

Bartosz Kalota, Mikhail Tsvirko

*Instytut Chemii, Ochrony Środowiska i Biotechnologii, Akademia im. Jana Długosza,  
42-200 Częstochowa, Armii Krajowej 13/15, Polska;  
e-mail: bartek.kalota@wp.pl; m.tsvirko@ajd.czyst.pl*

## **Technologia pojedynczo, podwójnie i potrójnie luminiforowych sensorów luminescencyjnych (2): Metody kalibracji i separacji sygnałów**

### **Streszczenie**

W przeglądzie zaprezentowano charakterystykę powszechnie stosowanych metod kalibracji współczesnych pojedynczo, podwójnie i potrójnie luminiforowych sensorów luminescencyjnych. Omówiono również główne metody separacji sygnałów współczesnych podwójnie i potrójnie luminiforowych sensorów luminescencyjnych.

**Słowa kluczowe:** sensory luminescencyjne; luminescencja; technologia; kalibracja sygnałów; separacja sygnałów

### **Zawartość**

Wykaz stosowanych skrótów, akronimów i symboli

Wprowadzenie

1. Pojedynczo luminiforowe sensory luminescencyjne
  - 1.1. Kalibracja sensorów czułych na tlen i ciśnienie
    - 1.1.1. Kalibracja względem wpływu temperatury
    - 1.1.2. Kalibracja względem pozostałych czynników
  - 1.2. Kalibracja sensorów czułych na temperaturę
2. Podwójnie luminiforowe sensory luminescencyjne
  - 2.1. Kalibracja sensorów podwójnie luminiforowych czułych na odmienne parametry
  - 2.2. Kalibracja sensorów podwójnie luminiforowych czułych na ten sam parametr
  - 2.3. Metody separacji sygnałów pojedynczo- i wieloluminiforowych sensorów opartych na częstotliwościowej i czasowej metodzie rozdziału (FLIM)
    - 2.3.1. Stosunek faz (PDR)
    - 2.3.2. Porównywanie stosunku faz (DLR)
    - 2.3.3. Szybkie określanie czasu życia (RLD)
    - 2.3.4. Podwójne określanie czasu życia (DLD)
    - 2.3.5. Odmiana metody DLD

3. Potrójnie luminoforowe sensory luminescencyjne
  - 3.1. Metody separacji sygnałów wieloluminoforowych sensorów oparte na modelu przestrzeni barw RGB

### Wykaz stosowanych skrótów, akronimów i symboli

$A_1, A_2, \dots$	– przedziały czasu (ang. <i>time gates</i> )
CCD	– matryca CCD (ang. <i>charge-coupled device</i> ); mikroukład detekcyjny
CMOS	– matryca CMOS (ang. <i>complementary metal oxide semiconductor</i> ); mikroukład detekcyjny
$\Delta\phi$	– przesunięcie fazy
DLD	– podwójne określanie czasu życia (ang. <i>dual lifetime determination</i> )
DL-P	– farba podwójnie luminoforowa (ang. <i>dual luminophore paint</i> )
DL-PSP	– farba podwójnie luminoforowa czuła na ciśnienie (tlen) i temperaturę (ang. <i>dual luminophore pressure sensitive paint</i> ) lub farba podwójnie luminoforowa czuła na ciśnienie (tlen)
DLR	– porównywanie stosunku faz (ang. <i>dual lifetime referencing</i> )
FLIM	– obrazowanie czasem życia fluorescencji (ang. <i>fluorescence lifetime imaging</i> )
FOVEON X3	– typ matrycy CMOS; mikroukład detekcyjny
$I$	– intensywność luminescencji
$I_{ref}$	– intensywność luminescencji w warunkach odniesienia
$L_{ref}$	– luminofor odniesienia
$L_{sens}$	– luminofor czuły na mierzony parametr
ML	– kompleks metal-ligand
$p$	– ciśnienie
$p_0, p_{ref}$	– ciśnienie w warunkach odniesienia
PDR	– stosunek faz (ang. <i>phase delay rationing</i> )
PSL	– luminofor czuły na ciśnienie (tlen) (ang. <i>pressure sensitive luminophore</i> )
PSP	– farba czuła na ciśnienie (tlen) (ang. <i>pressure sensitive paint</i> )
$r$	– stosunek $S_{sens}/S_{ref}$ przy podmuchu powietrza
$r'$	– stosunek $r/r_0$
$r_0, r_{ref}$	– stosunek $S_{sens}/S_{ref}$ w warunkach odniesienia
$R_{1,2}; R_{1,3}$	– stosunki intensywności poszczególnych przedziałów czasu
RGB	– czerwony, zielony, niebieski (ang. <i>red, green, blue</i> ); model przestrzeni barw
RLD	– szybkie określanie czasu życia (ang. <i>rapid lifetime determination</i> )
$S_{ref}$	– sygnał optyczny (luminescencja) luminoforu odniesienia
$S_{sens}$	– sygnał optyczny (luminescencja) luminoforu czułego na mierzony parametr
$\tau$	– czas życia luminescencji (ang. <i>luminescence lifetime</i> )
$t$	– czas
$T$	– temperatura
$T_0, T_{ref}$	– temperatura w warunkach odniesienia
TSL	– luminofor czuły na temperaturę (ang. <i>temperature sensitive luminophore</i> )
TSP	– farba czuła na temperaturę (ang. <i>temperature sensitive paint</i> )

## Wprowadzenie

Sensory luminescencyjne nazywane są często farbami. Nazwa „farba” pochodzi od sposobu nanoszenia sensora na powierzchnię badanego modelu w postaci cienkiej warstwy poprzez malowanie lub rozpylanie. Sensory luminescencyjne składają się głównie z dwóch elementów: (i) luminoforów wykazujących zmienność właściwości luminescencyjnych pod wpływem określonego parametru (np. ciśnienia, stężenia tlenu, temperatury) oraz (ii) matrycy (zazwyczaj polimerowej), do której wprowadza się luminofory.<sup>[1]</sup>

Jak już wspomniano w części pierwszej „Technologii...”, istnieją m.in. różnego typu (i) farby czułe na ciśnienie (ang. *pressure sensitive paint* – PSP) zawierające luminofory czułe na ciśnienie (ang. *pressure sensitive luminophore* – PSL), (ii) farby czułe na temperaturę (ang. *temperature sensitive paint* – TSP) zawierające luminofory czułe na temperaturę (ang. *temperature sensitive luminophore* – TSL) oraz (iii) farby wieloluminoforowe, które w zależności od posiadanych rodzajów luminoforów, są czułe na kilka wybranych parametrów jednocześnie.

Wszystkie PSP są w większym lub mniejszym stopniu czułe także na temperaturę, natomiast TSP na działanie tlenu (ciśnienia) (*zależność stężenia od ciśnienia opisuje prawo Henry’ego* → **Część 1. „Technologii...”**). Dodatkowo odpowiedź optyczna obydwu typów sensorów jest wrażliwa na kilka innych czynników takich, jak fluktuacji promieniowania wzbudzającego i drobnych ruchów modelu podczas przeprowadzania pomiarów. W związku z tym, powstało wiele metod kalibracji odpowiedzi optycznej sensorów.

Prace nad nowymi metodami kalibracji PSP i TSP dały początek farbie podwójnie luminoforowej czułej na ciśnienie (tlen) i temperaturę (ang. *dual luminophore pressure sensitive paint* – DL-PSP).<sup>[2-5]</sup> Farba ta, oprócz możliwości określania w stosunkowo wygodny sposób wpływu wyżej wymienionych czynników na pracę zawartych w farbie luminoforów, oferuje obrazowanie dwóch parametrów jednocześnie.<sup>[2-6]</sup> W przypadku każdego rodzaju farb wieloluminoforowych bardzo ważne jest, aby przed kalibracją emisji użyć skutecznej metody rozdziału emisji farby. W ten sposób możliwa jest dokładna kalibracja pojedynczych sygnałów (od każdego rodzaju luminoforów farby) z osobna.

Niniejsza praca prezentuje charakterystykę powszechnie stosowanych metod kalibracji oraz główne metody separacji sygnałów współczesnych pojedynczo, podwójnie i potrójnie luminoforowych sensorów luminescencyjnych. Część pierwsza „Technologii...” przedstawia charakterystykę, mechanizm działania oraz zastosowanie sensorów luminescencyjnych, do których odnoszą się prezentowane w niniejszej części drugiej metody kalibracji i separacji sygnałów. Zawartość obydwu części przedstawia zaledwie fragment informacji dotyczących ogromnego obszaru jaki stanowi technologia sensorów luminescencyjnych.

## 1. Pojedynczo luminoforowe sensory luminescencyjne

### 1.1. Kalibracja sensorów czułych na tlen i ciśnienie

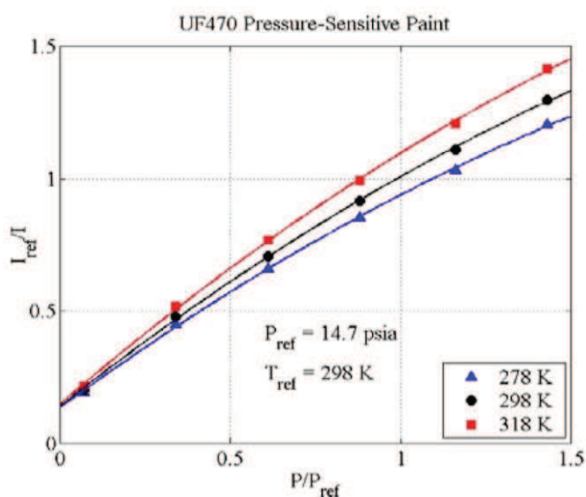
Odpowiedź optyczna sensorów czułych na tlen i ciśnienie zależy nie tylko od wpływu temperatury, lecz także od kilku innych czynników. W niniejszym podrozdziale przedstawiono metody kalibracji obejmujące wszystkie te czynniki.

### 1.1.1. Kalibracja względem wpływu temperatury

Wszystkie PSP są w większym lub mniejszym stopniu czułe także na temperaturę. Dzieje się tak z dwóch powodów: (i) termicznego wygaszania luminescencji PSP oraz (ii) zależnej od temperatury przepuszczalności tlenu; ten drugi powód dotyczy matrycy polimerowej. Podczas podmuchu powietrza, wraz z wzrostem ciśnienia na powierzchni modelu wzrasta również temperatura. Zatem do obliczeń barometrycznych informacja o temperaturze jest niezbędna. W związku z tym, dla pomiarów ciśnienia tworzy się warunki odniesienia.<sup>[7]</sup> W tym celu PSP poddaje się kalibracji polegającej na odczycie luminescencji PSP w kilku ustalonych temperaturach (Rys. 1).<sup>[8]</sup> Następnie przy użyciu właściwej kalibracji, obniża się wartości otrzymane z pomiarów barometrycznych.

Komora kalibracyjna PSP pozwala w sposób prosty i wygodny określać zależność między wpływem ciśnienia a wpływem temperatury na właściwości luminescencyjne PSP (Rys. 2). Mały płat aluminium jest malowany farbą czułą na ciśnienie. Następnie aluminium z PSP jest umieszczane na podstawce grzejnej wewnątrz komory ciśnieniowej. Temperatura i ciśnienie są sterowane komputerowo. Źródło wzbudzenia oświetla PSP, a detektor rejestruje jej luminescencję. Kalibracja rozpoczyna się od rejestracji luminescencji PSP w warunkach  $T = 298\text{ K}$  i  $p = 14.696\text{ psi}$  ( $1\text{ atm}$ ) służących za warunki odniesienia. Później następuje odczyt luminescencji PSP w ustalonych warunkach  $T$  i  $p$ . Luminescencja PSP jest rejestrowana poprzez stosunek intensywności luminescencji w warunkach odniesienia ( $I_{ref}(T_{ref}, p_{ref})$ ) do intensywności luminescencji w ustalonych warunkach ( $I(T, p)$ ).<sup>[9]</sup> Wyniki kalibracji są przedstawiane za pomocą funkcji:

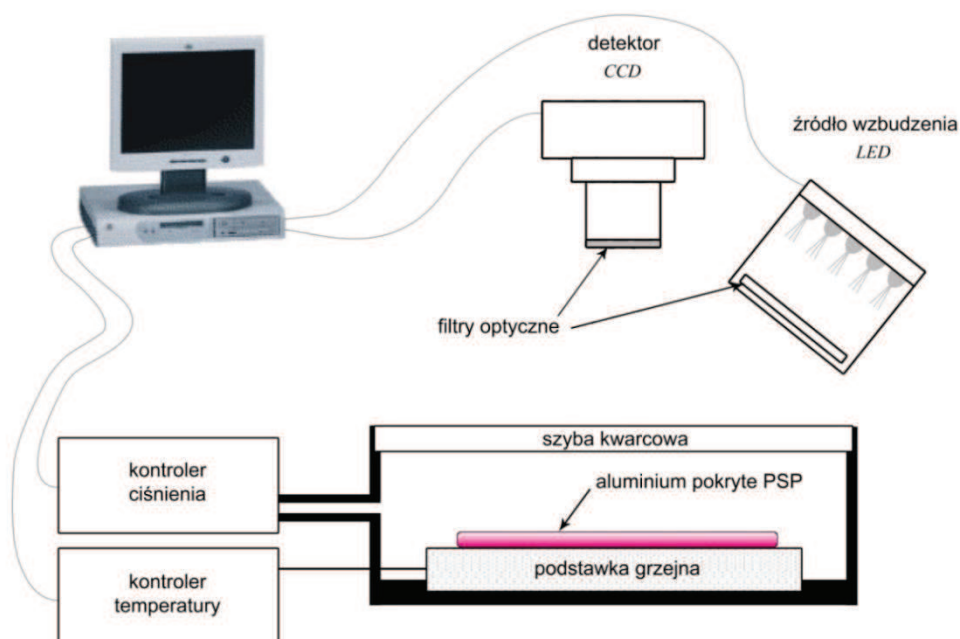
$$\frac{I_{ref}}{I} = f\left(\frac{p}{p_{ref}}\right) \quad (\text{Równ. 1})$$



**Rysunek 1.** Przykład kalibracji PSP poprzez odczyt jej luminescencji w wybranych temperaturach. Wyniki kalibracji PSP przedstawiają, że PSL wykazuje stosunkowo dobrą czułość na ciśnienie ( $-5.5\text{ \%}/\text{psi}$ ) oraz stosunkowo niską czułość na temperaturę ( $-0.5\text{ \%}/\text{K}$ ).<sup>[8]</sup>

gdzie  $p$  oznacza wartości ciśnienia w ustalonych warunkach, a  $p_{ref}$  w warunkach odniesienia.

Istnieje dogodniejsza i bardziej obiecująca metoda minimalizująca wpływ temperatury na pracę PSP. Metoda ta polega na wprowadzeniu luminoforu czułego na temperaturę do matrycy zawierającej luminofor czuły na ciśnienie, tworząc podwójnie luminoforowy sensor luminescencyjny – DL-PSP (*więcej o tej metodzie kalibracji* → 2.1). Równie dobry efekt można otrzymać dodając do matrycy z luminoforem czułym na ciśnienie luminofor odniesienia, którego właściwości luminescencyjne są niezależne od mierzonego parametru – farba podwójnie luminoforowa



**Rysunek 2.** Układ kalibracyjny dla sensorów pojedynczo luminoforowych.

(ang. *dual luminophore paint – DL-P*) (więcej o tej metodzie kalibracji → 2.2).

### 1.1.2. Kalibracja względem pozostałych czynników

Praca PSP zależy także od (i) fluktuacji promieniowania wzbudzającego, (ii) drobnych ruchów modelu pokrytego PSP podczas przeprowadzania pomiaru, (iii) stężenia PSL (zbyt duże stężenie prowadzi do efektu samowygaszania<sup>[10]</sup>), (iv) grubości warstwy PSP oraz (v) czułości detektora. Wpływ wymienionych czynników polega na fluktuacji intensywności luminescencji PSL rejestrowanej przez detektor.

Fluktuacje promieniowania wzbudzającego polegają na braku równomiernego oświetlenia każdego punktu powierzchni modelu pokrytego PSP. Przyczyną tego zjawiska są drobne zmiany intensywności promieniowania wzbudzającego wychodzącego z lampy lub (co jest bardziej powszechne) drobne ruchy modelu w obszarze oświetlenia podczas pomiaru aerodynamicznego.

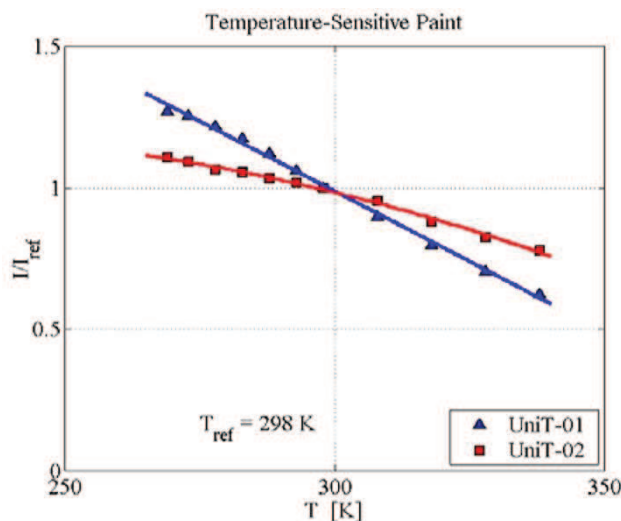
Błędy powstałe wskutek nierównomiernego oświetlenia są większe przy mniejszych prędkościach podmuchu powietrza, ponieważ odchylenia ciśnienia wywieranego na powierzchnię ( $< 1 \text{ psi}$ ) powodują odchylenia czułości luminescencji PSP na ciśnienie ( $\sim 1 \%$ ). W związku z tym, fluktuacje promieniowania wzbudzającego obniżają jakość wyników pomiarów barometrycznych przeprowadzonych przy małych prędkościach. Natomiast przy stosowaniu dużych prędkości podczas pomiarów barometrycznych, błąd dominujący stanowią drobne ruchy modelu.

W celu zminimalizowania wpływu obydwu błędów, oblicza się stosunek intensywności luminescencji w warunkach pomiarowych (przy podmuchu powietrza) ( $I$ ) do intensywności luminescencji w warunkach odniesienia (w warunkach bezwietrznych) ( $I_{ref}$ ). Opracowane wyniki przedstawia się za pomocą funkcji podanej w Równaniu 1. Wynaleziony został również algorytm zaznaczający konkretne punkty na powierzchni modelu w warunkach bezwietrznych i łączący je z punktami w warunkach podmuchu powietrza.<sup>[11]</sup> Jednak obydwie metody wykazują pewną niedokładność w porównaniu z metodą dodania luminoforu odniesienia do farby czulej na ciśnienie (*więcej o tej metodzie kalibracji* → 2.2).

## 1.2. Kalibracja sensorów czułych na temperaturę

Intensywność luminescencji TSP nie jest zależna wyłącznie od temperatury. Oprócz czułości pewnych TSP na tlen, praca wszystkich TSP zależy także od (i) fluktuacji promieniowania wzbudzającego, (ii) drobnych ruchów modelu pokrytego TSP podczas przeprowadzania pomiaru, (iii) stężenia TSL (podobnie jak w przypadku PSL może dojść do efektu samowygazania<sup>[12]</sup>), (iv) grubości warstwy TSP oraz (v) czułości detektora. Wpływ wymienionych czynników polega na fluktuacji intensywności luminescencji TSL rejestrowanej przez detektor.

Podobnie jak w przypadku kalibracji PSP, zarówno fluktuacje promieniowania wzbudzającego, jak i drobne ruchy modelu podczas pomiarów mogą zostać zminimalizowane poprzez (i) obliczenie stosunku intensywności luminescencji w warunkach pomiarowych do intensywności luminescencji w warunkach odniesienia, (ii) zastosowanie algorytmu



**Rysunek 3.** Przykład kalibracji dwóch TSP poprzez odczyt ich znormalizowanej luminescencji w temperaturze odniesienia. Farba UniT-02 wykazuje stosunkowo dobrą czułość na temperaturę (-1 %/K).<sup>[8]</sup>

mu zaznaczającego i łączącego konkretne punkty na powierzchni modelu w warunkach pomiarowych i warunkach odniesienia<sup>[11]</sup> oraz (iii) połączenie TSL z luminoforem odniesienia w wspólnej macierzy (*więcej o tej metodzie kalibracji* → 2.2).

Pierwsza z trzech przedstawionych wyżej możliwych kalibracji TSP polega na określeniu zależności pomiędzy temperaturą a właściwościami luminescencyjnymi TSP. Dokonuje się tego poprzez pomalowanie małego płyta farbą czulą na temperaturę, poczym następuje poddanie pomalowanego płyta na działanie kilku temperatur, wśród których jedna z temperatur

(zazwyczaj  $T = 298\text{ K}$ ) jest uznawana za warunki odniesienia. Podczas tej kalibracji, intensywności luminescencji TSP przy każdej z temperatur są rejestrowane. Na koniec, odczyty luminescencji są normalizowane poprzez korektę tych wyników wynikami pomiarów temperatury uznanych za warunki odniesienia ( $T_{ref}$ ) i przedstawiane są za pomocą funkcji:

$$\frac{I}{I_{ref}} = f(T) \quad (\text{Równ. 2})$$

Efekt opisywanej kalibracji przeprowadzonej na dwóch różnych TSP prezentuje Rysunek 3.<sup>[8]</sup>

## 2. Podwójnie luminoforowe sensory luminescencyjne

### 2.1. Kalibracja sensorów podwójnie luminoforowych czułych na odmienne parametry

Od czasu powstania DL-PSP czułej na ciśnienie (tlen) i temperaturę, można w sposób prosty określać wpływ temperatury na właściwości luminescencyjne PSL. Dokonuje się tego w sposób podobny do kalibracji PSP względem temperatury w komorze kalibracyjnej. Metoda ta umożliwia również jednoczesną kalibrację właściwości luminescencyjnych PSL względem TSL.

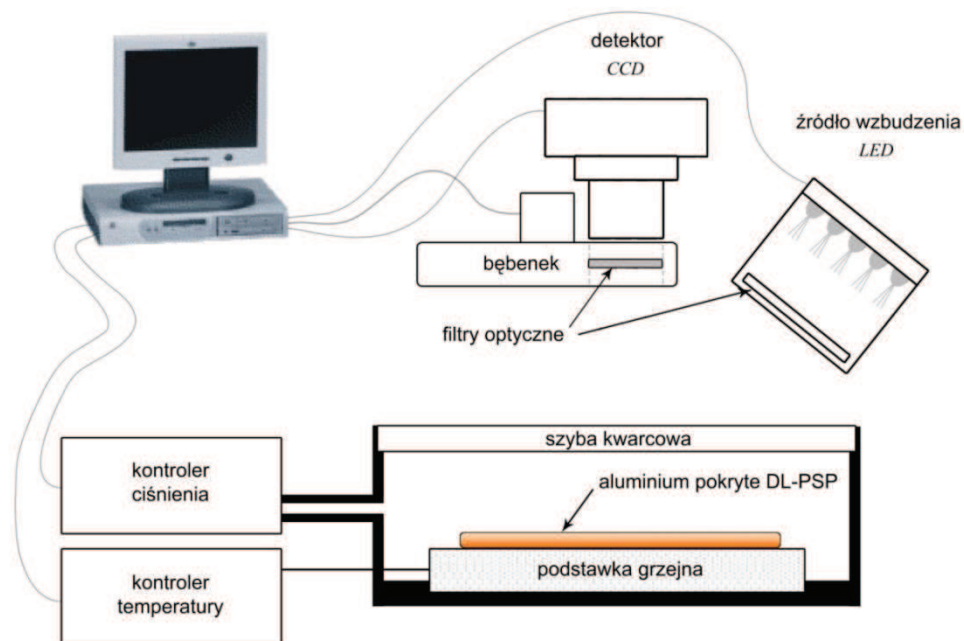
Mały płat aluminium pokrywa się DL-PSP i umieszcza się go wewnątrz komory kalibracyjnej. Następnie ustala się wybrane warunki ciśnienia i temperatury wewnątrz komory (Rys. 4). Układ kalibracyjny wyposażony jest ponadto w obracany bębenek umożliwiający szybką zmianę filtru.<sup>1</sup> Użycie filtrów ma na celu separację emisji poszczególnych rodzajów luminoforów wchodzących w skład kalibrowanej DL-PSP. Niekiedy użycie filtrów optycznych w celu separacji emisji obydwu rodzajów luminoforów bywa niewystarczające (*więcej o metodach rozdziału sygnałów* → 2.3). Po wzbudzeniu DL-PSP, kalibracja rozpoczyna się od odczytu sygnału PSL, a następnie odczytu TSL w warunkach  $T = 298\text{ K}$  i  $p = 14.696\text{ psi}$  ( $1\text{ atm}$ ) służących za warunki odniesienia. W dalszym etapie, wartości  $T$  i  $p$  zmienia się w szerokim zakresie skali. Po każdej zmianie przeprowadza się rejestrację emisji obydwu rodzajów luminoforów. Wyniki otrzymane z odczytów zostają opracowane za pomocą analogicznych równań, jak w przypadku kalibracji DL-P zawierających luminofor odniesienia (*więcej o tej metodzie kalibracji* → 2.2). Na koniec opracowane wyniki przedstawia się za pomocą funkcji:

$$\frac{r_{ref}}{r} = f\left(\frac{p}{p_{ref}}\right) \quad (\text{Równ. 3})$$

gdzie  $p$  oznacza wartości ciśnienia w warunkach ustalonych, a  $p_{ref}$  w warunkach odniesienia (*znaczenie pozostałych symboli* → 2.2).

Za pomocą kalibracji DL-PSP przeprowadzonej w komorze kalibracyjnej, czułość PSL na temperaturę została zmniejszona do  $-0.003\text{ \%}/\text{K}$  (Rys. 5).<sup>[8]</sup> Zatem, ta metoda kalibracji jest bardziej korzystna niż metoda kalibracji pojedynczej PSP przeprowadzonej w tej

<sup>1</sup> Chodzi o filtr optyczny i tylko o tego typu filtrach jest mowa w niniejszej pracy.



**Rysunek 4.** Układ kalibracyjny dla sensorów wieloluminoforowych.

samej komorze kalibracyjnej, ponieważ czułość PSL na temperaturę w metodzie kalibracji PSP została zmniejszona do  $-0.5\%/K$ .

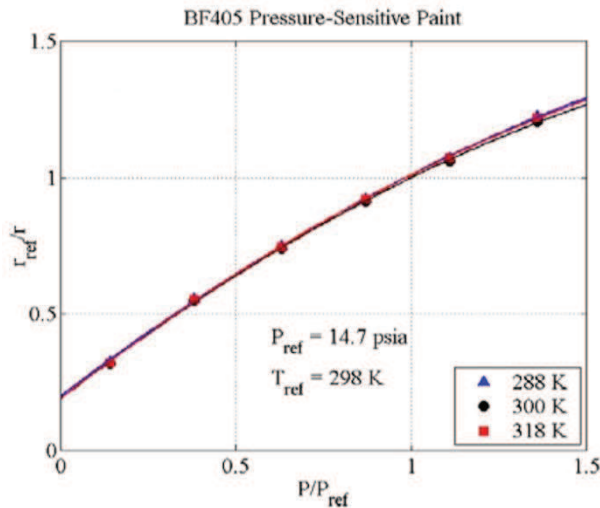
## 2.2. Kalibracja sensorów podwójnie luminoforowych czułych na ten sam parametr

Typ farby podwójnie luminoforowej zawierającej luminofor odniesienia jest szeroko stosowany ze względu na możliwość przeprowadzenia stosunkowo wygodnej, prostej oraz wysoce skutecznej kalibracji PSP lub TSP. Co więcej, kalibracja może zostać przeprowadzona zarówno względem wpływu temperatury na pracę luminoforu, fluktuacji promieniowania wzbudzającego, jak i drobnych ruchów modelu podczas pomiarów. Kalibrację względem wpływu temperatury na pracę luminoforu prowadzi się również przy użyciu sensora zawierającego jednocześnie PSL i TSL – DL-PSP.

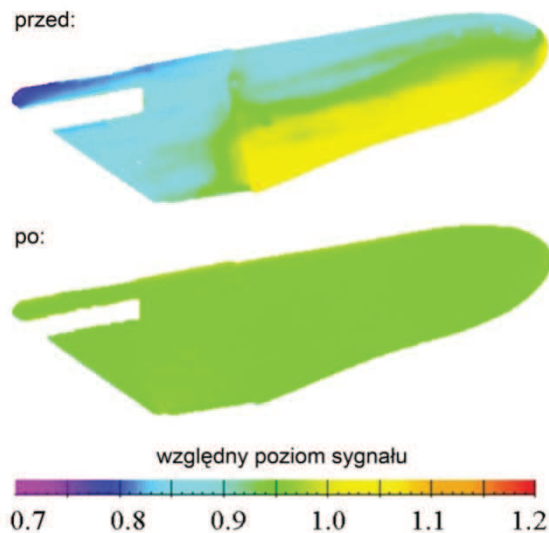
Luminescencja luminoforu odniesienia ( $L_{ref}$ ) wprowadzonego do matrycy zawierającej PSL lub TSL (luminofor czuły na mierzony parametr –  $L_{sens}$ ) jest niezależna (lub bardzo słabo zależna) od mierzonego parametru. W związku z tym, luminescencja  $L_{ref}$  pełni tym samym rolę wzorca, korygując odchylenia luminescencji  $L_{sens}$ . Kalibrację wykonuje się poprzez określenie stosunku ( $r$ ) luminescencji  $L_{sens}$  ( $S_{sens}$ ) do luminescencji  $L_{ref}$  ( $S_{ref}$ ):

$$r(T, p) = \frac{S_{sens}(T, p)}{S_{ref}(T, p)} \quad (\text{Równ. 4})$$





**Rysunek 5.** Przykład kalibracji DL-PSP. Po kalibracji, zawarty w DL-PSP luminofor PSL wykazuje stosunkowo dobrą czułość na ciśnienie ( $-4.5\%/psi$ ) oraz bardzo niską czułość na temperaturę ( $-0.003\%/K$ ).<sup>[8]</sup>



**Rysunek 6.** Przykład korzystnego wpływu kalibracji na odpowiedź luminescencyjną sensora podwójnie luminoforowego pokrywającego badaną powierzchnię. Zmodyfikowano.<sup>[8]</sup>

Stosunek ten zakłada, że iloraz  $S_{sens}$  i  $S_{ref}$  jest zależny od temperatury i ciśnienia. Oprócz tego, stosunek  $r$  jest wprost proporcjonalny do ilorazu stężeń odpowiadających im luminoforów.

W teorii, stosunek  $S_{sens}/S_{ref}$  powinien być stały. Jednak w praktyce tak nie jest. Nierównomierność stosunku  $S_{sens}/S_{ref}$  jest spowodowana wpływem temperatury na pracę PSL oraz fluktuacją promieniowania wzbudzającego i drobnymi ruchami modelu podczas pomiarów wpływającymi na pracę PSL i TSL. W celu zmniejszenia odchylenia wartości  $r$  (Równ. 4), spowodowanego nierównomiernym stosunkiem  $S_{sens}/S_{ref}$ , używa się stosunku  $r'$ :

$$r'(T, p) = \frac{r_0(T_0, p_0)}{r(T, p)} \quad (\text{Równ. 5})$$

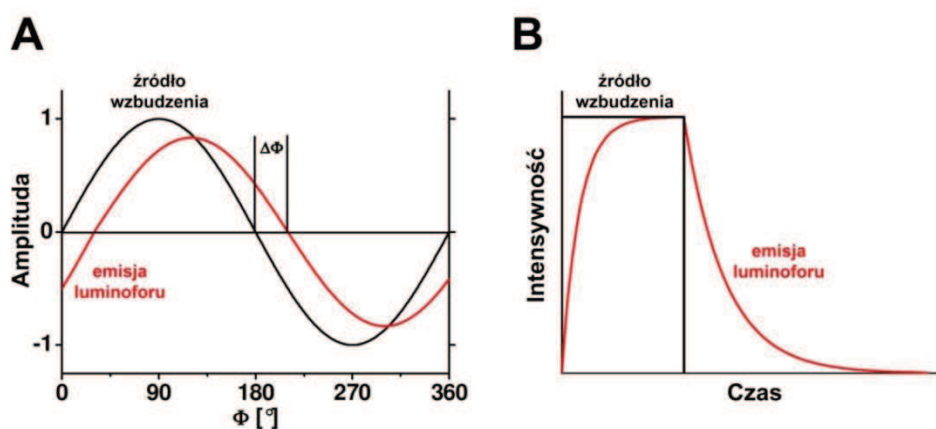
gdzie  $r$  oznacza stosunek  $S_{sens}/S_{ref}$  przy podmuchu powietrza, a  $r_0$  ( $r_{ref}$ ) ten sam stosunek w warunkach bezwietrznych (odniesienia).<sup>[7,13]</sup>

Proces kalibracji opisany w Równaniu 5 odbywa się w dwóch etapach. W pierwszym obliczane są wartości  $r$  oraz  $r_0$ . W drugim, zobrazowane na powierzchni modelu wartości  $r$  oraz  $r_0$  nakłada się na siebie, tworząc  $r'$ . Skuteczność tej kalibracji przedstawia Rysunek 6 ukazujący obraz przed kalibracją i po kalibracji.<sup>[8]</sup> Zakłócenia powstałe wskutek nierównomiernego stosunku  $S_{sens}/S_{ref}$  zostały znacznie zmniejszone, a tym samym  $L_{sens}$  wykazuje nienaruszoną czułość na ciśnienie.

nie (tlen) lub temperaturę w zależności od rodzaju kalibrowanego sensora (*charakterystyka bardziej wyszukanych metod kalibracyjnych* → 2.3).<sup>[7,13]</sup>

### 2.3. Metody separacji sygnałów pojedynczo i wieloluminoforowych sensorów opartych na częstotliwościowej i czasowej metodzie rozdziału (FLIM)

Istnieje wiele różnorodnych metod separacji sygnałów DL-P i analizy sygnałów PSP, TSP oraz DL-P. Tytułowa metoda stanowi jedną z najlepszych metod rozdziału sygnałów warstw sensorowych w przypadkach, gdy użycie filtrów optycznych nie przynosi pożądanego rezultatu. W bezpośrednim tłumaczeniu skrót FLIM oznacza obrazowanie czasem życia fluorescencji (ang. *fluorescence lifetime imaging*). Jednak metoda FLIM nie oznacza obrazowania przy użyciu czasu życia luminescencji, ponieważ stanowiłoby to kosztowny i skomplikowany zabieg. Istotą metody FLIM jest określanie czasu życia luminescencji luminoforu za pomocą częstotliwościowej (ang. *frequency domain*) lub czasowej (ang. *time domain*) metody rozdziału (Rys. 7).<sup>[14-19]</sup> Zaletą obydwu postaci metody FLIM jest brak wpływu na mierzony sygnał sygnałów powstałych wskutek rozproszenia lub odbicia. Metodę FLIM można stosować w celu separacji sygnałów zarówno pojedynczo, jak i wieloluminoforowych sensorów luminescencyjnych.



**Rysunek 7.** Metoda FLIM będąca w postaci (A): częstotliwościowej lub (B): czasowej metody rozdziału. Zmodyfikowano.<sup>[20]</sup>

W częstotliwościowej metodzie rozdziału luminofor jest wzbudzany przy pomocy światła zmodulowanego sinusoidalnie. Sygnał luminescencji wyprzedza sygnał wzbudzenia o wartość przesunięcia fazy ( $\Delta\Phi$ ). Ta wartość jest zależna od czasu życia luminescencji i jej określenie stanowi główny cel pomiaru częstotliwościowej metody rozdziału.

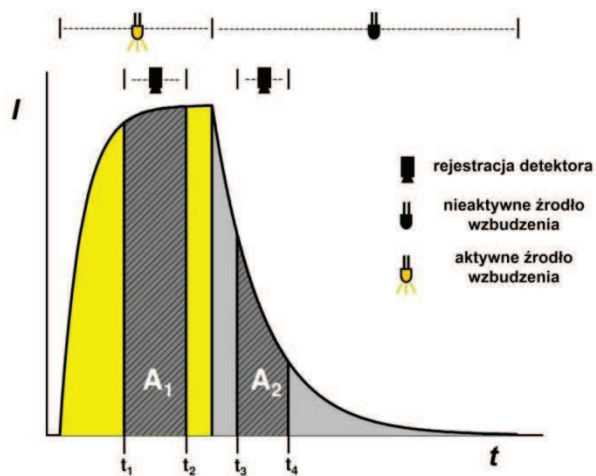
Czasowa metoda rozdziału wymaga impulsu światła wzbudzającego zmodulowanego w sposób standardowy (ang. *square shaped*). Metoda ta stanowi klasyczny pomiar kinetyki luminescencji. Na początku odpowiedź optyczna luminoforu wzrasta, po czym maleje z pewnym opóźnieniem zależnym od czasu życia luminescencji danego luminoforu.

Na podstawie różnic wartości czasu życia luminescencji (ang. *luminescence lifetime* –  $\tau$ ) można dokonywać rozdziału emisji luminoforów.

Częstotliwościowa metoda rozdziału może zostać skonwertowana na czasową metodę rozdziału (i na odwrót) przy użyciu transformacji Fouriera. Co ciekawe, sprzęt niezbędny do pomiarów czasu życia luminescencji przy pomocy czasowej metody rozdziału jest tańszy, a jego konfiguracja jest mniej skomplikowana w porównaniu z częstotliwościową metodą rozdziału. Dalsze podrozdziały przedstawiają charakterystykę metod należących do rodziny czasowej metody rozdziału znajdującej zastosowanie zarówno dla pojedynczo jak i wieloluminoforowych sensorów luminescencyjnych (*więcej o innej metodzie rozdziału sygnałów wieloluminoforowych sensorów* → 3.1).

### 2.3.1. Stosunek faz (PDR)

Metoda stosunku faz (PDR) (ang. *phase delay rationing*) polega na ustaleniu przedziałów czasu (ang. *time gate*) odpowiedzialnych za rejestrację intensywności luminescencji. Ustala się dwa przedziały czasu. Pierwszy znajduje się w fazie wzbudzenia luminoforu ( $A_1$ ), a drugi w fazie emisji luminoforu ( $A_2$ ) (Rys. 8). Stosunek intensywności sygnałów z obydwu przedziałów czasu ( $A_1$  i  $A_2$ ) jest zależny od czasu życia luminescencji luminoforu. Tym samym, stosunek ten stanowi skalibrowaną odpowiedź luminescencyjną sensora.<sup>[21,22]</sup> W związku z tym, metoda PDR może stanowić jedną z metod kalibracyjnych sensorów.



**Rysunek 8.** Schemat działania metody PDR. Po wzbudzeniu luminoforu, luminescencja jest rejestrowana za pomocą dwóch przedziałów czasu. Pierwszy jest umieszczony w fazie wzbudzenia ( $A_1$ ), drugi w fazie emisji ( $A_2$ ). Zmodyfikowano.<sup>[20]</sup>

Tym samym, stosunek ten stanowi skalibrowaną odpowiedź luminescencyjną sensora.<sup>[21,22]</sup> W związku z tym, metoda PDR może stanowić jedną z metod kalibracyjnych sensorów.

W praktyce ustalenie dokładnych wartości czasu życia luminescencji nie jest konieczne, ponieważ metoda PDR głównie określa zmiany czasów życia luminescencji. Natomiast wadą tej metody jest rejestracja fluorescencji tła w przedziale czasu  $A_1$ , ponieważ jest to obszar fazy wzbudzenia. W związku z powyższym, metoda PDR jest rzadko wykorzystywana w zastosowaniach biologicznych lub medycznych.

### 2.3.2. Porównywanie stosunku faz (DLR)

Metoda porównywania stosunku faz (DLR) (ang. *dual lifetime referencing*) jest ściśle powiązana z metodą PDR, o której była mowa w poprzednim podrozdziale. Co wię-

cej, metoda DLR jest częściej stosowana w celu rozdzielenia emisji luminoforów różniących się czasem życia luminescencji niż metoda PDR.

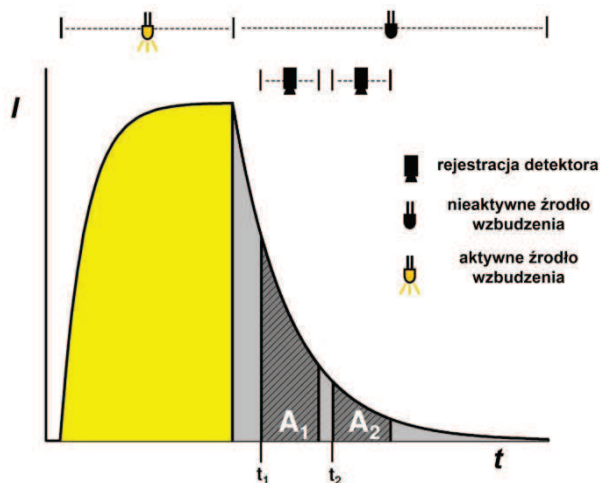
Po wzbudzeniu luminoforów, przedziały czasu  $A_1$  i  $A_2$  znajdują się w tych samych pozycjach, co w metodzie PDR (Rys. 8). Przedział czasu  $A_1$  będący w fazie wzbudzenia rejestruje intensywność wzbudzenia obydwu rodzajów luminoforów jednocześnie. Natomiast przedział czasu  $A_2$  będący w fazie emisji rejestruje intensywność emisji tylko jednego z luminoforów. Rejestracja intensywności emisji drugiego luminoforu jest możliwa poprzez przeniesienie przedziału czasu  $A_2$  w inny przedział czasu  $t$ . To znaczy, że jeżeli wartość  $\tau$  drugiego luminoforu jest mniejsza niż luminoforu pierwszego, przedział czasu  $A_2$  należałoby przenieść w obszar początkowej fazy emisji. Podobnie jak w przypadku metody PDR, stosunek  $A_1$  do  $A_2$  z metody DLR stanowi skalibrowaną odpowiedź luminescencyjną sensora.<sup>[23,24]</sup> Ponadto, uzyskuje się informacje na temat wkładu poszczególnych luminoforów w krzywą kinetyki luminescencji (Rys. 8).

Metoda DLR charakteryzuje się analogiczną wadą jak metoda PDR, tj. na intensywność z przedziału czasu  $A_1$  wpływa fluorescencja tła próbki. Co więcej, metoda DLR odznacza się wrażliwością na efekt rozkładu luminoforu pod wpływem światła wzbudzenia. To znaczy, że gdy jeden z luminoforów ulega temu efektowi, intensywność luminescencji obydwu rodzajów luminoforów rejestrowana w przedziale czasu  $A_1$  ulega zmianie, a zatem, stosunek  $A_1$  do  $A_2$  staje się niezgodny z prawdą.

### 2.3.3. Szybkie określanie czasu życia (RLD)

W odróżnieniu od poprzednich metod, metoda szybkiego określania czasu życia (RLD) (ang. *rapid lifetime determination*) opiera się na wykorzystaniu dwóch przedziałów czasu będących razem w fazie emisji (Rys. 9). Czas życia luminescencji oblicza się za pomocą wyrażenia:

$$\tau = \frac{t_2 - t_1}{\ln(A_1/A_2)} \quad (\text{Równ. 6})$$



**Rysunek 9.** Schemat działania metody RLD. Po wzbudzeniu luminoforu, luminescencja jest rejestrowana za pomocą dwóch przedziałów czasu, umieszczonych w fazie emisji ( $A_1$  i  $A_2$ ). Zmodyfikowano.<sup>[20]</sup>

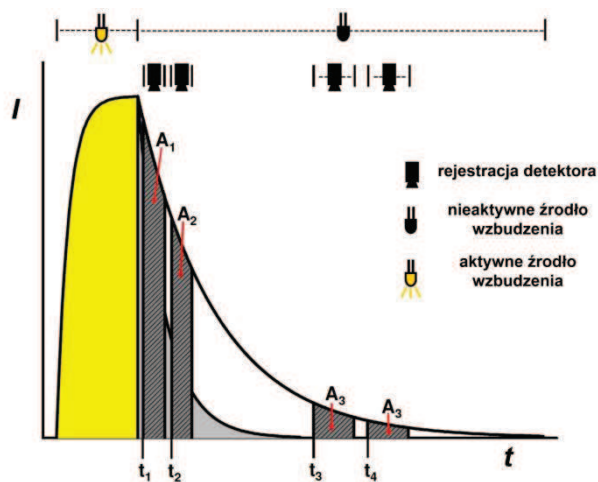
gdzie  $\tau$  oznacza czas życia luminescencji,  $t_1$  i  $t_2$  czasy rozpoczęcia rejestracji intensywności luminescencji w ustalonych przedziałach czasu, a  $A_1$  i  $A_2$  wartości zarejestrowanych intensywności z tych przedziałów.<sup>[16,17,25,26]</sup> W celu prawidłowego pomiaru  $\tau$  przy użyciu Równania 6, przedziały  $A_1$  i  $A_2$  muszą posiadać równą szerokość, a krzywa kinetyki luminescencji musi być jednoeksponencjalna.<sup>[27-29]</sup> Użycie Równania 6 wiąże się z kalibracją odpowiedzi optycznej sensora.

Metoda RLD stanowi poręczne narzędzie z powodu swoich licznych zalet. Są to: (i) niska podatność na interferencje, (ii) brak konieczności korekcji obszaru, w którym rozchodzi się promieniowanie wzbudzające (ponieważ  $\tau$  jest niezależny od intensywności), (iii) wykazywanie tolerancji na niskie poziomy światła z otoczenia oraz na przesunięcia sprzętu pomiarowego między kalibracją a pomiarami,<sup>[25]</sup> (iv) brak wrażliwości na fotodegradację luminoforu oraz (v) zwiększanie dokładności pomiaru  $\tau$  za pomocą Równania 6 poprzez 50 % nałożenie przedziałów czasu ( $A_1$  i  $A_2$ ) na siebie.<sup>[30]</sup>

Ostatnia zaleta wiąże się z możliwością pracy z krzywymi dwueksponencjalnymi kinetyki luminescencji występującymi często przy kompleksach metal-ligand (ML). Szerokość przedziałów  $A_1$  i  $A_2$  oraz ich pozycja względem siebie odgrywa istotną rolę w określaniu  $\tau$ .<sup>[31]</sup> Właściwe rozmieszczenie  $A_1$  i  $A_2$  w czasie  $t$  wpływa na otrzymaną wartość  $\tau$ . To znaczy, że jeżeli przedziały czasu  $A_1$  i  $A_2$  zostaną umieszczone na początku krzywej dwueksponencjalnej kinetyki luminescencji, wartość  $\tau$  będzie mniejsza niż gdyby  $A_1$  i  $A_2$  znajdowały się na końcu krzywej.

#### 2.3.4. Podwójne określanie czasu życia (DLD)

Sygnaly sensorów podwójnie luminoforowych powinny być oddzielane poprzez wykorzystanie różnic występujących w widmach i/lub czasach życia luminescencji luminoforów.<sup>[24,32]</sup> Metoda podwójnego określania czasu życia (DLD) (ang. *dual lifetime determination*) pozwala rozdzielać sygnaly pochodzące od dwóch rodzajów luminoforów emitujących jednocześnie (Rys. 10). Metoda DLD jest najskuteczniejsza, jeżeli czas życia luminescencji jednego z luminoforów różni się co najmniej 10x od czasu życia luminescencji drugiego.



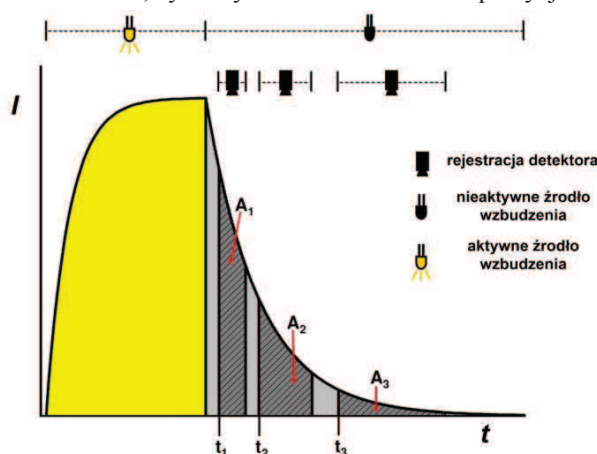
**Rysunek 10.** Schemat działania metody DLD. Po wzbudzeniu luminoforu, luminescencja jest rejestrowana za pomocą czterech przedziałów czasu umieszczonych w fazie emisji. Dwa z nich ( $A_1$  i  $A_2$ ) rejestrują sygnał obydwu luminoforów, natomiast dwa pozostałe ( $A_3$  i  $A_4$ ) sygnał luminoforu wykazującego dłuższy czas życia luminescencji. Zmodyfikowano.<sup>[20]</sup>

W metodzie DLD stosuje się cztery przedziały czasu umieszczone w fazie emisji. Pierwsze dwa, równie szerokie, przedziały ( $A_1$  i  $A_2$ ) są umieszczone w obszarze fazy emisji obydwu rodzajów luminoforów. Przedziały te rejestrują łączną intensywność, a tym samym  $\tau$  obydwu rodzajów luminoforów. Kolejne dwa przedziały ( $A_3$  i  $A_4$ ) o tej samej szerokości są umieszczone w obszarze  $t$ , gdzie luminescencja jednego z luminoforów już wygasła. Zatem, przedziały te nabywają informacje o luminescencji luminoforu wykazującego dłuższy  $\tau$ . Przedziały czasu umiesz-

czony na początku fazy emisji ( $A_1$  i  $A_2$ ) nie odzwierciedlają prawdziwej wartości  $\tau$  luminoforu wykazującego krótszy  $\tau$ , ponieważ sygnał ten stanowi połączenie sygnałów obydwu rodzajów luminoforów. Informacja o dokładnym  $\tau$  luminoforu wykazującego krótszy  $\tau$  jest uzyskiwana poprzez rejestrację zmian czasów życia luminescencji przy pomocy Równania 6.<sup>[33,34]</sup> A zatem, metoda DLD stanowi dwie metody RLD przeprowadzane w innych obszarach  $t$ , umożliwiając określanie zmian  $\tau$  dwóch różnych rodzajów luminoforów w tym samym czasie.

### 2.3.5. Odmiana metody DLD

Metody RLD i DLD opierają się na stosowaniu kilku przedziałów czasu w fazie emisji luminoforu na krzywej kinetyki luminescencji. Im większa liczba stosowanych przedziałów czasu, tym wyższa rozdzielczość i precyzja wyników.<sup>[31]</sup> Wysoka rozdzielczość



**Rysunek 11.** Schemat działania odmiany metody DLD. Po wzbudzeniu luminoforu, luminescencja jest rejestrowana za pomocą trzech przedziałów czasu ( $A_1$ ,  $A_2$  i  $A_3$ ) umieszczonych w fazie emisji. Parametry każdego przedziału czasu są ustalone tak, by rejestrowana była taka sama intensywność emisji. Zmodyfikowano.<sup>[20]</sup>

Ta metoda pozwala obliczyć  $\tau$  z krzywej kinetyki luminescencji kilkueksponencjalnej. Szerokość i ustalenie obszaru przedziałów czasu ( $A_1$ ,  $A_2$  i  $A_3$ ) są dostosowane tak, aby wszystkie rejestrowały tę samą intensywność. Stosunki intensywności przedziałów czasu ( $R_{1,2}$  i  $R_{1,3}$ ) są obliczane przy użyciu metody RLD:

$$R_{1,2} = \frac{A_1}{A_2} = f(p, T) \quad (\text{Równ. 7})$$

$$R_{1,3} = \frac{A_1}{A_3} = f'(p, T) \quad (\text{Równ. 8})$$

Skoro otrzymywane są dwa równania stosunku intensywności z jednego pomiaru, to możliwe jest jednoczesne określanie dwóch nieznanymi parametrów (ciśnienia i temperatury).

i precyzja wyników może zostać utrzymana również przez odpowiednie ustawienie przedziałów czasu w czasie  $t$ , gdy wartości  $\tau$  obydwu rodzajów luminoforów są już znane.<sup>[28]</sup> Poprzez ustawienie przedziałów czasu na właściwych pozycjach czasu  $t$  oraz poprzez odpowiednią szerokość tych przedziałów, możliwe jest określanie nawet dwóch parametrów jednocześnie (ciśnienia i temperatury) za pomocą jednego pomiaru. W ten sposób powstała odmiana metody DLD służąca do kalibracji odpowiedzi luminescencyjnej sensorów (Rys. 11).<sup>[35]</sup>

W związku z tym, obydwie parametry mogą być określane na podstawie emisji już nawet jednego luminoforu.

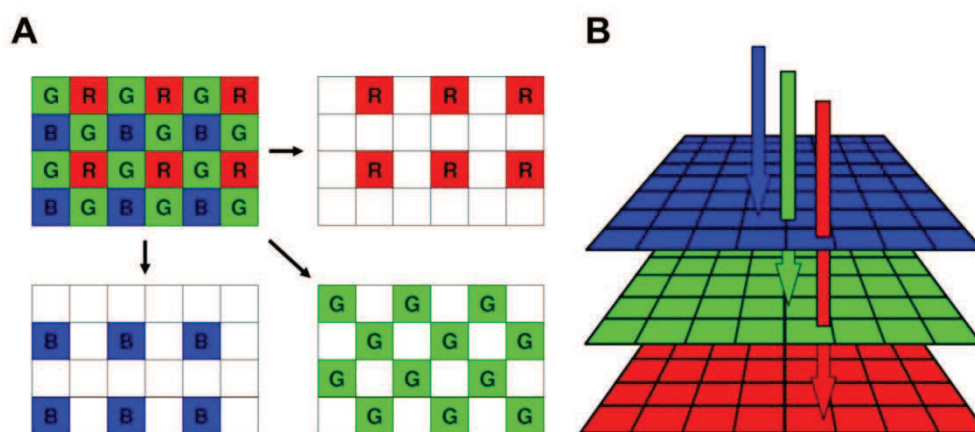
### 3. Potrójnie luminoforowe sensory luminescencyjne

#### 3.1. Metody separacji sygnałów wieloluminoforowych sensorów oparte na modelu przestrzeni barw RGB

Detektory oparte na matrycach CCD (ang. *charge-coupled device*) należą do szeroko stosowanych urządzeń służących do rejestracji odpowiedzi optycznej sensorów luminescencyjnych, dając możliwość przestrzennego obrazowania wyników. Jeżeli rejestrowany sygnał pomiarowy powstaje z nałożenia się odpowiedzi optycznych od dwóch lub więcej rodzajów luminoforów sensora, odpowiedzi te muszą być od siebie oddzielone. Zazwyczaj dokonuje się tego poprzez optyczny rozdział za pomocą obracanego bębna z filtrami (więcej o tej metodzie rozdziału → 2.1) lub poprzez czasowy rozdział przy użyciu metody FLIM (więcej o tej metodzie rozdziału → 2.3).<sup>[13,33]</sup>

Jednak powstała jeszcze inna metoda separacji. Wykorzystuje ona jeden z podstawowych modeli przestrzeni barw: czerwony, zielony, niebieski (ang. *red, green, blue* – RGB). Tę metodę separacji można stosować względem układów detekcyjnych opartych (i) na matrycach CCD i CMOS (ang. *complementary metal oxide semiconductor*) lub (ii) na matrycy CMOS typu FOVEON X3.

W przypadku matryc CCD i CMOS, zasada polega na nakryciu obiektywu detektora trzema różnymi filtrami optycznymi (kolejno niebieskim, zielonym i czerwonym). Każdy z filtrów jest uformowany w inny sposób. Umożliwia to wzajemne uzupełnianie się



**Rysunek 12.** Układ elementów dwóch metod separacji sygnałów opartych na modelu przestrzeni barw RGB. (A): Metoda stosowana względem matryc CCD i CMOS wykorzystująca trzy filtry optyczne (kolejno niebieski, zielony i czerwony) uformowane w odmienny sposób oraz (B): metoda stosowana względem matryc CMOS typu FOVEON X3 wykorzystująca trzy warstwy (kolejno niebieską, zieloną i czerwoną) absorbujące promieniowanie o odmiennym zakresie długości fali. Zmodyfikowano.<sup>[20]</sup>

struktur filtrów (Rys. 12).<sup>[20]</sup> Rozkład barw jest rozpoznawany przez mikroukład detekcyjny.<sup>[36,37]</sup>

Natomiast przy zastosowaniu matrycy CMOS typu FOVEON X3, zamiast optycznych filtrów o odmiennej strukturze, używa się trzech różnych warstw (w tej samej kolejności jak wyżej). Każda z warstw jest dostosowana do innego zakresu długości fal. Pierwsza z warstw absorbuje niebieski zakres wpadającego światła, druga zielony zakres, a pozostały czerwony zakres jest rejestrowany przez ostatnią warstwę (Rys. 12).<sup>[38-40]</sup> Intensywność każdej z barw jest rejestrowana i przetwarzana w odmiennym obszarze mikroukładu detektora. Informacje o intensywności są przenoszone za pomocą trzech różnych kanałów (każdy dla jednej barwy), a następnie obliczane, dając kolorowy obraz. Jeżeli pozwala na to detektor, poprzez wprowadzenie odpowiednich ustawień, możliwe jest rejestrowanie czasów życia zamiast intensywności luminescencji.

Zatem, metoda przestrzennego rozkładu RGB w mikroukładach detekcyjnych umożliwia rejestrację intensywności trzech odmiennych barw od różnych luminoforów z jednego sygnału pomiarowego.

**Podziękowania:** Autorzy pragną podziękować MNiSzW za częściowe sfinansowanie badań ze środków przeznaczonych na naukę w ramach Grantu N N313 442737 (2009-2012).

## Literatura:

- [1] M. Tsvirko, B. Kalota, *Wiad. Chem.*, **2011**, *65*, 1069-1097.
- [2] I. Klimant, M. Kühl, R.N. Glud, G. Holst, *Sens. Actuat. B*, **1997**, *38*, 29-37.
- [3] C.R. Schröder, G. Neuraüter, I. Klimant, *Microchim. Acta*, **2007**, *158*, 205-218.
- [4] S. Nagl, O.S. Wolfbeis, *Analyst*, **2007**, *132*, 507-511.
- [5] S. Nagl, C. Baleizão, S.M. Borisov, M. Schäferling, M.N. Berberan-Santos, O.S. Wolfbeis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 2317-2319.
- [6] S. Uchiyama, K. Iwai, A.P. deSilva, *Angew. Chem.*, **2008**, *120*, 4745-4747.
- [7] T. Liu, M. Guille, J.P. Sullivan, *AIAA J.*, **2001**, *39*, 103-112.
- [8] T. Liu, J.P. Sullivan, *Pressure and temperature sensitive paints*, R.J. Adrian, M. Gharib, W. Merzkirch, D. Rockwell, J.H. Whitelaw (red.), Springer, Berlin, **2004**.
- [9] E. Puklin, B. Carlson, S. Gouin, C. Costin, E. Green, S. Ponomarev, H. Tanji, M. Gouterman, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2000**, *77*, 2795-2804.
- [10] S. Grenoble, M. Gouterman, G. Khalil, J. Callis, L. Dalton, *J. Lumin.*, **2005**, *113*, 33-44.
- [11] M. Gouterman, *J. Chem. Educ.*, **1997**, *74*, 697-702.
- [12] G.E. Khalil, K. Lau, G.D. Phelan, B. Carlson, M. Gouterman, J.B. Callis, L.R. Dalton, *Rev. Sci. Instrum.*, **2004**, *75*, 192-206.
- [13] G.E. Khalil, C. Costin, J. Crafton, G. Jones, S. Grenoble, M. Gouterman, J.B. Callis, L.R. Dalton, *Sens. Actuat. B*, **2004**, *97*, 13-21.
- [14] D.S. Miller, S. Letcher, D.M. Barnes, M. David, *Am. J. Physiol.*, **1996**, *271*, F508-F520.
- [15] L. Paglaro, *Adv. Mol. Cell Biol.*, **1995**, *11*, 93-123.
- [16] G. Mariott, R.M. Clegg, D.J. Arndt-Jovin, T.M. Jovin, *Biophys. J.*, **1991**, *60*, 1374-1387.
- [17] X.F. Wang, T. Uchida, D.M. Coleman, S. Minami, *Appl. Spectr.*, **1991**, *45*, 360-366.
- [18] C.G. Morgan, A.C. Mitchel, *Chromosome Res.*, **1996**, *4*, 261-263.
- [19] J.W. Holmes, *Aeronautical J.*, **1998**, *2306*, 189-194.
- [20] M.I.J. Stich, *Ph.D. Thesis*, University of Regensburg, Regensburg, **2009**.
- [21] P. Hartmann, W. Ziegler, *Anal. Chem.*, **1996**, *68*, 4512-4514.



- 
- [22] P. Hartmann, W. Ziegler, G. Holst, D.W. Lübbers, *Sens. Actuat. B*, **1997**, 38, 110-115.
- [23] T. Mayr, C. Igel, G. Liebsch, I. Klimant, O.S. Wolfbeis, *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 4389-4396.
- [24] G. Liebsch, I. Klimant, C. Krause, O.S. Wolfbeis, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 4354-4363.
- [25] J.N. Demas, W.M. Jones, R.A. Keller, *Anal. Chem.*, **1986**, 58, 1717-1721.
- [26] R.J. Woods, S. Scypinski, L.J. Cline Love, H.A. Ashworth, *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 1395-1400.
- [27] R. Ballew, J.N. Demas, *Anal. Chem.*, **1989**, 61, 30-33.
- [28] S.P. Chan, Z.J. Fuller, J.N. Demas, B.A. DeGraff, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 4486-4490.
- [29] S.P. Chan, Z.J. Fuller, J.N. Demas, F. Ding, B.A. DeGraff, *Appl. Spectr.*, **2001**, 55, 1245-1250.
- [30] K.K. Sharman, A. Periasamy, H. Ashworth, J.N. Demas, N.H. Snow, *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 947.
- [31] C. Moore, S.P. Chan, J.N. Demas, B.A. DeGraff, *Appl. Spectr.*, **2004**, 58, 603-607.
- [32] C.R. Schröder, L. Polerecky, I. Klimant, *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 60-70.
- [33] M.I.J. Stich, S. Nagl, O.S. Wolfbeis, U. Henne, M. Schäferling, *Adv. Funct. Mater.*, **2008**, 18, 1399-1406.
- [34] S. Nagl, M.I.J. Stich, M. Schäferling, O.S. Wolfbeis, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, 393, 1199-1207.
- [35] K. Mitsuo, K. Asai, A. Takahashi, H. Mizushima, *Meas. Sci. Technol.*, **2006**, 17, 1282-1291.
- [36] J. Janesick, G. Putnam, *Annu. Rev. Nucl. Part. Sci.*, **2003**, 53, 263-300.
- [37] B.E. Bayer, *US Patent 3971065*, **1976**.
- [38] H. Nozaki, T. Adachi, *US Patent 4677289*, **1987**.
- [39] C.F. Gay, R.D. Wieting, *US Patent 4581625*, **1986**.
- [40] M.B. Chouikha, G.N. Lu, M. Sevil, G. Sou, *US Patent 5883421*, **1999**.

Bartosz Kalota, Mikhail Tsvirko

*Institute of Chemistry, Environmental Protection and Biotechnology, Jan Dlugosz University, 42-200 Częstochowa, Armii Krajowej 13/15, Poland;*

*e-mail: bartek.kalota@wp.pl; m.tsvirko@ajd.czyst.pl*

## **Single, double and triple luminophore luminescent sensors technology (2): Calibration and signal separation methods**

### **Abstract**

In this review, characteristics of commonly used calibration methods in contemporary single, double and triple luminophore luminescent sensors was presented. Main signal separation methods of contemporary double and triple luminophore luminescent sensors were discussed, as well.

**Keywords:** luminescent sensors; luminescence; technology; signal calibration; signal separation