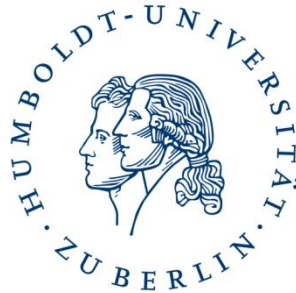


**INSTITUT FÜR PHYSIK DER
HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN**



ZEITKORELLIERTE EINZELPHOTONENZÄHLUNG - VERSUCHSSCRIPT

BETREUER: STEFFEN HACKBARTH

Die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (kurz TCSPC) ist eine Messmethode, mit der strahlende optische Übergänge untersucht werden. In diesem Versuch wird die Fluoreszenz von Phäophorbid a untersucht, einem Farbstoff, der zu den Porphyrinen zählt. Dabei soll es insbesondere darum gehen, die Messmethode kennenzulernen und einzelne Effekte und deren Einfluss auf die Messung zu verstehen.

Inhaltsverzeichnis

1 Aufbau und Prinzip der TCSPC.....	1
2 Fluoreszenz.....	2
2.1 Das Jablonski Diagramm.....	3
2.2 Quantenausbeute.....	5
2.3 Fluoreszenzlebensdauer.....	5
2.4 Anisotropie eines Fluorophors.....	6
2.5 Phäophorbid a.....	6
3 Das Programm.....	7
3.1 Wichtige Einstellungen.....	8
3.2 Datenformate.....	9
4 Apparatfunktion und Einflussfaktoren.....	10
4.1 Der Laserpuls.....	10
4.2 Die Laufzeitdifferenz.....	11
4.3 Der Strahlteiler.....	11
4.4 Anregungsintensität.....	11
4.5 Die Küvette.....	11
4.6 Der Detektor.....	12
4.7 Der Constant Fraction Discriminator.....	12
5 Arbeitsauftrag.....	14

1 Aufbau und Prinzip der TCSPC

Mit der TCSPC sollen strahlende optische Übergänge im Bereich vieler ps bis vieler ns untersucht werden. Nun entsteht aber wegen der Unschärferelation im Allgemeinen das Problem, nicht gleichzeitig schnell und genau messen zu können. Bei der TCSPC wird dieses Problem durch die **Entkopplung von Detektion und Zeitmessung** umgangen. Die Grundidee ist hierbei, dass sich eine Vielzahl identischer, nicht wechselwirkender Teilchen (oder Moleküle) statistisch genauso verhält wie ein einzelnes Teilchen (oder Molekül).

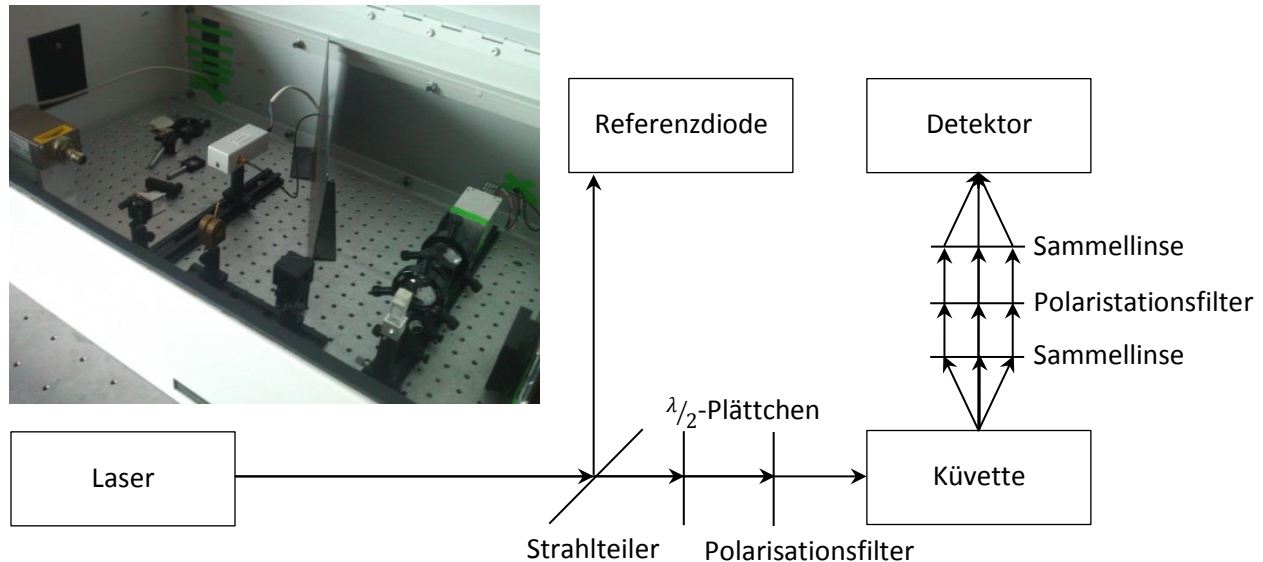


Abbildung 1: Messaufbau.

Der Laser emittiert einen gepulsten Laserstrahl, der auf einen halbdurchlässigen Spiegel trifft. Dieser teilt den Strahlenweg in zwei Komponenten. Der eine trifft auf eine Referenzdiode. Der andere wird mit Hilfe eines $\lambda/2$ -Plättchens und eines vertikal orientierten Polarisationsfilters abgeschwächt und trifft anschließend auf die Probe.

Wird also ein Puls vom Laser emittiert, trifft ein Teil dieses Pulses auf die Referenzdiode, welche die Zeitmessung startet. Der andere Teil des Pulses trifft abgeschwächt auf die Küvette, in der sich der fluoreszierende Stoff befindet. Wechselwirkt nun ein Photon des Pulses mit einem Fluorophor, so wird dieses angeregt. Bei der Rückkehr in den Grundzustand emittiert dieses Fluorophor dann mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit ein Photon, welches auf den Detektor treffen kann und die Messung durch ein Schaltsignal beendet. Bei dem Detektor handelt es sich um einen Photomultiplier dessen Pulse einen **Constant Fraction Discriminator** passieren müssen, um gemessen zu werden. Auf den CFD wird später genauer eingegangen.

Für die Elektronik ist es nun aber günstiger, die Messung mit dem Detektorpuls zu starten (**inverse TCSPC**), da wegen der Intensitätsverringering nur etwa alle 100 Pulse überhaupt ein Photon detektiert werden kann. Würde das Signal Referenzdiode als Startsignal verwendet werden, müsste die Elektronik bei jedem Puls eine neue Messung starten. Davon würden aber viele abgebrochen werden, weil kein Photon detektiert werden könnte. Das Starten der Messung am Detektor stellt hingegen sicher, dass jede begonnene Messung auch zu Ende geführt wird. Die Referenzdiode beendet dann die Messung und

liefert zusammen mit der Pulsfrequenz des Lasers die Startzeit des zum detektierten Photon gehörigen Laserpulses. Ausserdem verursacht jede Messung immer eine gewisse Totzeit, ein Zeitraum, in dem der Detektor quasi „blind“ ist.

2 Fluoreszenz

Lumineszenz bezeichnet allgemein die Emission von Photonen aus einem elektrisch angeregten Zustand. Je nach Art des Anregungszustandes unterscheidet man zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Um den Unterschied zu verstehen, sollen zwei Elektronen eines Systems (beispielsweise eines Atoms) betrachtet werden.

Liegen zwei Elektronen im gleichen elektrischen Zustand vor, so müssen sie sich nach dem Pauli-Prinzip in ihrem Spin-Zustand unterscheiden. Eines der Elektronen ist also im Spin-Up-Zustand ($\uparrow$) das andere im Spin-Down-Zustand ($\downarrow$). Die Summe der Spinquantenzahlen S der beiden Elektronen ist somit null und man bezeichnet die Elektronen als gepaart. Liegen auch ungepaarte Elektronen vor, die prinzipiell im Spin-Up- oder Spin-Down-Zustand vorliegen können, so muss die Summe der Spinquantenzahlen nicht mehr null ergeben. Ein Maß für die Summe aller Spinquantenzahlen eines Systems ist die Multiplizität $M = 2|S| + 1$. Liegen also z.B. nur gepaarte Elektronen vor, so ergibt sich die Multiplizität zu 1 und man spricht vom sogenannten Singulett-Zustand S . Ergibt sich die Summe der Spinquantenzahlen hingegen zu 1, so ist die Multiplizität 3 und man spricht vom Triplett-Zustand T . Den Unterschied zwischen Singulett- und Triplett-Zustand kann man beispielsweise in der Spektroskopie sehen, bei Aufhebung der Entartung (z.B. im Magnetfeld). Hier entspricht die Anzahl der sichtbaren Spektrallinien gerade der Multiplizität, d.h. bei einem Singulett-Zustand sieht man eine Linie, bei einem Triplett-Zustand hingegen drei Linien.

2.1. Das Jablonski Diagramm

Jedes Elektron des Systems liegt auf einem bestimmten Energieniveau in einem bestimmten Schwingungszustand. Für ein Energieniveau-Schema ist dabei zu beachten, dass die Energiedifferenzen zwischen verschiedenen Energieniveaus um Größenordnungen größer sind als die Energiedifferenzen zwischen den Schwingungszuständen. Wird nun ein Elektron aus seinem Grundzustand G auf ein höheres Energieniveau in einen bestimmten Schwingungszustand angeregt, so wird es unter Wärmeabgabe innerhalb von wenigen Femtosekunden in den energieärmsten Schwingungszustand des Energieniveaus wechseln. Die Übergangswahrscheinlichkeit zwischen zwei Zuständen gleicher Multiplizität ist antiproportional zur Energiedifferenz³.

Der energetische Abstand der Schwingungsniveaus eines angeregten Zustandes nimmt mit zunehmender Energie ab (die Parabelnäherung der Potentialkurven gilt nur bei kleinen Werten). Solange der energetische Abstand der einzelnen Energieniveaus kleiner ist, als die maximal mögliche Schwingungsenergie (sonst zerreißt das Molekül), ist somit im schwingungsfreien Zustand die Zahl der energetisch ähnlichen Schwingungszustände des nächsttieferen Energieniveaus deutlich höher als für das derzeit besetzte Niveau. Nach Fermis Goldener Regel ist somit ein Übergang sehr wahrscheinlich.

Diese gerade beschriebenen strahlungsfreien Übergänge nennt man Internal Conversion. Allgemein werden die energetischen Abstände sowohl der Energieniveaus, als auch der dazugehörigen Schwingungsniveaus mit abnehmender Anregungsenergie größer, womit die Übergänge auch langsamer werden. Der langsamste Übergang ist konsequenterweise der aus dem schwingungsfreien S_1 Zustand nach S_0 . Die Lebensdauer dieses Zustandes kann mehrere Nanosekunden betragen. Dadurch sind andere Prozesse, als die interne Konversion im Prinzip nur aus diesem Zustand möglich (**Regel von Kasha**). Dazu zählen die Fluoreszenz, intermolekularer Energie- und Elektronentransfer bzw. die Interkombination.

Die Lebensdauer dieses Zustandes ist somit für die Beschreibung der Eigenschaften eines Farbstoffes von entscheidender Bedeutung, da sie der Ausgangspunkt für alle nachgeordneten Prozesse ist. Zu ihrer Messung eignet sich die Fluoreszenz besonders gut, da sie ein natürlicher Vorgang ist und ihre Beobachtung die beteiligten Moleküle nicht beeinflusst. Es sei an dieser Stelle aber noch darauf hingewiesen, dass die Abklingzeit der Fluoreszenz (und somit der S_1 Besetzung) durch verschiedene Prozesse beeinflusst wird. Die Fluoreszenz mit der dazugehörigen „**natürlichen Lebensdauer**“ ist nur ein Entleerungskanal. Die tatsächlich beobachtete Lebensdauer ergibt sich aber als Reziprok der Summe aller beteiligten Ratenkonstanten.

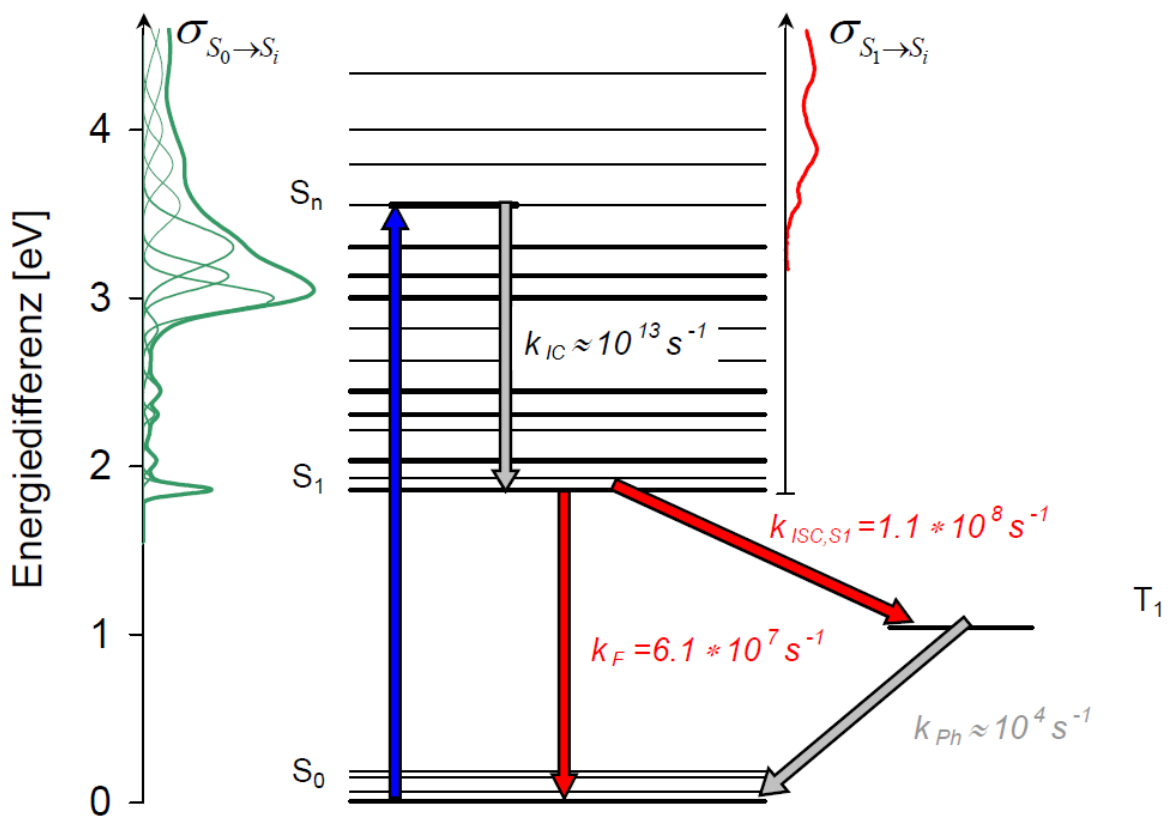


Abbildung 2: Jablonski-Diagramm von Pheophorbid a in Ethanol. Die bestimmten Absorptionsquerschnitte σ_i aus S_0 und S_1 sind ausgehend vom jeweiligen Zustand in Abhängigkeit von der Energiedifferenz dargestellt.

Wie gerade erwähnt, kann sich auch der Spin-Zustand des Elektrons während des strahlungsfreien Übergangs ändern. Es geht also von einem Singulett-Zustand in einen Triplett-Zustand über. Diesen

Prozess nennt man dann Intersystem Crossing. Das Elektron kann nun nicht mehr einfach in den Grundzustand wechseln, da sich dort bereits ein Elektron im gleichen Spin-Zustand befindet. Neben der Abgabe eines Photons muss sich also auch der Spin-Zustand des Elektrons wieder ändern. Dieser Prozess wird dann Phosphoreszenz genannt. Im Vergleich zur Fluoreszenz ist die Übergangsrate viel geringer und die Lebensdauer der angeregten Zustände viel höher.

2.2 Quantenausbeute

Im dargestellten Zusammenhang ist die sogenannte Fluoreszenz-Quantenausbeute Q eine interessante Größe. Sie beschreibt, wie groß der Anteil der von einem Stoff emittierten Photonen zu den von ihm absorbierten Photonen ist. Aufgrund strahlungsfreier Übergänge ist die Anzahl der emittierten Photonen kleiner als die Anzahl der absorbierten und die Quantenausbeute somit kleiner als eins. Sei Γ die Übergangsrate strahlender Übergänge und k die Übergangsrate strahlungsfreier Übergänge, dann ist

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k}$$

2.3. Fluoreszenzlebensdauer

Es wird jedoch schwierig sein, die Quantenausbeute zu bestimmen. Die TCSPC ist für die Messung der Fluoreszenzlebensdauer, also der Übergangsrate strahlender Übergänge konzipiert. Um nun auf die Übergangsraten zwischen Zuständen schließen zu können, wurden die Einstein-Koeffizienten eingeführt. Betrachten wir bspw. ein System mit 2 Zuständen, so ist

$$\dot{N}_2(t) = B_{12} \cdot u \cdot N_1(t) - B_{21} \cdot u \cdot N_2(t) - A_{21} \cdot N_2(t)$$

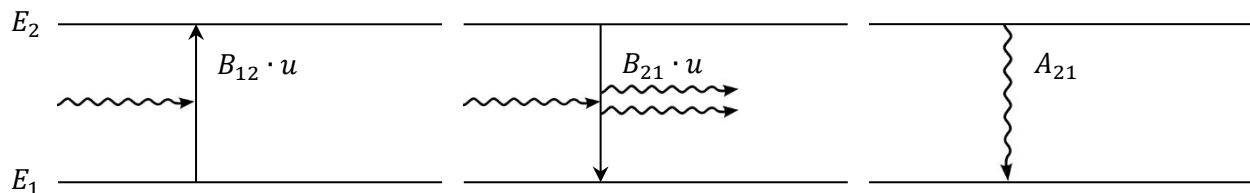


Abbildung 3: Einsteinkoeffizienten für stimulierte Absorption, ~ Emission und spontane Emission.

N_1 – Anzahl der Teilchen im Grundzustand	}	$N = N_1 + N_2 = \text{konst.}$
N_2 – Anzahl der Teilchen im angeregten Zustand		
B_{12} – stimulierte Absorption (Übergang 1 → 2)	}	Einsteinkoeffizienten
B_{21} – stimulierte Emission (Übergang 2 → 1)		
A_{21} – spontane Emission (Übergang 2 → 1)		
u – spektrale Strahlungsdichte		

$$\dot{N}_2 = B_{12} \cdot u \cdot N - (B_{12} \cdot u + B_{21} \cdot u + A_{21})N_2$$

$$\dot{N}_2 = a - b \cdot N_2$$

$$\Rightarrow N_2(t) = \frac{a}{b} + \frac{1}{b} e^{-b(t-t_0)}$$

beispielsweise Wasser) lösen. Die Moleküle würden sich zu Molekülgruppen zusammenschließen, die kaum bis gar nicht mehr fluoreszieren.

Gibt man jedoch einen Stoff hinzu, der sowohl einen hydrophoben als auch einen hydrophilen Anteil hat, so kann dieser das Pheophorbid a einhüllen und so eine Löslichkeit auch in Flüssigkeiten mit überwiegend polaren zwischenmolekularen Bindungen ermöglichen. Diese selbstorganisierte Molekülanordnung des so eingehüllten Pheophorbid-a nennt man auch **Mizelle**.

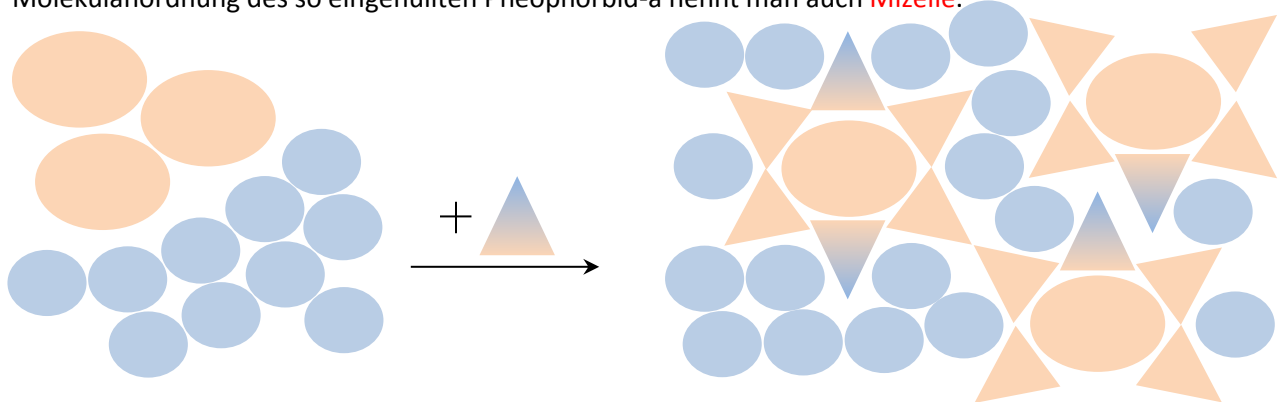


Abbildung 5: Ausbildung von Mizellen am Beispiel Pheophorbid a in Wasser unter Hinzugabe von Triton X-100.

3 Das Programm

Die Messelektronik, die für den Versuch verwendet wird, stammt von der Firma Becker und Hickl GmbH, weswegen auch das Programm SPC300 dieser Firma verwendet wird. Das Programm erstellt ein Histogramm über die detektierten Zeitpunkte. Dabei stehen für das Histogramm 1024 Kanäle bei einer minimalen Klassenbreite von 3.25ps zur Verfügung. Bei Messzeiten im Bereich einiger Nanosekunden bietet das eine hinreichend gute Auflösung.

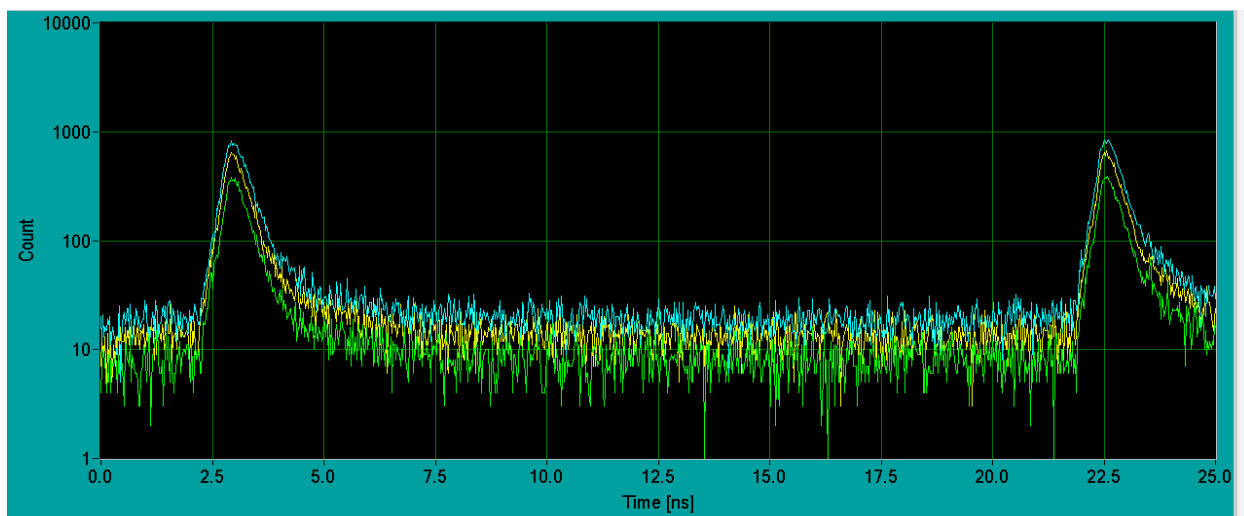


Abbildung 6: vom Programm erstelltes Histogramm dreier Apparatekurven

3.1 Wichtige Einstellungen

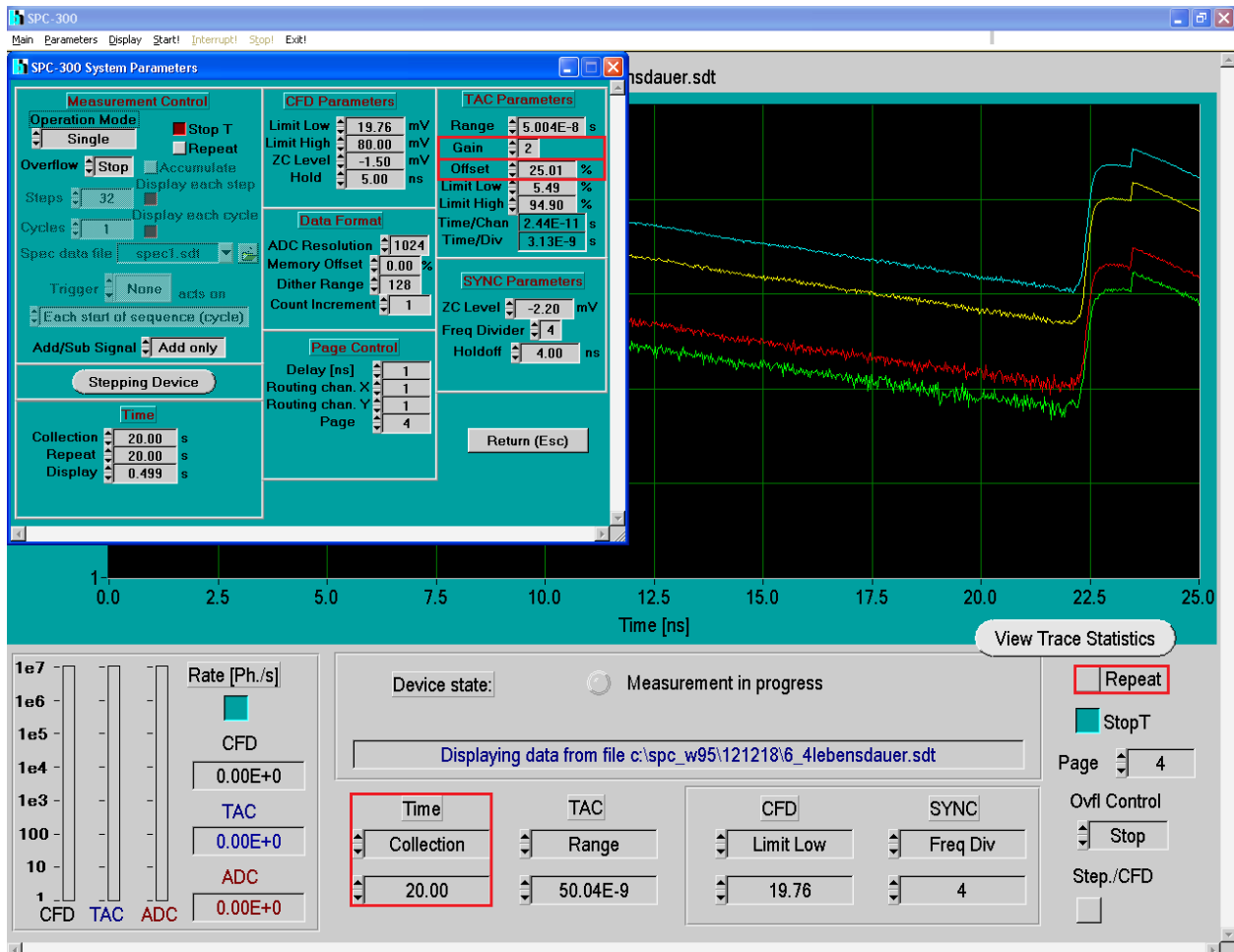


Abbildung 7: Programmoberfläche mit Einstellungen

Auswahlfeld Time:

- COLLECTION** definiert, wie lange die Messung für ein Histogramm dauert, wenn StopT aktiviert ist. Der Parameter sollte so gewählt werden, dass das Histogramm gut erkennbar ist, die Messung aber nicht unnötig in die Länge gezogen wird. Im Allgemeinen sollte ein Großteil der Kanäle mehr als 1000 Counts aufweisen (Erfahrungsaussage).
- DISPLAY** definiert, in welchem Zeitintervall der Bildschirm aktualisiert wird (bitte nicht zu kurz wählen, der Rechner ist nicht der Neueste)
- REPETITION** legt bei wiederholten Messungen die Zeit zwischen den Messungen fest

Auswahlfeld TAC:

- RANGE** legt den Messbereich fest (wählen Sie 50ns)
- OFFSET** legt das aktuelle Messfenster innerhalb des Messbereichs fest (in % des Messbereiches)
- GAIN** ist der Teiler, um wieviel, das Messfenster kleiner, als der Messbereich ist (also wieviel schneller gemessen wird)
- LIMIT L/H** ist gedacht um geringe Nichtlinearitäten am Anfang und Ende des Zeitintervalls des TAC auszublenden

Auswahlfeld CFD:

LIMIT L/H	legt die Limits für die Pulshöhen der zu zählenden Impulse fest. Limit Low dient dazu, das elektronische Schrotrauschen sowie sonstige Rauschimpulse auszusondern – Limit High ist ein Relikt aus Tagen, da man dachte, man müsse Doppelereignisse ausschliessen. Leider lässt es sich nicht höher, als 80 mV einstellen. Dadurch gehen insbesondere bei hohen Spannungen am PMT einige Zählimpulse unnötig verloren, obwohl sie bei den Zählraten ganz links enthalten sind.
ZC LEVEL	Legt die Komparatorspannung fest, bei der der CFD die Messung auslöst
HOLD	legt fest, welcher Zeitraum für die Betrachtung der Limits gilt (5ns, ausser bei Detektoren mit langsamerem Signalanstieg)

Auswahlfeld SYNC:

ZC LEVEL	Legt die Komparatorspannung fest, bei der der CFD des Sync Pulses die Messung stoppt
HOLDOFF	Totzeit zur Vermeidung von Problemen bei mehrfach reflektierten Signalen
FREQ DIV	legt fest, alle wieviel Pulse zur Synchronisation genutzt werden (sinnvoll ist ein Wert, für den die dann gemessenen Zyklen zusammen länger sind, als das Messfenster, aber ein grosser Wert verlängert die Messung)

Steuerfelder:

REPEAT	bietet die Möglichkeit eine Messung bei gleichen Einstellungen zu wiederholen (ohne Speicherung, diese Einstellung ist für die Justage hilfreich).
STOP T	Stoppt die Messung nach der unter COLLECTION vorgegebenen Zeit (wenn aktiviert)
PAGE	bestimmt in welchem Messkanal die Werte abgelegt werden, diese Kanäle sind später im asc file als Blöcke gekennzeichnet
OVFL CONT	regelt, was passiert, wenn die Zähler eines Kanals die maximale Speichertiefe (65536) überschreitet (wählen Sie Stop)

Für vergleichbare Ergebnisse sollten die Einstellungen für alle Messungen beibehalten werden. Für eine gute Auswertung, sollte mindestens ein kompletter Zyklus (vorgegeben durch die Mode-Locking Frequenz des Lasers) gemessen werden, idealerweise nicht unterbrochen (in anderen Worten, vorn und hinten sollte der Signalanstieg durch die Anregung im Fenster enthalten sein).

3.2 Datenformate

Bitte legen Sie unter C:/SPC ein neues Verzeichnis für Ihre Gruppe an oder speichern Sie Ihre Daten auf einem USB Stick.

Das Programm SPC300 erstellt beim Speichern (DATEI > SPEICHERN) einer Messung eine Datei des Typs *.sdt. Diese Datei enthält neben der Messung (also dem Histogramm) auch alle eingestellten Parameter (wie GAIN, OFFSET, ...). Beim Öffnen einer Datei diesen Typs kann eine Messung also vollständig nachvollzogen werden.

Da nun aber die gängigen Auswertungsprogramme nicht in diesem Format arbeiten, muss eine Datei des Typs *.sdt für die Weiterverarbeitung in ein anderes Format konvertiert werden (DATEI > CONVERT). Das Programm bietet hierzu die Möglichkeit ASCII-Dateien *.asc zu erstellen. Diese können nun mit Hilfe von Standardprogrammen weiterverarbeitet werden, haben aber den Nachteil, dass die gespeicherten Informationen über die eingestellten Parameter verloren gehen. Es ist daher bei der Konvertierung darauf zu achten, dass diese Parameter separat gespeichert und der Messung zugeordnet werden können, damit diese vollständig nachvollziehbar bleibt. Die .asc Datei ist sehr einfach (einspaltig) aufgebaut:

```
<HEADER>      das sind ein paar Zahlen, die nur dem Programmierer etwas sagen.....
*BLOCK 1*
<Werte>        1024 Werte – die Counts aus den Kanälen
*END*
*BLOCK 2*
...
```

Die Reihenfolge der Blocks kann vertauscht sein, sie wird durch die Reihenfolge der Nutzung der Kanäle zur Messung vorgegeben. Insgesamt können 256 Kanäle zur Messung genutzt werden, von denen jeweils 8 auf dem Bildschirm angezeigt werden können (Auswahl unter TRACE PARAMETER). Es empfiehlt sich jedoch, nicht mehr, als 18 Kanäle zu nutzen (Bug).

Für die Verwendung des Auswerteprogramms muss die Apparatefunktion in einem der Blocks enthalten sein.

4 Apparatefunktion und Einflussfaktoren

Das Messsignal weicht vom theoretischen Signal insbesondere am Anfang deutlich ab. Die Ursache hierfür liegt in der Impulsantwort des Systems. Der Laserpuls ist kein d-Puls, der Lichtweg nicht perfekt, der Detektor hat eine bestimmte Breite in der Messantwort, usw.

Da auch die meisten dieser Störeinflüsse der Statistik unterliegen, ändern sie sich nur wenig mit der Zeit und sie betreffen alle Signale in vergleichbarem Maße.

Daher macht es Sinn, die Impulsantwort des Systems zu bestimmen und bei der Auswertung die Faltung des tatsächlichen Signales mit der **Impulsantwort (IRF)** zu betrachten.

$$R(t) = \int_0^t dt' L(t')F(t - t')$$

, wobei F das Fluoreszenzabklingen und L die IRF darstellt.

4.1 Der Laserpuls

Der Laser emittiert Laserpulse mit einer Frequenz von 50MHz bei einer Wellenlänge von 652nm. Die Pulsbreite beträgt laut Datenblatt ca. 75ps. Das bedeutet, dass bereits bei einem Messfenster von 25 ns (wie hier verwendet) der Puls kein δ-Puls mehr ist, sondern über drei Kanäle reicht. Allerdings sind die anderen Einfüsse wesentlich stärker, so dass bei der Aufnahme der Impulsantwort das Streulicht des Lasers als ausreichend kurzzeitig angeregt angesehen werden kann. Die verwendeten Detektoren und auch die optischen Komponenten haben z.T. erheblichen Einfluss auf die Impulsantwort. Um dies zu

verdeutlichen, wurde für den Versuch bewusst ein nicht allzu schneller Photomultiplier mit überdurchschnittlich hohem Rauschen gewählt.

4.2. Die Laufzeitdifferenz

Bei der Messung wird ständig Referenz- und Messpuls zeitlich miteinander verglichen. Dabei haben aber beide beteiligten Detektoren verschiedene Anstiegs- und Verzögerungszeiten. Im Datenblatt zum Detektor findet sich beispielsweise die Bemerkung, dass die **Verzögerungszeit des Detektors** durch ein 1m bis 3m längeres Kabel für das Referenzsignal ausgeglichen werden kann. Für einen festen Messaufbau ändert sich die Zeitdifferenz zwischen Referenz- und Detektorsignal aber nicht mehr. Sie kann daher mit Hilfe einer Messung, bei der statt des fluoreszierenden Stoffes ein reines Streumedium verwendet wird, ermittelt werden und mittels OFFSET korrigiert werden.

4.3 Der Strahlteiler

Der Laserpuls wird mit Hilfe eines halbdurchlässigen Spiegels in einen Referenzpuls und einen am Detektor auftreffenden Puls geteilt. Dabei ist eine Seite antireflex-beschichtet, um einen **Doppelpuls** zu vermeiden. Der Referenzpuls unterliegt natürlich ähnlichen Schwankungen wie der Messpuls. Für eine gute Messung ist daher ein sauberes Referenzsignal unerlässlich. Bei schlechter Justage weist das Messsignal oft eine zusätzliche Schwingung auf.

4.4 Anregungsintensität

Bei der TCSPC soll pro Messung nur genau ein Photon des Laserpulses mit dem zu untersuchenden Stoff wechselwirken. Wären es zwei oder mehr Photonen pro Messung, so wäre die Messung trotzdem bereits nach der Detektion des ersten Photons beendet. Die durchschnittliche Lebensdauer würde sich somit fälschlicherweise verkürzen. Diesen Effekt nennt man **Peak-Pile-Up-Effekt**. Um nun zu verhindern, dass mehr als ein Photon auf die Küvette trifft, wird die Intensität des emittierten Laserpulses soweit verringert, dass nur etwa alle 100 Pulse überhaupt ein Photon detektiert werden kann. Dazu wird sowohl ein Graufilter als auch ein $\lambda/2$ -Plättchen verwendet. Der Vorteil des $\lambda/2$ -Plättchens ist, dass die Intensität des polarisierten Laserpulses durchstimmbar variiert werden kann. Die Verwendung eines solchen Plättchens ist besonders hilfreich, wenn sowohl stark als auch schwach konzentrierte Stoffe untersucht werden, da die Wahrscheinlichkeit ein fluoresziertes Photon zu detektieren mit der Konzentration abnimmt. Mit Hilfe des $\lambda/2$ -Plättchens kann also die Intensität so nachgestellt werden, dass die Histogramme verschiedener Messungen qualitativ besser verglichen werden können.

Schwierig wird es, wenn unterschiedliche Polarisationsrichtungen des Anregungslichtes ein dramatisch unterschiedliches Zeitverhalten aufweisen, was zu einer Abhängigkeit der Signalkinetik vom der Position des $\lambda/2$ Plättchens führen würde, das kann aber vernachlässigt werden.

4.5 Die Küvette

Nach der Dämpfung trifft der Laserpuls auf die Küvette, in der sich der zu untersuchende Stoff befindet. Dort kommt es zur Anregung eines Moleküls, der bei der Rückkehr in den Grundzustand fluoresziert. Nun kann es aber auch dazu kommen, dass das fluoreszierte Photon wiederum ein Molekül anregt.

Diesen Effekt bezeichnet man als **Reabsorption**. Es dauert daher länger, bis ein fluoresziertes Photon den Detektor erreicht, wodurch die Lebensdauer scheinbar erhöht wird. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, wird der Laser so ausgerichtet, dass der Laserpuls möglichst nah am Rand der Küvette läuft. Zum anderen verwendet man Proben mit geringer Konzentration des zu untersuchenden Stoffs. (Beim Versuch zum Nachweis der Reabsorption sind die Effekte deutlich grösser, wenn man den Laserstrahl nicht optimal positioniert, das darf an der entsprechenden Stelle gern gemacht werden.)

Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass aufgrund der Länge der Küvette und einer möglichen Reflexion an den beiden Enden Moleküle entsprechend ihrer Position in der Küvette zu unterschiedlichen Zeiten angeregt werden. Eine Abschätzung der dadurch entstehenden Unsicherheit liefert die Zeit für einen vollen Durchlauf durch die Küvette. Mit der Lichtgeschwindigkeit in Ethanol von $2.2 \cdot 10^8 \text{ m/s}$ und einer Länge der Küvette von 1 mm ergibt sich somit eine zeitliche Unsicherheit von etwa 5 ps . **Dies kann durch eine gute Abbildung auf den Detektor verringert werden.**

4.5 Der Detektor

Versorgt wird der Detektor von einer externen Spannungsquelle, bei der manuell die Spannung reguliert werden kann. Dadurch kann die Empfindlichkeit des Detektors eingestellt werden. Verwendet man also eine geringe Spannung, so ist auch die Empfindlichkeit entsprechend gering, d.h. nur starke Signale werden vom Detektor erfasst. Mit zunehmender Spannung erhöht sich die Empfindlichkeit des Detektors damit aber auch das Rauschsignal. Es sollte daher bereits zu Beginn der Messungen eine Spannung eingestellt werden, bei der das Rauschen im Vergleich zum relevanten Signal möglichst klein bleibt.

Da sich der Einfluss des Detektorrauschens aber nicht vollständig vermeiden lässt, handelt es sich bei den gemessenen Kurven um eine Überlagerung des Fluoreszenzsignals und des Detektorrauschens. Ist das **Detektorrauschen zeitunabhängig**, so kann das erwartete Modell eines exponentiellen Abfalls der Übergangsrate für die Fluoreszenz durch Addition einer Konstante für das Rauschen modifiziert werden.

$$\dot{N}_2(t) = -e^{-b(t-t_0)} + c$$

4.6. Der Constant Fraction Discriminator

Trifft nun ein (fluoresziertes) Photon auf den Detektor, so wird dieses Signal in einen elektrischen Puls umgewandelt, welcher einfachheitshalber als gaußförmig betrachtet werden soll. Ähnlich wie der oben diskutierte Laserpuls hat auch der elektrische Puls eine zeitliche Breite und eine Intensität. Dabei haben die elektrischen Pulse verschiedener Photonen zwar vergleichbare zeitliche Breiten, aber unterschiedliche Intensitäten. Für die Zuordnung eines gemessenen Photons zu einem bestimmten Zeitpunkt gibt es nun verschiedene Möglichkeiten. Beispielsweise könnte die Zeit verwendet werden, bei der die Intensität einen gewissen Schwellwert überschreitet. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass dieser Schwellwert bei unterschiedlichen Pulsen zu unterschiedlichen Zeiten, bzw. gar nicht erreicht wird.

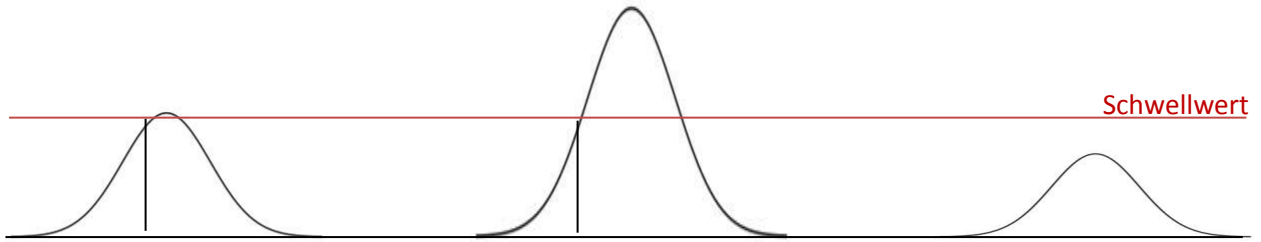


Abbildung 8: Zuordnung eines Pulses zu einem Zeitpunkt mit Hilfe eines Schwellwertes

Für qualitativ vergleichbare Zuordnungen eines Pulses zu einem Zeitpunkt, auch für unterschiedliche Intensitäten, bietet es sich daher an einen Schwellwert in Abhängigkeit des Intensitätsmaximums des jeweiligen Pulses zu verwenden. Hierfür wird ein **Constant Fraction Discriminator (CFD)** verwendet. Dieser teilt den eingehenden Puls in zwei Teilpulse auf und verändert nur die Parameter des einen: die Intensität wird auf einen Bruchteil verringert und das Intensitätsmaximum wird zeitlich verzögert. Anschließend werden die beiden Teilpulse wieder zusammengeführt, und zwar so, dass der ausgehende Puls sich durch die Differenz der beiden ergibt. Die Zuordnung dieses neuen Pulses zum Zeitpunkt seines Intensitätsnulldurchgangs ist dann auch für unterschiedliche Intensitäten qualitativ vergleichbar.

$$p_{\text{ein}}(t) = A \exp\left(-\frac{t^2}{2\sigma^2}\right)$$

$$p_1(t) = A' \exp\left(-\frac{t^2}{2\sigma^2}\right) \quad , \quad p_2(t) = \alpha A' \exp\left(-\frac{(t - t^*)^2}{2\sigma^2}\right)$$

$$\Rightarrow p_{\text{aus}}(t) = p_1(t) - p_2(t) = A' \exp\left(-\frac{t^2}{2\sigma^2}\right) \left[1 - \alpha \exp\left(\frac{tt^*}{\sigma^2} - \frac{t^{*2}}{\sigma^2}\right)\right]$$

$$\Rightarrow t_0 = \frac{\sigma^2}{t^*} \ln \alpha^{-1} + \frac{t^*}{2} \neq f(A')$$

t_0 hängt also nicht mehr von der Intensität sondern nur noch von der zeitlichen Breite des Pulses und dem CFD ab.

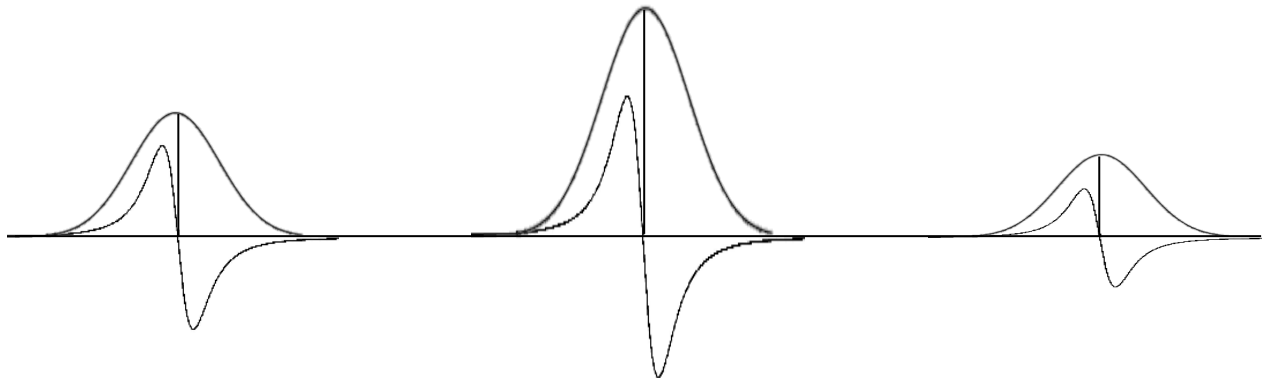


Abbildung 9: Zuordnung eines Pulses zu einem Zeitpunkt mit Hilfe eines CFDs

5 Arbeitsauftrag

5.1 Vorbereitung - Setzen Sie sich in Vorbereitung auf den Versuch mit den verwendeten Geräten (deren Aufbau und Funktion) auseinander: (gepulster) Laser, Zeit-Amplituden-Konverter, $\lambda/2$ -Plättchen, Constant Fraction Discriminator, ...

Machen Sie sich insbesondere Gedanken zu den im Text rot hervorgehobenen Begriffen, sowie über: Laser, Laser-Moden, Modelocking, Güteschaltung, Einsteinkoeffizienten, Huygens-Fresnell Prinzip, Fourier-Transformation.

Machen Sie sich mit den Grundlagen lumineszierender Stoffe vertraut: Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Jablonski-Diagramm, Löslichkeit, Mizellen, ...

5.2 Rauschsignal - Bereiten Sie den Aufbau für die Messungen vor. Verschaffen Sie sich zunächst einen Überblick über den konkreten Versuchsaufbau, richten Sie die Geräte aus und kontrollieren Sie die Lichtwege. Im Programm erscheint SYNC OK, wenn das Referenzsignal richtig eingestellt ist. Sinusförmige Störungen im Messsignal sind im allgemeinen auch auf ungünstige Beleuchtung der Referenzdiode zurückzuführen.

Stellen Sie eine Probe mit geringer Pheophobid a-Konzentration her. Setzen Sie nun die Küvette in die Halterung ein und stellen Sie die Betriebsspannung des Detektors zunächst auf etwa 0.75V. Machen Sie sich (beispielsweise durch Testmessungen) mit den Einstellungen des Programms vertraut.

5.2.1 CFD – Setzen Sie die am Platz vorhandene Streuküvette (stark verdünntes Ludox) ein und wählen Sie eine Spannung am Photomultiplier, bei der die Apparatefunktion mit guten Zählraten aufgezeichnet wird, jedoch noch keine Artefakte auftreten (bei der Wahl der richtigen Spannung hilft der REPEAT Modus). Die Messung machen Sie dann mit fester Messzeit. Wählen Sie verschiedene CFD Schwellwerte zwischen 5 mV und 60 mV und registrieren Sie die Halbwertsbreite der Apparatefunktion, sowie den Maximalwert und den durchschnittlichen Rauschwert. Wählen Sie für die weiteren Messungen einen CFD Wert klein genug für eine möglichst grosse Zählrate, aber dennoch hoch genug, um Artefakte und Rauschen niedrig zu halten.

5.2.2. SNR - Untersuchen Sie das Rauschsignal, indem Sie die Spannung am Detektor zwischen etwa 0.6V und 1.1V variieren und jeweils eine Messung mit und eine ohne Probe durchführen. Bestimmen Sie die Spannung, bei der das Verhältnis zwischen Rauschsignal und relevantem Signal am geringsten ist. Dazu bietet es sich an, den Quotienten aus der Anzahl aller Rauschsignale zu allen relevanten Signalen zu bilden und tabellarisch darzustellen.

5.3 Apparatefunktion - Verwenden Sie für alle folgenden Messungen die aus 5.2 ermittelte optimale Betriebsspannung des Detektors und Schwellwert des CFD, um die Ergebnisse besser vergleichen zu können.

Nehmen Sie nun eine Apparatekurve mit Hilfe der Streuküvette auf und stellen Sie diese graphisch dar. Sie brauchen in jedem Datenfile einen Messblock, der die Apparatefunktion enthält für die Auswertung (idealerweise BLOCK 1) für die spätere Auswertung. Wenn Sie am Anfang die Apparatefunktion einmal

im Block 1 aufgenommen haben, können Sie diese dort belassen und immer mit abspeichern. Normalerweise sollte man sie immer neu bestimmen, aber hier sind die Schwankungen sehr gering.

Um die Apparatefunktion aufzunehmen, müssen Sie den Detektor für die Anregungswellenlänge empfindlich machen, d.h. den Interferenzfilter der normalerweise vor Fehlbedienung schützt, durch ein Graufilter ersetzen. **ACHTUNG: Bevor Sie den Filterkasten öffnen, IMMER die Spannung auf 0V drehen, sonst zerstören Sie den PMT !!!** Nach der Messung wieder den Interferenzfilter einsetzen.

5.4 Fluoreszenzlebensdauer - Messen Sie die Fluoreszenzlebensdauer (Count rate ca. $2 \dots 5 \cdot 10^5$ Counts/s) von Pheophorbid a (OD = 0,1...0,2) und stellen Sie Ihr Ergebnis graphisch dar.

5.5 Peak-Pile-Up-Effekt - Führen Sie nun Messungen mit verschiedenen erhöhten Intensitäten des Laserpulses durch. Stellen Sie Ihr Ergebnis graphisch und tabellarisch dar und vergleichen Sie es mit dem aus 5.4.

5.6 Reabsorption - Stellen Sie mindestens 5 Proben mit verschiedenen verschiedenen Konzentrationen an Pheophorbid a her, so dass die optische Dichte zwischen 0,1 und 1,5 liegt.

Messen Sie die Fluoreszenzlebensdauer für diese Probe. Stellen Sie Ihr Ergebnis graphisch und tabellarisch dar und vergleichen Sie es mit der Fluoreszenzlebensdauer aus 5.4.

5.7 Pheophorbid a in Wasser - Stellen Sie mindestens 5 Proben gleicher Konzentration an Pheophorbid a her, bei denen sich aber das Verhältnis von Ethanol zu Wasser unterscheidet. Die stärksten Effekte sind für Wasseranteile im Bereich ab 50% zu erwarten. Eine Probe sollte zum Vergleich nur Ethanol und eine möglichst viel Wasser enthalten.

Führen Sie für jede dieser Proben eine Messung durch und stellen Sie diese graphisch dar. Diskutieren und interpretieren Sie die Verläufe bei zunehmendem Wasseranteil.

5.8 Triton X-100 - Triton X-100 ist ein Detergenz, welches Pheophorbid in Mizellen einbettet und so wasserlöslich macht.

Geben Sie 2 Tropfen der 10%igen Stammlösung des Triton X-100 in die Probe aus 5.7 mit höchstmöglichem Wasseranteil und führen Sie die Messungen erneut durch. Stellen Sie Ihre Ergebnisse graphisch dar und vergleichen Sie sie mit denen aus 5.7.

Gehen Sie in der Auswertung auf die Wirkungsweise von Triton X-100 ein und erklären Sie, warum das Pheophorbid a wieder fluoresziert.

5.9 Anisotropie - Drehen Sie nun den Polarisationsfilter hinter der Küvette zunächst ebenfalls in die senkrechte Position (d.h. die detektierten Photonen sind parallel zu den eingehenden polarisiert). Messen Sie erneut die Probe aus 5.4.

Drehen Sie den Polarisationsfilter in die waagerechte Position (d.h. die detektierten Photonen sind senkrecht zu den eingehenden polarisiert) und wiederholen Sie die Messung.

Verwenden Sie nun eine Probe aus 5.8 mit hohem Wasseranteil (und Triton X-100) und messen Sie sowohl für die senkrechte als auch für die waagerechte Position.

Stellen sie alle Ergebnisse graphisch dar und vergleichen sie die Verläufe bei paralleler und senkrechter Polarisation. Korrigieren Sie mit Hilfe der Messungen an Pheo in Ethanol eventuelle Empfindlichkeitsunterschiede des Messplatzes für die verschiedenen Polarisationsrichtungen und stellen Sie auch die Anisotropie

$$r = \left| \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \right|$$

graphisch dar und vergleichen Sie die Verläufe für Pheophorbid a in Ethanol und in Ethanol/Wasser mit Triton X-100. Diskutieren und interpretieren Sie die Unterschiede der beiden Verläufe.