

Messungen durch Fluoreszenz

Pascal Aeschi, Sebastian Lang, Xeno Meienberg

Experimental Methods for Engineers
ETH Zürich, D-MAVT, Gruppe 14 - 25.10.2018

Abstract

Dieser Bericht beleuchtet das Messen von Fluoreszenz in Druckabhängigkeit, welche oft in den Naturwissenschaften für die Forschung Verwendung findet. Sowohl um biologische Abläufe zu untersuchen, sowie um in den Ingenieurwissenschaften Aufschlüsse über Druckgradienten zu erhalten. Im Rahmen der Vorlesung ist das Ziel dieser Versuchsreihe, ein besseres Verständnis für Fluoreszenz und deren Anwendungen zu erhalten. Wir haben mit Hilfe eines Lasers ein organisches Material zur Fluoreszenz gebracht und diese mit einer Kamera gemessen. Dies liefert Aufschlüsse über die Druckabhängigkeit der Lebenszeit des spezifischen Fluoreszenzprozesses. In unserem Fall konnte man eine beinahe lineare Korrelation zwischen Druckanstieg, Intensität und Lebenszeit beobachten.

1. Einführung

In der experimentellen Fluidodynamik werden Fluoreszenzphänomene zur Messung verschiedenster Parameter verwendet. Die speziellen Eigenschaften der Fluoreszenz machen es beispielsweise möglich Strömungsgeschwindigkeiten, Temperaturen, Konzentrationen sowie Drücke optisch sichtbar zu machen. In diesem Experiment werden wir durch drei verschiedene Methoden die Druckabhängigkeit fluoreszierender Farbe zeigen.

Prinzip

Wir betrachten ein Modell von Energiezuständen: einem Grundzustand und einem angeregten Zustand mit ihren jeweiligen Populationsdichten N_0 , N_1 . Anregung durch Absorption von Photonen führt zu Erhöhung des Energieniveaus. Angeregte Zustände können sich entspannen über Fluoreszenz, Quenching oder andere nicht-fluoreszierende Übergänge.

$$\frac{d}{dt}N_0(t) = -\alpha(t)k_A N_0(t) + k_{nF}N_1(t) + k_Q N_1(t) \quad (1)$$

$$\frac{d}{dt}N_1(t) = \alpha(t)k_A N_0(t) - k_F N_1(t) - k_{nF}N_1(t) - k_Q N_1(t) \quad (2)$$

$$N_0(t) + N_1(t) = N_0^0 = \text{const.} \quad (3)$$

$$N_0(t_0 < 0) = N_0^0 \quad (4)$$

Diese Übergänge werden modelliert mittels Raten-gleichungen, welche die Veränderungen der jeweiligen Populationsdichte beschreiben. Die Geschwindigkeitskonstanten k_A , k_F , k_{nF} und k_Q modellieren die Raten mit welchen Absorption, Fluoreszenz, nicht-fluoreszente Entspannungen und Quenching auftreten. Das Fluoreszenzsignal ist linear von der Rate k_F abhängig. Allgemein kann man sagen, dass je mehr Übergänge über Fluoreszenz stattfinden, desto weniger Quenching tritt auf und umgekehrt. Als Quenching bezeichnet man die Energieübertragung auf andere Moleküle, besonders Sauerstoff ist ein sehr effizienter Quencher.

Das bei unserem Versuch observierte Fluoreszenzsignal wird gemäss unserem Modell mit der Gleichung

$$F(t) = k_F \cdot N_1(t) \quad (5)$$

beschrieben. In unserem Modell nehmen wir an, dass das Anschalten der Lichtquelle einer Heavyside-Funktion entspricht. Wenn das System diesem Reiz ausgesetzt wird, ergibt dies folgende Lösung für das Differentialgleichungssystem:

$$N_1(t > 0) = N_0^0 k_A \tau \left[1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right], \quad \tau = \frac{1}{k_A + k_F + k_{nF} + k_Q} \quad (6)$$

wobei zu erkennen ist, dass sich diese Lösung einem stationären Zustand annähert. Jene Lösung hängt

näherungsweise nur von den Geschwindigkeitskonstanten ab.

$$N_1(t \gg \tau) = N_0^0 \frac{k_A}{k_A + k_F + k_{nF} + k_Q} \quad (7)$$

Eine weitere Möglichkeit, um unser System anzuregen wäre eine Impulsanregung. Diese Reaktion wird herbeigeführt, in dem die Lichtquelle sehr schnell an- und wieder abgeschaltet wird. Im mathematischen Modell wird dieser Puls als eine sehr enge gauss-förmige Verteilung beschrieben. Es ergibt sich bei dieser Anregung bei gegebenem Differentialgleichungssystem ein exponentieller Zerfall der Emission gemäss

$$N_1(t > 0) = N_0^0 k_A \tau \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (8)$$

Wiederum verhält sich der Zerfall so, dass dieser praktisch nur von den Geschwindigkeitskonstanten abhängt. Für manche Experimente ergeben sich die Umstände so, dass für die optische Messapparatur nur wenig Energie aufwendet werden kann. Anstatt mit starken, kurzen Signalen zu arbeiten greift man hier auf periodische, jedoch schwächere Anregungen zurück. Unter der Ausnutzung der Eigenschaften von harmonischen Schwingungen lassen sich die Gleichungen gemäss

$$N_1(t \gg \tau) = N_0^0 k_a \tau \left[1 + \frac{1}{\sqrt{1 + \omega^2 \tau^2}} \sin(\omega t - \varphi) \right] \quad (9)$$

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nF} + k_Q}, \quad \varphi = \arctan(\omega \tau)$$

aus der Theorie herleiten. Unter der Ausnutzung der Periodizität kann man so ökonomisch Messungen erreichen. Hier folgt aus der Theorie einer solchen Anregung eine phasenverschobene Messung mit gleicher Periode bei kleinerer Amplitude.

In Gleichung 5 wurde gezeigt, dass das Fluoreszenzsignal proportional zur Anzahl angeregter Zuständen ist. Ebenso wurde in Gleichung 7 gezeigt, dass sich das Fluoreszenzsignal bei einer konstanten Anregung einem stationären Zustand annähert. Unter Annahme einer kleinen Anregung lässt sich die sogenannte "Quantenausbeute" Φ definieren. Das Verhältnis der Quantenausbeute zweier Zustände, bei denen im einen Fall kein Quenching vorliegt und im anderen Fall schon, verhält sich linear zur Quenchingrate. Diese Beziehung wird auch die "Stern-Vollmer" Beziehung genannt. Es sei ferner bekannt, dass der Partialdruck eines Gases linear mit der Anzahl von Molekülen in Gasphase zunimmt. Ebenso sei bekannt,

dass der Partialdruck proportional zum Gesamtdruck ist. Es folgt

$$k_Q \propto Q \propto p_{O_2} \propto p \quad (10)$$

Mit geschickter Algebra kann so eine Gleichung für eine Untersuchung der Ausbeute im Vergleich zu einem Referenzwert hergeleitet werden. Aus denselben Prinzipien können die gleichen linearen Verhältnisse für die Intensitäten gefolgert werden.

$$\frac{\Phi(Q = Q_{ref})}{\Phi(Q)} \approx 1 + \beta(p - p_{ref}) = \frac{I(p_{ref})}{I(p)} \quad (11)$$

Diese Beziehung lässt sich ebenfalls ausweiten, da die Quantenausbeute direkt mit der Zerfallszeit gekoppelt ist.

$$\frac{\tau(Q = 0)}{\tau(Q)} = 1 + \beta' p \quad (12)$$

2. Versuchsaufbau

Tabelle 1: Verwendete Apparatur und deren Spezifikationen

Drucksensor	Sensortechnics HCX001D6V 0-1000 mba
Datenerfassungsmodul	National Instruments USB-6009
Kamera	pco.1600, PCO GmbH
Objektiv	Nikon AF-S Micro- NIKKOR
LED-Leuchte	Lightspeed Technologies HPLS-36, 447nm
Verzögerungserzeuger	Berkeley Nucleonic BNC-575

Das Herzstück des Versuchsaufbaus ist die Druckkammer. In ihr befindet sich die fluoreszierende Zielschicht. Mittels einer Pumpe können wir die Luft in der Kammer evakuieren und so den Druck und damit die Quenchingkonzentration des Sauerstoffs senken. Den Druck messen wir mittels eines elektronischen Drucksensors, wessen analoges Signal an einem Datenerfassungsmodul diskretisiert und dann an den Computer weitergeleitet wird.

Die Intensität der Fluoreszenz nehmen wir über Bilder mit einer Kamera auf. Dank CCD-Technologie können zwei aufeinanderfolgende Bilder mit halber Auflösung innerhalb äusserst kurzer Zeit aufgenommen werden. An

der Kamera befindet sich ein Objektiv worauf sich ein Filter befindet, welcher nur die Wellenlänge des von der Probe emittierten Lichts zulässt. Damit kann der Einfluss der LED-Lichtquelle ausgeblendet werden.

Die fluoreszierende Farbe wird angeregt mit kurzen Pulsen von 150ns Pulsweite blauen Lichts, welche einer starken LED-Leuchte entspringen.

Es ist äusserst wichtig, dass die Signale zu den richtigen Zeitpunkten ankommen. Deshalb werden die Signale über einen digitalen Verzögerungserzeuger geleitet. Hauptsächlich sorgt er dafür, dass die Lichtpulse gesendet werden währenddem die Kamera im Busy Mode ist und erst nach dem Lichtpuls belichtet. In Abb. 1 ist nochmals der Versuchsaufbau grafisch dargestellt.

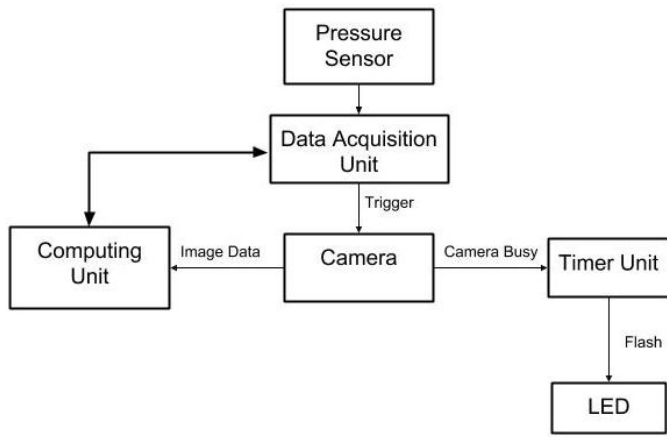


Abbildung 1: Darstellung des Signalflusses zwischen den für die Messversuche verwendeten Apparate

Insgesamt wird in dieser Versuchsreihe unter verschiedenen Druckverhältnissen jeweils mittels dreier Methoden die Stern-Vollmer Beziehung experimentell verifiziert. Um ein repräsentatives Ergebnis zu erreichen, werden mehrere, graduell steigende Druckmessungen im Bereich zwischen 0.2 bis 1 bar angestrebt.

Methodik

Die erste Methode bezieht sich auf das Verhältnis zwischen zwei gemessenen Intensitäten. Hierzu werden drei Bildausschnitte benötigt. Einerseits wird ein Ausschnitt als "Dunkelreferenz" definiert. Dieser beschreibt in unserem Modell den Fall, bei dem keine Fluoreszenz auftritt. Des weiteren werden zwei weitere Bilder benötigt, welche bei einem beliebigen Druck sowie einem Referenzdruck aufgenommen werden. Daraus folgt

$$\rho(p) = \frac{I(p) - I_{dark}}{I(p_{ref}) - I_{dark}} \quad (13)$$

Die zweite Methode, um das Fluoreszenzverhalten zu untersuchen ist die Messung der Lifetime, sprich der Zerfallszeit. Hierbei werden zwei Bilder direkt aufeinanderfolgend aufgenommen. Diese Methode hat den Vorteil, dass kein Referenzbild benötigt wird. Anhand des zeitlich festgelegten Abstandes zwischen zwei Aufnahmen und der Belichtungszeit lässt sich

$$\rho(p) = \frac{I_1 - I_1^{dark}}{I_2 - I_2^{dark}} \quad (14)$$

herleiten und unter Annahme eines exponentiellen Zerfalls die Lifetime berechnen.

Bei der dritten und letzte Methode wird die Zerfallszeit berechnet, ohne dass eine Dunkelreferenz extrahiert werden muss. Hier wendet man die in Gleichung 9 hergeleiteten Prinzipien an. Man nimmt nun vier zeitlich gleichverschobene Intensitäten aus den Bildern auf. Es folgt daraus

$$\tau = \frac{1}{\omega} \tan \left[\arctan \left(\frac{I_2 - I_4}{I_1 - I_3} \right) \right] \quad (15)$$

3. Messungen

Abb. 2 zeigt die Drücke pro jeweilige Messreihe. Hier sieht man sehr gut wie die Messpunkte in einem gleichmässigen Abstand voneinander entfernt sind und im Spektrum von 0.2-1 bar liegen.

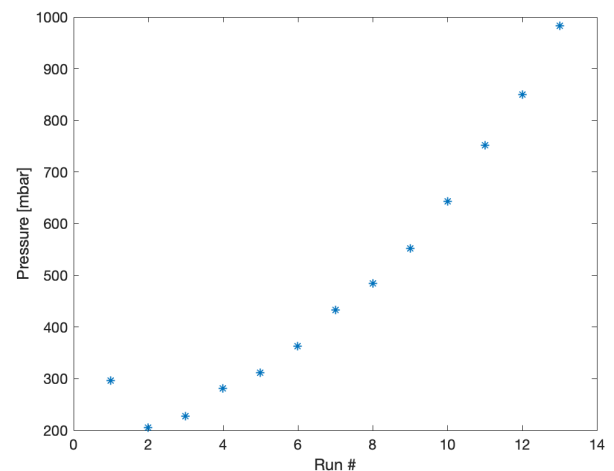


Abbildung 2: Darstellung der Messreihen bei verschiedenen Drücken

Abb. 3 veranschaulicht einen Schnappschuss einer angeregten Probe, welcher später in MATLAB für die weite-

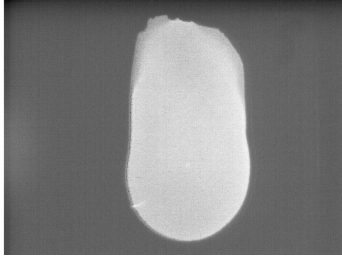


Abbildung 3: Schnappschuss einer angeregten Probe

re Analyse verwendet wird. Hierzu wird ein Kontrollelement in Form eines Rechtecks ausgewählt. Die Fluoreszenzverhältnisse werden in Form einer Matrix abgespeichert und für spätere Rechenoperationen abgerufen.

Abb. 4 zeigt die Messung der Intensitätsverhältnisse - gemäss der ersten Methode - bei den jeweiligen Drücken. Hierfür wurde eine Aufnahme von der mit einem Impuls angeregten Probe gemacht und einem Referenzbild verglichen.

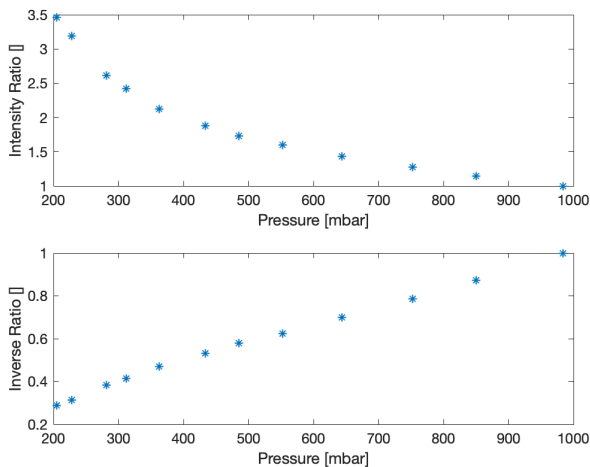


Abbildung 4: Messung der Intensitätsverhältnisse bei verschiedenen Drücken gemäss Methode 1

Abb. 5 zeigt die Messungen auf, bei der zwei sukzessive Schnappschüsse gemacht werden und so eine Aufnahme eines Referenzbildes nicht mehr benötigt wird.

Ziel der Messungen in Abb. 4 & 5 war es, mithilfe der Inversen der jeweiligen Intensitätsverhältnisse zu zeigen, dass mit zunehmendem Druck die Messpunkte sich alle auf einer Geraden befinden. Grund hierfür ist die Stern-Vollmer Beziehung wie oben beschrieben. In Abb. 4 ist dabei der lineare Verlauf deutlicher zu erkennen als in Abb. 5

Abb. 6 und 7 zeigen die Ergebnisse auf, welche bei

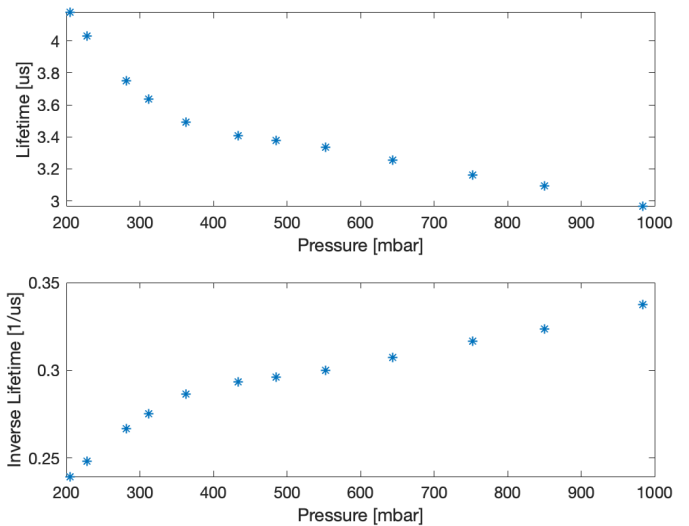


Abbildung 5: Messung der Zerfallszeiten bei verschiedenen Drücken gemäss Methode 2

der Phasenshift-Messung erzielt werden. Zum jeweiligen Druck wurden vier Intensitätsmessungen bei vier verschiedenen, gleichverschobenen Belichtungszeiten durchgeführt und so die Lifetime ermittelt. Wieder lässt sich in Abb. 6 der exponentielle Abfall der Zerfallszeit wiedererkennen sowie bei Abb. 7 die Stern-Vollmer-Beziehung.

Abb. 8 zeigt bei den jeweiligen Drücken zwei aufeinanderfolgende Aufnahmen bei einem gepulsten Signal auf, welche in Abb. 5 ausgewertet worden sind. Beim jeweiligen Druck lassen sich die Bilder oben und unten vergleichen. Erkennbar ist, dass das Fluoreszenz-Signal mit der Zeit abnimmt. Die unteren Bilder erscheinen gegenüber den oberen dunkler. Ebenso ist bei den unterschiedlichen Drücken ein Kontrastunterschied zu erkennen. Insbesondere zwischen denjenigen im tieferen Bereich von 0.204 bar und den höchsten Druckwerten von etwa 0.983 bar. Diese Beobachtung deckt sich Theorie, dass bei höheren Drücken mehr "Quenching" - also Fluoreszenzauslöschung auftritt.

Abb. 9 zeigt die Messreihe auf, welche für die Auswertung in Abb. 6 und 7 benötigt worden sind, um die Zerfallszeit zu berechnen. Anhand der vier Intensitätsmessungen bietet sich die Möglichkeit, ohne der expliziten Messung des "verdunkelten" Referenzbildes, die Berechnung der Lifetime durchzuführen.

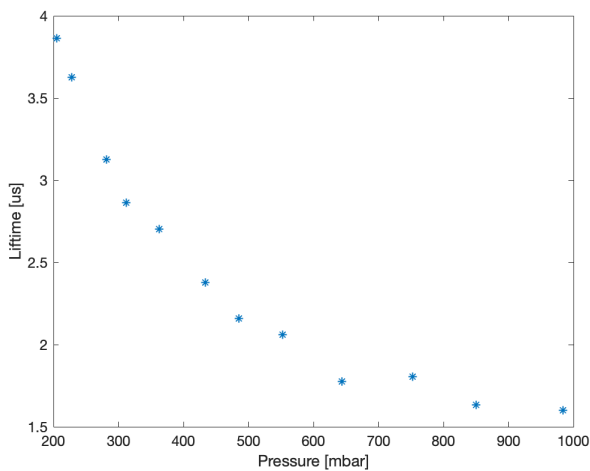


Abbildung 6: Messung der Zerfallszeiten bei verschiedenen Drücken gemäss Methode 3

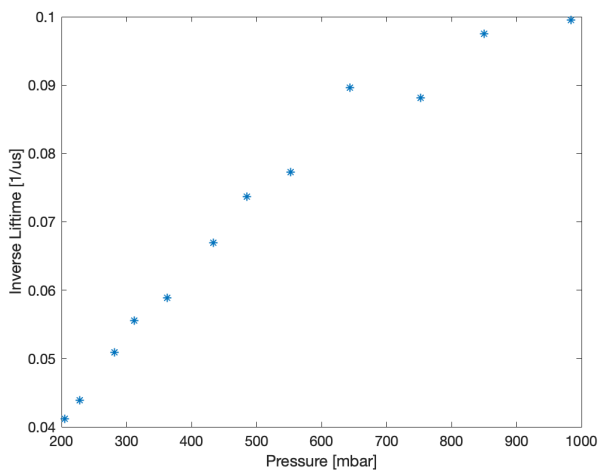


Abbildung 7: Messung der invertierten Zerfallszeiten bei verschiedenen Drücken gemäss Methode 3

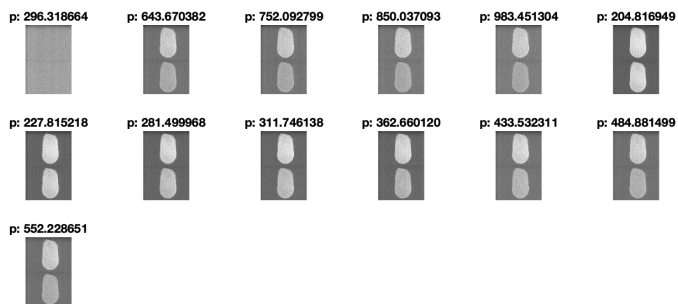


Abbildung 8: Darstellung von zwei sukzessiven Aufnahmen der Proben bei den jeweiligen Drücken gemäss Methode 2

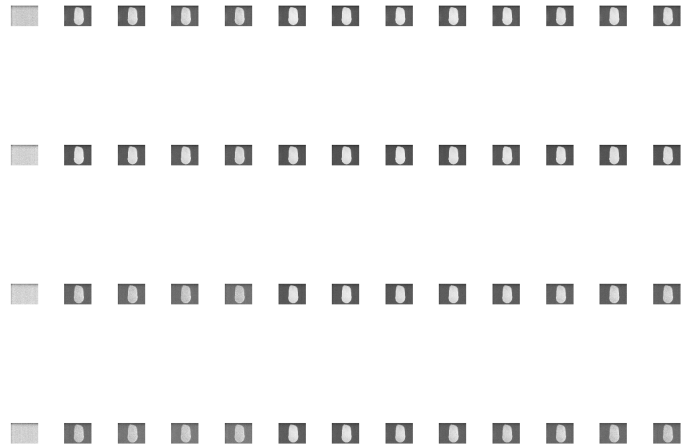


Abbildung 9: Darstellung der Bildaufnahmen von 4 Intensitätsmessungen bei verschiedenen Drücken

4. Diskussion/Analyse

Prinzipiell werden die theoretischen Überlegungen von den Messungen bestätigt. Man erkennt klar das es sich um eine lineare Abhängigkeit zwischen Druck und inverser Intensität handelt analog für inverse Lebenszeit und Druck. Allerdings sieht man auch, dass es sich nicht um perfekte Geraden handelt.

Wie bei allen Messungen liegen kleine Unsicherheiten vor die aus der Messgenauigkeit resultieren, diese sind allein jedoch etwas zu klein um für den gesamten Messfehler verantwortlich zu sein. Dies liegt vermutlich an Messfehlern die daher stammen können das z.B. die Kamera noch im transienten Bereich misst, wo natürlich kein lineares Verhalten vorliegt. Ausserdem ist es möglich, das andere Effekte welche in unserem Modell nicht berücksichtigt wurden eine Rolle spielen und unsere Messung beeinflussen, unser Modell also inhärente Fehler besitzt, bzw. gewisse Effekte nicht ausreichend berücksichtigt.

Mögliche Verbesserungen wären eine exaktere Kamera mit weniger Verzögerung und genauerer Auflösung, beziehungsweise die Verzögerung hier genauer einzustellen. Damit würde sichergestellt, dass wir nicht im transienten Bereich messen. Wenn die Kamera sensibler ist steigt die Datenqualität auch weiter vom Peak entfernt, wodurch man sich sicherer nur im abfallenden Bereich aufhält.

Weitere Störfaktoren könnten weiterhin sein, das auch externe Lichtquellen mitgemessen werden, um diese zu minimieren wäre eine bessere Abdeckung und Abdunkelung eine potentielle Verbesserungsmöglichkeit.