



(21) WP G 01 N / 281 931 4

(22) 21.10.85

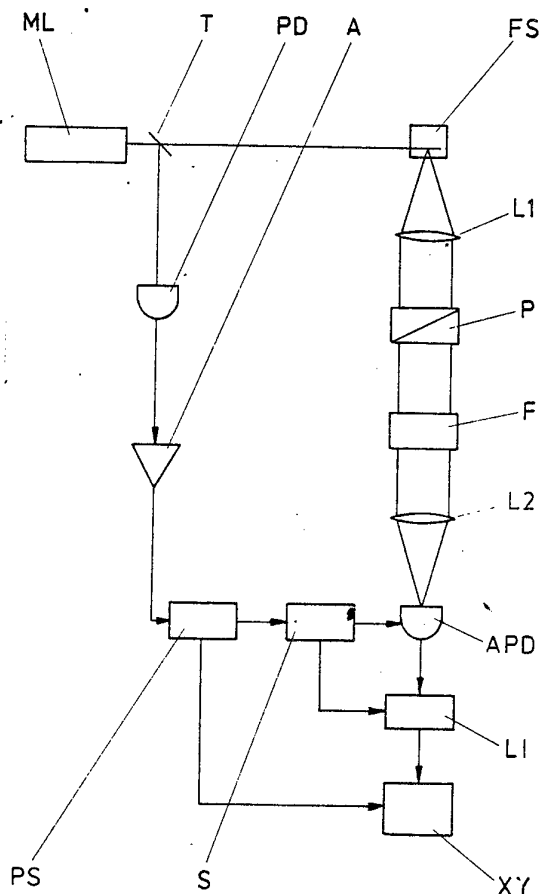
(44) 28.01.87

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

(72) Berndt, Klaus, Dr. Dipl.-Phys., DD

(54) Phasen- und Modulationsgrad-Fluorometer für die Kurzzeitspektroskopie

(57) Ziel der Erfindung ist es, aussagekräftige fluorometrische Messungen im Picosekundenbereich mit hoher Genauigkeit und Empfindlichkeit durchführen zu können. Die Aufgabe besteht darin, eine Fluorometer-Anordnung anzugeben, die Messungen der Phasenverschiebung und des Modulationsgrades des Fluoreszenzlichtes im Vergleich zum Anregungslicht mit hoher Empfindlichkeit für Modulationsfrequenzen bis etwa 1000 MHz gestattet. Zum Nachweis des Fluoreszenzlichtes dient eine Avalanche-Photodiode, deren Verstärkung niederfrequent getastet synchron zur Anregungsmodulation sinusförmig moduliert wird, und deren zeitlich gemittelter Photostrom mit einem vom Tast-Schalter getriggerten Lock-in-Verstärker in Abhängigkeit von der Phasenlage der Hochfrequenzmodulation gemessen und mittels XY-Schreiber registriert wird. Aus zwei Registrierkurven für eine fluoreszierende und eine streuende Probe können die Phasenverschiebung sowie der Modulationsgrad ermittelt werden. Zur Anregung dienen beliebig periodisch intensitätsmodulierte Lichtquellen. Insbesondere eignen sich modensynchronisierte cw-Laser und Argonlaser, die durch stabile 2-Moden-Oszillation sinusförmig bis etwa 1000 MHz modulierbar sind. Die Nachweisempfindlichkeit liegt bei etwa 1 Photon pro Laserperiode. Figur



Erfindungsanspruch:

1. Phasen- und Modulationsgrad-Fluorometer für die Kurzzeitspektroskopie mit einer im Strahlengang der Anregungslichtquelle befindlichen fluoreszierenden Probe, deren Fluoreszenzlicht über ein optisches System aus zwei Linsen mit dazwischen angeordnetem drehbarem Polarisator und Farbfilter auf eine Avalanche-Photodiode gelangt, an deren Signalausgang ein Lock-in-Verstärker angeschlossen ist, und in dem im Strahlengang der Anregungslichtquelle vor der fluoreszierenden Probe ein Strahlteiler zur Ablenkung eines Anteils der Strahlung auf einen Photodetektor mit nachgeschaltetem Verstärker angeordnet ist, wobei dessen Ausgang über einen Phasenschieber sowie einen darauffolgenden, niederfrequent periodisch arbeitenden Schalter in der Weise mit der Avalanche-Photodiode verbunden ist, daß das Signal zur Photodioden-Betriebsspannung addiert wird, wobei der Schalter über einen Referenzausgang verfügt, der zum Referenzeingang des Lock-in-Verstärkers geführt ist, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Anregungslichtquelle eine beliebige periodische Intensitätsmodulation aufweist, daß der Verstärker als abstimmbarer Schmalbandverstärker ausgeführt ist; und der Phasenschieber über einen separaten Ausgang mit einer zur Phasenverschiebung proportionalen Gleichspannung verfügt, der zum X-Eingang eines XY-Schreibers geführt ist, dessen Y-Eingang mit dem Ausgang des Lock-in-Verstärkers verbunden ist.

Phasen- und Modulationsgrad-Fluorometer nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Anregungslichtquelle eine sinusförmige Intensitätsmodulation aufweist.

3. Phasen- und Modulationsgrad-Fluorometer nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Anregungslichtquelle mit periodischer Intensitätsmodulation ein modensynchronisierter cw-Laser vorhanden ist.
4. Phasen- und Modulationsgrad-Fluorometer nach Punkt 1, 2 und 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß zwischen dem Strahlteiler und dem Photodetektor eine variable optische Verzögerungseinheit angeordnet ist, die über einen separaten Ausgang mit einer zur Verzögerung proportionalen Gleichspannung verfügt, der zum X-Eingang des XY-Schreibers geführt ist.
5. Phasen- und Modulationsgrad-Fluorometer nach Punkt 1, 2, 3 und 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß im Strahlengang zwischen dem Strahlteiler und dem Photodetektor ein Chopper angeordnet ist, dessen Referenzausgang mit dem Referenzeingang des Lock-in-Verstärkers verbunden ist.
6. Phasen- und Modulationsgrad-Fluorometer nach Punkt 1, 2 und 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß bei Vorhandensein einer Anregungslichtquelle mit optischem Modulator der Signalgenerator dieses Modulators über einen separaten Ausgang verfügt, der an den Eingang des Schmalbandverstärkers geführt ist.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie im Picosekunden- und Nanosekundenbereich. Die Anwendung ist bei der Bestimmung von Fluoreszenzlebensdauern möglich und zweckmäßig.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Untersuchung des zeitlichen Abklingverhaltens von Fluoreszenzprozessen werden häufig Phasen- und Modulationsgrad-Fluorometer eingesetzt. Hierbei dient zur Anregung der fluoreszierenden Probe eine sinusförmig intensitätsmodulierte Lichtquelle bzw. ein modensynchronisierter cw-Laser (DD-PS 156398, G01N 21/00). Aus der Phasenverschiebung und der Abnahme des Modulationsgrades des Fluoreszenzlichtes im Vergleich zum Anregungslicht können Aussagen zum Abklingverhalten der Probe gewonnen werden.

Die Wahl der Modulationsfrequenz f hat großen Einfluß auf die erzielbare Meßgenauigkeit. Sehr exakte Untersuchungen sind möglich, wenn die Bedingung $2\pi f\tau \geq 1$ erfüllt ist (Spencer, R. D. u. a., J. Chem. Phys. **52**, 1654, [1970]). Hierbei bedeutet τ die Fluoreszenzlebensdauer. Diese Bedingung zeigt, daß Fluoreszenzlebensdauern von 1 ns bis 100 ps am genauesten bei Modulationsfrequenzen von 160 MHz bis 1 600 MHz vermessen werden können.

In der Regel arbeiten Phasen- und Modulationsgrad-Fluorometer zur Gewährleistung hoher Nachweisempfindlichkeit auf der Basis von Photomultipliern. Diese sind jedoch infolge von Laufzeitstreuungen der Photo- bzw. Sekundärelektronen nicht für die Verarbeitung der genannten hohen Frequenzen geeignet. Das zur Zeit modernste Forschungsgerät mit Photomultipliern verfügt über einen Frequenzbereich von 1 MHz bis 160 MHz (Jameson, D. M. u. a., Appl. Spectr. Rev. **20**, 55, [1984]), während das einzige kommerziell verfügbare Gerät bis maximal 30 MHz arbeitet (Prospekt SLM 4800A der Firma SLM Instruments, Inc., Urbana, Illinois, USA).

Es sind auch Phasenfluorometer bekannt, in denen Avalanche-Photodioden zum Nachweis hochfrequent modulierter Strahlung dienen (DD-PS 215398, G01N 21/64 und DD-PS 217024, G01N 21/64). Zur Erzielung hoher Empfindlichkeit wird bei diesen Anordnungen die Verstärkung der Avalanche-Photodioden hochfrequent moduliert. Der Nachteil besteht jedoch darin, daß nur Messungen der Phasenverschiebung möglich sind und keine Bestimmung des Modulationsgrades der Fluoreszenzstrahlung erfolgt. Die Aussagekraft der Messungen bei der Untersuchung von Proben mit komplexem Abklingverhalten ist daher erheblich eingeschränkt.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, aussagekräftige fluorometrische Messungen im Picosekundenbereich mit hoher Genauigkeit und Empfindlichkeit durchführen zu können.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Fluorometer-Anordnung anzugeben, die Messungen der Phasenverschiebung und des Modulationsgrades des Fluoreszenzlichtes im Vergleich zum Anregungslicht mit hoher Empfindlichkeit für Modulationsfrequenzen bis ca. 1 000 MHz gestattet.

Die Aufgabe wird gelöst durch eine Fluorometer-Anordnung mit einer im Strahlengang der Anregungslichtquelle befindlichen fluoreszierenden Probe, deren Fluoreszenzlicht über ein optisches System aus zwei Linsen mit dazwischen angeordnetem drehbarem Polarisator und Farbfilter auf eine Avalanche-Photodiode gelangt, an deren Signalausgang ein Lock-in-Verstärker angeschlossen ist, und in der im Strahlengang der Anregungslichtquelle vor der fluoreszierenden Probe ein Strahlteiler zur Ablenkung eines Anteils der Strahlung auf einen Photodetektor mit nachgeschaltetem Verstärker angeordnet ist, wobei dessen Ausgang über einen Phasenschieber sowie einen darauffolgenden, niederfrequent periodisch arbeitenden Schalter in der Weise mit der Avalanche-Photodiode verbunden ist, daß das Signal zur Photodioden-Betriebsspannung addiert wird, wobei der Schalter über einen Referenz Ausgang verfügt, der zum Referenzeingang des Lock-in-Verstärkers geführt ist, und die erfindungsgemäß in nachfolgend beschriebener Weise ausgebildet ist.

Die Anregungslichtquelle weist eine beliebige periodische Intensitätsmodulation auf. Der Verstärker ist als abstimmbarer Schmalbandverstärker ausgeführt. Der Phasenschieber verfügt über einen separaten Ausgang mit einer zur Phasenverschiebung proportionalen Gleichspannung, der zum X-Eingang eines XY-Schreibers geführt ist. Der Y-Eingang des Schreibers ist mit dem Ausgang des Lock-in-Verstärkers verbunden.

Mögliche Ausführungsformen der Erfindung sind dadurch gekennzeichnet, daß entweder die Anregungslichtquelle eine sinusförmige Intensitätsmodulation aufweist, oder daß als periodisch intensitätsmodulierte Anregungslichtquelle ein modensynchronisierter cw-Laser vorhanden ist. Es ist auch möglich, daß im Strahlengang zwischen dem Strahlteiler und dem Photodetektor eine variable optische Verzögerungseinheit angeordnet ist, die über einen separaten Ausgang mit einer zur Verzögerung proportionalen Gleichspannung verfügt, der zum X-Eingang des XY-Schreibers geführt ist. In diesem Fall kann der Phasenschieber entfallen.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, daß im Strahlengang zwischen dem Strahlteiler und dem Photodetektor ein Chopper angeordnet ist, dessen Referenz Ausgang mit dem Referenzeingang des Lock-in-Verstärkers verbunden ist. Hier kann der Schalter entfallen. Enthält die Anregungslichtquelle einen optischen Modulator, so kann ein separater Ausgang am Signalgenerator dieses Modulators zum Eingang des Schmalbandverstärkers geführt werden. In diesem Fall sind der Strahlteiler und der Photodetektor nicht erforderlich.

Im Betrieb bewirkt sinusförmig intensitätsmoduliertes Anregungslicht in der Probe eine Fluoreszenzstrahlung, die ebenfalls sinusförmig moduliert ist. Es treten jedoch eine Phasenverschiebung sowie eine Reduzierung des Modulationsgrades im Vergleich zum Anregungslicht auf, die eng mit dem zeitlichen Abklingverhalten der Probe korreliert sind.

Vom Photodetektor gelangt über den auf die Frequenz der Intensitätsmodulation abgestimmten Schmalbandverstärker sowie über den Phasenschieber und den Schalter ein sinusförmiges elektrisches Signal an die Avalanche-Photodiode. Infolgedessen kommt es zu einer Verstärkungsmodulation in der Photodiode, und der zeitlich gemittelte Photostrom hängt in seiner Größe von der relativen Phasenlage des Fluoreszenzphotostromes bezüglich der mit der Anregung korrelierten Verstärkungsmodulation ab. Da der Lock-in-Verstärker im Zusammenwirken mit dem Schalter der Stromdifferenz zwischen den beiden Zuständen „Modulation EIN“ und „Modulation AUS“ registriert, wird die Phasenabhängigkeit mit hoher Empfindlichkeit und Genauigkeit angezeigt. Nicht modulierte Streulicht führt dagegen in beiden Zuständen zum gleichen zeitlich gemittelten Photostrom und liefert daher am Ausgang des Lock-in-Verstärkers kein Signal.

Zur Realisierung einer Fluoreszenzmessung wird zunächst ein Streumedium anstelle der fluoreszierenden Probe eingesetzt und durch kontinuierliche Änderung des Phasenschiebers eine Sinuskurve mittels des XY-Schreibers aufgenommen. Sodann wird das Streumedium gegen die zu untersuchende Probe ausgetauscht und eine zweite Kurve registriert. Durch Vergleich beider Kurven kann die gesuchte Phasenverschiebung direkt abgelesen werden. Berücksichtigt man noch den üblicherweise am Stromversorgungsgerät der Avalanche-Photodiode ablesbaren mittleren Photostrom, so ist auch der Modulationsgrad des Fluoreszenzlichtes im Vergleich zum Anregungslicht aus den Amplituden der beiden Kurven bestimmbar.

Bei Verwendung beliebig periodisch intensitätsmodulierter Anregungsstrahlung kann der Schmalbandverstärker auf die Grundwelle der periodischen Modulation bzw. auf verschiedene Oberwellen abgestimmt werden. In allen Fällen gelangt ein sinusförmiges elektrisches Modulationssignal an die Avalanche-Photodiode. Diese arbeitet daher als optoelektronischer Korrelator, wobei entsprechend der anliegenden Modulationsfrequenz eine Fourier-Selektion aus dem Frequenzgemisch der periodischen Intensitätsmodulation erfolgt. Die gemessenen Phasenverschiebungen bzw. Modulationsgrade sind somit unabhängig von der speziellen Modulationsform.

In der erfindungsgemäßen Fluorometer-Anordnung wird kein hochfrequent modulierter Fluoreszenzphotostrom gemessen, sondern der zeitliche Mittelwert dieses Stromes. Der Lock-in-Verstärker kann daher einen hochohmigen Eingang sowie eine sehr geringe äquivalente Bandbreite besitzen. Auf diese Weise ergibt sich eine hohe Nachweisempfindlichkeit. Die Verstärkungsmodulation ist bis zu Frequenzen von ca. 1 000 MHz an Avalanche-Photodioden realisierbar. Damit sind die zur Vermessung von Fluoreszenzproben mit Abklingzeiten im Picosekundenbereich optimalen Modulationsfrequenzen verfügbar.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung soll nachstehend an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert werden. In der zugehörigen Zeichnung ist das Schema des Phasen- und Modulationsgrad-Fluorometers dargestellt.

Im Strahlengang der periodisch intensitätsmodulierten Anregungslichtquelle ML befindet sich die fluoreszierende Probe FS, deren Fluoreszenzlicht über die Linse L1, den drehbaren Polarisator P, das Farbfilter F und die Linse L2 auf die Avalanche-Photodiode APD gelangt. Der Signalausgang der Avalanche-Photodiode APD ist an den Eingang des Lock-in-Verstärkers LI angeschlossen.

Im Strahlengang der Anregungslichtquelle ML ist vor der Probe FS ein Strahlteiler T angeordnet, über den ein Anteil der Strahlung auf den Photodetektor PD mit nachgeschaltetem abstimmbarem Schmalbandverstärker A gelangt, dessen Ausgang über den Phasenschieber PS sowie einen darauffolgenden, niederfrequent periodisch arbeitenden Schalter S in der Weise mit der Avalanche-Photodiode APD verbunden ist, daß das Signal zur Photodioden-Betriebsspannung addiert wird. Der Schalter S verfügt über einen Referenz Ausgang, der zum Referenzeingang des Lock-in-Verstärkers LI geführt ist.

Der Phasenschieber PS besitzt einen separaten Ausgang mit einer zur Phasenverschiebung proportionalen Gleichspannung, der mit dem X-Eingang eines XY-Schreibers XY verbunden ist, wobei dessen Y-Eingang an den Ausgang des Lock-in-Verstärkers LI angeschlossen ist.

Als Anregungslichtquelle kann beispielsweise ein modensynchronisierter cw-Laser verwendet werden. Hat dieser Laser eine typische Länge des Resonators von 120 cm, so beträgt die Impulsfolgefrequenz $f = c/2L = 125 \text{ MHz}$. Die Laserstrahlung ist somit dem Fourier-Theorem entsprechend gleichzeitig bei den Frequenzen 125 MHz, 250 MHz, 375 MHz usw. intensitätsmoduliert. Wird der Schmalbandverstärker nacheinander auf diese Frequenzen abgestimmt, so können phasen- und modulationsgrad-fluorometrische Messungen zwischen 125 MHz und ca. 1 000 MHz durchgeführt werden. Auf diese Weise ist es möglich, nach bekannten mathematischen Verfahren das Abklingverhalten fluoreszierender Proben zu ermitteln.

Bei Verwendung einer Silizium-Avalanche-Photodiode ergibt sich für einen zeitlich gemittelten Ausgangsstrom von 1 nA bei 0,3 Hz äquivalenter Bandbreite des Lock-in-Verstärkers für das Signal-Rausch-Verhältnis ein Wert von $7 \cdot 10^3$. Hierbei wurde eine Verstärkung von 100 angenommen. Der Ausgangsstrom von 1 nA entspricht einer Empfindlichkeit des Fluorometers von 1 absorbiertem Fluoreszenzphoton pro Laserimpuls. Diese hohe Empfindlichkeit wird wegen der verwendeten Frequenzen mit einer Zeitauflösung von ca. 3 ps kombiniert.

Benutzt man als Anregungslichtquelle einen Argonlaser, so kann ohne Verwendung von Modulatoren eine hochfrequente sinusförmige Intensitätsmodulation erzielt werden. Hierzu betreibt man den Laser in einem stabilen 2-Moden-Zustand. Für einen Argonlaser von 120 cm Resonatorlänge sind auf diese Weise die Modulationsfrequenzen 375 MHz, 500 MHz, 625 MHz, 750 MHz und 875 MHz erzielbar, wobei wegen der näherungsweise gleichen Intensität der beiden oszillierenden Moden ein Modulationsgrad größer 95% vorliegt. Ein solcher Laser ist hervorragend als Anregungslichtquelle für die erfindungsgemäße Fluorometer-Anordnung geeignet. Da die Ausgangsleistung hinreichend groß ist, kann der abstimmbare Schmalbandverstärker entfallen. Die Ausgangsspannung des Photodetektors genügt zur Erzeugung der Verstärkungsmodulation in der Avalanche-Photodiode.

