

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Dipl.-Ing. (FH) M. Sc. Robert Franke
aus Aleppo

Tag der mündlichen Prüfung:

Hochintegriertes Kamerasystem für die Multifrequenz- Lumineszenzabklingzeitbildgewinnung

Erstgutachter: Prof. Dr. Bernd Jähne
Zweitgutachter:

„Es heißt schon seit langem, der Spezialist sei ein Barbar, dessen Unwissenheit nicht allumfassend ist.“

Stanisław Lem: *Die Stimme des Herrn*

Zusammenfassung

Es wird ein neuartiges, hochintegriertes Kamerasystem mit einer räumlichen Auflösung von 1024×1024 Bildpunkten zur Messung von Lumineszenzabklingzeiten im Frequenzbereich bei Modulationsfrequenzen von 5 kHz bis 50 MHz vorgestellt. Es kann die bildhafte Messung von Lumineszenzabklingzeiten deutlich vereinfachen und neue Einsatzfelder eröffnen. Erste Messungen mit dem Kamerasystem zeigen bereits vielversprechende Resultate und ein hohes Maß an Flexibilität für zahlreiche Anwendungen.

Dynamische Photolumineszenzprozesse, wie die Lumineszenzlöschung und der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), werden theoretisch behandelt und mit Hilfe elektrischer Ersatzschaltungen modelliert. Durch bestehende elektrotechnische Methoden lassen sich die erstellten Modelle simulieren, visualisieren und mit realen Messungen vergleichen. Die in vorliegender Arbeit entworfenen Modelle werden mit ausgewählten Messungen verglichen und diskutiert. Dabei zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen Modell und realer Probe sowie das Potenzial, komplexere lumineszente Systeme zu untersuchen und zu modellieren, um ein tieferes Verständnis über diese zu erlangen.

Abstract

A new, highly integrated camera system with a spatial resolution of 1024×1024 pixels for luminescence lifetime measurements in the frequency domain is presented. The modulation frequency range reaches from 5 kHz to 50 MHz. The camera system is capable of simplifying existing luminescence lifetime measuring methods and opens up new application fields. First measurements with the camera already show promising results and a high flexibility for a variety of applications.

Dynamic processes of photoluminescence as the quenching of luminescence and the Förster resonance energy transfer (FRET) are investigated theoretically and modeled by means of electrical equivalent circuits. Using existing methods of electrical engineering the developed models can be simulated, visualised and compared to real measurements. The models presented in that work are discussed and compared to selected measurements. A good accordance between model and real sample can be found. It shows the potential to examine and model more complex luminescent systems to get a more profound knowledge about them.

Inhaltsverzeichnis

Verwendete Abkürzungen und Formelzeichen	xiii
Abkürzungen	xiii
Formelzeichen	xiv
1 Einleitung	1
2 Theorie der Photolumineszenz	3
2.1 Energieniveauschema und Jablonski-Diagramm	3
2.2 Lumineszenzdynamik	5
2.2.1 Beschreibung im Zeitbereich	6
2.2.2 Beschreibung im Frequenzbereich	6
2.3 Mehrkomponentensysteme	7
2.4 Energietransfer	9
2.4.1 Lumineszenzlöschung	9
2.4.2 Förster-Resonanzenergietransfer	10
3 Detektion und Bestimmung der Lumineszenzabklingzeiten	11
3.1 Lichtquellen	11
3.2 Detektoren	12
3.3 Methoden der Detektion	15
3.3.1 Methoden im Zeitbereich	15
3.3.2 Methoden im Frequenzbereich	18
3.4 Referenzierung im Frequenzbereich	21
3.5 Anpassungsmethoden und Interpretation der Abklingzeiten	22
3.6 Optimale Modulationsfrequenz	23
3.6.1 Optimale Modulationsfrequenz für eine Komponente	23
3.6.2 Optimale Modulationsfrequenz für zwei Komponenten	25
3.7 Nyquist-Diagramm	26
4 Modellierung der Lumineszenzdynamik mit elektrischen Ersatzschaltungen	29
4.1 Zweiniveausystem	30
4.1.1 Strahlender Übergang	30
4.1.2 Strahlender und strahlungsloser Übergang	31
4.2 Lumineszenzlöschung	33
4.3 Zweikomponentensystem	34
4.4 FRET-System	35

5	Entwicklung einer Lumineszenzabklingzeitkamera (FLICAM)	43
5.1	Kamerakonzept	44
5.2	Systemkomponenten	45
5.2.1	Kontrolleinheit	45
5.2.2	Bildsensoreinheit	47
5.2.3	Analog-Digital-Umsetzer	50
5.2.4	Bildverarbeitungseinheit	50
5.2.5	Stromversorgung	51
5.3	Firmware	51
6	Messungen und Ergebnisse	53
6.1	Messaufbau	53
6.2	Messungen	55
6.2.1	Rhodamin B	55
6.2.2	Planare Sauerstoff-Optode	56
6.2.3	Planare pH-Optode	57
6.2.4	HPTS und Rhodamin B in Mischung	57
6.3	Auswertung	58
6.4	Ergebnisse	60
6.4.1	Rhodamin B	60
6.4.2	Planare Sauerstoff-Optode	62
6.4.3	Planare pH-Optode	63
6.4.4	HPTS und Rhodamin B in Mischung	64
7	Diskussion der Ergebnisse	67
7.1	Kamera	67
7.2	Rhodamin B	68
7.3	Planare Sauerstoff-Optode	69
7.4	Planare pH-Optode	70
7.5	HPTS und Rhodamin B in Mischung	70
7.6	Schlussfolgerung	73
8	Ausblick	75
A	Mathematische Herleitungen	79
A.1	Kreuzkorrelation mit einer harmonischen Funktion	79
A.2	Kreuzkorrelation mit einer Fourier-Reihe	80
A.3	Sensitivität und optimale Modulationsfrequenz für eine Komponente	81
A.4	Sensitivität und optimale Modulationsfrequenz für zwei Komponenten	82
A.5	Reelle Polstellen	83
A.6	Lage der Pol- und Nullstellen	83
A.7	Koeffizientenvergleich und Impedanzen	84
B	Frequenzverhalten der Lichtquellen	85

B.1	Frequenzgang der Laserlichtquelle	85
B.2	Grenzfrequenzen von Lumineszenzdiolen (LEDs)	86
	Literaturverzeichnis	89
	Danksagung	97

Verwendete Abkürzungen und Formelzeichen

Abkürzungen

A	Akzeptor
ADU	Analog-Digital-Umsetzer
AF	Anregungsfilter
APD	<i>avalanche photodiode</i> (Avalanche-Photodiode)
BNC	<i>bayonet Neill Concelman</i> (Koaxialsteckverbinder)
CCD	<i>charge-coupled device</i> (ladungsgekoppeltes Bauteil, in einer Klasse von Bildsensoren eingesetzt)
CMOS	<i>complementary metal oxide semiconductor</i> (ein Halbleiterprozess)
D	Donor, optischer Diffusor
DAU	Digital-Analog-Umsetzer
DCDS	<i>digital correlated double sampling</i> (korrelierte Doppelabtastung der Pixelgrauwerte nach Belichtung und Löschen und digitale Subtraktion)
DDR	<i>double data rate</i> (Bitübertragung bei steigender und fallender Taktflanke)
DDS	<i>direct digital synthesis</i> (direkte digitale Synthese zur Erzeugung von harmonischen Schwingungen)
DN	<i>digital numbers</i> (Digitalwerte)
DSNU	<i>dark signal non-uniformity</i> (pixelspezifische, ortsfeste Dunkelstromverteilung)
EF	Emissionsfilter
EMVA	<i>European Machine Vision Association</i>
ENDO	starres Endoskop
ET	<i>energy transfer</i> (intermolekularer Energietransfer)
FLICAM	<i>fluorescence lifetime imaging camera</i> (Lumineszenzabklingzeitkamera)
FLIM	<i>fluorescence lifetime imaging microscopy</i>
FPGA	<i>field programmable gate array</i> (programmierbarer Logikbaustein)
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i> (Förster-Resonanzenergietransfer)
GigE	<i>Gigabit-Ethernet</i> (Netzwerkstandard)
HD-CAM	<i>high definition camera</i> (hochauflösende Kamera)
HPTS	8-Hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonsäure-Trinatriumsalz, auch Pyranin
IC	<i>internal conversion</i> (innere Umwandlung)
ISC	<i>intersystem crossing</i> (Interkombination)

LED	<i>light emitting diode</i> (Lumineszenzdiode)
LO	Optik zur Laserstrahlformung
LQ	Lichtquelle
MCP	<i>micro-channel plate</i> (Mikrokanalplatte)
OBJ	Kameraobjektiv
P	lumineszente Probe
PGA	<i>pin grid array</i> (Gehäuseform elektrischer Bauteile)
PLL	<i>phase-locked loop</i> (Phasenregelschleife)
PMT	<i>photomultiplier tube</i> (Sekundärelektronenvervielfacher)
PRNU	<i>photo response non-uniformity</i> (pixelspezifische, ortsfeste Verteilung der Verstärkung und Nichtlinearität)
PSP	<i>pressure-sensitive paint</i> (partialdruckabhängige Farbe)
RAM	<i>random access memory</i> (flüchtiger Speicher)
RLD	<i>rapid lifetime determination</i> (schnelles Verfahren zur Bestimmung einer einzelnen Abklingzeitkomponente)
ROI	<i>region of interest</i> (ausgewählter Bildsensorbereich)
SDK	<i>software development kit</i> (Software-Komponenten zur anwenderspezifischen Erstellung von Software)
SPICE	<i>simulation program with integrated circuit emphasis</i> (Software zur Simulation elektrischer Schaltungen)
ST	(dichroitischer) Strahlteiler
TCSPC	<i>time-correlated single-photon counting</i> (zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen)
TIFF	<i>tagged image file format</i> (Dateiformat für Bilddateien)
TOF	<i>time of flight</i> (Bezeichnung einer Klasse von Bildsensoren oder Kameras zur Entfernungsmessung)
TP	Tiefpass
USB	<i>universal serial bus</i> (Schnittstellenstandard)
VHDL	<i>very high speed integrated circuit hardware description language</i> (Hardware-Beschreibungssprache)
WL	Weißlicht
μC	Mikrocontroller

Formelzeichen

a	Amplitude, Skalierung einer normierten Übertragungsfunktion
a_{em}	Amplitude der harmonischen Lumineszenz
a_{exc}	Amplitude der harmonischen optischen Anregung
a_n	Amplitude der n -ten Harmonischen
b	Gleichanteil
b_{em}	Gleichanteil der harmonischen Lumineszenz
b_{exc}	Gleichanteil der harmonischen optischen Anregung
$c(t')$	Kreuzkorrelationsfunktion

C	elektrische Kapazität
C_1, C_2	elektrische Kapazität der Komponente 1, 2
C_A, C_D	elektrische Kapazität des Akzeptors, des Donors
d_p	mittlere absolute Abweichung der Verteilung komplexer Zeiger
D_1, D_2	integrierte Lumineszenzintensitäten zu den Zeitpunkten t_1, t_2
e	Euler'sche Zahl
e^-	Einheit der Elektronenzahl
E	Energie
E_N	Gesamtenergie der N Komponenten
f	Frequenz, Brennweite
f_1, f_2	relative Intensität der Komponente 1, 2
f_{clk}	Taktfrequenz des DDS-Kerns
f_{DDS}	Frequenz der harmonischen Grundschiwingung nach der DDS
$f_{\text{em}}(t)$	Funktion der Lumineszenz zur Beschreibung im Zeitbereich
$f_{\text{exc}}(t)$	Funktion der optischen Anregung zur Beschreibung im Zeitbereich
f_g	-3 dB-Grenzfrequenz
f_j, f_n	relativer energetischer Anteil der Komponente j, n
f_N	Eckfrequenz der Nullstelle
f_{P_1}, f_{P_2}	Eckfrequenzen der Polstellen
f_{tran}	Frequenz für Transientenmessungen
F	statische Lumineszenzintensität
F_0	statische Lumineszenzintensität mit ausschließlich strahlender Desaktivierung
\mathcal{F}	Fourier-Transformation
$g(t)$	harmonische Funktion des detektierten Lichts
g_1, g_2	untere, obere Schwelle
$g_{\text{det}}(t)$	Detektorfunktion
$g_{\text{em}}(t)$	Funktion der Lumineszenz zur Beschreibung im Frequenzbereich
$g_{\text{exc}}(t)$	Funktion der optischen Anregung zur Beschreibung im Frequenzbereich
$g_n(t)$	Funktion des detektierten Lichts mit höheren Harmonischen
G	elektrische Übertragungsfunktion
G_A, G_D	elektrische Übertragungsfunktion des Akzeptors, des Donors
$G_{A,n}, G_{D,n}$	normierte elektrische Übertragungsfunktion des Akzeptors, des Donors
h	Planck'sches Wirkungsquantum
$h(t)$	Impulsantwort
$h_N(t)$	Impulsantwort der N Komponenten
H	Übertragungsfunktion
$H_{1,n}, H_{2,n}$	normierte Übertragungsfunktion der Komponente 1, 2
H_A, H_D	Übertragungsfunktion des Akzeptors, des Donors
H_n	normierte Übertragungsfunktion
H_N	Übertragungsfunktion der N Komponenten
$H_{N,n}$	normierte Übertragungsfunktion der N Komponenten
$H_{\text{ref},n}$	normierte Übertragungsfunktion der Referenz

i	imaginäre Einheit $i = \sqrt{-1}$
\underline{I}	komplexer elektrischer Strom, repräsentiert die strahlende Desaktivierung
$\underline{I}_A, \underline{I}_D$	komplexer elektrischer Strom des Akzeptors, des Donors, repräsentiert die strahlende Desaktivierung
I_{DC}	elektrischer Gleichstrom im Arbeitspunkt
\underline{I}_{exc}	komplexer elektrischer Strom, repräsentiert die Pumprate
\bar{I}_n	normierte mittlere Intensität
$\bar{I}_{y,x,n}$	normierte mittlere Intensität an der Stelle (x, y)
k	Übergangsrate
k_{AD}	reversible Energietransferrate vom Akzeptor zum Donor
k_{DA}	Energietransferrate vom Donor zum Akzeptor
k_{ET}	intermolekulare Energietransferrate
k_{FRET}	FRET-Rate
k_{nr}	Rate der strahlungslosen Desaktivierung
k_q	bimolekulare Löschkonstante
K_{SV}	Stern-Volmer-Konstante
$\mathcal{L}, \mathcal{L}^{-1}$	Laplace-Transformation, inverse Laplace-Transformation
m	Modulationsindex
m'	Demodulationsindex
m_0	Modulationsindex der Grundschiwingung
m_{em}	Modulationsindex der harmonischen Lumineszenz
m_{exc}	Modulationsindex der harmonischen optischen Anregung
m_n	Modulationsindex der n -ten Harmonischen
m'_n	Demodulationsindex der n -ten Harmonischen
n	Dichte des angeregten Zustands
\underline{n}	komplexe Dichte des angeregten Zustands
n_A, n_D	Dichte des angeregten Zustands des Akzeptors, des Donors
$\underline{n}_A, \underline{n}_D$	komplexe Dichte des angeregten Zustands des Akzeptors, des Donors
N_{ph}	kumulierte Photonenzahl beim TCSPC-Verfahren
p	(referenzierter) Zeiger
\tilde{p}	Median der Verteilung komplexer Zeiger
p_{em}	Zeiger der Lumineszenz
p_{exc}	Zeiger der optischen Anregung
p_{ref}	Zeiger der Referenz
$p_{y,x}$	referenzierter Zeiger an der Stelle (x, y)
P, \underline{P}	Pumprate, komplexe Pumprate
$[Q]$	Konzentration des Lösers
r	Differenzbetrag
R	Molekülabstand, Änderungsradius eines komplexen Werts, elektrischer Widerstand für strahlende Desaktivierung
R_0	kritischer Molekülabstand (Förster-Radius)
R_1, R_2	elektrischer Widerstand für strahlende Desaktivierung der Komponenten

	te 1, 2
R_A, R_D	elektrischer Widerstand für strahlende Desaktivierung des Akzeptors, des Donors
R_{ET}	elektrischer Widerstand für intermolekularen Energietransfer
R_{nr}	elektrischer Widerstand für strahlungslose Desaktivierung
s	Laplace-Variable der Form $s = \sigma + i\omega$
s_N	Nullstelle der Übertragungsfunktion
s_{P_1}, s_{P_2}	Polstellen der Übertragungsfunktion
S_0	Grundzustand (Singulett)
S_n	angeregter Singulettzustand
t	Zeit
t'	Zeitverschiebung
t_1, t_2	Zeitpunkte beim RLD-Verfahren
t_f, t_r	Abfall-, Anstiegszeit (10 % – 90 %)
T	Periodendauer, normierte Abklingzeit
T_n	angeregter Triplettzustand
v_n	Vibrationszustand
w_j	Gewicht der j -ten Komponente
x	Koordinate eines kartesischen Koordinatensystems
y	Ordinate eines kartesischen Koordinatensystems
α	Anfangsintensität einer Abklingzeitkomponente
γ	Summe der Raten der strahlenden und strahlungslosen Desaktivierung
Γ	Rate der strahlenden Desaktivierung
Γ_A, Γ_D	Rate der strahlenden Desaktivierung des Akzeptors, des Donors
$\delta(t)$	Delta-Funktion (Dirac-Distribution)
ΔE_{phot}	Photonenenergie als Energiedifferenz bei elektronischen Übergängen
Δf_{DDS}	Frequenzauflösung der DDS
Δt	Torzeit, Zeitdifferenz
$\Delta\theta$	Phasenauflösung der DDS
ϵ_f	digitales Phaseninkrement der DDS
ϵ_θ	digitale Phasenverschiebung der DDS
θ	Phasenverschiebung der DDS
λ	Wellenlänge
$\lambda_A, \lambda_F, \lambda_P$	Photonenwellenlänge (Absorption, Fluoreszenz, Phosphoreszenz)
ν_A, ν_F, ν_P	Photonenfrequenz (Absorption, Fluoreszenz, Phosphoreszenz)
π	Kreiszahl
σ	Dämpfung
τ	Abklingzeit
$\bar{\tau}$	mittlere Abklingzeit
τ_0	Abklingzeit der ausschließlich strahlenden Desaktivierung
τ_1, τ_2	Abklingzeit der Komponente 1, 2
τ_A	Abklingzeit der reinen Akzeptorkomponente (ohne FRET)
τ_D	Abklingzeit der reinen Donorkomponente (ohne FRET)
$\tau_{D'}$	(zugeordnete) Abklingzeit der Donorkomponente (mit FRET)

$\bar{\tau}_{\text{geom}}$	geometrischer Mittelwert der Abklingzeiten τ_1 und τ_2
τ_m	Modulationsabklingzeit
τ_{ref}	Abklingzeit der Referenz
τ_ϕ	Phasenabklingzeit
$\tau_{\phi,0}$	Phasenabklingzeit der ausschließlich strahlenden Desaktivierung
$\tau_{\phi,1}, \tau_{\phi,2}$	Phasenabklingzeit der Komponente 1, 2
$\tau_{\phi,\text{app}}$	scheinbare (Phasen-) Abklingzeit
ϕ	Phase
ϕ'	Phasenverschiebung
ϕ_0	Phase der Grundschiwingung
ϕ'_k	Phasenverschiebung an der Stützstelle k
ϕ_n	Phase der n -ten Harmonischen
ω	Kreisfrequenz ($\omega = 2\pi f$)
ω_0	Bezugskreisfrequenz
ω_m	bezüglich des Demodulationsindex optimale Modulationskreisfrequenz
ω_N	Eckkreisfrequenz der Nullstelle
$\omega_{P_1}, \omega_{P_2}$	Eckkreisfrequenzen der Polstellen
ω_ϕ	bezüglich der Phase optimale Modulationskreisfrequenz
Ω	normierte Kreisfrequenz
*	Faltung der Laplace-Transformation
\otimes	Kreuzkorrelation

1 Einleitung

Die Untersuchung von Materie mit berührungslosen, zerstörungsfreien Verfahren unter Verwendung von optischer Strahlung, also Licht, unterteilt sich in unterschiedlichste Disziplinen. Der anhaltende wissenschaftliche und technische Fortschritt in diesem bedeutsamen Gebiet der Photonik führt zu neuen Methoden, die neue Parameter zur Analyse oder mehr Informationen liefern. Die erreichbare räumliche und zeitliche Auflösung der Instrumentation erhöht sich stetig und macht die Technologie durch einen hohen Grad von Systemintegration handhabbarer und vielseitiger einsetzbar.

Ein wichtiger Teilbereich ist die Beobachtung der Lumineszenz durch optische Anregung, der Photolumineszenz. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Untersuchung der dynamischen Lumineszenz durch modulierte oder gepulste Anregung, unter anderem die Bestimmung charakteristischer, zeitlicher Größen wie Lumineszenzabklingzeiten. Die Abklingzeiten von Molekülen können durch Eigenschaften ihrer Mikroumgebung, wie beispielsweise die Temperatur oder Stoffkonzentrationen, beeinflusst werden. Dieses Phänomen ermöglicht in der biomedizinischen Forschung die Untersuchung von Wechselwirkungen von Zellen mit ihrer Umgebung oder die Entwicklung spezifischer Sensoren. Aus den Abklingzeiten lassen sich abgeleitete Größen wie Temperatur, Sauerstoffkonzentrationen oder Drücke ermitteln. Da bildgebende Verfahren zuerst in der Mikroskopie eingesetzt wurden, ist dieses Themenfeld in der Literatur häufig unter dem Begriff „FLIM“ (*fluorescence lifetime imaging microscopy*) zu finden.

In vorliegender Arbeit wird ein neuartiges, hochintegriertes Kamerasystem vorgestellt, das sämtliche für die Detektion von Lumineszenzabklingzeiten notwendigen Funktionalitäten in einem kompakten Gerät vereint. Das Messprinzip entspricht dem der „Phasen-Modulationsfluorometrie“ [35]. Durch harmonische optische Anregung wird mit Hilfe eines neuartigen Bildsensors die Phasenlage und Tiefe der Modulation der Lumineszenz gemessen. Aus diesen Informationen können Abklingzeiten beziehungsweise komplexere dynamische Zusammenhänge abgeleitet werden. Zusätzlich zum Kamerasystem ist lediglich eine direkt anschließbare, modulierbare Lichtquelle in dem benötigten Spektralbereich notwendig.

Im Rahmen des BMBF-Förderprogramms „Optische Technologien – Biophotonik III“ mit der Projektbezeichnung „FLICAM“ und der vorliegenden Arbeit wurde das Kamerasystem bei der PCO AG realisiert. Mit einer Auflösung von 1024×1024 Bildpunkten, einem dynamischen Bereich von etwa 10 Bit und einem weiten Modulationsfrequenzbereich von 5 kHz bis etwa 50 MHz stellt die Kamera ein neuartiges, hochintegriertes Messgerät dar. Durch die Integration aller relevanten

und aufeinander abgestimmten Baugruppen in ein kompaktes System vereinfacht sich die Handhabung erheblich und erweitert sich der Einsatzbereich der Lumineszenzabklingzeitmesstechnik. Darüber hinaus liegen die Anschaffungskosten deutlich unter denen vergleichbarer, jedoch eingeschränkt nutzbarer und aufwendigerer Systeme.

Die bestehenden theoretischen Grundlagen zur dynamischen Photolumineszenz und Interpretation der messbaren Phasen und Modulationstiefen werden in vorliegender Arbeit von einer anderen Seite her untersucht. Fundierte und seit langem etablierte Methoden und Verfahren der Elektrotechnik werden zur Vereinfachung des Verständnisses auf verschiedene lumineszente Systeme, wie sie in Anwendungen vorkommen, adaptiert und äquivalente Ersatzmodelle mit elektrischen Impedanzen erstellt und theoretisch untersucht. Die Modelle beschreiben Zweiniveausysteme, die Löschung der Lumineszenz, Zweikomponentensysteme und den Förster-Resonanzenergietransfer (FRET).

Anhand realer Messungen entsprechender Systeme mit der entwickelten Kamera in einem weiten Frequenzbereich werden deren Charakteristika mit denen der Modelle verglichen und diskutiert. Es zeigt sich eine gute und vielversprechende Übereinstimmung sowie das Potenzial der zukünftigen Anwendbarkeit auf komplexere Proben und Systeme. Die benötigten Werkzeuge für die Modellierung, Verifizierung und Visualisierung existieren bereits in vielfältiger Weise und müssen nicht neu entwickelt werden.

Das Kamerasystem zeigt bereits bei diesen ersten Messungen ein ausgeprägtes Potenzial für diverse, vielfältige Anwendungen.

2 Theorie der Photolumineszenz

Die Lumineszenz beschreibt ein Phänomen der Materie, optische Strahlung zu emittieren. Sie beruht auf der Desaktivierung angeregter elektronischer Zustände in den Grundzustand unter Emission von elektromagnetischer Strahlung (Photonen). Ihre spektrale Charakteristik ist abhängig von der Beschaffenheit der lumineszierenden Materie (Atome, Festkörper oder Moleküle).

Es existieren verschiedene Formen der Anregung. Bei der hier betrachteten Photolumineszenz erfolgt sie durch Absorption von Photonen genügender Energie. Die strahlende Abgabe der absorbierten Energie unterscheidet zwei quantenmechanische Mechanismen: die Fluoreszenz und die Phosphoreszenz. In folgendem Abschnitt wird auf diesen Unterschied eingegangen.

Photolumineszierende Stoffe werden als Luminophore bezeichnet. Analog zum Mechanismus der Emission wird begrifflich zwischen Fluorophoren und Phosphoren unterschieden.

2.1 Energieniveauschema und Jablonski-Diagramm

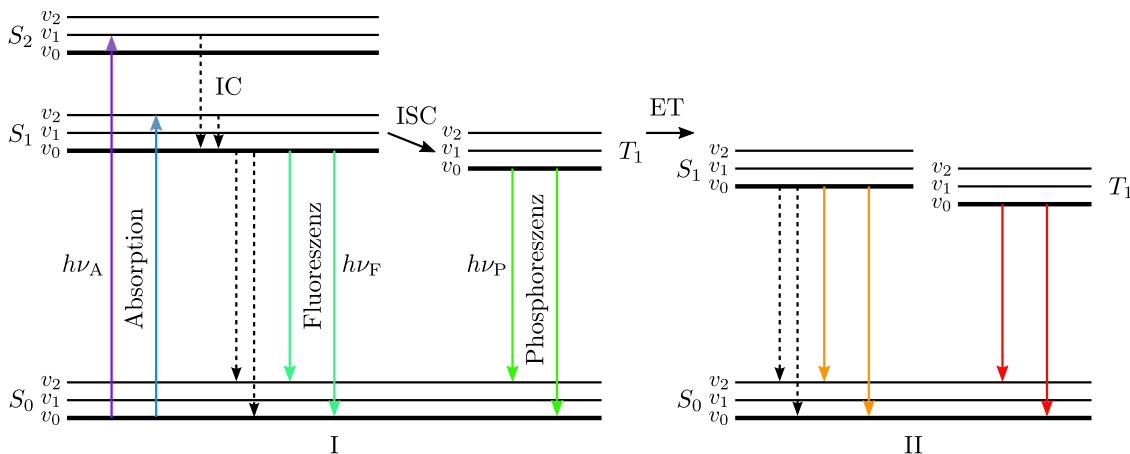


Abbildung 2.1: Jablonski-Diagramm nach [48]

Die elektronischen Zustände und Übergänge können in einem Energieschema dargestellt werden, dem sogenannten Jablonski-Diagramm (siehe Abbildung 2.1). Da in vorliegender Arbeit hauptsächlich Übergänge in Molekülen eine Rolle spielen, werden zwei Spinzustände der Elektronen unterschieden: der Singulettzustand S_n und der Triplettzustand T_n . Der Singulettzustand beschreibt gepaarte Elektronen

mit antiparallelem Spin, deren resultierender Gesamtspin null ist. Ungepaarte Elektronen, die einen parallelen Spin aufweisen, werden durch den Triplettzustand beschrieben. Der elektronische Grundzustand eines Moleküls ist S_0 .

Durch Schwingungen der Atomkerne in einem Molekül entstehen zusätzliche energetische Vibrationszustände v_n , die bei optischen Übergängen wie Absorption und Emission zu weiteren beobachtbaren Spektrallinien führen. Das Franck-Condon-Prinzip beschreibt die zugehörigen Übergangswahrscheinlichkeiten quantenmechanisch und erklärt die auftretende Linienverbreiterung sowie die kontinuierlichen Absorptions- und Emissionsspektren [16].

Prozess	Übergang	ΔE_{phot}	τ [s]
Absorption	$S_0(v_0) \rightarrow S_n(v_n)$	$h\nu_A$	10^{-15}
innere Umwandlung (IC)	$S_n(v_n) \rightarrow S_1(v_0)$	–	10^{-15}
	$S_1(v_0) \rightarrow S_0(v_n)$	–	10^{-9}
Interkombination (ISC)	$S_1(v_0) \rightarrow T_1(v_0)$	–	$10^{-9} \dots 10^{-6}$
Fluoreszenz	$S_1(v_0) \rightarrow S_0(v_n)$	$h\nu_F$	10^{-8}
Phosphoreszenz	$T_1(v_0) \rightarrow S_0(v_n)$	$h\nu_P$	$10^{-6} \dots 10^{-3}$
intermolekularer Energietransfer (ET)	$S_1^I(v_0) \rightarrow S_1^{II}(v_0)$	–	10^{-9}
	$T_1^I(v_0) \rightarrow T_1^{II}(v_0)$	–	$10^{-6} \dots 10^{-3}$

Tabelle 2.1: Übergänge im Jablonski-Diagramm und zugehörige mittlere Zeitkonstanten τ [48, 9]. Bei optischen Übergängen ist die Photonenenergie ΔE_{phot} angegeben.

Tabelle 2.1 zeigt die möglichen Übergänge und deren mittlere Zeitkonstanten. Durch Absorption von Photonen mit der Frequenz ν_A werden Elektronen aus S_0 in einen angeregten Zustand $S_n(v_n)$ überführt. Durch strahlungslose innere Umwandlung (IC: *internal conversion*) gehen die Elektronen in den Zustand $S_1(v_0)$ über. Sowohl die Absorption als auch die innere Umwandlung nach $S_1(v_0)$ verlaufen so schnell, dass deren Zeitkonstanten gegenüber den anderen vernachlässigbar klein sind.

Eine weitere innere Umwandlung von $S_1(v_0)$ nach $S_0(v_n)$ kann zu einer strahlungslosen Desaktivierung des angeregten Zustands führen. Die strahlende Desaktivierung von $S_1(v_0)$ nach $S_0(v_n)$ unter Emission von Photonen mit der Frequenz ν_F wird als Fluoreszenz bezeichnet. Die Zeitkonstante für diesen Prozess liegt typischerweise im Nanosekundenbereich.

Mit geringer Wahrscheinlichkeit kann auch ein Übergang vom Singulettzustand $S_1(v_0)$ zum Triplettzustand $T_1(v_0)$ stattfinden, der nach quantenmechanischen Auswahlregeln verboten ist, da eine Spinumkehr stattfindet. Er wird als Interkombination (ISC: *intersystem crossing*) bezeichnet. Unter erneuter Spinumkehr kann die strahlende Desaktivierung von $T_1(v_0)$ nach $S_0(v_n)$ unter Emission von Photonen mit der Frequenz ν_P erfolgen, die Phosphoreszenz genannt wird. Die dabei auftre-

tenden Zeitkonstanten liegen typischerweise im Mikro- oder Millisekundenbereich, da $T_1(v_0)$ metastabil ist.

Im Allgemeinen ist die Wellenlänge der absorbierten Photonen λ_A kleiner als die der emittierten Photonen λ_F beziehungsweise λ_P , da meist nichtstrahlende Energieumwandlungen (siehe oben) beteiligt sind. Dieser Effekt wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet.

Zwischen zwei Molekülen kann ein intermolekularer Energietransfer (ET: *energy transfer*) stattfinden (siehe Abschnitt 2.4). Dabei wird Energie aus dem angeregten Zustand $S_1^I(v_0)$ des Moleküls I in den Zustand $S_1^{II}(v_0)$ des Moleküls II übertragen. Der Energietransfer kann auch zwischen den metastabilen Zuständen $T_1^I(v_0)$ und $T_1^{II}(v_0)$ stattfinden.

Jeder Zeitkonstante kann eine zugehörige Rate

$$k = \frac{1}{\tau} \quad (2.1)$$

zugeordnet werden. τ ist der zeitliche Parameter des exponentiellen Abfalls als Systemantwort auf eine impulsförmige Anregung (siehe Abschnitt 2.2.1).

2.2 Lumineszenzdynamik

Wird die Photolumineszenz einer Probe durch eine sich zeitlich ändernde Anregung, zum Beispiel durch Modulation oder Pulsen, hervorgerufen, zeigt sie in der Regel eine sich zeitlich ändernde Antwort. Je nach Formulierung der Anregung im Zeit- oder Frequenzbereich ergibt sich eine zugehörige Systemantwort in der entsprechenden Domäne.

Bei Betrachtung linearer, zeitinvarianter Systeme stellen die Laplace- und Fourier-Transformation die Korrespondenzen zwischen Zeit- und Frequenzbereich her. Lumineszente Systeme erfüllen die Eigenschaften linearer, zeitinvarianter Systeme, wenn von durch die optische Anregung verursachten Sättigungsphänomenen oder Bleichung abgesehen wird. Die Definitionen sind nach [2] im Folgenden gegeben.

Die Laplace-Transformation bildet eine Funktion im Zeitbereich $f(t)$ in den Laplace-Bereich ab:

$$\mathcal{L}\{f(t)\}(s) = \int_{t=0}^{\infty} f(t) e^{-st} dt \quad (2.2)$$

mit $s \in \mathbb{C}$. Die Laplace-Variable $s = \sigma + i\omega$ setzt sich aus der Dämpfung σ und der Kreisfrequenz ω zusammen. Die Laplace-Transformation eignet sich für die Beschreibung von Systemen mit dämpfenden Elementen und somit auch von Ein- und Ausschaltvorgängen [72].

Die Beschreibung harmonisch angeregter und eingeschwungener Systeme ($\sigma = 0$) im Frequenzbereich kann mit Hilfe der verwandten Fourier-Transformation

$$\mathcal{F}\{f(t)\}(i\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{-i\omega t} dt \quad (2.3)$$

erfolgen. Das Verhalten im Frequenzbereich wird häufig in Form von Bode- oder Nyquist-Diagrammen [32] graphisch dargestellt (siehe Abschnitt 3.7).

2.2.1 Beschreibung im Zeitbereich

Bei einem optischen Übergang von einem angeregten Zustand in den Grundzustand ist die Lumineszenzintensität als zeitliche Antwort auf eine impulsförmige optische Anregung (Dirac-Stoß)

$$h(t) = \begin{cases} \alpha e^{-\frac{t}{\tau}}, & t \geq 0 \\ 0, & t < 0 \end{cases} \quad (2.4)$$

Hierbei ist τ die Zeitkonstante der Emission, auch Abklingzeit genannt, und α die anfängliche Intensität. Die Annahme der impulsförmigen Anregung und somit Besetzung des angeregten Zustands ist zulässig, da die Zeitkonstante der Absorption gegenüber der der Emission vernachlässigbar ist (siehe Tabelle 2.1).

Die emittierte Gesamtenergie der Impulsantwort ist durch das Integral

$$E = \int_{t=0}^{\infty} h(t) dt = \alpha\tau \quad (2.5)$$

gegeben. Bei zeitlich unveränderlicher Anregung stellt E ein Maß für die mittlere Lumineszenzintensität dar.

2.2.2 Beschreibung im Frequenzbereich

Für ein eingeschwungenes System, wie es bei Messungen im Frequenzbereich der Fall ist (siehe Abschnitt 3.3.2), ist die Korrespondenz der Impulsantwort aus Abschnitt 2.2.1 im Frequenzbereich mit Gleichung (2.3)

$$h(t) \circ\text{---} H(i\omega) = \frac{\alpha\tau}{1 + i\omega\tau}. \quad (2.6)$$

$H(i\omega)$ kann auch als Übertragungsfunktion des Systems mit zwei Zuständen aufgefasst werden. Da absolute Lumineszenzintensitäten in der Beschreibung der Dynamik im Frequenzbereich keine Rolle spielen, findet die normierte Übertragungsfunktion

$$H_n(i\omega) = \frac{H(i\omega)}{H(0)} \quad (2.7)$$

Verwendung. Für das System mit zwei Zuständen ist sie

$$H_n(i\omega) = \frac{1}{1 + i\omega\tau}, \quad (2.8)$$

so dass für konstante Anregung ($\omega = 0$) $H_n(0) = 1$ ist. Der Betrag einer normierten Übertragungsfunktion stellt den Modulationsindex

$$m(\omega) = |H_n(i\omega)| \quad (2.9)$$

dar, der Phasengang ist durch

$$\phi(\omega) = \arg(H_n(i\omega)) \quad (2.10)$$

gegeben. Für den Spezialfall eines Systems mit zwei Zuständen lässt sich mit Gleichung (2.9) eine Modulationsabklingzeit τ_m

$$m(\omega) = \frac{1}{\sqrt{1 + \omega^2\tau_m^2}} \Rightarrow \tau_m = \frac{1}{\omega} \sqrt{\frac{1}{m^2(\omega)} - 1} \quad (2.11)$$

definieren. Analog ergibt sich mit Gleichung (2.10) eine Phasenabklingzeit τ_ϕ

$$\tan \phi(\omega) = -\omega\tau_\phi \Leftrightarrow \tau_\phi = -\frac{1}{\omega} \tan \phi(\omega), \quad \omega \neq 0. \quad (2.12)$$

Es gilt $\tau_m = \tau_\phi = \tau$, so dass sich die Abklingzeit des Systems sowohl durch den Modulationsindex als auch durch die Phase bestimmen lässt.

2.3 Mehrkomponentensysteme

Im Folgenden werden Systeme betrachtet, die mehrere voneinander unabhängige Abklingzeiten beinhalten, die sich additiv überlagern. Dies ist nicht zu verwechseln mit Prozessen, wie dem Energietransfer (siehe Abschnitte 2.4 und 4.4), bei denen die Übergangsraten voneinander abhängig sind. Die Impulsantwort des Mehrkomponentensystems ist

$$h_N(t) = \sum_{j=1}^N \alpha_j e^{-\frac{t}{\tau_j}} \quad (2.13)$$

und die emittierte Gesamtenergie mit Gleichung (2.5)

$$E_N = \sum_{j=1}^N \alpha_j \tau_j. \quad (2.14)$$

Für jede Abklingzeitkomponente lässt sich ein relativer energetischer Anteil beziehungsweise eine relative Intensität

$$f_j = \frac{E_j}{E_N} = \frac{\alpha_j \tau_j}{\sum_{k=1}^N \alpha_k \tau_k} \quad (2.15)$$

mit $\sum_{j=1}^N f_j = 1$ formulieren. Die Übertragungsfunktion kann mit dem Additionstheorem der Fourier-Transformation wie folgt ausgedrückt werden:

$$H_N(i\omega) = \sum_{j=1}^N \frac{\alpha_j \tau_j}{1 + i\omega \tau_j}. \quad (2.16)$$

Mit den Gleichungen (2.7), (2.15) und (2.16) ist die normierte Übertragungsfunktion

$$H_{N,n}(i\omega) = \sum_{j=1}^N \frac{f_j}{1 + i\omega \tau_j}. \quad (2.17)$$

Die beobachtete Phase des Mehrkomponentensystems kann durch Vergleich mit den Gleichungen (2.10) und (2.12) zur Formulierung einer scheinbaren Abklingzeit

$$\tau_{\phi, \text{app}}(\omega) = \frac{\sum_{j=1}^N \frac{\alpha_j \tau_j^2}{1 + \omega^2 \tau_j^2}}{\sum_{j=1}^N \frac{\alpha_j \tau_j}{1 + \omega^2 \tau_j^2}} = \frac{\sum_{j=1}^N w_j(\omega) \tau_j}{\sum_{j=1}^N w_j(\omega)} \quad (2.18)$$

verwendet werden. $w_j(\omega) = \alpha_j \tau_j (1 + \omega^2 \tau_j^2)^{-1}$ sind frequenzabhängige Gewichte eines arithmetischen Mittels.

Nach [48] ist die mittlere Abklingzeit im Zeitbereich

$$\bar{\tau} = \frac{\sum_{j=1}^N \alpha_j \tau_j^2}{\sum_{j=1}^N \alpha_j \tau_j} = \frac{\sum_{j=1}^N w_j \tau_j}{\sum_{j=1}^N w_j} \quad (2.19)$$

mit den Gewichten $w_j = \alpha_j \tau_j$. Bei der Berechnung werden die Impulsantworten zugrunde gelegt und somit eine impulsförmige Anregung, die im Frequenzbereich mit allen Frequenzen simultan vertreten ist. Somit sind die scheinbaren mittleren Abklingzeiten $\tau_{\phi, \text{app}}(\omega)$ und $\bar{\tau}$ von der jeweiligen Messmethodik abhängig (siehe Abschnitte 3.3.1 und 3.3.2).

Werden die Gleichungen (2.11) und (2.12) – fälschlicherweise – auf ein Mehrkomponentensystem angewandt, ist im Allgemeinen $\tau_m \neq \tau_\phi$ [81].

2.4 Energietransfer

Der in Abschnitt 2.1 durch die Rate k_{ET} beschriebene intermolekulare Energietransfer kann zwischen den angeregten Singulettzuständen S_1^I , S_1^{II} beziehungsweise Triplettzuständen T_1^I , T_1^{II} stattfinden. Die Desaktivierung der angeregten Zustände kann durch Fluoreszenz, respektive Phosphoreszenz, erfolgen. Da beide Mechanismen gleichermaßen eine Rolle spielen, wird in den folgenden beiden Abschnitten der allgemeinere Begriff Lumineszenz verwendet.

2.4.1 Lumineszenzlöschung

Die Abnahme der Lumineszenzintensität durch die Anwesenheit eines Moleküls (Löschers) in der Mikroumgebung eines Luminophors wird als Lumineszenzlöschung bezeichnet. Es wird zwischen der statischen und der dynamischen Lumineszenzlöschung unterschieden [48].

Bei der statischen Lumineszenzlöschung nimmt die Konzentration lichtemittierender Luminophore ab, da nichtstrahlende Komplexe mit dem Löscher gebildet werden. Die Abklingzeit der verbleibenden Lumineszenz bleibt unverändert.

Die dynamische Lumineszenzlöschung geschieht durch Stoßprozesse zwischen Luminophor und Löscher. Sie wird deswegen auch als Stoßlöschung bezeichnet. Dabei tritt ein strahlungsloser Energietransfer vom angeregten Zustand des Luminophors zum Löscher auf. Letzterer bewirkt den strahlungslosen Übergang der übertragenen Energie in Wärme.

Charakteristisch ist hierbei, dass sowohl die Lumineszenzintensität als auch die Abklingzeit reduziert wird. Die Stern-Volmer-Gleichung beschreibt die Reduzierung der anfänglichen Intensität F_0 auf F und der Abklingzeit von τ_0 auf τ :

$$\frac{\tau_0}{\tau} = \frac{F_0}{F} = 1 + K_{\text{SV}} [\text{Q}]. \quad (2.20)$$

Dabei ist $K_{\text{SV}} = k_q \tau_0$ die Stern-Volmer-Konstante, k_q die bimolekulare Löschkonstante und $[\text{Q}]$ die Konzentration des Löschers.

In Abschnitt 4.2 wird die Stern-Volmer-Gleichung mittels Übertragungsfunktionen eines äquivalenten elektrischen Ersatzschaltbildes dargestellt.

Die Lumineszenzlöschung kann als qualitativer und quantitativer Indikator für Veränderungen in der Mikroumgebung eines Moleküls genutzt werden. Beispielsweise sind molekularer Sauerstoff und Halogenide wichtige Lumineszenzlöcher.

Mit Hilfe geeigneter Indikatoren können Größen wie spezifische Stoffkonzentrationen oder pH-Werte in der Mikroumgebung eines Systems (Zellbiologie) [48, 19] oder abgeleitete Größen wie der auf Flugzeugmodelle wirkende Luftdruck [46] bestimmt werden.

2.4.2 Förster-Resonanzenergietransfer

Eine bedeutende Variante des Energietransfers zwischen zwei Molekülen ist der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). Er beruht auf einer Dipol-Dipol-Wechselwirkung und ist in [30] beschrieben. Die Rate, mit der Energie vom angeregten Zustand des einen Moleküls (Donor) zum anderen (Akzeptor) übertragen wird, ist

$$k_{\text{FRET}} = \frac{1}{\tau_{\text{D}}} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6. \quad (2.21)$$

Dabei ist R der Molekülabstand, R_0 der kritische Molekülabstand beziehungsweise Förster-Radius und τ_{D} die Lumineszenzabklingzeit des Donors in Abwesenheit vom FRET. Der Parameter R_0 berücksichtigt molekülabhängige Größen wie die spektrale Überlappung des Emissionsspektrums des Donormoleküls mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptormoleküls sowie die räumliche Orientierung der Moleküle zueinander.

Wie bei der Lumineszenzlöschung (siehe Abschnitt 2.4.1) bewirkt k_{FRET} eine Reduktion der Lumineszenzintensität des Donors sowie der Abklingzeit τ_{D} . Für $R = R_0$ sind die Raten für die Donorlumineszenz und den FRET gleich [9]. Die an das Akzeptormolekül übertragene Energie kann dort durch strahlende Desaktivierung des angeregten Zustands in Lumineszenz überführt werden.

Charakteristisch für den FRET ist die ausgeprägte Abstandsabhängigkeit der beteiligten Moleküle: Der übertragene Energieanteil ist umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Molekülabstands. Damit können FRET-Systeme als extrem empfindliche Indikatoren für entfernungsabhängige Molekülwechselwirkungen genutzt werden [27, 7].

Mit Hilfe entsprechender Farbfilter bei der Beobachtung des FRETs können die oft spektral verschiedenen Lumineszenzen der Donor- und Akzeptormoleküle separiert und analysiert werden.

In Abschnitt 4.4 wird ein FRET-System mit den zugehörigen Raten und Zeitkonstanten ausführlich modelliert und in ein elektrisches Ersatzschaltbild überführt. Dort werden auch die Grundlagen für das Verständnis der beobachteten Abklingzeiten und des Systemverhaltens im Frequenzbereich entwickelt.

3 Detektion und Bestimmung der Lumineszenzabklingzeiten

In diesem Kapitel werden zu Beginn gebräuchliche Lichtquellen und Detektoren für Messungen und die Bestimmung von Lumineszenzabklingzeiten im Zeit- und Frequenzbereich vorgestellt. Der Schwerpunkt liegt in vorliegender Arbeit auf modulierbaren, phasensensitiven Bildsensoren, wie sie in Entfernungsmesskameras (TOF-Kameras, TOF: *time of flight*) eingesetzt werden. Sie beruhen auf Methoden im Frequenzbereich. Die Detektion harmonisch intensitätsmodulierter optischer Strahlung durch Kreuzkorrelation und anschließende Rekonstruktion mittels numerischer harmonischer Analyse werden ausführlicher behandelt, ebenso die Referenzierung im Frequenzbereich mit einem Referenzluminophor. Des weiteren werden zwei Ansätze zur Bestimmung optimaler Modulationsfrequenzen gezeigt und die Darstellung der komplexen Frequenzantwort eines Systems im Nyquist-Diagramm erklärt.

3.1 Lichtquellen

Anwendungen zur Bestimmung der Lumineszenzabklingzeiten benötigen modulierbare beziehungsweise pulsare Lichtquellen, deren Emissionswellenlängen zur optischen Anregung der zu untersuchenden Luminophore geeignet sind. Es gibt eine Vielzahl verschiedener Lichtquellen, die für Methoden im Zeit- oder Frequenzbereich (oder in beiden) geeignet sind, sich jedoch in der Modulationsbandbreite, Handhabbarkeit und in den Anschaffungskosten unterscheiden. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die in diesen Messverfahren üblichen Lichtquellen gegeben werden.

Neben den direkt modulierbaren Lichtquellen, auf die später eingegangen wird, gibt es externe Modulatoren, mit denen sich Licht konstanter Intensität (beispielsweise aus Dauerstrichlasern) modulieren lässt. Zu ihnen gehören akusto- und elektrooptische Modulatoren. Akustooptische Modulatoren können das Licht mit der doppelten Frequenz der akustischen Anregung des Modulatorkristalls intensitätsmodulieren (beispielsweise 28,84 MHz akustisch und 57,68 MHz optisch [11]). Elektrooptische Modulatoren (Pockels- und Kerr-Zelle) sind typischerweise bis 200 MHz modulierbar, benötigen jedoch hohe Modulationsspannungen und kollimiertes Licht [48]. Je nach Arbeitspunkt der elektrooptischen Modulatoren kann die Intensitätsmodulation mit der Grundschwingung oder der doppelten Frequenz, Mischformen ausgenommen, erfolgen. Der Nachteil dieser Modulatoren ist der strenggenommen nichtlineare Zusammenhang zwischen den Wellenformen des Modulatoreingangs

und der tatsächlichen Intensitätsmodulation. Somit enthält die Intensitätsmodulation selbst bei harmonischer Modulation höhere Harmonische.

Blitzlampen können ausschließlich zur optischen Pulserzeugung verwendet werden. Sie zeigen für die Anwendungen typische Pulsdauern von etwa 1 ns bei einer Puls wiederholrate von etwa 50 kHz [48]. Weitere Pulslichtquellen stellen in Modenkopplung betriebene Titan:Saphir-Laser mit Pulsdauern von 100 fs, deren optische Frequenz je nach Anwendung oft vervielfacht wird [48], oder Farbstofflaser mit Pulsdauern um 6 ps [61] dar.

In den letzten Jahren haben sich halbleiterbasierte, modulier- und pulsable Lichtquellen wie Laserdioden und Lumineszenzdioden (LED: *light emitting diode*) etabliert, zumal sie nicht nur in adäquaten Modulationsfrequenzbereichen betrieben werden können und in verschiedenen Emissionswellenlängen verfügbar sind, sondern auch kostengünstige und zuverlässige Bauteile mit kleiner Baugröße darstellen. Laserdioden emittieren im Gegensatz zu LEDs in einem deutlich schmaleren Spektralbereich.

Laserdioden mit einer Emissionswellenlänge von 405 nm und Pulsdauern von 70 ps mit Puls wiederholraten von 40 MHz oder harmonischer Modulation bis in den GHz-Bereich werden in [48] genannt.

Es existieren einige Arbeiten, die die Modulierbarkeit von LEDs im blauen oder ultravioletten Spektralbereich untersuchen. [22, 20] beschreiben blauemittierende LEDs, die bis 40 MHz modulierbar sind, [71] nennt eine -3 dB-Bandbreite von 31 MHz. [38] gibt eine Modulationsfrequenz von 250 MHz bei 460 nm und 370 nm Emissionswellenlänge an, [78] erzielt mit 280 nm- und 300 nm-LEDs bis zu 400 MHz (mit einer -3 dB-Bandbreite von 100 MHz). [76] gibt als maximale Modulationsfrequenz von LEDs verschiedener Emissionswellenlängen 100 MHz an. Da in einigen der obig zitierten Arbeiten keine Angaben zur Bandbreitendefinition gemacht werden, gestaltet sich der Vergleich der maximalen Modulationsfrequenzen als schwierig. Aus diesem Grund wurden LEDs verschiedener Hersteller mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen und optischen Leistungen in eigenen Messungen untersucht. In Anhang B.2 sind die Anstiegs- und Abfallzeiten aus Transientenmessungen und -3 dB-Grenzfrequenzen bei sinusförmiger Modulation des elektrischen Diodenstromes aufgelistet. Die höchsten gemessenen Grenzfrequenzen liegen bei etwa 20 MHz. Gepulste LEDs mit Pulsdauern von 4 ns bei Puls wiederholraten im kHz-Bereich zeigt [56]. [65] erwähnt Pulsdauern von etwa 0,8 ns bei Mikro-LED-Feldern mit 450 nm Emissionswellenlänge.

3.2 Detektoren

Zur Detektion der zeitabhängigen Lumineszenz und anschließenden Bestimmung der Lumineszenzabklingzeiten sind ausreichend schnelle beziehungsweise schnell modulierbare optische Sensoren erforderlich, die sich prinzipiell sowohl im Zeit- als auch im Frequenzbereich einsetzen lassen. Die benötigte Bandbreite ist abhängig von den zu messenden Abklingzeiten (vergleiche Abschnitt 3.6). Es lässt sich un-

terscheiden zwischen Detektoren, die eine Probe punktuell (Einkanaldetektor) oder bildgebend (zweidimensional, Weitfeld) vermessen. Mit Hilfe räumlich abtastender und somit sequentieller Verfahren können Proben mit einem Einkanaldetektor zwei- oder dreidimensional vermessen werden (beispielsweise konfokale Laserscanning-Mikroskopie [48]). Die bildgebenden Detektoren zeichnen sich dagegen dadurch aus, dass sie alle Bildpunkte simultan und somit in deutlich kürzerer Zeit erfassen, was besonders bei dynamischen Proben relevant ist.

Zu den Einkanaldetektoren zählen diskrete Photodioden, Avalanche-Photodioden (APD) und Sekundärelektronenvervielfacher (PMT: *photomultiplier tube*). Sie finden besonders im Zeitbereich zum zeitkorrelierten Einzelphotonenzählen (TCSPC: *time-correlated single-photon counting*) Anwendung [65, 18, 80, 13, 5, 10]. APDs lassen sich mit Zeitfenstern von etwa 400 ps [65] oder sogar 20 ps [48] schalten. PMTs erreichen eine Zeitauflösung von 112 ps [48] und erlauben eine direkte Modulation mit Frequenzen um 200 MHz–300 MHz [35] oder gar 1 GHz [48]. Nachteile der PMTs sind der benötigte Einsatz von modulierter Hochspannung und der Bedarf an vorsichtigem Umgang aufgrund ihrer mechanischen Beschaffenheit. Zudem können sie durch eine zu hohe Lichtintensität zerstört werden (Beschädigung der Photokathode).

Zu den bildgebenden Detektoren zählen modulierbare Bildverstärker in Kombination mit nachgeschalteter Kamera (Bildverstärkerkamera) und direkt modulierbare Bildsensoren in CCD- und CMOS-Technologie (CCD: *charge-coupled device*, CMOS: *complementary metal oxide semiconductor*). Die Bildverstärker besitzen Mikrokanalplatten (MCP: *micro-channel plate*), deren lateral angeordneten Mikrokanäle das Prinzip der PMTs beinhalten, und die das optische Zwischenbild verstärken und modulieren [41, 13, 73, 61]. Im Zeitbereich erlauben die geschalteten MCPs Zeitfenster von 200 ps bei 100 MHz Wiederholrate [77] oder gar 25 ps [48]. Im Frequenzbereich lassen sich Modulationsfrequenzen von 100 MHz [76] oder gar 1 GHz [69] erreichen. Hauptnachteile der MCPs sind die Nichtlinearität der Intensitätsmodulation und die geringe Lebensdauer.

Die direkte Modulation der Auslesestrukturen eines CCD-Sensors kann zu einer Modulation der effektiven Empfindlichkeit führen und wird in [55, 56] gezeigt. Die maximale Modulationsfrequenz ist mit 9 MHz angegeben. Seit einigen Jahren sind spezielle, modulierbare CMOS-Sensoren (beziehungsweise Kombinationen der CCD- und CMOS-Technologie) verfügbar, die als phasensensitive Sensoren eingesetzt werden können und häufig in Entfernungsmesskameras (TOF-Kameras) verbaut werden [33, 45, 52, 57, 53, 59]. Diese Sensoren werden überwiegend im Frequenzbereich genutzt und stellen phasensensitive Detektoren nach dem Prinzip des „Lock-In“ dar; durch Phasenschiebung der Bildsensormodulation und Ladungsintegration lässt sich die Kreuzkorrelationsfunktion bestimmen (siehe Abschnitt 3.3.2). Eine Anwendung einer TOF-Kamera (SwissRanger SR-2, CSEM) zur Lumineszenzabklingzeitbestimmung wird in [26] gezeigt.

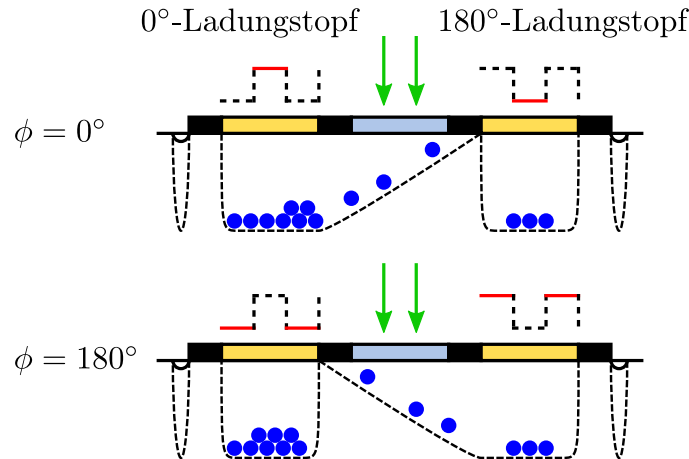


Abbildung 3.1: Funktionsprinzip eines TOF-Sensors mit zwei Ladungstöpfen nach [26]. Die durch Lichteinstrahlung in der Photodiode (Mitte) generierten Ladungsträger werden je nach Modulationsphase entweder im 0° -Ladungstopf (oben) oder im 180° -Ladungstopf (unten) akkumuliert. Zum Zweck der Eindeutigkeit der Ladungsverteilung wird der Sensor in diesem Fall rechteckförmig moduliert.

Abbildung 3.1 zeigt das Funktionsprinzip eines TOF-Sensors mit zwei Ladungstöpfen. Je nach Phase der rechteckförmigen Modulation des Bildsensors werden die durch Lichteinstrahlung in der Photodiode generierten Ladungsträger entweder im 0° - oder 180° -Ladungstopf akkumuliert. Die rechteckförmige Modulation wird aufgrund der Eindeutigkeit der Ladungsverteilung bevorzugt. Durch Aufnahme eines zweiten Phasenpaares mit 90° -Phasenverschiebung lässt sich bereits eine einstrahlende sinusförmige optische Modulation mit den vier Stützstellen 0° , 90° , 180° und 270° rekonstruieren (siehe Abschnitt 3.3.2). Es gibt auch Ansätze, TOF-Sensoren mit einem oder vier Ladungstöpfen pro Pixel zu realisieren [51].

	PMD[vision] ^{®1}	SwissRanger SR-3000 ²	Effector O3D ³
Auflösung (Spalten \times Zeilen)	160×120	176×144	64×50
Pixelgröße	$40 \times 40 \mu\text{m}^2$	$40 \times 40 \mu\text{m}^2$	$100 \times 100 \mu\text{m}^2$
Modulationsfrequenz	20 MHz	20 MHz	20 MHz
Bildwiederholrate	15 s^{-1}	40 s^{-1}	$1 \dots 100 \text{ s}^{-1}$

¹ PMDTechnologies GmbH

² MESA Imaging AG

³ IFM Electronic GmbH

Tabelle 3.1: Daten einiger Bildsensoren erhältlicher TOF-Kameras verschiedener Hersteller aus [67]

Die Vorteile der existierenden TOF-Sensoren sind die Integration der Demodulationsstrukturen auf dem Bildsensor (keine mechanisch bewegten, empfindlichen Teile, *solid-state*), eine hohe Lebensdauer, keine benötigten Hochspannungen und ein Modulationsfrequenzbereich, der zur Detektion von Lumineszenzabklingzeiten bis hinunter in den Nanosekundenbereich geeignet ist. Die Nachteile sind der (temperaturabhängige) hohe Dunkelstrom (und das entsprechende Dunkelstromrauschen) [43], eine eventuelle Gleichlichtunterdrückung, die eine Bestimmung des Demodulationsindex verhindert, und die verhältnismäßig geringe Pixelzahl. Tabelle 3.1 fasst einige Daten erhältlicher TOF-Sensoren zusammen.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete, neuartige modulierbare Bildsensor zeichnet sich durch eine bedeutend höhere Pixelzahl (1024×1024), einen geringeren Dunkelstrom und die Möglichkeit, den Gleichanteil des einstrahlenden Lichtes zu integrieren, aus. In Abschnitt 5.2.2 sind seine Leistungsdaten zu finden.

3.3 Methoden der Detektion

Es werden zwei Methoden der Detektion der Lumineszenzabklingzeiten begrifflich unterschieden: die Detektion im Zeit- und Frequenzbereich. Bei der Methode im Zeitbereich wird die lumineszierende Probe mit (wiederholten) optischen Pulsen angeregt, während bei der Methode im Frequenzbereich die Intensität der optischen Anregung harmonisch beziehungsweise mit höheren Harmonischen moduliert wird. Systemtheoretisch unterscheiden sich beide Methoden nicht voneinander und sind über die Fourier-Transformation (siehe Abschnitt 2.2) miteinander verknüpft. In der Literatur finden sich detaillierte Untersuchungen zum Signal-Rausch-Verhältnis existierender Methoden im Zeit- und Frequenzbereich [62, 21], die in die Auswahl der Instrumentierung und in das Abwägen der jeweiligen Vor- und Nachteile einfließen können [34].

3.3.1 Methoden im Zeitbereich

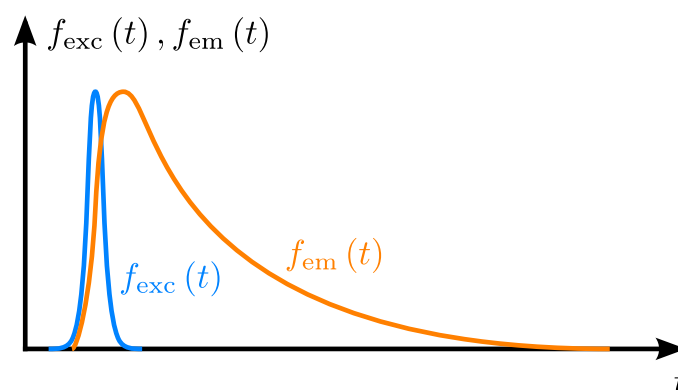


Abbildung 3.2: Durch pulsförmige Anregung $f_{exc}(t)$ resultierender zeitlicher Verlauf der Lumineszenz $f_{em}(t)$

Die optische Anregung erfolgt im Zeitbereich durch (wiederholte) Pulse. Der Lumiphor antwortet auf die impulsförmige Anregung mit einer abklingenden Funktion, wie es in Abbildung 3.2 dargestellt ist. Dabei werden Pulsdauern angestrebt, die klein gegenüber den erwarteten Abklingzeiten sind.

Der zeitliche Verlauf der Lumineszenz wird durch das Faltungsintegral der Laplace-Transformation [8]

$$f_{\text{em}}(t) = f_{\text{exc}}(t) * h(t) = \int_{t'=0}^t f_{\text{exc}}(t') h(t-t') dt' \quad (3.1)$$

mit der optischen Anregung $f_{\text{exc}}(t)$ und der Impulsantwort $h(t)$ aus Gleichung (2.4) beschrieben. Für den theoretischen Fall, dass $f_{\text{exc}}(t) = \delta(t)$ eine Delta-Funktion (Dirac-Distribution) [2] ist, stellt die Lumineszenz die Impulsantwort $f_{\text{em}}(t) = h(t)$ dar.

Da die Pulsform der optischen Anregung eine endliche Breite hat, kann durch Entfaltung mit der zuvor detektierten optischen Anregung die eigentliche Impulsantwort

$$h(t) = \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{\mathcal{L} \{f_{\text{em}}(t)\} (s)}{\mathcal{L} \{f_{\text{exc}}(t)\} (s)} \right\} (t) \quad (3.2)$$

bestimmt werden [4]. Dabei ist \mathcal{L}^{-1} die inverse Laplace-Transformation [8]. Da die optische Anregung und die Lumineszenz dieselbe Detektionskette durchlaufen, kann die Charakteristik des Messsystems, bestehend aus Lichtquelle und Detektor, durch diese Form der Referenzierung kompensiert werden.

Zur Bestimmung der Abklingzeit sollen im Folgenden zwei Methoden kurz erläutert werden: das Prinzip „*rapid lifetime determination*“ (RLD) und das zeitkorrelierte Einzelphotonenzählen (TCSPC: *time-correlated single-photon counting*).

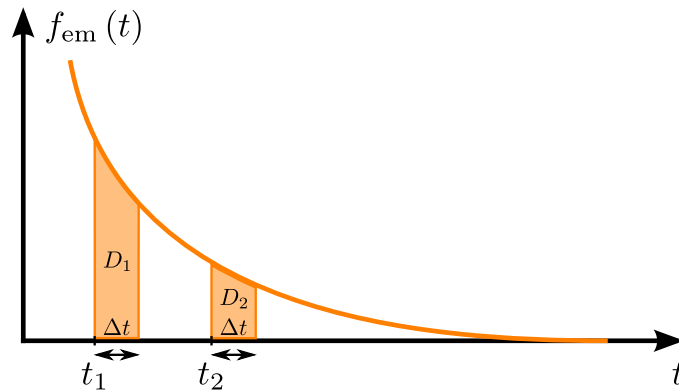


Abbildung 3.3: Lumineszenzabklingzeitbestimmung nach dem Prinzip „*rapid lifetime determination*“. Die während der Torzeit Δt zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 integrierten Lumineszenzintensitäten D_1 und D_2 lassen sich zur Bestimmung der Abklingzeit nach Gleichung (3.3) verwenden.

Bei der ersten Methode wird über zwei (oder mehr [14]) Zeitfenster mit der Torzeit Δt über den zeitlichen Verlauf der Lumineszenz $f_{\text{em}}(t)$ (idealerweise die Impulsantwort $h(t)$) integriert und nach [1, 61] die Abklingzeit

$$\tau = \frac{t_2 - t_1}{\ln \frac{D_1}{D_2}} \quad (3.3)$$

bestimmt. Dabei sind t_1 und t_2 die Zeitpunkte, ab denen die Intensitäten integriert werden (D_1 und D_2). Abbildung 3.3 illustriert das Verfahren.

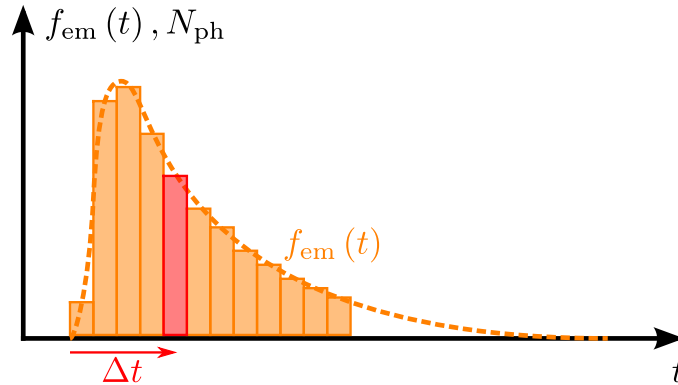


Abbildung 3.4: Prinzip des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens (TCSPC: *time-correlated single-photon counting*): Bei wiederholter Messung werden die Zeitdifferenzen Δt zwischen dem Anregungspuls und dem Eintreffen des ersten Photons bestimmt und die kumulierte Photonenzahl N_{ph} in einem Histogramm aufgetragen.

Beim Verfahren des TCSPC wird die Zeit Δt zwischen der pulsformigen optischen Anregung und der Detektion des ersten eintreffenden Photons gemessen und als Zählereignis in einem Histogramm aufgetragen. Durch oft wiederholte Messungen repräsentiert das Histogramm die Abklingkurve der Lumineszenz [48, 7]. Abbildung 3.4 zeigt das der Abklingkurve überlagerte Histogramm.

Der Vorteil der RLD-Methode ist die schnelle Erfassung und Auswertung einer einzelnen Abklingzeitkomponente. Das Verfahren ist nicht oder nur schlecht für Proben mit mehreren Abklingzeitkomponenten geeignet. Die TCSPC-Methode ist ein sehr empfindliches Verfahren, welches jedoch für das Photonenzählen aufgrund der hohen Anzahl der Messwiederholungen verhältnismäßig viel Zeit benötigt. Die Anzahl der registrierten Photonen darf nicht zu hoch sein, da sonst die Zählereignisse nicht mehr eindeutig den Zeitpunkten zugeordnet werden können. Aus diesem Grund dürfen die untersuchten Proben keine zu hohen Lumineszenzintensitäten aufweisen beziehungsweise müssen die Anregungsintensitäten reduziert werden.

Mit Hilfe anschließender nichtlinearer Regression werden verschiedene Modelle, die eine oder mehrere Abklingzeitkomponenten mit verschiedenen relativen Intensitätsanteilen beinhalten, zur Anpassung der Abklingkurve an die Messdaten verwendet.

Strenggenommen setzt die Gültigkeit der gewonnenen Abklingzeiten jedoch ein korrekt angenommenes Modell der untersuchten Probe voraus.

3.3.2 Methoden im Frequenzbereich

Die Detektion der Lumineszenz im Frequenzbereich ähnelt dem Prinzip der Netzwerkanalyse elektrischer Netzwerke mit Hilfe komplexer Netzwerkanalysatoren [39]. Das zu untersuchende System wird mit einer, meist sinusförmigen, Modulation beaufschlagt und dessen Antwort detektiert. Die Luminophore, die in vorliegender Arbeit als lineare, zeitinvariante Systeme betrachtet werden, zeigen im Falle der sinusförmigen Anregung ebenfalls eine sinusförmige Antwort sowie eine charakteristische frequenzabhängige Amplituden- und Phasenwinkeländerung.

Das Prinzip der komplexen Netzwerkanalyse kann auf lumineszente Systeme angewendet werden, indem die optische Anregung des Luminophors mit sinusförmig intensitätsmoduliertem Licht erfolgt. Abbildung 3.5 zeigt die zeitlichen Verläufe der optischen Anregung $g_{\text{exc}}(t)$ und der Lumineszenz $g_{\text{em}}(t)$, deren Modulationsindizes m_{exc} und m_{em} sowie die Phasenlagen beziehungsweise Phasenverschiebung ϕ .

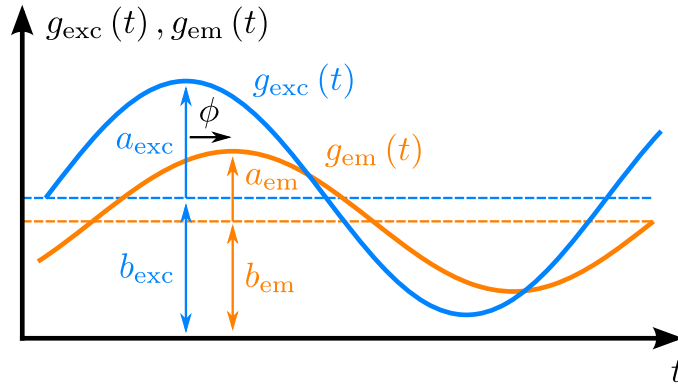


Abbildung 3.5: Durch harmonisch intensitätsmodulierte Anregung $g_{\text{exc}}(t)$ eines linearen, zeitinvarianten Systems resultiert ein ebenfalls harmonischer Verlauf der Lumineszenz $g_{\text{em}}(t)$. a_{exc} , a_{em} sind die Amplituden und b_{exc} , b_{em} die Gleichanteile der harmonischen Funktionen, woraus sich die Modulationsindizes $m_{\text{exc}} = a_{\text{exc}}/b_{\text{exc}}$ und $m_{\text{em}} = a_{\text{em}}/b_{\text{em}}$ ergeben. ϕ ist die durch den Luminophor verursachte Phasenverschiebung.

Der Modulationsindex m ist das Verhältnis der Amplitude a zum zeitlichen Mittelwert beziehungsweise Gleichanteil b . Zur Aufnahme der Lumineszenz ist es notwendig, sie spektral von der Anregung zu trennen. Mit Hilfe des Lock-In-Prinzips [59, 51], dessen mathematische Grundlage die Kreuzkorrelation darstellt, wird das detektierte Licht $g(t)$ (entweder die optische Anregung $g_{\text{exc}}(t)$ oder die Lumineszenz $g_{\text{em}}(t)$) mit der zeit- beziehungsweise phasenverschiebbaren Detektorfunktion $g_{\text{det}}(t)$, die meist rechteck- oder sinusförmig ist, gemischt (multipliziert) und anschließend integriert. Abbildung 3.6 zeigt das Verfahren der Kreuzkorrelation mit der resultierenden Kreuzkorrelationsfunktion $c(t')$.

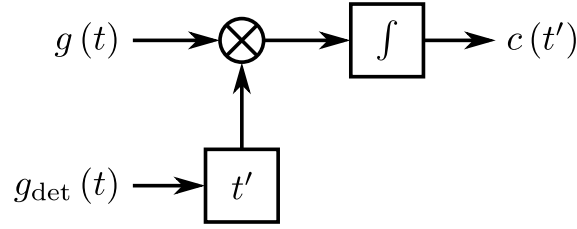


Abbildung 3.6: Funktionsprinzip des „Lock-In“ mit einem Mischer (Multiplizierer), der Zeitverschiebung t' und dem Integrator \int . Die resultierende Kreuzkorrelationsfunktion ist $c(t')$.

Gleichung (3.4) definiert die Kreuzkorrelation der Funktionen $g(t)$ und $g_{\text{det}}(t)$ mit der Periodendauer T nach [51].

$$c(t') = g(t) \otimes g_{\text{det}}(t) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{t=0}^T g(t) \cdot g_{\text{det}}(t + t') dt \quad (3.4)$$

Um die intensitätsmodulierte Wellenform zu detektieren, müssen dieselben Frequenzen im detektierten Licht $g(t)$ und in der Detektorfunktion $g_{\text{det}}(t)$ vorkommen, so dass es sich beim „Lock-In“ um ein homodynes Verfahren handelt. Bildverstärkerkameras und TOF-Sensoren stellen integrierende Sensoren nach dem Lock-In-Prinzip dar, deren Detektorfunktionen positiv und somit nicht mittelwertfrei sind. Da auch die Funktionen der optischen Anregung und Lumineszenz nicht mittelwertfrei sein können (kein „negatives Licht“) und somit einen Gleichanteil besitzen, enthält die Kreuzkorrelationsfunktion auch Information über den Gleichanteil und somit über den Modulationsindex des detektierten Lichtes.

Prinzipiell kann die optische Anregung sinusförmig oder mit höheren Harmonischen intensitätsmoduliert werden, so dass die Lumineszenz ebenfalls die entsprechenden Harmonischen beinhaltet, jedoch muss das Nyquist-Shannon-Abtasttheorem bei der Abtastung der Kreuzkorrelationsfunktion eingehalten werden, um Abtastfehler zu vermeiden.

Im Falle einer harmonischen optischen Anregung und Lumineszenz wie in Abbildung 3.5 ist die harmonische Funktion

$$g(t) = 1 + m_0 \cos(\omega_0 t + \phi_0) \quad (3.5)$$

mit dem Modulationsindex m_0 , der Kreisfrequenz ω_0 und der Phase ϕ_0 . Als Vereinfachung wird hier die normierte Darstellung betrachtet; der zeitliche Mittelwert von $g(t)$ ist eins. Die Detektorfunktion ist im Falle der TOF-Sensoren rechteckförmig

$$g_{\text{det}}(t) = \begin{cases} 1, & 0 \leq t < \frac{T}{2} \\ 0, & \frac{T}{2} \leq t < T \end{cases} \quad (3.6)$$

mit der Periode $T = 2\pi/\omega_0$. Zur Vereinfachung der Rechnung wird die Zeitverschiebung t' in $g(t)$ statt in $g_{\text{det}}(t)$ eingesetzt und mit $t' = \phi'/\omega_0$ durch die Phasen-

verschiebung ϕ' substituiert, da in TOF-Sensoren die Phase moduliert wird. Die Kreuzkorrelationsfunktion ist somit (Rechnung siehe Anhang A.1)

$$c(\phi') = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{t=0}^T g_{\text{det}}(t) \cdot g\left(t + \frac{\phi'}{\omega_0}\right) dt = \frac{1}{2} \left(1 - \frac{2m_0}{\pi} \sin(\phi' + \phi_0)\right). \quad (3.7)$$

$c(\phi')$ ist wiederum eine harmonische Funktion mit der Information über den Modulationsindex m_0 und die Phase ϕ_0 . Es ist ersichtlich, dass der Demodulationsindex in der Kreuzkorrelationsfunktion $m' = 2m_0/\pi$ mit $m_0 = 1$ einen Maximalwert von $2/\pi \approx 64\%$ haben kann und proportional zu m_0 ist.

Im Falle höherer harmonischer Frequenzanteile in der optischen Anregung und Lumineszenz lässt sich für jede n -te Harmonische

$$g_n(t) = f_n (1 + m_n \cos(n\omega_0 t + \phi_n)) \quad (3.8)$$

mit dem Gewicht f_n , dem Modulationsindex m_n und der Phase ϕ_n mit der Normierung $\sum_{n=1}^{\infty} f_n = 1$

$$g(t) = \sum_{n=1}^{\infty} g_n(t) = 1 + \sum_{n=1}^{\infty} f_n m_n \cos(n\omega_0 t + \phi_n) \quad (3.9)$$

als Fourier-Reihe schreiben. Die resultierende Kreuzkorrelationsfunktion mit der Detektorfunktion $g_{\text{det}}(t)$ aus Gleichung (3.6) lautet (Rechnung siehe Anhang A.2)

$$c(\phi') = \frac{1}{2} \left[1 - \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{f_{2n-1} m_{2n-1}}{2n-1} \sin((2n-1)\phi' + \phi_n) \right]. \quad (3.10)$$

$c(\phi')$ enthält auch die höheren, ungeraden Harmonischen, deren Beitrag, bedingt durch die Fourier-Reihe der rechteckförmigen Detektorfunktion, um den Faktor $(2n-1)^{-1}$ reduziert ist. Während im Fall der sinusförmigen optischen Anregung und Lumineszenz mindestens drei Stützstellen in der Phase (in der Praxis vier äquidistante Stützstellen) zur Rekonstruktion der Kreuzkorrelationsfunktion ausreichend sind, müssen bei höheren Harmonischen entsprechend dem Nyquist-Shannon-Abtasttheorem mehr Stützstellen verwendet werden, was jedoch zu einer längeren Erfassungsdauer führt.

Zur Vermeidung von Abtastfehlern durch unbekannte harmonische Anteile in der optischen Anregung und Lumineszenz (rechteckförmig angesteuerte Lichtquellen, „Wiggling“-Fehler [24, 70, 29, 67, 66]) bei kleinerer Anzahl von Stützstellen wird eine rein sinusförmige Anregung verwendet, da – im Gegensatz zu TOF-Anwendungen, bei denen sich die Kurvenform der Anregung und der Reflexion beziehungsweise Streuung nicht ändert – a priori nicht bekannt ist, wie groß die harmonischen Anteile in der Lumineszenz sind. Aus diesem Grund wird in vorliegender Arbeit eine sinusförmige Anregung verwendet und die Auswertung

der Grundschiwingung vorgenommen.

Des weiteren wird davon ausgegangen, dass die Integrationszeiten (bei Bildverstärkerkameras und TOF-Sensoren gleichbedeutend mit den Belichtungszeiten) groß gegenüber einer Schwingungsperiode T der verwendeten Modulationsfrequenz sind, so dass sie nicht zwangsweise ein Vielfaches von T betragen müssen. Andernfalls muss eine Anpassung der Integrationszeiten erfolgen, damit stets über vollständige Perioden T integriert wird.

Die Phase und Demodulation der Kreuzkorrelationsfunktion $c(\phi')$ lassen sich durch numerische harmonische Analyse mittels komplexer, diskreter Fourier-Transformation bestimmen [29, 2]. Dabei werden pro Periode N äquidistante Stützstellen $c(\phi'_k)$ bei den Phasen $\phi'_k = 2\pi k/N$ mit $k = 0, 1, 2, \dots, N - 1$ verrechnet. Die Amplitude der n -ten Harmonischen berechnet sich zu

$$a_n = \frac{2}{N} \left| \sum_{k=0}^{N-1} c(\phi'_k) e^{-i\frac{2\pi}{N}nk} \right|, \quad (3.11)$$

wobei für die Grundschiwingung $n = 1$ gilt. Für die jeweilige Phase gilt

$$\phi_n = \arg \left(\sum_{k=0}^{N-1} c(\phi'_k) e^{-i\frac{2\pi}{N}nk} \right). \quad (3.12)$$

Mit dem zeitlichen Mittel beziehungsweise Gleichanteil

$$b = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} c(\phi'_k) \quad (3.13)$$

lassen sich die Demodulationsindizes der jeweiligen Harmonischen $m'_n = a_n/b$ berechnen, die proportional zu m_n sind (siehe Gleichungen (3.7) und (3.10)).

Im Folgenden werden unter anderem Zeiger in der Form

$$p = m \cdot e^{i\phi} \quad (3.14)$$

verwendet, die den Modulations- beziehungsweise Demodulationsindex und die Phase in einer komplexen Größe vereinen und nach der Referenzierung (siehe Abschnitt 3.4) den normierten komplexen Übertragungsfunktionen aus Abschnitt 2.2.2 bei einer bestimmten Modulationsfrequenz entsprechen.

3.4 Referenzierung im Frequenzbereich

Analog zur Referenzierung im Zeitbereich, bei der durch Entfaltung die Impulsantwort des Messsystems, bestehend aus optischer Anregung und Detektion, herausgerechnet wird, geschieht die Referenzierung im Frequenzbereich durch komplexe Division der Zeiger (siehe Gleichung (3.14)) der Lumineszenz $p_{em}(\omega)$ und der optischen Anregung $p_{exc}(\omega)$

$$p(\omega) = \frac{p_{\text{em}}(\omega)}{p_{\text{exc}}(\omega)}. \quad (3.15)$$

Dabei werden die Demodulationsindizes durcheinander dividiert und die Phasen subtrahiert. Da sowohl die Detektion der Lumineszenz als auch die der optischen Anregung durch dasselbe Messsystem charakterisiert ist, wird dessen systembedingte Modulationstiefe und Phasenverschiebung (einschließlich Signallaufzeiten) kompensiert.

Da die Modulationstiefe und Phasenverschiebung des Messsystems wellenlängenabhängig und somit für die Messung der Lumineszenz und optischen Anregung unterschiedlich sein können (siehe Abschnitte 6.1 und 6.3 sowie [27, 80, 48]), ist es zweckmäßig, in einem ähnlichen Wellenlängenbereich zu referenzieren. Mit der Referenzmessung eines Luminophors $p_{\text{ref}}(\omega)$, das ein Zweiniveausystem mit einer einzelnen bekannten Abklingzeit τ_{ref} darstellt und dessen normierte Übertragungsfunktion $H_{\text{ref},n}(i\omega)$ ist (siehe Gleichung (2.8)), lässt sich die unbekannte lumineszierende Probe mit

$$p(\omega) = H_{\text{ref},n}(i\omega) \frac{p_{\text{em}}(\omega)}{p_{\text{ref}}(\omega)} = \frac{1}{1 + i\omega\tau_{\text{ref}}} \cdot \frac{p_{\text{em}}(\omega)}{p_{\text{ref}}(\omega)} \quad (3.16)$$

referenzieren.

3.5 Anpassungsmethoden und Interpretation der Abklingzeiten

In vorliegender Arbeit werden bildgebende Messungen homogener Proben im Frequenzbereich vorgestellt. Mit Hilfe der numerischen harmonischen Analyse als trigonometrische Interpolation werden die Phase und der Demodulationsindex pixelweise berechnet. Durch anschließende Mittelwertbildung wird eine einzelne Phasen- und Demodulationsabklingzeit beziehungsweise ein mittlerer Zeiger ermittelt (siehe Abschnitt 6.3). Ergänzend sollen im Folgenden weitere Methoden zur Abklingzeitbestimmung und Analyse heterogener (mehrere Komponenten verschiedener Abklingzeit), strukturierter Proben genannt werden.

Das Verfahren der numerischen harmonischen Analyse entspricht der in [3] untersuchten Methode des Fourier-basierten Sinus-Schätzers. Des weiteren untersucht [3] einen iterativen Sinus-Schätzer mittels Newton-Verfahren sowie einen linearisierten Sinus-Schätzer. Ein Anpassungsverfahren mittels nichtlinearer Regression, deren zu minimierende Fehlerfunktion die Abweichungen der Phase und des Demodulationsindex einbezieht, wird in [74] gezeigt.

Eine globale Analyse aller Bildpunkte zur Bestimmung der in der Probe vorkommenden Komponenten ist in [81] zu finden. Diesem Anpassungsverfahren unterliegt die Annahme, dass im gesamten Bild eine begrenzte Anzahl verschiedener Abklingzeitkomponenten vorkommt.

In den Arbeiten [82, 75, 25] wird mit Hilfe von Momenten ein (exakter) Lösungsweg zur Abklingzeitbestimmung N unabhängiger Komponenten in einer heterogenen Probe aus Messungen bei N verschiedenen Modulationsfrequenzen gezeigt.

Im Zeitbereich gibt es zur Abklingzeitbestimmung einer einzelnen Komponente die Methode „*rapid lifetime determination*“ aus Abschnitt 3.3.1 sowie die nichtlineare Regression zur Anpassung einer oder mehrerer Abklingzeiten an die gemessene Impulsantwort [4]. Ein Verfahren zur globalen Analyse der Bilddaten und Abklingzeitbestimmung zeigt [60] und basiert auf Segmentation.

Die im Frequenzbereich durch die verschiedenen Methoden gewonnenen Werte der Phasen und Demodulationsindizes können mit den Gleichungen (2.12) und (2.11) in Phasen- und Modulationsabklingzeiten τ_ϕ und τ_m umgerechnet werden. Jedoch liefern sie nur im Fall eines Einkomponentensystems denselben Wert; in allen anderen Fällen, wie additive Mischungen unabhängiger Komponenten oder durch Energietransfer gekoppelte Systeme, sind sie in der Regel ungleich und erlauben kaum eine Aussage über das untersuchte System, ohne Informationen über dessen Beschaffenheit zu haben (vergleiche [48]). Bei komplexeren Systemen ist es sinnvoll, den Frequenzgang der gemessenen Phase und des Demodulationsindex – im Gegensatz zu den bereits durch τ_ϕ und τ_m interpretierten Werten – aufzunehmen und mit Modellen und deren Simulationen zu vergleichen (siehe Kapitel 4).

3.6 Optimale Modulationsfrequenz

Die Sensitivität der Detektion von Lumineszenzabklingzeiten im Frequenzbereich hängt von der Modulationsfrequenz ab. Eine zu geringe Modulationsfrequenz verursacht kaum eine Phasenverschiebung beziehungsweise eine Änderung im Demodulationsindex. Eine zu hohe Modulationsfrequenz bewirkt, dass sich die Phase bereits asymptotisch einem Grenzwert nähert ($\phi = -90^\circ$ im Falle eines Zweiniveausystems) und der Demodulationsindex gegen null strebt (vergleiche Abschnitt 2.2.2 und Kapitel 4). Es gibt mehrere Ansätze zur Bestimmung der für die jeweilige Probe optimalen Modulationsfrequenz beziehungsweise Literaturangaben, auf die im Folgenden eingegangen wird.

3.6.1 Optimale Modulationsfrequenz für eine Komponente

In der Literatur wird teilweise zwischen der bezüglich der Phase und des Demodulationsindex optimierten Modulationsfrequenz unterschieden. Nach [3, 20] ist die für die Lumineszenzabklingzeit τ bezüglich der Phase optimale Modulationskreisfrequenz $\omega_\phi = \tau^{-1}$, während die bezüglich des Demodulationsindex $\omega_m = \sqrt{2}/\tau$ ist.

Ein Ansatz, der die Sensitivität anhand der Systembeschreibung in der komplexen Zahlenebene (siehe Abschnitt 2.2.2) formuliert, stammt aus [69]. Bezogen auf die normierte, komplexe Übertragungsfunktion einer Einzelkomponente $H_n(i\omega)$ aus

Gleichung (2.8) wird ein Radius $R(\omega, \tau)$ definiert, der eine Änderung des komplexen Wertes der Übertragungsfunktion durch τ in Abhängigkeit von ω beschreibt und mit

$$R^2(\omega, \tau) = \left(\frac{\partial}{\partial \tau} \Re \{H_n(i\omega, \tau)\} \right)^2 + \left(\frac{\partial}{\partial \tau} \Im \{H_n(i\omega, \tau)\} \right)^2 \quad (3.17)$$

gegeben ist. Es ergibt sich somit (Rechnung siehe Anhang A.3)

$$R(\omega, \tau) = \frac{\omega}{1 + \omega^2 \tau^2}. \quad (3.18)$$

Zur Bestimmung der optimalen Modulationskreisfrequenz wird die partielle Ableitung

$$\frac{\partial}{\partial \omega} R(\omega, \tau) = \frac{1 - \omega^2 \tau^2}{(1 + \omega^2 \tau^2)^2} \quad (3.19)$$

gebildet. Das Extremum liegt bei

$$\left. \frac{\partial}{\partial \omega} R(\omega, \tau) \right|_{\omega=\omega_0} = 0 \Rightarrow \omega_0 = \frac{1}{\tau} \quad (3.20)$$

und stellt mit

$$\left. \frac{\partial^2}{\partial \omega^2} R(\omega, \tau) \right|_{\omega=\omega_0=\frac{1}{\tau}} = -\frac{\tau}{2} < 0 \quad (3.21)$$

ein Maximum dar (Rechnung siehe Anhang A.3), so dass bei $\omega = \tau^{-1}$ die Sensitivität am größten ist und obig erwähntem Wert ω_ϕ entspricht. Dieselbe Rechnung führt in [69] jedoch zu einem fehlerhaften Ergebnis ($\omega_0 = 1/(\sqrt{3}\tau)$). Für ein Einkomponentensystem beträgt die Phasenverschiebung nach Gleichung (2.12) $\phi(\omega_0) = -\pi/4$.

Zur Veranschaulichung des dreidimensionalen Graphen von $R(\omega, \tau)$ wird mit $T = \tau/\tau_0$, $\Omega = \omega/\omega_0$ sowie $\omega_0 \tau_0 = 1$ die normierte Form

$$\frac{R(\Omega, T)}{\omega_0} = \frac{\Omega}{1 + \Omega^2 T^2} \quad (3.22)$$

gebildet. Dabei ist ω_0 die optimale Modulationskreisfrequenz und τ_0 eine Bezugsabklingzeit. Abbildung 3.7 zeigt die Abhängigkeit der normierten Sensitivität $R(\Omega, T)/\omega_0$ von T und Ω .

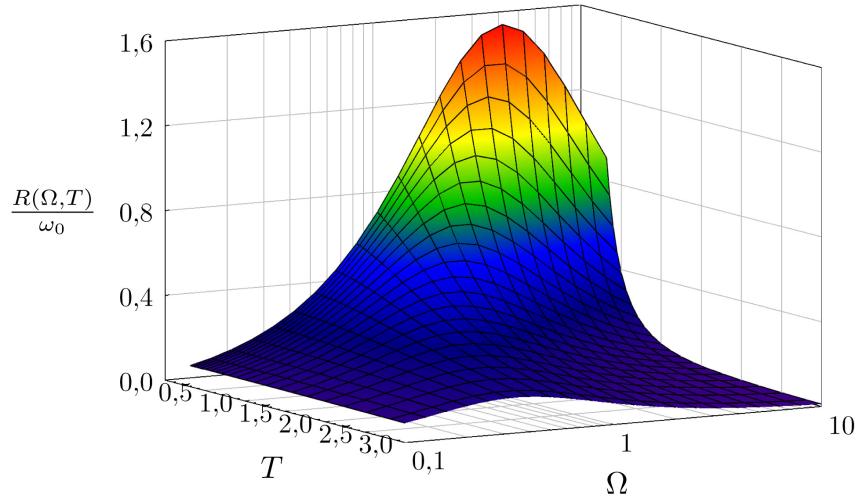


Abbildung 3.7: Normierte Darstellung der Sensitivität $R(\Omega, T)/\omega_0$ in Abhängigkeit von $T = \tau/\tau_0$ und $\Omega = \omega/\omega_0$, bezogen auf die optimale Modulationskreisfrequenz ω_0 und eine Bezugsabklingzeit τ_0 .

3.6.2 Optimale Modulationsfrequenz für zwei Komponenten

Für zwei Komponenten mit den Lumineszenzabklingzeiten τ_1 und τ_2 gelten bei zu niedrigen und zu hohen Modulationsfrequenzen dieselben Grenzwerte wie in Abschnitt 3.6. Die Idee aus [36], den Differenzbetrag zwischen den normierten, komplexen Übertragungsfunktionen $H_{1,n}(i\omega)$ und $H_{2,n}(i\omega)$ aus Gleichung (2.8) bezüglich der Modulationsfrequenz zu maximieren, wird hier aufgegriffen und fortgeführt. Der Differenzbetrag ergibt sich zu

$$r(\omega) = |H_{1,n}(i\omega) - H_{2,n}(i\omega)| = \frac{a\omega}{\sqrt{1 + b\omega^2 + c\omega^4}} \quad (3.23)$$

mit $a = \tau_2 - \tau_1$, $b = \tau_1^2 + \tau_2^2$ und $c = \tau_1^2\tau_2^2$ (Rechnung siehe Anhang A.4). Die Funktion

$$r^2(\omega) = \frac{a^2\omega^2}{1 + b\omega^2 + c\omega^4} \quad (3.24)$$

soll maximiert werden. Es ist

$$\frac{d}{d\omega} r^2(\omega) = \frac{2a^2\omega(1 - c\omega^4)}{(1 + b\omega^2 + c\omega^4)^2} \quad (3.25)$$

und ergibt für die Extrema

$$\left. \frac{d}{d\omega} r^2(\omega) \right|_{\omega=\omega_{\text{opt}}} = 0 \Rightarrow \omega_1 = 0, |\omega_{2,3,4,5}| = \sqrt[4]{\frac{1}{c}} = \frac{1}{\sqrt{\tau_1\tau_2}} = \frac{1}{\bar{\tau}_{\text{geom}}} \quad (3.26)$$

mit dem geometrischen Mittelwert $\bar{\tau}_{\text{geom}}$ der Lumineszenzabklingzeiten τ_1 und τ_2 . Mit

$$\left. \frac{d^2}{d\omega^2} r^2(\omega) \right|_{\omega=\omega_{\text{opt}}=\frac{1}{\bar{\tau}_{\text{geom}}}} = \frac{-2a^2}{\left(\frac{b}{\sqrt{c}} + 2\right)^2} < 0 \quad (3.27)$$

ist bei $\omega_{\text{opt}} = \bar{\tau}_{\text{geom}}^{-1}$ der Differenzbetrag $r(\omega_{\text{opt}})$ maximal (Rechnung siehe Anhang A.4), so dass eine bestmögliche Trennung von τ_1 und τ_2 erreicht werden kann.

3.7 Nyquist-Diagramm

Es existieren verschiedene Möglichkeiten zur grafischen Darstellung der komplexen Übertragungsfunktionen aus Abschnitt 2.2.2 und Kapitel 4. Neben dem Bode-Diagramm [32], das den Frequenzgang des Betrags und der Phase separat darstellt, gibt es die Möglichkeit der parametrischen Darstellung in der komplexen Zahlenebene mit der (Kreis-) Frequenz als Parameter: die Ortskurve beziehungsweise das Nyquist-Diagramm. Das Nyquist-Diagramm ähnelt dem durch konforme Abbildung konstruierten Smith-Diagramm, das zur Darstellung von Streuparametern in der Hochfrequenztechnik verwendet wird [40].

Trotz dieser bestehenden Definitionen finden in der Literatur für diese Art der Darstellung Begriffe wie „*Phasor Plot*“ (Zeigerdiagramm) [42, 15, 28], „*AB-Plot*“ [36, 37, 12] oder „*Polar Plot*“ [68] Verwendung.

Zur Darstellung der normierten Übertragungsfunktion eines Zweiniveausystems aus Gleichung (2.8) im Nyquist-Diagramm wird zur Veranschaulichung des Kurvenverlaufes die skalierte Form der Übertragungsfunktion

$$H_a(i\Omega) = \frac{a}{1 + i\omega\tau} = \frac{a}{1 + i\Omega} = \frac{a}{1 + \Omega^2} - i \frac{a\Omega}{1 + \Omega^2} \quad (3.28)$$

mit der normierten Kreisfrequenz $\Omega = \omega\tau$ und $a = 1$ beziehungsweise $a = f_j$ (siehe Abschnitt 2.3) verwendet. Da das Zweikomponentensystem einen Tiefpass darstellt (siehe Abschnitt 4.1), verzögert es die Phase, so dass sie negativ beziehungsweise null ist (siehe Gleichung (2.12)). Somit tragen die in vorliegender Arbeit gezeigten Nyquist-Diagramme die Phase vorzeichenrichtig auf. In der Literatur dagegen wird die Phase meist positiv dargestellt.

Mit den Substitutionen $x = a(1 + \Omega^2)^{-1}$ und $y = -a\Omega(1 + \Omega^2)^{-1}$ erfüllt

$$\left(x - \frac{a}{2}\right)^2 + y^2 = \left(\frac{a}{2}\right)^2 \quad (3.29)$$

die parametrische Form einer Kreisgleichung und stellt einen Halbkreis mit dem Radius $a/2$ beziehungsweise dem Durchmesser a und dem Mittelpunkt $a/2 + i0$ dar [2]. Da $x \geq 0$ und $y \leq 0$ ist, liegt der Halbkreis im vierten Quadranten der komplexen Ebene. Der Halbkreis geht somit durch folgende Punkte: $a + i0$ für $\Omega = 0$, $a/2 + ia/2$ für $\Omega = 1$ und $0 + i0$ für $\Omega = \infty$ als Grenzwert. Abbildung 3.8 zeigt das Nyquist-Diagramm der mit a skalierten Übertragungsfunktion eines Zweiniveausystems.

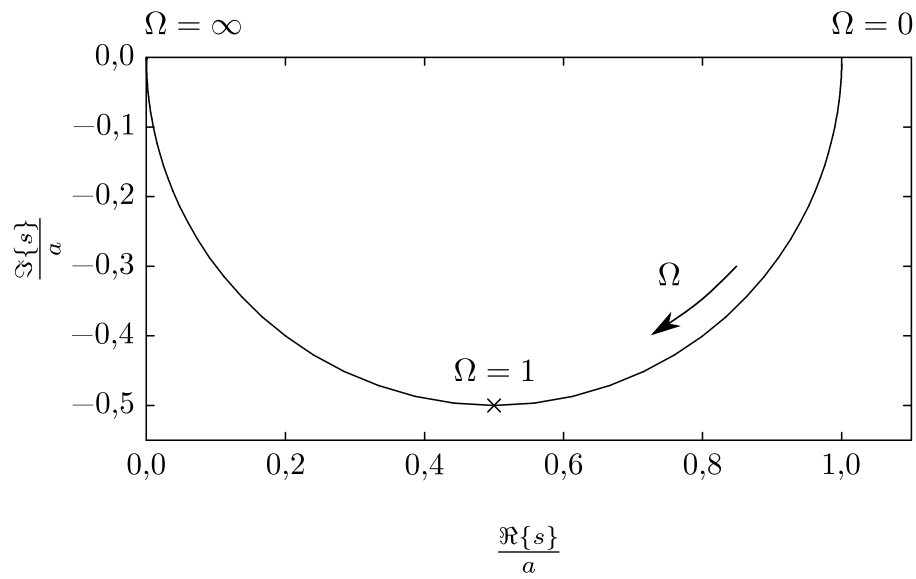


Abbildung 3.8: Nyquist-Diagramm eines Zweiniveausystems mit der Skalierung a seiner normierten Übertragungsfunktion

4 Modellierung der Lumineszenzdynamik mit elektrischen Ersatzschaltungen

Im Folgenden sollen die Lumineszenzdynamik und bestehende theoretische Grundlagen von einer anderen Seite her betrachtet werden. Aufgrund der Analogie zwischen der Lumineszenzdynamik und dem Zeit- und Frequenzverhalten elektrischer Schaltungen werden mit Hilfe elektrotechnischer Methoden Ersatzschaltungen erstellt, die Modelle des Lumineszenzverhaltens verschiedener Proben darstellen. Der große Vorteil besteht darin, dass umfangreiche Methoden und Werkzeuge für das Erstellen, die Analyse und Simulation elektrischer Schaltungen seit langem zur Verfügung stehen. An dieser Stelle sei beispielsweise die Software SPICE (*simulation program with integrated circuit emphasis*) genannt, mit der sich solche Simulationen im Zeit- und Frequenzbereich durchführen lassen. So können lumineszente Systeme durch elektrische Ersatzschaltungen nachempfunden und intuitiver tieferes Verständnis über sie erlangt werden. Anhand der festgestellten Charakteristika lassen sich die Parameter der Messungen an realen Proben entsprechend anpassen, um sie bestmöglich zu erfassen und beschreiben zu können. Die Messmethodik mit der in vorliegender Arbeit entwickelten Lumineszenzabklingzeitkamera (siehe Kapitel 5) ist – zusammen mit einer harmonisch modulierten Lichtquelle – mit einem komplexen Netzwerkanalysator, wie er zur Charakterisierung unbekannter, frequenzabhängiger elektrischer Schaltungen eingesetzt wird [39], vergleichbar.

Zur Modellierung wird ein vereinfachtes Energieniveauschema aus Kapitel 2 aufgegriffen. Die Energieniveaus bestehen aus dem Grundzustand und angeregten Zuständen, die durch optische Anregung aus dem Grundzustand bevölkert werden. Übergangsraten, die Übergangswahrscheinlichkeiten darstellen, und Dichten der Zustände charakterisieren die Übergänge zwischen den Energieniveaus sowohl im statischen als auch dynamischen Fall [48].

Analog zur Laserphysik werden die Dichten durch die Größe n [m^{-3}], die optische Anregung durch die Pumprate P [$\text{m}^{-3}\text{s}^{-1}$] und die Übergangsraten durch Γ, k [s^{-1}] beschrieben [47]. Es wird vorausgesetzt, dass die Dichte im Grundzustand groß gegenüber der in den angeregten Zuständen ist und der Grundzustand durch die Pumprate nicht wesentlich entvölkert werden kann. Die Lumineszenzintensität ist proportional zur Dichte des angeregten Zustands $n(t)$ mit der Rate Γ [s^{-1}] als Pro-

portionalitätsfaktor.

Die im Nachfolgenden formulierten Ratengleichungen stellen Differentialgleichungen dar, die sich mit Hilfe elektrotechnischer Methoden in Übertragungsfunktionen überführen lassen. Die Differentialgleichungen werden im Laplace-Bereich in Übertragungsfunktionen, die das Verhältnis der Lumineszenz- zur Anregungsintensität formulieren, umgeformt und mit den Übertragungsfunktionen einer äquivalenten Ersatzschaltung, bestehend aus Stromquellen, Widerständen und Kondensatoren, verglichen und die entsprechenden Bauteilwerte abgeleitet [58].

4.1 Zweiniveausystem

4.1.1 Strahlender Übergang

Das Zweiniveausystem besitzt das einfachste Energieniveauschema und besteht aus dem Grundzustand und dem angeregten Zustand. In Abbildung 4.1 wird der angeregte Zustand mit der Dichte n ausschließlich strahlend mit der Rate Γ desaktiviert.

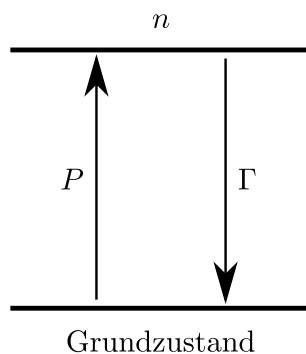


Abbildung 4.1: Energieniveauschema eines Zweiniveausystems mit strahlendem Übergang. P ist die Pumprate der Anregung, n die Dichte des angeregten Zustands und Γ die Rate der strahlenden Desaktivierung.

Die zugehörige Ratengleichung ist im Zeitbereich

$$\frac{dn(t)}{dt} = -\Gamma n(t) + P(t) \quad (4.1)$$

und stellt eine lineare, gewöhnliche Differentialgleichung dar. Sie kann mit Hilfe des Differentiationsatzes der Laplace-Transformation [8] im Laplace-Bereich formuliert werden:

$$s\underline{n}(s) = -\Gamma\underline{n}(s) + \underline{P}(s). \quad (4.2)$$

Die Übertragungsfunktion als Verhältnis der Lumineszenzintensität $\Gamma\underline{n}(s)$ zur Anregung $\underline{P}(s)$ ist

$$H(s) = \frac{\Gamma \underline{n}(s)}{\underline{P}(s)} = \frac{1}{1 + \frac{s}{\Gamma}} = \frac{1}{1 + s\tau} \quad (4.3)$$

mit der Zeitkonstanten beziehungsweise Abklingzeit $\tau = \Gamma^{-1}$. Bei einem eingeschwingenen System ($\sigma = 0$ und $s = i\omega$) vermindert sich der Betrag der Übertragungsfunktion mit steigender Frequenz. Die Frequenz, bei der sich der Betrag um den Faktor $\sqrt{2} \approx 3$ dB vermindert, wird als Grenz- oder Eckfrequenz bezeichnet [72, 32]. Es handelt sich um ein Tiefpasssystem erster Ordnung.

Abbildung 4.2 zeigt das zugehörige elektrische Ersatzschaltbild mit den entsprechenden Impedanzen im Laplace-Bereich [58]. Die Pumprate wird durch die Stromquelle $\underline{I}_{\text{exc}}$ modelliert, die Impedanzen R und $1/(sC)$ bilden einen frequenzabhängigen Stromteiler, wobei der elektrische Strom \underline{I} durch den Widerstand R die Lumineszenz repräsentiert.

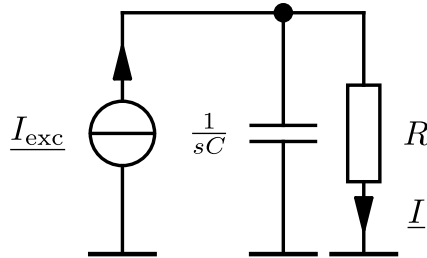


Abbildung 4.2: Elektrisches Ersatzschaltbild des Zweiniveausystems mit strahlendem Übergang im Laplace-Bereich. $\underline{I}_{\text{exc}}$ ist die Stromquelle äquivalent zur optischen Anregung, R und $1/(sC)$ sind die Impedanzen, die einen frequenzabhängigen Stromteiler bilden. Der Strom \underline{I} durch den Widerstand R repräsentiert die Lumineszenz.

Die Übertragungsfunktion der elektrischen Ersatzschaltung ist

$$G(s) = \frac{\underline{I}(s)}{\underline{I}_{\text{exc}}(s)} = \frac{1}{1 + sRC}. \quad (4.4)$$

Durch Koeffizientenvergleich mit Gleichung (4.3) ergibt sich für die Zeitkonstante $\tau = RC = \Gamma^{-1}$. Mit der Festlegung des Wertes des Widerstands R lässt sich die zugehörige Kapazität C berechnen.

4.1.2 Strahlender und strahlungsloser Übergang

Ein Zweiniveausystem, das zusätzlich zur strahlenden Desaktivierung des angeregten Zustands eine strahlungslose aufweist [42], ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Die Rate der strahlungslosen Desaktivierung ist k_{nr} .

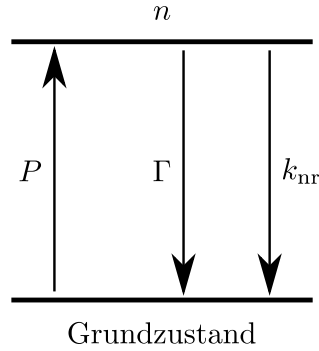


Abbildung 4.3: Energieniveauschema eines Zweiniveausystems mit strahlendem und strahlungslosem Übergang. P ist die Pumprate der Anregung, n die Dichte des angeregten Zustands, Γ die Rate der strahlenden und k_{nr} die der strahlungslosen Desaktivierung.

Die Ratengleichung ist im Zeitbereich

$$\frac{dn(t)}{dt} = -\gamma n(t) + P(t) \quad (4.5)$$

mit $\gamma = \Gamma + k_{nr}$. Mit der Beschreibung im Laplace-Bereich

$$s\underline{n}(s) = -\gamma\underline{n}(s) + \underline{P}(s) \quad (4.6)$$

ergibt sich die Übertragungsfunktion

$$H(s) = \frac{\Gamma\underline{n}(s)}{\underline{P}(s)} = \frac{1}{1 + \frac{k_{nr}}{\Gamma}} \cdot \frac{1}{1 + \frac{s}{\Gamma + k_{nr}}} = \frac{1}{1 + \frac{k_{nr}}{\Gamma}} \cdot \frac{1}{1 + s\tau} \quad (4.7)$$

mit der Abklingzeit $\tau = (\Gamma + k_{nr})^{-1}$. Im Fall der rein strahlenden Desaktivierung ($k_{nr} = 0$) ist $\tau = \tau_0 = \Gamma^{-1}$ und somit mit der Abklingzeit aus Abschnitt 4.1.1 identisch. Der frequenzunabhängige, erste Term ist eins. Mit $k_{nr} > 0$ verringert sich die Abklingzeit, und der frequenzunabhängige Term ist kleiner als eins: die statische Lumineszenzintensität verringert sich.

Abbildung 4.4 zeigt das zugehörige Ersatzschaltbild. Die strahlungslose Desaktivierung erfolgt durch den zusätzlichen Widerstand R_{nr} .

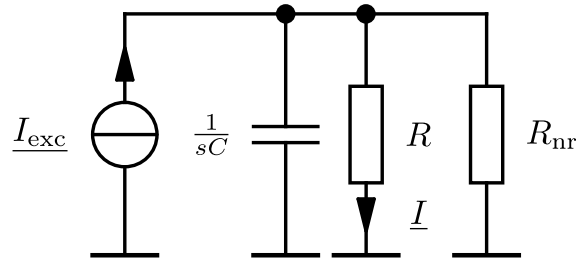


Abbildung 4.4: Elektrisches Ersatzschaltbild des Zweiniveausystems mit strahlendem und strahlungslosem Übergang im Laplace-Bereich. I_{exc} ist die Stromquelle äquivalent zur optischen Anregung, R , R_{nr} und $1/(sC)$ sind die Impedanzen, die einen frequenzabhängigen Stromteiler bilden. Der Strom I durch den Widerstand R repräsentiert die Lumineszenz.

Die Übertragungsfunktion der elektrischen Ersatzschaltung ist

$$G(s) = \frac{\underline{I}(s)}{\underline{I}_{\text{exc}}(s)} = \frac{1}{1 + \frac{R}{R_{\text{nr}}}} \cdot \frac{1}{1 + s \frac{RR_{\text{nr}}}{R+R_{\text{nr}}} C}. \quad (4.8)$$

Durch Koeffizientenvergleich mit Gleichung (4.7) errechnet sich die Zeitkonstante zu $\tau = \frac{RR_{\text{nr}}}{R+R_{\text{nr}}} C$. Mit Festlegung des Widerstandswertes für R errechnen sich die restlichen Bauteilwerte zu

$$R_{\text{nr}} = \frac{\Gamma}{k_{\text{nr}}} R \quad (4.9)$$

und

$$C = \frac{R + R_{\text{nr}}}{RR_{\text{nr}}(\Gamma + k_{\text{nr}})}. \quad (4.10)$$

Die Reduktion der statischen Lumineszenzintensität durch den frequenzunabhängigen Term der Übertragungsfunktionen $H(s)$ beziehungsweise $G(s)$ hat keinen Einfluss auf die Größe des Modulationsindex (Gleichung (2.9)), da dieser Term durch Normierung (siehe Gleichung (2.7)) entfällt.

4.2 Lumineszenzlöschung

Die dynamische Lumineszenzlöschung aus Abschnitt 2.4.1 kann mit Hilfe des Modells aus Abschnitt 4.1.2 dargestellt werden. Dabei ist die Rate der strahlungslosen Desaktivierung $k_{\text{nr}} = k_{\text{q}} [\text{Q}]$.

Das statische Intensitätsverhältnis der Lumineszenz ($k_{\text{nr}} > 0$ bezogen $k_{\text{nr}} = 0$) führt zu der Stern-Volmer-Gleichung (siehe Gleichung (2.20))

$$\frac{|H_{k_{\text{nr}}=0}(0)|}{|H_{k_{\text{nr}}>0}(0)|} = 1 + \frac{k_{\text{nr}}}{\Gamma} = 1 + k_{\text{q}} [\text{Q}] \tau_0 = 1 + K_{\text{SV}} [\text{Q}]. \quad (4.11)$$

Das Verhältnis der Abklingzeiten für die Fälle $k_{nr} > 0$ und $k_{nr} = 0$ führt zu demselben Ergebnis:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + \frac{k_{nr}}{\Gamma} = 1 + K_{SV} [Q]. \quad (4.12)$$

4.3 Zweikomponentensystem

Ein Zweikomponentensystem entsteht aus der additiven Überlagerung zweier Zweiniveausysteme. Die systemtheoretische Überlagerung beider Komponenten (Linearität [32]) mit den normierten Übertragungsfunktionen $H_{1,n}(s)$, $H_{2,n}(s)$ und den relativen Intensitäten f_1 , f_2 ist in Abbildung 4.5 dargestellt.

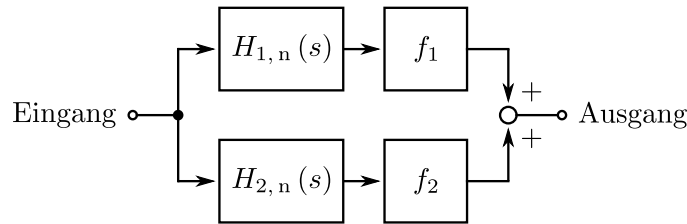


Abbildung 4.5: Additive Überlagerung zweier Zweiniveausysteme mit den normierten Übertragungsfunktionen $H_{1,n}(s)$ und $H_{2,n}(s)$ sowie den relativen Intensitäten f_1 und f_2 .

Die resultierende Übertragungsfunktion ergibt sich mit den Gleichungen (2.17) und (4.3) sowie mit $N = 2$ und $f_1 + f_2 = 1$ zu

$$H_{N=2,n}(s) = f_1 H_{1,n}(s) + f_2 H_{2,n}(s) = \frac{1 + s(f_1 \tau_2 + f_2 \tau_1)}{(1 + s\tau_1)(1 + s\tau_2)}. \quad (4.13)$$

$H_{N=2,n}(s)$ liegt ebenfalls in der normierten Form vor, so dass $H_{N=2,n}(0) = 1$ ist. Wie in Abschnitt 4.1.1 lassen sich die Impedanzen des elektrischen Ersatzschaltbildes der einzelnen Komponenten berechnen: $\tau_1 = R_1 C_1$ und $\tau_2 = R_2 C_2$.

Im Folgenden wird der eingeschwungene Zustand betrachtet ($s = i\omega$), und es sei $\tau_2 \ll \tau_1$. Für den Fall, dass $\omega\tau_2 \ll 1$ ist, ergibt sich die Übertragungsfunktion

$$H_{N=2,n}(i\omega) \approx f_2 + \frac{f_1}{1 + i\omega\tau_1}. \quad (4.14)$$

Somit ist die Komponente 1 dominant. Das Nyquist-Diagramm (siehe Abschnitt 3.7) beschreibt einen Halbkreis mit dem Durchmesser f_1 , der um f_2 im Realteil verschoben ist. Für den Fall, dass $\omega\tau_1 \gg 1$ ist, ergibt sich die Übertragungsfunktion

$$H_{N=2,n}(i\omega) \approx \frac{f_2}{1 + i\omega\tau_2}. \quad (4.15)$$

Die Komponente 2 ist dominant und beschreibt im Nyquist-Diagramm einen Halbkreis mit dem Durchmesser f_2 durch den Ursprung.

In Abbildung 4.6 ist das Nyquist-Diagramm eines Zweikomponentensystems mit den relativen Intensitäten $f_1 = 0,3$, $f_2 = 0,7$ und verschiedenen Verhältnissen von τ_1 zu τ_2 dargestellt. Der obig beschriebene Fall $\tau_2 \ll \tau_1$ wird durch die Kurve e beschrieben.

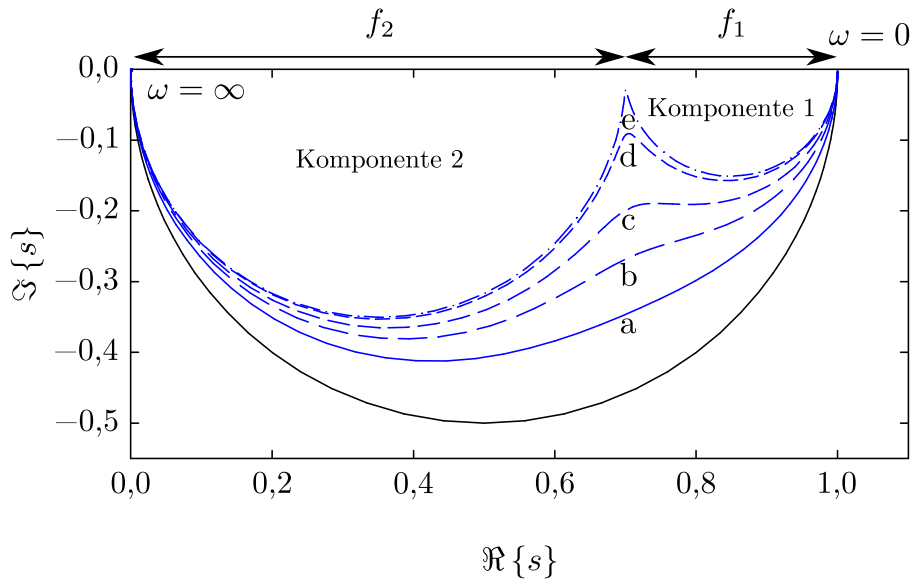


Abbildung 4.6: Nyquist-Diagramm eines Zweikomponentensystems mit den relativen Intensitäten $f_1 = 0,3$ und $f_2 = 0,7$ mit a: $\tau_1 = 5\tau_2$, b: $\tau_1 = 10\tau_2$, c: $\tau_1 = 20\tau_2$, d: $\tau_1 = 100\tau_2$ und e: $\tau_1 = 1000\tau_2$

4.4 FRET-System

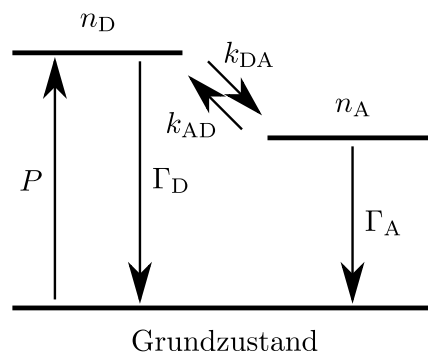


Abbildung 4.7: Energieniveauschema eines FRET-Systems bestehend aus Donor (D) und Akzeptor (A). P ist die Pumprate der Anregung, n_D und n_A sind die Dichten der angeregten Zustände, Γ_D und Γ_A die Raten der strahlenden Desaktivierung, k_{DA} und k_{AD} die Raten des reversiblen Energietransfers zwischen Donor und Akzeptor.

Ein Modell, das den Förster-Resonanzenergietransfer (FRET, siehe Abschnitt 2.4.2) beschreibt, wird im Folgenden entwickelt. Das Ratenmodell ist an [50, 49] angelehnt und das Energieniveauschema in Abbildung 4.7 dargestellt.

Zur Vereinfachung absorbiert nur der Donor (D) die optische Anregung P und gibt seine Energie teilweise an den Akzeptor (A) ab. Γ_D und Γ_A sind die Raten der strahlenden Desaktivierung der angeregten Zustände mit den Dichten n_D und n_A des Donors, respektive Akzeptors. Die Raten k_{DA} und k_{AD} beschreiben den (reversiblen) Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor.

Die Ratengleichungen im Zeitbereich für die beiden angeregten Zustände sind

$$\frac{dn_D(t)}{dt} = -(\Gamma_D + k_{DA})n_D(t) + k_{AD}n_A(t) + P(t) \quad (4.16)$$

und

$$\frac{dn_A(t)}{dt} = -(\Gamma_A + k_{AD})n_A(t) + k_{DA}n_D(t). \quad (4.17)$$

Im Laplace-Bereich lauten sie

$$s\underline{n}_D(s) = -(\Gamma_D + k_{DA})\underline{n}_D(s) + k_{AD}\underline{n}_A(s) + \underline{P}(s) \quad (4.18)$$

sowie

$$s\underline{n}_A(s) = -(\Gamma_A + k_{AD})\underline{n}_A(s) + k_{DA}\underline{n}_D(s) \quad (4.19)$$

und lassen sich in die Übertragungsfunktionen der Donorkomponente

$$H_D(s) = \frac{\Gamma_D \underline{n}_D(s)}{\underline{P}(s)} = \Gamma_D \frac{s + \gamma_A}{\beta + \alpha s + s^2} \quad (4.20)$$

und der Akzeptorkomponente

$$H_A(s) = \frac{\Gamma_A \underline{n}_A(s)}{\underline{P}(s)} = \frac{\Gamma_A k_{DA}}{\beta + \alpha s + s^2} \quad (4.21)$$

mit den Substitutionen $\alpha = \Gamma_D + \Gamma_A + k_{DA} + k_{AD}$, $\beta = \Gamma_D \Gamma_A + \Gamma_A k_{DA} + \Gamma_D k_{AD}$ und $\gamma_A = \Gamma_A + k_{AD}$ umformen. Es wird vorausgesetzt, dass die Lumineszenz beider Komponenten spektral separierbar ist.

Die Übertragungsfunktionen $H_D(s)$ und $H_A(s)$ lassen sich im Zähler und Nenner mit Hilfe des Fundamentalsatzes der Algebra [8] in Linearfaktoren mit den Wurzeln s_N , s_{P_1} und s_{P_2} zerlegen:

$$H_D(s) = \Gamma_D \frac{s - s_N}{(s - s_{P_1})(s - s_{P_2})} \quad (4.22)$$

und

$$H_A(s) = \Gamma_A k_{DA} \frac{1}{(s - s_{P_1})(s - s_{P_2})}. \quad (4.23)$$

s_N ist die Nullstelle, s_{P_1} und s_{P_2} sind die Polstellen. Beide Übertragungsfunktionen $H_D(s)$ und $H_A(s)$ stellen ein Tiefpasssystem zweiter Ordnung dar, da der Nenner ein Polynom zweiten und somit höheren Grades als das Zählerpolynom ist [32]. Die Polstellen errechnen sich zu

$$\beta + \alpha s_P + s_P^2 = 0 \Leftrightarrow s_{P_{1,2}} = \frac{1}{2} \left(-\alpha \pm \sqrt{\alpha^2 - 4\beta} \right). \quad (4.24)$$

Da $\alpha^2 - 4\beta > 0$ ist (Herleitung siehe Anhang A.5), existieren zwei reelle Pole bei verschiedenen Eckfrequenzen und es tritt keine Resonanzüberhöhung (Vergrößerung des Betrags der Übertragungsfunktion bei der Eckfrequenz) auf [32]. Ferner ist aus Gleichung (4.24) ersichtlich, dass $s_{P_{1,2}} < 0$ ist. Die Nullstelle in Gleichung (4.22) ist $s_N = -\gamma_A$. Es lässt sich zeigen, dass $s_{P_2} < s_N < s_{P_1}$ gilt (Herleitung siehe Anhang A.6).

Abbildung 4.8 zeigt qualitativ die Lage der Pol- und Nullstellen in der komplexen Ebene. Die (positiven) Eckkreisfrequenzen, bei denen sich die Beträge der Linearfaktoren aus den Gleichungen (4.22) und (4.23) im eingeschwungenen Zustand ($s = i\omega$) im Vergleich zu $\omega = 0$ um den Faktor $\sqrt{2} \approx 3$ dB vergrößern, sind $\omega_{P_1} = |s_{P_1}|$, $\omega_{P_2} = |s_{P_2}|$ und $\omega_N = |s_N|$.

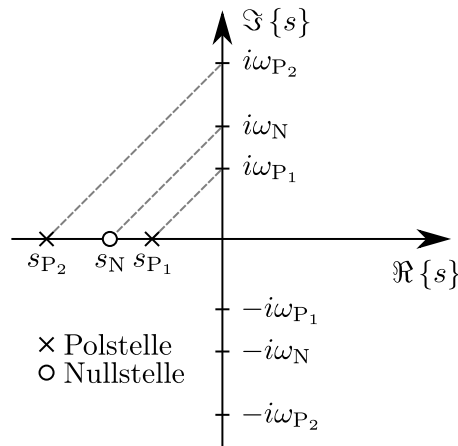


Abbildung 4.8: Pol-Nullstellen-Diagramm der Übertragungsfunktion $H_D(s)$ beziehungsweise $H_A(s)$. Die gestrichelten Linien repräsentieren die Vergrößerung der Beträge der Linearfaktoren aus den Gleichungen (4.22) und (4.23) um den Faktor $\sqrt{2}$ bei den entsprechenden Grenzkreisfrequenzen $\omega = \pm\omega_{P_1}$, $\omega = \pm\omega_N$ beziehungsweise $\omega = \pm\omega_{P_2}$ im Vergleich zu $\omega = 0$. Hierbei wird der eingeschwungene Zustand betrachtet und es gilt $s = i\omega$.

Für Frequenzen, die groß gegenüber den jeweiligen Eckfrequenzen sind, verursacht jede Polstelle in asymptotischer Darstellung ein Abfall des Amplitudenganges um -20 dB pro Frequenzdekade und eine Phasenverschiebung von -90° ; eine Nullstelle verursacht ein Ansteigen des Amplitudenganges um 20 dB pro Frequenzdekade und eine Phasenverschiebung von 90° [32]. Für hohe Frequenzen

zeigt demnach die Übertragungsfunktion der Akzeptorkomponente $H_A(i\omega)$ durch die beiden Polstellen im asymptotischen Fall einen Abfall des Amplitudenganges um -40 dB pro Frequenzdekade und eine Phasenverschiebung von -180° . Durch die zusätzliche Nullstelle zeigt die Übertragungsfunktion der Donorkomponente $H_D(i\omega)$ im asymptotischen Fall einen Abfall des Amplitudenganges um -20 dB pro Frequenzdekade und eine Phasenverschiebung von -90° .

Abbildung 4.9 zeigt das elektrische Ersatzschaltbild des FRET-Systems. Die Impedanzen $1/(sC_D)$, R_D und $1/(sC_A)$, R_A modellieren jeweils ein strahlendes Zweiveausystem des Donors, respektive Akzeptors. Der Widerstand R_{ET} modelliert die Energieübertragung zwischen Donor und Akzeptor.

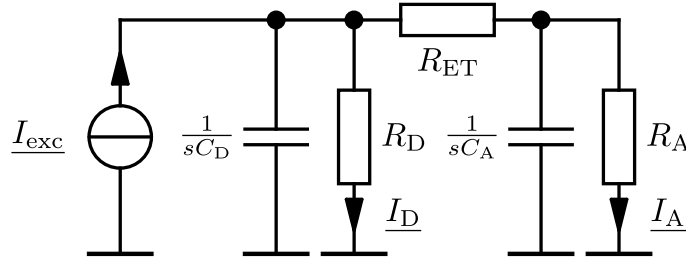


Abbildung 4.9: Elektrisches Ersatzschaltbild des FRET-Systems bestehend aus Donor (D) und Akzeptor (A) im Laplace-Bereich. I_{exc} ist die Stromquelle äquivalent zur optischen Anregung, I_D und I_A sind die Ströme, die die Donor- beziehungsweise Akzeptorlumineszenz repräsentieren. Der Widerstand R_{ET} modelliert die Energieübertragung zwischen Donor und Akzeptor.

Die zugehörigen elektrischen Übertragungsfunktionen sind

$$\begin{aligned}
 G_D(s) &= \frac{I_D(s)}{I_{exc}(s)} \\
 &= \frac{R_A + R_{ET}}{R_D + R_A + R_{ET}} \cdot \frac{1 + s \frac{R_A R_{ET} C_A}{R_A + R_{ET}}}{1 + s \frac{R_A R_{ET} C_A + R_D R_A C_D + R_D R_{ET} C_D + R_D R_A C_A}{R_D + R_A + R_{ET}} + s^2 \frac{R_D R_A R_{ET} C_D C_A}{R_D + R_A + R_{ET}}}
 \end{aligned} \tag{4.25}$$

und

$$\begin{aligned}
 G_A(s) &= \frac{I_A(s)}{I_{exc}(s)} \\
 &= \frac{R_D}{R_D + R_A + R_{ET}} \cdot \frac{1}{1 + s \frac{R_A R_{ET} C_A + R_D R_A C_D + R_D R_{ET} C_D + R_D R_A C_A}{R_D + R_A + R_{ET}} + s^2 \frac{R_D R_A R_{ET} C_D C_A}{R_D + R_A + R_{ET}}}
 \end{aligned} \tag{4.26}$$

Durch Koeffizientenvergleich der Übertragungsfunktion $H_D(s)$ aus Gleichung (4.20) mit $G_D(s)$ aus Gleichung (4.25) errechnen sich die Impedanzen zu (Zwischenrechnung siehe Anhang A.7)

$$R_D C_D = \frac{1}{\Gamma_D}, \quad (4.27)$$

$$R_{ET} = \frac{\Gamma_D}{k_{DA}} R_D, \quad (4.28)$$

$$R_A = \frac{k_{AD}}{\Gamma_A} R_{ET}, \quad (4.29)$$

$$C_A = \frac{1}{\Gamma_A R_A}. \quad (4.30)$$

Aus den Gleichungen (4.27) und (4.30) ist ersichtlich, dass die Zeitkonstanten $R_D C_D = \Gamma_D^{-1} = \tau_D$ und $R_A C_A = \Gamma_A^{-1} = \tau_A$ ohne energetische Kopplung ($R_{ET} = \infty$) den Abklingzeiten der einzelnen Komponenten aus Abschnitt 4.1.1 entsprechen.

Als anschauliches Beispiel seien in Tabelle 4.1 die Raten vorgegeben.

Rate	Wert
Γ_D	10^6 s^{-1}
Γ_A	$0,5 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$
k_{DA}	$0,5 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$
k_{AD}	$0,25 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$

Tabelle 4.1: Exemplarische Werte für die Raten eines FRET-Modells

Es ergeben sich die Abklingzeiten $\tau_D = 1 \mu\text{s}$ und $\tau_A = 2 \mu\text{s}$ des Donors beziehungsweise Akzeptors. Die zugehörigen Bauteilwerte des elektrischen Ersatzschaltbildes sind in Tabelle 4.2 aufgelistet, wobei $R_D = 50 \Omega$ festgelegt ist.

Bauteil	Wert
R_D	50Ω
R_A	50Ω
R_{ET}	100Ω
C_D	20 nF
C_A	40 nF

Tabelle 4.2: Zu Tabelle 4.1 zugehörige Bauteilwerte des FRET-Modells mit der Festlegung $R_D = 50 \Omega$

Das Bode-Diagramm in Abbildung 4.10 zeigt den Amplituden- und Phasengang der Übertragungsfunktionen $G_D(i f)$ und $G_A(i f)$. Für hohe Frequenzen sind die obig erwähnten asymptotischen Fälle der Amplituden- und Phasengänge ersichtlich.

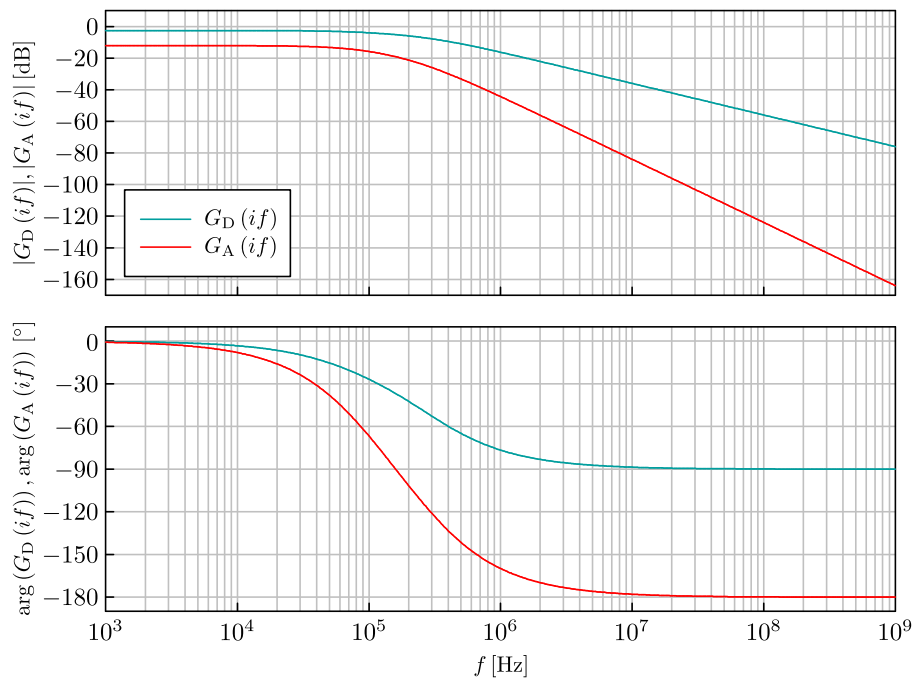


Abbildung 4.10: Bode-Diagramm der Übertragungsfunktionen $G_D(i f)$ und $G_A(i f)$ des exemplarischen FRET-Systems

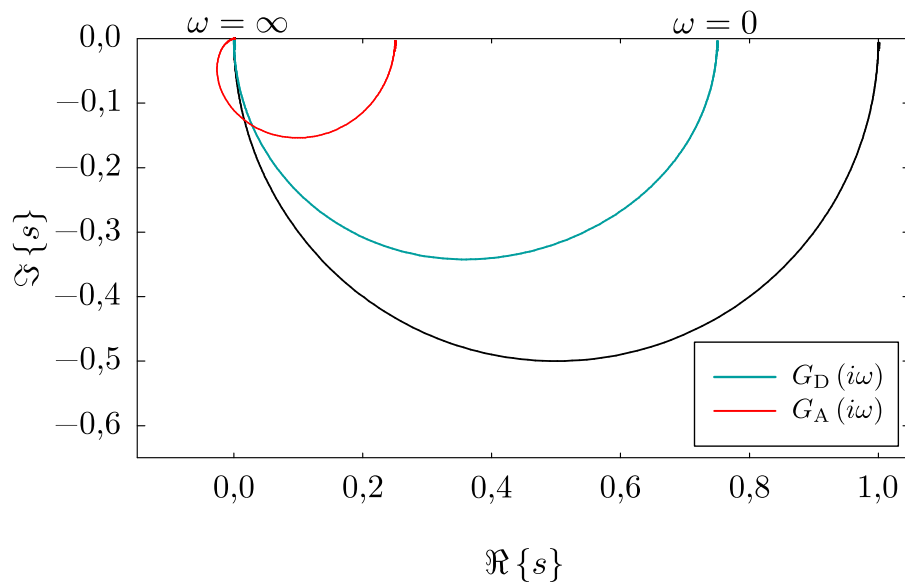


Abbildung 4.11: Nyquist-Diagramm der Übertragungsfunktionen $G_D(i \omega)$ und $G_A(i \omega)$ des exemplarischen FRET-Systems

Abbildung 4.11 zeigt das Nyquist-Diagramm derselben Übertragungsfunktionen. Sowohl im Bode- als auch im Nyquist-Diagramm ist erkennbar, dass die Beträge der Übertragungsfunktionen für gegen null gehende Frequenzen durch den Stromteiler R_D , R_{ET} , R_A kleiner als eins beziehungsweise 0 dB sind, in der Summe jedoch eins ergeben.

Abbildung 4.12 zeigt das Nyquist-Diagramm der normierten Übertragungsfunktionen $G_{D,n}(i\omega)$ und $G_{A,n}(i\omega)$. Durch die Normierung entspricht der Amplitudengang dem Demodulationsindex. Des weiteren ist ersichtlich, dass die Akzeptorübertragungsfunktion außerhalb des schwarz eingezeichneten Halbkreises eines Zweiniveausystems liegen kann, was in [36] formuliert wurde.

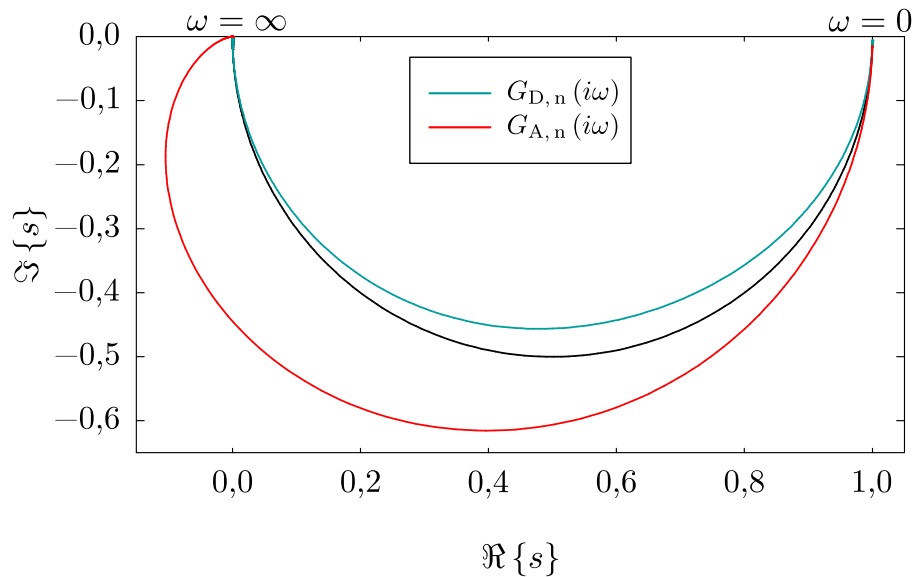


Abbildung 4.12: Nyquist-Diagramm der normierten Übertragungsfunktionen $G_{D,n}(i\omega)$ und $G_{A,n}(i\omega)$ des exemplarischen FRET-Systems

5 Entwicklung einer Lumineszenzabklingzeitkamera (FLICAM)

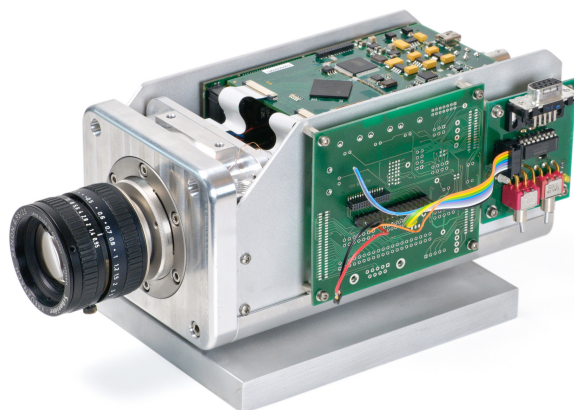


Abbildung 5.1: Prototyp der FLICAM

Im Nachfolgenden wird der Aufbau und die Entwicklung der für die Messungen zur Lumineszenzmodellierung verwendeten Lumineszenzabklingzeitkamera „FLICAM“ (*fluorescence lifetime imaging camera*, in Anlehnung an den in der Literatur gebräuchlichen englischen Begriff *fluorescence lifetime imaging microscopy*) erläutert. Im Rahmen der Kameraentwicklung wurde ein CMOS-basierter (CMOS: *complementary metal oxide semiconductor*), modulierbarer Bildsensor innerhalb eines Forschungsprojekts entworfen und gebaut, der auf dem Funktionsprinzip der Entfernungsmesskameras (TOF: *time of flight*) und der Kreuzkorrelationsdetektion beruht (siehe Abschnitt 3.3.2). Der Bildsensor besitzt 1024×1024 Bildpunkte mit je zwei Ladungstöpfen zur Demodulation, so dass die 0° - und 180° -Phaseninformation während der Belichtung mit sinusförmig moduliertem Licht alternierend aufintegriert werden kann. Nach erfolgter Belichtung eines solchen „Doppelbildes“ mit der 0° - und 180° -Phaseninformation wird der nächste Phasenschritt relativ zur Modulation der Lichtquelle ausgewählt und belichtet. In Abschnitt 3.2 ist das Funktionsprinzip näher beschrieben und illustriert. Die obere Grenzfrequenz der Demodulation ist mit 40 MHz spezifiziert. Die FLICAM beinhaltet sowohl die modulierbare Bildaufnahmeeinheit als auch einen Frequenzgenerator für extern anschließbare modulierbare

Lichtquellen.

Über einen C-Mount-Anschluss lässt sich die Kamera an beliebige optische Systeme (Objektive, Mikroskope, Endoskope etc.) ankopeln.

Die Kamera besitzt zur Bildübertragung und Kommunikation eine Camera Link[®]-Schnittstelle (Konfiguration *full*, mit einer Bandbreite von maximal 640 MByte/s) und unterstützt durch steckbare Schnittstellenkarten gebräuchliche Standards wie USB 2.0/3.0 (USB: *universal serial bus*) oder Gigabit-Ethernet (GigE). Die FLICAM ist vollständig in die PCO-Softwareumgebung (Kamerabediensoftware *pco.camware*, SDK: *software development kit*) integriert.

5.1 Kamerakonzzept

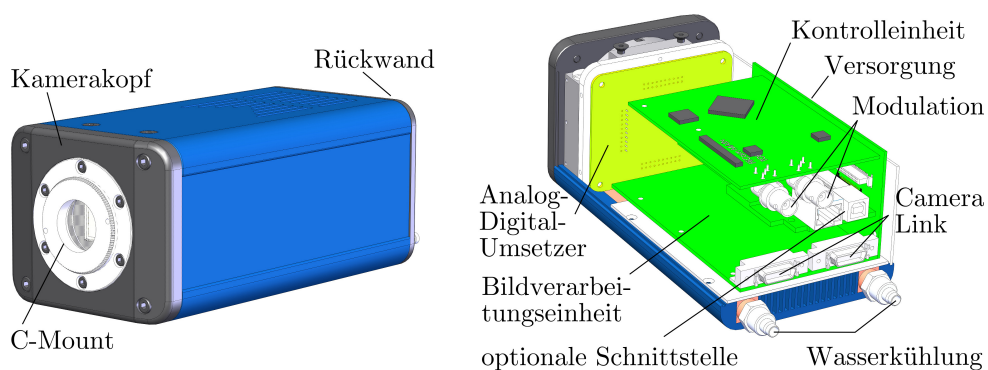


Abbildung 5.2: Konstruktionszeichnungen der FLICAM mit einigen ihrer Systemkomponenten, links: Ansicht von vorne, rechts: mechanische Anordnung der Leiterplatten und Anschlüsse

Abbildung 5.2 zeigt den mechanischen Aufbau der FLICAM mit dem Gehäusekonzept, dem Kamerakopf, der Leiterplattenanordnung sowie den elektrischen Anschlüssen.

Der für CMOS-Sensoren typische, temperaturabhängige Dunkelstrom [43] macht eine Kühlung und Temperierung des Bildsensors erforderlich, um den Dunkelstrom und das zugehörige Dunkelstromrauschen zu reduzieren. Der Bildsensor wird im Kamerakopf mit Hilfe eines Peltier-Elements gekühlt und der abgeführte Wärmestrom an das Gehäuse übertragen. Ein eingebauter Lüfter kühlt das Gehäuse mit der Umgebungsluft. Optional kann das Gehäuse über anschließbare Schläuche wassergekühlt werden.

Da die lichtempfindliche Fläche des Bildsensors mit den lateralen Abmessungen $5,73 \times 5,73 \text{ mm}^2$ verhältnismäßig klein ist, ist ein C-Mount-Anschluss mit einem freien Durchmesser von 25,4 mm vorgesehen, um die FLICAM abschattungsfrei an ein optisches System anzuschließen.

An der Kamerarückwand befinden sich Ein- und Ausgänge zur Modulation (BNC-

Buchsen), die beiden Buchsen der fest eingebauten Camera Link-Schnittstelle, eine weitere optionale Schnittstelle, ein Trigger-Anschluss zur optionalen Belichtungssteuerung und ein Anschluss für die Stromversorgung durch ein externes Netzteil.

5.2 Systemkomponenten

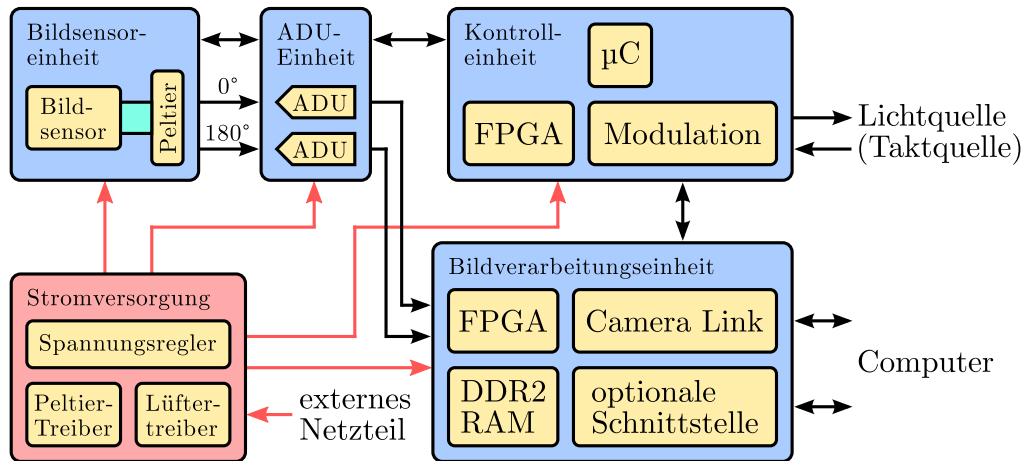


Abbildung 5.3: Systemkomponenten der FLICAM mit den Abkürzungen μC : Mikrocontroller und ADU: Analog-Digital-Umsetzer. Die Komponenten sowie die restlichen Abkürzungen werden im Text näher erläutert.

Abbildung 5.3 zeigt das Blockdiagramm der Systemkomponenten der FLICAM: Kontrolleinheit, Analog-Digital-Umsetzer, Bildsensoreinheit, Bildverarbeitungseinheit und Stromversorgung. Die Anordnung der Funktionsblöcke entspricht in etwa der Integration der Komponenten in die Kamera. Im Nachfolgenden werden die Systemkomponenten näher beschrieben.

5.2.1 Kontrolleinheit

Die Kontrolleinheit ist auf einer Leiterplatte untergebracht und hat folgende Aufgaben: Kommunikation mit einem Computer, Ablaufsteuerung der Bildaufnahme, Generierung der Modulation, bildsynchrones Phasenschieben der Modulation, Temperaturregelung des Bildsensors und Systemüberwachung (Temperaturgrenzwerte, elektrische Versorgungsspannungen).

Ein 32 Bit-Mikrocontroller (AVR32-Familie, Atmel) initialisiert alle Systemkomponenten und setzt die Kamera in einen bildaufnahme-fähigen Zustand. Die über die Schnittstelle empfangenen Befehle sind in einer Telegrammstruktur mit dem kodierten Kommando, entsprechenden Parametern und einer Prüfsumme organisiert. Mit ihnen lassen sich alle Kameraparameter wie Bildausschnitt, Belichtungszeit oder Pixelauslesefrequenz einstellen.

Die Bildsensortemperatur wird über ein per Pulsbreitenmodulation angesteuertes Peltier-Element mit Hilfe eines Software-PID-Reglers (Regler mit Proportional-, Integral- und Differentialanteil) [79] vom Mikrocontroller geregelt.

An den Mikrocontroller ist ein FPGA (*field programmable gate array*, programmierbarer Logikbaustein) aus der Spartan-3E-Familie von Xilinx angebunden, der über interne Register durch den Mikrocontroller konfigurierbar ist und zeitkritische und automatisierte Aufgaben wie Bildaufnahmesequenzen und bildsynchrones Phasenschieben erfüllt.

Die für die Lumineszenzabklingzeitbestimmung notwendige Generierung der Modulation kann wahlweise durch eine interne Taktquelle erfolgen oder durch einen externen Takt, auf den mit Hilfe einer Phasenregelschleife (PLL: *phase-locked loop*) [31] aufsynchronisiert werden kann. Der Frequenzbereich der internen Modulation beträgt 5 kHz – 100 MHz, der der externen wurde auf 500 kHz – 100 MHz festgelegt, um für die PLL stabile Arbeitspunkte zu gewährleisten.

Der Modulationstakt wird intern frequenzvervielfacht und zur Generierung einer analogen, sinusförmigen Modulation mit Hilfe der direkten digitalen Synthese (DDS: *direct digital synthesis*) [31] verwendet, die dieselbe Frequenz wie der Modulationstakt aufweist. Der DDS-Baustein ist an das FPGA angebunden und erlaubt neben der diskreten Konfiguration der Frequenz eine direkte Phasenmodulation, die für das bildsynchrones Phasenschieben zur Rekonstruktion der demodulierten Wellenform erforderlich ist.

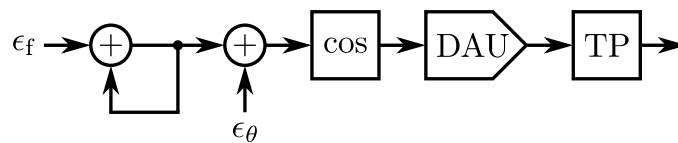


Abbildung 5.4: Funktionsprinzip der Erzeugung einer harmonischen Schwingung mit Hilfe der direkten digitalen Synthese (DDS) in Anlehnung an [31]. Die erste Summation mit Rückkopplung (links) repräsentiert den Phasenakkumulator mit dem Phaseninkrement ϵ_f . Mit Hilfe der zweiten Summation wird die Phase mit ϵ_θ verschoben beziehungsweise moduliert. Die \cos -Tabelle, der Digital-Analog-Umsetzer (DAU) und der Tiefpass (TP) als Rekonstruktionsfilter übersetzen die digitale Phase in eine analoge, harmonische Schwingung.

Abbildung 5.4 zeigt Funktionsprinzip der direkten digitalen Synthese. Bis auf die Digital-Analog-Umsetzung arbeitet der DDS-Kern mit digitalen Werten. Der Phasenakkumulator summiert das Phaseninkrement ϵ_f mit der Taktfrequenz f_{clk} . Das Phaseninkrement bestimmt die Frequenz der resultierenden harmonischen Grundschwingung f_{DDS} . Zur Phasenmodulation wird zu der akkumulierten Phase die digitale Phasenverschiebung ϵ_θ addiert. Die \cos -Tabelle übersetzt die Phase in Digitalwerte einer \cos -Funktion, die mit Hilfe eines Digital-Analog-Umsetzers in einen analogen Spannungsverlauf konvertiert werden. Ein nachgeschalteter Tiefpass (TP) rekonstruiert die harmonische Grundschwingung und beseitigt Abtastartefakte.

Der eingesetzte DDS-Baustein beinhaltet einen 32 Bit-Phasenakkumulator. Die Frequenz der harmonischen Schwingung errechnet sich demnach zu

$$f_{\text{DDS}} = \frac{\epsilon_f}{2^{32}} f_{\text{clk}}. \quad (5.1)$$

Mögliche Werte für ϵ_f sind mit $0 \leq \epsilon_f \leq 2^{31}$ gegeben, so dass gemäß dem Nyquist-Shannon-Abtasttheorem $0 \leq f_{\text{DDS}} \leq 0,5 \cdot f_{\text{clk}}$ gilt. Die Frequenzauflösung ist mit $\epsilon_f = 1$ durch $\Delta f_{\text{DDS}} = 2^{-32} \cdot f_{\text{clk}}$ gegeben. Im Fall der eingesetzten Taktfrequenz von $f_{\text{clk}} = 400 \text{ MHz}$ beträgt sie etwa $93,13 \text{ mHz}$.

Die Phase kann mit einer Auflösung von 14 Bit verschoben werden und ergibt sich zu

$$\theta = 2\pi \frac{\epsilon_\theta}{2^{14}}. \quad (5.2)$$

Mit $\epsilon_\theta = 1$ ist die Phasenauflösung $\Delta\theta = 2\pi \cdot 2^{-14} \approx 0,38 \text{ mrad}$.

Die sinusförmige Modulation wird mittels eines Analogkomparators in einen rechteckförmigen Takt konvertiert, so dass am Kameramodulationsausgang wahlweise eine sinus- oder rechteckförmige Modulationswellenform zur Verfügung steht. Zum Bildsensor gelangt die durch Phasenmodulation phasenverschiebbare rechteckförmige Modulation. Es sind 1, 2, 4, 8 oder 16 äquidistante Phasen pro Demodulationsperiode auswählbar.

Die besondere Herausforderung lag dabei im Entwurf der digitalen und analogen Pfade für die Erzeugung der sinus- und rechteckförmigen Modulation. Zur Vermeidung von Bandbreitenbegrenzungen durch parasitäre Kapazitäten (Anschlusskapazitäten der Bauteile, Leiterbahnen und Durchkontaktierungen auf der Leiterplatte) sind diese Pfade niederimpedant ausgelegt. Dies betrifft besonders den Entwurf der diskret aufgebauten Rekonstruktionsfilter höherer Ordnung, die dem DDS-Baustein nachgeschaltet sind.

5.2.2 Bildsensoreinheit

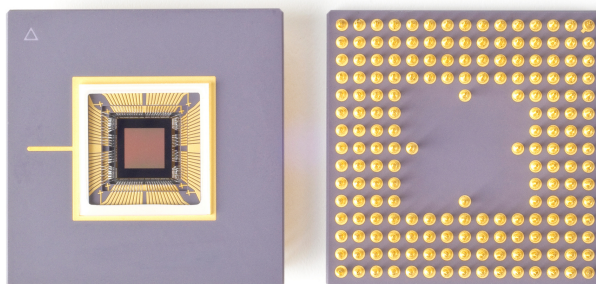


Abbildung 5.5: FLICAM-Bildsensor im PGA-Gehäuse, links: Ansicht von oben, rechts: Ansicht von unten

Der FLICAM-Bildsensor (siehe Abbildung 5.5) ist in einem PGA-Gehäuse (PGA: *pin grid array*) eingebettet. Er besitzt 1024×1024 Pixel, von denen die sechs äußeren Spalten beziehungsweise Zeilen durch eine Maskierung lichtunempfindlich sind und zur dynamischen Dunkelstromkorrektur verwendet werden können.

Der Bildsensor belichtet mit einem „rollenden Verschluss“ (*rolling shutter*) als elektronischen Verschluss [43]; nach dem Löschen (*reset*) einer Zeile beginnt die Belichtung, die durch das anschließende Auslesen der Bildinformation beendet wird. Das Zeitfenster zwischen Löschen und Auslesen definiert die Belichtungszeit. Zur Rauschreduktion wird sowohl die Lösch- als auch die Bildinformation alternierend ausgelesen und extern die Löschwerte von der Bildinformation digital subtrahiert (DCDS: *digital correlated double sampling*). Ein aufgenommenes Grauwertbild zeigt Abbildung 5.6.



Abbildung 5.6: Unkorrigiertes (nur DCDS) Grauwertbild, das mit der FLICAM ohne Modulation aufgenommen wurde.

Jedes Pixel besitzt zwei Ladungstöpfe zur Ladungsintegration während der Belichtung, zwischen denen durch die Modulation alternierend ausgewählt wird. Nach erfolgter Belichtung steht pro Pixel die 0° - und 180° -Phaseninformation zur Verfügung (siehe Abbildung 3.1 in Abschnitt 3.2). Pro Sensorzeile werden acht Pixel sowie die 0° - und 180° -Phaseninformation simultan ausgelesen, so dass ein analoger Datenstrom mit 16 Kanälen verfügbar ist, der zu den Analog-Digital-Umsetzern (siehe Abschnitt 5.2.3) gelangt. Die Pixelauslesefrequenz beträgt wahlweise 12,5 MHz oder 25 MHz, die effektive Pixelrate 200 MHz beziehungsweise 400 MHz. Da das DCDS extern in der Bildverarbeitungseinheit (siehe Abschnitt 5.2.4) gerechnet wird, müssen die Lösch- und Bildgrauwerte zeilenweise alternierend ausgelesen werden.

Durch einen Mangel in der Pixelstruktur, der sich im Nachhinein herausstellte, sollte nach gewünschter Belichtung die (modulierte) Szenenbeleuchtung während

des Auslesens des Bildsensors abgeschaltet werden, um zusätzliches Rauschen zu vermeiden. Zu diesem Zweck liefert die Kamera ein bildsynchrones Signal, das die benutzte Lichtquelle ein- und ausschaltet.

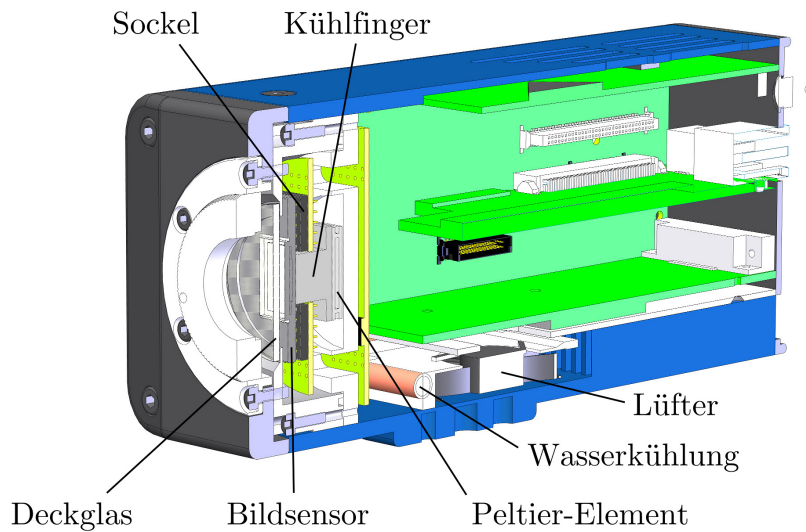


Abbildung 5.7: Bildsensorkühlkonzept der FLICAM: Der Bildsensor ist zur Kühlung und Temperaturregelung thermisch über einen Kühlfinger und ein Peltier-Element an das Kameragehäuse angebunden.

Das PGA-Gehäuse des Bildsensors ist thermisch an einen Kühlfinger angekoppelt, der den durch Verlustleistung des Sensors hervorgerufenen Wärmestrom mit Hilfe eines Peltier-Elementes an das Kameragehäuse abführt. Die Einheit Bildsensor, Kühlfinger und Peltier-Element ist gasdicht verschlossen und mit einem Gas mit geringer Wärmeleitfähigkeit befüllt, um eine stärkere Kühlwirkung zu erzielen und Kondensation auf dem Sensor beziehungsweise auf dem Deckglas zu verhindern. Abbildung 5.7 zeigt das Kühlkonzept der FLICAM.

Tabelle 5.1 fasst die wichtigen Sensorparameter zusammen.

Eigenschaft	Wert
Technologie	0,18 μm CMOS
Auflösung (Spalten \times Zeilen)	1024 \times 1024
Pixelgröße	5,6 \times 5,6 μm^2
Anzahl Ladungstöpfe pro Pixel	2
elektronischer Verschlussmodus	„rollender Verschluss“ (<i>rolling shutter</i>)

Tabelle 5.1: Daten des FLICAM-Bildsensors (aus dem vorläufigen Datenblatt). Die Einheit e^- gibt die Anzahl der Elektronen an.

Eigenschaft	Wert
maximale Modulationsfrequenz	40 MHz
Füllfaktor (ohne Mikrolinsen)	18 %
Ladungstopfkapazität (<i>full well capacity</i>)	20,5 ke ⁻
Ausleserauschen	22 e ⁻
Dynamikbereich	59 dB
maximale Verlustleistung	4,4 W

Tabelle 5.1: (Fortsetzung)

5.2.3 Analog-Digital-Umsetzer

Zwei Analog-Digital-Umsetzerbausteine mit je acht Kanälen und einer Auflösung von 14 Bit wandeln den analogen Datenstrom in einen digitalen, seriellen Datenstrom mit 16 differentiellen Kanälen um, der zur Bildverarbeitungseinheit geführt wird. Der digitale Datenstrom überträgt bei steigender und fallender Taktflanke jeweils ein Bit (DDR: *double data rate*), so dass die physikalische Datenstromfrequenz das Siebenfache der Pixelauslesefrequenz beträgt (87,5 MHz beziehungsweise 175 MHz).

Die Analog-Digital-Umsetzerbausteine sind aufgrund ihrer Verlustleistung außerhalb der thermisch stabilisierten Bildsensoreinheit platziert.

5.2.4 Bildverarbeitungseinheit

Die Bildverarbeitungseinheit besteht aus einem FPGA aus der Virtex-5-Familie von XILINX, flüchtigem Bildspeicher (DDR2-RAM, RAM: *random access memory*), nichtflüchtigem Bildkorrekturspeicher, einer Camera Link-Schnittstelle (*full*) und einer weiteren, optionalen Schnittstelle wie USB 2.0/3.0 oder Gigabit-Ethernet. Die von den Analog-Digital-Umsetzern kommenden, seriellen Datenströme werden im FPGA in Pixelgrauwerte umgewandelt und nach Lösch- und Bilddaten sowie nach 0°- und 180°-Phaseninformation sortiert. Der Bildspeicher, bestehend aus zehn 16 Bit-Speicherbausteinen in vier Gruppen, dient zur Verrechnung der Lösch- und Bildgrauwerte (DCDS) und sieht weitere Ressourcen zur Bestimmung von Phasen- und Demodulationsbildern durch numerische harmonische Analyse sowie deren Referenzierung vor (siehe Abschnitte 3.3.2 und 3.4).

In einer weiteren Verarbeitungsstufe ist eine bildsensorspezifische Bildfehlerkorrektur (defekte Pixel, Linearität) vorgesehen. Die verrechneten (Roh-) Bilddaten werden standardmäßig in voller Bandbreite über die Camera Link-Schnittstelle ausgegeben.

Das FPGA ist, wie auch das der Kontrolleinheit, über interne Register durch den Mikrocontroller konfigurierbar. Das Gehäuse des FPGAs ist zu Kühlzwecken thermisch direkt an die Bodenplatte des Kameragehäuses angebunden, die durch einen eingebetteten Lüfter von der Umgebungsluft durchströmt wird.

5.2.5 Stromversorgung

Die Stromversorgungseinheit wird von einem externen Netzteil gespeist und generiert alle benötigten elektrischen Grundspannungen für die analogen und digitalen Baugruppen. Sie stellt eine elektrische Leistung von maximal 50 W zur Verfügung. Zwei Spannungsquellen speisen das Peltier-Element in der Bildsensoreinheit und den Gehäuselüfter und werden durch Pulsbreitenmodulation von der Kontrolleinheit gesteuert. Die Stromversorgungseinheit wird thermisch über das Kameragehäuse sowie durch den Gehäuselüfter gekühlt.

5.3 Firmware

Die Programmierung der Software für die Systemkomponenten (Firmware) teilt sich in zwei Hauptbereiche: die imperative Programmierung des Mikrocontrollers, der sequentiell arbeitet, und die Generierung einer sowohl sequentiell als auch parallel arbeitenden Logik innerhalb der FPGAs.

Der Mikrocontroller wird in der Hochsprache C programmiert und das lauffähige Programm in seinem nichtflüchtigen Speicher abgelegt. Durch ein im Mikrocontroller permanent gespeichertes Programm (*bootloader*) können Software-Aktualisierungen im späteren Betrieb vorgenommen werden.

Das Verhalten der Logikgruppen in den FPGAs wird durch die Beschreibungssprache VHDL (*very high speed integrated circuit hardware description language*) formuliert, die die Beschreibung in synthesefähige und im diskreten FPGA realisierbare Logikverschaltungen übersetzt. Über definierbare Grenzwerte (*constraints*) für die verwendeten Frequenzen und eventuellen Signallaufzeiten lässt sich die Logik dahingehend optimieren, dass sie zuverlässig innerhalb der Herstellerspezifikationen (Setup- und Haltezeiten, Arbeitstemperaturbereich) arbeitet. Da die Logikverknüpfungen flüchtig sind, müssen sie bei jedem Kamerastart aus einem externen Speicher geladen werden.

6 Messungen und Ergebnisse

Zur Prüfung der Anwendbarkeit der Modelle für die Lumineszenzdynamik (siehe Kapitel 4) wurden geeignete fluoreszierende organische Farbstoffe beziehungsweise bekannte Systeme ausgewählt. Jeder dieser Farbstoffe stellt in Näherung ein Zweiniveausystem (siehe Abschnitt 4.1) mit einer Abklingzeitkomponente, deren Größe in der Literatur dokumentiert ist, dar. Somit konnten sie zur Plausibilitätsprüfung der Messmethodik sowie zur Referenzierung eingesetzt werden. Bei Messungen zum Energietransfer zwischen zwei Farbstoffmolekülen wurden die Farbstoffe dahingehend ausgewählt, dass das Emissionsspektrum des einen Moleküls genügend mit dem Absorptionsspektrum des anderen überlappt, und dennoch eine ausreichende spektrale Trennung der Emissionen beider Komponenten in Mischung möglich ist.

6.1 Messaufbau

Der schematische Messaufbau für Lumineszenzabklingzeitmessungen ist in Abbildung 6.1 wiedergegeben. Die im Rahmen der Arbeit entwickelte, analog modulierbare Lichtquelle wurde mit einer Laserdiodeeinheit der Firma RGB Lasersysteme GmbH bestückt, die bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer mittleren optischen Leistung von 50 mW emittiert. Die Laserdiodeeinheit beinhaltet eine Laseroptik zur Aufweitung des Laserstrahls und flächigen Beleuchtung der Probe sowie einen Diffusor zur Reduktion der Speckle-Muster, die durch Selbstinterferenz des Laserstrahls hervorgerufen werden. Die von der Abklingzeitkamera (FLICAM) generierte sinusförmige analoge Modulation wird über ein BNC-Kabel in die Lichtquelle eingespeist, die bis zu einer Frequenz von etwa 50 MHz moduliert werden kann. Über eine weitere elektrische Verbindung von der FLICAM zur Lichtquelle kann die Belichtung zum Auslesen des Bildsensors synchronisiert werden (siehe Abschnitt 5.2.2). Mit Hilfe eines ITOS Breitbandinterferenzfilters #30751W40 mit einer spektralen Transmissionshalbwertsbreite von 400 nm – 540 nm als Anregungsfilter wird die längerwellige spontane Emission der Laserdiode blockiert. Über einen dichroitischen Strahlteiler (Chroma 500DCXRUV, Reflexionshalbwertsbreite 350 nm – 485 nm, Transmissionshalbwertsbreite 515 nm – 800 nm) wird das Anregungslicht auf die Probe gelenkt. Die Lumineszenzemission der Probe wird durch den Dichroiten und mit Hilfe eines Emissionsfilters vom Anregungslicht separiert und mit einem Kameraobjektiv (Schneider Kreuznach Xenon f/0,95, $f = 25$ mm, C-Mount) von der FLICAM aufgenommen. Der Typ des Emissionsfilters hängt von der spektralen Lumineszenz der Probe ab und wird in den folgenden Abschnitten zu den Messungen spezifiziert.

Anfängliche Messungen zeigten eine Wellenlängenabhängigkeit der errechneten Demodulationstiefe, so dass für die Messung der Probe und einer geeigneten Referenz jeweils dasselbe Emissionsfilter verwendet wurde (siehe [80]). Diese Wellenlängenabhängigkeit eines Bildsensors wurde in [27] bereits beobachtet und auf den unterschiedlichen Diffusionsweg der Ladungsträger aufgrund verschiedener Eindringtiefen der absorbierten Photonen unterschiedlicher Wellenlänge im Silizium zurückgeführt. Die Abmessungen der verwendeten Filter lagen bei $50 \times 50 \text{ mm}^2$ beziehungsweise einem Durchmesser von 50 mm.

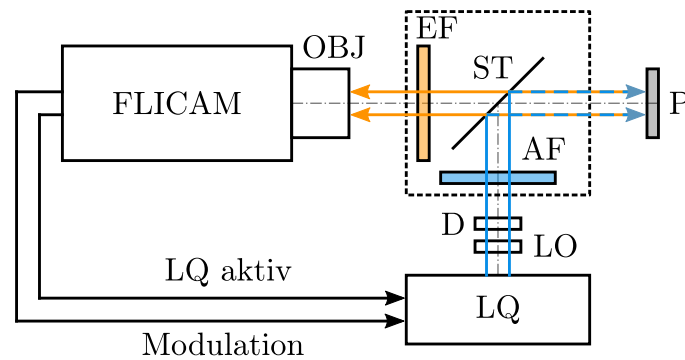


Abbildung 6.1: Schematischer Messaufbau für Lumineszenzabklingzeitmessungen: Laserlichtquelle (LQ), Optik zur Laserstrahlformung (LO), Diffusor (D), Anregungsfilter (AF), dichroitischer Strahlteiler (ST), lumineszierende Probe (P), Emissionsfilter (EF), Kameraobjektiv (OBJ) und Abklingzeitkamera (FLICAM).

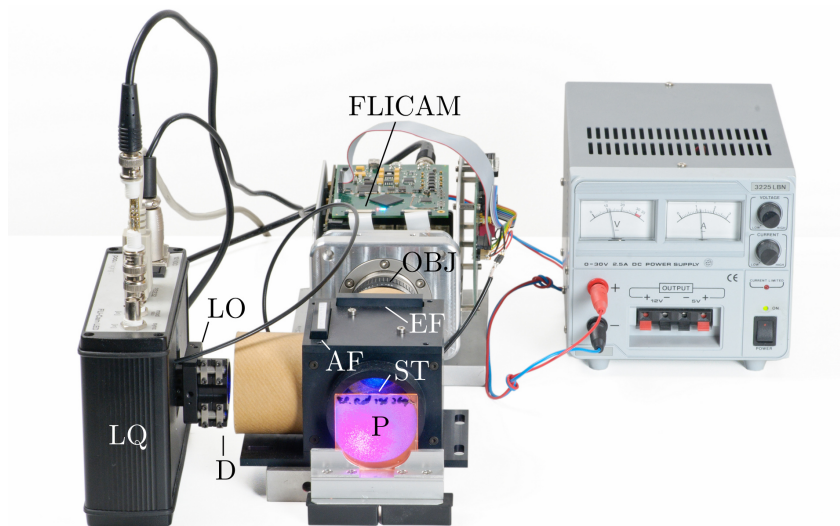


Abbildung 6.2: Realer Messaufbau zum Schema aus Abbildung 6.1. Als Probe ist im Vordergrund das Abklingzeitreferenzplättchen „guardi Flammrot“ (SCHOTT AG) zu sehen.

6.2 Messungen

In Tabelle 6.1 ist die allgemeine Kamerakonfiguration aufgelistet. Die Kamera lieferte im 2×16 Phasenbildmodus 16 äquidistante Phasenbilder pro Modulationsperiode und jeweils das um 180° versetzte Phasenbild, wobei letzteres aufgrund von Asymmetrien bezogen auf das 0° -Phasenbild in der folgenden Auswertung nicht berücksichtigt wurde.

Durch geringfügige Defokussierung der Abbildung wurde das auf der Probe verbliebene Speckle-Muster weiter reduziert; der Verlust an lateraler Bildauflösung war vernachlässigbar, da es sich um homogene Proben handelte.

Es wurden alle 1024×1024 Bildpunkte des Sensors ausgelesen und somit auch die die lichtsensitiven Pixel umgebenden jeweils sechs Dunkelzeilen und -spalten. Der belichtungszeitabhängige Dunkel-Offset wurde bei der Auswertung durch numerische harmonische Analyse berücksichtigt (siehe Abschnitt 6.3). Sowohl für die Referenz- als auch für die Probenmessungen wurde jeweils dieselbe effektive Belichtungszeit benutzt, um den Dunkel-Offset konstant zu halten. Die Kamerakonfiguration, Bildaufnahme und -speicherung wurde mit Hilfe eines MATLAB[®]-Skriptes und des PCO Software-Entwicklungssystems (SDK: *software development kit*) realisiert. Die Bilddaten wurden mit 14 Bit Grauwertauflösung pro Pixel in Form eines Bildstapels mit 32 Einträgen in einem 16 Bit Multipage-TIFF-Format (TIFF: *tagged image file format*) abgespeichert.

Kameraparameter	Einstellung
Pixelauslesefrequenz	25 MHz
Sensortemperatur	20°C
Modulationswellenform	Sinus
Phasenbildmodus	2×16 Phasen (je 0° und 180° Phasen simultan)
ROI	1024×1024 Pixel
Dunkel-Offset	100 DN

Tabelle 6.1: Konfiguration der FLICAM mit ROI (*region of interest*): ausgewählter Sensorbereich und DN (*digital numbers*): Digitalwerte

6.2.1 Rhodamin B

Als Zweiniveausystem wurde der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B mit einer Abklingzeit von $\tau = (1,74 \pm 0,02)$ ns ausgewählt [4]. Der Kompromiss zwischen ausreichender Fluoreszenzintensität und dem Auftreten von Artefakten durch Reabsorption führte zu der Wahl einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$. Das Rhodamin B (Carl Roth GmbH & Co KG) wurde in einer Phosphatpufferlösung mit $\text{pH} = 7,00 \pm 0,02$ (Carl Roth GmbH & Co KG) angesetzt und zeigte anschließend einen pH-Wert von $\text{pH} = 7,28$, gemessen mit einem Voltcraft[®] pH-Messgerät PH-100ATC bei einer Raumtemperatur von 23°C . Das pH-Meter wurde zuvor auf denselben Phosphat-

puffer kalibriert.

Als Probe wurde eine Glasküvette 100-QS von Hellma Analytics mit einer Schichtdicke von 2 mm mit 0,6 ml Rhodamin B-Lösung befüllt. Während der Messung betrug die Probentemperatur 24 °C.

Eine Rotfilterfolie (LEE Filters Plasa Red #029) mit einer spektralen Transmission oberhalb von etwa 620 nm diente als nichtfluoreszierendes Emissionsfilter. Die Modulationsfrequenz wurde von 100 kHz – 50,1187 MHz in logarithmischen Schritten mit 10 Frequenzen pro Dekade eingestellt. Die effektive Belichtungszeit wurde auf 478,5 ms, die Blende auf $f/0,95$ eingestellt.

Als Referenz wurde ebenfalls die Rhodamin B-Probe vermessen unter der Annahme eines Zweiniveausystems und der in [4] angegebenen Abklingzeit. Diese Messung diente zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und der Systemstabilität (beispielsweise die mögliche Anfälligkeit gegenüber einer temperaturabhängigen Phasendrift im Verlauf der Messung).

6.2.2 Planare Sauerstoff-Optode

Dynamische Lumineszenzlöschung wurde mit Hilfe einer planaren Sauerstoff-Optode SF-PST5-NAU-L4/W4-YOP (PreSens – Precision Sensing GmbH) in wässriger Lösung gemessen. Die Folie enthält einen in einem Polymer immobilisierten, phosphoreszierenden Ruthenium-Farbstoff, dessen Phosphoreszenz durch den in Wasser gelösten Sauerstoff dynamisch gelöscht werden kann, und dessen Abklingzeit τ im Mikrosekundenbereich liegt (Herstellerangabe: $\tau_0 = 4,47 \mu\text{s}$ bei einer Temperatur von 20 °C). Zwei Folienabschnitte wurden in UV-Kunststoffküvetten PLASTIBRAND[®] makro (BRAND GmbH & Co KG) mit den Abmessungen $12,5 \times 12,5 \times 45 \text{ mm}^3$ platziert. Eine Küvette wurde mit einer gesättigten Natriumsulfatlösung befüllt und luftdicht abgeklebt, die andere Küvette enthielt destilliertes Wasser, das durch vorheriges Schütteln mit Luftsauerstoff angereichert wurde. Die Probentemperatur betrug 25 °C.

Als Referenz diente ein Abklingzeitreferenzplättchen (guardi Flammrot, SCHOTT AG, Schichtdicke 450 μm) mit einer angegebenen Abklingzeit von $\tau_{\text{ref}} = (4,0 \pm 0,5) \text{ ns}$. Der verhältnismäßig große relative Fehler von τ_{ref} war von untergeordneter Bedeutung, da für die Abklingzeit der Probe $\tau \gg \tau_{\text{ref}}$ gilt; die Phasenverschiebung durch die Referenz bei der verwendeten Modulationsfrequenz von 20 kHz als optimale Modulationsfrequenz für den Ruthenium-Farbstoff (siehe Abschnitt 3.6) ist nahezu null.

Als Emissionsfilter wurde eine Orangefilterfolie (LEE Filters Deep Golden Amber #135) mit einer spektralen Transmission oberhalb von etwa 600 nm verwendet. Die effektive Belichtungszeit betrug 18,5 ms. Die Blende wurde für die Referenz auf $f/2,0$ und für die Probe auf $f/3,4$ eingestellt.

6.2.3 Planare pH-Optode

Ein Zweikomponentensystem stellt die planare pH-Optode SF-HP5-L4/W4-OIW (PreSens) dar. Sie enthält als pH-wertabhängigen Fluoreszenzfarbstoff ein HPTS-Derivat (HPTS: 8-Hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonsäure-Trinatriumsalz, auch Pyranin, siehe Abschnitt 6.2.4) und einen von seiner Mikroumgebung abgekapselten phosphoreszierenden Ruthenium-Farbstoff (siehe Abschnitt 6.2.2) als Referenzierungsmöglichkeit. Der Hersteller gibt als Abklingzeit für das HPTS-Derivat etwa 5 ns und für den Ruthenium-Farbstoff etwa 6 μ s an.

Die pH-Optode wurde in einer Phosphatpufferlösung mit $\text{pH} = 7,00 \pm 0,02$ in einer UV-Kunststoffküvette PLASTIBRAND[®] makro platziert. Die Proben temperatur betrug 25 °C. Als Referenz diente das Abklingzeitreferenzplättchen guardi Flammrot (SCHOTT AG) aus Abschnitt 6.2.2. Das Emissionsfilter war die Orange filterfolie Deep Golden Amber #135. Die Modulationsfrequenz wurde von 10 kHz – 39,811 MHz in logarithmischen Schritten mit 5 Frequenzen pro Dekade eingestellt. Die effektive Belichtungszeit betrug 58,5 ms. Die Blende wurde für die Referenz auf $f/2,8$ und für die Probe auf $f/2,0$ eingestellt.

6.2.4 HPTS und Rhodamin B in Mischung

Als FRET-System wurden die beiden Fluoreszenzfarbstoffe 8-Hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonsäure-Trinatriumsalz (HPTS, auch Pyranin) als Donor und Rhodamin B (aus Abschnitt 6.2.1) als Akzeptor verwendet. Das HPTS absorbiert bei einer Wellenlänge von 450 nm wesentlich stärker als Rhodamin B und emittiert in einem Spektralbereich, der mit dem Absorptionsspektrum des Rhodamin B überlappt [4, 63]. Somit kann bei direktem Kontakt zwischen Donor- und Akzeptormolekül ein strahlungsloser Energietransfer stattfinden.

Zusätzlich zur Rhodamin B-Lösung aus Abschnitt 6.2.1 wurden zwei Lösungen mit HPTS (Reinheit $\geq 97\%$, Institut für Umweltp Physik der Universität Heidelberg) beziehungsweise einer Mischung von HPTS und Rhodamin B in dem Phosphatpuffer mit $\text{pH} = 7,00 \pm 0,02$ hergestellt. Die Konzentration jeder Komponente betrug 50 μ M. Bei einer Raumtemperatur von 23 °C zeigte die HPTS-Lösung einen pH-Wert von $\text{pH} = 7,25$ und die Mischung beider Farbstoffe von $\text{pH} = 7,28$.

Als Probenbehälter wurden Glasküvetten 100-QS von Hellma Analytics mit einer Schichtdicke von 2 mm verwendet. Für die Vermessung der HPTS-Lösung beziehungsweise der HPTS-Komponente in Mischung wurde als Emissionsfilter eine Filterkombination aus den dichroitischen Farbtrennfiltern Linos DT-Cyan (384 084 036) und DT-Yellow (384 083 036) mit einer resultierenden spektralen Transmissionshalbwertsbreite von etwa 530 nm – 580 nm eingesetzt. Als Emissionsfilter für die Vermessung der Rhodamin B-Komponente in Mischung diente die Rotfilterfolie (LEE Filters Plasa Red #029). Die Auswahl dieser Emissionsfilter ergab visuell eine deutliche spektrale Trennung der Emissionen der HPTS- und Rhodamin B-Komponente in Mischung.

Wie auch in Abschnitt 6.2.1 wurde die HPTS-Lösung sowohl als Probe als auch als

Referenz gemessen. Zusammen mit der Rhodamin B-Messung stellten die Messreihen auch gleichzeitig Referenzen für die Messungen der Emissionen beider Spektralbereiche der HPTS- und Rhodamin B-Komponenten in Mischung dar.

Während der Messung betrug die Proben temperatur 24 °C. Die Modulationsfrequenz wurde von 100 kHz – 50,1187 MHz in logarithmischen Schritten mit 10 Frequenzen pro Dekade eingestellt. Die effektive Belichtungszeit betrug 478,5 ms. In folgender Tabelle sind die jeweiligen Blendeneinstellungen gegeben.

Probe	Emissionsfilter	Blende
HPTS	DT-Cyan + DT-Yellow	f/3,4
HPTS + Rhodamin B	DT-Cyan + DT-Yellow	f/2,8
HPTS + Rhodamin B	Plasa Red #029	f/1,7

Tabelle 6.2: Blendeneinstellungen des Kameraobjektivs für die Fluoreszenzproben und eingesetzten Emissionsfilter

6.3 Auswertung

Zur Auswertung der Messdaten wurden Kurzprogramme in MATLAB[®] erstellt. Für jedes Phasenbild eines aufgenommenen Bildstapels wurde der arithmetische Mittelwert der Dunkelzeilen und -spalten berechnet und von den Grauwerten des Bildes subtrahiert. Um einzelne defekte Pixel (*dead pixel*, *hot pixel*) beziehungsweise durch längere Belichtungszeiten sowie durch höhere Modulationsfrequenzen generierte Ausreißer (signifikant dunklere oder hellere Pixel) zu eliminieren, wurde jedes Phasenbild mit einer 3×3 Matrix mediangefiltert und anschließend das Signal-Rausch-Verhältnis mit Hilfe eines 5×5 Wiener-Filters erhöht.

Anschließend wurde durch numerische harmonische Analyse (siehe Abschnitt 3.3.2) der 16 äquidistanten Phasenbilder für jeden Bildpunkt der Phasenwinkel, der Demodulationsindex und die normierte Intensität bestimmt. Dabei fanden aufgrund von Asymmetrieffekten während der modulationsbedingten Ladungstrennung in jedem Pixel die 180°-Informationen (zweiter Ladungstopf) der Phasenschritte keine Verwendung.

Phasen- und Demodulationsinformation ist nur in den Bildbereichen der Proben- und Referenzmessung auswertbar, deren normierte mittlere Intensität eine gewisse untere Schwelle überschreitet und das Signal-Rausch-Verhältnis ausreichend groß ist. Oberhalb einer bestimmten Schwelle können bei zu hoher Belichtung Sättigungseffekte des Demodulationsindex auftreten. Die untere Schwelle g_1 und obere Schwelle g_2 mit $g_1, g_2 \in [0, 1]$ beziehen sich auf die normierte mittlere Intensität \bar{I}_n .

Für jeden Bildpunkt der Probe und der Referenz an der Stelle (x, y) wurde überprüft, ob der referenzierte Zeiger $p_{y,x}(\omega)$ auswertbar ist, andernfalls wurde er auf null gesetzt:

$$p_{y,x}(\omega) = \begin{cases} p_{y,x}(\omega), & g_1 < \bar{I}_{y,x,n} < g_2 \\ 0, & \text{sonst} \end{cases}. \quad (6.1)$$

Alle Zeiger mit $p_{y,x}(\omega) \neq 0$ wurden in einen komplexen Vektor $p_j(\omega)$ umsortiert und dessen Median $\tilde{p}(\omega)$ und mittlere absolute Abweichung $d_p(\omega)$ (siehe [2]) nach folgenden Definitionen berechnet:

$$\tilde{p}(\omega) = \Re\{\widetilde{p_j(\omega)}\} + i\Im\{\widetilde{p_j(\omega)}\} \quad (6.2)$$

$$d_p(\omega) = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N |\Re\{p_j(\omega)\} - \Re\{\tilde{p}(\omega)\}| + \frac{i}{N} \sum_{j=1}^N |\Im\{p_j(\omega)\} - \Im\{\tilde{p}(\omega)\}|. \quad (6.3)$$

$\tilde{p}(\omega)$ enthält somit die Mediane der Real- und Imaginärteile, $d_p(\omega)$ deren entsprechende mittlere absoluten Abweichungen. Der Median erwies sich gegenüber Ausreißern robuster als das arithmetische Mittel.

Zur Bestimmung der Fehler der Phasenabklingzeiten aus Nyquist-Diagrammen wurden Tangenten durch den Ursprung an komplexe Fehlerellipsen, deren Halbachsen durch $\Re\{d_p(\omega)\}$ und $\Im\{d_p(\omega)\}$ definiert sind, gebildet.

Die Abbildungen 6.3 und 6.4 mit Messungen aus Abschnitt 6.2.2 illustrieren die Zwischenschritte der Auswertung. Durch Beurteilung des Graustufenbildes der normierten Intensität (Abbildung 6.3a) werden die Schwellen g_1 und g_2 ausgewählt, mit denen das Demodulationsindexbild (Abbildung 6.3b) und das Phasenbild (Abbildung 6.3c) nach Gleichung (6.1) maskiert werden.

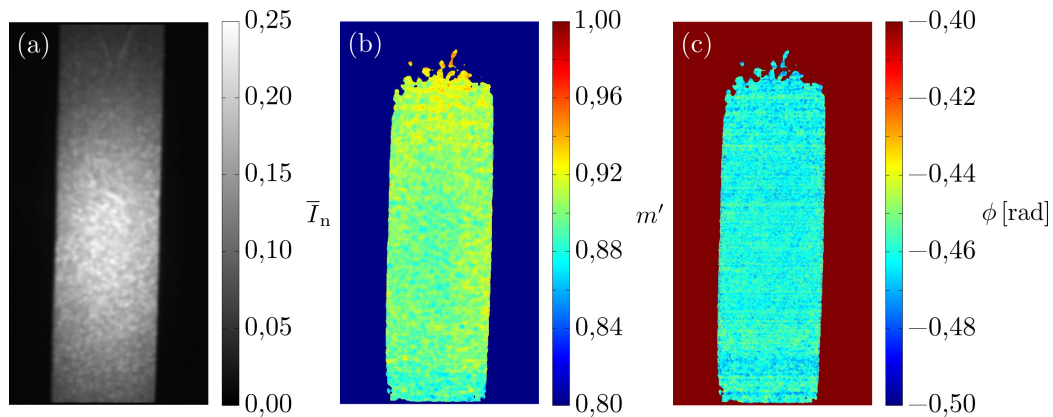


Abbildung 6.3: Planare Sauerstoff-Optode (PreSens) in mit Luftsauerstoff angereicherterem Wasser, Modulationsfrequenz 20 kHz (jeweils Bildausschnitte): normiertes Intensitätsbild (a), Demodulationsindexbild (b) und Phasenbild (c) mit der unteren und oberen Schwelle $g_1 = 0,07$ und $g_2 = 0,50$. Die Abbildungen (b) und (c) zeigen bereits referenzierte Verteilungen.

Die so gewonnenen referenzierten Zeiger $p_{y,x}$ sind in Abbildung 6.4 als zweidimensionales, farblich kodiertes Histogramm im Nyquist-Diagramm eingezeichnet.

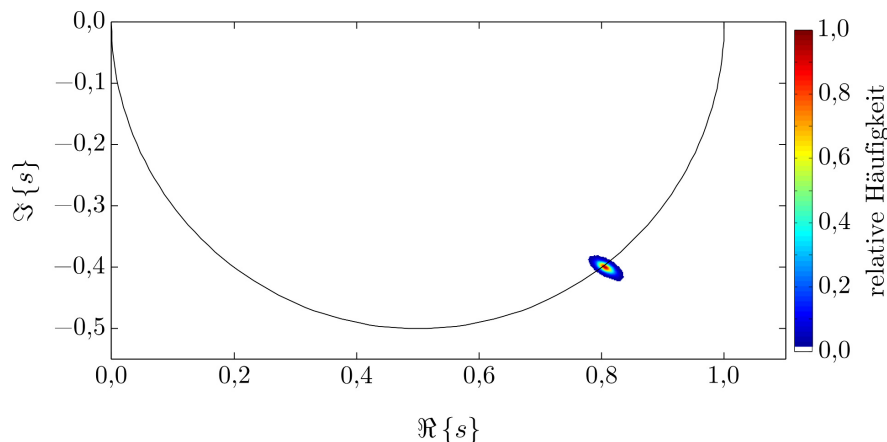


Abbildung 6.4: Nyquist-Diagramm der Messung der planaren Sauerstoff-Optode (Pre-Sens) in mit Luftsauerstoff angereichertem Wasser, Modulationsfrequenz 20 kHz. Die referenzierten Zeiger sind in Form eines zweidimensionalen Histogramms dargestellt und mit der relativen Häufigkeit farblich kodiert. Der eingezeichnete Halbkreis kennzeichnet ein ideales Zweiniveausystem.

Zur Referenzierung wurde für jede Probe eine Referenzmessung mit einem Farbstoff, der ein Zweiniveausystem darstellt und somit eine einzelne Abklingzeit besitzt (siehe Gleichung (2.8)), durchgeführt. Wenn möglich, lag dabei die Lumineszenzemission in einem ähnlichen Spektralbereich wie die Probenlumineszenz, so dass dasselbe Emissionsfilter eingesetzt werden konnte, um wellenlängenabhängige Fehler in der Demodulation weitestgehend auszuschließen (siehe [80]). Für die Abklingzeiten der Referenzfarbstoffe wurden Literaturangaben beziehungsweise auf deren Grundlagen aus Messungen ermittelte Abklingzeiten verwendet. Mathematisch ist die Referenzierung in Abschnitt 3.4 beschrieben und wurde auf die Messdaten angewandt.

6.4 Ergebnisse

6.4.1 Rhodamin B

Im Nyquist-Diagramm (Abbildung 6.5) sind die Zeiger $\tilde{p}(\omega)$ der Rhodamin B-Messungen im Modulationsfrequenzbereich 100 kHz – 50,1187 MHz sowie Fehlerbalken der mittleren absoluten Abweichungen eingezeichnet. Der durchgezogene Halbkreis repräsentiert ein ideales Zweiniveausystem für alle Kreisfrequenzen $\omega \in \mathbb{R}_0^+$.

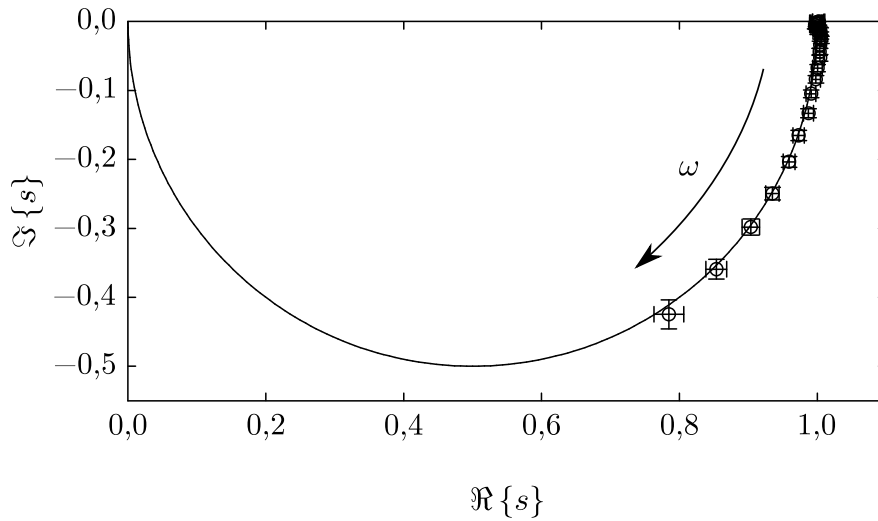


Abbildung 6.5: Nyquist-Diagramm Rhodamin B, Modulationsfrequenz 100 kHz–50,1187 MHz. Der eingezeichnete Halbkreis kennzeichnet ein ideales Zweiniveausystem.

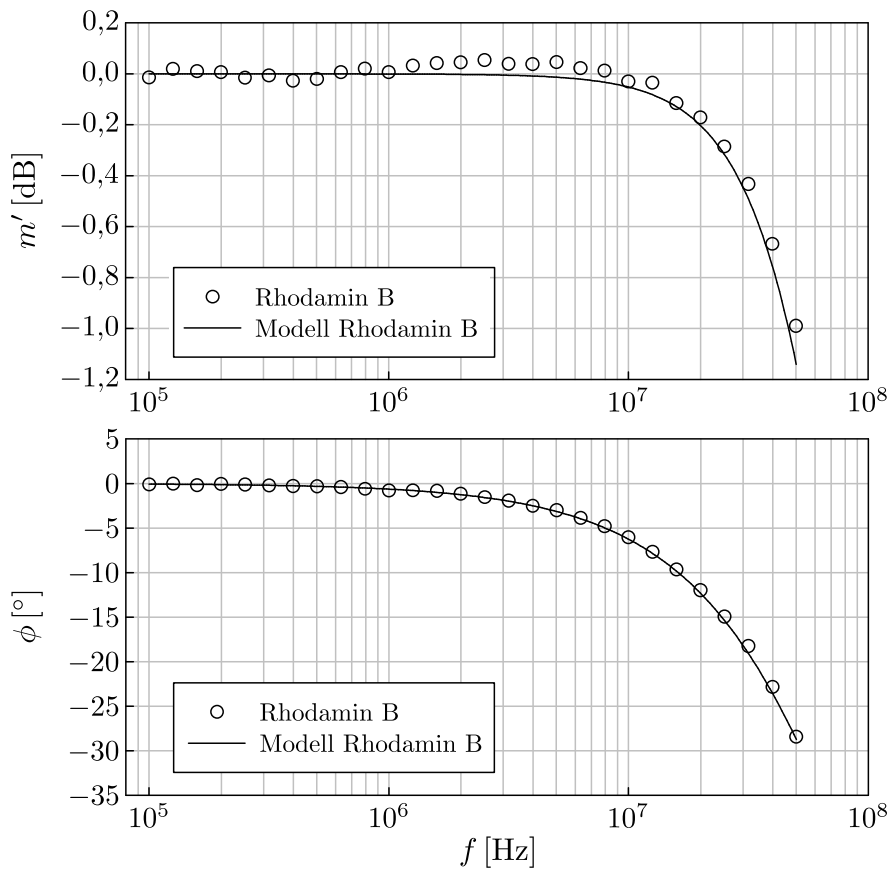


Abbildung 6.6: Bode-Diagramm Rhodamin B (oben: Demodulationsindex m' , unten: Phase ϕ), Modulationsfrequenz 100 kHz – 50,1187 MHz

Abbildung 6.6 zeigt das zugehörige Bode-Diagramm, das den Demodulationsindex- und den Phasengang repräsentiert. Durchgehend eingezeichnet ist die Übertragungsfunktion eines Zweiniveausystems aus Abschnitt 4.1.1 mit einer Zeitkonstanten von $\tau = 1,74$ ns. Für das zugehörige Impedanzmodell ergibt sich mit Festlegung des Widerstands für strahlende Desaktivierung auf $R = 50 \Omega$ nach Gleichung (4.4) die Kapazität zu $C = 34,8$ pF.

6.4.2 Planare Sauerstoff-Optode

Abbildung 6.7 zeigt das Nyquist-Diagramm der Messungen der planaren Sauerstoff-Optode SF-PST5-NAU-L4/W4-YOP in gesättigter Natriumsulfitlösung (angenommener Sauerstoffausschluss) und in mit Luftsauerstoff angereichertem Wasser bei einer Modulationsfrequenz von 20 kHz.

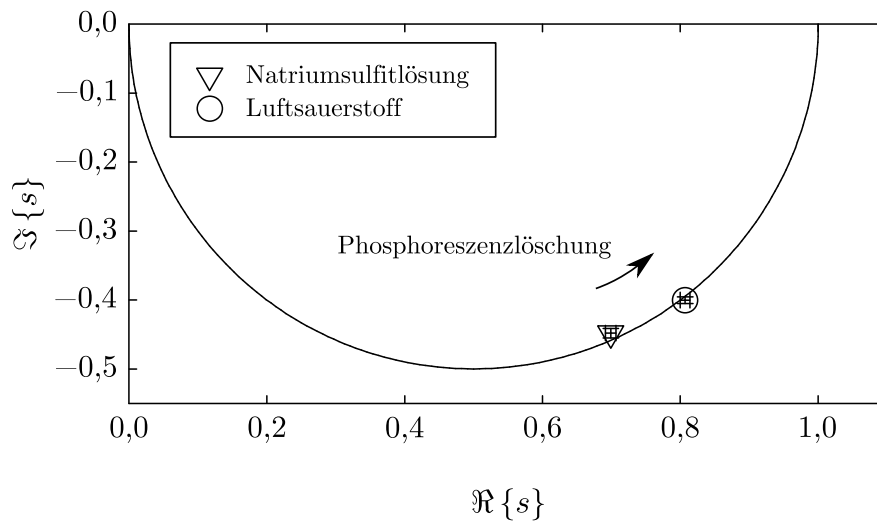


Abbildung 6.7: Nyquist-Diagramm planare Sauerstoff-Optode in gesättigter Natriumsulfitlösung und in mit Luftsauerstoff angereichertem Wasser, Modulationsfrequenz 20 kHz. Der eingezeichnete Halbkreis kennzeichnet ein ideales Zweiniveausystem.

Die aus der Phase abgeleitete Abklingzeit unter Sauerstoffausschluss beträgt $\tau_0 = \tau_{\phi,0} = (5,10 \pm 0,10) \mu\text{s}$. In der luftsauerstoffreichen Umgebung reduziert sich die Abklingzeit auf $\tau = \tau_{\phi} = (3,95 \pm 0,06) \mu\text{s}$. Damit errechnet sich nach Gleichung (2.20) die Stern-Volmer-Konstante zu $K_{SV} [\text{Q}] = 0,29$.

Mit $\tau_0 = 5,10 \mu\text{s}$ im Fall des Sauerstoffausschlusses und dem Widerstand für strahlende Desaktivierung mit $R = 50 \Omega$ errechnet sich nach Gleichung (4.10) die Kapazität des Impedanzmodells zu $C = 102,02$ nF. Der Widerstand für die Phosphoreszenzlöschung R_{nr} entfällt ($R_{nr} \rightarrow \infty$). Im Fall der sauerstoffreichen Umgebung ergibt sich mit Gleichung (4.9) $R_{nr} = 170,83 \Omega$, so dass die Abklingzeit auf $\tau = 3,95 \mu\text{s}$ reduziert wird.

6.4.3 Planare pH-Optode

Abbildung 6.8 zeigt das Nyquist-Diagramm der Messungen der planaren pH-Optode SF-HP5-L4/W4-OIW im Modulationsfrequenzbereich 10 kHz – 39,811 MHz. Der Verlauf der Zeiger $\tilde{p}(\omega)$ in Abhängigkeit von der Modulationsfrequenz folgt zwei Kreisbögen innerhalb des Kreisbogens (durchgezogene Linie) eines Zweiniveausystems. Der Hinweis auf das Vorhandensein zweier Komponenten mit sehr unterschiedlichen Abklingzeiten ($\tau_2 \ll \tau_1$) ließ die grafische Bestimmung ihrer relativen Intensitäten zu, die durch die Durchmesser beider Kreisbögen repräsentiert werden (siehe Abschnitt 4.3). Es ergab sich für die Komponente 1 $f_1 = 0,42$ und für die Komponente 2 $f_2 = 0,58$. Jeder der beiden Kreisbögen wurde als separates Zweiniveausystem betrachtet, auf einen Durchmesser von eins skaliert und die jeweilige Abklingzeit aus der Phase berechnet. Dabei wurden die Zeiger nahe der jeweils optimalen Modulationsfrequenz (siehe Abschnitt 3.6) ausgewählt: 25,1189 kHz für die Komponente 1 und 25,1189 MHz für die Komponente 2. Es ergab sich $\tau_1 = \tau_{\phi,1} = (6,27 \pm 0,54) \mu\text{s}$ und $\tau_2 = \tau_{\phi,2} = (5,53 \pm 0,45) \text{ns}$. Die Abklingzeiten lassen sich den Komponenten aus Abschnitt 6.2.3 zuordnen (τ_1 : Ruthenium-Farbstoff, τ_2 : HPTS-Derivat).

Die gestrichelt eingezeichnete Kurve ist die Übertragungsfunktion aus Abschnitt 4.3 mit oben ermittelten Parametern. Mit der Festlegung der Widerstände auf $R_1 = R_2 = 50 \Omega$ errechnen sich die Kapazitäten des Impedanzmodells zu $C_1 = 125,30 \text{ nF}$ und $C_2 = 110,66 \text{ pF}$.

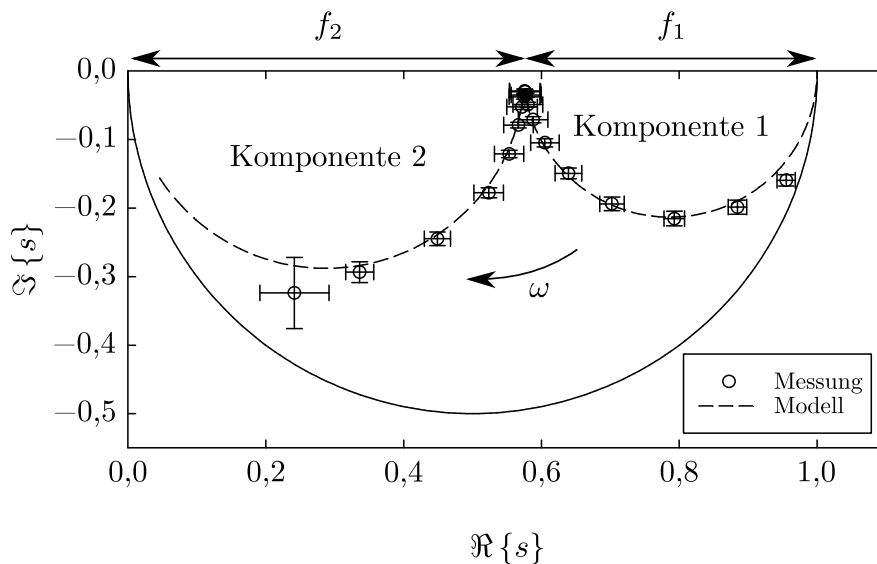


Abbildung 6.8: Nyquist-Diagramm planare pH-Optode, Modulationsfrequenz 10 kHz – 39,811 MHz. Der eingezeichnete durchgezogene Halbkreis kennzeichnet ein ideales Zweiniveausystem.

6.4.4 HPTS und Rhodamin B in Mischung

Abbildung 6.9 zeigt das Bode-Diagramm der Messung von HPTS, Rhodamin B und deren jeweilige Komponente in Mischung im Modulationsfrequenzbereich 100 kHz – 50,1187 MHz. Die Rhodamin B-Messung wurde aus Abschnitt 6.4.1 übernommen, ebenso der Literaturwert für die Abklingzeit mit $\tau_A = 1,74$ ns. Das HPTS wurde auf sich selbst referenziert und dabei eine Abklingzeit von $\tau_D = 4,4$ ns vorausgesetzt, die zuvor aus der Phasenabklingzeit mit Rhodamin B als Referenz abgeleitet wurde. Der Demodulationsindex eignete sich aufgrund seiner Wellenlängenabhängigkeit nicht dazu (siehe Abschnitt 6.1). Literaturwerte der Abklingzeit von HPTS zeigen eine starke Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel und pH-Wert [63], so dass eine erneute Messung der Abklingzeit der vorliegenden HPTS-Lösung notwendig war. Sowohl HPTS als auch Rhodamin B werden in der Ergebnisdarstellung jeweils als Zweiniveausysteme angenommen.

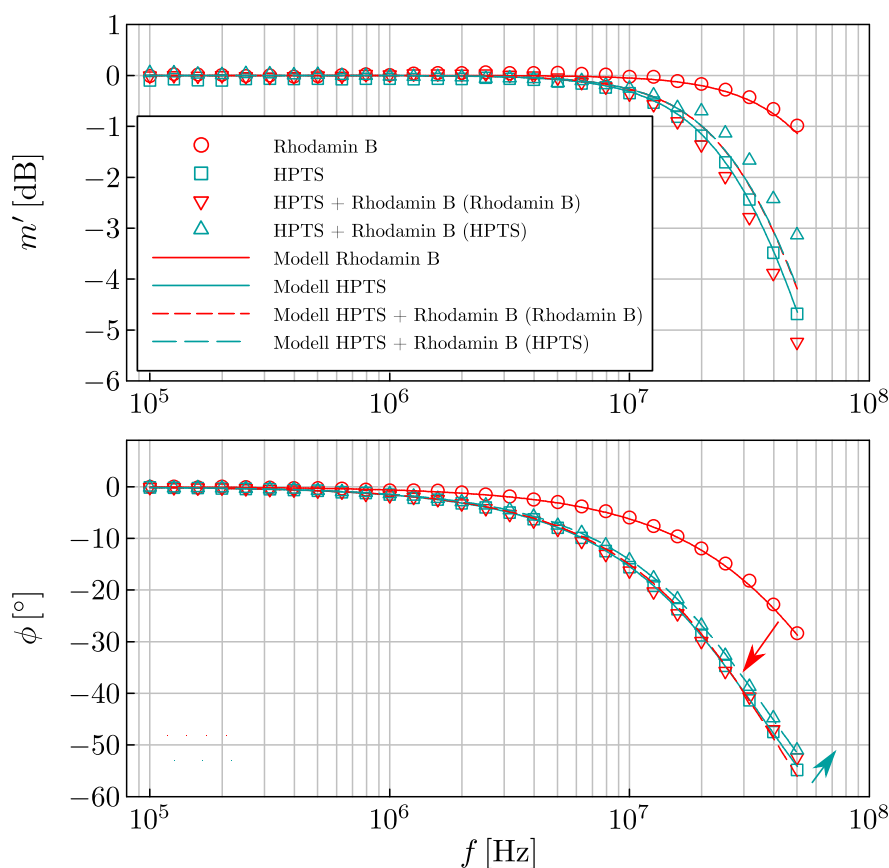


Abbildung 6.9: Bode-Diagramm HPTS (blaugrün) und Rhodamin B (rot) einzeln und in Mischung mit Angabe der jeweiligen Komponente in Klammern. Oben: Demodulationsindex m' , unten: Phase ϕ , Modulationsfrequenz 100 kHz – 50,1187 MHz. Die Pfeile kennzeichnen die Verschiebung des Phasenganges der Einzelkomponente zur jeweiligen Komponente in Mischung.

Im Demodulationsindex- und Phasengang ist ersichtlich, dass die Zeitkonstante der HPTS-Komponente in Mischung kleiner ist als in reiner HPTS-Lösung; die Grenzfrequenz ist nach oben hin verschoben. Die Zeitkonstante der Rhodamin B-Komponente in Mischung ist deutlich größer als in reiner Rhodamin B-Lösung und liegt geringfügig höher als die des HPTS; die Grenzfrequenz ist nach unten hin verschoben.

Zur Kurvenanpassung der Übertragungsfunktionen $G_D(i\omega)$ und $G_A(i\omega)$ aus Abschnitt 4.4 an die gemessenen Zeiger der HPTS- und Rhodamin B-Komponenten in Mischung wurden die Parameter k_{DA} und k_{AD} durch nichtlineare Regression mit dem Quasi-Newton-Verfahren optimiert (vergleiche [64]). Die Optimierung bestand in der Minimierung der Summe der quadratischen Abweichungen in Form von Differenzbeträgen $|\tilde{p}(\omega) - G(i\omega)|$. Die Parameter Γ_D und Γ_A blieben dabei konstant, da sie die reziproken Werte der Abklingzeiten τ_D , respektive τ_A , darstellen. Die Optimierung gestaltete sich hinsichtlich der Konvergenz als schwierig und zeigte eine Abhängigkeit von den Anfangswerten von k_{DA} und k_{AD} . Ein plausibles Ergebnis der Optimierung hinsichtlich der Messwerte stellen die Werte $k_{DA} = 2,38 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ und $k_{AD} = 3,42 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ dar.

Die Bauteilwerte des zugehörigen elektrischen Ersatzschaltbildes ergeben sich nach Gleichungen (4.27)–(4.30) und sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Bauteil	Wert
R_D	50 Ω
C_D	88 pF
R_{ET}	47,75 Ω
R_A	284,13 Ω
C_A	6,12 pF

Tabelle 6.3: Ermittelte Bauteilwerte des elektrischen Ersatzschaltbildes des FRET-Systems aus HPTS (Donor) und Rhodamin B (Akzeptor)

7 Diskussion der Ergebnisse

7.1 Kamera

Die Entwicklung des FLICAM-Bildsensors führte zu einem Ausleserauschen, das mit $22 e^-$ deutlich über dem anfangs projektierten Wert von $8 e^-$ liegt. Somit steht mit der vorhandenen Ladungstopfkapazität (*full well capacity*) von $20,5 ke^-$ nur ein nutzbarer dynamischer Bereich von 59 dB anstelle von 66 dB zur Verfügung, was einer Auflösung von knapp 10 Bit entspricht. Die maximale Leistungsaufnahme des Bildsensors ist mit $4,4 W$ etwa doppelt so hoch wie ursprünglich erwartet und erfordert eine überarbeitete Kühlung, um den Dunkelstrom zu reduzieren. Aufgrund der veränderten Sensoreigenschaften wurde die Bildsensoransteuerung optimiert. Ein zusätzlich definiertes Signal zum bildsynchrone Ein- und Ausschalten der modulierbaren Lichtquelle umgeht einen weiteren Mangel der Bildsensors (siehe Abschnitt 5.2.2).

Die Kamera zeigt einen Entwicklungsstand, mit dem es möglich ist, unmodulierte und modulierte Grauwertbilder mit beliebigen Belichtungszeiten aufzunehmen und sie nach DCDS-Prozessierung (siehe Abschnitt 5.2.2) in verschiedenen Auflösungen über die Camera Link-Schnittstelle auszugeben. Es lassen sich nahezu beliebige Modulationsfrequenzen im Bereich von 5 kHz bis 100 MHz sowie die Anzahl der äquidistanten Phasenstützstellen für die Kreuzkorrelation von 2 bis 16 (in Zweierpotenzen) einstellen.

Eine Korrektur der Pixel hinsichtlich des ortsfesten Rauschens durch den pixelspezifischen Dunkelstrom (DSNU: *dark signal non-uniformity*) und die pixelspezifische Verstärkung (PRNU: *photo response non-uniformity*) sowie der für CMOS-Sensoren typischen Nichtlinearität wurde noch nicht vorgenommen. Um den Einfluss der Nichtlinearität gering zu halten, wurden die in den Messungen zur Lumineszenzmodellierung aufgenommenen Phasengrauwertbilder bis etwa zur Hälfte des dynamischen Bereichs ausgesteuert. Dies reduziert jedoch das Signal-Rausch-Verhältnis im Vergleich zur Vollaussteuerung und führt zu größeren mittleren absoluten Abweichungen bei der Zeigerberechnung. Das in den Phasengrauwertbildern vorkommende natürliche Photonenrauschen führt ebenfalls zu einer Verteilung der Phase und des Demodulationsindex beziehungsweise der Zeiger [29].

Aufgrund der beobachteten Wellenlängenabhängigkeit des Demodulationsindex (siehe Abschnitt 6.1) wurde die Referenzierung in einem ähnlichen Wellenlängenbereich wie die Probenmessung durchgeführt. Die Kenntnis der Abklingzeit eines geeigneten Referenzluminophors in Abhängigkeit von seinen Umgebungsbedingun-

gen, wie Temperatur, pH-Wert oder seiner Konzentration, wurde aus der Literatur entnommen, die jedoch widersprüchliche Angaben lieferte. So finden sich in [4] für Rhodamin B verschiedene Ergebnisse zur Abklingzeit. Zudem herrscht keine Einigkeit, ob es sich um ein mono- oder gar multiexponentielles System (mehrere Abklingzeiten) handelt. Somit besteht eine literaturbedingte Unsicherheit bei der Verwendung der Referenzwerte, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss.

7.2 Rhodamin B

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Phasen- und Demodulationsindexmessungen anhand des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin B wurde in einer weiteren Messung auf ihn selbst referenziert (siehe Abschnitt 6.2.1). Dabei wird angenommen, dass es sich um ein Zweiniveausystem mit einer einzelnen Abklingzeit handelt, und ihr Literaturwert von $\tau = 1,74 \text{ ns}$ [4] zur Referenzierung verwendet. Die Aufnahmeparameter waren für die Referenz und die Probe identisch.

Das Bode-Diagramm (Abbildung 6.6) zeigt im Phasengang eine sehr gute Übereinstimmung mit dem theoretischen Modell. Der Frequenzgang des Demodulationsindex zeigt dagegen auch bei verhältnismäßig kleinen Modulationsfrequenzen deutlich größere zufällige Fehler. Bei der kleinsten Modulationsfrequenz von 100 kHz beträgt die zugehörige Periodendauer $10 \mu\text{s}$, die gegenüber der effektiven Belichtungszeit von 478,5 ms sehr klein ist. Somit lässt sich ein Einfluss der über nicht ganzzahlige Modulationsperioden integrierten Kreuzkorrelation ausschließen, zumal die zufälligen Fehler, wie sie im Demodulationsindex auftreten, nicht im Phasengang erkennbar sind.

Die zufälligen Fehler im Demodulationsindex sind möglicherweise auch in folgenden Ursachen begründet. Die Rohdaten aus dem Bildsensor wurden unkorrigiert zur Verrechnung verwendet (mit Ausnahme der Korrektur defekter Pixel durch einen Medianfilter, einer Glättung mit einem Wiener-Filter und einer einfachen Dunkelstromkorrektur, siehe Abschnitt 6.3). Die Abhängigkeit der Stabilität der Pixelarbeitspunkte sowie der Linearität von der Modulationsfrequenz wurde noch nicht untersucht.

Möglicherweise zeigt auch die Laserlichtquelle eine Temperatur- oder Zeitabhängigkeit der Modulationstiefe, die zu unterschiedlichen Demodulationsindizes bei der Referenz- und Probenmessung führt, jedoch die Phase nicht beeinflusst. Die Laserlichtquelle weist insbesondere bei höheren Modulationsfrequenzen eine Abnahme der Modulationstiefe auf (siehe Anhang B.1), so dass das Signal-Rausch-Verhältnis der Messwerte bei hohen Frequenzen abnimmt und die mittleren absoluten Abweichungen der berechneten Zeiger zunehmen.

7.3 Planare Sauerstoff-Optode

Die Messungen der planaren Sauerstoff-Optode (siehe Abschnitt 6.4.2) zeigen im Nyquist-Diagramm sehr kleine Fehlerbalken der mittleren absoluten Abweichungen. Dies ist sicherlich auf die für den Bildsensor verhältnismäßig niedrige Modulationsfrequenz von 20 kHz und die im Vergleich zur Rhodamin B-Messung deutlich kürzere effektive Belichtungszeit von 18,5 ms zurückzuführen; die niedrige Modulationsfrequenz und die kürzere Belichtungszeit ergeben eine wesentlich kleinere Anzahl der Schaltzyklen während der Demodulation im Bildsensor. Pro Schaltzyklus werden somit wesentlich mehr photogenerierte Ladungsträger in die 0°- und 180°-Ladungstöpfe transferiert. Bei angenommenem, konstantem Zusatzrauschen des Schaltvorganges erhöht sich dadurch das Signal-Rausch-Verhältnis. Die Modulationsperiodendauer von 50 μs ist klein gegenüber der effektiven Belichtungszeit von 18,5 ms, so dass auch hier keine signifikante Fehlerquelle bei der Kreuzkorrelation zu erwarten ist. Des Weiteren zeigt die Laserlichtquelle bei der Modulationsfrequenz die maximal mögliche Modulationstiefe.

Die Zeiger der Messungen der ungelöschten und gelöschten Sauerstoff-Optode liegen im Nyquist-Diagramm nahezu auf dem Halbkreis eines idealen Zweiniveausystems, so dass die Phasen- und Demodulationsabklingzeiten nahezu gleich sind. Die angegebenen Abklingzeiten sind aus der Phase abgeleitet. Die Abklingzeit der ungelöschten Sauerstoff-Optode liegt laut Herstellerangaben bei $\tau_0 = 4,47 \mu\text{s}$ bei einer Umgebungstemperatur von 20 °C, gemessen wurde $\tau_0 = 5,10 \mu\text{s}$ bei 25 °C. Selbst in Anwesenheit von Restsauerstoff in der gesättigten Natriumsulfitlösung wäre durch Phosphoreszenzlöschung eher eine kleinere als eine größere Abklingzeit zu erwarten. Auch zeigen Ruthenium-Komplexe bei Temperaturerhöhung meist eine Abnahme der Abklingzeit [54, 17, 6], so dass der Probenunterschied wahrscheinlich nicht als Ursache für die Diskrepanz in Frage kommt. Gegebenenfalls wäre die Messmethodik des Herstellers mit der der FLICAM zu vergleichen.

Die Anreicherung des Wassers mit Luftsauerstoff erfolgte qualitativ, so dass keine Sättigung beziehungsweise Übersättigung festgestellt werden konnte. Ebenso ist unsicher, ob die gesättigte Natriumsulfitlösung tatsächlich sauerstofffrei war. Signifikant ist jedoch, dass der Phosphoreszenzfarbstoff gelöscht wird und eine kleinere Abklingzeit aufweist. Wie in den Abschnitten 2.2.2 und 4.1.2 beschrieben, hat die Reduktion der statischen Lumineszenzintensität aufgrund der Löschung keinen Einfluss auf den Modulationsindex; er hängt nur von der reduzierten Abklingzeit τ ab und entspricht dem eines Zweiniveausystems mit strahlendem Übergang. Aus diesem Grund liegen beide Zeiger im Nyquist-Diagramm auf dem Halbkreis.

In Anlehnung an die Demodulationsindexvariationen aus der Rhodamin B-Messung wird ein Vergleich mit der bildhaften Darstellung der Probe sowie ihrer Demodulationsindex- und Phasenverteilung angestellt. Es ist ersichtlich, dass die Phasenverteilung in der Probe (Abbildung 6.3c) homogener ist als die Demodulationsindexverteilung (Abbildung 6.3b). Zudem zeigt letztere im Gegensatz zur Phasenverteilung eine ähnliche Verteilung wie die normierte Intensität aufgrund der Speckle-Muster der Laserlichtbeleuchtung (Abbildung 6.3a); in den helleren Be-

reichen erscheint der Demodulationsindex etwas geringer als in den weniger stark beleuchteten. Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche Nichtlinearität der Pixel, die den Demodulationsindex stärker beeinflusst als die Phase. Das zweidimensionale Histogramm der Zeigerverteilung im Nyquist-Diagramm (Abbildung 6.4) ist etwa in Richtung des Demodulationsindex (Richtung Ursprung) elongiert, was die Annahme unterstützt.

7.4 Planare pH-Optode

Die im Nyquist-Diagramm dargestellten Messergebnisse der pH-Optode (Abbildung 6.8) zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Modell eines Zweikomponentensystems mit zwei sehr unterschiedlichen, unabhängigen Abklingzeiten (vergleiche Abbildung 4.6, Kurve e). Obgleich beide Komponenten gleichzeitig und im zeitlichen Mittel mit konstanter Intensität lumineszieren, lassen sich mit Hilfe des Frequenzgangs im Nyquist-Diagramm bereits visuell zwei in der Abklingzeit sehr verschiedene Komponenten sowie ihre relativen Intensitäten identifizieren.

Durch Behandlung jedes der kleineren Halbkreise als unabhängiges Zweiniveausystem sind die individuellen Phasen- und Demodulationsabklingzeiten bestimmbar. Die Abklingzeit der ersten Komponente $\tau_1 = (6,27 \pm 0,54) \mu\text{s}$ lässt sich dem Ruthenium-Farbstoff zuordnen und stimmt mit der Herstellerangabe von etwa $6 \mu\text{s}$ überein. Die Abklingzeit $\tau_2 = (5,53 \pm 0,45) \text{ ns}$ lässt sich dem HPTS-Derivat zuordnen und stimmt mit der Herstellerangabe von etwa 5 ns gut überein.

7.5 HPTS und Rhodamin B in Mischung

Bei der HPTS-Messung bestand die Schwierigkeit der Referenzierung, da die HPTS-Lumineszenz spektral in einem kürzeren Wellenlängenbereich liegt als die Rhodamin B-Lumineszenz, so dass letztere nicht als Referenz für eine Phasen- und Demodulationsindexmessung verwendet werden konnte; es besteht, wie bereits beschrieben, die Wellenlängenabhängigkeit des Demodulationsindex durch den Bildsensor.

Die Phasenmessung scheint von diesem Phänomen weniger stark betroffen zu sein, so dass die HPTS-Abklingzeit aus der Phaseninformation mit Rhodamin B als Referenz ermittelt wurde. Die gemessene Phasenabklingzeit beträgt $\tau_D = 4,4 \text{ ns}$ und liegt nach Literaturangaben in einem plausiblen Bereich. Die in [63] zusammengetragenen Abklingzeiten des HPTS berücksichtigen zwei, vom pH-Wert abhängige Erscheinungsformen des Moleküls: das protonierte Molekül in saurem Milieu mit einer Abklingzeit von $4,1 \text{ ns}$ und das deprotonierte Molekül in basischem Milieu mit einer Abklingzeit von $5,5 \text{ ns}$. Da das HPTS in einer pH-neutralen Pufferlösung dissoziiert ist, kommen wahrscheinlich die protonierte und deprotonierte Form mit einer resultierenden Abklingzeit vor, die den gemessenen Wert plausibel erscheinen lässt.

Mit der Kenntnis der HPTS-Abklingzeit steht somit eine zweite Referenzierungsmöglichkeit für den HPTS-typischen Spektralbereich zur Verfügung. Die Frequenzgänge des Demodulationsindex und der Phase der separaten Rhodamin B- und HPTS-Messungen zeigen im Bode-Diagramm (siehe Abbildung 6.9) eine sehr gute Reproduzierbarkeit; die HPTS-Messung wurde auf sich selbst referenziert und – wie beim Rhodamin B – ein Zweiniveausystem mit einer Abklingzeit von $\tau_D = 4,4 \text{ ns}$ angenommen.

Die Messungen der Mischung von HPTS als Donormolekül und Rhodamin B als Akzeptormolekül zeigen im Bode-Diagramm deutliche Hinweise auf einen Energietransfer. Die durch den Donor an den Akzeptor übertragene Energie führt zu einer zusätzlich verzögerten Systemantwort des Akzeptors, so dass die Lumineszenz der Rhodamin B-Komponente gegenüber dem reinen Rhodamin B und sogar dem reinen HPTS stärker verzögert ist (siehe Frequenzgänge der Rhodamin B-Komponente, roter Pfeil). Durch die zusätzliche Energietransferrate wird der angeregte Zustand des HPTS rascher deaktiviert, so dass seine Zeitkonstante reduziert und die Systemantwort der HPTS-Komponente beschleunigt wird (siehe Frequenzgänge der HPTS-Komponente, blauer Pfeil).

Die Anpassung der Modellparameter des FRET-Systems aus Abschnitt 4.4 an die Messergebnisse gestaltete sich schwierig, insbesondere die Abschätzung der Energietransferraten k_{DA} , k_{AD} und somit des Koppelwiderstands R_{ET} . Das Hauptproblem war dabei die teils unzureichende Konvergenz der Optimierung mittels nichtlinearer Regression.

Es erscheint zunächst widersprüchlich, dass die reversible Energietransferrate k_{AD} mit $3,42 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ größer ist als die Energietransferrate k_{DA} mit $2,38 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$. Die Raten stellen jedoch Übergangswahrscheinlichkeiten dar, so dass die tatsächlichen Übergänge auch von den Dichten der Zustände n_D und n_A abhängen (siehe Kapitel 4). Im statischen Fall ($dn_A(t)/dt = 0$) ergibt sich mit Gleichung (4.17) und den im Obigen ermittelten Raten für das Verhältnis der beiden angeregten Zustände

$$\frac{n_A}{n_D} = \frac{k_{DA}}{\Gamma_A + k_{AD}} \approx 0,06. \quad (7.1)$$

Die Dichte n_D ist somit etwa um den Faktor 16,78 größer als n_A . Werden die Übergänge für den normalen und reversiblen Energietransfer gegenübergestellt, ist mit Gleichung (7.1) und

$$\frac{n_D k_{DA}}{n_A k_{AD}} = 1 + \frac{\Gamma_A}{k_{AD}} \approx 1,17 \quad (7.2)$$

ersichtlich, dass der resultierende Energietransfer vom Donor zum Akzeptor stattfindet und nicht umgekehrt.

Die Modellierung des FRET-Systems mit Hilfe von Ratengleichungen (siehe Abschnitt 4.4) zeigt, dass die Übertragungsfunktion des Donors mit zwei Polstellen und einer Nullstelle detaillierter beziehungsweise exakter ist als die Betrachtung eines Löschesprozesses eines einfachen Zweiniveausystems (siehe Abschnitte 2.4 und 4.1). Bei letzterem handelt es sich um ein Tiefpasssystem erster Ordnung, welches

nur eine Polstelle besitzt und bei dem die Abklingzeit und die statische Lumineszenzintensität durch Löschung in gleichem Verhältnis reduziert werden. In Tabelle 7.1 sind die positiven Eckfrequenzen der Polstellen und der Nullstelle der Übertragungsfunktion des Donors aus Gleichung (4.22) wiedergegeben.

Eckfrequenz	Wert [MHz]
f_{P_1}	39,478
f_{P_2}	670,353
f_N	635,776

Tabelle 7.1: Positive Eckfrequenzen der Polstellen und der Nullstelle der Übertragungsfunktion des Donors

Die Eckfrequenzen f_{P_2} und f_N sind groß gegenüber f_{P_1} und liegen darüber hinaus relativ dicht beieinander. Die Polstelle s_{P_2} und die Nullstelle s_N heben sich in guter Näherung in ihrer Wirkung im Frequenzgang auf, so dass die dominante Polstelle s_{P_1} verbleibt. Diesem vereinfachten Tiefpasssystem erster Ordnung lässt sich somit die Zeitkonstante beziehungsweise Abklingzeit $\tau'_D = \omega_{P_1}^{-1}$ zuordnen. Das Verhältnis dieser reduzierten Abklingzeit zu der Abklingzeit des reinen Donors ist $\tau'_D/\tau_D \approx 0,916$.

Wird dagegen die statische Lumineszenzintensität des Donors betrachtet, so ist sie nach Gleichung (4.20) $H_D(0) \approx 0,869$ und somit vom obigen Abklingzeitverhältnis leicht verschieden. Dies zeigt, dass das dynamische Verhalten des Förster-Energietransfers strenggenommen von der Lumineszenzlöschung unterschieden werden muss.

Nichtsdestoweniger lässt sich mit Hilfe der Gleichung (4.7) die Rate k_{FRET} aus Gleichung (2.21) in Form der Rate k_{nr} ausdrücken. Mit $k_{\text{nr}} = k_{\text{FRET}}$, $\tau_0 = \tau_D$ und $\tau = \tau'_D$ ergibt sich

$$k_{\text{FRET}} = \frac{1}{\tau'_D} - \frac{1}{\tau_D} \approx 2,08 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}. \quad (7.3)$$

Damit lässt sich mit Gleichung (2.21) für den Förster-Radius $R \approx 1,49 \cdot R_0$ abschätzen.

Weitere Unsicherheiten existieren in der spektralen Anregung und Isolation beider Komponenten. Das erstellte FRET-Modell berücksichtigt die ausschließliche Anregung des Donormoleküls, während bei der Messung ein kleiner Teil der optischen Anregung auch das Akzeptormolekül direkt anregt. Darüber hinaus überlappen die Donor- und Akzeptorlumineszenzen spektral, so dass mit den eingesetzten Filtern keine absolute spektrale Trennung gewährleistet werden kann. Durch das Vorkommen der protonierten und deprotonierten Form des HPTS kommt es zu einer spektralen Überlappung der Emission mit der Absorption dieser beiden chemischen Spezies [63], so dass ein Homo-FRET [11, 44] nicht ausgeschlossen werden kann.

Zudem betragen die effektiven Belichtungszeiten knapp eine halbe Sekunde. Eine höhere Anregungsintensität würde das erreichbare Signal-Rausch-Verhältnis sicherlich deutlich erhöhen.

Die extrahierten Modellparameter stellen zwar keine sicheren Werte dar, demonstrieren jedoch die Anwendbarkeit des FRET-Modells auf ein reales System. Insbesondere die Phasengänge zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit der Modellierung. Das entworfene FRET-Modell sollte jedoch in zukünftigen Messungen auch an anderen FRET-Systemen erprobt werden.

7.6 Schlussfolgerung

Die Messungen mit der entwickelten Lumineszenzabklingzeitkamera zeigen trotz der im Laufe der Arbeit festgestellten Unzulänglichkeiten des Bildsensors das Potenzial, exakte und reproduzierbare Abklingzeitmessungen in einem großen Modulationsfrequenzbereich durchzuführen. Die Handhabbarkeit des Kamerasystems und die einfache Bedienung ermöglichen zahlreiche weitere Anwendungsmöglichkeiten.

Die gute Übereinstimmung der Modellsimulationen mit den tatsächlichen Messergebnissen demonstriert die Anwendbarkeit der elektrischen Ersatzschaltungen auf lumineszente Systeme. Die Modelle lassen sich unter Fortführung der elektrotechnischen Methodik weiterentwickeln und auf komplexere Systeme anwenden.

8 Ausblick

Der nächste Schritt in der Kameraentwicklung stellt die Korrektur der bildsensortypischen Pixelfehler in der Kamera dar. Zusammen mit einer Linearitätskorrektur sind höhere Signal-Rausch-Verhältnisse und weniger fehlerbehaftete Phasen- und Demodulationsindexinformation sowie abgeleitete Lumineszenzabklingzeiten zu erwarten. Nach diesen Maßnahmen ist eine Charakterisierung der Kamera nach dem EMVA Standard 1288 [23] möglich.

Es ist vorgesehen, dass die Kamera intern die numerische harmonische Analyse sowie die Referenzierung für eine oder mehrere Modulationsfrequenzen durchführt. Die notwendigen Ressourcen sind hierfür bereitgestellt. Darüber hinaus wäre es möglich, optisch mit der dreifachen Modulationsfrequenz (bis zu 150 MHz) anzuregen und bei der Abtastung der Kreuzkorrelationsfunktion mit 16 äquidistanten Phasen unter Einhaltung des Nyquist-Shannon-Abtasttheorems die dritte Harmonische zu rekonstruieren. Der in Abschnitt 3.3.2 formulierten Amplitudendämpfung der dritten Harmonischen um den Faktor 3 steht ein doppelt so hohes Signal-Rausch-Verhältnis gegenüber, da im Vergleich zur Grundschiwingung mit 16 statt 4 Phasen abgetastet wird. Mit der dreifachen Modulationsfrequenz ließen sich optimale Arbeitspunkte zur Bestimmung von Abklingzeiten bis hinunter zu 1 ns realisieren.

Für exakte Messungen der Abklingzeiten sind zuverlässige und gegenüber ihrer Umgebung (zum Beispiel Temperatur) stabile Referenzstandards mit definierten Abklingzeiten und Emissionen in verschiedenen Spektralbereichen notwendig. Ein aktuelles Projekt zu diesem Thema ist das von der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) durchgeführte Programm „MNPQ-Transfer“. Die Referenzierung in ähnlichem Spektralbereich vereinfacht den Messablauf, da die Probe durch die Referenz ersetzt werden kann, ohne den optischen Pfad (Farbfilter, Strahlteiler) modifizieren zu müssen.

Die Impedanzmodelle haben sich als ein nützliches und durch elektrotechnische Grundlagen gut untersuchtes Werkzeug zur Beschreibung der Lumineszenzdynamik erwiesen. Für Entwürfe erweiterter oder neuer Impedanzmodelle komplexerer Systeme stehen bereits erprobte Simulationswerkzeuge (theoretische Methoden sowie Simulations-Software wie SPICE) zur Verfügung, so dass sie vorab intuitiver und mit grafischer Unterstützung untersucht und entsprechende Messungen an realen Proben geplant werden können.

Zukünftige Abklingzeitmessungen in verschiedensten Bereichen wie Luftströmungsmessungen mit partialdruckabhängigen Farben (PSP: *pressure-sensitive paint*) oder Zelluntersuchungen in der biomedizinischen Forschung können durch Einsatz der in vorliegender Arbeit entwickelten Kamera deutlich kompakter und

unkomplizierter durchgeführt werden, zumal bestehende Messsysteme nur durch die Kamera und gegebenenfalls eine andere modulierbare Lichtquelle ersetzt werden müssten.

Eine zukünftig geplante Anwendung der Kamera in einem mobilen System findet sich in der Endoskopie des oberen Luft-Speisewegs zur Identifikation von Krebszellen. Dieses Vorhaben wird innerhalb des aktuellen FLENDOS-Projekts, gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), durchgeführt. Abbildung 8.1 zeigt den vorläufigen Versuchsaufbau und dokumentiert die einzelnen Komponenten.

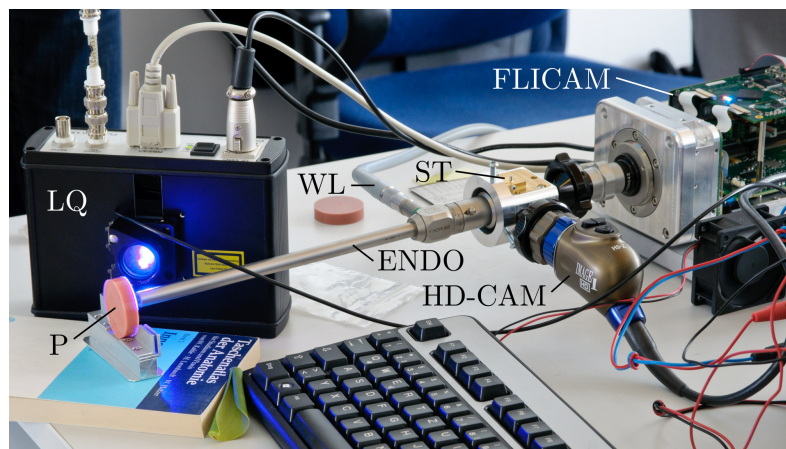


Abbildung 8.1: Experimenteller Versuchsaufbau mit der Abklingzeitkamera (FLICAM), einem starren Endoskop (ENDO) mit einem Strahlteiler (ST) und einer HD-Farbkamera (HD-CAM) (KARL STORZ GmbH & Co. KG) sowie der Beleuchtungseinheit mit moduliertem Laserlicht (LQ). Die untersuchte Probe (P) – in diesem Fall ein Autofluoreszenzmodell für menschliches Gewebe – wird entweder mit Weißlicht (WL) beleuchtet und mit der Farbkamera aufgenommen oder mit moduliertem Laserlicht die Abklingzeitverteilung mit Hilfe der FLICAM bestimmt.

Hierfür ist vorgesehen, das Laserlicht zukünftig in die Beleuchtungsfaser des Endoskops einzukoppeln. In Kombination mit im Weißlicht aufgenommenen Farbbildern können in diese Abklingzeitinformationen eingeblendet und somit Bereiche krankhaften Gewebes, das (möglicherweise) andere Abklingzeiten aufweist, differenziert werden.

Abbildung 8.2 zeigt die Phasenabklingzeitverteilung des Autofluoreszenzmodells, in der sich zwei Bereiche mit unterschiedlichen Abklingzeiten (etwa 3,6 ns und 4,6 ns) differenzieren lassen.

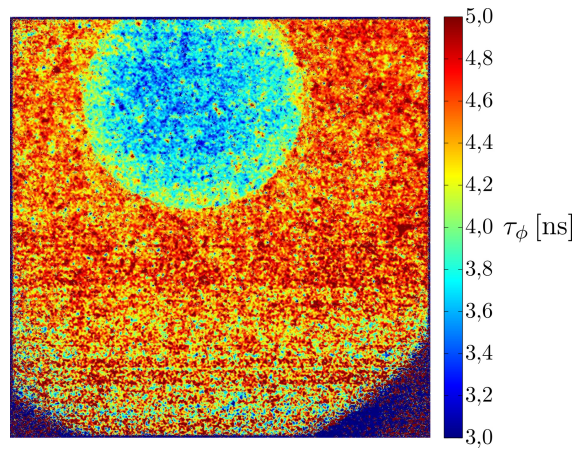


Abbildung 8.2: Phasenabklingzeitverteilung des Autofluoreszenzmodells, gemessen bei einer Modulationsfrequenz von 20 MHz.

A Mathematische Herleitungen

A.1 Kreuzkorrelation mit einer harmonischen Funktion

Mit der Periodendauer T sowie der Kreisfrequenz ω_0 ist $t'/T = \phi'/2\pi$ und $T = 2\pi/\omega_0$. Die Kreuzkorrelationsfunktion

$$c(t') = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{t=0}^T g_{\text{det}}(t) \cdot g(t+t') dt \quad (\text{A.1})$$

der harmonischen Funktion $g(t)$ aus Gleichung (3.5) mit der Zeitverschiebung t' in $g(t)$ und der Detektorfunktion $g_{\text{det}}(t)$ aus Gleichung (3.6) lässt sich als Kreuzkorrelationsfunktion mit der Phasenverschiebung ϕ' schreiben

$$\begin{aligned} c(\phi') &= \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{t=0}^T g_{\text{det}}(t) \cdot g\left(t + \frac{\phi'}{\omega_0}\right) dt \\ &= \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{t=0}^{\frac{T}{2}} 1 + m_0 \cos\left(\omega_0\left(t + \frac{\phi'}{\omega_0}\right) + \phi_0\right) dt \\ &= \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \left[\frac{T}{2} + m_0 \int_{t=0}^{\frac{T}{2}} \cos(\omega_0 t + \phi' + \phi_0) dt \right] \\ &= \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \left[\frac{T}{2} + \frac{m_0}{\omega_0} \sin(\omega_0 t + \phi' + \phi_0) \Big|_{t=0}^{\frac{T}{2}} \right] \\ &= \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \left\{ \frac{T}{2} + \frac{m_0}{\omega_0} [\sin(\pi + \phi' + \phi_0) - \sin(\phi' + \phi_0)] \right\} \\ &= \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \left[\frac{T}{2} - \frac{2m_0}{\omega_0} \sin(\phi' + \phi_0) \right] \\ &= \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \left[\frac{T}{2} - \frac{T}{\pi} m_0 \sin(\phi' + \phi_0) \right] \\ &= \frac{1}{2} - \frac{m_0}{\pi} \sin(\phi' + \phi_0) \end{aligned}$$

$$= \frac{1}{2} \left(1 - \frac{2m_0}{\pi} \sin(\phi' + \phi_0) \right). \quad (\text{A.2})$$

A.2 Kreuzkorrelation mit einer Fourier-Reihe

Mit der Fourier-Reihe für $g(t)$ aus Gleichung (3.9) und der Detektorfunktion $g_{\text{det}}(t)$ aus Gleichung (3.6) ist die resultierende Kreuzkorrelationsfunktion mit der Phasenverschiebung ϕ' und dem Vorgehen aus Abschnitt A.1

$$\begin{aligned}
c(\phi') &= \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{t=0}^T g_{\text{det}}(t) \cdot g\left(t + \frac{\phi'}{\omega_0}\right) dt \\
&= \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{t=0}^{\frac{T}{2}} 1 + \sum_{n=1}^{\infty} f_n m_n \cos\left(n\omega_0\left(t + \frac{\phi'}{\omega_0}\right) + \phi_n\right) dt \\
&= \frac{1}{2} + \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{t=0}^{\frac{T}{2}} \sum_{n=1}^{\infty} f_n m_n \cos(n\omega_0 t + n\phi' + \phi_n) dt \\
&= \frac{1}{2} + \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \sum_{n=1}^{\infty} \left(f_n m_n \int_{t=0}^{\frac{T}{2}} \cos(n\omega_0 t + n\phi' + \phi_n) dt \right) \\
&= \frac{1}{2} + \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{f_n m_n}{n\omega_0} \sin(n\omega_0 t + n\phi' + \phi_n) \Big|_{t=0}^{\frac{T}{2}} \right) \\
&= \frac{1}{2} + \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{\omega_0 T} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{f_n m_n}{n} (\sin(n\pi + n\phi' + \phi_n) - \sin(n\phi' + \phi_n)) \\
&= \frac{1}{2} - \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{2}{\omega_0 T} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{f_{2n-1} m_{2n-1}}{2n-1} \sin((2n-1)\phi' + \phi_n) \\
&= \frac{1}{2} - \frac{1}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{f_{2n-1} m_{2n-1}}{2n-1} \sin((2n-1)\phi' + \phi_n) \\
&= \frac{1}{2} \left[1 - \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{f_{2n-1} m_{2n-1}}{2n-1} \sin((2n-1)\phi' + \phi_n) \right]. \quad (\text{A.3})
\end{aligned}$$

A.3 Sensitivität und optimale Modulationsfrequenz für eine Komponente

Der Realteil der normierten Übertragungsfunktion $H_n(i\omega, \tau)$ eines Zweikomponentensystems aus Gleichung (2.8) ist

$$\Re \{H_n(i\omega, \tau)\} = \frac{1}{1 + \omega^2\tau^2} \quad (\text{A.4})$$

und der Imaginärteil

$$\Im \{H_n(i\omega, \tau)\} = -\frac{\omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2}. \quad (\text{A.5})$$

Die partiellen Ableitungen von Gleichungen (A.4) und (A.5) nach τ sind

$$\frac{\partial}{\partial\tau} \Re \{H_n(i\omega, \tau)\} = -\frac{2\omega^2\tau}{(1 + \omega^2\tau^2)^2} \quad (\text{A.6})$$

und

$$\frac{\partial}{\partial\tau} \Im \{H_n(i\omega, \tau)\} = -\frac{\omega - \omega^3\tau^2}{(1 + \omega^2\tau^2)^2}. \quad (\text{A.7})$$

Mit den Gleichungen (A.6) und (A.7) lässt sich für den Radius $R(\omega, \tau)$ schreiben

$$\begin{aligned} R^2(\omega, \tau) &= \left(\frac{\partial}{\partial\tau} \Re \{H_n(i\omega, \tau)\} \right)^2 + \left(\frac{\partial}{\partial\tau} \Im \{H_n(i\omega, \tau)\} \right)^2 \\ &= \frac{4\omega^4\tau^2 + \omega^2 - 2\omega^4\tau^2 + \omega^6\tau^4}{(1 + \omega^2\tau^2)^4} \\ &= \frac{\omega^6\tau^4 + 2\omega^4\tau^2 + \omega^2}{(1 + \omega^2\tau^2)^4} \\ &= \frac{\omega^2(1 + \omega^2\tau^2)^2}{(1 + \omega^2\tau^2)^4} \\ &= \frac{\omega^2}{(1 + \omega^2\tau^2)^2} \\ \Rightarrow R(\omega, \tau) &= \frac{\omega}{1 + \omega^2\tau^2}. \end{aligned} \quad (\text{A.8})$$

Die zweite partielle Ableitung von $R(\omega, \tau)$ nach ω ist mit Gleichung (3.19)

$$\frac{\partial^2}{\partial\omega^2} R(\omega, \tau) = \frac{-2\omega\tau^2(1 + \omega^2\tau^2)^2 - (1 - \omega^2\tau^2)2(1 + \omega^2\tau^2)2\omega\tau^2}{(1 + \omega^2\tau^2)^4}$$

$$\begin{aligned}
 &= \frac{2\omega\tau^2 (\omega^4\tau^4 - 2\omega^2\tau^2 - 3)}{(1 + \omega^2\tau^2)^4} \\
 &= \frac{2\omega\tau^2 \left((\omega^2\tau^2 - 1)^2 - 4 \right)}{(1 + \omega^2\tau^2)^4}.
 \end{aligned} \tag{A.9}$$

Für $\omega = \omega_0 = \tau^{-1}$ ist

$$\left. \frac{\partial^2}{\partial \omega^2} R(\omega, \tau) \right|_{\omega=\omega_0=\frac{1}{\tau}} = -\frac{\tau}{2}. \tag{A.10}$$

A.4 Sensitivität und optimale Modulationsfrequenz für zwei Komponenten

Mit $a = \tau_2 - \tau_1$, $b = \tau_1^2 + \tau_2^2$ und $c = \tau_1^2\tau_2^2$ ist

$$\begin{aligned}
 r(\omega) &= |H_{1,n}(i\omega) - H_{2,n}(i\omega)| \\
 &= \left| \frac{i\omega(\tau_2 - \tau_1)}{1 - \omega^2\tau_1\tau_2 + i\omega(\tau_1 + \tau_2)} \right| \\
 &= \frac{\omega(\tau_2 - \tau_1)}{\sqrt{(1 - \omega^2\tau_1\tau_2)^2 + \omega^2(\tau_1 + \tau_2)^2}} \\
 &= \frac{\omega(\tau_2 - \tau_1)}{\sqrt{1 + \omega^2(\tau_1^2 + \tau_2^2) + \omega^4\tau_1^2\tau_2^2}} \\
 &= \frac{a\omega}{\sqrt{1 + b\omega^2 + c\omega^4}}.
 \end{aligned} \tag{A.11}$$

Mit Gleichung (3.25) ist die zweite Ableitung von $r^2(\omega)$

$$\begin{aligned}
 \frac{d^2}{d\omega^2} r^2(\omega) &= \frac{1}{(1 + b\omega^2 + c\omega^4)^4} 2a^2 (1 - 2b\omega^2 - (3b^2 + 11c)\omega^4 - 16bc\omega^6 \\
 &\quad - (9c^2 + b^2c)\omega^8 + 2bc^2\omega^{10} + 3c^3\omega^{12}).
 \end{aligned} \tag{A.12}$$

Bei $\omega = \omega_1 = 0$ ist das Extremum mit

$$\left. \frac{d^2}{d\omega^2} r^2(\omega) \right|_{\omega=\omega_1=0} = 2a^2 > 0 \tag{A.13}$$

ein Minimum.

A.5 Reelle Polstellen

Für die Raten Γ_D , Γ_A , k_{DA} und $k_{AD} > 0$ gilt

$$\begin{aligned}
\alpha^2 - 4\beta &= (\Gamma_D + \Gamma_A + k_{DA} + k_{AD})^2 - 4(\Gamma_D\Gamma_A + \Gamma_A k_{DA} + \Gamma_D k_{AD}) \\
&= \Gamma_D^2 + \Gamma_A^2 + k_{DA}^2 + k_{AD}^2 + 2\Gamma_D\Gamma_A + 2\Gamma_D k_{DA} + 2\Gamma_D k_{AD} + 2\Gamma_A k_{DA} \\
&\quad + 2\Gamma_A k_{AD} + 2k_{DA}k_{AD} - 4\Gamma_D\Gamma_A - 4\Gamma_A k_{DA} - 4\Gamma_D k_{AD} \\
&= \Gamma_D^2 + \Gamma_A^2 + k_{DA}^2 + k_{AD}^2 - 2\Gamma_D\Gamma_A + 2\Gamma_D k_{DA} - 2\Gamma_D k_{AD} - 2\Gamma_A k_{DA} \\
&\quad + 2\Gamma_A k_{AD} + 2k_{DA}k_{AD} \\
&= (\Gamma_D + k_{DA})^2 + (\Gamma_A + k_{AD})^2 - 2(\Gamma_D + k_{DA})(\Gamma_A + k_{AD}) + 4k_{DA}k_{AD} \\
&= (\Gamma_D + k_{DA} - \Gamma_A - k_{AD})^2 + 4k_{DA}k_{AD} > 0.
\end{aligned} \tag{A.14}$$

A.6 Lage der Pol- und Nullstellen

Mit $s_{P,1} = \left(-\alpha + \sqrt{\alpha^2 - 4\beta}\right)/2$, $s_N = -\gamma_A$ und Gleichung (A.14) ist

$$\begin{aligned}
&s_{P,1} > s_N \\
&\Leftrightarrow -s_{P,1} < -s_N \\
&\Leftrightarrow \frac{1}{2} \left(\alpha - \sqrt{\alpha^2 - 4\beta} \right) < \gamma_A \\
&\Leftrightarrow \frac{1}{2} \left(\Gamma_D + \Gamma_A + k_{DA} + k_{AD} \right. \\
&\quad \left. - \sqrt{(\Gamma_D + k_{DA} - \Gamma_A - k_{AD})^2 + 4k_{DA}k_{AD}} \right) < \Gamma_A + k_{AD} \\
&\Leftrightarrow \frac{1}{2} \left(\Gamma_D + k_{DA} - \Gamma_A - k_{AD} \right. \\
&\quad \left. - \sqrt{(\Gamma_D + k_{DA} - \Gamma_A - k_{AD})^2 + 4k_{DA}k_{AD}} \right) < 0 \\
&\Leftrightarrow \Gamma_D + k_{DA} - \Gamma_A - k_{AD} < \sqrt{(\Gamma_D + k_{DA} - \Gamma_A - k_{AD})^2 + 4k_{DA}k_{AD}}
\end{aligned} \tag{A.15}$$

wahr. Mit $s_{P,2} = \left(-\alpha - \sqrt{\alpha^2 - 4\beta}\right)/2$ ist

$$\begin{aligned}
& s_{P,2} < s_N \\
\Leftrightarrow & -s_{P,2} > -s_N \\
\Leftrightarrow & \frac{1}{2} \left(\alpha + \sqrt{\alpha^2 - 4\beta} \right) > \gamma_A \\
\Leftrightarrow & \frac{1}{2} \left(\Gamma_D + \Gamma_A + k_{DA} + k_{AD} \right. \\
& \quad \left. + \sqrt{(\Gamma_D + k_{DA} - \Gamma_A - k_{AD})^2 + 4k_{DA}k_{AD}} \right) > \Gamma_A + k_{AD} \tag{A.16} \\
\Leftrightarrow & \frac{1}{2} \left(\Gamma_D + k_{DA} - \Gamma_A - k_{AD} \right. \\
& \quad \left. + \sqrt{(\Gamma_D + k_{DA} - \Gamma_A - k_{AD})^2 + 4k_{DA}k_{AD}} \right) > 0 \\
\Leftrightarrow & \Gamma_D + k_{DA} - \Gamma_A - k_{AD} > -\sqrt{(\Gamma_D + k_{DA} - \Gamma_A - k_{AD})^2 + 4k_{DA}k_{AD}}
\end{aligned}$$

wahr.

A.7 Koeffizientenvergleich und Impedanzen

Durch Koeffizientenvergleich der Übertragungsfunktion $H_D(s)$ aus Gleichung (4.20) mit $G_D(s)$ aus Gleichung (4.25) ergibt sich folgendes Gleichungssystem, das die Impedanzen R_D , C_D , R_{ET} , R_A und C_A des FRET-Systems eindeutig bestimmt.

$$\frac{\Gamma_D \gamma_A}{\beta} = \frac{\Gamma_D (\Gamma_A + k_{AD})}{\Gamma_D \Gamma_A + \Gamma_A k_{DA} + \Gamma_D k_{AD}} = \frac{R_A + R_{ET}}{R_D + R_A + R_{ET}} \tag{A.17}$$

$$\gamma_A = \Gamma_A + k_{AD} = \frac{R_A + R_{ET}}{R_A R_{ET} C_A} \tag{A.18}$$

$$\begin{aligned}
\frac{\alpha}{\beta} &= \frac{\Gamma_D + \Gamma_A + k_{DA} + k_{AD}}{\Gamma_D \Gamma_A + \Gamma_A k_{DA} + \Gamma_D k_{AD}} \\
&= \frac{R_A R_{ET} C_A + R_D R_A C_D + R_D R_{ET} C_D + R_D R_A C_A}{R_D + R_A + R_{ET}} \tag{A.19}
\end{aligned}$$

$$\beta = \Gamma_D \Gamma_A + \Gamma_A k_{DA} + \Gamma_D k_{AD} = \frac{R_D + R_A + R_{ET}}{R_D R_A R_{ET} C_D C_A} \tag{A.20}$$

B Frequenzverhalten der Lichtquellen

B.1 Frequenzgang der Laserlichtquelle

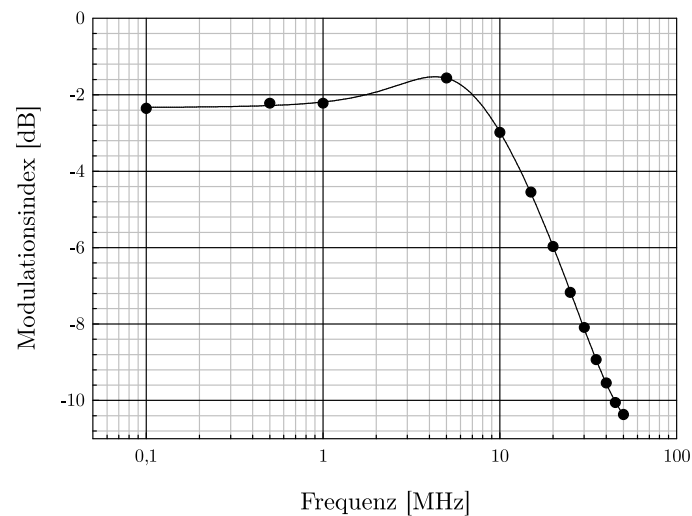


Abbildung B.1: Gemessener Frequenzgang des Modulationsindex der Laserlichtquelle bei einer mittleren optischen Leistung der Laserdiode von 50 mW bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm

B.2 Grenzfrequenzen von Lumineszenzdiolen (LEDs)

Tabelle B.1: Schaltcharakteristika verschiedener Lumineszenzdiolen mit unterschiedlichen mittleren Emissionswellenlängen λ . Die Anstiegs- und Abfallzeiten t_r und t_f (bezogen auf 10 % – 90 % der optischen Leistung) wurden aus Transientenmessungen bei den Frequenzen f_{tran} und die –3 dB-Grenzfrequenzen f_g bei sinusförmiger Ansteuerung mit angegebenem elektrischen Gleichstrom im Arbeitspunkt I_{DC} gemessen.

Hersteller	Bezeichnung	λ [nm]	I_{DC} [mA]	t_r [ns]	t_f [ns]	f_{tran} [MHz]	f_g [MHz]
EPIGAP Optoelektronik GmbH	ELD-475-524-1	475	20	23	41	2,5	16,9
	ELD-525-523	515	20	16	35	5	18,7
	ELD-625-523	625	20	24	26	5	16,6
	ELD-630-524	630	20	24	24	3	17,1
Kingbright Elec. Co., Ltd.	L-7113 UVC	400	20	16	19	5	18,7
MARL international limited	NSPB 500S	470	20	25	51	2	14,5
OSA Opto Light GmbH	OCU-400 403OS-X	400	20	29	21	2,5	16,3
	OCL-400 EB460-X	460	20	39	50	2,5	15,7
OSRAM Opto Semiconductors GmbH	LB 543C	470	20	15	18	5	18,6
	LB E6SG	469	30	15	23	5	18
	LB G6SP	470	140	51	80	2	7,1
	LB W5SN	470	222	69	122	1,5	5
	LT W5SN	528	222	59	95	1,5	5,9
	LR W5SN	625	222	65	98	2	5
Philips Lumileds Lighting Company	LXML-PR01-0275	455	222	106	217	1	3
	LXHL-LM3C	530	222	89	184	1	3,4
	LXHL-LB3C	470	222	87	138	1	4,8
Roithner Lasertechnik GmbH	M3L1-HB-60	470	222	126	222	0,5	2,9

Tabelle B.1: (Fortsetzung)

Hersteller	Bezeichnung	λ [nm]	I_{DC} [mA]	t_r [ns]	t_f [ns]	f_{tran} [MHz]	f_g [MHz]
	M3L1-HU-60	400	222	140	166	0,5	3,5
	M3L1-HG-30	525	222	99	156	1	4,6
	M3L1-HR-30	625	222	80	119	1	5,4
	ELJ-630-628	630	222	68	94	2	5,7
	ELJ-525-627	525	222	53	104	2	6,8
	ELJ-465-627	465	222	83	158	1	5,2
	H2A1-H650	650	222	173	179	1	2,9
	H2A1-H390	390	222	98	105	1	5,3
	H-HP803NB	470	222	95	154	1	4,5
	H-HP803PG	530	222	83	149	1	5,2
	H-HP803NR	625	222	116	192	1	3,1
	5B4HCA-H	470	20	91	119	1	7,8
Roithner Lasertechnik GmbH	5P4FCA	405	20	14	18	5	22,9
	5G4HCA-H	525	20	26	43	4	14,8
	5R3BCA-H	632	20	37	35	2	12,6
	LED375-33	375	20	14	16	4	23,3
	LED405-03V	405	20	26	25	2	17,5
	LED425-6-30	425	20	24	24	2	17,4
	B5B-437-CV	400	20	14	17	5	20,6
	B5-433-B525	525	20	12	31	5	21,3
	B5-435-TL	628	20	19	22	5	17,7
	RLS-UV370	370	20	10	14	5	23,4
	RLS-UV400	400	20	19	20	5	19,2
	RLS-410-3-25	410	20	14	17	5	20,8
	RLS-5B475-S	477	20	40	66	2	9,3

Tabelle B.1: (Fortsetzung)

Hersteller	Bezeichnung	λ [nm]	I_{DC} [mA]	t_r [ns]	t_f [ns]	f_{tran} [MHz]	f_g [MHz]
Roithner Lasertechnik GmbH	NS375L-5RLO	375	20	16	17	5	23,8
	L5T15B	470	20	14	23	5	20,2
	UVLED370-10	370	14,8	14	18	5	23,4
Seoul Semiconductor	B32280-01	460	222	124	226	1	3,2
	D32280-01	460	222	105	192	1	3,6
	C32280-01	505	222	106	201	1	3,6
	G32280-01	527	222	115	212	1	3,3

Literaturverzeichnis

- [1] R.M. Ballew and J.N. Demas. An error analysis of the rapid lifetime determination method for the evaluation of single exponential decays. *Analytical Chemistry*, 61(1):30–33, 1989.
- [2] H.-J. Bartsch. *Taschenbuch mathematischer Formeln*. Fachbuchverlag Leipzig, 18. edition, 1999.
- [3] Frank Robbert Boddeke. *Quantitative Fluorescence Microscopy: autofocusing, z-axis calibration, image sensors, fluorescence lifetime imaging*. PhD thesis, Delft University of Technology, 1998.
- [4] N. Boens, W. Qin, N. Basarić, J. Hofkens, M. Ameloot, J. Pouget, J.-P. Lefèvre, B. Valeur, E. Gratton, M. vandeVen, N. D. Jr. Silva, Y. Engelborghs, K. Willaert, A. Sillen, G. Rumbles, D. Phillips, A. J. W. G. Visser, A. van Hoek, J. R. Lakowicz, H. Malak, I. Gryczynski, A. G. Szabo, D. T. Krajcarski, N. Tamai, and A. Miura. Fluorescence lifetime standards for time and frequency domain fluorescence spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 79(5):2137–2149, 2007.
- [5] M. J. Booth and T. Wilson. Low-cost, frequency-domain, fluorescence lifetime confocal microscopy. *Journal of Microscopy*, 214(1):36–42, 2004.
- [6] S. M. Borisov, A. S. Vasylevska, C. Krause, and O. S. Wolfbeis. Composite luminescent material for dual sensing of oxygen and temperature. *Adv. Funct. Mater.*, 16:1536–1542, 2006.
- [7] J. W. Borst and A. J. W. G. Visser. Fluorescence lifetime imaging microscopy in life sciences. *Measurement Science and Technology*, 21(10), 2010.
- [8] I. N. Bronstein and K. A. Semendjajew. *Taschenbuch der Mathematik*. Verlag Harri Deutsch, Thun, 24 edition, 1989.
- [9] Ralf Brune. *Grenzen und Möglichkeiten des Förster Resonanz-Energietransfer – Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopische Untersuchung an starren Systemen*. PhD thesis, Universität Bielefeld, 2009.
- [10] Albert Edward Cerussi. *Quantitative Frequency-Domain Fluorescence Spectroscopy in Tissues and Tissue-Like Media*. PhD thesis, University of Illinois at Urbana-Champaign, 1999.

- [11] A. H. A. Clayton, Q. S. Hanley, D. J. Arndt-Jovin, V. Subramaniam, and T. M. Jovin. Dynamic fluorescence anisotropy imaging microscopy in the frequency domain (rflim). *Biophysical Journal*, 83(3):1631–1649, 2002.
- [12] A. H. A. Clayton, Q. S. Hanley, and P. J. Verveer. Graphical representation and multicomponent analysis of single-frequency fluorescence lifetime imaging microscopy data. *Journal of Microscopy*, 213(1):1–5, 2004.
- [13] R. M. Clegg, O. Holub, and C. Gohlke. *Biophotonics, Part A*, volume 360 of *Methods in Enzymology*, chapter [22] Fluorescence Lifetime-Resolved Imaging: Measuring Lifetimes in an Image, pages 509–542. Academic Press, 2003.
- [14] M. J. Cole, J. Siegel, S. E. D. Webb, R. Jones, K. Dowling, M. J. Dayel, D. Parsons-Karavassilis, P. M. W. French, M. J. Lever, L. O. D. Sucharov, M. A. A. Neil, R. Juškaitis, and T. Wilson. Time-domain whole-field fluorescence lifetime imaging with optical sectioning. *Journal of Microscopy*, 203(3):246–257, 2001.
- [15] R. A. Colyer, C. Lee, and E. Gratton. A novel fluorescence lifetime imaging system that optimizes photon efficiency. *Microscopy Research and Technique*, 71(3):201–213, 2008.
- [16] E. Condon. A theory of intensity distribution in band systems. *Physical Review*, 28:1182–1201, 1926.
- [17] J.N. Demas and B.A. DeGraff. Design and applications of highly luminescent transition metal complexes. *Analytical Chemistry*, 63(17):829–837, 1991.
- [18] John Safwat Eid. *Two-Photon Dual Channel Fluctuation Correlation Spectroscopy: Theory and Application*. PhD thesis, University of Illinois at Urbana-Champaign, 2002.
- [19] A. D. Elder, J. H. Frank, J. Swartling, X. Dai, and C. F. Kaminski. Calibration of a wide-field frequency-domain fluorescence lifetime microscopy system using light emitting diodes as light sources. *Journal of Microscopy*, 224:166 – 180, 2006.
- [20] A. D. Elder, S. M. Matthews, J. Swartling, K. Yunus, J. H. Frank, C. M. Brennan, A. C. Fisher, and C. F. Kaminski. The application of frequency-domain fluorescence lifetime imaging microscopy as a quantitative analytical tool for microfluidic devices. *Optics Express*, 14(12):5456–5467, 2006.
- [21] Alan Elder, Simon Schlachter, and C.F. Kaminski. Theoretical investigation of the photon efficiency in frequency-domain fluorescence lifetime imaging microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A*, 25:452 – 462, 2008.

-
- [22] D. S. Elson, V. Poher, C. Dunsby, J. Requejo-Isidro, P. M. W. French, and M. A. A. Neil. Video rate fluorescence lifetime imaging and structured illumination using a blue led. In *Focus on Microscopy*, 2005.
- [23] EMVA. *EMVA Standard 1288 - Standard for Characterization of Image Sensors and Cameras*. European Machine Vision Association, release 3.0 edition, November 2010.
- [24] Michael Erz. *Charakterisierung von Laufzeitkamarasystemen für Lumineszenzlebensdauer-messungen*. Dissertation, IWR, Fakultät für Physik und Astronomie, University of Heidelberg, 2011.
- [25] A. Esposito, H. C. Gerritsen, and F. S. Wouters. Fluorescence lifetime heterogeneity resolution in the frequency domain by lifetime moments analysis. *Biophysical Journal*, 89(6):4286–4299, 2005.
- [26] A. Esposito, T. Oggier, H. C. Gerritsen, F. Lustenberger, and F. S. Wouters. All-solid-state lock-in imaging for wide-field fluorescence lifetime sensing. *Optics Express*, 13(24):9812–9821, 2005.
- [27] Alessandro Esposito. *Molecular and Cellular Quantitative Microscopy Theoretical investigations, technological developments and applications to the neurosciences*. PhD thesis, Utrecht University, 2006.
- [28] F. Fereidouni, A. Esposito, G. A. Blab, and H. C. Gerritsen. A modified phasor approach for analyzing time-gated fluorescence lifetime images. *Journal of Microscopy*, 2011. early view.
- [29] Mario Frank, Matthias Plaue, Holger Rapp, Ullrich Köthe, Bernd Jähne, and Fred A. Hamprecht. Theoretical and experimental error analysis of continuous-wave time-of-flight range cameras. *Optical Engineering*, 48:013602, 2009.
- [30] T. Förster. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 6(2):55–75, 1948.
- [31] F. M. Gardner. *Phaselock Techniques*. Wiley-Interscience, 3rd edition, 2005.
- [32] B. Girod, R. Rabenstein, and A. Stenger. *Einführung in die Systemtheorie: Signale und Systeme in der Elektrotechnik und Informationstechnik*. B. G. Teubner, Wiesbaden, 3. edition, 2005.
- [33] S. Burak Gokturk, Hakan Yalcin, and Cyrus Bamji. A time-of-flight depth sensor - system description, issues and solutions. In *Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR) Workshop*, volume 3, 2004.
- [34] E. Gratton, S. Breusegem, J. Sutin, Q. Ruan, and N. Barry. Fluorescence lifetime imaging for the two-photon microscope: time-domain and frequency-domain methods. *Journal of Biomedical Optics*, 8(3):381–390, 2003.

- [35] E. Gratton, D. M. Jameson, N. Rosato, and G. Weber. Multifrequency cross-correlation phase fluorometer using synchrotron radiation. *Review of Scientific Instruments*, 55(4):486–494, 1984.
- [36] Q. S. Hanley. Spectrally resolved fluorescent lifetime imaging. *Journal of the Royal Society Interface*, 6(1):83–92, 2009.
- [37] Q. S. Hanley and A. H. A. Clayton. Ab-plot assisted determination of fluorophore mixtures in a fluorescence lifetime microscope using spectra or quenchers. *Journal of Microscopy*, 218(1):62–67, 2005.
- [38] P. Herman, B. P. Maliwal, H.-J. Lin, and J. R. Lakowicz. Frequency-domain fluorescence microscopy with the led as a light source. *Journal of Microscopy*, 203(2):176–181, 2001.
- [39] M. Hiebel. *Grundlagen der vektoriellen Netzwerkanalyse*. Rohde & Schwarz, 2. edition, 2007.
- [40] Michael H. W. Hoffmann. *Hochfrequenztechnik: ein systemtheoretischer Zugang*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1997.
- [41] O. Holub, M. J. Seufferheld, Gohlke C., Govindjee, and Clegg R. M. Fluorescence lifetime imaging (fli) in real-time – a new technique in photosynthesis research. *Photosynthetica*, 38(4):581–599, 2000.
- [42] D. M. Jameson, E. Gratton, and R. D. Hall. The measurement and analysis of heterogeneous emissions by multifrequency phase and modulation fluorometry. *Applied Spectroscopy Reviews*, 20(1):55–106, 1984.
- [43] J. Janesick and G. Putnam. Developments and applications of high-performance CCD and CMOS imaging arrays. *Annual Review of Nuclear and Particle Science*, 53:263–300, 2003.
- [44] E. A. Jares-Erijman and T. M. Jovin. FRET imaging. *Nature Biotechnology*, 21(11):1387–1395, 2003.
- [45] T. Kahlmann, F. Remondino, and H. Ingensand. Calibration for increased accuracy of the range imaging camera swissranger. *International Archives of Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*, XXXVI(5):136–141, 2006.
- [46] C. Klein, R. H. Engler, U. Henne, and W. E. Sachs. Application of pressure-sensitive paint for determination of the pressure field and calculation of the forces and moments of models in a wind tunnel. *Experiments in Fluids*, 39:475–483, 2005.
- [47] W. Koechner and M. Bass. *Solid-State Lasers: A Graduate Text*. Springer-Verlag, New York, 2003.

-
- [48] J. R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, 3. edition, 2006.
- [49] J. R. Lakowicz and A. Balter. Analysis of excited-state processes by phase-modulation fluorescence spectroscopy. *Biophysical Chemistry*, 16(2):117–132, 1982.
- [50] J. R. Lakowicz and A. Balter. Theory of phase-modulation fluorescence spectroscopy for excited-state processes. *Biophysical Chemistry*, 16(2):99–115, 1982.
- [51] R. Lange, P. Seitz, A. Biber, and S. Lauxtermann. Demodulation pixels in ccd and cmos technologies for time-of-flight ranging. In M. M. Blouke, N. Sampat, G. M. Jr. Williams, and T. Yeh, editors, *Sensors and Camera Systems for Scientific, Industrial, and Digital Photography Applications*, volume 3965, pages 177–188. SPIE, 2000.
- [52] Robert Lange. *3D Time-of-Flight Distance Measurement with Custom Solid-State Image Sensors in CMOS/CCD-Technology*. PhD thesis, Department of Electrical Engineering and Computer Science at University of Siegen, 2000.
- [53] Xuming Luan. *Experimental Investigation of Photonic Mixer Device and Development of TOF 3D Ranging Systems Based on PMD Technology*. PhD thesis, Department of Electrical Engineering and Computer Science, 2001.
- [54] M. D. Marazuela, M. C. Moreno-Bondi, and G. Orellana. Luminescence lifetime quenching of a ruthenium(II) polypyridyl dye for optical sensing of carbon dioxide. *Applied Spectroscopy*, 52:1314–1320, 1998.
- [55] A. C. Mitchell, J. E. Wall, J. G. Murray, and C. G. Morgan. Direct modulation of the effective sensitivity of a ccd detector: a new approach to time-resolved fluorescence imaging. *Journal of Microscopy*, 206(3):225–232, 2002.
- [56] A. C. Mitchell, J. E. Wall, J. G. Murray, and C. G. Morgan. Measurement of nanosecond time-resolved fluorescence with a directly gated interline ccd camera. *Journal of Microscopy*, 206(3):233–238, 2002.
- [57] T. Möller, H. Kraft, J. Frey, M. Albrecht, and R. Lange. Robust 3d measurement with pmd sensors. Technical report, PMDTec, 2005.
- [58] F. Moeller, H. Frohne, K.-H. Löcherer, and H. Müller. *Grundlagen der Elektrotechnik*. B. G. Teubner, Stuttgart, 18. edition, 1996.
- [59] Thierry Oggier, Michael Lehmann, Rolf Kaufmann, Matthias Schweizer, Michael Richter, Peter Metzler, Graham Lang, Felix Lustenberger, and Nicolas Blanc. An all-solid-state optical range camera for 3D real-time imaging with

- sub-centimeter depth resolution. In L. Mazuray, P.J. Rogers, and R. Wartmann, editors, *Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) Conference Series*, volume 5249, pages 534–545, 2 2004.
- [60] S. Pelet, M. J. R. Previte, L. H. Laiho, and P. T. C. So. A fast global fitting algorithm for fluorescence lifetime imaging microscopy based on image segmentation. *Biophysical Journal*, 87(4):2807–2817, 2004.
- [61] A. Periasamy, P. Wodnicki, X. F. Wang, S. Kwon, G. W. Gordon, and B. Herman. Time-resolved fluorescence lifetime imaging microscopy using a picosecond pulsed tunable dye laser system. *Review of Scientific Instruments*, 67(10):3722–3731, 1996.
- [62] Johan Philip and Kjell Carlsson. Theoretical investigation of the signal-to-noise ratio in fluorescence lifetime imaging. *Journal of the Optical Society of America A, optics, image science and vision.*, 20:368–379, 2 2003.
- [63] Cecile Prayer. *Etude du transfert photoinduit de proton dans un hydroxyarène, la pyranine. Compétition avec le transfert photoinduit d'électron à un accepteur, le méthylviologène*. PhD thesis, L'universite Paris VI, Frankreich, 1997.
- [64] William H. Press, Saul A. Teukolsky, William T. Vetterling, and Brian P. Flannery. *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, 2 edition, June 1992.
- [65] B. R. Rae, K. R. Muir, Z. Gong, J. McKendry, J. M. Girkin, E. Gu, D. Renshaw, and R. K. Dawson, M. D. Henderson. A cmos time-resolved fluorescence lifetime analysis micro-system. *Sensors*, 9(11):9255–9274, 2009.
- [66] H. Rapp, M. Frank, F.A. Hamprecht, and Bernd Jähne. A theoretical and experimental investigation of the systematic errors and statistical uncertainties of time-of-flight cameras. *Int. J. Intelligent Systems Technologies and Applications*, 5:402–413, 2008.
- [67] Holger Rapp. Experimental and theoretical investigation of correlating tof-camera systems. Diplomarbeit, IWR, Fakultät für Physik und Astronomie, Universität Heidelberg, 2007.
- [68] G. I. Redford and R. M. Clegg. Polar plot representation for frequency-domain analysis of fluorescence lifetimes. *Journal of Fluorescence*, 15(5):805–815, 2005.
- [69] Glen Ivan Redford. *Fast fluorescence lifetime imaging using a full-field homodyne system with applications in biology*. PhD thesis, University of Illinois at Urbana-Champaign, 2005.

-
- [70] Mirko Schmidt and Bernd Jähne. A physical model of time-of-flight 3d imaging systems, including suppression of ambient light. In R. Koch and A. Kolb, editors, *3rd Workshop on Dynamic 3-D Imaging*, volume 5742 of *Lecture Notes in Computer Science*, pages 1–15. Springer, 2009.
- [71] J. Sipior, G. M. Carter, J. R. Lakowicz, and G. Rao. Blue light-emitting diode demonstrated as an ultraviolet excitation source for nanosecond phase-modulation fluorescence lifetime measurements. *Review of Scientific Instruments*, 68(7):2666–2670, 1997.
- [72] S. W. Smith. *The Scientist and Engineer’s Guide to Digital Signal Processing*. California Technical Publishing, 1st edition, 1997.
- [73] A. Squire and P. I. H. Bastiaens. Three dimensional image restoration in fluorescence lifetime imaging microscopy. *Journal of Microscopy*, 193(1):36–49, 1999.
- [74] A. Squire, P. J. Verveer, and P. I. H. Bastiaens. Multiple frequency fluorescence lifetime imaging microscopy. *Journal of Microscopy*, 197:136 – 149, February 2000.
- [75] Christian Stehning. Aufbau eines dsp-gestützten signalverarbeitungssystems für temperaturkompensierte faseroptische sauerstoffsensoren. Diplomarbeit, Universität Bremen, 2001.
- [76] K. W. J. Stoop, L. K. van Geest, and C. J. R. van der Oord. Lifa system for fluorescence lifetime imaging microscopy (flim), May 2002. EMBO Practical Course “Light Microscopy of Live Specimens“ EMBL Heidelberg.
- [77] M. Straub and S. W. Hell. Fluorescence lifetime three-dimensional microscopy with picosecond precision using a multifocal multiphoton microscope. *Applied Physics Letters*, 73(13):1769–1771, 1998.
- [78] E. Terpetschnig, D. M. Jameson, and B. Barbieri. Frequency-domain spectroscopy using 280-nm and 300-nm leds. Application notes, ISS Inc., 2006.
- [79] U. Tietze and C. Schenk. *Halbleiter-Schaltungstechnik*. Springer-Verlag, 10. edition, 1993.
- [80] M. vandeVen, M. Ameloot, B. Valeur, and N. Boens. Pitfalls and their remedies in time-resolved fluorescence spectroscopy and microscopy. *Journal of Fluorescence*, 15(3):377–413, 2005.
- [81] P. J. Verveer, A. Squire, and P. I. H. Bastiaens. Global analysis of fluorescence lifetime imaging microscopy data. *Biophysical Journal*, 78(4):2127–2137, 2000.

- [82] G. Weber. Resolution of the fluorescence lifetimes in a heterogeneous system by phase and modulation measurements. *The Journal of Physical Chemistry*, 85(8):949–953, 1981.

Danksagung

Ich möchte mich besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Bernd Jähne für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die gute und freundliche Betreuung dieser Arbeit und seine Hilfsbereitschaft bei organisatorischen Fragen bedanken. Dem BMBF bin ich für die Förderung der Projekte 13N9242 und 13N11177 zu Dank verpflichtet.

Dr. Emil Ott und Karin Ott danke ich ganz herzlich für die unproblematische Aufnahme bei der PCO AG, die für das Gelingen der Arbeit notwendigen Freiräume und firmenseitige Unterstützung. Meinen Kollegen von der PCO AG bin ich für ihre Mitarbeit und die technische Unterstützung zu Dank verpflichtet. Ganz besonderer Dank gilt meinem Kollegen Dr. Gerhard Holst für die vielen fachlichen und überaus interessanten Diskussionen, die ausgezeichnete Betreuung der Arbeit und die Unterstützung bei Projekttreffen und organisatorischen Fragen. Darüber hinaus möchte ich ihm für seine freundschaftliche und hilfsbereite Art, die vielen schönen musikalischen Stunden und die gelegentliche Ablenkung danken, wenn mein Kopf zu sehr mit Fragen beschäftigt war.

Ein herzlicher Dank gilt Dr. Michael Erz und Zhuang Lin für die vielen interessanten Diskussionen und die Unterstützung bei bürokratischen Fragen. Dr. Alexandra Herzog und Felix Friedl bin ich für das Bereitstellen und Zusenden des HPTS sowie für die entsprechenden Literaturstellen zu großem Dank verpflichtet.

Dr. Gregor Liebsch möchte ich für die zur Verfügung gestellten Sauerstoff- und pH-Optoden danken sowie Dr. Axel Engel für das Zusenden der SCHOTT-Referenzplättchen. Mathias Reichl, Florian Paulik und Gerhard Sedlmeier danke ich für die unproblematischen Umbaumaßnahmen an der Laserlichtquelle. Ein großer Dank gilt Prof. Dr. Fred S. Wouters für die kritische Diskussion über den Förster-Resonanzenergietransfer.

Johanna Frischeisen und der Belegschaft des Cafés „Am Donautor“ möchte ich für die größeren Portionen, die kleinen Aufmerksamkeiten und die freundliche Art danken. Ohne die reichhaltigen mittäglichen Mahlzeiten hätte ich nicht die notwendige Energie gehabt.

Zu guter Letzt seien zwei Menschen erwähnt, die mich stets in allem unterstützen und immer für mich da sind: meine Eltern, Asdrig und Christian Franke. Sie gaben mir Offenheit und vielseitiges Interesse mit auf den Weg und erlaubten so meine technische und wissenschaftliche Laufbahn. Aus diesem Grund gilt ihnen mein ganz besonderer Dank und sei ihnen diese Arbeit gewidmet.