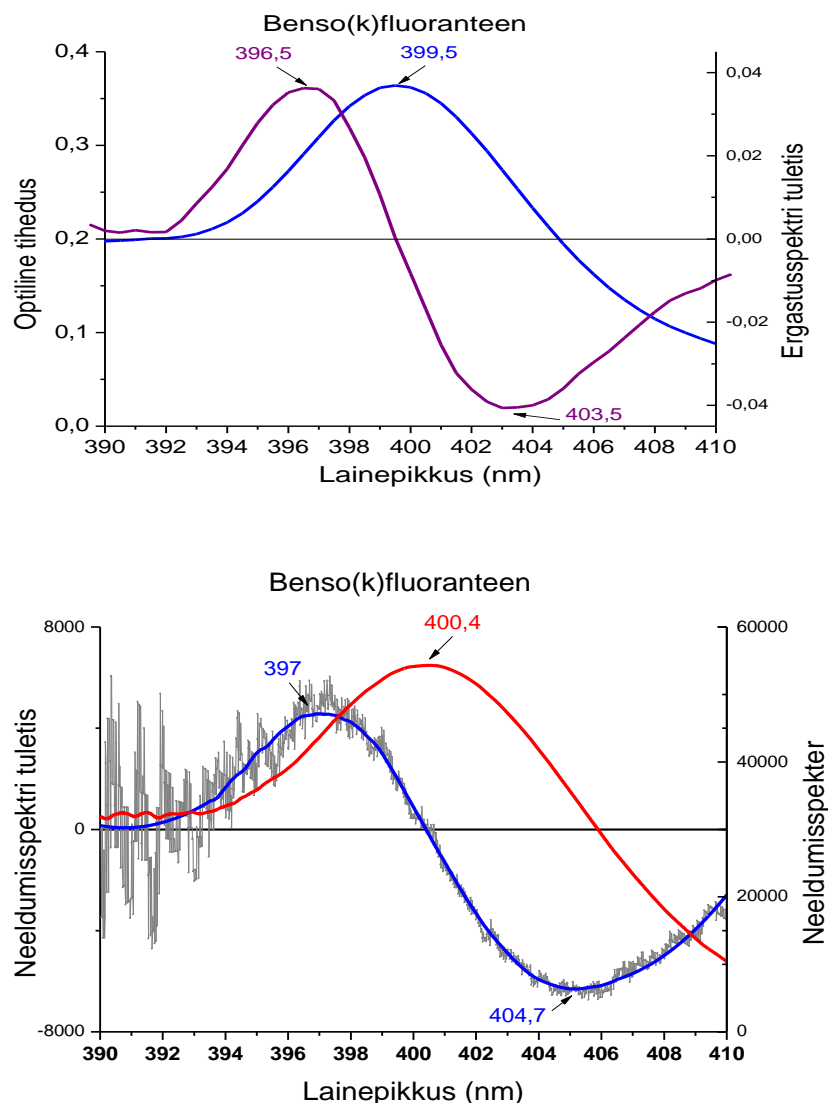


Joonis 9. Punasega on näidatud meie poolt kasutatud filtri läbilaskvus. Nagu näha, laseb see filter läbi ainult fluorestsentsi signaali, mida me fotodetektori abil mõõdame.



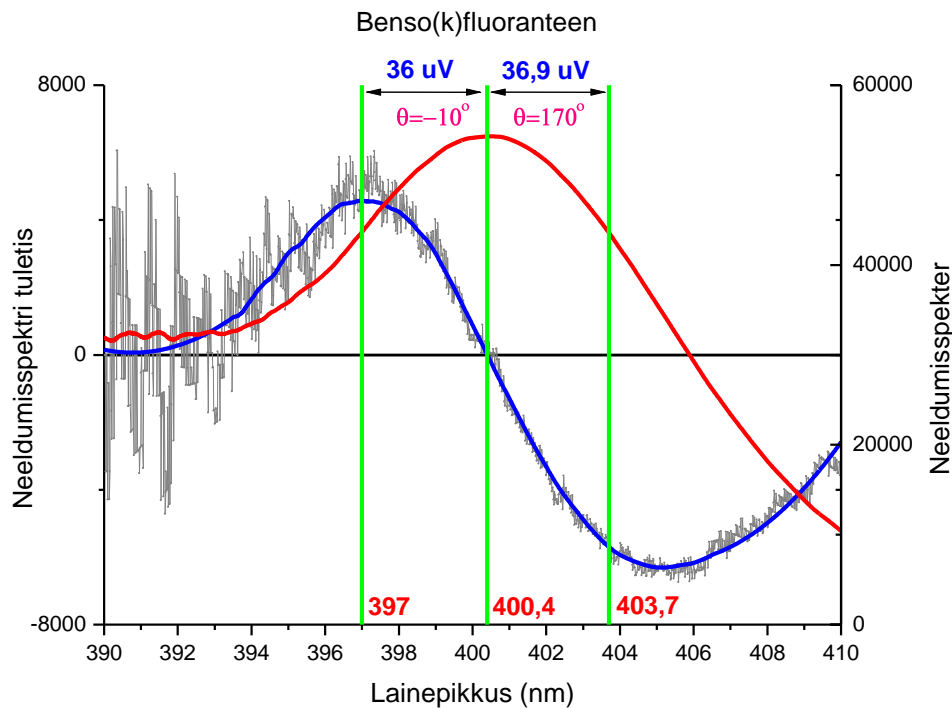
Joonis 10. Kasutatud ergastava valguse spektrid, kui nende maksimumid on seadistatud lainepikkustele 397, 400 ja 403,5 nm. See joonis illustreerib ka seda, et ergastav valgus oli võimeline mõjutama ainet põhimõtteliselt ainult meie poolt valitud lainepikkustel, kuna ergastava valguse spektrijooned olid suhteliselt kitsad, umbes 3 nm maksimumi pooleri kõrgusel.

LED-ide kasutamine tegi süsteemi natuke keerukamaks, aga see ei takistanud meid saada oodatud tulemusi. Esiteks, et võrrelda ehitatud süsteemi juba olemasolevate fluoromeetritega me jooksutasime seda lainepikkuste pideva skaneerimise režiimis ja mõõtsime uuritava aine ergastusspektri. Selleks mõõtsime fluorestsentsi intensiivsuse $I_{fl}(\lambda_{ex})$ sõltuvalt ergastava valguse lainepikkusest. Kuna ergastava valguse intensiivsus eri lainepikkustel ei olnud konstantne, siis pidime mõõtma ka ergastava valguse intensiivsuse lainepikkuse sõltuvuse $I_{ex}(\lambda_{ex})$. Jagades fluorestsentsi ergastusega $\frac{I_{fl}(\lambda_{ex})}{I_{ex}(\lambda_{ex})}$, saime ergastusspektri. Kui võrrelda seda fluoromeetriga mõõdetud ergastusspektriga, siis on näha, et saadud tulemused on väga sarnased, mis kinnitab, et meie süsteem annab ka õigeid tulemusi (joonis 11).



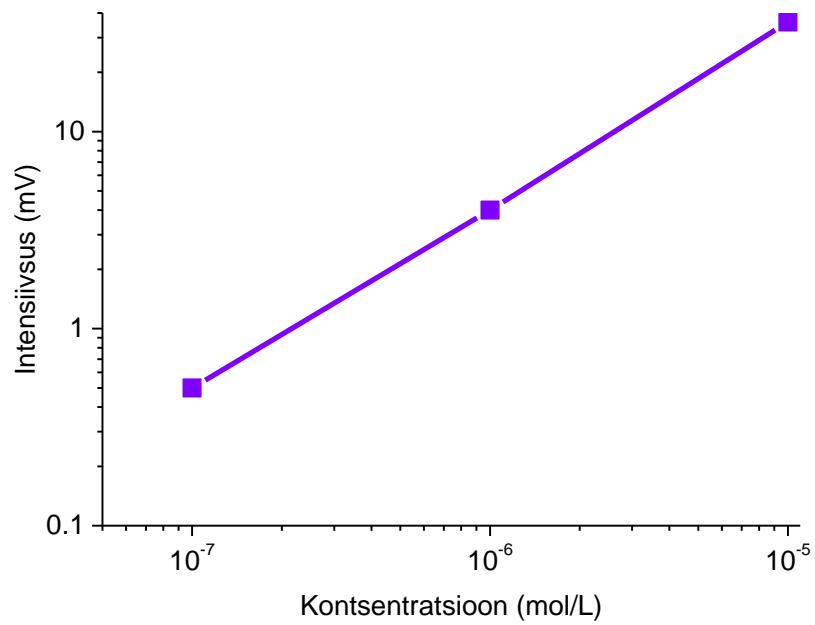
Joonis 11. LED-ga mõõdetud ergastusspekter (alumine graafik) ja fluoromeetriga mõõdetud ergastusspekter (ülemine graafik).

Teiseks, me kontrollisime ideed, et ergastades ainet talle iseloomulikel lainepikkustel, saab teda selektiivselt tuvastada. Me tegime seda mõõtes fluorestsentsi intensiivsuste vahet ergastades kahel valitud lainepikkusel. Ja saime oodatud tulemuse – fluorestsentsi diferentsisignaali olid sarnased (36 ja 36,9 μV) ja vastasfaasis ($\theta = -10^\circ$ ja 170°) (joonis 12).



Joonis 12. Roheliste joontega on näidatud ergastuse lainepikkused. Ergastuspaaridele vastavad diferentsisignaali ja faasid on toodud joonise ülalosas. Faaside erinevus 0-st ja 180-st tuleb sellest, et mõõtmistel kasutasime omavõimendusega fotodetektorit, mis natuke mõjutab mõõdetava fluorestsentsisignaali faasi. Nagu näha, on signaalide faasivahe ikkagi 180 kraadi, st nad on vastasfaasis.

Tegime ka lahuste kontsentratsiooni rea ja leidsime fluorestsentsi intensiivsuse sõltuvuse kontsentratsioonist (joonis 13). Selgub, et mõõdetud kontsentratsioonide vahemikus on signal proportsionaalne fluorestsentsi intensiivsusega ja kuna see säilitab proportsionaalsust isegi kontsentratsioonini 10^{-7}M juures, võib järeldada, et isegi sellisel väikesel kontsentratsioonil õnnestus meil benso(k)fluoranteeni tuvastada.

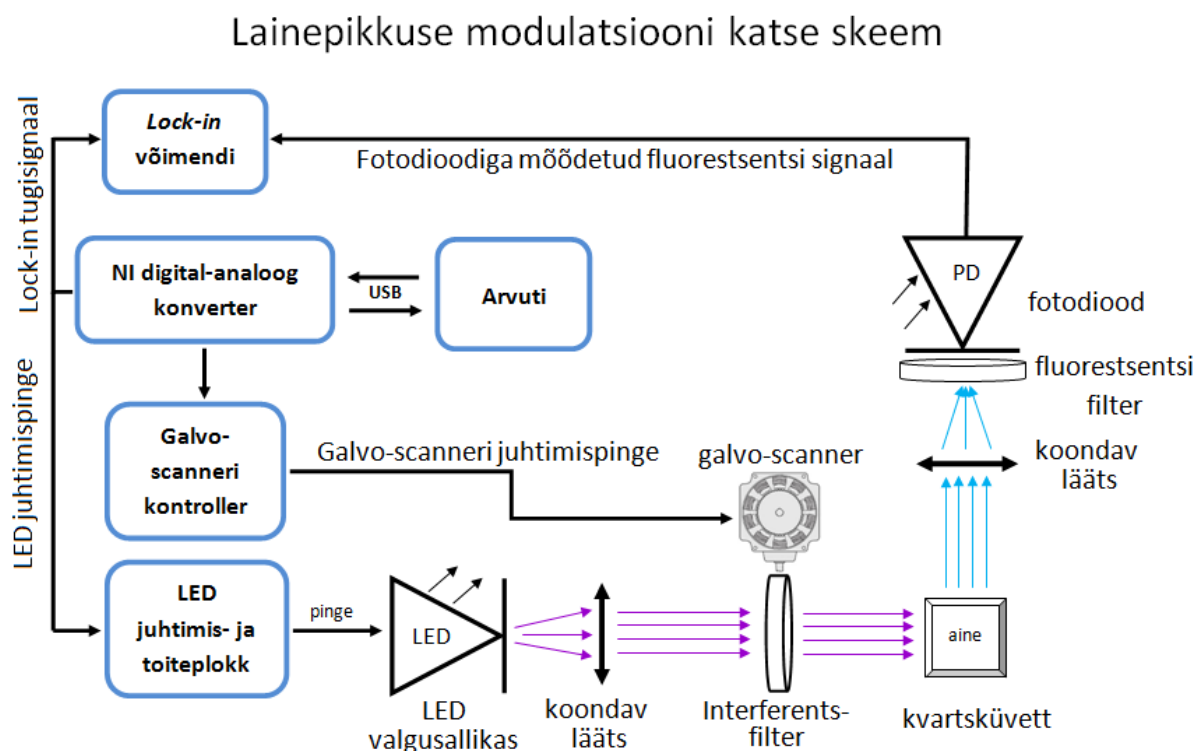


Joonis 13. Fluorestsentsi intensiivuse sõltuvus kontsentratsioonist

Kokkuvõttes võime tõdeda, et katsetes saadud tulemused tõestavad, et meie ergastusvalguse intensiivuse moduleerimise meetodika töötab hästi, ning seda saab tõepoolest kasutada kahjulike PAS-de detekteerimisel ja tuvastamisel.

Ergastusvalguse lainepikkuse modulatsioon

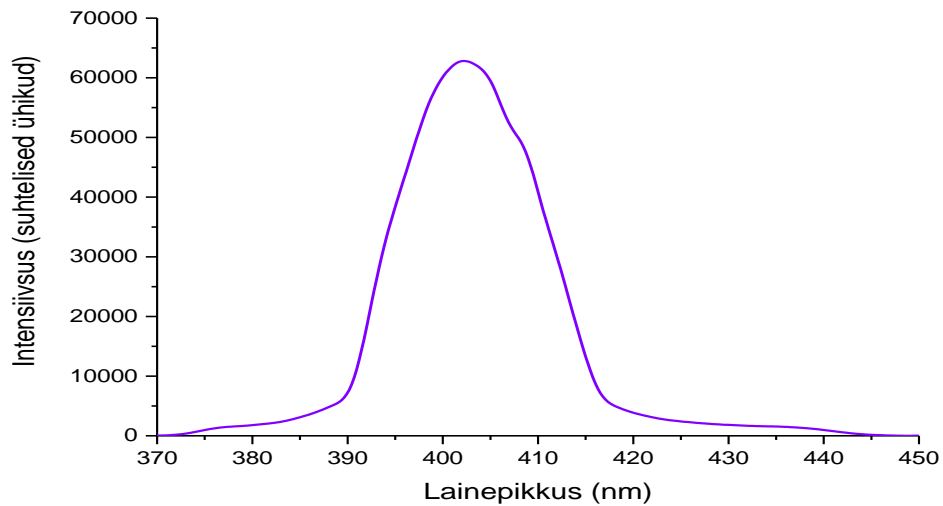
Veidi põhjalikumalt tegime me katseid ergastusvalguse lainepikkuse moduleerimise meetodi kontrolliks, kasutades selleks hetkeks tekkinud lihtsamat ja täiuslikumat võimalust lainepikkuste selekteerimiseks ergastusallika pidevast spektrist. Laborisse saabusid tellitud interferentsfiltrid ja me ehitasime oma katseseadme ümber. See võimaldas kõvasti vähendada eelmise seadme ergastava valguse valguskadusid ning tegi süsteemi juhitavamaks ja kompaksemaks. Uue katseseadme skeem on toodud joonisel 14.



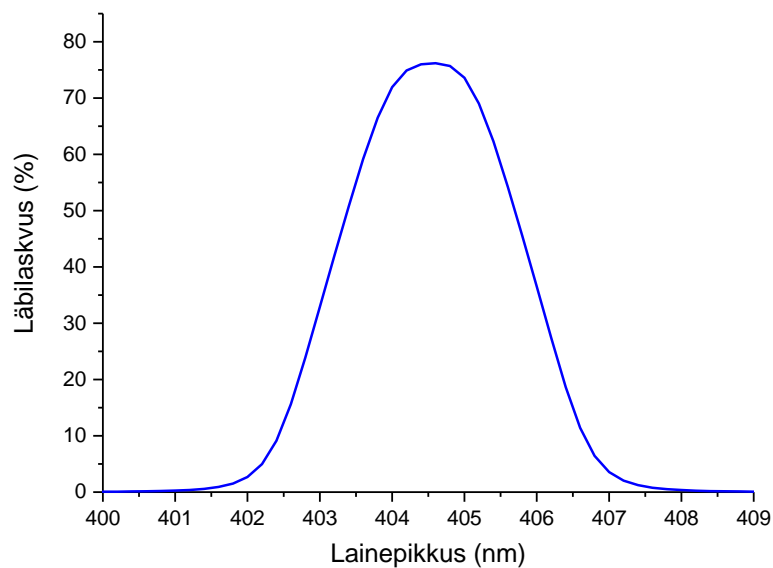
Joonis 14. Ergastusvalguse lainepikkuse modulatsiooni katse skeem.

Ergastusvalguse allikaks me taaskord otsustasime kasutada LED-i selle väikese hinna ja meid huvitavas lainepikkuste piirkonnas pideva spektri tõttu (LED-i spekter on toodud joonisel 15). LED-i valgust me muutsime paralleelseks valguskimbuks koondva läätse abil ja suunasime läbi kitsaribalise (ca 3nm riba laiusega, vaata joonis 16.) interferentsfiltri uuritavale proovile. Ergastava valguse lainepikkuse modulatsiooniks pöörasime galvo-scanneri abil interferentsfiltrit samal ajal nii, et ergastava valguse lainepikkus muutus ajas sinusoidselt. Pööramist ja ergastusvalguse intensiivsuse konstantsust juhtisime meie koostatud LabView programmi ja National Instruments USB6251 digitaal-analoog konverteri

abil. Proovist saadud fluorestsentsi signaali kogusime ergastusvalguse suuna suhtes 90 kraadi all et välistada ergastusvalguse sattumist fotodiodile. Sama eesmärki teenis ka eelmises katseseadmes kirjeldatud fluorestsentsi filter. Fluorestsentsi signaali mõõtsime *lock-in* võimendi abil ergastava valguse lainepikkuse modulatsiooni teisel harmoonikul.



Joonis 15. Katses kasutatud LED kiirgusspekter.



Joonis 16. Interferentsfiltri läbilaskvuse spekter, mille maksimum on 404.5 nm.

Katse ettevalmistamise detailid

Ergastava valguse lainepikkuse sinusoidaalsuse saavutamine

Antud katse puhul parima tulemuse saavutamiseks oli oluline tekitada ergastusvalguse lainepikkuse sinusoidaalne muutumine ajas. Kuigi interferentsfiltri kasutamisel lihtsalt seda teostada ei õnnestu, kuna filtri läbinud valguse lainepikkus sõltub selle langemisnurgast mitted sinusoidaalselt, vaid omab keerulisemat sõltuvust:

$$\lambda_c = \lambda_0 \cdot \sqrt{1 - \frac{\sin^2 \theta}{K^2}}. \quad (1)$$

See tähendab, et kui me lihtsalt muudame valguse filtrile langemise nurka ajas lineaarselt filtrit pöörates, ei õnnestu saada sinusoidaalselt muutuvat lainepikkust. Küll aga saame soovitud tulemuse, kui muudame filtri asendit erinevate nurkade võrra kvaasipidevalt teatud lühikeste ajavahemike järel. Selliste nurkade määramiseks me töötasime välja algoritmi ja koostasime arvutusprogrammi LabVIEW programeerimiskeskonnas.

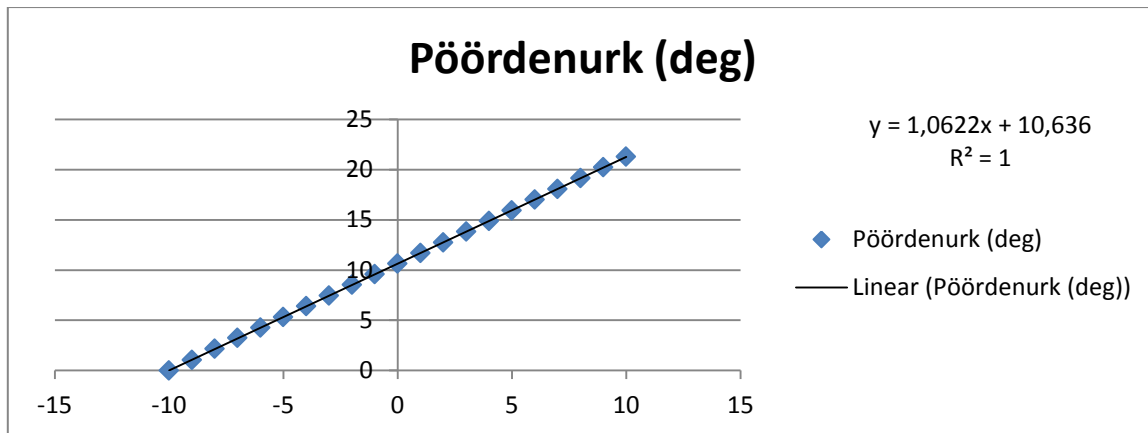
Algoritmi sisu on järgmine. Me valime otsitava PAS-i ergastus- või neeldumisspektri analüüsi käigus määratud sobiva lainepikkuste vahemiku ja tekitame selles lainepikkuste vahemikus $\lambda_{max} - \lambda_{min}$ ajast sõltuva koosinusfunktsiooni kasutades järgmist seost:

$$\lambda(t) = \frac{\lambda_{max} - \lambda_{min}}{2} \cdot \cos \omega t + \frac{\lambda_{max} + \lambda_{min}}{2}. \quad (2)$$

Seejärel võtame saadud funktsiooni ühe perioodi $T = 2\pi/\omega$, jagame selle N ajavahemikuks (sõltuvalt soovitavast täpsusest), saame N ajahetke t_i ja leiame igale ajahetkele vastava lainepikkuse λ_i . (Meie katses $N = 1000$ andis andis piisavalt täpse tulemuse.) Järgmisena leiame nendele lainepikkustele λ_i vastava interferentsfiltri pöördnurka võrrandist (1):

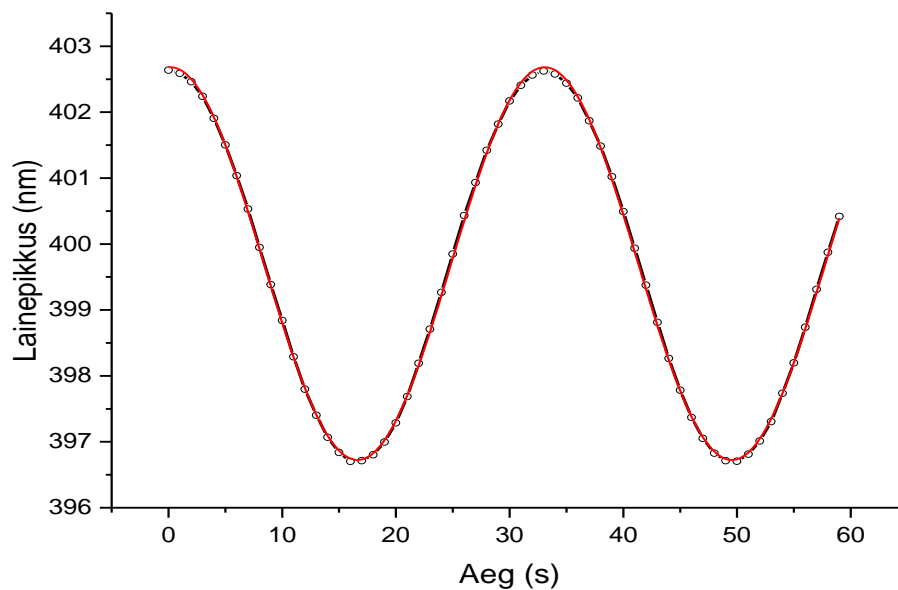
$$\theta_i = \arcsin \left(K \cdot \sqrt{1 - \frac{\lambda_i^2}{\lambda_0^2}} \right). \quad (3)$$

Kuna filtri pööramist sooritasime galvo-scanneri abil, siis tuli viimase sammuna konverteerida saadud koosinuse järgi muutuvatele lainepikkustele vastavad nurgad galvo-scanneri juhtimispingeteks. Õnneks filtri pöördumisnurga ja galvo-scanneri juhtimispinge vaheline seos oli lineaarne; lineaarse võrrandi parameetrid määrasime eelnevas eksperimentis (Joonis17).



Joonis 17. Eksperimentaalselt määratud sõltuvus galvomootori pinge ja selle pöördumisnurga vahel.

Lainepikkuse ajas muutumise sinusoidaalsust sai kontrollitud FSD-mini spektromeetri abil, mille tarkvara võimaldas teha spektrite automaatseid mõõtmisi valitud ajavahemiku tagant (vt. joonis 18).



Joonis 18. FSD-mini spektromeetriga uuritud lainepikkuse ajaline muutus.

Nagu graafikult näha, toimus lainepikkuse muutumine väga heas lähenduses sinusoidaalselt ja seega meie algoritm töötab antud olukorras perfektselt.

Ergastava valguse intensiivsuse konstantsuse saavutamine

Ergastava valguse lainepikkuse modulatsiooni korral peab pidama meeles ka seda, et saadud mõõtmistulemusi mõjutab kõvasti ka ergastusvalguse intensiivsuse ebastabiilsus ja üldiselt on selle mõju selektiivsele ja tundlikule detekteerimisele negatiivne. Näiteks ergastusvalguse intensiivsuse vähenemine samal ajal kui suureneb valguse neeldumine mingis lainepikkuste vahemikus võib teatud olukordades põhjustada täiesti mittemuutva fluorestsentsi signaali. Või mõjutab intensiivsuse muutus fluorestsentssignaali teist harmoonikut, takistades mõõtmistulemuste analüüsi ja järelduste tegemist analüüdi kontsentratsiooni kohta. Seepärast on väga oluline, et ergastava valguse lainepikkuse modulatsiooni korral valguse intensiivsus erinevatel lainepikkustel oleks konstantne.

Iseenesest on selline olukord aga vähetõenäoline, sest juba LED kiirgusspektrist (joonis 15) on näha, et erinevatel lainepikkustel on valguse intensiivsus erinev. Peale selle mõjutab valguse intensiivsust ka interferentsfiltri läbilaskvuse sõltuvus pealelangeva valguse langemisnurgast. Mida suurem nurk, seda vähem valgust laseb filter läbi, kusjuures muutus ulatub mitmekümne protsendini. Seepärast ergastava valguse intensiivsuse konstantsuse tagamine skaneerimisel osutus meie jaoks väljakutseks. Siiski õnnestus meil ka see ülesanne edukalt lahendada.

Selleks me kasutasime LED toiteploki LDC501 (Stanford Research Systems) võimalust juhtida LED toitevoolu vastavalt modulatsioonisisendisse saadetavale juhtimissignaali. Koostasime LabVIEW programeerimiskeskonnas programmi, mis võimaldab autonoomselt leida selliseid juhtimispingeid, mille juures LED toitevoolu muutus kompenseerib erinevatel lainepikkustel intensiivsuse muutuse. See on võimalk tänu sellele, et LED valguse intensiivsus on proportsionaalne selle toitevooluga. Programm õige LED juhtimispinge leidmiseks sai aga keeruline. Esimese sammuna see uurib, kuidas filtri pööramisel muutub ergastava valguse intensiivsus ilma LED-i toitevoolu juhtimiseta. Seejärel, hoides intensiivsust mõõtvat fotodiodi signaali konstantsena ja kasutades PID-regulaatori põhimõtteid protsessi kiirendamiseks, leiab programm sobivad LED juhtimispinged. Kuid sellega asi ei lõpe, kuna süsteemi mõninga hilistumise pärast juhtimispinge ei ole ideaalne ja vajab parandamist. Paranduste leidmiseks programm mõõdab intensiivsuse muutust eelmises etapis (PID süsteemi abil) leitud juhtimispinge kasutamisel ja võrdleb saadud tulemust teoreetiliselt ideaalse mittemuutuva intensiivsusega ja leiab, kui võrd tuleb juhtimispinget igas

lainepikkuse punktis suurendada või vähendada, et saada võimalikult konstantne intensiivsus. Võrdlusprotsessis kasutatakse ka kõige esimese mõõtmise andmeid ja arvutuse loogika on järgmine (nooltega on näidatud ühe suuruse teisele vastavus):

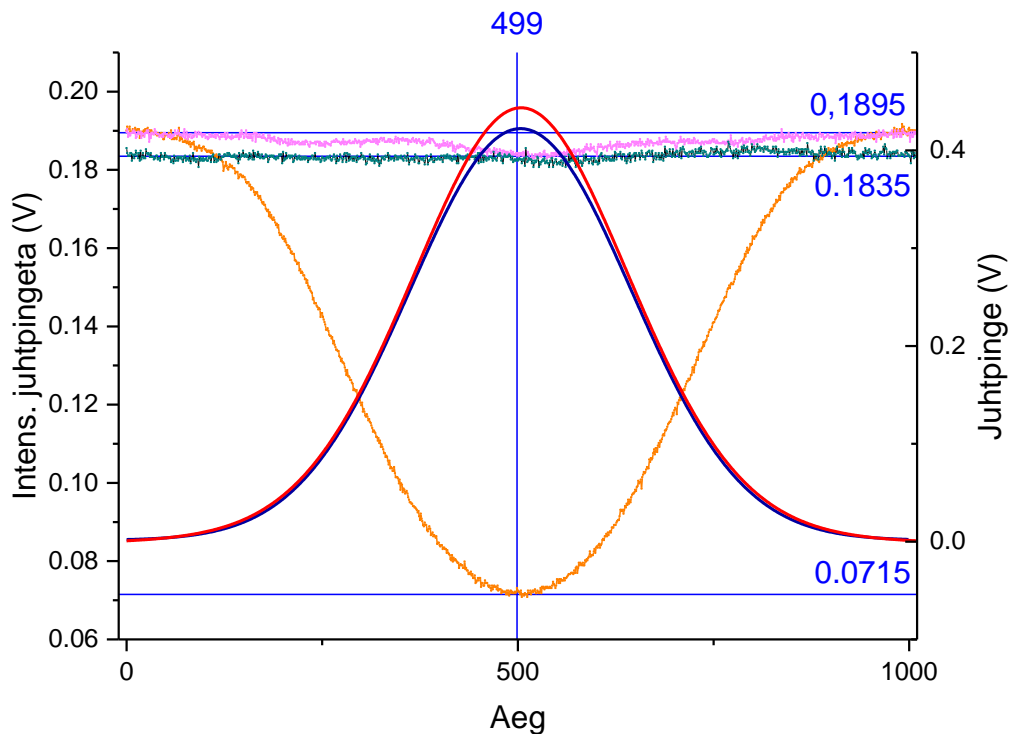
PID leitud juhtimispingega intensiivsus – juhtimiseta intensiivsus → PID abil leitud juhtimispinge
 Ideaalde intensiivsus – juhtimiseta intensiivsus → parandatud tundmatu juhtimispinge.

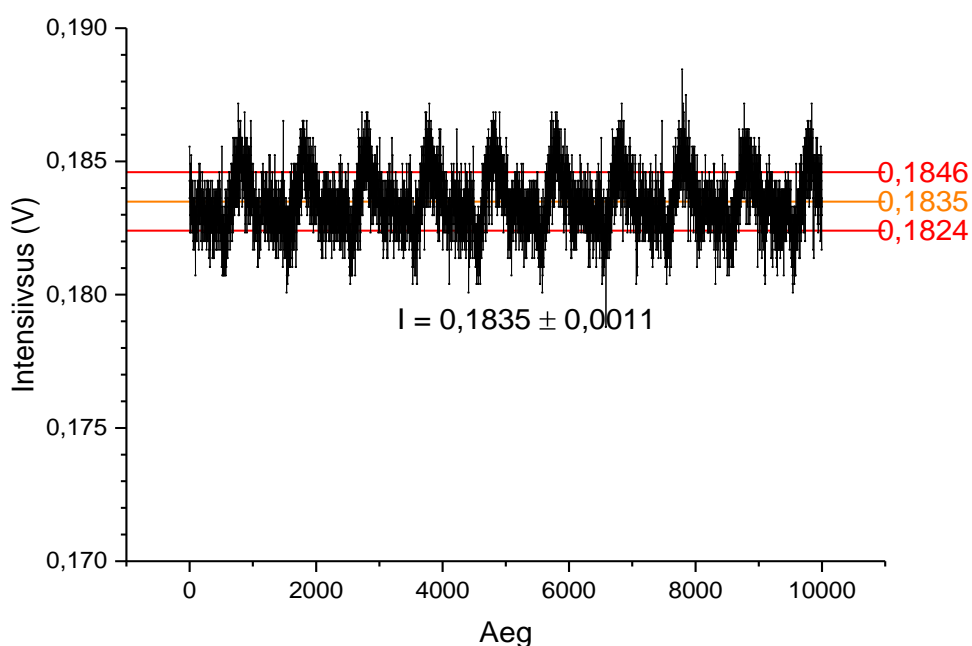
Siit

parandatud tundmatu juhtimispinge

$$= \frac{\text{PID abil leitud juhtimispinge} * \text{Ideaalde intensiivsus} - \text{juhtimiseta intensiivsus}}{\text{PID leitud juhtimispingega intensiivsus} - \text{juhtimiseta intensiivsus}}$$

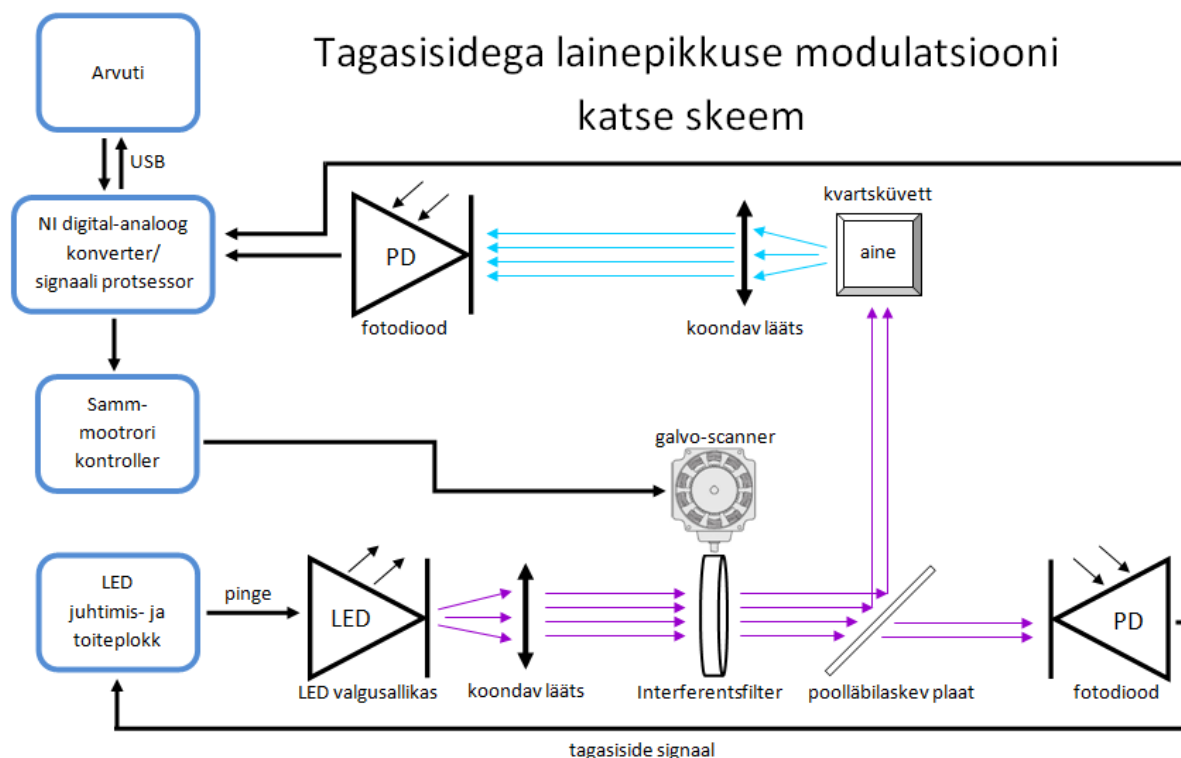
Sellisel määrab programm parandatud LED juhtimispinge ergastuse iga lainepikkuse λ_i jaoks. Parandatud juhtimispinge reeglina tuleb aga liiga mürane ja ei kõlba otseseks LED-i voolu juhtimiseks. Seepärast viimases etapis sileda juhtimispinge saavutamiseks program leiab parandatud juhtimispinge kõverale lähendusfunktsiooni parameetrid. Meie juhul väga hästi sobis lähendus Voigti kõveraga. (Voigti kõver on Gaussi ja Lorentzi kõvera konvolutsioon.) Saadud Voigtiga aproksimeeritud parandatud juhtimispinget kasutamegi ergastusvalguse konstantse intensiivsuse hoidmiseks. Ja nagu on näha joonisel 19, meil õnnestus seda teha täpsusega $\sim 1/200$.





Joonis 19. Ülemine joonis illustreerib, kuidas paraneb LED juhtimise protsessi käigus ergastava valguse intensiivsuse stabiilsus ja kuidas muutub LED juhtimispinge pärast parandanduse leidmist. Oranžiga on värvitud ergastusvalguse intensiivsus ilma juhtimiseta. Roosaks on värvitud ergastusvalguse intensiivsus, mille korral LED on juhitud PID süsteemi abil leitud juhtimispingega. Roheline kõver illustreerib parandatud LED juhtimispingega saadud ergastusvalguse intensiivsuse muutust ajas. Tumesinine on parandamata LED juhtimispinge ja punane on parandatud ja Voigti kõveraga aproksimeeritud LED juhtimispinge. Alumine joonis kirjeldab fotodiodiga mõõdetud LED juhtimisvooluga stabiliseeritud ergastava valguse intensiivsust koos standardhälbega.

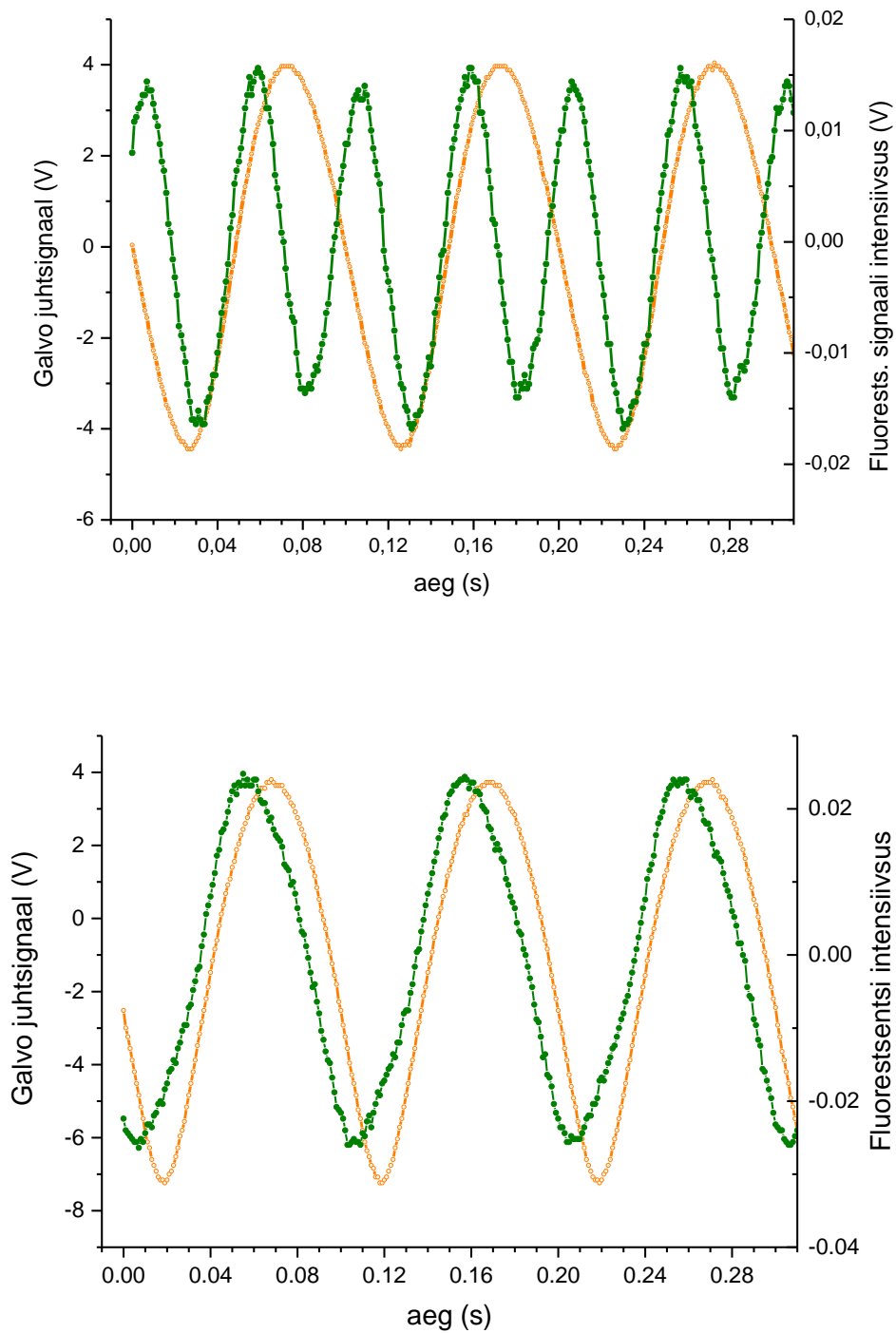
Tegelikult saaks LED-i toiteploki väljundvoolu juhtida ka negatiivse tagasiside abil. Näiteks, kui me kasutaks veel ühte fotodiodi ergastusvalguse intensiivsuse mõõtmiseks ja käsiks kontrollerial hoida selle fotodiodi signaali konstantsena (*power control* režiim). Selline meetod lubaks vältida keeruliste programmide koostamist ja annaks võimaluse hoida LED valguse intensiivsuse konstantsena. Kahjuks meie kontrolleri puhul andis see meetod ebarahuldavaid tulemusi ja me olime sunnitud otsima teist lahendust. Siiski, võimaliku tagasisidega katseskeemi saab näha joonisel 20.



Joonis 20. Tagasisidega lainepikkuse modulatsiooni katse skeem.

Katse tulemused

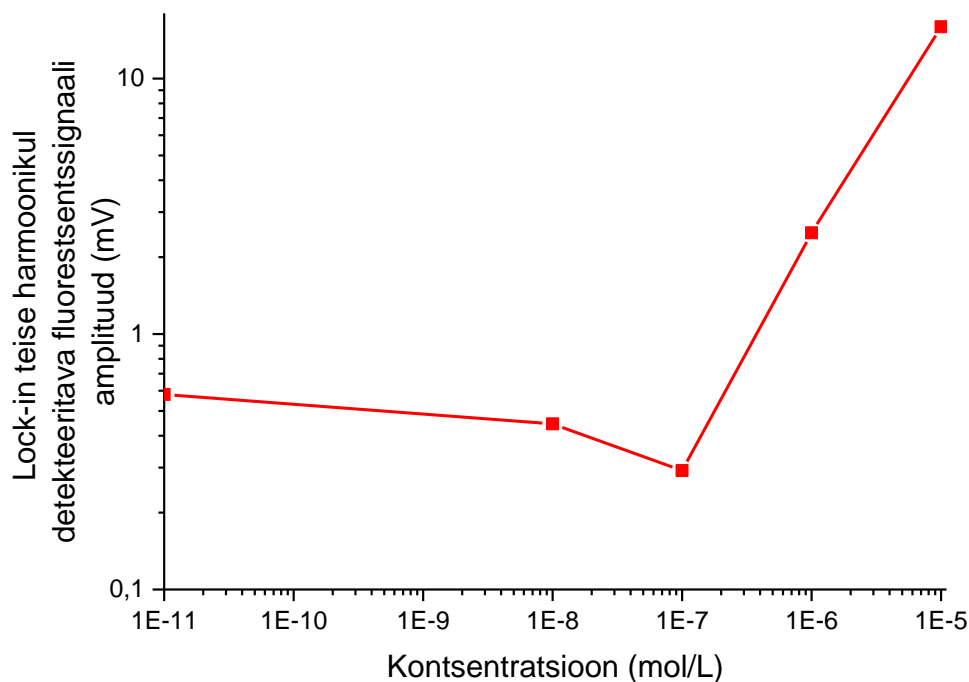
Kui kõik ettevalmistused olid tehtud, siis viisime läbi eksperimendi kasutades ka seekord benso(k)fluoranteeni lahust testobjektina. Kuigi seekord me ei hakanud neeldumisspektreid mõõtma vaid kontrollisime ostsillograafia fluorestsentsignaali kuju ja sagedust. Saadud ostsillogrammid on toodud joonisel 21 ning sellest on näha, et ka seekord me saime oodatud tulemuse. Kui me ergastasime proovi 400 nm ümbruses moduleeritud lainepikkusega valgusega, saime tulemuseks kahekordse sagedusega fluorestsentsignaali (joonisel 21 ülemine graafik). Kui aga sättisime lainepikkuste vahemiku nii, et ergastamine toimus spektri piirkonnas, kus benso(k)fluoranteenil ei ole neeldumismaksimumi, siis saime ühekordse sagedusega signaali (joonisel 21 alumine graafik).



Joonis 22. Fluorestsentsignaali ostsillogrammid. Ülemine graafik: ergastuse lainepikkus skaneeritud neeldumismaksimumi ümbruses. Alumine graafik: ergastuse lainepikkus skaneeritud neeldumismaksimumi kõrval. Fluorestsentsi signaal on näidatud rohelse joonega. Punasega joonega on näidatud moduleeritud lainepikkusega sama sagedusega muutuv galvo-scanneri jutimispinge.

Metoodika korrektset tööd kinnitavad ka lock-in võimendi abil tehtud mõõtmised, mille puhul ergastusvalguse moduleerimise sageduse teisel harmoonikul detekteeritav signaal oli märksa suurem kui esimese harmooniku signaal kui toimus proovi ergastus benso(k)fluoranteeni neeldumismaksimumi juures. Samas pilt muutus, kui me ergastasime neeldumismaksimumi kõrval: esimese harmooniku signaal oli suur ja teise harmooniku signaal nullilähedane (nii nagu meie metoodika teooria ennustaski). (Mõõtmistulemuste täpsustamiseks: benso(k)fluoranteeni 10^{-5}M kontsentratsiooni korral maksimumi juures teise harmooniku signaal oli umbes 16 mV ja esimese harmooniku signaal oli ca 1 mV.)

Metoodika tundlikkuse uurimiseks sai tehtud ka katse benso(k)fluoranteeni kontsentratsioonireaga, mille käigus me ergastasime erinevate kontsentratsioonidega benso(k)fluoranteeni lahuseid ja mõõtsime teisel harmoonikul saadavat fluorestsentsisignaali lock-in võimendiga. Me alustasime kontsentratsiooniga 10^{-5}M ja lõpetasime puhta lahustiga. Saadud tulemusi näitab joonis 23.



Joonis 23. Teisel harmoonikul signaali sõltuvus benso(k)fluoranteeni lahuse kontsentratsioonist. 1×10^{-11} kontsentratsioonile vastab puhas lahusti.

Nagu näha, kuni 10^{-7} M lahuseni saadav signaal väheneb ligikaudu lineaarselt kontsentratsiooni vähenemisega, mis on loogiline, kuna fluorestseeruva aine koguse vähenemisega väheneb ka saadav fluorestsenssignaal. Alates 10^{-8} M toimus aga järsk hüpe ja teisel harmoonikul oleva signaali suurenemine. Kui võrrelda 10^{-8} M juures saadud signaali puhta lahusti (0M) signaaliga, siis näeme, et nad on väga sarnased. See tähendab, et kontsentratsioonil 10^{-8} M me juba ei suuda detekteerida benso(k)fluoranteeni olemasolu. Lock-in süsteem ei suuda enam õigesti detekteerida teisel harmoonikul olevat fluorestsenssignaali, mis peegeldub mõõdetud signaali ebamäärases suurenemises. See tulemus näitabki, et antud hetkel meie meetodika tundlikkuse piiriks on 10^{-7} mooli benso(k)fluoranteeni ühe liitri kohta.

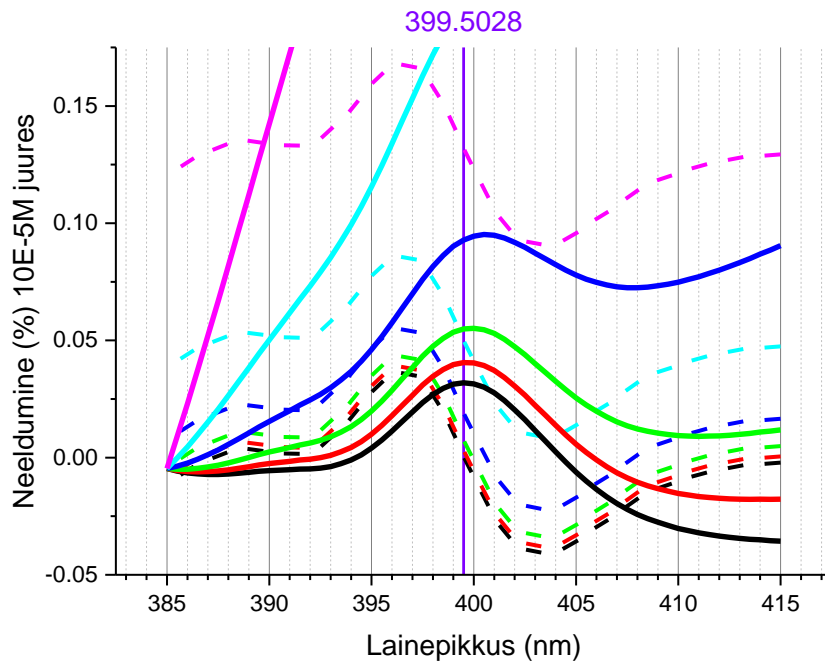
Tundlikkuse edasiseks tõstmiseks oleks vaja mõõtmise põhimõtet veelgi täiustada. Ülalkirjeldatud ergastuse lainepikkuse sinusoidaalne moduleerimine annab küll kahekordse sagedusega fluorestsenssignaali, kuid ei garanteeri selle täpset sinusoidaalsust. See lisab kõrgemaid harmoonikuid ja ebatäpsust mõõtetulemusse. Vaja oleks saavutada selline lainepikkuse muutumine ajas neeldumismaksimumi ümbruses, mis tagaks fluorestsensi intensiivsuse sinusoidaalse muutumise. Lisaks sellele tuleks kasutusele võtta suurema võimsusega LED. On ju fluorestsensi intensiivsus võrdeline analüüdi kontsentratsiooni ja ergastava valguse intensiivsuse korrutisega, seega kümnekordne ergastusintensiivsuse tõus võiks anda tundlikkuse kümnekordse tõusu (eeldusel, et fooni fluorestsens pole piiravaks faktoriks).

Lainepikkuse moduleerimise eksperimendi simulatsioon

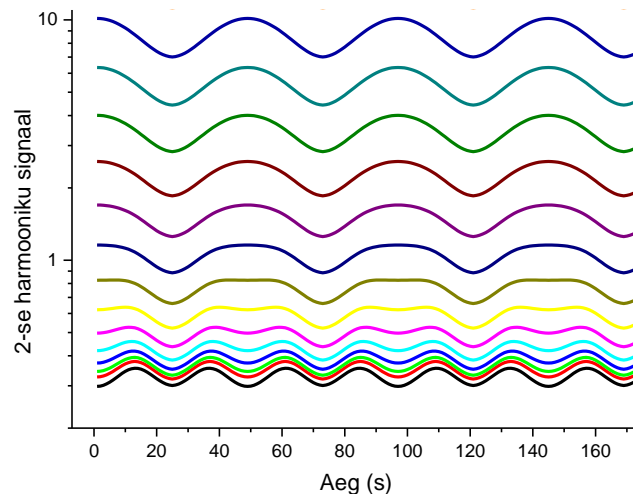
Käesolevaks hetkeks kõik katsed sooritati puhaste benso(k)fluoranteeni lahustega ja laboratoorses tingimustes. Väljatöötavat meetodikat planeeritakse aga kasutada veesaate määramiseks väliskeskonna tingimustes, kus saadav fluorestsentsisignaal sõltub mitmest erinevast mõjurist nagu fluorestsentsi foon, mürasignaalid, teiste ainete poolt ergastusvalguse neeldumine ja muudest asjaoludest. Seepärast on oluline teada, kuidas meie meetodika hakkab töötama välistingimustes ja peab läbi viima vastavad uuringud. Paljude välistegurite mõjude eksperimentaalne uurimine on aga aeganõudev ja rutiinne protsess. Seetõttu me otsustasime kasutada kaasaegse tehnoloogia eeliseid ja koostasime LabVIEW programmeerimiskeskonnas programmi ergastusvalguse lainepikkuse modulatsiooni kasutavate eksperimentide simuleerimiseks ja visualiseerimiseks.

Programm väga tõetruult imiteerib reaalselt katsesüsteemi alates interferentsfiltri pööramisest ja lõpetades *lock-in* võimendiga. Seejuures kasutatakse simulatsioonis reaalse eksperimendi parameetreid. Näiteks, programm võtab sisendiks reaalselt kasutatava ergastuse valgusallika (LED-i) kiirgusspektri ja otsitava aine neeldumisspektri selleks, et simuleerida virtuaalsest proovist saadavat fluorestsentsisignaali intensiivsuse ajalist muutust, mida programm kuvabgraafikul. Peale selle on võimalik lisada süsteemile erinevaid kõrvalmõjusid, mis imiteerivad väliskeskonna fluorestsentsi fooni ja müra signaale. Kõik see võimaldab virtuaalselt uurida lainepikkuste moduleerimise meetodikat aeganõudvaid reaalkatseid sooritamata.

Käesolevaks hetkeks sai simulatsiooni programmi abil uuritud näiteks lineaarse, erineva tõusuga fluorestsentsfooni mõju teise harmooniku signaalile. Selleks sai benso(k)fluoranteeni neeldumisspektrile lisatud programmiga genereeritud lainepikkusest lineaarselt sõltuv neeldumisriba. Saadud komplekssetest neeldumisspektritest, mille kujusid saab näha joonisel 24, arvutati välja fluorestsentsisignaal, kujutati see joonisel ja suunati virtuaalsesse *lock-in* võimendisse. Joonisel 25 on näha, kuidas sõltub fluorestsentsi signaali kuju lineaarse fooni tõusust.



Joonis 24. Jämedate pidevate joontega on näidatud benso(k)fluoranteeni 10^{-5}M kontsentratsiooniga lahuseneeldumisspektri moonutamine sõltuvalt lisatud lineaarsest neeldumisfoonist. Katkendlike joontega on näidatud saadud neeldumisspektrite tuletised. Alt üles suureneb lisatud lineaarse fooni tõus.



Jonis 25. Graafik illustreerib lainepikkuse moduleerimisel saadava fluorestsentsignaali ajalise käigu sõltuvust olenevalt lisatud lineaarse fooni tõusust. (Alt üles suureneb lisatud lineaarse fooni tõus. Mida suurem tõus, seda vähem on visuaalselt eristatav teise harmooniku signaali panus.)

Joonisel 25 on näha, et lineaarse fooni tõusu suurenemisega teise harmooniku komponent muutub **visuaalselt** aina väiksemaks ja lõpuks üldse kaob. See võib viia mõttele, et väliskeskkonna tugeva fluorestsentsfooni olemasolul meie meetodikat ei saa kasutada teise harmooniku puudumise tõttu. Tegelikult saame aga meie meetodika jaoks lootustandva tulemuse. Osutub, et virtuaalse *lock-in* mõõtmiste käigus me kogu aeg saame lähedase panusega teise harmooniku signaale ja lineaarsest foonist see märgatavalt ei sõltu. Seda saab väga kergesti seletada vaadates joonisel 24 kujutatud neeldumisspektrite tuletisi. On näha, et kuigi neeldumisspektrite kuju muutub ja isegi toimub nende neeldumismaksimumide nihkumine, jäävad neeldumisspektrite tuletiste kujudsamaks. Toimub ainult tuletisspektrite nihkumine vertikaalsuunas. See tähendab seda, et lainepikkuse moduleerimise käigus fluorestsentsi signaalis leidub teine harmoonik ka lineaarse fluorestsentsfooni korral. Tulemus näitab, et ka lineaarse fluorestsentsfooni juures meie meetodika peaks andma usaldusväärseid tulemusi.

Kokkuvõte

Käesoleva bakalaureusetöö ülesandeks oli teha ettevalmistav uuring polütsükliiliste aromaatsete süsivesinike suhtes selektiivse ja tundliku veesaaste anduri tööpõhimõtte väljatöötamiseks. Töö põhitulemused on järgmised:

- On välja pakutud ja eksperimentaalselt katsetatud polütsükliiliste aromaatsete süsivesinike fluorestsentsdetekteerimise kaks tööpõhimõtet:
 - ergastava valguse intensiivsuse moduleerimisel ja fluorestsentsi sünkroondetekteeerimisel põhinev süsteem
 - ergastava valguse lainepikkuse moduleerimisel ja fluorestsentsi teise harmooniku detekteerimisel põhinev süsteem.
- Ülalmainitud lainepikkuse moduleerimise süsteemi jaoks on LabVIEW programmeerimiskeskkonnas välja töötatud lainepikkuse täpse sinusoidaalse moduleerimise meetod ja on saavutatud ergastuse intensiivsuse konstantsus (täpsusega 1/200) lainepikkuse moduleerimisel.
- On välja töötatud lainepikkuse moduleerimise eksperimendi simulatsiooni ja visualiseerimise programm, mis võimaldab analüüsida polütsükliiliste aromaatsete süsivesinike detekteerimist loodusliku keskkonna tingimustes.

Kokkuvõte inglise keeles

Bachelor's thesis name

“Development of detection method of water pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons ”

Conclusion

The present bachelor's thesis main objective was to conduct studies needed for development of on-line polycyclic aromatic hydrocarbons detector. In the course of the present work the following results were achieved:

- We developed and tested experimentally two selective and sensitive methods of fluorescence detection of polycyclic aromatic hydrocarbons :
 - method of excitation light intensity modulation and synchronous fluorescence detection
 - method of excitation light wavelength modulation and fluorescence signal second harmonic measurement.
- For the latter modulation system, using LabVIEW programming environment, method for precise sine-law modulation of the excitation light wavelength was developed. The stabilization of excitation light intensity during wavelength modulation at accuracy $\sim 1/200$ was achieved .
- simulation and visualisation program for excitation light wavelength modulation studies in field conditions was developed.

Kasutatud kirjanduse loetelu

1. N.Gough, „Pollutants From Plant Killed Fish in China“, The New York Times (2013), http://www.nytimes.com/2013/09/05/world/asia/thousands-of-fish-killed-by-waste-from-chinese-plant.html?_r=0.
2. N.Ross, „WORLD WATER QUALITY FACTS AND STATISTICS“, World Water Day brochure (2010).
3. „All about PAHs“, Oregon State University, http://superfund.oregonstate.edu/about_PAHs.
4. ["Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – Occurrence in foods, dietary exposure and health effects"](#). European Commission, Scientific Committee on Food, (2002).
5. „Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)“, US Environmental Protection Agency, (2008).
6. D.M. Pampanin, M. O. Sydnes, „Polycyclic Aromatic Hydrocarbonsa Constituent of Petroleum: Presence and Influence in the Aquatic Environment“, Polish Journal of Environmental Studies Vol. 11, No. 6, 695-706, (2002).
7. A.K.M. Kabzinski, J.Cyran, R.Juszczak. „Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water“, Polish Journal of Environmental Studies Vol. 11, No. 6, 695-706, (2002).
8. M.C.Diaz Ramos, A. Suarez, A. Rubies, R. Companyo, „Determination of 24 PAHs in Drinking Water“, USA, Agilent Technologies’s application note, (2012).
9. M.C. Sterling, J.S. Bonner, C.A. Page, C.B. Fuller, A.N.S. Ernest, R.L. Autenrieth, „Partitioning of Crude Oil Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Aquatic Systems“, Environ. Sci. Technol., 37, 4429-4434, (2003).
10. „Gas chromatography“, The Linde Groupe, (2013), http://hiq.linde-gas.com/en/analytical_methods/gas_chromatography/index.html.
11. Daniel C. Harris, *Quantitative chemical analysis, eighth edition*, (W.H, Freeman and Co., New York, 2010).
12. Chhabil Dass, *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. (John Wiley & Sons, 5. 2013).
13. D. Harvey, “Modern Analytical Chemistry”, McGraw-Hill Companies Inc., (2000).
14. „How it works?“, Laser Diagnostic Instruments AS, (2013), <http://www.ldirow.com/>.

15. „Remote Optical Watcher – ROW”, Laser Diagnostic Instruments AS, (2013), <http://www.ldi.ee/index.php?main=392>
16. „Dialysis adequacy“, Ldiamon, (2013), <http://ldiamon.eu/dialysi-monitoring/>.
17. „Water quality monitoring“, Ldiamon, (2013), <http://ldiamon.eu/water-quality-monitoring/>.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Dmitri Lanevski (sünnikuupäev: 09.09.1992),

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

VEES POLÜTSÜKLILISTE AROMAATSETE SÜSIVESINIKE SAASTE SELEKTIIVSE AVASTAMISE METOODIKA VÄLJATÖÖTAMINE,

mille juhendaja on Koit Muring.

reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartu, 28.05.2014

Lisa 1. Topeltmoduleerimise teooria

Fluorestsentsi intensiivsus F avaldub neeldumis- ja kiirgusspektri kaudu:

$$F(\lambda_{ex}, \omega_{ex}, \lambda_{fl}, \omega_{fl}) = \eta \cdot \kappa_{\lambda_{ex}, \omega_{ex}} \cdot \varphi_{\lambda_{fl}, \omega_{fl}}, \quad (1)$$

kus

λ_{ex} ja λ_{fl} on vastavalt ergastava valguse ja fluorestsentsi detekteerimise lainepikkused,

$\kappa_{\lambda_{ex}, \omega_{ex}}$ on neeldumisspekter lainepikkusel λ_{ex} ,

$\varphi_{\lambda_{fl}, \omega_{fl}}$ on fluorestsentsispektri intensiivsus lainepikkusel λ_{fl} ,

η on fluorestsentsi kvantsaagise ja ergastuse intensiivsuse korrutis.

Võrrandis (1) oleme teinud eelduse, et ergastava valguse lainepikkust moduleeritakse koosinusoidaalselt ringsagedusel ω_{ex} :

$$\lambda_{ex} t = \lambda_{ex}^0 \mathbf{1} + \alpha \cdot \cos \omega_{ex} t \quad (2)$$

ja fluorestsentsi registreerimise lainepikkust moduleeritakse ringsagedusel ω_{fl} :

$$\lambda_{fl} t = \lambda_{fl}^0 \mathbf{1} + \beta \cdot \cos \omega_{fl} t \quad (3)$$

Eeldusel, et lainepikkuste modulatsioonide laiused on väikesed võrreldes lainepikkusega, st koefitsiendid α ja β on väikesed võrreldes 1-ga (joonis 13), võime neeldumise lainepikkuse λ_{ex}^0 ümbruses arendada Taylori ritta ja selles reas alles jätta ainult kaks liiget, neeldumise väärtuse $\kappa_{\lambda_{ex}}^0$ lainepikkusel λ_{ex}^0 ja neeldumisspektri esimese tuletisega liikme:

$$\kappa_{\lambda_{ex}, \omega_{ex}} = \kappa_{\lambda_{ex}^0}^0 + \frac{d\kappa_{\lambda_{ex}^0}}{d\lambda} \lambda_{ex} - \lambda_{ex}^0 \quad (4)$$

Asendades valemist (2)

$$\lambda_{ex} - \lambda_{ex}^0 = \alpha \cdot \lambda_{ex}^0 \cdot \cos \omega_{ex} t$$

valemisse (4), saame neeldumise muutuseks

$$\kappa_{\lambda_{ex}, \omega_{ex}} = \kappa_{\lambda_{ex}^0}^0 + \frac{d\kappa_{\lambda_{ex}^0}}{d\lambda_{ex}} \alpha \cdot \lambda_{ex}^0 \cdot \cos \omega_{ex} t \quad (5)$$

Täiesti analoogselt saame esimese lähenduse fluorestsentsispektri ajaliseks muutumiseks

$$\varphi \lambda_{fl}, \omega_{fl} = \varphi \lambda_{fl}^0 + \frac{d\varphi \lambda_{fl}^0}{d\lambda_{fl}} \beta \cdot \lambda_{fl}^0 \cdot \cos \omega_{fl} t . \quad (6)$$

Asendades (5) ja (6) valemisse (1), saame

$$F \lambda_{ex}, \omega_{ex}, \lambda_{fl}, \omega_{fl} = \eta \cdot \kappa \lambda_{ex}^0 + \frac{d\kappa \lambda_{ex}^0}{d\lambda_{ex}} \alpha \cdot \lambda_{ex}^0 \cdot \cos \omega_{ex} t \cdot \varphi \lambda_{fl}^0 + \frac{d\varphi \lambda_{fl}^0}{d\lambda_{fl}} \beta \cdot \lambda_{fl}^0 \cdot \cos \omega_{fl} t . \quad (7)$$

Saadud valemist (7) on näha, et fluorestsentsi intensiivsuse ajas muutumatule osale $\eta \cdot \kappa \lambda_{ex}^0 \cdot \varphi \lambda_{fl}^0$ lisaks saame ostsilleeruvad liikmed. Ergastuse lainepikkuse moduleerimise sagedusel ω_{ex} ostsilleeruv liige on võrdeline neeldumisspektri tuletisega ergastuse lainepikkusel

$$\eta \cdot \varphi \lambda_{fl}^0 \cdot \frac{d\kappa \lambda_{ex}^0}{d\lambda_{ex}} \alpha \cdot \lambda_{ex}^0 \cdot \cos \omega_{ex} t .$$

Fluorestsentsi registreerimise lainepikkuse moduleerimise sagedusel ω_{fl} ostsilleeruv liige on võrdeline kiirgusspektri tuletisega registreerimise lainepikkusel

$$\eta \cdot \kappa \lambda_{ex}^0 \cdot \frac{d\varphi \lambda_{fl}^0}{d\lambda_{fl}} \beta \cdot \lambda_{fl}^0 \cdot \cos \omega_{fl} t .$$

Kolmas ajas muutuv fluorestsentsi komponent sisaldab koosinuste korrutist:

$$\eta \cdot \frac{d\kappa \lambda_{ex}^0}{d\lambda_{ex}} \alpha \cdot \lambda_{ex}^0 \cdot \cos \omega_{ex} t \cdot \frac{d\varphi \lambda_{fl}^0}{d\lambda_{fl}} \beta \cdot \lambda_{fl}^0 \cdot \cos \omega_{fl} t$$

Kasutades koosinuste korrutise avaldamist koosinuste summana

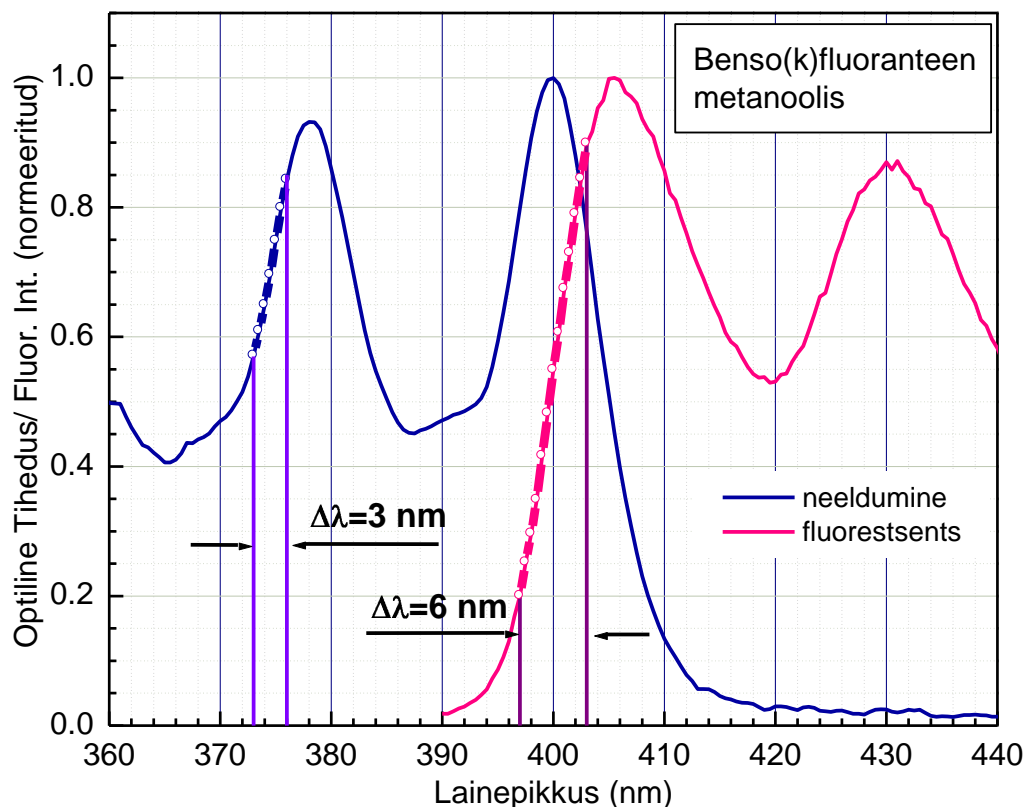
$$\cos u \cdot \cos v = \frac{1}{2} \cos u - v + \cos u + v ,$$

saame

$$\frac{1}{2} \eta \cdot \alpha \cdot \beta \cdot \lambda_{ex}^0 \cdot \lambda_{fl}^0 \cdot \frac{d\kappa \lambda_{ex}^0}{d\lambda_{ex}} \cdot \frac{d\varphi \lambda_{fl}^0}{d\lambda_{fl}} \cos \omega_{ex} - \omega_{fl} t + \cos \omega_{ex} + \omega_{fl} t . \quad (8)$$

Seega oleme näidanud, et fluorestsentsi intensiivsuse sagedusspektris leiduvad ergastuse ja kiirguse lainepikkuste modulatsioonisageduste kombinatsioonid (sageduste vahe $\omega_{ex} -$

ω_{fl} ja summa $\omega_{ex} + \omega_{fl}$). Detekteerides fluorestsentsi ühel nendest kombinatsioonisagedustest kitsariba-sünkroonvõimendiga (*lock-in amplifier*), saame otsitava analüüdi välja valida topeltselektiivsusega. Tõepoolest, valides nii ergastuse lainepikkuse λ_{ex}^0 kui ka fluorestsentsi detekteerimise lainepikkuse λ_{fl}^0 sobivalt, nii et nendes punktides on vastavalt neeldumis- ja kiirgusspektrite tuletsed võimalikult suured, saame kombinatsioonisagedusel tugeva signaali. On üsna väike tõenäosus, et mitmel analüüdil on nii neeldumis- kui ka kiirgusspektris väljavalitud lainepikkustel korraga kiired muutused. Selektiivsus on seda suurem, mida suuremad on neeldumis- ja kiirgusspektri muutused lainepikkustel λ_{ex}^0 ja λ_{fl}^0 , st tuletsed $\frac{d\kappa \lambda_{ex}^0}{d\lambda_{ex}}$ ja $\frac{d\varphi \lambda_{fl}^0}{d\lambda_{fl}}$. See meetod on hästi sobiv polütsükliiliste aromaatsete süsivesinike detekteerimiseks, kuna nende neeldumis- ja kiirgusspektrid sisaldavad suhteliselt kitsaid ribasid, mille tõusudel või langustel ongi sobivaimad λ_{ex}^0 ja λ_{fl}^0 valikud. Kombinatsioonisageduse signaal on võrdeline modulatsiooni ulatustega α ja β . Mõistetatavalt ei tohi modulatsiooni piirväärtused $\lambda_{ex}^0 \pm \alpha \cdot \lambda_{ex}^0$ ja $\lambda_{fl}^0 \pm \beta \cdot \lambda_{fl}^0$ olla ülearu suured, nii et ergastuse või fluorestsentsi registreerimise lainepikkused läheksid vastava spektririba kiire tõusu või languse piirkonnast välja (joonis 15).



Joonis 15. Benso(k)fluoranteeni neeldumis- ja kiirgusspekter. Paksu joonega on näidatud ergastuse ja kiirguse lainepikkuse sobivad moduleerimisulatused, millele vastab $\alpha = 0,004$ ja $\beta = 0,0075$.

Erijuhul võib võtta modulatsioonisagedused võrdseks: $\omega_{ex} = \omega_{fl} \equiv \omega_0$, siis saame sünkroondetekteerimise sageduseks $2\omega_0$. Sageduse kahekordistamine on kordades lihtsam kui laitmatu siinuselise signaali genereerimine sagedusel $\omega_{ex} + \omega_{fl}$, siinjuures kaob ka vajadus kahe erineva sagedusega sinusoidaalse signaali genereerimiseks. Negatiivseks asjaoluks on siinjuures võimalus, et mõõtesüsteemi mittelineaarsuse korral tekib kahekordsel sagedusel $2\omega_0$ signaal ka detekteeritava aine puudumisel, st tegemist ei ole enam nullväärtusega signaali nivooaga.

Vaatleme veel topeltmoduleerimise juhtu, kus objekti ergastatakse korraga kahe erineva lainepikkusega valgusega λ_{ex}^1 ja λ_{ex}^2 , kusjuures neid lainepikkusi moduleeritakse kosinusoidaalselt vastavalt sagedustel ω_{ex}^1 ja ω_{ex}^2 . Fluorestsentsi registreeritakse läbi ribafiltri keskmisel lainepikkusel λ_{fl} ja see ajas ei muutu. Sellistel tingimustel avaldub fluorestsentsi intensiivsus järgmise võrrandiga:

$$F(\lambda_{ex}^1, \omega_{ex}^1, \lambda_{ex}^2, \omega_{ex}^2, \lambda_{fl}) = \vartheta \cdot I_{ex}^1 \cdot \kappa(\lambda_{ex}^1, \omega_{ex}^1) + I_{ex}^2 \cdot \kappa(\lambda_{ex}^2, \omega_{ex}^2) \cdot \varphi(\lambda_{fl}) \quad (9)$$

Siin tähistab

ϑ kvantsaagist,

I_{ex}^1 ja I_{ex}^2 ergastava valguse intensiivsusi vastavalt lainepikkustel λ_{ex}^1 ja λ_{ex}^2 .

ω_{ex}^1 ja ω_{ex}^2 on ergastamise lainepikkuste λ_{ex}^1 ja λ_{ex}^2 moduleerimise ringsagedused.

Analoogselt võrrandiga (2) muutuvad ergastuse lainepikkused ajas koosinusoidaalselt:

$$\lambda_{ex}^1(t) = \lambda_{ex}^{01} [1 + \alpha^1 \cdot \cos(\omega_{ex}^1 t)] \quad (10)$$

ja

$$\lambda_{ex}^2 t = \lambda_{ex}^{02} \mathbf{1} + \alpha^2 \cdot \cos \omega_{ex}^2 t . \quad (12)$$

Võrrandile (5) sarnaselt saame moduleerimisest tulenevad neeldumise muutused

$$\kappa \lambda_{ex}^{01}, \omega_{ex}^1 = \kappa \lambda_{ex}^{01} + \frac{d\kappa \lambda_{ex}^{01}}{d\lambda_{ex}} \alpha^1 \cdot \lambda_{ex}^{01} \cdot \cos \omega_{ex}^1 t \quad (13)$$

$$\kappa \lambda_{ex}^{02}, \omega_{ex}^2 = \kappa \lambda_{ex}^{02} + \frac{d\kappa \lambda_{ex}^{02}}{d\lambda_{ex}} \alpha^2 \cdot \lambda_{ex}^{02} \cdot \cos \omega_{ex}^2 t . \quad (14)$$

Asendades need võrrandisse (9), saame

$$F \lambda_{ex}^1, \omega_{ex}^1, \lambda_{ex}^2, \omega_{ex}^2, \lambda_{fl} = \vartheta \cdot \varphi \lambda_{fl} \cdot \left(I_{ex}^1 \cdot \kappa \lambda_{ex}^{01} + \frac{d\kappa \lambda_{ex}^{01}}{d\lambda_{ex}} \alpha^1 \cdot \lambda_{ex}^{01} \cdot \cos \omega_{ex}^1 t + I_{ex}^2 \cdot \kappa \lambda_{ex}^{02} + \frac{d\kappa \lambda_{ex}^{02}}{d\lambda_{ex}} \alpha^2 \cdot \lambda_{ex}^{02} \cdot \cos \omega_{ex}^2 t \right) \quad (15)$$

Seega oleme saanud ajast sõltumatu liikme

$$\vartheta \cdot \varphi \lambda_{fl} \cdot I_{ex}^1 \cdot \kappa \lambda_{ex}^{01} + I_{ex}^2 \cdot \kappa \lambda_{ex}^{02}$$

ja koosinusoidaalsete liikmete summa:

$$\vartheta \cdot \varphi \lambda_{fl} \left(I_{ex}^1 \cdot \alpha^1 \cdot \lambda_{ex}^{01} \cdot \frac{d\kappa \lambda_{ex}^{01}}{d\lambda_{ex}} \cdot \cos \omega_{ex}^1 t + I_{ex}^2 \cdot \alpha^2 \cdot \lambda_{ex}^{02} \cdot \frac{d\kappa \lambda_{ex}^{02}}{d\lambda_{ex}} \cdot \cos \omega_{ex}^2 t \right)$$

Erijuhul, kui nurksulgudes olevate koosinuste kordajad on võrdsed

$$I_{ex}^1 \cdot \alpha^1 \cdot \lambda_{ex}^{01} \cdot \frac{d\kappa \lambda_{ex}^{01}}{d\lambda_{ex}} = I_{ex}^2 \cdot \alpha^2 \cdot \lambda_{ex}^{02} \cdot \frac{d\kappa \lambda_{ex}^{02}}{d\lambda_{ex}} \equiv \mathbf{K},$$

ja tähistades need kordajad \mathbf{K} , saame koosinuste summa valemit kasutades

$$\cos u + \cos v = 2 \cdot \cos \frac{u+v}{2} \cdot \cos \frac{u-v}{2};$$

$$2 \cdot \mathbf{K} \cdot \vartheta \cdot \varphi \lambda_{fl} \cdot \cos \frac{\omega_{ex}^1 + \omega_{ex}^2}{2} \cdot \cos \frac{\omega_{ex}^1 - \omega_{ex}^2}{2}$$

Seega on tulemuseks signaal sagedusega $\frac{\omega_{ex}^1 + \omega_{ex}^2}{2}$, mis on läbi moduleeritud madalama

sagedusega $\frac{\omega_{ex}^1 - \omega_{ex}^2}{2}$.