

(19) DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



**Wirtschaftspatent**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

# PATENTSCHRIFT

ISSN 0433-6461

(11)

**213 512**

Int.Cl.<sup>3</sup>

3(51) G 01 N 21/64

**AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP G 01 N/ 2475 444

(22) 06.01.83

(44) 12.09.84

(71) AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR, BERLIN, DD  
(72) BERNDT, KLAUS, DR. DIPL.-PHYS., DD;

(54) **FLUORESZENZDETEKTOR FÜR ROUTINE-MESSUNGEN IN DER KURZZEITSPEKTROSKOPIE**

(57) Ziel der Erfindung ist, Fluoreszenz-Abklingzeiten mit hoher Empfindlichkeit und großer Zeitauflösung unter Verwendung von Avalanche-Photodioden messen zu können. Die Aufgabe besteht darin, einen Fluoreszenzdetektor für die Kurzzeitspektroskopie anzugeben, in dem die Avalanche-Photodiode ohne Verlust an Zeitauflösung mit großem Lastwiderstand arbeitet. Zur Fluoreszenzanregung dient ein modensynchronisierter cw-Laser mit einem Ausgang für ein sinusförmiges elektrisches Signal, dessen Frequenz mit der Folgefrequenz der Laserimpulse phasenstarr übereinstimmt. Über eine variable Verzögerungseinheit und einen elektronischen Schalter wird dieses Signal der Photodioden-Betriebsspannung überlagert und damit die Verstärkung moduliert. Der zeitlich gemittelte Photostrom steuert über einen vom elektronischen Schalter getriggerten Lock-in-Verstärker die Verzögerungseinheit so, daß die Phasenverschiebung  $\theta$  der Bedingung  $\tan \theta = (2\pi/T)\tau$  genügt, in der  $\tau$  die Fluoreszenz-Abklingzeit und  $T$  die Laserperiodendauer bedeuten. Ein mit der Verzögerungseinheit gekoppeltes geeichtes Spannungsmeßgerät mit Schreiber zeigt direkt die Fluoreszenz-Abklingzeit an. Meßgenauigkeiten von 10 ps sind erreichbar. Figur

Dr. Klaus Berndt

Berlin, den 2. 12. 1982

Zustellungsbevollmächtigt:

Akademie der Wissenschaften der DDR  
Zentralinstitut für Optik und  
Spektroskopie - Patentbüro  
1199 Berlin-Adlershof, Rudower Chaussee 6

Fluoreszenzdetektor für Routine-Messungen  
in der Kurzzeitspektroskopie

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie im Picosekunden- und Nanosekundenbereich. Die Anwendung ist in Spektrofluorometern auf der Basis modensynchronisierter kontinuierlich arbeitender Laser möglich und zweckmäßig.

## Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Untersuchung von Fluoreszenz-Abklingzeiten im Picosekunden- und Nanosekundenbereich werden zunehmend modensynchronisierte cw-Laser eingesetzt, die sehr kurze Impulsdauern und hohe Impulsfolgefrequenzen besitzen. Der empfindliche Nachweis der Fluoreszenzstrahlung erfolgt mittels elektronenoptischer Streak-Kameras [Lill, E. u.a., Appl. Phys. 22, 197 (1980)] oder mit Hilfe von Photomultipliern in zeitkorrelierten Einzelphotonen-Zählsystemen [Kinoshita, S. u.a., Rev. Sci. Instr. 52, 572 (1981)]. Streak-Kameras verfügen über Zeitaufösungen besser als 10 ps, haben aber den Nachteil außerordentlich hoher Kosten. Einzelphotonen-Zählsysteme besitzen infolge Laufzeitschwankungen der Photoelektronen im Photomultiplier nur eine Zeitauflösung von ca. 500 ps. Mit Hilfe von Avalanche-Photodioden in Verbindung mit Boxcarintegratoren bzw. Sampling-Oszillographen sind Zeitaufösungen um 100 ps erreichbar [Dähne, S. u.a., Feingerätetechnik 29, 463 (1980)]. Die Nachweissysteme mit Avalanche-Photodioden haben den Nachteil relativ geringer Empfindlichkeit, da Boxcarintegratoren und Sampling-Oszillographen niederohmige Eingänge und ca. 2 mV Eigenrauschen besitzen. Eine Erhöhung der Empfindlichkeit durch Vergrößern der Eingangsimpedanzen ist stets mit einem Verlust an Zeitauflösung verbunden.

## Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist, Fluoreszenz-Abklingzeiten mit hoher Empfindlichkeit und großer Zeitauflösung unter Verwendung von Avalanche-Photodioden messen zu können.

### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen Fluoreszenzdetektor für die Kurzzeitspektroskopie anzugeben, in dem die zum Nachweis der Fluoreszenzstrahlung dienende Avalanche-Photodiode ohne Verlust an Zeitauflösung mit großem Lastwiderstand arbeitet.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß als Anregungslichtquelle ein modensynchronisierter cw-Laser vorhanden ist. Im Strahlengang des Lasers ist die fluoreszierende Probe angeordnet, deren Fluoreszenzlicht über ein optisches System auf eine Avalanche-Photodiode gelangt. Der Signalausgang der Photodiode ist mit dem Eingang eines Lock-in-Verstärkers verbunden. Erfindungsgemäß verfügt der modensynchronisierte cw-Laser über einen Ausgang für ein sinusförmiges elektrisches Signal, dessen Frequenz mit der Folgefrequenz der Laserimpulse übereinstimmt, und dessen Phase starr mit den Laserimpulsen gekoppelt ist. Dieser Ausgang ist über eine variable Verzögerungseinheit und einen elektronischen Schalter in der Weise mit der Avalanche-Photodiode verbunden, daß das sinusförmige Signal zur Photodioden-Betriebsspannung addiert wird.

Der elektronische Schalter besitzt einen Referenzausgang, der mit dem Referenzeingang des Lock-in-Verstärkers verbunden ist. Der Ausgang des Lock-in-Verstärkers ist zu einem Steuereingang der variablen Verzögerungseinheit geführt. Diese verfügt über einen zusätzlichen Ausgang mit einer der eingestellten Verzögerung proportionalen Gleichspannung, der mit einem Spannungsmeßgerät verbunden ist.

Im Betrieb bewirkt einfach exponentiell abklingendes Fluoreszenzlicht bei geöffnetem elektronischen Schalter in der Photodiode Stromsignale der Form

$$i(t) = I_p M_0 \exp(-t/\tau) . \quad (1)$$

In (1) bedeuten  $I_p$  den Anfangswert des Primär-Photostromes,  $M_0$  die innere Verstärkung durch den Avalanche-Prozeß sowie  $\tau$  die Fluoreszenz-Abklingzeit. Es wird zunächst angenommen,

daß sowohl die Laserimpulsdauer als auch die charakteristischen Zeitkonstanten der Photodiode hinreichend klein im Vergleich zu  $\tau$  sind, so daß sie vernachlässigt werden dürfen. Für den zeitlich gemittelten Photostrom erhält man

$$I = (1/T) \int_0^T i(t) dt = I_p M_0 \tau / T, \quad (2)$$

wobei T die Periodendauer des modensynchronisierten cw-Lasers bedeutet. In (2) wird vorausgesetzt, daß die Exponentialfunktion (1) nach Ablauf der Zeit T bereits sehr stark abgefallen ist.

Bei geschlossenem elektronischen Schalter wird die innere Verstärkung der Avalanche-Photodiode näherungsweise sinusförmig moduliert:

$$M(t) = M_0 (1 + m \sin(2\pi t/T)) \quad (3)$$

In (3) bedeutet m den Modulationsgrad der inneren Verstärkung, der vom Arbeitspunkt der Avalanche-Photodiode und von der Spannung des Sinus-Signals abhängt. Für den zeitlich gemittelten Photostrom ergibt sich bei geschlossenem Schalter mit (1) - (3)

$$I = (I_p M_0 \tau / T) \left[ 1 + m / (1 + (2\pi\tau/T)^2) \left\{ \sin\theta + (2\pi\tau/T) \cos\theta \right\} \right] \quad (4)$$

Der Winkel  $\theta$  gibt die relative Phasenlage des Beginns der Exponentialfunktion (1) bezüglich der Verstärkungsmodulation nach (3) an. Für eine fluoreszierende Probe mit  $\tau = 0$  liefert der Ausdruck (4) den gleichen mittleren Photostrom wie (2), wenn mittels der variablen Verzögerungseinheit  $\theta = \theta_0 = 0$  eingestellt wird. In diesem Fall entsteht am Ausgang des Lock-in-Verstärkers ein Null-Signal.

Wird nun eine Fluoreszenzprobe mit der Abklingzeit  $\tau \neq 0$  verwendet, so liefert (4) einen von (2) verschiedenen Photostrom, und am Ausgang des Lock-in-Verstärkers entsteht ein polaritätsgerechtes Gleichspannungssignal für den Steuereingang der

variablen Verzögerungseinheit. Dieses Signal verändert die ursprünglich eingestellte Verzögerung solange, bis die Bedingung

$$\sin \theta + (2\pi\tau/T) \cos \theta = 0 \quad (5)$$

erfüllt ist, d.h., am Ausgang des Lock-in-Verstärkers wieder ein Null-Signal entsteht. Zwischen der sich einstellenden Phasenwinkeländerung und der Abklingzeit besteht nach (5) die Beziehung

$$\tau = (T/2\pi) \tan (-\theta) \quad (6)$$

Bei entsprechender Eichung des mit der Verzögerungseinheit verbundenen Spannungsmeßgerätes kann an diesem entsprechend der Beziehung (6) die Abklingzeit  $\tau$  direkt abgelesen werden. Da der Lock-in-Verstärker den zeitlich gemittelten Photostrom verarbeitet, kann er einen hochohmigen Signaleingang und geringe Bandbreite besitzen. Auf diese Weise ist ein sehr empfindlicher Fluoreszenznachweis möglich. Bei entsprechend großer Kreisverstärkung in dem aus Photodiode, Lock-in-Verstärker und steuerbarer Verzögerungseinheit gebildeten Regelkreis sind darüber hinaus auch große Phasenmeßgenauigkeit bzw. Zeitauflösung erzielbar.

Ist die Fluoreszenz-Abklingzeit wesentlich kleiner als die Laserimpulsdauer bzw. die charakteristischen Zeitkonstanten der Photodiode, so entstehen in der Photodiode Stromimpulse, die nicht dem Ausdruck (1) entsprechen. Die Signalform wird in diesem Fall durch das Zeitverhalten der Photodiode und die Form der Laserimpulse bestimmt. Eine genaue Analyse zeigt, daß der Stromimpuls um den Betrag  $\tau$  verzögert wird, und seine Dauer nahezu unabhängig von  $\tau$  ist. Das bedeutet, die Gleichung (6) kann ebenfalls angewendet werden, denn für kleine Phasenverschiebungen kann  $\theta = \tan \theta$  gesetzt werden. Somit gestattet die erfindungsgemäße Anordnung auch Messungen an Substanzen mit extrem kurzen Fluoreszenz-Abklingzeiten.

Die Gewinnung des sinusförmigen elektrischen Signals für die Verstärkungsmodulation der Avalanche-Photodiode kann am Laser auf verschiedene Weise erfolgen. Wird ein aktiv elektrooptisch modensynchronisierter Laser verwendet, so ist lediglich ein

geeigneter Signalkoppler in die Ansteuerleitung für den Mode-Locker einzufügen und dessen Koppelausgang mit dem Eingang der variablen Verzögerungseinheit zu verbinden. Im Falle akustooptisch modensynchronisierter Laser ist zusätzlich ein Frequenzverdoppler zwischen dem Signalkoppler und der variablen Verzögerungseinheit erforderlich.

Eine weitere Variante, die auch bei passiv modensynchronisierten Lasern anwendbar ist, besteht darin, daß im Strahlengang des Lasers vor der fluoreszierenden Probe ein Strahlteiler zur Ablenkung eines kleinen Anteils der Strahlung auf einen Hilfsphotodetektor mit nachgeschaltetem, auf die Folgefrequenz der Laserimpulse abgestimmtem, frequenzselektivem Verstärker angeordnet ist. Der Ausgang des frequenzselektiven Verstärkers ist mit dem Eingang der variablen Verzögerungseinheit verbunden. Bei dieser Variante kann im Strahlengang vor dem Hilfsphotodetektor ein Chopper angeordnet sein, dessen Referenzausgang zum Referenzeingang des Lock-in-Verstärkers geführt ist. Der Chopper übernimmt hierbei die Funktion des elektronischen Schalters.

Wird an das geeichte Spannungsmeßgerät ein Schreiber, Plotter oder Drucker angeschlossen, so sind mit dem erfindungsgemäßen Fluoreszenzdetektor kontinuierliche Messungen von Abklingzeiten als Funktion anderer physikalischer oder chemischer Parameter möglich.

#### Ausführungsbeispiel

Die Erfindung soll nachstehend an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert werden. In der zugehörigen Zeichnung ist das Schema des Fluoreszenzdetektors dargestellt.

Als Anregungslichtquelle dient ein Argonlaser L, der mittels elektrooptischen Mode-Lockers ML modensynchronisiert wird. Im Strahlengang des Lasers L ist die fluoreszierende Probe F angeordnet, deren Fluoreszenzlicht über ein optisches System aus zwei Linsen L1 und L2 mit dazwischen angeordnetem Polarisator P und Monochromator M auf die Avalanche-Photodiode D gelangt. Der Signalausgang der Photodiode D ist mit dem Eingang des Lock-in-Verstärkers LI verbunden. Der Synthesizer S

ist über den Verstärker A und den Signalkoppler C mit dem Mode-Locker ML verbunden. Ein Teil des Mode-Locker-Ansteuersignals, dessen Frequenz mit der Folgefrequenz der Laserimpulse übereinstimmt, und dessen Phase starr mit den Impulsen gekoppelt ist, wird am Signalkoppler C ausgekoppelt und über die variable elektrische Verzögerungseinheit EV sowie den elektronischen Schalter ES so an die Avalanche-Photodiode geführt, daß es sich der an der Photodiode anliegenden Betriebsspannung überlagert. Der elektronische Schalter ES verfügt über einen Referenzausgang, der mit dem Referenzeingang des Lock-in-Verstärkers LI verbunden ist. Der Ausgang des Lock-in-Verstärkers LI ist zu einem Steuereingang der variablen Verzögerungseinheit EV geführt. Diese verfügt über einen zusätzlichen Ausgang mit einer der eingestellten Verzögerung proportionalen Gleichspannung, der mit dem Spannungsmeßgerät R verbunden ist. Das variable Graufilter G im Strahlengang des Lasers L ermöglicht eine Anpassung der Anregungsintensität an die zu untersuchende fluoreszierende Substanz.

Zunächst wird anstelle der fluoreszierenden Probe ein Streumedium eingesetzt und eine konstante Grundverzögerung so eingestellt, daß am Ausgang des Lock-in-Verstärkers ein Null-Signal entsteht. In diesem Zustand wird das Spannungsmeßgerät auf den Wert Null justiert. Nun kann anstelle des Streumediums eine fluoreszierende Probe bestrahlt werden. Die variable Verzögerung stellt sich dabei automatisch auf den Wert ein, der der Gleichung (5) genügt. Aus der Verzögerung kann nach (6) die Fluoreszenz-Abklingzeit berechnet bzw. bei entsprechender Eichung des Spannungsmeßgerätes an diesem direkt abgelesen werden. Als variable Verzögerungseinheit eignet sich beispielsweise eine durch Stellmotor gesteuerte koaxiale Verzögerungsleitung. An einer solchen kann die zeitliche Verzögerung mit einer Genauigkeit von ca. 1 ps abgelesen werden. Dies entspricht einer Ablesegenauigkeit für  $\theta$  von  $0.05^\circ$ , wenn ein 120 cm langer Laser mit  $T = 8$  ns bzw. 125 MHz Impulsfolgefrequenz angenommen wird.

Die Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit gegenüber bekannten Anordnungen mit Avalanche-Photodioden und Boxcarintegratoren bzw. Sampling-Oszillographen kann auf folgende Weise verdeut-

licht werden: Bei einem Eigenrauschen von 1 mV benötigt ein Boxcarintegrator einen Mindeststrom von  $2 \cdot 10^{-5}$  A an 50 Ohm. Der Lock-in-Verstärker würde bei 1 Hz Bandbreite und 1  $\mu$ V Eigenrauschen nur  $10^{-12}$  A an 1 MOhm benötigen. Da Avalanche-Photodioden Dunkelströme von  $10^{-9}$  A aufweisen, ist mit diesem Wert als Mindeststrom zu rechnen. Daraus leitet sich ein Gewinn an Empfindlichkeit um den Faktor  $2 \cdot 10^4$  ab, denn bei einer inneren Verstärkung von  $10^2$  und einem Zusatzrauschfaktor von 2 (Silizium) besitzt ein Signal-Photostrom von  $10^{-9}$  A noch ein Signal-Rausch-Verhältnis von  $4 \cdot 10^3$ . Die Eingangsspannung am Lock-in-Verstärker liegt dann mit 1 mV um den Faktor  $10^3$  über dessen Eigenrauschen. Dieses große Signal-Rausch-Verhältnis ermöglicht eine hohe Verstärkung im Lock-in-Verstärker und damit hohe Phasenmeßgenauigkeit bzw. Zeitauflösung. Aus der Forderung, daß die Fluoreszenz innerhalb einer Laserperiode stark abgefallen sein muß, ergibt sich eine obere Grenze für die meßbaren Abklingzeiten. Fordert man einen Abfall auf 1% des Anfangswertes, so können an einem 120 cm langen Laser mit  $T = 8$  ns Abklingzeiten bis ca. 1.8 ns gemessen werden. Für sehr kurze Abklingzeiten ergibt sich bei einer Phasenmeßgenauigkeit von  $0.5^\circ$  am gleichen Laser ein Fehler von 11 ps für die Abklingzeit. Damit ist auch die untere Meßbereichsgrenze gegeben. Mit steigender Abklingzeit nimmt der Fehler zu und erreicht an der oberen Meßbereichsgrenze 33 ps. Der erfindungsgemäße Fluoreszenzdetektor ist auf Grund des selbsttätigen Phasenabgleichs und der direkten Anzeige der Fluoreszenz-Abklingzeit besonders gut für Routine-Messungen in der Kurzzeitspektroskopie geeignet. Wird an das geeichte Spannungsmeßgerät ein Schreiber, Plotter oder Drucker angeschlossen, so kann der Fluoreszenzdetektor vorteilhaft für Experimente eingesetzt werden, in denen die Abklingzeit als Funktion anderer physikalischer bzw. chemischer Parameter gemessen werden soll. Darüber hinaus kann der Fluoreszenzdetektor zur Prozeßkontrolle im on-line-Betrieb, gegebenenfalls mit Datenfernübertragung, dienen.

## Erfindungsanspruch

1. Fluoreszenzdetektor für Routine-Messungen in der Kurzzeitspektroskopie mit einem modensynchronisierten cw-Laser als Anregungslichtquelle, mit einer im Strahlengang des Lasers befindlichen Probe, und mit einem im Strahlengang des Fluoreszenzlichtes der Probe angeordneten optischen System zur Bestrahlung einer Avalanche-Photodiode, deren Signalausgang mit einem Lock-in-Verstärker verbunden ist, gekennzeichnet dadurch, daß der Laser über einen Ausgang für ein sinusförmiges elektrisches Signal verfügt, dessen Frequenz mit der Folgefrequenz der Laserimpulse übereinstimmt, und dessen Phase starr mit den Laserimpulsen gekoppelt ist, und dieser Ausgang über eine variable Verzögerungseinheit sowie einen elektronischen Schalter in der Weise mit der Avalanche-Photodiode verbunden ist, daß das sinusförmige Signal zur Photodioden-Betriebsspannung addiert wird, wobei der elektronische Schalter einen Referenzausgang besitzt, der mit dem Referenzeingang des Lock-in-Verstärkers verbunden ist, der Ausgang des Lock-in-Verstärkers zu einem Steuereingang der Verzögerungseinheit geführt ist, und diese über einen zusätzlichen Ausgang mit einer der Verzögerung proportionalen Gleichspannung verfügt, der mit einem Spannungsmeßgerät verbunden ist.
2. Fluoreszenzdetektor nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß im Falle aktiv elektrooptisch modensynchronisierter cw-Laser in die Ansteuerleitung des Mode-Lockers ein Signalkoppler eingefügt ist, dessen Koppelausgang mit dem Eingang der variablen Verzögerungseinheit verbunden ist.

3. Fluoreszenzdetektor nach Punkt 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß im Falle aktiv akustooptisch modensynchronisierter cw-Laser der Koppelausgang des Signalkopplers über einen Frequenzverdoppler mit dem Eingang der variablen Verzögerungseinheit verbunden ist.
4. Fluoreszenzdetektor nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß im Strahlengang des Lasers vor der fluoreszierenden Probe ein Strahlteiler zur Ablenkung eines Anteils der Strahlung auf einen Hilfsphotodetektor mit nachgeschaltetem, auf die Folgefrequenz der Laserimpulse abgestimmtem, frequenzselektivem Verstärker angeordnet ist, und der Ausgang des frequenzselektiven Verstärkers mit dem Eingang der variablen Verzögerungseinheit verbunden ist.
5. Fluoreszenzdetektor nach Punkt 1 und 4, gekennzeichnet dadurch, daß im Strahlengang vor dem Hilfsphotodetektor ein Chopper angeordnet ist, dessen Referenzausgang mit dem Referenzeingang des Lock-in-Verstärkers verbunden ist.
6. Fluoreszenzdetektor nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß an das Spannungsmeßgerät ein Schreiber angeschlossen ist.

Hierzu / Seiten Zeichnungen

