

# **Dreidimensionale konfokale Absorptionsmessungen zur räumlichen Strukturaufklärung**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

vorgelegt von  
Dipl.-Chem. Rainer Bornemann  
geb. am 13. Juli 1971 in Schmallenberg

eingereicht beim Fachbereich 8  
der Universität Siegen  
urn:nbn:de:hbz:467-1073

14. September 2005

für meine Patenkinder Jan Oskar und Jan

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Juni 2005  
Vorsitzender: PD Dr. E. Thiel  
Beisitzer: Prof. Dr. A. Mews, Prof. Dr. U. Lemmer

# Zusammenfassung

In Rahmen dieser Arbeit wird ein neuartiges Messverfahren zur dreidimensionalen Mikroskopie vorgestellt. Dabei erfolgt die Bilderzeugung allein anhand einer induzierten Transmissionsänderung bestimmter Bestandteile innerhalb einer transparenten Probe.

Dazu wird ein mathematisches Modell erarbeitet, das die Bilderzeugung aufgrund der photophysikalischen Hintergründe am Beispiel eines einfachen Farbstoffsystems erläutert. Mit Hilfe dieses Modells lässt sich die erzielbare räumliche Auflösung und Nachweisempfindlichkeit des Verfahrens bestimmen. Weiterhin prognostiziert dieses Modell einen alternativen Weg, um die Zerfallskinetik angeregter Molekülzustände zu untersuchen.

Es wird ein Messaufbau beschrieben, mit dem die einzelnen Vorhersagen des Modells experimentell überprüft werden können. Es werden Messungen gezeigt, die die Vorhersagen des Modells einzeln überprüfen und die Möglichkeiten des Verfahrens aufzeigen. Diese Untersuchungen zeigen, dass eine räumliche Abbildung nicht fluoreszierender, mikroskopischer Proben mit hoher Auflösung möglich ist. Weiterhin wird die erzielbare Nachweisempfindlichkeit abgeschätzt, die mit derzeitigen kommerziell erhältlichen Messlichtquellen erreichbar ist. Ebenso wird gezeigt, dass es möglich ist die Dynamik transientser Zerfallsprozesse mit diesem Verfahren zu untersuchen.

Auf Grundlage dieser Arbeiten wurde im Jahre 2002 von der Universität Siegen erfolgreich ein Patent angemeldet.

# Abstract

This study introduces a new measurement procedure for three-dimensional microscopy. With this procedure, image formation results merely from an induced change in transmission of certain components in a transparent sample.

In order to achieve this, a mathematical model was created to explain image formation due to the photophysical backgrounds based on a simple dye system. Using this model, the attainable spatial resolution and sensitivity of detection of this measurement technique can be determined. Furthermore, the model forecasts an alternative method to examine the molecular dynamics.

Also contained is a description of a setup for the experimental verification of the individual forecasts of the model. The study describes measurements to verify the individual forecasts of the model and to indicate the prospects of the procedure. The tests demonstrate that the spatial imaging of non-fluorescent specimen with high resolution is possible. Furthermore, the study contains an estimation of the attainable detection sensitivity which can be achieved with commercialized light sources for measurement currently available. The study also shows that the dynamics of transient decay processes can be examined using this procedure.

Based on these studies, the University of Siegen in Germany has successfully filed a patent in 2002.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die zum Erfolg dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben und die mir letztendlich geholfen haben, viele gefährliche Klippen des Laboralltages zu meistern.

Die Arbeit entstand im Zeitraum von Januar 1999 bis April 2004 unter der Betreuung von Herrn PD Dr. Erwin Thiel. Er stand während dieser Zeit immer als hilfreicher Diskussionspartner zur Verfügung. Für die Überlassung dieses interessanten Themas möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken. Ebenso bedanke ich mich bei dem Arbeitsgruppenleiter Herrn Prof. Dr. Alfred Meixner für die Anregungen und Ideen von seiner Seite.

Bei der DFG und der BASF AG für die finanzielle Unterstützung und bei der Fa. Provendis bei der Unterstützung zur Einreichung des Patentes.

Für die Experimente mussten viele mechanische und elektronische Bauteile angefertigt werden. Hier mein Dank an D. Gaumann, G. Neumann, B. Meyer, P. Rickert, B. Goerke, W. Twelsick, R. Wumbach.

Mein Dank gilt auch meinen Kollegen im ZESS und in der Arbeitsgruppe M. Adlung, M. Heupel, I. Gregor, M. Bornemann und R. Püschl. Sie hatten immer eine helfende Hand wenn Not am Mann war.

Meinen derzeitigen Chef Prof. Dr. U. Lemmer gilt der Dank, dass er die Hoffnung in meine Arbeit immer wieder neu bekundet hat.

Zum Schluss gilt der Dank noch meiner Mutter, die mich auf dem gesamten Weg immer unterstützt hat.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1. Zielsetzung . . . . .	10
<b>2. Theorie</b>	<b>12</b>
2.1. Molekulare Grundlagen . . . . .	12
2.2. Beschreibung des Grundkonzeptes . . . . .	17
2.3. Intensitätsverteilung im Laserfokus und Auflösung Mikroskopischer Verfahren . . . . .	18
2.4. Zusammenfassung . . . . .	26
<b>3. Beschreibung des Experimentes</b>	<b>27</b>
3.1. Theorie der Signalgewinnung . . . . .	27
3.1.1. Konzentration angeregter Moleküle $c_{trans}(x, y, z)$ am Ort $(x, y, z)$ :	28
3.1.2. Intensitätsabnahme des Messlichtes . . . . .	30
3.2. Transmissionsänderung eines quasi "punktförmigen" Absorbers bei $(x, y, z)$ :	30
3.3. Berechnung für Gaussförmige Strahlprofile von Anregungs- und Messlaser:	33
3.4. Auflösung für beugungsbegrenzte Strahlen . . . . .	37
3.5. Zeitabhängigkeit der induzierten Transmissionsänderung . . . . .	38
3.6. Bestimmung der Empfindlichkeitsgrenze . . . . .	40
3.7. Zusammenfassung . . . . .	42
<b>4. Experimenteller Aufbau</b>	<b>44</b>
4.1. Aufbau zur Bildaufnahme und Zeitverhalten der Probe . . . . .	44
4.2. Justage des Experimentes . . . . .	47
4.3. Rauschanalyse . . . . .	48
4.4. Zusammenfassung . . . . .	50
<b>5. Beschreibung der Messergebnisse</b>	<b>51</b>
5.1. Test der axialen Auflösung . . . . .	51
5.2. Diskriminierung hintereinanderliegender absorbierender Schichten . . . . .	54
5.3. 3-Dimensionale Bildaufnahme . . . . .	55
5.4. Lebensdauer-Messungen . . . . .	59
5.5. Abschätzung der erreichbaren Messempfindlichkeit . . . . .	63

## INHALTSVERZEICHNIS

5.6. Zusammenfassung der Messergebnisse . . . . .	66
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>67</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>69</b>
A.1. Geräteliste . . . . .	69
A.2. Lebenslauf . . . . .	70
A.3. Veröffentlichungen . . . . .	71
A.4. Tagungsbeiträge . . . . .	71
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>



# 1. Einleitung

Mit dem Beginn der modernen Mikroskopie hat Ernst Abbe die Grundlagen zur Erforschung des Mikrokosmos gelegt [1]. Erst mit seinen grundlegenden Arbeiten konnten grundlegende Fragestellungen der Biologie erforscht werden und die eigentlichen Zusammenhänge unserer Umwelt erkannt werden. Auf so wichtige Fragen, wie z.B. “Wie ist eine Zelle aufgebaut?”, “Welche Bestandteile der Zelle wirken in welcher Weise zusammen?” konnten erst dann beantwortet werden, als es gelang diese Strukturen sichtbar zu machen, voneinander abzugrenzen und abzubilden.

Um diese Strukturen zu unterscheiden ist es oftmals jedoch nötig diese anzufärben und damit einen Kontrast, der zur Unterscheidung dient, künstlich herbeizuführen. Dabei werden oftmals Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt [2]. Diese Farbstoffe absorbieren einen Teil des Anregungslichtes und geben ihn in Form von Fluoreszenz langwellig verschoben wieder ab. Durch geeignete Farbfilterkombinationen lässt sich das Anregungslicht mehr oder weniger gut von dem Fluoreszenzlicht abtrennen [3] und man erhält ein nahezu untergrundfreies Bild der angefärbten Strukturen.

Aber es bleibt bei der reinen Beobachtung dieser Strukturen doch meist unklar, wie die räumliche Struktur bzw. die dreidimensionale Anordnung der Objekte untereinander im einzelnen aufgebaut ist.

Lange Zeit konnten dreidimensionale Strukturen nur durch mechanisches schichtweises Abtragen aufgenommen werden und durch nachträgliches Zusammenstellen der Bilder rekonstruiert werden. Dabei ist man in der Tiefenauflösung natürlich sehr beschränkt und damit ist unweigerlich eine Zerstörung der Probe verbunden. Eine alternative Möglichkeit besteht darin, aus den Bildern mit unterschiedlicher Fokussierung und mit Hilfe eines mathematischen Entfaltungsalgorithmus ein räumliches Bild zu rekonstruieren[4]. Diese mathematischen Konzepte stehen dem Anwender aber erst seit ein paar Jahren praktisch zur Verfügung, seitdem Rechenzeit relativ preiswert zur Verfügung steht. Diese Verfahren sind trotz ihrer Einfachheit in der Anwendung aber niemals frei von Artefakten [5] und man erreicht nur unter den seltensten Rahmenbedingungen eine Auflösung in der Abbildung, die an die physikalischen Grenzen der Mikroskopie heran reicht.

Erst die Erfindung der konfokalen Mikroskopie durch M. Minsky im Jahre 1957 brachte hier einen Durchbruch[7]. Mit dieser vergleichsweise einfachen Technik gelang es erstmals, die räumliche Struktur einer mikroskopischen Probe zerstörungsfrei direkt aufzuklären bzw. aufzuzeichnen. Dabei wird die Probe quasi optisch zerschnitten, indem die Beleuchtung der Probe mit Hilfe eines Punktabbildes erfolgt, und dieses Bild durch ein Pinhole betrachtet wird. Dieses Pinhole wirkt dabei als Raumfilter, das alle Bildebenen ausblendet, die nicht in der Fokalebene der Punktabbildung der Beleuchtung liegen. Man erhält also ein Schnittbild aus der Fokalebene, ohne dass die Probe zerschnitten werden muss. Rastert man nun die Probe noch dreidimensional ab, erhält man daraus ein komplettes

räumliches Abbild der Probe welches weiterhin noch fast frei von Bildartefakten ist und zudem noch die physikalisch erzielbare Auflösung direkt erreicht.

Auf Grundlage von Teilen dieser Arbeit wurde ein Patent angemeldet, dass vom Deutschen Patent und Markenamt mittlerweile als solches anerkannt [6] und mit einem Hochschülerfinderpreis des Landes NRW im Jahre 2003 ausgezeichnet wurde.

### 1.1. Zielsetzung

Meistens basiert die konfokale Mikroskopie auf der Fluoreszenzmikroskopie [2], mit allen Vorteilen, aber auch deren Einschränkungen. Eine ausgeprägte Fähigkeit zur Fluoreszenz ist aber eine sehr selten anzutreffende Eigenschaft unserer normalen Umgebung [8]. So greift man meist auf relativ exotische Markersonden zurück, die dabei wiederum oftmals eine ganze Reihe von unerwünschten Nebenwirkungen haben. So sind z.B. Fluoreszenzfarbstoffe in der Regel nicht sehr photostabil [9] im Vergleich zu nicht fluoreszierenden Farbstoffen. Zudem sind sie relativ komplexe Moleküle, die die biologischen Funktionen (z.B. einer Zelle) beeinflussen bzw. behindern können [10].

Es besteht dadurch großes Interesse, Farbstoffe zu finden, die diese Einschränkungen nicht mit sich bringen. Andererseits ist eine Vielzahl von Farbstoffen bekannt, die zum Einen ausgezeichnet photostabil sind und zum Anderen die Funktionen der biologischen Abläufe nicht beeinflussen. Aber diese Farbstoffe fluoreszieren in der Regel nicht oder nur äußerst schwach und scheiden deshalb für die normale Fluoreszenzdetektion aus.

Andere Abwandlungen dieses Verfahrens, die die dreidimensionale Bilderfassung ermöglichen sollen, sind vorgestellt worden. Dabei ist zunächst die konfokale Raman-Mikroskopie zu nennen [11]. Bei dieser Methode wird das von der Probe inelastisch gestreute, und damit wellenlängenverschobene Anregungslicht zur Detektion genutzt. Ein Hauptproblem der Anwendung bei dieser Methode ist, dass eine geringe Restfluoreszenz der Probe genügt um das nur äußerst schwache Ramanlicht sehr effektiv zu überblenden und damit die Messung drastisch erschwert.

Als weiteren Weg sind Methoden entwickelt worden, die auf einer Mehrphotonenabsorptionen beruhen [12]. Das Problem dieser Methoden liegt darin, dass zur Erzeugung der nichtlinearen optischen Effekte sehr hohe Intensitäten benötigt werden. Dies ist im Allgemeinen derzeit nur mit gepulsten Lasersystemen erreichbar. Daraus folgt aber weiterhin, dass durch die hohe Lichtintensität eine hohe Materialbelastung einher geht [13].

Aus diesem Dilemma soll diese Arbeit einen neuen Ausweg anbieten. Sie wird ein neuartiges Messverfahren vorstellen, dass die dreidimensionale Bildaufnahme einzig und allein anhand der direkten Absorption bzw. einer induzierten Änderung der Transmission erlaubt. Zudem liegt die experimentell erzielbare räumliche Auflösung in der Größenordnung einer idealisierten konfokalen Mikroskopanwendung.

Dabei werden zunächst die photochemischen Grundlagen des vorgestellten Experimentes ausgearbeitet und die Ergebnisse der theoretischen Überlegungen anhand von einigen praktischen Beispielen belegt.

Weiterhin soll auf die zu erreichende Empfindlichkeit eingegangen werden, sowie auf weitere Messparameter, die das Experiment gleichzeitig zur Interpretation der Bilddaten

## *1. Einleitung*

noch zur Verfügung stellt.

Anschließend sollen die Ergebnisse zusammengetragen werden und dem Experimentator damit ein neues leistungsfähiges Werkzeug zur dreidimensionalen Bildgebung in die Hand gegeben werden, welches auch gleichzeitig Informationen über die Dynamik der photophysikalischen Prozesse nach erfolgter Anregung liefern kann.

## 2. Theorie

Die Fragestellung, die sich ergibt wenn man ein 3-dimensionales Bild aufnehmen möchte, lässt sich letztendlich auf die Positionsbestimmung einer dünnen absorbierenden Schicht im Raum zurückführen. Wie diese Positionsbestimmung erfolgt, soll in diesem und dem folgenden Kapitel näher beschrieben werden.

Da es sich in dieser Arbeit um ein lichtmikroskopisches Verfahren mit organischen Farbstoffmolekülen als Sonden handelt, soll zunächst am Beispiel des Farbstoffes Rhodamin 6G veranschaulicht werden, welche Prozesse sich bei Wechselwirkung von Licht mit solchen Molekülen abspielen und welche Kenntnisse zu der späteren Interpretation der Messsignale herangezogen werden können. Dieser Farbstoff ist in der Literatur eingehend untersucht worden und ist der am häufigsten verwendete Laserfarbstoff [14].

Danach wird eine kurze Einführung in das Konzept des hier vorgestellten Verfahrens gegeben und noch einmal kurz auf die üblich Kenngrößen der Mikroskopie eingegangen. In dem anschließenden Kapitel werden dann die Aussagen zusammengetragen und ein mathematisches Modell dieses bildgebenden Verfahrens entwickelt.

### 2.1. Molekulare Grundlagen

Organische Farbstoffmoleküle sind meist sehr große, komplexe Moleküle. Aus dieser Größe und Komplexität folgt, dass man heutzutage noch nicht alle Moleküleigenschaften komplett mit ab-initio-Methoden erfassen kann. Aber schon in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts hat Jablonski einen Weg vorgeschlagen, mit dem es möglich ist die spektroskopischen Daten zumindest qualitativ und anschaulich zu bewerten und zu verstehen [15].

Nach diesem Modell befinden sich die Moleküle in definierten Energiezuständen, zwischen denen sie z.B. nach erfolgter Lichtabsorption oder -emission hin und her wechseln. Dies wird in Abbildung 2.1 gezeigt. Die Wahrscheinlichkeit mit denen solch ein Wechsel geschieht, ist über die sog. Auswahlregeln gegeben und spiegelt sich in den Intensitäten der zugehörigen Absorptionsbanden wieder.

Bei Raumtemperatur und ohne äußeres Strahlungsfeld befindet sich ein organisches Molekül im seinem elektronischen Grundzustand  $S_0$ . Diesem elektronischen Zustand, wie auch allen anderen elektronischen Zuständen, sind noch weitere Schwingungs-, Rotations- und Translationszustände überlagert. Diese Zustände geben sich im Absorptionsspektrum als charakteristische Schultern, Nebenmaxima und/oder Verbreiterungen der Absorptionsmaxima zu erkennen.

Die Nomenklatur des hier bezeichneten Grundzustandes ergibt sich daraus, dass die meisten Moleküle im Grundzustand als Singulett vorliegen. Dies bedeutet, dass sich

## 2. Theorie

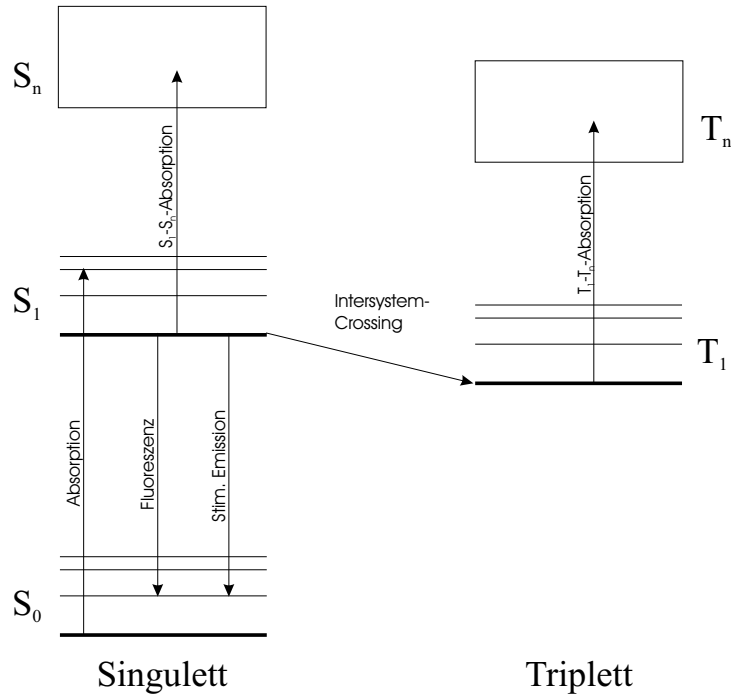


Abbildung 2.1.: Jablonski Diagramm

der Gesamtspinn aller Elektronen des Moleküls sich zu Null addiert oder anders ausgedrückt, es liegen keine ungepaarten Elektronen vor. Dies ergibt eine Spinnmultiplizität des Gesamtmoleküles von Eins [16].

Eine wichtige Ausnahme von dieser Regel findet sich im Sauerstoffmolekül. Dieses Molekül liegt in seinem elektronisches Grundzustand als Triplet vor. Auf diese Eigenschaft wird im späteren Verlauf noch einmal kurz eingegangen.

Durch Energiezufuhr von außen kann das Molekül in höhere Energiezustände überwechseln. Die Gleichgewichtsbesetzung dieser höheren Zustände folgt einer Boltzmann-Verteilung und ist über die Temperatur  $T$  und die Energiedifferenz  $\Delta E$  zwischen zwei Zuständen  $i$  und  $j$  nach folgender Beziehung gegeben [17, 18]:

$$\frac{N_j}{N_i} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \quad (2.1)$$

mit  $N_i$ = Anzahl der Moleküle im unteren Zustand  $i$ ,  $N_j$ = Anzahl der Moleküle in oberen Zustand  $j$  und  $k$  = Boltzmann-Konstante

In den Lehrbüchern zur Spektroskopie wird als einführendes Beispiel gerne gezeigt, dass bei einem Farbstoff der in der Mitte des sichtbaren Spektrums seine Hauptabsorptionsbande hat (ca. bei  $\lambda = 500$  nm), bei 6000 K noch nicht einmal 1 % der Moleküle in den ersten elektronisch angeregten Zustand übergewechselt sind [18]. Dies hat zur praktischen Folge, dass die Besetzung der angeregten elektronischen Zustände bei normalen Umweltbedingungen vernachlässigbar klein ist. Gleichwohl können die höheren

## 2. Theorie

Schwingungs-, Rotations und Translationszustände sehr wohl merklich besetzt sein, da deren Energiedifferenz gemeinhin deutlich geringer ist.

Erfolgt die Energiezufuhr durch Licht einer gegebenen Wellenlänge  $\lambda$ , also durch elektromagnetische Strahlung, so erfolgt ein Übergang der Moleküle in den höheren Energiezustand nur, wenn die Energiedifferenz  $\Delta E$  der Zustände genau der Energie des einfallenden Lichts entspricht. Dies haben schon Franck und Hertz durch Messung der Anregungsenergie und Messung der Frequenz des Fluoreszenzlichtes von Quecksilberatomen direkt bestätigt und es gilt[19]:

$$\Delta E = h * \nu = \frac{h * c_0}{\lambda} \quad (2.2)$$

mit  $h$ = Planck'sches Wirkungsquantum,  $c_0$ = Lichtgeschwindigkeit im Vakuum und  $\nu$ = Frequenz des eingestrahlenen Lichtes

In wie weit der Übergang erfolgt, hängt aber noch von der quantenmechanischen Übergangswahrscheinlichkeit ab, die ungleich Null sein muss. Diese Übergangswahrscheinlichkeiten sind als sog. Auswahlregeln qualitativ beschrieben [17].

Des weiteren darf der elektrische Feldvektor des Anregungslichtes nicht senkrecht zum Übergangsdipolmoment des Moleküles stehen. Bei Erfüllung dieser Randbedingungen kann es zur Absorption kommen.

Ist es nun zur Absorption gekommen, wechselt das Molekül in einen elektronisch angeregten Zustand. Aus diesem Zustand fällt es nach einer für das Molekül charakteristischen Zeit  $\tau$  wieder zurück in seinen elektronischen Grundzustand, falls es nicht durch eine Photoreaktion chemisch verändert oder sogar zerstört wird. Mit diesem Wechsel der Anregungszustände ist eine reversible Änderung des Absorptionsspektrums des Moleküls verbunden. Dieser Effekt wird später noch entscheidend für das Messverfahren sein. Der Rückkehrprozess für das Molekül zurück in den elektronischen Grundzustand kann über mehrere unterschiedliche "energetische" Wege durchlaufen werden. Jedem dieser möglichen Wege, bzw. deren Aufenthaltspositionen, kann man charakteristische Verweilzeiten  $\tau_{Position}$  zuordnen und weiterhin eine Wahrscheinlichkeit  $\eta_{Weg}$  dass das Molekül einen dieser Wege einschlägt. Im Folgenden sollen die für die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse notwendigen "Wege" im Einzelnen anhand des Jablonski-Diagramms (Abb. 2.1) dargestellt werden.

### Moleküle im elektronischen Grundzustand $S_0$

Geht man von dem Grundzustand  $S_0$  aus, so ergeben die Übergänge in höhere elektronische Zustände das sog. Grundzustandsspektrum, welches auch als Absorptionsspektrum bezeichnet wird. Ist der Farbstoff in Lösung, so sind die Absorptionsbanden durch Schwingungs-, Rotationsprozesse und durch Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel typischerweise verbreitert. Dieser Effekt der Verbreiterung der Absorptionsbanden ist abhängig von der Temperatur und von der Fähigkeit des Lösungsmittels die Schwingungsenergie des Farbstoffmoleküls aufzunehmen und abzuführen. Als Maß für die Wahrscheinlichkeit, ein Molekül mit Licht einer bestimmten Wellenlänge  $\lambda$  anzuregen, kann man den molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten  $\varepsilon_0(\lambda)$  nehmen. Für den in dieser Arbeit verwendeten Beispielfarbstoff, Rhodamin 6G, liegt dieser Wert

## 2. Theorie

am Maximum der Hauptabsorptionsbande bei  $1,05 * 10^5 \frac{l}{mol * cm}$  bei Raumtemperatur in Ethanol [21]. Dieser Wert entspricht einem erlaubten Übergang und ist im Vergleich mit anderen Farbstoffen ein sehr großer Wert, der sich jedoch durch starkes Abkühlen der Farbstofflösung noch weiter steigern lässt. Regt man nun innerhalb dieser Absorptionsbande des Moleküles die Probe mit Licht geeigneter Wellenlänge  $\lambda$  an, so promoviert man Moleküle in den ersten elektronisch angeregten Zustand  $S_1$ . Direkte Übergänge in noch höhere Singulett-Zustände ( $S_0 - S_n$ -Absorptionen) sind ebenfalls beobachtbar und liegen im kurzwelligen Teil des Absorptionsspektrums. Ein Übergang des elektronischen Zustandes ist meist mit einem gleichzeitigen Wechsel des Schwingungszustandes verbunden. Dies bedeutet oftmals, dass sich das Molekül direkt nach einem elektronischen Übergang in einem der angeregten Schwingungsniveaus befindet.

### Moleküle im ersten elektronisch angeregten Zustand $S_1$

Wurden Moleküle durch Lichtanregung in dieses elektronische Niveau promoviert, so relaxieren sie innerhalb von einigen Pikosekunden in den Schwingungsgrundzustand dieses Niveaus. Dort haben sie eine gewisse Aufenthaltsdauer, die der natürlichen Lebensdauer  $\tau_0$  entspricht, bevor sie durch Aussendung von Fluoreszenz in tiefere Zustände fallen. Diese Zeit ergibt sich aus [22]:

$$\frac{1}{\tau_0} = 2,88 * 10^{-12} \frac{cm * mol}{l} * n^2 * \frac{\int F(\lambda) * d\lambda}{\int F(\lambda) * \lambda^3 * d\lambda} * \int \varepsilon_0(\lambda) \frac{d\lambda}{\lambda} \quad (2.3)$$

mit  $n$  = Brechungsindex der Lösung,  $F(\lambda)$  = Intensität des Photonenspektrums für die Fluoreszenz

Im Allgemeinen wird die experimentell messbare Lebensdauer des  $S_1$ -Zustandes aber durch weitere Relaxationsprozesse noch weiter verkürzt. Deshalb ist es nützlich, alle Deaktivierungswege aufzuzeigen, die mit verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{Weg}$  ablaufen können. Die einzelnen Wege werden hier der Vollständigkeit aufgeführt:

Weg A mit  $k_{fl} = \frac{1}{\tau_0}$ : Durch spontane Emission von Licht gelangen die Moleküle auf direktem Weg wieder zurück in den elektronischen Grundzustand.

Weg B mit  $k_{IC}$ : Analog der Schwingungsrelaxation kann das Molekül strahlungslos in hoch angeregte Schwingungszustände des elektronischen Grundzustandes überwechseln. Diesen Vorgang nennt man Innere Umwandlung oder "Internal Conversion" (IC). Die zuvor aufgenommene Energie wird dabei als Wärme an die Umgebung abgegeben.

Weg C mit  $k_{ST}$ : Durch Spinumkehr des angeregten Elektrons kann das Molekül in einen Triplettzustand gelangen, der energetisch etwas günstiger liegt. Diesen Vorgang nennt man "Intersystem Crossing" (ISC). Weiterhin ist noch zu bemerken, dass dieser Übergang ein sog. spinverbotener Übergang ist und demnach quantenmechanisch nur beschränkt erlaubt ist, trotzdem aber beobachtbar ist.

Die Wahrscheinlichkeit der Rückkehr für den Weg A ist über die Fluoreszenzquantenausbeute  $\eta_{fl}$  gegeben nach:

$$\eta_{fl} = \frac{N_{fl}}{N_{abs}} = \frac{k_{fl}}{k_{fl} + k_{ST} + k_{IC}} \quad (2.4)$$

## 2. Theorie

mit  $N_{fl}$  = Anzahl der Fluoreszenzphotonen und  $N_{abs}$  = Anzahl der absorbierten Photonen

Daraus ergibt sich eine wirkliche Lebensdauer  $\tau_1$  nach

$$\tau_1 = \eta_{fl} * \tau_0 \quad (2.5)$$

Bei Anwesenheit eines äußeren Strahlungsfeldes geeigneter Wellenlänge ergeben sich noch weitere Wege, um die Moleküle aus diesem Zustand zu entfernen.

Weg D: Durch stimulierte Emission kann das Molekül ebenfalls auf direktem Weg (mit Hilfe eines 2. Photons) wieder zurück in den Grundzustand überwechseln. Die maßgebliche Größe für diesen Prozess ist  $\varepsilon_{SE}$ <sup>1</sup>. Der Koeffizient  $\varepsilon_{SE}$  lässt sich aus dem Photonenspektrum der Fluoreszenz bestimmen nach [23]:

$$\varepsilon_{SE}(\lambda) = \frac{1}{\tau_0} * \frac{F(\lambda) * \lambda^4 * N_L}{8 * \pi * n^2 * c^0 * \ln(10)} \quad (2.6)$$

mit  $N_L$  = Avogadro-Konstante

Weg E: Durch einen weiteren Absorptionsprozess kann das Molekül in einen höheren Zustand angehoben werden. Die bestimmende Größe für diesen weiteren Absorptionsprozess ist der Extinktionskoeffizient  $\varepsilon_1$ .

Um die Wege D und E messtechnisch zu erfassen, ist eine weitere Messlichtquelle nötig.

### **Moleküle im ersten elektronisch angeregten Triplettzustand $T_1$**

Moleküle in diesem Zustand sind erst einmal gefangen, da die Relaxation in den elektronischen Grundzustand ebenfalls spinverboten ist. Bei normalen Bedingungen relaxiert das Molekül dann letztendlich doch noch über einen Weg, der dem Intersystem Crossing entspricht. Es ergibt sich daraus eine Lebensdauer  $\tau_T$ . Der strahlende Übergang kann ebenfalls beobachtet werden [24]. Dazu muss bei dem hier exemplarisch beschriebenen Farbstoff aber die Temperatur stark abgesenkt werden, um den bei Raumtemperatur weitaus effektiveren Weg der Schwingungsrelaxation über intermolekulare Prozesse zu unterdrücken. An dieser Stelle soll aber nicht verschwiegen werden, dass andere Farbstoffklassen als bei dem hier beschriebenen Modell-Farbstoff, sog. Phosphoreszenzemitter, aus diesem Zustand ihre stärkste Emission zeigen. Weiterhin können die Moleküle in einen höheren Triplettzustand angeregt werden. Da dieser Übergang wieder "erlaubt" ist, ergibt sich daraus auch ein Extinktionskoeffizient  $\varepsilon_T$ , welcher durchaus in der Größenordnung des Extinktionskoeffizienten der Absorption aus dem elektronischen Grundzustand liegt.

Weiterhin können die Moleküle in diesem Zustand von Ihrer Umgebung beeinflusst werden. Hier kommt die Sonderstellung des Sauerstoffes zum Tragen. Die Triplett-Natur des

---

<sup>1</sup> Analog der Größe  $\varepsilon_0$ , die die Absorption aus dem Grundzustand bestimmt, lässt sich für diesen Vorgang ebenfalls ein Koeffizient der stimulierten Emission  $\varepsilon_{SE}$  angeben.



Sauerstoff-Moleküls ermöglicht es, dass die Energie auf dieses Molekül übertragen werden kann und es dadurch zu einer Verkürzung der Lebensdauer im  $T_1$ -Zustand kommt. Eingehende Untersuchungen zu diesem Wechselspiel findet man in [25].

### Photozerstörungen

Durch Photozerstörung der angeregten Moleküle ergibt sich noch ein weiterer Reaktionskanal, in dem die Moleküle die Anregungsenergie abgeben können. Dabei relaxieren sie nicht wieder zurück in den elektronischen Grundzustand, sondern reagieren zu Folgeprodukten ab. Die zuvor absorbierte Energie dient dabei als Aktivierungsenergie dieser Reaktionen. Maßgeblich wird die Photostabilität eines Farbstoffes davon beeinflusst, wie oft er im statistischen Mittel einen Anregungs-/Relaxationszyklus durchlaufen kann, bevor er letztendlich durch diese Photoreaktionen zerstört wird. Für Rhodamine liegt die durchschnittliche Anzahl von Anregungsprozessen im Bereich von  $10^5$  Zyklen, bevor sie irreversibel zerstört werden [28].

## 2.2. Beschreibung des Grundkonzeptes

Bei dem hier vorgestellten Verfahren zur Bildaufnahme handelt es sich um ein Modulationstransfer-Verfahren. Dabei wird ein mit der Frequenz  $\omega_a$  in seiner Amplitude modulierten und fokussierten Laserstrahl der Wellenlänge  $\lambda_a$  (hier als Anregungslaser bezeichnet) die zu untersuchende Probe beleuchtet. Die Wellenlänge dieses Lasers ist auf die Absorptionseigenschaften der zu untersuchenden Probe abgestimmt und sollte im Bereich der Hauptabsorptionsbande des zu untersuchenden Farbstoffes oder Absorbers liegen.

Diese Bestrahlung bewirkt innerhalb der Probe aufgrund der Modulation eine oszillierende Besetzung angeregter Molekülzustände. Die zeitliche Abfolge dieser Besetzung folgt dabei der eingestrahnten Modulationsfrequenz  $\omega_a$ . Das Maß der Besetzung dieser transienten Zustände ist aber von der räumlichen Intensitätsverteilung des Anregungslaserfokus abhängig.

Diese räumlich inhomogene Besetzung angeregter Molekülzustände innerhalb der Probe bewirkt in der Regel auch eine Veränderung der Transmissionseigenschaften der Probe, die aufgrund der hohen Intensität am Ort des Anregungslaserfokus besonders ausgeprägt ist. Je nach Beobachtungswellenlänge  $\lambda_m$  kann sich nun eine verringerte oder auch erhöhte Transmission ergeben. Dies ergibt sich aus der Abhängigkeit, dass die Moleküle ein verändertes Absorptionsspektrum in ihren angeregten Zuständen zeigen. Aufgrund der periodischen Anregung oszilliert diese Transmissionsänderung mit der Frequenz der Anregung.

Diese Veränderung wird nun mit einem zweiten, zum Anregungslaser konfokalen Laserstrahl der Wellenlänge  $\lambda_m$  (hier als Messlaser bezeichnet) abgefragt. Dieser Messlaserstrahl, der zunächst in der Intensität unmoduliert ist und auf den gleichen Punkt im Raum fokussiert wird wie der Anregungslaser, durchleuchtet die Probe und wird durch die Transmissionsänderung der Probe nun ebenfalls in seiner Intensität moduliert. Die

Modulation ist also von dem Anregungslaserstrahl über die Farbstoffmoleküle auf den Messlaserstrahl transferiert worden.

Rastert man die Probe nun Punkt für Punkt ab und zeichnet die Größe dieser Veränderung für jeden Punkt auf, so lässt sich aus diesen Daten ein Volumenbild generieren.

### 2.3. Intensitätsverteilung im Laserfokus und Auflösung Mikroskopischer Verfahren

Um die Leistungsfähigkeit des hier vorgestellten Verfahrens zu verdeutlichen, ist es zweckmäßig zunächst ein paar Größen näher zu betrachten und diese dann als Vergleichsgrößen heranzuziehen. Dazu gehört die Größe der Auflösung als geometrisches Maß und die Auflösung als Maß über die absolute Nachweisgrenze bzw. die Unsicherheit bei der Konzentrationsbestimmung.

Unter dem Begriff des räumlichen Auflösungsvermögens versteht man in der klassischen Mikroskopie die Fähigkeit zwei benachbarte Objektpunkte  $P_i$  und  $P_j$  noch als getrennt voneinander wahrzunehmen, wenn sie sehr dicht beieinander liegen. Die Auflösungsgrenze ist dann genau die minimale Entfernung dieser Punkte voneinander, bei dem die Punkte noch als getrennt wahrzunehmen sind.

Zur Berechnung bzw. Bestimmung dieses Abstandes geht man von zwei selbstleuchtenden punktförmigen Objekten aus. Aufgrund des quantenmechanischen Korpuskel-Welle-Dualismus des ausgestrahlten Lichts geht die Welleneigenschaft direkt in die Objekterfassung ein und bildet somit eine Unschärfe für die Positionsbestimmung. Man betrachtet also zwei Wellenzüge, die von den Objekten die bei  $P_i$  und  $P_j$  liegen ausgesendet werden und die es zu unterscheiden gilt.

In Abbildung 2.2 [26] sind zwei jeweils zwei selbstleuchtende Punkte  $P_i$  und  $P_j$  eingezeichnet. Die Kreise stellen die Kugelwellenfronten  $\omega_1$  und  $\omega_2$  dar, die von den Ursprungspunkten  $P_i$  bzw.  $P_j$  ausgesendet werden. Der radiale Abstand zwischen zwei konzentrischen Kreisen symbolisiert die Wellenlänge  $\lambda$ . Zur Unterscheidung von  $P_i$  und  $P_j$  wird ein Ausschnitt erfasst, der sich im Mittel in Richtung  $z$  ausbreitet. In 2.2b) sind die Wellenfronten für den kleinen Aperturwinkel  $\alpha_1$  nicht unterscheidbar und die in  $z$ -Richtung angeordneten Punkte  $P_i$  und  $P_j$  nicht zu trennen. Anders in 2.2c), wo die Punkte senkrecht zur Ausbreitungsrichtung der gemessenen Wellenfront angeordnet sind. Der Unschärfebereich ist also vertikal elongiert. Weiterhin gilt: Bei gleichem Ausschnitt  $\alpha_2$  sind  $\omega_i$  und  $\omega_j$  in 2.2a) weniger differenzierbar als in 2.2b), als Folge der größeren Wellenlänge.

Aus den Zeichnungen geht hervor, dass man die beiden Punkte umso besser voneinander unterscheiden kann, je größer der berücksichtigte Ausschnitt  $\alpha$  aus der Wellenfront ist und je kleiner die Wellenlänge  $\lambda$  ist. Für Winkel kleiner als  $\alpha_1$  sind die Wellenfronten von  $P_i$  und  $P_j$  in (Abb. 2.2b) nicht mehr zu unterscheiden.

Es ist unschwer zu erkennen, dass der Abstand zwischen den beiden Punkten umso kleiner sein darf, je größer der Beobachtungswinkel und je kleiner die verwendete Wellenlänge ist.

## 2. Theorie

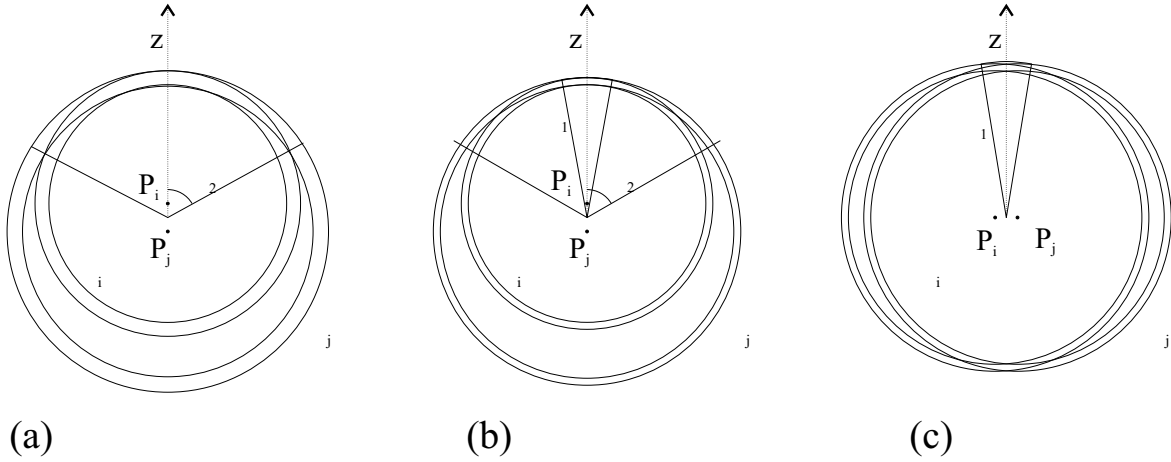


Abbildung 2.2.: Unterscheidbarkeit von Wellenfronten

Die Abbildungswahrscheinlichkeit eines selbstleuchtenden Punktes am Ort  $(x, y, z)$ , der mit einer Sammelloptik beobachtet und abgebildet werden soll und deren Fokuspunkt sich am Ort  $(x = 0, y = 0, z = 0)$  befindet, lässt sich über die sog. Punktabbildungsfunktion  $h$  (engl. Pointspreadfunktion, PSF) nach folgender Gleichung bestimmen:

$$h(x, y, z) = \frac{-i}{\lambda} A \int_0^{p_{max}} \int_0^{2\pi} e^{ik \left( p^2 + \sqrt{x^2 + y^2}^2 - 2 * p * \sqrt{x^2 + y^2} * \cos \varphi + \left( \sqrt{f^2 - p^2} + z \right)^2 \right)} * \frac{p}{\cos(\arcsin p/f)} * dp * d\varphi \quad (2.7)$$

mit  $p_{max}$  = Öffnungsradius der Sammelloptik,  $f$  = Brennweite der Sammelloptik,  $k = \frac{2 * \pi}{\lambda}$  = Wellenvektor des ausgesendeten Lichtes und  $\varphi$  = Phasenwinkel der Wellenfront

Diese Gleichung beschreibt das Zusammenspiel von Betrag und Phase der ausgesendeten Wellenfronten von dem Punkt  $(x, y, z)$ .

Da aber die Abbildungswahrscheinlichkeit eines selbstleuchtenden Punktes gerade auch die umgekehrte Wahrscheinlichkeit wiedergibt, Licht auf einen sehr kleinen Punkt zu fokussieren, lässt sich so die Intensitätsverteilung an einem Punkt  $(x, y, z)$  bestimmen, die gerade das Betragsquadrat von  $h$  ist.

$$I(x, y, z) \sim |h(x, y, z)|^2 \quad (2.8)$$

Im Idealfall lässt sich in der Umgebung des Fokus die Verteilung aus nur 2 Größen bestimmen: Der Wellenlänge des Lichts und des Öffnungswinkels der verwendeten Sammelloptik. In [30] ist eine vollständige mathematische Beschreibung und Herleitung eines idealen Intensitätsprofils für kleine Aperturwinkel gegeben. Diese Beziehungen werden

## 2. Theorie

für die folgenden numerischen Betrachtungen herangezogen. Die dabei hergeleiteten Formeln geben den Zusammenhang zwischen Öffnungswinkel, Wellenlänge und Intensitätsverteilung im Fokus eines idealen beugungsbegrenzten optischen Lichtsammelsystemes wieder. Eine genauere Beschreibung und die Grenzen der praktischen Realisierbarkeit der erreichbaren Auflösung von Objektiven mit großer Apertur sind in [26] gegeben.

Für die weitere Diskussion soll aber zunächst nur der Idealfall von Abbildungen mit kleinen Aperturwinkeln herangezogen werden.

Die Wellenlänge des Lichts wird hierbei mit  $\lambda$  angegeben, wobei  $\lambda$  die Wellenlänge für die Wellenlänge im Vakuum steht.

Mit Hilfe des Huygenschen Prinzips lässt sich eine Intensitätsverteilung im Fokus einer Linse bestimmen, wobei eine Lösung entlang der Raumachsen analytisch berechenbar ist. Für alle Bereiche ausserhalb dieser Raumachsen ist in [30] ein numerischer Lösungsweg angegeben, der wie im folgenden beschrieben wird<sup>2</sup>:

Zunächst werden die kartesischen Koordinaten  $x$ ,  $y$  und  $z$  in ein sog. Optisches Koordinatensystem mit den Koordinaten  $u$  und  $v$  transformiert. Diese optischen Koordinaten bieten den Vorteil, die Berechnungen unabhängig von der Wellenlänge  $\lambda$  und dem Öffnungsverhältnissen der verwendeten Linsen durchzuführen. Ebenfalls wird der Brechungsindex  $n$  bei dieser Betrachtung auf 1 gesetzt. Es ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$u = \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{a}{f}\right)^2 * z \quad (2.9)$$

und

$$v = \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{a}{f}\right) * r = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{a}{f} \sqrt{x^2 + y^2} \quad (2.10)$$

mit  $a =$  Öffnung der Apertur und  $f =$  Brennweite der Linse.

Mit Hilfe dieses Koordinatensystems lassen sich nun 2 Bestimmungsgleichungen zur Berechnung des Intensitätsverlaufes in der Nähe des Fokus angeben:

$$I(u, v) = \left(\frac{2}{u}\right)^2 * [U^2_1(u, v) + U^2_2(u, v)] * I_0 \quad (2.11)$$

bzw.

$$I(u, v) = \left(\frac{2}{u}\right)^2 * [1 + V^2_0(u, v) + V^2_1(u, v) - 2V_0(u, v) * \cos\left\{\frac{1}{2}\left(u + \frac{v^2}{u}\right)\right\} - 2V_1(u, v) * \sin\left\{\frac{1}{2}\left(u + \frac{v^2}{u}\right)\right\}] * I_0 \quad (2.12)$$

mit

$$U_n(u, v \neq 0) = \sum_{s=0}^{\infty} (-1)^s \left(\frac{u}{v}\right)^{n+2s} J_{n+2s}(v) \quad (2.13)$$

$$V_n(u \neq 0, v) = \sum_{s=0}^{\infty} (-1)^s \left(\frac{v}{u}\right)^{n+2s} J_{n+2s}(v) \quad (2.14)$$

---

<sup>2</sup>Hier werden nur die Ergebnisse der Diskussion zusammengefasst.

und

$$I(0, 0) = \left( \frac{\pi a^2 |A|}{\lambda f^2} \right)^2 = \left( \frac{\pi N A^2 |A| (P_a)}{\lambda n} \right)^2 \quad (2.15)$$

Die Hilfsgrößen  $U_n$  und  $V_n$  sind die sog. LommelFunktionen [30, 31], die eigens zu diesem Zweck eingeführt wurden. Die Größen  $J_n(x)$  bezeichnen die Besselfunktionen  $n$ -ter Ordnung. Diese Gleichungen erlauben es nun eine numerische Berechnung der Intensitätsverteilung aufzustellen. Die Intensitätsverteilung innerhalb der Meridionalebene<sup>3</sup> ist in der Abbildung 2.3 dargestellt.

**Intensitätsprofil eines Beugungsbegrenzten Fokus**  
(Optische Koordinaten)

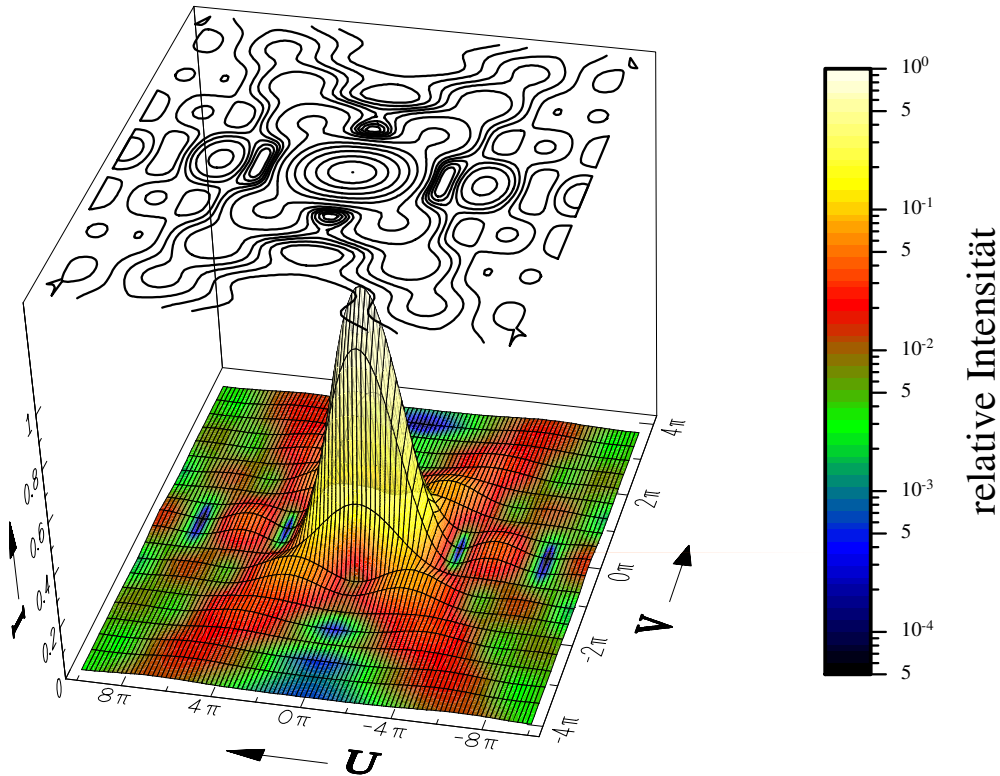


Abbildung 2.3.: Intensitätsverteilung der Fokusumgebung einer idealen Abbildung. Oberhalb des Intensitätsprofils sind Isophoten (d.h. Konturlinien gleicher Intensität) eingezeichnet. Da die Intensitätsverteilung rotationssymmetrisch um die optische Achse ist, ist hier eine Meridionalebene gezeigt. Die Achsen-Koordinate  $u$  entspricht demzufolge die  $z$ -Koordinate und die Koordinate  $v$  dem Abstand senkrecht zur optischen Achse.

<sup>3</sup>Als Meridionalebenen oder auch Tangentialebenen wird die Ebene bezeichnet, durch die der Hauptstrahl (oder auch optische Achse) und der Mittelpunkt der Aperturblende geht [32]. Da in diesem Beispiel die Intensitätsverteilung rotationssymmetrisch angenommen wird, gibt es demzufolge unendlich viele Meridionalebenen.

## 2. Theorie

Die Intensität am Ursprung des Koordinatensystemes  $I_0$ , der den Fokuspunkt bezeichnet, ist hier auf 1 gesetzt. Entlang der Hauptachsen lässt sich eine Intensitätsverteilung angeben:

$$I(u, 0) = \left( \frac{\sin \frac{u}{4}}{\frac{u}{4}} \right)^2 * I_0 \quad (2.16)$$

und

$$I(0, v) = \left[ \frac{2 * J_1(v)}{v} \right]^2 * I_0 \quad (2.17)$$

Der Intensitätsverlauf entlang dieser Achsen ist in Abb.2.4 wiedergeben.

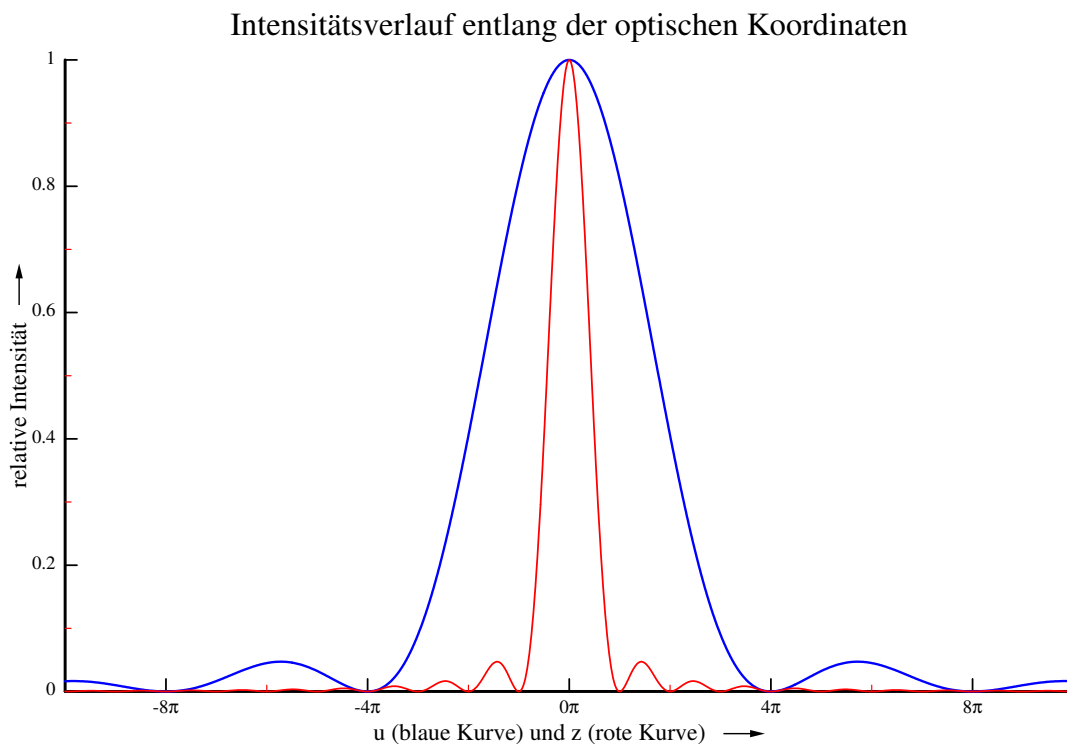


Abbildung 2.4.: Intensitätsverlauf entlang der Raumachsen (blau entlang der optischen Koordinate u, rot entlang der optischen Koordinate v)

Aus dieser Abbildung ist zu erkennen, dass sich in einem bestimmten Abstand um den Fokuspunkt Bereiche befinden, an denen die Intensität gegen Null geht. Diese Stellen zeigen sich im Mikroskopbild als die bekannten Airy-Ringe und bilden deutlich erkennbare Begrenzungen in der Abbildung des Lichtspots im Fokus.

Es hat sich in der Mikroskopie eingebürgert, den Öffnungswinkel  $\alpha$  über die Numerische Apertur  $NA$  anzugeben:

## 2. Theorie

$$NA = n * \sin(\alpha) \quad (2.18)$$

mit  $n$  = Brechungsindex des umschließenden Mediums und  $\alpha$  = der halbe Öffnungswinkel der verwendeten Optik

Diese Größe berücksichtigt damit auch die Wellenlängenveränderung im Medium und gestattet auch kompliziertere Linsenkonstruktionen miteinander zu vergleichen.

Der Öffnungswinkel  $\alpha$  bzw. sein Sinus entspricht dabei dem Verhältnis  $\frac{a}{f}$  und die Größe  $r$  bezeichnet den geometrische Abstand des Raumpunktes zur optischen Achse  $z$ . Daraus ergibt nun sich eine leicht vereinfachte Form obiger Koordinaten mit den Größen  $\lambda$  und  $NA$ :

$$u = \frac{2\pi * n}{\lambda} (\sin(\alpha))^2 * z = \frac{2\pi}{\lambda * n} * NA^2 * z \quad (2.19)$$

und

$$v = \frac{2\pi * n}{\lambda} * \sin(\alpha) * r = \frac{2\pi}{\lambda} * NA * r \quad (2.20)$$

Als die Auflösungsgrenze wird oftmals das sog. Rayleigh-Kriterium angeführt. Diese Größe, die nach John William Strutt, 3. Baron Rayleigh benannt ist [29], definiert die Auflösungsgrenze als den Abstand der Beugungsmaxima von zwei Lichtintensitäten, bei dem das Beugungsmaximum des zweiten Strahl in das erste Beugungsminimum des ersten Strahls fällt. Für einen beugungsbegrenzten Lichtstrahl ergibt das innerhalb der Fokalebene einen Abstand  $d$  von:

$$d_{x/y} = 0,61 * \frac{\lambda}{NA} \quad (2.21)$$

Und in senkrechter Richtung dazu:

$$d_z = 2 * \frac{\lambda * n}{NA^2} \quad (2.22)$$

Dabei nimmt die Intensität auf ca. 76 % des jeweiligen Maximalwertes entlang der Verbindungslinie zwischen den beiden Ursprungspunkten der Wellenfronten innerhalb der Fokalebene ab. Liegen die Punkte auf der optischen Achse so nimmt die Intensität zwischen diesen Punkten auf ca 81 % ab. Dies entspricht genauer gesagt dem Wert  $\frac{8}{\pi}$ . Dies ist in Bild 2.4 gezeigt.

Für die konfokale Mikroskopie ergibt sich ein leicht modifiziertes Bild dieser Beziehungen. Dies erkennt man leicht an dem typischen Aufbau eines konfokalen Mikroskops, wie er in Abb. 2.5 gezeigt wird.

Hierbei erfolgt idealerweise die Beleuchtung der Probe so durch eine Lochblende (engl. Pinhole), dass sich in der Probe eine Intensitätsverteilung eines beugungsbrenzten Lichtstrahles ergibt. Dies wird dadurch erreicht, dass die Größe des Abbildes der Lochblende bedeutend kleiner ist, als die minimale Intensitätsverteilung es eigtl. gestatten würde. Man spricht von einer sog. Punktabbildung. Die Ebenen, in der die Beleuchtungs-Lochblende und der sich aus der Abbildung dieser Blende ergebende Fokus liegt, bilden sog. korrespondierende Fokalebene.

## 2. Theorie

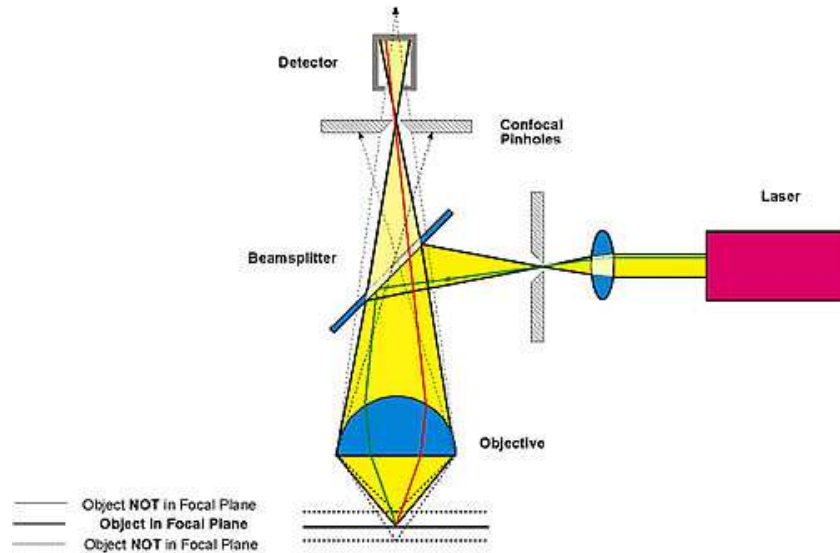


Abbildung 2.5.: Aufbau eines konfokalen Mikroskop

Das von der Probe zurückgesandte Licht wird nun durch einen teildurchlässigen Spiegel auf einen möglichst punktförmigen Detektor geleitet, der sich in einer, zu den ersten beiden Ebenen, weiteren dazu korrespondierenden Fokalebene befindet.

Einen möglichst punktförmigen Detektor erzielt man häufig so, dass das Licht wiederum durch eine möglichst kleine Lochblende gelenkt wird. Durch Einbringen dieser Lochblende erzielt man zweierlei: Zum Einen wirkt sie als Raumfilter, der dafür sorgt dass fast nur Licht auf den Detektor fällt, dass aus der direkten Umgebung des Fokusbereiches stammt. Damit werden andere Fokalebenen effektiv ausgeblendet und man ist in der Lage auch ein lateral aufgelöstes Bild der Probe aufzunehmen. Dies gestattet überhaupt erst die Aufnahme von 3-dimensionalen Bildern. Zum Zweiten verbessert sie auch die Auflösung der Detektion.

Diese Konsequenzen ergeben sich aus dem im folgenden betrachteten Zusammenhang:

Aus dieser Geometrie lässt sich eine Punktabbildungsfunktion der Detektion  $h_{det}$  bestimmen.

Sie ist gegeben durch:

$$h_{det} = h_{bel} * h_{em} \quad (2.23)$$

mit  $h_{bel}$  = Abbildungsfunktion zur Beleuchtung bzw.  $h_{em}$  Abbildungsfunktion des von der Probe zurückgesandten Licht

Die vom Detektor aufgenommene Intensität ergibt sich aus

$$|h_{det}(x, y, z)|^2 \sim |h_{bel}(x, y, z)|^2 * |h_{em}(x, y, z)|^2 \quad (2.24)$$

Für den einfachsten Fall, dass die Beleuchtungs und die Detektionswellenlänge identisch sind ergibt sich



## 2. Theorie

$$|h_{det}(x, y, z)|^2 \sim |h_{bel}(x, y, z)|^4 \quad (2.25)$$

Und die detektierte Intensität  $I_{det}(x, y, z)$  zu

$$I_{det}(x, y, z) \sim I_{bel}(x, y, z)^2 \quad (2.26)$$

Dies ist für den Intensitätsverlauf der Detektions innerhalb der Fokalebene in Abb. 2.4 gezeigt.

Es zeigt sich, dass um den gleichen Intensitätskontrast zu erreichen und zwei Punkte als zwei getrennte Intensitätsmaxima aufgelöst zu erkennen, man den Abstand um den Faktor  $\sqrt{2}$  verringern kann. So kann man nach dem so wie hier definierten Rayleigh-Kriterium zwei neue Auflösungen angeben:

Innerhalb der Fokalebene:

$$\Delta d_{x/y}^{con} = \frac{0,61}{\sqrt{2}} * \frac{\lambda}{NA} \simeq 0,43 * \frac{\lambda}{NA} \quad (2.27)$$

für die axiale Richtung ergibt sich:

$$\Delta d_Z^{con} = \frac{2}{\sqrt{2}} * \frac{\lambda * n}{NA^2} \simeq 1,4 * \frac{\lambda * n}{NA^2} \quad (2.28)$$

Weiterhin wird als Merkmal der Auflösung oftmals die sog. Halbwertsbreite (engl. "Full Width at Half Maximum", FWHM) des Signals angegeben. Diese Größe entspricht der Signalbreite bei 50% der Maximalintensität ohne einen Untergrundoffset.

Zum späteren Vergleich sind diese Größen hier nochmals kurz in Tabelle 2.1 zusammengefaßt.

Raumrichtung	Weitfeld-Mikroskop	konfokal Rayleigh	konfokal FWHM
lateral	$\Delta d_{x/y} \simeq 0,61 * \frac{\lambda}{NA}$	$\Delta d_{x/y} \simeq 0,43 * \frac{\lambda}{NA}$	$\Delta d_{x/y} \simeq 0,37 * \frac{\lambda}{NA}$
axial	Z-Auflösung unbestimmbar	$\Delta d_Z \simeq 1,4 * \frac{\lambda * n}{NA^2}$	$\Delta d_Z \simeq 1,28 * \frac{\lambda * n}{NA^2}$

Tabelle 2.1.: Zusammenfassung der Auflösungskriterien für beugungsbegrenzte Fokalabbildungen

Es ist dabei zu beachten, daß die hier angegebenen Beziehungen strenggenommen nur für Optiken mit kleiner numerischer Apertur gelten. Weiterhin ist zu beachten, dass die für diese Bestimmung angenommenen Pinhole-Durchmesser auf Null gesetzt wurden. In der Praxis macht sich dieser Unterschied jedoch deutlich bemerkbar, da die Pinhole-durchmesser aus rein experimentell bedingten Gründen nicht zu klein gewählt werden können. Die hier diskutierten Werte sind also die theoretische Grenze der erzielbaren Auflösung, die mit dem hier besprochenen Aufbau erreicht werden kann.

Um nun ein Volumenabbildung der Probe aufzunehmen, wird die Probe oder der Fokus relativ zueinander verschoben und dabei systematisch dreidimensional abgerastert. Die detektierte Lichtintensität wird dabei für jede Position aufgezeichnet. Für jedes dieser Voxel (Volumenpixel) ergibt sich eine Superposition aus den gewichteten Intensitäten,

die die Probe aufgrund der Anregung emittiert. Trägt man diese Intensität gegen die Position in einem Bild als Helligkeitswert auf, so erhält man daraus ein Volumenabbild der Probe.

### **2.4. Zusammenfassung**

In diesem Kapitel ist beschrieben worden, welche photophysikalischen Vorgänge sich in einem Farbstoffsystem abspielen wenn es mit Licht bestrahlt wird. Weiterhin sind einige wichtige Kenngrößen der Mikroskopie eingeführt worden.

In den folgenden Kapiteln wird nun gezeigt, wie man durch dieses grundsätzlichen Verhalten der Farbstoffmoleküle in die Lage ist, eine dreidimensionale Konzentrationsverteilung anhand einer reinen Transmissionsmessung zu bestimmen und mit welcher Auflösung dies möglich ist.

### 3. Beschreibung des Experimentes

Das in dem vorherigen Kapitel vorgestellte Grundkonzept der Bildgebung soll nun in diesem Kapitel durch ein mathematisches Modell quantifiziert werden und mit dem klassischen konfokalen Mikroskop verglichen werden.

Ein exemplarischer Aufbau ist in Abb. 3.1 gegeben. Dabei dient ein Laserstrahl als Anregungsquelle und ist in der Amplitude mit der Frequenz  $\omega_A$  moduliert. Der zweite Laserstrahl dient zur Detektion dieser Modulation und wird zunächst unmoduliert auf die Probe gegeben. Diese Vorgehensweise wird oft als Pump-Probe-Verfahren bezeichnet und ist weit verbreitet in der Spektroskopie [27].

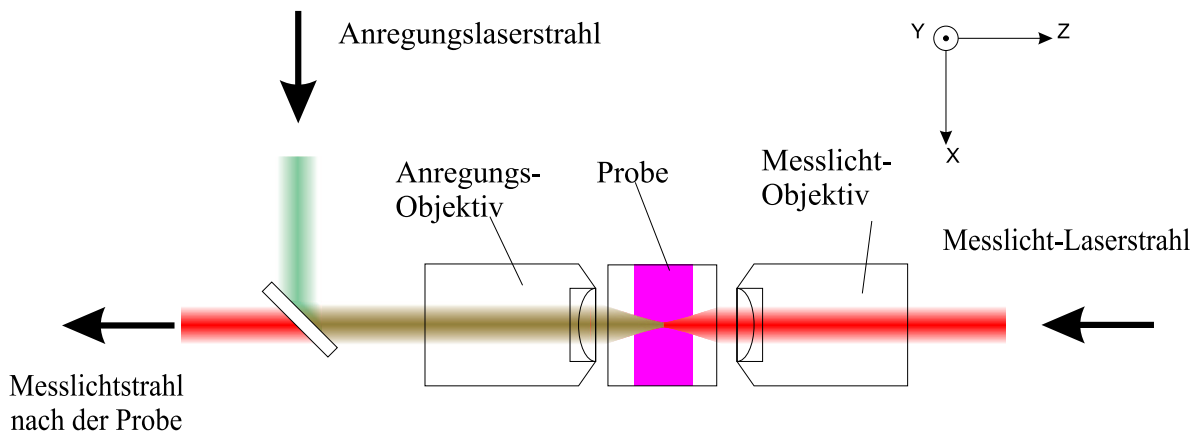


Abbildung 3.1.: Prinzip der verwendeten Messmethode

Das hier im folgenden vorgestellte Experiment unterscheidet sich aber in einem wesentlichen Punkt gegenüber den sonstigen Experimenten: Ziel ist nicht nur die spektralen, und die damit verbundenen zeitabhängigen Eigenschaften nach erfolgter Anregung einer Probe zu charakterisieren, sondern weiterhin auch noch die räumliche Struktur bzw. Konzentrationsverteilung des Objektes aufzuklären.

#### 3.1. Theorie der Signalgewinnung

Beleuchtet man eine dünne Probe mit homogener Farbstoffverteilung, d.h. konstanter Einwaagekonzentration  $c_0$ , mit einem fokussierten Anregungsstrahl der Wellenlänge  $\lambda_a$ , so erzeugt man innerhalb der Probe eine Inhomogenität, verursacht durch die Anregung der Moleküle durch das einfallende Licht. Dieses Verhalten wurde im vorhergehenden

### 3. Beschreibung des Experimentes

Kapitel beschrieben. Dabei führt die inhomogene Intensitätsverteilung des Lichtes zu einer ebenso inhomogenen Konzentrationsverteilung von angeregten Farbstoffmolekülen  $c_{trans}$  innerhalb der Probe.

Der einfallende Laser wird durch die Absorption der zu untersuchenden Moleküle in seiner Intensität nach folgender Gleichung geschwächt:

$$I_A(x, y, z) = I_A^0 * e^{-\frac{x^2+y^2}{a^2}} * 10^{-\varepsilon_0(\lambda_A)*c_0(x,y,z)*z} \quad (3.1)$$

mit  $I_a(x, y, z)$  = Anregungslichtintensität am Ort  $(x, y, z)$ ,  $\varepsilon_0$  = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda_A$ ,  $a$  = Gausradius und  $I_A^0$  = Maximalintensität im Fokus des Anregungslasers

Wählt man einen beliebigen Raumbereich innerhalb der Probe als einen Punkt  $(x, y, z)$ , so sind die folgenden Beziehungen nicht von der Strahlgeometrie abhängig. Dies gilt nur, wenn der Bereich um diesen Punkt nur so klein gewählt wird, dass innerhalb diesen Bereiches eine annähernd konstante Anregungslichtintensität  $I_a$  herrscht.

#### 3.1.1. Konzentration angeregter Moleküle $c_{trans}(x, y, z)$ am Ort $(x, y, z)$ :

Zunächst werden die Konzentrationen der angeregten Molekülspezies bestimmt, die sich im zeitlichen Mittel durch die Lichtanregung ergeben. Dazu ist es hilfreich sie zunächst gesondert nach ihrem elektronischen Charakter zu separieren:

**Konzentration angeregter Singulett-Moleküle bei  $(x, y, z)$ :** Durch Absorption des Grundzustandes werden die Moleküle zunächst in den ersten elektronisch angeregten Zustand angehoben. Um die Besetzung dieses Zustandes zu bestimmen ( $c_1$ ), muß folgende Bilanzgleichung

$$\begin{aligned} \frac{dc_1(x, y, z)}{dt} &= I_a(x, y, z) * \frac{\ln(10) * \varepsilon_{0,\lambda_a}}{N_L} * c_0(x, y, z) - \frac{c_1(x, y, z)}{\tau_1} \\ &= I_a(x, y, z) * \sigma_{0,\lambda_a} * c_0(x, y, z) - \frac{c_1(x, y, z)}{\tau_1} \end{aligned} \quad (3.2)$$

mit  $\frac{dc_1(x,y,z)}{dt} = 0$  im Gleichgewicht gelöst werden. Diese Gleichung beschreibt den Zufluss der Moleküle in den  $S_1$ -Zustand und den Abfluss aus diesem Zustand. Der Zufluss wird durch das äußere Strahlungsfeld  $I_a$  und der Absorption aus dem Grundzustand ( $\sigma_{0,\lambda_a} * c_0(x, y, z)$ , mit  $\sigma_{0,\lambda_a}$  = Absorptionsquerschnitt der Farbstoffmoleküle und  $c_0$  = Grundzustandkonzentration) erzeugt. Wie man sieht, ist er proportional zur Anregungslichtintensität und der Konzentration der Moleküle im Grundzustand  $c_0$ . Der Abfluss beschreibt alle Zerfallsprozesse dieses Zustandes. Da die Moleküle für eine gewisse mittlere Verweilzeit in dem angeregten Zustand verbleiben, wird dieser Zerfallsprozess über die Lebensdauer  $\tau_1$  gekennzeichnet.

### 3. Beschreibung des Experimentes

Für die Konzentration in dem kleinen Volumenelement um den Punkt  $(x, y, z)$  ergibt sich dann eine Konzentration von Molekülen im  $S_1$ -Zustand von:

$$c_1(x, y, z) = I_a(x, y, z) * \frac{\ln(10) * \varepsilon_{0, \lambda_a}}{N_L} * c_0(x, y, z) * \tau_1 \quad (3.3)$$

**Anzahl angeregter Triplett-Moleküle bei  $(x, y, z)$ :** Ebenso lässt sich die Besetzung ( $c_T$ ) des Triplett-Zustandes  $T_1$  bestimmen. Hierbei erfolgt der Zufluss jedoch normalerweise nicht über die Grundzustandskonzentration sondern fast ausschließlich über die Besetzung des  $S_1$  Zustandes. Es muss also hierbei die folgende Ratengleichung gelöst werden:

$$\frac{dc_T(x, y, z)}{dt} = k_{ST} * c_1(x, y, z) - \frac{c_T(x, y, z)}{\tau_T} \quad (3.4)$$

Mit  $\frac{dc_T(x, y, z)}{dt} = 0$  für den Gleichgewichtszustand, ergibt sich analog der vorherigen Gleichung die Konzentration des ersten Triplett-Zustandes  $T_1$  zu:

$$c_T(x, y, z) = k_{ST} * c_1(x, y, z) * \tau_T \quad (3.5)$$

**Gesamtkonzentration angeregter Moleküle  $c_{trans}$ <sup>1</sup> bei  $(x, y, z)$ :** Aus diesen beiden Größen lässt sich mittels der Annahme, dass das Anregungslicht keine weiteren Anregungsprozesse initiiert eine Gesamtkonzentration von angeregten Molekülen angeben:

$$c_{trans, (x, y, z)} = c_1(x, y, z) + c_T(x, y, z) \quad (3.6)$$

Da nun  $c_T$  von  $c_1$  abhängt, lässt sich zeigen, dass die Gesamtkonzentration von angeregten Molekülen direkt von der Anregungslichtintensität  $I_a$  und der Grundzustandskonzentration  $c_0$  abhängig ist.

$$\begin{aligned} c_{trans}(x, y, z) &= c_1(x, y, z) * (1 + k_{st} * \tau_T) \\ &= I_a(x, y, z) * \frac{\ln(10) * \varepsilon_{0, \lambda_a}}{N_L} * \tau_1 * (1 + k_{st} * \tau_T) * c_0(x, y, z) \end{aligned} \quad (3.7)$$

Diese Aussage ist nicht weiter verwunderlich. Trotzdem wird sie noch entscheidend sein für die spätere Berechnung der Auflösung.

Für den Zerfall dieser angeregten Moleküle lässt ebenso noch eine mittlere Lebensdauer  $\tau_{trans}$  angeben:

---

<sup>1</sup>Die Bezeichnung  $c_{trans}$  leitet sich von  $c_{transient}$  ab, mit "transient" werden alle angeregten Molekülzustände gemeint, die eine endliche Verweildauer in diesen Zustand haben.

### 3. Beschreibung des Experimentes

$$\frac{1}{\tau_{trans}} = \frac{1}{\tau_1} + \frac{1}{\tau_T} \quad (3.8)$$

Da aber die beiden Zerfallszeiten sehr stark unterschiedlich sind, wird je nach Messsystem sich eine dominante Lebensdauer herausbilden.

#### 3.1.2. Intensitätsabnahme des Messlichtes

Tritt nun ein Messlichtstrahl durch dieses betrachtete Volumenelement, so wird dieser Lichtstrahl unterschiedlich stark abgeschwächt, je nach Konzentrationsverhältnis der Analytmoleküle in angeregten Zuständen.

Daraus folgt eine ortsabhängige Schwächung des Messlichtes, je nach Fall mit und ohne Anregungslicht. Es werden 2 Fälle unterschieden:

Fall 1, ohne Anregungslicht:

$$\frac{dI_{m,0}(x, y, z)}{dz} = -I_m(x, y, z) * \ln(10) * \varepsilon_{0,\lambda_m} * c_0(x, y, z) \quad (3.9)$$

Fall 2, mit Anregungslicht:

$$\begin{aligned} \frac{dI_{m,1}(x, y, z)}{dz} = & -I_m(x, y, z) * \ln(10) * \varepsilon_{0,\lambda_m} * (c_0(x, y, z) - c_{trans}(x, y, z)) \\ & -I_m(x, y, z) * \ln(10) * \varepsilon_{trans,\lambda_m} * c_{trans}(x, y, z) \end{aligned} \quad (3.10)$$

Zur Vereinfachung wird ein effektiver Extinktionskoeffizient für das Messlicht  $\varepsilon_{trans,\lambda_m}$  eingeführt, der eine gewichtete Größe für die Messwellenlänge  $\lambda_m$  darstellt:

$$\varepsilon_{trans,\lambda_m} = (\varepsilon_0 - \varepsilon_{SE} + \varepsilon_1) + (\varepsilon_T - \varepsilon_0) * k_{ST} * \tau_T \quad (3.11)$$

## 3.2. Transmissionsänderung eines quasi "punktförmigen" Absorbers bei $(x, y, z)$ :

Es ergibt sich daraus, dass sich die Intensität des gesamten Messstrahls abhängig von der Position des Absorbers unterschiedlich stark ändert.

Die Gesamtleistung, der durch das Flächenelement gehenden Lichtleistungen  $P_a$  und  $P_M$  ist durch die folgenden Beziehungen gegeben:

$$P_a(z) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} I_a(x, y, z) dx dy \quad (3.12)$$

### 3. Beschreibung des Experimentes

$$P_m(z) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} I_m(x, y, z) dx dy \quad (3.13)$$

Durch einen nahezu punktförmigen Absorber der Fläche  $\sigma_{m,0} = \frac{\ln(10)}{N_L} * \varepsilon_{0,\lambda_m}$  erfolgt die Abnahme der Gesamtleistung des Messlichtes quasi nur am Ort  $(x, y, z)$ , der als der geometrischer Schwerpunkt des Absorbers angesehen werden kann. Es gilt für eine annähernd konstante Messlichtintensität  $I_m(x, y, z) \simeq const$  am Ort  $(x, y, z)$  beim Durchtritt durch die Schicht  $dz$ :

$$\delta P_{m,0}(x, y, z) = -I_m(x, y, z) * \sigma_{m,0} \quad (3.14)$$

$\delta P_{m,0}(x, y, z)$  = Leistungsänderung des Messlichtes beim Durchtritt durch das Volumenelement mit dem geometrischen Schwerpunkt  $(x, y, z)$

Dabei wird nur die Variation durch die Fokusgeometrie in der Intensitätsänderung berücksichtigt. Sättigungseffekte der Besetzung angeregter Molekülzustände aufgrund hoher Lichtleistungen werden vernachlässigt.

Es ergibt sich wiederum eine Fallunterscheidung:

**Fall 1: Ausgeschalteter Anregungslaser** Es ergibt sich eine Leistung am Detektor nach dem Durchtritt durch die Probe:

$$\begin{aligned} P_{m,(x,y,z),det,0} &= P_{m,0} + \delta P_{m,0}(x, y, z) \\ &= P_{m,0} - I_m(x, y, z) * \sigma_{m,0} \end{aligned} \quad (3.15)$$

Hierbei ist  $P_{m,0}$  die Leistung des Messlichtes vor der Probe

Demzufolge würde sich schon eine orts aufgelöste Transmissionsänderung ergeben. Die experimentelle Handhabung bzw. der Nachweis wäre aber nahezu unmöglich, da ein Referenzpunkt fehlt.

**Fall 2: Eingeschalteten Anregungslaser ( $I_A$  ist weit unterhalb der Sättigungsintensität):**

$$\delta P_{m,1}(x, y, z) = -I_m(x, y, z) * \overline{\sigma_{m,1}(x, y, z)} \quad (3.16)$$

mit  $\overline{\sigma_{m,1}(x, y, z)}$  = Effektiver Absorptionsquerschnitt mit Anregungslicht am Ort  $(x, y, z)$

$$\overline{\sigma_{m,1}(x, y, z)} = \sigma_{m,0} + I_a(x, y, z) * \sigma_{a,0} * \tau_{trans} * (\sigma_{m,trans} - \sigma_{m,0}) \quad (3.17)$$

$$\sigma_{m,trans} = \varepsilon_{trans} * \frac{\ln(10)}{N_L} \quad (3.18)$$

Anmerkung: Die Größe  $I_a(x, y, z) * \sigma_{a,0} * \tau_{trans}$  gibt die mittlere Wahrscheinlichkeit an, dass sich der Absorber in einem angeregten Zustand befindet, der die mittlere Lebensdauer  $\tau_{trans}$  hat und durch das Anregungslicht induziert wurde.

### 3. Beschreibung des Experimentes

Die Leistung am Detektor ergibt sich mit eingeschalteten Anregungslaser zu:

$$\begin{aligned} P_{m,(x,y,z),det,1} &= P_{m,0} + \delta P_{m,1}(x, y, z) \\ &= P_{m,0} - I_m(x, y, z) * \overline{\sigma_{m,1}(x, y, z)} \end{aligned} \quad (3.19)$$

Durch den Vergleich der beiden Leistungen lässt sich die Transmissionänderung der Probe orts aufgelöst bestimmen:

$$\begin{aligned} \frac{\Delta P}{P_m} &= \frac{P_{m,(x,y,z),det,1} - P_{m,(x,y,z),det,0}}{P_{m,0}} \\ &= \frac{(P_{m,0} - I_m(x, y, z) * \overline{\sigma_{m,1}(x, y, z)}) - (P_{m,0} - I_m(x, y, z) * \sigma_{m,0})}{P_{m,0}} \\ &= \frac{P_{m,0} - I_m(x, y, z) * \overline{\sigma_{m,1}(x, y, z)} - P_{m,0} + I_m(x, y, z) * \sigma_{m,0}}{P_{m,0}} \\ &= \frac{I_m(x, y, z) * \sigma_{m,0} - I_m(x, y, z) * \overline{\sigma_{m,1}(x, y, z)}}{P_{m,0}} \\ &= \frac{I_m(x, y, z) * (\sigma_{m,0} - \overline{\sigma_{m,1}(x, y, z)})}{P_{m,0}} \\ &= \frac{I_m(x, y, z) * (\sigma_{m,0} - \sigma_{m,0} + I_a(x, y, z) * \sigma_{a,0} * \tau_{trans} * (\sigma_{m,trans} - \sigma_{m,0}))}{P_{m,0}} \\ &= \frac{I_m(x, y, z) * I_a(x, y, z) * \sigma_{a,0} * \tau_{trans} * \Delta\sigma_{det}}{P_{m,0}} \end{aligned} \quad (3.20)$$

mit

$$\Delta\sigma_{det} = \sigma_{m,0} - \sigma_{m,trans} = (\varepsilon_0 - \varepsilon_{trans}) * \frac{\ln(10)}{N_L} \quad (3.21)$$

Für kleine Änderungen kann man auf die mittlere transmittierte Leistung normieren, die wiederum direkt von der eingestrahlten Messlichtleistung abhängt, d.h.  $P_m = const * P_{m,0}$ . Führt man die Substitution  $I_m(x, y, z) = P_m * f_m(x, y, z)$  und  $I_a(x, y, z) = P_a * f_a(x, y, z)$  ein, so ergibt sich dass die Intensitäten am Ort  $(x, y, z)$  direkt proportional zu den Gesamtleistungen der Laser sind. Daraus ergibt sich eine, über die Größe  $\frac{\Delta P_{(x,y,z)}}{P_m}$  ortsabhängige Signalintensität, die von den Absorptionseigenschaften (Spektren des Grundzustandes und der transienten Zustände und deren Zeitabhängigkeiten) der Probe und der Anregungslichtintensität  $P_a$  abhängt:

$$\begin{aligned} \frac{\Delta P_{(x,y,z)}}{P_m} &= \frac{f_a(x, y, z) * f_m(x, y, z) * P_m * P_a * \sigma_{a,0} * \tau_{trans} * \Delta\sigma_{det}}{P_m} \\ &= f_a(x, y, z) * f_m(x, y, z) * P_a * \sigma_{a,0} * \tau_{trans} * \Delta\sigma_{det} \end{aligned} \quad (3.22)$$



### 3. Beschreibung des Experimentes

$f_a(x, y, z)$  bzw.  $f_m(x, y, z)$  bezeichnen dabei rein geometrische Funktionen, durch die das Strahlprofil des jeweiligen Lasers beschrieben wird.

Diese Gleichung gibt quasi die Detektionswahrscheinlichkeit für ein beliebiges System von Absorber, Mess- und Anregungslaser wieder. Über die Größen  $f_a$  und  $f_m$  als rein geometrische Verteilungskurven, lässt sich das Auflösungsvermögen an nahezu jegliche Strahlgeometrie anpassen und bei Kenntniss dieser eine Punktabbildungsfunktion angeben.

Über die Größen  $f_a(x, y, z)$  bzw.  $f_m(x, y, z)$  ist die räumliche Auflösungsfähigkeit des Verfahrens definiert.

Weiterhin zeigt diese Gleichung aber auch, dass über die Größen  $\sigma_{a,0} * \tau_{trans} * \Delta\sigma_{det}$  noch weitere Erkenntnisse aus dem erhaltenen Signal gezogen werden können. Insbesondere eine mittlere Lebensdauer  $\tau_{trans}$  ist aus dem Messignal extrahierbar. Aber durch Kombination der absorberspezifischen Größen und den Strahlgeometrien lässt sich z.B. noch die Nachweisgrenze dieses Messsystemes quantifizieren.

### 3.3. Berechnung für Gaussförmige Strahlprofile von Anregungs- und Messlaser:

Für die folgenden Berechnungen und eine erste Abschätzung werden die Intensitätsverteilungen der fokussierten Laser zunächst jeweils als Gauß'sches Intensitätsprofil angenommen. Solch ein Intensitätsprofil erfüllt die im Laserresonator gegebenen Bedingungen für einen stabilen Betrieb des Lasers und ist ein guter Ausgangspunkt für die Bestimmung der räumlichen Auflösung.

Das Intensitätsprofil für den Anregungslaser am Punkt  $(x, y, z)$  im Umfeld des Fokusbereichs einer Linse ist durch die folgende Gleichung gegeben [35]:

$$I_a(x, y, z) = I_a(x = 0, y = 0, z) * e^{-\frac{x^2+y^2}{\omega_a^2(z)}} \quad (3.23)$$

mit  $\omega_a(z)$  = Radius des Intensitätsprofil in der Ebene  $(z)$ , auf dem die Maximalintensität  $I_a(x = 0, y = 0, z)$  dieser Ebene auf  $\frac{1}{e}$  abgefallen ist

Die Größe  $I_a(x = 0, y = 0, z)$  ist über die Gesamtintensität des eingestrahlt Laserlicht definiert:

$$I_a(x = 0, y = 0, z) = \frac{P_a(z)}{\pi * \omega_a^2(z)} \quad (3.24)$$

Und der Gaussradius der Ebene  $(z)$  ist gegeben durch:

$$\omega_a(z) = \omega_a^0 * \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_{r,a}}\right)^2} \quad (3.25)$$

### 3. Beschreibung des Experimentes

mit  $z_{r,a}$  = Rayleigh-Länge des Fokusspots

Die sog. Rayleigh-Länge beschreibt den Abstand vom Intensitätsmaximum in ( $z$ ) und ( $-z$ )-Richtung, bei dem der Gaussradius um den Faktor  $\sqrt{2}$  angewachsen ist und die Intensität am Maximum auf die Hälfte der Maximalintensität abgesunken ist und beträgt

$$z_{r,a} = \frac{\pi * \omega_a^2(z=0)}{\lambda_a} \quad (3.26)$$

Analog ergeben sich für den Messlaserstrahl die folgenden Beziehungen:

$$I_m(x, y, z) = I_m(x=0, y=0, z=0) * e^{-\frac{x^2+y^2}{\omega_m^2(z)}} \quad (3.27)$$

$$I_m^0(x=0, y=0, z) = \frac{P_m(z)}{\pi * \omega_m^2(z)} \quad (3.28)$$

$$\omega_m(z) = \omega_m^0 * \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_{r,m}}\right)^2} \quad (3.29)$$

$$z_{r,m} = \frac{\pi * \omega_m^2(z=0)}{\lambda_m} \quad (3.30)$$

Die in den vorherigen Abschnitt eingeführten geometrischen Größen der Intensitätsverteilung  $f_a(x, y, z)$  und  $f_m(x, y, z)$  ergeben sich nun wie folgt:

$$f_a(x, y, z) = \frac{1}{\pi * \left(\omega_a^0 * \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_{r,a}}\right)^2}\right)^2} * e^{-\frac{x^2+y^2}{\left(\omega_a^0 * \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_{r,a}}\right)^2}\right)^2}} \quad (3.31)$$

$$f_m(x, y, z) = \frac{1}{\pi * \left(\omega_m^0 * \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_{r,m}}\right)^2}\right)^2} * e^{-\frac{x^2+y^2}{\left(\omega_m^0 * \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_{r,m}}\right)^2}\right)^2}} \quad (3.32)$$

Bei annähernd gleichen Wellenlängen von Mess- und Anregungslaser kann man ein  $\overline{\omega^0} = \frac{\omega_m^0 + \omega_a^0}{2}$  und ein  $\overline{z_r} = \frac{z_a + z_m}{2}$  für beide Laserstrahlen bilden, damit man ein einfachere Beschreibung der geometrischen Verteilungsfunktion  $f_a(x, y, z)$  und  $f_m(x, y, z)$  erhält:

### 3. Beschreibung des Experimentes

$$\overline{f_{m,a}(x, y, z)} = \frac{1}{\pi * \left( \overline{\omega^0} * \sqrt{1 + \left( \frac{z}{z_r} \right)^2} \right)^2} * e^{-\frac{x^2+y^2}{\left( \overline{\omega^0} * \sqrt{1 + \left( \frac{z}{z_r} \right)^2} \right)^2}} \quad (3.33)$$

Daraus folgt eine angenäherte ortsabhängige Signalintensität  $\frac{\Delta P_{(x,y,z)}}{P_m}$  nach:

$$\begin{aligned} \frac{\Delta P_{(x,y,z)}}{P_m} &\simeq \overline{f_{m,a}(x, y, z)}^2 * \sigma_{a,0} * P_a * \tau_{trans} * \Delta \sigma_{det} \\ &= \frac{\sigma_{a,0} * \tau_{trans} * P_a * \Delta \sigma_{det}}{\pi^2 * \left( \overline{\omega^0} * \sqrt{1 + \left( \frac{z}{z_r} \right)^2} \right)^4} * e^{-2 * \frac{x^2+y^2}{\left( \overline{\omega^0} * \sqrt{1 + \left( \frac{z}{z_r} \right)^2} \right)^2}} \end{aligned} \quad (3.34)$$

Als Auflösungsvermögen wird ein bestimmter Abstand definiert, bei dem die Intensität soweit abgefallen ist, dass man zwei benachbarte, punktförmigen Testobjekte noch als getrennte Objekte erkennen kann. Wie im Kapitel 2 beschrieben sind mehrere Definitionen bekannt.

Im folgenden soll der als die Halbwertsbreite des Signales (oder FWHM) bekannte Abstand hier näher beschrieben werden, da z.B. das Rayleigh-Kriterium bei rein Gauss'schen Strahlen nicht fasst. Das Rayleigh-Kriterium setzt eindeutige Minima voraus, wohingegen ein Laserstrahl der als gaussförmig zu beschreiben ist rein asymptotisch an Intensität verliert.

In unserem Fall ergibt sich in lateraler Richtung ( $x = x_{FWHM}, y = 0, z = 0$ ):

$$\begin{aligned} \frac{\frac{\Delta P_{(x=x_{FWHM}, y=0, z=0)}}{P_m}}{\frac{\Delta P_{(x=0, y=0, z=0)}}{P_m}} &= 0,5 \\ 0,5 &= \frac{e^{-\frac{2 * x_{FWHM}^2}{\overline{\omega^0}^2}}}{1} \\ x_{FWHM} &= \overline{\omega^0} * \sqrt{-\frac{\ln(0,5)}{2}} \\ x_{FWHM} &\simeq 0,589 * \overline{\omega^0} \end{aligned} \quad (3.35)$$

da im rotationssymmetrischen Fall  $x$  und  $y$  äquivalent sind ergibt sich ein  $r_{FWHM, z=0} = \sqrt{x^2 + y^2} = 0,589 * \overline{\omega^0}$

in axialer Richtung ( $x = 0, y = 0, z = z_{FWHM}$ ) ergibt sich:

$$\frac{\frac{\Delta P_{(x=0, y=0, z=z_{FWHM})}}{P_m}}{\frac{\Delta P_{(x=0, y=0, z=0)}}{P_m}} = 0,5$$

### 3. Beschreibung des Experimentes

$$\begin{aligned}
 0,5 &= \frac{1}{\left(1 + \left(\frac{z_{FWHM}}{z_r}\right)^2\right)^2} \\
 \left(1 + \left(\frac{z_{FWHM}}{z_r}\right)^2\right)^2 &= 2 \\
 z_{FWHM} &= \sqrt{\sqrt{2} - 1} * z_r \\
 z_{FWHM} &\simeq 0,643 * z_r
 \end{aligned} \tag{3.36}$$

Die Größen  $\bar{\omega}_0$  und  $\bar{z}_r$  hängen dabei im Idealfall nur von der mittleren Wellenlänge  $\bar{\lambda} = \frac{\lambda_m + \lambda_a}{2}$  und von dem Öffnungswinkel  $\Theta$  im Fernfeld ab, der durch die verwendeten Mikroskopobjektive gegeben ist:

$$\begin{aligned}
 \bar{\omega}_0 &= \frac{\bar{\lambda}}{\pi * \theta} \\
 \theta &= \frac{\bar{\lambda}}{\pi * \bar{\omega}_0}
 \end{aligned} \tag{3.37}$$

und

$$\begin{aligned}
 \bar{z}_r &= \frac{\bar{\omega}_0}{\theta} \\
 \bar{z}_r &= \frac{\bar{\lambda}}{\pi * \theta^2}
 \end{aligned} \tag{3.38}$$

Die Größe  $\theta$  ist über die numerische Apertur  $NA$  gegeben:

$$\begin{aligned}
 NA &= n * \sin(\alpha) \\
 \alpha = \theta &= \arcsin\left(\frac{NA}{n}\right)
 \end{aligned} \tag{3.39}$$

mit  $n$ = Brechungsindex im verwendeten Medium.

Dabei ist für einen Gauss'schen Strahl zu beachten, dass diese Beziehungen nur dann als gültig angenommen werden können, wenn Beugungseffekte durch den Rand der Apertur als vernachlässigbar klein angenommen werden. D.h. im konkreten Fall, dass die Ausleuchtung der zur Verfügung stehen Apertur keine wesentlichen Anteile des Strahles abblockt.

Es hat sich in der Praxis gezeigt, dass wenn der Eintrittsradius der zur Verfügung stehenden Apertur  $r_a$   $\Gamma$ -mal so groß ist, wie der Gaussradius  $\omega$  diese Beugungseffekte keine Rolle spielen, wenn  $\Gamma \geq 3$  ist. Für  $\Gamma = 3$  gilt, dass durch eine Apertur mit dem Radius  $r = \Gamma * \omega$  über 99 % des Lichtstrahls gelangen [35].

Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Experimente handelt es sich um Experimente mit sog. Luftobjektiven. D.h. der Brechungsindex  $n$  ist annähernd 1 und demnach  $\theta \simeq \frac{\arcsin(NA)}{\Gamma}$ .

### 3. Beschreibung des Experimentes

Es gilt folgende Näherung für kleine  $NA$  bzw.  $\theta$ :

$$\theta \simeq NA/\Gamma \quad (3.40)$$

Daraus ergibt sich für die Auflösung nach dem Kriterium des FWHM folgende angenäherte Größen:

$$\begin{aligned} r_{FWHM,Gauss} &\simeq 0,589 * \overline{\omega^0} \\ &\simeq 0,589 * \frac{\overline{\lambda} * \Gamma}{\pi * NA} \\ z_{FWHM,Gauss} &\simeq 0,643 * \overline{z_r} \\ &\simeq 0,643 * \frac{\overline{\lambda} * \Gamma^2 * n}{\pi * NA^2} \end{aligned} \quad (3.41)$$

Für  $\Gamma = 3$  als unteren Grenzwert für einen rein gaussförmigen Laserfokus erhält man nun folgende vereinfachte Beziehung:

$$r_{FWHM,Gauss} \simeq 0,561 * \frac{\overline{\lambda}}{NA} \quad (3.42)$$

und

$$z_{FWHM,Gauss} \simeq 1,845 * \frac{\overline{\lambda} * n}{NA^2} \quad (3.43)$$

Diese beiden Beziehungen gelten wie beschrieben nur wenn die Eingangsapertur des Objektivs deutlich größer als der Gaussradius der einfallenden Laserstrahles ist.

## 3.4. Auflösung für beugungsbegrenzte Strahlen

Im Folgenden Abschnitt soll nun der weitere Grenzfall betrachtet werden, wenn  $\Gamma$  klein gegen 1 ist, d.h. man koppelt in das Objektiv eine Wellenfront ein, die die Apertur homogen ausleuchtet. Damit erreicht man eine sog. beugungsbegrenzte optische Abbildung und die Intensitätsprofile bzw. deren geometrischen Beschreibungsfunktionen gehen in die Gleichungen aus Kapitel 2 über.

Dabei sind die in diesem Kapitel verwendeten Größen  $f_a(x, y, z)$  und  $f_m(x, y, z)$  analog den Größen  $|h_{bel}|^2$  und  $|h_{det}|^2$  zu verwenden. Aus der hergeleiteten Punktabbildungsfunktion ergibt sich demzufolge eine der klassischen idealen konfokalen Mikroskopie identische Auflösung.

In radialer Richtung innerhalb der Fokalebene:

$$\Delta d_{x/y}^{dCAM} = \frac{0,61}{\sqrt{2}} * \frac{\lambda}{NA} \simeq 0,43 * \frac{\lambda}{NA} \quad (3.44)$$

und in axialer Richtung entlang der optischen Achse:

$$\Delta d_Z^{dCAM} = \frac{2}{\sqrt{2}} * \frac{\lambda * n}{NA^2} \simeq 1,4 * \frac{\lambda * n}{NA^2} \quad (3.45)$$

Dabei ergibt sich jedoch ein für den Experimentator wesentlicher Unterschied: Die in Kapitel 2 angenommenen infinitesimal kleinen Lochblenden zur Anregung und Detektion, insbesondere die zur Detektion, werden bei der in diesem Kapitel beschriebenen Methode nicht benötigt. Es muß einzig eine Abbildungsgüte des Anregungs und des Messspots sichergestellt werden, der die Beschreibung eines beugungsbegrenzten Intensitätsverlauf wiedergibt.

### 3.5. Zeitabhängigkeit der induzierten Transmissionsänderung

Die in Gleichung 3.22 hergeleitete Beziehung zeigt, dass die Signalintensität abhängig von der mittleren Lebensdauer  $\tau_{trans}$  der angeregten Molekülzustände ist. In der hier vorgestellten Modifikation des Experimentes wird nun die Anregungsintensität periodisch mit der Frequenz  $\omega_a$  ein- und ausgeschaltet, diese Frequenz dabei variiert und die Amplitude der sich dadurch induzierten Transmissionsänderung bestimmt. Mit Änderung dieser Modulationsfrequenz kann man Sättigungs- oder Dämpfungseffekte beobachten, wenn der Kehrwert der Modulationsfrequenz  $\frac{1}{\omega_a}$  in der Größenordnung der mittleren Lebensdauer  $\tau_{trans}$  der angeregten Molekülspezies liegt [34]:

$$\frac{1}{\omega_a} \simeq \tau_{trans} \quad (3.46)$$

Bei den bisherigen Überlegungen wurde dieser Effekt als vernachlässigbar klein betrachtet. Im folgenden soll er aber nun näher betrachtet werden.

Aus der zeitaufgelösten optischen Spektroskopie ist ein Verfahren bekannt, dass sich genau diesen Effekt zu nutze macht, die Phasenfluorimetrie [33]. Dabei wird eine fluoreszierende Probe mit einem in seiner Intensität modulierten Anregungsstrahl angeregt, und die von der Probe emittierte Fluoreszenzintensität gegen die Zeit aufgezeichnet.

Das von der Probe emittierte Signal ist in seiner Phase und Amplitude verändert. Die Änderung ist abhängig von der Lebensdauer des fluoreszierenden Zustandes. Es ergeben sich folgende Zusammenhänge:

Für die Phasenverschiebung  $\Delta\phi$  des empfangenen Signals gegenüber dem Anregungssignal aus der Lebensdauer  $\tau_\phi$ :

$$\tan(\Delta\phi) = \omega_a * \tau_\phi \quad (3.47)$$

Für die Änderung der Modulationstiefe  $\Delta m$  des empfangenen Signals gegenüber dem Anregungssignal aus der Lebensdauer  $\tau_m$ :

$$\Delta m = \frac{1}{\sqrt{1 + \omega_a^2 \tau_m^2}} \quad (3.48)$$

### 3. Beschreibung des Experimentes

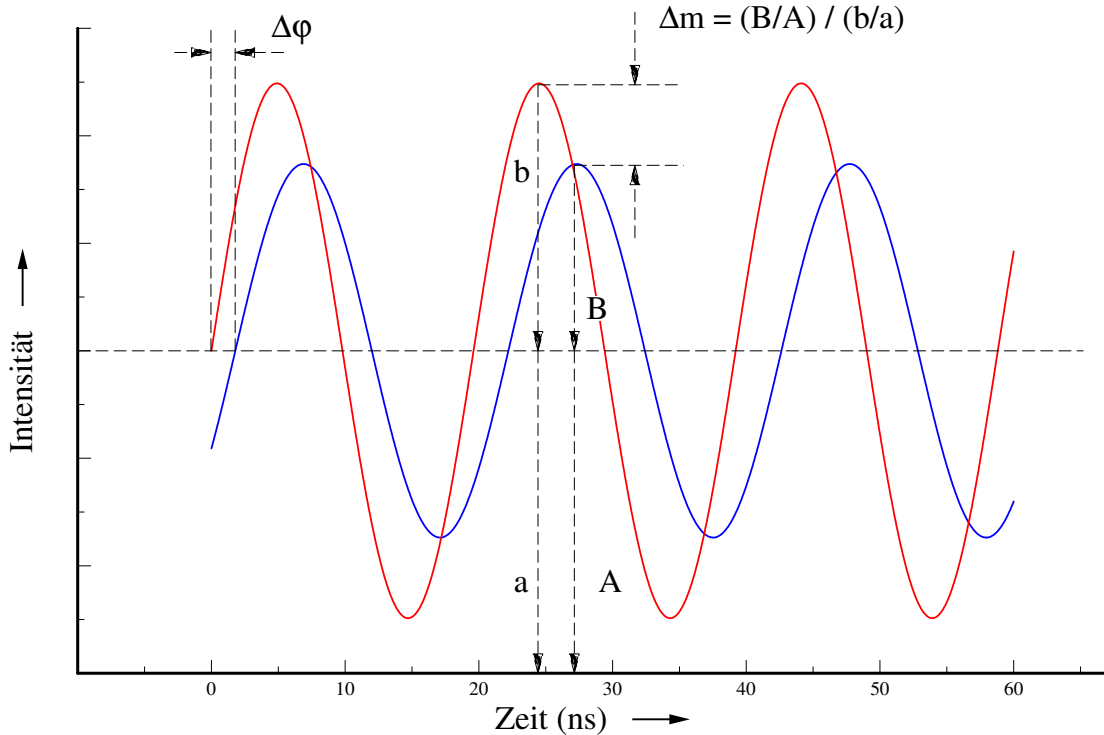


Abbildung 3.2.: Prinzip der Phasenfluorometrie (rot die Anregungsfunktion, blau die Antwortfunktion der Probe)

Die Lebensdauern ergeben sich je nach Auswertungsmethode daraus dann wie folgt:

$$\tau_{\phi} = \frac{\tan \Delta\phi}{\omega_a} \quad (3.49)$$

für eine Auswertung nach der Phasenverschiebung und

$$\tau_m = \frac{1}{\omega_a} \left[ \frac{1}{\Delta m^2} - 1 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3.50)$$

wenn man die Veränderung der Modulationstiefe als Kriterium wählt.

Dabei ist zu beachten, dass die hier ermittelbaren Lebensdauern durchaus nicht identisch sein müssen. Je nachdem ob mehrere Molekülzustände an dem Emissionsprozess beteiligt sind, lassen sich sehr wohl von einer identischen Probe abweichende Lebensdauern bestimmen, je nach Betrachtungsweise des Auswerteverfahrens.

Betrachtet man bei der Messung der Signal nur die AC-Anteile, d.h. Signale die vom Gleichanteil befreit sind, so gibt die Größe  $\Delta m$  direkt die Amplitude des Wechselanteiles wieder. Diese Amplitude  $\Delta m$  entspricht aber wiederum der hier vorgestellten Transmissionsänderung  $\frac{\Delta P}{P}$  und ist von der Modulationsfrequenz  $\omega_a$  abhängig.

Ein weiterer Gesichtspunkt bei dieser Art der Lebensdauerbestimmung ist, dass die Lebensdauerermessung abhängig von der räumlichen Position des Absorbers erfolgen kann.

### 3.6. Bestimmung der Empfindlichkeitsgrenze

Im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie würde man vermuten, dass dieses Messkonzept sich als relativ unempfindlich erweist. Um eine quantitative Aussage über die Nachweisempfindlichkeit zu treffen wird nun im Folgenden auf diesen Aspekt näher eingegangen.

Aus Gleichung 3.22 ist ersichtlich, dass die Nachweiswahrscheinlichkeit vom Ort des Absorbers abhängt. Die Größe  $f_m(x, y, z) * \Delta\sigma_{det}$  gibt dabei die Anteil des Messlichtes an, der durch einen punktförmigen angeregten Absorber am Punkt  $(x, y, z)$  absorbiert wird. Die Größe  $f_a(x, y, z) * P_a * \sigma_{a,0} * \tau_{trans}$  ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich an diesem Punkt ein angeregtes Molekül befindet.

Die hinter der Probe gemessene Transmissionsänderung  $\frac{\Delta P}{P}$  gibt aber ein über die gesamte Probe gemittelt Signal wieder. Naturgemäß wird die Größenordnung von  $\frac{\Delta P}{P}$  sehr klein sein und die Nachweisempfindlichkeit von dem Rauschhintergrund der Messlichtdetektion  $\Delta P_{noise}$  begrenzt.

Als Nachweisgrenze  $\left(\frac{\Delta P}{P}\right)_{limit}$  wird das dem detektierbaren Laserrauschen äquivalente Leistungsverhältnis angegeben:

$$\frac{\Delta P_{noise}}{P} = \left(\frac{\Delta P}{P}\right)_{limit} \quad (3.51)$$

Für einen Idealen Messprozeß, bei dem eine mittlere Anzahl von  $N_{Photonen}$  registriert werden, ergibt sich eine Messunsicherheit  $\Delta N_{Photonen}$  aus der folgenden Beziehung [37]:

$$\Delta N_{Photonen} = \sqrt{N_{Photonen}} \quad (3.52)$$

Für eine gegebene Laserleistung  $P_{Laser}$  (eines als ideal angenommenen Lasers) und eine Messzeit  $t_{mess}$  ergibt sich die Anzahl der detektierten Photonen zu

$$N_{Photonen} = \frac{\lambda}{h * c} * P_{laser} * t_{Mess}$$

mit  $h$  = Plancksches Wirkungsquantum,  $c$  = Lichtgeschwindigkeit im Vakuum und  $\lambda$  = Wellenlänge des verwendeten Laser.

Die Messunsicherheit ergibt sich dann demzufolge zu

$$\Delta N_{Photonen} = \sqrt{\frac{\lambda}{h * c} * P_{laser} * t_{Mess}}$$

Diese Messunsicherheit ergibt nun eine Rauschleistung  $\Delta P_{noise}$ , die der Durchschnittsleistung überlagert ist zu:

$$\begin{aligned} \Delta P_{noise} &= \sqrt{\frac{\lambda}{h * c} * P_{laser} * t_{Mess}} * \frac{h * c}{\lambda} * \frac{1}{t_{mess}} \\ &= \sqrt{\frac{h * c}{\lambda} * P_{laser} * \frac{1}{t_{Mess}}} \end{aligned}$$

Daraus ergibt sich:



### 3. Beschreibung des Experimentes

$$\left(\frac{\Delta P}{P}\right)_{limit} = \frac{\sqrt{\frac{h*c}{\lambda} * P_{laser} * \frac{1}{t_{Mess}}}}{P_{laser}} \quad (3.53)$$

$$= \sqrt{\frac{h * c}{\lambda} * \frac{1}{P_{laser}} * \frac{1}{t_{Mess}}} \quad (3.54)$$

Damit ist eine einfache Beziehung der Nachweisempfindlichkeit zu der detektierten Messlichtleistung gegeben.

Da das maximale Signal von Absorbern zu erwarten ist, die sich im Intensitätsmaximum der beiden Laser befinden, erhält man eine minimal detektierbare Menge  $N$  von Absorbern, die sich im Intensitätsmaximum der Laser befinden:

$$\left(\frac{\Delta P}{P}\right)_{limit} = \frac{\Delta P_{(0,0,0)}}{P_m} = N * \frac{I_{m,(0,0,0)} * I_{a,(0,0,0)} * \sigma_{a,0} * \tau_{trans} * \Delta\sigma_{det}}{P_m} \quad (3.55)$$

Für Laserstrahlen die einem gaussförmigen Intensitätsprofil folgen ergibt sich:

$$\left(\frac{\Delta P}{P}\right)_{limit} = N * \frac{P_m}{\pi * \omega_{m,(z)}^2} * \frac{P_a}{\pi * \omega_{a,(z)}^2} * \frac{\sigma_{a,0} * \tau_{trans} * \Delta\sigma_{det}}{P_m} \quad (3.56)$$

und für annähernd gleiche Wellenlängen und Gausradien der beiden Messlaser:

$$\left(\frac{\Delta P}{P}\right)_{limit} = N * \frac{P_a * \sigma_{a,0} * \tau_{trans} * \Delta\sigma_{det}}{\pi^2 * \omega_{eff,(z)}^4} \quad (3.57)$$

Dabei ist zu beachten, dass die Größe des Wirkungsquerschnittes  $\sigma_{a,0}$  für die Grundzustandsabsorption von der Anregungsleistung abhängig ist wenn  $P_a$  größer wird. Diese Sättigungseffekte führen dazu, dass sich die Anregungswahrscheinlichkeit, die sich aus dem Produkt  $P_a * \sigma_{a,0} * \tau_{trans}$  ergibt, nicht beliebig steigern lässt. So ist bei einer konstant gegebenen Anregungsleistung  $P_a$ , einer Messlichtleistung  $P_m$  und gegebenen Gausradien  $\omega$  eine minimale Anzahl von  $N$  Absorbern vonnöten, um ein eindeutiges Signal zu ergeben.

$$N = \frac{\pi^2 * \omega_{eff,(z)}^4}{P_a * \sigma_{a,0} * \tau_{trans} * \Delta\sigma_{det}} * \sqrt{\frac{h * c}{\lambda} * \frac{1}{P_m} * \frac{1}{t_{Mess}}} \quad (3.58)$$

Zur Verdeutlichung soll folgendes Zahlenbeispiel gegeben werden:

$I_{a,(0,0,0)}$  für folgende Daten (aus einem Gausstrahl in einem quasi homogenes Medium umgerechnet)

$$\begin{aligned} P_a &= 0,1 \mu W \\ t_{mess} &= 1 s \\ \lambda_a &= 532 nm \\ \omega_a &= 1 \mu m \end{aligned} \quad (3.59)$$

### 3. Beschreibung des Experimentes

$$\begin{aligned}
 I_{a,(0,0,0)} &= 3,18 * 10^4 W/m^2 \\
 &= 3,18 W/cm^2 \\
 &= 3,18 J/(s * cm^2) \\
 1 W &:= 2.7 * 10^{18} Photonen/s \\
 I_{a,(0,0,0)} &= 8,6 * 10^{18} Photonen/(s * cm^2) \\
 \sigma_0 &= 4 * 10^{-16} cm^2 \\
 &\Rightarrow 3440 Photonen/s auf \sigma_{a,0} \\
 \tau_{trans} &= 20 \mu s \\
 I_{a,(x,y,z)} * \sigma_{a,0} * \tau_{trans} &= 8,6 * 10^{18} * 4 * 10^{-16} * 20 * 10^{-6} \\
 &= 0,07 (!)
 \end{aligned} \tag{3.60}$$

Aus diesem Beispiel, ist ersichtlich, dass bei einer eingestrahnten Anregungslichtmenge von 100 nW ein typisches Rhodamin 6G-Molekül sich nur zu ca. 7 % der Zeit in einem angeregten Zustand befindet.

Für ein einzelnes Molekül ergibt sich nun aus dem vorherigen Rechenbeispiel eine Transmissionsänderung  $\left(\frac{\Delta P}{P}\right)_{single}$  von:

$$\left(\frac{\Delta P}{P}\right)_{single} = \frac{\Delta\sigma_M}{\omega_m^2 * \pi} \tag{3.61}$$

Für den einfachsten Fall, dass die Farbstoffmoleküle einfach nach erfolgter Anregung zu 100 % ausbleichen und  $\lambda_M = \lambda_A$ , so geht der die Änderung des Absorptionsquerschnitt  $\Delta\sigma_M$  einfach in den Absorptionsquerschnitt  $\sigma_M$  über.

Das hier skizzierte Zahlenbeispiel ergibt für diese Rechnung:

$$\left(\frac{\Delta P}{P}\right)_{single} \cong \frac{4 * 10^{-16} cm^2}{4 * 10^{-8} cm^2} \cong 1 * 10^{-8} \tag{3.62}$$

D.h. aber im Umkehrschluss auch, dass ich die Laserleistung nach der Probe auf  $1 * 10^{-8}$  genau bestimmen muss.

Bei Verwendung eines gegebenen Lasers lässt sich nun für jeden Absorber über eine relativ einfach zu bestimmende Rauschmessung eine absolute Nachweisgrenze für die Detektion in einer Anzahl von Absorbern  $N_{min\ Absorber}$  angeben.

$$N_{min\ Absorber} = \frac{\left(\frac{\Delta P}{P}\right)_{limit}}{\left(\frac{\Delta P}{P}\right)_{single}} \tag{3.63}$$

## 3.7. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde eine mathematische Beschreibung einer experimentellen Methode hergeleitet, die es gestattet die dreidimensionale Struktur bzw. Konzentrationsverteilung einer Probe aufzuklären und als Grundlage für ein bildgebendes Verfahren dient. Die Bildaufnahme erfolgt identisch mit der konfokalen Bildgebung indem man die

### *3. Beschreibung des Experimentes*

Probe relativ zu dem Fokuspunkt abstrahlt. Weiterhin ist man in der Lage, intrinsische Moleküleigenschaften ebenfalls orts aufgelöst zu spektroskopieren. Weiterhin wurde eine einfache Beziehung hergeleitet, mit der direkt die absolute Nachweisgrenze eines gegebenen Messaufbaus direkt bestimmt werden kann.

## 4. Experimenteller Aufbau

In dem folgenden Kapitel soll nun der experimentelle Aufbau im Einzelnen beschrieben werden, mit dem die im vorherigen Kapitel theoretisch beschriebene neuartige Messmethode realisiert wurde.

### 4.1. Aufbau zur Bildaufnahme und Zeitverhalten der Probe

Bei dem hier vorgestellten Experiment, handelt es sich um ein Zwei-Wellenlängen-Experiment. Der schematische Aufbau ist in Abb.4.1 gezeigt. Als Anregungslichtquelle dient ein frequenzverdoppelter NdYAG-Laser, der eine Wellenlänge von 532 nm emittiert und Dauerstrich-Leistung von ca. 20 mW aussendet. Als Messlaser dient ein grüner HeNe-Laser mit der Wellenlänge von 543.5 nm und einer Leistung von 1,5 mW.

Der Anregungslaser wird mit einem akustooptischen Modulator (AOM) in seiner Amplitude mit der Frequenz  $\omega_A$  moduliert. Die Modulationsfrequenz generiert der zur späteren Signalaufbereitung verwendete Lock-In-Verstärker (hier als der Master-Lock-In bezeichnet) mittels eines eingebauten digitalen Oszillators. Dies hat den Vorteil, dass die Referenzfrequenz, auf die der Lock-In-Verstärker synchronisiert wird, von ihm selber generiert wird und der Lock-In-Verstärker seine internen Oszillatoren nicht mit einem Regelkreis auf eine externe Frequenz synchronisieren muss. Andernfalls hat es sich experimentell gezeigt, dass diese nachlaufende Regelung unweigerlich zu einem von dem Regelkreis hervorgerufenen Frequenz-Jitter führt, der sich wiederum als Rauschquelle bemerkbar macht. Weiterhin kann so die Anregungsfrequenz leicht variiert werden. Dies wird bei der zeit-aufgelösten Messung der transienten Absorption wichtig.

Nach der Modulation durch den AOM, wird der Durchmesser, des von dem AOM in die erste Ordnung gebeugten Strahlteiles, mittels eines Strahlaufweisersystems auf ca. 20 mm aufgeweitet. Dieses Strahlaufweisersystem beinhaltet eine 20  $\mu\text{m}$  große Lochblende, die hier als Raumfilter wirkt. Damit wird für den Anregungslaser ein Intensitätsprofil erzeugt, das wieder annähernd dem eines Lasers entspricht, der in einen reinen  $TEM_{00}$ -Mode emittiert. Abbildungsfehler und Störungen im Intensitätsprofil, die durch den AOM verursacht werden, werden so wieder beseitigt. Über eine Reflektion der Oberfläche einer Quarzglasplatte wird dieser Strahl nun zu dem Anregungsobjektiv geleitet.

Mit Hilfe dieses Mikroskopobjektives (10-fach Objektiv,  $NA=0,3$ ) wird der Anregungslaserstrahl auf die Probe fokussiert. Bevor der Anregungslaserstrahl auf die Quarzglasplatte trifft, wird zuvor noch über eine zweite Quarzglasplatte ein Teil des Anregungslichtes auf eine Photodiode gegeben. Das Signal dieser Photodiode dient später dazu, Schwankungen in der Anregungslichtintensität zu korrigieren. Dies erfolgt dadurch, dass

#### 4. Experimenteller Aufbau

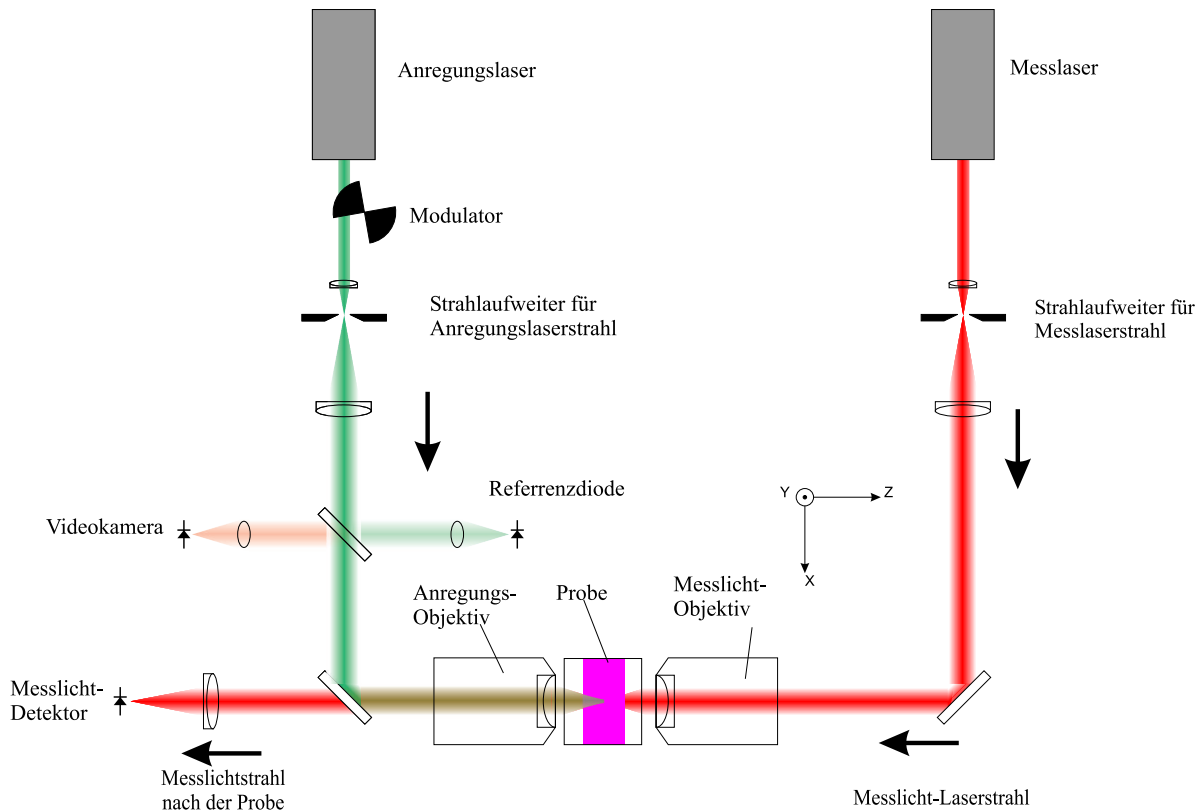


Abbildung 4.1.: Experimenteller Aufbau zur dreidimensionalen Bildaufnahme

das modulierte Anregungssignal dieser Photodiode auf einen zweiten Lock-In-Verstärker gegeben wird, der in Frequenz und Phase auf den ersten Lock-In-Verstärker abgestimmt ist. Am Anfang jeder Messung wird diese Intensität als eine Referenzintensität  $P_r$  bestimmt und dann während der eigtl. Messung fortlaufend als Anregungslichtintensität  $P_a(t)$  zum Mess-Zeitpunkt  $t$  mit aufgezeichnet. Das empfangene Messsignal zum Mess-Zeitpunkt  $t$  wird danach mit dem Verhältnis  $\frac{P_r}{P_a(t)}$  multipliziert und so die Anregungslichtschwankungen ausgeglichen. Es zeigte sich, dass diese Schwankungen im Bereich bei Messzeiten von mehreren Stunden in einem Bereich von mehreren Prozent lagen. Weiterhin wird die Rückseite dieser Quarzglasplatte dazu verwendet, einen Teil der von der Probe emittierten und zurückgesendeten Fluoreszenz auf eine Video-Kamera abzubilden. Diese Kamera gestattet die gefahrlose Justage der Laserstrahlen und bildet gleichzeitig eine Art vereinfachtes klassisches konfokales Mikroskop. Dazu wird jeweils bei einer Messung die Intensität des Kamerapixels ausgelesen, bei dem sich zum Zeitpunkt der Justage das Maximum des Fluoreszenzbildes befindet.

Die Probe wird auf einem motorisierten Positioniertisch befestigt, der von dem Computer gesteuert die Probe verfahren kann. Die Abrasterung der Probe zu späteren Bildgenerierung erfolgt ebenfalls mit diesem Proportioniertisch.

Der Messlichtstrahl wird ebenfalls in seinem Strahldurchmesser in analoger Weise wie

#### 4. Experimenteller Aufbau

der Anregungslaserstrahl aufgeweitet, bevor er mit dem zweiten Mikroskop-Objektiv (ebenfalls ein 10-fach Objektiv,  $NA=0,3$ ) auf die Probe fokussiert wird. Die konfokale Justage erfolgt so, dass der Anregungsfokus und der Messlichtfokus auf dem selben Punkt im Raum zu liegen kommen und in dem Kamerabild möglichst einen scharfen punktförmigen Bildfleck geben.

Nach Durchlaufen der Probe wird der Messlichtstrahl von dem Anregungsobjektiv wieder aufgesammelt und gleichzeitig dabei wieder in einen parallelen Laserstrahl transformiert.

Um das Anregungslicht vor dem Detektor abzublocken, wird in den parallelen Strahlengang des Messlichtes ein schmalbandiges Interferenzfilter passend für diesen Lasertyp eingesetzt.

Dieser Laserstrahl wird, nachdem er die Quarzglasplatte, über den der Anregungslaser in den Strahlengang eingekoppelt wurde, und den Interferenzfilter durchlaufen hat, mit einer achromatischen Sammellinse ( $f=160$  mm) auf ein Lochblende ( $D = 100 \mu\text{m}$ ) fokussiert. Hinter dieser Lochblende befindet sich eine Photodiode, die das Messlicht in einen Photostrom umwandelt. Dieser Photostrom wird über einen rauscharmen Stromverstärker in eine Spannung transformiert. Diese Spannung wird auf den Master-Lock-In zur Signalanalyse gegeben. Dieser Master-Lock-In ist in der Lage, den Wechselanteil bei der Frequenz und Phase des Anregungslichtes zu bestimmen, den Gleichanteil des Messlichtes sowie noch die Amplitude des Anregungslichtes, welches von dem zweiten Lock-In-Verstärker bestimmt wird, auszulesen und aufzuzeichnen.

Diese Werte werden von dem Computer anschließend digital ausgelesen und zur späteren Auswertung mit den Koordinaten der Probe bzw. deren Verschiebungsposition im Raum in einer Datei aufgezeichnet. Die Daten einer Messung werden zur späteren Bildverarbeitung in dem sog. "ics"-Dateiformat abgespeichert [36]. Dieses Dateiformat gestattet es, sehr flexibel eine mehrdimensionale Datenstruktur zu speichern und wird von vielen kommerziellen Programmpaketen zur Bildverarbeitung unterstützt. Die Steuerung des gesamten Experiments erfolgt dabei mit einem eigens dazu angefertigten Programm.

Um das zeitliche Abklingverhalten der Probe zu bestimmen, wird der Aufbau wie folgt modifiziert:

Das von der Photodiode detektierte Signal wird anstatt in den Master-Lock-In einzuspeisen, mit einem Spektrum-Analyzer mit angeschlossenen Tracking-Generator weiterverarbeitet. Dieser Spektrum-Analyzer gestattet es den Amplitudenverlauf des empfangenen Signals gegen die Modulationsfrequenz aufzuzeichnen. Dazu ist dieses Gerät mit einem sog. Tracking-Generator ausgestattet. Dieser Gerät folgt dabei der momentanen Detektions-Frequenz des Spektrum-Analyzers und gibt diese Frequenz als ein sinusförmiges Spannungssignal mit einstellbarer Amplitude heraus. Dieses Signal wird nun in den akustooptischen Modulator als Steuersignal eingespeist. Damit ist man in der Lage, die von von der Probe auf den Messlaser transformierte Antwortfunktion auf den modulierten Anregungslaser zu bestimmen und nach Gleichung 3.48 die Lebensdauer  $\tau_{trans}$  zu bestimmen.

## 4.2. Justage des Experimentes

Um eine reproduzierbare und gleichbleibende Signalaufnahme zu gewährleisten, wird hier kurz eine Justageanleitung gegeben.

Die Justage erfolgt dabei im wesentlichen in 8 Schritten:

1. Justage des Strahlaufweiters für den Messlaser und Erzeugung eines parallelen Laserstrahls. Dazu wird der Messlaserstrahl möglichst mittig in das Aufweitungssystem eingekoppelt (ohne Pinhole). Danach wird das Pinhole wieder eingesetzt und so im Raum nach der 1. Linse positioniert, dass eine möglichst homogene und gleichförmige Intensitätsverteilung in einem Abstand von mehreren cm hinter diesem Pinhole ergibt. Die Fokussierung erfolgt über die Abbildungslinse des Strahlaufweiter so, dass eine mittige Ausleuchtung der ganzen Linse sichergestellt ist und dass man bei Durchtritt durch eine um  $45^\circ$  verkippte planparallele Glasplatte die Interferenzstreifen sich zu einer möglichst homogenen Fläche verbinden.

2. Justage des AOM auf den Anregungslaserstrahl. Dazu wird der Laserstrahl so auf den Glaskörper des Modulators ausgerichtet, dass eine möglichst hohe Beugungseffizienz erzielt wird.

3. Analoge Justage des Strahlaufweiters für den Anregungslaser. Dazu wird der von dem AOM aus der direkten Strahlrichtung des Lasers gebeugte Strahl 1. Ordnung in analoger Weise wie der Strahlaufweiter für den Messlaser justiert.

4. Entfernen der Mikroskop-Objektive und Justage des Pinholes vor dem Detektor. Dies erfolgt in dem der parallele Messlaserstrahl so auf das Pinhole abgebildet wird, dass eine maximale Intensität durch dieses Pinhole hindurchtritt.

5. Einbau der Mikroskop-Objektive und der Probe, Justage dieser Objektive auf den Mess- und Anregungslaser. Die Mikroskop-Objektive werden wieder eingebaut und mit dem Messlaser-Objektiv wird nun die Fokussierung so justiert, dass wiederum eine maximale Messlichtintensität durch das Detektionspinhole gelangt. Eine gute Kontrolle über einen koaxialen Winkelversatz der Laser erhält dadurch, dass man die beiden Strahlaufweiter in umgekehrter Richtung jeweils als Detektionspinholes für das Mess- bzw. Anregungslicht benutzen kann.

6. Justage der Probe in den gemeinsamen Fokus von Anregungs- und Messlichtlaser. Durch Einbringen der Probe ändert sich normalerweise der Abstand zur Fokussierung der beiden Mikroskop-Objektive. Diese muss über das Messlichtobjektiv kompensiert werden. Der optimale Fokuspunkt wird mit der CCD-Kamera gesucht.

7. Kompensation von achromatischen Abbildungsfehlern durch die Abbildungslinse des Strahlaufweiters für den Anregungslaser. Dazu nimmt man ein erstes "Rohsignal" von dem Master-Lock-In auf und justiert mittels axialer Verschiebung der Abbildungslinse des Anregungsstrahlaufweiters auf eine maximale Signalintensität.

8. Nun werden die einzelnen Komponenten des ganzen Systemes im Wechselspiel gegeneinander justiert. Dies erfolgt am besten in kleinen Justageschritten wobei die Signalintensität bei jedem Justageschritt beobachtet wird. Verändert sich die Signalamplitude nicht mehr merklich, so ist das System zur eigtl. Bildaufnahme justiert.

### 4.3. Rauschanalyse

Die Nachweisgrenze des hier vorgestellten Messverfahrens wird im Wesentlichen durch die Intensitätsfluktuationen des Messlaser beschränkt. Um die Größe dieser Intensitätsfluktuationen genau zu bestimmen und so Aussagen über die experimentelle Nachweisgrenze machen zu können, wurde folgender Messaufbau und Messelektronik entwickelt.

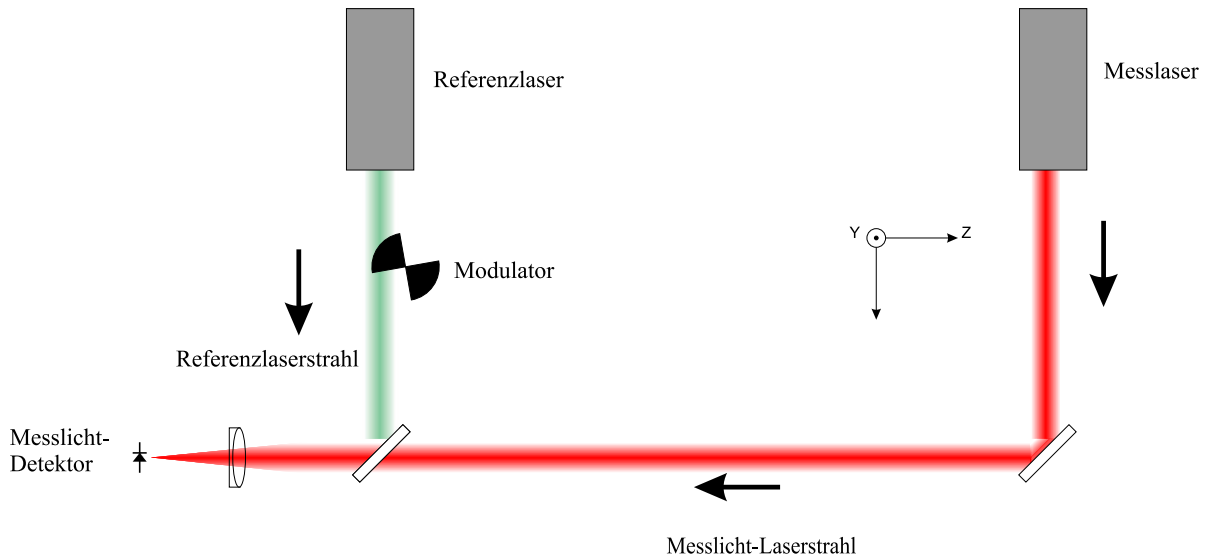


Abbildung 4.2.: Prinzip des Rauschmessplatz

Es wird das zu untersuchende Messlicht auf eine Photodiode gegeben, die an dem rauscharmen Stromverstärker angeschlossen ist. Das Eingangsruschen dieses Verstärkers liegt dabei deutlich unter dem zu erwartenden Schrot-Rauschen, das man aufgrund der detektierten Lichtintensität erwartet. Um Sättigungseffekte bei der Detektion auszuschließen, kann zusätzlich zu dem zu vermessenden Lichtsignal ein zweites modulierte Signal über eine Quarzglasplatte eingekoppelt werden. Dazu wird dieses Signal in Frequenz und Phase auf den zur Messung dienenden Lock-In-Verstärker abgeglichen und die Signalintensität mit und ohne Messlicht bestimmt.

Es hat sich experimentell gezeigt, dass bei Lichtintensitäten, die einen Photostrom über 5 mA generieren, die Amplitude dieses Zusatzsignals gedämpft wurde und damit die Messung als nicht mehr linear anzusehen ist. Deshalb wurde das Messlicht mittels Graufiltern wenn nötig so weit abgeschwächt, dass dieser Photostrom nie überschritten wurde. Der Hintergrund liegt in dem Aufbau dieser Halbleiterdetektoren begründigt. Einzelheiten dazu sind in [37, 39] beschrieben, sollen aber hier nicht weiter erläutert werden.

Weiterhin wird um diese Sättigungseffekte innerhalb der Photodiode zu minimieren, diese mit einer stabilisierten Gegenspannung (BIAS-Voltage) von ca. 10 V betrieben [40]. Dieses Vorgehen wird in dem Datenblatt des Herstellers der verwendeten Photodiode empfohlen und erweitert den Bereich der linearen Photostromgenerierung. Diese



#### 4. Experimenteller Aufbau

Gegenspannung stellt der hier verwendete Stromverstärker direkt am Spannungseingang zur Verfügung. Das von dem Verstärker in eine Spannung umgewandelte Nutzsignal wird nun durch den Lock-In-Verstärker weiterverarbeitet. Der Lock-In-Verstärker bildet nun in dieser Messanordnung einen sehr schmalbandigen Frequenzfilter mit nachgeschalteten Leistungsmesser. Mit Hilfe des eingebauten Oszillators ist es möglich, die im Frequenzband schmalbandige Rauschamplitude über einen weiten Bereich sehr genau zu bestimmen.

Der Lock-In-Verstärker ist dabei mit Hilfe der eingebauten elektronischen Filtergruppen und seiner Zeit-Konstante zur Messdatenaufnahme so eingestellt, dass er einen effektiven Bandpass mit einer elektronischer Filterbandbreite von  $\Delta f = 1 \text{ Hz}$  bildet. Damit ist man in der Lage, den zu späteren Messung günstigsten Frequenzbereich zu bestimmen bei dem der Anregungslaser moduliert wird und die Messung am wenigsten durch Störsignale der Laserelektronik gestört wird.

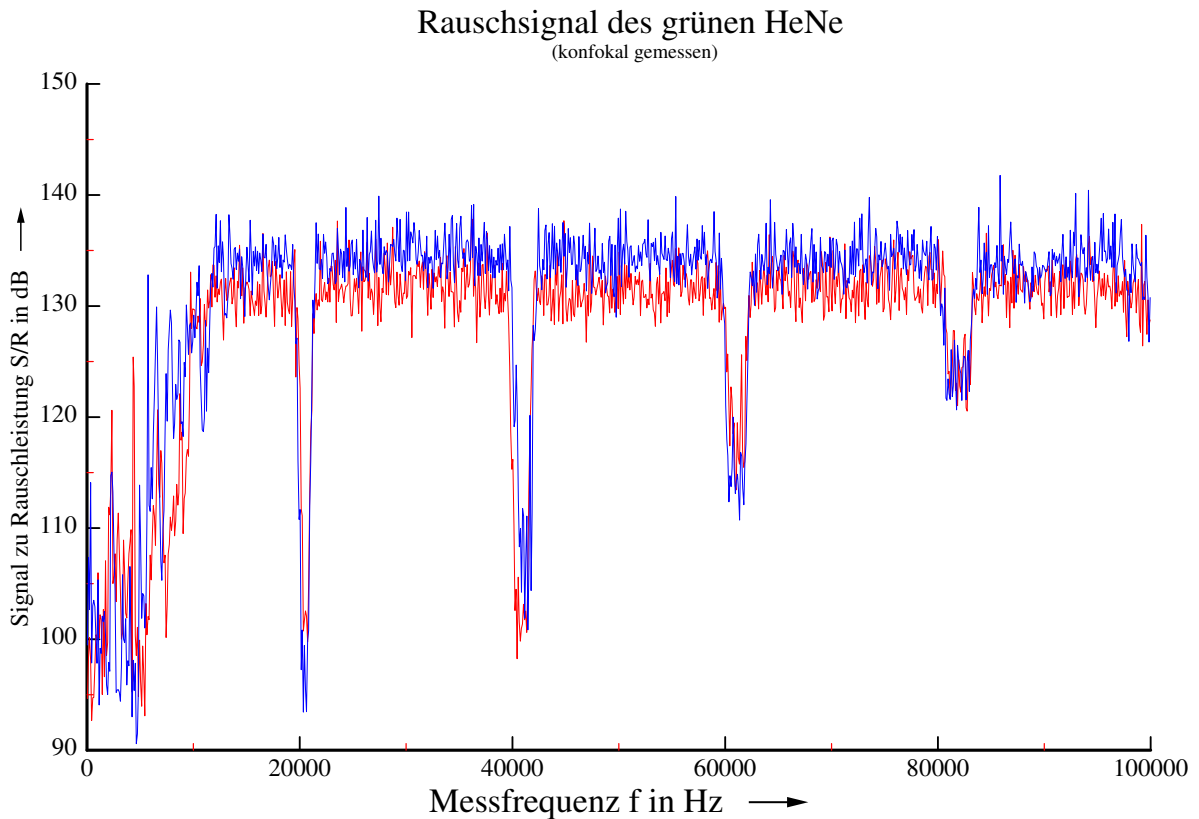


Abbildung 4.3.: Rauschspektrum des grünen HeNe-Lasers

Ein typisches Rauschspektrum für einen der verwendeten Messlaser ist in Abb. 4.3 dargestellt. Auf der x-Achse ist die Messfrequenz eingezeichnet und auf der y-Achse das Signal zur Rauschverhältnis  $S/R$  in dB. Dieses Verhältnis wird gebildet aus der Rauschamplitude  $V_{AC(\Delta=1\text{Hz})}$  und dem Gleichanteil  $V_{DC}$  des von der Diode empfangenen

#### 4. Experimenteller Aufbau

Signals. Dabei bedeutet z.B. ein  $S/R$ -Wert von 120 dB, dass der Rauschanteil  $10^{-6}$  mal kleiner ist, als der von der Diode gemessenen Gleichanteil in V. Es gilt:

$$\frac{S}{R} = \frac{V_{DC}}{V_{AC(\Delta=1Hz)}} \quad (4.1)$$

bzw.

$$\left(\frac{S}{R}\right)_{dB} = 20 * \log\left(\frac{V_{DC}}{V_{AC(\Delta=1Hz)}}\right) \quad (4.2)$$

Die rote und die blaue Kurve geben jeweils zwei unterschiedliche Messaufnahmen wieder. Man sieht deutlich, dass in dem Rauschspektrum ausgeprägte Frequenzen vorhanden sind, bei denen das Verhältnis  $\frac{S}{R}$  um über 30 dB kleiner ist. Dies entspricht einer verminderten Nachweisempfindlichkeit von einem Faktor über 30. Die Ursache für diese ausgeprägten Störfrequenzen liegen in dem Aufbau dieses Lasertyp begründet. Diese Art von Gaslasern wird mit einem Schaltnetzteil betrieben, dass für die Hochspannung in dem Glaskolben des Laserresonators zuständig ist. Diese Schaltnetzteile bzw. deren Bauelemente arbeiten typischerweise mit Arbeitsfrequenzen im Bereich von 20-30 kHz. Als Folge findet man diese Arbeitsfrequenzen als zusätzliche kleine Modulationen in der Intensität der Laserstrahlung wieder. In dem Niederfrequenten Bereich bis ca. 15 kHz erkennt man das sog.  $1/f$ -Rauschen, dass erst oberhalb einer gewissen Grenzfrequenz  $f$  in ein frequenzunabhängiges weißes Rauschen übergeht (ohne Berücksichtigung der Störfrequenzen des Netzteils). Im Idealfall geht dann dieses Rauschen in das sog. Photonenrauschen über, dass einer Poisson-Verteilung in der Intensität folgt und nur quantenmechanisch bedingt von der Intensität abhängt.

Oberhalb dieser Grenzfrequenz gilt für die Unsicherheit oder auch für die Varianz  $\Delta N_{Photonen}$ , dass eine gewisse Anzahl an Photonen  $N_{Photonen}$  in einem Zeitbereich  $\Delta t$  auf die Fläche eines Detektors fallen und dabei detektiert werden [37]:

$$\Delta N_{Photonen} = \sqrt{N_{Photonen}} \quad (4.3)$$

Werden nun die Messungen bei Frequenzen oberhalb dieser Grenzfrequenz durchgeführt, so lassen sich sog. Photonenlimitierte Messungen durchführen. Dies bedeutet im einzelnen, dass die Empfindlichkeit einzig durch die Statistik der emittierten Photonen limiert ist und man damit an eine fundamentale Grenze der Messempfindlichkeit stößt.

### 4.4. Zusammenfassung

In dem vorliegenden Kapitel wurde der Aufbau eines experimenteller Messplatz beschrieben, der es ermöglicht die einzelnen Vorhersagen aus dem vorherigen Kapitel zu überprüfen. Einzelne exemplarische Messungen werden in dem nächsten Kapitel besprochen.

# 5. Beschreibung der Messergebnisse

Im folgenden Kapitel wird zunächst die Möglichkeit der axialen Auflösung überprüft, da dies das wesentlichste Kriterium zu einer dreidimensionalen Bildaufnahme ist. Daraufhin wird die Fähigkeit untersucht, zwei hintereinanderliegende absorbierende Schichten voneinander zu unterscheiden bzw. deren Abstand voneinander zu bestimmen. Im Anschluss daran soll überprüft werden, ob das Messsystem auch umfangreichere Strukturen in analoger Weise, vergleichbar dem eines klassischen konfokalen Mikroskopes, mit einem schlecht fluoreszierenden Farbstoffsystem abzubilden vermag. Weiterhin wird noch die Fähigkeit zu einer Lebensdauermessung an einem unbekanntem System gezeigt werden. Zum Schluss wird noch die Nachweisempfindlichkeit des Verfahrens abgeschätzt, die mit modernen Lasersystemen derzeit möglich ist.

## 5.1. Test der axialen Auflösung

Zum Test der axialen Auflösung wurde eine dünne absorbierende Schicht in axialer Richtung durch den Fokusbereich bewegt und die Signalintensität  $\frac{\Delta P}{P_m}$  gegen die Verschiebungsposition aufgetragen. Die für diese Messung erforderliche sehr gleichmäßige und sehr dünne Farbstoffschicht wurde mittels einer Lackschleudertechnik hergestellt. Dieses auch als "Spin-Coating" bezeichnete Verfahren wird in der Halbleiterindustrie häufig verwendet [41], da es die Möglichkeit bietet, über größere Flächen extrem dünne und gleichmäßige Lackfilme aufzutragen.

In diesem Fall wurde es dazu verwendet, einen sehr dünnen mit Farbstoff versetzten Polymerfilm auf ein handelsübliches Deckglas für die Mikroskopie aufzutragen. Als Farbstoff wurde Rhodamin 6G (Fa. Radiant Dyes, Lasergrade) verwendet. Dieser Farbstoff wird in Chloroform (Fa. Merck, p.a.) gelöst ( $10^{-6} \frac{mol}{l}$ ). Zu dieser Lösung wird 3-5 Massenprozent Polycarbonat (Makrolon, Fa. Bayer) gegeben und ebenfalls aufgelöst.

Von dieser Farbstoff-Polymerlösung werden 1-2 Tropfen auf ein Deckglas gegeben, das auf eine Motorwelle gespannt ist. Der Motor dreht sich dabei mit ca.  $2000 U/min$ . Nach dem Auftropfen lässt man bis zur vollständigen Verdampfung des Chlorforms den Motor noch ca. 10-15 Sekunden weiterlaufen. Als Ergebnis erhält man eine sehr dünne und gleichmäßige fluoreszierende Farbstoffschicht auf einem ca.  $100 \mu m$  dicken Glasträger.

Es wurde versucht, die Dicke der Farbstoffschicht mittels eines kommerziellen konfokalen Fluoreszenzmikroskopes (Nikon TE300 mit PCM2000-Zusatz) zu bestimmen. Jedoch ist die Schichtdicke unterhalb der Auflösungsgrenze dieses Mikroskopes (verwendetes Objektiv  $NA=0,85$ , Fa. Nikon) und man detektiert nur ein schmales Intensitätsmaximum.

Dies resultiert daher, dass die Auflösungsgrenze dieses Objektivs im sichtbaren Wellenlängenbereich (ca.  $550 \text{ nm}$ ) nach Gleichung 2.28 bei ca.  $500 \text{ nm}$  liegt. D.h. die ver-

## 5. Beschreibung der Messergebnisse

wendete Farbstoffschicht ist deutlich dünner als diese 500 nm und bildet damit ein quasi ideales Testobjekt zum Test der axialen Auflösung.

Die Justage des optischen Systemes erfolgte gemäß der im vorherigen Kapitel angeführten Justageanleitung.

Um Ausbleicheffekte bzw. Photozerstörungen innerhalb der Probe während der Messung zu minimieren und für den Zeitraum der Messung immer eine konstante Einwaagekonzentration zu gewährleisten, wurde die Probe nicht nur in axialer Richtung bewegt, sondern gleichzeitig eine mäanderförmige Bewegung in lateraler Richtung durchgeführt. Diese mäanderförmige Verschiebung senkrecht zur optischen Achse der Laser führt zu keiner nennenswerten Defokussierung. Dies wurde mittels der Video-Kameradaten visuell überprüft. Ein typisches Messsignal in Abhängigkeit der axialen Position der Probe ist in Abbildung 5.1 wiedergegeben.

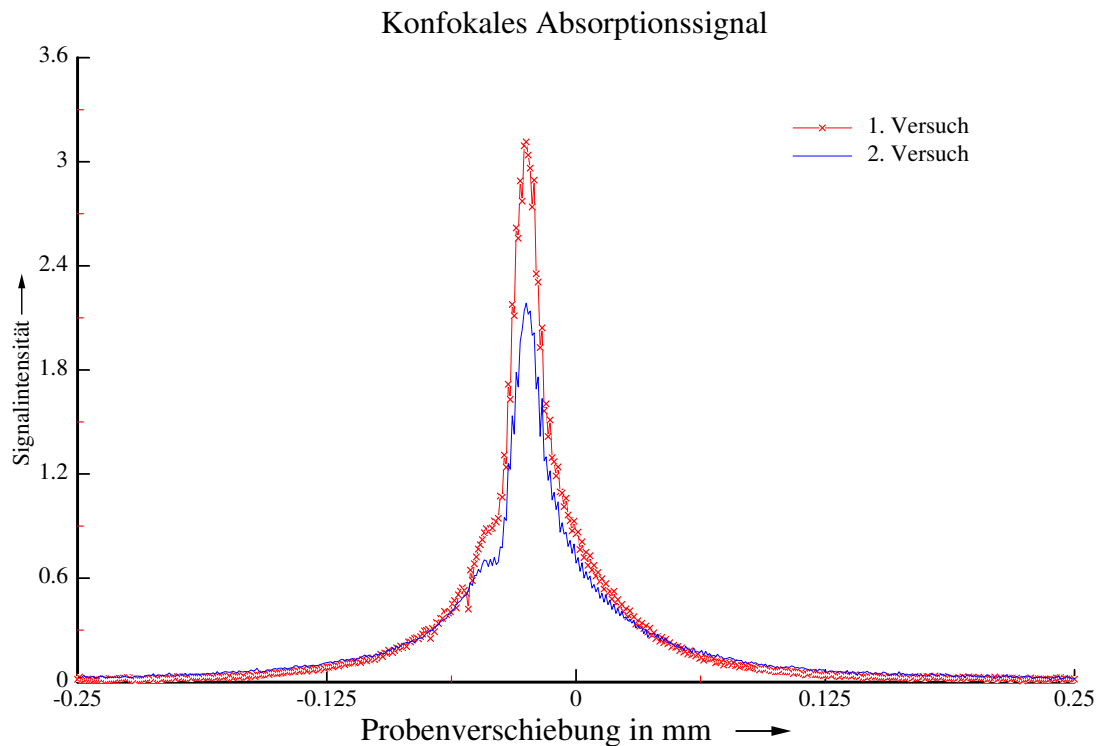


Abbildung 5.1.: Signal bei Verschiebung in lateraler Richtung

In diesem Diagramm sind zwei Messkurven wiedergegeben, die direkt hintereinander aufgenommen wurden. Man erkennt deutlich die Verminderung in der Signalintensität, aber auch, dass die beiden Kurven bis auf einen Intensitätsfaktor einen identischen Profilverlauf ergeben.

Zum Test der Axialen Auflösung wird das leicht zu bestimmende Kriterium der Halbwertsbreite (FWHM) genommen. Dazu ist in Abbildung 5.2 das erste Intensitätsprofil nochmals wiedergegeben. In diesem Bild ist bei einer Intensität eine waagerechte Markierung hinzugefügt worden, die einem Abfall auf 50 % der Maximalintensität entspricht.

## 5. Beschreibung der Messergebnisse

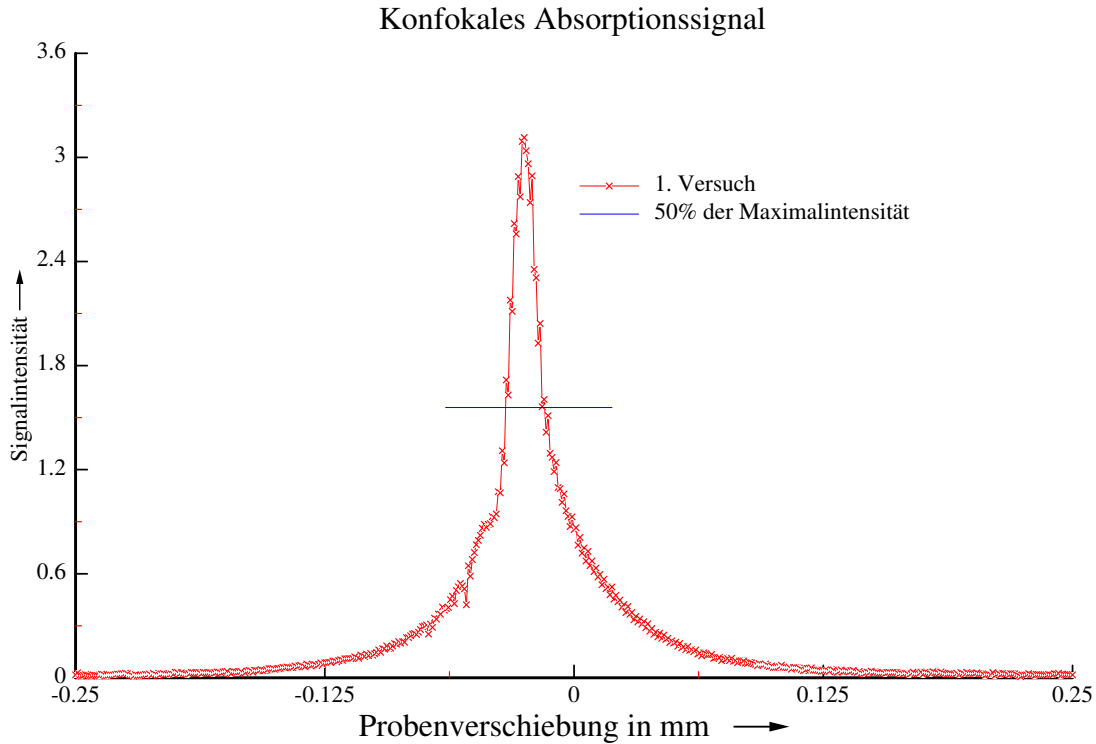


Abbildung 5.2.: Signal mit eingezeichneter Halbwertsbreite FWHM

Der Abstand der Schnittpunkte dieser waagerechten Markierung mit der Messkurve ergibt die Halbwertsbreite. Diese Halbwertsbreite ist aus dem Bild zu  $16 \mu\text{m}$  bestimmt worden. Dies entspricht der Auflösung, die man für eine gaussartige Strahlgeometrie erwarten würde, mit einem Überstrahlungsfaktor von  $\Gamma \simeq 3$  und einem effektiven Brechungsindex von  $n \simeq 1,5$  für die Messung.

Auffällig ist noch die Asymmetrie des Flankenverlaufs der Messkurve links und rechts des Maximums. Diese Asymmetrie lässt sich dadurch erklären, dass in Blickrichtung des Messstrahls unterschiedliche Brechungsindizes vor und nach der Probe vorherrschen und sich durch Verschiebung der Probe der Fokusort für den Messlaser und den Anregungslaser geringfügig gegeneinander verschiebt. Dieser Effekt der Bildverzerrung ist von anderen mikroskopischen Verfahren ebenfalls bekannt.

Da die verwendeten Mikroskopobjektive jedoch eine vergleichsweise kleine numerische Apertur aufweisen und es keine neuartigen Erkenntnisse erbringen würde, würde eine vollständige Abhandlung dieses Effektes den Rahmen dieser Arbeit übersteigen und wurde nicht weiter verfolgt.

## 5.2. Diskriminierung hintereinanderliegender absorbierender Schichten

In dem vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass es eine direkte Abhängigkeit der Signalintensität von der axialen Verschiebungsposition gibt. Daraus ergibt sich die Frage, ob es möglich ist, hintereinanderliegende absorbierende Schicht getrennt voneinander zu messen oder ihren Abstand voneinander zu bestimmen.

In der klassischen Absorptionsspektroskopie würde diese Messung von zwei homogenen hintereinander liegenden Schichten lediglich eine Superposition der beiden Absorptionsspektren ergeben. In dem hier vorgestellten Transmissionsexperiment ist aber die Änderung der Transmissionsänderung vom Ort des Absorbers abhängig und so sollten zwei hintereinanderliegende Absorber voneinander getrennt detektiert werden können.

Um diese Hypothese der Unterscheidbarkeit experimentell zu verifizieren, wurde ein leicht modifiziertes Testobjekt angefertigt. Hierbei wurde nicht nur eine Farbstoff-/Polymerschicht auf ein Deckglas aufgebracht, sondern zusätzlich auf die Rückseite des Deckglases eine zweite identische Schicht aufgebracht.

Die Signalintensität gegenüber der Verschiebungsposition ist in Abbildung 5.3 dargestellt.

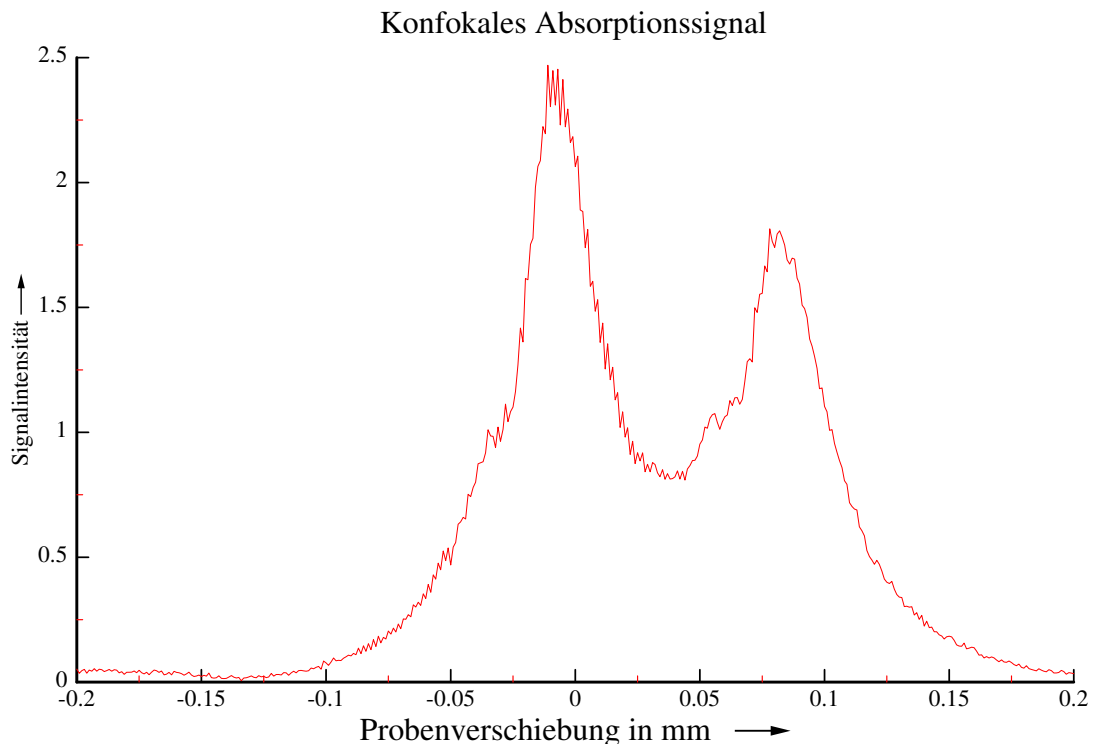


Abbildung 5.3.: Konfokales Absorptionssignal von zwei hintereinanderliegenden absorbierenden Schichten

## 5. Beschreibung der Messergebnisse

In der dargestellten Messkurve sind zwei deutlich ausgeprägte Signal-Maxima zu erkennen. Der Abstand dieser beiden Maxima entspricht einem Abstand von ca.  $75 \mu\text{m}$ . Dieser Abstand lässt sich gut mit der Deckglasdicke in Verbindung bringen. Diese Dicke wurde mechanisch zu  $111 \mu\text{m}$  bestimmt. Die Diskrepanz aus diesen beiden Werte ergibt sich daraus, dass sich der geometrische Ort eines der beiden Laserfoki um den Faktor  $n$  verlängert bzw. verschoben wird. Daraus ergibt sich mit  $n \simeq 1,5$  (für das Deckglas) ein durch das Verfahren ermittelter Abstand von  $75 \mu\text{m} * 1,5 = 112,5 \mu\text{m}$ , der mit dem mechanisch bestimmten Abstand sehr gut übereinstimmt.

Der Unterschied in den Signalhöhen lässt sich ebenfalls mit der leichten Defokussierung bzw. Fokusverschiebung von Anregungs- und Messlaserfokus erklären. Bei dieser Messung macht sich dieses Phänomen etwas stärker bemerkbar als im vorherigen Abschnitt, da die Strahlrichtung der beiden Laserstrahlen aus experimentellen Gründen gegenläufig gewählt wurde. Dies hat zur Folge, dass die vor der Messung vorgenommene Justage nur für eine der beiden Schichten optimal ist und für die andere kompensiert werden müsste. Dieses Problem ließe sich jedoch minimieren, wenn beide Laserstrahlen koaxial und richtungsgleich verlaufen würden.

Als Ergebniss kann man aber zunächst feststellen: Mit Hilfe des hier vorgestellten Experimentes ist es möglich, das Transmissionsverhalten von mehreren hintereinanderliegende Schichten unabhängig voneinander zu bestimmen. Ein wesentliches Ziel zur dreidimensionalen Bildgebung ist also erreicht.

### 5.3. 3-Dimensionale Bildaufnahme

In dem nun folgenden Abschnitt wird gezeigt, dass es damit möglich ist, auch real existierende und komplexere Strukturen dreidimensional mit dem hier vorgestellten Mikroskopie-Verfahren abzubilden. Dazu wurde zunächst ein Testsubstrat ausgesucht, für das folgende Anforderungen gestellt wurden: Es muss einfach handhabbar bzw. reproduzierbar herstellbar sein, eine gute Photostabilität haben und mit den zur Verfügung stehenden Lasersystemen anregbar sein.

Die gute Photostabilität ist nützlich und erforderlich, da mit einer relativ langen Messzeit zu rechnen ist und sie dabei hilft schädliche Photoreaktionen innerhalb der Probe, die die Messung stören könnten, auf ein Minimum zu reduzieren. Von vielen Fluoreszenzfarbstoffen ist jedoch bekannt, dass sie genau bei diesem Kriterium eine Schwachstelle haben [9]. Ihre gute Fluoreszenzfähigkeit ist inherent mit einer sehr langen Lebensdauer in den angeregten Zuständen verknüpft und dies bedeutet im Umkehrschluß oftmals einen sehr guten Reaktionskanal für Photoreaktionen jeglicher Art. Farbstoffe mit exzellenten Photostabilitäten fluoreszieren dem gegenüber jedoch fast nicht, stehen aber Grundsätzlich für dieses Messverfahren zur Verfügung.

Die Anregbarkeit mit dem Messlasersystem ist leicht zu überprüfen. Wenn das System im Wellenlängenbereich der Laser eine ausgeprägte Absorptionsbande aufweist, so sollte es grundsätzlich anregbar sein und als Messsonde zur Verfügung stehen.

Als Testobjekt wurde dann eine handelsübliche Inkjet-Folie (HP Inkjet-Folie) ausgewählt, die mit einer magentafarbenden Fläche mit einem handelsüblichen Inkjet-Drucker

## 5. Beschreibung der Messergebnisse

(HP Deskjet 600) flächig bedruckt wurde. Das Absorptionsspektrum einer solchen bedruckten Folie ist in Abbildung 5.4 gezeigt. Die bei solchen Produkten verwendeten Farbstoffe sind auf die Eigenschaften Bedeckungsgrad und Photostabilität hin optimiert. Aus dem Absorptionsspektrum ist ersichtlich, dass die Wellenlänge des Anregungs-, sowie auch des Messlasers innerhalb der Absorptionsbande dieses Farbstoffsystemes liegen. Durch eine einfache Dünnschicht-Chromatographie ließ sich dabei feststellen, dass diese Druckertinte aus einem Gemisch von mindestens 2 unterschiedlichen Farbstoffen bestand. Auf eine weitere Untersuchung der Tinte wurde jedoch verzichtet, da ein direkter Test der Signalaufnahme bzw. Bildaufnahme positiv verlief.

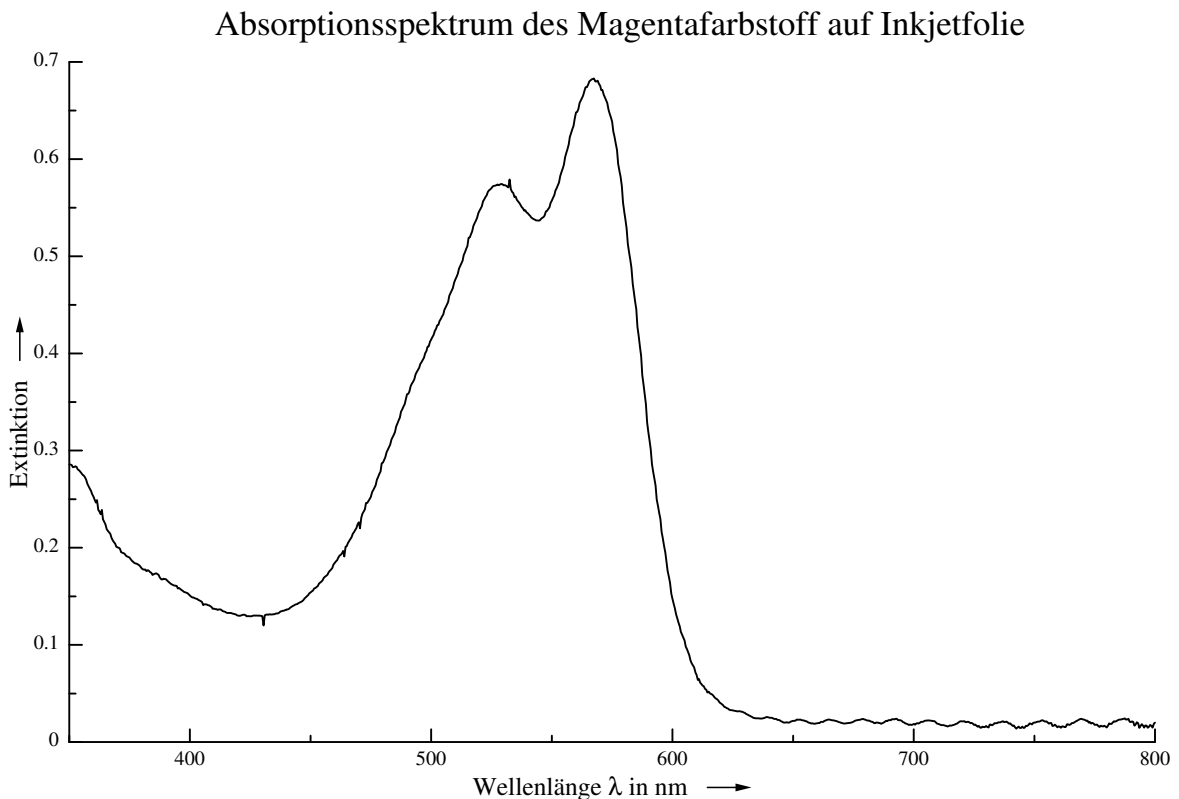


Abbildung 5.4.: Absorptionsspektrum eine mit Magenta bedruckten InkJet-Folie

Nun wurde ein dreidimensionales Bild der Probe aufgenommen. Dabei wurde die Probe mittels einer Relativbewegung zu dem gemeinsamen Anregungs- und Messlichtfokus Punkt für Punkt abgerastert. Als Messdaten wurden dabei für jeden Punkt die Signalleistung  $\frac{\Delta P}{P}$ , die transmittierte Messlichtleistung  $P_m$ , die relative Anregungsleistung  $P_a$  und die von der CCD-Kamera empfangene Restfluoreszenz detektiert und im ICS-Dateiformat abgespeichert. Dieser Datensatz wurde nun mit einem kommerziellen Programm ausgewertet und daraus wurden die hier präsentierten Bilder extrahiert.

Im Bild 5.5 ist eine Bildebene dargestellt. Dabei repräsentiert grün die Amplitude



## 5. Beschreibung der Messergebnisse

des Messsignals  $\frac{\Delta P}{P}$  und rot die transmittierte Lichtintensität. Die Größenordnungen für die Maximalintensitäten liegen bei  $35 \cdot 10^{-6}$  für das Signal  $\frac{\Delta P}{P}$  und bei ca.  $10 \text{ V}$  für die Messlichtintensität. Diese Spannung ergibt sich aus der Strom-Spannungswandlung des Stromverstärkers mit  $10^6 \text{ V/A}$  und repräsentiert den Photostrom des Detektors.

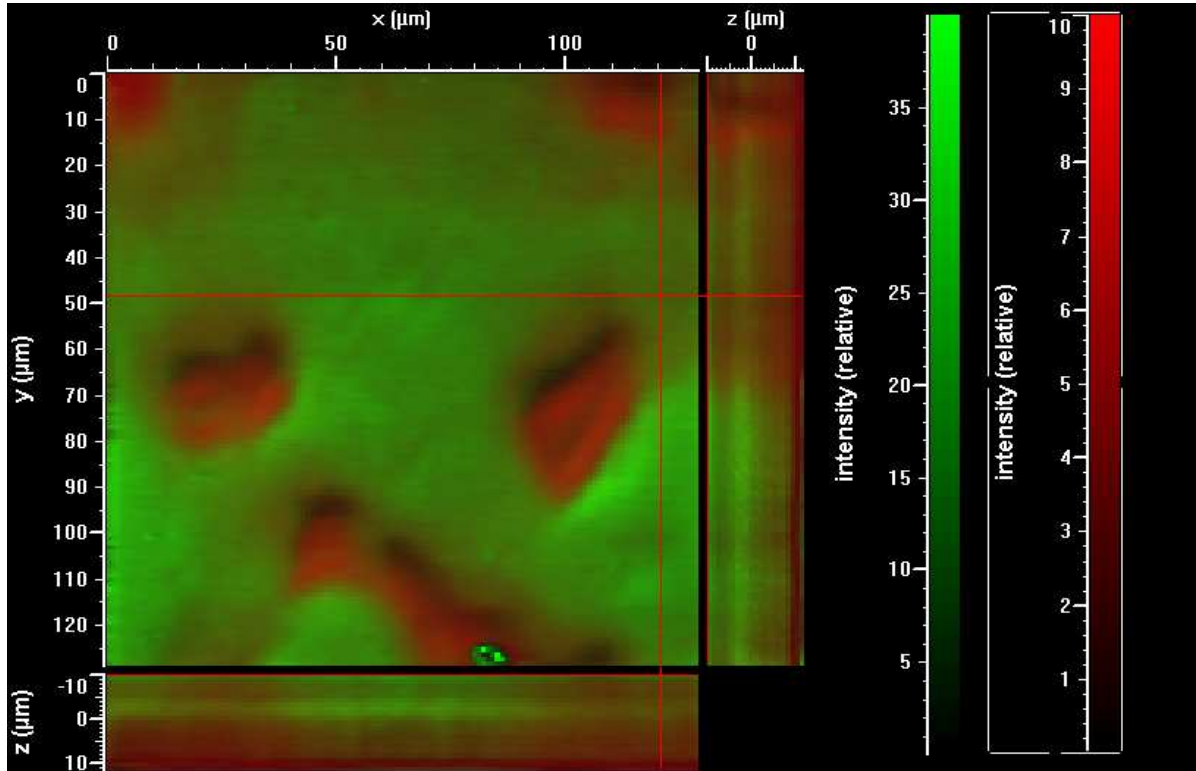


Abbildung 5.5.: Schnitt durch eine einzelne Bild-Ebene

In dem Bild sind nun deutlich Bereiche zu erkennen, an denen entweder die transmittierte Messlichtintensität erhöht ist oder das Signal der induzierten Transmission zunimmt. Im Durchlicht bzw. im normalen Mikroskopbild erkennt man, dass die Farbstoffschicht keine homogene Fläche bildet, sondern eher eine Schicht aus in sich zusammenfließenden Tropfen bildet. Weiterhin ist die verwendete Injekt-Folie einseitig mit einer Schicht von cellulose-artigen Fasern beschichtet. Diese Fasern sollen dafür sorgen, dass die Druckertinte beim Druck durch diese Fasern zügig aufgesogen und damit dauerhaft an die Folie gebunden wird. Daraus ergibt sich die einseitig rauhe Oberfläche der Druckfolie.

Um nun ein komplettes Volumenbild der Probe zu erhalten, werden einzelne Bilder für die jeweilige axiale Verschiebung aufgenommen. Der dabei resultierende Bilderstapel ist in Abb. 5.6 wiedergegeben.

## 5. Beschreibung der Messergebnisse

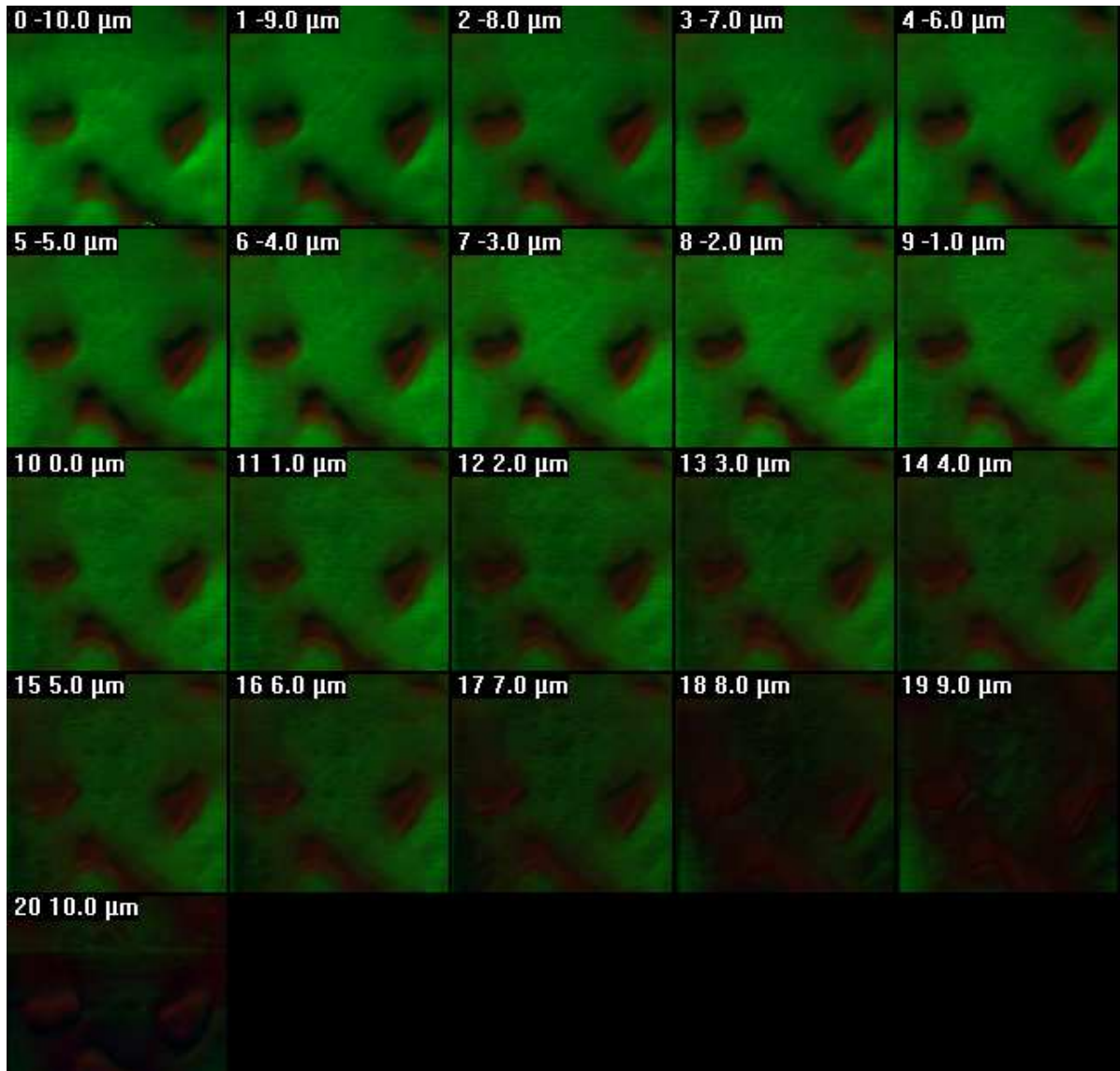


Abbildung 5.6.: Bilderstapel zur 3D-Bildgenerierung

Insgesamt ist dabei ein quaderförmiger Volumenkörper von  $128 * 128 * 20 \mu\text{m}^3$  mit einer Schrittweite von  $1 \mu\text{m}$  abgerastert worden. Aus diesem Bilderstapel lässt sich nun ein Volumenabbild der Probe rekonstruieren. Dazu wurde Software “Imaris” [42] verwendet. Zwei beispielhafte Ergebnisse sind in Abb. 5.7 wiedergegeben.

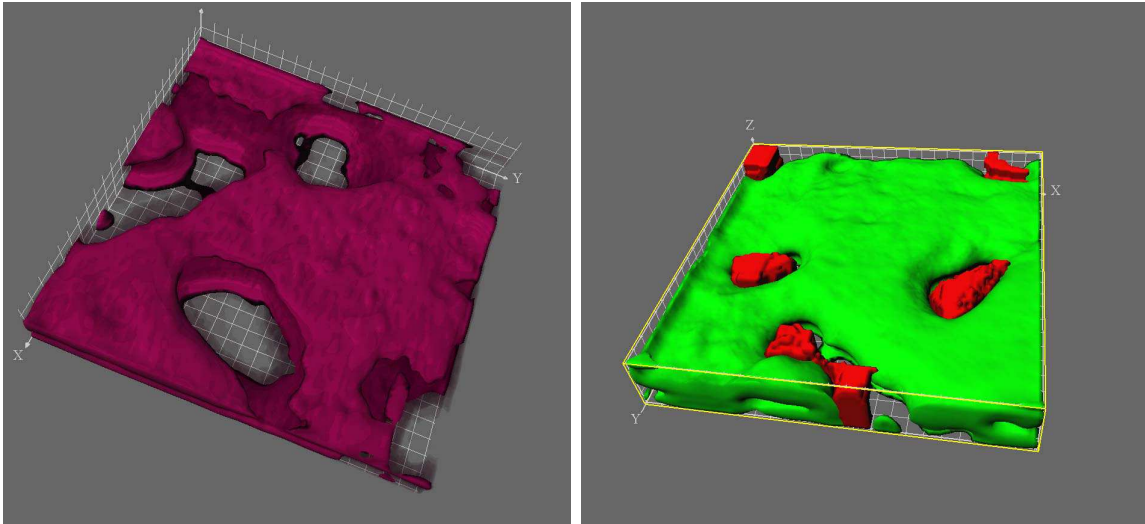


Abbildung 5.7.: Beispielhafte 3D-Bilder

In dem linken Bild wurden die Voxel-Daten<sup>1</sup> des grünen Farbkanals einem Entfaltungsalgorithmus unterzogen und das Ergebnis in einer perspektivischen Darstellung des Volumenkörpers wiedergeben. Als Kodierungsfarbe wurde hierbei Magenta verwendet. Man erkennt deutlich die räumlich inhomogene Farbstoffverteilung mit einer schichtweisen Struktur der zusammengefloßenen Farbstofftropfen, die durch deutliche Löcher unterbrochen wird. In dem rechten Bild ist ein Volumenmodell dargestellt, in dem aus einzelnen Isophoten des ersten und zweiten Farbkanals (hier grün und rot dargestellt) ein Ausgleichskörper des jeweiligen Farbkanals erstellt wurde. Wiederum ist im Vordergrund die gestapelte Verteilung der Farbstoffkonzentration deutlich zu erkennen.

Es lässt sich bis hierhin zusammenfassend sagen, dass es möglich ist, mit dem hier vorgestellten Verfahren der induzierten Transmissionsänderung mikroskopische Strukturen dreidimensional abzubilden.

## 5.4. Lebensdauer-Messungen

Eine weitere Vorhersage gilt es noch zu überprüfen. Im Folgenden soll nun die Bestimmung der Lebensdauer näher beschrieben werden.

In Kapitel 3 wurde das Prinzip der Phasenfluorimetrie eingehend beschrieben und auch die Transformation auf das hier vorgestellte Messverfahren. In Kapitel 4 wurde die zur Bestimmung der Lebensdauer notwendige Modifikation des Experimentes beschrieben. Das Messsignal bzw. die Signalamplitude von  $\frac{\Delta P}{P}$  wird nun mit einem Spektrum-Analyzer detektiert. Dabei wird die Detektionsfrequenz mit Hilfe eines Tracking-Generators auf den AOM gegeben, der nun dieser Frequenz folgt.

<sup>1</sup>Voxel: Analog dem Pixel im 2-dimensionalen Bild spricht man von einem Voxel (Volumen-Pixel oder Volumenelement) im 3-dimensionalen Bild.

## 5. Beschreibung der Messergebnisse

Die Frequenzabhängigkeit der Signalamplitude von einer mit Magenta bedruckten InkJetfolie ist im Bild 5.8 aufgezeichnet.

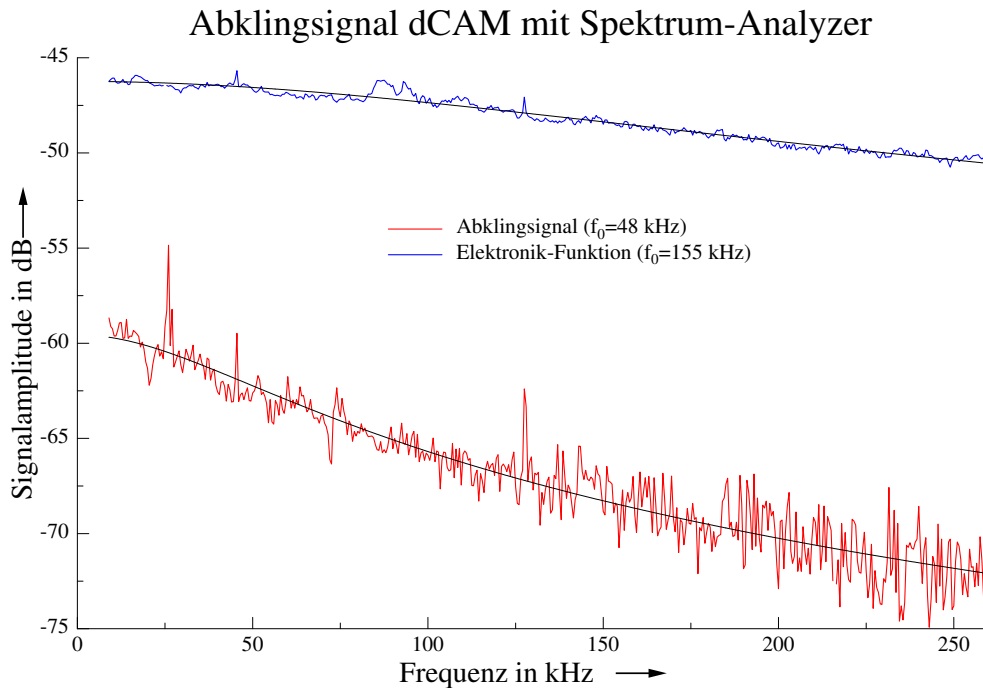


Abbildung 5.8.: Abklingverhalten in Abhängigkeit der Modulationsfrequenz

Die obere Kurve gibt die als Referenz mit aufgenommene Signalleistung wieder, die sich durch eine reine Rückreflexion des Anregungslichtes ergibt. Für diese Messung wird der schmalbandige Interferenzfilter für die Messwellenlänge aus dem Strahlengang entfernt, so dass Anregungslicht auf die Photodiode gelangen kann. Damit ist man in der Lage die Antwortfunktion bzw. die maximale Grenzfrequenz des gesamten Detektorsystemes zu bestimmen. Diese beinhaltet das Zeitverhalten in der Modulation des AOM, das Ansprechverhalten der Photodiode und den Frequenzgang des Stromverstärkers.

In der Signalverarbeitung wird dabei häufig das sog. 3dB-Kriterium herangezogen. Dabei bezeichnet man als die “3dB-Grenze” oder Grenzfrequenz die Frequenz [43], bei der die Amplitude eines gewünschten Systemes um 3 dB in der Intensität abgesunken ist. Diese Definition der 3dB-Marke als Grenzfrequenz ist in der Signal- und Kommunikationstechnik weit verbreitet. Sie sagt dabei aus, dass bei einem Abfall um 3 dB sich die Amplitude gerade halbiert hat und sich eine Phasenverschiebung um  $90^\circ$  im Signal ergeben hat. Dies hat für elektronische Bauteile weitreichende Bedeutung für ihre Verwendung.

Diese Größe wird hier so bestimmt, dass  $P_{\omega_a=\omega_G} = -3dB * P_{f=0}$  gilt. Dazu wird dann Amplitudenspektrum im gewünschten Frequenzbereich aufgezeichnet und diese experimentellen Daten an die Gleichung angefitet:

## 5. Beschreibung der Messergebnisse

$$\left(\frac{\Delta P}{P}\right)_f = -20 * P_{Amplitude} * \log\left(\sqrt{1 + (\omega_a \tau)^2}\right) + P_{Offset}$$

mit  $\left(\frac{\Delta P}{P}\right)_f$  = f-abhängige Signalintensität,  $P_{Amplitude}$  = angefitteter Amplitudenfaktor,  $\omega_a$  = Modulationsfrequenz,  $\tau$  = anzufittende Lebensdauer und  $P_{Offset}$  = anzufittender Hintergrundoffset des Messsignals

Da der Messbereich des Spektrum-Analyzers erst bei 9 kHz beginnt, wird die Messkurve auf 0 Hz extrapoliert und dort die Amplitude bestimmt.

Als Fitparameter ergibt sich daraus die Grenzfrequenz  $\omega_G$  die der reziproken Lebensdauer  $\frac{1}{\tau}$  entspricht. Für das hier vorgestellte Messsystem ergibt sich daraus eine Grenzfrequenz von 150 kHz.

Für das eigtl. Messsignal  $\frac{\Delta P}{P}$ , welches die Antwortfunktion der Farbstoffmoleküle auf die Anregungsmodulation des Anregungslasers beinhaltet, ergibt sich in analoger Messweise eine Grenzfrequenz von ca. 48 kHz. Diese Frequenz ergibt nach Gleichung 3.48 eine experimentell bestimmbare Lebensdauer  $\tau_{trans}$  von ca. 21  $\mu s$  für die angeregten Zustände, die die Transmissionänderung hervorrufen.

Diese experimentell bestimmte Lebensdauer steht im Einklang mit einer alternativen Messmethode. Das Prinzip dieser von E. Thiel entwickelten Messmethode ist in [44] beschrieben und in Abb. 5.9 dargestellt.

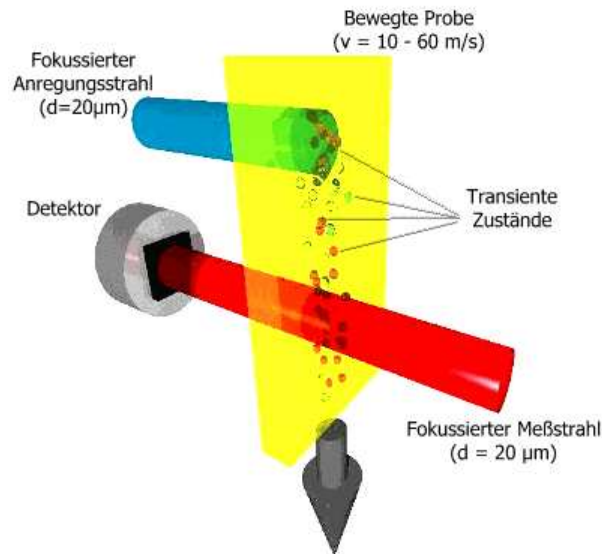


Abbildung 5.9.: Alternative Bestimmungsmethode der Lebensdauermessungen

Bei diesem Messaufbau wird die Probe in schnelle Bewegung versetzt und durch die Foki zweier Laser bewegt. Die Geschwindigkeit der Probe bewirkt, dass die Moleküle, die durch den Anregungslaser in langlebige Molekülzustände angehoben wurden, so weit

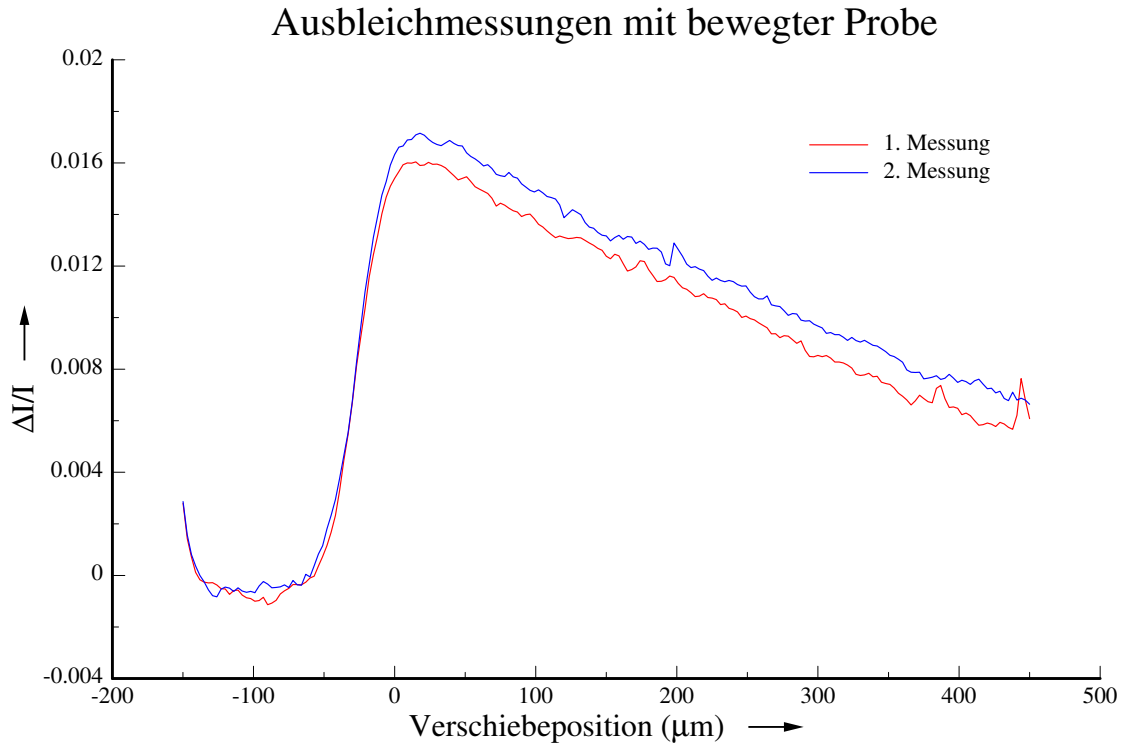


Abbildung 5.10.: Messsignale zur Lebensdauerbestimmung nach dem alternativen Verfahren

aus dem Fokusbereich herausgetragen werden, dass es möglich ist deren spektrale Eigenschaften und zeitliches Verhalten von dem kurzlebigen Molekülzuständen räumlich und damit zeitlich zu separieren und zu untersuchen. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, dass die Probe mit hoher Genauigkeit untersucht werden kann, da irreversible Ausbleicheffekte so ausgeschlossen bzw. minimiert werden können. Die Bewegung der Probe ist aber auch ein Nachteil, da ein relativ komplexer Messaufbau notwendig ist um die Probe in dem Messbereich zu führen.

Bei dem hier gezeigten Messprinzip wird der relative Abstand der beiden Laserfoki durch die Geschwindigkeit der Probe in einen zeitlichen Abstand zwischen Anregung und Detektion verwandelt. Trägt man die Signalamplitude  $\frac{\Delta P}{P}$  gegen den Relativ-Abstand der beiden Foki bei einer gegebenen Geschwindigkeit auf, so erhält man eine zeitliche Antwortfunktion der angeregten Molekülspezies auf den Anregungslaser. Beispielhafte Messungen sind in Abbildung 5.10 wiedergeben.

Aus diesen Messungen wurde ebenfalls eine langlebige Lebensdauer im angeregten Zuständen einer identisch bedruckten Inkjet-Folie von  $23 \mu\text{s}$  bestimmt. Dies ist, insbesondere wenn man bedenkt dass in den beiden Experimenten sehr unterschiedliche Mess- und Probenbedingungen vorherrschen, eine relativ gute Übereinstimmung der Ergebnisse aus den beiden unabhängigen Bestimmungsverfahren. Zusammenfassend kann hier für diese Messung angegeben werden, dass es mit dem neuen Verfahren möglich ist über

die punktuelle Änderung der Transmissionseigenschaften Lebensdauern von angeregten Molekülspezies zu bestimmen.

## 5.5. Abschätzung der erreichbaren Messempfindlichkeit

Im folgenden Abschnitt soll nun die experimentell erzielbare Messempfindlichkeit des Messverfahrens abgeschätzt werden. In Kapitel 3.6 wurde gezeigt, dass die erzielbare Messempfindlichkeit im Wesentlichen von den Rauscheigenschaften des zur Verfügung stehenden Messlaser abhängt.

Zur Abschätzung der erzielbaren Messauflösung wurden mehrere kommerziell erhältliche Lasersysteme getestet. Ziel dieses Testes war herauszufinden, ob es möglich ist, ein einzelnes Molekül in einem Absorptionsexperiment bei Raumtemperatur eindeutig zu detektieren und damit nachzuweisen.

Diese Messaufgabe ist bis heute den Experimentatoren versperrt geblieben. Der Einzelmolekülnachweis mittels der Absorption ist von L. Kador schon 1989 gezeigt worden [45]. Das von ihm benutzte Verfahren bzw. Nachweis erfordert jedoch zwingend extrem tiefe Temperaturen. Bei Raumtemperatur ist der direkte Nachweis eines einzelnen Moleküles in einem Absorptionsexperiment bisher noch nicht gelungen.

Die in dieser Richtung empfindlichsten Experimente sind derzeit die Diplomarbeit des Autors und die Arbeiten um Kitamori [46, 47].

Für eine Abschätzung, wie weit man technisch von diesem Nachweislimit entfernt ist wurde uns von verschiedenen Laserherstellern freundlicherweise Testlasersysteme zur Verfügung gestellt und mit im Labor verfügbaren Systemen verglichen.

Hier eine kurze Auflistung der verwendeten Lasersysteme:

Fa. Lightwave Electronics (Vertrieb in Deutschland über Fa. Soliton): 200 mW-System, grüner DPSS-Laser, Typ 142-532,  $\lambda = 532 \text{ nm}$

Fa. Coherent, 200 mW System blauergrüner DPSS-Laser, Typ Sapphire 488,  $\lambda = 488 \text{ nm}$

Fa. Coherent, 5 mW blaue Laserdiode, Typ Radius 405,  $\lambda = 405 \text{ nm}$

Fa. MellesGriot, 1,5 mW grüner HeNe-Laser, Typ 25 LGR 193-230,  $\lambda = 543,5 \text{ nm}$

Fa. Crystal GmbH, 3 mW blauer DPSS-Laser, Typ FDSS473-M,  $\lambda = 473 \text{ nm}$

Fa. Innolight, 100 mW grüner DPSS-Laser, Typ Prometheus,  $\lambda = 532 \text{ nm}$

In Abbildung 5.11 sind die erhaltenen Rauschspektren der verschiedenen Testlaser dargestellt. Die oberste rote Kurve stellt dabei das theoretische Auflösungsvermögen des Messsystems dar. Dieses Signal wird gebildet, in dem das Rauschsignal der Diode und des Stromverstärkers detektiert wird und dabei die Diode vor Licht geschützt wird. Der für diese Messungen verwendete Stromverstärker ist von dem Hersteller [40] für diese Messaufgabe so modifiziert worden, dass das Eigangrauschen des Verstärkers kleiner bzw. gleich der Größenordnung ist, wie man es für ein rein photonenlimitierten Messvorgang erwarten würde.

Was heißt das nun konkret? Die Verstärkerstufen wurden so optimiert, dass der Wert des jeweiligen Eingangrauschen so klein ist, dass das zusätzliche Schrotrauschen eines Signals mit der Maximalamplitude dieser Stufe gleich groß ist und damit dominant wird.

## 5. Beschreibung der Messergebnisse

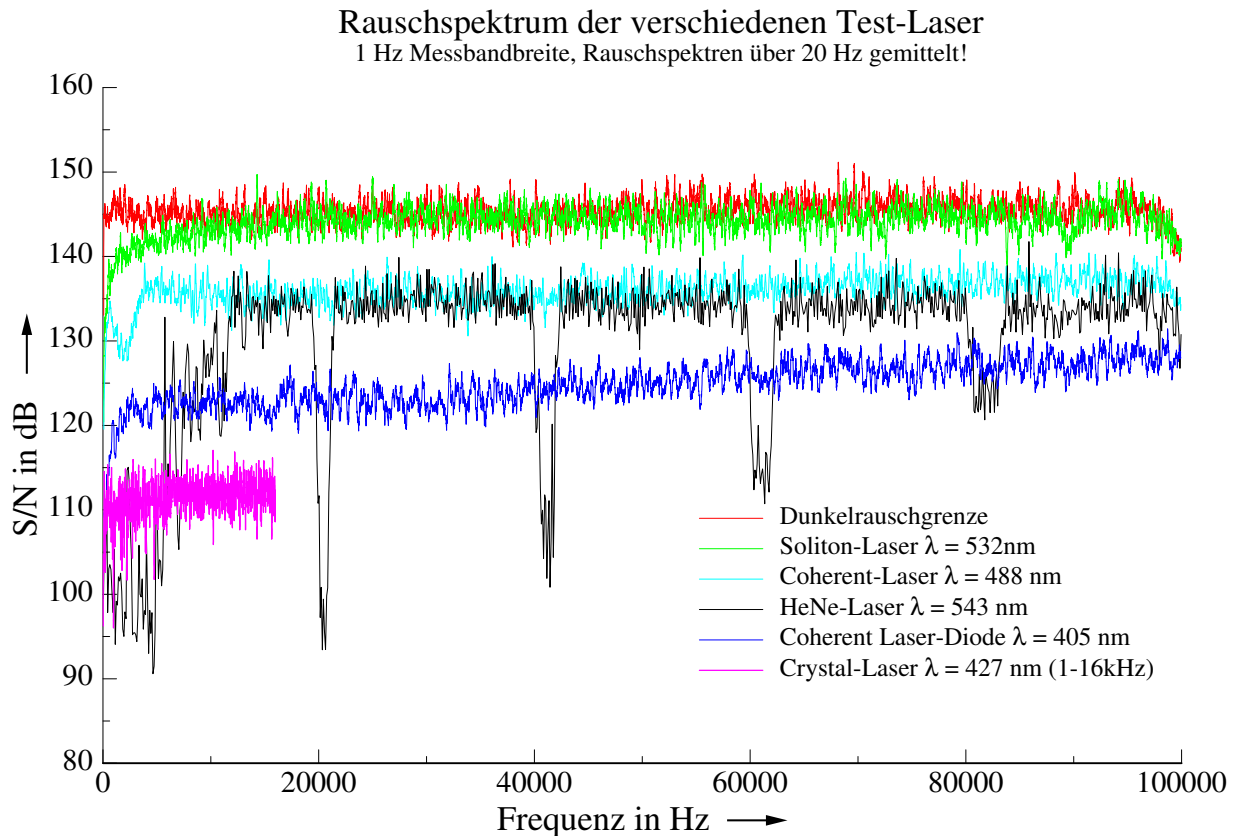


Abbildung 5.11.: Übersicht zum Vergleich des Rauschverhaltens verschiedener Testlaser

Diese Eingangsverstärkerrauschen ist der am Ende elektrisch dominante Rauschanteil neben dem unvermeidbaren Quantenrauschen des Messlichtes. Das Dunkelrauschen des Photodetektors und das Eingangsruschen der weiterhin verwendeten Messgeräte ist deutlich kleiner und verschwindet gegen diese beiden Rauschterme.

Bestimmt man nun die Rauschamplitude dieses Eingangsruschens und setzt dieses in das Verhältnis zur Maximalamplitude dieser Verstärkungsstufe, so erhält man eine theoretische Rauschuntergrenze des Messgerätes. Da bei einer Photonenlimitierten Messung noch das Schrotrauschen hinzukommt, was in etwa gleich groß sein sollte wie dieses Hintergrundrauschen, verschlechtert sich für diese Art von Messung die Auflösung um 3 dB (dies ist in der Abbildung der Messkurven mit berücksichtigt).

Wie man in Abbildung 5.11 erkennt, erreicht der Laser der Fa. Lightwave mit seinen Rauschdaten diese theoretische Grenze fast. Nur im Frequenzbereich unterhalb von 10 kHz weicht er etwas deutlicher ab. In diesem Bereich dominiert das technische Rauschen der Laserstrahlgenerierung noch etwas.

Als zweiten Testlaser, der dieses Limit fast erreicht, wurde das System der Fa. Innolight getestet. Der Vergleich dieser beiden Laser ist in Abbildung 5.12 dargestellt. Man erkennt deutlich, dass der InnoLigh-Laser im Mittel zwischen 5 und 6 dB schlechter abschneidet als das System von Lightwave Electronics. Trotzdem stellen diese beiden Laser derzeit



Vergleich des InnoLigth-Laser mit dem Soliton-Laser

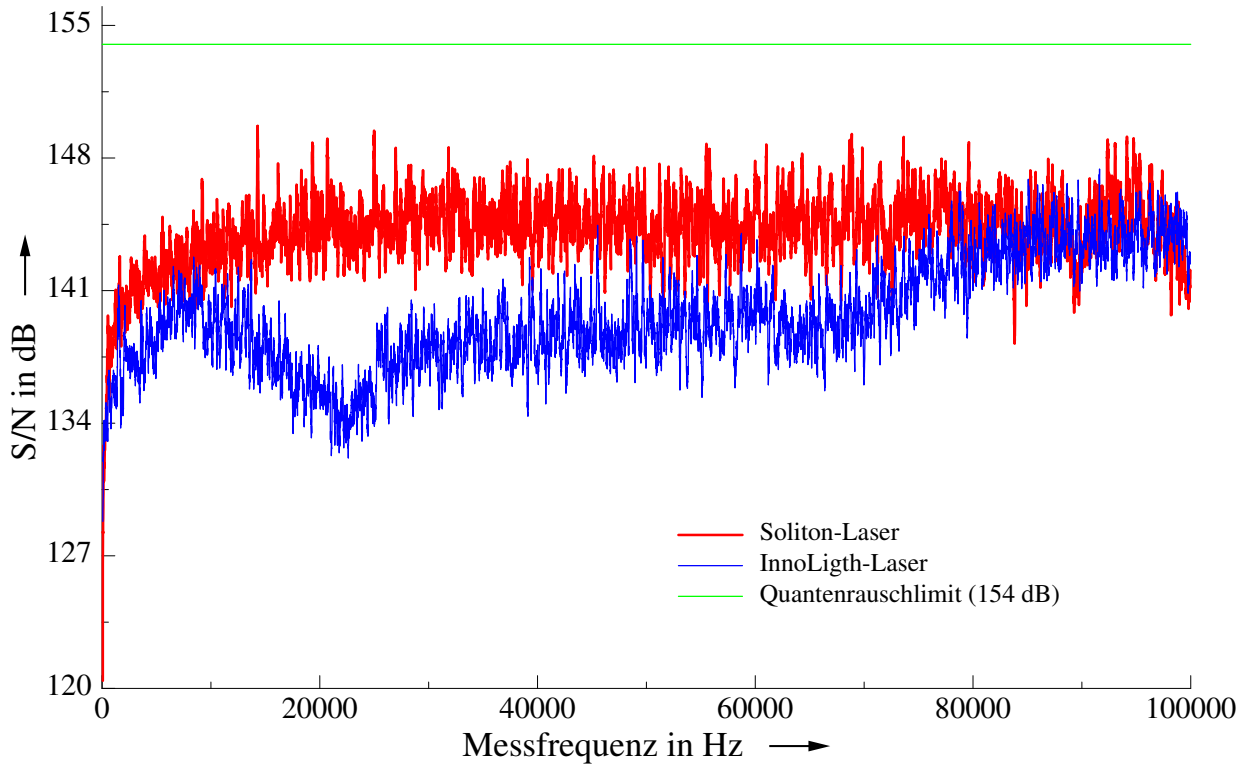


Abbildung 5.12.: Vergleich Rauscheigenschaften des InnoLigth- und des Soliton-Laser

das Optimum an kommerziell erhältlichen kontinuierlichen Lichtquellen dar, wenn es um einen großen Signal-zu-Rausch-Abstand geht.

Der hier maximal erzielbare Signal-zu-Rausch-Abstand von 144 dB bedeutet im Umkehrschluss eine Messauflösung von  $\left(\frac{\Delta P}{P}\right)_{limit} = 6 * 10^{-8}$ . Dies lässt sich bestimmt durch die Wellenlänge dieses Lasers, dem daraus resultierenden beugungslimitierten Strahldurchmesser und einer entsprechend ausgesuchten Mess-Sonde (in diesem Falle z.B. Rhodamin 6G-Moleküle) in eine untere theoretische Nachweisgrenze dieses Messverfahrens umrechnen.

Für diesen Fall ergibt sich analog dem Rechenbeispiel 3.62 eine Nachweisgrenze von ca. 6 Molekülen bei einer elektronischen Messbandbreite von  $\Delta f = 1 Hz$ . Dies ergibt für den Lock-In-Verstärker eine Zeitkonstante von 100 ms. Es ließe sich demzufolge rein theoretisch ein dreidimensionales Bild mit nahezu Einzelmolekülaufösung bei einer Voxelfrequenz von ca. 1 Hz aufnehmen.

Leider konnte dieses Experiment aufgrund des Preises dieses Lasers (ca. 100.000 Euro) nicht verwirklicht werden, trotzdem ist es sinnvoll, die Nachweisgrenze dieses Messverfahrens zu kennen.

Der in dieser Arbeit verwendete Helium-Neon-Laser bietet mit -120 dB eine Messauflösung von  $\left(\frac{\Delta P}{P}\right)_{limit} = 1 * 10^{-6}$  und damit bei einer Messbandbreite von  $\Delta f = 1 Hz$

ebenfalls aber schon einer Nachweisgrenze von ca. 100 Molekülen bei einem gut fokussierten Laserspot. Durch Reduzierung der Messbandbreite  $\Delta f$  ließe sich die Nachweisgrenze jedoch noch weiter absenken. Dies ist erfolgreich in [46] schon gezeigt worden und hätte in diesem Zusammenhang keine neuen Erkenntnisse gebracht.

## 5.6. Zusammenfassung der Messergebnisse

Die in diesem Kapitel vorgestellten experimentellen Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist einzig über eine Transmissionsmessung die dreidimensionale mikroskopische Struktur eine Probe aufzuklären und zu dem noch Hinweise auf die Dynamik der Probe im Milli- bis Mikrosekundenbereich zu erhalten.

Es wurden alle Vorhersagen aus der Theorie zur Messgewinnung einzeln überprüft und es zeigt sich, dass die theoretische Beschreibung die in Kapitel 3 hergeleitet wurde die Ergebnisse schlüssig zu interpretieren vermag.

Weiterhin ist abgeschätzt worden, welche Nachweisgrenze mit heutzutage erhältlichen Lasern erzielt werden könnte und man durch Einsatz dieser Laser mit der Nachweisgrenze bei Absorptionsmessungen bei Raumtemperatur bis in den Einzelmolekülbereich vorzudringen vermag.

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit ist ein neuartiges Messverfahren zur dreidimensionalen Strukturbestimmung mikroskopischer Objekte vorgestellt worden.

Dazu wurden zunächst die photochemischen Grundlagen, auf denen dieses Messverfahren beruht, näher erläutert und basierend auf diesen Erkenntnissen ein mathematisches Modell entwickelt, das wesentliche Eigenschaften dieser Mikroskopiemethode zu erklären vermag. Dieses Modell prognostiziert die Möglichkeit einer dreidimensionalen Strukturaufklärung anhand einer Transmissionsmessung und gibt einfache Beziehungen zur räumlichen Auflösung und zur erzielbaren Nachweisgrenze dieses Verfahrens.

Es sagt weiterhin voraus, dass noch weitere photophysikalische Eigenschaften des verwendeten Absorbers, wie die transiente Lebensdauer der Absorbersonden, bestimmt werden können.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde ein experimenteller Aufbau realisiert, mit dem die einzelnen Voraussagen des Modells verifiziert werden konnten. Zum Ende wurden dann die einzelnen Vorhersagen einzeln in entsprechenden Experimenten überprüft.

Es wurde experimentell gezeigt, dass eine axiale Auflösung mittels einer Transmissionsmessung realisierbar ist und damit eine dreidimensionale Abbildung einer komplexen Probe möglich ist. Neben der räumlichen Abbildung wurde ebenfalls gezeigt, dass ebenfalls die Dynamik transienter Absorptionsprozesse mit diesem Verfahren aufgeklärt werden können und es wurde weiterhin die erzielbare Nachweisempfindlichkeit abgeschätzt.

Es zeigte sich, dass das in dieser Arbeit vorgestellte Modell die experimentellen Ergebnisse schlüssig erklären zu vermag.

Zusammenfassend lässt sich nun sagen, dass es erstmalig möglich ist rein absorbierende Proben mit hoher räumlicher Auflösung und hoher Nachweisempfindlichkeit zu erfassen und dreidimensional abzubilden. Dabei ist die theoretisch erzielbare räumliche Auflösung nicht nur eine theoretische Grenze, sie lässt sich vielmehr auch praktisch relativ leicht über eine beugungslimitierte Fokussierung realisieren. Damit erschließt sich nun eine ganze Palette von Untersuchungsobjekten, die sich der dreidimensionalen Strukturaufklärung via der klassischen konfokalen Mikroskopie bisher erfolgreich entzogen haben.

Weiterhin wurde auch noch der Grundstein gelegt, der es ermöglicht orts aufgelöst die Lebensdauer der Absorbersonden zu spektroskopieren. Viele materialwissenschaftliche Fragestellungen, z.B. in der Membranforschung, könnten damit erfolgreich beantwortet werden.

Ebenfalls wurde gezeigt, dass der Nachweis einzelner Moleküle bei Raumtemperatur einzig anhand ihrer Absorption in erreichbare Nähe gerückt ist. Dies würde der Grundlagenforschung helfen viele noch ungeklärte Fragen zu beantworten, z.B. der Frage nach den "Dark States" bei der Einzelmoleküldetektion via der Laserinduzierten Fluoreszenz.

## 6. Zusammenfassung

Die Würdigung des auf wesentlichen Teilen dieser Arbeit basierenden Patentes mit dem Hochschülerfinderpreis im Jahre 2003 zeigt, dass das Potenzial dieses Messverfahrens über den reinen Bereich der Grundlagenforschung hinaus geht.

# A. Anhang

## A.1. Geräteliste

1. Master-Lock-In-Verstärker: Fa. Stanford Research Systems, SR830
2. Slave-Lock-In-Verstärker: Fa. Stanford Research Systems, SR850
3. Stromverstärker: Fa. Femto, Variable-Gain Low-Noise Current Amplifier DLPCA-100, modifiziert auf Rauschdaten des Nachfolge-System Variable-Gain Low-Noise Current Amplifier DLPCA-200
4. Photodetektor: Fa. Hamamatsu, S2386-18K
5. Mikroskopobjektive: Fa. Linos, jeweils ein 10-fach-Objektiv, NA=0,3
6. Strahlaufweitungssysteme: Fa. Linos, modifiziertes 25-faches Strahlaufweitungssystem mit Raumfilter (20  $\mu\text{m}$ -Pinhole), die Austrittslinse wurde jeweils durch eine achromatische Linse ( $f=50$  mm, freier Durchgang 12 mm) der Fa. Linos ersetzt.
7. Fokussierlinse zur Detektion: Fa. Linos, achromatische Linse,  $f=160$  mm, freier Durchgang 30 mm.
8. Positioniertisch für die Probenhalterung: Fa. Märzhäuser, HS 6 / 3 mit Steuerung MCL 3.
9. Positioniertisch für das Messlichtobjektiv: Fa. Newport, 562 Series ULTRAlign Precision Fiber Optic Positioning System für 3-Raumachsen
10. Messlaser: Fa. MellesGriot, grüner HeNe-Laser ( $\lambda = 543,5$  nm), 1,5 mW Ausgangsleistung
11. Anregungslaser: Fa. HB-Laser, grünes DPSS-A-Lasermodul ( $\lambda = 532$  nm), 40 mW Ausgangsleistung
12. Interferenzfilter: Fa. OmegaOptical, passend für beide Lasertypen, FWHM der Transmission 0,5 nm
13. Modulationsquelle: Fa. HB-Laser, OEM-Modul inkl. Treiberelektronik, Typ AOM Acustooptik-Modulator, einkanalig, bis 20 MHz modulierbar.
14. Video-Kamera: Fa. Lechner CCTV, Typ Minitron MTV-62V1-EX
15. Video-Objektiv: Fa. Rodenstock, Macro-Objektiv, 1:1 Abbildung

## **A.2. Lebenslauf**

### **Personalien**

Name: Rainer Bornemann

Geburtsdatum: 13. Juli 1971

Geburtsort: Schmallenberg

Eltern: Franz und Elisabeth Bornemann

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: Deutsch

### **Schulbildung**

Aug. 1978 - Juni 1982: Kath. Grundschule Schmallenberg

Aug. 1982 - Juni 1988: Realschule der Stadt Schmallenberg in Fredeburg

Aug. 1988 - Juni 1991: Priv. Gymnasium Maria Königin in Lennestadt-Altenhundem

### **Wehrdienst**

Juli 1991 - Juni 1992: Grundwehrdienst

### **Studium**

Okt. 1992 - Nov. 1998: Chemiestudium an der Universität Siegen

Abgabe der Diplomarbeit: 8. Nov. 1998

Thema der Diplomarbeit: Detektion einzelner Moleküle anhand ihrer Absorption

### **Beruf**

Aug. 1995 - Dez. 1998: Studentische Hilfskraft, Fachbereich Chemie, Universität Siegen

Jan. 1999 - Dez. 2002: Wissenschaftlicher Mitarbeiter Fachbereich Chemie, Universität Siegen

seit Mai 2003: Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Lichttechnisches Institut der Universität Karlsruhe

### A.3. Veröffentlichungen

1. R. Menzel, R. Bornemann, E. Thiel, Influence of Chemical Substitution and Electronic Effects on the Triplet State Kinetics of Xanthene Dyes , Phys. Chem. Chem. Phys. 1 (1999) 2435
2. R. Bornemann, E. Thiel, "Single molecule level absorption spectroscopy in solution", in: J. Greve, G.J. Puppels and C. Otto (ed.), Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions (1999) 683
3. B. Walk-Laufer, R. Bornemann, D. Knöfel, E. Thiel, "In Situ Observation of Hydrating Cement-Clinker-Phases by Means of Confocal Scanning Microscopy - First Results", 24th International Congress on Cement Microscopy, 2002 in San Diego (USA), 95-106, ICMA
4. Rainer Bornemann, Erwin Thiel, "dCAM - Dreidimensionale konfokale Laser-Absorptionsmikroskopie zur räumlichen Strukturaufklärung", Photonik 01/05, 44 (2005)

### Patente

1. R. Bornemann, I. Gregor, E. Thiel, "Konfokale 3D-Scanning Absorption", Deutsches Patent Nr. DE10231543 bzw. PCT-Anmeldung Nr. WO2004008217.
2. R. Bornemann, R. Sens, E. Thiel, "Verfahren zur Detektion der durch einen Umwelteinfluss hervorgerufenen Eigenschaftsänderung einer Probe", Deutsche Patent-Anmeldung Nr. DE10337877 bzw. PCT-Anmeldung Nr. WO2005019808.

### A.4. Tagungsbeiträge

1. "Absorptionsspektroskopie auf Einzelmolekülebene", Bunsentagung Dortmund (1999)
2. "Single Molecule Level Absorption Spectroscopy in Solution", New Trends in Physics, Chemistry and Biology with Single Molecules, Symposium der VW-Stiftung, Wiesbaden (1999)
3. "Absorption Spectroscopy at Single Molecule Level", 6th international conference on methods and applications of fluorescence, Paris, Frankreich (1999)
4. "Nachweis von Triplett-Triplett-Absorptionen auf Einzelmolekülebene", Bunsentagung Würzburg (2000)
5. "Sind Absorptionsmessungen an einzelnen Molekülen unterhalb des Beugungslimits klassischer Optik möglich?", Bunsentagung, Stuttgart, 2001

## A. Anhang

6. "Absorption measurements at single molecule level behind the diffraction limit", 7th Conference on Methods and Applications of Fluorescence Spectroscopy, Imaging and Probes, Amsterdam (2001)
7. "Absorption measurements at single molecule level behind the diffraction limit", LANMAT, Venedig (2001)
8. "Absorption measurements at single molecule level behind the diffraction limit", Optics 2001, St. Petersburg (2001)
9. "dCAM: direct Confocal Absorption Microscopy", 4th International Symposium on Physics, Chemistry & Biology with Single Molecules, Symposium der VW-Stiftung, Kloster Banz (2004)
10. "dCAM: direct Confocal Absorption Microscopy", Nanofair 2004, Karlsruhe (2004)

## Preise

Sonderpreis "Technologiesprung" des Hochschulerfinderwettbewerbes "Patente Erfinder" des Landes NRW 2004



# Literaturverzeichnis

- [1] Ernst Abbe, "Verbesserungen des Mikroskops mit Hilfe neuer Arten optischen Glases", Jena (1886).
- [2] M. Hoppert, "Microscopy Techniques in Biotechnology", Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2003).
- [3] Gemeinsame Internetseite der Hersteller von Fluoreszenzmikroskopen, <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/filtercubes/filterindex.html>
- [4] James G. McNally et al., "Three-Dimensional Imaging by Deconvolution Microscopy", *Methods* **19**, 373-385 (1999).
- [5] A. Chomik et al., "Quantification in optical sectioning microscopy: a comparison of some deconvolution algorithms in view of 3D image segmentation", *J. Opt.* **28**, 225-233 (1997).
- [6] R. Bornemann, I. Gregor, E. Thiel, "Konfokale 3D-Scanning Absorption", Deutsches Patent Nr. DE10231543 bzw. PCT-Anmeldung Nr. WO2004008217 (2003).
- [7] M. Minsky, "Microscopy Apparatus", U.S. Patent No. 3,013,467 (1957).
- [8] P. W. Atkins, "Physikalische Chemie", VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1990).
- [9] R. Zondervan, F. Kulzer, M.A. Kol'chenko, M. Orrit "Photobleaching of Rhodamine 6G in Poly(vinyl alcohol) at the Ensemble and Single-Molecule Levels" *J. Phys. Chem. A* **108**, 1657-1665 (2004).
- [10] E. Horstkotte, T. Schröder, J. Niewöhner, E. Thiel, D. G. Jay and S. W. Henning, "Toward Understanding the Mechanism of Chromophore-assisted Laser Inactivation-Evidence for the Primary Photochemical Steps", *Photochemistry and Photobiology*, Vol. **81**, No. 2, 358-366 (2004).
- [11] L. Kador, T. Schittkowski, M. Bauer und Y. Fan, "Three-Dimensional Materials Analysis by Confocal Raman Microspectroscopy", *Appl. Opt.* **40**, 4965 (2001).
- [12] J. B. Pawley (ed.), "Handbook of biological confocal microscopy", Plenum Press, New York (1995).

## LITERATURVERZEICHNIS

- [13] George H. Patterson and David W. Piston, "Photobleaching in Two-Photon Excitation Microscopy", *Biophys J.*, Vol. 78, No. 4, p. 2159-2162, (2000).
- [14] E. Thiel, "Laser Dyes", *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* 6th ed. (2001) .
- [15] A. Jablonski, *Z. Physik*, **94** (1935) 38.
- [16] H.G.O. Becker, "Einführung in die Photochemie", *Deutscher Verlag der Wissenschaften*, Berlin (1991).
- [17] M. Klessinger, J. Michel, "Lichtabsorption und Photochemie organischer Verbindungen", *VCH*, Weinheim (1989).
- [18] Werner Schmidt, "Optische Spektroskopie", *VCH*, Weinheim (1994).
- [19] H. Paul, "Photonen", *B.G. Teubner-Verlag*, Stuttgart (1995).
- [20] J. Franck and H. Hertz, *Verhand. Deut. Physik Ges.*, **16**, 512, (1914).
- [21] U. Brackman, "Lambdachrome Laser Dyes", *Lambda Physik GmbH* (1986).
- [22] S. J. Strickler, R. A. Berg, *J. Chem. Phys.*, **37** (1962), 814.
- [23] EpsilonSE O. G. Peterson, "Methods of Experimental Physics", *Academic Press*, New York (1979).
- [24] R. Menzel, R. Bornemann, E. Thiel "Influence of Chemical Substitution and Electronic Effects on the Triplet State Kinetics of Xanthene Dyes", *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1** 2435 (1999).
- [25] F. Stracke, Ma. Heupel and E. Thiel, "Singlet Molecular Oxygen Photosensitized by Rhodamine Dyes: Correlation with Photophysical Properties of the Sensitisers", *Photochem. Photobiol. A* 126 (1999) 51.
- [26] Stefan Hell, *Dissertation*, Heidelberg (1990).
- [27] W. Demtröder, "Laser Spectroscopy", *Springer Verlag*, Berlin (1996).
- [28] E. Thiel, "Eigenschaften angeregter Rhodaminfarbstoffe und deren Wirkung im Farbstofflaser", *Habilitationschrift*, *Shaker Verlag Aachen* (1996).
- [29] Name von Baron Rayleigh, [http://de.wikipedia.org/wiki/John\\_William\\_Strutt%2C\\_3.\\_Baron\\_Rayleigh](http://de.wikipedia.org/wiki/John_William_Strutt%2C_3._Baron_Rayleigh)
- [30] Max Born & Emil Wolf, "Principle of Optics", *Pergamon Press* (1986).
- [31] G. N. Watson, "A Treatise on the Theory of Bessel Functions", *Cambridge University Press* (1922).

## LITERATURVERZEICHNIS

- [32] Eugene Hecht, "Optik", Addison-Wesley, München (1989)
- [33] Joseph R. Lakowicz, "Principles of Fluorescence Spectroscopy", Second Edition, New York (1999)
- [34] M. Pientka et al., "Photoinduced charge transfer in composites of conjugated polymers and semiconductor nanocrystals", *Nanotechnology* **15**, 163-170 (2004).
- [35] A. Siegman, "Lasers", University Science Books, Mill Valley (1986).
- [36] Dean et. al., "Proposed Standard for Image Cytometry Data Files", *Cytometric* **11** (1990), 561-569.
- [37] Dereniak, "Optical Radiation Detectors", John Wiley & Sons, New York (1984)
- [38] A. Yariv, "Optical Electronics in Modern Communications", 5th Edition, Oxford University Press, New York (1997)
- [39] Datenblatt, Si-Photodiode S2386-18K, Fa. HAMAMATSU PHOTONICS DEUTSCHLAND GmbH.
- [40] Datenblatt, Variable-Gain Low-Noise Current Amplifier DLPCA-200, Fa. FEMTO Messtechnik GmbH.
- [41] Sato et al., "Spin coating process ", US-Patent Nr. 4,113,492.
- [42] Software Produkt "Imaris", Fa. Bitplane AG, Zürich
- [43] J. R. Ohm, H. D. Lüke, "Signalübertragung", Springer Verlag (1999).
- [44] Ma. Heupel, I. Gregor, St. Becker and E. Thiel, "Photophysical and Photochemical Properties of Electronically Excited Fluorescent Dyes: A New Type of Time-resolved Laser-scanning Spectroscopy", *Int. J. Photoenergy*. **1**, 165 (1999).
- [45] W. E. Moerner und L. Kador, "Optical Detection and Spectroscopy of Single Molecules in a Solid", *Phys. Rev. Lett.* **62**, 2535 (1989).
- [46] R. Bornemann, "Detektion einzelner Moleküle anhand ihrer Absorption", Diplomarbeit, Universität Siegen (1998).
- [47] M. Tokeshi, M. Uchida, K. Uchiyama, T. Sawada and T. Kitamori "Single and Countable Molecule Detection of Non-Fluorescent Molecules in Liquid Phase", *J. Luminescence*, 83-84, 261-264 (1999).