

Kapitel 3

Methoden und Materialien

Der im vorherigen Kapitel vorgestellte Ansatz für ein bildgebendes Sauerstoffmesssystem beruht auf der Lebensdauerermessung sauerstoffsensitiver Farbstoffe. Ein Ansatz, um die Lebensdauer einer Lumineszenzabklingkurve zu bestimmen, ist die Messung der Lumineszenzintensität zu verschiedenen Zeitpunkten während des Abklingens und Anpassung der Werte mit einer Modellkurve. Das Prinzip dieser Methode ist in Kap. 3.1.1 dargestellt. Sie dient der genauen Bestimmung der Lebensdauer, ist jedoch für die pixelweise Bestimmung der Lebensdauer in Echtzeit, wie es für die Bildgebung benötigt wird, nicht geeignet. Hierfür wird eine schnellere Methode, die Rapid-Lifetime-Determination-Methode, benötigt, die im Kap. 3.1.2 beschrieben ist. Die Zuordnung der gemessenen Lebensdauer zur Sauerstoffkonzentration ist jedoch erst möglich, wenn die Stern-Volmer-Konstanten für die verwendeten Farbstoffe und deren Umgebungsbedingungen bekannt sind. Die Methode zur Bestimmung der Stern-Volmer-Konstanten und die für die *in vivo* Bildgebung wichtige Ansprechzeit von Gewebe sind in den Kap. 3.1.3 und 3.1.4 erläutert.

Die Grundlage des Messsystems bilden sauerstoffsensitive Farbstoffe. Die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe sind der Metallkomplex Ruthenium-tris-bipyridyl und die kommerziell erhältliche Sol-Gel-Schicht FOXY-SGS-M. Diese müssen an die physiologischen Parameter, die Einfluss auf das Messverfahren haben können, angepasst sein. Die Eigenschaften der Farbstoffe und die physiologischen Parameter sind in den Kapiteln 3.2.1, 3.2.2 und 3.2.3 dargestellt. Um die Funktionalität des Systems zu zeigen, wurden erste Versuche an *in vitro* Schweinehautproben durchgeführt. Die Eigenschaften und die Präparation dieser Proben sind im Kap. 3.2.4 beschrieben.

Das Messprinzip und der Aufbau des realisierten Messsystems sind in Kap. 3.3 erläutert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die einzelnen Komponenten ausgewählt und zu einem System zusammengeführt. Anschließend wurden die einzelnen Elemente in Hinblick auf die Anwendung charakterisiert. Für das System wurden zwei verschiedene Probenkammern realisiert, die zum einen der Kalibrierung der Sensoren und zum anderen der Vermessung von *in vitro* Proben dienen.

3.1 Methoden zur Bestimmung der Lebensdauer

3.1.1 Lebensdauerbestimmung durch Messung der Abklingkurve

Die Bestimmung der physikalischen Lebensdauer τ einer Lumineszenzabklingkurve erfolgt durch die Anregung der Probe mit einem kurzen Anregungspuls und die Aufnahme mehrerer Intensitätswerte I zu verschiedenen Zeitpunkten t während des Abklingens der Lumineszenz. Die Intensitätswerte $I(t)$ werden in Abhängigkeit der Zeit t in einem Diagramm aufgetragen und mittels der nicht-linearen 'Least-Square-Fit'-Methode (Methode der kleinsten Fehlerquadrate) einfach oder auch mehrfach exponentiell angepasst [96]. Die Anpassung erfolgt mit einem Fit-Programm (Origin[®] 7.0) und die Genauigkeit der Anpassung wird mit der Summe der quadratischen Abweichungen χ^2 und dem Bestimmtheitsmaß R^2 angegeben. Das Bestimmtheitsmaß R^2 der Modellkurve ergibt sich aus dem Quadrat des PEARSONSchen Korrelationskoeffizienten R und nimmt Werte zwischen 0 (kein Zusammenhang) und 1 (starker Zusammenhang) an. Die an die Messwerte angepasste Modellkurve, bei der der Wert von χ^2 minimal ist, wird am Ende der Anpassung als Modellkurve ausgegeben. Aus den Parametern der an die Messwerte angepassten Modellkurve ergibt sich die Lebensdauer oder bei einem mehrfach exponentiellen Abfall mehrere Lebensdauern. Der Fehler dieser Werte, der auf der Abweichung des Fits zu den gemessenen Daten beruht, wird ebenfalls angegeben. Der tatsächlich zu Grunde liegende Fehler der Lebensdauer kann jedoch auf Grund der Versuchsdurchführung oder auf Grund von Eigenschaften des Versuchsaufbaus größer sein als dieser berechnete Fehler. Er muss daher für jede Versuchsanordnung neu überprüft werden.

Die Aufnahme mehrerer Intensitätswerte einer Abklingkurve dauert je nach verwendetem System einige Zeit und die Anpassung der Modellkurve kann wegen der großen Datenmengen meist nur für einen Datensatz erfolgen. Für ein bildgebendes System bedeutet das, dass der Fit nur für einen Pixel oder für den Mittelwert des Bildes erfolgen kann. Um die Genauigkeit der ermittelten Lebensdauerwerte zu maximieren, wurde in der vorliegenden Arbeit stets der Intensitätsmittelwert des Bildes verwendet, der auf Grund der Gesamtanzahl der Pixel eine hohe Genauigkeit hat. Die mit einem Fit ermittelte Lebensdauer entspricht daher der mittleren Lebensdauer eines Bildes.

Für den Aufbau eines bildgebenden Systems ist diese Methode der Lebensdauerbestimmung zu langsam und nicht geeignet, um pixelweise eine Lebensdauer anzugeben. Es wird daher eine Methode benötigt, um die Lebensdauer in Echtzeit und pixelweise bestimmen zu können, auch wenn der Fehler der Lebensdauerberechnung dabei größer sein kann.

3.1.2 Methode der Rapid-Lifetime-Determination

Eine Methode, mit der die Lebensdauer eines Farbstoffs in Echtzeit bestimmt werden kann, ist die Rapid-Lifetime-Determination-Methode (schnelle Lebensdauerbestimmungs-

Methode, RLD) [96, 97]. Diese kann sowohl für punktuelle, als auch für bildgebende Messungen eingesetzt werden. Dabei wird der Farbstoff mit einem kurzen Anregungspuls angeregt und die Lumineszenzabklingkurve beobachtet. Liegt der Farbstoff in homogenen Lösungen vor, so ist das Abklingverhalten einfach exponentiell, wie in Abb. 3.1 schematisch dargestellt ist. Die gemessene Intensität zu einem Zeitpunkt $t = x$ lässt sich dann wie folgt beschreiben:

$$I_{t_x} = I_0 \cdot e^{-\frac{t_x}{\tau}} + I_{UG} \quad (3.1)$$

I_0 ist die Intensität zum Zeitpunkt $t = 0$, τ ist die Lebensdauer und I_{UG} das Untergrundsignal. Messungen, bei denen die Intensität integriert wird, ergeben sich aus der separaten Integration des Signals und des Untergrundsignals, wenn dieses signalunabhängig ist.

$$I_i = \int I_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} dt + \int I_{UG} dt \quad (3.2)$$

Für zwei verschiedene Intensitäten I_1 und I_2 und das Untergrundsignal I_3 ergibt sich:

$$I_1 = I_0 \int_{t_1}^{t_1+\Delta t_1} e^{-\frac{t}{\tau}} dt + I_3 \quad (3.3)$$

$$I_2 = I_0 \int_{t_2}^{t_2+\Delta t_2} e^{-\frac{t}{\tau}} dt + I_3 \quad (3.4)$$

$$I_3 = \int_{t_3}^{t_3+\Delta t_3} I_{UG} dt \quad (3.5)$$

Sind die Integrationszeiten $\Delta t_1 = \Delta t_2 = \Delta t_3$ für diese Intensitäten gleich und die Integrationszeitfenster der Intensitäten $I_{1,2}$ zudem benachbart, so ergibt sich durch Umstellen der Gleichungen 3.3, 3.4 und 3.5 ein einfacher Zusammenhang für die Lebensdauer:

$$\tau = \frac{t_2 - t_1}{\ln\left(\frac{I_1 - I_3}{I_2 - I_3}\right)} \quad (3.6)$$

Bei einem einfach exponentiellen Abfall kann also die Lebensdauer τ aus zwei Intensitäten I_1 und I_2 , die zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 mit gleichen Integrationszeiten Δt während des Abfalls detektiert werden, berechnet werden [96, 97]. Wenn das Untergrundsignal konstant ist, kann eine Untergrundkorrektur mit einer dritten Intensität I_3 erfolgen, die direkt vor dem Anregungspuls oder nach dem Abklingen der Lumineszenz detektiert wird. Das Zeitschema für die Berechnung der Lebensdauer ist in Abb. 3.1 dargestellt. Die Zeitpunkte t_1 und t_2 und die Integrationszeit Δt müssen an den Messbereich der erwarteten Lebensdauerwerte angepasst werden. Bei einem großen Wertebereich der Lebensdauer müssen die Zeitpunkte und die Integrationszeit so angepasst werden, dass bei der Berechnung der Lebensdauer der Fehler sowohl für die kleinen als auch für die großen Werte minimal ist. Die Wahl der Parameter beeinflusst dabei maßgeblich die Genauigkeit der Lebensdauerbestimmung [97].

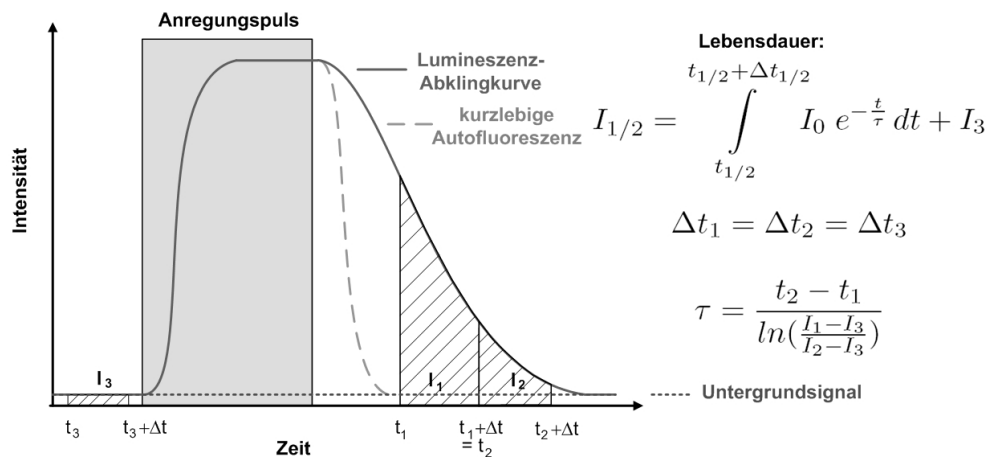


Abbildung 3.1: Zeitschema für die Lebensdauerberechnung nach der RLD-Methode: nach einem Anregungspuls fällt die Lumineszenz einfach exponentiell ab, zwei Intensitäten $I_{1,2}$ werden detektiert und mit der Untergrundintensität I_3 korrigiert und τ wird nach der RLD-Formel berechnet. Die kurzlebige Autofluoreszenz des Gewebes kann durch geeignete Fensterwahl ausgeschlossen werden.

Die Berechnung der Lebensdauer nach der RLD-Methode ermöglicht den Ausschluss der kurzlebigen Autofluoreszenz des Gewebes, die nur einige Nanosekunden lang ist. Die Integrationszeitpunkte t_1 und t_2 müssen dafür zeitlich nach das Abklingen der Autofluoreszenz gelegt werden und die Lebensdauer des Farbstoffs muss ausreichend lang ist ($\sim \mu s$). Da im sichtbaren Spektralbereich die Autofluoreszenz des Gewebes sehr stark ist, ist dieser Ausschluss für die Messung wesentlich. Inhomogenitäten des Anregungslichts und Schwankungen der Farbstoffkonzentration können ebenfalls ausgeschlossen werden, da nur das Verhältnis der Intensitäten in die Berechnung eingeht.

Bei lumineszierenden Farbstoffen, deren Lebensdauer in Abhängigkeit der Konzentration eines Quenchers gequenchet wird, kann die Lebensdauer mit Hilfe der RLD-Methode bestimmt werden. Ist für ein System die Lebensdauer in Abhängigkeit der Quencherkonzentration bekannt, so kann der gemessenen Lebensdauer die Quencherkonzentration zugeordnet werden. Wird für die Messung z. B. eine CCD-Kamera verwendet, so kann dieses Prinzip auch zur pixelweisen Berechnung der Lebensdauer genutzt werden und den Lebensdauerwerten dann ebenso pixelweise eine Quencherkonzentration, hier der molekularen Sauerstoffkonzentration, zugeordnet werden.

Bei vielen Farbstoffen, die in Schichten eingebettet sind, fällt die Abklingkurve jedoch nicht einfach, sondern multi-exponentiell ab [51]. Die Bestimmung der Lebensdauer nach der RLD-Methode liefert dann keine physikalische Lebensdauer, sondern eine Mischung aus den zu Grunde liegenden Lebensdauern τ_i . Wenn eine dieser Lebensdauern τ_i abhängig von der Quencherkonzentration ist, so kann dennoch die nach der RLD-Methode bestimmte, nicht physikalische Lebensdauer für die Zuordnung zur Quencherkonzentration genutzt werden.

3.1.3 Bestimmung der Stern-Volmer-Konstanten

Die Bestimmung der molekularen Sauerstoffkonzentration ist erst durch eine eindeutige Zuordnung der gemessenen Lebensdauer zur Sauerstoffkonzentration möglich. Hierfür muss die Abhängigkeit der Lebensdauer von der Sauerstoffkonzentration für den verwendeten Farbstoff und dessen Umgebungsbedingungen, z. B. Temperatur und Lösungsmittel, bekannt sein. Die Bestimmung dieser Abhängigkeiten erfolgt durch die Aufnahme von Kalibrierkurven und Stern-Volmer-Graphen.

Für die Messung der Kalibrierkurven werden für eine Anzahl fest eingestellter Sauerstoffkonzentration die Lebensdauern ermittelt. Die gemessenen Lebensdauern werden dann in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration aufgetragen und die gemessenen Daten mit einer Modellkurve angepasst. Mit Hilfe dieser Modellkurve können aus den gemessenen Lebensdauern unbekannte Sauerstoffkonzentrationen von Proben mit den gleichen Umgebungsbedingungen berechnet werden. Da sich die Modellkurven verschiedener Farbstoffe und deren Umgebungen unterscheiden, müssen für jeden Farbstoff und für alle relevanten Umgebungsbedingungen Kalibriermessungen durchgeführt und Modellkurven erstellt werden.

Aus den Parametern der Modellkurven kann die Lebensdauer τ_0 in Abwesenheit von Sauerstoff berechnet werden. Dies ist wichtig, da für eine Messung dieses Werts die Probe vollständig von Sauerstoff entleert werden müsste, was nur mit einem hohen zeitlichen und apparativen Aufwand möglich ist. Mit Hilfe der berechneten Lebensdauer τ_0 kann aus der Kalibrierkurve der Stern-Volmer-Graph, d. h. das Abklingzeitverhältnis τ_0/τ in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration $[O_2]$, erstellt werden. Die Form des Stern-Volmer-Graphen kann für eine Interpretation des zu Grunde liegenden Quenchingprozesses genutzt werden, wie bereits in Kapitel 2.1.4 erläutert wurde.

Bei einem rein dynamischen Quenchingprozess ergibt sich ein linearer Stern-Volmer-Graph, der die Ordinate bei 1 schneidet. Die Steigung der Geraden gibt dabei die Stern-Volmer-Konstante für diesen Farbstoff und Quencher und deren Umgebung wieder. Die Form der Kalibrierkurve ist in diesem Fall wie folgt gegeben:

$$\tau = \frac{\tau_0}{1 + K_{SV}[O_2]} = \frac{1}{\frac{1}{\tau_0} + \frac{K_{SV}}{\tau_0}[O_2]} \quad (3.7)$$

Der Zusammenhang zwischen der Lebensdauer τ und der Sauerstoffkonzentration $[O_2]$ folgt also einem $1/x$ -Verlauf. Der Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse gibt die Lebensdauer τ_0 in Abwesenheit von Sauerstoff wieder.

An die Messungen der Kalibrierkurven und der Stern-Volmer-Graphen sind hohe Anforderungen gestellt, um eine Zuordnung der gemessenen Lebensdauer zur Sauerstoffkonzentration mit hoher Genauigkeit gewährleisten zu können. Für ein bildgebendes System bedeutet das, dass die pixelweise berechneten Lebensdauern über das gesamte Bildfeld gemittelt

werden können und der Mittelwert so eine hohe Genauigkeit hat. Damit jedoch die pixelweise berechneten Lebensdauern auf derselben Sauerstoffkonzentration und denselben Umgebungsbedingungen beruhen, ist eine gleichmäßige Durchmischung der Probe erforderlich. Weiter sollte eine Vielzahl an Sauerstoffkonzentrationen eingestellt und die resultierenden Lebensdauern gemessen werden, um die Anzahl der Datenpunkte n_{eff} für die Anpassung der Modellkurven der Kalibrierkurven und der Stern-Volmer-Graphen zu maximieren. Je größer diese Anzahl ist, desto genauer kann die Anpassung erfolgen.

Eine Möglichkeit, eine große Anzahl von Sauerstoffkonzentrationen in der Probe zu erzeugen, ohne jede einzeln einzustellen, bietet die Sauerstoffdiffusion in die Probe hinein und aus dieser heraus. Um dies nutzen zu können, wird jedoch ein Referenzmesssystem benötigt, mit dem innerhalb der Probe kontinuierlich die Sauerstoffkonzentration gemessen werden kann. Ohne ein solches System ist keine Zuordnung der gemessenen Lebensdauer zur Sauerstoffkonzentration möglich. Die Messmethode beruht auf der Sauerstoffdiffusion in und aus der Probe auf Grund eines Sauerstoffkonzentrationsgefälles. Dieses wird durch die Sättigung der Probe mit Stickstoffgas erreicht, so dass eine möglichst geringe Sauerstoffkonzentration in der Probe vorliegt. Wenn die Probe nach oben hin offen im System gelagert ist, liegt oberhalb der Probenlösung eine normale Luftatmosphäre vor, was zu einem Sauerstoffkonzentrationsgefälle führt. Durch die Diffusion des molekularen Sauerstoffs aus der Atmosphäre in die Probe, nähert sich die Sauerstoffkonzentration in der Probe langsam der der Luftatmosphäre. Wird während dieser Zeit kontinuierlich sowohl die Sauerstoffkonzentration als auch die Lebensdauer gemessen, so kann in diesem Konzentrationsbereich eine Vielzahl an Daten gewonnen werden. Die Messzeitpunkte für die Messung der Sauerstoffkonzentration und der Lebensdauer müssen jedoch identisch sein und die Probe muss kontinuierlich durchmischt werden, so dass eine einheitliche Sauerstoffkonzentration in der Probe zu jedem Zeitpunkt realisiert ist. Durch die anschließende Sättigung der Probe mit Sauerstoffgas kann auch der Sauerstoffkonzentrationsbereich, der über dem der Luftatmosphäre liegt, erfasst werden.

3.1.4 Bestimmung der Ansprechzeit von Gewebe

Die Einsetzbarkeit des Messsystems als nicht invasives oberflächliches Sauerstoffmessgerät kann in einem ersten Schritt mit Messungen an *in vitro* Präparaten gezeigt werden. Diese sollen nicht nur die prinzipielle Eignung des Systems belegen, sondern auch die Tiefenauflösung des Systems zeigen. Da mit dem Messsystem die Sauerstoffkonzentration nur oberflächlich gemessen wird, muss die Tiefe, aus der noch Sauerstoff detektiert werden kann, ermittelt werden. Dies kann durch die Vermessung von *in vitro* Proben mit unterschiedlichen Schichtdicken erzielt werden.

Die Gewebeproben werden für diese Messungen in unterschiedlichen Schichtdicken präpariert und deren Ansprechzeit gemessen. Die Ansprechzeit entspricht der Zeit, die der

Sauerstoff benötigt, um durch die Gewebeschicht zu diffundieren. Sie wird so gemessen, dass die Farbstoffprobe und die auf dieser liegende Gewebeschicht zuerst mit Luft gesättigt werden. Dann wird die Lebensdauer τ_{Air} und die Sauerstoffkonzentration $[O_2]_{Air}$ gemessen. Wenn eine Sättigung der Probe und damit ein konstantes Signal vorliegt, wird zu einem bestimmten Zeitpunkt die Sauerstoffkonzentration oberhalb der Gewebeschicht rapide geändert und die Änderung der Lebensdauer und der Sauerstoffkonzentration beobachtet. Nach einer gewissen Zeit nähern sich die Werte der Lebensdauer und der Sauerstoffkonzentration einem Sättigungswert, und das neue Sauerstoffkonzentrationsniveau $[O_2]_{Niv}$ ist erreicht.

Nach der Messung kann die Signaländerung der Lebensdauer $\Delta\tau$ und auch der Sauerstoffkonzentration $\Delta[O_2]$ ermittelt werden.

$$\Delta\tau = |\tau_{[O_2]_{Air}} - \tau_{[O_2]_{Niv}}| \quad (3.8)$$

$$\Delta[O_2] = |[O_2]_{Air} - [O_2]_{Niv}| \quad (3.9)$$

Die Zeit für die Signaländerung von 10% auf 90% wird dabei als die Ansprechzeit des Gewebes bezeichnet.

$$\Delta t_{Res} = t_{\tau_{90\%}} - t_{\tau_{10\%}} \quad (3.10)$$

Die gemessenen Ansprechzeiten sind meist eine Faltung aus der tatsächlich benötigten Zeit des Gases durch die Gewebeschicht mit der Zeit, die benötigt wird, um die Gasatmosphäre oberhalb der Probe fest auf das neue Niveau einzustellen.

3.2 Verwendete Sensorfarbstoffe und Proben

Das hier vorgestellte System wurde mit zwei verschiedenen Farbstoffen getestet. Der eine Farbstoff, Ruthenium-tris-bipyridyl, wurde für die Überprüfung der Funktionalität des Messsystems verwendet. Der zweite Farbstoff, die Sol-Gel-Schicht FOXY-SGS-M, dient als erste Anpassung der Sensorschicht an die Anwendung in der Klinik. Beide Farbstoffe wurden für *in vitro* Versuche eingesetzt.

3.2.1 Ruthenium-tris-bipyridyl in wässriger Lösung

Der Farbstoff Ruthenium-tris-bipyridyl ist ein Übergangsmetallkomplex, der mit hoher Effizienz durch molekularen Sauerstoff gequencht wird. Die Lebensdauer des angeregten Zustand 3MLCT des Farbstoffs ist daher von der molekularen Sauerstoffkonzentration abhängig, wie bereits in Kap. 2.3.2 dargestellt ist. Jedoch kann die Deaktivierung auch über andere strahlungslose Prozesse erfolgen. Zu diesen gehört die thermische Deaktivierung über den 3MC -Zustand, deren Übergangsrate abhängig von der Umgebungstemperatur des Farbstoffs ist. Weiter kann der Farbstoff durch Photodegradation zerstört werden. Dieser Prozess

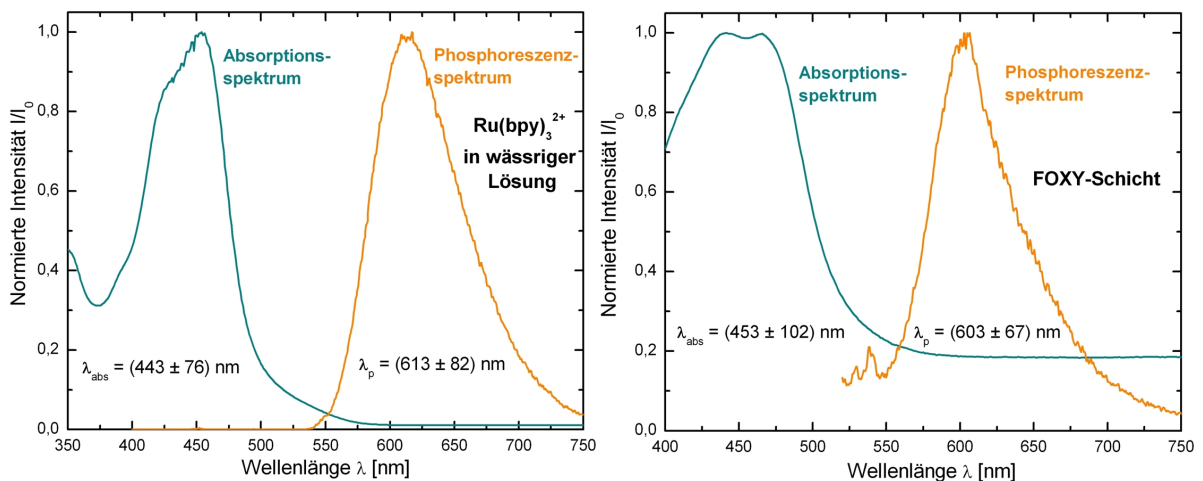


Abbildung 3.2: Absorptions- und Phosphoreszenzspektrum von $Ru(bpy)_3^{2+}$ in wässriger Lösung (links), Absorptions- und Phosphoreszenzspektrum der FOXY-SGS-M-Schicht (rechts).

ist ebenfalls abhängig von der Temperatur, aber auch vom pH-Wert der Lösung. Um den Farbstoff für die molekulare Sauerstoffkonzentrationsbestimmung nutzen zu können, müssen daher der Einfluss der Temperatur und des pH-Werts auf die Lebensdauer bekannt sein.

Der Einfluss der Temperatur, des pH-Werts und der Sauerstoffkonzentration auf die Lebensdauer wird in Stern-Volmer-Graphen gezeigt. Aus diesen ergeben sich die Stern-Volmer-Konstanten und die Lebensdauern τ_0 in Abwesenheit von Sauerstoff für die verschiedenen Temperaturen und pH-Werte. Für einige pH-Werte und Temperaturen, wie z. B. $T = 25^\circ\text{C}$, sind für diesen Farbstoff Werte aus der Literatur bekannt. Die mit dem hier vorgestellten System gemessenen Werte können mit diesen verglichen und damit die Funktionalität des Systems gezeigt werden. Für Temperaturen größer als $T = 25^\circ\text{C}$ sind jedoch keine Werte bekannt, so dass ein Vergleich für diese Temperaturen nicht möglich ist.

Der ausgewählte Temperaturbereich für die Messungen ergibt sich aus den für die PDT relevanten Temperaturen. Diese werden im Abschnitt 3.2.3 abgeleitet. Zusätzlich muss, um die Funktionalität des Systems zu zeigen und die gemessenen Werte mit Literaturwerten vergleichen zu können, die Stern-Volmer-Konstante für die Temperatur $T = 25^\circ\text{C}$ ermittelt werden. Um den Einfluss auch von höheren Temperaturen zu zeigen, wird exemplarisch eine Messung bei $T = 50^\circ\text{C}$ durchgeführt.

Der Farbstoff $Ru(bpy)_3^{2+}$ ist in Pulverform als Tris(2,2'-bipyridyl)dichloro-ruthenium(II) hexahydrate ($Ru(bpy)_3^{2+}Cl_2^{2-}$) mit einer Reinheit von 99,99% von der Firma Sigma Aldrich erhältlich. Durch Einmischen des Farbstoffs in wässriger Lösung dissoziiert dieser zu $Ru(bpy)_3^{2+}$ und Cl_2^{2-} . Der Farbstoff wurde für Messungen in wässrigen Lösungen mit physiologisch relevanten pH-Werten gelöst. Die Ableitung der relevanten Werte befindet sich im Abschnitt 3.2.3.

Das Absorptionsspektrum des Farbstoffs wurde mit einem UV/Vis-Spektrophotometer

Typ Lambda 2 der Firma Perkin-Elmer vermessen. Dieses ist wie auch das Phosphoreszenzspektrum in Abb. 3.2 gezeigt. Das Absorptionsmaximum von $Ru(bpy)_3^{2+}$ in wässriger Lösung liegt im blauen Spektralbereich bei $\lambda_{abs} = 443 \pm 76 \text{ nm}$. Bei dieser Wellenlänge ist die Eindringtiefe des Lichts in humanes Gewebe gering. Dies ist jedoch für die geplante Anwendung nicht relevant, da der Farbstoff nur oberflächlich verwendet werden soll. Das Phosphoreszenzspektrum wurde mit einem Lumineszenzspektrometer Typ LS 50 B der Firma Perkin-Elmer in 45° -Anordnung aufgenommen. Das Phosphoreszenzmaximum liegt bei $\lambda_p = 613 \pm 82 \text{ nm}$.

3.2.2 FOXY-SGS-M-Schicht

Die sauerstoffdurchlässige FOXY-SGS-M-Schicht ist eine kommerziell erhältliche Sol-Gel-Schicht von der Firma Ocean Optics. In die Sol-Gel-Schicht ist der Farbstoff Rutheniumtris-(diphenyl-1,10-phenanthroline) ($Ru(phen)_3^{2+}$) eingebracht, der stark durch molekularen Sauerstoff gequencht wird. Der Farbstoff, im weiteren FOXY-Schicht genannt, hat eine deutlich längere Lebensdauer als $Ru(bpy)_3^{2+}$, die im Bereich von einigen Mikrosekunden liegt. Zusätzlich wird diese durch molekularen Sauerstoff stärker gequencht, so dass vermutet wird, dass die Sensitivität der Lebensdauerermessung größer ist. Da auch bei diesem Farbstoff strahlungslose Deaktivierungsprozesse des angeregten Zustands stattfinden, muss auch bei dieser Probe der Einfluss der Temperatur und des pH-Werts auf die Lebensdauer ermittelt werden.

Die Farbstoffschicht ist durch ein Spin-Coating-Verfahren auf ein Objektträgerglas mit der Größe $1 \cdot 3 \text{ Zoll}^2$ aufgebracht, das für Messungen auf die gewünschte Größe zugeschnitten werden kann. Sie ist gut sauerstoffdurchlässig und dient daher in dieser Arbeit als eine erste Anpassung des Messsystems an *in vivo* Bedingungen während der PDT. Durch das Einlegen der Schicht in wässrige Lösungen mit verschiedenen pH-Werten, kann auch bei dieser Probe der Einfluss des pH-Werts ermittelt werden. Der für die Messungen ausgewählte Temperaturbereich und pH-Wertebereich ist derselbe wie für den ersten Farbstoff.

Die Spektren des zweiten Farbstoffs wurden ebenso wie für den ersten Farbstoff mit den Spektrometern der Firma Perkin-Elmer aufgenommen und sind in Abb. 3.2 gezeigt. Das Absorptionsmaximum liegt bei diesem Farbstoff bei $\lambda_{abs} = 453 \pm 102 \text{ nm}$ und das Phosphoreszenzmaximum bei $\lambda_p = 603 \pm 67 \text{ nm}$.

Die Maxima der Absorptions- und der Phosphoreszenzwellenlänge der FOXY-SGS-M-Schicht sind im Vergleich zu denen des Farbstoffs $Ru(bpy)_3^{2+}$ nur um 10 nm verschoben. Die Anregung der beiden Farbstoffe kann daher mit einer Lichtquelle, die bei ca. 450 nm Licht emittiert, realisiert werden. Die selektive Transmission der Phosphoreszenz wird durch optische Filter realisiert, die bei geeigneter Wellenlängencharakteristik die Detektion der Phosphoreszenz von beiden Farbstoffen ermöglicht.

3.2.3 Physiologische Einflüsse auf die Lebensdauermessung

Das in dieser Arbeit vorgestellte System soll als Messsystem für die Dosimetrie und Kontrolle der PDT genutzt werden können. Es muss daher an die physiologischen Parameter, die im Gewebe während der PDT vorliegen, angepasst sein. Diese Parameter sind die molekulare Sauerstoffkonzentration, die oberflächliche Hauttemperatur und der pH-Wert.

Molekulare Sauerstoffkonzentration

Die molekulare Sauerstoffkonzentration im Gewebe variiert je nach Gewebetyp, Sauerstoffversorgung und Stand der Therapie. Im arteriellen Blut beträgt die Sauerstoffkonzentration zwischen $92 - 98 \text{ mmHg}$, im venösen Blut ca. 45 mmHg . Der durchschnittliche Sauerstoffgehalt von Körperzellen dagegen beträgt nur ca. 20 mmHg , wohingegen die Luft eine Sauerstoffkonzentration von ca. 160 mmHg hat. Der Messbereich der molekularen Sauerstoffkonzentration *in vivo* während der PDT umfasst Werte von ca. $3 - 55 \text{ mmHg}$ ($c \approx 5 - 100 \mu\text{mol/l}$) [4, 64, 79]. Das Messsystem muss daher in diesem Bereich mit hoher Genauigkeit und Sensitivität die Konzentration bestimmen können. Da die Sauerstoffkonzentration bereits bei kleinen Distanzänderungen stark schwanken kann, ist zudem eine hohe Ortsauflösung gefordert.

Hauttemperatur

Die Kerntemperatur und die oberflächliche Hauttemperatur des Menschen sind funktionell gekoppelt und werden über thermoregulative Mechanismen gesteuert [98]. Die Hauttemperatur ist daher von vielen endogenen und exogenen Faktoren abhängig. Sie variiert je nach Hautregion, nach Umgebungstemperatur und nach Bekleidungsstatus des Menschen [99]. Die durchschnittliche Hauttemperatur beträgt zwischen $T = 31^\circ\text{C} - 33^\circ\text{C}$ [98]. Diese kann sich jedoch durch Kühlung oder Erwärmung stark verändern. Beispielsweise wurde gezeigt, dass sie bei einer Kühlphase von nur 5 Minuten bereits um 4°C sinken kann [98].

Weiter wurde nachgewiesen, dass bei der Kühlung oder Erwärmung im Gehirn Verbindungen involviert sind, die sowohl die Schmerz-, als auch die Temperaturempfindung steuern [98]. Dies ist für die PDT wichtig, da dort neben der gezielten Tumorzerstörung auch unerwünschte Nebenwirkungen wie z. B. die Schmerzentwicklung während der Behandlung auftreten können [100]. Diese Schmerzen führten in vielen Behandlungen dazu, dass die Therapie abgebrochen werden musste, so dass für eine Fortführung der Behandlung eine Schmerzreduktion erforderlich war. Es hat sich gezeigt, dass dies auch ohne lokale Anästhetika mittels Kühlung der Haut durch einen vorgekühlten Luftstrom möglich ist [100, 101]. Die Hauttemperatur im Behandlungsareal sinkt durch die Kühlung, wobei die Art des Luftstroms eine große Rolle spielt. Bei einem Luftstrom aus komprimierter Luft (CPAC) wurde

im Maximum eine Kühlung von 4°C erzielt [100], bei Kühlungen mit dem Kaltluftgerät Cryo 5 hingegen sogar teilweise bis zu 17°C [101].

Bei der PDT wurden durch die Behandlung selbst auch Temperaturanstiege im Behandlungsvolumen von bis zu 3°C festgestellt [4, 79]. Bedingt sind diese einerseits durch die während der PDT-Behandlung auftretende erhöhte Perfusion und andererseits durch das eingestrahlte Bestrahlungslicht [79]. Bei einer Temperaturerhöhung von ca. 6°C kann eine Steigerung des Sauerstoffpartialdrucks im Gewebe bewirkt werden, dies zeigte sich jedoch bei geringeren Temperaturanstiegen, wie sie bei der PDT auftreten, nicht [4].

Der physiologisch relevante Temperaturbereich bei einer PDT liegt auf Grund der Luftstrom-Kühlung und des behandlungsbedingten Temperaturanstiegs im Bereich von ca. $T = 27^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$. Der Einfluss der Temperatur auf ein Messsystem für die PDT muss daher für diesen Temperaturbereich bekannt sein und das System so ausgelegt sein, dass es temperaturunsensibel ist. Um auch einen geringen Einfluss der Temperatur auf das Messverfahren zu ermitteln und um die gemessenen Werte mit Literaturwerten vergleichen zu können, wurde für die Messungen der Temperaturbereich auf $T = 25^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$ erweitert.

pH-Wert

Der pH-Wert des menschlichen Körpers liegt je nach Körperregion im Bereich von $pH = 4 - 7,5$. Dabei unterscheidet sich der pH-Wert im Inneren deutlich von dem der oberflächlichen Hautregionen. Der Wertebereich im Blut und im Serum beträgt zwischen $pH = 7,35 - 7,46$ [102] und der durchschnittliche Wert wird mit $pH = 7,41$ angegeben [103]. Der Durchschnittswert der Haut dagegen liegt im Bereich von $pH = 5,5 - 6,5$ [104]. Dabei wird der normale pH-Wert der Haut häufig als der pH-Wert verstanden, der auf der Oberfläche des Unterarms eines gesunden männlichen Kaukasiers gemessen wird. Der pH-Wert ist jedoch abhängig von der Hautregion, vom Alter und in geringem Maße auch von dem Geschlecht, der Rasse und dem Tageszeitpunkt, an dem der Wert ermittelt wird [102, 105]. Der physiologische Wertebereich des pH-Werts, der auch für ein medizinisches Messsystem relevant ist, liegt daher bei $pH = 4 - 7,5$ [104].

3.2.4 Verwendete *in vitro* Proben

Das bildgebende Lebensdauermesssystem soll der nicht invasiven, orts aufgelösten Messung der Sauerstoffkonzentration dienen. Das Messprinzip muss daher, um es einerseits an den Einsatz anzupassen und um andererseits die Funktionalität des Verfahrens zu zeigen, in einem ersten Schritt an *in vitro* Proben überprüft werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben waren *in vitro* Schweinehautproben, die aus Schlachthofpräparaten hergestellt wurden. Schweinehaut ist anatomisch, physiologisch und biochemisch der menschlichen Haut ähnlich. Hautabsorptions- und Permeationsmessungen, die sowohl an Schweine-

haut als auch an humaner Haut durchgeführt wurden, zeigten, dass sich Schweinehaut bei *in vitro* Messungen ähnlich verhält und daher für Permeationsmessungen als Model verwendet werden kann [106]. Um die oberen Hautschichten der Gewebeproben von dem Unterhautfettgewebe zu trennen, wurden mittels eines Kryo-Mikrotoms dünne Hautscheiben abgetrennt. Die für die Bestimmung der Ansprechzeit präparierten Proben hatten eine Schichtdicke von $d = 500 \mu m$.

Die Dicke der Proben ist so gewählt, dass aus der gemessenen Ansprechzeit auf eine Permeation des molekularen Sauerstoffs aus den tieferen Gewebeschichten bis hin zur Oberfläche geschlossen werden kann. *In vivo* ist das Sauerstoffangebot in der humanen Haut bedingt durch den aus der Atmosphäre aufgenommenen und aus dem Blut aufgenommenen Sauerstoff, so dass das Sauerstoffangebot im Korium eine Balance zwischen Sauerstofftransport des Bluts und transepidermaler Sauerstoffaufnahme aus der Atmosphäre ist [107]. Bei normalem Sauerstoffverbrauch können so die oberen Hautschichten bis zu einer Tiefe von $d = 250 - 423 \mu m$ durch atmosphärischen Sauerstoff versorgt werden [108]. Weiter stellt das Stratum Corneum eine Diffusionsbarriere für molekularen Sauerstoff dar und die Haut selbst verbraucht einen Teil des hindurch diffundierenden Sauerstoffs. Für die Verwendung des Sauerstoffmesssystems zur Messung der molekularen Sauerstoffkonzentration im Gewebe muss daher die Hautdurchlässigkeit bis hin zu einer Tiefe von $d = 500 \mu m$ gezeigt werden.

3.3 Konstruktion und Aufbau des Messsystems

Ziel dieser Arbeit ist der Aufbau und die Konstruktion des bildgebenden Lebensdauermesssystems für die *in vivo* Messung und Darstellung der Sauerstoffkonzentration. Dies beinhaltet die Auswahl und Charakterisierung der einzelnen Bauelemente, die Konstruktion und den Aufbau der Probenkammern sowie den Zusammenbau und die Charakterisierung des Gesamtsystems. Ebenso ist die Programmierung des Steuerprogramms für die Steuerung des Systems und die Auswertung der Daten ein Teil des Systemaufbaus.

Die Anforderungen an das Messsystem und damit die Auswahl der Komponenten richten sich nach dem zukünftigen Einsatzgebiet und den verwendeten Farbstoffen. Weiter muss es für die Untersuchung der Stern-Volmer-Charakteristika und für *in vitro* Versuche geeignet sein. Daraus ergeben sich einige Bedingungen, die das System erfüllen muss. Diese sind in der folgenden Auflistung zusammengefasst:

- *Anregung:*
 - relativ homogene Beleuchtung ($\pm 10\%$) im blauen Spektralbereich $\lambda \sim 450 nm$,
 - gepulste Anregung mit adaptierbarer Pulslänge ($\sim \mu s$) und steil abfallender Pulsflanke ($\sim 0,1 \mu s$),
 - hohe Wiederholfrequenz der Pulse ($\sim 10 kHz$)

- *Detektion:*
hohe Transmission im roten Spektralbereich $\lambda \sim 600\text{nm}$ ($T > 0,8$),
geringe Transmission des Anregungs- und des Umgebungslichts ($T < 10^{-4}$),
zeitlich gesteuerte Aufnahme während des Lumineszenzabklings mit variabler Start- und Integrationszeit ($\Delta t_{Int} = 0,1 - 1\ \mu\text{s}$),
schnelles Umschalten für die Aufnahme der drei Intensitäten ($\sim s$),
Akkumulation der Intensitäten wegen der geringen Intensität eines einzelnen Pulses,
hohe Wiederholfrequenz für eine schnelle Intensitätsakkumulation ($\sim 10\text{kHz}$),
scharfe Abbildung des Bildfeldes ($5 \cdot 5\text{mm}^2 - 25 \cdot 25\text{mm}^2$)
- *Lebensdauerbestimmung:*
pixelweise und in Echtzeit mit der RLD-Methode
- *Sauerstoffkonzentration:*
Einstellbarkeit der Sauerstoffkonzentration in der Probe im Bereich von 0 – 50% Luftsättigung ($c = 0 - 900\ \mu\text{mol/l}$)
- *Temperierung:*
Temperierbarkeit im Bereich von $T = 25 - 50^\circ\text{C}$ mit geringem Temperaturdrift ($\Delta T_{Drift} = \pm 0,5^\circ\text{C}$),
konstante Temperatur innerhalb der Probe ($\Delta T_{Probe} = \pm 0,5^\circ\text{C}$)
- *Kalibrierung:*
gute Durchmischung der Probe für eine homogene Sauerstoffkonzentrationsverteilung ($\Delta c_{Probe} = \pm 10\ \mu\text{mol/l}$),
Vermessung verschiedener Lösungsmittel und pH-Werte ($pH = 4 - 7,5$),
Referenzierung der Sauerstoffkonzentrationswerte
- *Durchflussküvette:*
Vermessung von festen und flüssigen Proben (Farbstofflösungen und Schichten),
Vermessung von *in vitro* Proben mit unterschiedlichen Schichtdicken $d = 0 - 15\text{mm}$ in 0,5 mm-Schritten,
Luftdichtigkeit der Kammer,
Referenzierung der Sauerstoffkonzentrationswerte,
Beobachtung des Farbstoffs für die Untersuchung des Ansprechverhaltens (*in vitro* Probe positioniert auf der Kamera-abgewandten Seite)

Diese Anforderungen sind im realisierten System, das im folgenden detailliert beschrieben ist, umgesetzt worden. In den ersten beiden Abschnitten ist der Gesamtaufbau und dessen Steuerung erläutert. In den folgenden Unterkapiteln sind die Eigenschaften der einzel-

nen Baugruppen, bestehend aus Anregungseinheit, Detektionseinheit, Kalibrier Aufbau und Durchflussküvette, dargestellt.

3.3.1 Aufbau des Systems

Das bildgebende Lebensdaueremesssystem beruht auf der Detektion zweier Intensitätsbilder zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 während des Abklingens der Lumineszenz. Die zeitliche Kontrolle für die Anregung der Lumineszenz und für die Aufnahme der Bilder erfolgt durch einen Puls-/Delay-Generator (Model DG535, Fa. Stanford Research Systems). Dieser wird von einem Rechner und der selbst entwickelten Software (Microsoft Visual C++ Vers. 6.0, Programmiersprache C++) gesteuert. Die Anregung der Lumineszenz ist mit zwei schaltbaren Hochleistungs-LED-Arrays (Model Luxeon[®] V Star LXHL-LR5C, Fa. Stocker-Yale) mit vorgesetzten Kollimieroptiken (Model 4° LED Optic, No. 10048, Fa. Carclo) und Linsen (Brennweite $f = 27\text{mm}$, Fa. Linos) realisiert. Die Detektion der Lumineszenzintensitätsbilder erfolgt mit einem schaltbaren Bildverstärker (Multi-Channel-Plate (MCP), Model C9546-01 GA AS M, Fa. Hamamatsu), vor dem ein Objektiv (Model Xenoplan 1,4/23-0512 kompakt, Fa. Schneider-Kreuznach) und ein Kantenfilter (Model XF 3089 ALP 575, Fa. Omega Filters) zur selektiven Transmission der Lumineszenz angebracht sind, sowie mit einer hochempfindlichen 2/3"-Chip CCD-Kamera (Model C4742-95-12ER, Fa. Hamamatsu). Die Steuerung und der Aufbau des Systems sind in Abb. 3.3 schematisch dargestellt.

Für die Vermessung der Farbstoffproben stehen zwei Probenkammern zur Verfügung. Der Kalibrier Aufbau dient der Vermessung der Kalibrierkurven und der Stern-Volmer-Charakteristika, bei denen die gleichmäßige Durchmischung der Probe, d. h. eine in der Probe konstante Temperatur und Sauerstoffkonzentration, benötigt wird. Der zweite Aufbau, die Durchflussküvette, dient der Vermessung von *in vitro* Proben und der Bestimmung von Ansprechzeiten.

Die Anregung der Lumineszenz erfolgt mit einem LED-Anregungspuls, der in seiner Länge, Anregungswellenlänge und Intensität an die Farbstoffe angepasst ist. Für die hier verwendeten Farbstoffe wird Licht im blauen Spektralbereich mit einer Pulslänge von $\Delta t_{Puls} = 8 - 10\ \mu\text{s}$ verwendet. Es wird von zwei blau leuchtenden Hochleistungs-LED-Arrays, deren Licht durch zwei Kollimieroptiken und zwei Linsen auf die Probe abgebildet wird, geliefert. Die zeitliche Steuerung der LED-Arrays erfolgt mit einem TTL-Signal, das vom Generator geliefert wird. Dieses Signal wird zu einer selbst gebauten LED-Kontrollbox geleitet, in der mit einem Transistor die Stromversorgung an-, bzw. ausgeschaltet wird. Ein separates Netzgerät versorgt die Arrays mit Strom sobald der Transistor geschaltet wird.

Die Detektion der Lumineszenzbilder erfolgt mit dem Bildverstärker und der hochempfindlichen CCD-Kamera. Die gemessenen Intensitäten werden vom Bildverstärker verstärkt und mittels der 1:1 Ankoppeloptik (A5309, Fa. Hamamatsu) scharf auf den Kamera-Chip

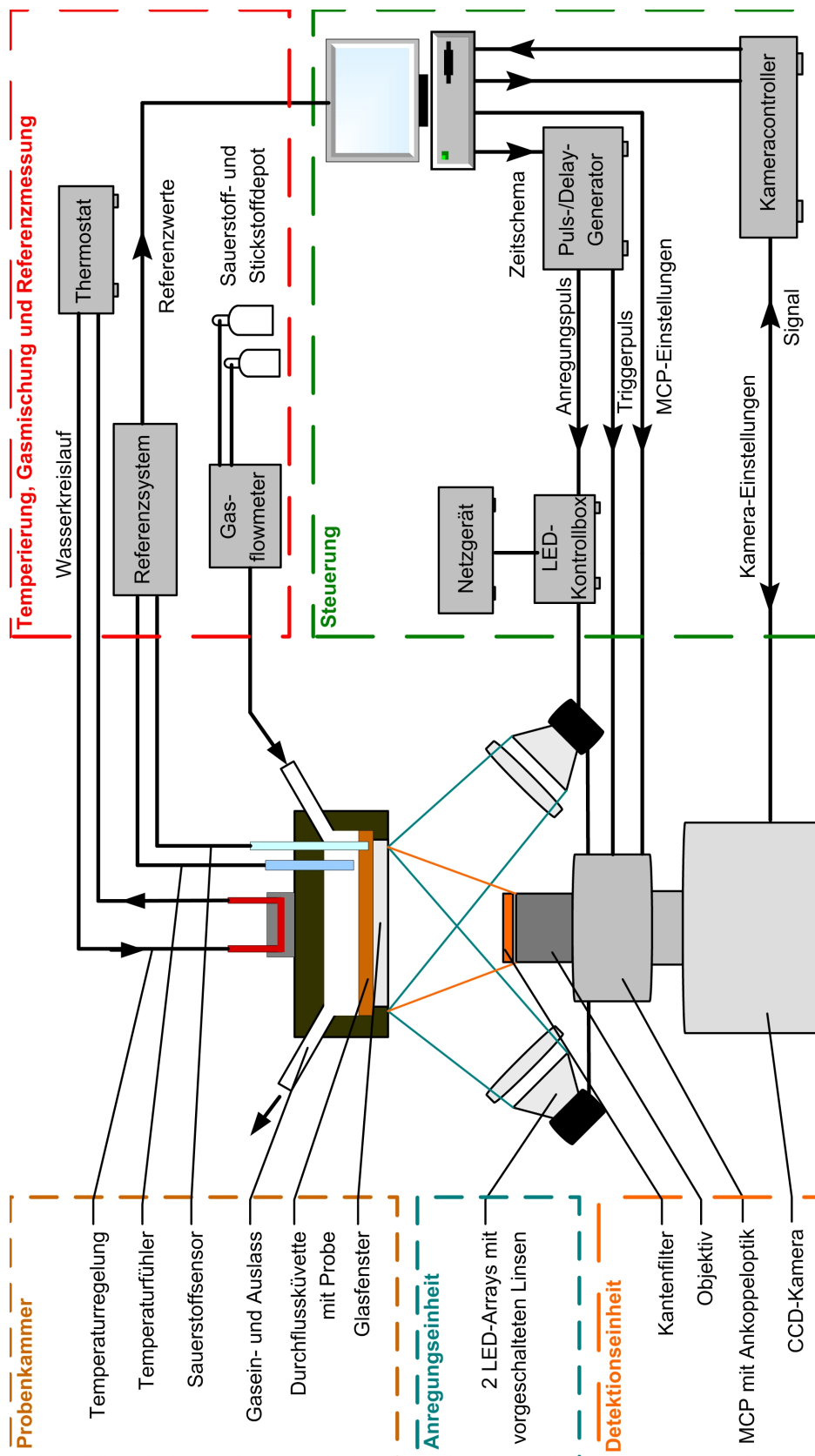


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Aufbaus: Anregungseinheit bestehend aus zwei LED-Arrays mit vorgeschalteter Kollimieroptik und Linsen, Detektionseinheit bestehend aus Objektiv, Kantenfilter, Bildverstärker (Multi-Channel-Plate, MCP) mit einer 1:1 Ankoppeloptik und CCD-Kamera, temperierte Durchflussküvette mit Gasein- und Auslass und eingestecktem Referenzsystem.

abgebildet. Die zeitliche Steuerung für die Detektion der beiden Intensitätsbilder zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 nach dem Anregungspuls erfolgt über den Bildverstärker, da die Kamera selbst nicht zeitlich geschaltet werden kann. Da die gemessenen Intensitäten während eines Abfalls sehr gering sind, werden mehrere Anregungspulse generiert und die Lumineszenzintensitäten addiert. Die Addition der Intensitäten erfolgt dabei direkt auf dem Kamera-Chip, während nur der Bildverstärker geschaltet wird. Der Zeitpunkt der Belichtung t , die Belichtungszeit Δt_{Int} und die Wiederholfrequenz f der Pulse wird mit einem TTL-Signal des Generators gesteuert, das an den Bildverstärker geleitet wird. Die Intensität der Lumineszenzbilder wird durch die variabel einstellbare Verstärkung (MCP Gain) mit dem Steuerprogramm angepasst.

Vor dem MCP ist ein Objektiv angebracht, mit dem die Proben scharf auf das MCP-Eingangsfenster abgebildet werden. Um die Lumineszenz von dem Anregungslicht und dem Streulicht der Umgebung zu trennen, ist vor dem Objektiv ein Kantenfilter eingebaut, der nur Licht mit einer Wellenlänge größer als $\lambda = 575\text{ nm}$ transmittiert. Um das System vor Raumlicht und Licht anderer Geräte zusätzlich zu schützen, ist es in einem schwarzen Kasten untergebracht. Dieser ist, bis auf eine Öffnung für die Kabeldurchführung, vollständig lichtundurchlässig aufgebaut.

Der Kalibrieraufbau besteht aus einem temperierbaren Küvettenhalter, in den eine Küvette (2,5 ml Makro-Küvette) mit der Probe eingesteckt werden kann. Die Küvette ist $12,5 \cdot 12,5\text{ mm}^2$ breit und 45 mm hoch. Die Probenfläche beträgt $10 \cdot 10\text{ mm}^2$, von der $5 \cdot 5\text{ mm}^2$ als Objektfläche abgebildet werden. So können Lichtreflexe des Küvettenrandes und die Halterung der Küvette aus der Abbildung ausgeschlossen werden. Unterhalb der Küvette ist ein Magnetrührer (Magnet Stirrer R1000, Fa. Roth) angebracht, der die Probe mittels eines in der Küvette befindlichen Magnetrührstabes durchmischt. Innerhalb der Probe werden die Sauerstoffkonzentration und die Temperatur mit dem Referenzsystem (OxygenMeter, Fibox 3, Fa. PreSens GmbH) gemessen. Dieses Referenzsystem besteht aus einem Temperaturfühler und einer punktuell messenden Sauerstoffsonde, die ebenfalls auf der Messung der Lumineszenz eines Farbstoffs beruht. Die Sauerstoffkonzentrationsänderung in der Küvette erfolgt über einen in die Probe eingebrachten Schlauch. Dieser ist an einen Gasflussmesser (Model L-1370-060, Fa. Brooks Instrument B.V.) angeschlossen, der mit einer Sauerstoffgasflasche (O_2 verdichtet, Reinheit $\geq 99,5\%$, Fa. Linde Ag) und einer Stickstoffgasflasche (N_2 verdichtet, Reinheit $\geq 99,8\%$, Fa. Linde AG) verbunden ist. Über den Gasflussmesser wird die Strömungsgeschwindigkeit und die Sauerstoffkonzentration des Gases eingestellt.

Die Temperierung der Küvette erfolgt über den Thermostaten (Model U10, Fa. MLW), der über einen Wasserkreislauf die Küvette erwärmt. Das Wasser wird in dem Vorratsbehälter des Thermostaten auf die gewünschte Temperatur erwärmt und mit einer Pumpe durch den Schlauchkreislauf gepumpt. Der Kreislauf durchläuft den Küvettenhalter und erwärmt die-

sen sowie die darin befindliche Küvette. Die Temperatur im Vorratsbehälter wird über einen Temperaturfühler eingestellt und reguliert, so dass diese während der Messzeit im Vorratsbehälter und daher auch in der Küvette konstant ist.

Die zweite Probenkammer ist eine temperierbare Durchflussküvette, in die sowohl flüssige als auch feste Proben eingebracht werden können und die für die *in vitro* Versuche geeignet ist. Die Probenfläche beträgt $30 \cdot 30 \text{ mm}^3$, von der $25 \cdot 25 \text{ mm}^2$ auf den Kamerachip abgebildet werden. Die Kammer ist so ausgelegt, dass verschiedene Probendicken ($d = 0 - 15 \text{ mm}$) und deren Ansprechverhalten durch das Einlegen von unterschiedlich dicken Zwischenlegscheiben vermessen werden können. Die Küvette hat einen Gaseinlass, der an den Gasflussmesser angeschlossen ist, sowie einen Gasauslass. Über den auf die Durchflussküvette aufgeschraubten Kalibrierküvettenhalter, der an den Wasserkreislauf des Thermostaten angeschlossen ist, ist die Durchflussküvette temperierbar, und die Sauerstoffkonzentration sowie die Temperatur sind innerhalb der Küvette mit dem Referenzsystem messbar.

3.3.2 Ansteuerung und Auswertung

Die zeitliche Steuerung der Bildaufnahme wird mit dem Puls-/Delay-Generator realisiert. Dieser Generator liefert vier TTL-Signale, A , B , C und D , die zu dem Haupttriggersignal T_0 zeitlich variabel geschaltet werden können. Die TTL-Signale werden zu der eingestellten Zeit von 0 Volt auf 4 Volt geschaltet und nach $800 \mu\text{s}$ wieder auf 0 Volt zurückgesetzt. Die Wiederholfrequenz f des Haupttriggers und der Signale ist variabel einstellbar.

Die ersten beiden TTL-Signale, A und B , werden für die Steuerung des Lumineszenz-anregungspulses genutzt. Dabei markiert der Start des Signals A den Start des Anregungspulses und der Start des Signals B das Ende. Das resultierende Signal ist als Rechteckpuls am Signalausgang \overline{AB} des Generators abgreifbar. Die Länge des Pulses ist über den zeitlichen Verzug von A und B zu T_0 einstellbar.

Die beiden TTL-Signale C und D werden für die Steuerung der Belichtungszeit genutzt. Dabei ist das Startsignal vom TTL-Signal C das Startsignal für das Integrationszeitfenster und das Startsignal von D das Endsignal. Dieses Signal ist am Signalausgang \overline{CD} des Generators verfügbar. Da das MCP mit maximal 10 kHz geschaltet werden kann, ist die maximale Wiederholfrequenz der Signale f_{max} auf diesen Wert begrenzt.

Die Werte für die Wiederholfrequenz f und die Signale \overline{AB} und \overline{CD} werden über das Steuerprogramm eingegeben und über eine GPIB-Schnittstelle an den Generator gesendet. Die Zeit, bis der Generator neue Werte übernommen hat, beträgt 2 Sekunden. Da für die Bestimmung der Lebensdauer zwei bzw. mit einer Untergrundkorrektur drei Intensitätsbilder aufgenommen werden müssen, müssen zwischen den Aufnahmen die Zeiten für die Signale C und D verschoben und die neuen Werte an den Generator gesendet werden. Dies begrenzt

die Schnelligkeit der Messung und damit die maximale Anzahl der Bilder pro Minute auf 6 Bilder/min . Das Zeitschema des Generators für die Steuerung der LED-Arrays, des MCPs und der Kamera ist schematisch in Abb. 3.4 dargestellt.

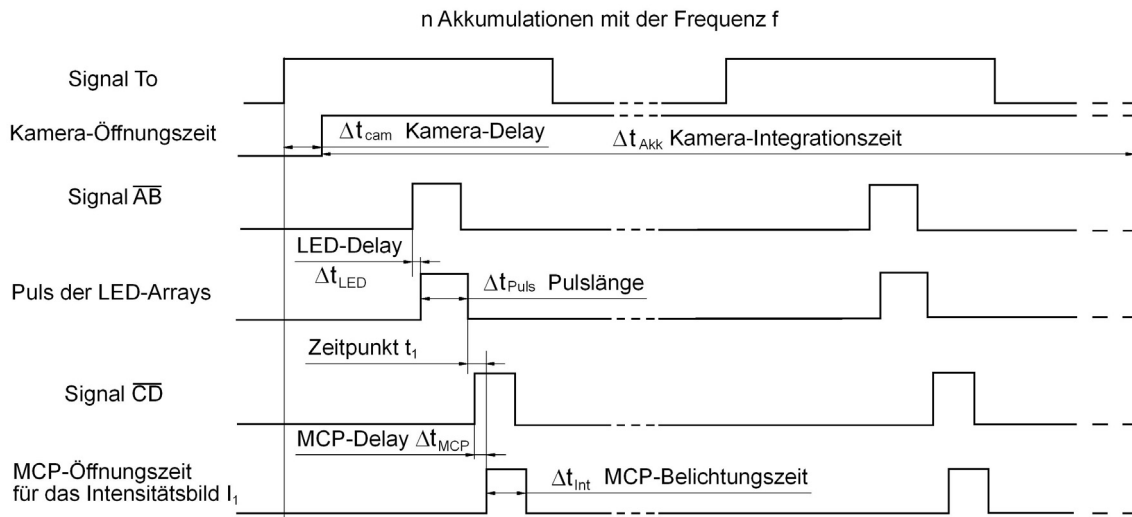


Abbildung 3.4: Zeitschema für die Steuerung der CCD-Kamera, der LED-Arrays und des MCPs.

Während das MCP zeitlich für die Aufnahme der Intensitäten geschaltet wird, werden die Lumineszenzintensitäten mit der CCD-Kamera detektiert und auf dem Kamerachip integriert. Um die im Programm eingegebene Anzahl n von Belichtungen auf dem Chip akkumulieren zu können, integriert die Kamera, während das MCP mit der Wiederholfrequenz f geschaltet wird. Um die eingestellte Anzahl von Pulsen innerhalb einer Kamerabelichtungszeit zu erzielen, wird diese aus der Anzahl der Akkumulationen n und der Wiederholfrequenz f mittels $\Delta t_{Akk} = n/f$ berechnet, und über eine RS232-Schnittstelle an die Kamera gesendet. Die Verstärkung des MCPs kann ebenfalls über eine RS232-Schnittstelle, über die das MCP mit dem Rechner verbunden ist, eingestellt werden. Die Übertragung der gemessenen Bilder erfolgt von der Kamera über eine Framegrabberkarte (PCDig, Fa. Coreco Imaging). Diese wird über das Steuerprogramm gesteuert, und die Daten werden vom Programm von dort eingelesen. Die Anzeige und Auswertung der Bilder erfolgt ebenfalls mit dem Steuerprogramm.

Mit dem Steuerprogramm können sowohl Intensitätsbilder aufgenommen, als auch die Lebensdauerbilder berechnet werden. Um ein Objekt zu positionieren und die Belichtung des Bildes einzustellen, steht ein Live-Bild-Modus zur Verfügung. In diesem Modus werden kontinuierlich Intensitätsbilder aufgenommen und angezeigt.

Für die Berechnung der Lebensdauerbilder werden zwei Intensitätsbilder detektiert. Wird die Untergrundkorrektur der Bilder gewünscht, so wird ein drittes Intensitätsbild, das zeitlich vor dem Anregungspuls liegt, aufgenommen und von den beiden anderen Intensitätsbildern

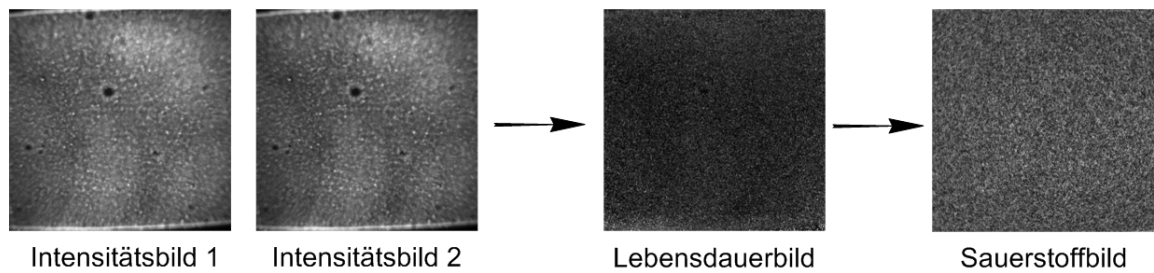


Abbildung 3.5: Berechnung des Lebensdauerbildes aus zwei untergrundkorrigierten Intensitätsbildern und Berechnung des Sauerstoffbildes aus dem Lebensdauerbild am Beispiel der FOXY-Schicht.

abgezogen. Aus diesen beiden Bildern oder auch aus zwei nicht untergrundkorrigierten Bildern wird dann pixelweise die Lebensdauer berechnet. Die Aufnahme der Intensitätsbilder, die Untergrundkorrektur und die Berechnung der Lebensdauer für ein Lebensdauerbild erfolgt automatisch. Exemplarisch sind in Abb. 3.5 zwei korrigierte Intensitätsbilder und das aus diesen berechnete Lebensdauerbild gezeigt.

Für die Kalibrierung des Systems werden Kalibrierkurven und Stern-Volmer-Graphen gemessen, um die Abhängigkeit der Lebensdauer von der Sauerstoffkonzentration zu bestimmen. Sind die Abhängigkeiten bekannt, so kann aus der Lebensdauer die Sauerstoffkonzentration berechnet werden und ein Sauerstoffkonzentrationsbild angezeigt werden, wie in Abb. 3.5 gezeigt ist. Zur Vereinfachung der Analyse der Bilder können dabei ausgewählte Sauerstoffkonzentration oder Konzentrationsbereiche in den angezeigten Bildern farbig markiert werden. Die Aufnahme der Lebensdauerbilder für die Erstellung der Kalibrierkurven erfolgt automatisch mit einem variabel einstellbaren Zeitverzug zwischen den Bildern. Die Auswertung der Intensitäts- und Lebensdauerbilder erfolgt ebenfalls automatisch und die berechneten Werte werden am Ende eines solchen Lebensdauerbildescans in einer Textdatei ausgegeben. Die ausgegebenen Werte umfassen die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Fehler der Mittelwerte, sowohl der Intensitäts- als auch der Lebensdauerbilder, sowie den Zeitpunkt der Messungen in Bezug zur Startzeit des Scans.

Um die zu Grunde liegenden Lebensdauern eines mehrfach exponentiellen Lumineszenzabfalls bestimmen zu können, kann die Aufnahme eines Intensitätsverlaufs, also die Aufnahme von Intensitäten zu verschiedenen Zeitpunkten während des Abklingens, automatisch erfolgen. Die Anpassung der Modellfunktion an diese Werte erfolgt jedoch nicht automatisch, sondern muss mit einem separaten Fitprogramm durchgeführt werden.

3.3.3 Anregungseinheit

Die Anregung der Farbstoffproben erfolgt mit zwei Hochleistungs-LED-Arrays, deren Emissionswellenlänge an die Farbstoffe angepasst ist, um diese zu Lumineszenz anregen zu können. Das Spektrum der LED-Arrays wurde mit einem CDI-Spektrograph (Fa. Control-

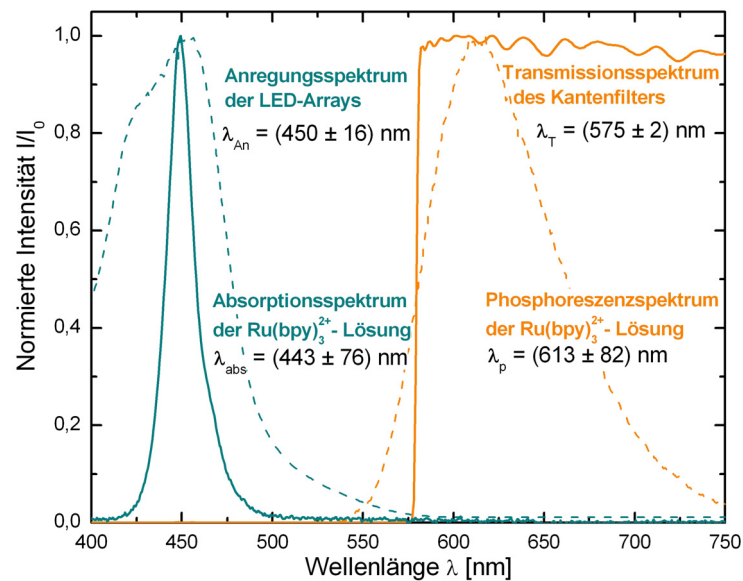


Abbildung 3.6: Anregungsspektrum der LED-Arrays und Transmissionsspektrum des Kantenfilters mit dem Absorptions- und Phosphoreszenzspektrum der $Ru(bpy)_3^{2+}$ -Lösung.

Development Inc.) vermessen, um den Überlapp der Anregung mit der Absorptionscharakteristik der Farbstoffe zu überprüfen. Das gemessene Spektrum ist in den Abb. 3.6 und 3.7 zusammen mit den Absorptionsspektren der Farbstoffe gezeigt. Das Maximum der Anregung liegt bei $\lambda_{An} = 450 \pm 16 \text{ nm}$ und die Arrays sind daher für die Anregung beider Farbstoffe gut geeignet.

Die LED-Arrays bestehen aus $4 \cdot 4$ LED-Emissionsstreifen, die auf einer Fläche von $4 \cdot 4 \text{ mm}^2$ auf einer Platine angeordnet sind (siehe Abb. 3.8 A). Auf dieser Platine sind eine 4° -Kollimieroptik und davor eine Linse ($f = 27 \text{ mm}$) angebracht, um das Licht auf das Objektfeld zu kollimieren. Die LED-Arrays mit den Kollimieroptiken sowie den Linsen sind in zwei Halteringen eingeschraubt, die an zwei beweglichen Haltearmen befestigt sind (siehe Abb. 3.8 D). Die LED-Arrays befinden sich daher seitlich neben dem Bildverstärker und können variabel justiert werden. So kann ein geringer Abstand zwischen den Arrays und der Farbstoffprobe realisiert werden, der in einer Maximierung der Bestrahlungsstärke auf der Probe resultiert, ohne das Blickfeld einzuschränken.

Da die LED-Emissionsstreifen auf der Platine in vier Gruppen sortiert aufgebracht sind, entsteht bei der Abbildung durch die Kollimieroptik und durch die Linse eine inhomogene Bestrahlung des Objektfeldes, so dass die Bestrahlungsstärke im Bildfeld nicht konstant ist. Im Aufbau werden zwei LED-Arrays verwendet, so dass durch geeignete Justage die Bestrahlungsleistung weitgehend homogenisiert werden kann. Aber auch dann bleibt das Muster der LEDs auf dem Objekt erhalten, wie in Abb. 3.8 B) und C) gezeigt ist. Da für die Bestimmung der Lebensdauer die RLD-Methode verwendet wird und nur das Intensitätsverhältnis in die Berechnung eingeht, hat die inhomogene Ausleuchtung keinen Einfluss auf

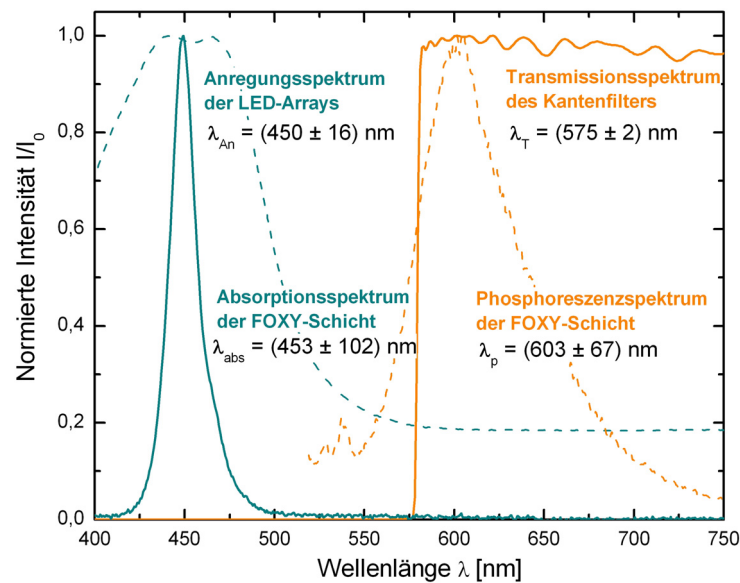


Abbildung 3.7: Anregungsspektrum der LED-Arrays und Transmissionsspektrum des Kantenfilters mit dem Absorptions- und Phosphoreszenzspektrum der FOXY-Schicht.

die Lebensdauerbestimmung.

Die Steuerung der LED-Arrays erfolgt mit dem TTL-Signal \overline{AB} des Generators. Dieses wird zu einer selbst gebauten LED-Kontrollbox geführt, in der ein Transistor eingebaut ist. Dieser Transistor schaltet die Spannung eines separaten Netzgeräts zu den LED-Arrays weiter, wenn das TTL-Signal für die Zeit der Pulslänge von 0 auf 4 Volt gesetzt ist, so dass erst dann die LEDs mit Strom versorgt werden. Das Rechtecksignal des TTL-Pulses wird so in einen annähernd rechteckigen Lichtpuls der LED-Arrays umgewandelt. Die Schaltzeit des Transistors und der LEDs führt zu einem Verzug des Pulses Δt_{LED} , so dass der Lichtpuls um diese Verzugszeit verzögert wird. Der verzögerte Start des Pulses ist für die Lebensdauerermessung nicht relevant, wohingegen der Verzug des Pulsendes für die Vermessung der Lumineszenzlebensdauer beachtet werden muss. Da die Verzugszeit des Pulses auch von der Versorgungsspannung der LEDs abhängt, ist diese für die Messungen fest am Netzgerät auf $U = 6,83 \text{ Volt}$ eingestellt. Die gemessene Verzugszeit des Pulsendes für diese Spannung beträgt $\Delta t_{LED} = 1,74 \mu\text{s}$.

Der TTL-Puls wird durch die LED-Schaltung jedoch nur in einen annähernd rechteckigen Lichtpuls umgewandelt. Die Flankensteilheit des Pulsendes muss ebenfalls für die Lebensdauerermessung beachtet werden. Die Vermessung der Flanke erfolgte mit einer Avalanche-Photodiode (C5460, Fa. Hamamatsu), die eine Cut-off-Frequenz von 10 MHz hat und somit eine Zeitauflösung von 100 ns liefert. Die Messung der Flankensteilheit des Lichtpulsendes ergab einen Wert von $\Delta t_{Flanke} = 192 \text{ ns}$ (siehe Abb. 3.9).

Der in Kap. 2.1 erläuterte Zusammenhang zwischen der Lumineszenzlebensdauer und der Quencherkonzentration gilt nur, wenn die Anzahl der im angeregten Zustand befind-

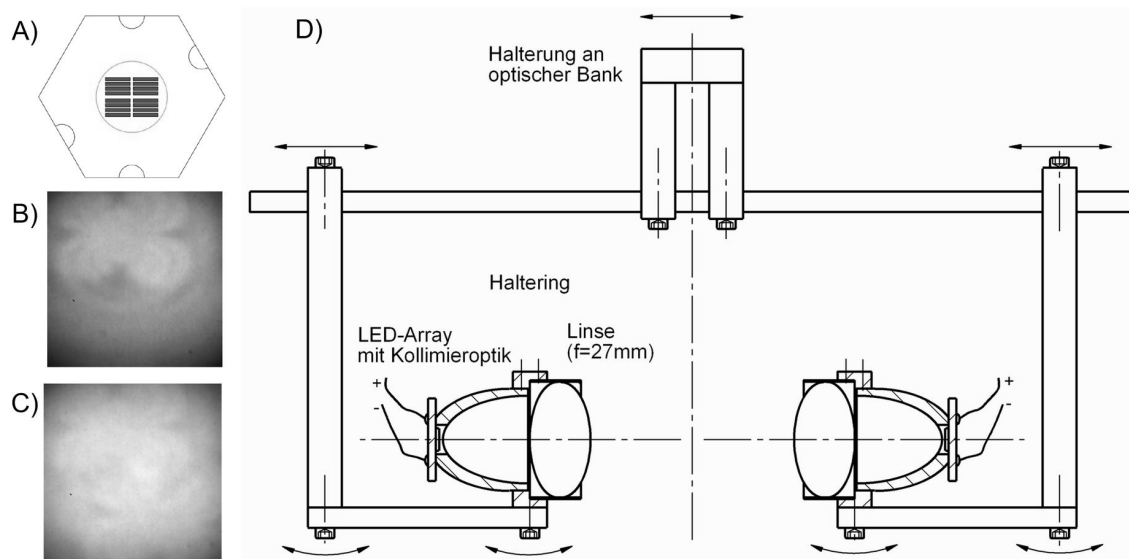


Abbildung 3.8: A) Anordnung der einzelnen LEDs auf der Platine, B) Darstellung der LED-Beleuchtung auf der Probe: mit einem Array, C) mit zwei Arrays, D) Schematische Darstellung der LED-Halterung, die Pfeile markieren die Justagepunkte.

lichen Moleküle T_1 pro Zeiteinheit konstant, also $dT_1/dt = 0$, ist. Dies kann mit einer pulsformigen Anregung jedoch nur erreicht werden, wenn die einzelnen Lichtpulse hinreichend lang sind. Dieser stationäre Zustand wird in einer Probe erreicht, wenn während der Anregung ein Sättigungswert der Lumineszenz erreicht wird. Das theoretische Rechtecksignal des Generators, der von den LED-Arrays ausgesandte und gemessene Lichtpuls und die gemessenen Lumineszenzantworten der beiden Farbstoffe sind in Abb. 3.10 dargestellt. Für den Farbstoff $Ru(bpy)_3^{2+}$ zeigte sich eine Sättigung der Lumineszenz bereits bei einer Pulslänge von weniger als $8\mu s$, wohingegen für die FOXY-Schicht auf Grund der längeren Lebensdauer eine Pulslänge von $10\mu s$ benötigt wird. Da sich die benötigten Pulslängen für die beiden Farbstoffe unterscheiden, unterscheidet sich auch der mittlere Stromverbrauch der LED-Arrays.

Die mit den LED-Arrays erreichte Bestrahlungsstärke ist abhängig von der verwendeten Kollimieroptik und dem Abstand der Arrays zum Objekt. Weiter haben die Justage der Arrays und die Überlagerung der LED-Muster der beiden LED-Arrays Einfluss auf die Bestrahlungsstärke. Die Messung der Bestrahlungsstärke wurde daher einerseits in Abhängigkeit des Abstandes zum Objekt und andererseits entlang der x - und y -Achsen des Bildfeldes gemessen. Hierzu wurde ein Detektor für den sichtbaren Spektralbereich (Messkopf VIS) und das Leistungsmessgerät LabMaster (Fa. Coherent) verwendet.

Die Messung der Bestrahlungsstärke in Abhängigkeit des Abstandes zum Objekt ergab einen Bereich, in dem diese innerhalb eines Fehlerbereiches von 10% unabhängig vom Abstand ist. Dieser liegt zwischen $65 - 95\text{mm}$, wie in Abb. 3.11 dargestellt ist. Bei einem klei-

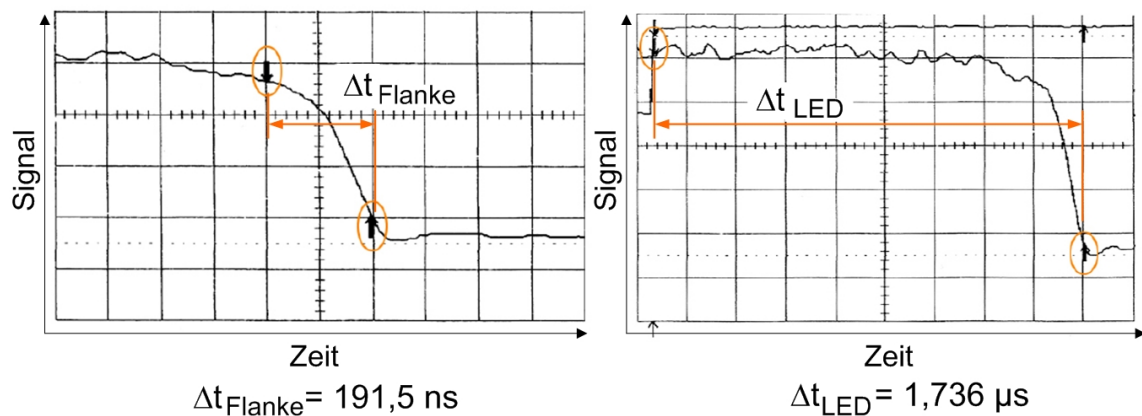


Abbildung 3.9: Messung der Flankensteilheit des Pulsendes Δt_{Flanke} und der LED-Verzugszeit Δt_{LED} mit der Avalanche-Photodiode (10 MHz).

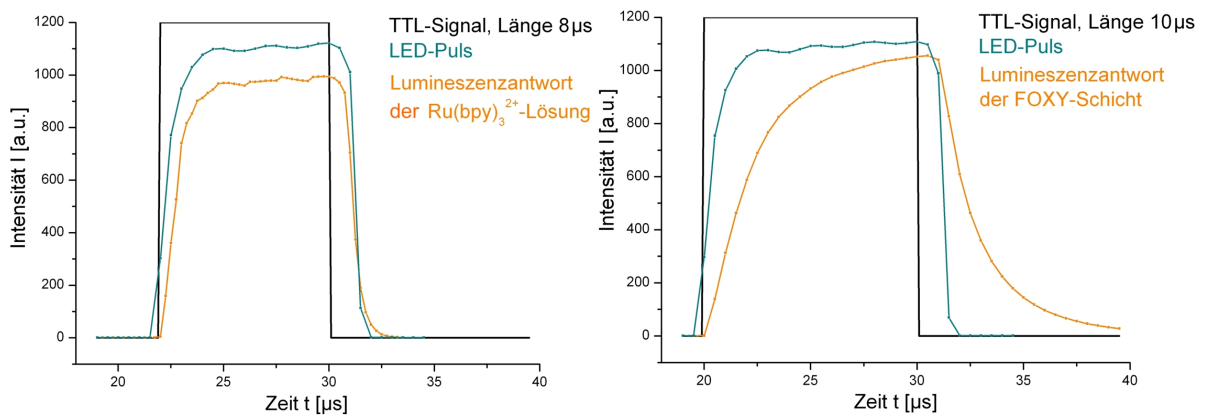


Abbildung 3.10: Vermessung des LED-Pulses: theoretisches Rechtecksignal des Generators, gemessener Lichtpuls der LED-Arrays und gemessene Lumineszenzantworten der $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -Lösung (links) und der FOXY-Schicht (rechts).

neren oder bei einem größeren Abstand sinkt die Bestrahlungsstärke im Objektfeld und steigt erst bei einem Abstand von weniger als 35 mm wieder an. Bei diesem Abstand ist jedoch keine scharfe Abbildung mehr möglich und die Justage der LED-Arrays beeinträchtigt entweder die Abbildung oder die homogene Ausleuchtung, da die Arrays in einem sehr steilen Winkel zum Objekt aufgehängt werden müssen. Es wurde daher der Abstand von 85 mm für die Abbildung ausgewählt. Die LED-Arrays müssen bei diesem Abstand in einem Winkel von 42° zur optischen Achse aufgehängt werden.

Die Bestrahlungsstärke wurde weiter entlang der x- und y-Achse des Bildfeldes bei dem Abstand von 85 mm vermessen. Die Messung ergab, dass sie in der Mitte des Bildfeldes maximal ist und nach außen hin in beiden Bildachsen abfällt. Die Ausleuchtung der Bildfläche ist demnach nicht gleichmäßig, kann aber in dem abgebildeten Bildfeld von $25 \cdot 25 \text{ mm}^2$, bzw. von $5 \cdot 5 \text{ mm}^2$, als homogen angesehen werden, wie in Abb. 3.11 gezeigt

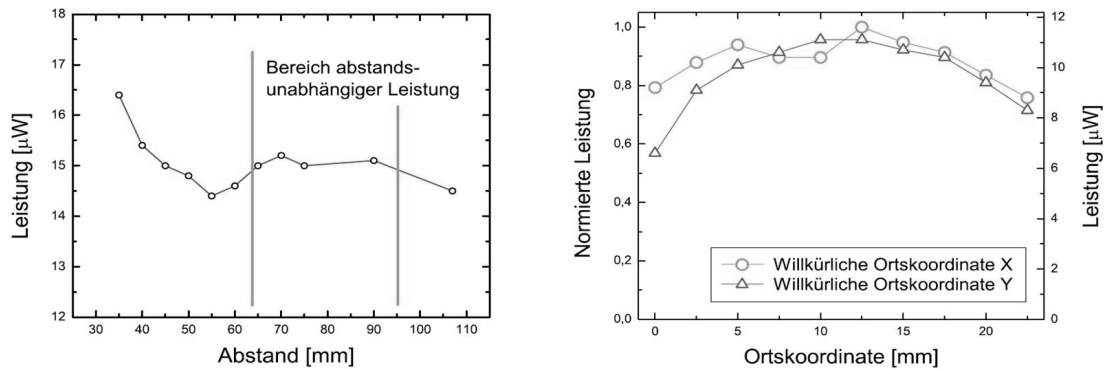


Abbildung 3.11: Leistung der LED-Arrays in Abhängigkeit des Abstandes zum Objekt (links) und entlang der x - und y -Achse des Bildfeldes bei dem Abstand von 85 mm (rechts).

ist. In dem Bildbereich von $5 \cdot 5\text{ mm}^2$ schwankt die mit dem Messkopf gemessene Leistung um max. $7,5\%$. Bei dem größeren Bildbereich von $25 \cdot 25\text{ mm}^2$ schwankt sie im Randbereich um bis zu 34% , in dem mittleren Bereich von $2,5 - 20\text{ mm}$ beträgt die Schwankung aber lediglich 12% . Der mittlere Wert beträgt $\bar{P} = 10,0 \pm 0,3\ \mu\text{W}$ bei einer Detektorfläche von $A = 0,385\text{ cm}^2$. Die Bestrahlungsstärke \bar{I} beträgt daher im Mittel

$$\bar{I} = \frac{\bar{P}}{A} = 26,0 \pm 0,8\ \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}. \quad (3.11)$$

Diese mittlere Bestrahlungsstärke ist, da die LED-Arrays nur im Pulsbetrieb betrieben werden können, abhängig von der Wiederholfrequenz f und der eingestellten Pulslänge Δt_{Puls} . Die in der Messung verwendeten Werte sind $f = 1000\text{ Hz}$ und $\Delta t_{\text{Puls}} = 5\ \mu\text{s}$, so dass die Zeit, die die LED-Arrays pro Sekunde betrieben werden, $t_B = 5\text{ ms}$ ist. Die gemessene Bestrahlungsstärke muss daher auf diese Betriebszeit pro Sekunde bezogen werden, so dass sich daraus die tatsächliche Anregungsbestrahlungsstärke der LED-Arrays I_{An} berechnen lässt:

$$I_{An} = \frac{\bar{I}}{t_B/1\text{ s}} = 52 \pm 2\ \text{W}/\text{m}^2. \quad (3.12)$$

Der verwendete Detektor ist so gebaut, dass die Detektorfläche 6 mm hinter der Auflagefläche des Detektormesskopfes liegt. Die so ermittelte Bestrahlungsstärke ist daher ebenfalls nur für eine Ebene 6 mm hinter der Probenfläche gültig. Der gemessene Wert dient dennoch als eine gute Näherung und kann als minimale Bestrahlungsstärke angesehen werden. Der exakte Wert ist für die Anwendung nicht relevant, weil in die Lebensdauerberechnung lediglich das Verhältnis der Lumineszenzintensitäten eingeht. Dennoch muss eine relativ homogene Anregung erzielt werden, um alle Moleküle in der Probe zu Lumineszenz anzuregen und eine Sättigung der Lumineszenz während des Anregungspulses zu erreichen. Dies ist in diesem Fall gegeben.

3.3.4 Detektionseinheit

Die Detektionseinheit besteht aus dem Kantenfilter, dem Objektiv und dem MCP, das mit der Ankoppeloptik an die CCD-Kamera gekoppelt ist. Um die Lumineszenz der Farbstoffe von dem Anregungs- und Umgebungslicht zu trennen, ist vor dem Objektiv ein Kantenfilter eingebaut, der nur Licht mit einer Wellenlänge größer als $\lambda = 575 \pm 2 \text{ nm}$ transmittiert. Das Transmissionsspektrum des Filters wurde mit dem UV/Vis-Spektrometer Typ Lambda 2 der Firma Perkin-Elmer gemessen. Es ist zusammen mit den Phosphoreszenzspektren der beiden Farbstoffe in den Abb. 3.6 und 3.7 dargestellt. Da die Lumineszenzmaxima der Farbstoffe bei $\lambda_{p,Ru} = 613 \text{ nm}$ und $\lambda_{p,FOXY} = 603 \text{ nm}$ liegen, wird die Lumineszenz durch den Filter transmittiert, während das kurzwellige Anregungslicht blockiert wird.

Die Abbildung des Bildfeldes erfolgt mit dem Objektiv, welches das Bildfeld scharf auf das Eingangsfenster des MCPs abbildet. Die Brennweite des Objektivs ist $f = 23 \text{ mm}$, so dass ein Bildfeld von $25 \cdot 25 \text{ mm}^2$ abgebildet werden kann. Es besitzt eine manuell verstellbare Blende von $k = 1,4 - 11$. Für Messungen in der Kalibrierküvette wird die Abbildung eines Bildfeldes von $5 \cdot 5 \text{ mm}^2$ benötigt. Hierfür wird das Objektiv umgekehrt vor dem MCP befestigt, so dass es als Makroobjektiv genutzt wird.

Da die gemessenen Lumineszenzintensitäten relativ schwach sind, wird ein Bildverstärker für die Messungen benötigt. Dieser Bildverstärker verstärkt intern die gemessenen Intensitäten und bildet das Bild vom Eingangsfenster scharf auf den Phosphoreszenzschirm ab. Die Höhe der Verstärkung kann über das Steuerprogramm variabel eingestellt werden, wobei die Intensitätswerte exponentiell mit dem eingestellten Verstärkungswert steigen. Mit der 1:1 Ankoppeloptik wird der Phosphoreszenzschirm auf den CCD-Chip der Kamera abgebildet. Der Bildverstärker ist über das TTL-Signal \overline{CD} des Generators schaltbar mit einer minimalen Pulslänge von 10 ns und einer maximalen Wiederholfrequenz von $f = 10 \text{ kHz}$.

Die CCD-Kamera ist eine hochempfindliche 2/3"-Chip Kamera mit $1280 \cdot 1024$ Pixeln, von denen jedoch nur $1024 \cdot 1024$ Pixel ausgelesen werden. Die Pixel sind quadratisch und haben eine Größe von $6,45 \cdot 6,45 \mu\text{m}^2$. Die Datentiefe pro Pixel beträgt 12 Bit , die in einem 16 Bit -Datenformat abgelegt werden. Die Kamera wird über einen Kamerakontroller, der über eine RS232-Schnittstelle an den Steuerrechner angeschlossen ist, gesteuert. Weiter hat sie eine RS488-Schnittstelle, die mit einer Framegrabberkarte im Rechner verbunden ist. Über diese Verbindung werden die gemessenen Daten auf den Rechner übertragen. Während das MCP durch das TTL-Signal \overline{CD} des Generators repetitiv zu den eingestellten Belichtungszeiten Licht verstärkt und auf den Kamerachip abbildet, misst die Kamera kontinuierlich mit der Belichtungszeit Δt_{Akk} , so dass die Lumineszenzintensitäten von n Akkumulationen auf dem Chip integriert werden. Da die Kamerabelichtungszeit aus der Anzahl der Akkumulationen n und der Wiederholfrequenz f berechnet wird, kann die Anzahl der addierten Intensitäten eingestellt werden. Die Auslesung der mit der Kamera gemessenen

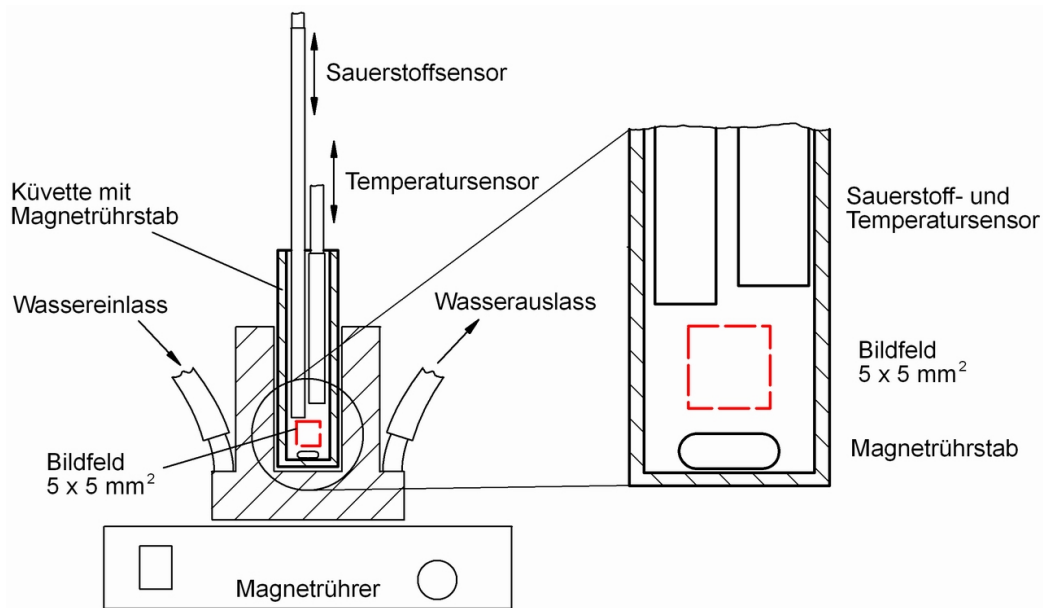


Abbildung 3.12: Zusammenbau der Kalibrierküvette in der Frontansicht: Makro-Küvette mit Magnetrührstab und eingestecktem Temperatur- und Sauerstoffsensor eingesetzt in den temperierten Kuvettenhalter. Das rote umrandete Feld markiert das $5 \cdot 5 \text{ mm}^2$ grosse Bildfeld. Unterhalb des Kuvettenhalters befindet sich der Magnetrührer, der den Magnetrührstab bewegt und damit die Durchmischung der Probe realisiert.

Daten erfolgt über die Framegrabberkarte. Mit dieser können entweder kontinuierlich oder einzeln Bilder von der Kamera abgefragt werden, so dass im Steuerprogramm ein Live-Bild-Modus und ein Einzelbildmodus verfügbar sind.

Die mit dem Messaufbau erzielte Ortsauflösung ergibt sich aus dem abgebildeten Bildfeld und der Pixelanzahl der Kamera. Das abgebildete Bildfeld der Kalibrierküvette beträgt $5 \cdot 5 \text{ mm}^2$ und das der Durchflussküvette $25 \cdot 25 \text{ mm}^2$, so dass die Ortsauflösungen folgende sind:

$$\delta x_{Kali} = 4,9 \mu\text{m}/Pxl \quad \text{und} \quad \delta x_{Durchfluss} = 24,4 \mu\text{m}/Pxl. \quad (3.13)$$

Dies gilt sowohl für die vertikale, als auch für die horizontale Bildachse, da die Pixelanzahl der Kamera in beiden Bildachsen gleich ist und die Pixel quadratisch sind. Da im zweiten Fall ein größeres Bildfeld abgebildet wird, ist die Ortsauflösung kleiner.

3.3.5 Kalibrier Aufbau

Die Aufnahme der Kalibrierkurven und der Stern-Volmer-Graphen für verschiedene Temperaturen und pH-Werte erfolgt mit dem Kalibrier Aufbau, der eine gute Durchmischung der Proben gewährleistet. Er besteht aus dem temperierten Kuvettenhalter mit der Küvette, der Anregungs- und der Detektionseinheit. Eine Zeichnung und ein Foto des Aufbaus sind in den Abb. 3.12 und 3.13 gezeigt.

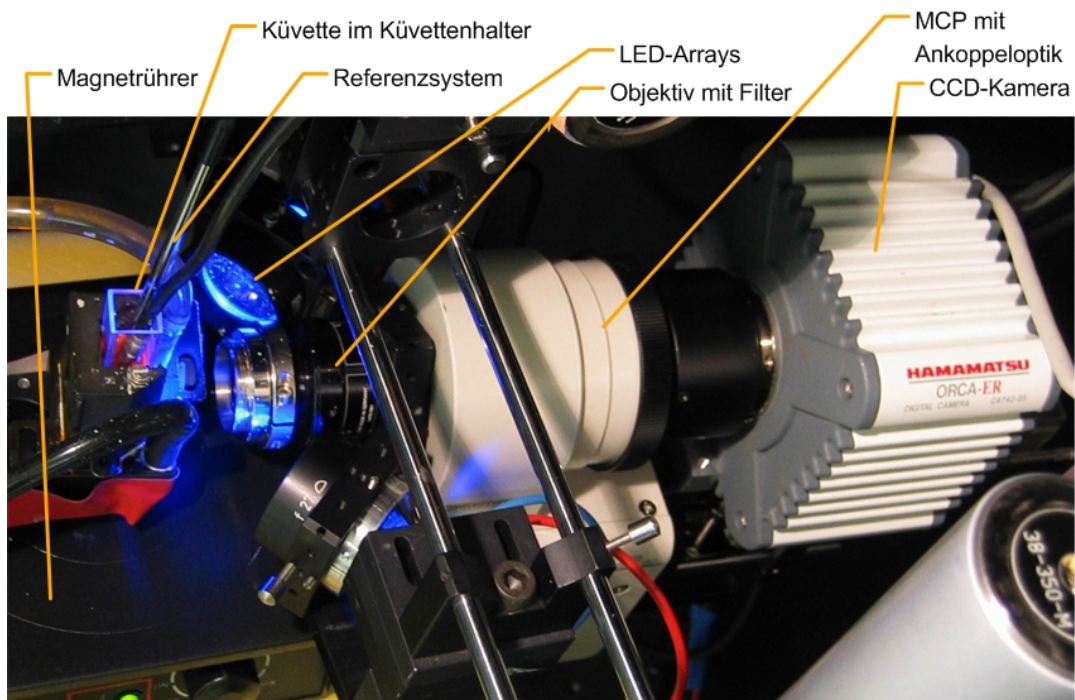


Abbildung 3.13: Foto des realisierten Kalibrierbaus mit der Küvette im temperierten Küvettenhalter, mit dem in der Küvette befindlichen Referenzsystem, dem unterhalb der Küvette befindlichen Magnetrührer und der Anregungs- und Detektionseinheit.

Der Küvettenhalter ist ein metallener Halter, in den eine $12,5 \cdot 12,5 \cdot 45 \text{ mm}^3$ -Makro-Küvette eingesteckt werden kann. Das abgebildete Bildfeld der Küvette beträgt $5 \cdot 5 \text{ mm}^2$. An das Gehäuse können an zwei Schlauchanschlüssen Schläuche befestigt werden, so dass die Küvette über einen Wasserkreislauf erwärmt werden kann. Da der Halter aus Metall ist und nahezu die gesamte Küvette umfasst, wird die in der Küvette befindliche Probe gleichmäßig erwärmt. Der Halter ist dunkelgrün lackiert, so dass keine Lichtspiegelungen die Messung stören.

Die Temperierung des Küvettenhalters wird über den Thermostaten realisiert. Dieser besteht aus einem Wasservorratsgefäß, in dem das Wasser über eine Heizspirale erwärmt wird. Die Einstellung und Kontrolle der Temperatur erfolgt mit einem Temperaturfühler, der an dem Vorratsgefäß befestigt ist. Mit einer integrierten Umwälzpumpe wird das erwärmte Wasser durch den Schlauchkreislauf gepumpt und erwärmt so den Küvettenhalter. Die Temperatur in der Küvette kann zwischen Zimmertemperatur und 50°C auf $\pm 0,5^\circ\text{C}$ genau eingestellt werden.

Die Einstellung der Sauerstoffkonzentration in der Probe erfolgt über einen Gasstrom aus einem Schlauch, der an den Gasflussmesser angeschlossen ist, an den wiederum eine Sauerstoff- und eine Stickstoffgasflasche angeschlossen sind. Mit dem Flussmesser kann die Flussgeschwindigkeit und die Sauerstoffkonzentration des Gases durch die Mischung von Sauerstoff- und Stickstoffgas eingestellt werden. Da das aus den Gasflaschen ausströmende

Gas kälter ist als die Raumluft, ist ein Teil des Gasschlauches in den Thermostatvorratsbehälter eingetaucht, um es, bevor es die Probe erreicht, zu erwärmen.

In der Probe ist ein Magnetrührstab eingebracht, der mit dem unterhalb der Küvette angebrachten Magnetrührer bewegt wird und so die gleichmäßige Durchmischung der Probe realisiert. Die Sauerstoffkonzentration und auch die Temperatur sind so in der Probe an jedem Ort gleich. Für die Kontrolle der Sauerstoffkonzentration und der Temperatur in der Probe ist in die Küvette ein Referenzmesssystem eingebracht. Dieses System der Firma PreSens besteht aus einem Temperaturfühler und einem punktuell messenden Sauerstoffsensor, dem Minisensor OxygenMeter. Beide sind an die Kontrollbox (Fibox 3) angeschlossen. Die Kontrolle des Messsystems und die Datenaufzeichnung erfolgt mit einem auf dem Steuerrechner installierten Programm (OxyView Vs. 5.32). Es ermöglicht die Messung der Temperatur und der Sauerstoffkonzentration in 1 s, 5 s, 10 s oder 30 s-Schritten oder noch längeren Zeitintervallen. Die Temperaturmessung dient zur Korrektur der mit dem Referenzsystem gemessenen Sauerstoffkonzentration, die, da sie ebenfalls auf der Lebensdauermessung eines sauerstoffsensitiven Farbstoffs beruht, temperaturempfindlich ist. Mit Hilfe des Referenzsystems kann die Sauerstoffkonzentration direkt innerhalb der Probe bestimmt werden. Dies ist für die temperaturabhängigen Messungen wichtig, da die Löslichkeit von Sauerstoff in wässrigen Lösungen mit steigender Temperatur abnimmt und so die Referenzierung der Lebensdauerwerte nicht auf Messungen im zugeführten Gas beruhen darf.

3.3.6 Durchflussküvette

Die Durchflussküvette wurde für Messungen an flüssigen und festen Proben mit verschiedenen Dicken von $d = 0 - 15 \text{ mm}$ aufgebaut. Sie ist so konzipiert, dass das Objekt durch eine Quarzglasscheibe von unten beobachtet wird, und daher gut geeignet für *in vitro* Messungen. Der Probenraum ist $30 \cdot 30 \text{ mm}^2$ groß, wovon $25 \cdot 25 \text{ mm}^2$ auf die Kamera abgebildet werden. In Abb. 3.14 ist eine Konstruktionszeichnung der Durchflussküvette und in Abb. 3.15 ein Foto abgebildet.

Die Küvette besteht aus schwarz eloxiertem Aluminium, welches die Probe fast vollständig umschließt. Lediglich das Glasfenster, der Gasein- und Auslass sowie die Öffnungen für den Temperatur- und Sauerstoffsensor des Referenzsystems sind in diese Um-mantelung eingebracht. Das Glasfenster ist eine 4 mm dicke Quarzglasscheibe, die fest in den Boden der Küvette eingeklebt ist. Auf die Bodenplatte können Zwischenlegscheiben mit unterschiedlichen Dicken ($d = 0 - 15 \text{ mm}$) aufgeschraubt werden. Durch Kombination mehrerer Scheiben kann die Dicke in 0,5 mm-Schritten angepasst werden. Zwischen der Bodenplatte und den Zwischenlegscheiben befindet sich ein Gummidichtring, der für die Dichtigkeit der Küvette sorgt. Die Zwischenlegscheiben haben in der Mitte eine quadratische oder runde Öffnung, in die die Probe eingebracht wird. Durch das Anschrauben des

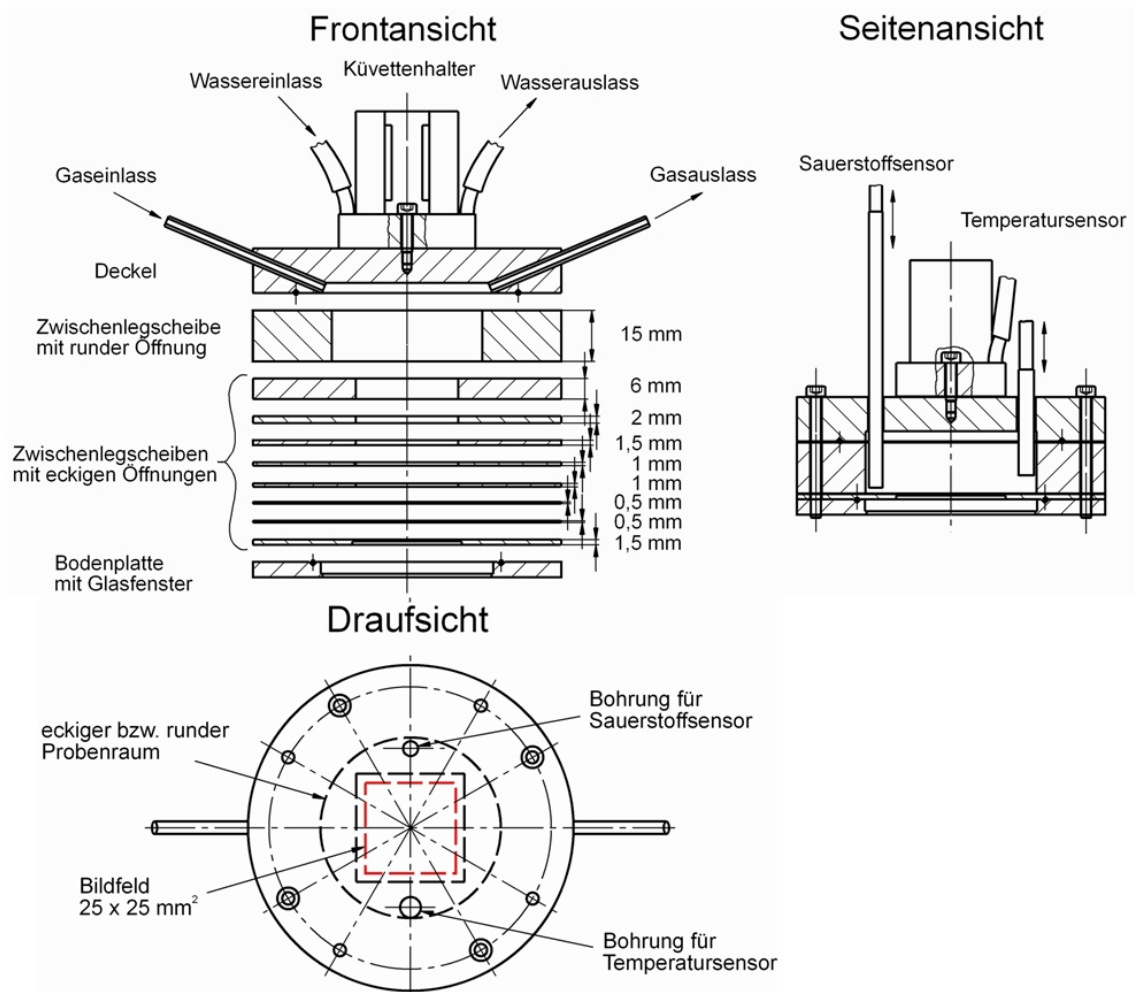


Abbildung 3.14: Konstruktionszeichnung der Durchflussküvette in der Front-, Seiten- und Draufsicht: mit aufgeschraubtem Küvettenhalter für die Temperierung und mit eingebrachtem Temperatur- und Sauerstoffsensor. Der runde bzw. eckige Probenraum ist schwarz gestrichelt, und das Bildfeld von $25 \cdot 25 \text{ mm}^2$ ist rot umrandet dargestellt.

Deckels mit dazwischen aufgelegtem Gummidichtring wird die Küvette geschlossen. In den Deckel sind zwei Metallrohre eingeklebt, die als Gasein- und Auslass dienen. An dem einen Rohr ist der Gasschlauch für den Gaseinlass, der vom Flussmesser kommt, befestigt, an dem anderen der Gasschlauch für den Auslass.

Die Zwischenlegscheiben mit quadratischen Öffnungen sind für die Messungen mit der FOXY-Schicht geeignet, da diese so konstruiert sind, dass die Sol-Gel-Probe fest auf das Sichtglas gepresst wird und nicht mehr verrutschen kann. Die Scheibe mit der runden Öffnung ist für flüssige Proben oder auch für das Einbringen von runden Petrischalen geeignet. In die Petrischalen können z. B. Zellsuspensionen oder Zellrasen eingebracht werden, ohne die Küvette oder die Zellproben zu verunreinigen.

Die Temperierung der Durchflussküvette erfolgt mit dem in Kap. 3.3.5 beschriebenen Küvettenhalter, der über den Wasserkreislauf an den Thermostaten angeschlossen ist. Dafür

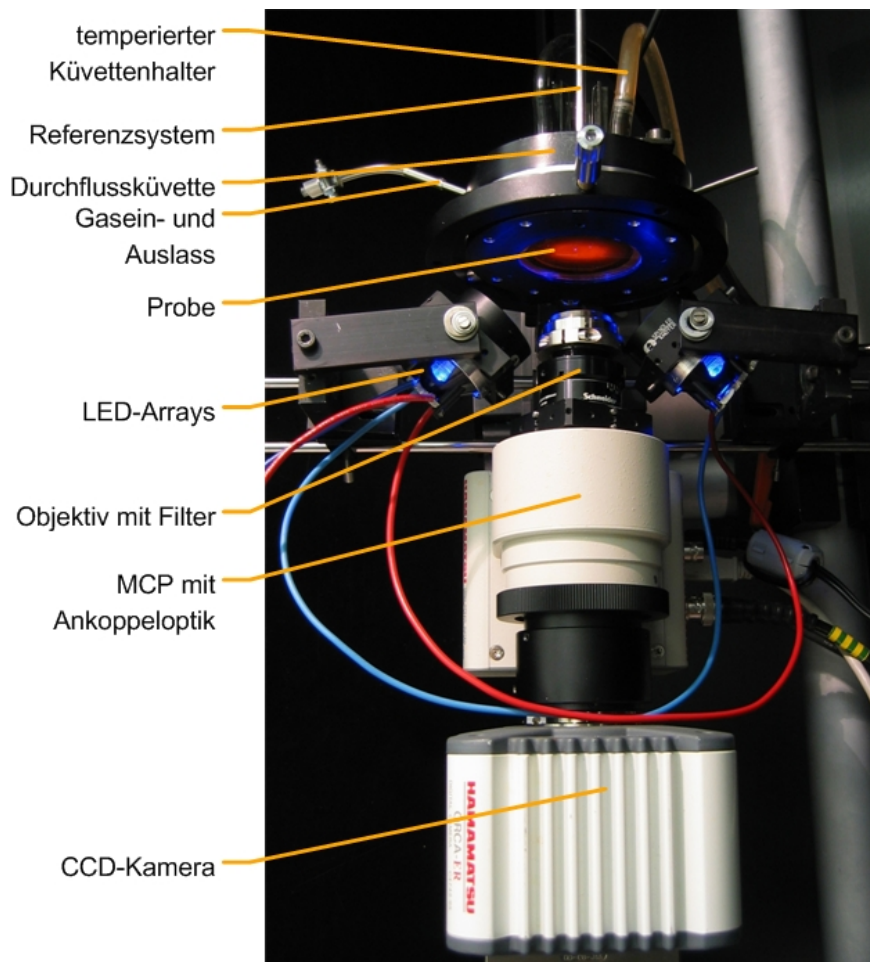


Abbildung 3.15: Foto der Durchflussküvette gefüllt mit einer $Ru(bpy)_3^{2+}$ -Lösung: Die Probe wird mit der Anregungseinheit blau beleuchtet und luminesziert orange-rot. In der Küvette steckt von oben das Referenzsystem.

wird der Küvettenhalter auf den Deckel der Durchflussküvette geschraubt und so in Wärmekontakt mit der Küvette gebracht. Da der Deckel, die Zwischenscheiben und der Boden der Küvette aus Aluminium bestehen und im Wärmekontakt zueinander stehen, wird die Probe gleichmäßig erwärmt. Die Aufwärmphase der Durchflussküvette beträgt ca. 1 Stunde, da die Wärme vom Küvettenhalter über die gesamte Durchflussküvette geleitet werden muss.

Das Sauerstoffmesssystem der Firma PreSens wird auch für die Messungen mit der Durchflussküvette als Referenzsystem verwendet. Durch zwei im Deckel befindliche Bohrungen können der Temperatur- und der Sauerstoffsensoren in die Küvette eingebracht werden. Durch Justage der Einstecktiefe der Fühler in die Küvette können entweder die Temperatur und die Sauerstoffkonzentration in der Probe oder in dem über der Probe befindlichen Luftraum gemessen werden. Die Luftspalte zwischen den Fühlern und den Bohrungen können mit Modelliermasse luftdicht verschlossen werden.