



PARTIKELDETEKTION
IN MIKROFLUIDISCHEN
SYSTEMEN



SIEGFRIED KETTLITZ



Scientific
Publishing

Siegfried Kettlitz

Partikeldetektion in
mikrofluidischen Systemen

Partikeldetektion in mikrofluidischen Systemen

von
Siegfried Kettlitz

Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik, 2015

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Februar 2015

Referenten: Prof. Dr. rer. nat. Uli Lemmer

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Friedrich K. Jondral

Impressum



Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
KIT Scientific Publishing
Straße am Forum 2
D-76131 Karlsruhe

KIT Scientific Publishing is a registered trademark of Karlsruhe
Institute of Technology. Reprint using the book cover is not allowed.

www.ksp.kit.edu



*This document – excluding the cover – is licensed under the
Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 DE License
(CC BY-SA 3.0 DE): <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/de/>*



*The cover page is licensed under the Creative Commons
Attribution-No Derivatives 3.0 DE License (CC BY-ND 3.0 DE):
<http://creativecommons.org/licenses/by-nd/3.0/de/>*

Print on Demand 2015

ISBN 978-3-7315-0364-4

DOI 10.5445/KSP/1000046492

Partikeldetektion in mikrofluidischen Systemen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTOR-INGENIEURS

von der Fakultät für

Elektrotechnik und Informationstechnik
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Ing. Siegfried Werner Kettlitz
geb. in Balingen

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Februar 2015

Hauptreferent: Prof. Dr. rer. nat. Uli Lemmer

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Friedrich K. Jondral

Kurzfassung

In dieser Arbeit wird der Themenbereich der Partikeldetektion mit mikrofluidischen Systemen mit einem Augenmerk auf die mögliche Massenfertigung solcher Systeme mittels Drucktechnologien untersucht.

Der Anwendungsbereich für solche Technologien findet sich vor allem in der Medizin und Biologie, wo Durchflusszytometer zur Analyse von Blut und anderen Körperflüssigkeiten verwendet werden. Hierbei werden menschliche Zellen und Krankheitserreger als Partikel detektiert. Durch Einfärbemethoden können einzelne Zelltypen sehr spezifisch mit Fluoreszenzfarbstoffen versehen werden. Hierdurch kann eine Vielzahl von Anwendungsfällen abgedeckt werden. Für die Detektion werden also unterschiedliche optische Eigenschaften wie Absorption, Streuung und Fluoreszenz verwendet.

Während klassische Durchflusszytometer exzellente Eigenschaften bezüglich Sensitivität und Durchsatz bieten, können mit solchen Ansätzen keine preiswerten Einweg-Analysesysteme für den dezentralen Vor-Ort-Einsatz hergestellt werden. Deshalb wird in dieser Arbeit ein grundlegend anderer Ansatz gewählt. Dies geschieht im Hinblick auf die Druckbarkeit der neu zu entwickelnden optischen Systeme.

Für mikrofluidische Systeme gibt es bereits Ansätze, diese mittels Abformung oder Prägeverfahren in einem Rolle-zu-Rolle-Prozess herzustellen. Das abbildende optische System des klassischen Durchflusszytometers muss jedoch durch einen äquivalenten planaren optischen Aufbau ersetzt werden. Hierfür stehen prinzipiell druckbare optischen Komponenten wie Blenden oder absorbierende Farbschichten zu Verfügung. Des Weiteren können für die elektrooptische Wandlung gedruckte organische Leuchtdioden bzw. organische Photodioden eingesetzt werden.

Um die optischen Parameter wie Absorption, Streuung und Fluoreszenz von Mikropartikeln zu messen werden zwei neuartige mikrofluidische Systeme entworfen, auf Folienbasis realisiert und evaluiert. Das erste eignet sich für die Messung von Fluoreszenz. Das zweite System wird für die kombinierte Messung von Absorption und Streuung ausgelegt. Ein Vergleich von Messungen mit einer anorganischen sowie einer organischen Photodiode zeigt die ausreichende Leistungsfähigkeit von organischen Photodioden.

Bei etablierten Konzepten wird generell das Signal des Streulichtes zur Triggerung der Fluoreszenzmessung und anderer Parameter verwendet. Bei den hier untersuchten Detektionssystemen steht pro Parameter jedoch prinzipiell nur ein Signalkanal für die Messung zu Verfügung, was eine akkurate Triggerung verhindert. Deshalb werden weitergehende Untersuchungen bezüglich der statistischen Eigenschaften der Messsignale und der daraus resultierenden Statistik der Partikeldetektion durchgeführt. Damit können akkurate Aussagen über die Fehlerraten bei der Partikeldetektion getroffen werden. Diese Informationen sind für die Systemauslegung wichtig, um die Anforderungen für eine konkrete Anwendung zu erfüllen.

Da die Partikeldetektion auf Grundlage nur eines Messsignals erfolgt, ergibt sich bei der Verteilung der falsch positiven Detektionen eine Abweichung gegenüber der Normalverteilung. Diese kann jedoch mithilfe einfach ermittelbarer Signaleigenschaften sehr gut analytisch beschrieben werden. Breitbandiges Rauschen im Signal führt zu einer hohen Rate von falsch positiven Detektionen, was jedoch mithilfe einer einfachen Signalfilterung wirkungsvoll unterdrückt werden kann.

Aus der gefilterten Pulsform des Signals ergibt sich eine räumliche Auflösung, die zusammen mit der Partikelgeschwindigkeit die maximale Partikelrate definiert. Um über die Pulsform eine gute Kontrolle zu behalten, wird aufgrund des Signalmodells nach dem *Minimum-Mean-Square-Error*-Prinzip ein Filter zur Rekonstruktion einer Pulsform mit hoher räumlicher Auflösung und guter Rauschunterdrückung hergeleitet. Dieses Filter eignet sich sowohl für modulierte als auch für nichtmodulierte Signale und kann farbiges Rauschen berücksichtigen.

Um für die Systemauslegung ein Gesamtkonzept zu erhalten, wird das Signalmodell in ermittelbare Systemparameter aufgeschlüsselt. Auf der

einen Seite steht die pro Partikel gesammelte Ladung. Dem gegenüber stehen unterschiedliche Arten von Rauschen. Wesentliche Beiträge liefern hier das Dunkelrauschen und Rauschen durch Hintergrundlicht. Durch Messungen an dem gebauten mikrofluidischen System werden die zugehörigen Systemparameter ermittelt.

Mithilfe der Modellierung können darauf basierend allgemeine Aussagen über die Signalqualität bei Änderung von Auslegungsparametern des Systems gemacht werden. Zu wichtigen Auslegungsparametern gehören die Partikelgeschwindigkeit sowie die Länge der Detektionszone. Bei einer Verlängerung der Detektionszone ist im betrachteten System keine weitere Signalverbesserung möglich, da das zusätzliche vom Hintergrundlicht verursachte Rauschen den Zugewinn an Nutzsignal wieder aufwiegt. Dies beschränkt insbesondere die Höhe der möglichen Signalverbesserung bei räumlicher Modulation. Es wird auch gezeigt, dass durch eine gleichzeitige Verringerung der Partikelgeschwindigkeit und Verkürzung der Detektionszone im untersuchten Fluoreszenzdetektionssystem eine deutliche Verbesserung der Signalqualität erreicht werden kann.

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit ein auf der Praxis aufbauendes Gesamtverständnis für die Auslegung von druckbaren mikrofluidischen Partikeldetektionssystemen mit planaren optischen Komponenten entwickelt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Gliederung der Arbeit	2
2	Grundlagen	5
2.1	Mikrofluidische Durchflusszytometer	5
2.1.1	Durchflusszytometer	5
2.1.2	Mikrofluidische Systeme	9
2.2	Photodioden	11
2.2.1	PIN-Photodioden	11
2.2.2	Organische Photodioden	13
2.2.3	Kenngößen	14
2.3	Signalverarbeitung	15
2.3.1	Mathematische Grundlagen	15
2.3.1.1	Zufallsvariable	15
2.3.1.2	Erwartungswert	16
2.3.1.3	Standardabweichung	17
2.3.1.4	Poissonverteilung	17
2.3.1.5	Normalverteilung	18
2.3.1.6	Fouriertransformation	19
2.3.1.7	Leistungsdichtespektrum	20
2.3.2	Signalfilterung	21
2.3.2.1	FIR-Filter	21
2.3.2.2	Mittelwertfilter	22
2.3.2.3	Hann-Funktion	23
2.3.2.4	MMSE-Filter	25
2.3.2.5	Medianfilter	26
2.3.2.6	Signal-zu-Rausch-Verhältnis	26
2.3.2.7	PSNR	27

2.3.2.8	Variationskoeffizient	27
2.3.3	Fehlerklassen	28
2.3.4	Transimpedanzverstärker	29
2.3.5	Physikalische Rauschquellen	31
2.3.5.1	Thermisches Rauschen	31
2.3.5.2	Schrotrauschen	32
2.3.5.3	Addition von Rauschströmen	33
2.4	Optik	33
2.4.1	Absorption und Streuung	34
2.4.2	Fluoreszenz	38
2.4.3	Planare optische Systeme	39
3	Fluoreszenzbasierte Partikeldetektion	47
3.1	Design des optofluidischen Systems	52
3.1.1	Partikelfokussierung	52
3.1.2	Optische Filter	54
3.1.3	Gekreuzte Polarisatoren	56
3.1.4	Messapertur	59
3.1.5	Anregellichtquelle	59
3.1.6	Detektor	60
3.1.7	Analog-Digital-Wandler	60
3.1.8	Stromversorgung	61
3.1.9	Messverstärker	62
3.1.9.1	Abschirmung gegen Störquellen	63
3.2	Herstellungsprozess	65
3.3	Durchführung der Messungen	69
3.4	Ergebnisse	71
3.4.1	Partikelfokussierung	71
3.5	Rekonstruktion der Basislinie	72
3.5.1	Pulsformen	74
3.5.2	Histogramme der Partikelintensitäten	77
3.6	Zusammenfassung	79
4	Statistik der Partikeldetektion	89
4.1	Voruntersuchungen	91
4.1.1	Durchführung der Messungen	91

4.1.2	Gemessene Pulsform	92
4.1.3	Eigenschaften des Hintergrundrauschens	94
4.2	Modellierung	97
4.2.1	Signalmodell	97
4.2.2	Partikeldetektion aus lokalen Maxima	99
4.2.3	Auflösungsvermögen	99
4.2.4	Analytische Pulsformen	100
4.2.5	Numerische Simulationen	104
4.2.6	Überlagerung von zwei Pulsen	105
4.2.7	Maximaler Partikeldurchsatz	108
4.2.8	Effektive Partikelrate	108
4.2.9	Signalqualität	112
4.2.10	Rate der falsch negativen Detektionen	113
4.2.11	Rate der falsch positiven Detektionen	114
4.2.12	Ermittlung des Bandbreitenparameters	115
4.2.13	Berücksichtigung mehrerer Partikeltypen	118
4.2.14	Analyse der Verteilung der Maxima in der Messung	119
4.2.15	Analyse der Verteilung der falsch negativen Detektionen	120
4.2.16	Wahl des optimalen Schwellwertes	120
4.2.17	Einfluss der Bandbreite des Rauschens	126
4.2.18	Vergleich mit Zwei-Kanal-Detektion	128
4.2.19	Einfluss von Geschwindigkeitsvariation	132
4.2.20	Falsch positive Detektionen an Partikelflanken	133
4.3	Vergleich mit dem Experiment	134
4.3.1	Degradation des Blaufilters	135
4.3.2	Einfluss der Signalfilterung auf das Histogramm	135
4.3.3	Analytische und experimentelle Partikelverteilungen	139
4.3.4	Reduzierte Flussrate	142
4.4	Zusammenfassung	144
5	Räumliche Modulation und Signalfilterung	147
5.1	Signaleigenschaften bei Modulation	148
5.2	Methoden für die Signalrekonstruktion	154
5.2.1	Matched Filter	155
5.2.2	DCS-Filter	156

5.2.3	Anforderungen an die Filtermethode	157
5.3	MMSE-Filter	157
5.3.1	Herleitung	157
5.4	Geschwindigkeitsvariation	161
5.5	Zusammenfassung	163
6	Signalqualität des Gesamtsystems	165
6.1	Signalmodell	167
6.1.1	Signalqualität	171
6.1.2	Rauschquellen	172
6.1.3	Schrotrauschen durch Fluoreszenz	173
6.1.3.1	Schrotrauschen durch Hintergrundlicht	174
6.1.4	Dunkelrauschen	176
6.1.5	Kombinierte Rauschströme	177
6.1.6	Hintergrund und Effizienz	178
6.1.7	Charakteristische Aperturlänge	178
6.2	Messungen	179
6.3	Messergebnisse und Diskussion der Systemparameter	179
6.3.1	Ermittelte Systemparameter	180
6.3.2	Rauschspektren	182
6.3.3	Konstante Partikelgeschwindigkeit	183
6.3.4	Räumliche Modulation	185
6.3.5	Konstante Partikelrate	185
6.3.6	Einfluss auf das PSNR	187
6.4	Zusammenfassung	190
7	Extinktionsbasierte Partikeldetektion	191
7.1	Methoden	193
7.1.1	Messanordnung	193
7.1.2	Geometrieoptimierung	195
7.1.3	Simulierte Pulsformen	200
7.1.4	Ortsintegral	203
7.2	Lichtstreuung an kleinen Partikeln	204
7.3	Experiment	208
7.3.1	Herstellung des mikrofluidischen Chips	209
7.3.2	Herstellung der organischen Photodioden	211

7.3.3	Modifikation des Messaufbaus	212
7.3.4	Durchführung der Messungen	212
7.4	Ergebnisse und Diskussion	213
7.4.1	Pulsformen	213
7.4.2	Histogramme	216
7.4.3	Dichteplots	219
7.4.4	Variationskoeffizienten	220
7.5	Zusammenfassung	222
8	Transiente Signale von organischen Photodioden	225
8.1	RC-Modell	230
8.1.1	Numerische Implementierung	233
8.1.1.1	Methodenvergleich	235
8.1.1.2	Einfluss des Rauschens	237
8.1.2	Anwendung auf Messwerte	238
8.2	Ausgedehnte Elektrode	241
8.2.1	Simulationsmodell	242
8.2.2	Positionsabhängige Pulsantworten	246
8.3	Zusammenfassung	249
9	Zusammenfassung und Ausblick	251
9.1	Zusammenfassung	251
9.2	Ausblick	252
	Abkürzungsverzeichnis	255
	Abbildungsverzeichnis	257
	Tabellenverzeichnis	277
	Publikationsliste	279
	Literaturverzeichnis	285

1 Einleitung

Mikrofluidische Systeme besitzen ein großes Potential als Technologieplattform im Bereich der Miniaturisierung, Automatisierung und Integration von Analyse- und Manipulationsverfahren an Flüssigkeiten und Mikropartikeln [1, 2]. Ein wichtiger Anwendungsbereich findet sich im Bereich der Biologie [3]. Hier sind unter anderem Methoden zur Identifizierung und Sortierung von Zellen gefragt. Dies wird bisher typischerweise mit Durchflusszytometern bewerkstelligt, indem optische Parameter wie Absorption, Streuung und Fluoreszenz gemessen werden. Der klassische Aufbau eines Durchflusszytometers erfordert vergleichsweise große und teure Komponenten und lässt sich dadurch schlecht mit mikrofluidischen Systemen kombinieren oder gar in diese integrieren. Ein Ansatz, welcher derzeit verfolgt wird, ist die Ersetzung von leistungsfähigen, aber großen und teuren Komponenten durch kleinere und kostengünstigere Komponenten [4]. Beim Einsatz herkömmlicher Bauteile, wie Laserdioden, Photodioden und optischer Linsen und Filter für Durchflusszytometer, kann zwar eine deutliche Reduktion der Größe und Kosten erreicht werden. In diesem Fall sind das optische und das mikrofluidische System jedoch immer noch zwei getrennte Baueinheiten [5]. Gerade im Bereich der Vor-Ort-Diagnostik (engl. *point-of-care* PoC) sollten die Systeme jedoch einen hohen Integrationsgrad aufweisen, damit geringe Abmessungen und Kosten erreicht werden können [6].

In dieser Arbeit werden zwei Entwicklungen aufgegriffen. Zum einen versprechen aktuelle Entwicklungen im Bereich der Drucktechnologien Fortschritte in der Herstellung von mikrofluidischen Systemen [7, 8]. Zum anderen wird im Bereich der gedruckten organischen Elektronik [9, 10] an der Integration von Lichtquellen [11, 12] und optischen Detektoren [13–17] in folienbasierte Druckprozesse gearbeitet, welche für die notwen-

dige Sensorik eines integrierten mikrofluidischen Durchflusszytometers eingesetzt werden können.

Um diese Komponenten funktional zu einem Partikeldetektionssystem zu verbinden, kann der klassische, auf Spiegeln und Linsen basierende Aufbau, nicht verwendet werden. Stattdessen müssen mit Drucktechnologie herstellbare Strukturen genutzt werden. Anstatt Linsen zur Fokussierung eines Laserstrahls einzusetzen, soll eine Leuchtdiode sehr nahe an die Messzone gebracht und eine gedruckte Apertur zur genauen Beschränkung der Messzone verwendet werden. Anstatt dichroitischer Filter, die eine spektrale Trennung der Lichtanteile vornehmen, sollen aus druckbaren Farbstoffen bestehende Absorptionsfilter verwendet werden.

Um die Machbarkeit zu zeigen, müssen diese neuartigen optischen Systeme aufgebaut und getestet werden. Eine Herausforderung dabei ist, dass die hier eingesetzten Komponenten des optischen Systems in vieler Hinsicht schlechtere optische und elektronische Eigenschaften aufweisen. Deshalb ist anhand der gewonnenen Messdaten eine genaue Analyse der Systemeigenschaften, sowie von Möglichkeiten zur Optimierung der Partikeldetektionssysteme notwendig.

1.1 Gliederung der Arbeit

Im Grundlagenkapitel werden die Grundlagen zu den Themen der Mikrofluidik, Organischen Elektronik, sowie Optik aufgeführt.

In Kapitel 3 wird ein Mikrofluidiksystem zur Detektion fluoreszierender Partikel entwickelt und getestet.

Um ein Verständnis für die statistischen Eigenschaften der Partikeldetektion, insbesondere der Rate von falsch positiven bzw. falsch negativen Detektionen zu entwickeln wird in Kapitel 4 ein statistisches Modell entwickelt und mit den experimentellen Daten der fluoreszierenden Partikel verglichen.

Ein optimiertes Signalfilter zur Rekonstruktion der einzelnen Pulsformen aus deformierten oder räumlich modulierten Signalen wird in Kapitel 5 entwickelt und simulativ mit Methoden aus der Literatur verglichen.

Für die Systemoptimierung wird in Kapitel 6 ein Gesamtmodell für die Signalqualität des Partikeldetektionssystems entwickelt. Mithilfe von an einem einzelnen Detektionssystem gemessenen Parametern (Dunkelrauschen, Rauschen mit Hintergrundlicht und Signalstärke mit einem Referenzpartikel) erlaubt dieses Modell eine Vorhersage der Signalqualität bei Änderung von Systemparametern. Damit wird am in Kapitel 3 vorgestellten Messsystem der Einfluss von Aperturlänge und Partikelgeschwindigkeit untersucht.

In Kapitel 7 ein zweites Mikrofluidiksystem zur Partikeldetektion über die Extinktion entwickelt und getestet.

Auf die Signalverarbeitung bei organischen Photodioden für transiente Messungen wird in Kapitel 8 eingegangen.

2 Grundlagen

2.1 Mikrofluidische Durchflusszytometer

2.1.1 Durchflusszytometer

In diesem Kapitel wird eine kurze Einführung der relevanten Themen der Durchflusszytometrie gegeben. Detailliertere Ausführungen können der Literatur in [18], [19] und [20] entnommen werden. Die Zytometrie bezeichnet die Charakterisierung von einzelnen biologische Zellen anhand ihrer Eigenschaften. Bei der Durchflusszytometrie werden diese Zellen als Partikel in einem Fluidsystem geführt. Die Charakterisierung kann dabei anhand elektrischer Parameter wie Impedanz, sowie optischer Parameter wie Absorption, Streuung und Fluoreszenz erfolgen. Im Folgenden wird das Augenmerk auf die optischen Parameter gelegt.

Die hierfür relevanten optischen Bestandteile eines Durchflusszytometers sind in den Abbildungen 2.1 und 2.2 dargestellt. Ein Laser erzeugt Licht einer Wellenlänge, die für die Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen geeignet ist (z.B. 488 nm). Über ein Linsensystem wird der Laserstrahl auf den Messbereich fokussiert. Die zu messenden Partikel passierenden die Messzone und werden dabei seitlich vom Laserlicht angestrahlt.

Das in Vorwärtsrichtung propagierende Laserlicht wird dabei vom Partikel abgeschattet. Dies kann zur Messung der Extinktion genutzt werden. Üblicherweise wird jedoch leicht seitlich unter einem kleinen Winkel zur Einfallachse das Streulicht in Vorwärtsrichtung (engl. *forward scatter* FSC) gemessen. Da die Lichtsignale hier generell stark sind, kann dies mit einer Photodiode erfolgen. Dieses Lichtsignal wird benutzt, um das Vorhandensein eines Partikels in der Messzone zu detektieren. Da die

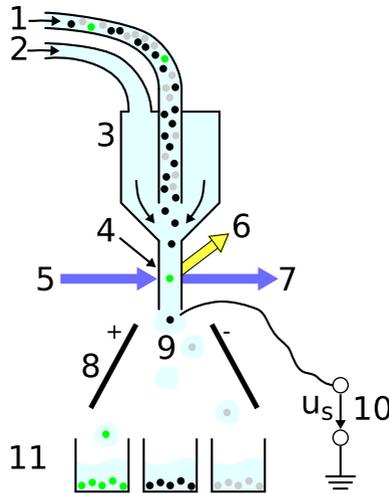


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers mit Partikelsortierung. Zwei Fluidikanschlüsse dienen zum Zuführen des Partikelstromes (1) sowie des Mantelflusses (2). In der koaxialen Fokussierungsstruktur (3) werden die Partikel in das Zentrum des Fluidstromes fokussiert und passieren in der Kapillare (4) die Messzone. Ein Laserstrahl (5) trifft in der Messzone auf die Partikel. Licht, welches seitlich (6) bzw. in Vorwärtsrichtung (7) abgelenkt wird dient zur Partikeldetektion. Der Sortiermechanismus besteht aus elektrisch geladenen Platten (8), die das Fluid in Tröpfchenform (9) seitlich ablenken können, wenn es mit einer Spannung (10) beaufschlagt wurde. Damit können Partikel aufgrund ihrer optischen Signale klassifiziert und entsprechend in unterschiedliche Gruppen (11) sortiert werden.

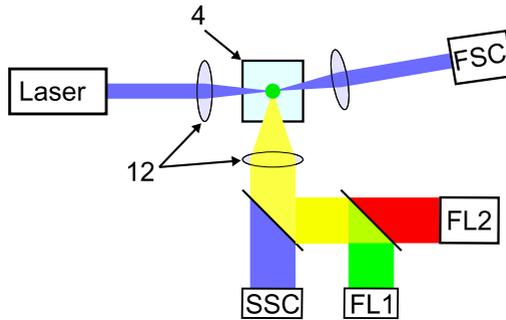


Abbildung 2.2: Optische Anordnung des Durchflusszytometers in Abbildung 2.1 mit dem Querschnitt der Kapillaren (4) im Detail dargestellt. Der zu messende Partikel wird im Zentrum einer Kapillaren durch die Messzone geführt. Ein Laser wird über ein Linsensystem (12) auf die Messzone fokussiert. Vom Partikel abgelenktes Streulicht in Vorwärtsrichtung wird über eine Linse parallelisiert und auf einen Detektor (engl. *forward scatter* FSC) geführt. Senkrecht zum einfallenden Laserstrahl wird ebenfalls vom Partikel abgestrahltes Licht mit einer Linse parallelisiert und über dichroitische Spiegel in mehrere Anteile aufgeteilt. Der erste Spiegel ist durchlässig für Licht der Anregewellenlänge, welches direkt als seitliches Streulicht (engl. *side scatter* SSC) detektiert wird. Fluoreszenz längerer Wellenlänge wird vom ersten Spiegel reflektiert. Mit Hilfe weiterer Spiegel kann die Fluoreszenz weiter unterteilt werden. Im Diagramm wird dies für zwei Spektralbereiche FL1 und FL2 gezeigt.

optischen Signale hier verhältnismässig stark sind, kann eine normale Photodiode als Detektor verwendet werden.

Senkrecht zum einfallenden Laserstrahl wird ebenfalls Streulicht detektiert. Zusätzlich wird hier jedoch auch Fluoreszenz detektiert. Um die unterschiedlichen Lichtanteile verlustfrei zu trennen wird der parallelisierte Lichtstrahl durch eine Reihe von dichroitischen Spiegeln geführt. Hierbei wird abhängig von der Wellenlänge ein Teil des Lichtes transmittiert bzw. reflektiert. Das Streulicht hat die Wellenlänge des Lasers und wird vom ersten Spiegel transmittiert und als seitliches Streulicht (engl. *side scatter* SSC) detektiert. Da das seitliche Streulicht schwächer als die Vorwärtsstreuung ausfällt, werden hier üblicherweise multiplizierende Photodetektoren wie beispielsweise Photodioden mit Lawineneffekt eingesetzt.

Von einem Farbstoff emittierte Fluoreszenz hat eine größere Wellenlänge als das zur Anregung verwendete Licht und wird dementsprechend vom ersten Spiegel reflektiert. Weitere dichroitische Spiegel werden dazu verwendet, unterschiedliche Wellenlängenbereiche zu trennen. Dies dient dazu, beim Einsatz mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe diese anhand ihrer Spektren unterscheiden zu können. Im Beispiel sind zwei Fluoreszenzkanäle FL1 bzw. FL2 dargestellt. Um mehr Kanäle zu erhalten werden entsprechend in den Lichtstrahl vor dem Detektor FL2 weitere Spiegel mit Detektoren eingefügt. Da die Lichtsignale der Fluoreszenz bzw. der seitlichen Streuung sehr schwach sind, werden hier generell Photodioden mit Lawineneffekt oder Röhren mit Photoverstärkung als Detektor eingesetzt.

Für die Quantisierung der Fluoreszenzmessungen wird die Einheit MESF (engl. *molecules of equivalent soluble fluorochrome*) verwendet. Sie beschreibt die Intensität eines Partikels relativ zu einer Anzahl von gelösten Fluoreszenzmolekülen welche dieselbe Intensität erzeugen würden.

In der praktischen Realisierung wird das in Abbildung 2.2 dargestellte System generell um weitere Komponenten wie folgt erweitert. Zusätzliche Blenden schränken den Winkelbereich der Detektoren ein und schirmen gegen Streulicht innerhalb der Apparatur ab. Durch weitere absorbierende bzw. reflektierende Farbfilter wird der Wellenlängenbereich weiter eingeschränkt.

Aus den bei der optischen Partikeldetektion gewonnenen Daten können Rückschlüsse auf Eigenschaften der Zellen bzw. sonstiger Partikel gewonnen werden. Hierzu zählen einerseits Größe und Granularität aus Streulicht in Vorwärtsrichtung bzw. seitlicher Richtung. Andererseits können einzelne Zelltypen mit speziell präparierten Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, wodurch dieser Zelltyp direkt identifiziert werden kann. Ein Beispiel hierfür sind an Antikörper gekoppelte Farbstoffe, die sich dann an entsprechenden Zelltyp mit passender Oberfläche ansammeln. Aus den Daten können Schlussfolgerungen für die Diagnose von Krankheiten z.B. ein Mangel an T-Zellen getroffen werden.

Der Preis für ein Durchflusszytometer bewegt sich im Bereich von 30 000 \$ bis 100 000 \$ [2], was zwar für medizinische Labore und Forschungseinrichtungen keine große Einschränkung darstellt, jedoch die weitere Verbreitung in neue Anwendungsgebiete stark behindert. Dies motiviert die Forschung an günstigeren Systemen für spezielle Detektionsanwendungen, welche die volle Leistungsfähigkeit etablierter Systeme nicht erfordern.

2.1.2 Mikrofluidische Systeme

Unter Mikrofluidik versteht man die Forschung an und Entwicklung von Systemen mit Kanaldurchmessern im Bereich 10 – 100 μm , die kleine Fluidmengen (10^{-18} bis 10^{-9} Liter) analysieren bzw. verarbeiten können [1].

Begonnen hat die Entwicklung der Mikrofluidik in den 1970er Jahren mit Gaschromatographen [21] und der Inkjet-Technologie [22, 23]. Während diese Technologien auf den Materialien Silizium und Glas aufbauen, geht die neuere Entwicklung in Richtung Kunststoffmaterialien [1]. Insbesondere im Forschungsbereich ist Polydimethylsiloxan (PDMS) weit verbreitet, da es exzellente optische Eigenschaften aufweist, biokompatibel ist und sich mittels Rapid-Prototyping Chipdesigns schnell im Labor umsetzen lässt [24].

Die Vorzüge der Mikrofluidik sind ihre kompakte Bauform und die Möglichkeit zusätzliche Komponenten wie Ventile, Flüssigkeitsmischer, Pumpen und viele andere fluidische Bauteile auf engem Bauraum zu integrieren [2].

Der direkte Ansatz, aus mikrofluidischen Systemen ein Durchflusszytometer zu bauen, ist, ein Kanalstück auf dem mikrofluidischen Chip optisch zugänglich zu machen und in ein klassisches Durchflusszytometer anstelle des herkömmlichen makroskopischen Fluidiksystems zu integrieren [25, 26]. Das so entstandene System erhält die Vorzüge der Mikrofluidik und kombiniert diese mit der hohen Leistungsfähigkeit des klassischen optischen Durchflusszytometers. Mit diesem Ansatz können jedoch weder die hohen Kosten gesenkt werden, noch kann damit ein kompaktes, für den portablen Einsatz geeignetes Gerät hergestellt werden. Auch können komplexere Anordnungen mit mehreren über den Chip verteilten Detektionszonen mit diesem Ansatz nur mit großem Aufwand realisiert werden.

Um hierfür Abhilfe zu schaffen wurden Ansätze entwickelt um die optischen Komponenten besser in das System zu integrieren. Um die Fokussierung des Linsensystems zu umgehen werden Lichtleiterfasern [27, 28] in den Mikrofluidikchip eingebracht oder Wellenleiter direkt bei der Herstellung des Mikrofluidikchips mittels höherbrechender Materialien integriert [29]. Mittels integrierter Linsen [30] und Aperturen [31, 32] wird die Effizienz der Lichteinkopplung in die Detektionszone und die Auskopplung aus der Detektionszone erhöht und Streulicht reduziert. Durch diese Ansätze können mit klassischen Durchflusszytometern vergleichbare Empfindlichkeiten erreicht werden [33]. Zwar wird hierdurch die optische Ankopplung des Detektionssystems an das mikrofluidische System vereinfacht, jedoch bleiben die restlichen Komponenten des Detektionssystems unverändert.

Um eine wesentliche Kostenreduktion zu erreichen muss sowohl bei der Herstellung des Mikrofluidikchips als auch bei der Auslegung des optischen Systems ein neuer Ansatz gewählt werden. Ein möglicher Ansatz ist hierfür die Rolle-zu-Rolle-Prozessierung wie sie in der Drucktechnologie verwendet wird [8]. Hierbei werden die mikrofluidischen Strukturen durch Abformen in Foliensubstrate eingeprägt. Der Kanal wird mit einer zusätzlichen Deckfolie gebildet. Mittels weiterer in der Drucktechnologie verbreiteter Methoden ist es denkbar, dass optische Filter, Aperturen, organische Leuchtdioden [34], sowie organische Photodioden [16, 35] auf demselben Substrat integriert werden und somit ein komplettes Durchflusszytometer gebildet wird. Die Auslegung des optischen Systems muss entsprechend angepasst werden, damit sie mit dieser Herstellungsmethode kompatibel wird.

Der Vorteil dieser Herstellungsmethode ist, dass sich mikrofluidische Systeme wie Durchflusszytometer, aber auch andere Detektionssysteme, die auf Absorption, Streuung oder Fluoreszenz von Partikeln oder partikelähnlichen Objekten basieren, in Zukunft sehr billig herstellen lassen. Dies ist insbesondere in der Medizin von Vorteil, da solche Chips nach Gebrauch nicht aufwändig gereinigt werden müssen, sondern einfach entsorgt werden können. Bei chemischen Untersuchungen ist der Wegfall von Reinigungsschritten ebenfalls erwünscht, da sich so keine störenden Rückstände bilden können. Durch eine Parallelschaltung vieler kleiner mikrofluidischer Detektionssysteme kann zudem der Durchsatz von Analysesystemen in der Medizin bzw. Materialforschung deutlich erhöht werden.

2.2 Photodioden

Photodioden bestehen aus Halbleitermaterialien, die einen Teil der Photonen des einfallenden Lichtes in positiv bzw. negativ geladene Ladungsträgerpaare wandeln können und diese dann über die Anode bzw. Kathode extrahieren. Der bei der Ladungsträgerbewegung erzeugte Strom wird für die Lichtmessungen über die Elektroden abgeführt und kann durch Transimpedanzverstärker in Spannungssignale umgewandelt werden.

Die Ladungsträger werden maßgeblich durch das im Bauteil vorhandene elektrische Feld zu den entsprechenden Elektroden transportiert. Dies ist in Abbildung 2.3 für zwei in dieser Arbeit verwendete Photodiodenarchitekturen dargestellt.

2.2.1 PIN-Photodioden

Aus Silizium oder anderen kristallinen Halbleitern hergestellte Photodioden gehören zu den Standardbauteilen für die Detektion von optischen Signalen.

In Abbildung 2.3a wird das Energie-Banddiagramm einer PIN-Diode dargestellt. Sie unterscheidet sich von PN-Dioden durch den zusätzlichen intrinsischen Bereich. Die stark dotierten p- bzw. n-dotierten Bereiche weisen eine hohe Leitfähigkeit auf. Beim direkten Kontakt von P- und N-Bereich

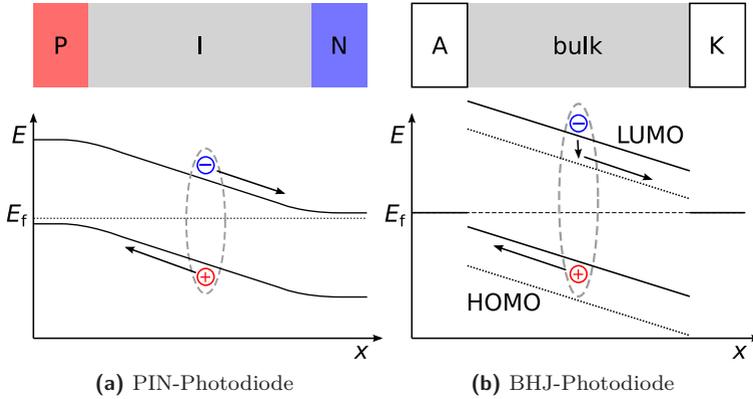


Abbildung 2.3: Schematische Energie-Banddiagramme über den Ort a) einer PIN-Diode und b) einer *Bulk-Hetero-Junction* (BHJ) im Gleichgewichtszustand ohne angelegte Spannung. Die Anode bzw. Kathode wird im Fall der PIN-Diode am p-dotierten bzw. n-dotierten Bereich angeschlossen. Im Fall der BHJ wird die Anode bzw. Kathode von einem Metall mit hoher bzw. niedriger Austrittsarbeit im Kontakt zum Bulk gebildet. Durch die unterschiedliche Dotierung entsteht bei der PIN-Diode an den PI- und IN-Übergängen eine Raumladungszone, die ein elektrisches Feld im I-Bereich aufbaut. Im Fall der BHJ wird das elektrische Feld von der unterschiedlichen Kontaktpotentialen erzeugt. In der PIN-Diode aus Silizium sind von Photonen erzeugte gebundene Ladungsträgerpaare nur schwach gebunden und können direkt getrennt und zu den jeweiligen Elektroden abtransportiert werden. Im Fall der BHJ sind die von Photonen erzeugten Ladungsträgerpaare stark gebunden. Hier wird vom Absorbermaterial das Elektron an den auf tieferem Niveau liegende Elektronenleiter abgegeben. Danach findet der Abtransport der Ladungsträger zu den Elektroden in den beiden Materialien getrennt statt.

bildet sich nur ein dünner Bereich mit geringer Ladungsträgerkonzentration und daher geringer elektrischer Leitfähigkeit aus. Die Kapazität einer Diode wird vom Abstand der beiden hochleitfähigen Bereiche bestimmt. Hier hat der intrinsische Bereich der PIN-Diode den Vorteil, dass er diese Zone stark vergrößert und damit die Bauteilkapazität verringert. Zudem können Ladungsträger, welche innerhalb der dotierten Bereiche absorbiert werden nur schlecht getrennt werden. Dieser Anteil wird durch die große intrinsische Zone verringert, was die Quanteneffizienz erhöht.

2.2.2 Organische Photodioden

Durch die Entwicklung elektrisch leitfähiger organischer Materialien [36] wurde eine für den Bau von Photodioden geeignete Materialklasse erschaffen, die sich in ihrer Handhabung deutlich von kristallinen Halbleitern unterscheidet. Hierzu gehören unter anderem konjugierte Polymere [36] und Fullerene [37] sowie deren Derivate. Von großem Interesse ist die Anwendung von organischen Materialien als aktives Material zur Wandlung von Strom in Licht in organischen Leuchtdioden [38] und umgekehrt zur Wandlung von Licht in Strom in Solarzellen [39]. Photodioden können hierbei als kleinflächige Solarzellen angesehen werden. Organische Materialien zeichnen sich dadurch aus, dass sie durch Hinzufügung von chemischen Gruppen eine Löslichkeit erhalten und somit eine Flüssigprozessierung ermöglicht wird. Dies macht sie für Herstellungsverfahren aus der Flüssigphase wie *Spin-Coating*, Rakeln, aber auch für Druckverfahren geeignet. Insbesondere die Herstellung von organischen Photodioden im Rolle-zu-Rolle-Prozess [10, 16, 34, 35] oder mittels Inkjet-Verfahren [14] ist hier interessant, da sich damit kostengünstig großflächige bzw. kleinflächige organische Photodioden herstellen lassen.

Der in Abbildung 2.3a für anorganische kristalline Halbleiter verwendete Aufbau einer Photodiode mit p- und n-Dotierung kann in organischen Halbleitern in dieser Form nicht bzw. nur schwer umgesetzt werden. Stattdessen wird das interne Feld über unterschiedliche Elektrodenmaterialien eingestellt. Das zugehörige Banddiagramm wird in Abbildung 2.3b dargestellt und im folgenden näher beschrieben. Bei organischen Halbleitern tritt

zusätzlich das Problem auf, dass von Photonen erzeugte Ladungsträgerpaare stark gebunden sind [40]. Das bedeutet, dass sie nicht effizient durch thermische Anregung getrennt werden können. Um hierfür Abhilfe zu schaffen werden zwei Halbleitermaterialien miteinander vermischt und bilden den sogenannten *Bulk*. Dieses Gemisch besteht aus einem Absorbermaterial (durchgezogene Kurve in Abbildung 2.3b) und einem Elektronenleiter (gepunktete Kurve in Abbildung 2.3b). Ein im Absorbermaterial erzeugtes Ladungsträgerpaar kann sich nun auftrennen, indem das Elektron auf den Elektronenleiter übergeht. Damit dies effizient gelingt, muss das Energieniveau des niedersten normalerweise unbesetzten Zustands (engl. *lowest unoccupied molecular orbit*, LUMO) im Elektronenleiter deutlich niedriger liegen als im Absorbermaterial. Umgekehrt soll die Lochleitung im höchsten normalerweise besetzten Zustand (engl. *highest occupied molecular orbit*, HOMO) des Absorbermaterials erfolgen. Dafür muss das HOMO des Elektronenleiters entsprechend unterhalb des HOMO des Absorbermaterials liegen. Der Abstand von HOMO zu LUMO bestimmt die Bandlücke und definiert damit die längste Absorptionswellenlänge. Einmal getrennte Ladungsträger verbleiben also auf den entsprechenden Materialien – das Elektron auf einem LUMO des Elektronenleiters und das Loch auf einem HOMO des Absorbers – und werden vom elektrischen Feld zu den Elektroden transportiert. An den Elektroden können die Ladungsträger auf das energetisch jeweils günstigere Elektrodenmaterial übergehen. Die Elektrodenmaterialien spielen eine entscheidende Rolle. Sie müssen unterschiedliche Austrittsarbeiten aufweisen damit sich im dazwischen befindlichen Halbleiter ein elektrisches Feld aufbaut. Dabei stellt das Material mit hoher Austrittsarbeit die Anode und das Material mit niedrigerer Austrittsarbeit die Kathode dar.

2.2.3 Kenngrößen

Zwei wichtige Kenngrößen von Photodioden sind die Spektrale Empfindlichkeit und die Quanteneffizienz. Die spektrale Empfindlichkeit R definiert sich zu

$$R(\lambda) = \frac{dI_{\text{ph}}}{dP_{\text{opt}}(\lambda)}. \quad (2.1)$$

Sie gibt für eine Wellenlänge λ die Änderung des Photostromes I_{ph} bei einer Änderung der bei dieser Wellenlänge eingestrahnten optischen Leistung P_{opt} an. Davon leitet sich die externe Quanteneffizienz

$$\text{EQE}(\lambda) = R(\lambda) \frac{hc}{\lambda q} \quad (2.2)$$

mit dem Planckschen Wirkungsquantum h , der Lichtgeschwindigkeit c und der Elementarladung q ab. Sie gibt an wie viele Elektronen-Loch-Paare pro eingestrahlem Photon der Wellenlänge λ erzeugt werden.

Für organische Solarzellen stellt die hohe Bindungsenergie der Ladungsträgerpaare ein Problem dar, da beim Übergang des Elektrons vom Absorbermaterial auf den Elektronenleiter Energie verloren geht, die nicht für die Wandlung von optischer in elektrische Leistung genutzt werden kann. Bei Photodioden hingegen wird nur der erzeugte Strom gemessen, also ist alleine die externe Quanteneffizienz im relevanten Wellenlängenbereich von Bedeutung.

2.3 Signalverarbeitung

Die Signalverarbeitung in dieser Arbeit umfasst die analoge und digitale Vorverarbeitung von Messsignalen, um ein für die Partikeldetektion geeignetes Signal zu erhalten. Hierfür werden zuerst die mathematischen Grundlagen eingeführt, auf die Signalfilterung eingegangen und relevante physikalische Rauschquellen beschrieben.

2.3.1 Mathematische Grundlagen

2.3.1.1 Zufallsvariable

Messgrößen wie beispielsweise der über einen Widerstand fließende Strom haben sowohl einen bekannten, zeitlich invarianten Anteil, als auch einen zufälligen Anteil, welcher zeitlich variiert. Verschiedene Messungen weisen

also eine gewisse Variation auf. Um diese Variation zu beschreiben werden Zufallsvariable verwendet.

Eine Zufallsvariable X , die unterschiedliche Werte annehmen kann, wird über die zugehörigen Verteilungsfunktion

$$F_X(x) = P(X \leq x)$$

charakterisiert. $F_X(x)$ gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass X den Wert x nicht überschreitet. Für den Wertebereich der Verteilungsfunktion gilt $0 \leq F_X(x) \leq 1$ und $\lim_{x \rightarrow \infty} F(x) = 1$.

Die Verteilungsfunktion ist das Integral über die Wahrscheinlichkeitsdichte $f_X(x)$. Es gilt

$$F_X(x) = \int_{-\infty}^x f_X(y) dy.$$

Die Wahrscheinlichkeitsdichte $f_X(x)$ nimmt keine negativen Werte an. Dadurch wird $F_X(x)$ monoton nicht fallend.

Die komplementäre Verteilungsfunktion (engl. *complementary cumulative density function*, CCDF) entspricht der Wahrscheinlichkeit, dass X den Wert x überschreitet, berechnet sich folglich zu $P(X > x) = 1 - F_X(x)$.

Bei zeitlich stationären Prozessen bleiben die Eigenschaften der Zufallsvariablen zeitlich konstant.

2.3.1.2 Erwartungswert

Der Erwartungswert $E\{X\}$ einer Zufallsvariablen X entspricht dem ersten Moment ihrer Wahrscheinlichkeitsdichte $f_X(x)$. Es gilt

$$E\{X\} = \int_{-\infty}^{+\infty} x f_X(x) dx. \quad (2.3)$$

Bei ergodischen Prozessen stimmt der Erwartungswert $E\{X\}$ mit dem zeitlichen Mittelwert μ_X überein. Der zeitliche Mittelwert μ_i für ein Stromsignal $i(t)$ kann für den Zeitraum a bis b mit

$$\mu_i \approx \sqrt{\frac{1}{b-a} \int_a^b i(t) dt}$$

abgeschätzt werden. Für einen unendlichen Zeitraum verschwindet der Schätzfehler.

2.3.1.3 Standardabweichung

Die Standardabweichung σ_X einer Zufallsvariablen X gibt die Streuung einer Zufallsvariablen an. Sie entspricht der Wurzel der Varianz und berechnet sich zu

$$\sigma_X = \sqrt{E\{|X - E\{X\}|^2\}}.$$

Bei ergodischen Prozessen entspricht die Standardabweichung dem RMS-Wert (engl. *root mean square*). Dieser kann für ein Stromsignal $i(t)$ für den Zeitraum a bis b mit

$$\sigma_i \approx \sqrt{\frac{1}{b-a} \int_a^b (i(t) - \mu_i)^2 dt}$$

abgeschätzt werden. Für einen unendlichen Zeitraum verschwindet der Schätzfehler.

2.3.1.4 Poissonverteilung

Die nach Siméon Denis Poisson benannte Poissonverteilung kann als Wahrscheinlichkeitsverteilung zur Beschreibung von diskreten Prozessen mit unabhängigen Ereignissen verwendet werden. Ein Beispiel ist die Anzahl

der in einem Zeitintervall auf einem Photodetektor ankommenden Photonen bei konstanter mittlerer Bestrahlungsstärke.

Die Poissonverteilung wird über den Parameter λ bestimmt, der die mittlere Anzahl von Ereignissen im betrachteten Experiment beschreibt. Für die Wahrscheinlichkeit, dass im betrachteten Zufallsexperiment k Ereignisse stattfinden, gilt

$$P_\lambda(k) = \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda}. \quad (2.4)$$

Wichtige Parameter der Poissonverteilung sind der Erwartungswert

$$E\{P_\lambda\} = \lambda, \quad (2.5)$$

sowie die Standardabweichung

$$\sqrt{E\{ |P_\lambda - E\{P_\lambda\}|^2 \}} = \sqrt{\lambda}. \quad (2.6)$$

Bei der Poissonverteilung entspricht die Standardabweichung also der Wurzel des Erwartungswertes. Damit sind ihre Eigenschaften über einen einzigen Parameter festgelegt. Die Addition zweier stochastisch unabhängiger Poissonverteilungen P_{λ_1} und P_{λ_2} ergibt ebenfalls eine Poissonverteilung mit $P_{\lambda_1+\lambda_2}$.

Für große Werte von λ nähert sich die Form der Poissonverteilung der im Folgenden beschriebenen Normalverteilung mit den Parametern $\mu_{\text{normal}} = \lambda$ und $\sigma_{\text{normal}} = \sqrt{\lambda}$ an.

2.3.1.5 Normalverteilung

Werden viele unabhängige Zufallsvariable aufaddiert (z.B. Poisson-Verteilungen, Normalverteilungen oder Gleichverteilungen), nähert sich die Verteilungsfunktion der Summe einer Normalverteilung an. Deshalb nimmt bei elektronischen Signalen mit vielen Störprozessen die Verteilungsfunktion des Rauschens von Strömen bzw. Spannungen üblicherweise eine Normalverteilung an.

Die Wahrscheinlichkeitsdichte der Normalverteilung mit der Varianz σ_{normal}^2 und dem Mittelwert μ_{normal} hat die Form einer Gauß-Glocke und ist gegeben durch

$$p_{\text{normal}}(x) = \frac{1}{\sigma_{\text{normal}}\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu_{\text{normal}}}{\sigma_{\text{normal}}}\right)^2}. \quad (2.7)$$

Die Verteilungsfunktion der Normalverteilung kann nicht elementar dargestellt werden. Deshalb wird auf die Standardnormalverteilung Φ zurückgegriffen und es gilt

$$P_{\text{normal}}(x) = \Phi\left(\frac{x-\mu_{\text{normal}}}{\sigma_{\text{normal}}}\right). \quad (2.8)$$

Diese Standardnormalverteilung selbst kann über die tabellierte bzw. numerisch implementierte Fehlerfunktion $\text{erf}(x)$ [41] berechnet werden:

$$\Phi(x) = \frac{1}{2} + \frac{1}{2}\text{erf}\left(\frac{x}{\sqrt{2}}\right). \quad (2.9)$$

2.3.1.6 Fouriertransformation

Die Fouriertransformierte eines Zeitsignals $S(f) = \mathcal{F}\{s(t)\}$ ist gegeben durch

$$S(f) = \int_{-\infty}^{+\infty} s(t) e^{-2\pi i f t} dt. \quad (2.10)$$

$S(f)$ ist im allgemeinen komplexwertig. Ist $s(t)$ reell, dann gilt $S(f) = S^*(-f)$, also ist $|S(f)|$ gerade. Ist $s(t)$ reell und gerade, dann ist $S(f)$ ebenfalls reell und gerade.

Eine Faltung wird im Frequenzbereich zur Multiplikation

$$\mathcal{F}\{(s * u)(t)\} = S(f) \cdot U(f). \quad (2.11)$$

Eine Verschiebung im Zeitbereich führt zu einer Phasendrehung im Frequenzbereich

$$\mathcal{F}\{s(t-x)\} = S(f) \cdot e^{-2\pi i f x}. \quad (2.12)$$

Eine Streckung im Zeitbereich führt zu einer Stauchung im Frequenzbereich

$$\mathcal{F}\{s(ct)\} = \frac{1}{c} S\left(\frac{f}{c}\right). \quad (2.13)$$

Die Energie im Zeitbereich entspricht der Energie im Frequenzbereich

$$\int_{-\infty}^{+\infty} |s(t)|^2 dt = \int_{-\infty}^{+\infty} |S(f)|^2 df. \quad (2.14)$$

2.3.1.7 Leistungsdichtespektrum

Das Leistungsdichtespektrum (engl. *power spectral density*, PSD) $\Phi_{SS}(f)$ im Frequenzbereich eines reellwertigen Signals oder Zufallsprozesses $s(t)$ im Zeitbereich entspricht der Fouriertransformierten der zugehörigen Autokorrelationsfunktion $\phi_{SS}(\tau) = E\{s(t)s(t-\tau)\}$. Damit gilt

$$\Phi_{SS}(f) = \mathcal{F}\{\phi_{SS}(\tau)\}.$$

Für Rauschsignale (z.B. weißes Rauschen mit konstanter Leistungsdichte bzw. gefiltertes weißes Rauschen) kann sie analytisch angegeben oder aus Messungen näherungsweise ermittelt werden. Bei der näherungsweisen Schätzung eines Leistungsdichtespektrums aus einem gemessenen Signal werden viele gleichlange Zeitabschnitte des Messsignals in den Frequenzbereich transformiert und für jede Frequenz wird der Mittelwert gebildet.

Die in dieser Arbeit diskutierten Nutzsignale bestehen aus einer Reihe von Pulsen. Für sie ist folgende Betrachtung wichtig, um das Leistungsdichtespektrum zu bestimmen. Ein Einzelimpuls mit der Pulsform $h_P(t)$ hat eine gewisse Energie im Zeitbereich bzw. nach Gleichung 2.14 auch im Frequenzbereich. Die mittlere Leistung eines einzelnen Pulses über einen unendlich großen Zeitraum verschwindet jedoch. Ein Prozess, der zu zufällig verteilten Zeitpunkten mit der Amplitude a_P skalierte Pulse erzeugt, erzeugt ein kontinuierliches Zeitsignal

$$s_P(t) = \sum_k a_P h_P(t - t_k).$$

Da nun eine gewisse Dichte von Pulsen vorherrscht, kann für das Zeitsignal die mittlere Leistung $E \left\{ |s_P(t)|^2 \right\}$ angegeben werden. Diese Leistung skaliert linear mit der mittleren Pulsrate r_P .

Die Autokorrelationsfunktion des Signals wird hier von der Form der Einzelpulse h_P bestimmt. Das Leistungsdichtespektrum besteht also aus dem Produkt von Pulsrate und spektraler Energiedichte

$$\Phi_{S_P S_P}(f) = r_P a_P^2 |H_P(f)|^2 \quad (2.15)$$

wobei $H_P(f) = \mathcal{F} \{h_P(t)\}$ die Fourier-Transformierte der Einzelpulse ist. Die Bildung der Autokorrelationsfunktion spiegelt sich im Betragsquadrat in Gleichung 2.15 wider. Die Zeitverschiebung der Einzelpulse um t_k wird im Frequenzbereich nach Gleichung 2.12 als ein Phasenfaktor hinzumultipliziert. Dieser lässt den den Betrag des transformierten Signals jedoch unverändert. Für die Berechnung der spektralen Leistungsdichte ist der Betrag ausschlaggebend. Deshalb skaliert das Leistungsdichtespektrum auch im Frequenzbereich linear mit der mittleren Pulsrate r_P .

2.3.2 Signalfilterung

In dieser Arbeit werden zeitdiskrete Signale im Zeitbereich gefiltert. Hierfür werden sowohl lineare Filter mit endlicher Impulsantwort (engl. *finite impulse response filter*, FIR-Filter) verwendet, als auch nichtlineare Filter wie das Medianfilter. Für die FIR-Filter wird die Impulsantwort entweder anhand einer analytischen Funktion vorgegeben oder über die Minimierung des mittleren quadratischen Fehlers (engl. *minimum mean square error*, MMSE) berechnet.

2.3.2.1 FIR-Filter

Bei der linearen Filterung wird ein Signal $s(t)$ mit der Impulsantwort des Filters $h(t)$ gefaltet

$$s_F(t) = (s * h)(t).$$

Für zeitdiskrete Signale lässt sich diese Faltung durch eine Summe ausdrücken. Der gefilterte Signalwert $s_{\text{FIR},k}$ zum Zeitpunkt t_k ergibt sich danach aus der Summe der zeitlich verschobenen Signalwerten $s_n = s(t_n)$ gewichtet mit der zeitlich diskretisierten Filterfunktion h_l als

$$s_{\text{FIR},k} = \sum_l h_l s_{k-l}. \quad (2.16)$$

Die Summe in Gleichung 2.16 erstreckt sich theoretisch über einen unbeschränkten Zeitbereich. Eine Auswertung muss jedoch nur für Werte l , bei denen h_l ungleich Null ist, durchgeführt werden. Bei einem FIR-Filter sind entsprechend nur endlich viele Werte ungleich 0 vorhanden. Mit Indizes $l > 0$ werden Signalwerte aus der Vergangenheit, bei $l = 0$ der aktuelle Signalwert und bei $l < 0$ zukünftige Signalwerte angesprochen.

In Echtzeitsystemen können nur kausale FIR-Filter realisiert werden, die keine zukünftigen Signalwerte erfordern. Deshalb wird für eine nichtkausale Filterimpulsantwort eine zusätzliche Zeitverzögerung eingeführt, sodass die Impulsantwort des FIR-Filters soweit verschoben wird, dass $h_l = 0$ für $l < 0$ gilt. Das gefilterte Signal steht dann entsprechend nur mit dieser Zeitverzögerung zu Verfügung. Im Fall von aufgenommenen Signalen stehen ausgehend vom betrachteten Referenzzeitpunkt auch zukünftige Werte zu Verfügung, sodass hier der Zeitversatz berücksichtigt werden kann. Damit können prinzipiell auch zeitlich begrenzte nichtkausale Filterimpulsantworten mit FIR-Filtern abgebildet werden.

Die Eigenschaften eines FIR-Filters werden somit von der Impulsantwort h_l bestimmt. Wenn beispielsweise h_l nur für $l = 0$ den Wert 1 annimmt und sonst Null ist, entspricht das gefilterte Signal dem originalen Signal.

2.3.2.2 Mittelwertfilter

Beim Mittelwertfilter (engl. *moving average*) wird jeweils der Mittelwert über einen Signalblock gebildet. Die Impulsantwort des Mittelwertfilters hat die Form einer Rechteckfunktion.

Die entsprechende Impulsantwort ist

$$h_{m,l} = \begin{cases} \frac{1}{N} & \text{wenn } 0 \leq l < N \\ 0 & \text{sonst.} \end{cases}$$

Die Zeitverzögerung beträgt hier $(N - 1)/2$ Abtastwerte.

2.3.2.3 Hann-Funktion

Die Hann-Funktion [42] wird als Alternative zum Mittelwertfilter eingesetzt. Sie hat die Form eines angehobenen und abgeschnittenen Kosinus. Im kontinuierlichen Zeitbereich gilt

$$h_{\text{Hann}}(t) = \begin{cases} \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cos(\pi t) & \text{wenn } -1 < t < 1 \\ 0 & \text{sonst.} \end{cases} \quad (2.17)$$

Im diskreten Zeitbereich gilt für die auf das Maximum von 1 normierte Hann-Funktion

$$h_{\text{Hann},1,l} = \begin{cases} \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cos\left(2\pi \frac{l - \frac{N-1}{2}}{N-1}\right) & \text{wenn } 0 \leq l \leq N-1 \\ 0 & \text{sonst.} \end{cases} \quad (2.18)$$

Die Zeitverzögerung beträgt hier $(N - 1)/2$ Abtastwerte. Für die Signalfilterung werden die Filterkoeffizienten so normiert, dass ihre Summe 1 ergibt, also gilt für die Impulsantwort

$$h_{\text{Hann},l} = \frac{h_{\text{Hann},1,l}}{\sum_k h_{\text{Hann},1,k}}.$$

Eine mögliche Anwendung von Hann-Funktion und Rechteckfunktion ist die Verwendung als Tiefpassfilter. Der Vorteil der Hann-Funktion als Impulsantwort gegenüber der Rechteckfunktion als Impulsantwort ist eine bessere Unterdrückung hoher Frequenzanteile bei der Filterung.

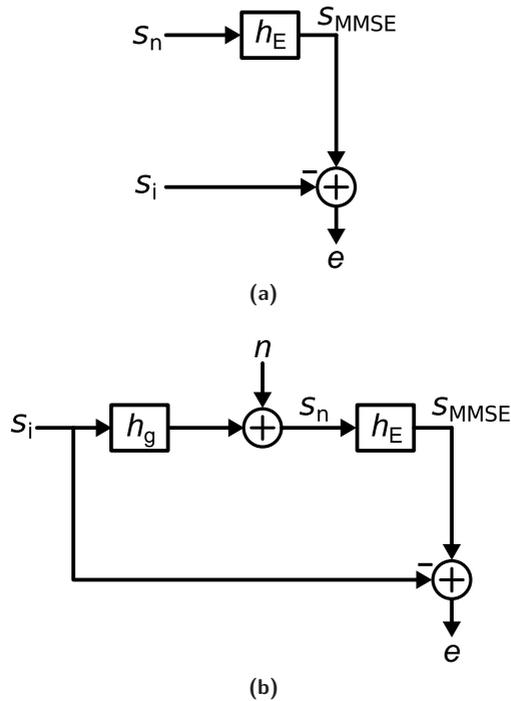


Abbildung 2.4: In a) allgemeines MMSE-Filter mit verrauschtem und verzerrtem Eingangssignal s_n und gewünschtem rauschfreien Signal s_i . Das Schätzsignal s_{MMSE} entsteht durch Filterung von s_n mit h_E . Die Differenz zwischen s_i und s_{MMSE} ergibt den Schätzfehler e . Die Form von h_E wird so gewählt, dass der mittlere Schätzfehler minimiert wird. In b) eine in dieser Arbeit verwendete spezielle Realisierung. Hier ergibt sich das verzerrte und verrauschte Signal s_n aus dem idealen Signal s_i durch Filterung mit einer Systemfunktion h_g und additivem Rauschen n .

2.3.2.4 MMSE-Filter

Signalfilterung wird häufig eingesetzt, um die Pulsform eines Signals zu verändern und gleichzeitig im System auftretendes additives Rauschen zu unterdrücken. Wird nur die Pulsform an eine idealerweise gewünschte Pulsform angepasst, so kann das Problem auftreten, dass im gefilterten Signal eine sehr hohe Rauschleistung auftritt. Wird nur das Rauschen unterdrückt, dann kann die resultierende Pulsform von der gewünschten Pulsform stark abweichen. Beide Ziele können jedoch mit der Minimierung des quadratischen Fehlers zusammengefasst werden. Der allgemeine Fall wird in Abbildung 2.4a dargestellt. Ein verzerrtes und gestörtes Signal s_n wird durch ein Filter mit der Impulsantwort h_E gefiltert und resultiert in s_{MMSE} . Dieses Resultat wird mit einem gewünschten Signal s_i verglichen. Die Differenz der beiden Signale ergibt den Fehler e . Die Wahl des Filters h_E erfolgt derart, dass der Erwartungswert des quadratischen Fehlers e^2 minimiert wird. Für zeitlich stationäre Prozesse wurde die Lösung von Norbert Wiener publiziert [43].

Für die Minimierung des quadratischen Fehlers muss der Zusammenhang zwischen s_i und s_n bekannt sein. Eine Möglichkeit dies zu definieren ist in Abbildung 2.4b dargestellt. Hier wird das gewünschte Signals s_i durch eine gegebene Systemfunktion h_g verzerrt und durch ein additives Rauschen n überlagert. Damit ergibt sich

$$s_n(t) = (s_i * h_g)(t) + n(t).$$

Das zugehörige Filter kann im Frequenzbereich berechnet werden [44] und es ergibt sich

$$H_E(f) = \frac{\Phi_{S_i S_i}(f) \cdot H_g^*(f)}{\Phi_{S_i S_i}(f) \cdot |H_g(f)|^2 + \Phi_{NN}(f)} \quad (2.19)$$

mit dem Leistungsdichtespektrum des Eingangssignals $\Phi_{S_i S_i}(f)$, dem Leistungsdichtespektrum des Rauschens $\Phi_{NN}(f)$ und der Fouriertransformierten der Systemfunktion $H_g(f) = \mathcal{F}\{h_g(t)\}$. Für die Filterung wird $H_E(f)$ wieder in den Zeitbereich zurücktransformiert, um $h_E(t)$ zu erhalten.

2.3.2.5 Medianfilter

Ein Medianfilter betrachtet einen Signalabschnitt der Länge N . Dabei werden zum Zeitpunkt t_k die Signalwerte $s(t_{k-(N-1)/2})$ bis $s(t_{k+(N-1)/2})$ anhand ihrer Werte sortiert. Der Wert in der Mitte der sortierten Liste an der Stelle $(N+1)/2$ ist der Median für den Zeitpunkt t_k . Für die Signalfilterung muss entsprechend für jeden Abtastwert erneut der Median ermittelt werden und es müssen entsprechend viele zukünftige Abtastwerte verfügbar sein, was eine Zeitverzögerung von $(N+1)/2$ Abtastwerten nach sich zieht.

Der so ermittelte Median entspricht näherungsweise dem Mittelwert über denselben Zeitraum. Voraussetzung hierfür ist eine symmetrische Wahrscheinlichkeitsverteilung, wie es bei der für die Störung erwarteten Normalverteilung der Fall ist. Ein Medianfilter kann also dann einen Mittelwertfilter ersetzen. Vorteil des Medianfilters gegenüber dem Mittelwertfilter ist, dass durch Störungen verursachte Extremwerte keinen wesentlichen Einfluss auf das Ergebnis haben solange mindestens 50 % der Signalwerte keine extremen Störungen aufweisen.

2.3.2.6 Signal-zu-Rausch-Verhältnis

Das bei der Beurteilung der Signalqualität üblicherweise benutzte Signal-zu-Rausch-Verhältnis (engl. *signal-to-noise ratio*, SNR) bezieht sich auf das Verhältnis der mittleren Signalleistung des Nutzsignals σ_{signal}^2 zur mittleren Rauschleistung σ_{noise}^2

$$\text{SNR} = \frac{\sigma_{\text{signal}}^2}{\sigma_{\text{noise}}^2}. \quad (2.20)$$

In Dezibel ausgedrückt ergibt sich

$$\text{SNR}_{\text{dB}} = 10 \cdot \log_{10} \left(\frac{\sigma_{\text{signal}}^2}{\sigma_{\text{noise}}^2} \right). \quad (2.21)$$

2.3.2.7 PSNR

Das SNR ist für die Beurteilung von gestörten Leistungssignalen nützlich. Wenn die Signalqualität für einzelne Signalpulse betrachtet werden soll, entsteht ein Problem. Einem Pulszug kann nach Gleichung 2.15 zwar eine mittlere Leistung zugeordnet werden jedoch hängt das SNR dann von der mittleren Pulsrate ab - es liefert also keine Auskunft über die Signalqualität für einzelne Pulse. Ein alternatives Maß stellt das quadrierte Verhältnis aus der mittleren Höhe einer Signalspitze μ_{peak} zur von Rauschen verursachten Standardabweichung σ_{noise} des Signals (engl. *peak signal-to-noise ratio*, PSNR) dar [45, 46]

$$\text{PSNR} = \frac{\mu_{\text{peak}}^2}{\sigma_{\text{noise}}^2} \quad (2.22)$$

bzw. in Dezibel

$$\text{PSNR}_{\text{dB}} = 10 \cdot \log_{10} \left(\frac{\mu_{\text{peak}}^2}{\sigma_{\text{noise}}^2} \right). \quad (2.23)$$

Für Verfahren, die den Spitzenwert eines Pulses auslesen, stellt das PSNR damit ein sinnvolles Maß dar, um die Signalqualität zu beurteilen.

2.3.2.8 Variationskoeffizient

Der Variationskoeffizient (engl. *coefficient of variation*, CV) beschreibt die Standardabweichung σ_m der Verteilung von Messwerten im Verhältnis zum Mittelwert μ_m .

$$\text{CV} = \frac{\sigma_m}{\mu_m} \quad (2.24)$$

Prinzipiell stellt der CV den Kehrwert der Wurzel des PSNR dar. Der Unterschied ist, dass sich das PSNR auf kontinuierliche Signale bezieht, der CV jedoch auf diskrete Messwerte. Je nach Art der Extraktion von diskreten Messwerten aus einem kontinuierlichen Signal kann der CV jedoch vom Kehrwert der Wurzel des PSNR abweichen.

Die Verwendung des Variationskoeffizienten anstelle des PSNR ist insbesondere dann sinnvoll, wenn der eigentlich zu messende Parameter selbst eine Streuung aufweist. Diese spiegelt sich zwar nicht im vom Rauschen verursachten Hintergrundsignal wider, welches in das PSNR eingeht, führt jedoch zu einer Erhöhung der Messwertstreuung σ_m .

2.3.3 Fehlerklassen

Tabelle 2.1: Fehlerklassifikation der Partikeldetektion

	Partikel vorhanden	Partikel nicht vorh.
Partikel erkannt	korrekt	falsch positiv
Partikel nicht erk.	falsch negativ	korrekt

Bei der Auslegung und Parameterisierung eines Partikeldetektionssystems besteht prinzipiell die Problematik, dass einerseits alle Partikel erkannt werden sollen. Andererseits jedoch soll nur dann eine Erkennung stattfinden wenn auch ein Partikel vorhanden ist. Daraus ergibt sich das in Tabelle 2.1 dargestellte Schema von korrekten Partikelerkennungen bzw. Fehlern.

Es ist offensichtlich, dass in einem System, das versucht in einem von Rauschen gestörten Signal möglichst viele Partikel korrekt zu erkennen, zwar die Rate von falsch negativen Erkennungen gering ist, aber umgekehrt die Rate von falsch positiven Erkennungen steigt. Umgekehrt sinkt die Rate von falsch positiven Erkennung wenn die Ansprechschwelle erhöht wird, jedoch steigt damit die Rate von falsch negativen Erkennungen. Die Folge ist eine geringere Trefferrate von korrekt erkannten Partikeln.

Bei der Diskussion der Fehlerraten werden die Variablen r_{FP} für die Rate der falsch positiven Erkennungen bzw. r_{FN} für die Rate der falsch negativen Erkennungen verwendet. Die Rate der korrekten Erkennungen r_{KP} ergibt sich somit wenn von der Partikelrate r_P die Rate der falsch positiven Erkennungen r_{FP} abgezogen wird.

Aus diesen Maßzahlen lassen unterschiedliche sich Gütemaße für ein Detektionssystem ableiten [47]. Die Aussagekraft der Gütemaße ist jedoch

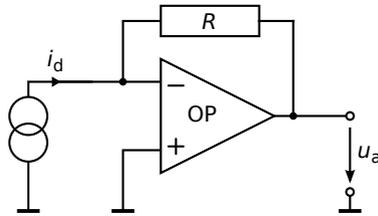


Abbildung 2.5: Schaltplan eines Transimpedanzverstärkers. Die Photodiode wird als Stromquelle modelliert mit dem Photostrom i_d als Eingangssignal für den Transimpedanzverstärker mit dem Rückkoppelwiderstand R und der Ausgangsspannung u_a .

von der konkreten Anwendung abhängig. Eine einfache Möglichkeit zur Systemoptimierung bildet beispielsweise die anwendungsspezifische Einführung von Kostenfaktoren, mit der die Fehlerraten r_{FN} und r_{FP} unterschiedlich gewichtet werden, wodurch eine globale Kostenoptimierung ausgeführt werden kann.

2.3.4 Transimpedanzverstärker

Um das in einer Photodiode erzeugte Stromsignal in ein weiter verarbeitbares Spannungssignal umzuwandeln wird üblicherweise ein Transimpedanzverstärker eingesetzt. Dieser weist idealerweise eine Eingangsimpedanz von 0Ω auf. Hierdurch stellt er eine ideale Stromsenke dar, wodurch ein in der Photodiode erzeugtes Stromsignal keinen Spannungsabfall erzeugt und die damit verbundenen störenden Einflüsse auf die Signalförm vermieden werden.

In Abb. 2.5 ist der Schaltplan eines invertierenden Transimpedanzverstärkers bestehend aus einem Operationsverstärker (OP) und einem Rückkoppelwiderstand R dargestellt. Die Photodiode wird als Stromquelle mit dem Photostrom i_d modelliert. Dieses dient als Eingangssignal für den Transimpedanzverstärker. Die Ausgangsspannung u_a wird über den Rückkoppelwiderstand R auf den Stromeingang zurückgeführt und führt somit

zu einer Verstärkung um den Faktor $-R$. Ein Stromsignal i_d wird somit in ein Spannungssignal u_a umgewandelt.

Die Eingangsimpedanz des Transimpedanzverstärkers hängt von der Spannungsverstärkung A des Operationsverstärkers ab. Die Spannungsverstärkung gibt das Verhältnis zwischen Eingangsspannung zwischen positivem und negativem Eingang des Operationsverstärkers, sowie der Ausgangsspannung an. Für niedrige Frequenzen unterhalb einer Grenzfrequenz f_0 hat die Spannungsverstärkung einen festen Wert A_0 und sinkt für höhere Frequenzen ab. Mit dem Verstärkungs-Bandbreite-Produkt (engl. *gain bandwidth product*, GBW) kann der Verstärkungswert für höhere Frequenzen f berechnet werden zu

$$A(f) = \begin{cases} A_0 & \text{für } f \leq f_0 \\ \frac{\text{GBW}}{f} & \text{für } f > f_0 \end{cases}.$$

Die Eingangsimpedanz ergibt sich somit zu

$$R_{\text{Eingang}}(f) = \frac{R}{A(f)}.$$

Als Rauschquellen treten bei Operationsverstärkern generell ein Stromrauschen und ein Spannungsrauschen auf. Das Stromrauschen addiert sich zu i_d und das Spannungsrauschen addiert sich zu u_a . In den Betrachtungen in dieser Arbeit wird als einzige Rauschquelle das thermische Rauschen des Rückkoppelwiderstandes R betrachtet, welches bei den verwendeten hohen Verstärkungsfaktoren dominiert.

Werden Einflüsse von $1/f$ -Rauschen sowie kapazitive Elemente ebenfalls berücksichtigt, ergibt sich für niedrige bzw. hohe Frequenzen ein frequenzabhängiges Rauschspektrum [48]. Da dies jedoch stark von den eingesetzten Bauteilen abhängt wird von einem vom Rückkoppelwiderstand R dominierten weissen Rauschen ausgegangen.

2.3.5 Physikalische Rauschquellen

2.3.5.1 Thermisches Rauschen

An jedem Widerstand kann eine Rauschspannung bzw. ein Rauschstrom gemessen werden, deren Stärke nur vom Widerstandswert und dessen Temperatur abhängt. Dies wird dadurch verursacht, dass die Anschlussdrähte des Widerstandes eine Art Antenne darstellen, die thermische Fluktuationen der Ladungsträger im Inneren des Widerstandes empfängt und nach außen leitet. Dies kann generell nicht vermieden werden. Es kann höchstens die Temperatur im Inneren des Widerstandes abgesenkt werden, indem z.B. die gesamte Platine, welche die Schaltung mit dem Widerstand enthält, gekühlt wird.

Die Ursache für das thermische Rauschen am Widerstand ist dieselbe Schwarzkörperstrahlung, wie sie von allen warmen Objekten emittiert wird [49]. Ein wichtiger Unterschied jedoch ist, dass die Anschlussdrähte eines Widerstandes ein eindimensionales System darstellen während z.B. die Sonne ihr Lichtspektrum in drei Raumdimensionen abstrahlt. Das hat direkte Auswirkungen auf die Form des Spektrums und führt dazu, dass der Rauschstrom für niedrigere Frequenzen ein flaches, weißes Spektrum aufweist, für hohe Frequenzen jedoch abfällt. Die Grenze für den Übergang ist gegeben durch

$$f_{\text{falloff}} = \frac{k_{\text{B}}T}{h},$$

mit der Boltzmannkonstante k_{B} , dem Planckschen Wirkungsquantum h , sowie der Temperatur T in Kelvin. Für Raumtemperatur ergibt sich für $f \ll 6.25$ THz ein weißes und damit frequenzunabhängiges Spektrum. Um den Rauschstrom zu berechnen muss daher nur über die im System betrachtete Bandbreite integriert werden. Für den Rauschstrom in einem Widerstand gilt also

$$i_{\text{th}} = \sqrt{\frac{4k_{\text{B}}TB}{R}}, \quad (2.25)$$

wobei B die Bandbreite in Hertz und R der Widerstandswert selbst ist.

Der Rauschstrom des Rückkoppelwiderstandes in einem Transimpedanzverstärker wird zum eigentlich zu messenden Eingangssignal hinzuaddiert und verfälscht die Messung. Um diesen Rauschstrom zu minimieren soll die Größe des Widerstandes also maximiert und die Bandbreite des Systems minimiert werden.

2.3.5.2 Schrotrauschen

Sowohl Ladungsträger als auch Photonen stellen diskrete Teilchen dar. Dies bedeutet, dass ein von einem Photodetektor empfangener Lichtstrom eine Rate von diskreten Ereignissen der Ladungsträgerpaarerzeugung hervorruft. Diese Ereignisse folgen generell der Statistik eines Poissonprozesses, was dazu führt, dass ein Photodetektor, der eigentlich einen zeitlich konstanten Lichtstrom empfängt, ein Stromsignal abgibt, welches zeitliche Schwankungen aufweist.

Analog zum thermischen Rauschen des Rückkoppelwiderstandes kann das Schrotrauschen einer Photodiode angegeben werden. Hier ergibt sich die mittlere Rate von Ladungsträgerpaketen aus dem mittleren elektrischen Strom I dividiert durch die Ladung pro Paket $N_q q$. Daraus ergibt sich der Rauschstrom

$$i_{\text{schrot}} = \sqrt{2N_q q I B} \quad (2.26)$$

für die betrachtete Bandbreite B [49]. Der Wert von N_q gibt die Anzahl von Elementarladungen pro Ereignis an. Für eine normale Photodiode gilt $N_q = 1$, während ein Photodetektor mit Ladungsträgervervielfachung $N_q > 1$ aufweist.

Für die Modellierung von Schrotrauschen kann in dieser Arbeit generell eine Normalverteilung angenommen werden, da jeweils eine Vielzahl von Ladungsträgern betrachtet wird und die Poissonverteilung in diesem Fall näherungsweise in eine Normalverteilung übergeht.

Besteht das Signal eines Empfängers aus einem Nutzanteil i_{nutz} und einem Hintergrundanteil $i_{\text{hintergrund}}$, so erhöht sich das entsprechende Schrotrauschen in Gleichung 2.26 proportional zur Wurzel der Summe beider

Stromanteile. Um das Verhältnis von Nutzsignal zu Rauschsignal zu maximieren sollte das Verhältnis $(i_{\text{nutz}} + i_{\text{hintergrund}})/i_{\text{schrot}}$ maximiert werden. Daraus ergibt sich, dass $i_{\text{hintergrund}}$ generell minimiert werden sollte. Eine Erhöhung von i_{nutz} führt maximal zu einer Verbesserung des Verhältnisses proportional zur Wurzel der Nutzsignalerhöhung. In einem realen System sind die Werte des Nutzstromes sowie des Hintergrundstromes auf komplexe Weise verknüpft, sodass eine detaillierte Betrachtung des Gesamtsystems notwendig wird, um ein optimales Verhältnis zwischen Signal und Rauschen zu erreichen.

2.3.5.3 Addition von Rauschströmen

Werden zwei Rauschströme addiert, so werden ihre Leistungen addiert, also gilt

$$i_{\text{total}} = \sqrt{i_{\text{th}}^2 + i_{\text{schrot}}^2}. \quad (2.27)$$

2.4 Optik

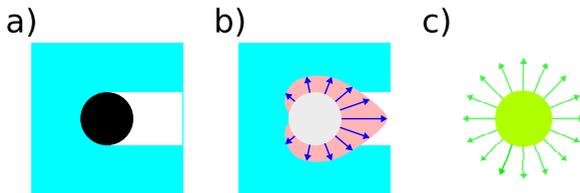


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung von a) Absorption, b) Streuung und c) Fluoreszenz. Der Lichteinfall erfolgt von Links. Der absorbierende Partikel erzeugt einen Schatten. Der streuende Partikel erzeugt einen Schatten und emittiert das gestreute Licht richtungsabhängig. Der fluoreszierende Partikel emittiert die Fluoreszenz gleichmäßig in alle Raumrichtungen.

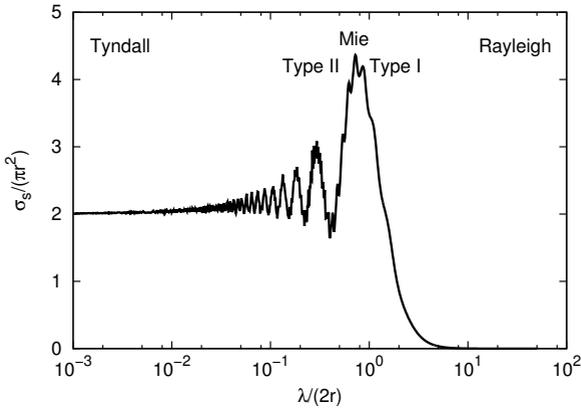


Abbildung 2.7: Exemplarische Darstellung des Streuquerschnittes eines Partikels mit Brechungsindex 1.5 in einem Medium mit Brechungsindex 1.0 in Abhängigkeit der Partikelgröße.

Im Folgenden werden die in Abbildung 2.6 schematisch dargestellten Effekte der Absorption, Streuung und Fluoreszenz diskutiert. Diese optischen Effekte sind die Grundlage für die Partikeldetektion.

2.4.1 Absorption und Streuung

Bei der Absorption von Licht werden Photonen aufgenommen und gegebenenfalls verzögert mit anderer Wellenlänge emittiert. Streuung ist die Ablenkung von Photonen in ihrer Richtung. Um dieses Phänomen für beliebige Partikelgrößen zu erfassen, müssen die Gleichungen der auftretenden elektrischen Wellen gelöst werden. Dies ist im Fall von kugelförmigen Partikeln in einem homogenen Medium vergleichsweise einfach möglich und wird von der Mie-Theorie beschrieben [50–53].

Exemplarisch wird in Abbildung 2.7 das Verhältnis des Streuquerschnittes zum geometrischen Querschnitt einer nichtabsorbierenden Kugel in Abhängigkeit der Größe dieser Kugel dargestellt. Diese Kurve kann in vier charakteristische Teile aufgeteilt werden [50]. Für große Kugeln beträgt

dieser konstant das Doppelte des geometrischen Querschnittes, hier wird von Tyndall-Streuung gesprochen [54]. Bei Kugeldurchmessern im Bereich der Wellenlänge treten Resonanzen auf. Hier wird von Mie-Streuung gesprochen, welche in zwei Untertypen aufgeteilt werden kann. Typ I für Durchmesser kleiner als das erste Maximum und Typ II für Durchmesser größer als das erste Maximum [53]. Für sehr kleine Durchmesser geht die Mie-Streuung in Rayleigh-Streuung über, bei welcher der Streuquerschnitt mit der vierten Potenz des Kugeldurchmessers abnimmt [55, 56].

Der Extinktionsquerschnitt

$$\sigma_{\text{EX}} = \sigma_{\text{A}} + \sigma_{\text{S}}. \quad (2.28)$$

ist die Summe aus Streuquerschnitt σ_{S} und Absorptionsquerschnitt σ_{A} .

Dass der Streuquerschnitt bzw. Extinktionsquerschnitt für große Partikel dem doppelten geometrischen Querschnitt entspricht, wie in Abbildung 2.7 dargestellt ist, liegt darin begründet, dass die Streuung eine doppelte Aufgabe übernimmt. Einerseits sorgt sie für die Auslöschung des einfallenden Lichtstrahls, erzeugt also damit einen Schatten hinter dem Objekt. Dies ist der Fall sowohl bei reiner Absorption ($\sigma_{\text{S}} = \sigma_{\text{A}} = \sigma_{\text{geom}}$), als auch bei reiner Streuung ($\sigma_{\text{S}} = 2\sigma_{\text{geom}}$). Im Fall der reinen Streuung wird die der einfallenden Welle entnommene Leistung unter anderen Winkeln wieder abgestrahlt. Der Extinktionsquerschnitt beträgt jedoch in diesen beiden Fällen das doppelte des geometrischen Querschnittes [57].

Nach Referenz [51] gilt für die Berechnung die folgendermaßen definierte Reihe

$$\sigma_{\text{S}} = \frac{2}{\alpha^2} \sum_1^{\infty} (2n+1) \left(|a_n|^2 + |b_n|^2 \right) \quad (2.29)$$

mit den Elementen

$$a_n = (-1)^{n+\frac{1}{2}} \frac{S_n(\alpha) S'_n(\beta) - m S_n(\beta) S'_n(\alpha)}{S'_n(\beta) \phi_n(\alpha) - m S_n(\beta) \phi'_n(\beta)} \quad (2.30)$$

und

$$b_n = (-1)^{n+\frac{1}{2}} \frac{m S_n(\alpha) S'_n(\beta) - S_n(\beta) S_n(\alpha)}{m S'_n(\beta) \phi_n(\alpha) - S_n(\beta) \phi'_n(\beta)}. \quad (2.31)$$

Von der Partikelgröße hängen die Faktoren

$$\alpha = \frac{2\pi r}{\lambda} \quad (2.32)$$

und

$$\beta = m\alpha \quad (2.33)$$

direkt ab. Der Brechungsindex fließt über Verhältnis der Brechungsindizes des Mediums n_1 und des Partikels n_2

$$m = n_2/n_1 \quad (2.34)$$

ein.

Die restlichen Faktoren werden über die Bessel-J-Funktion J_n vom Grad n definiert zu

$$\phi_n(z) = S_n(z) + iC_n(z), \quad (2.35)$$

$$S_n(z) = \sqrt{\frac{\pi z}{2}} J_{n+\frac{1}{2}}(z), \quad (2.36)$$

$$C_n(z) = \sqrt{\frac{\pi z}{2}} (-1)^n J_{-n-\frac{1}{2}}(z), \quad (2.37)$$

bzw. der Ableitung dieser Funktionen

$$\phi'_n(z) = S'_n(z) + iC'_n(z), \quad (2.38)$$

$$C'_n(z) = \frac{dS_n(z)}{dz}, \quad (2.39)$$

$$S'_n(z) = \frac{dS_n(z)}{dz}. \quad (2.40)$$

Für die Berechnung muss die Reihenentwicklung in Gleichung 2.29 mit ausreichender Genauigkeit ausgewertet werden. Die sich daraus ergebenden Streuquerschnitte sind in Abbildung 2.7 exemplarisch dargestellt.

In einem Durchflusszytometer bzw. in einem mikrofluidischen System wird nicht direkt der Extinktionsquerschnitt gemessen, sondern der Strahlungsfluß, der auf den Detektor fällt. Von Messung der Absorption bzw.

Extinktion spricht man dann wenn der Lichtstrahl der Quelle direkt auf den Detektor trifft. In diesem Fall ist für die Signalstärke also die Hälfte des Extinktionsquerschnittes entscheidend, wodurch sich das Extinktionsparadoxon auflöst und für große Objekte Mie-Theorie und geometrische Optik in Einklang stehen. Von Messung der Streuung wird gesprochen, wenn kein direkter Lichtpfad besteht und somit nur gestreutes Licht auf den Detektor fällt. Hier ist der Anteil des Lichtes entscheidend, der in den entsprechenden Winkelbereich des Detektors gestreut wird.

Bei klassischen Durchflusszytometern kann Absorption in Vorwärtsrichtung, Streuung in Vorwärtsrichtung (z.B. im Winkel von 0.5° - 10°) und Streuung unter größeren Winkeln (z.B. 45° , 90°) gemessen werden. Aus diesen Signalen kann auf das Vorhandensein bzw. die Größe von Partikeln geschlossen werden [58, 59]. Zusätzlich besteht bei der Kombination mehrerer Messwerte die Möglichkeit, zusätzliche Informationen über die Beschaffenheit von Partikeln, wie beispielsweise roten Butkörperchen, zu erhalten [60–67]. Vergleiche von Messungen an roten Blutkörperchen mit Vorhersagen der Mie-Theorie ergaben eine gute Übereinstimmung [63, 64].

Für die Implementierung von Streuungs- und Absorptionsmessungen in einem kleinen mikrofluidischen System ist es wichtig zu beachten, dass der Winkelbereich der Messung aufgrund fehlender abbildender optischer Komponenten nicht so eng eingeschränkt werden kann wie in klassischen Durchflusszytometern. Zudem führen Partikelbewegungen dazu, dass sich der Winkelzusammenhang zwischen Lichtquelle, Partikel und Detektor im Laufe der Messung ändert.

Im Falle von großen Partikeln lassen sich die Eigenschaften grundsätzlich mit geometrischer Optik berechnen, da im Bereich von Tyndall-Streuung der Extinktionsquerschnitt konstant ist. Für kleinere Partikel muss für Querschnitt der Extinktion entsprechend der Mie-Theorie eine Korrektur vorgenommen werden. Die hierbei auftretende Winkelverteilung der gestreuten Strahlung muss ebenfalls nach der Mie-Theorie berechnet werden. Für sehr kleine Partikel gilt, dass der Streuquerschnitt entsprechend der Rayleigh-Streuung viel kleiner als der geometrische Querschnitt ist. Dies bedeutet, dass sehr kleine Partikel nur ein sehr geringes Signal erzeugen können. Damit wird die Messung sehr kleiner Partikel sehr schwierig. Das

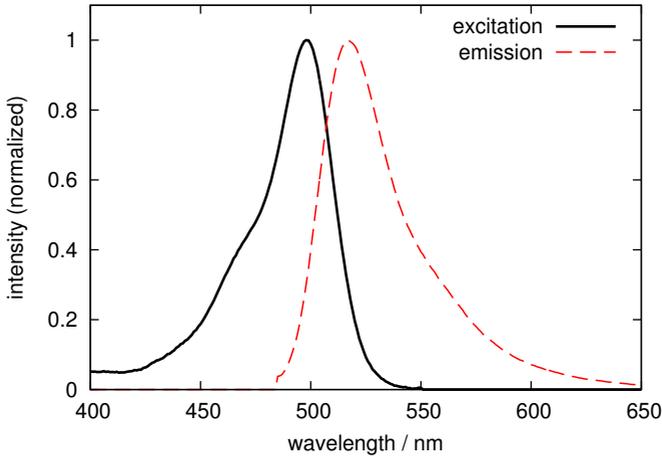


Abbildung 2.8: Absorptions- und Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein. (Datenquelle: invitrogen.com)

hat jedoch auch den Vorteil, dass Verunreinigungen in der zu messenden Flüssigkeit nur geringe Störungen verursachen. Da Blutzellen Größen im Mikrometerbereich aufweisen ist deren Messung über Streuung und Absorption nicht beeinträchtigt.

2.4.2 Fluoreszenz

Fluoreszenz wird das Licht genannt, welches bei radiativer Deaktivierung von angeregten Zuständen aus einem Molekül eines Fluoreszenzfarbstoffes emittiert wird. Die Anregung der Fluoreszenzmoleküle erfolgt im Fall von Durchflusszytometrie ebenfalls durch Licht, jedoch kürzerer Wellenlänge, beispielsweise durch einen Laser mit 488 nm Wellenlänge. Die hierdurch angeregten Zustände haben üblicherweise eine deutlich höhere Energie als der niedrigste angeregte Zustand. Ein angeregter Zustand gibt seine überschüssige Energie sehr schnell thermisch ab, bis er den niedersten angeregten Zustand erreicht hat. Die Energie eines emittierten Photons

ist also grundsätzlich geringer als die zur Anregung verwendete Energie. Zusätzlich ist das emittierte Spektrum eines Fluoreszenzfarbstoffes deshalb weitgehend unabhängig von der Anregewellenlänge.

Die Fähigkeit eines Fluoreszenzfarbstoffes, Photonen zu absorbieren und zu emittieren unterliegt einer Wellenlängenabhängigkeit. Daraus ergeben sich das Absorptions- und Emissionsspektrum des Farbstoffes. Für den Fall von Fluorescein sind diese in Abbildung 2.8 dargestellt.

Eine sehr verbreitete Methode, um Zellen selektiv mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren, ist, die Fluoreszenzmoleküle mit biologischen Antikörpern zu koppeln. Dadurch kann sehr selektiv nur eine bestimmte Subpopulation von Zellen (z.B. CD4+) angesprochen werden.

Um unterschiedliche Zellpopulationen über ihr Spektrum zu trennen, werden entsprechende Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Emissionsspektren eingesetzt. Diese werden mit den für die Zellpopulationen passenden Antikörpern versehen. Durch den Einsatz von spektralen Filtern wie dichroitischen Spiegeln kann das Fluoreszenzsignal dann auf mehrere Detektoren aufgeteilt werden.

2.4.3 Planare optische Systeme

Um den Einfluss der von geometrischen Größen wie Schichtdicken, Abständen und Größen von Flächen der Lichtquellen und Detektoren auf das Messsignal abschätzen zu können, werden nun einige Betrachtungen durchgeführt.

Im einfachsten Fall steht eine planare Lichtquelle einem planaren Detektor gegenüber. Ein absorbierender Partikel kann hierbei beispielsweise als planare Abschattung modelliert werden. Im Fall von Fluoreszenz wird der Partikel als Punktlichtquelle betrachtet. Hier ist die auf den Partikel einfallende Lichtintensität, sowie der vom Detektor wahrgenommene Anteil des Lichts entscheidend.

Um hier eine einfache und intuitive Abschätzung zu erhalten, wird der Raumwinkel bzw. die Raumwinkelprojektion zwischen einer Fläche und einem Punkt bzw. Flächenelement betrachtet.

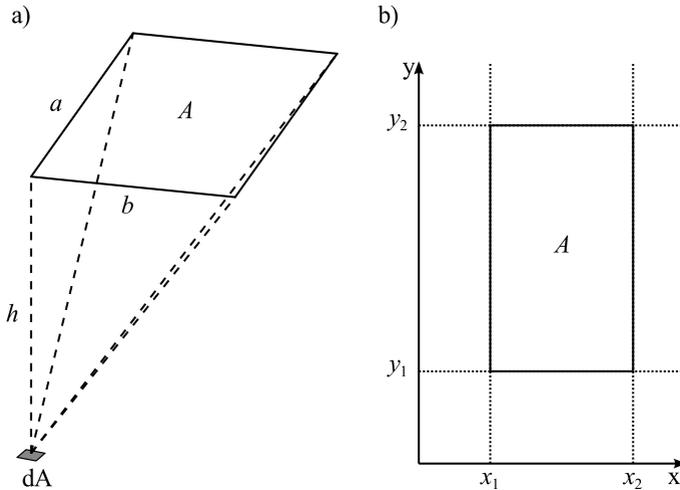


Abbildung 2.9: In a) ist die Raumwinkelprojektion eines Rechtecks auf ein Flächenelement unterhalb einer Ecke der Fläche dargestellt. Hierfür kann eine einfache Formel angegeben werden. In b) ist die Definition einer Fläche A mit beliebigen Eckpunkten dargestellt. Diese kann auf vier Unterflächen bestehend aus den Eckpunkten $(0,0)$ für die eine Ecke sowie den Eckpunkten (x_1, y_1) , (x_2, y_1) , (x_1, y_2) bzw. (x_2, y_2) für die andere Ecke dargestellt werden. Diese vier Flächen entsprechen der in a) dargestellten Konfiguration und erlauben damit die Berechnung des Raumwinkels bzw. projizierten Raumwinkels für beliebige Verschiebungen der Fläche.

Der von einem Rechteck mit den Dimensionen a und b zu einem dazu senkrechten Flächenelement im Abstand h unterhalb einer Ecke des Rechtecks abgedeckte Raumwinkel beträgt nach Referenz [68]

$$\omega_{R,E}(a, b, h) = \arctan \frac{ab}{h\sqrt{a^2 + b^2 + h^2}}. \quad (2.41)$$

Befindet sich am Ort des Flächenelements eine Punktlichtquelle mit der Leistung P_P , die homogen in den gesamten Raum abstrahlt, so ist die vom Flächenelement empfangene Leistung $P_{P \rightarrow F}$ proportional zum abgedeckten Raumwinkel

$$P_{P \rightarrow F} = P_P \frac{\omega_{R,E}}{4\pi}. \quad (2.42)$$

Für die von einem Flächenelement empfangene Leistungsdichte wird nicht der Raumwinkel direkt, sondern die Raumwinkelprojektion benötigt, da die einfallende Leistung mit dem Kosinus des Einfallswinkels gewichtet wird.

Die Raumwinkelprojektion $\omega_{p,R,E}(\alpha, \beta)$ mit $\alpha = b/h$ und $\beta = a/h$ beträgt

$$\begin{aligned} \omega_{p,R,E}(\alpha, \beta) &= \frac{1}{2} \left(\frac{\alpha}{\sqrt{1 + \alpha^2}} \arctan \left(\frac{\beta}{\sqrt{1 + \alpha^2}} \right) \right. \\ &\quad \left. + \frac{\beta}{\sqrt{1 + \beta^2}} \arctan \left(\frac{\alpha}{\sqrt{1 + \beta^2}} \right) \right) \end{aligned} \quad (2.43)$$

[69, 70].

Wenn sich die Ecke des Rechtecks nicht direkt über dem Flächenelement befindet, sondern zwischen den Geraden x_1 und x_2 sowie y_1 und y_2 aufgespannt wird und sich das Flächenelement im Ursprung befindet kann Formel 2.43 nicht direkt angewandt werden. Es ist jedoch möglich die verschobene Fläche durch vier Flächen darzustellen (in Abb. 2.9b gezeigt), die jeweils einen Eckpunkt über dem Ursprung einnehmen. Damit kann die von der Fläche abgedeckte Raumwinkelprojektion folgendermaßen berechnet werden:

$$\begin{aligned} \omega_{p,R}(x_1, x_2, y_1, y_2) &= +\omega_{p,R,E} \left(\frac{y_1}{h}, \frac{x_1}{h} \right) + \omega_{p,R,E} \left(\frac{x_2}{h}, \frac{y_2}{h} \right) \\ &\quad - \omega_{p,R,E} \left(\frac{x_1}{h}, \frac{y_2}{h} \right) - \omega_{p,R,E} \left(\frac{x_2}{h}, \frac{y_1}{h} \right) \end{aligned} \quad (2.44)$$

Handelt es sich bei der Leuchtfläche um einen in den Halbraum abstrahlenden Lambertschen Flächenstrahler mit der Leistung P_F und der Fläche A_F ergibt sich die Bestrahlungsstärke eines Empfängers aus der Strahldichte E der Quelle und der Raumwinkelprojektion der Quelle

$$E_{F \rightarrow P} = \frac{P_F}{A_F} \cdot \frac{\omega_{D,R}}{\pi}. \quad (2.45)$$

Gleichung 2.45 kann für die Berechnung der Bestrahlungsstärke auf der Oberfläche eines von einer flächigen LED bestrahlten Fluoreszenzpartikels verwendet werden. Gleichung 2.42 berechnet die Fluoreszenzstrahlung, die von einem kleinen Fluoreszenzpartikel auf eine Photodetektor eingestrahlt wird.

Die von einem Flächenstrahler auf eine Fläche eingestrahlte Leistung $P_{F \rightarrow F}$ lässt sich berechnen, indem $E_{F \rightarrow P}$ über die Empfangsfläche numerisch integriert wird. Bei planaren optischen Systemen können hierbei für jeden Punkt der Empfängerfläche die an dieser Stelle sichtbaren Leuchtflächen in Rechtecke aufgeteilt und aufsummiert werden um komplexe Geometrien mit teilweisen Abschattungen zu berücksichtigen. Dadurch lassen sich Abschattungseffekte zwischen einer planaren LED und einer planaren Fotodiode einfach mit hoher Genauigkeit berechnen.

Für eine quadratische Leuchtfläche mit der Kantenlänge l wird der Raumwinkel berechnet den die Fläche für einen Leuchtpunkt in Abstand h mittig angebracht einnimmt. Das Ergebnis wird in Abbildung 2.10 dargestellt. In 2.11 wird derselbe Sachverhalt für den auf ein Flächenelement projizierten Raumwinkel dargestellt. Hierbei fällt auf, dass sich für geringe Abstände deutlich unterschiedliche Kurvenverläufe ergeben, während für große Abstände beide Kurven invers proportional dem quadrierten Abstand folgen.

Die auf ein Flächenelement eingestrahlte Leistung weist für geringe Abstände eine Sättigung auf. Damit verringert sich die Abstandsabhängigkeit. Da die Oberfläche eines sphärischen Mikropartikels gekrümmt ist und daher tendenziell seitlich mehr Strahlung empfängt als ein parallel ausgerichtetes Flächenelement, stellen die Kurven in Abbildung 2.10 bzw. 2.11 bezogen auf die Oberfläche bzw. den Querschnitt der Kugel prinzipiell Grenzwerte der tatsächlich empfangenen Leistung dar. In beiden Fällen wird jedoch

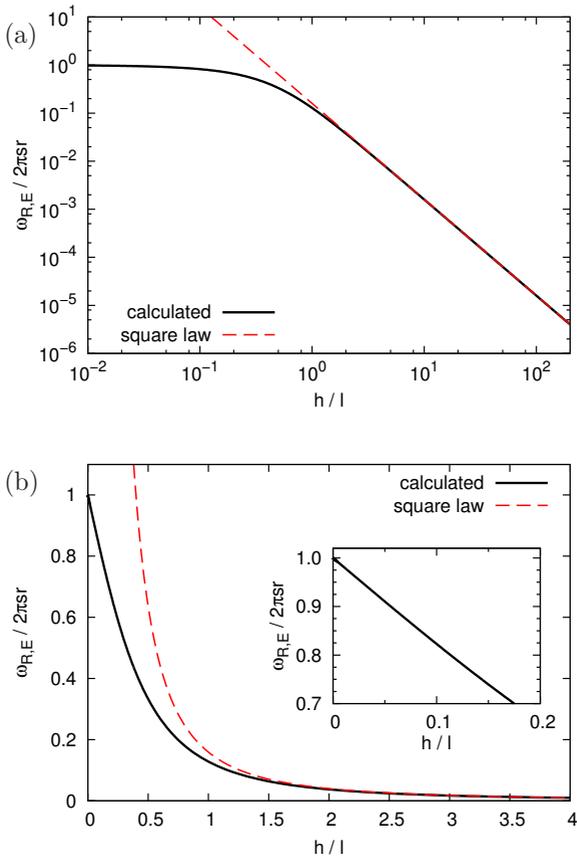


Abbildung 2.10: Raumwinkel einer Fläche mittig angebracht vor einer Punktlichtquelle bei Variation des Abstandes h in a) logarithmischer und b) linearer Auftragung mit quadratischer Näherung.

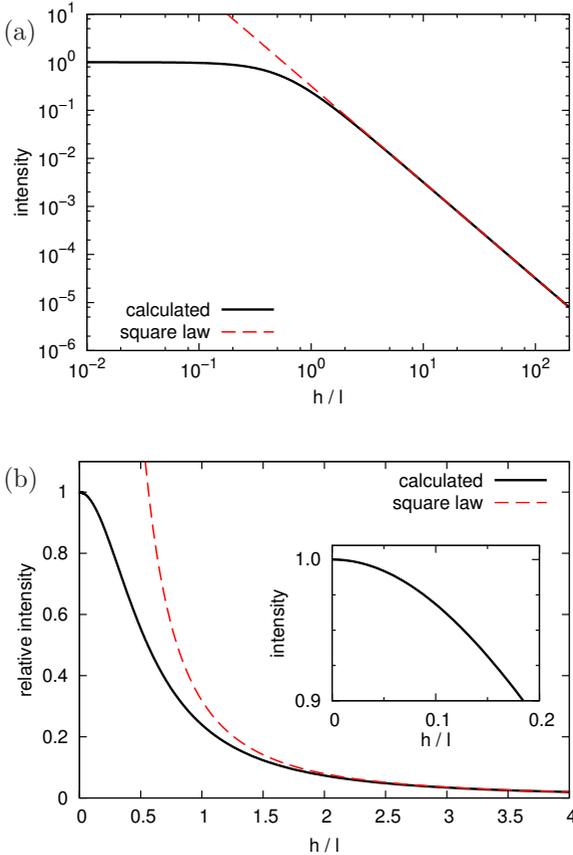


Abbildung 2.11: Relative Bestrahlungsstärke eines Flächenelements mittig angebracht vor einer quadratischen Leuchtfläche bei Variation des Abstandes h in a) logarithmischer und b) linearer Auftragung mit quadratischer Näherung.

deutlich, dass auch bei relativ großen Leuchtflächen das bestrahlte Objekt möglichst nahe an die Lichtquelle herangeführt werden sollte um die Verluste der Bestrahlungsstärke gering zu halten.

Der Raumwinkel ist relevant für die von einer flächigen Lichtquelle an einen Partikel übertragene Lichtleistungsdichte bzw. umgekehrt von einem Partikel zu einem flächigen Empfänger übertragene Lichtleistung. Dies gilt beispielsweise für Fluoreszenzpartikel. Die Raumwinkelprojektion ist genauso relevant für die Berechnung der übertragenen Lichtleistung von einer flächigen Lichtquelle zu einem flächigen Detektor.

3 Fluoreszenzbasierte Partikeldetektion

Die Detektion von Partikeln mithilfe von Fluoreszenzsignalen erlaubt eine hohe Selektivität bei der Detektion von Zellen wenn diese mit entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden. In diesem Kapitel wird die Realisierung eines mikrofluidischen Chips zur Fluoreszenzdetektion beschrieben und die Messergebnisse werden diskutiert. Ein wesentlicher Unterschied im Vergleich zu herkömmlichen Durchflusszytometern und bisherigen mikrofluidischen Systemen besteht in der dünnen Bauweise mit Aperturen und Absorptionsfiltern in Form von Folien. Dadurch werden abbildende Optiken vermieden, wobei die Empfindlichkeit der Detektion dennoch für Anwendungen der Durchflusszytometrie ausreichend bleibt.¹

Die Partikelklassifizierung mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern ist eine gängige Methode in der biomedizinischen Analytik und auch der Durchflusszytometrie [18]. Etablierte Systeme bieten eine sehr gute Sensitivität und Analysegeschwindigkeit, was für viele Anwendungen im Labor von hoher Wichtigkeit ist. Neuere Entwicklungen, welche im Bereich der Mikrofluidik stattfinden, konzentrieren sich jedoch auf die Verbesserung der Flexibilität als auch der vereinfachten Handhabung zusammen mit einer Kostensenkung der Systeme. Dem flexiblen Einsatz entgegen stehen platzraubende Bauteile, die für eine Miniaturisierung ersetzt werden müssen. Einher mit der Ersetzung von teuren, leistungshungrigen und großen Komponenten durch neuartige Komponenten geht auch eine Kostenreduktion. Durch

¹Teile dieses Kapitels wurden bereits in [71, 72] veröffentlicht.

die Reduktion von Platz- und Stromverbrauch werden die Systeme portabel einsetzbar, was das Anwendungsspektrum gerade im Bereich der Vor-Ort-Diagnose (engl. *point-of-care diagnostics*, PoC) verbessert.

Ein Beispiel für den Komponententausch ist der Austausch von Gaslasern durch Festkörperlaser, Diodenlaser [28, 73–78] oder LEDs [79–81]. Während beim Ersatz der Gaslaser durch Diodenlaser prinzipiell das restliche elektrooptische System ohne Funktionseinbußen unverändert übernommen werden kann, stellt sich die Situation beim Einsatz von LEDs gänzlich anders dar. Der Grund hierfür liegt darin begründet, dass LEDs kein kohärentes Licht emittieren sondern eine inkohärent leuchtende Fläche besitzen. Dadurch kann das von der LED emittierte Licht nicht analog zum Laserlicht im Messbereich auf eine hohe Leistungsdichte fokussiert werden. Die Leistungsdichte im Messbereich ist vielmehr auf die Leistungsdichte der Lichtquelle beschränkt. Nichtsdestotrotz gibt es auf dem Markt mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer [82] bereits ein Produkt, welches neben einer Laserlichtquelle auch eine blaue LED als Anregelichtquelle für Fluoreszenzmessungen in mikrofluidischen Systemen verwenden kann.

Analog zur Entwicklung beim Ersatz der Anregelichtquelle findet auf der Detektionsseite ein ähnlicher Prozess statt. Hier werden Photoelektronenvervielfacherröhren (engl. *photo multiplier tubes*, PMT) durch Lawineneffekt-Photodioden (engl. *avalanche photodiode*, APD) bzw. Photodioden ohne Verstärkungseffekt ersetzt [28, 77, 83, 84]. Während bei PMTs und APDs prinzipiell einzelne Photonen bzw. eine geringe Anzahl von Photonen detektiert werden können ist dies beim Einsatz von Photodioden ohne Verstärkungseffekt aufgrund des hohen Hintergrundrauschens nicht mehr möglich. Dadurch verliert das Detektionssystem gerade bei geringen Anregungsleistungen wie sie bei Anregung durch LED-Licht entstehen deutlich an Empfindlichkeit.

Ein weiterer Aspekt des Detektionssystems sind die optischen Komponenten zur Führung und Aufbereitung des Lichts. Hierzu gehören dichroitische Spiegel, welche Anregelicht von Emissionslicht unterschiedlicher Wellenlängen trennen, Filter, welche zur weiteren Unterdrückung von transmittiertem Restlicht eingesetzt werden, sowie Linsen zur Fokussierung und Kollimation des Anregelichtes sowie des Emissionslichtes. Hochwertige

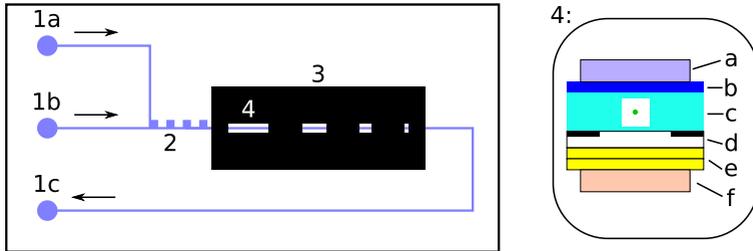


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des in diesem Kapitel verwendeten Mikrofluidikchips. Links ist die Draufsicht dargestellt. Die Mikrofluidischen Anschlüsse für den Probenstrom (1a), welcher die zu messenden Partikel enthält, der Mantelfluss (1b) welcher partikelfreie Flüssigkeit enthält und der Auslass (1c). Die Einlässe werden mit einer Spritzenpumpe verbunden, um eine kontrollierte Flussrate einzustellen. Eine Fokussierungsstruktur (2) sorgt dafür, dass der Probenstrom in die Mitte des Kanals gelenkt wird und vom Mantelfluss umgeben fließt. Eine Schattenmaske (3) enthält eine Reihe von Messaperturen unterschiedlicher Länge. Die Detailansicht rechts zeigt schematisch den Querschnitt durch die erste Messapertur (4). Eine LED (a) strahlt Licht nach unten. Ein Blaufilter (b) absorbiert enthaltene langwellige Anteile. Der Mikrofluidikkanal mit dem Probenstrom in der Mitte ist von einem Silikon umgeben (c). Die Messapertur (d) schränkt den Messbereich ein. Gelbfilter (e) absorbieren kurzwellige Anteile des Lichtes aber transmittieren Fluoreszenz. Von im Kanal (c) an die Messzone passierenden Fluoreszenzpartikeln erzeugte Fluoreszenz wird somit auf die Photodiode (f) transmittiert und kann detektiert werden.

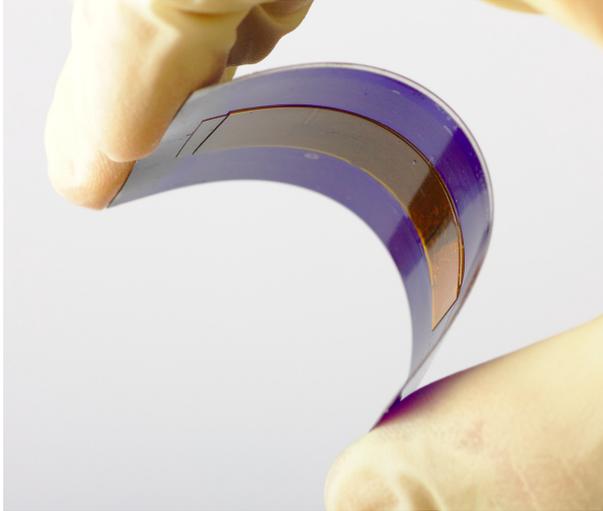


Abbildung 3.2: Demonstration der Flexibilität des in dieser Arbeit hergestellten mikrofluidischen Chips zur fluoreszenzbasierten Partikeldetektion.

Komponenten sind hier ebenfalls teuer und, im Vergleich zum mikrofluidischen System, platzraubend. Als Ersatz bietet sich hier der Einsatz von absorbierenden Farbfiltern sowie Polarisationsfiltern an, wobei die Wellenlängenselektivität hochwertiger Interferenzfilter nicht erreicht wird [83].

Durch mangelnde Unterdrückung des Anregelichts entsteht auf dem Detektor ein konstantes Hintergrundsignal, welches bei der Detektion von nichtmodulierten Signalen wie sie bei der Messung der Konzentration von Fluoreszenzmolekülen auftreten nicht vom eigentlichen Messsignal getrennt werden kann [30, 77, 83–88]. Dadurch sind solche Systeme prinzipiell in ihrer Empfindlichkeit durch das Hintergrundlicht stark beeinträchtigt. Bei der Detektion von Fluoreszenzpartikeln im Durchflusszytometer werden jedoch einzelne transiente Pulse erzeugt, welche sich leicht vom Hintergrundlicht trennen lassen. Dadurch können solche Systeme ein Level des Hintergrundlichtes tolerieren, welches wesentlich über der eigentlichen Messamplitude liegt.

Eine weitere interessante Entwicklung findet im Bereich der Drucktechnologien statt. Mikrofluidische Systeme sind auf flexible Substrate druckbar und somit auch Rolle-zu-Rolle verarbeitbar [7, 89]. Organische Bauelemente wie Leuchtdioden und Solarzellen zur Erzeugung bzw. Detektion von Licht sind ebenfalls auf flexible Substrate druckbar und eignen sich somit für einen Rolle-zu-Rolle-Prozess [16, 34, 35]. Deshalb liegt es nahe, das optische Design eines Partikeldetektionssystems zu diesen Herstellungsverfahren kompatibel zu machen. Grundsätzlich eignen sich hierfür planare Strukturen. Dies bedeutet jedoch, dass Mikroskopobjektive, dichroitische 45°-Spiegel und sonstige voluminöse optische Bauelemente nicht in das Detektionssystem integrierbar sind. Deshalb gilt es hierfür einen adäquaten Ersatz zu finden.

Etablierte laser-basierte Durchflusszytometer weisen üblicherweise eine deutlich bessere Empfindlichkeit als 10^3 MESF (engl. *molecules of equivalent soluble fluorochrome*) für eine Vielzahl unterschiedlicher Fluorophore auf. Beim kommerziell erhältlichen mikrofluidischen Analysesystem Agilent 2100 Bioanalyzer beträgt die Empfindlichkeit jedoch etwa $2 \cdot 10^6$ MESF beim Einsatz der blauen LED als Anregelichtquelle, was für einige Anwendungen nicht ausreicht [90]. Für mikrofluidische Systeme wurde jedoch mit Festkörperlasern eine Empfindlichkeit von besser als 600 MESF gezeigt [91]. Auch der Einsatz einer LED als Anregelichtquelle stellt kein prinzipielles Hindernis dar [81]. Deshalb ist davon auszugehen, dass bei guter Auslegung des Systems die Empfindlichkeit in den Bereich von 10^5 MESF verbessert werden kann was für einige Detektionsanwendungen von gefärbten Zellen ausreichend ist [92–95]. Es ist also durchaus denkbar, dass solche Systeme für den Vor-Ort-Einsatz Anwendung finden, um eine günstige und vor allem schnelle Diagnose zu ermöglichen.

Ein schematischer Entwurf für das in diesem Kapitel entwickelte Mikrofluidiksystem wird in Abbildung 3.1 dargestellt und gibt einen Überblick über die Zusammensetzung der Komponenten. Abbildung 3.2 demonstriert die Flexibilität des in dieser Arbeit hergestellten mikrofluidischen Chips.

3.1 Design des optofluidischen Systems

Das optofluidische System soll auf flexiblen Foliensubstraten aufgebaut sein. Für den optischen Teil eignen sich bedruckte und beschichtete Substrate, um Aperturen und Farbfilter herzustellen. Für die Herstellung des mikrofluidischen Kanals wird ein etabliertes Softlithografieverfahren [24], welches sich für *Rapid-Prototyping* eignet, adaptiert.

Im Folgenden wird auf das Design des hier vorgestellten Systems eingegangen. Da Partikel für die Messungen üblicherweise auf einen Teilbereich in der Mitte der Messzone fokussiert werden, wird eine hydrodynamische Fokussierungsmethode adaptiert. Danach wird auf die optischen Absorptionsfilter und die Eignung von Polarisationsfiltern eingegangen. Um den Messbereich zu definieren, findet zusätzlich eine auf Folie gedruckte Apertur Anwendung. Das elektrooptische System besteht aus einer LED als Anregelichtquelle, einer Photodiode als Detektor, sowie einem eigens für den Anwendungszweck entwickelten Verstärker mit Stromversorgung und Signalwandlung über einen USB-Port.

3.1.1 Partikelfokussierung

Für die Partikelmessung werden üblicherweise Partikelfokussierungsverfahren eingesetzt, damit die Position und Geschwindigkeit der Partikel kontrolliert werden kann. In klassischen Zytometern geschieht dies über eine koaxiale Kapillarstruktur, wobei die partikelhaltige Flüssigkeit von einem partikelfreien Mantelfluss umgeben wird. Solch eine koaxiale Struktur kann prinzipiell auch in mikrofluidischen Systemen realisiert werden [96–98]. Diese Strukturen lassen sich mit dem gewählten einfachen Herstellungsprozess jedoch nicht realisieren. Vereinfachte Strukturen benötigen eine weniger komplexe Feinstrukturierung und müssen sich in einem planaren Herstellungsprozess realisieren lassen [99–105]. Es gibt jedoch auch Ansätze, die ohne mehrschichtige Strukturen auskommen.

Ein Ansatz basiert auf Kräften, die auf Partikel wirken wenn diese einen langen dünnen Kanal passieren. Einerseits werden Partikel von der Kanalwand weggedrückt. Andererseits driften sie aus dem Kanalzentrum in

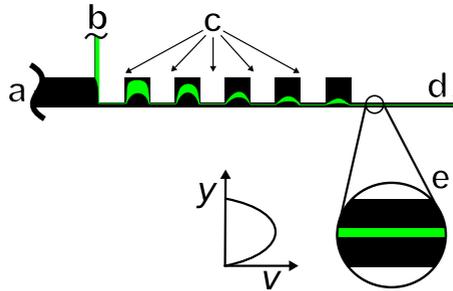


Abbildung 3.3: Geometrie der eingesetzten Struktur für die Partikelfokussierung mit schematisch eingezeichnetem Probenstrom. a: Einlass des Mantelflusses, b: Einlass des Probenstroms, c: Einschnürungen des Kanals zur Fokussierung, d: Auslass des im Mantelfluss fokussierten Partikelstromes. e: Detailansicht des in die Kanalmitte fokussierten Partikelstromes. Links davon eine schematische Darstellung des parabolischen Geschwindigkeitsprofils. Die Flussgeschwindigkeit hat im Zentrum des Kanals ein Maximum und fällt zum Rand hin auf Null ab.

Richtung der Wand. Hieraus ergeben sich eine oder mehrere Gleichgewichtspositionen, in denen sich die Partikel sammeln [106–110]. Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass sie prinzipiell bei einer bestimmten Partikelgröße nur in jeweils einem engen Fenster der Strömungsgeschwindigkeit funktionieren. Wenn unterschiedliche Partikelgrößen eingesetzt werden sollen, werden diese entweder nicht oder nur teilweise fokussiert. Folglich variieren die Positionen und Geschwindigkeiten zwischen den Partikeltypen. Insbesondere kleine Partikel erfahren geringere Kräfte, wodurch die Fokussierung erst ab einer bestimmten Mindestgröße funktioniert.

Abhilfe kann mit einer Struktur geschaffen werden, die auf dem sogenannten *Dean-Flow* basiert [111–113]. Diese Fokussierungsmethode basiert darauf, dass in einer Kanalbiegung die Flüssigkeit nahe der Innenwand des Kanals in Richtung Kanalmitte gedrückt wird. Damit dieser Effekt genutzt werden kann werden Mantelfluss und Probenfluss aus zwei Mikrofluidikkanälen zusammengeführt. Hierbei wird ein wesentlich höhere Flussrate für den Mantelfluss verwendet, wodurch sich der Probenfluss

nahe einer Kanalwand befindet. Durch eine Hintereinanderreihung von rechteckigen Ein- bzw. Ausbuchtungen auf der Seite des Probenflusses werden die gewünschten Kurven erzeugt, in denen die Probenflüssigkeit in Richtung Kanalmitte gedrückt wird.

Die eingesetzte Struktur zur Partikelfokussierung wird aus der Literatur adaptiert [113] und ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Dem Mantelfluss (a) wird seitlich der Probenfluss (b) zugegeben. Die Partikel passieren fünf Einschnürungszonen (c) und fließen über den Mikrofluidikkanal (d) zum Messbereich ab. Die Einschnürungszonen (Abbildung 3.3c) sind jeweils $300\ \mu\text{m}$ lang und $300\ \mu\text{m}$ breit und schnüren den Kanal an den Engstellen auf $50\ \mu\text{m}$ Breite ab. Die Abstände zwischen den Einschnürungen betragen ebenfalls $300\ \mu\text{m}$.

Um die optimale Flussrate zu bestimmen werden die Partikelgeschwindigkeiten aus den erzeugten Pulsbreiten extrahiert und deren Variationskoeffizient durch experimentelle Anpassung der Mantelflussrate minimiert.

3.1.2 Optische Filter

Für die Detektion von Fluoreszenz werden unterschiedliche Filter für das Anregungslicht und das Emissionslicht benötigt. Hierbei sollte die Transmission beider Filter keine spektrale Überlappung aufweisen, damit das Anregungslicht möglichst gut ausgefiltert wird. Da bei Fluoreszenzfarbstoffen üblicherweise ein verhältnismäßig kleiner *Stokes-Shift* auftritt, d. h. der Beginn des Emissionsspektrums spektral nahe dem Absorptionsmaximum liegt, sollten sowohl der Anregungsfilter als auch der Emissionsfilter in diesem Bereich steile Kanten im Transmissionsspektrum aufweisen.

Diese Eigenschaft wäre mit dichroitischen Spiegeln sehr gut realisierbar. Auf Glas oder ähnlichen unflexiblen Substraten basierende dichroitische Spiegel sind jedoch nicht mit dem Herstellungsprozess kompatibel und existierende polymerbasierte dichroitische Spiegel zeigen eine starke Winkelabhängigkeit der Filterkante [114]. Deshalb wird auf der Basis von kommerziell verfügbaren FarbfILTERFOLIEN eine Kombination ermittelt, deren Transmissionsübergang im Bereich von $500\ \text{nm}$ liegt.

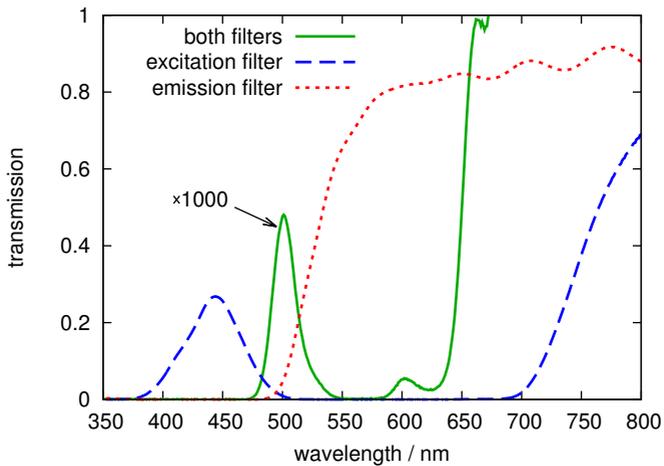


Abbildung 3.4: Transmissionsspektren der eingesetzten Filter für Anregung (Lee Filters, #071HT, gepunktete Linie) und Emission (Zwei Folien, Lee Filters #767, gestrichelte Linie), sowie die Transmission beider Filter um den Faktor 1000 vergrößert.

Die Transmissionsspektren der Filterfolien sind in Abbildung 3.4 dargestellt. Für das Anregelicht wird ein Blaufilter (Lee Filters, #071HT) eingesetzt, der im Vergleich zu der Standardserie von Lee Filters eine höhere Temperaturstabilität und geringere Schichtdicke aufweist. Dadurch wird einerseits die Degradation des mikrofluidischen Systems verringert, andererseits erhöht sich die Leistungsdichte des Anregungslichts in der Detektionszone, da der Abstand zwischen Leuchtdiode und Kanal verringert wird. Auf der Detektionsseite sind diese Faktoren von untergeordneter Relevanz, weshalb dort Filter der Standardserie eingesetzt werden (Lee Filters #767). Auf dieser Seite werden zwei Filterfolien kombiniert, um die optische Dichte zu erhöhen und die Transmission im Bereich von 450 nm stark zu unterdrücken.

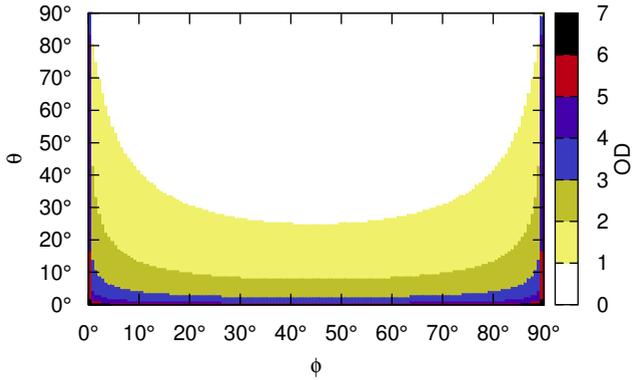
An den Filterkanten existiert ein Überlappungsbereich bei 500 nm. Hier werden durch den Filterstapel ca. 0.05 % des Lichtes transmittiert. Um dies zu vermeiden müsste die Filterkante des Emissionsfilters zu höheren Wellenlängen verschoben werden. Dies würde jedoch entweder auch das gewünschte Fluoreszenzlicht ausfiltern oder einen Fluoreszenzfarbstoff mit höherem *Stokes-Shift* und damit höherer Emissionswellenlänge erfordern.

Die hohe Transmission oberhalb von ca. 650 nm ist typisch für Folienfarbfilter. Um auftretendes Licht im Infrarotbereich auszufiltern wird deshalb zusätzlich ein Kronglasfilter eingesetzt, der sichtbares Licht transmittiert, jedoch Infrarotlicht absorbiert. Dies ist nur notwendig wenn der Photodetektor oberhalb von 650 nm eine Empfindlichkeit zeigt, was bei Silizium-Photodioden der Fall ist, jedoch nicht bei organischen Photodioden beispielsweise mit dem Absorbermaterial P3HT:PCBM [115].

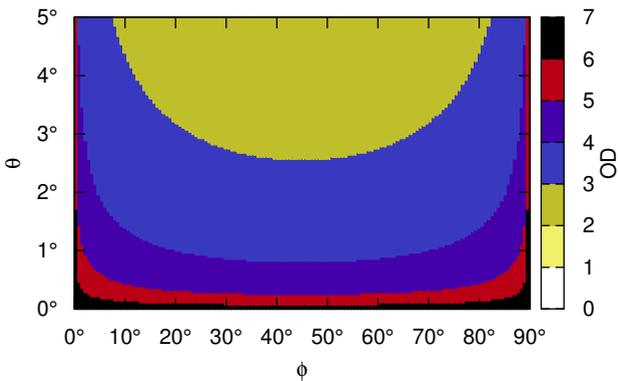
3.1.3 Gekreuzte Polarisatoren

Da mit Absorptionsfiltern noch keine perfekte Trennung von Anregelicht und Fluoreszenz möglich ist wird in diesem Unterkapitel auf den Einsatz von gekreuzten Polarisationsfiltern eingegangen.

In Displays werden zwei gegeneinander um 90° gedrehte Polarisatoren eingesetzt, damit ohne zusätzlichen Einfluss der zwischen den Polarisatoren enthaltenen Flüssigkristalle kein Licht durch das Display hindurch tritt.



(a) Voller Winkelbereich.



(b) Detailansicht bis 5° Schrägeinfall in θ .

Abbildung 3.5: Optische Dichte von gekreuzten Polarisatoren bei schräg einfallendem Licht.

Diese gekreuzte Anordnung von Polarisatoren kann prinzipiell auch in einem mikrofluidischen System für Fluoreszenzdetektion verwendet werden [83]. Von Flüssigkristalldisplays ist jedoch auch bekannt, dass eine hohe Winkelabhängigkeit besteht, d.h. bei schrägem Durchtritt des Lichtes erhöht sich an den dunklen Stellen die Transmission und der Kontrast wird dadurch verringert.

Um mit einer LED als Lichtquelle hohe Intensitäten im Kanal zu erreichen ist ein großer Winkelbereich für das einfallende Licht notwendig. Um die Leistungsfähigkeit von gekreuzten Polarisatoren als Filter für das Anregelicht abzuschätzen wird die optische Dichte einer solchen Anordnung winkelabhängig in Kugelkoordinaten berechnet und in Abbildung 3.5 dargestellt. Da eine LED unpolarisiertes Licht aussendet geht hier am ersten Polarisator immer die Hälfte des Lichtes verloren. Dies kann nicht für die Anregung verwendet werden und wird deshalb nicht berücksichtigt. Wie in Abbildung 3.5 ersichtlich verringert sich bei schräg einfallendem Licht ($\theta > 0^\circ$) die Filterwirkung wenn der Schrägeinfall nicht in Richtung bzw. quer ($\phi = 0^\circ$ bzw. $\phi = 90^\circ$) zur Richtung der Polarisatoren erfolgt. In der Detailansicht in Abbildung 3.5b ist zu erkennen, dass selbst für leicht schräg einfallendes Licht die Filterwirkung bereits stark nachlässt. Für die Qualität des Filters ist die Gesamtmenge des transmittierten Lichtes entscheidend. Bei einem schrägen Lichteinfall bis $\theta < 5^\circ$ liegt die optische Dichte unter 3. Für $\theta > 45^\circ$ sinkt diese unter 1. Damit bieten in den Chip integrierte Polarisationsfilter in Kombination mit LEDs als Anregelichtquelle für Fluoreszenzmessungen im Vergleich zu den eingesetzten Absorptionsfiltern nur eine geringe Filterwirkung. Als zusätzliche Filter könnten sie jedoch die Unterdrückung des Hintergrundlichtes verbessern. Ryu et al. [83] haben gezeigt, dass die Verwendung von Polarisationsfiltern in Kombination mit absorbierenden Filtern zu einer weiteren Unterdrückung des Anregelichts einer LED in einem Fluoreszenzdetektionssystem führt. Dort wurde jedoch eine LED mit integrierter Optik verwendet, was den Raumwinkel der Emission verringert.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass durch zusätzliche Filter der Aufbau komplizierter und fehleranfälliger wird und sich der Abstand zwischen LED und Kanal weiter vergrößert. Deshalb wird vom Einsatz von Polarisationsfiltern abgesehen.

3.1.4 Messapertur

Um Messbereiche in der Länge zu definieren und das Anregelicht möglichst gut abzuschirmen werden rechteckige Aperturen eingesetzt. Siehe hierzu das Schema in Abbildung 3.1. Diese sind auf eine Folie (BuWeMedia) aufgebracht, welche gleichzeitig als Trägersubstrat dienen kann. Über die Länge der Apertur des aktiven Messbereichs, kann dieser beschränkt werden, was Auswirkungen auf die maximal mögliche Partikeldichte hat. Bei der Breite der Apertur muss ein Kompromiss zwischen transmittiertem Anregelicht, detektiertem Fluoreszenzlicht und geometrischen Toleranzen bei der Herstellung getroffen werden. Für die Herstellung wird eine Breite von $200\ \mu\text{m}$ quer zum Kanal gewählt. Die Länge wird in mehreren Abstufungen entlang des Kanals variiert. Direkt hinter der Fokussierungsstruktur befindet sich die längste Apertur mit $1779\ \mu\text{m}$ gefolgt von Aperturen mit $888\ \mu\text{m}$, $436\ \mu\text{m}$, $211\ \mu\text{m}$, $96\ \mu\text{m}$, $49\ \mu\text{m}$ und $18\ \mu\text{m}$. Zwischen den Aperturen wird jeweils eine geschlossene Fläche eingefügt, damit die restliche Fläche der LED abgeschattet wird.

3.1.5 Anregelichtquelle

Die Lichtquelle für die Anregung soll ein Flächenemitter sein, eine ausreichend hohe Leistungsdichte bieten und im richtigen Spektralbereich emittieren. Deshalb fällt die Wahl auf eine blaue LED (Luxeon, Rebel LXML-PR01-0425) [116]. Diese LED besitzt einen Silikon-Dom für eine verbesserte Lichtauskopplung im Einsatz als Beleuchtungsmittel. Dieser wird entfernt, um die Leuchtfläche freizulegen. Im Gegensatz zu anderen Leuchtdioden erfolgt bei dieser Leuchtdiode die Stromversorgung nicht über einen Bond-Draht, welcher über die Leuchtfläche hinausragt. Dadurch kann die Leuchtfläche nach dem Entfernen eines Bauteils für den Überspannungsschutz direkt auf den Mikrofluidikchip gedrückt werden und stellt analog zu einer organischen Leuchtdiode einen integrierten Flächenemitter dar.

3.1.6 Detektor

Als Detektor wird eine handelsübliche Silizium-PIN-Photodiode (BPW34, Osram) mit 2.65 mm Kantenlänge eingesetzt [117]. Sie zeichnet sich durch ihre verhältnismäßig große aktive Fläche aus und dadurch, dass das Licht durch eine flache Oberfläche einfällt. Dadurch kann die Photodiode analog zur LED auf die gegenüberliegende Seite des Substrates gedrückt werden und stellt einen zu einer integrierten organischen Photodiode optisch äquivalenten Detektor dar.

3.1.7 Analog-Digital-Wandler

Für die Analog-Digital-Wandlung wird eine handelsübliche USB-Soundkarte mit dem Wandlerchip (CM108, C-Media) eingesetzt. Sie kann über den USB-Port angeschlossen und mit Strom versorgt werden. Die Signale werden mit einer Auflösung von 16 bit gewandelt und können von einer Software auf dem angeschlossenen PC gespeichert bzw. verarbeitet werden. Der Vorteil dieser einfachen Lösung ist, dass keine Spezialsoftware nötig ist um die Signale aufzuzeichnen und moderne Betriebssysteme für die Verarbeitung von Soundsignalen bereits Echtzeitfähigkeiten bieten.

An der Schaltung der Soundkarte werden folgende Modifikationen durchgeführt. 1) Die Herausführung der 5 V Versorgungsspannung des USB-Anschlusses. 2) Die Überbrückung des analogen Hochpasses der Soundkarte.

Die Überbrückung des Hochpasses wurde durchgeführt, um auch niederfrequente Signale problemlos zu digitalisieren. Üblicherweise beträgt der Frequenzbereich von Soundkarten von weniger als 20 Hz bis über 20 kHz. Der Spannungsbereich des A/D-Wandlers beträgt ± 1.574 V mit einem Offset von ca. 2.2 V.

Auf dem PC werden die Signale entweder direkt mit einem Signalanalyseprogramm (baudline, SigBlips DSP engineering) analysiert oder mit einem Mehrkanal-Soundbearbeitungsprogramm (Audacity, audacity.org) aufgenommen und als unkomprimierte Wave-Dateien gespeichert.

3.1.8 Stromversorgung

Über den USB-Anschluss der Soundkarte steht eine Stromversorgung mit ca. 5 V und bis zu 500 mA zu Verfügung. Diese könnte direkt zur Versorgung der Leuchtdiode mit etwa 3.3 V Betriebsspannung sowie des Vorverstärkers verwendet werden. Nachteilig hierbei ist jedoch, dass die Qualität der Spannungsstabilität insbesondere bei längeren Kabeln und stark variierender Belastung der speisenden Stromquellen (beispielsweise in Computernetzteile) nicht immer gewährleistet werden kann. Weiterhin vereinfacht ein symmetrischer Aufbau der Stromversorgung mit ausreichend hoher Versorgungsspannung das Schaltungsdesign des Transimpedanzverstärkers. Deshalb wird ein DC-DC-Wandlerbaustein eingesetzt, der aus 5 V Eingangsspannung symmetrisch ± 15 V bereitstellt, die über Linearregler auf ± 12 V für den Vorverstärker stabilisiert werden.

Über einen weiteren Linearregler wird eine Spannung von +10 V für die LED bereitgestellt. Über einen variablen Vorwiderstand wird der Strom der LED auf den gewünschten Wert eingestellt. Damit lässt sich einfach eine rauscharme Stromquelle realisieren [118].

Um die Einsatzfähigkeit des Systems an ortsungebundenen Stromquellen zu testen wird der Stromverbrauch an der Versorgung gemessen. Hierbei ergibt sich eine maximale Stromaufnahme von 430 mA wobei der USB-Hub 80 mA benötigt und die Soundkarte 50 mA. Der Vorverstärker ohne LED benötigt 130 mA. Das Zuschalten der LED mit einem Strom von 50 mA benötigt an der Stromversorgung zusätzlich 170 mA. Dies geschieht aufgrund der ineffizienten Wandlung auf zuerst 15 V mit nachgeschalteter Reduktion der Spannung auf etwa 3.15 V an der LED. Hier wäre im Hinblick auf die Stromversorgung der Betrieb der LED mit vierfach höherem Strom möglich wenn ein effizienter rauscharmer Stromregler eingesetzt würde. Die Beschränkung auf 50 mA LED-Strom geschieht jedoch aus Lebensdauererwägungen, da die eingesetzten Farbfilter eine Degradation aufweisen. Dies wird im Detail in Kapitel 4.3.1 näher analysiert.

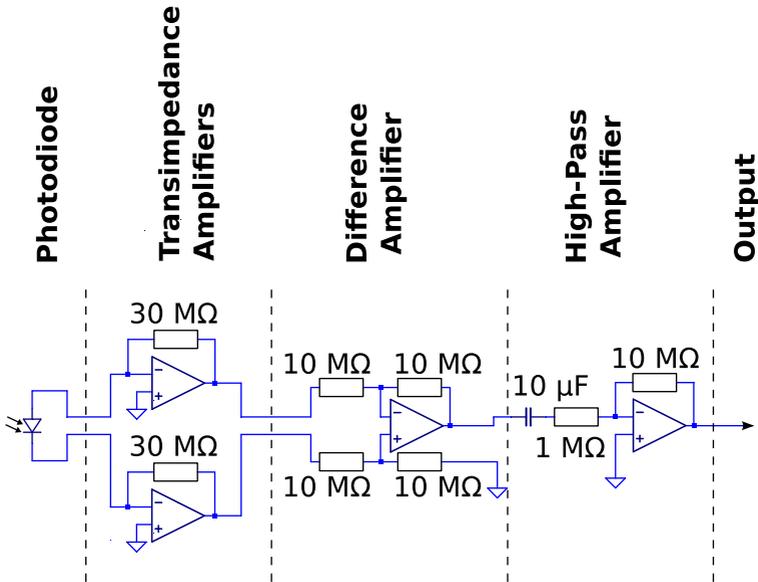


Abbildung 3.6: Schaltplan des Verstärkers.

3.1.9 Messverstärker

Um eine flexible Plattform für die Auswertung optischer Signale unterschiedlicher mikrofluidischer Systeme zu erhalten wird ein konfigurierbarer Verstärker gebaut. Die Schaltung ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Er besteht aus zwei Transimpedanzverstärkern als Eingangsstufe, einem subtrahierenden Verstärker und einem verstärkenden Hochpass als Ausgangsstufe zur Potentialanpassung. Der Rückkoppelwiderstand der Transimpedanzverstärker kann ausgetauscht werden, um die maximale Verstärkung sowie den maximal zulässigen Photodiodenstrom anzupassen. Die Grenzfrequenz des Hochpassfilters kann durch Austausch des Kopplkondensators angepasst werden.

Die Wahl von symmetrischen Eingängen ist nicht zwingend notwendig, bietet jedoch Vorteile. Die Rauscheigenschaften sind prinzipiell identisch zu einem Verstärker mit einzeltem Eingang und doppelter Verstärkung

des Transimpedanzverstärkers. Jedoch ist die Grenzfrequenz bei doppelter Ausführung aufgrund der jeweils halb so großen Rückkoppelwiderstände entsprechend verdoppelt. Dies spielt insbesondere dann eine Rolle, wenn besonders hohe Rückkoppelwiderstände eingesetzt werden sollen und die Operationsverstärker im Verstärkungs-Bandbreiten-Produkt begrenzt sind. Ein weiterer Vorteil ist, dass symmetrische Störungen, wie sie durch elektrostatische Einstreuungen auf die Kabel auftreten, unterdrückt werden können.

Im folgenden Experiment werden die beiden Transimpedanzverstärkerstufen jeweils mit einem $30\text{ M}\Omega$ -Widerstand betrieben, der Hochpass mit $10\text{ }\mu\text{F}$ und $1\text{ M}\Omega$ und einer Verstärkung von 10. Hieraus ergibt sich eine Gesamtverstärkung von 600 MV/A .

Eine mögliche Erweiterung wäre der Einsatz einer separaten Monitordiode im negativen Verstärkerzweig bzw. ein zweiter Differenzverstärker, um die Einflüsse von Helligkeitsschwankungen im Anregellicht zu kompensieren [119]. Dies ist aufgrund des niedrigen Rauschens der eingesetzten Leuchtdioden jedoch nicht notwendig. Bei organischen Leuchtdioden könnten jedoch deutlich höhere Schwankungen der emittierten Lichtleistung auftreten [120–122]. Der Einsatz einer Monitordiode ist in der vorliegenden Konfiguration jedoch nicht notwendig und würde bei rauscharmen Lichtquellen zu zusätzlichem Rauschen führen.

3.1.9.1 Abschirmung gegen Störquellen

Um vor der Messung Störquellen zu eliminieren wird das aufgenommene digitale Signal in Echtzeit mit Hilfe eines Signalanalyseprogramms (baudline, SigBlips DSP engineering) analysiert. Es können eine Reihe unterschiedlicher Störquellen mit jeweils charakteristischer Basisfrequenz identifiziert werden.

Optische Einstreuungen kommen von Lichtquellen mit zeitlich nicht konstanter Intensität. Hierzu zählen vor allem Glühlampen, die direkt mit Netzfrequenz betrieben werden und eine Störung bei 100 Hz erzeugen. Leuchtstofflampen, die mit einem Vorschaltgerät mit hoher Frequenz betrieben werden, sind prinzipiell außerhalb des betrachteten Frequenzbereichs, jedoch zeigen auch sie eine zeitliche Variation der Intensität mit doppelter

Netzfrequenz. Um diese Einstreuungen zu vermeiden und trotzdem den Messaufbau zu beleuchten eignen sich Lichtquellen mit gut stabilisierter Stromversorgung, also beispielsweise mit Labornetzteilen betriebene LED-Beleuchtungen. Eine weitere Quelle für Störungen durch Licht sind Lichtvariationen durch Abschattungen. Diese können durch Schattenwurf von Personen, Lüfter in Lampengehäusen oder auch Zerhackerräder entstehen. Um diese optischen Störquellen zu eliminieren wird der Aufbau optisch durch ein lichtundurchlässiges schwarzes Tuch abgeschirmt und die Raumbelichtung für die Messungen abgeschaltet.

Nach der Elimination der optischen Einstreuungen treten die elektromagnetischen Einstreuungen in den Vordergrund. Diese können durch magnetische Felder von Netzteilen verursacht werden. Insbesondere die Zuleitungen zu den Leuchtdioden für die Anregellichtquelle haben sich hier als stöempfindlich erwiesen. Hierbei treten hauptsächlich Störungen von 50 Hz auf, die durch Modulation des LED-Stromes entstehen. Ein Verdrillen der Leitungen sowie ein größerer Abstand zu Netzteilen verringert hier die Störungen deutlich. Elektrostatische Einstreuungen wirken auch direkt auf die Photodiode. Diese können nicht vom differentiellen Verstärker eliminiert werden wenn sie asymmetrisch einwirken. Hiergegen hilft es, die Unterseite des Aufbaus zu erden und mittels einer Aluminiumfolie auch die Oberseite abzuschirmen. Zusätzlich muss die elektrisch leitfähige Salzwasserlösung im Mikrofluidikkanal geerdet oder abgeschirmt werden, da sonst über die Anschlussleitungen direkt auf der Vorderseite der Photodiode elektrostatische Felder eingekoppelt werden. Ein weiteres Problem sind starke magnetische Pulse, wie sie durch Schaltvorgänge im Stromnetz entstehen. Diese Störquellen sind schwer abzuschirmen. Deshalb sollten Schaltvorgänge während der Messdauer vermieden werden.

Ein weiterer Punkt sind mechanische Schwingungen, die auf das optische System einwirken. Sie können über die Luft oder über den Labortisch übertragen werden. Hierbei hat sich gezeigt, dass die Übertragung über die Luft kein großes Problem darstellt, jedoch jegliche Vibrationen am Labortisch zu deutlichen Signalschwankungen führen. Da dies für alle im Gebäude vorhandenen Schwingungen gilt, werden z.B. Asynchronmotoren bei einer Frequenz etwas geringer als 100 Hz im Spektrum sichtbar. Um hierbei

Abhilfe zu schaffen, werden die Messungen entweder auf luftgefederten Labortischen oder im Keller des Gebäudes durchgeführt.

Alle diese Störquellen lassen sich darauf zurückführen, dass auf das Detektionssystem entweder mechanisch, elektrostatisch oder optisch eingewirkt wird. Bei Integration der elektrischen und optischen Komponenten in ein kleines, abgeschlossenes System ist zu erwarten, dass die hier erwähnten Probleme keine wesentliche Rolle mehr spielen. Elektrostatische Einstreuungen und Streulicht können einfach durch ein geschlossenes Gehäuse verhindert werden. Mechanische Schwingungen führen durch eine kleinere Bauweise ebenfalls zu geringeren Störungen.

3.2 Herstellungsprozess

Für die Bauteilherstellung wird eine weitverbreitete Softlithographiemethode adaptiert, um die Mikrofluidikkanäle in das Bauteil zu integrieren [24]. Bei dieser Methode werden Negative der Mikrofluidikstrukturen zunächst auf einem Master photolithographisch hergestellt und danach in Silikon abgeformt. Anschliessend wird das Silikon auf einen Glasträger gebondet und mit fluidischen Anschlussleitungen versehen. Hierbei werden üblicherweise hohe Silikonschichtdicken verwendet, um die notwendige Stabilität zu gewährleisten. Fluidikanschlüsse können dabei einfach in die Silikonform gesteckt werden. Für die einfache Integration in einen Druckprozess eignen sich jedoch keine starren Glassubstrate und hohe Schichtdicken führen wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben zu geringen Intensitäten des Anregelichtes. Deshalb muss die Silikonschichtdicke reduziert werden.

Die Verwendung von Silikon vereinfacht und verkürzt den Herstellungsprozess von Substraten im Labor im Vergleich zu aufwändigeren Ätz-, Abform- oder Prägeverfahren und kann potentiell auch auf Rolle-zu-Rolle-Prozesse übertragen werden [123]. Andere Herstellungsmethoden wie das Heißprägen, sind jedoch besser skalierbar und eignen sich deshalb eher für hohe Produktionsvolumina [8]. Die optischen Eigenschaften des Mikrofluidiksystems hängen nicht wesentlich vom verwendeten Herstellungsverfahren

ab. Deshalb lassen sich die hier erzielten Ergebnisse gut auf gedruckte mikrofluidische Systeme übertragen.

Um mit der Softlithographie eine Geometrie zu erreichen, die der Geometrie eines im Rolle-zu-Rolle-Druckprozesses hergestellten Mikrofluidikchips entspricht werden folgende Modifikationen durchgeführt. Die Schichtdicke des Silikons wird auf wenig mehr als die Kanaldicke reduziert indem bei der Abformung der Kanäle eine Folie auf das noch flüssige Silikon aufgedrückt wird. Diese Folie dient gleichzeitig als Trägersubstrat und enthält die Apertur. Das harte Glassubstrat wird durch eine dünn mit Silikon beschichtete Filterfolie ersetzt. Durch das Zusammenbonden beider Folien entsteht ein dünner, flexibler Mikrofluidikchip.

Im Folgenden wird der in Abbildung 3.7 dargestellte Herstellungsprozess im Detail beschrieben. Eine $50\ \mu\text{m}$ dicke Schicht Photolack (Microchem, SU8-2050) wird mittels Spincoating auf einen Siliziumwafer aufgebracht. Danach erfolgt das Ausbacken, der sogenannte Softbake, bei $65\ ^\circ\text{C}$ und $95\ ^\circ\text{C}$, um das Lösungsmittel zu verdampfen. Anschliessend wird die mikrofluidische Struktur mittels eines Mask Aligners (MJB3 Standard, Suss) von einem Folienfilm auf das Substrat durch Belichtung übertragen. Anschliessend wird das Substrat wiederum auf $65\ ^\circ\text{C}$ und $95\ ^\circ\text{C}$ erhitzt, um den belichteten Lack auszuhärten, der sogenannte Post Exposure Bake. Danach wird das Substrat in die Entwicklerlösung gegeben, worin sich die unbelichteten Bereiche auflösen und die Mikrofluidikstruktur als Negativ zurückbleibt. Damit ist der Master für die Silikonabformung fertig.

Für die Abformung wird als Silikon Polydimethylsiloxan (PDMS) (Sylgard, 184 silicone elastomer kit) eingesetzt. Es besteht aus Basismaterial und Härter, die im Verhältnis 10:1 gut durchmischt werden. Anschließend werden Blasen aus der Flüssigkeit in einem Exsikkator entfernt. Bevor eine geringe Menge PDMS mittig auf den Master gegossen wird, wird dieser mit einem Tropfen HMDS (Sigma-Aldrich, Hexamethyldisilazane) behandelt. Dadurch wird die Haftung des Silikons am Master nach dem Aushärten deutlich verringert.

Als Trägersubstrat wird die Folie mit der Apertur eingesetzt. Diese wird vor der Verwendung in einem Plasmaofen (Diener electronic, model Femto) mit einem Sauerstoffplasma für eine Dauer von 240s bei 50 W Leistung

behandelt. Dies erhöht die Haftung von PDMS an der Folie. Hierbei wird auf die optisch relevanten Bereiche der Apertur ein Tropfen PDMS aufgetragen, um spätere Blasenbildung in diesem Bereich zu verhindern. Danach wird die Folie mit der Aperturseite nach unten auf den Master gelegt und angedrückt. Durch das Andrücken wird das PDMS zwischen Master und Folie gleichmäßig verteilt. Durch weiteren Druck wird die Schichtdicke des PDMS soweit reduziert, bis die Folie fast auf den Mikrofluidikstrukturen aufliegt. Beim Auflegen entstandene Blasen werden dabei weitgehend nach außen gedrückt.

Die Folie liegt nun dicht auf den Mikrofluidikstrukturen auf, kann aber noch bewegt werden. Dies wird ausgenutzt um unter einem Mikroskop die auf der Folie aufgebrachte Apertur auf den Mikrofluidikkanal auszurichten. Hierbei wird die längste Apertur direkt hinter die Fokussierungsstruktur auf dem Master platziert (siehe Abbildung 3.9). Danach erfolgt ein Ausheizschritt bei 100 °C für 600 s um das PDMS zu härten. Danach wird die Folie mitsamt dem PDMS vom Substrat abgezogen und die überstehenden Randbereiche abgeschnitten. Anschließend werden Löcher für die Flüssigkeitsanschlüsse in die Anschlusszonen gestanzt. Hierbei wird das Stanzwerkzeug von der PDMS-Seite her aufgesetzt. Dies geschieht damit erstens die Oberfläche nicht verschmutzt und zweitens weisen dadurch beim Stanzen um die Stanzlöcher entstehende Verformungen nach außen und behindern das Bonding nicht.

Um den Chip zu komplettieren wird eine blaue Filterfolie eingesetzt (Lee Filters, no. 071HT). Diese wird für 120 s mit Sauerstoffplasma behandelt. Auf diese Folie wird im Spincoater mittig PDMS gegossen und dann bei 1500 RPM für 60 s sowie danach bei 4000 RPM für 60 s rotiert. Dadurch entsteht eine flächige 10 µm bis 20 µm dicke PDMS-Schicht. Diese wird bei 100 °C für nur 60 s vorgeheizt, um das PDMS zwar etwas zu verfestigen, jedoch nicht auszuhärten. Anschliessend wird die Folie mit der Mikrofluidikstruktur für 30 s in das Sauerstoffplasma gegeben und beide Folien mit den PDMS-Schichten zusammen gepresst. Innerhalb von 12 h entsteht eine feste Verbindung beider Schichten. Damit ist der Mikrofluidikkanal komplett.

Die dünne PDMS-Schicht auf der Filterfolie erfüllt zwei Zwecke. Einerseits verbessert sie die Haftung, andererseits schützt sie die Farbschicht vor der im Kanal fließenden Flüssigkeit. Wenn eine flüssigkeitsresistente Filterfolie eingesetzt wird, kann prinzipiell direkt auf PDMS gebondet werden und innerhalb von kurzer Zeit eine feste Haftung erreicht werden [124]. Dadurch könnte die Herstellungsdauer deutlich verkürzt werden.

Der fertige Mikrofluidikchip wird in Abbildung 3.2 dargestellt. Aufgrund der für die Herstellung eingesetzten dünnen Folien hat er eine hohe Flexibilität und kann im Gegensatz zu aus Glas oder sprödem Kunststoff hergestellten Mikrofluidikchips in Rolle-zu-Rolle-Prozessen verarbeitet werden.

Die Schichtstruktur des Mikrofluidikchips in der Messzone ist als Mikroskopaufnahme in Abbildung 3.8 dargestellt. Hierbei wird die LED direkt auf den Farbfilter (Schicht D) aufgesetzt. Damit in den verbleibenden Zwischenräumen durch den niedrigen Brechungsindex von Luft keine hohen Verluste bei der Lichttransmission auftreten wird flüssiges PDMS-Basismaterial ohne Aushärter als zähflüssige Masse auf die LED und den Chip aufgetragen. Durch die beiden Silikonschichten (Schicht Ca und Cb) wird der Mikrofluidikkanal (Schicht F) komplett eingeschlossen und sowohl die Apertur als auch der Anregelichtfilter vor Flüssigkeit geschützt. Die Apertur befindet sich auf der der Silikonschicht zugewandten Seite von Schicht E, also in direkter Nähe zum Mikrofluidikkanal. Auf der gegenüberliegenden Detektionsseite werden vor der Messung noch zwei Absorptionsfilter (Lee Filters, #767) angebracht, ebenfalls mit PDMS-Basismaterial zur Brechungsindexanpassung. Darauf wird die Photodiode platziert. Für diese Messungen wird die Photodiode mit einem zusätzlichen Stück Kronglas für den Infrarotbereich unempfindlich gemacht. Dieses wird durch die Plastikfilter nur unzureichend ausgefiltert. Beim Einsatz von Detektoren, die in diesem Bereich keine externe Quanteneffizienz mehr aufweisen, wird dies unnötig.

Wie in Abbildung 3.8 zu sehen ist wurden die parasitären Schichtdicken des Silikons sehr stark reduziert. Beim Anregelichtfilter besteht die Wahl zwischen der normalen Version (Lee Filters, #71) und der temperaturstabileren Version (Lee Filters, #71HT). Letztere wird gewählt weil sie auch eine deutlich geringere Schichtdicke von 56 μm gegenüber 110 μm der normalen Version aufweist. Auf der Detektionsseite ist der geringe

Abstand zwischen Kanal und Detektor hinsichtlich der Lichtausbeute aufgrund des größeren Detektors nicht ganz so wichtig, jedoch führt ein geringer Abstand zwischen Partikel und Apertur zu schärferen Kanten im Detektorsignal wenn ein Partikel die Detektionszone betritt bzw. verlässt. Der Lichtverlust durch die seitliche Einschränkung der Apertur, sichtbar in der Draufsicht in Abbildung 3.9, fällt ebenfalls geringer aus wenn der Abstand zum Kanal verringert wird.

3.3 Durchführung der Messungen

Die Verbindung von Mikrofluidikchip mit den Zuleitungen ist aufgrund der geringen Schichtdicke nicht durch Einstecken der Zuleitungen in Löcher im PDMS möglich. Stattdessen werden die Zuleitungen in ein Stück transparentes Plastik als Anschlussplatte und Halterung fest eingeklebt. Zwischen Mikrofluidikchip und Anschlussplatte wird ein dünnes Stück PDMS mit Löchern bei den Anschlüssen als Dichtung gelegt. Die Verbindung wird über eine rückseitige Platte sowie Stahlfederklammern abgedichtet. Diese Methode ermöglicht die Wiederverwendbarkeit aller Komponenten und zerstört den Mikrofluidikchip nicht.

Vor der Durchführung der eigentlichen Messung muss der Mikrofluidikchip blasenfrei mit Flüssigkeit gefüllt werden. Hierfür werden Spritzen mit partikelfreier Flüssigkeit an die Anschlüsse angeschlossen sowie am Ausfluss mit Hilfe einer 50 ml-Spritze ein geringer Unterdruck erzeugt. Hierdurch wird Flüssigkeit aus den an den Einlässen angeschlossenen Spritzen in den Chip hineingezogen ohne dass ein großer Überdruck aufgebaut werden muss. Der Mikrofluidikchip wird so für einige Minuten gespült bis die Blasen aus den Zuleitungen entfernt sind. Danach werden die für die Messung verwendeten Spritzen an die Zuleitungen und die Spritzenpumpen angeschlossen. Hierbei muss beachtet werden, dass beim Spritzenwechsel keine neuen Luftblasen in die Anschlüsse gelangen.

Damit sich während längerer Messvorgänge die Partikel nicht absetzen, wurden Vorversuche gemacht, um die Sinkgeschwindigkeit der Partikel über die Dichte des Mediums zu verringern. Hierbei hat sich gezeigt,

dass die Partikel in reinem Wasser nach unten absinken, aber in unverdünntem 10-fach konzentriertem PBST (Sigma-Aldrich, Phosphate buffered saline with Tween-20 10x concentrate) aufschwimmen. Bei einem Mischungsverhältnis von 2 : 1 PBST zu Wasser verringert sich die Sinkgeschwindigkeit erheblich, sodass lang andauernde Messungen möglich werden. Dieses Mischungsverhältnis wird sowohl für den Proben- als auch für den Mantelstrom eingesetzt.

Pro 1 ml Probenflüssigkeit werden 100 μl dispergierte Kalibrationspartikel (Kisker Biotech, Yellow Calibration Particles, 6.2 μm) hinzugefügt. Diese Kalibrationspartikel haben Intensitäten von $4.9 \cdot 10^6$, $4.7 \cdot 10^5$, $4.5 \cdot 10^4$ MESF FITC (engl. *molecules of equivalent soluble fluorophores of Fluorescein isothiocyanate*), sowie zusätzlich noch geringere Intensitäten und ungefärbte Partikel, die mit dem vorliegenden System jedoch nicht detektiert werden können.

Der Partikelstrom muss vor der Messung die Zuleitung weitgehend füllen. Da in den Zuleitungen ein Laminarfluss herrscht, fließt die Flüssigkeit im Zentrum der Anschlüsse mit doppelter Geschwindigkeit. Bei einem Totvolumen von 460 μl der verwendeten Zuleitung erreicht also nach 230 μl der Probenstrom den Mikrofluidikchip. Um einen ausreichend hohen Anteil von Probenflüssigkeit zu erreichen werden etwa 500 μl Probenflüssigkeit bei erhöhter Pumprate gefördert bevor die Pumpraten an die für die Messung vorgesehenen Werte angepasst werden.

Die Spritzenpumpe für den Probenstrom wird für die Messungen konstant auf 50 $\mu\text{l}/\text{h}$ eingestellt, während für den Mantelfluss eine hohe Flussrate von 3000 $\mu\text{l}/\text{h}$, sowie eine niedrige Flussrate von 150 $\mu\text{l}/\text{h}$ verwendet wird. Die hohe Flussrate ergibt sich aus Experimenten, in denen die Flussrate mit der geringsten Geschwindigkeitsvariation ermittelt wurde. Eine geringe Geschwindigkeitsvariation wird angestrebt, da dann bei der Partikeldetektion eine einheitliche Geschwindigkeit für die Partikel angenommen werden kann. Dadurch werden theoretische Betrachtungen deutlich vereinfacht. Die niedrige Flussrate ist dem gegenüber deutlich verringert, um die Leistungsfähigkeit des Systems bei geringeren Partikelgeschwindigkeiten zu untersuchen. Ebenfalls kann hierbei der Einfluss einer größeren Geschwindigkeitsvariation untersucht werden. Nach einer Änderung der Pumprate

wird eine kurze Zeit gewartet, bis sich die Druckverhältnisse ausgeglichen haben und eine konstanter Flüssigkeitsströmung vorliegt.

Die Leuchtdiode wird zwischen den Messungen sowie für das Ausrichten der Komponenten mit einem deutlich reduzierten Strom betrieben, damit die Degradation des blauen Farbfilters verlangsamt wird. Vor dem Einbau des Mikrofluidikchips wurden die Leuchtdiode und Photodiode aufeinander grob ausgerichtet. Die Ausrichtung des Mikrofluidikchips erfolgt zuerst optisch auf das gewünschte Aperturfenster. Danach wird anhand des transmittierten Lichtes (gemessen über das Photodiodensignal) die genaue Ausrichtung durchgeführt. Hierbei wird das Photodiodensignal maximiert. Für die Messung wird der Strom der Leuchtdiode auf voreingestellte 50 mA geschaltet. Die Signale der Soundkarte werden mit einem Laborcomputer aufgenommen und für die Weiterverarbeitung als lineare unkomprimierte WAVE-Dateien gespeichert.

3.4 Ergebnisse

3.4.1 Partikelfokussierung

Voruntersuchungen zur Partikelfokussierung haben gezeigt, dass generell nur bestimmte Flussgeschwindigkeiten zu geringen Variationen in der Partikelgeschwindigkeit führen. Für das verwendete Layout wurden Flussgeschwindigkeiten von 3000 $\mu\text{l}/\text{h}$ für den Mantelstrom und 50 $\mu\text{l}/\text{h}$ für den Probenstrom ermittelt. Die Partikelgeschwindigkeit wird hierbei aus der Halbwertsbreite des Pulses (engl. *full width half maximum* FWHM) des gemessenen Fluoreszenzsignals der Partikel mit der höchsten Intensität ermittelt. Da sich die unterschiedlichen Partikelpopulationen nur in der Intensität, jedoch nicht in der Form unterscheiden, ist das Ergebnis repräsentativ für alle gemessenen Partikelintensitäten.

Der Variationskoeffizient der Geschwindigkeitsverteilung beträgt in dieser Messung 3.1 %. Dies deutet auf eine gute Fokussierung hin und ist vergleichbar mit Literaturwerten [125].

Interessant ist die Verteilung der gemessenen Geschwindigkeiten, dargestellt in Bild 3.10. Partikel mit guter Fokussierung in der Kanalmitte haben hierbei eine hohe Geschwindigkeit. Partikel, die nicht gut fokussiert sind weisen eine geringere Geschwindigkeit auf. Im Histogramm führt das zu einer einseitig verbreiterten Verteilung der Partikelgeschwindigkeiten.

Geschwindigkeitsmessungen mit größerem Abstand zur Fokussierungsstruktur ergeben Variationskoeffizienten von circa 10%. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass auch auf fokussierte Partikel weiterhin hydrodynamische Kräfte einwirken. Hierdurch werden diese in Gleichgewichtspositionen nahe den Kanalwänden gedrückt [110, 125, 126]. Daraus lässt sich ableiten, dass eine Fokussierungsmethode, welche alle Partikel in die Kanalmitte fokussiert, nur eine begrenzte Messstrecke zulässt. Da die Gleichgewichtspositionen prinzipiell abhängig von der Partikelgröße sind und der Kanal ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil aufweist kann es auch keine Fokussierungsmethode geben, die Partikel beliebiger Größe zuverlässig auf dieselbe Geschwindigkeit fokussiert.

3.5 Rekonstruktion der Basislinie

In Abbildung 3.11 wird als obere, schwarze Kurve das Signal vor der Rekonstruktion der Basislinie dargestellt. Dieses Signal weist niederfrequente Schwankungen auf, welche sich im Sekundenbereich als ein zeitlich variierender Offset äußern. Durch diesen Offset würden Messungen von Signalpulsen entsprechend verfälscht. Deshalb ist es notwendig, die Basislinie wiederherzustellen, sodass sich jede Pulsmessung auf dieselbe Referenz bezieht. Die rote Kurve unter dem Messsignal stellt das mit einem Medianfilter der Länge von 1.3s extrahierte Signal dar. Hierbei wurden die hochfrequenten Schwankungen ausgefiltert, wodurch der niederfrequente Anteil extrahiert wird. Im Anschluss wird der niederfrequente Anteil vom gemessenen Signal abgezogen. Daraus resultiert ein Signal mit wiederhergestellter, flacher Basislinie, in Abbildung 3.11 unten als blaue Kurve dargestellt. Von Partikeln generierte Pulse sollen die Wiederherstellung der Basislinie nur minimal beeinflussen. Dadurch können aus dem unteren Signal zusätzliche Pulsamplituden ohne zusätzlichen Offset extrahiert werden.

Die Extraktion der Basislinie wird prinzipiell mit einer Art Tiefpassfilter vorgenommen. Wird vom Originalsignal das tiefpassgefilterte Signal abgezogen entsteht ein hochpassgefiltertes Signal, d.h. die niederfrequenten Anteile wurden eliminiert. Ein Hochpass ist prinzipiell schon im Vorverstärker enthalten. Dabei hat sich jedoch gezeigt, dass ein analoger Hochpass ein ungewünschtes Verhalten zeigt. Wenn im Signal ein starker Puls enthalten ist, dann weist das Signal nach dem Puls durch den Hochpass einen Offset auf. Bei einem positiven Puls wird das Signal nach dem Puls zu negativen Werten verschoben. Deshalb wird ein Hochpassfilter mit einer Grenzfrequenz eingesetzt, deren Zeitkonstante deutlich länger ist als die Pulslänge. Dadurch wird dieser Effekt umgangen, aber es werden sehr niederfrequente Störungen mit verstärkt. Diese Störungen sind deutlich niederfrequenter als die Frequenzen der eigentlich zu messenden Pulse und sollten wie in Abbildung 3.11 gezeigt vor der Signalauswertung mit einem digitalen Filter entfernt werden.

Ein Medianfilter ausreichender Länge ist eine Möglichkeit, die niederfrequenten Anteile auch dann noch extrahieren zu können wenn das Signal Pulse enthält. Dies beruht auf der Eigenschaft, dass wenige Extremwerte, die z.B. hundertfach größer als die Standardabweichung des Hintergrundrauschens sind, den Median nur geringfügig verschieben. Ein Mittelwertfilter oder andere lineare Signalfilter besitzen diese Eigenschaft nicht und werden schon durch wenige Extremwerte stark beeinflusst. Es wäre jedoch prinzipiell denkbar, digitale lineare Filter so zu modifizieren, dass die von Partikeln erzeugten Pulse durch eine zusätzliche Logik ausgefiltert werden. Deshalb stellt sich die Frage, ob der Medianfilter in einem partikelfreien Signal prinzipiell mit optimierten linearen Filtern bei der Wiederherstellung der Basislinie konkurrieren kann.

In Abbildung 3.12 werden verschiedene Methoden zur Wiederherstellung der Basislinie verglichen. Der nichtkausale Medianfilter wird in dieser Arbeit verwendet. Dieser wird mit Wiener Filtern und Mittelwertfiltern verglichen. Diese werden jeweils als kausale Variante, sowie als nicht-kausale Variante ausgeführt. Bei der kausalen Variante wird die Basislinie zum aktuellen Zeitpunkt ausschliesslich aufgrund zu diesem Zeitpunkt bekannten Messwerten rekonstruiert. Dies ist für die verzögerungsarme Datenverarbeitung z.B. in Partikelsortierern sinnvoll. Bei der nichtkausalen Variante

stehen auch zukünftige Messwerte zu Verfügung, was die Verzögerung um die halbe Filterlänge erhöht. Das dargestellte Gütekriterium ist die Standardabweichung des Messsignals nach Rekonstruktion der Basislinie im Vergleich zum originalen Signal. In Abbildung 3.12 wird die Länge der Filter variiert. Eine geringere Standardabweichung ist hierbei besser.

Alle Filter erzielen im Optimum sehr ähnliche Ergebnisse, was sich durch den engen Wertebereich der vertikalen Achse äußert. Die erreichte Verringerung der Standardabweichung des Signals von nur etwa 30 % ergibt sich durch den hohen Anteil von hochfrequentem Rauschen, das nicht vorhersehbar ist und deshalb auch nicht ausgefiltert werden kann. Nichtkausale Filter erzielen generell etwas bessere Ergebnisse. Dies ist bei Mittelwertfiltern leicht zu erklären, da der nichtkausale Filter aus den Signalanteilen vor und hinter dem Messwert einen Filterwert bildet, der keinen Phasenversatz besitzt, während der kausale Mittelwertfilter dem aktuellen Signalwert immer hinterherläuft. Bei zunehmender Filterlänge wird dieser Effekt stärker und der vorhersagende Mittelwertfilter weist ab 200 ms deutlich schlechtere Ergebnisse auf. Die Wiener Filter haben dieses Problem nicht, da die Filterkoeffizienten für große Zeitdifferenzen entsprechend abnehmen. Deshalb werden die Ergebnisse der Wiener Filter bei zunehmender Länge besser. Für Filterlängen größer als etwa 1000 ms werden die Ergebnisse mit dem Mittelwertfilter sowie dem Medianfilter ebenfalls wieder schlechter.

Aus den in Abbildung 3.12 dargestellten Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass ein Medianfilter - sofern er nicht zu kurz oder zu lang ist - eine sehr gute Qualität aufweist. Durch die Implementierung eines nichtlinearen Wiener Filters, der die Präsenz von Partikeln berücksichtigt, wäre kein wesentlicher Zugewinn an Empfindlichkeit des Messsystems zu erwarten.

3.5.1 Pulsformen

Da sich bei der Partikelmessung idealerweise jeweils nur genau ein Partikel im Messbereich befinden soll, ist es unter diesem Gesichtspunkt vorteilhaft, diesen möglichst kurz zu wählen. Deshalb werden die durch Partikel erzeugten Pulsformen für verschiedene Aperturlängen von 18 μm , 49 μm , 96 μm , 211 μm , 436 μm , 888 μm und 1779 μm verglichen. In Abbildung 3.13a sind

die gemessenen Pulsformen für die hohe Flussrate sowie in Abbildung 3.13b für die niedrige Flussrate dargestellt. Die dargestellte Pulsform stammt jeweils von einem einzelnen Partikel mit hoher Intensität und ist wiederum repräsentativ für die gesamte Population aller Intensitäten, da die Partikel sich geometrisch kaum unterscheiden.

Bei der hohen Flussrate sind die Pulsdauern wesentlich kürzer als bei der reduzierten Flussrate und die Bandbreitenlimitierung des Transimpedanzverstärkers führt zu Verzerrungen des Signals. Dies wird insbesondere für die kürzeren Aperturlängen deutlich. Dies kann durch einen Verstärker mit höherer Bandbreite behoben werden. Möglichkeiten dies zu erreichen sind eine geringere Verstärkung in der ersten Stufe oder der Einsatz eines Operationsverstärkers mit höherem Verstärkungs-Bandbreiten-Produkt. Für den Einsatzzweck hier ist die Bandbreite jedoch ausreichend, damit die Pulsflanken bei der hohen Flussrate und langen Apertur zwar verformt, jedoch die 50 %-Pulsbreite nicht wesentlich vergrößert wird. Dies ist der Fall, da die Impulsantwort des Verstärkers, welche bei den kurzen Aperturlängen und hoher Flussgeschwindigkeit die Pulsform dominiert, deutlich kürzer ist als die Gesamtlänge des durch den Partikel erzeugten Pulses. Dies ist zu beachten, wenn die Partikelgeschwindigkeit über die Pulsbreite ermittelt wird und würde sich dann bei Aperturlängen unterhalb $436\ \mu\text{m}$ deutlich äußern.

Bei der niedrigen Flussrate tritt die Bandbreitenlimitierung durch die ca. 10-fach breiteren Pulse in den Hintergrund. Diese Pulsformen können herangezogen werden, um das optische System zu beurteilen. Offensichtlich besitzen die Pulsformen ab $211\ \mu\text{m}$ Aperturlänge ein abgeflachtes Plateau. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das vom Fluoreszenzpartikel emittierte Licht über eine Wegstrecke mit unveränderter Effizienz vom Detektor empfangen wird. Des Weiteren haben die Flanken bis zu einer Aperturlänge von $888\ \mu\text{m}$ eine nahezu identische Form. Dies kann auf Abschattungseffekte durch die Apertur, wenn sich der Partikel nahe dem Anfang bzw. Ende des Messbereiches befindet, erklärt werden. Ebenfalls ist dies die Erklärung für das Fehlen des Plateaus und der deutlich geringeren Pulshöhe für Aperturlängen unterhalb von $211\ \mu\text{m}$. In diesem Fall wird selbst bei mittiger Position des Partikels innerhalb der Apertur eine deutliche Menge der Fluoreszenz durch die Apertur abgeschattet und kann den Detektor nicht erreichen. Auch verhält sich die Pulsbreite nicht mehr proportional

zur Aperturlänge, da schräg durch die Apertur tretendes Licht einen verhältnismäßig starken Anteil hat. Deshalb bieten Aperturlängen unterhalb von etwa 150 μm bei der verwendeten geometrischen Anordnung prinzipiell nur noch geringe Vorteile hinsichtlich der Verkürzung von Pulsbreiten.

Für eine Aperturlänge von 1779 μm weicht die Form der Flanken des erzeugten Pulses deutlich von den Formen zwischen 211 μm und 888 μm ab. Der Grund hierfür liegt in der Länge der Leuchtfläche der LED mit 1000 μm . Was die Pulsform bei der längsten Apertur bestimmt, ist also nicht die Apertur selbst, sondern der von der LED ausgeleuchtete Bereich. Deshalb ist die Pulsbreite auch nur geringfügig breiter als bei der Aperturlänge von 888 μm . Eine weitere Verlängerung der Apertur ohne Änderungen bei der Anregelichtquelle führt nicht zu einer Verbreiterung der Pulsform.

Ein interessanter Aspekt des flachen Plateaus der Pulsformen ergibt sich zusammen mit dem quadratischen Geschwindigkeitsprofil des Kanals wenn ein Rechteckfilter zur Rauschunterdrückung eingesetzt wird. Da die Maximalgeschwindigkeit der Partikel aufgrund des Strömungsprofils im Kanal begrenzt ist, existiert eine minimale Pulsbreite. Wird nun der Rechteckfilter für diese Pulsbreite ausgelegt, ergibt sich auch für alle geringeren Geschwindigkeiten derselbe Spitzenwert des gefilterten Signals, lediglich die Breite des gefilterten Signals weist Variationen auf. Dies bedeutet, dass prinzipiell Geschwindigkeitsvariationen der Partikel toleriert werden können wenn ein flaches Plateau in der Pulsform existiert und ein Rechteckfilter eingesetzt wird. Dieser Aspekt wird für die Weiterverarbeitung der Signale berücksichtigt. Die Eigenschaften der LED als verhältnismäßig großflächige und homogen beleuchtende Lichtquelle werden hierbei genutzt, um die Einflüsse von Positions- und Geschwindigkeitsvariationen der Partikel im Messsignal zu verringern. Dies wäre mit eng fokussierten Laserlichtquellen in dieser Form nicht möglich.

Durch die Wahl der Aperturlänge und der Flussgeschwindigkeiten kann das System an unterschiedliche Einsatzzwecke angepasst werden. Eine Abschätzung der maximal möglichen Partikelrate unter der Annahme von dichtest gepackten, jedoch im Messbereich einzeln vorkommenden Partikeln, ergibt für die niedrige Flussrate einen Durchsatz von 36 bis 406 Partikel pro Sekunde für die längste bzw. kürzeste Apertur. Für die hohe

Flussrate ergeben sich Partikelraten von 600 bis 2526 Partikel pro Sekunde für die längste bzw. kürzeste Apertur. Die Einflüsse dieser Parameter auf die Messgenauigkeit wird Kapitel 6 untersucht.

3.5.2 Histogramme der Partikelintensitäten

Um eine Aussage über die Leistungsfähigkeit des Messsystems im Hinblick auf den Einsatz als Durchflusszytometer für floreszenzmarkierte Partikel machen zu können werden die an Kalibrationspartikeln mit unterschiedlichen Intensitäten durchgeführten Messungen als Histogramm in Abbildung 3.14 aufgetragen. Hierbei wird wiederum zwischen der niedrigen und hohen Flussrate unterschieden, da diese sich im Partikeldurchsatz und der Empfindlichkeit unterscheiden.

Eine bestimmte Partikelpopulation weist eine bestimmte Verteilung der Intensitäten auf. Für die Kalibrationspartikel ist die zugehörige Verteilung sehr schmal und sollte sich im Histogramm als scharfe Spitze äußern.

In Durchflusszytometern werden üblicherweise die Signale der Vorwärtstreuung ausgewertet, um die Anwesenheit eines Partikels zu bestimmen. Das zu diesem Zeitpunkt anliegende Fluoreszenzsignal wird ausgewertet, um die Intensität des Partikels zu bestimmen. Diese Methode kann im vorliegenden System nicht angewendet werden, da nur ein Signalkanal vorhanden ist. Stattdessen sollen die Partikel anhand der Pulshöhen im Fluoreszenzsignal detektiert werden.

Da die aufgenommenen Signale ein hohes Hintergrundrauschen aufweisen, welches die Detektion von Partikeln mit geringen Intensitäten erschwert. Eine Filterung des Signals mit einem Tiefpassfilter ist deshalb sinnvoll. Die Impulsantwort dieses Tiefpassfilters wird in diesem Kapitel manuell optimiert. In den nachfolgenden Kapiteln erfolgt eine genauere Analyse bezüglich der Filterung und Partikeldetektion aus lokalen Maxima. Für die Bestimmung der Pulshöhen werden die lokalen Maxima des gefilterten Signals bestimmt und als Histogramm aufgetragen.

Um die Histogrammdata aus den Messdaten zu erzeugen werden die gemessenen Signale folgendermassen vorverarbeitet. Hierfür wird die Ab-

tastrate des Messsignals zunächst um einen Faktor 5 bzw. 30 für die hohe bzw. niedrige Flussgeschwindigkeit verringert. Dies reduziert den Rechenaufwand der nachfolgenden Operationen. Danach wird das Signal mit einem Filter mit endlicher Impulsantwort (engl. *finite impulse response*, FIR) tiefpassgefiltert. Hierfür wird die Hann-Fensterfunktion [42] mit einer Länge von 10 Abtastwerten gewählt. Diese Vorfilterung dient vor allem der Unterdrückung von hochfrequentem Rauschen, was allein durch ein Rechteckfenster aufgrund dessen scharfer Kanten weniger effizient wäre. Anschließend wird die Nulllinie des Signals mittels eines Medianfilters von 1000 Abtastwerten Länge rekonstruiert. Danach erfolgt die Rechteckfilterung mittels eines Rechtecks von 20 Abtastwerten. Vom resultierenden Signal werden nun die lokalen Maxima extrahiert, auf die Intensität des stärksten Kalibrationspartikels von $4.9 \cdot 10^6$ MESF FITC normiert, und für die Histogramme in Abbildung 3.14 verwendet. Über diese Normierung werden alle linearen Einflüsse des optischen und elektrischen Systems korrigiert, was eine Kalibration jedes einzelnen Bauteils des Messsystems überflüssig macht.

Als Kriterium für die prinzipielle Einsetzbarkeit als Durchflusszytometer kann die Intensität der zweithellsten Partikelklasse betrachtet werden. Diese liegt mit $4.7 \cdot 10^5$ MESF FITC nahe an einem berichteten Wert für mit Fluoreszenzmarkern versehenen weissen Blutkörperchen [94]. Bei Betrachtung der Histogramme in Abbildung 3.14 ist zu sehen, dass diese Partikelintensität bei beiden Flussgeschwindigkeiten sehr gut sichtbar und deutlich vom Rauschen und anderen Partikelpopulationen getrennt ist. Daher kann angenommen werden, dass für diesen Zelltyp die Identifizierung von fluoreszenzmarkierten Zellen durchgeführt werden kann. Bis zum Rauschlevel von etwa $1 \cdot 10^5$ MESF FITC können auch eine Reihe von mit fluoreszierenden Antikörpern eingefärbte Blutzellen detektiert werden, beispielsweise die Antikörper CD14 [92], CD20 [93], CD45 [93, 94] und CD52 [95].

Darüber hinaus wird bei einer Reduktion der Flussgeschwindigkeit das Rauschen deutlich reduziert, was die Population mit einer Intensität von $4.5 \cdot 10^4$ MESF FITC aus dem Rauschen hervortreten lässt. Da bei dieser Population der Abstand zum Rauschen geringer ist wird das Histogramm für diese Population unschärfer, ist jedoch im Histogramm noch deutlich vom Rauschen trennbar.

Eine weitere Reduktion der Partikelgeschwindigkeit ist hinsichtlich der Signalverarbeitung problemlos möglich, was die Empfindlichkeit weiter verbessert, jedoch den maximalen Partikeldurchsatz verringert. Ein Problem hierbei ist jedoch das im Messsystem auftretende $1/f$ -Rauschen, welches bei besonders niedrigen Frequenzen in Halbleiterbauteilen sowie durch Fluktuationen der Flüssigkeitsströmungsgeschwindigkeiten auftritt. Diese Art von Rauschen wird bei der Rekonstruktion der Basislinie eliminiert, was jedoch nur möglich ist, wenn die durch die Partikel erzeugten Pulse entsprechend kurz sind. Ebenfalls tritt bei geringen Flussgeschwindigkeiten vermehrt ein Absetzen und Anhaften von Partikeln im Kanal auf, was abhängig vom Partikeltyp ein Problem darstellen kann. Durch den Einsatz entsprechend hochwertiger Halbleiter für die Elektronik und von Präzisionspumpen für die Mikrofluidik kann also die Empfindlichkeit des Systems für bestimmte Partikelsorten potentiell deutlich gesteigert werden.

3.6 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde ein Partikelmesssystem zu demonstriert, welches einerseits auf teure und platzraubende Komponenten klassischer Durchflussszytometer verzichtet und portabel einsetzbar ist, aber andererseits auch die Leistungsfähigkeit bewiesen hat, um für Detektionsanwendungen in der Durchflussszytometrie zu genügen. Durch die planare Struktur und geringe Schichtdicke des Mikrofluidikchips wird eine preisgünstige Herstellung durch Druckprozesse ohne grundlegende Änderungen am optischen oder mikrofluidischen System ermöglicht.

Als Stromversorgung dient ein einziger USB-Port was den batteriefreien Einsatz an mobilen Geräten wie Tablet-Computern erlaubt. Durch den Einsatz einer mit 1 mm Kantenlänge grossflächigen Lichtquelle sowie einer noch größeren Photodiode wird die Justage des Chips gegenüber der Ankopplung von Lichtwellenleitern oder Ausrichtung von fokussierten Laserstrahlen deutlich vereinfacht.

Die Leistungsfähigkeit des optischen Systems wurde mit etwa $1 \cdot 10^5$ MESF FITC bei einer Gesamtflussrate von 3050 $\mu\text{l}/\text{h}$ bestimmt, was für die

Detektion von mit fluoreszierenden Antikörpern eingefärbten Blutzellen mit in der Literatur berichteten Einfärbeintensitäten für die Antikörper CD14 [92], CD20 [93], CD45 [93, 94], sowie CD52 [95] ausreicht. Durch die Partikelfokussierung mit einem Variationskoeffizienten der Geschwindigkeit von nur 3.1 % sowie einer aufgrund der großen Leuchtfläche sehr geringen Positionsabhängigkeit wird bei der Messung eine hohe Genauigkeit erreicht.

Des Weiteren wurde durch eine Flussratenreduktion die Empfindlichkeit weiter gesteigert, sodass auch Fluoreszenzpartikel mit einer Intensität von $4.5 \cdot 10^4$ MESF FITC detektiert werden konnten. Hierdurch kann ein Kompromiss zwischen Durchsatz des Analyts und Empfindlichkeit des Messinstruments getroffen werden. Damit kann das vorgestellte Konzept an den jeweiligen Einsatzzweck optimal angepasst werden. Weitere Verbesserung der Empfindlichkeit können durch Geschwindigkeitsreduktion aber auch durch Erhöhung der Leuchtdichte der LED erreicht werden. Letztere wurde aufgrund der noch geringen Haltbarkeit des Blau-Filters auf 50 mA reduziert, was deutlich unter den Herstellerangaben von 1000 mA für Dauerbetrieb liegt, sodass hier noch deutliche Verbesserungen zu erwarten sind. Ebenfalls wurde beobachtet, dass die Absorptionsfilter das Anregelicht noch nicht optimal ausfiltern und dadurch die Empfindlichkeit der Messung noch deutlich reduziert wird. Damit ist zu erwarten, dass bei weiterer Optimierung der Lichtquelle und Absorptionsfilter in die Leistungsregionen von herkömmlichen Durchflusszytometern vorgestossen werden kann.

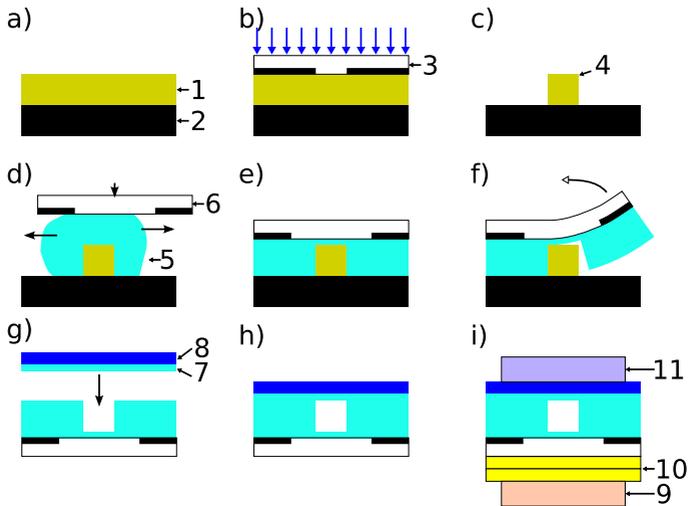


Abbildung 3.7: Herstellungsprozess des Mikrofluidikchips. a) Siliziummaster (1) mit SU8-Schicht (2). b) Belichtung der Struktur durch eine Schattenmaske (3). c) Negativ des Mikrofluidikkkanals (4) auf dem Siliziummaster. d) Beim Abformvorgang wird flüssiges PDMS (5) mit einer Folie, welche die Messapertur enthält (6), auf dem Master dünn verteilt. e) Ausbackschritt. f) Ablösen der abgeformten Struktur. g) Deckelung mittels einer mit PDMS (7) versehenen Filterfolie (8). h) Ausbacken der fertigen Struktur. i) Für die Messung werden eine Photodiode (9) und zwei Lagen Emissionsfilter (10) auf die Aperturseite aufgebracht. Eine Leuchtdiode (11) wird direkt auf die Emissionsfolie aufgelegt.

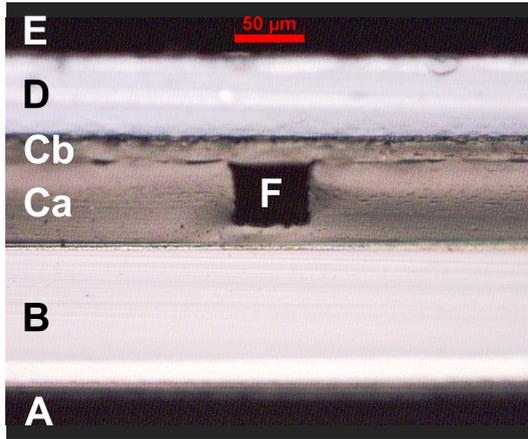


Abbildung 3.8: Mikroskopaufnahme des Querschnittes des Mikrofluidik-chips. A: Detektionsseite. Hier werden zwei Lagen Emissionsfilter angebracht und darauf die Photodiode platziert. B: Maskenfolie, die Maske zeigt zum PDMS. Ca: Abgeformte PDMS-Schicht mit den Mikrofluidikstrukturen. Cb: Durch Spincoating aufgebrachte PDMS-Schicht zur Kanaldeckelung. D: Filterfolie für das Anregelicht. E: Anregeseite. Hier wird die LED direkt angebracht. F: von PDMS umschlossener Mikrofluidikkanal.



Abbildung 3.9: Mikroskopaufnahme der Draufsicht auf den Mikrofluidik-chip. A: Fokussierungsstruktur. B: Schattenmaske beginnt auf Fokussierungsstruktur. C: Messapertur mit Kanal.

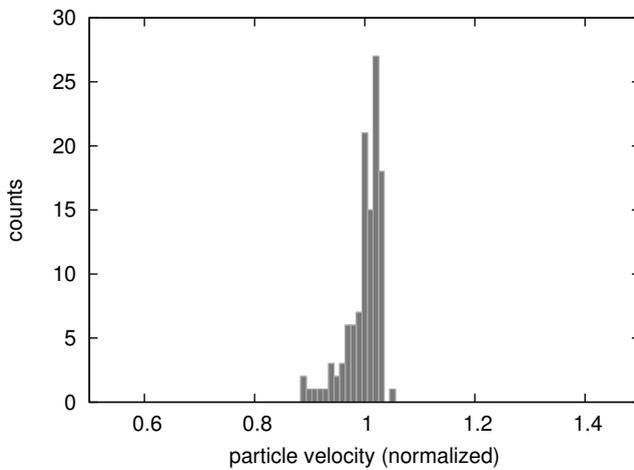


Abbildung 3.10: Histogramm der Partikelgeschwindigkeiten direkt nach der Fokussierungsstruktur.

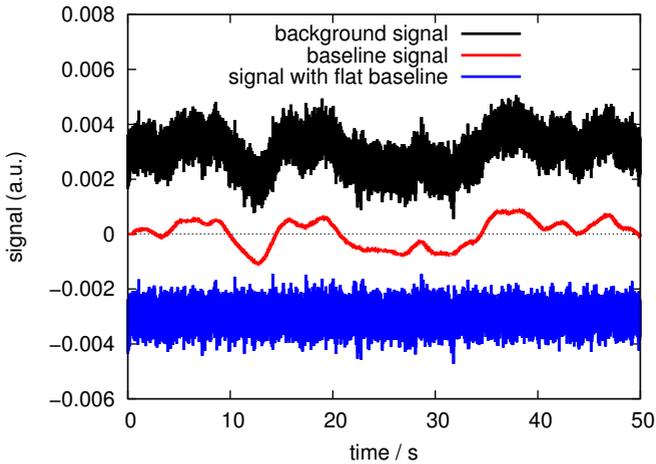


Abbildung 3.11: Beispiel für die Rekonstruktion der Basislinie mithilfe eines Medianfilters. Dargestellt ist ein das Hintergrundsignal einer partikel-freien Messung. Die enthaltene Basislinie wird mithilfe eines Medianfilter geschätzt und vom aufgenommenen Signal subtrahiert. Daraus resultiert das Signal mit flacher Basislinie, welches keine niederfrequenten Variationen mehr enthält.

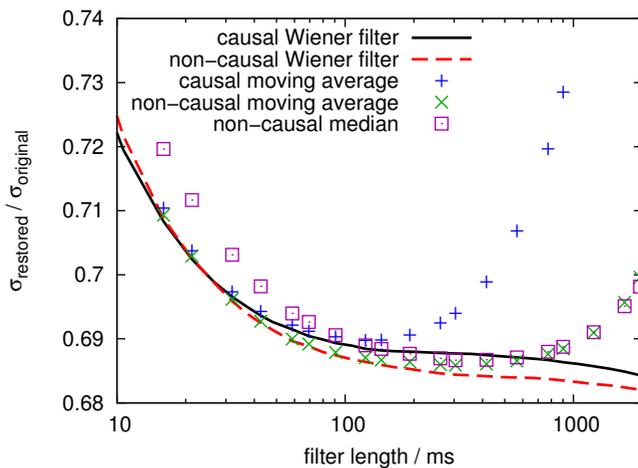


Abbildung 3.12: Vergleich unterschiedlicher Methoden zur Wiederherstellung der Basislinie. Gezeigt wird die Standardabweichung des Signals nach der Wiederherstellung der Basislinie relativ zur Standardabweichung vor der Wiederherstellung. Die maximale Filterlänge und die Möglichkeit ein nichtkausales Filter zu verwenden wird von der Anwendung bestimmt.

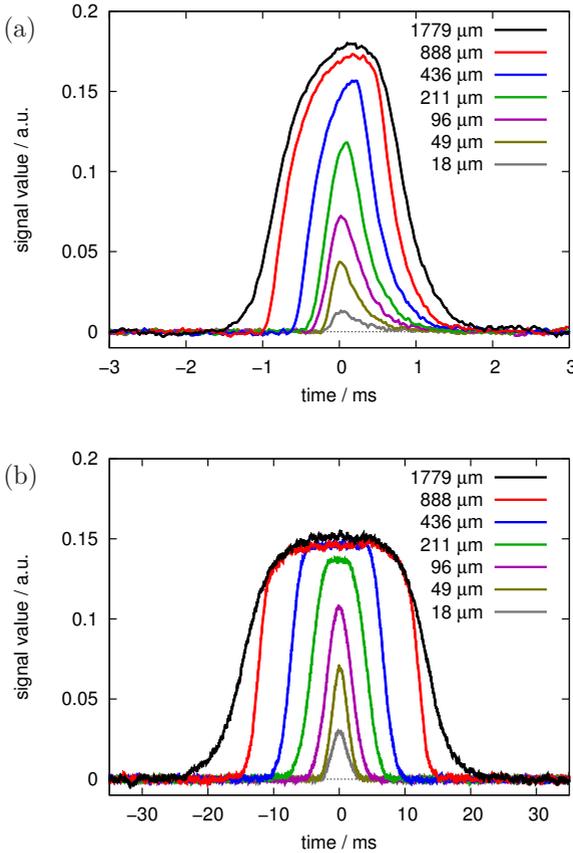


Abbildung 3.13: Typische durch Partikel erzeugte Pulsformen in Abhängigkeit der Aperturlänge. In a) wird die hohe Flussrate von insgesamt 3050 $\mu\text{l/h}$ verwendet und in b) die niedrige Flussrate von insgesamt 200 $\mu\text{l/h}$. Die Länge der Apertur spiegelt sich in der Breite der Pulse bzw. für kurze Aperturlängen in der Höhe der Pulse wider.

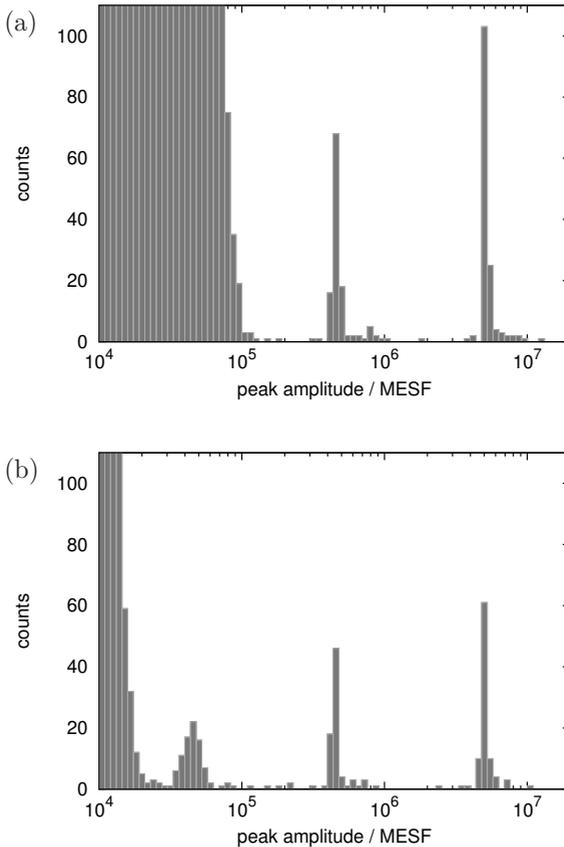


Abbildung 3.14: Histogramme der detektierten Partikelamplituden einer fünfminütigen Aufnahme. Bei der hohen Flussrate in a) beträgt die Fließgeschwindigkeit des Mantelflusses 3000 $\mu\text{l/h}$ bei der niedrigen Flussrate in b) 150 $\mu\text{l/h}$. Die Flussrate der Partikelflüssigkeit beträgt in beiden Fällen 50 $\mu\text{l/h}$.

4 Statistik der Partikeldetektion

Für jedes Detektionssystem sind die maximal mögliche Detektionsrate und die Raten der falsch positiven bzw. falsch negativen Detektionen essentielle Kenngrößen. Um diese für die hier untersuchten mikrofluidischen Systeme herzuleiten wird zuerst ein Auflösungskriterium bestimmt welches die maximal mögliche Detektionsrate festlegt. Für die Detektion von Partikeln aus im Messsignal von Partikeln erzeugten lokalen Maxima eignet sich hierfür das Sparrow-Kriterium. Die Pulsform muss ein einziges Maximum aufweisen und kompakt sein um eine hohe Partikelrate zu ermöglichen. Durch im Messsignal vorhandenes additives Rauschen wird der Signalverlauf verfälscht und es entstehen zusätzliche Maxima in partikelfreien Signalabschnitten. Ein Signalfilter bringt hier eine deutliche Verbesserung durch Unterdrückung von hochfrequentem Rauschen. Für die Raten und die Verteilungsfunktionen der durch Rauschen entstehenden falsch positiven bzw. falsch negativen Detektionen werden analytische Ausdrücke gebildet. Da die Gleichungen teilweise Näherungen enthalten, werden Simulationen durchgeführt um den Fehler abschätzen zu können. Um die praktische Anwendbarkeit der Signalstatistik zu testen wird sie mit den Daten des Fluoreszenzpartikeldetektors aus Kapitel 3 verglichen. Ein Vergleich der analytisch erwarteten Histogramme mit den Messergebnissen liefert eine sehr gute Übereinstimmung.¹

Für die Erstellung der Histogramme wurde in Kapitel 3 das gemessene Signal mit einem manuell optimierten Filter gefiltert und danach das Histogramm aus lokalen Maxima erstellt. In der Literatur findet diese Methode weite Anwendung [28, 74, 79, 128–131]. Um die Leistungsfähigkeit dieses

¹Teile dieses Kapitels wurden bereits in [127] veröffentlicht.

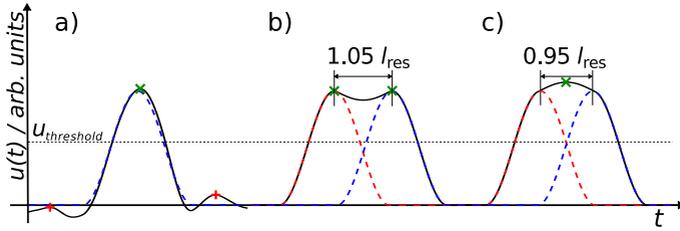


Abbildung 4.1: Schema für die Partikeldetektion mit Schwellwert $u_{\text{threshold}}$ in a). Akzeptierte Detektionen sind mit x markiert, zurückgewiesene Detektionen mit $+$. In b) und c) überlagern sich zwei benachbarte Partikel, die in b) aufgelöst sind, aber in c) zu einem einzelnen Maximum verschmelzen.

Verfahrens beurteilen und optimieren zu können ist jedoch eine detaillierte Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Pulsform, maximaler Partikeldurchsatz, Rauschen und Detektionsfehlern notwendig.

Die prinzipielle Funktionsweise wird anhand von Abbildung 4.1 erklärt. Für die Detektion der Partikel werden nur lokale Maxima ausgewertet. Lokale Maxima, die einen Schwellwert $u_{\text{threshold}}$ (in Abbildung 4.1a als gestrichelte Linie dargestellt) übersteigen, werden als Partikel akzeptiert. Lokale Maxima, die den Schwellwert nicht übersteigen, werden als Rauschen zurückgewiesen. In Abbildung 4.1b und 4.1c wird exemplarisch die Auflösungsgrenze l_{res} des Systems dargestellt. Zwei Partikel, die wie in Abbildung 4.1b dargestellt aufgelöst sind, erzeugen zwei lokale Maxima. In Abbildung 4.1c werden die Pulse von zwei Partikeln dargestellt, deren Abstand die Auflösungsgrenze unterschreitet. Hier wird nur ein lokales Maximum mit einer veränderten Amplitude erzeugt. Dies wird als Fehler angesehen.

Ein Vorteil der Partikeldetektion aus lokalen Maxima ist, dass das Ergebnis bei kontinuierlicher Signalverarbeitung mit geringer Verzögerung zu Verfügung steht. Für Partikelsortierverfahren ist diese Eigenschaft essentiell, da hierbei der Sortiermechanismus mit geringer Verzögerung aktiviert werden muss. Detektionsverfahren, die auf größeren Signalblöcken arbeiten können dies nicht bewerkstelligen. Beispiele für blockbasierte Verfahren, welche die Zuordnung zwischen Signalpulsen und deren Ursachen treffen,

gibt es in vielen Bereichen der Wissenschaft. Zu Nennen sind hier die Sequenzierung von DNA [132], die Analyse von Ultraschallsignalen [133], die Analyse der Aktivität neuronaler Zellen [134] oder Anwendungen in der Massenspektroskopie [135, 136]. Durch die blockweise Verarbeitung von Signalen kann mit diesen Verfahren zwar prinzipiell eine bessere Leistungsfähigkeit erzielt werden, da sich überlappende Pulse besser berücksichtigt werden können, jedoch steigt damit neben der Verarbeitungszeit auch der Rechenaufwand teilweise erheblich und die resultierende Fehlerstatistik ist schwieriger zu handhaben. Deshalb sollen im Folgenden die statistischen Eigenschaften der effizient implementierbaren Partikeldetektion aus lokalen Maxima untersucht werden.

Insbesondere die Berechnung der Rate der falsch positiven Detektionen stellt eine Herausforderung dar. Zwar ist das Rauschen selbst zu jedem Zeitpunkt normalverteilt, was in einer Normalverteilung der falsch positiven Detektionen resultieren würde, wenn ein unabhängiges Signal zur Festlegung des Messzeitpunktes zur Verfügung stehen würde. Im vorliegenden Fall jedoch werden die lokalen Maxima ausgewertet, die eine Tendenz zu positiveren Werten haben. Dieses Problem wurde in der Literatur im Zusammenhang mit dem Deichbau, bei dem die Verteilungsfunktion der Maximalhöhe der Wellen im Meer entscheidend ist, untersucht [137]. Die zugehörige statistische Verteilung entspricht der Verteilung der Maxima und wird entsprechend auf das untersuchte Signalmodell angewendet.

4.1 Voruntersuchungen

Für die Modellbildung werden zuvor die Eigenschaften der Pulsformen, sowie des Hintergrundrauschens ermittelt. Damit soll sichergestellt werden, dass die bei der Modellbildung getroffenen Annahmen korrekt sind.

4.1.1 Durchführung der Messungen

Analog zu den Messungen mit Fluoreszenzpartikeln in Kapitel 3 werden Messungen mit partikelfreier Flüssigkeit bei angeschalteter LED durchge-

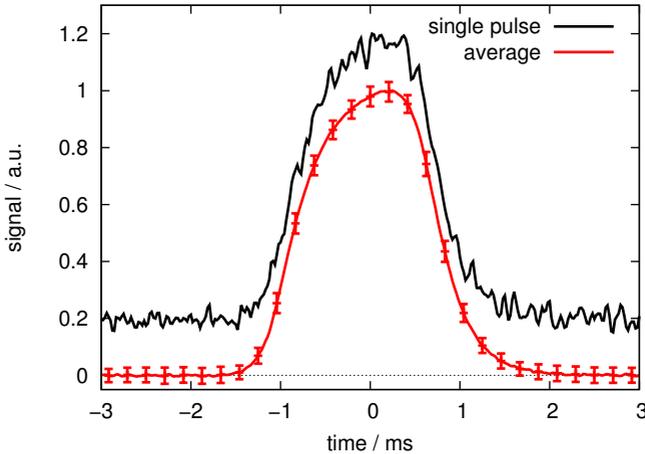


Abbildung 4.2: Von einem einzelnen Partikel generierte Pulsform (oben, Offset 0.2) und durchschnittliche Pulsform von 169 Partikeln (unten) mit Standardabweichung (vertikale Balken).

führt. Hierdurch kann das bei der Messung vorhandene Hintergrundrauschen analysiert werden. Für die Analyse der Pulsformen werden wiederum die Daten der Partikelmessungen verwendet. Da nur bei der hohen Durchflussrate von 3050 $\mu\text{l/h}$ eine gute Geschwindigkeitsfokussierung erreicht wurde, werden hier nur diese Messungen der Partikel ausgewertet.

4.1.2 Gemessene Pulsform

In Abbildung 3.13a wird die von einem Partikel erzeugte Pulsform gezeigt. Die für die Messungen relevante Pulsform ist hierbei diejenige bei 1779 μm Fensterlänge und hoher Flussrate. In Abbildung 4.2 ist diese Pulsform einer Einzelmessung der höchsten Partikelintensität von $5 \cdot 10^4$ MESF als obere Kurve dargestellt. Darunter ist zum Vergleich der Durchschnitt der Pulsformen von 169 Partikeln dargestellt. Die Fehlerbalken geben die aus der Gruppe ermittelte Standardabweichung zum jeweiligen Zeitpunkt

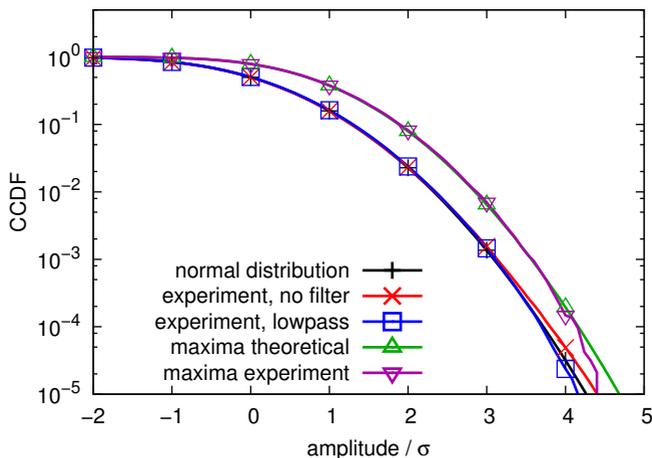


Abbildung 4.3: Halblogarithmische Darstellung der komplementären Verteilungsfunktion (engl. *complementary cumulative distribution function*, CCDF) der Amplituden sowie der lokalen Maxima des gemessenen Rauschsignals sowie die theoretisch erwarteten Verteilungen. Die Amplitudenverteilung des ungefilterten Messsignals (x-Symbole) sowie des gefilterten Messsignals (offene Quadrate) folgen der Normalverteilung (+-Symbole). Die Maxima des gefilterten Messsignals (umgedrehte Dreiecke) folgen der in Kapitel 4.2.11 eingeführten Verteilung nach Gleichung 4.21 (Dreiecke).

an. Wenn sich die Pulsformen in der Amplitude deutlich unterscheiden würden, wäre dies durch eine erhöhte Standardabweichung im Maximum sichtbar. Eine starke Variation der Pulsformen bzw. Pulsbreiten wäre in einer erhöhten Standardabweichung an den Flanken sichtbar. Da dies in Abbildung 4.2 nicht sichtbar ist, kann die durchschnittliche Pulsform als repräsentativ angenommen werden.

Diese Eigenschaft ist wichtig, da im Folgenden für alle Partikel dieselbe Pulsform, insbesondere auch dieselbe Pulsbreite angenommen wird. Damit wird implizit eine gute Partikelfokussierung mit geringer Geschwindigkeitsvariation vorausgesetzt.

4.1.3 Eigenschaften des Hintergrundrauschens

Das im System auftretende Rauschen ist der begrenzende Faktor für die Detektion kleiner Amplituden. Um dieses Rauschen zu untersuchen, wird ein mit partikelfreier Flüssigkeit aufgenommenes Signal untersucht. Dabei ist wie bei der Messung die Lichtquelle eingeschaltet, um dieselben Bedingungen zu erhalten. In Abbildung 4.3 ist die komplementäre kumulative Verteilungsfunktion (engl. *complementary cumulative distribution function*, CCDF) für die Amplitudenverteilung des ungefilterten aufgenommenen Signals dargestellt (Symbol \times). Zum Vergleich wird die CCDF einer Normalverteilung hinterlegt (Symbol $+$). Beide Kurven liegen über Zehnerpotenzen gut übereinander. Dies zeigt, dass das System nicht durch einzelne Störquellen ohne gaußsche Amplitudenverteilung dominiert wird. Nach einer Tiefpassfilterung des Signals mittels Faltung mit einer Hann-Funktion ergibt sich dieselbe Amplitudenverteilung (Symbol \square). Daraus kann geschlossen werden, dass das im System auftretende Rauschen durch farbiges gaußsches Rauschen modelliert werden kann. Im Gegensatz zu weißem Rauschen muss farbiges Rauschen keine Gleichverteilung der Leistung im Frequenzbereich besitzen und ist damit allgemeiner. Da analoge Systeme generell in der Bandbreite begrenzt sind, ist die Leistungsverteilung des Rauschens nur in bestimmten Frequenzbereichen annähernd weiß. Die nachfolgenden Betrachtungen setzen daher kein weißes Rauschen voraus.

Für die in diesem Kapitel durchgeführten Simulationen wird weißes Rauschen tiefpassgefiltert, um die Eigenschaften eines analogen Systems nachzuzahlen.

Für die Partikeldetektion aus lokalen Maxima ist außer der Amplitudenverteilung auch die Verteilung der Maxima wesentlich. Diese ist ebenfalls in Abbildung 4.3 eingezeichnet (Symbol \triangle) und weicht deutlich von einer Normalverteilung ab (Symbol $+$). Die zugehörige Verteilungsfunktion wird in Kapitel 4.2.11 behandelt und ist ebenfalls in Abbildung 4.3 eingezeichnet (Symbol ∇). Auch hier ergibt sich eine gute Übereinstimmung. Festzuhalten ist, dass die Verteilungsfunktion der Maxima keiner Normalverteilung entspricht, sondern nach rechts verschoben ist und eine leicht andere Form besitzt.

Tabelle 4.1: Liste der in Kapitel 4 verwendeten Symbole.

Symbol	Bedeutung
A_E	Menge der als Partikel detektierten Maxima
a_E	Detektierte Partikelamplitude
a_P	Partikelamplitude
c_E	Normierungsfaktor für Filterung
f_g	Grenzfrequenz eines Tiefpassfilters
h_E	Pulsform des Signalfilters
h_{res}	Pulsform nach Filterung, entscheidend für Auflösungskriterium
h_P	Vom Partikel erzeugte Pulsform
l_{res}	Räumliche Auflösung
n	Rauschsignal
p_m	Dichtefunktion der Wahrscheinlichkeitsverteilung der durch Rauschen verursachten Maxima
P_m	Wahrscheinlichkeit, dass ein vom Rauschen verursachtes Maximum einen Schwellwert überschreitet

Fortsetzung von Tabelle 4.1.

Symbol	Bedeutung
$r_{\text{FN,noise}}$	Rate der vom Rauschen verursachten falsch negativen Detektionen
$r_{\text{FP,noise}}$	Rate der vom Rauschen verursachten falsch positiven Detektionen
r_{m}	Rate der vom Rauschen verursachten Maxima
r_{m}^-	Rate der vom Rauschen verursachten Maxima mit negativen Werten
r_{m}^+	Rate der vom Rauschen verursachten Maxima mit positiven Werten
r_{P}	Partikelrate
$r_{\text{P,eff}}$	Rate der Partikeldetektionen
$r_{\text{P,max}}$	Maximal detektierbare Partikelrate
$r_{\text{P,multiple}}$	Rate der Partikeldetektionen mit Pulsüberlagerung mehrerer Partikel
$r_{\text{P,single}}$	Rate der Partikeldetektionen für die das Auflösungskriterium erfüllt ist
u	Messsignal
u_{E}	Gefiltertes Messsignal
$u_{\text{threshold}}$	Schwellwert für Partikeldetektion
t_{P}	Zeitpunkt, an dem ein Partikel die Nullstelle der Messzone passiert
t_{res}	Zeitliche Auflösung
v_{P}	Partikelgeschwindigkeit
ϵ	Bandbreitenparameter für die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Maxima
σ_{E}	Vom Rauschen verursachte Standardabweichung im gefilterten Signal

4.2 Modellierung

4.2.1 Signalmodell

Das Signalmodell wird zunächst auf idealisierten Annahmen über das mikrofluidische Partikeldetektionssystem aufgebaut, um eine kompakte Beschreibung und eine handhabbare Statistik zu erhalten. Anschließend werden Einflüsse von in der Praxis auftretenden Abweichungen vom Ideal separat untersucht.

Wesentlich für die Betrachtungen ist, dass im mikrofluidischen System Partikel an einer Detektionszone vorbeifließen und dabei eine spezifische Pulsform h_P im Signal erzeugen. Die Höhe dieser Pulsform a_P ist von der jeweiligen Konzentration an Fluoreszenzmolekülen abhängig. Die Dauer der Pulsform hängt von der Partikelgeschwindigkeit v_P ab, welche als konstant für alle Partikel und alle Zeitpunkte angenommen wird. Dies wird durch Partikelfokussierung [71, 125] innerhalb des mikrofluidischen Systems erreicht und Werte der Geschwindigkeitsvariation unterhalb von 2% sind in der Literatur bekannt [125]. Da die durch unterschiedliche Partikel erzeugten Pulsformen, wie in Kapitel 4.1.2 gezeigt, nicht stark voneinander abweichen, wird für alle Partikel dieselbe Pulsform h_P angenommen. Dies ist der Fall, da das optische System durch die große homogen ausgeleuchtete Detektionszone speziell dafür ausgelegt wurde. Die Größe der Partikel im Mikrometerbereich ist deutlich geringer als die Länge der Detektionszone von knapp 1.5 mm und hat damit keinen messbaren Einfluss auf die Pulsform. Das im Detektionssystem auftretende Rauschen wird als additives farbiges Rauschen n mit gaußscher Amplitudenverteilung angenommen. Der Offset im Signal durch Hintergrundlicht und ungenau justierte Komponenten wird vernachlässigt. Dies ist möglich, da der Vorverstärker einen Hochpass enthält, der Gleichanteile entfernt und die Rekonstruktion der Basislinie entfernt ebenfalls Gleichanteile und niederfrequente Schwankungen.

Das Modell für das Signal u der Pulse eines Partikelstromes ist somit

$$u(t) = \sum_k a_{P,k} \cdot h_P(t - t_{P,k}) + n(t). \quad (4.1)$$

Hierbei gibt $a_{P,k}$ die Pulshöhe und $t_{P,k}$ die zeitliche Position der einzelnen Partikel an. Die Pulsform h_P der Partikel ist normiert. Dadurch kann mit $a_{P,k}$ die maximale Pulshöhe bestimmt werden. Das additive Rauschen ist vom eigentlichen partikelgenerierten Signal unabhängig. Dies ist für das vorliegende System eine gute Näherung, da die Fluoreszenz der Partikel nur sehr klein ist gegenüber dem insgesamt auf den Detektor fallenden Licht. Bei Systemen, die nahezu kein Hintergrundrauschen haben, gilt diese Annahme nicht mehr.

Im Folgenden wird das Subskript P für den Partikeln zugehörige Variablen verwendet und das Subskript E für dem gefilterten Signal zugehörige Variablen.

Um die Signalqualität zu verbessern, wird optional ein Tiefpassfilter mit der Impulsantwort h_E eingesetzt. Damit durch diese zusätzliche Filterung die Höhe der Maxima in den Pulsformen nicht verfälscht wird, wird ein Skalierungsfaktor c_E eingeführt. Das gefilterte Signal u_E entsteht durch Faltung mit dem Filter und beträgt

$$u_E(t) = c_E \cdot (u * h_E)(t), \quad (4.2)$$

wobei der zugehörige Skalierungsfaktor

$$c_E = \max_t \{(h_P * h_E)(t)\}^{-1} \quad (4.3)$$

sich aus dem Kehrwert des Maximums der gefalteten Impulsantworten des Partikels sowie des Tiefpasses ergibt. Damit entsprechen die Pulsmaxima des gefilterten Signals a_E den gewünschten Messwerten a_P .

Die neutrale Pulsform für h_E ist ein Dirac-Impuls. Dadurch wird die Faltung in Gleichung 4.2 wirkungslos und $(h_P * h_E)(t) = h_P(t)$. Mit diesem Signalmodell lassen sich somit sowohl gefilterte als auch ungefilterte Signale beschreiben.

4.2.2 Partikeldetektion aus lokalen Maxima

Eine kompakte mathematische Definition für Menge der lokalen Maxima A_E über einem definierten Schwellwert $u_{\text{threshold}}$ ist

$$A_E = \left\{ a_{E,k} = u_E(t_k) \mid u_E(t_k) > u_{\text{threshold}} \wedge \frac{du_E(t_k)}{dt} = 0 \wedge \frac{d^2u_E(t_k)}{dt^2} < 0 \right\}. \quad (4.4)$$

Die Verwendung von zeitkontinuierlichen Ableitungen ist für das zeitdiskrete digitalisierte Signal problematisch. Auf ein digitalisiertes Signal kann hingegen der folgende Algorithmus angewandt werden: Ein detektiertes Maximum zum Abtastwert k tritt dann auf wenn der Schwellwert überschritten ist, also $u_E(t_k) > u_{\text{threshold}}$ und ein lokales Maximum vorhanden ist, also $u_E(t_{k-1}) < u_E(t_k)$ und $u_E(t_k) \geq u_E(t_{k+1})$. Damit kann mit nur einem Abtastwert Zeitverzögerung ein Maximum detektiert werden.

Eine mögliche Erweiterung, die in Kapitel 4.2.18 diskutiert wird, ist, dass nur das höchste Maximum zwischen zwei Nulldurchgängen der Signalkurve gewertet wird. Hierdurch werden mehrfache Zählungen einzelner Partikel bei stark verrauschten Signalen vermieden. Die zugehörige Statistik wird jedoch komplizierter und die Überlegungen zur maximalen Partikelrate in Kapitel 4.2.7 sind nicht mehr allgemein gültig. Deshalb konzentrieren sich die folgenden Betrachtungen auf die Detektion von Partikeln aus Maxima ohne zusätzliche Auswahllogik.

4.2.3 Auflösungsvermögen

Es gibt eine Reihe von Kriterien [138], um das Auflösungsvermögen zweier benachbarter Pulse (optische Intensitäten oder ähnliche Signalförmungen) zu definieren. Beispielsweise wird für das optische Auflösungsvermögen häufig das Rayleigh-Kriterium [139] verwendet. Bei diesem verbleibt jedoch an der damit definierten Auflösungsgrenze ein Minimum zwischen den beiden Zentren. Bei einem rauschfreien Signal könnten die Maxima zweier benachbarter Pulse also auch noch leicht unterhalb der durch das Rayleigh-Kriterium

gegebenen Auflösungsgrenze detektiert werden. Deshalb ist dieses Kriterium nicht für die verwendete Detektionsmethode über die Maxima nützlich. Beim Sparrow-Kriterium [140] hingegen wird die Auflösungsgrenze dadurch festgelegt, dass zwischen zwei Maxima gerade das Minimum verschwindet. Diese Definition passt gut zur verwendeten Detektionsmethode, da genau unterhalb der nach dem Sparrow-Kriterium definierten Auflösungsgrenze zwei Pulse nicht mehr getrennt werden können.

Das Auflösungsvermögen des Systems wird im Ortsbereich als Längenangabe l_{res} definiert. Es legt den Mindestabstand fest, den zwei Partikel einhalten müssen, um getrennt detektiert zu werden. Beachtet werden muss bei der Festlegung der zugehörigen Pulsform, dass bei der Überlagerung zweier Pulse keine zusätzlichen Maxima auftreten dürfen. Betrachtet man mehr als zwei Partikel, deren Pulsformen sich überlappen, können je nach Pulsform noch zusätzliche Effekte auftreten, die dann leicht höhere Abstände zwischen den Partikeln erfordern. Diese Effekte werden in Kapitel 4.2.8 näher untersucht.

Eine Veranschaulichung des Auflösungsvermögen ist in Abbildung 4.1 dargestellt. In Abbildung 4.1b ist die Überlagerung zweier Pulse dargestellt, welche mit einem Abstand von $1.05 \cdot l_{\text{res}}$ leicht über dem Auflösungsvermögen des Systems sind. Es sind deutlich zwei separate Maxima erkennbar. In Abbildung 4.1c hingegen ist mit einem Abstand von $0.95 \cdot l_{\text{res}}$ das Auflösungsvermögen leicht unterschritten und die Maxima der einzelnen Pulse sind in ein einziges Maximum in der Mitte verschmolzen.

Das Subskript $_{\text{res}}$ wird im Folgenden für Variablen verwendet, die im Zusammenhang mit der Auflösung stehen.

4.2.4 Analytische Pulsformen

Im Folgenden wird eine Reihe von Pulsformen definiert die nach dem Sparrow-Kriterium in ihrer Ausdehnung skaliert sind. Das bedeutet, dass die räumliche bzw. zeitliche Ausdehnung der Pulsform so gewählt ist, dass zwei sich überlagernde identische Pulse genau dann zwei Maxima bilden wenn der Abstand der Pulse größer als l_{res} im Ortsbereich bzw. t_{res} im Zeitbereich ist. Eine verbreitete Pulsform ist die Gaußglocke (siehe

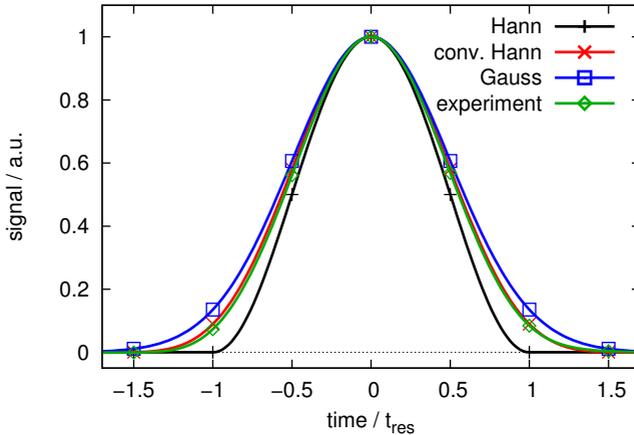


Abbildung 4.4: Vergleich der gemessenen Pulsform nach Filterung (Raute) mit den untersuchten analytischen Pulsformen, der Hann-Funktion (+-Symbole), gefalteten Hann-Funktion (x-Symbole), sowie der Gaußglocke (Quadrate).

Gleichung 2.7), die näherungsweise in vielen Systemen vorkommt. In Anlehnung an die im Experiment gemessene Pulsform wird eine Hann-Funktion definiert. Sie ist besonders kompakt. Da die Signale vor der Detektion mit einer Filterfunktion gefaltet werden wird ebenfalls eine mit sich selbst gefaltete Hann-Funktion definiert und mit der mit einer Hann-Funktion gefalteten Pulsform des Experiments verglichen.

Entscheidend für das Auflösungsvermögen ist nicht direkt die Pulsform, die der Partikel im gemessenen Signal u erzeugt, sondern diejenige, die der Detektionsalgorithmus im gefilterten Signal u_E sieht. Die zugehörige Pulsform h_{res} ist also

$$h_{\text{res}}(t) = c_E \cdot (h_P * h_E)(t). \quad (4.5)$$

Hierdurch werden die Effekte des Signalfilters berücksichtigt und h_{res} ist im Maximum auf 1 normiert.

Die untersuchten Pulsformen sollen sich an den in der Praxis auftretenden Pulsformen orientieren. In der Literatur beispielsweise wird von einer Gaußglockenform berichtet [141]. Diese Pulsform ist besonders interessant, da sich bei wiederholter Faltung von Impulsantworten das Resultat einer Gaußglockenform annähert. Die zugehörige Pulsform mit der Auflösung t_{res} ist

$$h_{\text{res,Gauss}}(t) = \exp\left(-2t^2 \frac{v_{\text{P}}^2}{l_{\text{res}}^2}\right). \quad (4.6)$$

Ein Nachteil der Gaußglockenform ist jedoch, dass sie unendlich ausgedehnt ist und in realen Systemen in dieser Form nicht auftreten kann. Sie stellt damit einen Grenzfall dar, der angenähert, aber nicht erreicht werden kann. Beim vorliegenden mikrofluidischen System wird die Detektionszone durch eine Apertur beschränkt, wodurch die Pulsform in ihrer Ausdehnung eingeschränkt wird. In Abbildung 3.13 sind typische Pulsformen dargestellt. Bei niedriger Partikelgeschwindigkeit und hohen Fensterlängen enthält die Pulsform ein flaches Plateau. Bei kleineren Fensterlängen verschwindet das flache Plateau und die Pulsform reduziert sich auf die abgerundeten Flanken. Bei Erhöhung der Flussgeschwindigkeit wird die Pulsform durch die Tiefpasswirkung des Verstärkers verrundet. In Kapitel 4.1.2 wurde diese Pulsform bei hoher Flussgeschwindigkeit und langer Fensterlänge näher untersucht, da diese Konfiguration für die Signalanalyse verwendet wird.

Eine zum Experiment bei hoher Flussgeschwindigkeit sehr ähnliche Pulsform ist durch die Hann-Funktion aus Gleichung 2.17 gegeben. Diese Pulsform wird im Zeitbereich so skaliert, dass sich eine Auflösung von t_{res} bei der Überlagerung zweier identischer Pulse ergibt. Daraus resultiert

$$h_{\text{res,Hann}}(t) = \begin{cases} \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cos\left(\pi \cdot t \cdot \frac{v_{\text{P}}}{l_{\text{res}}}\right) & \text{wenn } -1 < t \cdot \frac{v_{\text{P}}}{l_{\text{res}}} < 1 \\ 0 & \text{sonst.} \end{cases} \quad (4.7)$$

Diese Funktion hat den Vorteil, dass sie zeitlich eng beschränkt und im Gegensatz zur Rechteck- oder Dreiecksfunktion keine scharfen Kanten

aufweist. Des Weiteren kann die Faltung dieser Funktion mit sich selbst ebenfalls mathematisch kompakt dargestellt werden und beträgt

$$h_{\text{CHann}}(t, c) = \begin{cases} \left(\frac{2-c|t| \frac{v_P}{l_{\text{res}}}}{3} \cdot \frac{2+\cos\left(\pi c|t| \frac{v_P}{l_{\text{res}}}\right)}{2} \right. \\ \quad \left. + \frac{1}{2\pi} \sin\left(\pi c|t| \frac{v_P}{l_{\text{res}}}\right) \right) & \text{wenn } c|t| \frac{v_P}{l_{\text{res}}} < 2 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (4.8)$$

wobei c ein zeitlicher Skalierungsparameter ist. Mit $c = 1$ gilt $h_{\text{CHann}}(t, c) = (h_{\text{res,Hann}} * h_{\text{res,Hann}})(t)$. Die Faltung der Funktion mit sich selbst ist nützlich, da die Signale digital gefiltert werden sollen, um hochfrequentes Rauschen zu unterdrücken. Idealerweise wird zu dieser Faltung ein Filter eingesetzt, dessen Pulsform der zeitlich gespiegelten Pulsform des eigentlichen Signals entspricht, also ein *Matched-Filter* [142]. Natürlich hat nun das Resultat der Faltung der beiden Hann-Funktionen als Resultat eine breitere Pulsbasis und auch ein reduziertes Auflösungsvermögen. Es muss also der Skalierungsparameter c angepasst werden, um diese Pulsform als Auflösungsfunktion zu verwenden. Der entsprechende Wert für c beträgt 1.1394 womit gilt

$$h_{\text{res,CHann}}(t) = h_{\text{CHann}}(t, 1.1394). \quad (4.9)$$

Dies bedeutet, dass durch die zusätzliche Filterung der Hann-Funktion im Messsignal durch Faltung mittels einer Hann-Funktion derselben Form zwar die Länge der Pulsbasis verdoppelt wurde, jedoch wurde der maximale Partikeldurchsatz nur um 14 % gesenkt. Ein nützlicher Nebeneffekt ist, dass die Pulsform aus dem Experiment weiter verrundet und an die gewünschte Pulsform angeglichen wird. Kleinere, je nach Mikrofluidikchip auftretende Fehler in der Pulsform werden damit weitgehend ausgeglichen.

In Abbildung 4.4 sind die gerade vorgestellten Pulsformen dargestellt. In der Darstellung sind die Pulsformen auf die aus der räumlichen Auflösungslänge l_{res} hergeleitete Auflösungszeit $t_{\text{res}} = l_{\text{res}}/v_P$ normiert. Der Mittelpunkt der nächsten Pulsform darf sich also frühestens nach dem Zeitpunkt t_{res} befinden, um vom Detektionsalgorithmus noch aufgelöst zu werden. Die Hann-Funktion $h_{\text{res,Hann}}$ hat die kompakteste Form und die

schmalste Basis (Symbol $+$). Die mit sich selbst gefaltete Hann-Funktion $h_{\text{res,CHann}}$ (Symbol \times) weist eine deutlich breitere Pulsform auf, ist aber nicht so weit ausgedehnt wie die Gaußglocke $h_{\text{res,Gauss}}$ (Symbol \square). Für die Auswertung der Experimente relevant ist die experimentelle Pulsform gefaltet mit der Hann-Funktion (Symbol \diamond). Diese Pulsform liegt wie vorgesehen sehr eng an der gefalteten Hann-Funktion.

4.2.5 Numerische Simulationen

Numerische Simulationen sind ein nützliches Werkzeug, um analytisch schwer oder nicht exakt fassbare Sachverhalte zu untersuchen. Da, um die statistischen Eigenschaften kompakt zu fassen, Vereinfachungen angenommen werden müssen, wird dies in den folgenden Untersuchungen der Signalstatistik des öfteren der Fall sein. Um die Simulationen zu realisieren wird mit Hilfe eines zeitdiskreten Signals die entsprechende Situation numerisch nachgestellt. Dies entspricht den digitalisierten zeitdiskreten Signalen, die der im System enthaltene A/D-Wandler liefert.

Für die Simulation von Rauschen wird weißes gaußsches Rauschen durch einen Zufallszahlengenerator erzeugt. Da dieses Rauschen nur innerhalb der betrachteten Abtastbandbreite weiß ist hängt die spektrale Leistungsdichte und die Standardabweichung des Rauschsignals von der Abtastrate ab. Dies ist unerwünscht, da, um die Detektion von lokalen Maxima mit hoher Präzision zu simulieren, die Abtastrate variiert werden soll. Einen Ausweg bildet hierbei der Einsatz eines Tiefpass-Filters, welcher für die jeweilige Abtastrate angepasst wird. Hierdurch kommt es ab einer ausreichend hohen Abtastrate nur noch zu geringen Änderungen der Ergebnisse wenn die Abtastrate geändert wird. Insbesondere die Rate der lokalen Maxima und deren Verteilung bleibt nahezu konstant. Um dies effizient zu realisieren wird weißes gaußsches Rauschen mit einem Butterworth-Filter vierter Ordnung mit jeweils definierter Grenzfrequenz tiefpassgefiltert. Das resultierende Rauschsignal entspricht $n(t)$ in Gleichung 4.1.

Die Addition des Pulszuges mit dem Rauschsignal in Gleichung 4.1 wird hinter die Signalfilterung verschoben, um die beiden Signale getrennt

analysieren zu können. Insbesondere die Standardabweichung des Rauschsignals kann hier ermittelt bzw. durch lineare Skalierung auf einen vorher festgelegten Wert eingestellt werden.

Die Pulserzeugung nach Gleichung 4.1 wird durch jeweils zeitlich verschobene sequentielle Addition der einzelnen Pulsformen auf einen Signalvektor erreicht. Der zeitliche Nullpunkt der Signalpulse liegt hierbei in deren Maximum. Am Anfang und Ende des Signals sind entsprechende zusätzliche Pufferzeiten erforderlich, um Artefakte bei der Signalerzeugung und Filterung zu vermeiden.

Die Signalfilterung in Gleichung 4.2 wird durch Faltung der Filterpulsform mit dem Signal des Pulszuges bzw. des Rauschens vorgenommen. Hierbei wird die Normierung berücksichtigt, um nach der Filterung die korrekte Pulshöhe zu erhalten.

Für die Analyse werden in dem nach der Addition resultierenden Gesamtsignal die Positionen und Werte der lokalen Maxima detektiert und deren Statistiken analysiert bzw. als Histogramme dargestellt.

4.2.6 Überlagerung von zwei Pulsen

Die in Abschnitt 4.2.3 gemachten Überlegungen zur Auflösungsgrenze sollen nun anhand der Pulsformen verfeinert werden. Hierfür wird die entstehende Kurve bei Überlagerung zweier identischer Pulsformen genau an der Auflösungsgrenze betrachtet.

In Abbildung 4.5 ist die Überlagerung von Pulsen aus Abbildung 4.4 mit einem Abstand, der gerade dem Auflösungskriterium entspricht, dargestellt. Die Maxima der Einzelpulse liegen jeweils bei $\pm 0.5 \cdot t_{\text{res}}$. Hier ist gut zu sehen, dass die kompakte Pulsform von $h_{\text{res,Hann}}$ einen deutlichen Vorteil gegenüber den restlichen Pulsformen bietet, denn selbst an der Auflösungsgrenze hat sich das Maximum nicht über den Wert der Einzelpulse hinaus erhöht. Dies liegt an der speziellen Symmetrie der Pulsform, da $h_{\text{res,Hann}}(t) = 1 - h_{\text{res,Hann}}(t - t_{\text{res}})$ für $0 \leq t \leq t_{\text{res}}$. Solch eine Pulsform muss jenseits des Limits von $\pm t_{\text{res}}$ auf Null abgefallen sein. Das kann in einer praktischen Realisierung natürlich nur näherungsweise erreicht werden.

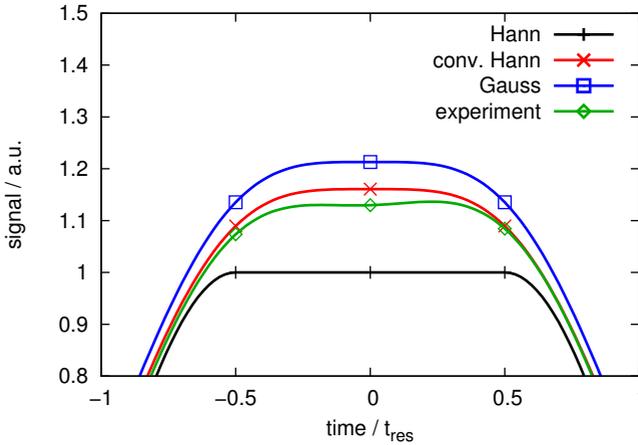


Abbildung 4.5: Überlagerung zweier Pulse aus Abbildung 4.4 mit einem Abstand, welcher der Auflösungsgrenze entspricht.

Für die anderen untersuchten Pulsformen ergeben sich erhöhte Werte der Maxima, wobei die gaußförmige Pulsform am schlechtesten abschneidet. Die mit der Hann-Funktion gefilterte experimentelle Pulsform schneidet wie erwartet sehr ähnlich zur mit sich selbst gefalteten Hann-Funktion ab. Die Asymmetrie in der experimentellen Pulsform äußert sich durch eine leichte Asymmetrie des Bereichs um das Maximum. Die Erhöhung des Maximums an der Auflösungsgrenze entspricht ca. 15 % für die experimentelle Pulsform und kann damit abhängig von der Anwendung noch akzeptabel sein.

Interessant ist natürlich, wie schnell der Fehler durch die Erhöhung des Pulsmaximums in Abhängigkeit der Pulsabstände abfällt. Dies wird in Abbildung 4.6 dargestellt. Für die Hann-Funktion fällt der Fehler sobald die Auflösungsgrenze erreicht ist auf Null. Für die gefaltete Hann-Funktion sowie die experimentelle Pulsform wird ein Fehlermaß von 1 % bei etwa $1.3 \cdot t_{\text{res}}$ unterschritten. Der Fehler für die Gaußfunktion fällt etwas langsamer ab, wodurch das Fehlermaß von 1 % bei etwa $1.5 \cdot t_{\text{res}}$ unterschritten wird. In der Messung entstehen also nur sehr geringe Fehler in der ermittelten Pulshöhe wenn sich die Pulse zweier Partikel teilweise überlagern. Falls der

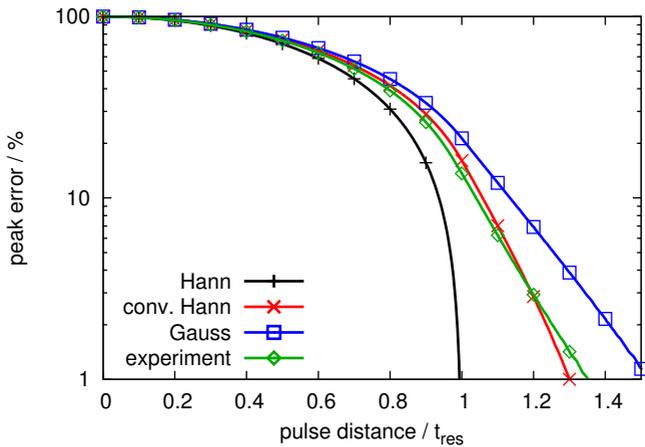


Abbildung 4.6: Höhe der Pulsmaxima bei Überlagerung von zwei Pulsen nach Abbildung 4.4. Wenn der Pulsabstand geringer als die Auflösung ist, wird nur ein Partikel detektiert. Der Verbleibende Fehler durch Pulsüberlagerung für größere Abstände nimmt in allen Fällen sehr schnell ab. Für die Hann-Funktion fällt dieser Fehler auf Null sobald das Auflösungskriterium erfüllt ist.

Fehler durch Pulsüberlagerung in einer Anwendung kleiner als 1 % gehalten werden soll, muss der Mindestabstand zweier Partikel entsprechend auf mehr als $1.3 \cdot t_{\text{res}}$ bzw. $1.5 \cdot t_{\text{res}}$ erhöht werden.

4.2.7 Maximaler Partikeldurchsatz

Der maximale Partikeldurchsatz entspricht der maximal detektierbaren Partikelrate wenn ein ideal geordneter Partikelstrom angenommen wird. Der Partikelabstand wird durch das Auflösungskriterium vorgegeben. Diese Rate ist zwar nicht unter realen Bedingungen erreichbar, stellt aber dennoch ein sinnvolles Maß dar, um ein System zu charakterisieren.

Somit ergibt sich für die maximale Partikelrate $r_{\text{P,max}}$ aus der Partikelgeschwindigkeit v_{P} und der räumlichen Auflösung l_{res}

$$r_{\text{P,max}} = \frac{v_{\text{P}}}{l_{\text{res}}}. \quad (4.10)$$

Dieser Wert wird im Folgenden als Referenzwert verwendet.

4.2.8 Effektive Partikelrate

Die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei oder mehr Partikel in einem Bereich kürzer als die Auflösungsgrenze befinden ist für ungeordnete Partikelströme durch eine Poissonverteilung gegeben [125, 126, 143].

Folglich ergibt sich für die effektive Partikelrate, welche die bei der Messung detektierte Partikelrate darstellt

$$r_{\text{P,eff}} \leq r_{\text{P}} \cdot \frac{\sum_{k=1}^{\infty} P_{\lambda}(k)}{\sum_{k=1}^{\infty} k \cdot P_{\lambda}(k)}. \quad (4.11)$$

Hierbei gibt $P_{\lambda}(k) = (k!)^{-1} \cdot \lambda^k \cdot e^{-\lambda}$ die Wahrscheinlichkeit von k Partikeln innerhalb der Auflösungsgrenze an. Dabei beträgt der Faktor $\lambda = 2 \cdot l_{\text{res}} \cdot r_{\text{P}}/v_{\text{P}} = 2 \cdot r_{\text{P}}/r_{\text{P,max}}$, wobei r_{P} die durchschnittliche Partikelrate ist. Die detektierte Partikelrate $r_{\text{P,eff}}$ ist also geringer als

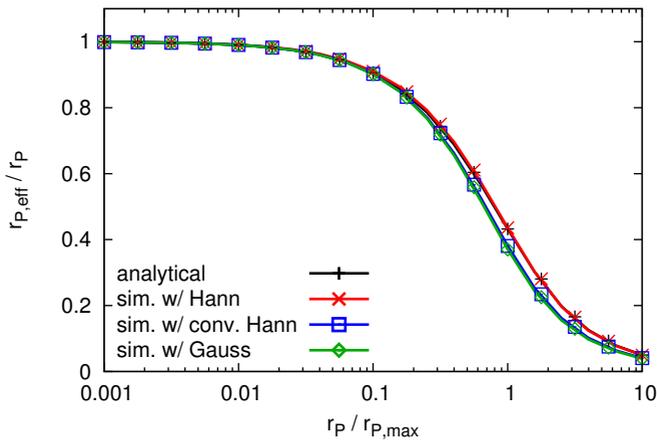


Abbildung 4.7: Absinken der relativen effektiven Partikelrate $r_{P,eff}/r_P$ nach Gleichung 4.11 (+-Symbole) verglichen mit Simulationen, welche die Hann-Funktion (x-Symbole), gefaltete Hann-Funktion (Quadrate), sowie die Gauß-Funktion verwenden (Rauten) in Abhängigkeit der normalisierten Partikelrate $r_P/r_{P,max}$. Die Ergebnisse für die Hann-Funktion stimmen sehr genau mit der Poissonstatistik überein. Für die gefaltete Hann-Funktion sowie die Gaußglocke ergeben sich leicht erhöhte Abweichungen.

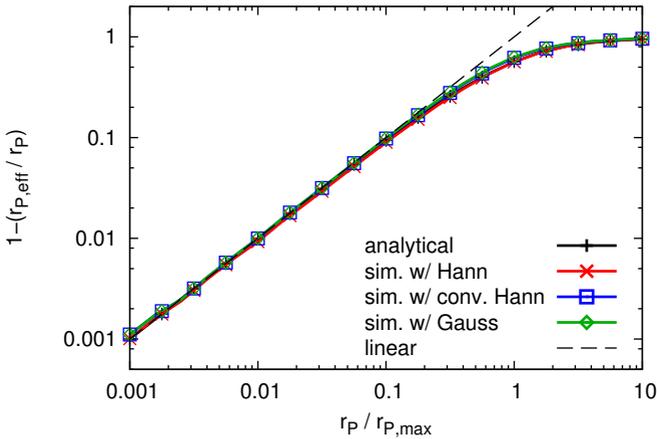


Abbildung 4.8: Aufgetragen ist die Differenz der effektiven Zählrate relativ zur Partikelrate aus Abbildung 4.7, also die relative Rate von nichtdetektierten Partikeln aufgrund von Pulsüberlagerung. Die gestrichelte Linie entspricht einem linearen Zusammenhang. Da bei geringen Zählraten die Wahrscheinlichkeit mehrfacher Pulsüberlagerungen sehr gering ist, stimmt der Verlauf für alle Pulsformen hier sehr gut mit der Theorie überein.

die tatsächliche Partikelrate r_P weil sich Partikel überlagern und nicht korrekt detektiert werden.

Das Ungleichheitszeichen in Gleichung 4.11 kommt folgendermaßen zustande: In Gleichung 4.11 wird der Fall berücksichtigt, dass sich n Partikel innerhalb eines Intervalls der Länge l_{res} befinden, wobei es für $n > 1$ zu $n - 1$ nicht detektierten Partikeln kommt. Wenn sich schon mindestens zwei Partikel im Intervall befinden kann der Fall auftreten dass ein Partikel, der sich außerhalb des betrachteten Intervalls befindet dennoch einen geringeren Abstand als l_{res} zu mindestens einem Partikel innerhalb des Intervalls aufweist. Dadurch treten zusätzliche, auf der rechten Seite von Gleichung 4.11 nicht berücksichtigte Fehler auf, die die effektive Partikelrate weiter reduzieren können. Wenn die Überlagerung der Pulse von zwei Partikeln jedoch schon eine geringe Wahrscheinlichkeit hat, ist anzunehmen, dass dieser zusätzliche Faktor einen geringen Einfluss hat.

Ein anderer Effekt, der auftreten kann ist, wenn sich die Ausläufer breiter Pulse, wie $h_{\text{res,Gauss}}$ oder $h_{\text{res,CHann}}$ überlagern und Einfluss auf das Signal außerhalb von l_{res} nehmen. Die Stärke dieses wird mittels Simulationen untersucht. Dazu wird ein Signal mit zufällig verteilten Pulsen einer gegebenen Form und einheitlicher Amplitude simuliert. Die Rate der Pulse r_P wird variiert und die detektierte Pulsrate in Relation zur tatsächlichen Pulsrate in Abbildung 4.7 aufgetragen. Hier zeigt sich im Fall von $h_{\text{res,Hann}}$ eine sehr gute Übereinstimmung mit der rechten Seite von Gleichung 4.11. Für $h_{\text{res,CHann}}$ und $h_{\text{res,Gauss}}$ treten leichte Abweichungen für höhere Partikelraten auf.

Um zu beurteilen, wie hoch die Abweichungen für geringe Partikelraten sind, wird in Abbildung 4.8 die Differenz zur erwarteten Partikelrate logarithmisch dargestellt. Hier zeigt sich, dass für geringe Partikelraten quasi keine Abweichung zwischen der Simulation und der rechten Seite von Gleichung 4.11 auftritt. Für Einsatzgebiete mit geringer Partikeldichte kann der Wert also verwendet werden.

Für eine höhere Partikeldichte gibt es ein erweitertes Modell, welches Gleichung 4.11 mit einem zusätzliche Parameter ausstattet [144], sowie ein von Keij et al. [145] mittels Simulationen erstelltes Modell, um die Differenzen zu berücksichtigen. Da die Differenzen für die verwendeten

Pulsformen relativ klein sind, wird jedoch das einfache Modell nach Gleichung 4.11 verwendet.

Analog zur effektiven Partikelrate kann die Rate von Einzeldetektionen definiert werden zu

$$r_{\text{P,single}} \leq r_{\text{P}} \cdot \frac{P_{\lambda}(1)}{\sum_{k=1}^{\infty} P_{\lambda}(k)}. \quad (4.12)$$

Diese Rate ist relevant, da die Amplituden bei Partikelüberlagerung verfälscht werden. Hier gilt das Ungleichheitszeichen wenn die erwähnten seltenen Randfälle auftreten.

Je nach Anwendung ist diskutabel, ob eine oder zwei Fehldetektionen vorliegen, wenn zwei sich überlagernde Pulse als ein Partikel mit höherer Amplitude gezählt werden. Im Falle des reinen Zählens von Partikeln wäre dies nur eine Fehldetektion. Wenn die Partikel jedoch anhand ihrer Amplitude auch noch klassifiziert werden sollen, wird das Ergebnis verfälscht. Die Rate überlagerter Pulsformen ist gegeben durch

$$r_{\text{P,multiple}} = r_{\text{P,eff}} - r_{\text{P,single}} \quad (4.13)$$

und kann bei der Systemauslegung entsprechend berücksichtigt werden.

4.2.9 Signalqualität

Für die Definition der Signalqualität ist die Qualität der Einzelnen Partikeldetektionen von Bedeutung. Deshalb wird nicht das mittlere Signal-zu-Rausch-Verhältnis (siehe Kapitel 2.3.2.6) verwendet, sondern das PSNR verwendet, welches sich als Verhältnis aus der mittleren Höhe der Signalspitze a_{E} zur vom Rauschen verursachten Standardabweichung σ_{E} definiert (siehe Kapitel 2.3.2.7). Um dies für das vorliegende Signal zu definieren wird der Spitzenwert des Pulses benötigt welcher sich aus den Gleichungen 4.1 und 4.2 zu

$$a_{\text{E}} = a_{\text{P}} \cdot c_{\text{E}} \cdot (h_{\text{P}} * h_{\text{E}})(t = 0) \quad (4.14)$$

ergibt. Hierbei gilt aufgrund von Gleichung 4.3 $a_{\text{E}} = a_{\text{P}}$. Die eigentliche Pulsform spielt also keine Rolle mehr.

Die vom additiven Rauschen in Gleichung 4.1 ausgelöste Standardabweichung σ_E im Signal u_E wird am einfachsten im Frequenzbereich berechnet. Durch die Faltung in Gleichung 4.2 ergibt sich ein Integral über das Rauschspektrum $N(f)$ des additiven Rauschens $n(t)$ und die Filterfunktion $H_E(f)$ des Signalfilters $h_E(t)$ zu

$$\sigma_E = \left(\int_{-\infty}^{\infty} |c_E \cdot H_E(f)|^2 \cdot E \left\{ |N(f)|^2 \right\} df \right)^{\frac{1}{2}}. \quad (4.15)$$

Auch hier geht der in Gleichung 4.3 bestimmte Skalierungsfaktor c_E ein.

Nun kann mit Gleichung 2.22 das PSNR berechnet werden

$$\text{PSNR} = \frac{a_E^2}{\sigma_E^2} \quad (4.16)$$

bzw. in Dezibel ausgedrückt

$$\text{PSNR}_{\text{dB}} = 10 \cdot \log_{10} \left(\frac{a_E^2}{\sigma_E^2} \right). \quad (4.17)$$

4.2.10 Rate der falsch negativen Detektionen

Aufgrund der Addition des Rauschens zu den von den Partikeln generierten Signalpulsen können diese in ihrer Höhe sowohl zunehmen als auch abnehmen, wodurch sie unter den Schwellwert $u_{\text{threshold}}$ fallen können. Dadurch würde ein vorhandener Partikel nicht detektiert und damit tritt eine falsch negative Detektion auf.

Bei bekannter Partikelposition folgt die Amplitudenverteilung zum Zeitpunkt, an dem der ungestörte Signalpuls sein Maximum hat, also einer Normalverteilung, da für das Störsignal eine Normalverteilung angenommen wird. Da hier jedoch Partikel über die lokalen Maxima im gestörten Signal detektiert werden, ist der Zeitpunkt des Maximums im ungestörten Signal unbekannt. Die Position des nächstgelegenen detektierten Maximums wird also von der eigentlichen Partikelposition leicht abweichen. Dadurch entsteht der Effekt, dass dieses verschobene Maximum im Mittel

auch einen höheren Wert annimmt. Also ergibt sich folgende Ungleichung für die Verteilungsfunktion der falsch negativen Detektionen

$$P(a_E < u_{\text{threshold}}) \lesssim \Phi\left(\frac{a_P - u_{\text{threshold}}}{\sigma_E}\right), \quad (4.18)$$

mit der detektierten Partikelamplitude a_E , dem Schwellwert $u_{\text{threshold}}$, der kumulativen Verteilungsfunktion der Normalverteilung Φ , der eigentlichen Partikelamplitude a_P , sowie der Standardabweichung des Rauschens σ_E .

Die Rate der falsch negativen Detektionen ist somit gegeben durch

$$r_{\text{FN,noise}} \lesssim r_{\text{P,single}} \cdot \Phi\left(\frac{a_P - u_{\text{threshold}}}{\sigma_E}\right). \quad (4.19)$$

Im Simulationsabschnitt 4.2.15 wird gezeigt, dass die Abweichung der Verteilungsfunktion der falsch negativen Detektionen von der Normalverteilung vernachlässigbar klein ist.

4.2.11 Rate der falsch positiven Detektionen

Um die Rate der falsch positiven Detektionen zu ermitteln, wird Referenz [137] gefolgt. Dort wird die Verteilungsdichtefunktion $p_m(\eta)$ der Maxima in einem Signal angegeben, wobei $\eta = a_E/\sigma_E$ die normalisierte Signalamplitude darstellt. Eine Integration ausgehend von einem Startwert u_0 ergibt die Wahrscheinlichkeit, dass ein zufällig ausgewähltes Maximum den Wert u_0 übersteigt. Also gilt

$$P_m(a_E \geq u_0) = \int_{u_0}^{\infty} p_m(a_E/\sigma_E) da_E. \quad (4.20)$$

Durch Integration ergibt sich

$$\begin{aligned}
 P_m(a_E \geq u_0) &= \frac{1}{2} \left(1 - \operatorname{erf} \left(\frac{u_0}{\sqrt{2} \cdot \epsilon \cdot \sigma_E} \right) \right) \\
 &\quad + \frac{1}{2} \sqrt{1 - \epsilon^2} e^{-\frac{1}{2} u_0^2 / \sigma_E^2} \\
 &\quad \times \left[\operatorname{erf} \left(\frac{u_0}{\sigma_E} \cdot \frac{\sqrt{1 - \epsilon^2}}{\sqrt{2} \epsilon} \right) + 1 \right]. \quad (4.21)
 \end{aligned}$$

Diese Funktion enthält neben dem Wert des Maximums a_E , dem Schwellwert u_0 und der Standardabweichung des Rauschsignals σ_E noch den Parameter ϵ . Der Wertebereich von ϵ beträgt $0 < \epsilon < 1$ und leitet sich aus der spektralen Verteilung des Rauschsignals her. Für $\epsilon = 0$ stellt sich eine Normalverteilung ein, die für steigende Werte von ϵ zunehmend deformiert und zu höheren Werten verschoben wird. Dies wird im folgenden Abschnitt näher behandelt.

Die Rate der falsch positiven Detektionen ist das Maß, welches für die Beurteilung der Detektionsqualität benötigt wird. Sie ergibt sich aus dem partikelfreien Signalanteil, der durchschnittlichen Rate von Maxima im Rauschsignal r_m sowie der in Gleichung 4.21 angegebenen Wahrscheinlichkeit über einem festgelegten Schwellwert $u_{\text{threshold}}$. Somit gilt

$$r_{\text{FP,noise}} = \left(1 - \frac{2 \cdot r_{\text{P,eff}}}{r_{\text{P,max}}} \right) \cdot r_m \cdot P_m(a_E \geq u_{\text{threshold}}). \quad (4.22)$$

Hierbei ergibt sich der Faktor $2 \cdot r_{\text{P,eff}}/r_{\text{P,max}}$ durch die Annahme, dass pro Partikel der Bereich, in dem falsch positive Detektionen stattfinden können, um $2 \cdot t_{\text{res}}$ reduziert wird.

4.2.12 Ermittlung des Bandbreitenparameters

Für die Bestimmung des in Gleichung 4.21 erforderlichen Bandbreitenparameters ϵ gibt es unterschiedliche Methoden. Eine Möglichkeit ist die

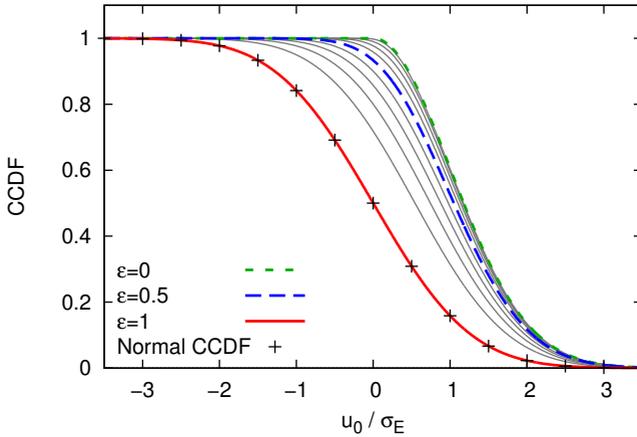


Abbildung 4.9: Wahrscheinlichkeit, dass ein Maximum oberhalb eines Schwellwertes u_0 liegt für verschiedene Werte von ϵ . Zum Vergleich die CCDF einer Normalverteilung (+).

Verwendung der spektralen Momente m_k , wodurch sich nach Referenz [137] folgende Gleichung ergibt

$$\epsilon = \sqrt{\frac{m_0 \cdot m_4 - m_2^2}{m_0 \cdot m_4}}. \quad (4.23)$$

Die zugehörigen spektralen Momente berechnen sich im Frequenzbereich für ein fouriertransformiertes Signal $U(f) = \mathcal{F}\{u(t)\}$ zu

$$m_k = \int_{-\infty}^{\infty} f^k \cdot \mathbb{E}\{|U(f)|^2\} df. \quad (4.24)$$

Für ein aufgenommenes Rauschsignal ist diese Methode jedoch nicht praktikabel, da bei m_4 das Rauschen bei hohen Frequenzen ein sehr hohes Gewicht erhält. Dadurch wirken sich kleine Fehler in der spektralen Schätzung sehr stark auf den Wert von ϵ aus. Nützlicher ist die alternative

Lösung über die Gesamtrate der Maxima r_m sowie die Rate der Maxima mit negativen Werten r_m^- , also lokale Maxima, die unterhalb der Null-Linie liegen. Hieraus berechnet sich nach Referenz [137] ϵ zu

$$\epsilon = \sqrt{1 - \left(1 - 2 \cdot \frac{r_m^-}{r_m}\right)^2}. \quad (4.25)$$

Für ein gegebenes aufgenommenes oder simuliertes Signal können also einfach Maxima gezählt werden, um daraus ϵ zu berechnen.

In Abbildung 4.9 wird Gleichung 4.21 für verschiedene Werte von ϵ gezeichnet. Hier lassen sich zwei Extreme identifizieren. Für $\epsilon = 1$ stimmt die Funktion mit der CCDF einer Normalverteilung überein. Für fallende Werte von ϵ verschiebt sich die Kurve hin zu höheren Werten und für $\epsilon = 0$ gibt es keine Maxima mit Werten kleiner als Null mehr. Man kann sich das korrespondierende Rauschen als bandpassgefiltert vorstellen. Ausgehend von einem breitbandigen flachen (weißen) Rauschspektrum für $\epsilon = 1$, bei dem die Maxima über alle Amplitudenwerte verteilt liegen, schränkt ein Bandpass bei steigendem Wert von ϵ zunehmend die Bandbreite um seine Mittenfrequenz herum ein. Bei $\epsilon = 0$ bleibt nur ein reiner Sinus übrig. Für tiefpassgefiltertes Rauschen ergeben sich also Werte zwischen 0 und 1, die anhand der spektralen Verteilung mit Gleichung 4.23 berechnet werden können.

Ein rechteckiges Rauschspektrum, welches zu einem mit einem idealen Tiefpass gefilterten weißem Rauschen korrespondiert, führt zu $\epsilon = 2/3$. Wird in einer numerischen Simulation weißes Rauschen innerhalb der betrachteten Bandbreite durch normalverteilte Zufallszahlen simuliert, so ergibt sich ein Wert von $\epsilon = 0.66136 \pm 0.00004$, was gering, aber dennoch signifikant vom erwarteten Wert von $2/3$ abweicht. Wiederholte Simulationen zeigen stets eine signifikante Abweichung. Dadurch, dass ϵ kleiner als erwartet ausfällt kann geschlossen werden, dass zu viele Maxima unterhalb der Nulllinie detektiert werden.

Der Unterschied zwischen der zeitdiskreten numerischen Simulation und der zugrundeliegenden Theorie liegt gerade in dieser zeitlichen Diskretisierung. Die Abtastwerte enthalten zwar die gesamte Information über ein bandbreitenbegrenztes Signal, sind jedoch lediglich die Stützstellen

des Signals. Das zeitkontinuierliche Signal besteht aus der Superposition der entsprechend verschobenen und skalierten zeitkontinuierlichen Sinc-Funktionen der einzelnen Stützstellen.

Es kann einfach veranschaulicht werden, dass eine Stützstelle nahe eines Maximums im zeitkontinuierlichen Signal immer einen niedrigeren Wert haben wird als das Maximum, wenn nicht beide zufällig exakt auf dieselbe Position fallen. Dadurch ergeben sich niedrigere Werte in der aus den Stützstellen direkt ermittelten Verteilung und folglich auch mehr Maxima unterhalb der Nulllinie.

Um dieses zeitkontinuierliche Signal simulativ besser anzunähern wird die Abtastrate des Signals um den Faktor 10 erhöht und mittels eines Sinc-Filters interpoliert. Die aus diesem Signal extrahierten Werte ergeben $\epsilon = 0.66678 \pm 0.00004$, was deutlich näher am erwarteten Wert liegt. Es ist also für die hier diskutierte Anwendung empfehlenswert bei zeitdiskreten Signalen, wie sie in Simulation und der Messung nach dem A/D-Wandler auftreten, die Abtastrate deutlich höher zu wählen als für die Repräsentation der Signale aufgrund ihrer Bandbreite eigentlich notwendig wäre.

Ein idealer Tiefpassfilter lässt sich in realen Systemen nicht umsetzen. Deshalb muss mit Filtern mit weicherer Filterkante gearbeitet werden. Dies führt zu höheren Werten von ϵ . Im Falle eines mittels eines Butterworth-Tiefpassfilters gefilterten Signales der Ordnung 1, 2, 4, 6, bzw. 10 ergibt sich ein Wert für ϵ von 0.90, 0.89, 0.76, 0.70 bzw. 0.68. Hierbei ist gut zu sehen, dass sich der Wert von ϵ ausgehend von einem hohen Wert für sehr weiche Filterkanten bei niedrigen Filterordnungen demjenigen für den idealen Tiefpass annähert je höher die Filterordnung und damit die Unterdrückung hoher Frequenzanteile wird.

4.2.13 Berücksichtigung mehrerer Partikeltypen

Die bisherigen Untersuchungen nehmen nur einen einzelnen Partikeltyp mit einer konstanten Amplitude a_P an. Eine einfache Methode für die Systemauslegung ist, die niedrigste Partikelamplitude für den gesamten Partikelstrom anzunehmen, was eine zu hohe Abschätzung der Rate der

falsch negativen Detektionen ergibt. Als konservative Abschätzung ist dies jedoch durchaus geeignet.

Um zu einer besseren Abschätzung zu gelangen können die Raten der falsch negativen Detektionen auch einzeln berücksichtigt werden. Dadurch wird Gleichung 4.19 folgendermaßen modifiziert

$$r_{\text{FN,noise}} \lesssim \sum_k P_{P,k} r_{P,\text{single}} \cdot \Phi\left(\frac{a_{P,k} - u_{\text{threshold}}}{\sigma_E}\right), \quad (4.26)$$

mit der Wahrscheinlichkeit $P_{P,k}$, dass ein Partikel die Amplitude $a_{P,k}$ aufweist, wobei gilt

$$P_{P,k} = \frac{r_{P,k}}{\sum_n r_{P,n}}, \quad (4.27)$$

mit der Partikelrate $r_{P,k}$ des Subtyps k .

Damit lassen sich nun allgemein die Raten der falsch negativen Detektionen berechnen. Für eine differenzierte Berechnung von einer Kostengleichung kann Gleichung 4.26 dahingehend modifiziert werden, dass jedem Partikeltyp vor der Summierung noch mit einem eigenen Kostenfaktor gewichtet wird.

Nach diesen theoretischen Betrachtungen soll nun die Überprüfung der aufgenommenen Messdaten erfolgen.

4.2.14 Analyse der Verteilung der Maxima in der Messung

Nach Gleichung 4.25 wird ϵ aus der Rate der Maxima r_m sowie die Rate der Maxima mit negativen Werten r_m^- berechnet. Für das gefilterte Messsignal betragen diese Werte $r_m = 316.89 \text{ s}^{-1}$ und $r_m^- = 66.82 \text{ s}^{-1}$. Daraus kann nach Gleichung 4.25 der Wert von $\epsilon = 0.82$ für das gefilterte Messsignal berechnet werden. Für das ungefilterte Messsignal wird analog $\epsilon = 0.72$ ermittelt. Das mit dem Butterworth-Tiefpass vierter Ordnung gefilterte Signal weist ein $\epsilon = 0.76$ auf und liegt damit relativ nahe am Messsignal.

Zusätzlich wird in Gleichung 4.22 die Standardabweichung des gefilterten Signals benötigt. Sie beträgt $\sigma_E = 5.87 \cdot 10^{-4}$.

In Kapitel 4.1.3 wurde gezeigt, dass die Verteilung der Amplituden wie erwartet einer Normalverteilung folgt. Nun wird mithilfe der extrahierten Werte die Verteilung der Maxima berechnet und mit dem Experiment verglichen. Hierzu wird die CCDF der Maxima des gefilterten Rauschens aus dem Experiment, sowie die nach Gleichung 4.22 berechnete Verteilung in Abbildung 4.3 eingezeichnet.

Auch hier ergibt sich wie schon bei der Verteilung der Amplituden eine sehr gute Übereinstimmung über mehrere Größenordnungen. Die theoretisch hergeleitete Verteilungsfunktion entspricht also sehr gut der Realität.

4.2.15 Analyse der Verteilung der falsch negativen Detektionen

Eine Überprüfung der Rate der falsch negativen Detektionen für die eingesetzten Pulsformen kann nicht direkt anhand der aufgenommenen Messdaten vorgenommen werden, da die Partikel zufällig verteilt ankommen und keine Referenzmessung vorliegt. Als Alternative wird durch numerische Simulation ein geordneter Partikelstrom mit den entsprechenden Pulsformen nachgebildet. Hier kann der Einfluss von additivem Rauschen simuliert werden.

Hierfür werden in einer Simulation die Pulsformen mit additivem Rauschen überlagert und die Abhängigkeit der Rate der falsch negativen Detektionen wird in Abhängigkeit des Schwellwertes ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.10 dargestellt. Die Pulsform hat keinen merklichen Einfluss auf die Rate der falsch negativen Detektionen und es besteht eine sehr gute Übereinstimmung mit Gleichung 4.19.

4.2.16 Wahl des optimalen Schwellwertes

Da der Schwellwert die Rate der falsch positiven Detektionen und falsch negativen Detektionen gleichzeitig beeinflusst, können diese nicht einfach

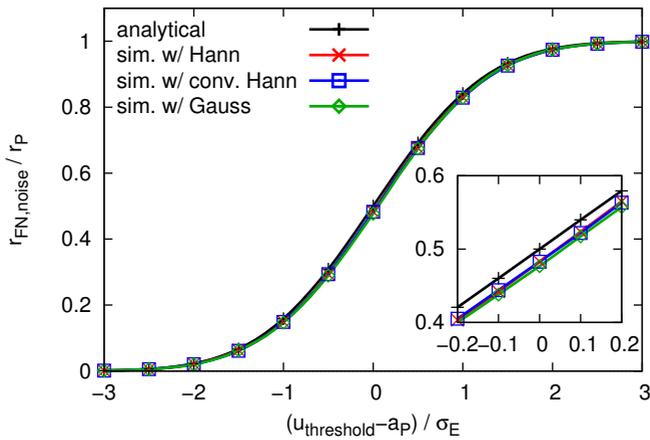


Abbildung 4.10: Rate der falsch negativen Detektionen nach Gleichung 4.19 (+-Symbole) verglichen mit Simulationen der anderen Pulsformen, welche die Hann-Funktion (x-Symbole), gefaltete Hann-Funktion (Quadrate), sowie die Gauß-Funktion (Rauten) verwenden.

getrennt betrachtet werden. Um die Rate von falsch positiven Detektionen zu reduzieren kann der Schwellwert erhöht werden. Dies erhöht jedoch die Rate der falsch negativen Detektionen. Um dies zu analysieren, wird die Rate der falsch negativen Detektionen und der falsch positiven Detektionen nach den Gleichungen 4.22 und 4.19 berechnet und in Abbildung 4.11 dargestellt. Während die Rate der falsch negativen Detektionen mit sehr guter Näherung einer Normalverteilung folgen, hängt die Verteilungsfunktion der falsch positiven Detektionen auch von weiteren Parametern ab. Bei der Berechnung der falsch positiven Detektionen wird weißes Rauschen, das mit einem Butterworth-Tiefpass-Filter 4ter Ordnung gefiltert wurde, angenommen. Aus den spektralen Momenten des gefilterten Rauschens ergibt sich nach Gleichung 4.23 ein Wert von $\epsilon = 0.76$. Die Rate der Maxima hängt von der Grenzfrequenz des Filters f_g ab und beträgt hier $r_m = 0.50 \cdot f_g$. Die maximale Partikelrate hängt von der Systembandbreite und der Pulsform ab und liegt idealerweise nahe an der Grenzfrequenz des Rauschens im gefilterten Signal. Vergleiche hierzu die Auflösung der gefalteten Hann-Pulse in Kapitel 4.2.4, welche um lediglich 13% größer als die Auflösung der einzelnen Hann-Pulse ist.

Bei den Abbildung 4.11 dargestellten normalisierten Fehlerraten ist zu sehen, dass für ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis von z.B. 30 dB die Fehlerraten zur Mitte des dargestellten Bereichs hin steil abfallen und damit ein weiter Bereich zwischen $0.2 \cdot a_P$ und $0.8 \cdot a_P$ für den Schwellwert mit geringen Fehlerraten kleiner 10^{-6} existiert. Die Wahl des Schwellwertes bei der Hälfte der Partikelamplitude ist in diesem Fall generell sinnvoll, da hier sowohl die Rate von falsch positiven Detektionen und falsch negativen Detektionen gering ist.

Würde für die Verteilungsfunktion der falsch positiven Detektionen ebenfalls eine Normalverteilung vorliegen, dann würden sich die Kurven stets bei $0.5 \cdot a_P$ kreuzen. Durch die geänderte Verteilungsfunktion der Maxima nach Gleichung 4.22 jedoch ist dies nicht der Fall. Für ein PSNR von 20 dB kreuzen sich die Kurven innerhalb des dargestellten Bereichs. Für ein geringeres steigt der Kreuzungspunkt weiter an.

Um die Fehlerraten für eine bestimmte Anwendung zu bestimmen sind konkrete Zahlen für die Rate der Maxima durch Rauschen r_m sowie die

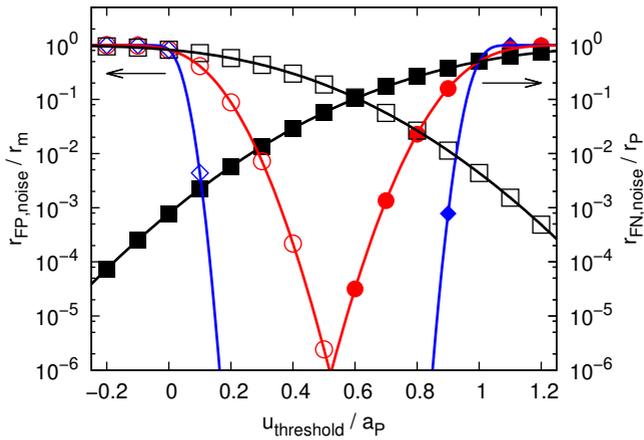


Abbildung 4.11: Einfluss des Schwellwertes auf die Rate der falsch positiven Detektionen (offene Symbole, linke Achse) nach Gleichung 4.22 sowie der falsch negativen Detektionen (gefüllte Symbole, rechte Achse) nach Gleichung 4.19 für PSNR-Werte von 10 dB (Quadrate), 20 dB (Kreise) und 30 dB (Rauten).

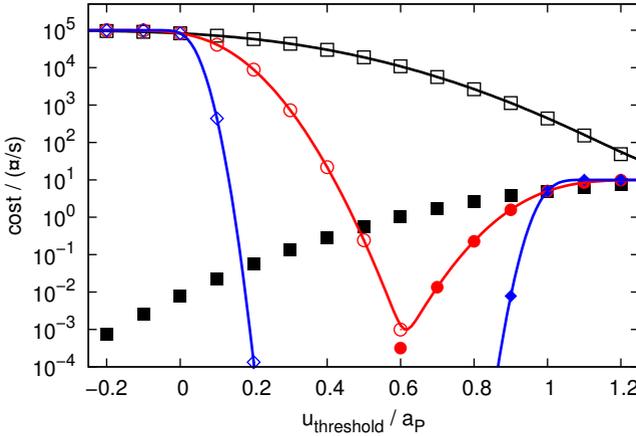


Abbildung 4.12: Einfluss des Schwellwertes auf die Kostenfunktion der falsch positiven Detektionen (offene Symbole, linke Achse) nach Gleichung 4.22 sowie falsch negativen Detektionen (gefüllte Symbole, rechte Achse) nach Gleichung 4.19 für PSNR-Werte von 10 dB (Quadrate), 20 dB (Kreise) und 30 dB (Rauten). Die Kurve zeigt jeweils die Gesamtkostenrate für den entsprechenden PSNR-Wert unter der Annahme der Kosten von $100 \square$ für eine falsch positive Detektion und $1 \square$ für eine falsch negative Detektion, einer Rate von Maxima im Rauschsignal von $r_m = 1000 \text{ s}^{-1}$ und einer Partikelrate von $r_p = 0.01 \cdot r_m$.

Partikelrate r_P notwendig, mit der die berechnete Verteilungsfunktion multipliziert werden muss. Hierbei ergibt sich aufgrund der notwendigen Bandbreite für die Partikelmessungen für die Rate der Maxima im Rauschen generell $r_m > r_P$. Dadurch, dass Partikelinterferenz bei ungeordnetem Partikelstrom vermieden werden soll, gilt $r_m \gg r_P$. Durch die Gewichtung der Verteilungsfunktion mit den Raten r_P und r_m ergeben sich die Raten $r_{FN,noise}$ und $r_{FP,noise}$. Diesen Raten werden wiederum Kostenfaktoren c_{FN} bzw. c_{FP} zugeordnet, da das Auftreten von falsch positiven Detektionen und falsch negativen Detektionen je nach Anwendung unterschiedliche Bedeutung haben.

Als Beispiel wird ein System für die Detektion von relativ selten auftretenden Fluoreszenzpartikeln angenommen. Die maximale Zählrate soll 1000 Partikel pro Sekunde betragen, wodurch sich ebenfalls näherungsweise $r_m = 1000 \text{ s}^{-1}$ ergibt. Durch die Vorgabe einer geringen Partikelrate ergibt sich beispielsweise $r_P = 0.01 \cdot r_m$, wodurch Partikelinterferenzen sehr selten vorkommen (siehe Abbildung 4.7 und 4.8). Da bei selten auftretenden Ereignissen die zugehörigen Kosten falsch positiver generell höher bewertet werden, wird $c_{FP} = 100 \text{ } \sphericalangle$ hundertfach höher als $c_{FN} = 1 \text{ } \sphericalangle$ gewählt. Für diese (hier beliebig) angenommenen Werte ergibt sich der in Abbildung 4.12 dargestellte Verlauf. Im Gegensatz zu Abbildung 4.11 kann hier eine gesamte Kostenrate (durchgezogene Kurve) für beide Fehlerarten dargestellt werden. Die Kostenrate stellt eine Gewichtung der falsch positiven Detektionen und falsch negativen Detektionen dar und bietet nun einen einzelnen Gütefaktor, der jetzt durch Wahl von $u_{\text{threshold}}$ minimiert werden kann.

Die Ergebnisse für die unterschiedlichen Signal-zu-Rausch-Verhältnisse sehen sehr unterschiedlich aus. Für ein PSNR von 10 dB liegt das Optimum deutlich oberhalb der Partikelamplitude. Es lässt sich damit also kein zuverlässiges System realisieren. Für ein PSNR von 20 dB liegt der das Minimum bei $0.6 \cdot a_P$ und es existiert hier ein deutlich ausgeprägtes Minimum in der Kurve der Gesamtkostenrate. Für ein PSNR von 30 dB ergibt sich im Vergleich zum PSNR von 20 dB eine geringere Kostenrate als $10^{-4} \text{ } \sphericalangle$ im gesamten Bereich zwischen $0.2 \cdot a_P$ und $0.85 \cdot a_P$. Dies zeigt, dass für ein System mit ausreichend hohem PSNR die Wahl des Schwellwertes bei $0.5 \cdot a_P$ eine gute Wahl darstellt. Bei geringen PSNR-Werten bringt jedoch eine Optimierung des Schwellwertes deutliche Vorteile.

4.2.17 Einfluss der Bandbreite des Rauschens

Die Bandbreite des Rauschens nach der Signalfilterung hat einen linearen Einfluss auf die Rate der falsch positiven Detektionen über den Faktor r_m in Gleichung 4.22. Wird beispielsweise ein Signal zeitlich auf die Hälfte gestaucht ($s'(t) = s(2t)$) erhöht sich die Bandbreite auf das Doppelte, die Amplitudenverteilung und somit die Anzahl und Werte der Maxima bleiben jedoch identisch. Da die Signallänge halbiert wurde verdoppelt sich somit die Rate der Maxima. Diese Überlegung alleine zeigt schon, dass die Bandbreite des Rauschens minimiert werden sollte. Beim ungefilterten Signal ist dies nicht möglich, da beispielsweise durch Schrotrauschen des Detektors weißes Rauschen erzeugt wird. Die Systembandbreite muss so groß gewählt werden, dass die zeitliche Auflösung des Systems für die Reproduktion der Auflösungspulse ausreicht, also gilt $f_g > 1 \cdot t_{\text{res}}^{-1}$. Eine flexiblere Wahl ist, ein breitbandiges System für die Digitalisierung der Signale einzusetzen, z.B. mit $f_g = 10 \cdot t_{\text{res}}^{-1}$ und dann ein digitales Filter auf das Signal anzuwenden.

Um diese Konstellationen zu beurteilen, wird eine Simulation vorgenommen. Es werden $5 \cdot 10^4$ Pulse mit $h_P = h_{\text{res,Hann}}$ und einem Abstand von $4 \cdot l_{\text{res}}$ erzeugt, um ein interferenzfreies Signal zu erhalten. Hiermit werden die Effekte der falschen positiven Detektionen sowohl an den Pulsspitzen, Pulsflanken als auch zwischen den Signalpulsen untersucht. (Vergleiche hierzu das verrauschte Signal in Abbildung 4.2.) Um den Einfluss der Rauschamplituden zu berücksichtigen, werden die Simulationen sowohl für ein PSNR von 20 dB, als auch für ein PSNR von 30 dB, durchgeführt.

Die Ergebnisse der Simulation sind in Abbildung 4.13a dargestellt. Wie erwartet erhöht sich die Rate der Maxima mit Werten nahe Null bei der Erhöhung der Bandbreite des Rauschens von $f_g = 1 \cdot t_{\text{res}}^{-1}$ auf $f_g = 10 \cdot t_{\text{res}}^{-1}$ deutlich, es treten also zwischen den Signalpulsen deutlich mehr Maxima auf, sowohl für das niedrige, als auch für das hohe Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Beim hohen Signal-zu-Rausch-Verhältnis sind diese lediglich schärfer um den Nullpunkt fokussiert. Die Maxima um den Nullpunkt sind kein wesentliches Problem für die Partikeldetektion. Wesentlich gravierender ist jedoch der Effekt, dass selbst beim hohen Signal-zu-Rausch-Verhältnis zusätzliche Maxima an den Pulsflanken entstehen und sich bis

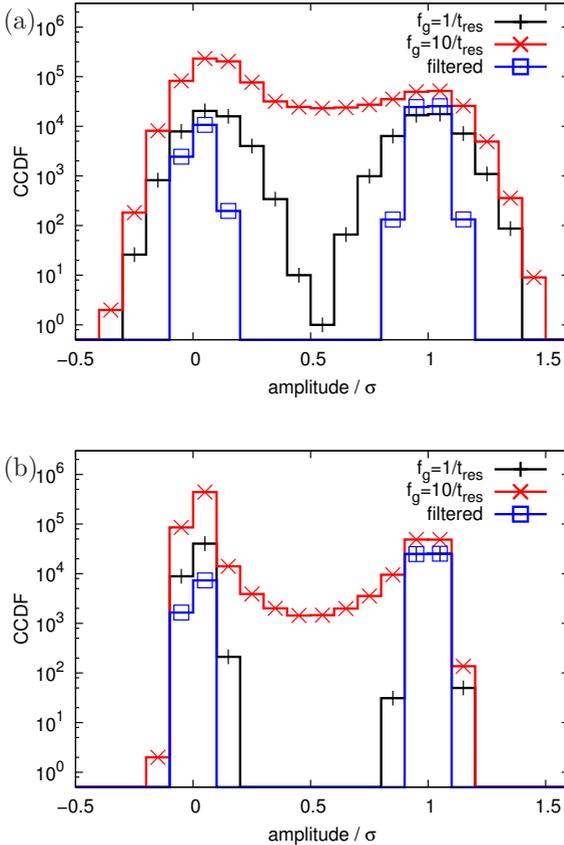


Abbildung 4.13: Histogramme der detektierten Amplituden bei unterschiedlichen Bandbreiten f_g des Rauschens und einem PSNR von 20 dB in a) bzw. 30 dB in b). Für niederfrequentes Rauschen (+-Symbole), breitbandiges Rauschen (x-Symbole), sowie breitbandiges Rauschen, jedoch mit Filterung (Quadrate).

zur eigentlichen Partikelamplitude erstrecken. Wenn das Signal am Detektionsalgorithmus breitbandiges Rauschen enthält ist also keine zuverlässige Detektion möglich. Wird die Rauschbandbreite jedoch in den Bereich der durch die Partikel erzeugten Frequenzen auf $f_g = 1 \cdot t_{\text{res}}^{-1}$ verringert, dann verschwinden diese zusätzlichen Maxima an der Pulsflanke für beide Signal-zu-Rausch-Verhältnisse. Dies zeigt, dass die Maxima an den Pulsflanken kein Problem darstellen solange die Bandbreite des Rauschens gering ist.

Um die Effekte der zusätzlichen Signalfilterung zu simulieren, wird auf das für die Partikeldetektion ungeeignete Signal mit $f_g = 10 \cdot t_{\text{res}}^{-1}$ ein *Matched-Filter* mit $h_E = h_P$ angewendet. Dieses Filter reduziert die Bandbreite des Rauschens. Durch die Unterdrückung des hochfrequenten Rauschens erhöht sich das PSNR um 8.8 dB. Zusätzlich ändert sich die Pulsform nach der Filterung von $h_P = h_{\text{res,Hann}}$ zu $h_P * h_E = h_{\text{res,CHann}}$. Dadurch wird die räumliche Auflösung und folglich die maximal zählbare Partikelrate um etwa 14% reduziert. In Abbildung 4.13a ändert sich das Histogramm durch die zusätzliche Filterung dramatisch und ist vergleichbar mit dem Histogramm mit niedriger Rauschbandbreite in Abbildung 4.13b. Die $5 \cdot 10^4$ Pulse der Simulation wurden dabei alle korrekt detektiert und es treten keine zusätzlichen Maxima höher als $0.5 \cdot a_P$ auf. Die mittlere detektierte Amplitude beträgt $1.0005 \cdot a_P$ und ist damit nur sehr geringfügig gegenüber dem korrekten Wert erhöht.

Damit ist nachgewiesen, dass eine Filterung des Signals ein essentieller Bestandteil des Detektionssystems ist und den maximalen Partikeldurchsatz nur geringfügig verringert.

4.2.18 Vergleich mit Zwei-Kanal-Detektion

Ein grundlegender Aspekt der eingesetzten Detektionsmethode ist, dass nur ein einzelner Signalkanal zu Verfügung steht. Dadurch müssen sowohl die Präsenz als auch die Amplitude eines Partikels gleichzeitig detektiert werden, wodurch sich die Statistik im Vergleich zu einer Methode mit bekannten Partikelpositionen ändert. Dadurch, dass nicht der Signalwert zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessen wird, sondern das nächstliegende

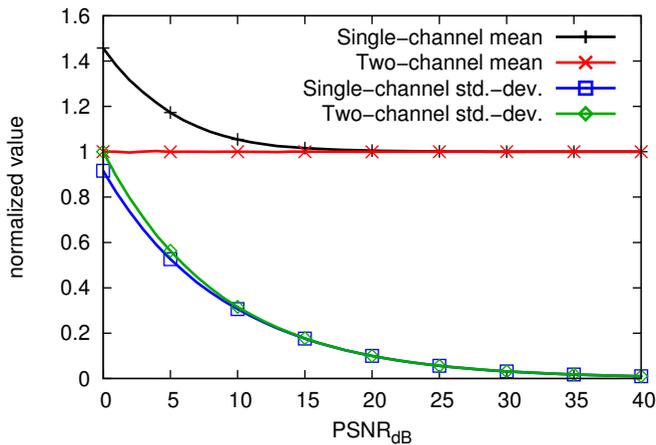


Abbildung 4.14: Vergleich der statistischen Parameter bei Einzelkanal- detektion aus lokalen Maxima mit Zweikanal- detektion mit exakt vorgegebenem Zeitwert. Der Mittelwert bei Einzelkanal- detektion (+-Symbole) weist unterhalb eines PSNR von 15 dB eine Abweichung zu positiveren Werten auf, während dies bei der Zweikanal- detektion (x-Symbole) nicht auftritt. Die Standardabweichung der beiden Methoden (Quadrate und Rauten) haben einen ähnlichen Verlauf.

Maximum, hat das additive Rauschen im Mittel den Effekt, dass die gemessene Amplitude höher ist als die durch den Partikel erzeugte.

Um diesen Effekt zu beurteilen wird ein Signal mit tiefpassgefiltertem Rauschen von $f_g = 10 \cdot t_{\text{res}}^{-1}$ sowie nicht-überlappenden äquidistanten Pulsen simuliert. Vor der Detektion wird das Signal wie im vorherigen Kapitel mit $h_E = h_P = h_{\text{res, Hann}}$ tiefpassgefiltert. Hier wird jedoch das PSNR von 0 dB bis 40 dB variiert und nur die Maxima berücksichtigt, die dem erzeugten Puls am nächsten liegen. Hierdurch werden die falsch positiven Detektionen von der Auswertung ausgeschlossen. Aus den verbleibenden Amplituden wird sowohl der Mittelwert als auch die Standardabweichung ermittelt und in Abbildung 4.14 aufgetragen. Zum Vergleich enthält Abbildung 4.14 noch die an den exakten Partikelpositionen ermittelten Werte, was einer Detektion mit einem zweiten Kanal für die Triggerung entspricht. Wie erwartet ändert das mittelwertfreie Rauschen die gemittelten Amplitudenwerte an exakter Partikelposition nicht und die Standardabweichung der Messwerte entspricht der Standardabweichung des Rauschens.

Im Gegensatz dazu weisen beim Ein-Kanal-System die mittleren gemessenen Amplituden bei geringen PSNR-Werten eine deutliche Tendenz zu höheren Werten auf. Die Standardabweichung der gemessenen Werte wird gleichzeitig etwas geringer, da die Verteilung der Maxima eine geringere Standardabweichung besitzt als das zugrundeliegende Signal.

Der Mittelwert der Amplituden ist bei 0 dB etwas höher als $1.4 \cdot a_P$ und nähert sich für höhere PSNR-Werte schnell an a_P an. Dies kann gut begründet werden. Durch die Filterung sowohl des Partikelsignals als auch des Rauschens erhalten beide Signale etwa dieselbe Bandbreite. Ähnlich zur Addition zweier Zufallssignale mit gleicher Leistung ist eine Erhöhung der mittleren Amplitude mit der Wurzel der Summe der quadrierten Standardabweichungen zu erwarten. Bei 0 dB ergibt sich also der Faktor $\sqrt{2}$. Als Abschätzung für die durch Rauschen erzeugte Erhöhung der gemessenen Amplituden kann also die Leistung des Rauschens herangezogen werden. Dies erklärt auch, warum die Abweichung bei einem PSNR von 10 dB nur noch unwesentlich ist, obwohl die Signalqualität wie in Abbildung 4.11 dargestellt nicht für eine zuverlässige Detektion ausreichend ist. Bei

einem PSNR von 20 dB, welches für eine gute Partikeldetektion geeignet ist, tritt nur noch eine geringe Abweichung auf.

Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Hinzuziehung eines zweiten Signalkanals für die exakte Messung der Partikelamplituden hinsichtlich der Genauigkeit der gemessenen Amplituden nur geringe Vorteile bietet.

Es sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass ein zweiter Signalkanal bei der Reduktion der falsch positiven Detektionen durchaus Vorteile bietet. Für die im Experiment vorhandenen Signale kann der Vergleich der CCDFs der Signalwerte des gefilterten Signals sowie der Maxima des gefilterten Signals in Abbildung 4.3 herangezogen werden. In der Abbildung ist deutlich zu sehen, dass die komplementäre Verteilungsfunktion der Maxima etwas zu höheren Werten verschoben ist, was sich durch eine höhere Rate von falsch positiven Erkennungen äußert. Diese Überlegungen sind jedoch nur für niedrige PSNR-Werte unterhalb von 20 dB überhaupt sinnvoll. Um bei den in Abbildung 4.12 dargestellten Konfigurationen dieselben Kostenraten zu erreichen sind mit dem Zwei-Kanal-System anstatt einem PSNR von 20 dB dann 19.7 dB und anstatt 10 dB dann 9.1 dB notwendig. Diese Verbesserungen unterhalb von 1 dB sind gering und können nur erreicht werden wenn die Partikelpositionen durch das zusätzliche Messsignal hinreichend genau bekannt sind. Deshalb bietet die Zusammenführung unterschiedlicher Detektionsmechanismen nur geringe Vorteile, schränkt jedoch die Flexibilität des Systemdesigns deutlich ein und bringt zusätzliche Komplexität mit sich. Deshalb ist eine Ein-Kanal-Detektion grundsätzlich vorzuziehen.

Ein weiterer Aspekt der in Abbildung 4.14 dargestellten Kurvenverläufe ist der Zusammenhang zwischen PSNR und CV. Für die Detektion mit zwei Signalkanälen ergibt sich bei den extrahierten Messwerten derselbe Mittelwert und dieselbe Standardabweichung wie im Messsignal. Dies bedeutet, dass dabei $CV = PSNR^{-1}$ gilt. Für die Signaldetektion aus einem Signalkanal erhöht sich der Mittelwert und die Standardabweichung verringert sich bei geringen PSNR-Werten. Deshalb fällt der CV hier geringer aus und es gilt $CV \leq PSNR^{-1}$. Für gute PSNR-Werte über etwa 15 dB kann dies jedoch vernachlässigt werden.

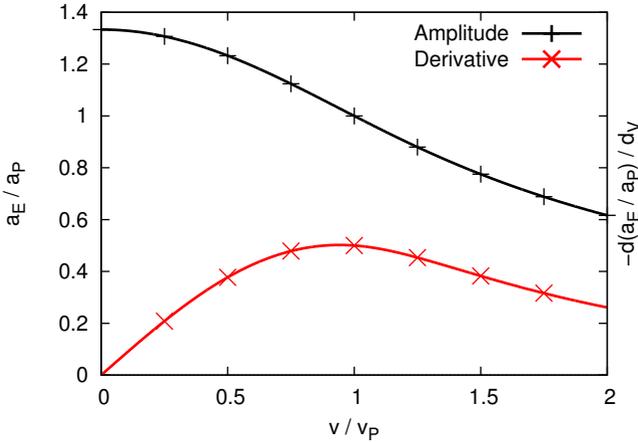


Abbildung 4.15: Relative Änderung der detektierten Partikelamplitude a_E/a_P (+-Symbole) abhängig von der relativen Partikelgeschwindigkeit v/v_P . Zusätzlich ist die Ableitung dieser Kurve eingezeichnet (x-Symbole).

4.2.19 Einfluss von Geschwindigkeitsvariation

Die Annahme derselben konstanten Geschwindigkeit für alle Partikel, welche den statistischen Betrachtungen zugrunde liegt, ist in der Realität nicht erfüllt. Im Laminarfluss treten Geschwindigkeiten von nahezu Null an der Kanalwand bis hin zum doppelten der mittleren Geschwindigkeit in der Kanalmitte auf. Durch Fokussierung der Partikel in einen eingeschränkten Bereich kann diese Variation verringert werden, jedoch lässt sie sich nie völlig beseitigen. Im vorliegenden Mikrofluidiksystem wurde beispielsweise ein Variationskoeffizient der Geschwindigkeiten von 3.1% ermittelt (siehe Kapitel 3.4.1).

Im gemessenen Zeitsignal wirkt sich eine Variation der Geschwindigkeit als Variation der Pulsbreite aus. Für die Berechnung wird eine Pulsform des Signalfilters von $h_E(t) = h_{\text{res,Hann}}(t)$, sowie einer Pulsform des Partikels von $h(t) = h_{\text{res,Hann}}(t \cdot v/v_P)$ mit der variierten Partikelgeschwindigkeit v angenommen. Die Variation der Geschwindigkeit wird analog zu den

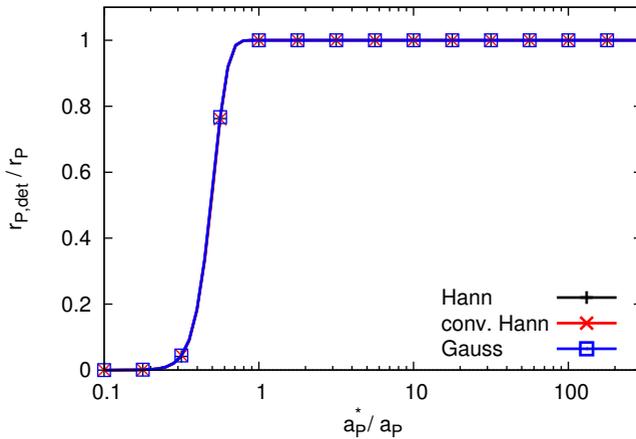


Abbildung 4.16: Rate der Partikeldetektionen bei Amplitudenvariation für die Pulsformen Hann-Funktion (+-Symbole), gefaltete Hann-Funktion (x-Symbole), sowie die Gauß-Funktion (\square -Symbole). Für Partikelamplituden $a_P^* > a_P$ größer als beim Systementwurf vorgesehen treten keine zusätzlichen falsch positive Detektionen an den Pulsflanken auf.

im Laminarfluss auftretenden Extremwerten im Bereich von Null bis zur doppelten des Sollwertes v_P angenommen. Die Änderung der resultierenden Pulshöhe nach der Signalfilterung ist in Abbildung 4.15 aufgetragen. Für die Beurteilung des Einflusses einer geringen Geschwindigkeitsvariation auf die gemessenen Amplituden ist die Ableitung der Pulshöhen im Bereich um $v/v_P = 1$ interessant. Dort beträgt sie etwa 0.5, was bedeutet, dass sich der Variationskoeffizient der Geschwindigkeit von 3.1 % in einen Beitrag zum Variationskoeffizient der Amplituden von 1.6 % auswirkt.

4.2.20 Falsch positive Detektionen an Partikelflanken

Die Rate der falsch positiven Detektionen in Gleichung 4.22 ist von den Partikelamplituden nicht direkt betroffen. Jedoch kann es bei ungünstiger

Pulsform dazu kommen, dass zusätzliche Maxima detektiert werden. Um dies zu untersuchen wird die Simulation ausgehend von der in Kapitel 4.2.17 besprochenen Konfiguration mit PSNR = 20 dB und $f_g = t_{\text{res}}^{-1}$, deren Histogramm in Abbildung 4.13a dargestellt ist, erweitert. Es werden für Vergleiche die Pulsformen $h_{\text{res,Hann}}$, $h_{\text{res,CHann}}$ und $h_{\text{res,Gauss}}$ verwendet. Die verwendete Partikelamplitude a_p^* wird gegenüber der Ursprungsconfiguration skaliert. In Abbildung 4.16 wird die relative detektierte Partikelrate von Maxima über $u_{\text{threshold}} = 0.5 \cdot a_p$ gegenüber der relativen Partikelamplitude aufgetragen. Für die ersteren drei Pulsformen ergibt sich, dass für Partikelamplituden $a_p^* > a_p$ die detektierte Partikelrate konstant bleibt. Es treten also nur vernachlässigbar wenige zusätzliche Maxima an den Pulsflanken auf. Dies kann dadurch einfach erklärt werden, dass die relative Steigung der Pulsformen $(dh_{\text{res}}(t)) / (dt \cdot h_{\text{res}}(t))$ für kleine Werte von $h_{\text{res}}(t)$ groß ist. Dies bedeutet, dass die Steilheit der Pulsflanken im Bereich des Schwellwerts $u_{\text{threshold}}$ zunimmt wenn der Spitzenwert a_p^* zunimmt. Dadurch, dass die Kurve im Bereich des Schwellwertes steil ist, kann das Rauschen hier keine zusätzlichen Maxima erzeugen. Mit solchen Pulsformen besteht also kein Problem bei der Detektion von Partikeln, die eine um Größenordnungen höhere Amplitude als vorgesehen haben.

4.3 Vergleich mit dem Experiment

Im Folgenden werden die Messergebnisse aus Kapitel 3 genauer analysiert und mit der theoretisch erwarteten Signalstatistik verglichen. Hierzu muss zuerst der Einfluss der Degradation des Blaufilters kompensiert werden, da sich hierdurch die Amplituden im Verlauf der Messung leicht ändern. Danach wird untersucht, welche Einflüsse unterschiedliche Methoden der Signalfilterung auf das Histogramm haben. Hierauf folgend werden die erwarteten Histogramme mit den gemessenen Histogrammen verglichen und die Effekte der reduzierten Flussrate diskutiert.

4.3.1 Degradation des Blaufilters

Die Degradation des Blaufilters äußert sich in einem Anstieg der gemessenen Partikelamplitude. Für die Messdaten wird aufgrund der Degradation des Filters eine Rate für die Erhöhung der Partikelamplitude von $1.03 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ermittelt. Diese Änderung der Amplituden führt im Histogramm zu einer Verbreiterung der Verteilungen insbesondere bei Partikeln mit hoher Amplitude. Deshalb wird das Messsignal entsprechend zeitabhängig skaliert mit

$$u_{\text{comp}}(t) = \frac{u(t)}{1 + t \cdot 1.03 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}}$$

um die Degradationseffekte zu kompensieren. Da die Rauschmessungen nicht zeitgleich mit den Partikelmessungen durchgeführt wurden, sondern im Anschluss, wird der aus den Rauschmessungen ermittelte Wert für σ_E um 6% für die Partikelmessungen verringert. Um diese Effekte zu minimieren empfiehlt sich eine Verkürzung der Messdauer bzw. der Einsatz eines besseren Filters.

4.3.2 Einfluss der Signalfilterung auf das Histogramm

Für die Histogramme der gemessenen Partikelamplituden, dargestellt in den Abbildungen 4.17 und 4.19, wird eine logarithmische Skala nicht nur wie üblich für die Amplituden, sondern auch für die Zählraten gewählt. Diese Achsskalierung wird gewählt, damit sowohl große als auch kleine Zahlenbereiche wie beispielsweise einzelne Zählereignisse dargestellt werden können. Der in Abbildung 4.17 sichtbare Abfall der Kurve für kleine Amplitudenwerte (kleiner als 10^{-2}) ist ein Artefakt, das aus der logarithmischen Amplitudenskalierung entsteht. Es handelt sich hierbei um Rauschen, dessen Amplituden näherungsweise um den Nullpunkt normalverteilt sind. Die Verschiebung der Maxima zu positiven Amplitudenwerten verstärkt diesen Effekt zwar, ist aber nicht ausschlaggebend. Dadurch, dass die Intervalle für kleine Amplitudenwerte auch kleiner werden, nimmt die Zählrate ab. Dies erklärt den Abfall der Kurve links von 10^{-2} . Das Maximum könnte ohne dieses Wissen als Partikelsorte mit der Amplitude

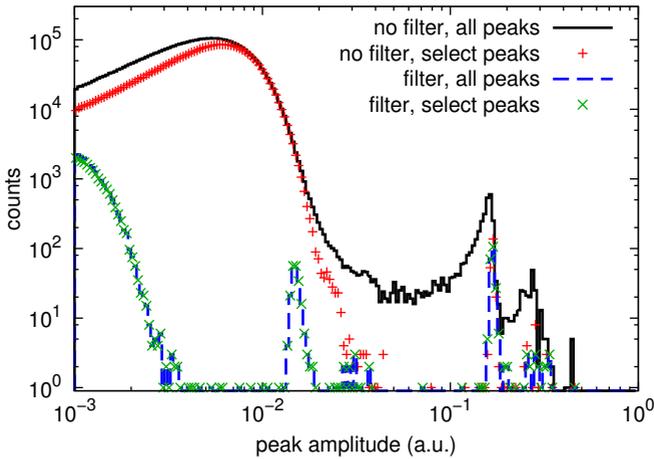


Abbildung 4.17: Histogramm der lokalen Maxima des Messsignals vor der Filterung (durchgezogene Linie), sowie nach der Filterung (gestrichelte Linie). Durch eine zusätzliche Auswahlregel werden einzelne Maxima im ungefilterten Signal (+-Symbole), sowie im gefilterten Signal (x-Symbole) ausgewählt, wodurch sich im Fall des ungefilterten Signals für hohe Amplitudenwerte eine deutliche Verbesserung erzielen lässt.

10^{-2} fehlgedeutet werden. Um solche Effekte zu vermeiden wurde in der Literatur eine Kombination aus linearer Skalierung um den Nullpunkt und logarithmischer Skalierung für größere Amplitudenwerte eingeführt [146]. Die durch Partikel erzeugten Maxima sind von diesem Effekt bei unserer Untersuchung nicht stark betroffen.

Bei der Partikeldetektion in ungefilterten Signalen gibt es das Problem vieler zusätzlicher Maxima. Dies zeigt sich im ungefilterten Signal in Abbildung 4.17. Um hierfür eine Verbesserung zu erreichen, wird eine zusätzliche Selektion der Maxima durchgeführt. Diese wird in Abbildung 4.18 exemplarisch dargestellt. In Abbildung 4.18a wird das ungefilterte Signal dargestellt. Wird dieses wie in Abbildung 4.18b dargestellt von schmalbandigem Rauschen gestört, werden die Pulsformen (1) und (2) korrekt detektiert. Für breitbandiges Rauschen in Abbildung 4.18c werden jedoch zusätzliche Maxima detektiert. Um diese zusätzlichen Maxima zu entfernen wird als Auswahlkriterium nur das höchste Maximum zwischen zwei Nulldurchgängen akzeptiert. Im Fall des einzelnen Pulses (1) und des schlecht geformten Pulses (3) wird dadurch korrekterweise nur ein einzelnes Maximum detektiert, es lassen sich effektiv zusätzliche Maxima unterdrücken. Im Fall zweier sich teilweise überlagernder Pulse (2) wird jedoch von den beiden korrekten Maxima ebenfalls nur ein einzelnes detektiert. Der minimal mögliche Partikelabstand um falsch negative Detektionen zu vermeiden ist also größer als durch das Auflösungskriterium gegeben. Durch dieses zusätzliche Auswahlkriterium verändert sich also die Detektionsstatistik deutlich. Deshalb sollte es nur eingesetzt werden, wenn es notwendig ist.

In Abbildung 4.17 werden die Anzahl der Maxima ohne und mit Signalfilterung sowie ohne und mit zusätzlicher Selektion nach dem diskutierten Auswahlkriterium dargestellt. Die durchgezogene Linie stellt die Verteilung der Maxima ohne Signalfilterung und zusätzliche Selektion dar. Hier ist deutlich zu sehen, dass das im Signal enthaltene breitbandige Rauschen zu sehr vielen Maxima führt. Die Situation ähnelt Abbildung 4.13a mit dem breitbandigen Rauschen. Verschiedene Möglichkeiten, die Signaldetektion zu verbessern wurden bereits diskutiert. Die direkte Verminderung der Rauschbandbreite ist hier nicht möglich, jedoch kann eine zusätzliche Filterung mit einer Art von Tiefpass durchgeführt werden, welche

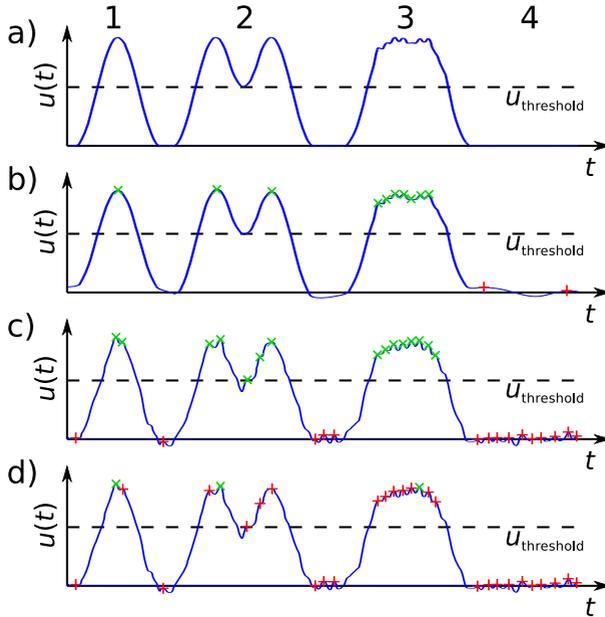


Abbildung 4.18: Illustration der Partikeldetektion mit zusätzlichem Auswahlkriterium. Drei verschiedene Pulsformen und ein partikelfreies Signal werden exemplarisch dargestellt: (1) ein einzelner Puls, (2) zwei sich teilweise überlappende Pulse, (3) eine für die Partikeldetektion ungeeignete Pulsform, (4) partikelfreies Signal. Das in a) dargestellte Signal ist ungestört. In b)-d) ist es mit Rauschen überlagert. In b) mit schmalbandigem und in c) und d) mit breitbandigem Rauschen. Als Partikel akzeptierte Maxima werden mit einem x-Symbol markiert. Zurückgewiesene Maxima mit einem +-Symbol. In b) wird für die Fälle (1) und (2) pro Partikel korrekt ein Maxima detektiert. Im Fall (3) werden jedoch viele Maxima detektiert, da es sich um eine ungeeignete Pulsform handelt. Im partikelfreien Signalteil (4) werden die Maxima in allen Fällen korrekt zurückgewiesen. Für breitbandiges Rauschen werden in c) in den Fällen (1) und (2) zusätzliche Maxima detektiert. In d) wird nur das höchste Maximum zwischen zwei Nulldurchgängen akzeptiert.

sowohl die Rauschbandbreite verringert als auch gleichzeitig das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessert. Dies führt zum mit der gestrichelten Linie dargestellten Histogramm. Hier ist deutlich zu sehen, dass die Zählraten für hohe Amplituden geringer werden und das Rauschen nach links weit zurückgedrängt wird. Rechts von 10^{-2} wird ein zusätzlicher Partikeltyp mit geringerer Amplitude sichtbar.

Im gefilterten Signal herrscht nur schmalbandiges Rauschen vor. Durch das zusätzliche Auswahlkriterium entsteht in Abbildung 4.17 keine wesentliche Veränderung des Histogramms ohne (gestrichelte Kurve) bzw. mit zusätzlichem Auswahlkriterium (x-Symbole). Davon kann geschlossen werden, dass bei guter Pulsform und Signalfilterung eine zusätzliche Auswahl der Maxima nicht notwendig oder sinnvoll ist.

4.3.3 Analytische und experimentelle Partikelverteilungen

Um die hier aus der Theorie hergeleitete Signalstatistik mit den experimentell gewonnenen Daten zu testen wird ein Vergleich zwischen berechneten und gemessenen Histogrammen durchgeführt. Dies wird in Abbildung 4.19 dargestellt. Die durchgezogene Linie stellt die experimentellen Daten dar. Dazu im Vergleich wird das theoretisch erwartete Histogramm als gestrichelte Linie dargestellt. Dies wird weiter aufgeschlüsselt in durch Rauschen erwartete Maxima, als Plus-Symbole dargestellt, sowie durch Partikel erzeugte Maxima, als x-Symbole dargestellt. Um den gesamten Bereich der Partikelamplituden und Zählraten im Histogramm darzustellen werden beide Achsen logarithmisch gewählt. Hierdurch wird die geringe Anzahl von Dubletten sichtbar, welche etwa die doppelte Amplitude der Hauptpopulationen aufweist. Für die Population mit der geringsten Amplitude erheben sich nur die Dubletten aus dem Rauschen, während die beiden helleren Populationen deutlich sichtbare schmale Spitzen im Histogramm formen. Die Dublettenbildung kann durch besseres Mischen der Messlösung sowie eine geringere Partikelkonzentration prinzipiell verhindert werden. Es jedoch auch möglich, dass sich an den Einlässen des Mikrofluidiksystems einzelne Partikel temporär absetzen und dann von nachfolgenden Partikeln wieder aufgewirbelt werden. Um solche Einflüsse zu vermeiden müssten die Einlässe mit geringem Totvolumen gefertigt werden, was dann

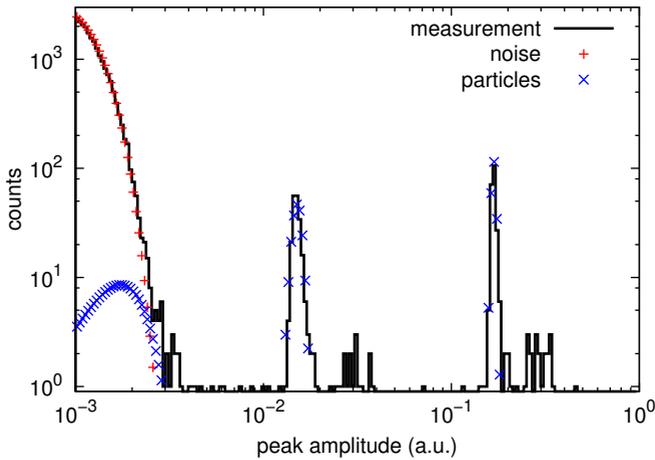


Abbildung 4.19: Histogramm der lokalen Maxima aus dem gefilterten Messsignal (durchgezogene Linie). Zum Vergleich sind die theoretisch erwarteten Maxima aufgrund des Rauschens (+-Symbole), durch die Partikel (x-Symbole), sowie deren Summe (gestrichelte Linie) eingetragen.

jedoch ein präzises Alignment aller Komponenten erfordern würde und bei manueller Fertigung noch nicht realisierbar ist.

Es hat sich gezeigt, dass am idealen Systemmodell noch eine Reihe von gut begründbaren Anpassungen durchgeführt werden müssen, damit die in Abbildung 4.19 sichtbare sehr gute Übereinstimmung zwischen dem berechneten und gemessenen Histogramm erreicht wird.

Die Degradation der optischen Filter wird, wie in Kapitel 4.3.1 diskutiert, berücksichtigt. Ohne diese Berücksichtigung würde sich das gemessene Histogramm je nach Messdauer durch die zeitabhängige langsame Amplitudenänderung verbreitern.

Die Partikelrate wird aus den gemessenen Daten ermittelt. Durch Absetzungseffekte ändert sich die Partikelkonzentration und die Partikelrate kann nicht einfach aus den Herstellerangaben der Partikellösung, dem Mischverhältnis und der an der Spritzenpumpe eingestellten Durchflussrate ermittelt werden. Die Partikelrate wird aus der Partikeln mit der höchsten Partikelamplitude zwischen 0.16 und 0.18 bestimmt und auf die restlichen Populationen anhand der im Datenblatt angegebenen Konzentrationen übertragen.

Um eine gute Übereinstimmung der Breite der Histogramme zu erhalten wird eine Variation der Partikelamplitude von 2% berücksichtigt. Hiermit gilt $\sigma_{E,\text{mod}} = \sigma_E + 2\% \cdot a_P$. Von dieser Variation lassen sich 1.6% allein durch die Geschwindigkeitsvariation der Partikel erklären. Zusätzlich können die Partikel selbst eine Variation der Intensitäten aufweisen und es können geringe positionsabhängige Variationen auftreten, die sich hier auch niederschlagen. Diese müssen jedoch folglich in Summe unterhalb von 1.2% liegen und sind damit vergleichsweise gering.

Die Parameter für das Rauschen, σ_E , r_m und ϵ , wurden in Kapitel 4.2.14 anhand eines partikelfreien Signals ermittelt. Diese werden unverändert übernommen. Zusammen mit den ermittelten durchschnittlichen Partikelamplituden ergeben sich PSNR-Werte von 8.9 dB, 28.7 dB sowie 49.7 dB für die drei dargestellten Partikeltypen.

Während ein PSNR-Wert von 8.9 dB offensichtlich nicht ausreicht, um die Partikel dieser Intensität zu detektieren, wurde in Simulationen gezeigt,

dass ein PSNR-Wert von 15 dB ausreicht, um eine deutliche Trennung im Histogramm zu erreichen. Eine Verbesserung des PSNR um 6 dB kann durch eine Erhöhung der Lichtausbeute des Fluoreszenzsignals um den Faktor 2 erreicht werden, wenn das Hintergrundlicht nicht gleichzeitig erhöht wird. Um dies zu erreichen empfiehlt es sich, die Schichtdicken zwischen LED, Kanal und Photodiode weiter zu verringern. Dies kann beispielsweise durch direkt auf die den Kanal bildenden Folien aufgedruckte Farbfilter erreicht werden. Wird das Hintergrundlicht simultan erhöht, wie es beispielsweise bei Steigerung der Intensität des Anregelichtes stattfindet, ist hier ein Faktor 4 notwendig. Alternativ kann die Flussgeschwindigkeit um den Faktor 4 gesenkt werden, um die Expositionsdauer zu erhöhen. Das entsprechende Ergebnis der Messung mit um Faktor 15.25 verringerter Flussgeschwindigkeit ist in Abbildung 4.20 dargestellt.

4.3.4 Reduzierte Flussrate

Da für die geringe Flussgeschwindigkeit eine andere Signalfilterung verwendet wurde (siehe Kapitel 3.5.2), müssen die Werte für das Rauschen entsprechend angepasst werden. Es werden $\sigma_E = 2.45 \cdot 10^{-4}$, $r_m = 101.42 \text{ s}^{-1}$ sowie $\epsilon = 0.946$ ermittelt. Im Vergleich zu den in Kapitel 4.2.14 ermittelten Parametern hat die Signalfilterung hier eine geringere Bandbreite, was den Wert von r_m um den Faktor 3 verringert und den Wert von σ_E halbiert. Der Wert von ϵ erhöht sich jedoch durch die Signalfilterung weiter. Wie in Diagramm 4.20 zu sehen ist wird mit diesen Parametern die Verteilung des Rauschens gut abgeschätzt. Bei geringen Amplituden ergibt sich in der Theorie eine leicht höhere Rate von Maxima als im Experiment. Im Gegensatz hierzu gibt es im Bereich von 10^{-3} zwischen den vom Rauschen erzeugten Maxima und den von den Partikeln erzeugten Maxima in der Messung mehr Maxima als theoretisch erwartet werden. Dies kann eventuell durch schwache Störsignale wie mechanische Schwingungen oder elektromagnetische Einstreuungen entstehen und zu zusätzlichen Signalspitzen führen, die in der Statistik nicht berücksichtigt werden können. Die Verteilung der Maxima für alle Populationen ist in der Messung etwas breiter als theoretisch erwartet. Dies lässt sich durch die bei dieser Flussgeschwindigkeit nur bedingt funktionierende Partikelfokussierung

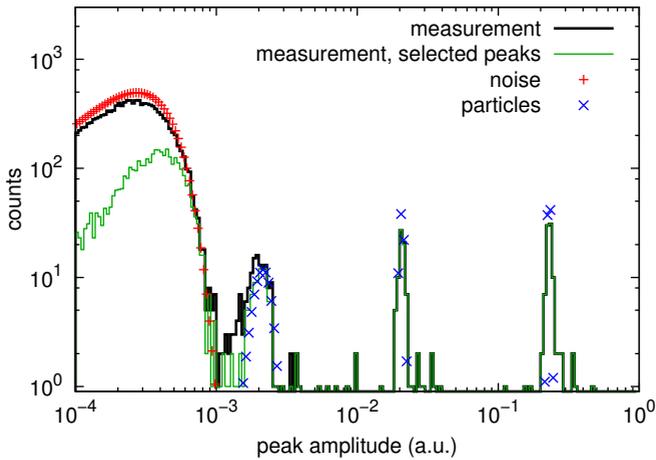


Abbildung 4.20: Analog zu Abbildung 4.19 wird hier das Ergebnis für die geringe Flussgeschwindigkeit aufgezeigt. Durch eine zusätzliche Auswahlregel lassen sich die Ergebnisse zwischen Rauschen und niedrigster Partikelsorte (dicke Linie) deutlich verbessern.

zurückführen. Das Ausmaß dieser Geschwindigkeitsvariation wird jedoch etwas durch die abgeänderte Signalfilterung abgemildert.

In diesem Fall wird ebenfalls zum Vergleich die in Kapitel 4.3.2 diskutierte zusätzliche Auswahl der Maxima durchgeführt. Dadurch wird zwischen zwei Nulldurchgängen jeweils nur das höchste Maximum gezählt. Zusätzliche Maxima, die bei langsamen Partikeln und den damit verbundenen breiten Pulsformen auftreten, bzw. Maxima, die an Pulsflanken von hellen Partikeln auftreten, werden hierdurch zurückgewiesen.

Werden die Maxima so ausgedünnt (dünne Linie in Abbildung 4.20), dann stimmt das gemessene Histogramm auch für die kleine Partikelorte sehr gut mit der berechneten Verteilung überein. Es besteht also bei dieser Art der Filterung im Experiment ein Problem zusätzlicher Maxima an den Pulsflanken bei sehr kleinen Partikelamplituden. Also lässt sich die gute Übereinstimmung zwischen der erwarteten und gemessenen Verteilung im Histogramm mit geringen Einschränkungen auch auf ein System mit höherer Geschwindigkeitsvariation, modifizierter Filterung und vom Ideal abweichender Pulsform übertragen.

4.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Signalstatistik eines mikrofluidischen Systems analysiert. Ein einfaches Signalmodell beschreibt die Signalfilterung zur Rauschunterdrückung und Pulsformung. Anhand grundlegender Annahmen wurden Formeln für die Verteilungsfunktionen der Signale bzw. der lokalen Maxima abgeleitet. Anhand der experimentellen Daten wurde nachgewiesen, dass die Verteilung der Amplituden bzw. Maxima mit den erwarteten Verteilungsfunktionen sehr gut übereinstimmen. Auch die im Experiment gemessene Pulsform eignet sich gut für die Anwendung der Partikeldetektion aus lokalen Maxima. Auf Basis des Sparrow-Kriteriums wurde für unterschiedliche Pulsformen das Auflösungsvermögen des Detektionssystems berechnet und daraus die maximale Partikelrate abgeleitet. In ungeordneten Partikelströmen auftretende Überlagerungen von Pulsformen wurde mit Hilfe der Poisson-Statistik als Fehlerquelle berücksichtigt.

Die Signalqualität wurde über das PSNR definiert. Formeln, welche die durch Rauschen erzeugten Fehldetektionen beschreiben, wurden aus den Verteilungsfunktionen abgeleitet. Ein Schwellwert wurde definiert und die optimale Wahl desselben wurde diskutiert. Weitergehende Untersuchungen haben sich mit dem Einfluss der Rauschbandbreite befasst und aufgezeigt, dass durch die Signalfilterung einerseits durch Unterdrückung des Rauschens und damit einer Erhöhung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses, aber andererseits auch speziell durch die Unterdrückung hochfrequenter Rauschanteile die Partikeldetektion verbessert wird. Es wurde gezeigt, dass die Ein-Kanal-Detektion bei guten PSNR-Werten der Zwei-Kanal-Detektion ebenbürtig ist und bei guter Signalfilterung keine zusätzlichen Nebenmaxima an den Pulsflanken großer Pulse entstehen, sich das Detektionsverfahren also auch für eine hohe Variation von Intensitäten eignet. Anhand des Vergleichs zwischen den experimentell gemessenen Histogramm Daten und den aus den hergeleiteten Formeln berechneten Histogrammen wurde gezeigt, dass eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment besteht.

Die Partikeldetektion anhand lokaler Maxima ist mit passend gefilterten Signalen also problemlos möglich und die dabei auftretenden Fehlerraten lassen sich anhand der präsentierten Formeln berechnen.

5 Räumliche Modulation und Signalfilterung

In diesem Kapitel werden Eigenschaften von Signalfiltern mithilfe von simulierten Signalen untersucht. Hierfür werden die Signaleigenschaften im Frequenzspektrum analysiert. Insbesondere wird hier das Augenmerk auf die Signaleigenschaften bei räumlicher Modulation der Messzone mittels einer Schattenmaske gelegt. Ein Beispiel hierfür ist ein Detektionssystem für Fluoreszenz, welches mittels einer nach einem Muster strukturierten Schattenmaske abschattet und dadurch anstatt eines einzelnen breiten Signalpulses ein feinaufgelöstes Muster erzeugt. Um aus dem modulierten Signal ein für die im vorhergehenden Kapitel vorgestellte Methode nutzbares Signal zu machen werden drei verschiedene Methoden untersucht, das Signal zu filtern: 1) Das Matched-Filter. 2) Ein aus der Literatur entnommener Entwurf. 3) Ein eigenes Filterdesign. Beim Vergleich der Filterentwürfe zeigt sich, dass Nebenmaxima im Signal ein wesentliches Problem darstellen, da sie vom Detektionsalgorithmus als zusätzliche Partikel interpretiert werden. Das hier entworfene eigene Filterdesign ermöglicht eine sehr gute Unterdrückung von Nebenmaxima und eine gezielte Reproduktion einer gewünschten Pulsform. Dies gelingt insbesondere im Fall von modulierten Signalen aber auch von nichtmodulierten Signalen. Damit stellt es hinsichtlich der Reproduktion der gewünschten Pulsform eine bessere Alternative zum Matched-Filter dar.¹

In der Literatur findet sich die Idee eine lange Messdauer mit einer hohen räumlichen Auflösung zu vereinen indem ein Fluoreszenzsignal durch Schattenmasken räumlich moduliert wird [78]. Ein nach diesem Prinzip

¹Teile dieses Kapitels wurden bereits in [147] veröffentlicht.

arbeitendes Partikeldetektionssystem, das mit einer Laserdiode und einer Lawinenphotodiode arbeitet, konnte eine Empfindlichkeit von etwa 1000 MEPE demonstrieren [148]. Da die Partikeldetektionssysteme in dieser Arbeit sowieso mit Schattenmasken arbeiten ist eine Implementierung eines solchen Modulationssystems generell möglich. Jedoch ist dabei die einfache Detektionsmethode über lokale Maxima aus dem vorhergehenden Kapitel nicht direkt anwendbar. Deshalb wird in diesem Kapitel theoretisch erörtert, welche Einflüsse solch eine Modulation auf die Signale hat und wie sich über Filterung wieder lokale Maxima herstellen lassen. Es werden die aus der Literatur bekannten Filtermethoden getestet und bewertet sowie ein eigener Filterentwurf vorgestellt.

5.1 Signaleigenschaften bei Modulation

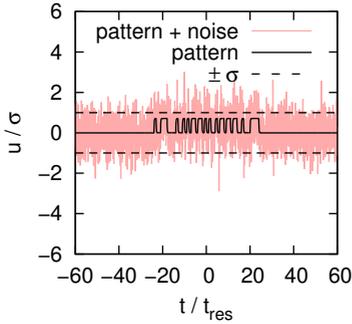
Im Gegensatz zum einzelnen Signalpuls bei einem nicht-modulierten optischen System tritt bei Modulation für jeden Partikel eine ganze Folge von Pulsen auf. Dies ist in Abbildung 5.1a dargestellt. Um die Auswirkungen der Modulation besser zu verstehen, finden die folgenden Betrachtungen im Frequenzbereich statt.

In Abbildung 5.3 wird das Frequenzspektrum zweier nichtmodulierter Pulsformen mit der des modulierten Signals verglichen. Die Achsskalierung von f_{res} bezieht sich hierbei auf das nichtmodulierte kurze Signal und das modulierte Signal. Die Auflösung des nichtmodulierten langen Signals ist entsprechend geringer.

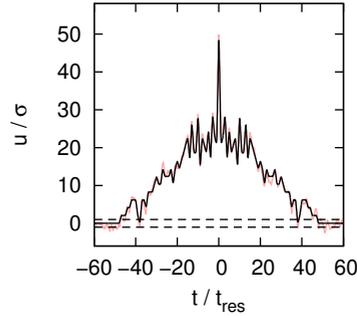
Das nichtmodulierte Signal kurzer Länge weist ein breites, glattes Spektrum auf, welches bei f_{res} einen ersten Einbruch aufweist und danach steil abfällt. Wird diese Pulsform verlängert verringert sich in gleichem Maße seine Bandbreite, die prinzipielle spektrale Form bleibt jedoch erhalten. Die nicht-modulierte zeitlich ausgedehnte Funktion hat bei tiefen Frequenzen eine deutlich höhere Amplitude als das zeitlich kurze Pendant. Für die lange Apertur erhöht sich die pro Partikel detektierte Fluoreszenz in dem Maß wie es der Amplitudenanstieg zeigt gleichzeitig wird jedoch die maximale Zählrate entsprechend dem Verlängerungsfaktor reduziert.

Tabelle 5.1: Liste der in Kapitel 5 verwendeten Symbole.

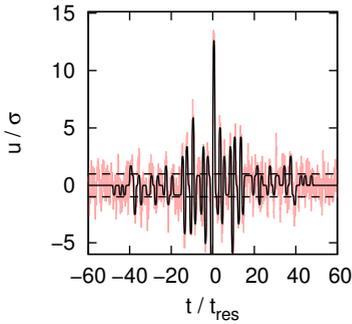
Symbol	Bedeutung
a_P	Partikelamplitude
h_E	Pulsform des Signalfilters
$h_{E,MMSE}$	Pulsform des nach MMSE-Kriterien entworfenen Signalfilters
h_P	Vom Partikel erzeugte Pulsform
h_{res}	Gewünschte Pulsform nach Auflösungskriterium
n	Rauschsignal
t	Zeit
t_P	Zeitpunkt, an dem ein Partikel die Nullstelle der Messzone passiert
t_{res}	Zeitabstand zwischen zwei Partikeln ab dem das Auflösungskriterium erfüllt ist
u	Messsignal
u_{error}	Fehlersignal
u_{ideal}	Ideales, ungestörtes Signal
u_{MMSE}	Signal nach MMSE-Filterung



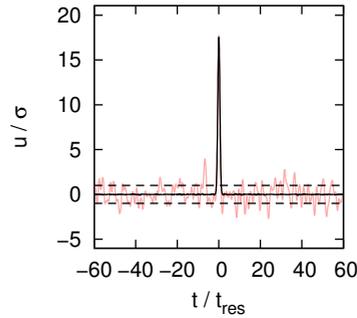
(a) Ungefiltert.



(b) Matched Filter.

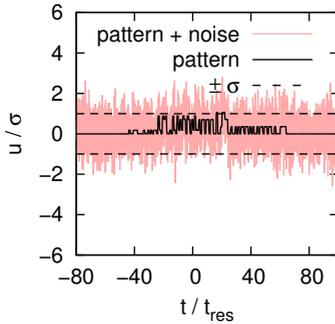


(c) DCS-Filter.

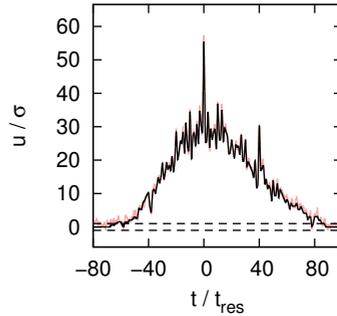


(d) MMSE-Filter.

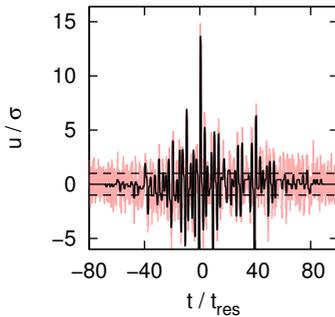
Abbildung 5.1: In a) das modulierte Signal. Der Einfluss additiven Rauschens wird als rote Linie dargestellt. Dessen Standardabweichung wird als gestrichelte Linie dargestellt. Das ungefilterte Signal befindet sich gänzlich innerhalb der Standardabweichung des Rauschens. In b)-d) das Signal nach Filterung mit den unterschiedlichen Filtertypen. Das Matched Filter bietet die beste Rauschunterdrückung, jedoch keine scharf abgegrenzte Pulsform. Das DCS-Filter verringert die Höhe der Nebenmaxima auf Kosten der Rauschunterdrückung. Das MMSE-Filter bietet sowohl eine gute Pulsforms als auch eine hohe Rauschunterdrückung.



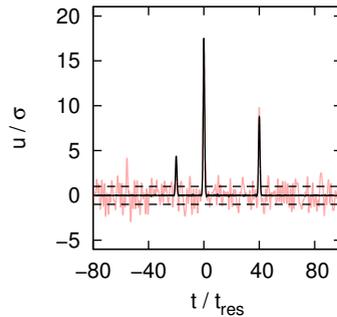
(a) Ungefiltert.



(b) Matched Filter.



(c) DCS-Filter.



(d) MMSE-Filter.

Abbildung 5.2: Vergleich des modulierten Signals in a), sowie des Signals nach Filterung mit den unterschiedlichen Filtertypen in b)-d). Im Unterschied zu Abbildung 5.1 enthält das Nutzsinal hier drei Partikel. Sowohl das Matched Filter, als auch das DCS-Filter können die zusätzlichen Partikel nicht sauber im gefilterten Signal wiederherstellen. Dies gelingt jedoch für das MMSE-Filter.

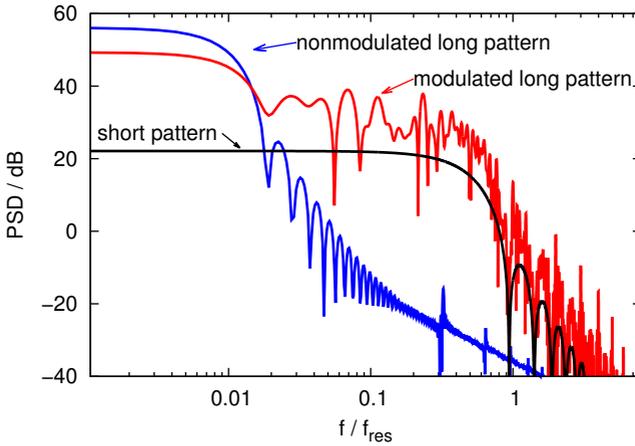


Abbildung 5.3: Signalspektrum für eine kurze und lange nichtmodulierte Apertur, sowie für das modulierte Muster. Die lange Apertur hat im Vergleich zur kurzen Apertur ein höheres Signalniveau, jedoch eine reduzierte Bandbreite. Das modulierte Signal hat eine Bandbreite, die der kurzen Apertur entspricht und gleichzeitig ein Signalniveau, welches im Mittel deutlich über der kurzen Apertur liegt.

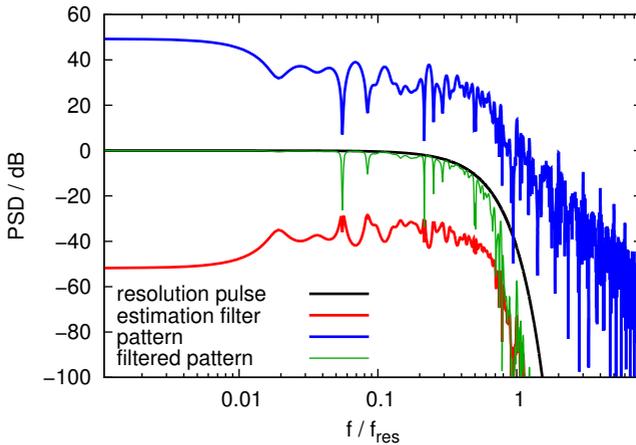


Abbildung 5.4: Dargestellt ist das modulierte Signalspektrum aus Abbildung 5.3 (obere Kurve). Das zugehörige Filterspektrum des MMSE-Filters nach Gleichung 5.8 berechnet bildet die untere Kurve. Die glatte Kurve in der Mitte zeigt das Spektrum des Auflösungspulses H_{res} . Das gefilterte Signal zeichnet diese Auflösungskurve bis auf vereinzelte Einbrüche im relevanten Frequenzbereich sehr gut nach.

Um beide Vorteile zu kombinieren, wird die zeitlich ausgedehnte Pulsform mittels eines Modulationsmusters im Raster der zeitlich kurzen Pulsform zerhackt. Bei der Betrachtung des zugehörigen Frequenzspektrums sieht man einen glatten Verlauf bis zum ersten Einbruch im Frequenzspektrum des langen Modulationsmusters. Dies kommt durch die unipolare Modulation zustande, welche man sich als bipolare Modulation auf ein Signal mit der halben Amplitude vorstellen kann. Dadurch liegt der niederfrequente Anteil beim modulierten Signal auch um 6 dB niedriger als beim nichtmodulierten zeitlich ausgedehnten Signal. Dafür ist das Signal bei höheren Frequenzen entsprechend erhöht und liegt im Mittel mit der Amplitude deutlich über der des zeitlich kurzen Signals, fällt jedoch für höhere Frequenzen über f_{res} mit derselben Steilheit ab.

Anhand der Frequenzspektren kann festgehalten werden, dass das höchste PSNR für eine lange nichtmodulierte Sequenz erzielt wird. Durch die Abschattungen bei der Modulation verringert sich entsprechend die Signalstärke. Die pro Partikel empfangene Energie verteilt sich bei Modulation über einen größeren Bereich, der dem des Pulses der Rastereinheit ähnelt. Die Energie wird jedoch nicht gleichmäßig im Frequenzbereich verteilt, was bei der Signalrekonstruktion zu Problemen führen kann.

5.2 Methoden für die Signalrekonstruktion

Im vorliegenden Fall soll die Anzahl, Position und Intensität von Partikeln ermittelt werden. Eine optimale Realisierung würde alle Möglichkeiten durchprüfen und dann die wahrscheinlichste bzw. beste Möglichkeit auswählen. Dies ist jedoch unrealistisch aufwändig, da eine Vielzahl von Kombinationen von Partikelpositionen und Partikelamplituden geprüft werden müsste.

Wird die maximale Anzahl von zugelassenen Partikeln verringert und eine iterative Methode verwendet, um die Freiheitsgrade (hier Positionen und Amplituden) zu bestimmen, verringert sich der Aufwand. Es wird jedoch eine gute Schätzung für die Anzahl und Position der Partikel als Startbedingung benötigt [133, 134]. Solch eine Methode bietet Vorteile

wenn aus den Signalen von sich überlappenden Pulsen akkurat auf die einzelnen Partikel geschlossen werden soll.

Die in Kapitel 4 vorgestellte Methode zur Partikeldetektion ist im Vergleich hierzu sehr einfach und führt direkt zum Ergebnis. Durch die Annahme, dass eine Überlappung von mehreren Pulsformen nicht auftritt (bzw. als Fehler gewertet wird) ist die Auswertung von lokalen Maxima für die Partikeldetektion ausreichend. Diese Methode setzt jedoch eine kompakte Pulsform mit einem einzelnen Maximum für jeden Partikel voraus. Folglich lässt sich die Partikeldetektion über lokale Maxima nicht direkt auf modulierte Signale anwenden, da hier pro Partikel viele Maxima im Signal existieren und Überlappungen der Pulsformen erlaubt werden sollen. Stattdessen muss das Signal erst gefiltert werden, um aus den vielen Maxima ein einzelnes zu machen, welches dann mit hoher Auflösung detektiert werden kann.

Als Referenz wird das Matched Filter gewählt, welches bei weißem Rauschen das maximale Signal-zu-Rausch-Verhältnis bietet. Problematisch hierbei ist jedoch die breite Basis der Pulsform (dargestellt in Abbildung 5.1b), welche keine höhere Partikelrate zulässt. Kiesel et al. [78] schlagen deshalb vor, die Ableitung des mittels eines Matched filters gefilterten Signals zu bilden, was die dreieckige Basis entfernt und eine Spitze zurücklässt (dargestellt in Abbildung 5.1c).

Als eigener Lösungsansatz wird ein MMSE-Filter (engl. *minimum mean square error*) gewählt, welcher die Frequenzspektren des modulierten Signals sowie des Rauschens benutzt, um eine für die Detektion geeignete Pulsform zu rekonstruieren und gleichzeitig das Rauschen zu unterdrücken.

5.2.1 Matched Filter

Die Grundidee hinter dem Matched Filter ist, bei weißem Hintergrundrauschen das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu maximieren [142]. Dies resultiert in einer Filterform, welche im Frequenzbereich und Zeitbereich dieselbe Form hat wie die eigentlichen Signalpulse. Das in Abbildung 5.1a dargestellte ungefilterte Signal ist von starkem Rauschen überlagert, welches nach der Filterung mit einem Matched Filter sehr gut unterdrückt wird.

Das gefilterte Signal in Abbildung 5.1b zeigt eine klar vom Rauschen abgehobene Pulsform.

Das für unterschiedliche Pulsformen resultierende PSNR erreicht für alle getesteten Modulationsmuster einen konstanten Wert von knapp 50, da es bei weißem Hintergrundrauschen nicht von der Pulsform abhängt.

Problematisch für die Detektion aus Maxima sind jedoch zwei Dinge. Einerseits enthält die Pulsform in Abbildung 5.1b Nebenmaxima mit - im Vergleich zum Hauptmaximum - verhältnismäßig hoher Amplitude. Andererseits hat die Pulsform noch eine breite Basis in Form eines Dreiecks. Das Dreieck entspricht der Faltung zweier Rechtecke. Dies rührt daher, dass das optische Signal unipolar ist. Deshalb hat es im Mittel die halbe Spitzenamplitude. Dadurch ist die Detektion einer hohen Zahl von Partikeln mit kleinen Abständen anhand der lokalen Maxima aus solch einem Signal nicht möglich. Dies ist Abbildung 5.2b für den Fall dreier Partikel deutlich dargestellt.

5.2.2 DCS-Filter

Als Modifikation des Matched Filters wird in Referenz [78] die Ableitung des gefilterten Signals gebildet, hier als DCS-Filter (engl. *derivative of the correlation signal*) bezeichnet. Hierdurch wird bei dem in Abbildung 5.1b dargestellten Signal die zugrundeliegende dreieckige Basis entfernt und es entsteht ein flacheres Signal, welches in Abbildung 5.1c dargestellt wird. Die Höhe der Nebenmaxima verringert sich. Dies erlaubt eine bessere Detektion von benachbarten überlappenden Partikeln. Dennoch kann bei ungünstiger Überlagerung von mehreren Partikeln ein zusätzliches Maximum auftreten, welches zu einer Fehldetektion führt. Für das Erreichen des theoretisch maximal möglichen Partikeldurchsatzes muss jedoch die maximale Anzahl an gleichzeitig detektierbaren Partikeln der Länge des Modulationsmusters entsprechen. Zusätzlich tritt bei der Bildung der Ableitung das Problem auf, dass das hochfrequente Rauschen verstärkt wird. In Abbildung 5.2c ist zu sehen, dass die drei einzelnen Partikel nicht von den Nebenmaxima unterscheidbar sind.

5.2.3 Anforderungen an die Filtermethode

Die mit den der Literatur entnommenen Methoden erzielten Ergebnisse sind nicht zufriedenstellend für die Partikeldetektion aus Maxima. Zwar wird mit dem Matched Filter ein sehr hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis erreicht, jedoch treten starke Nebenmaxima auf und die Pulsform ist ungeeignet. Beim DCS-Filter wird die Pulsform verbessert, jedoch treten immer noch viele starke Nebenmaxima auf und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist deutlich schlechter als beim Matched Filter. Deshalb wird eine eigene Methode entwickelt.

Die Anforderungen sind, dass Nebenmaxima stark unterdrückt werden, damit sich mehrere Partikel gegenseitig möglichst wenig beeinflussen, wobei weiterhin auch das Rauschen möglichst gut unterdrückt werden soll. Die Pulsform nach der Filterung soll möglichst einer für die Detektion gut geeigneten Zielfunktion entsprechen. Als Ansatz wird ein MMSE-Filter gewählt, dessen Zielfunktion einem gewünschten idealen Signal entspricht.

5.3 MMSE-Filter

5.3.1 Herleitung

Ein MMSE-Filter minimiert ein quadratisches Fehlermaß. Der vorliegende Fall wird in Abbildung 5.5 dargestellt. Als Eingangssignal gilt ein Pulszug, der den Partikelstrom nachbildet. Der Pulszug besteht aus einem Diracstoß für jeden Partikel zum entsprechenden Zeitpunkt an dem der Partikel auftritt. Der untere Signalpfad stellt das ideale Referenzsignal dar. Hier erhält jeder Partikel die ideale Pulsform h_{res} . Der obere Signalpfad modelliert das Messsignal, das per MMSE-Filter gefiltert wird. Das MMSE-Filter wird so gewählt, dass das Fehlersignal, welches aus der Differenz zum idealen Signal besteht, minimiert wird. Es wird angenommen, dass die Partikelverteilung einem Poissonprozess mit der Rate r_P entspricht. Das Leistungsdichtespektrum des gefilterten Signals entspricht deshalb dem Energiedichtespektrum der Impulsantwort multipliziert mit der durchschnittlichen Partikelrate. Für die Berechnung des Filters muss also nicht der konkrete Partikelstrom

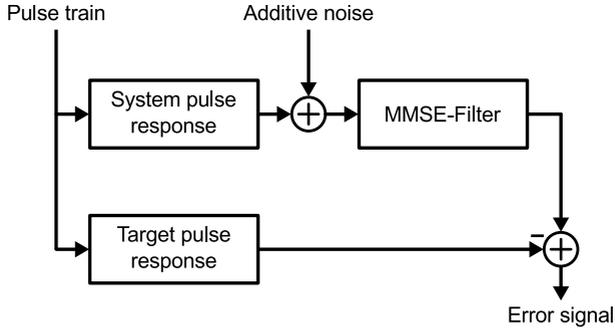


Abbildung 5.5: Signalmodell für das MMSE-Filter zur Erzeugung einer bestimmten Ziel-Pulsform h_{res} aus einer beliebigen System-Pulsform h_{P} über die Wahl der Pulsform des MMSE-Filters $h_{\text{E,MMSE}}$ unter Berücksichtigung des als Pulszug modellierten Partikelstromes und additivem Rauschen in der Messung.

berücksichtigt werden, stattdessen reichen die einzelnen Impulsantworten der Filter zusammen mit der mittleren Partikelrate aus.

Für das gefilterte Signal gilt das in Kapitel 4.2.1 in den Gleichungen 4.1 und 4.2 vorgestellte Modell. Hierbei ist h_{P} die modulierte Pulsform und $h_{\text{E}} = h_{\text{E,MMSE}}$ die entsprechend idealisierte Filterfunktion. Zusammengefasst ergibt sich für das gefilterte Signal

$$u_{\text{MMSE}}(t) = \sum_k a_{\text{P},k} \cdot (h_{\text{P}} * h_{\text{E}})(t - t_{\text{P},k}) + (n * h_{\text{E}})(t). \quad (5.1)$$

Beim idealisierten Signal gilt analog $h_{\text{P}} = h_{\text{res}}$ und es gibt kein additives Rauschen, also ergibt sich hier

$$u_{\text{ideal}}(t) = \sum_k a_{\text{P},k} \cdot h_{\text{res}}(t - t_{\text{P},k}). \quad (5.2)$$

Das Fehlersignal beträgt

$$u_{\text{error}}(t) = u_{\text{MMSE}}(t) - u_{\text{ideal}}(t). \quad (5.3)$$

Die Minimierung des Fehlersignals führt zur gewünschten Filterfunktion

$$h_{E,MMSE} = \arg \min_{h_{E,MMSE}} E \left\{ |u_{\text{error}}(t)|^2 \right\}. \quad (5.4)$$

Die Berechnung des Signalfilters im Frequenzbereich kann entweder direkt durch Minimieren dem zugehörigen Leistungsdichtespektrum des Fehlersignals erfolgen oder es kann auf die Lösung des Wiener Filters in Kapitel 2.3.2.4 in Gleichung 2.19 zurückgegriffen werden. Damit dies möglich ist, muss zunächst das Signalmodell in Abbildung 5.5 modifiziert werden, da sich die gewünschte Pulsform im unteren Signalzweig befindet, der in Abbildung 2.4b nicht vorgesehen ist. Als Abhilfe wird das Eingangssignal zusätzlich mit Zielfunktion h_{res} gefiltert. Damit das System identisch bleibt muss jedoch die Systemfunktion mit dem Inversen von h_{res} gefiltert werden. Also gilt für die neue Systemfunktion

$$H_g(f) = H_P(f) \cdot H_{\text{res}}^{-1}(f).$$

Das neue Eingangssignal besteht aus einem Pulszug und nach Gleichung 2.15 gilt für dessen Leistungsdichtespektrum

$$\Phi_{S_i S_i}(f) = r_P \cdot a_P^2 \cdot |H_{\text{res}}(f)|^2$$

das Leistungsdichtespektrum des Rauschens beträgt $\Phi_{NN}(f)$.

Damit können die Faktoren in Gleichung 2.19 eingesetzt werden und es ergibt sich

$$H_{E,MMSE}(f) = \frac{\left(r_P \cdot a_P^2 \cdot |H_{\text{res}}(f)|^2 \right) \cdot \left(H_P^*(f) \cdot H_{\text{res}}^{-1}(f) \right)}{\left(r_P \cdot a_P^2 \cdot |H_{\text{res}}(f)|^2 \right) \cdot \left| H_P^*(f) \cdot H_{\text{res}}^{-1}(f) \right|^2 + \Phi_{NN}(f)}. \quad (5.5)$$

da $h_{\text{res}}(t)$ symmetrisch und reellwertig ist, gilt

$$H_{\text{res}}^*(f) = H_{\text{res}}(f) \quad (5.6)$$

und

$$\left| H_P^*(f) \cdot H_{\text{res}}^{-1}(f) \right|^2 = H_{\text{res}}^{-2}(f) \cdot \left| H_P^*(f) \right|^2. \quad (5.7)$$

Damit lässt sich Gleichung 5.5 umschreiben zu

$$H_{E,MMSE}(f) = H_{\text{res}}(f) \frac{r_P \cdot a_P^2 \cdot H_P^*(f)}{r_P \cdot a_P^2 \cdot |H_P(f)|^2 + \Phi_{NN}(f)}. \quad (5.8)$$

Die Lösung von $H_{E,MMSE}(f)$ kann wieder in den Zeitbereich zurücktransformiert werden, um die Impulsantwort des Signalfilters $h_{E,MMSE}$ zu erhalten.

Der Bruch in Gleichung 5.8 bewirkt eine Wiederherstellung des angenommenen Pulszuges unter Berücksichtigung des frequenzabhängigen SNR. Der Faktor $H_{\text{res}}(f)$ wiederum bewirkt die gewünschte Pulsformung. Bei dieser Lösung kann r_P auch als Designparameter angesehen werden und abweichend von der eigentlichen mittleren Partikelrate gewählt werden. Ein höherer Wert von r_P bewirkt eine bessere Reproduktion der Pulsform h_{res} während ein kleinerer Wert eine höhere Rauschunterdrückung bewirkt.

Die aus der Filterung mit dem MMSE-Filter resultierende Pulsform in Abbildung 5.1d zeigt eine sehr gute Reproduktion der gewünschten Pulsform mit einer einzelnen scharfen Spitze und sehr kleinen Nebenmaxima. Das MMSE-Filter ist also in der Lage, die modulierte Pulsform wieder zurück in eine einfache Pulsform mit einem einzelnen Maximum zu transformieren. Dies ist insbesondere im Fall von höheren Partikelraten sinnvoll, da sich die Nebenmaxima aufaddieren. Im Beispiel von drei überlappenden Partikeln in Abbildung 5.2d sind alle drei Einzelpulse deutlich erkennbar und klar vom Rauschen und den Nebenmaxima trennbar.

Um die Funktion des MMSE-Filters zu verstehen wird das Spektrum der Filterfunktion $H_{E,MMSE}(f)$ in Abbildung 5.4 im Vergleich zum Signalspektrum des Partikels $H_P(f)$ sowie dem Spektrum der Zielfunktion für den Auflösungs puls $H_{\text{res}}(f)$ betrachtet. Die Form der Spektrens der Filterfunktion stellt über einen weiten Frequenzbereich quasi ein Spiegelbild der Form des Spektrens des Partikels dar. Ausnahmen treten nur an den Stellen auf, an denen das Spektrum des Partikels Einbrüche aufweist, sowie für höhere Frequenzen, an denen das Spektrum des Auflösungs pulses abnimmt. Im Frequenzbereich muss also die vom Partikel erzeugte Pulsform eine ausreichende Amplitude für alle für die Rekonstruktion von $H_{\text{res}}(f)$ benötigten

Frequenzen aufweisen. Einbrüche im Spektrum des Partikelsignals führen zu Einbrüchen im gefilterten Signal, was wiederum zu Nebenmaxima führt.

Die einfachste Möglichkeit, solche Einbrüche zu vermeiden, ist die Realisierung eines einzelnen Signalpulses für das vom Partikel erzeugte Signal. Das bedeutet, dass das MMSE-Filter nicht nur für modulierte Signale, sondern auch für nichtmodulierte Signale eine gute Möglichkeit darstellt, gleichzeitig das Rauschen zu unterdrücken und die Signalform für die Partikeldetektion anzupassen.

Ein weiterer Vorteil ergibt sich im Fall von farbigem Rauschen, da das Matched Filter nur bei weißem Rauschen ein ideales Signal-zu-Rausch-Verhältnis bietet. Beim MMSE-Filter geht jedoch das gesamte Rauschspektrum in die Betrachtung mit ein.

5.4 Geschwindigkeitsvariation

In Kapitel 4.2.20 wurde gezeigt, dass bei idealer Pulsform keine Probleme durch von Rauschen erzeugte Nebenmaxima entstehen, wenn Partikel mit sehr hoher Amplitude vorhanden sind. Da bei der mit dem MMSE-Filter gefilterten Pulsform jedoch kleine Nebenmaxima nicht vermeidbar sind, soll diese Eigenschaft weiter untersucht werden. Die Unterdrückung der Nebenmaxima lässt sich mit der Partikelrate r_P als Freiheitsgrad in Gleichung 5.8 steuern.

In Kapitel 3.4.1 wurde gezeigt, dass auch bei guter Partikelfokussierung Geschwindigkeitsvariationen verbleiben. Diese führen im Frequenzbereich entsprechend zu Verzerrungen im zeitlichen Verlauf des gemessenen Signals und somit auch im Spektrum. Dadurch passen die zeitlichen Verläufe bzw. die Spektren des Partikelsignals sowie des Filters nicht mehr genau aufeinander. Das hat die Folge, dass das resultierende Spektrum ebenfalls wellig wird und somit Nebenmaxima entstehen. Dies ist ein prinzipielles Problem bei dieser Art der Filterung, da sich alle hier diskutierten Filtertypen über die spektrale Form bzw. die Impulsantwort charakterisieren lassen.

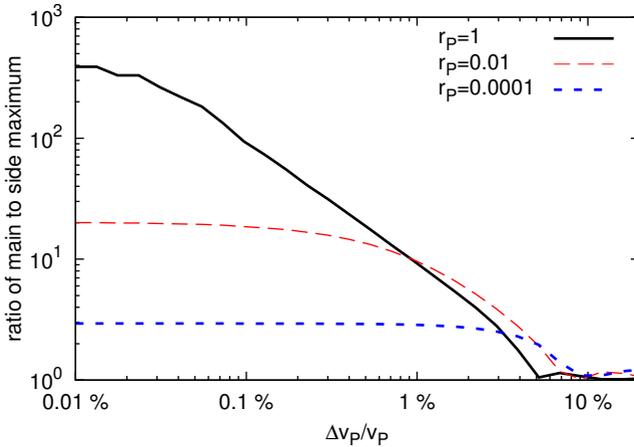


Abbildung 5.6: Das Verhältnis aus Hauptmaximum und höchstem Nebenmaximum des gefilterten Signals ist für unterschiedliche Werte von r_P über die Höhe der Geschwindigkeitsabweichung aufgetragen.

Um das Zusammenspiel der Variation von r_P und der Geschwindigkeitsvariation zu zeigen wird in Abbildung 5.6 das Verhältnis von Hauptmaximum zu höchstem Nebenmaximum aufgetragen. Für niedrige Partikelraten ähnelt das MMSE-Filter dem Matched Filter und bietet nur geringe Unterdrückung von Nebenmaxima. Bei einer hohen Partikelrate werden die Nebenmaxima um einen Faktor 300 unterdrückt. Die Unterdrückung der Nebenmaxima ist jedoch sehr anfällig für Geschwindigkeitsvariationen. Schon bei einer Geschwindigkeitsabweichung von 1%, wie sie im Experiment beobachtet wurde, werden Nebenmaxima nur noch um einen Faktor von 10 unterdrückt.

Hierbei gilt zusätzlich noch ein Zusammenhang mit der Musterlänge (in Abbildung 5.6 beträgt sie 50). Je länger das Muster ist, desto höher die Anforderung an die Konstanzhaltung der Geschwindigkeit. Umgekehrt gilt für ein kurzes Muster oder gar eine nichtmodulierte Apertur, dass entsprechend höhere Geschwindigkeitsvariationen toleriert werden können.

Bei Verwendung einer einzelnen Apertur wie in Kapitel 4 sind die Anforderungen an die Partikelfokussierung entsprechend deutlich geringer. Hier bietet das MMSE-Filter gegenüber der Filterung mit dem Hann-Puls oder dem Matched Filter zwei entscheidende Vorteile. Einerseits lässt sich die für die Partikeldetektion verwendete Pulsform festlegen. Dies ist insbesondere bei ungünstig geformten Pulsen nützlich. Andererseits kann bei der Filterauslegung auch farbiges Rauschen berücksichtigt werden. Über den Wert von r_P kann zusätzlich ein Kompromiss zwischen Verbesserung der Pulsform bzw. Unterdrückung des Rauschens eingestellt werden.

5.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde der Einfluss von räumlicher Modulation auf das vom Partikel generierte Signal und Methoden zur Detektion diskutiert. Zwei in der Literatur bekannte Methoden, um modulierte Signale vor der Detektion zu filtern, wurden analysiert. Diese Methoden haben sich als nicht geeignet erwiesen mehrere Partikel innerhalb der Detektionszone zu unterscheiden. Die Ursache hierfür sind hohe Nebenmaxima im gefilterten Signalverlauf.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde ein neues Filter nach dem Prinzip der Fehlerminimierung zwischen gefiltertem und beabsichtigtem Signalverlauf entworfen. Dieses Filter kann prinzipiell beliebige Signalformen, also räumlich modulierte, aber auch nicht modulierte, in für die Detektion geeignete Signalformen überführen. Gleichzeitig kann ein Kompromiss zwischen Rauschunterdrückung und Fehler in der Signalform getroffen werden.

Bei der Untersuchung des Einflusses von Geschwindigkeitsvariation wurde festgestellt, dass eine gute Unterdrückung der Nebenmaxima eine sehr geringe Geschwindigkeitsvariation erfordert. Dies hat zwar nur geringe Auswirkungen für nichtmodulierte Signale, bei langen Modulationsmustern übersteigen die hohen Anforderungen an die Geschwindigkeitsvariation jedoch die mit der mikrofluidischen Partikelfokussierungsstruktur erreichten Ergebnisse.

6 Signalqualität des Gesamtsystems

In diesem Kapitel wird eine gesamtheitliche Betrachtung der Signalqualität eines Partikeldetektionssystems in Abhängigkeit der Systemparameter entwickelt. Hierzu wird ein Signalmodell aufgestellt in welchem die detektierte Ladung pro Partikel sowie das Rauschen in Abhängigkeit der Systemgeometrie, der Partikelgeschwindigkeit sowie optischer Eigenschaften berechnet wird. Mit diesem Modell lassen sich relative Änderungen der Signalqualität bei Änderung eines dieser Parameter abschätzen. Für ein reales System sind nur drei Messungen notwendig. Erstens das Dunkelrauschen ohne Beleuchtung, zweitens das Rauschen mit Beleuchtung jedoch ohne Partikel und drittens eine Messung des Stromes mit einem bekannten Partikel von bekannter Intensität. In diesem Kapitel wird ein Augenmerk auf den Einfluss der Partikelgeschwindigkeit und der Aperturlänge gelegt. Eine Kenngröße für ein System ist die Aperturlänge, ab welcher das zusätzliche Rauschen bei Beleuchtung das Dunkelrauschen übersteigt. Längere Aperturlängen führen nur zu geringen Verbesserungen der Signalqualität. Kürzere Aperturlängen in Verbindung mit einer geringeren Partikelgeschwindigkeit sind hingegen sinnvoll, da hierbei der maximale Partikeldurchsatz erhalten bleibt und das zusätzliche Rauschen bei Beleuchtung minimiert wird. Eine weitere Untersuchung beschäftigt sich mit den im System eingesetzten Absorptionsfiltern. Hier wird die Signalqualität alternativer Filtermaterialien ermittelt und deren Filterschichtdicke simulativ optimiert.¹

Beim Design eines mikrofluidischen Systems müssen eine Vielzahl von Komponenten und Parametern gewählt werden. Hierzu zählen die geometrischen

¹Teile dieses Kapitels wurden bereits in [72, 149] veröffentlicht.

Eigenschaften des Systems – insbesondere die Abmessung der Apertur für die Definition des Messbereichs, die Geschwindigkeit der zu messenden Partikel, die optischen Eigenschaften wie die spektralen Eigenschaften von Lichtquelle, Detektor, Fluoreszenzfarbstoff und der optischen Filter und die elektrischen Eigenschaften wie die Intensität der Anregelichtquelle und Rauscheigenschaften der Komponenten.

Alle diese Parameter haben einen Einfluss auf die Signalqualität und damit die Fehlerstatistik des Gesamtsystems. Deshalb soll hier ein einfaches und allgemeines Modell entwickelt werden um den Einfluss der einzelnen Parameter auf die Signalqualität abschätzen zu können. Des Weiteren soll für den im vorherigen Kapitel betrachteten Fall von räumlicher Modulation eine obere Abschätzung der Signalqualität möglich sein. Als Gütekriterium wird hier das PSNR herangezogen. Dieses setzt sich aus dem Signalwert der Messung im Verhältnis zum auftretenden Rauschen zusammen. Im vorliegenden Fall ist es sinnvoll die pro Partikel detektierte Ladung zu betrachten.

Der Schwerpunkt dieses Kapitels ist nicht das detaillierte Verständnis jeden Aspektes des Partikeldetektionssystems sondern die Abschätzung des relativen Einflusses der verschiedenen Parameter. Hierfür werden aus Messungen am in Kapitel 3 diskutierten Fluoreszenzsystem wesentliche Kenngrößen extrahiert und der Einfluss von Geschwindigkeit, Aperturlänge sowie der Absorptionsfilter analysiert.

Tabelle 6.1: Liste der in Kapitel 6 verwendeten Symbole.

Symbol	Einheit	Bedeutung
a_{mod}	1	Anteil der offenen Subaperturen
A_{fl}	m^2	Partikelquerschnitt
B_{Chase}	MESF	Äquivalente Anzahl von Fluoreszenzmolekülen im Hintergrundlicht
Q	As	Detektierte Ladung
E_{ex}	Wm^{-2}	Anregeintensität
F_{Chase}	MESF	Anzahl von Fluoreszenzmolekülen
i	A	Strom

Fortsetzung von Tabelle 6.1.

Symbol	Einheit	Bedeutung
I_{bias}	A	Mittelwert des Hintergrundstromes
i_{sys}	A	Durch Partikel erzeugte Stromstärke
K_{mod}	1	Länge der Modulationssequenz
l	m	(Sub-)Aperturlänge
l_{eff}	m	Gesamtlänge der geöffneten Subaperturen
$N_{0,i}$	A^2Hz^{-1}	Rauschleistungsdichte des Stromes
N_{det}	1	Anzahl von Ladungsträgern pro detektiertem Photon
n	A	Rauschstrom
p_k	1	Öffungsgrad der Subapertur
PSNR	1	Verhältnis von Signalwert zu Rauschen
q	As	Elementarladung
Q_{Chase}	MESF^{-1}	Anzahl von Ladungsträgerpaketen pro Fluoreszenzmolekül
T	s	Abtastraster
v	ms^{-1}	Partikelgeschwindigkeit
α_{bias}	AmW^{-1}	Transmissionsgrad für Biaslicht
η_{coll}	AW^{-1}	Sammeleffizienz des Detektors
μ_{Poisson}	1	Mittlere Anzahl von Ladungsträgerpaketen
μ_Q	As	Mittlere Ladung pro Partikel
σ_i	A	Standardabweichung des Stroms
σ_Q	As	Standardabweichung der gesammelten Ladung

6.1 Signalmodell

Um ein kompaktes mathematisches Signalmodell zu bilden, welches auch Modulation erlaubt, muss das in Kapitel 4.2.1 vorgestellte Modell leicht

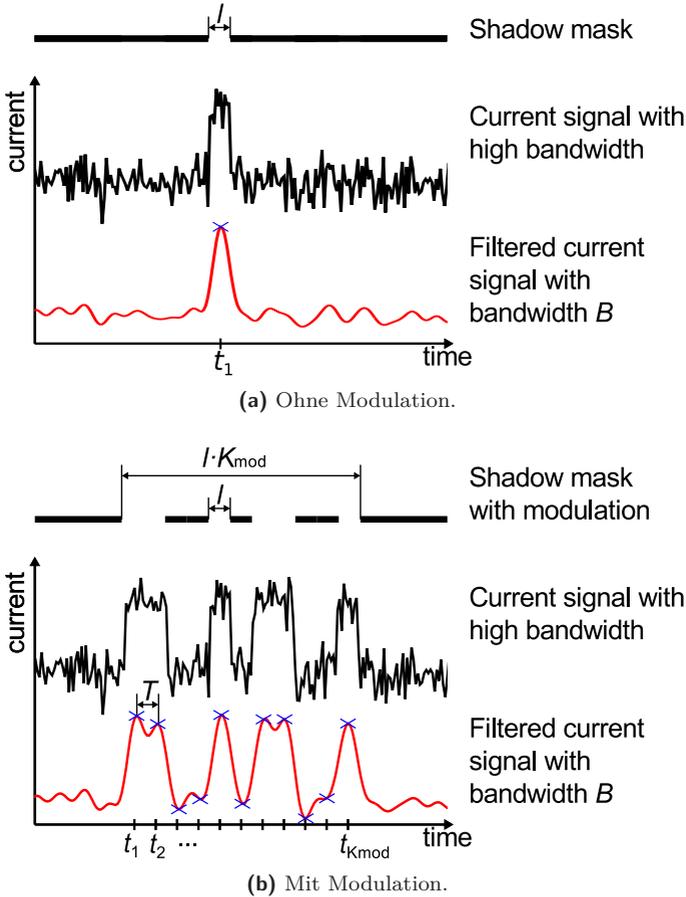


Abbildung 6.1: Schematisches Diagramm der Pulsformen von Signalen ohne bzw. mit räumlicher Modulation über eine Schattenmaske. Das ungefilterte Signal zeigt den rechteckigen Verlauf der Abschattungen durch die Apertur aber auch breitbandiges Rauschen. Im tiefpassgefilterten Signal wurde das breitbandige Rauschen eliminiert. Die Stromwerte zu den Abtastzeitpunkten t_k sind mit einem x markiert.

abgewandelt werden. Die dort frei wählbare Form der Signalpulse h_P und Filterimpulsantwort h_E wird so eingeschränkt, dass das Rauschen und die partikelgenerierten Signale zwischen den Abtastzeitpunkten t_k paarweise unabhängig sind. Dies entspricht bei weißem Rauschen der Filterung mittels eines idealen Tiefpasses. Hierdurch wird die Form von h_E festgelegt. Ebenfalls wird im nicht-modulierten Fall $h_P = h_E$ gewählt, um eine ideale Filterung zu bewerkstelligen. Im modulierten Fall wird h_P aus mehreren, anhand des Modulationsmusters zeitlich versetzten, Pulsen der Form h_E zusammengesetzt. Die Impulsantwort eines idealen Tiefpasses enthält sowohl positive als auch negative Werte. Positive Signalwerte können in einem Fluoreszenzsystem durch unterschiedlich stark gewählte Abschattung erzeugt werden. Bei negativen Signalwerten gelingt dies jedoch nicht. Die prinzipielle Eigenschaft, dass das optisch modulierte Signal zu unterschiedlichen Zeitpunkten t_k entsprechende Werte annimmt, ist jedoch gut annäherbar. Es ist also anzunehmen, dass die in diesem Kapitel gemachten Aussagen sich auf reale Systeme gut übertragen lassen.

Im Signalmodell dient das am Photodetektor generierte rauschfreie Stromsignal s mit additivem Rauschen n als Eingangsgröße. Damit gilt für das verrauschte Stromsignal $i = s + n$. Aus dem Spannungssignal u in Gleichung 4.1 kann das Stromsignal per Division mit der Transimpedanzverstärkung A_{total} berechnet werden. Die Verwendung des Stromsignals hat hier den Vorteil, dass Eingangsgrößen betrachtet werden, die unabhängig vom verwendeten Verstärkungsfaktor sind.

Die Partikelgeschwindigkeit v wird als konstant angenommen. Dies setzt eine funktionierende Partikelfokussierung voraus. In welchem Maße Abweichungen der Geschwindigkeit sich auf das Messergebnis auswirken kommt auf die verwendete Filtermethode an. Im nichtmodulierten Fall ist ein sehr geringer negativer Einfluss zu erwarten, vergleiche hierzu Kapitel 4.2.19. Hier sollten sich die in diesem Kapitel erlangten Ergebnisse mit nur geringen Abweichungen auch auf Systeme ohne Partikelfokussierung übertragen lassen. Im Falle von Modulation können die Anforderungen an die Partikelfokussierung jedoch sehr hoch sein, wie in Kapitel 5.4 gezeigt wurde.

Das Verhältnis aus Partikelgeschwindigkeit v ergibt zusammen mit der Basislänge der Apertur l das Zeitraster T für die Abtastung des Signals zu

$$T = \frac{l}{v}. \quad (6.1)$$

Die zugehörige einseitige Bandbreite des zu verwendenden idealen Tiefpassfilters h_E beträgt

$$B = \frac{1}{2}T^{-1}. \quad (6.2)$$

In Abbildung 6.1a werden das ungefilterte und das tiefpassgefilterte Signal bei einer einfachen Apertur dargestellt. Die hochfrequenten Rauschanteile werden durch das Tiefpassfilter entsprechend unterdrückt. Dieses Schema wird um eine Modulation der Länge K_{mod} erweitert und in Abbildung 6.1b dargestellt. Hierbei werden mehrere Abtastwerte zu den Zeitpunkten t_k im Abstand T genommen. Die Grundlänge l bleibt hierbei konstant, die Gesamtlänge vergrößert sich also. Es wird angenommen, dass die Abtastzeitpunkte so gewählt werden, dass diese immer genau dem partikelgenerierten Signal entsprechen.

Das Muster der Modulation wird durch die zugehörige Sequenz

$$p_k = \begin{cases} 1 & \text{Subapertur offen} \\ 0 & \text{Subapertur geschlossen} \end{cases} \quad (6.3)$$

festgelegt. In Abbildung 6.1 ist ein Beispiel eines Signals mit bzw. ohne Modulation dargestellt.

Aus dem tiefpassgefilterten Signal i enthält man über Integration die Ladung Q mit

$$Q = T \sum_{k=1}^{K_{\text{mod}}} i(t_k) p_k. \quad (6.4)$$

Bei dieser Summe sind die einzelnen Abtastzeitpunkte gleichwertig, es kommt also nicht auf die eigentliche Form des Musters an, lediglich der Anteil von geöffneten Subaperturen ist entscheidend und wird über den Faktor

$$a_{\text{mod}} = \frac{1}{K_{\text{mod}}} \sum_{k=1}^{K_{\text{mod}}} p_k^2 \quad (6.5)$$

angegeben.

Bei den hier untersuchten Modulationsmustern ist grundsätzlich etwa die Hälfte der Aperturen geschlossen, sodass $a_{\text{mod}} = 0.5$ für $K_{\text{mod}} \geq 2$ verwendet wird. Der nichtmodulierte Fall wird mit $K_{\text{mod}} = 1$ und $a_{\text{mod}} = 1$ abgedeckt. Somit gilt für die effektive Aperturlänge allgemein $l_{\text{eff}} = l a_{\text{mod}} K_{\text{mod}}$.

Der Strom zu den Abtastzeitpunkten hat die Form

$$i(t_k) = i_{\text{sys}} \cdot p_k + n(t_k) - i_{\text{offset}}. \quad (6.6)$$

Hier gibt der Faktor i_{sys} den Stromwert an, den ein Partikel im Messbereich generiert. Dieser wird weiter unterteilt zu

$$i_{\text{sys}} = E_{\text{ex}} A_{\text{fl}} \eta_{\text{coll}}, \quad (6.7)$$

mit der Anregeintensität E_{ex} , der effektiven Querschnittfläche des Partikels A_{fl} und der Sammeleffizienz η_{coll} . Der Wert von i_{offset} wird so gewählt, dass $n - i_{\text{offset}}$ mittelwertfrei ist. Dies kann beispielsweise durch eine Rekonstruktion der Nulllinie des Messsignals geschehen.

Gleichung 6.4 lässt sich damit durch Einsetzen der Gleichungen 6.5, 6.6 und 6.7 zu

$$Q = T a_{\text{mod}} K_{\text{mod}} i_{\text{sys}} \quad (6.8)$$

vereinfachen.

6.1.1 Signalqualität

Zur Bewertung der Signalqualität wird wieder das in Gleichung 2.22 definierte PSNR herangezogen. Im vorliegenden Fall wird das PSNR über

das quadrierte Verhältnis des Mittelwerts der aufgesammelten Ladung μ_Q zu ihrer Standardabweichung σ_Q bestimmt und beträgt

$$\text{PSNR} = \frac{\mu_Q^2}{\sigma_Q^2}. \quad (6.9)$$

In Durchflusszytometern werden diese Werte beispielsweise aus der Form der aufgenommenen Histogramme abgeleitet [150]. Im Gegensatz dazu können hier direkt die statistischen Parameter aus dem Signalmodell abgeleitet werden. Da der Erwartungswert hier unabhängig vom mittelwertfreien Rauschen ist, folgt aus den Gleichungen 6.1, 6.4, 6.6, 6.7

$$\mu_Q = v^{-1} E_{\text{ex}} A_{\text{fl}} \eta_{\text{coll}} l_{\text{eff}}. \quad (6.10)$$

Damit steht schon ein für die Berechnung des PSNR benötigter Faktor fest. Die Berechnung von σ_Q jedoch stellt sich deutlich komplexer dar, da hier verschiedene Rauschquellen eingehen, die im Folgenden getrennt betrachtet werden.

Der in Kapitel 2.3.2.8 eingeführte Variationskoeffizient (engl. *coefficient of variation CV*), welcher im Bereich der Durchflusszytometrie üblicherweise verwendet wird, bezieht sich auf die Streuung der Messwerte im Verhältnis zu deren Mittelwert. Wenn die Positionen der Partikel exakt bekannt sind, gilt $\text{CV} = \text{PSNR}^{-1}$ bezogen auf das PSNR, welches das Signal am Detektionsalgorithmus hat. Bei der Detektion über lokale Maxima und Werte des PSNR kleiner etwa 15 dB fällt der CV etwas niedriger aus. Grund hierfür ist dass der Mittelwert der detektierten Maxima etwas größer als der eigentliche Mittelwert ist und die Standardabweichung der Maxima etwas geringer ist. Dieser Sachverhalt wird in Kapitel 4.2.18 in Abbildung 4.14 dargestellt.

6.1.2 Rauschquellen

Das im System auftretende Rauschen wird in drei Anteile aufgeteilt. 1) Schrotrauschen durch die vom zu messenden Partikel emittierte Fluoreszenz. 2) Schrotrauschen aufgrund des Hintergrundlichtes, welches z.B. von

den Absorptionsfiltern nicht vollständig ausgefiltert wird. 3) Dunkelrauschen welches unabhängig vom optischen System in den elektronischen Komponenten auftritt.

Das von der Fluoreszenz verursachte Schrotrauschen kann nicht vermieden werden und tritt in jedem Messsystem auf. Idealerweise stellt es die einzige Rauschquelle dar. Das vom Hintergrundlicht verursachte Schrotrauschen hängt stark von der Systemgeometrie und optischen Eigenschaften ab. An dieser Stelle haben Änderungen der Systemparameter einen großen Einfluss. Das Dunkelrauschen wiederum ist vom elektronischen System gegeben. Hierauf kann höchstens indirekt über eine Reduktion der notwendigen Detektorfläche oder die Auslegung des Transimpedanzverstärkers ein geringer Einfluss genommen werden.

Im Folgenden werden mit dem Subskript fl Variablen mit durch Fluoreszenz ausgelöstem Schrotrauschen gekennzeichnet, während für das Hintergrundrauschen das Subskript bias und für das Dunkelrauschen das Subskript dark verwendet wird.

6.1.3 Schrotrauschen durch Fluoreszenz

Das durch die Fluoreszenz ausgelöste Schrotrauschen kann durch einen Poissonprozess beschrieben werden. Jedes detektierte Photon erzeugt im Detektor ein Ladungsträgerpaket. In einer herkömmlichen Photodiode ist das ein Elektron-Loch-Paar, welches effektiv wie ein einzelner Ladungsträger im Stromsignal sichtbar wird. In Detektoren mit interner Verstärkung, z.B. Avalanche-Photodioden (engl. *avalanche photodiode*, APD) oder Photovervielfacherröhren (engl. *photomultiplier tube*, PMT) tragen pro detektiertem Photon mehrere Ladungsträger zum Stromsignal bei. Da für die Poisson-Verteilung die Anzahl der Ereignisse wichtig ist muss dies mit dem Faktor N_{det} berücksichtigt werden.

Da bei Schrotrauschen die einzelnen Ereignisse unabhängig auftreten und jeweils einen kurzen Puls mit der Impulsantwort des Detektionssystems auslösen, kann dieses Rauschen im für die Messung verwendeten Frequenzbereich als weiß angenommen werden.

Aus der durchschnittlich detektierten Ladung pro Partikel μ_Q ergibt sich mit der Elementarladung q die Anzahl der detektierten Photonen als

$$\mu_{\text{Poisson}} = \frac{\mu_Q}{N_{\text{det}}q}. \quad (6.11)$$

Da für die Poissonverteilung $\sigma_{\text{Poisson}} = \sqrt{\mu_{\text{Poisson}}}$ gilt kann hieraus die Standardabweichung für die detektierte Ladungsträgeranzahl berechnet werden. Hierzu muss σ_{Poisson} mit $N_{\text{det}}q$ multipliziert werden, um die Ladung pro detektiertem Photon zu berücksichtigen. Also ergibt sich für die Standardabweichung bei durch Fluoreszenz ausgelöstem Schrotrauschen

$$\sigma_{Q,\text{fl}} = \sqrt{N_{\text{det}}q\mu_Q}. \quad (6.12)$$

Wird Gleichung 6.12 und Gleichung 6.10 in Gleichung 6.9 eingesetzt resultiert das PSNR zu

$$\text{PSNR}_{\text{fl}} = \frac{A_{\text{fl}}\eta_{\text{coll}}E_{\text{ex}}l_{\text{eff}}}{vN_{\text{det}}q}. \quad (6.13)$$

Das PSNR reduziert sich umgekehrt proportional zur Anzahl der detektierten Photonen. Wird N_{det} im Faktor η_{coll} berücksichtigt kann N_{det} in Gleichung 6.13 gekürzt werden und PSNR_{fl} ist unabhängig vom Multiplikationsfaktor des Detektors. Ein Zugewinn an Signalqualität ergibt sich folglich erst wenn auch Dunkelrauschen berücksichtigt wird.

6.1.3.1 Schrotrauschen durch Hintergrundlicht

Das durch das Hintergrundlicht ausgelöste Rauschen folgt prinzipiell den gleichen statistischen Gesetzmäßigkeiten wie das durch die Fluoreszenz ausgelöste Rauschen, jedoch sind hier andere Größen maßgeblich.

Der vom Hintergrundlicht ausgelöste mittlere elektrische Strom I_{bias} hängt von der Anregeintensität E_{ex} , einem Wert α_{bias} , der unter anderem die Filtertransmission für unerwünschtes Licht beschreibt sowie der effektiven Länge der Apertur l_{eff} ab und es ergibt sich

$$I_{\text{bias}} = E_{\text{ex}}\alpha_{\text{bias}}l_{\text{eff}}. \quad (6.14)$$

Mit den Gleichungen 6.4, 6.5 kann mit $i = I_{\text{bias}}$ die hierdurch pro Partikel zusätzlich aufgrund des Hintergrundlichtes detektierte Ladung $\mu_{\text{Q,bias}}$ berechnet werden

$$\mu_{\text{Q,bias}} = T I_{\text{bias}} a_{\text{mod}} K_{\text{mod}}. \quad (6.15)$$

Bei den normalen Partikeldetektionen wird der Mittelwert des vom Hintergrundlicht erzeugte Stromes abgezogen, sodass I_{bias} das Messergebnis nicht direkt beeinflusst. Das dadurch jedoch hervorgerufenen Rauschen führt jedoch zu Schwankungen im Messergebnis. Die pro Partikel detektierte Ladung $\mu_{\text{Q,bias}}$ steigt quadratisch an, wenn K_{mod} erhöht wird. Dies liegt daran, dass durch die zusätzliche Aperturlänge der Wert von I_{bias} ansteigt, aber gleichzeitig auch die Integrationsdauer um denselben Faktor erhöht wird.

Die Annahme, dass I_{bias} eine Poissonverteilung erzeugt, rührt von der Annahme her, dass die von LEDs emittierten Photonen untereinander statistisch unabhängig sind. Untersuchungen hierzu zeigen geringe Abweichungen [118, 151]. Interessant ist, dass, wenn eine LED bei relativ hohem Strom mit einem großen Vorwiderstand betrieben wird, der erzeugte Photonenstrom ein etwas geringeres Rauschen aufweist als bei einer perfekten Poisson-Statistik zu erwarten wäre. Wenn I_{bias} nicht direkt gemessen, sondern aus dem gemessenen Rauschen zurückgerechnet wird, wird der entsprechende Effekt automatisch mit berücksichtigt.

Im Folgenden wird angenommen, dass die Poisson-Statistik gilt. So kann durch Einsetzen von Gleichung 6.15 in Gleichung 6.12 die Standardabweichung in der Messung ermittelt werden

$$\sigma_{\text{Q,bias}} = l_{\text{eff}} \sqrt{v^{-1} E_{\text{ex}} \alpha_{\text{bias}} N_{\text{detQ}}}. \quad (6.16)$$

Anschließend werden die Gleichungen 6.7, 6.10 und 6.16 in Gleichung 6.9 eingesetzt. Daraus resultiert

$$\text{PSNR}_{\text{bias}} = \frac{A_{\text{fl}}^2 \eta_{\text{coll}}^2 E_{\text{ex}}}{v N_{\text{detQ}} \alpha_{\text{bias}}}. \quad (6.17)$$

Dieses Resultat unterscheidet sich in einigen Aspekten sehr deutlich von Gleichung 6.13. Der wichtigste Aspekt ist, dass der Faktor l_{eff} darin nicht

vorkommt. Wenn Rauschen durch Hintergrundlicht dominant wird, spielt die eigentliche Gesamtlänge der Apertur also keine Rolle mehr. Dies betrifft sowohl die Länge der Subapertur als auch die Modulationslänge. Die Flussgeschwindigkeit hat jedoch weiterhin einen Einfluss. Der Grund hierfür ist, dass bei höherer Gesamtlänge der Apertur zwar die insgesamt detektierte Anzahl von Photonen pro Partikel ansteigt, gleichzeitig jedoch proportional mehr Hintergrundlicht über einen ebenso längeren Zeitraum integriert wird.

Wird der Multiplikationsfaktor des Detektors N_{det} geändert muss dies wie vorhin in η_{coll} berücksichtigt werden, aber zusätzlich auch in α_{bias} , wodurch sich der Faktor N_{det} wiederum kürzen lässt. Auch für diese Rauschquelle bringen multiplizierende Photodetektoren keinen Vorteil.

6.1.4 Dunkelrauschen

Neben den durch bisher diskutierten Rauscheinflüssen gibt es noch eine Reihe weiterer Quellen für Rauschen. Beispielsweise fungieren Widerstände unvermeidlich als eindimensionale Antennen für Schwarzkörperstrahlung und erzeugen im Signal eine entsprechende Rauschspannung bzw. Rauschstrom. Im verhältnismäßig niedrigen Frequenzbereich - hier nur bis zu einigen Kilohertz - ist die Rauschleistungsdichte, wie in Kapitel 2.3.5.1 diskutiert, konstant. Diese Rauschquelle kann also als weiß angenommen werden. Zu beachten sind jedoch weitere Effekte, die beim Transimpedanzverstärker auftreten und das Frequenzspektrum des Rauschens bei tiefen und hohen Frequenzen modifizieren, sodass das Rauschen im für die Messung betrachteten Frequenzbereich möglicherweise nicht als weiß angenommen werden kann. Kurz gefasst wird angenommen, dass mehrere Rauschquellen alle zusammen ein weißes Spektrum erzeugen.

Das weiße Rauschspektrum des Dunkelrauschens kann durch eine spektrale Rauschleistungsdichte $N_{0,i,\text{dark}}$ charakterisiert werden. Die Standardabweichung im Stromsignal ergibt sich dann zusammen mit der Systembandbreite B zu

$$\sigma_{i,\text{dark}}^2 = N_{0,i,\text{dark}} B. \quad (6.18)$$

Nach Gleichung 6.2 hängt die Systembandbreite von der Abtastfrequenz ab und es ergibt sich

$$\sigma_{i,\text{dark}}^2 = \frac{1}{2} N_{0,i,\text{dark}} T^{-1}. \quad (6.19)$$

Hierbei gilt mit Gleichung 6.1 ein fester Zusammenhang zwischen der Basislänge l und der Partikelgeschwindigkeit v . Durch Einsetzen der Gleichungen 6.4, 6.1 in Gleichung 6.19 resultiert für die Standardabweichung der gemessenen Ladung

$$\sigma_{Q,\text{dark}} = \sqrt{\frac{1}{2} v^{-1} l_{\text{eff}} N_{0,i,\text{dark}}}. \quad (6.20)$$

Durch Einsetzen von Gleichung 6.10 in Gleichung 6.9 ergibt sich das PSNR für das Dunkelrauschen zu

$$\text{PSNR}_{\text{dark}} = \frac{A_{\text{fl}}^2 \eta_{\text{coll}}^2 E_{\text{ex}}^2 l_{\text{eff}}}{\frac{1}{2} v N_{0,i,\text{dark}}}, \quad (6.21)$$

Aus dieser Gleichung ist ersichtlich, dass eine Erhöhung der Aperturlänge zu einer Verbesserung der Signalqualität führt.

6.1.5 Kombinierte Rauschströme

Da die Rauschquellen alle als unabhängig angenommen werden können addieren sich deren Leistungen auf. Für das PSNR gilt damit

$$\text{PSNR}_{\text{sum}} = \frac{\mu_Q^2}{\sigma_{Q,\text{fl}}^2 + \sigma_{Q,\text{bias}}^2 + \sigma_{Q,\text{dark}}^2 + \sigma_{Q,\text{other}}^2}. \quad (6.22)$$

Der Faktor σ_{other} beschreibt zusätzliche Einflüsse, beispielsweise Variationen in der Partikelgröße [150].

Da die einzelnen Anteile quadriert aufsummiert werden, spielen Beiträge, die wesentlich kleiner sind als der größte Einzelanteil, keine Rolle für die Qualität der Messung.

6.1.6 Hintergrund und Effizienz

Von Chase et al. [150] werden zwei Parameter eingeführt, mit welchen die Empfindlichkeit eines Durchflusszytometers definiert werden kann. Der Parameter Q_{Chase} gibt die Lichtausbeute an und der Parameter B_{Chase} gibt die Menge an Hintergrundlicht pro Messung an. Diese Parameter werden in MESF-Einheiten angegeben und können von den Ergebnissen dieser Arbeit direkt abgeleitet werden.

Der Parameter Q_{Chase} ist als Anzahl von Ladungsträgerpaketen pro Fluoreszenzeinheit definiert. Mit dem MESF-Wert des Partikels als F_{Chase} und μ_{Poisson} aus Gleichung 6.11 ergibt sich

$$Q_{\text{Chase}} = \frac{\mu_{\text{Poisson}}}{F_{\text{Chase}}}. \quad (6.23)$$

Der Faktor B_{Chase} wiederum gibt die Standardabweichung im Messsignal an die durch das Hintergrundlicht erzeugt wird. Der Wert von B_{Chase} entspricht der in MESF-Einheiten gemessenen Intensität eines Partikels, der dieselbe Amplitude erzeugt. Somit ergibt sich

$$B_{\text{Chase}} = \frac{1}{Q_{\text{Chase}}} \frac{\sqrt{\sigma_{Q,\text{bias}}^2 + \sigma_{Q,\text{dark}}^2}}{N_{\text{det}Q}}. \quad (6.24)$$

Damit ist die Verbindung zwischen den hier erlangten Messergebnissen und den bei klassischen Durchflusszytometern erlangten Ergebnissen hergestellt.

6.1.7 Charakteristische Aperturlänge

Da das Rauschen durch das Hintergrundlicht $\sigma_{Q,\text{bias}}$ bei Verlängerung der Apertur stetig zunimmt während das Dunkelrauschen $\sigma_{Q,\text{dark}}$ konstant bleibt, kann durch Gleichsetzen der rechten Seite von Gleichung 6.16 mit Gleichung 6.20 und Auflösen nach l_{eff} die charakteristische Aperturlänge des Systems zu

$$l_{\text{eff,crossover}} = \frac{N_{0,\text{dark}}}{2E_{\text{ex}}\alpha_{\text{bias}}N_{\text{det}Q}}$$

ermittelt werden. Ab dieser Länge dominiert das Rauschen durch Hintergrundlicht über das Dunkelrauschen.

Bei Vernachlässigung von $\sigma_{Q,fl}$ gilt für Werte $l_{eff} \ll l_{eff,crossover}$ mit guter Näherung $PSNR_{dark}$ aus Gleichung 6.21 und für Werte $l_{eff} \gg l_{eff,crossover}$ gilt $PSNR_{bias}$ aus Gleichung 6.17.

6.2 Messungen

Um die in diesem Kapitel hergeleiteten Gleichungen auf ein reales System anwenden zu können sind Messungen des Dunkelrauschens, des Rauschen durch Hintergrundlicht und der Detektionseffizienz notwendig.

Für das in Kapitel 3 vorgestellte Fluoreszenzmesssystem werden für unterschiedliche Aperturlängen Messungen des Hintergrundrauschens durchgeführt. Die Aperturlängen betragen 1779 μm , 888 μm , 436 μm , 211 μm , 96 μm , 49 μm und 18 μm . Zusätzlich wird eine Messung mit komplett geschlossener Apertur durchgeführt. Vor der Auswertung wird die Abtastrate der mit 48 kHz aufgenommenen Signale um den Faktor 64 reduziert. Ein Medianfilter von 1000 Abtastwerten Länge entfernt danach den Offset. Eine einzelne Partikelmessung aus Kapitel 3 wird ausgewertet, um die Referenzamplitude von 394 pA für den Partikel mit $4.9 \cdot 10^6$ MESF zu bestimmen.

6.3 Messergebnisse und Diskussion der Systemparameter

Im Folgenden werden zuerst aus den Messungen die relevanten Systemparameter ermittelt. Eine spektrale Betrachtung des Rauschens zeigt unter welchen Bedingungen die Annahme eines weißen Rauschspektrums gerechtfertigt ist. Danach werden die relativen Änderungen der Signalqualität bei Variation von Systemparametern untersucht.

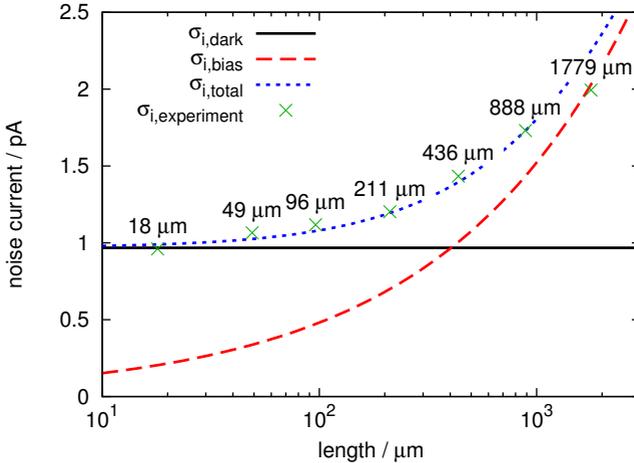


Abbildung 6.2: Längenabhängigkeit des gemessenen Rauschstromes für eine Bandbreite von 375 Hz (Symbole) im Vergleich zu den erwarteten Werten des Dunkelrauschens (durchgezogene Linie), des Rauschens durch Hintergrundlicht (gestrichelte Linie), sowie des Gesamtrauschens (gepunktete Linie).

6.3.1 Ermittelte Systemparameter

Aus der Dunkelmessung ergibt sich ein Stromrauschen von $\sigma_{i,\text{dark}} = 0.958 \text{ pA}$, was einer spektralen Rauschleistungsdichte von $N_{0,\text{dark}} = 2.45 \cdot 10^{-27} \text{ A}^2\text{Hz}^{-1}$ entspricht. Hiervon können $5.52 \cdot 10^{-28} \text{ A}^2\text{Hz}^{-1}$ dem Rauschen der Rückkoppelwiderstände des Transimpedanzverstärkers zugeschrieben werden. Das restliche Rauschen stammt aus unterschiedlichen Quellen wie Halbleitern und anderen in späteren Stufen der Verstärkerschaltung befindlichen Widerständen. Einen großen Einfluss hat auch eine nicht-ideale Auslegung des Verstärkers für den Dunkelfall, welche zu einem Anstieg im Rauschspektrum bei niedrigen und hohen Frequenzen führt, wie nachfolgend in Kapitel 6.3.2 näher erläutert wird.

Da die Aperturlänge von $1779 \mu\text{m}$ die Kantenlänge der LED von $1000 \mu\text{m}$ deutlich übersteigt, ist bei dieser Konfiguration kein von der Apertur sau-

ber beschränktes Signal zu erwarten. Dies zeigte sich schon in der Pulsform in Abbildung 3.13b. Für das Rauschen ist ebenfalls zu erwarten, dass der gemessene Rauschwert einer Aperturlänge zwischen der Kantenlänge der LED und der eigentlichen Aperturlänge entspricht. Deshalb wird die Messung mit einer Aperturlänge von $888\ \mu\text{m}$ verwendet, um das längenabhängige Rauschen zu bestimmen. Der resultierende Rauschstrom beträgt $\sigma_{i,888\mu\text{m}} = 1.71\ \text{pA}$. Nach Abzug des Dunkelstroms ergibt sich der längenabhängige Hintergrundstrom von $I_{\text{bias}}l^{-1} = E_{\text{ex}}\alpha_{\text{bias}} = 18.96\ \mu\text{Am}^{-1}$.

In Abbildung 6.2 ist der längenabhängige Rauschstrom für die unterschiedlichen Aperturlängen zusammen mit dem theoretischen Verlauf aus den ermittelten Werten aufgetragen. Für Aperturlängen kürzer als die Kantenlänge der LED ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung. Die effektive Aperturlänge für die $1779\ \mu\text{m}$ lange Apertur entspricht etwa $1300\ \mu\text{m}$ und liegt damit wie erwartet zwischen der eigentlichen Länge und der Kantenlänge der LED.

Der Wert von $l_{\text{eff,crossover}}$ für das hier untersuchte System beträgt $403\ \mu\text{m}$. Folglich wird ab diesem Wert der Anteil des Hintergrundlichtes dominant.

Die Amplitude des gemessenen Partikels mit $4.9 \cdot 10^6$ MESF beträgt $E_{\text{ex}}A_{\text{fl}}\eta_{\text{coll}} = 394\ \text{pA}$. Das Signal dieses Partikels ist viel größer als das Hintergrundrauschen. Um das System für Partikel mit geringerer Intensität zu optimieren wird für die folgenden Untersuchungen ein um zwei Größenordnungen schwächeres Signal angenommen. In Kapitel 3 liegt dies an der Grenze der Detektierbarkeit.

Legt man die MESF-Werte aus dem Datenblatt der Partikel zugrunde können die Kenngrößen des Durchflusszytometers ermittelt werden. Da die Spektren der zur Kalibrationsmessung verwendeten Geräte von den hier verwendeten Spektren der LED abweichen, sind diese Werte als grobe Einschätzung zu sehen. Aus Gleichung 6.23 ergibt sich eine Effizienz der Fluoreszenzdetektion von $Q_{\text{Chase}} = 0.96$ Ladungspaketen pro MESF bei $v = 0.678\ \text{ms}^{-1}$ und $l = 1300\ \mu\text{m}$. Nach Gleichung 6.24 ergibt sich eine Hintergrundintensität von $B_{\text{Chase}} = 0.98 \cdot 10^9$ MESF. Im Vergleich mit etablierten Durchflusszytometern aus Referenz [150] ist die Detektionseffizienz etwa zwei Größenordnungen besser, aber das Hintergrundsignal um sechs Größenordnungen höher.

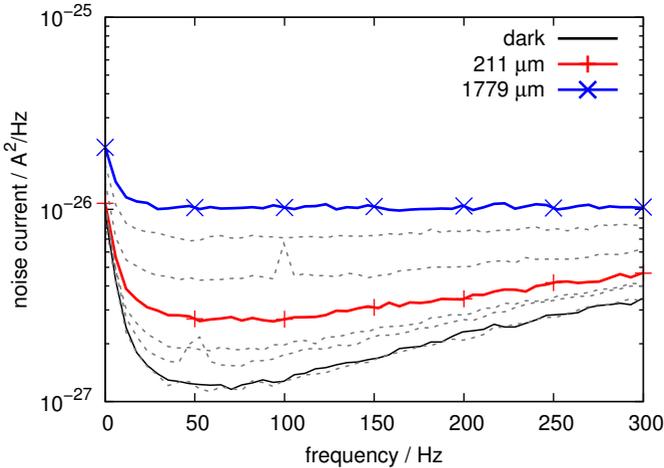


Abbildung 6.3: Gemessene spektrale Rauschleistungsdichte aufgetragen über der Frequenz für die untersuchten Aperturlängen. Die Rauschleistung steigt ausgehend vom Dunkelfall (durchgezogene Kurve ohne Symbole) bei Verlängerung der Apertur an (durchgezogene Kurve mit +- bzw. x-Symbolen für 211 µm bzw. 1779 µm Aperturlänge). Die gestrichelten Linien stellen die Ergebnisse der dazwischen liegenden Aperturlängen dar.

6.3.2 Rauschspektren

Für die Herleitung der statistischen Eigenschaften wird für das Rauschen vereinfachend angenommen, dass es ein weißes Frequenzspektrum besitzt. Diese Eigenschaft ist im allgemeinen in natürlichen Systemen nicht für alle Frequenzen gegeben. Deshalb wird der für die Untersuchung wesentliche Frequenzbereich analysiert und in Abbildung 6.3 für die untersuchten Öffnungslängen dargestellt. Deutlich ist hier zu sehen, dass das Dunkelrauschspektrum eine Frequenzabhängigkeit aufweist. Diese beinhaltet erhöhtes niederfrequentes Rauschen unterhalb von ca. 20 Hz und einen Anstieg der Rauschleistung für hohe Frequenzen ab etwa 100 Hz. Das zusätzliche Rauschen, welches durch das Hintergrundlicht erzeugt wird, hat jedoch ein weißes Spektrum und dominiert das Rauschspektrum für

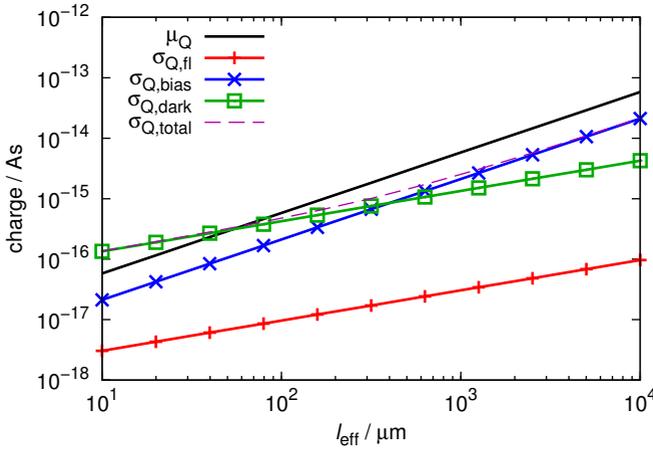


Abbildung 6.4: Berechnete Werte des Signalmittelwerts μ_Q und der Rauschbeiträge σ_Q bei variabler Aperturlänge aber konstanter Partikelgeschwindigkeit von $v = 0.678 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. Bei wachsender effektiver Aperturlänge l_{eff} steigen der Signalmittelwert und das Rauschen durch Hintergrundlicht linear an. Dunkelrauschen und Rauschen aus Fluoreszenz steigen proportional zur Wurzel von l_{eff} an.

große Aperturlängen. In diesem Fall stimmt die Annahme eines weißen Rauschspektrums sehr gut. Die Frequenzabhängigkeit des Dunkelrauschens erklärt, dass das dabei gemessene Stromrauschen höher ist als allein aus den Rückkoppelwiderständen der Transimpedanzverstärker zu erwarten wäre. Um diese Diskrepanz zu beheben ist der Einsatz von hochwertigen Halbleiterbauteilen notwendig.

6.3.3 Konstante Partikelgeschwindigkeit

Die in Kapitel 3.1.1 benutzte Fokussierungsstruktur erfordert eine konstante Flussgeschwindigkeit, um eine gute Flokussierung zu erlangen, was das System auf eine bestimmte Partikelgeschwindigkeit festlegt. Für die erste

Untersuchung wird deshalb die Partikelgeschwindigkeit konstant gehalten und die effektive Länge der Apertur $l_{\text{eff}} = l_{\text{a,mod}}K_{\text{mod}}$ variiert. Im Fall einer nichtmodulierten Apertur gilt $l_{\text{eff}} = l$.

Ausgehend von den gemessenen Parametern kann die Signalqualität nun für unterschiedliche Werte von l_{eff} berechnet werden. In Abbildung 6.4 ist der Einfluss der effektiven Aperturlänge auf die Beiträge des Rauschens sowie des Mittelwertes der Ladung dargestellt. Das Rauschen durch Fluoreszenz ist hier vernachlässigbar. Dies liegt daran, dass die untersuchte Partikelintensität relativ dunkel ist im Vergleich zum Hintergrundlicht. Da das Fluoreszenzrauschen proportional zur Wurzel der Intensität anwächst müsste ein Partikel etwa drei Größenordnungen heller sein, sodass das durch Fluoreszenz erzeugte Rauschen das Dunkelrauschen erreichte. Die dominanten Rauschbeiträge sind somit für alle in der Messung vorhandenen Partikelintensitäten das Dunkelrauschen und das vom Hintergrundlicht verursachte Rauschen. Ab der charakteristischen Aperturlänge $l_{\text{eff,crossover}}$ von $403\ \mu\text{m}$ dominiert das Rauschen durch Hintergrundlicht. Die Beiträge des Dunkelrauschens und des Fluoreszenzrauschens wachsen proportional zur Wurzel der effektiven Aperturlänge. Die Beiträge des Rauschens durch Hintergrundlicht und die gesammelte Ladung wachsen proportional zur Aperturlänge. Dies hat zur Folge, dass die Signalqualität für große Aperturlängen nicht mehr steigt da der Zugewinn an gesammelter Ladung von der Erhöhung des Rauschens wieder aufgewogen wird.

Für den Fall einer Aperturlänge kürzer als $l_{\text{eff,crossover}}$ gilt für das PSNR näherungsweise Gleichung 6.21. Hier verbessert sich die Signalqualität bei Verlängerung der Apertur. Beim Überschreiten von $l_{\text{eff,crossover}}$ gilt näherungsweise Gleichung 6.17 für das PSNR. Hier steigt die pro Partikel gesammelte Ladung proportional zur Aperturlänge an. Gleichzeitig steigt jedoch die Menge Hintergrundlicht pro Zeiteinheit proportional zur Aperturlänge und die Zeitdauer pro Partikelmessung proportional zur Aperturlänge an. Dies bedeutet, dass das zugehörige Rauschen ebenfalls proportional anwächst. Der Wert des PSNR erhöht sich also für lange effektive Aperturlängen nicht mehr.

Da für Aperturlängen über der kritischen Länge $l_{\text{eff,crossover}}$ nur noch geringe Zugewinne in der Signalqualität zu erreichen sind, muss deshalb

durch eine entsprechend gute spektrale Filterung des Anregelichtes das Hintergrundlicht ausreichend gut unterdrückt werden, sodass $l_{\text{eff,crossover}}$ einen ausreichend großen Wert annimmt.

6.3.4 Räumliche Modulation

In Kapitel 5 wurde die Möglichkeit einer räumlichen Modulation angesprochen. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass die Grundlänge der Apertur l konstant bleibt, jedoch K_{mod} erhöht wird. Die Partikelgeschwindigkeit und der Durchsatz bleiben ebenfalls konstant. Durch Abschattung verringert sich der Faktor a_{mod} von 1 auf 0.5 für $K_{\text{mod}} \geq 2$. Die effektive Aperturlänge entspricht somit der halben gesamten Aperturlänge.

Für die Signalqualität ausschlaggebend ist hier ebenfalls die effektive Aperturlänge l_{eff} und es gilt der in Abbildung 6.4 dargestellte Verlauf mit dem Unterschied, dass nun K_{mod} variiert wird. Während sich bei einer Verlängerung von l der maximal mögliche Partikeldurchsatz reduzieren würde, wird der Wert von l hier fest gewählt und der maximal mögliche Partikeldurchsatz bleibt erhalten.

6.3.5 Konstante Partikelrate

Ein interessanter Fall ist wenn bei Variation der Aperturlänge die Partikelrate konstant gehalten wird. Hierbei wird die Länge der Apertur gemeinsam mit der Partikelgeschwindigkeit erhöht oder verringert. Damit wird der Parameter T und damit die maximale Partikelrate des Systems konstant gehalten.

Das Resultat der Beiträge des Rauschens, sowie der gesammelten Ladung ist wiederum in Abbildung 6.5 aufgetragen. Hierbei zeigt sich, dass die Partikelladung und somit das Rauschen aus Fluoreszenz, aber auch das Dunkelrauschen, unabhängig von der Aperturlänge sind. Einzig das vom Hintergrundlicht verursachte Rauschen nimmt bei Erhöhung der Aperturlänge zu. Somit lässt sich der einfache Schluss ziehen, dass eine

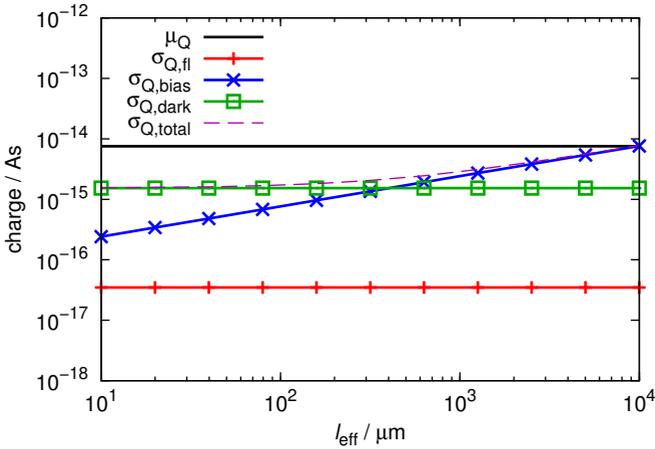


Abbildung 6.5: Werte des Signals und der Rauschbeiträge bei gleichzeitig variierter Aperturlänge und Partikelgeschwindigkeit, sodass die Partikelrate konstant bleibt mit $T = 1.48$ ms. Da die Zeitdauer der Messung konstant bleibt, bleiben die mittlere Ladung sowie die Rauschbeiträge aus Fluoreszenz und Dunkelrauschen ebenfalls konstant. Das gesamte Hintergrundlicht wächst jedoch proportional zur effektiven Aperturlänge l_{eff} und damit wächst der damit verbundene Beitrag zum Rauschen mit der Wurzel der effektiven Aperturlänge.

kürzere Apertur zusammen mit einer geringeren Partikelgeschwindigkeit grundsätzlich besser ist.

In der Praxis treten jedoch Einschränkungen bezüglich der minimalen Aperturlänge bzw. Partikelgeschwindigkeit auf. Einerseits kann eine Partikelfokussierung eine bestimmte Partikelgeschwindigkeit erfordern, womit diese nicht variiert werden kann. In den in Abbildung 3.13b gezeigten Messungen bei Aperturlängen $\leq 96 \mu\text{m}$ tritt der Effekt auf, dass die Pulsbreite sich nicht mehr verringert sondern die Pulshöhe sich reduziert. Dies liegt daran, dass der Partikel einen bestimmten Abstand zur Apertur hat und die Fluoreszenz schräg durch die Apertur auf den Detektor fällt. Hierdurch ergibt sich eine minimale sinnvolle Aperturlänge im betrachteten System von etwa $100 \mu\text{m}$.

6.3.6 Einfluss auf das PSNR

Während in den Abbildungen 6.4 und 6.5 die Einflüsse des Rauschens und der gesammelten Ladung getrennt gezeigt wurden soll hier das PSNR untersucht werden.

Hierfür werden ausgehend vom vorliegenden System mit einer effektiven Aperturlänge von $1300 \mu\text{m}$ einige Modifikationen überprüft. Das resultierende PSNR ist in Abbildung 6.6 dargestellt. Die Ausgangslage ist hier mit einem Dreieck gekennzeichnet.

Eine mögliche Modifikation ist die Verlängerung der Aperturlänge. Dabei bewegt sich das PSNR auf der roten gestrichelten Linie nur leicht aufwärts. Wie in Kapitel 6.3.3 erwähnt wächst hier das Rauschen durch Hintergrundlicht gemeinsam mit der gesammelten Ladung an. Somit bietet das resultierende System einen geringeren Durchsatz aber keine Verbesserung der Signalqualität.

Die nächste Möglichkeit ist die in Kapitel 6.3.5 diskutierte simultane Reduktion von Aperturlänge und Partikelgeschwindigkeit. Diese Modifikation ist in Abbildung 6.6 (Pfeil a) durch die durchgezogene schwarze Kurve dargestellt. Hierbei ergibt sich eine Verbesserung um den Faktor 1.83 bei

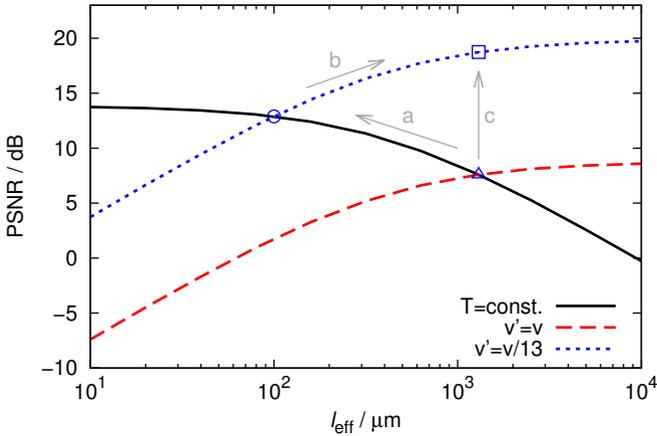


Abbildung 6.6: Vergleich des PSNR für unterschiedliche Aperturlängen. Bei der durchgezogenen Kurve wird die Partikelrate konstant gehalten. Bei der gestrichelten bzw. der gepunkteten Kurve wird die Flussgeschwindigkeit konstant gehalten. Das nach oben gerichtete Dreieck gibt die Ausgangslage wieder. Pfeil a) Bei Reduktion von Aperturlänge und Partikelgeschwindigkeit um den Faktor 13 findet eine Erhöhung des PSNR statt (Kreis). Pfeil b) Durch nachfolgende Erhöhung der Aperturlänge um den Faktor 13 (offenes Rechteck) kann das PSNR auf Kosten der Partikelrate weiter erhöht werden. Pfeil c) Die Kombination aus Pfeil a) und Pfeil b) entspricht einer Verringerung der Geschwindigkeit um den Faktor 13.

einer Reduktion der Aperturlänge um den Faktor 13 auf die prinzipiell realisierbare Länge von $100\ \mu\text{m}$. Da hierbei die Partikelrate konstant gehalten wird, ist diese Modifikation generell empfehlenswert.

Wird ausgehend von der kurzen Apertur und der geringen Partikelgeschwindigkeit (Kreis in Abbildung 6.6) bei konstanter Partikelgeschwindigkeit die Aperturlänge wieder auf den Originalwert erhöht (Abbildung 6.6 (Pfeil b)), dann erhöht sich das PSNR um einen Faktor 1.69. Dies stellt den Fall von $l_{\text{eff}} \ll l_{\text{eff,crossover}}$ dar, bei dem das Rauschen nicht durch das Hintergrundlicht dominiert wird. Hierbei kann also noch eine deutliche Verbesserung durch Verlängerung der Apertur erreicht werden. Bei weiterer Verlängerung von l_{eff} bleiben die Zugewinne an Signalqualität sehr gering. Der maximale Partikeldurchsatz wird jedoch um den Verlängerungsfaktor reduziert.

Die Kombination aus Abbildung 6.6 (Pfeil b) und (Pfeil c) entspricht einer Reduktion der Geschwindigkeit um einen Faktor von 13 (Abbildung 6.6 (Pfeil c)). Im Vergleich zur Verlängerung der Apertur ist der Zugewinn an Signalqualität bei einer Verringerung der Geschwindigkeit nicht limitiert. Durch eine Reduktion der Partikelgeschwindigkeit wird in jedem Fall das PSNR um die Wurzel der Geschwindigkeitsverringering gesteigert. Der maximale Partikeldurchsatz wird jedoch entsprechend proportional verringert. Also ist eine Verringerung der Geschwindigkeit in jedem Fall sinnvoller als eine Verlängerung der Apertur.

Um eine Reduktion des maximal möglichen Partikeldurchsatzes zu vermeiden könnte auch ausgehend von der kurzen Aperturlänge (Kreis in Abbildung 6.6) eine räumliche Modulation mit $K_{\text{mod}} = 26$ eingesetzt werden, um die effektive Aperturlänge von $100\ \mu\text{m}$ auf $1300\ \mu\text{m}$ zu erhöhen (Quadrat in Abbildung 6.6). Dabei würde sich das selbe PSNR wie im nichtmodulierten Fall ergeben.

Der resultierende PSNR hat bei der um den Faktor 13 reduzierten Geschwindigkeit einen Wert von 18.7 dB, was prinzipiell für die Partikeldetektion ausreicht. Dies wird durch die Messergebnisse in Kapitel 3 bestätigt. Dort wurde durch eine Geschwindigkeitsreduktion um den Faktor 15 die Detektion von Partikeln mit der hier diskutierten Intensität ermöglicht, wie der Vergleich der Histogramme mit hoher und niedriger Flussgeschwindigkeit in Abbildung 3.14 zeigt.

6.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde eine gesamtheitliche Betrachtung des Einflusses der Systemparameter auf die Signalqualität entwickelt. Drei Messungen (Dunkelrauschen, Rauschen bei Beleuchtung und ein Partikel mit bekannter Intensität) sind notwendig um ein Detektionssystem zu charakterisieren. Es wurde untersucht welche Einflüsse die Änderung der Aperturlänge und der Partikelgeschwindigkeit auf die Signalqualität haben. Zusätzlich wurde der Einfluss von Modulationsmustern diskutiert. Es wurden generell zwei dominante Rauschquellen identifiziert, die durch eine charakteristische Länge getrennt sind. Für kurze Aperturen ist das Dunkelrauschen dominant. Für lange Aperturen wird das Rauschen durch Hintergrundlicht dominant. Wenn das Hintergrundlicht dominiert, können keine wesentlichen Zugewinne an Signalqualität durch Verlängerung der Apertur bzw. Verlängerung der Modulationssequenz erreicht werden.

Für das Design eines Mikrofluidiksystems wurde die generelle Regel ermittelt, dass sowohl Partikelgeschwindigkeit als auch Aperturlänge, im Rahmen des Möglichen, minimiert werden sollen. Wesentlich für die minimale Aperturlänge ist die sich bei der Messung ergebende Pulsform. Diese sollte nichts in ihrer Höhe einbüßen. Für die Partikelgeschwindigkeit stellt einerseits der notwendige Systemdurchsatz eine Grenze dar, aber auch eine eingesetzte Partikelfokussierung kann die Partikelgeschwindigkeit nach unten beschränken.

Eine Reduktion der Partikelgeschwindigkeit führt in jedem Fall zu einer Verbesserung der Signalqualität. Deshalb ist für die Systemoptimierung die Kenntnis der Fehlerstatistik wichtig, damit der für eine Anwendung minimal notwendige Partikeldurchsatz als Designparameter bekannt ist.

7 Extinktionsbasierte Partikeldetektion

Neben der Fluoreszenz ist die Messung von Absorption und Streuung bzw. Extinktion ein zentraler Bestandteil eines Durchflusszytometers. Während Fluoreszenzpartikel speziell markiert werden müssen, tritt Streuung und somit Extinktion bei jedem Partikel auf. In diesem Kapitel wird eine einfache Anordnung zur Messung von Extinktion beschrieben und diskutiert. Zunächst wird mittels eines vereinfachten optischen Modells eine geometrische Anordnung mehrerer Aperturen für die Messung der Absorption optimiert. Das so optimierte System wird gebaut und mit einer Reihe von Partikeln evaluiert. Um die Einsetzbarkeit von organischen Photodioden nachzuweisen, werden Messungen mit einer organischen sowie mit einer anorganischen Photodiode durchgeführt und verglichen. Bei der Auswertung der Messungen zeigt sich, dass der Beitrag der Streuung an der Extinktion aufgrund der Signalform beurteilt werden kann. Mit einer anorganischen Photodiode als Detektor können Partikel ab 1 μm Durchmesser erkannt werden und mit der organischen Photodiode Partikel ab 3 μm Durchmesser.

In klassischen Durchflusszytometern wird die Streuung in Vorwärtsrichtung zur Triggerung weiterer Messungen wie der Fluoreszenz oder Streuung in seitlicher Richtung verwendet. Da jeder Mikropartikel, dessen Brechzahl sich vom umgebenden Medium unterscheidet, Streuung hervorrufen können hiermit alle in einer Flüssigkeit vorhandenen Partikel gezählt werden. Dies ist wichtig, um die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Partikel in Relation zur Gesamtmenge der Partikel setzen zu können.

Um den Satz an messbaren Parametern zu komplettieren, soll neben der Fluoreszenz auch die Absorption und Streuung von Partikeln gemessen

werden. Das im vorhergehenden Kapitel vorgestellte System zur Fluoreszenzmessung soll hierfür entsprechend modifiziert werden. Farbfilter sind hier generell nicht sinnvoll oder notwendig, da keine Wellenlängenverschiebung erfolgt. Dadurch erhöht sich die Menge des von der Leuchtdiode zur Photodiode transmittierten Lichtes beträchtlich, weshalb die Apertur verkleinert werden kann.

Eine getrennte Messung von Absorptions- und Streueigenschaften an Partikeln wäre wünschenswert. Dies kann in guter Näherung in Durchflusssystemen erreicht werden, da dort schmale Lichtstrahlen mit entsprechend ausgelegten Optiken geführt werden können. In direkter Vorwärtsrichtung kann so die aus der Summe von Absorption und Streuung bestehende Extinktion gemessen werden. Unter kleinen Winkeln kann die Streuung in Vorwärtsrichtung gemessen werden, welche beim Vorhandensein eines Partikels gut detektierbare Signale erzeugt. Beim Einsatz flächiger Lichtquellen und Detektoren ohne abbildende Optiken, wie es hier der Fall ist, tritt das Problem auf, dass Lichtstrahlen immer einen vergleichsweise großen Winkelbereich einnehmen. Deshalb enthält das gemessene Signal neben der Extinktion immer auch einen Anteil des gestreuten Lichtes, welches den von der Extinktion hervorgerufenen Lichtverlust zum Teil kompensiert. Für stark absorbierende Partikel fällt die Streuung entsprechend geringer aus wodurch hier stärkere Signale zu erwarten sind. Da sich die Winkelverhältnisse zwischen Lichtquelle, Partikel und Detektor beim Durchlaufen der Messzone ändern ist zu erwarten, dass die dabei erzeugte Pulsform sich für absorbierende und nichtabsorbierende Partikel unterscheidet. Da sich die Beiträge von Absorption und Streuung in der hier verwendeten Messmethode immer zu veränderlichen Anteilen vermischen, ist die Bezeichnung Extinktion der in diesem Kapitel gemessenen Eigenschaften zwar nicht exakt, beschreibt aber die auftretenden Effekte am besten.

Die Methode der Partikelfokussierung im vorhergehenden Kapitel bringt Einschränkungen hinsichtlich der möglichen Flussgeschwindigkeiten mit sich und erfordert einen zusätzlichen Mantelfluss. Deshalb wird hier auf eine Fokussierungsmethode verzichtet. Im Gegenzug soll über die Geometrie zusätzlicher Aperturen der Lichtpfad zwischen Leuchtdiode, Partikel und Photodiode so optimiert werden, dass eine möglichst geringe Positionsabhängigkeit der vom Partikel erzeugten Pulsformen entsteht.

In diesem Kapitel wird zuerst die neue Messanordnung vorgestellt. Danach wird auf die Optimierung der Pulsform über die Geometrie der Aperturen mittels einer einfachen Simulation eingegangen. Da Streuung an kleinen Partikeln stark nichtlineare Effekte bezüglich der Menge des gestreuten Lichtes und des geometrischen Partikelquerschnittes zeigt, wird dies darauf folgend näher untersucht. Anschliessend wird der so optimierte mikrofluidische Chip gebaut und es werden damit Partikelmessungen durchgeführt. Die Messungen werden sowohl mit einer anorganischen Photodiode als auch einer organischen Photodiode wiederholt und die Ergebnisse werden verglichen.

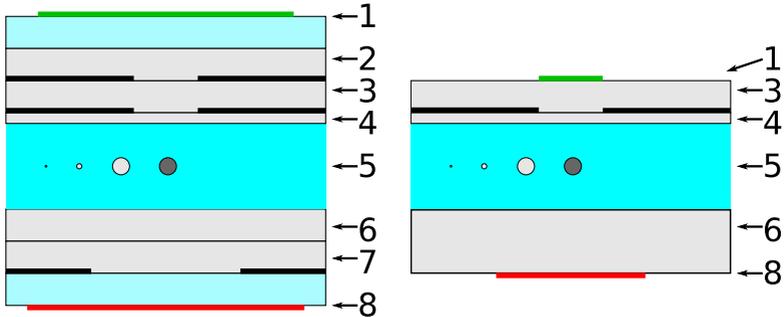
7.1 Methoden

7.1.1 Messanordnung

Als Ausgangspunkt für den Aufbau für die Messung der Extinktion wird das Design der Fluoreszenzmessungen aus dem vorhergehenden Kapitel ohne die Absorptionsfilter verwendet.

Bei Voruntersuchungen hat sich herausgestellt, dass die geometrischen Abmessungen der Aperturen sowie der aktiven Flächen der Lichtquelle bzw. des Detektors von entscheidender Bedeutung sind. Im Fall großer aktiver Flächen von Lichtquelle, Detektor und Apertur ergibt sich ein sehr hoher Anteil von Hintergrundlicht, was das Rauschen stark erhöht. Wird die Apertur verringert, dann verbessert sich das Verhältnis zwischen Hintergrundlicht und dem durch einen absorbierenden Partikel erzeugten Signal. Gleichzeitig entsteht jedoch eine hohe Abhängigkeit der Signalform von der Partikelposition im Kanal. Zur Optimierung von Signalform und Rauschen sind also weitere Freiheitsgrade notwendig. Diese können durch Einschränkung der aktiven Fläche von Lichtquelle und Detektor erlangt werden.

Bei gedruckten organischen Photodioden bzw. Leuchtdioden kann dies, wie in Abbildung 7.1b dargestellt, durch Änderung der mit aktivem Material bedruckten Flächen erreicht werden. Äquivalent zur kleinen bedruckten Fläche kann jedoch auch eine kleine Apertur vor ein optisches Bauteil



(a) Realisiertes Design.

(b) Design für druckbare Struktur.

Abbildung 7.1: Prinzipieller Aufbau der Messanordnung. In a) wird das mit zusätzlichen Aperturen realisierte Design gezeigt. Unterabbildung b) stellt das optisch äquivalente druckbare Design dar. Hier werden die aktiven elektrooptischen Flächen an die Stellen der zugehörigen Schattenmasken platziert. Im Höhenmaßstab sind hier transparente Partikel von $1\ \mu\text{m}$, $3\ \mu\text{m}$, $10\ \mu\text{m}$ sowie ein absorbierender Partikel mit $10\ \mu\text{m}$ eingezeichnet. Die einzelnen Elemente sind (1) die Lichtquelle, (2) die Folie mit der Lichtquellenapertur, (3) die Folie mit der Kanalapertur, (4) eine dünne PDMS-Schicht zwischen Kanalstruktur und Apertur, (5) Mikrofluidikkanal mit Partikeln, (6) eine transparente Maske, (7) die Folie mit Detektorapertur und (8) der Detektor.

mit großer aktiver Fläche gelegt werden. Dies wird in Abbildung 7.1a dargestellt. Beide Anordnungen weisen nahezu dieselben optischen Eigenschaften auf. Deshalb können mithilfe anorganischer Bauelemente mit großen aktiven Flächen und der Integration zusätzlicher Aperturen die optischen Eigenschaften, welche mit organischen Bauelementen zu erwarten wären, im Experiment nachgebildet werden. Für die Experimente wird also die in Abbildung 7.1a dargestellte Anordnung verwendet. Als Detektor kann jedoch auch hier eine organische Photodiode verwendet werden, die jedoch eine entsprechend größere aktive Fläche aufweisen muss.

7.1.2 Geometrieoptimierung

Berechnungen, welche die optischen Eigenschaften kleiner Partikel akkurat berücksichtigen, sind sehr ressourcenaufwändig. Eine Systemoptimierung eines stark nichtlinearen Systems mit mehreren Freiheitsgraden (Länge bzw. Breite der drei Aperturen) erfordert wiederum viele Berechnungen des optischen Systems mit leicht veränderten Parametern. Dies gilt insbesondere für akkurate Simulationen der elektrischen Felder mittels einer Finiten-Elemente-Methode. Da auch akkurate Simulationen mittels Raytracing in einigen Fällen sehr lange dauern, wird ein semi-analytischer Ansatz mit geometrischer Optik gewählt, um die optischen Simulationen zu beschleunigen.

Die Leistung, die von einer flächigen Lichtquelle zu einer Detektorfläche übertragen wird, kann über die Integration der Leistungsdichte auf den Flächenelementen erfolgen. Die Leistungsdichte an einem Punkt auf einer Fläche wiederum ist über den projizierten Raumwinkel gegeben. Dieser wiederum kann mit Gleichung 2.44 für rechteckige Flächen einfach berechnet werden. Um damit eine schnelle Berechnung der von der Lichtquelle an den Detektor übertragenen Leistung zu ermöglichen, muss das optische System also so vereinfacht werden, dass alle von Punkten auf der Detektorfläche aus sichtbaren Flächen der Lichtquelle in Rechtecke aufgeteilt werden können. Die verwendete Realisierung hierfür wird im Folgenden kurz vorgestellt.

Beim hier gewählten Ansatz wird der Partikel durch eine zusätzliche quadratische Apertur mit einer dem Partikelquerschnitt entsprechenden

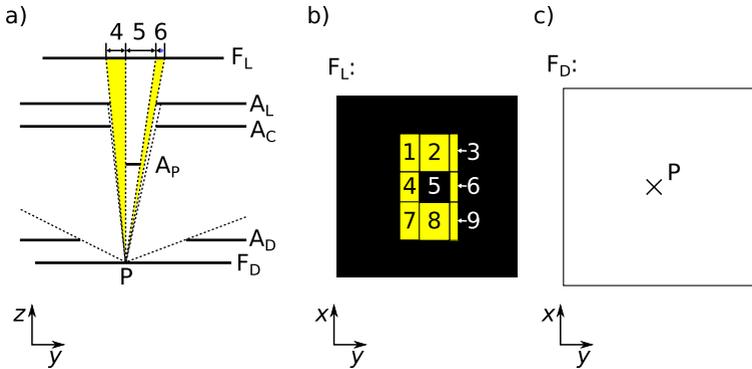


Abbildung 7.2: Schema des Verfahrens zur Berechnung von der Lichtquelle F_L auf den Detektor F_D eingestrahlten Lichtleistung bei Abschattung durch die Lichtquellenapertur A_L , Kanalapertur A_C , Detektorapertur A_D und den als Rechteck angenommenen Partikel A_P . In a) ist der Querschnitt dargestellt. In b) bzw. c) die Fläche der Lichtquelle bzw. des Detektors in Draufsicht. Flächen, bei denen eine direkte Verbindung zwischen Lichtquelle und Flächenelement auf dem Detektor besteht, sind gelb dargestellt. Das Flächenelement P sieht von der Lichtquelle die Flächen 1-4 und 6-9. Die Fläche 5 stellt die durch den Partikel verursachte Abschattung dar. Um die gesamte Leistung auf dem Detektor zu ermitteln wird die Leistungsdichte aller Flächenelemente über die Fläche F_D integriert.

Fläche angenähert. Dieser Sachverhalt wird in Abbildung 7.2 schematisch dargestellt. Alle aktiven Lichtpfade zwischen Lichtquelle und jedem Flächenelement sind rechteckig. Dadurch können die in Kapitel 2.4.3 vorgestellten Integrale für die Berechnung des von der flächigen Lichtquelle zum flächigen Detektor transmittierten Lichtes angewendet werden. Um die Gesamtleistung auf dem Detektor zu erhalten, müssen entsprechend viele Punkte auf dem Detektor ausgewertet werden, sodass die integrierte Leistung mit ausreichender Genauigkeit ermittelt werden kann.

Um die Genauigkeit und Simulationsgeschwindigkeit weiter zu erhöhen, kann folgende Methode angewandt werden. Für die Abschätzung der Hintergrundleistung wird die Simulation ohne die Partikelfläche A_P durchgeführt. Für die Abschätzung der von einem Partikel erzeugten Abschattung wird die Simulation mit der invertierten Partikelfläche A_P^* durchgeführt. Dabei wird der Partikel durch eine Apertur mit einem der Partikelfläche entsprechenden Loch ersetzt. Anstatt eine kleine Abschattung zu verursachen erzeugt der Partikel nun durch eine kleine Transmission in der Subfläche 5 in Abbildung 7.2 a) bzw. b). Dadurch muss nurmehr einmal der Raumwinkel berechnet werden und die Anforderungen an die numerische Genauigkeit werden deutlich gesenkt. Dies erlaubt eine sehr schnelle Auswertung vieler geometrischer Konfigurationen wie es bei der Parameteroptimierung erforderlich ist.

Dieser Ansatz vernachlässigt zunächst alle streuenden Eigenschaften der Partikel und weist für sehr schräg einfallendes Licht Fehler auf. Die hierbei erzeugten Fehler sind jedoch tolerierbar. Dadurch, dass am Partikel keine sehr flachen Winkel im Lichtpfad zwischen Lichtquelle und Detektor auftreten, sind die damit zusammenhängenden Fehler ebenfalls nicht wesentlich. Für große absorbierende Partikel ist die Annahme von reiner Absorption gerechtfertigt. Streuende Partikel lenken Teile des auf den Detektor fallenden Lichtes ab und erzeugen analog zu den absorbierenden Partikeln ein Signal, welches im Zusammenhang mit dem Extinktionsquerschnitt steht. Dies wird im Folgenden noch näher theoretisch untersucht und in den Messungen durch mehrere nichtabsorbierende Partikel unterschiedlicher Größen experimentell untersucht.

Für die Beurteilung der Signalqualität sind folgende Bestandteile von entscheidender Wichtigkeit.

1. Die Höhe des Signalpulses, der vom Partikel erzeugt wird.
2. Abhängig von der Position des Partikels im Kanal kann diese Höhe jedoch auch Variationen aufweisen. Durch Anordnung der optischen Komponenten sollen diese Variationen gering gehalten werden.
3. Durch auf den Detektor fallendes Licht wird Schrotrauschen erzeugt, das zu zufälligen Schwankungen im gemessenen Signal führt.
4. Der im Transimpedanzverstärker eingesetzte Rückkoppelwiderstand weist thermisches Rauschen auf, welches zum Schrotrauschen hinzukommt und unabhängig von der optischen Anordnung ist.

Aus diesen Einflussfaktoren kann ein Variationskoeffizient abgeleitet werden, der insgesamt zu minimieren ist.

In der Simulation ergibt sich aufgrund der Geometrie ein Strom, der an sechs unterschiedlichen Partikelpositionen simulativ ermittelt wird. Hierfür wird die Partikelposition entlang des Kanals zentral unterhalb der Aperturen gewählt und in der Tiefe variiert (oben, mittig, unten) sowie seitlich zentriert bzw. zum Kanalrand verschoben. Daraus ergeben sich die maximalen Stromänderungen i_k . Zusammen mit dem vom Rückkoppelwiderstand erzeugten Rauschen $\sigma_{i,\text{th}}$ sowie dem vom Hintergrundlicht erzeugten Schrotrauschen $\sigma_{i,\text{schrot}}$ wird hier der Variationskoeffizient CV mit

$$\text{CV} = \sqrt{\frac{\min_k (i_k^2)}{\sigma_{i,\text{th}}^2 + \sigma_{i,\text{shot}}^2} + \frac{\max_k (i_k^2) - \min_k (i_k^2)}{\min_k (i_k^2)}}$$

berechnet. Die maximale positionsabhängige Variation wird zur vom Rauschen verursachten Variation hinzuaddiert.

Für die Optimierung werden die geometrischen Parameter mittels Simulation variiert. Zusätzlich werden für das elektronische Rauschen einige Annahmen getroffen, welche die Messsituation realistisch darstellen sollen.

Für die Simulationen werden folgende elektrische Parameter angenommen, um die Einflüsse des Rauschens zu berechnen. Der Wert des Rückkoppelwiderstandes im Transimpedanzverstärker beträgt $1\text{ M}\Omega$, die Umgebungstemperatur beträgt 300 K und die Messbandbreite beträgt 1 kHz . Hieraus lässt sich das Dunkelrauschen nach Gleichung 2.25 berechnen. Für das Schrotrauschen sind folgende Parameter wichtig. Die Lichtquelle weist eine Leistungsdichte von 60 mW/mm^2 auf. Der Photodetektor weist eine Empfindlichkeit von 0.155 A/W bei der entsprechenden Wellenlänge auf.

Die Partikelgeschwindigkeit spielt bei dieser Simulation keine Rolle, da ungefilterte Signale betrachtet werden. Die angenommene Bandbreite von 1 kHz beschränkt jedoch die Rate der maximal möglichen Partikeldetektionen. Die zugehörige maximal mögliche Partikelgeschwindigkeit ergibt sich in Kombination mit der Pulsbreite. Wenn die Breite variiert, so limitiert die kürzeste Pulsform die Partikelgeschwindigkeit nach oben. Die längste Pulsform limitiert die maximal mögliche Partikelrate. Deshalb ist eine geringe Variation der Pulsbreiten hier vorteilhaft.

Für die Simulation der Pulsform sind folgende geometrische Parameter aus den Abmessung der eingesetzten Bauteile wichtig. Die relevanten Abstandsmaße sind $110\text{ }\mu\text{m}$ zwischen Lichtquellenapertur und Kanalapertur, $10\text{ }\mu\text{m}$ zwischen Kanalapertur und Kanal, $50\text{ }\mu\text{m}$ Kanalhöhe, sowie $200\text{ }\mu\text{m}$ zwischen Kanal und Detektorapertur. Die Leuchtfläche der Lichtquelle beträgt wie im vorhergehenden Kapitel $1 \times 1\text{ mm}^2$. Die Fläche der Photodiode beträgt entsprechend $2.65 \times 2.65\text{ mm}^2$.

In der Simulation soll die Detektion kleiner Partikel optimiert werden. Deshalb wird für die Größe des quadratischen Partikelquerschnittes $1\text{ }\mu\text{m}$ Kantenlänge angenommen. Da der Partikelstrom unfokussiert gemessen werden soll wird für die Abschätzung der Messfehler der ungünstigste Fall ermittelt. Hierfür werden die Partikelpositionen in der Mitte bzw. den Extremstellen des im Querschnitt $50\text{ }\mu\text{m}$ mal $50\text{ }\mu\text{m}$ großen Kanals platziert. Normiert auf die minimal gemessene Amplitude, ergibt sich eine Abschätzung der zu erwartenden relativen Messfehler im ungünstigsten Falle eines unfokussierten Partikelstromes.

Damit sind alle relevanten Parameter gegeben und per Simulation wird die Gesamtvariation unter Berücksichtigung der Positionsabhängigkeit

sowie des Rauschens minimiert. Das Ergebnis der Simulation sind folgende Maße entlang bzw. quer zum Kanal von $96\ \mu\text{m}$ bzw. $254\ \mu\text{m}$ für die Lichtquellenapertur, $110\ \mu\text{m}$ bzw. $141\ \mu\text{m}$ für die Kanalapertur, sowie $155\ \mu\text{m}$ bzw. $185\ \mu\text{m}$ für die Detektorapertur.

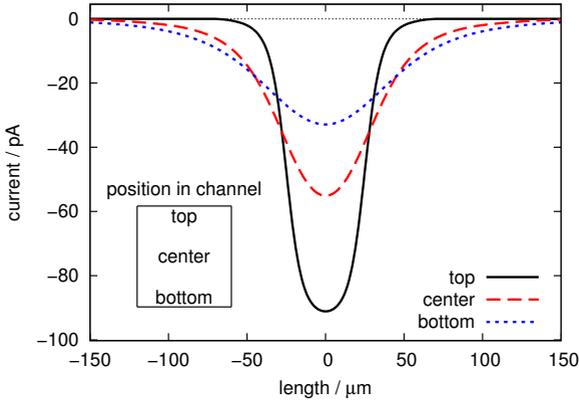
7.1.3 Simulierte Pulsformen

Die damit erreichte Pulsform wird in Abbildung 7.3b dargestellt. Für eine gute Partikeldetektion ist hierbei die geringe Variation des Maximums, sowie die seitlich beschränkte und steil abfallende Pulsform sehr nützlich. Werden die Aperturen vor der Lichtquelle und dem Detektor (Abbildung 7.1a (2) bzw. (7)) weg gelassen, ergibt sich die in Abbildung 7.3a dargestellte Pulsform. Hier hängt die Höhe und Breite der Pulsformen sehr stark von der Position des Partikels ab.

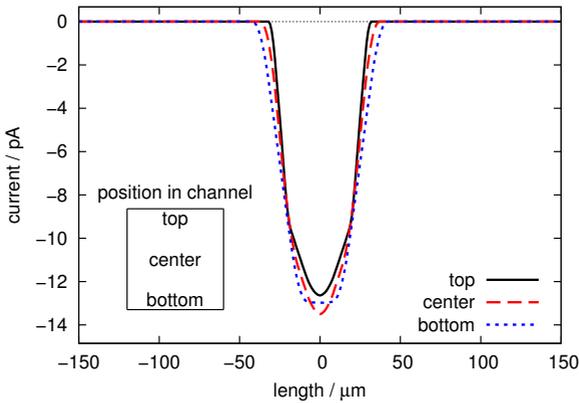
Die Pulsform alleine spricht schon für den Einsatz der drei Aperturen. Entscheidend für die Qualität jedoch ist vor allem der Variationskoeffizient der Messung. Dieser wird in Abbildung 7.4a für eine Apertur bzw. in Abbildung 7.4b für drei Aperturen aufgetragen. In diesem Diagramm wird die Länge der Kanalapertur als Freiheitsgrad gewählt.

Hierbei ist zu sehen, dass die positionsabhängigen Variationen dominieren. Der zweitgrößte Beitrag zur Variation kommt vom Schrotrauschen, während der Beitrag des thermischen Rauschens hier vernachlässigbar ist. Für sehr kleine Aperturlängen kleiner $30\ \mu\text{m}$ zeigen beide Varianten eine sehr hohe Positionsabhängigkeit. Für größere Aperturlängen ist die Variation der Variante mit drei Aperturen nahezu konstant während sie für die Variante mit einer Apertur weiter abfällt. Die Gesamtvariation ist jedoch deutlich geringer für die Variante mit drei Aperturen. Ebenfalls ist das Schrotrauschen für die Variante mit drei Aperturen geringer, da hier weniger Licht von der Quelle auf den Detektor fällt.

Die beiden zusätzlichen Aperturen bieten also in jeder Hinsicht Vorteile und die Signalqualität kann nicht von einer Lösung mit nur einer Apertur erreicht werden. Der Nachteil ist das notwendige Ausrichten der beiden zusätzlichen Aperturen bzw. der gedruckten Leuchtdiode und Photodiode, was die Herstellung komplizierter gestaltet.

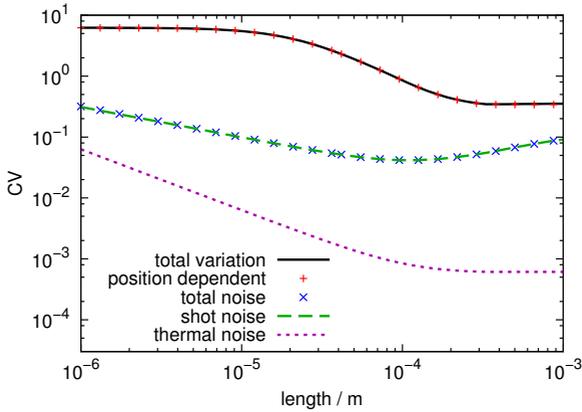


(a) Nur Kanalapertur.

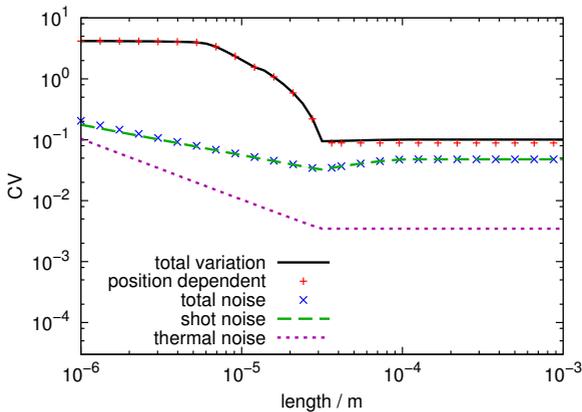


(b) Drei Aperturen, optimiert.

Abbildung 7.3: Vergleich der Pulsformen der Stromänderung im Signal abhängig von der Position des Partikels im Kanal. In a) die Konfiguration mit einer einzelnen Apertur nahe dem Kanal. In b) die simulativ optimierte Konfiguration mit drei Aperturen. Im Inset sind die Partikelpositionen innerhalb des Kanalquerschnittes illustriert. Die Beleuchtung erfolgt wie in Abbildung 7.1a von oben.



(a) Nur Kanalapertur.



(b) Drei Aperturen, optimiert.

Abbildung 7.4: Simulierter Variationskoeffizient für die Konfiguration mit einer bzw. drei Aperturen. Der Einfluss des thermischen Rauschens spielt hierbei keine Rolle. Das Schrotrauschen hat ebenfalls nur einen geringen Einfluss. Dominiert wird die Variation der Messwerte durch die positionsabhängigen Variationen. Die Anordnung mit drei Aperturen erreicht einen deutlich geringere Variationskoeffizienten.

7.1.4 Ortsintegral

Die Pulsform in Abbildung 7.3a zeigt eine zunehmende Pulsbreite bei abnehmender Pulshöhe. Dies lässt vermuten, dass das Ortsintegral über den Strompuls wesentlich geringere Variationen zeigt als die Variation der Pulshöhe. Da sich diese Konfiguration einfacher herstellen lässt als die Lösung mit drei Aperturen, soll dieser Sachverhalt hier kurz theoretisch untersucht werden. Für den Strom im Ortsbereich i_x bzw. Zeitbereich i_t gilt $i_x(x) = i_t(t)$ mit dem Ort $x = tv$ als Produkt aus Partikelgeschwindigkeit v und Zeitpunkt t . Bei den Pulsen wird die Stromänderung gegenüber dem konstanten Hintergrundstrom I_0 betrachtet. Das Pulsintegral im Ortsbereich lautet damit

$$c_{\text{Ort}} = \int_{x_1}^{x_2} I_0 - i_x(x) dx = v \int_{t_1}^{t_2} I_0 - i_t(t) dt$$

mit dem Pulsanfang x_1 bzw. t_1 und dem Pulsende x_2 bzw. t_2 . Der ermittelte Wert des Integrals c_{Ort} hängt nicht von der eigentlichen Partikelgeschwindigkeit v sondern nur von der örtlich aufgelösten Pulsform $i_x(x)$ ab. Durch die Substitution mit $x = tv$ kann das Integral entsprechend in den Zeitbereich umgeschrieben werden. Dabei ergibt sich bei der Integration der Zeitsignale $i_t(t)$ eine Abhängigkeit von der Partikelgeschwindigkeit v . Für die Berechnung des Ortsintegrals aus dem aufgenommenen Zeitsignal, muss demzufolge die Partikelgeschwindigkeit bekannt sein.

Der positionsabhängige Variationskoeffizient bei Betrachtung der Pulsmaxima beträgt bei der in Abbildung 7.3a ausgewerteten Konfiguration 39.1%. Wird jedoch das Ortsintegral gebildet ergibt sich ein Variationskoeffizient von nur 1.1%. Diese Variation ist sogar deutlich geringer als in der in Abbildung 7.3b dargestellten Konfiguration der Maxima von 3.4%. Wird über die Pulsformen in Abbildung 7.3b integriert steigt die resultierende Variation auf 7.7%.

Damit das Ortsintegral aus den Zeitsignalen der Messung gebildet werden kann, muss für jeden Partikel die Geschwindigkeit bekannt sein. Da dies ausreichende Signalstärke und zusätzliche Messungen erfordert, ist dieser Ansatz für die Messung von Partikeln mit sehr geringen Amplituden in

dieser Form nicht gut geeignet. Die Anordnung der drei Aperturen hat aufgrund der Signalform hier deutliche Vorteile und wird deshalb für die Messung verwendet.

7.2 Lichtstreuung an kleinen Partikeln

In der Simulation sind bisher Streueigenschaften von Partikeln nicht berücksichtigt worden. Deshalb werden hier die größenabhängigen Streuquerschnitte von sphärischen Partikeln in einem Medium diskutiert.

Die grundlegenden Zusammenhänge der Streuung wurden bereits in den Grundlagen in Kapitel 2.4.1 eingeführt. Im Folgenden werden nicht-absorbierende sphärische Partikel genauer behandelt. Der effektive Streuquerschnitt σ_s einer dielektrischen Kugel hängt von dem Verhältnis ihres Radius r zur Lichtwellenlänge im umgebenden Medium λ_1 sowie dem Verhältnis $m = n_2/n_1$ des Brechungsindex des Mediums n_1 sowie des Brechungsindex der Kugel n_2 ab. Der Brechungsindexhub zwischen Wasser $n_1 \approx 1.34$ [152] und mit Salz und Proteinen versetztem Wasser wie es im Zytoplasma vorkommt mit $n_{2,\text{Zytoplasma}} \approx 1.36$ [153] kann sehr gering sein, während bei Polystyrol mit $n_{2,\text{Polystyrol}} \approx 1.60$ [154] ein deutlich höherer Brechungsindexhub vorliegt. Deshalb wird in Abbildung 7.5 ein weiter Bereich von $m = n_2/n_1$ dargestellt.

Für die Partikeldetektion von sphärischen Objekten wie Zellen oder Polystyrolkugeln ist insbesondere wichtig, dass das gemessene Signal auch mit der Partikelgröße korreliert. Betrachtet man die Entwicklung des relativen Streuquerschnitts in Abbildung 7.5 (berechnet nach Referenz [51]), so ist ersichtlich, dass hierfür der Bereich der Tyndall-Streuung zu bevorzugen ist, d.h. die Wellenlänge des Anregungslichtes im umgebenden Medium sollte deutlich geringer sein als die Partikelgröße. Insbesondere für Partikel mit geringem Brechungsindexhub gegenüber dem Medium verschiebt sich diese Grenze hin zu kleinen Wellenlängen. Akzeptabel im Hinblick auf die reine Erkennung von Partikeln ist die Mie-Streuung Typ II, da hierbei noch ein starkes Signal generiert wird. Mie-Streuung Typ I, sowie Rayleigh-Streuung hingegen liefern für vergleichsweise kleine Partikel einen

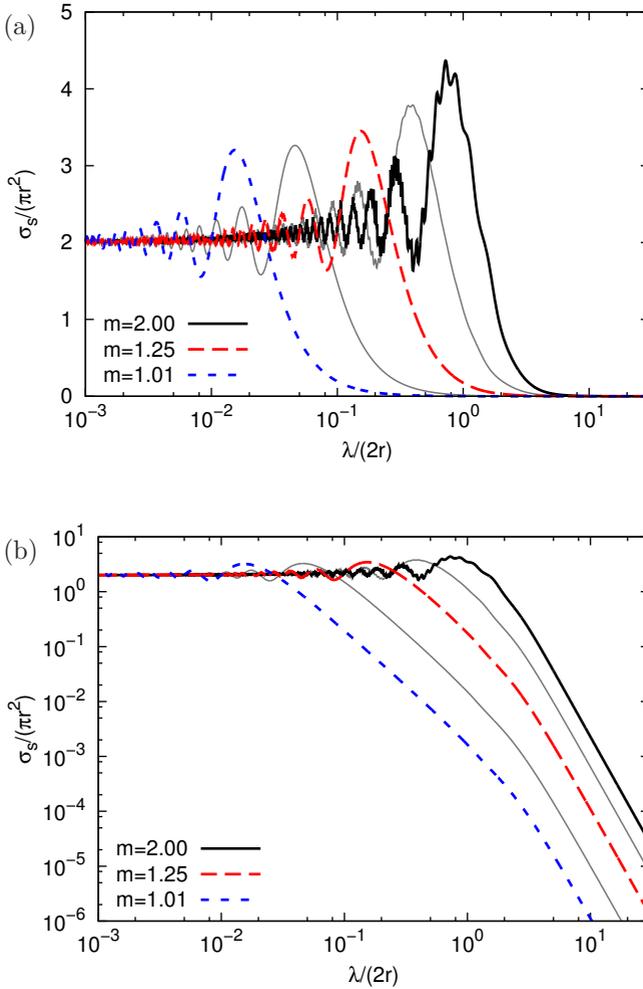


Abbildung 7.5: Streuquerschnitt einer Kugel normiert auf die Querschnittsfläche aufgetragen über das Verhältnis von Wellenlänge im umgebenden Medium zu Kugeldurchmesser in a) mit linearer und in b) mit logarithmischer Achsskalierung für eine Reihe von Brechungsindexverhältnisse $m = n_2/n_1$.

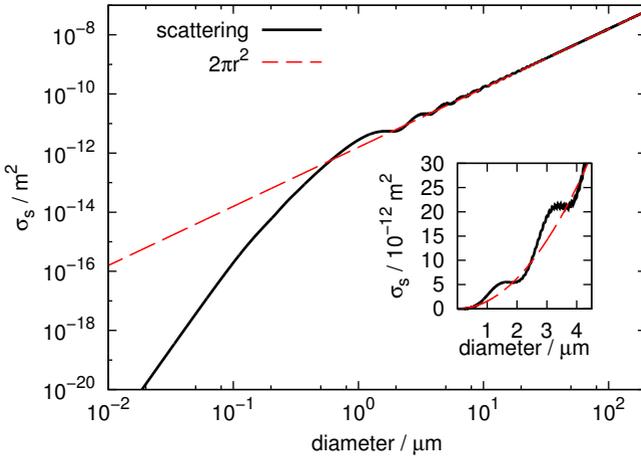


Abbildung 7.6: Entwicklung des Streuquerschnitts bei 450 nm Wellenlänge einer Polystyrolkugel in Wasser bei Variation des Kugeldurchmessers.

Streuquerschnitt, der nochmals deutlich unter dem Partikelquerschnitt liegt. Dies bedeutet, dass solch kleine Partikel nur sehr schwer zu detektieren sind. Im Umkehrschluss jedoch bedeutet dies auch, dass die Störungen im Signal, die durch Verunreinigungen mit kleinen Partikelgrößen erzeugt werden, nur einen geringen Einfluss auf das Messergebnis haben.

Mit zunehmendem Brechzahlhub tritt eine hochfrequente Welligkeit der Kurven in Abbildung 7.5 auf, welche die generelle Welligkeit überlagert [52]. Diese hochfrequenten Anteile können die Messgenauigkeit zusätzlich negativ beeinflussen und führen zu Mehrdeutigkeiten zwischen Streuquerschnitt und Kugeldurchmesser. Bei den hier vorliegenden Brechzahlhuben spielt dieser Effekt jedoch eine untergeordnete Rolle.

In Abbildung 7.6 wird der Streuquerschnitt einer Polystyrolkugel bei 450 nm Wellenlänge in Wasser in Abhängigkeit des Kugeldurchmessers dargestellt. Hier ist deutlich zu erkennen, dass bei 1 μm Kugeldurchmesser ein lokales Maximum die Partikeldetektion unterstützt während unterhalb von 500 nm Kugeldurchmesser ein sehr steiler Abfall des Streuquerschnittes

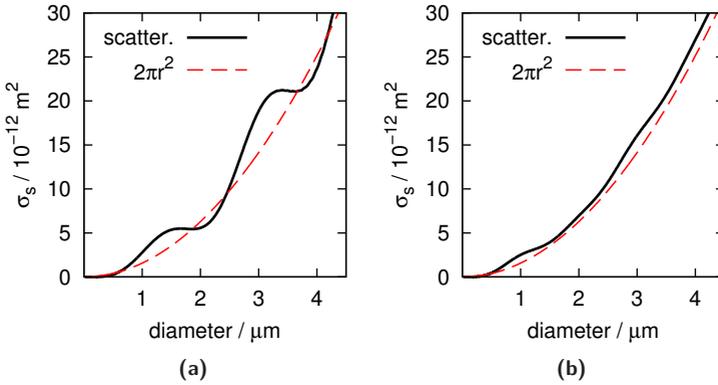


Abbildung 7.7: Simulation des Streuquerschnitts für Beleuchtung in a) mit einer LED und in b) mit einer breitbandigen Lichtquelle.

stattfindet. Die Wahl einer kurzwelligen Lichtquelle ist in dieser Hinsicht sehr wichtig, da das erste Resonanzmaximum proportional zur Wellenlänge ist und eine kurzwellige Lichtquelle die Detektion von kleineren Partikeln erlaubt.

Im Inset in Abbildung 7.6 ist in linearer Skalierung deutlich zu erkennen, dass die groben Resonanzen zu einer Signalstagnation zwischen Partikelgrößen von $1 \mu\text{m}$ und $2 \mu\text{m}$ sowie zwischen $3 \mu\text{m}$ und $4 \mu\text{m}$ führen, während zwischen $2 \mu\text{m}$ und $3 \mu\text{m}$ ein steiler Anstieg des Streuquerschnittes stattfindet. Dies lässt erwarten, dass bei sphärischen Partikeln, deren Größe sich nahe den ersten Resonanzmaxima befindet, eine zusätzliche Messunsicherheit von ca. $1 \mu\text{m}$ auftritt. Spätere Resonanzmaxima haben einen zunehmend verschwindenden Anteil gegenüber dem absoluten Streuquerschnitt. Die feinen Resonanzeffekte sind im Inset ebenfalls erkennbar, werden aber in der Praxis aufgrund von Variationen der Partikelgröße für diese Materialkombination keine Rolle spielen. Ho et al. glätten deshalb die Kurve unter der Annahme einer Größenvariation von 2.5% , um diese kurzwelligen Resonanzen in der Darstellung auszufiltern [50].

Wenn für die Messung anstatt eines Lasers eine Leuchtdiode oder gar eine Lichtquelle mit noch höherer spektraler Bandbreite eingesetzt wird, ergibt sich ein ähnlicher glättender Effekt. In Abbildung 7.7a wird eine Leuchtdiode mit 447.5 nm Wellenlänge und einem gaußförmigen Spektrum mit 20 nm Halbwertsbreite angenommen [116]. Hierdurch werden die hochfrequenten Schwingungen auf der Kurve eliminiert, jedoch beeinträchtigen weiterhin die Resonanzen die Messung. Dies führt dazu, dass für Partikel zwischen 0.5 μm und 1.5 μm Durchmesser ein deutlich stärkeres Signal gemessen wird. Zwischen einem Durchmesser von 1.5 μm und 2 μm stagniert der Signalanstieg und es können hier keine Größen unterschieden werden. Für eine angenommene Lichtquelle mit einem gleichmäßig verteilten Spektrum zwischen 400 nm und 800 nm Wellenlänge ergibt sich die Kurve von Abbildung 7.7b, welche deutlich glatter verläuft und wesentlich geringere Abweichungen von der geometrisch erwarteten Kurve zeigt.

Für die Messung von Streuparametern an Partikeln unter 10 μm Durchmesser kann deshalb der Einsatz von mehreren LEDs mit unterschiedlicher Wellenlänge bzw. von weißen LEDs mit breitem Spektrum einen deutlichen Vorteil bieten. Insbesondere wenn die Größe von Partikeln Größenbereich bestimmt werden soll, ist ein gleichmäßiger Zusammenhang zwischen Streuquerschnitt und Partikeldurchmesser wünschenswert. Falls nur Partikel mit einem bestimmten vorher bekannten Durchmesser detektiert werden sollen, können die Resonanzen hingegen durch entsprechende Wahl der Wellenlänge so verschoben werden, dass der Streuquerschnitt für den entsprechenden Partikeldurchmesser deutlich größer als der geometrische Querschnitt ausfällt, was in einer zuverlässigeren Detektion resultiert.

7.3 Experiment

Für die Extinktionsmessung sind somit die theoretischen Untersuchungen abgeschlossen und werden anhand eines mikrofluidischen Chips geprüft. Die Ergebnisse der Geometrieoptimierung werden als Grundlage für die Herstellung eines mikrofluidischen Chips genommen. Damit die Effekte der Extinktion besser untersucht werden können, werden sowohl transparente als auch eingefärbte Partikel verwendet.

7.3.1 Herstellung des mikrofluidischen Chips

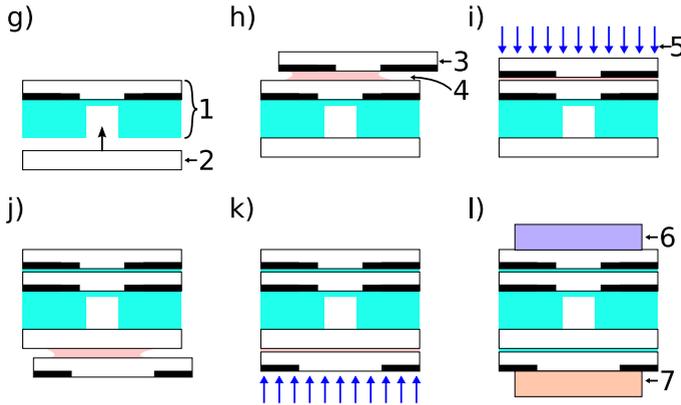


Abbildung 7.8: Herstellungsprozess des Mikrofluidikchips. Die Herstellungsschritte a)-f) werden in Abbildung 3.7 dargestellt und beschrieben. g) Die dabei resultierende Mikrofluidikstruktur (1) wird mit einer klaren Folie (2) gedeckelt. h) Eine zusätzliche Folie mit der Lichtquellenapertur (3) wird unter dem Mikroskop auf Kanal und untere Apertur ausgerichtet. Für die Fixierung wird flüssiger UV-aktivierbarer Klebstoff (4) zwischen die Folien eingebracht. i) Aushärtung des Klebstoffes mittels UV-Bestrahlung (5). j) Anbringung der Detektorapertur und Ausrichtung auf die Maske. k) Aushärtung des Klebstoffes mittels UV-Bestrahlung. l) Anbringung der Lichtquelle (6) und des Detektors (7) auf den fertigen Mikrofluidikchip für die Messung.

Für die Herstellung des mikrofluidischen Chips wird der in Kapitel 3.2 vorgestellte Herstellungsprozess modifiziert. Der Farbfilter ist hier nicht notwendig, jedoch werden zwei zusätzliche Maskenfolien für die Aperturen benötigt. Daraus ergibt sich der in Abbildung 7.8 dargestellte Herstellungsprozess. Dieser wird im Folgenden beschrieben.

Eine 50 μm dicke Schicht Photolack (Microchem, SU8-2050) wird auf ein Glassubstrat aufgetragen und mit dem Maskenbelichter (MJB3 Standard, Süss) durch eine Folienmaske (BuWeMedia, offset film 3600 dpi) mit der

Mikrofluidikstruktur belichtet. Der Photolack wird nach der Belichtung entwickelt und einem Aushärteschritt unterzogen. Vor der Abformung wird das Substrat mit HMDS (Sigma-Aldrich, hexamethyldisilazane) behandelt. Für die Abformung der mikrofluidischen Strukturen wird PDMS (Dow Corning, Sylgard 184 silicone elastomer kit) in einem Mischungsverhältnis Härter zu Basismaterial von 1:10 verwendet. Eine Maskenfolie, welche die Kanalapertur enthält, wird im Plasmaverascher (Diener Electronic, Modell Femto) mit Sauerstoffplasma behandelt, um die Haftungseigenschaften zu verbessern. Ein Tropfen PDMS wird auf das Substrat mit den Kanalstrukturen, sowie die Maskenfolie auf der Maskenseite aufgebracht. Die Maskenfolie wird danach mit der Maskenseite auf das Substrat mit den Kanalstrukturen gelegt und flach angedrückt. Hierdurch wird die Schichtdicke wie im vorhergehenden Kapitel stark reduziert. Mit einem Mikroskop wird die Kanalstruktur auf die Apertur ausgerichtet. Nach einem Ausbackschritt bei 100 °C für 600 s wird die Folie mitsamt der in PDMS abgeformten Kanalstruktur vom Substrat gelöst.

Da keine wasserempfindliche Farbfolie verwendet wird, kann die Deckelfolie direkt auf die Kanalfolie gebondet werden. Hierzu werden in eine klare 80 µm dicke Folie Löcher für die Fluidikanschlüsse gestanzt. Danach wird die Folie für mindestens 20 Minuten in 1 %ige APTES (Sigma-Aldrich, 3-aminopropyltriethoxysilane) Lösung getaucht. Dieser Schritt dient dazu, die Verbindung zwischen PDMS und Folie zu verbessern [124]. Nachdem die klare Folie aus der Lösung genommen wird, wird sie mit Wasser abgespült, getrocknet und zusammen mit der Kanalstruktur für 10 s in den Plasmaverascher gelegt. Danach werden beide Folien zusammengefügt, wodurch der mikrofluidische Chip gedeckelt wird.

Danach können die beiden zusätzlichen Aperturen jeweils auf der Seite der Lichtquelle bzw. des Detektors angebracht werden. Dies geschieht unter einem Mikroskop für die genaue Ausrichtung. Durch einen Tropfen UV-Lack zwischen dem Mikrofluidikchip und der zusätzlichen Aperturfolie wird einerseits ein Luftspalt vermieden. Andererseits kann somit nach der mechanischen Ausrichtung die Position der Folie durch Belichtung mit UV-Strahlung einfach fixiert werden.

Für die Messung wird der Einlass des mikrofluidischen Chips mittels einer flexiblen Leitung mit einer in einer Spritzenpumpe (Landgraf, LA-30) befindlichen Spritze verbunden. Der Auslass wird mit einer als Abfallgefäß genutzten großen Spritze verbunden. Durch Aufziehen der Abfallspritze mit Luft auf 40 ml vor dem Anschließen und nachfolgend weiteres Aufziehen kann ein leichter Unterdruck hergestellt werden. Dieser hat sich als nützlich erwiesen, um Blasen aus dem System zu entfernen und für einen gleichmäßigen Fluss zu sorgen.

Der optische Messaufbau aus Kapitel 3.2 wird wieder verwendet und der mikrofluidische Chip wird so justiert, dass das transmittierte Licht maximiert wird. Dies ist der Fall, wenn Leuchtdiode, Messapertur und Photodiode aufeinander zentriert sind.

7.3.2 Herstellung der organischen Photodioden

Für die Messung werden die in Publikation [115] beschriebenen organischen Photodioden verwendet.¹ Diese zeichnen sich durch das Fehlen einer sonst üblichen Schicht von Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) : Poly(styrenesulfonate) (PEDOT : PSS) aus, was die Stabilität bei Luftfeuchtigkeit erhöht [155] und den Dunkelstrom reduziert [156, 157].

Der Herstellungsprozess ist wie folgt: Auf ein mit elektrisch leitfähigem Indium-Zinn-Oxid (engl. *indium tin oxide*, ITO) beschichtetes Glassubstrat wird per Spin-Coating eine 450 nm dicke Schicht aus Poly(3-hexylthiophene) (P3HT) und Phenyl-C₆₁-Butyric Acid Methyl Ester (PCBM) aufgebracht. Durch Aufdampfen durch eine Maske werden Aluminiumkontakte als Kathode aufgebracht. Die Überlappfläche beider Elektroden definiert die aktive Photodiodenfläche und beträgt $2 \times 2 \text{ mm}^2$.

Die in der Publikation [115] beschriebenen Charakteristika der Photodiode zeigen eine gute externe Quanteneffizienz im Kurzschlussfall von über 40 % im Wellenlängenbereich von 400 nm bis 600 nm. Damit ist die Emissionswellenlänge der Leuchtdiode von 450 nm gut abgedeckt. Auf das

¹Die für die Messung verwendeten organischen Photodioden wurden von Christian Hönes im Rahmen seiner Diplomarbeit hergestellt.

Anlegen einer Vorspannung von -5 V wird hier verzichtet, da dadurch die Quanteneffizienz nur geringfügig gesteigert werden kann.

7.3.3 Modifikation des Messaufbaus

Da der Lichtpfad zwischen Leuchtdiode und Photodiode hier nicht von Absorptionsfiltern blockiert wird, muss die Verstärkerschaltung aus Kapitel 3.1.9 leicht angepasst werden. Im Gegensatz zu den Fluoreszenzmessungen erzeugen die Photodioden bei der hier verwendeten optischen Anordnung ein größeres Stromsignal, welches in den Transimpedanzverstärkern entweder eine höhere Maximalspannung oder einen kleineren Rückkoppelwiderstand erfordert. Der für die Fluoreszenzmessungen verwendete Wert von $30\text{ M}\Omega$ für die Rückkoppelwiderstände wird deshalb hier im Falle der anorganischen Photodiode (Osram, BPW 34) auf $1\text{ M}\Omega$, bzw. im Falle der organischen Photodiode auf $0.56\text{ M}\Omega$ reduziert.

Um die Lichtverteilung auf der Seite der Lichtquelle zu verbessern, wird vor die Leuchtdiode eine zusätzliche Streufolie (LEE filters, No. 224) eingesetzt.

7.3.4 Durchführung der Messungen

Um die Leistungsfähigkeit des Partikeldetektionssystems einzuschätzen, werden eine Reihe von unterschiedlichen Mikropartikeln verwendet. Es werden transparente sphärische Polystyrolpartikel von $1\text{ }\mu\text{m}$, $3\text{ }\mu\text{m}$, $7\text{ }\mu\text{m}$, sowie $10\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser verwendet. Zusätzlich werden absorbierende Polystyrolpartikel mit $10\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser verwendet. Die Partikel werden in einer 1:2 Mischung aus deionisiertem Wasser und 10fach konzentriertem PBST (Sigma-Aldrich, „Phosphate buffered saline with Tween-20 10x concentrate“) dispergiert. Dieses Mischungsverhältnis wird gewählt, da dabei das Absinken der Polystyrolpartikel stark verlangsamt wird, da die spezifische Dichte von Partikel und Flüssigkeit gut angepasst sind.

Vor der Messung wird das Mikrofluidiksystem bei einer Flussrate von $1000\text{ }\mu\text{l/h}$ für ca. 30 Minuten mit der verdünnten Partikelflüssigkeit gespült.

Dabei werden ein Großteil der Rückstände vorheriger Messungen und Luftblasen ausgespült. Danach wird die Flussrate auf $100 \mu\text{l/h}$ reduziert und das Messsignal wird über eine Dauer von mindestens 5 Minuten aufgenommen. Diese Aufnahmen werden für alle Partikeltypen beginnend bei $10 \mu\text{m}$ Größe durchgeführt, um die Signalverläufe der Partikel zu bestimmen. Die Messungen werden mit der größten Partikelgröße begonnen damit in Folgemessungen Signale von Rückständen größerer Partikel eindeutig erkannt und aussortiert werden können.

Danach wird eine Lösung, die alle Partikeltypen mit Ausnahme von $7 \mu\text{m}$ Durchmesser enthält, verwendet, um eine Aufnahme für die Erstellung eines Histogramms zu erhalten. Die Partikelgröße von $7 \mu\text{m}$ wird hier ausgelassen, um im Histogramm Überlappungen mit den beiden $10 \mu\text{m}$ großen Partikeln zu vermeiden. Nach jedem Messdurchgang mit Partikeln wird der Mikrofluidikchip mit partikelfreier Flüssigkeit gespült.

Der hier beschriebene Messablauf wird zuerst mit der anorganischen Photodiode durchgeführt und danach für die organische Photodiode wiederholt.

7.4 Ergebnisse und Diskussion

7.4.1 Pulsformen

Um die Funktionsfähigkeit des Messverfahrens generell nachzuweisen werden zunächst die Signalformen für die einzelnen Partikeltypen ausgewertet. Typische Pulsformen sind in Abbildung 7.9 dargestellt. Die symmetrische Form der Pulse zeigt, dass die Ausrichtung der optischen Elemente hinreichend genau ist.

Wie erwartet ist eine starke Größenabhängigkeit der Pulshöhe für die transparenten Partikel mit $3 \mu\text{m}$, $7 \mu\text{m}$ und $10 \mu\text{m}$ Durchmesser in Abbildung 7.9 zu sehen. Die Pulsform für einzelne Partikel mit $1 \mu\text{m}$ Durchmesser ist in Abbildung 7.9 nicht dargestellt, da die Flanken der Pulse im ungefilterten Signal nicht erkennbar sind.

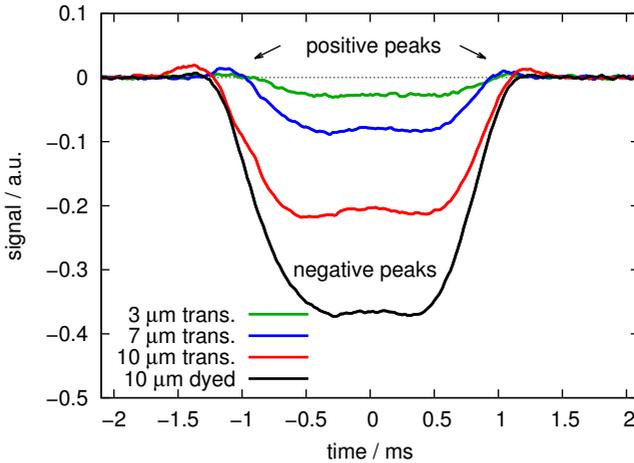


Abbildung 7.9: Repräsentative ungefilterte Pulsformen von transparenten bzw. absorbierenden Partikeln mit den in der Legende angegebenen Größen gemessen mit der anorganischen Photodiode. Der Lichtverlust durch Extinktion erzeugt den negativen Hauptpuls. Davor und danach erzeugen streuende Partikel noch kleinere positive Pulse durch Licht, das zum Detektor hin gestreut wird.

Im Vergleich zu den transparenten Partikeln mit $10\ \mu\text{m}$ Durchmesser zeigen die absorbierenden Partikel mit $10\ \mu\text{m}$ Durchmesser einen deutlich stärkeren negativen Puls. Dies lässt sich leicht dadurch erklären, dass bei transparenten Partikeln etwa die Hälfte des Streulichtes auf den Detektor fällt und dadurch den Lichtverlust vermindert.

Am Anfang und am Ende der Messzone erzeugen die nichtabsorbierenden Partikel zwar noch keinen Schatten auf dem Detektor aber sie erzeugen schon Streulicht welches auf den Detektor fällt. Dadurch entsteht bei den transparenten Partikeln in Abbildung 7.9 am Anfang und Ende des großen negativen Pulses eine kleine positive Erhebung im Signal. Für die absorbierenden Partikel fällt diese Erhebung entsprechend deutlich geringer aus, da sie weniger Streulicht erzeugen. Diese Geometrie der Aperturen erlaubt also die gleichzeitige Messung von Extinktion und zusätzlich von Lichtstreuung hin zum Detektor.

Die in Abbildung 7.9 gezeigten Pulsformen zeigen für jeden Partikeltyp einen typischen Verlauf. Da die Partikel auf diesem Mikrofluidikchip nicht auf einen engen Bereich im Zentrum des Kanals fokussiert werden, können Abhängigkeiten der Pulsform von der Partikelposition zu Variationen der Pulsformen und damit zu Messfehlern führen. Um die Eignung der Messanordnung nachzuweisen, muss eine hohe Anzahl von Partikeln ausgewertet werden. Wenn sich dabei keine große Variation der gemessenen Signalwerte unterschiedlicher Partikel ergibt, ist nachgewiesen, dass die verbleibende Positionsabhängigkeit der Pulsform keinen negativen Einfluss auf das Messergebnis hat. Vorteilhaft ist hierbei, dass die Geometrie der Aperturen in Kapitel 7.1.2 explizit entworfen wurde, um eine Unabhängigkeit von der Pulsform zu gewährleisten.

Eine fehlende Partikelfokussierung hat auch die Folge, dass höhere Geschwindigkeitsvariationen auftreten. Da die Pulsform ein abgeflachtes Plateau aufweist, kann die Signalfilterung wie bei der niederen Flussrate in Kapitel 3.5.2 angewendet werden, wodurch die resultierende Variation der gefilterten Signalmaxima deutlich geringer ausfallen kann als die Geschwindigkeitsvariation.

Tabelle 7.1: Parameter der Wahrscheinlichkeitsverteilungen der gemessenen Partikelpopulationen. Der Mittelwert μ und der Variationskoeffizient CV wurden für die anorganische (tiefgestelltes i), sowie organische (tiefgestelltes o) Photodiode, als auch für die negative (hochgestelltes -) und positive (hochgestelltes +) Pulshöhen, ausgewertet.

Anorganische PD	μ_i^-	$CV_i^-/\%$	μ_i^+	$CV_i^+/\%$
10 μm dyed	3.5×10^{-1}	5.3	8.0×10^{-3}	18.3
10 μm trans.	2.0×10^{-1}	4.6	1.6×10^{-2}	16.9
3 μm trans.	2.6×10^{-2}	11.3	4.3×10^{-3}	19.7
1 μm trans.	3.5×10^{-3}	17.7	2.1×10^{-3}	32.2

Organische PD	μ_o^-	$CV_o^-/\%$	μ_o^+	$CV_o^+/\%$
10 μm dyed	2.7×10^{-1}	10.6	6.0×10^{-3}	24.1
10 μm trans.	1.3×10^{-1}	9.5	1.2×10^{-2}	17.0
3 μm trans.	1.7×10^{-2}	18.3	3.5×10^{-3}	28.8
1 μm trans.	-	-	-	-

7.4.2 Histogramme

Die Signale für die Mischung aus transparenten Partikeln mit 1 μm , 3 μm und 10 μm Durchmesser sowie den eingefärbten Partikeln mit 10 μm Durchmesser wurden jeweils mit einer anorganischen sowie einer organischen Photodiode gemessen und ausgewertet. Die zugehörigen Histogramme für den negativen Hauptpuls sind in Abbildung 7.10a für die anorganische sowie in Abbildung 7.10b für die organische Photodiode dargestellt. Im direkten Vergleich fällt auf, dass die organische Photodiode sowohl ein stärkeres Rauschen als auch eine geringere Pulshöhe für dieselbe Partikelgröße aufweist. Der Unterschied in den Pulshöhen liegt in der unterschiedlichen Quanteneffizienz der Photodioden kombiniert mit der unterschiedlichen Verstärkung des Transimpedanzverstärkers begründet. Durch Anpassung der Verstärkung könnte dieser Unterschied ausgeglichen werden.

Für das erhöhte Grundrauschen gibt es mehrere Erklärungsansätze. Einerseits weist die organische Photodiode eine höhere Kapazität von ca.

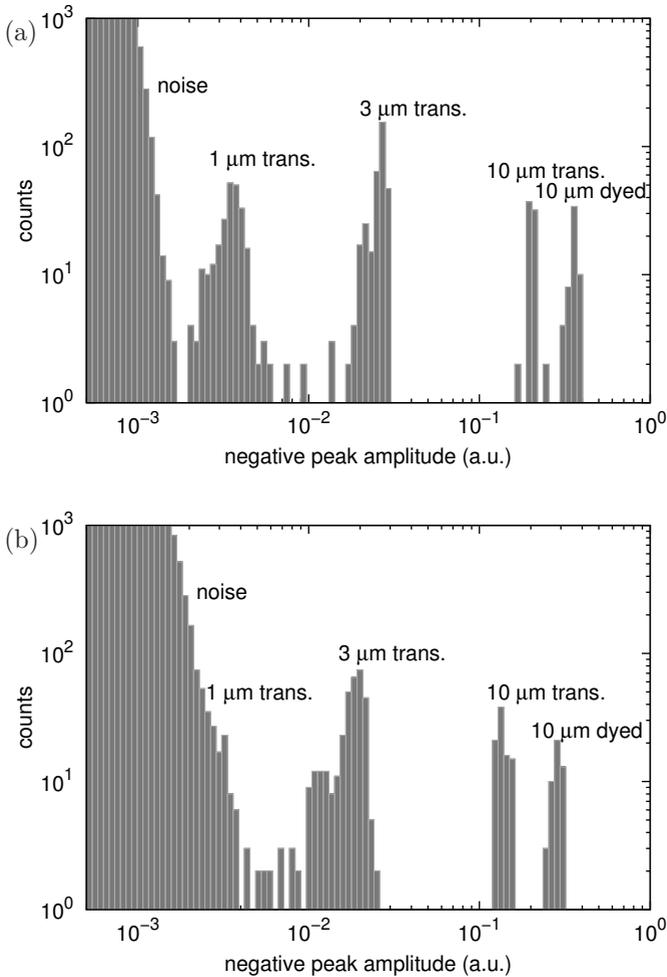


Abbildung 7.10: Histogramme der negativen Pulse nach Signalfilterung für eine Mischung von Partikeln. In a) mit der anorganischen Photodiode und in b) mit der organischen Photodiode gemessen. In beiden Fällen sind Partikel ab $3 \mu\text{m}$ Durchmesser gut detektierbar. Bei der anorganischen Photodiode können auch Partikel mit $1 \mu\text{m}$ Durchmesser detektiert werden.

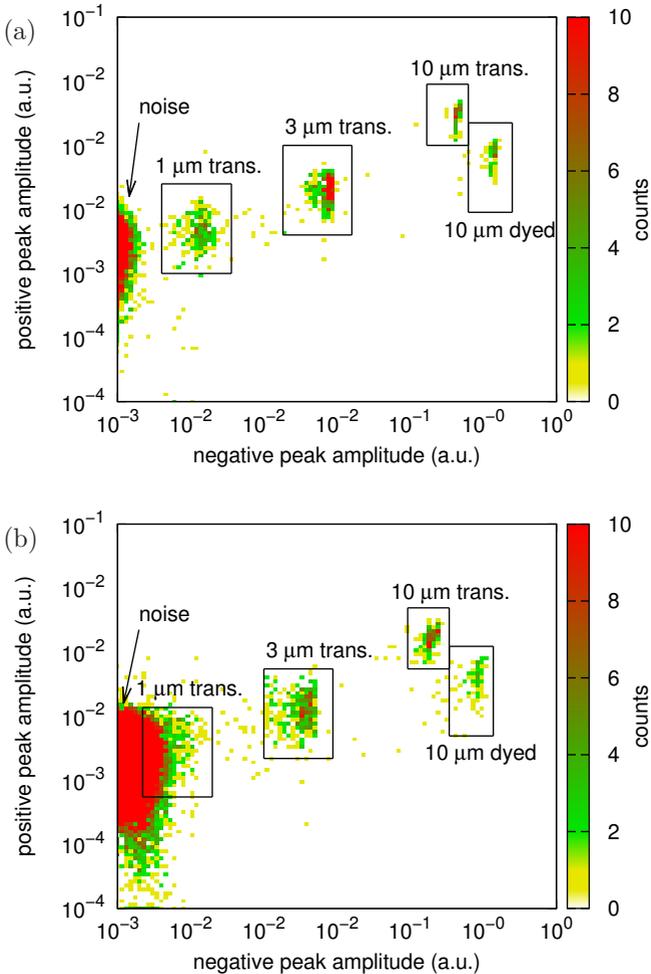


Abbildung 7.11: Dichteplot der Höhe der negativen Pulse aus den vorhergehenden Diagrammen 7.10 auf der x-Achse, sowie die Höhe der zugehörigen positiven Pulse auf der y-Achse. Die Ergebnisse von anorganischer (a) und organischer (b) Photodiode zeigen eine gute Übereinstimmung. Die eingefärbten Partikel haben aufgrund der geringeren Streuung durchweg eine geringere Höhe der positiven Pulse als die transparenten Partikel.

268 pF im Vergleich zur anorganischen Photodiode mit 70 pF auf. Andererseits sind organische Halbleiter dafür bekannt, ein höheres Rauschen aufzuweisen [158].

Während durch die Signalfilterung bei der Messung mit der anorganischen Photodiode die 1 μm großen Partikel sehr gut vom Rauschen getrennt sind, überlappt bei der Messung mit der organischen Photodiode das Histogramm des Rauschens mit dem der 1 μm großen Partikel. Die größeren Partikel können jedoch mit beiden Photodioden sehr gut detektiert werden. Die Signalqualität der Messung mit der organischen Photodiode erreicht also fast diejenige der anorganischen Photodiode. Die organische Photodiode könnte, wenn sie per Druckverfahren hergestellt wird, direkt auf oder anstelle der Detektorapertur prozessiert werden, wodurch sich die Diodenfläche und damit die Kapazität der Diode um einen Faktor 139 reduzieren würde. Es ist also zu erwarten, dass integrierte Lösungen aus organischen Materialien in solchen Fällen den anorganischen Bauteilen überlegen sein werden.

7.4.3 Dichteplots

Um die erwähnten Effekte bei Streuung in den Pulsformen näher zu untersuchen, wird für die nächste Auswertung für jede detektierte Pulsform mit negativer Amplitude noch die von der Streuung erzeugte positive Amplitude ausgewertet. Hierbei wird die große negative Spitze für die Detektion vorhandener Partikel und deren Positionen verwendet. Die kleine positive Spitze wird danach abhängig von der Position der negativen Spitze ermittelt.

Diese Daten werden wiederum für die anorganische sowie die organische Photodiode ausgewertet und als zweidimensionaler Dichteplot in Abbildung 7.11 dargestellt. Dabei bestätigen sich die bei den Pulsformen gemachten Beobachtungen. Die eingefärbten 10 μm großen Partikel weisen konsistent eine höhere Amplitude verbunden mit einer geringeren Lichtstreuung auf. Für die kleineren Partikel nehmen beide Effekte ab.

Während die Verteilung der negativen Amplituden für die großen Partikel sehr schmal ist, zeigt sich für die 3 μm Partikel eine breite Verteilung hin

zu kleineren Amplituden. Dies kann mithilfe der Simulationsergebnisse aus Abschnitt 7.2 in Abbildung 7.7a einfach erklärt werden. Wenn angenommen wird, dass die Partikel eine Variation in der Größe aufweisen, ändert sich der Streuquerschnitt für Partikel über $3\ \mu\text{m}$ Durchmesser kaum. Für Partikel mit Durchmessern kleiner als $3\ \mu\text{m}$ nimmt der Streuquerschnitt jedoch stark ab, was im Histogramm zu einer einseitig verbreiterten Verteilung führt.

Für die Partikel mit $1\ \mu\text{m}$ Durchmesser ist entsprechend aufgrund der größenabhängigen Variation des Streuquerschnittes, aber auch aufgrund des Hintergrundrauschens eine breitere Variation zu erwarten. Kleinere Partikel weisen nach Abbildung 7.7a einen sehr geringen Streuquerschnitt auf, womit $1\ \mu\text{m}$ große Partikel die kleinsten, gut detektierbaren Partikel sind.

7.4.4 Variationskoeffizienten

Neben der visuellen Darstellung der Messergebnisse sind natürlich die Variationskoeffizienten für die einzelnen Partikelsorten interessant, um die Qualität des Messverfahrens zu beurteilen. Der Variationskoeffizient (engl. *coefficient of variation*, CV) ist das Verhältnis aus der Standardabweichung σ zum Mittelwert μ einer Messwertreihe. Dieser wird für jede Partikelsorte einzeln bestimmt. Um die Partikel zu sortieren, werden in Abbildung 7.11 entsprechend rechteckige Kästen gezeichnet, um die unterschiedliche Partikelsorten von Messfehlern abzugrenzen.

Die Variationskoeffizienten CV werden für die negativen (hochgestelltes -) und die positiven (hochgestelltes +) Signalspitzen sowie für die anorganische (tiefgestelltes i) und organische Photodiode (tiefgestelltes o) in Tabelle 7.1 gezeigt.

Der CV_{i}^{-} für die anorganische Photodiode entspricht in etwa der Hälfte des CV_{o}^{-} für die organische Photodiode. Im Vergleich zu Literaturwerten von einem CV_{i}^{-} von 8.4% bzw. 19.1% für Partikel eines Durchmessers von $12\ \mu\text{m}$ bzw. $8\ \mu\text{m}$ sind die in Tabelle 7.1 gezeigten Werte auch für die organische Photodiode sehr gut.

Die Variationskoeffizienten der positiven Signalspitzen sind in allen Fällen deutlich größer als die korrespondierenden negativen Spitzen. Dies ist

aufgrund der geringeren Pulshöhe bei gleichbleibendem Hintergrundrauschen auch zu erwarten. Um hier Abhilfe zu schaffen, müsste das optische Design des Systems entsprechend angepasst werden. Generell ist jedoch die Detektion der Extinktion deutlich einfacher als die Detektion des zum Detektor hin gestreuten Lichtes.

Von Interesse ist, dass die Variationskoeffizienten der negativen Pulshöhen für die transparenten $10\ \mu\text{m}$ großen Partikel etwas geringer sind als für die absorbierenden $10\ \mu\text{m}$ großen Partikel. Eigentlich wäre der gegenteilige Effekt zu erwarten, da die absorbierenden Partikel eine größere Pulshöhe aufweisen. Möglicherweise weisen die gefärbten Partikel eine höhere Größenvariation auf oder die Verteilung des gestreuten Lichtes verringert die Abhängigkeit der Pulshöhe von der Partikelposition im Kanal.

Ein weiteres Augenmerk soll auf die Partikelfokussierung geworfen werden. Zwar ist in dieser Kanalgeometrie keine explizite Partikelfokussierung eingebaut, jedoch gibt es Strömungseffekte, die die Partikel einerseits weg von einer Kanalwand, aber andererseits auch weg vom Zentrum des Kanals treiben. Unter kontrollierten Bedingungen können Partikel so ebenfalls in eine oder mehrere Positionen nahe der Kanalwände fokussiert werden [109, 125, 159, 160]. Die Auswertung der Pulsbreiten für die Partikelgrößen von $10\ \mu\text{m}$ ergeben hier Variationskoeffizienten von 15 % für die absorbierenden sowie 16 % für die eingefärbten Partikel. Dies ist zwar im Vergleich zu den Ergebnissen aus Kapitel 3.4.1 schlechter, zeigt jedoch, dass eindeutig Partikelfokussierungseffekte stattfinden. Für die kleineren Partikelgrößen von $3\ \mu\text{m}$ und $1\ \mu\text{m}$ ergeben sich Variationskoeffizienten der Geschwindigkeit von 30 % und 35 %. Dies zeigt, dass kleinere Partikel entsprechend schlechter fokussiert werden.

Bemerkenswert ist in diesem Hinblick, dass die Variationskoeffizienten der gemessenen und gefilterten Lichtsignale trotz starker Variationen in Partikelposition und Partikelgeschwindigkeit deutlich geringer sind als die Variation der Partikelgeschwindigkeit. Dieses Resultat wird durch die speziell angepasste Geometrie der Aperturen ermöglicht.

7.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde eine einfache druckbare Anordnung für die Messung der Extinktion von Partikeln entworfen. Mittels einer vereinfachten Simulation wurde die Geometrie derart für Absorptionsmessungen optimiert, dass die ermittelte Pulshöhe möglichst wenig von Rauschen und der Position des Partikels im Kanal beeinflusst wird.

Um die auch bei transparenten Partikeln auftretende Extinktion zu berücksichtigen, wurde der Streuquerschnitt sphärischer Partikel simuliert. Dies wurde insbesondere für den Fall des Spektrums der für die Messung verwendeten LED als Lichtquelle durchgeführt. Das Ergebnis ist, dass für Größen unter $1\ \mu\text{m}$ Durchmesser Rayleighstreuung mit entsprechend geringen Streuquerschnitten auftritt. Zwischen $1\ \mu\text{m}$ und $10\ \mu\text{m}$ treten starke Resonanzen auf, die den Streuquerschnitt beeinflussen, sodass hier kein linearer Zusammenhang zwischen Streuquerschnitt und Partikelquerschnitt besteht. Dies hat für die Messung bestimmter Partikelgrößen Vorteile, da hier ein stärkeres Signal gemessen wird. Für die Bestimmung des Partikeldurchmessers aus den Messdaten wirkt sich dies jedoch nachteilig aus.

Mit der optimierten Aperturgeometrie wurde ein Mikrofluidikchip hergestellt und mit unterschiedlichen absorbierenden und transparenten Mikropartikeln getestet. Die gemessene Pulsform für die absorbierenden Partikel entspricht der aus der Simulation erwarteten Pulsform. Bei transparenten Partikeln treten zusätzliche bei der Simulation nicht berücksichtigte Effekte auf. Diese führen zu einem lokalen Anstieg im gemessenen Lichtsignal und korrespondieren mit der Streuung. Die Messungen wurden sowohl mit einer anorganischen, als auch mit einer organischen Photodiode als Detektor durchgeführt.

Die Ergebnisse der $10\ \mu\text{m}$ großen Partikel zeigen einen Variationskoeffizienten von etwa 5 % für die anorganische und etwa 10 % für die organische Photodiode. Mit der anorganischen Photodiode können auch Partikel mit nur $1\ \mu\text{m}$ Durchmesser klar erkannt werden, während die organische Photodiode etwas schlechter ist, jedoch für Partikel mit $3\ \mu\text{m}$ deutlich erkennbare Signale liefert. Diese Ergebnisse wurden ohne zusätzliche Fokussierungsstrukturen erreicht und es wurde ermittelt, dass abhängig von

der Partikelgröße auch im geraden Kanal eine automatische hydrodynamische Partikelfokussierung mit einem Variationskoeffizienten von 15 %, 30 % bzw. 35 % für die Partikelgrößen von 10 μm , 3 μm bzw. 1 μm stattfindet.

Mit der vorgestellten optischen Struktur wurden also erfolgreich Partikel bis hinab zu 1 μm Durchmesser über Extinktion detektiert. Zusätzlich wurde anhand einer organischen Photodiode gezeigt, dass diese sich für den Einsatz in diesem mikrofluidischen System eignet.

8 Transiente Signale von organischen Photodioden

Organische Photodioden stellen eine vielversprechende Technologie dar, um optische Sensoren per Druckverfahren in mikrofluidische Systeme zu integrieren. Da es sich um eine relativ neue Technologie handelt, bei der insbesondere für organischen Solarzellen entwickelte Materialien eingesetzt werden, besteht noch Bedarf bei der Material- und Bauelementforschung. Eine hierbei verbreitete Methode, um Materialparameter zu ermitteln ist die Analyse der transienten Stromantwort auf einen kurzen Lichtpuls an kleinflächigen organischen Photodioden. Mit dieser Methode kann die damit charakterisierte Photodiode auch auf ihre Eignung als Sensor für transiente Signale wie sie bei der Partikelmessung auftreten charakterisiert werden. In diesem Kapitel werden Methoden entwickelt, um bei der Pulsantwort von Messungen an organischen Photodioden störende Einflüsse von Widerständen und elektrischen Kapazitäten der Bauteilelektroden zu korrigieren. Darauf aufbauend werden Effekte untersucht, die bei länglich ausgedehnten Photodiodenflächen auftreten. Bei lokaler Anregung tritt eine positionsabhängige Pulsform auf. Es wird untersucht, wie diese Effekte zur Positionsbestimmung verwendet werden können.¹

In Abbildung 8.1a ist schematisch der Aufbau einer organischen Photodiode skizziert. Sie besteht aus einem Absorbermaterial, das auf einem transparenten Trägersubstrat mit transparenter Elektrode aufgebracht ist. Die Rückelektrode wird beispielsweise durch eine Metallelektrode gebildet. Beide Elektroden werden elektrisch kontaktiert und mit dem Messgerät verbunden.

¹Teile dieses Kapitels wurden bereits in [161–164] veröffentlicht.

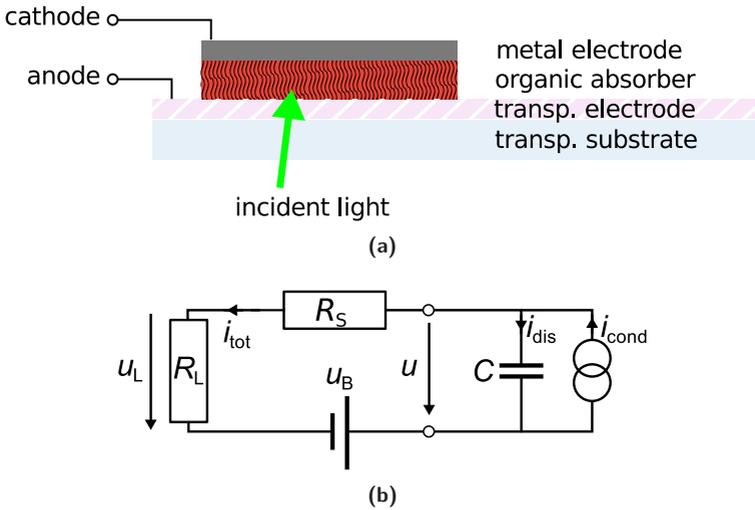


Abbildung 8.1: In a) wird der schematische Aufbau einer organischen Photodiode dargestellt. In b) das zugehörige Ersatzschaltbild. Der Kondensator C wird aus den beiden Elektroden mit dem organischen Absorber als Dielektrikum dazwischen gebildet. Der organische Absorber selbst stellt die Stromquelle dar.

Die gemessene Impulsantwort einer Photodiode wird von mehreren Faktoren bestimmt. 1) Die Pulsform der optischen Anregung. 2) Die Generation und der Transport der Ladungsträger innerhalb des Halbleiters. 3) Das RC-Glied, welches aus geometrischer Bauteilkapazität und dem Lastwiderstand des Messgerätes und den Serienwiderständen aus der Kontaktierung besteht. 4) Der Impulsantwort des Messgerätes selbst.

Wird das Bauteil mit geringen Signalstärken im linearen Bereich betrieben, so ergibt sich die gemessene Pulsantwort aus der zeitlichen Faltung der einzelnen Einflüsse.

Je nach Anwendung sind diese Anteile von unterschiedlicher Priorität. Generell gilt, dass im Vergleich sehr kurze Impulsantworten vernachlässigt werden können. Soll die Pulsform eines optischen Signals gemessen werden, so müssen entsprechend die Einflüsse der Faktoren 2-4 gering gehalten werden. Dies ist beispielsweise bei der Datenübertragung der Fall, da hier die Signalform analysiert wird. Mit organischen Photodioden wurden hier beispielsweise Signale einer Pulsbreite von 177.2 ns detektiert [165]. Bei der Anwendung für die Partikeldetektion in mikrofluidischen Systemen wäre dies bis zu einer Partikelrate von mehr als einer Million Partikeln pro Sekunde ausreichend. Der verhältnismässig langsame Ladungsträgertransport in organischen Halbleitern stellt also für die Anwendung in der Mikrofluidik kein Hindernis dar.

In der Materialforschung selbst ist gerade der Ladungsträgertransport von Interesse. Um diesen zu messen müssen die Einflüsse der Faktoren 1, 3 und 4 gering gehalten werden, damit der vom Ladungsträgertransport dominierte Anteil der Impulsantwort extrahiert werden kann. Dies wird mithilfe eines gepulsten Lasers, kleinen Bauteilflächen, sowie eines breitbandigen Oszilloskops als Messinstrument erreicht [155, 166–172].

In Abbildung 8.2 sind die Messungen der transienten Impulsantworten zweier organischer Photodioden, die sich nur hinsichtlich ihrer Schichtdicke (65 nm bzw. 165 nm) unterscheiden beispielhaft dargestellt. Details zur Herstellung und Versuchsdurchführung werden in Referenz [161] gegeben. Die in Abbildung 8.2 dargestellten Messungen wurden mit -5 V Vorspannung durchgeführt. Die Dauer des Anregepulses beträgt etwa 1 ns und hat deshalb keinen wesentlichen Einfluss auf den Verlauf des Pulses.

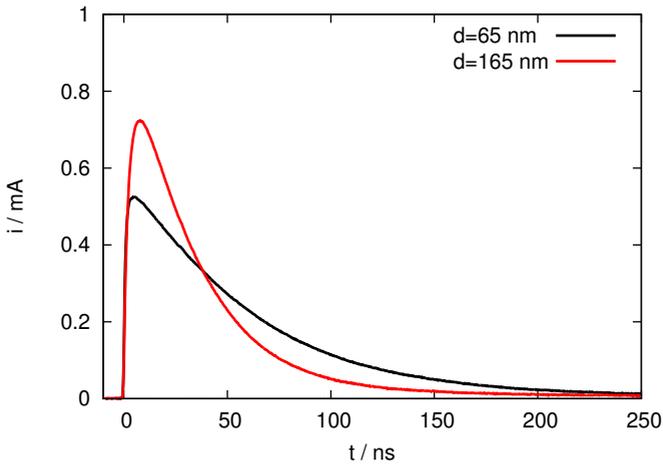


Abbildung 8.2: Transiente Impulsantworten zweier Photodioden mit unterschiedlichen Schichtdicken von 65 nm bzw. 165 nm. Hierbei zeigt die dünnere Photodiode einen langsameren Abfall des Pulses obwohl die Transitzeiten der Ladungsträger kürzer sind. Dieser Effekt wird auf die höhere Bauteilkapazität zurückgeführt.

Da sich die Ladungsträger nach ihrer Erzeugung im Halbleiter zu den Elektroden bewegen müssen, ist zu erwarten, dass der Pulsabfall bei zunehmender Schichtdicke langsamer wird. In Abbildung 8.2 ist jedoch der gegenteilige Effekt zu beobachten. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die geometrische Kapazität C bei zunehmender Schichtdicke d entsprechend umgekehrt proportional abnimmt. Die Dielektrizitätskonstante $\epsilon_r \epsilon_0$ kann für das Absorbermaterial generell als konstant angenommen werden. Im vorliegenden Fall ist die Diodenfläche A konstant. Damit ergibt sich die Kapazität zu

$$C = \epsilon_r \epsilon_0 \frac{A}{d}.$$

In Abbildung 8.2 zeigt sich, dass die aus den Bauteilelektroden gebildeten Kapazität und dem Lastwiderstand des Oszilloskops von 50Ω verursachte RC-Konstante einen wesentlichen Einfluss auf die Pulsantwort hat [161]. Dies äußert sich dadurch, dass für Photodioden mit dünnen Absorberschichten bei einer Verringerung der Schichtdicken die hierdurch ansteigende Kapazität der Photodiode die abfallenden Flanken der Pulsantwort verzögert. Dieser Effekt wurde an Photodioden mit einer Fläche von etwa 1.8 mm^2 beobachtet [161]. Für die Integration in mikrofluidische Systeme sind jedoch auch größere Flächen interessant. Die in dieser Arbeit verwendete anorganische Photodiode hat beispielsweise eine aktive Fläche von 7.5 mm^2 [117].

Die Eingangsimpedanz eines einzelnen Tansimpedanzverstärkers mit $30 \text{ M}\Omega$ Rückkoppelwiderstand und einem GBW von 3 MHz (z. B. TL074 [173]) ergibt bei einer Frequenz von 1 kHz einen Wert von $10 \text{ k}\Omega$. Dieser Wert ist deutlich höher, als der Lastwiderstand von 50Ω beim direkten Anschluss eines Oszilloskops [161]. Eine organische Photodiode mit einer Schichtdicke von 100 nm und einer Fläche von 7.5 mm^2 hat bei einem ϵ_r von 3.8 [161, 174] eine Kapazität von 18.92 nF . Zusammen mit einem Lastwiderstand von $10 \text{ k}\Omega$ ergibt sich eine RC-Konstante von 0.38 ms . Dieser Wert ist deutlich höher als die bei der Datenübertragung erreichten Pulsbreiten von 177.2 ns [165], was an der größeren Diodenfläche und dem geänderten Messverstärker liegt.

Deshalb ist es sowohl für Detektion von optischen Signalen als auch für die Messung von Materialparametern interessant, die Einflüsse des aus den Elektroden des Bauteils gebildeten Kapazität und dem Lastwiderstand gebildeten RC-Gliedes numerisch zu kompensieren. Hierfür wird im folgenden ein mathematisches Modell entwickelt und eine numerische Implementierung gezeigt.

8.1 RC-Modell

Abbildung 8.1a zeigt das Ersatzschaltbild einer Photodiode. Der Strom im Bauteil kann generell aufgeteilt werden in den Leitungsstrom i_{cond} innerhalb des Halbleiters, den Verschiebestrom i_{dis} , der durch die Elektroden gebildeten Kapazität, sowie die Summe beider Ströme i_{tot} , die den gemessenen Gesamtstrom ergibt. Neben dem Lastwiderstand R_L des Messgerätes, über den die gemessene Spannung u_L abfällt, wird noch ein Serienwiderstand R_S für die Kontaktwiderstände und eine Spannungsquelle u_B für eine statische bzw. dynamische Vorspannung berücksichtigt.

Um den Einfluss von i_{dis} zu kompensieren muss dieser Strom aus dem Messsignal u_B berechnet werden und vom Gesamtstrom i_{tot} abgezogen werden.² Damit ergibt sich

$$i_{\text{cond}} = i_{\text{tot}} + i_{\text{dis}}. \quad (8.1)$$

Für das Messsignal und den Gesamtstrom ergibt sich der Zusammenhang

$$i_{\text{tot}} = \frac{u_L}{R_L}. \quad (8.2)$$

Für den Verschiebestrom ist die Änderung der Spannung u über die Kapazität ausschlaggebend, es gilt

$$i_{\text{dis}} = C\dot{u} \quad (8.3)$$

²Aufgrund der gegensätzlich gewählten Richtung der Strompfeile von i_{dis} und i_{cond} in Abbildung 8.1a ergibt sich in Gleichung 8.1 eine Addition von i_{dis} zu i_{tot} .

Tabelle 8.1: Liste der in Kapitel 8 verwendeten Symbole.

Symbol	Einheit	Bedeutung
A	m^2	Kondensatorfläche
C	AsV^{-1}	Kapazität
d	m	Dicke des Kondensators
i_{cond}	A	Leitungsstrom
i_{tot}	A	Gesamtstrom
i_{dis}	A	Verschiebestrom
\hat{i}	A	Lokaler zeitlicher Mittelwert des Stromes
l	m	Länge des Bauteils
Q	s^{-1}	Transitionsmatrix
R_{E}	AV^{-1}	Elektrodenwiderstand
R_{L}	AV^{-1}	Lastwiderstand
R_{S}	AV^{-1}	Serienwiderstand
t	s	Zeit
t_k	s	Zeit zum Abtastzeitpunkt k
u	V	Spannung an den Kontakten des Kondensators
u_{B}	V	Vorspannung
u_{comp}	V	RC-kompensierte Spannung
u_{L}	V	Spannung über dem Lastwiderstand
x	m	Entfernung zum Kontakt
ϵ_0	$\text{AsV}^{-1}\text{m}^{-1}$	Permittivität
ϵ_{r}	1	Relative Permittivität
τ_{RC}	s	RC-Konstante

mit

$$\dot{u} = \dot{u}_B + \dot{u}_L \frac{(R_L + R_S)}{R_L}. \quad (8.4)$$

Die RC-Konstante beträgt hierbei

$$\tau_{RC} = (R_L + R_S) C. \quad (8.5)$$

Aus den Gleichungen 8.1 bis 8.4 ergibt sich

$$i_{\text{cond}} = \frac{u_L}{R_L} + C\dot{u}_B + \frac{\dot{u}_L}{R_L} (R_L + R_S) C. \quad (8.6)$$

Da sich die Spannung ohne RC-Effekte u_{comp} aus i_{cond} berechnen würde, gilt für die RC-kompensierte Spannung

$$u_{\text{comp}} = i_{\text{cond}} (R_L + R_S). \quad (8.7)$$

Auflösen von Gleichung 8.6 nach u_L mit anschließender Integration ergibt

$$u_L(t) = u_L(0) - \frac{R_L}{(R_L + R_S)} u_B(t) + \frac{1}{(R_L + R_S) C} \int_0^t (R_L i_{\text{cond}}(\tau) - u_L(\tau)) d\tau. \quad (8.8)$$

Hierbei besteht die aktuell am Messgerät anliegende Spannung aus vier Teilen, 1) dem Anfangswert u_L für $t = 0$, 2) der durch den Spannungsteiler aus R_L und R_S reduzierten Vorspannung u_B , 3) der integrierten Spannungshistorie von u_L bis zum betrachteten Zeitpunkt t geteilt durch die RC-Konstante, sowie 4) dem skalierten Integral des Leitungsstromes i_{cond} bis zum Zeitpunkt t . Werden hier nur die Teile 1 und 3 betrachtet, so ergibt sich eine Integralgleichung, die einen exponentiellen Abfall von u_L beschreibt. Beim vierten Teil befindet sich i_{cond} im Integral, da durch die Parallelschaltung des Kondensators ein Strom nicht sofort eine Spannung erzeugen kann, sondern erst den Kondensator laden muss.

Gleichung 8.8 kann prinzipiell für zwei Anwendungen genutzt werden. Einerseits kann aus einem simulierten Strom i_{cond} , bei welchem die Simulation keine RC-Effekte berücksichtigt der Bauteilstrom eines Bauteils mit

RC-Effekten vorhergesagt werden. Andererseits kann durch nachgeschaltete Anwendung der Gleichungen 8.6 und 8.8 die Stärke des RC-Effektes nach einer Messung angepasst werden, um andere Bauteilgeometrien zu simulieren.

Betrachtet man den Transport von Ladungsträgern in einem Halbleiter, so hängt dieser vom lokalen Feld ab, welches wiederum auch von der extern anliegenden Spannung abhängt. Der über den Lastwiderstand anfallende Spannungsabfall muss also verhältnismässig gering sein, damit das intern anliegende Feld keine großen Änderungen erfährt. Dies ist der Fall für kleine optische Leistungen [161].

8.1.1 Numerische Implementierung

Für die numerische Implementierung der Gleichungen 8.6 und 8.8 stehen verschiedene Möglichkeiten zur Auswahl. Eine Möglichkeit ist der zeitkontinuierliche Ansatz über numerische Lösungsverfahren für Integrale, für die viele Implementierungen existieren. Da es sich um ein lineares System handelt, können die Systemeigenschaften auch über die Impulsantwort und folglich im Frequenzbereich beschrieben werden. Durch Faltung des Signals mit der Systemimpulsantwort im Zeitbereich bzw. effizientere Methoden im Frequenzbereich können die Gleichungen 8.6 und 8.8 ebenfalls gelöst werden. Hier wird jedoch eine direkte numerische Implementierung gewählt, welche einfache Approximationen für die Ableitung der Spannung in Gleichung 8.6, sowie des Integrals in Gleichung 8.8 verwendet. Damit können die Gleichungen sehr effizient iterativ und mit sehr kurzen Zeitverzögerungen in einem zeitdiskreten System gelöst werden.

Eine zeitdiskrete Lösung von u_L in Gleichung 8.8 mittels iterativer Integration ergibt

$$\begin{aligned}
 u_{L,01}(t_k) &= u_{L,01}(t_{k-1}) - \frac{R_L}{(R_L + R_S)} (u_B(t) - u_B(t-1)) \\
 &\quad + \frac{R_L i_{\text{cond}}(t_k) - u_{L,01}(t_{k-1})}{(R_L + R_S) C} (t_k - t_{k-1}). \quad (8.9)
 \end{aligned}$$

Für u_B wird jeweils die zwischen den Iterationsschritten auftretende Differenz aufsummiert. Für die Integrale von i_{cond} und u_L werden deren Werte

mit der Schrittweite der Iteration $(t_k - t_{k-1})$ multipliziert. Die Zeitpunkte an denen die Werte von i_{cond} und u_L genommen werden sind aus praktischen Gesichtspunkten gewählt. Für den Strom i_{cond} liegt der Wert zum aktuellen Zeitpunkt t_k vor und wird verwendet. Für die zu integrierende Spannung $u_{L,01}$ liegt jedoch nur der vorhergehende Zeitpunkt t_{k-1} vor. Deshalb muss hier t_{k-1} anstatt t_k verwendet werden.

Für Gleichung 8.6 folgt damit direkt durch Auflösen von Gleichung 8.9 nach i_{cond}

$$i_{\text{cond},01}(t_k) = \frac{u_{L,01}(t_{k-1})}{R_L} + \frac{u_B(t_k) - u_B(t_{k-1})}{t_k - t_{k-1}} C + \frac{u_{L,01}(t_k) - u_{L,01}(t_{k-1})}{t_k - t_{k-1}} \frac{(R_L + R_S) C}{R_L}. \quad (8.10)$$

Hier sind alle Terme nur vom zum aktuellen Zeitpunkt t_k bekannten Werten und von im vorhergehenden Zeitpunkt t_{k-1} berechneten Werten abhängig. Bei einer festen Abtastrate mit einem Zeitintervall von $T = t_k - t_{k-1}$ erfordert die Berechnung der Gleichungen nur Addition, Subtraktion und Multiplikation. Somit ist eine Implementierung mithilfe eines Digitalen Signalprozessors (DSP) sehr einfach realisierbar.

In Gleichung 8.10 fällt auf, dass sich die numerische Ableitung von u_L auf den Zeitpunkt $t_{k-0.5}$ bezieht, jedoch u_L zum Zeitpunkt t_{k-1} und i_{cond} zum Zeitpunkt t_k verwendet werden. Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass für die numerische Berechnung des Integrals nach Gleichung 8.9 keine zukünftigen Werte von u_L bereitstehen, da diese ja eben erst durch die Integration berechnet werden. Durch diesen kleinen Zeitversatz können sich für schnelle Transienten folglich ebenfalls kleine Zeitversätze beim berechneten Signal ergeben. Um diesen Effekt für die Berechnung von i_{cond} zu eliminieren kann eine modifizierte Implementierung verwendet werden

$$i_{\text{cond},11}(t_k) = \frac{u_L(t_k)}{R_L} + \frac{u_B(t_{k+1}) - u_B(t_{k-1})}{t_{k+1} - t_{k-1}} C + \frac{u_L(t_{k+1}) - u_L(t_{k-1})}{t_{k+1} - t_{k-1}} \frac{(R_L + R_S) C}{R_L}. \quad (8.11)$$

Hierbei wird für die Berechnung des Leitungsstromes zum Zeitpunkt t_k nun der Spannungswert u_L zum Zeitpunkt t_k bzw. für die Ableitung zu den

Zeitpunkten $t_{k\pm 1}$ verwendet. Durch diese symmetrische Anordnung kann der Zeitversatz eliminiert werden. Ein Nachteil hierbei ist jedoch, dass Gleichung 8.11 nicht mehr das direkte Gegenstück zu Gleichung 8.9 darstellt.

Vorteile der Umkehrbarkeit zwischen den Gleichungen 8.9 und 8.10 ergeben sich bei aufeinanderfolgender Anwendung von Gleichung 8.10 gefolgt von Gleichung 8.9. Wenn bei der Umrechnung von i_{cond} in u_L eine modifizierte RC-Konstante verwendet wird lassen sich hierdurch aus einer einzelnen Messung an einem Bauteil mit einer bestimmten RC-Konstante Vorhersagen für Bauteile mit geänderten RC-Konstanten erlangen.

Für Anwendungen, bei denen die Umkehrbarkeit keine Rolle spielt, wie beispielsweise die Berechnung des Leitungsstroms aus der gemessenen Spannung, ist generell die Implementierung nach Gleichung 8.11 vorzuziehen.

8.1.1.1 Methodenvergleich

Um den Einfluss der Methode für die Ableitung auf den Verlauf des rekonstruierten Signals beurteilen zu können, wird ein Signal mit einem kurzen Puls simuliert. Hierfür wird die Gleichung

$$i_{\text{cond,cos}} = \begin{cases} 0 & t < 0 \\ i_{\text{cond},0} \left(\frac{1}{2} - \frac{1}{2} \cos \left(2\pi \frac{t}{t_0} \right) \right) & 0 < t < t_0 \\ 0 & t > t_0 \end{cases} \quad (8.12)$$

angesetzt mit den Parametern $i_{\text{cond},0}$ für die Höhe des Pulsmaximums und t_0 für die Pulsbreite.

Das dazugehörige Spannungssignal lässt sich für diese Pulsform einfach analytisch berechnen, was eine gute Ausgangslage für eine Beurteilung der numerischen Implementierung der Gleichungen 8.9, 8.10 und 8.11 bildet. Die Pulsform des Leitungsstromes mit dem zugehörigen Spannungssignal bei einer Zeitkonstante von $\tau_{\text{RC}} = \frac{1}{4}t_0$ ist in Abbildung 8.3a dargestellt. Für die Zeitdiskretisierung wird eine Schrittweite von $t_0/14$ gewählt, was eine recht grobe zeitliche Auflösung bietet und dadurch numerische Probleme deutlich hervorhebt.

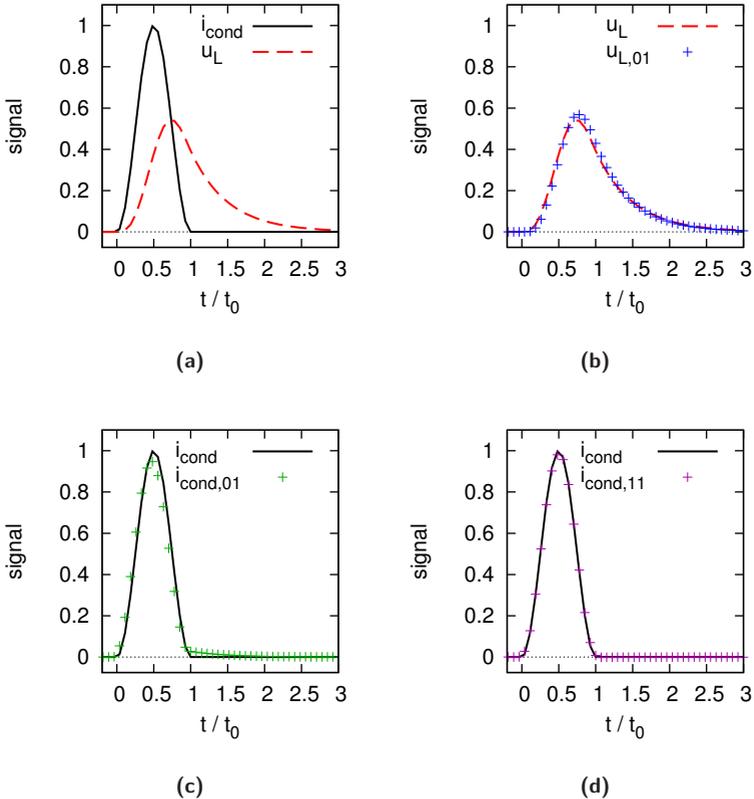


Abbildung 8.3: Darstellung der analytischen Lösung des Leitungsstromes und der Spannung über dem Lastwiderstand in a). In b) Vergleich der analytischen Lösung von u_L mit Gleichung 8.9. In c) und d) der Vergleich der analytischen Lösung für i_{cond} mit der nach Gleichung 8.10 bzw. 8.11 berechneten Lösung.

In Abbildung 8.3a führen die RC-Effekte im Stromsignal $i_{\text{cond,cos}}$ zu einer Verschmierung der Pulsform von $u_{\text{L,cos}}$. Durch Anwendung von Gleichung 8.9 auf das analytische Zeitsignal von $i_{\text{cond,cos}}$, in Abbildung 8.3b dargestellt, kann die analytische Pulsform von $u_{\text{L,cos}}$ gut nachgebildet werden. Leichte Abweichungen ergeben sich in der Höhe des Pulses und an den Pulsflanken. Analog treten bei Anwendung von Gleichung 8.10 auf $u_{\text{L,cos}}$ beim rekonstruierten Leitungsstrom leichte Abweichungen in Pulshöhe und Position auf, wie in Abbildung 8.3c zu sehen ist. Durch die verbesserte Berechnung der Ableitung in Gleichung 8.11 sind in Abbildung 8.3d keine Abweichungen sichtbar.

Daraus können geschlossen werden, dass für generelle Anwendungszwecke Gleichung 8.11 am besten geeignet ist und bei den Gleichungen 8.9 und 8.10 für eine ausreichend hohe Dichte der Abtastwerte gesorgt werden sollte, um die Abweichungen zu minimieren.

8.1.1.2 Einfluss des Rauschens

Reale Messsignale enthalten immer additives Rauschen. Vor der Anwendung auf ein reales Signal wird deshalb hier zunächst ein analytisches Signal mit additivem Rauschen verarbeitet und das Ergebnis mit dem rauschfreien Signal verglichen.

Da die Gleichungen 8.10 bzw. 8.11 zur Berechnung des Leitungsstroms prinzipiell ein Hochpassverhalten aufweisen wird dadurch hochfrequentes Rauschen verstärkt. Um dem entgegenzuwirken gibt es prinzipiell die Möglichkeit durch Anwendung von Gleichung 8.9 die RC-Konstante der Messung zu verringern und damit die Verstärkung des Rauschens einzuschränken. Hierbei muss je nach Anwendung eine Abwägung zwischen negativem Einfluss durch Signaldeformierung und Rauschverstärkung getroffen werden.

Eine andere Möglichkeit wird für den Fall einer Pulsform von t^{-1} simuliert. Ein solches Zeitverhalten kann bei dispersivem Ladungsträgertransport auftreten. Hierbei ist für kurze Zeitspannen das Signal stark gegenüber dem Rauschen und bei langen Zeitspannen flacht der Signalverlauf sehr stark ab, sodass hier über mehrere Messwerte der Mittelwert werden kann.

Mit einer Signalmittelung der Form

$$\hat{i}(t) = \frac{1}{t \left(a - \frac{1}{a}\right)} \int_{t/a}^{t \cdot a} i(\tau) d\tau \quad (8.13)$$

wobei $a > 1$ die Zeiträume für die Mittelung vorgibt, wird eine der Pulsform angepasste Erhöhung der Mittelungsdauer erreicht. Durch sukzessives Erhöhen der Abstände zwischen den Abständen, kann in einem Diagramm mit logarithmischer Auftragung eine äquidistante Verteilung der Punkte erreicht werden.

Um den Einfluss des Rauschens auf ein hyperbolisch abfallendes Signal unter RC-Effekten bzw. nach der Kompensation zu demonstrieren, wird eine Simulation durchgeführt. Die Signalform von $i_{\text{cond}} \propto t^{-1}$ ist in Abbildung 8.4b als durchgezogene schwarze Linie dargestellt. Diese wird durch Anwendung von Gleichung 8.9 mit einer Zeitkonstanten versehen. Das daraus resultierende Signal u_L ist in Abbildung 8.4a als durchgezogene schwarze Linie dargestellt. Dieses Signal wird mit Rauschen versehen. Daraus resultiert $u_{L,n}$ und wird in Abbildung 8.4a als graue Linie dargestellt. Die Rücktransformation resultiert in $i_{\text{cond},n}$ und wird in Abbildung 8.4b als graue Linie dargestellt. Der Verlauf von $i_{\text{cond},n}$ zeigt deutlich, dass das Rauschen stark verstärkt wurde. Durch Anwendung einer Mittelung nach dem Schema von Gleichung 8.13 wird in beiden Fällen eine starke Reduktion des Rauschens erreicht. Die entsprechenden Signalwerte sind in den Abbildungen 8.4b und 8.4a als + Symbole dargestellt. Nach der Mittelung folgen die Werte über den gesamten betrachteten Zeitbereich sehr gut der unverrauschten Kurve.

8.1.2 Anwendung auf Messwerte

Um die Anwendbarkeit der Methode exemplarisch an einer Messung zu testen werden zwei Messkurven von organischen Photodioden ausgewertet. Die Details der Versuchsdurchführung sind in Referenz [161] und [162] beschrieben.

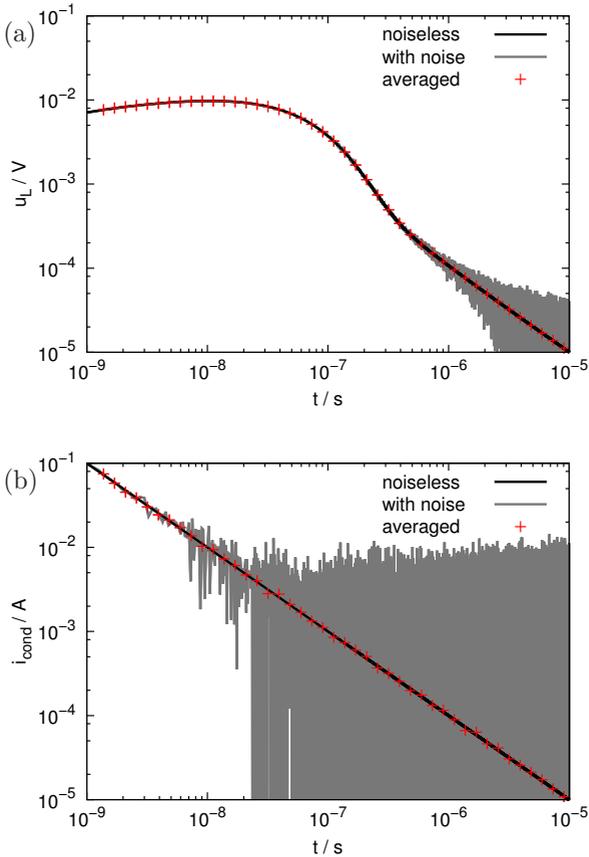


Abbildung 8.4: Einfluss von additivem Rauschen auf das Signal ohne Rauschen (schwarze Kurve) im Vergleich zum verrauschten Signal (graue Kurve). In a) wird zum rauschfreien Signal u_L Rauschen addiert. Aus diesem verrauschten Signal wird der Leitungsstromes i_{cond} wiederhergestellt und in b) als graue Kurve dargestellt. Die Symbole zeigen die lokalen Zeitmittelwerte des verrauschten Signals der jeweiligen Unterabbildung. Sie weisen eine geringe Abweichung zum unverrauschten Signal (schwarze Kurve) auf.

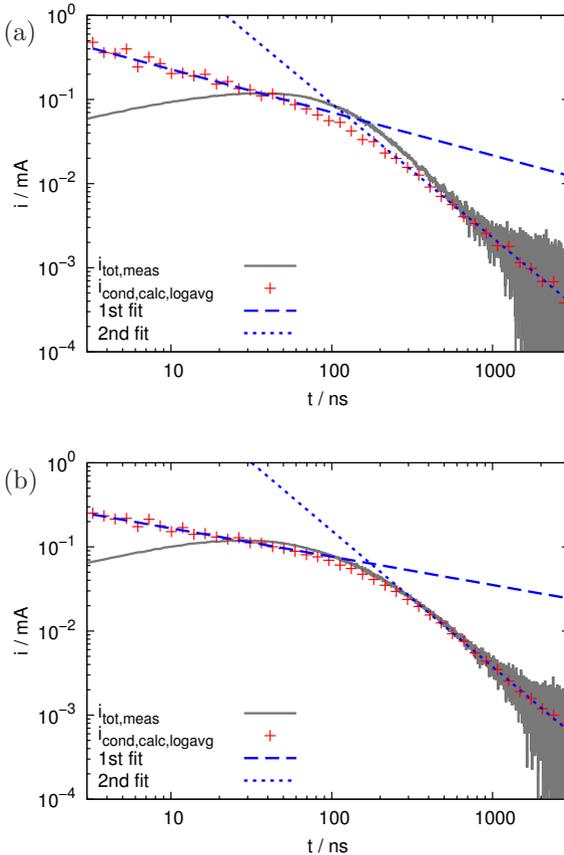


Abbildung 8.5: Transiente Pulsantwort zweier Photodioden mit 65 nm Schichtdicke in a) und 165 nm Schichtdicke in b). Die graue Linie stellt die unverarbeiteten Messdaten dar. Mit Symbolen sind die nach Gleichung 8.11 kompensierten und nach Gleichung 8.13 gemittelten Messdaten dargestellt. An die so verarbeiteten Messdaten können zwei Geraden (gestrichelt bzw. gepunktet) für den vorderen bzw. hinteren Teil der Pulsantwort angelegt werden.

In Abbildung 8.5 sind die Messkurven als graue Linie dargestellt. Sie weisen die eingangs anhand von Abbildung 8.2 besprochenen RC-Effekte auf. Dies äußert sich durch den verzögerten Anstieg und Abfall der Pulsflanke. Zu erwarten sind in organischen Halbleitern mit dispersivem Ladungsträgertransport in der hier gewählten Darstellung mit logarithmischer Zeit- und Stromachse für die abfallende Flanke der Pulsantwort zwei Geraden der Art $t^{-1-\alpha}$, sowie $t^{-1+\alpha}$ [175]. Durch die vorhandenen RC-Effekte ist die Pulsantwort jedoch deutlich deformiert, sodass die abfallende Flanke nur im hinteren Teil der Pulsantwort durch eine Gerade angenähert werden kann.

Deshalb werden die RC-Effekte zuerst nach Gleichung 8.11 kompensiert. Hierbei zeigt sich wie zwischen den Abbildungen 8.4a und 8.4b eine starke Verstärkung des in der Messung vorhandenen Rauschens (hier nicht dargestellt). Deshalb wird nach Gleichung 8.13 eine Mittelung durchgeführt. Das Ergebnis ist als +-Symbole in Abbildung 8.5 dargestellt. Diese beiden Kurven weisen den nach Referenz [175] vorhergesagten charakteristischen Knick auf, wobei die Steigung der Kurve vor bzw. nach dem Knick gut durch Geraden angenähert werden kann (gestrichelte bzw. gepunktete Gerade). Die Kompensation der RC-Effekte ist also in dieser Messung nach der vorgestellten Methode erfolgreich.

8.2 Ausgedehnte Elektrode

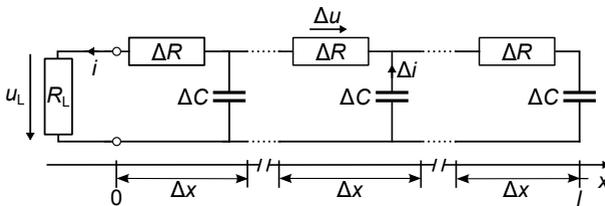


Abbildung 8.6: Räumlich diskretisiertes RC-Netzwerk für eine ausgedehnte Elektrode.

Die Elektrodenflächen einer organischen Photodiode haben einen elektrischen Widerstand. Dieser wurde bisher vernachlässigt, da er bei kleinen

Diodenflächen im Vergleich zum Lastwiderstand vernachlässigt werden kann. Liegt jedoch eine längliche einseitig kontaktierte Diodenfläche vor so erhöht sich dieser Einfluss und kann nicht mehr vernachlässigt werden. Um die Einflüsse abzuschätzen werden die Diodenfläche und die Flächenwiderstände nach Abbildung 8.6 als RC-Netzwerk diskretisiert.

8.2.1 Simulationsmodell

Dieses RC-Netzwerk lässt sich als Markov-Prozess darstellen, wobei anstatt Übergängen von Wahrscheinlichkeiten hierbei der Ladungsfluss zwischen den Kondensatoren modelliert wird [176–178]. Solch eine Modellierung bietet ein einfaches mathematisches Modell, mit dem der Pulsabfall über einen mehrere Dekaden umfassenden Zeitraum schnell berechnet werden kann. In einem räumlich entlang der x-Achse diskretisierten RC-Netzwerk ergeben sich die Parameter des Lastwiderstandes R_L , sowie der Widerstandselemente ΔR sowie der Kapazitätselemente ΔC . Mit einer gleichmäßigen Diskretisierung Δx der Gesamtlänge l ergibt sich somit

$$\Delta R = R_E \frac{\Delta x}{l} \quad (8.14)$$

und

$$\Delta C = C \frac{\Delta x}{l}. \quad (8.15)$$

Daraus können die Übergangsraten zwischen den benachbarten Zellen innerhalb der Fläche abgeleitet werden. Hier ergibt sich die Zeitkonstante $(\Delta R \Delta C)^{-1}$. Spezialfälle treten an den Rändern auf. Am offenen Rand betragen der Stromfluss von bzw. zu der Außenwelt und die zugehörigen Übergangsraten Null. Beim Lastwiderstand beträgt der Zufluss Null und der Abfluss wird von R_L bestimmt. Der Übersichtlichkeit dienend wird hier der Serienwiderstand R_S , sowie die Biasspannung u_B nicht in das Modell aufgenommen. Als Simulationsparameter ist hier noch zu beachten, an welcher Stelle innerhalb der Zellen die Kapazität lokalisiert wird. Hierdurch ergibt sich für die Zelle mit dem Lastwiderstand eine Rate von $((R_L + a\Delta R) \Delta C)^{-1}$ mit $a = 0$ wenn die Kapazität direkt am Lastwiderstand lokalisiert ist bzw. $a = 1$ wenn sie auf der gegenüberliegenden Seite

der Zelle lokalisiert ist. Hier ist die Wahl einer mittigen Anordnung mit $a = 0.5$ generell sinnvoll. Der hierdurch entstehende Diskretisierungsfehler wird mit höherer Auflösung und damit geringer werdendem Δx kleiner.

Für den Stromfluss zwischen Zelle j und k ergibt sich somit

$$Q = \begin{bmatrix} \tau_{1,1} & \tau_{1,2} & \cdots & \tau_{1,N} \\ \tau_{2,1} & \tau_{2,2} & & \\ \vdots & & \ddots & \vdots \\ \tau_{N,1} & & \cdots & \tau_{N,N} \end{bmatrix} \quad (8.16)$$

mit

$$\tau_{j,k} = \begin{cases} (\Delta R \Delta C)^{-1} & \text{wenn } j - k = \pm 1 \\ -\sum_n (1 - \delta(j - n)) \tau_{j,n} & \text{wenn } j = k \wedge j, k \neq 1 \\ -\sum_n (1 - \delta(j - n)) \tau_{j,n} - \frac{1}{(R_L + a \Delta R) \Delta C} & \text{wenn } j, k = 1 \\ 0 & \text{sonst.} \end{cases} \quad (8.17)$$

Die resultierende Matrix Q enthält nur Werte ungleich Null auf der Hauptdiagonalen und den ersten beiden Nebendiagonalen. Die Werte sind so gewählt damit Ladungserhaltung gewährleistet ist. Einzige Ausnahme hiervon ist der Wert von $\tau_{1,1}$. Durch diesen Wert wird der Ladungsabfluss über den Lastwiderstand modelliert.

Mit Q kann die Spannungsverteilung (bzw. analog die Ladungsverteilung) zum Zeitpunkt t aus der Anfangsverteilung

$$u(0) = \begin{bmatrix} u_1 \\ \vdots \\ u_N \end{bmatrix} \quad (8.18)$$

mit Hilfe des Matrixexponenten zu

$$u(t) = e^{tQ} u(0) \quad (8.19)$$

berechnet werden.

Für die Berechnung mit diskreten Zeitschritten Δt muss der Matrixexponent nur einmal berechnet werden. Die Berechnung der Spannungsverteilung kann dann iterativ vorgenommen werden. Dabei gilt

$$P_{\Delta t} = e^{\Delta t Q} \quad (8.20)$$

und

$$u(t + \Delta t) = P_{\Delta t} u(t). \quad (8.21)$$

Die zugehörige Stromantwort für den Zeitpunkt t ergibt sich hier jeweils aus der Spannung an dem am Lastwiderstand R_L angeschlossenen Element $u_1(t)$ zu

$$i(t) = \frac{u_1(t)}{(R_L + a\Delta R)\Delta C}. \quad (8.22)$$

Diese Art der Berechnung erlaubt im Gegensatz zu iterativen Methoden mit festen Zeitschritten eine Berechnung für sehr kleine als auch sehr große Zeiträume mit hoher Genauigkeit. Zusätzlich kann die Anfangsverteilung beliebig ausfallen.

Um die transienten Eigenschaften genauer zu untersuchen wird die vorgestellte Methode numerisch implementiert und exemplarisch simuliert. Dabei wird das zu simulierende Bauteil räumlich diskretisiert und die Übergangskoeffizienten werden als Matrix Q dargestellt. Die Anfangsverteilung des Lichtes geht in die Werte von $u(0)$ ein. Die Spannungsverteilung zum Zeitpunkt t wird dann nach Gleichung 8.19 berechnet.

Die Parameter für die Simulation sind eine Länge von 10 mm und eine Breite von 0.5 mm der Photodiode mit einem Flächenwiderstand der transparenten Elektrode von $12 \Omega/\square$. Daraus ergibt sich ein Elektrodenwiderstand von $R_E = 240 \Omega$, der einem Lastwiderstand von $R_L = 50 \Omega$ gegenübersteht. Für die Kapazität wird eine Schichtdicke von $d = 65 \text{ nm}$ angenommen.

Die zeitliche Änderung des normierten räumlichen Spannungsverlaufs ist in Abbildung 8.7a dargestellt. Die einzelnen Kurven sind hierbei auf 1 normiert, da die Restspannung für große Zeiten annähernd exponentiell abfällt.

Der zugehörige Stromverlauf ist in Abbildung 8.7b dargestellt. Zu Beginn findet ein schneller Abfall statt, der sich dann im weiteren Verlauf einer

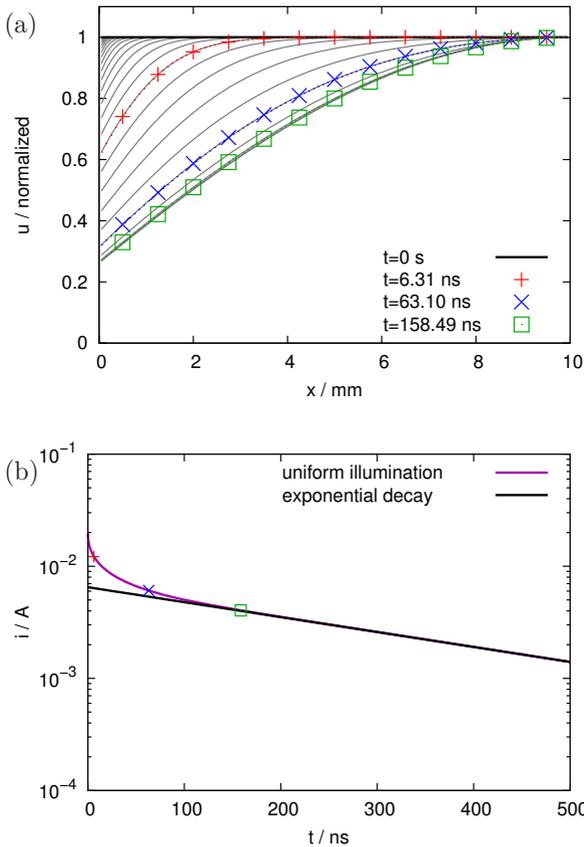


Abbildung 8.7: In a) wird der zeitliche Verlauf der Spannungsverteilung innerhalb einer seitlichen an $x = 0$ kontaktierten Photodiode dargestellt. Bei $t = 0$ wird ein gleichmäßiges Beleuchtungsprofil entlang des Bauteils angenommen. Der Zeitverlauf zeigt anfangs einen ungleichmäßigen Abfall der Spannung. Nach kurzer Zeit stellt sich ein stabiles Profil ein. In b) wird der zugehörige zeitliche Stromverlauf dargestellt. Er nähert sich nach kurzer Zeit einer Exponentialfunktion an.

exponentiellen Kurve annähert. Betrachtet man Abbildung 8.7a, so ist zu erkennen, dass bis zum Zeitpunkt $t = 100$ ns ein schneller Abfall auf der linken Seite der Kurve erfolgt und sich danach eine stabile Spannungsverteilungskurve einstellt, welche mit einer exponentiell abfallenden Stromkurve einhergeht. Wird diese finale Spannungsverteilungskurve gleich zu $t = 0$ in die Simulation eingespeist so ergibt sich folglich über den gesamten Zeitraum ein exponentieller Stromabfall.

8.2.2 Positionsabhängige Pulsantworten

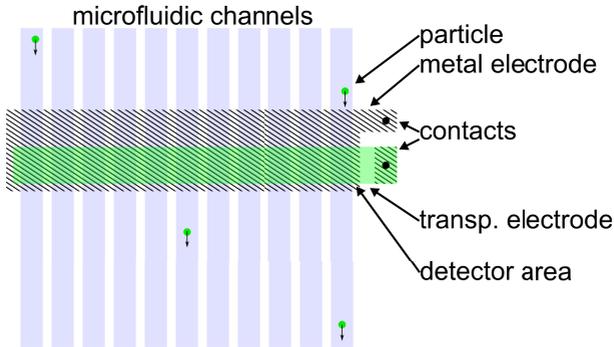


Abbildung 8.8: Schema eines Mikrofluidikchips mit mehreren vertikal angeordneten Kanälen (hellblau) über die quer eine längliche Photodiode gelegt ist. In den Mikrofluidikkanälen (hellblaue Flächen) werden von oben nach unten Partikel (grüne Punkte) transportiert. Die aktive Fläche der Photodiode wird aus dem Überlapp der Metallelektrode (schraffierte Fläche) sowie der transparenten Elektrode (grüne Fläche) gebildet. In der Überlappfläche wird das organische Absorbermaterial der Photodiode zwischen den Elektroden eingebracht. Die Photodiode wird seitlich an der transparenten Elektrode kontaktiert, wodurch sie eine längliche Form annimmt. Die Partikel in den Mikrofluidikkanälen haben entsprechend einen unterschiedlichen Abstand zum Kontakt.

Eine Anwendung für die deformierten Stromantworten auf einen Lichtpuls ergibt sich bei lokalisierter Beleuchtung. Dies kann beispielsweise in einem

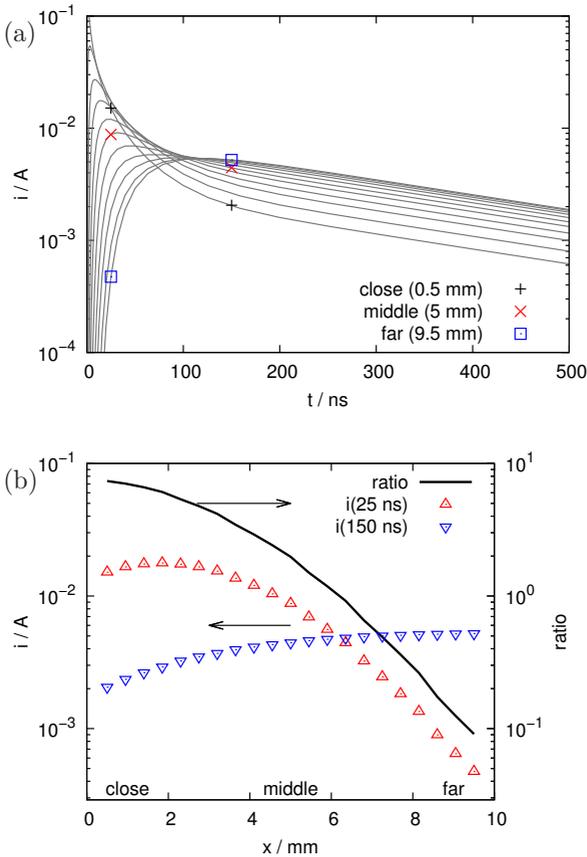


Abbildung 8.9: In a) wird der zeitliche Verlauf der Stromantwort bei lokaler Beleuchtung dargestellt. Bei einer Beleuchtung nahe zum Kontakt ($x = 0.5$ mm) zeigt die Pulsform eine Spitze mit schnellem Abfall in den ersten 100 ns. Wenn der Schwerpunkt der Beleuchtung auf der vom Kontakt abgewandten Seite liegt ($x = 9.5$ mm) findet ein verzögerter Anstieg der Pulsform statt. In b) werden die Stromwerte zu den Zeitpunkten 25 ns und 150 ns und der Quotient aus beiden ortsabhängig dargestellt. Die in a) beobachtete Änderung der Pulsform spiegelt sich in b) in einer monotonen Positionsabhängigkeit des Stromquotienten wider.

Mikrofluidiksystem mit mehreren Kanälen und einer Photodiode mit langer Elektrode realisiert werden. In Abbildung 8.8 wird dies schematisch dargestellt. Dadurch, dass die Ladung nahe dem Lastwiderstand schnell abfließen kann, ergibt sich anfangs eine schneller Pulsabfall wenn die Beleuchtung nahe am Lastwiderstand erfolgt. Im Gegensatz dazu ergibt sich ein verzögerter Pulsabfall wenn die Beleuchtung entsprechend an der entfernten Seite stattfindet. Das heisst, dass aus der Pulsform auf den Abstand des Partikels zur Elektrode und somit auf den Kanal geschlossen werden kann. Dadurch kann mit einer einzelnen Photodiode eine ganze Reihe von Kanälen abgedeckt werden.

Um die Positionsabhängigkeit der Pulsantwort theoretisch zu untersuchen wird in der Simulation eine lokale Beleuchtung eingeführt, welche nur jeweils 10 % der Bauteillänge beleuchtet. Bei Variation der Position ergeben sich die in Abbildung 8.9a dargestellten Transienten. Hier ist deutlich zu sehen, dass vor $t = 150$ ns eine starke Positionsabhängigkeit in der Pulsform besteht und nach diesem Zeitpunkt für alle Kurven ein monoexponentieller Abfall stattfindet. Der spätere Abfall wird jedoch stark von der im früheren Teil schnell abgeflossenen Ladung geprägt. Bei Einstrahlung nahe des Lastwiderstandes fliesst im frühen, steil abfallenden Teil des Pulses viel Ladung ab, wodurch sich später ein niedrigerer Stromwert ergibt.

In Abbildung 8.9b sind die positionsabhängigen Werte des Stromes zu den Zeitpunkten 25 ns (Dreiecke) und 150 ns (Invertierte Dreiecke) aufgetragen. Der frühe Stromwert bei $t = 25$ ns zeigt für $x > 4$ mm eine deutliche, monotone Positionsabhängigkeit. Bei $x \approx 2$ mm befindet sich jedoch ein lokales Maximum. Wenn von diesem Wert auf die Position der Anregung geschlossen werden soll, treten Mehrdeutigkeiten auf. Im Gegensatz dazu weist der Stromwert bei $t = 150$ ns für $x < 4$ mm eine Steigung auf, die jedoch für größere Werte zunehmend abnimmt. Deshalb wird aus diesen beiden Kurven das Verhältnis gebildet. Das Resultat ist als durchgezogene Linie in Abbildung 8.9 dargestellt. Hier ergänzen sich die beiden Einzelmessungen derart, dass ein durchgehend monotoner Zusammenhang zwischen Position und Messwert besteht. Zudem ist dieser Wert nun unabhängig von der eigentlichen Pulshöhe, was die Messung unempfindlich gegenüber Variationen der Intensität macht.

Damit dies für Mikrofluidiksysteme ausgenutzt werden kann müssen zwei Dinge sichergestellt sein. 1) Die RC-Effekte müssen gegenüber der Pulsantwort des Ladungsträgertransport innerhalb des Halbleiters dominieren. 2) Die Pulsform der Anregung muss entsprechend viel kürzer als die RC-Konstante des Bauteils sein. Beides lässt sich prinzipiell dadurch realisieren, dass in der Photodiode entsprechend hohe Elektroden- und Lastwiderstände eingesetzt werden.

Damit könnte die in Abbildung 8.8 dargestellte Anwendung prinzipiell realisiert werden. Bei den verwendeten Parametern besteht jedoch noch das Problem, dass die von den Partikeln erzeugte Pulsdauer natürlich deutlich kleiner sein muss als die für die Auswertung der Pulsformen erforderlichen Zeitspannen von 150 ns. Dies bedeutet, dass in einem System mit der hier gewählten Sensorbreite von 0.5 mm eine unrealistisch hohe Flussgeschwindigkeit von 3333 m/s notwendig wäre. Um dies zu beheben, sollte sowohl der Flächenwiderstand der Elektrode als auch der Lastwiderstand um den Faktor 3333 erhöht werden um eine realistische Flussgeschwindigkeit von 1 m/s zu erreichen. Dies ist prinzipiell möglich mit z. B. einer dünnen Schicht PEDOT als Elektrodenmaterial [179] und einem zusätzlichen Serienwiderstand vor dem Verstärker.

8.3 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden transiente Eigenschaften von organischen Photodioden untersucht. Es wurde gezeigt, dass der Einfluss der RC-Konstante speziell bei großflächigen organischen Photodioden eine stärkere Beschränkung darstellt als der Ladungsträgertransport. Es wurden numerische Methoden entwickelt, um diese Beschränkung zu umgehen und den Einfluss der RC-Konstanten zu eliminieren. Eine Bandbreitenlimitierung aufgrund der RC-Konstanten der Photodiode kann somit numerisch behoben werden.

Bei logarithmischer Darstellung einer Pulstransienten wird das Messrauschen deutlich sichtbar. Um dem entgegenzuwirken wurde eine dynamische Mittelung des Signals angewandt. Damit kann sowohl vor, als auch nach der Kompensation von RC-Einflüssen das Rauschen stark unterdrückt werden.

Anhand zweier an organischen Photodioden gemessenen Pulstransienten wurde das Verfahren erfolgreich getestet.

Für große Photodioden wachsen nicht nur die RC-Konstanten an, es treten auch zusätzliche transiente Effekte entlang des Bauteils auf. Hierfür wurde ein numerisches Simulationsmodell gebildet und untersucht. Bei lokaler Beleuchtung ergeben sich entsprechend unterschiedliche Pulstransienten. Mittels Simulation wurde gezeigt, dass aus der Form der Transienten auf die Anregeposition geschlossen werden kann. Dies lässt sich beispielsweise in einem Mikrofluidiksystem ausnutzen, um mit einem einzelnen Detektor die laterale Partikelposition zu bestimmen.

9 Zusammenfassung und Ausblick

9.1 Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit gemachten Untersuchungen orientieren sich an der Idee, ein mikrofluidisches Partikeldetektionssystem, welches in der Anwendung als Durchflusszytometer geeignet ist, mittels gedruckter Komponenten zu realisieren. Durch experimentelle Untersuchungen wurde gezeigt, dass üblicherweise verwendete Komponenten etablierter Durchflusszytometer durch planare, druckbare Komponenten ersetzt werden können. Die Leistungsfähigkeit der experimentell untersuchten Systeme reicht prinzipiell für den Einsatz als Durchflusszytometer für ausgewählte Anwendungen aus. Das Themengebiet der Partikeldetektion in mikrofluidischen Systemen wurde sowohl von der praktischen Seite des Designs und der Herstellung neuartiger mikrofluidischer Partikeldetektoren, als auch von der theoretischen Seite der Fehlerstatistik sowie der Systemoptimierung, untersucht. Für organische Photodioden wurden Methoden zur Signalaufbereitung entwickelt und es wurden Partikelmessungen mit einer organischen Photodiode durchgeführt.

In Kapitel 3 wurde ein Mikrofluidiksystem zur Detektion fluoreszierender Partikel entwickelt und evaluiert. Fluoreszenzpartikel ab einer Intensität von 50 000 MESF konnten detektiert werden.

In Kapitel 4 wurde die Signalstatistik der Partikeldetektion untersucht und es konnte eine gute Übereinstimmung zwischen den analytischen Ergebnissen und der Messung in Kapitel 3 nachgewiesen werden. Mit diesen Untersuchungen können für mikrofluidische Partikeldetektionssysteme die entsprechenden Fehlerraten angegeben werden.

In Kapitel 5 wurde ein optimiertes Signalfilter zur Unterdrückung von Rauschen und Verbesserung der Pulsform entwickelt. Dieses Filter eignet sich auch für Partikeldetektionssysteme mit räumlicher Modulation und bietet eine deutlich bessere Unterdrückung von Nebenmaxima als andere bekannte Methoden.

In Kapitel 6 wurde ein Modell entwickelt, welches den Zusammenhang der Signalqualität mit den Systemparametern darstellt. Dies kann zur Systemoptimierung verwendet werden. Es wurden zwei Bereiche identifiziert, die durch eine charakteristische Aperturlänge getrennt sind. Für lange Aperturen dominiert das Rauschen durch Hintergrundlicht. Für kurze Aperturen dominiert das Dunkelrauschen. Generell sollte die eingesetzte Aperturlänge deutlich kürzer als die charakteristische Aperturlänge gewählt werden. Gleichzeitig sollte die Partikelgeschwindigkeit möglichst gering gewählt werden.

In Kapitel 7 wurde ein Mikrofluidiksystem zur Partikeldetektion über Extinktion entwickelt und evaluiert. Hier wurde auch eine organische Photodiode eingesetzt und es konnte gezeigt werden, dass die Leistungsfähigkeit der organischen Photodiode fast diejenige einer anorganischen Photodiode erreicht. Es konnten Partikel mit Durchmessern zwischen $1\ \mu\text{m}$ und $10\ \mu\text{m}$ detektiert werden. Absorbierende und transparente Partikel von $10\ \mu\text{m}$ Durchmesser können anhand ihrer Pulsformen unterschieden werden.

In Kapitel 8 wurde auf die Aufbereitung von Messsignalen organischer Photodioden eingegangen. Insbesondere die RC-Konstante spielt eine wichtige Rolle und es wurde eine Methode zur Kompensation hierfür entwickelt. Bei länglichen Photodioden treten aufgrund von Elektrodenwiderständen Effekte auf, die eine Positionsbestimmung bei lokaler Anregung erlauben.

9.2 Ausblick

Damit Partikeldetektionssysteme, welche nach den hier entwickelten Entwürfen aufgebaut sind, in großen Stückzahlen gebaut werden können, müssen die entsprechenden Produktionstechnologien erst bis zur Marktreife

entwickelt werden. Einige Zwischenschritte sind hier denkbar. Ein Mikrofluidiksystem mit aufgedruckten Aperturen und Absorptionsfiltern kann, wie in dieser Arbeit gezeigt, einfach mit externen optischen Komponenten wie LEDs und Photodioden kombiniert werden. Mittels Tintenstrahldruck können bereits heute organische Photodioden hergestellt werden, was die Integration in gedruckte mikrofluidische Systeme prinzipiell erlaubt. Da die Leistungsdichte der Anregelichtquelle einer der wichtigsten Parameter für die Detektionsempfindlichkeit ist wird hier der Ersatz von anorganischen Lasern und Leuchtdioden durch direkt aufgedruckte organische Leuchtdioden eine große Herausforderung. Des Weiteren können zusätzliche nichtoptische Detektionsmethoden zusätzliche Messparameter liefern.

Es ist zu erwarten, dass sich solche gedruckten Mikrofluidiksysteme zu sehr geringen Stückpreisen herstellen lassen. Zusätzliche Kosten für zur Durchführung einer Messung benötigte Komponenten sind aufgrund des optischen Designs ebenfalls deutlich geringer als bei etablierten Durchflusssytometern. Für den wirtschaftlichen Erfolg spielen jedoch andere Parameter eine wichtigere Rolle. Einerseits besteht noch ein sehr hoher Entwicklungsaufwand, um die Produktionsanlagen für die Herstellung der gedruckten Mikrofluidiksysteme bereitzustellen. Andererseits sind bei den derzeitigen Anwendungen von Durchflusssytometern andere Kosten wie das notwendige medizinisch geschulte Personal zur Bedienung des Systems beträchtlich. Damit sind mikrofluidische Systeme vor allem für neue Anwendungsgebiete interessant, die sich erst noch entwickeln müssen. Beispiele sind medizinische Vor-Ort-Untersuchungen, bei denen Blutuntersuchungen direkt durchgeführt werden müssen und ein kleines, mobil einsetzbares, Diagnosesystem mit einfach zu entsorgenden Einwegsensoren erfordern. Dies wäre nützlich für den Einsatz in Seuchengebieten mit Krankheiten, die eine schnelle Verbreitung aufweisen. Auch denkbar sind Untersuchungen der Wasserqualität, um dabei Verunreinigungen mit Bakterien zu identifizieren, die Zucht und Kultivierung von Bakterien oder Zellen in mikrofluidischen Systemen oder das Überwachen von chemischen Prozessen in mikrofluidischen Systemen zur kontrollierten Herstellung geringster Mengen von Substanzen wie Medikamenten. Um für diese Anwendungsgebiete die passenden und preiswerten Systeme mit den in dieser Arbeit untersuchten Detektionsmethoden herstellen zu können, muss die

Entwicklung zielgerichtet vorangetrieben werden, damit alle benötigten Komponenten und Maschinen bereit stehen.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
APD	engl. <i>avalanche photodiode</i>
BHJ	engl. <i>bulk hetero junction</i>
CCDF	engl. <i>complementary cumulative density function</i>
CV	engl. <i>coefficient of variation</i>
DCS	engl. <i>derivative of the correlation signal</i>
FITC	Fluorescein
FWHM	engl. <i>full-width half-maximum</i>
GBW	engl. <i>gain bandwidth product</i>
LED	engl. <i>light emitting diode</i>
MESF	engl. <i>molecules of equivalent soluble fluorochrome</i>
MMSE	engl. <i>minimum mean square error</i>
P3HT	Poly(3-hexylthiophen-2,5-diy)
PCBM	[6,6]-Phenyl-C ₆₁ Buttersäuremethylester
PDMS	Polydimethylsiloxan
PMT	engl. <i>photomultiplier tube</i>
PoC	engl. <i>point of care</i>
PSNR	engl. <i>peak signal-to-noise ratio</i>
RMS	engl. <i>root mean square</i>
RPM	engl. <i>revolutions per minute</i>
USB	engl. <i>universal serial bus</i>

Abbildungsverzeichnis

- 2.1 Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers mit Partikelsortierung. Zwei Fluidikanschlüsse dienen zum Zuführen des Partikelstromes (1) sowie des Mantelflusses (2). In der koaxialen Fokussierungsstruktur (3) werden die Partikel in das Zentrum des Fluidstromes fokussiert und passieren in der Kapillare (4) die Messzone. Ein Laserstrahl (5) trifft in der Messzone auf die Partikel. Licht, welches seitlich (6) bzw. in Vorwärtsrichtung (7) abgelenkt wird dient zur Partikeldetektion. Der Sortiermechanismus besteht aus elektrisch geladenen Platten (8), die das Fluid in Tröpfchenform (9) seitlich ablenken können, wenn es mit einer Spannung (10) beaufschlagt wurde. Damit können Partikel aufgrund ihrer optischen Signale klassifiziert und entsprechend in unterschiedliche Gruppen (11) sortiert werden. 6

2.6	Schematische Darstellung von a) Absorption, b) Streuung und c) Fluoreszenz. Der Lichteinfall erfolgt von Links. Der Absorbierende Partikel erzeugt einen Schatten. Der streuende Partikel erzeugt einen Schatten und emittiert das gestreute Licht richtungsabhängig. Der fluoreszierende Partikel emittiert die Fluoreszenz gleichmäßig in alle Raumrichtungen.	33
2.7	Exemplarische Darstellung des Streuquerschnittes eines Partikels mit Brechungsindex 1.5 in einem Medium mit Brechungsindex 1.0 in Abhängigkeit der Partikelgröße. . . .	34
2.8	Absorptions- und Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein. (Datenquelle: invitrogen.com)	38
2.9	In a) ist die Raumwinkelprojektion eines Rechteckes auf ein Flächenelement unterhalb einer Ecke der Fläche dargestellt. Hierfür kann eine einfache Formel angegeben werden. In b) ist die Definition einer Fläche A mit beliebigen Eckpunkten dargestellt. Diese kann auf vier Unterflächen bestehend aus den Eckpunkten $(0,0)$ für die eine Ecke sowie den Eckpunkten (x_1, y_1) , (x_2, y_1) , (x_1, y_2) bzw. (x_2, y_2) für die andere Ecke dargestellt werden. Diese vier Flächen entsprechen der in a) dargestellten Konfiguration und erlauben damit die Berechnung des Raumwinkels bzw. projizierten Raumwinkels für beliebige Verschiebungen der Fläche.	40
2.10	Raumwinkel einer Fläche mittig angebracht vor einer Punktlichtquelle bei Variation des Abstandes h in a) logarithmischer und b) linearer Auftragung mit quadratischer Näherung.	43
2.11	Relative Bestrahlungsstärke eines Flächenelements mittig angebracht vor einer quadratischen Leuchtfläche bei Variation des Abstandes h in a) logarithmischer und b) linearer Auftragung mit quadratischer Näherung.	44

- 3.1 Schematische Darstellung des in diesem Kapitel verwendeten Mikrofluidikchips. Links ist die Draufsicht dargestellt. Die Mikrofluidischen Anschlüsse für den Probenstrom (1a), welcher die zu messenden Partikel enthält, der Mantelfluss (1b) welcher partikelfreie Flüssigkeit enthält und der Auslass (1c). Die Einlässe werden mit einer Spritzenpumpe verbunden, um eine kontrollierte Flussrate einzustellen. Eine Fokussierungsstruktur (2) sorgt dafür, dass der Probenstrom in die Mitte des Kanals gelenkt wird und vom Mantelfluss umgeben fließt. Eine Schattenmaske (3) enthält eine Reihe von Messaperturen unterschiedlicher Länge. Die Detailansicht rechts zeigt schematisch den Querschnitt durch die erste Messapertur (4). Eine LED (a) strahlt Licht nach unten. Ein Blaufilter (b) absorbiert enthaltene langwellige Anteile. Der Mikrofluidikkanal mit dem Probenstrom in der Mitte ist von einem Silikon umgeben (c). Die Messapertur (d) schränkt den Messbereich ein. Gelbfilter (e) absorbieren kurzwellige Anteile des Lichtes aber transmittieren Fluoreszenz. Von im Kanal (c) an die Messzone passierenden Fluoreszenzpartikeln erzeugte Fluoreszenz wird somit auf die Photodiode (f) transmittiert und kann detektiert werden. 49
- 3.2 Demonstration der Flexibilität des in dieser Arbeit hergestellten mikrofluidischen Chips zur fluoreszenzbasierten Partikeldetektion. 50
- 3.3 Geometrie der eingesetzten Struktur für die Partikelfokussierung mit schematisch eingezeichnetem Probenstrom. a: Einlass des Mantelflusses, b: Einlass des Probenstroms, c: Einschnürungen des Kanals zur Fokussierung, d: Auslass des im Mantelfluss fokussierten Partikelstromes. e: Detailansicht des in die Kanalmitte fokussierten Partikelstromes. Links davon eine schematische Darstellung des parabolischen Geschwindigkeitsprofils. Die Flussgeschwindigkeit hat im Zentrum des Kanals ein Maximum und fällt zum Rand hin auf Null ab. 53

3.4	Transmissionsspektren der eingesetzten Filter für Anregung (Lee Filters, #071HT, gepunktete Linie) und Emission (Zwei Folien, Lee Filters #767, gestrichelte Linie), sowie die Transmission beider Filter um den Faktor 1000 vergrößert.	55
3.5	Optische Dichte von gekreuzten Polarisatoren bei schräg einfallendem Licht.	57
3.6	Schaltplan des Verstärkers.	62
3.7	Herstellungsprozess des Mikrofluidikchips. a) Siliziummaster (1) mit SU8-Schicht (2). b) Belichtung der Struktur durch eine Schattenmaske (3). c) Negativ des Mikrofluidikkanaals (4) auf dem Siliziummaster. d) Beim Abformvorgang wird flüssiges PDMS (5) mit einer Folie, welche die Messapertur enthält (6), auf dem Master dünn verteilt. e) Ausbackschritt. f) Ablösen der abgeformten Struktur. g) Deckelung mittels einer mit PDMS (7) versehenen Filterfolie (8). h) Ausbacken der fertigen Struktur. i) Für die Messung werden eine Photodiode (9) und zwei Lagen Emissionsfilter (10) auf die Aperturseite aufgebracht. Eine Leuchtdiode (11) wird direkt auf die Emissionsfolie aufgelegt.	81
3.8	Mikroskopaufnahme des Querschnittes des Mikrofluidikchips. A: Detektionsseite. Hier werden zwei Lagen Emissionsfilter angebracht und darauf die Photodiode platziert. B: Maskenfolie, die Maske zeigt zum PDMS. Ca: Abgeformte PDMS-Schicht mit den Mikrofluidikstrukturen. Cb: Durch Spincoating aufgebrachte PDMS-Schicht zur Kanaldeckelung. D: Filterfolie für das Anregelicht. E: Anregeseite. Hier wird die LED direkt angebracht. F: von PDMS umschlossener Mikrofluidikkanal.	82
3.9	Mikroskopaufnahme der Draufsicht auf den Mikrofluidikchip. A: Fokussierungsstruktur. B: Schattenmaske beginnt auf Fokussierungsstruktur. C: Messapertur mit Kanal. . .	82
3.10	Histogramm der Partikelgeschwindigkeiten direkt nach der Fokussierungsstruktur.	83

- 3.11 Beispiel für die Rekonstruktion der Basislinie mithilfe eines Medianfilters. Dargestellt ist ein das Hintergrundsignal einer partikelfreien Messung. Die enthaltene Basislinie wird mithilfe eines Medianfilter geschätzt und vom aufgenommenen Signal subtrahiert. Daraus resultiert das Signal mit flacher Basislinie, welches keine niederfrequenten Variationen mehr enthält. 84
- 3.12 Vergleich unterschiedlicher Methoden zur Wiederherstellung der Basislinie. Gezeigt wird die Standardabweichung des Signals nach der Wiederherstellung der Basislinie relativ zur Standardabweichung vor der Wiederherstellung. Die maximale Filterlänge und die Möglichkeit ein nichtkausales Filter zu verwenden wird von der Anwendung bestimmt. 85
- 3.13 Typische durch Partikel erzeugte Pulsformen in Abhängigkeit der Aperturlänge. In a) wird die hohe Flussrate von insgesamt 3050 $\mu\text{l/h}$ verwendet und in b) die niedrige Flussrate von insgesamt 200 $\mu\text{l/h}$. Die Länge der Apertur spiegelt sich in der Breite der Pulse bzw. für kurze Aperturlängen in der Höhe der Pulse wider. 86
- 3.14 Histogramme der detektierten Partikelamplituden einer fünfminütigen Aufnahme. Bei der hohen Flussrate in a) beträgt die Fließgeschwindigkeit des Mantelflusses 3000 $\mu\text{l/h}$ bei der niedrigen Flussrate in b) 150 $\mu\text{l/h}$. Die Flussrate der Partikelflüssigkeit beträgt in beiden Fällen 50 $\mu\text{l/h}$ 87
- 4.1 Schema für die Partikeldetektion mit Schwellwert $u_{\text{threshold}}$ in a). Akzeptierte Detektionen sind mit x markiert, zurückgewiesene Detektionen mit +. In b) und c) überlagern sich zwei benachbarte Partikel, die in b) aufgelöst sind, aber in c) zu einem einzelnen Maximum verschmelzen. 90
- 4.2 Von einem einzelnen Partikel generierte Pulsform (oben, Offset 0.2) und durchschnittliche Pulsform von 169 Partikeln (unten) mit Standardabweichung (vertikale Balken). 92

4.3	Halblogarithmische Darstellung der komplementären Verteilungsfunktion (engl. <i>complementary cumulative distribution function</i> , CCDF) der Amplituden sowie der lokalen Maxima des gemessenen Rauschsignals sowie die theoretisch erwarteten Verteilungen. Die Amplitudenverteilung des ungefilterten Messsignals (x-Symbole) sowie des gefilterten Messsignals (offene Quadrate) folgen der Normalverteilung (+-Symbole). Die Maxima des gefilterten Messsignals (umgedrehte Dreiecke) folgen der in Kapitel 4.2.11 eingeführten Verteilung nach Gleichung 4.21 (Dreiecke).	93
4.4	Vergleich der gemessenen Pulsform nach Filterung (Raute) mit den untersuchten analytischen Pulsformen, der Hann-Funktion (+-Symbole), gefalteten Hann-Funktion (x-Symbole), sowie der Gaußglocke (Quadrate).	101
4.5	Überlagerung zweier Pulse aus Abbildung 4.4 mit einem Abstand, welcher der Auflösungsgrenze entspricht.	106
4.6	Höhe der Pulsmaxima bei Überlagerung von zwei Pulsen nach Abbildung 4.4. Wenn der Pulsabstand geringer als die Auflösung ist, wird nur ein Partikel detektiert. Der Verbleibende Fehler durch Pulsüberlagerung für größere Abstände nimmt in allen Fällen sehr schnell ab. Für die Hann-Funktion fällt dieser Fehler auf Null sobald das Auflösungskriterium erfüllt ist.	107
4.7	Absinken der relativen effektiven Partikelrate $r_{P,eff}/r_P$ nach Gleichung 4.11 (+-Symbole) verglichen mit Simulationen, welche die Hann-Funktion (x-Symbole), gefaltete Hann-Funktion (Quadrate), sowie die Gauß-Funktion verwenden (Rauten) in Abhängigkeit der normalisierten Partikelrate $r_P/r_{P,max}$. Die Ergebnisse für die Hann-Funktion stimmen sehr genau mit der Poissonstatistik überein. Für die gefaltete Hann-Funktion sowie die Gaußglocke ergeben sich leicht erhöhte Abweichungen.	109

4.8	Aufgetragen ist die Differenz der effektiven Zählrate relativ zur Partikelrate aus Abbildung 4.7, also die relative Rate von nichtdetektierten Partikeln aufgrund von Pulsüberlagerung. Die gestrichelte Linie entspricht einem linearen Zusammenhang. Da bei geringen Zählraten die Wahrscheinlichkeit mehrfacher Pulsüberlagerungen sehr gering ist, stimmt der Verlauf für alle Pulsformen hier sehr gut mit der Theorie überein.	110
4.9	Wahrscheinlichkeit, dass ein Maximum oberhalb eines Schwellwertes u_0 liegt für verschiedene Werte von ϵ . Zum Vergleich die CCDF einer Normalverteilung (+).	116
4.10	Rate der falsch negativen Detektionen nach Gleichung 4.19 (+-Symbole) verglichen mit Simulationen der anderen Pulsformen, welche die Hann-Funktion (x-Symbole), gefaltete Hann-Funktion (Quadrate), sowie die Gauß-Funktion (Rauten) verwenden.	121
4.11	Einfluss des Schwellwertes auf die Rate der falsch positiven Detektionen (offene Symbole, linke Achse) nach Gleichung 4.22 sowie der falsch negativen Detektionen (gefüllte Symbole, rechte Achse) nach Gleichung 4.19 für PSNR-Werte von 10 dB (Quadrate), 20 dB (Kreise) und 30 dB (Rauten).	123
4.12	Einfluss des Schwellwertes auf die Kostenfunktion der falsch positiven Detektionen (offene Symbole, linke Achse) nach Gleichung 4.22 sowie falsch negativen Detektionen (gefüllte Symbole, rechte Achse) nach Gleichung 4.19 für PSNR-Werte von 10 dB (Quadrate), 20 dB (Kreise) und 30 dB (Rauten). Die Kurve zeigt jeweils die Gesamtkostenrate für den entsprechenden PSNR-Wert unter der Annahme der Kosten von $100 \text{ } \text{Q}$ für eine falsch positive Detektion und $1 \text{ } \text{Q}$ für eine falsch negative Detektion, einer Rate von Maxima im Rauschsignal von $r_m = 1000 \text{ s}^{-1}$ und einer Partikelrate von $r_p = 0.01 \cdot r_m$	124

- 4.13 Histogramme der detektierten Amplituden bei unterschiedlichen Bandbreiten f_g des Rauschens und einem PSNR von 20 dB in a) bzw. 30 dB in b). Für niederfrequentes Rauschen (+-Symbole), breitbandiges Rauschen (x-Symbole), sowie breitbandiges Rauschen, jedoch mit Filterung (Quadrate). 127
- 4.14 Vergleich der statistischen Parameter bei Einzelkanaldetektion aus lokalen Maxima mit Zweikanaldetektion mit exakt vorgegebenem Zeitwert. Der Mittelwert bei Einzelkanaldetektion (+-Symbole) weist unterhalb eines PSNR von 15 dB eine Abweichung zu positiveren Werten auf, während dies bei der Zweikanaldetektion (x-Symbole) nicht auftritt. Die Standardabweichung der beiden Methoden (Quadrate und Rauten) haben einen ähnlichen Verlauf. 129
- 4.15 Relative Änderung der detektierten Partikelamplitude a_E/a_P (+-Symbole) abhängig von der relativen Partikelgeschwindigkeit v/v_P . Zusätzlich ist die Ableitung dieser Kurve eingezeichnet (x-Symbole). 132
- 4.16 Rate der Partikeldetektionen bei Amplitudenvariation für die Pulsformen Hann-Funktion (+-Symbole), gefaltete Hann-Funktion (x-Symbole), sowie die Gauß-Funktion (\square -Symbole). Für Partikelamplituden $a_P^* > a_P$ größer als beim Systementwurf vorgesehen treten keine zusätzlichen falsch positive Detektionen an den Pulsflanken auf. . . . 133
- 4.17 Histogramm der lokalen Maxima des Messsignals vor der Filterung (durchgezogene Linie), sowie nach der Filterung (gestrichelte Linie). Durch eine zusätzliche Auswahlregel werden einzelne Maxima im ungefilterten Signal (+-Symbole), sowie im gefilterten Signal (x-Symbole) ausgewählt, wodurch sich im Fall des ungefilterten Signals für hohe Amplitudenwerte eine deutliche Verbesserung erzielen lässt. 136

- 4.18 Illustration der Partikeldetektion mit zusätzlichem Auswahlkriterium. Drei verschiedene Pulsformen und ein partikelfreies Signal werden exemplarisch dargestellt: (1) ein einzelner Puls, (2) zwei sich teilweise überlappende Pulse, (3) eine für die Partikeldetektion ungeeignete Pulsform, (4) partikelfreies Signal. Das in a) dargestellte Signal ist ungestört. In b)-d) ist es mit Rauschen überlagert. In b) mit schmalbandigem und in c) und d) mit breitbandigem Rauschen. Als Partikel akzeptierte Maxima werden mit einem x-Symbol markiert. Zurückgewiesene Maxima mit einem +-Symbol. In b) wird für die Fälle (1) und (2) pro Partikel korrekt ein Maxima detektiert. Im Fall (3) werden jedoch viele Maxima detektiert, da es sich um eine ungeeignete Pulsform handelt. Im partikelfreien Signalteil (4) werden die Maxima in allen Fällen korrekt zurückgewiesen. Für breitbandiges Rauschen werden in c) in den Fällen (1) und (2) zusätzliche Maxima detektiert. In d) wird nur das höchste Maximum zwischen zwei Nulldurchgängen akzeptiert. 138
- 4.19 Histogramm der lokalen Maxima aus dem gefilterten Messsignal (durchgezogene Linie). Zum Vergleich sind die theoretisch erwarteten Maxima aufgrund des Rauschens (+-Symbole), durch die Partikel (x-Symbole), sowie deren Summe (gestrichelte Linie) eingetragen. 140
- 4.20 Analog zu Abbildung 4.19 wird hier das Ergebnis für die geringe Flussgeschwindigkeit aufgezeigt. Durch eine zusätzliche Auswahlregel lassen sich die Ergebnisse zwischen Rauschen und niedrigster Partikelsorte (dicke Linie) deutlich verbessern. 143

- 5.1 In a) das modulierte Signal. Der Einfluss additiven Rauschens wird als rote Linie dargestellt. Dessen Standardabweichung wird als gestrichelte Linie dargestellt. Das ungefilterte Signal befindet sich gänzlich innerhalb der Standardabweichung des Rauschens. In b)-d) das Signal nach Filterung mit den unterschiedlichen Filtertypen. Das Matched Filter bietet die beste Rauschunterdrückung, jedoch keine scharf abgegrenzte Pulsform. Das DCS-Filter verringert die Höhe der Nebenmaxima auf Kosten der Rauschunterdrückung. Das MMSE-Filter bietet sowohl eine gute Pulsforms als auch eine hohe Rauschunterdrückung. 150
- 5.2 Vergleich des modulierten Signals in a), sowie des Signals nach Filterung mit den unterschiedlichen Filtertypen in b)-d). Im Unterschied zu Abbildung 5.1 enthält das Nutzsignal hier drei Partikel. Sowohl das Matched Filter, als auch das DCS-Filter können die zusätzlichen Partikel nicht sauber im gefilterten Signal wiederherstellen. Dies gelingt jedoch für das MMSE-Filter. 151
- 5.3 Signalspektrum für eine kurze und lange nichtmodulierte Apertur, sowie für das modulierte Muster. Die lange Apertur hat im Vergleich zur kurzen Apertur ein höheres Signalniveau, jedoch eine reduzierte Bandbreite. Das modulierte Signal hat eine Bandbreite, die der kurzen Apertur entspricht und gleichzeitig ein Signalniveau, welches im Mittel deutlich über der kurzen Apertur liegt. 152
- 5.4 Dargestellt ist das modulierte Signalspektrum aus Abbildung 5.3 (obere Kurve). Das zugehörige Filterspektrum des MMSE-Filters nach Gleichung 5.8 berechnet bildet die untere Kurve. Die glatte Kurve in der Mitte zeigt das Spektrum des Auflösungspulses H_{res} . Das gefilterte Signal zeichnet diese Auflösungskurve bis auf vereinzelte Einbrüche im relevanten Frequenzbereich sehr gut nach. 153

- 5.5 Signalmodell für das MMSE-Filter zur Erzeugung einer bestimmten Ziel-Pulsform h_{res} aus einer beliebigen System-Pulsform h_{P} über die Wahl der Pulsform des MMSE-Filters $h_{\text{E,MMSE}}$ unter Berücksichtigung des als Pulszug modellierten Partikelstromes und additivem Rauschen in der Messung. 158
- 5.6 Das Verhältnis aus Hauptmaximum und höchstem Nebenmaximum des gefilterten Signals ist für unterschiedliche Werte von r_{P} über die Höhe der Geschwindigkeitsabweichung aufgetragen. 162
- 6.1 Schematisches Diagramm der Pulsformen von Signalen ohne bzw. mit räumlicher Modulation über eine Schattenmaske. Das ungefilterte Signal zeigt den rechteckigen Verlauf der Abschattungen durch die Apertur aber auch breitbandiges Rauschen. Im tiefpassgefilterten Signal wurde das breitbandige Rauschen eliminiert. Die Stromwerte zu den Abtastzeitpunkten t_k sind mit einem x markiert. 168
- 6.2 Längenabhängigkeit des gemessenen Rauschstromes für eine Bandbreite von 375 Hz (Symbole) im Vergleich zu den erwarteten Werten des Dunkelrauschens (durchgezogene Linie), des Rauschens durch Hintergrundlicht (gestrichelte Linie), sowie des Gesamtrauschens (gepunktete Linie). . . 180
- 6.3 Gemessene spektrale Rauschleistungsdichte aufgetragen über der Frequenz für die untersuchten Aperturlängen. Die Rauschleistung steigt ausgehend vom Dunkelfall (durchgezogene Kurve ohne Symbole) bei Verlängerung der Apertur an (durchgezogene Kurve mit +- bzw. x-Symbolen für 211 μm bzw. 1779 μm Aperturlänge). Die gestrichelten Linien stellen die Ergebnisse der dazwischen liegenden Aperturlängen dar. 182

- 6.4 Berechnete Werte des Signalmittelwerts μ_Q und der Rauschbeiträge σ_Q bei variabler Aperturlänge aber konstanter Partikelgeschwindigkeit von $v = 0.678 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. Bei wachsender effektiver Aperturlänge l_{eff} steigen der Signalmittelwert und das Rauschen durch Hintergrundlicht linear an. Dunkelrauschen und Rauschen aus Fluoreszenz steigen proportional zur Wurzel von l_{eff} an. 183
- 6.5 Werte des Signals und der Rauschbeiträge bei gleichzeitig variierter Aperturlänge und Partikelgeschwindigkeit, sodass die Partikelrate konstant bleibt mit $T = 1.48 \text{ ms}$. Da die Zeitdauer der Messung konstant bleibt, bleiben die mittlere Ladung sowie die Rauschbeiträge aus Fluoreszenz und Dunkelrauschen ebenfalls konstant. Das gesamte Hintergrundlicht wächst jedoch proportional zur effektiven Aperturlänge l_{eff} und damit wächst der damit verbundene Beitrag zum Rauschen mit der Wurzel der effektiven Aperturlänge. . . 186
- 6.6 Vergleich des PSNR für unterschiedliche Aperturlängen. Bei der durchgezogenen Kurve wird die Partikelrate konstant gehalten. Bei der gestrichelten bzw. der gepunkteten Kurve wird die Flussgeschwindigkeit konstant gehalten. Das nach oben gerichtete Dreieck gibt die Ausgangslage wieder. Pfeil a) Bei Reduktion von Aperturlänge und Partikelgeschwindigkeit um den Faktor 13 findet eine Erhöhung des PSNR statt (Kreis). Pfeil b) Durch nachfolgende Erhöhung der Aperturlänge um den Faktor 13 (offenes Rechteck) kann das PSNR auf Kosten der Partikelrate weiter erhöht werden. Pfeil c) Die Kombination aus Pfeil a) und Pfeil b) entspricht einer Verringerung der Geschwindigkeit um den Faktor 13. 188

- 7.1 Prinzipieller Aufbau der Messanordnung. In a) wird das mit zusätzlichen Aperturen realisierte Design gezeigt. Unterabbildung b) stellt das optisch äquivalente druckbare Design dar. Hier werden die aktiven elektrooptischen Flächen an die Stellen der zugehörigen Schattenmasken platziert. Im Höhenmaßstab sind hier transparente Partikel von $1\ \mu\text{m}$, $3\ \mu\text{m}$, $10\ \mu\text{m}$ sowie ein absorbierender Partikel mit $10\ \mu\text{m}$ eingezeichnet. Die einzelnen Elemente sind (1) die Lichtquelle, (2) die Folie mit der Lichtquellenapertur, (3) die Folie mit der Kanalapertur, (4) eine dünne PDMS-Schicht zwischen Kanalstruktur und Apertur, (5) Mikrofluidikkanal mit Partikeln, (6) eine transparente Maske, (7) die Folie mit Detektorapertur und (8) der Detektor. 194
- 7.2 Schema des Verfahrens zur Berechnung von der Lichtquelle F_L auf den Detektor F_D eingestrahlt Lichtleistung bei Abschattung durch die Lichtquellenapertur A_L , Kanalapertur A_C , Detektorapertur A_D und den als Rechteck angenommenen Partikel A_P . In a) ist der Querschnitt dargestellt. In b) bzw. c) die Fläche der Lichtquelle bzw. des Detektors in Draufsicht. Flächen, bei denen eine direkte Verbindung zwischen Lichtquelle und Flächenelement auf dem Detektor besteht, sind gelb dargestellt. Das Flächenelement P sieht von der Lichtquelle die Flächen 1-4 und 6-9. Die Fläche 5 stellt die durch den Partikel verursachte Abschattung dar. Um die gesamte Leistung auf dem Detektor zu ermitteln wird die Leistungsdichte aller Flächenelemente über die Fläche F_D integriert. 196
- 7.3 Vergleich der Pulsformen der Stromänderung im Signal abhängig von der Position des Partikels im Kanal. In a) die Konfiguration mit einer einzelnen Apertur nahe dem Kanal. In b) die simulativ optimierte Konfiguration mit drei Aperturen. Im Inset sind die Partikelpositionen innerhalb des Kanalquerschnittes illustriert. Die Beleuchtung erfolgt wie in Abbildung 7.1a von oben. 201

7.4	Simulierter Variationskoeffizient für die Konfiguration mit einer bzw. drei Aperturen. Der Einfluss des thermischen Rauschens spielt hierbei keine Rolle. Das Schrotrauschen hat ebenfalls nur einen geringen Einfluss. Dominiert wird die Variation der Messwerte durch die positionsabhängigen Variationen. Die Anordnung mit drei Aperturen erreicht einen deutlich geringere Variationskoeffizienten.	202
7.5	Streuquerschnitt einer Kugel normiert auf die Querschnittsfläche aufgetragen über das Verhältnis von Wellenlänge im umgebenden Medium zu Kugeldurchmesser in a) mit linearer und in b) mit logarithmischer Achsskalierung für eine Reihe von Brechungsindexverhältnisse $m = n_2/n_1$	205
7.6	Entwicklung des Streuquerschnitts bei 450 nm Wellenlänge einer Polystyrolkugel in Wasser bei Variation des Kugeldurchmessers.	206
7.7	Simulation des Streuquerschnitts für Beleuchtung in a) mit einer LED und in b) mit einer breitbandigen Lichtquelle. .	207
7.8	Herstellungsprozess des Mikrofluidikchips. Die Herstellungsschritte a)-f) werden in Abbildung 3.7 dargestellt und beschrieben. g) Die dabei resultierende Mikrofluidikstruktur (1) wird mit einer klaren Folie (2) gedeckelt. h) Eine zusätzliche Folie mit der Lichtquellenapertur (3) wird unter dem Mikroskop auf Kanal und untere Apertur ausgerichtet. Für die Fixierung wird flüssiger UV-aktivierbarer Klebstoff (4) zwischen die Folien eingebracht. i) Aushärtung des Klebstoffes mittels UV-Bestrahlung (5). j) Anbringung der Detektorapertur und Ausrichtung auf die Maske. k) Aushärtung des Klebstoffes mittels UV-Bestrahlung. l) Anbringung der Lichtquelle (6) und des Detektors (7) auf den fertigen Mikrofluidikchip für die Messung.	209

- 7.9 Repräsentative ungefilterte Pulsformen von transparenten bzw. absorbierenden Partikeln mit den in der Legende angegebenen Größen gemessen mit der anorganischen Photodiode. Der Lichtverlust durch Extinktion erzeugt den negativen Hauptpuls. Davor und danach erzeugen streuende Partikel noch kleinere positive Pulse durch Licht, das zum Detektor hin gestreut wird. 214
- 7.10 Histogramme der negativen Pulse nach Signalfilterung für eine Mischung von Partikeln. In a) mit der anorganischen Photodiode und in b) mit der organischen Photodiode gemessen. In beiden Fällen sind Partikel ab $3\ \mu\text{m}$ Durchmesser gut detektierbar. Bei der anorganischen Photodiode können auch Partikel mit $1\ \mu\text{m}$ Durchmesser detektiert werden. 217
- 7.11 Dichteplot der Höhe der negativen Pulse aus den vorhergehenden Diagrammen 7.10 auf der x-Achse, sowie die Höhe der zugehörigen positiven Pulse auf der y-Achse. Die Ergebnisse von anorganischer (a) und organischer (b) Photodiode zeigen eine gute Übereinstimmung. Die eingefärbten Partikel haben aufgrund der geringeren Streuung durchweg eine geringere Höhe der positiven Pulse als die transparenten Partikel. 218
- 8.1 In a) wird der schematische Aufbau einer organischen Photodiode dargestellt. In b) das zugehörige Ersatzschaltbild. Der Kondensator C wird aus den beiden Elektroden mit dem organischen Absorber als Dielektrikum dazwischen gebildet. Der organische Absorber selbst stellt die Stromquelle dar. 226
- 8.2 Transiente Impulsantworten zweier Photodioden mit unterschiedlichen Schichtdicken von $65\ \text{nm}$ bzw. $165\ \text{nm}$. Hierbei zeigt die dünnere Photodiode einen langsameren Abfall des Pulses obwohl die Transitzeiten der Ladungsträger kürzer sind. Dieser Effekt wird auf die höhere Bauteilkapazität zurückgeführt. 228

- 8.3 Darstellung der analytischen Lösung des Leitungsstromes und der Spannung über dem Lastwiderstand in a). In b) Vergleich der analytischen Lösung von u_L mit Gleichung 8.9. In c) und d) der Vergleich der analytischen Lösung für i_{cond} mit der nach Gleichung 8.10 bzw. 8.11 berechneten Lösung. 236
- 8.4 Einfluss von additivem Rauschens auf das Signal ohne Rauschen (schwarze Kurve) im Vergleich zum verrauschten Signal (graue Kurve). In a) wird zum rauschfreien Signal u_L Rauschen addiert. Aus diesem verrauschten Signal wird der Leitungsstromes i_{cond} wiederhergestellt und in b) als graue Kurve dargestellt. Die Symbole zeigen die lokalen Zeitmittelwerte des verrauschten Signals der jeweiligen Unterabbildung. Sie weisen eine geringe Abweichung zum unverrauschten Signal (schwarze Kurve) auf. 239
- 8.5 Transiente Pulsantwort zweier Photodioden mit 65 nm Schichtdicke in a) und 165 nm Schichtdicke in b). Die graue Linie stellt die unverarbeiteten Messdaten dar. Mit Symbolen sind die nach Gleichung 8.11 kompensierten und nach Gleichung 8.13 gemittelten Messdaten dargestellt. An die so verarbeiteten Messdaten können zwei Geraden (gestrichelt bzw. gepunktet) für den vorderen bzw. hinteren Teil der Pulsantwort angelegt werden. 240
- 8.6 Räumlich diskretisiertes RC-Netzwerk für eine ausgedehnte Elektrode. 241
- 8.7 In a) wird der zeitliche Verlauf der Spannungsverteilung innerhalb einer seitlichen an $x = 0$ kontaktierten Photodiode dargestellt. Bei $t = 0$ wird ein gleichmäßiges Beleuchtungsprofil entlang des Bauteils angenommen. Der Zeitverlauf zeigt anfangs einen ungleichmäßigen Abfall der Spannung. Nach kurzer Zeit stellt sich ein stabiles Profil ein. In b) wird der zugehörige zeitliche Stromverlauf dargestellt. Er nähert sich nach kurzer Zeit einer Exponentialfunktion an. 245

- 8.8 Schema eines Mikrofluidikchips mit mehreren vertikal angeordneten Kanälen (hellblau) über die quer eine längliche Photodiode gelegt ist. In den Mikrofluidikkanälen (hellblaue Flächen) werden von oben nach unten Partikel (grüne Punkte) transportiert. Die aktive Fläche der Photodiode wird aus dem Überlapp der Metallelektrode (schraffierte Fläche) sowie der transparenten Elektrode (grüne Fläche) gebildet. In der Überlappfläche wird das organische Absorbermaterial der Photodiode zwischen den Elektroden eingebracht. Die Photodiode wird seitlich an der transparenten Elektrode kontaktiert, wodurch sie eine längliche Form annimmt. Die Partikel in den Mikrofluidikkanälen haben entsprechend einen unterschiedlichen Abstand zum Kontakt. 246
- 8.9 In a) wird der zeitliche Verlauf der Stromantwort bei lokaler Beleuchtung dargestellt. Bei einer Beleuchtung nahe zum Kontakt ($x = 0.5 \text{ mm}$) zeigt die Pulsform eine Spitze mit schnellem Abfall in den ersten 100 ns. Wenn der Schwerpunkt der Beleuchtung auf der vom Kontakt abgewandten Seite liegt ($x = 9.5 \text{ mm}$) findet ein verzögerter Anstieg der Pulsform statt. In b) werden die Stromwerte zu den Zeitpunkten 25 ns und 150 ns und der Quotient aus beiden ortsabhängig dargestellt. Die in a) beobachtete Änderung der Pulsform spiegelt sich in b) in einer monotonen Positionsabhängigkeit des Stromquotienten wider. 247

Tabellenverzeichnis

2.1	Fehlerklassifikation der Partikeldetektion	28
4.1	Liste der in Kapitel 4 verwendeten Symbole.	95
5.1	Liste der in Kapitel 5 verwendeten Symbole.	149
6.1	Liste der in Kapitel 6 verwendeten Symbole.	166
7.1	Parameter der Wahrscheinlichkeitsverteilungen der gemessenen Partikelpopulationen. Der Mittelwert μ und der Variationskoeffizient CV wurden für die anorganische (tiefgestelltes i), sowie organische (tiefgestelltes o) Photodiode, als auch für die negative (hochgestelltes -) und positive (hochgestelltes +) Pulshöhen, ausgewertet.	216
8.1	Liste der in Kapitel 8 verwendeten Symbole.	231

Publikationsliste

Publikationen in referierten Zeitschriften

- **S. W. Kettlitz**, C. Moosmann, S. Valouch, U. Lemmer, *Sensitivity improvement in fluorescence-based particle detection*, Cytometry Part A 85, 746-755 (2014)
- J. Mescher, **S. W. Kettlitz**, N. Christ, M. F. G. Klein, A. Pütz, A. Mertens, A. Colsmann, U. Lemmer, *Design rules for semi-transparent organic tandem solar cells for window integration*, Organic Electronics 15, 1476 - 1480 (2014)
- J. Mescher, **S. W. Kettlitz**, A. Egel, C. Moosmann, N. S. Christ, S. Valouch, U. Lemmer, *RC-Constant in Organic Photodiodes Comprising Electrodes With a Significant Sheet Resistance*, Photonics Technology Letters, IEEE 26, 579-582 (2014)
- N. Christ, **S. W. Kettlitz**, J. Mescher, U. Lemmer, *Extracting the charge carrier mobility from the nanosecond photocurrent response of organic solar cells and photodiodes*, Applied Physics Letters 104, 053302 (2014)
- C. Eschenbaum, D. Großmann, K. Dopf, **S. W. Kettlitz**, T. Bockrocker, S. Valouch, U. Lemmer, *Hybrid lithography: Combining UV-exposure and two photon direct laser writing*, Optics Express 21, 29921-29926 (2013)
- N. Christ, **S. W. Kettlitz**, J. Mescher, S. Valouch, U. Lemmer, *Dispersive transport in the temperature dependent transient photoresponse of organic photodiodes and solar cells*, Journal of Applied Physics 113, 234503 (2013)

- **S. W. Kettlitz**, S. Valouch, U. Lemmer, *Statistics of Particle Detection From Single-Channel Fluorescence Signals for Flow Cytometric Applications*, IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement 62, 1960 (2013)
- **S. W. Kettlitz**, J. Mescher, N. Christ, M. Nintz, S. Valouch, A. Colsmann, U. Lemmer, *Eliminating RC-effects in transient photocurrent measurements on organic photodiodes*, Photonics Technology Letters, IEEE 25, 682 (2013)
- N. Christ, **S. W. Kettlitz**, S. Valouch, J. Mescher, M. Nintz, U. Lemmer, *Intensity dependent but temperature independent charge carrier generation in organic photodiodes and solar cells*, Organic Electronics 14, 973-978 (2013)
- S. Valouch, H. Sieber, **S. W. Kettlitz**, C. Eschenbaum, U. Hollenbach, U. Lemmer, *Direct fabrication of PDMS waveguides via low-cost DUV irradiation for optical sensing*, Optics Express 20, 28855-28861 (2012)
- S. Valouch, C. Hönes, **S. W. Kettlitz**, N. Christ, H. Do, M. F. G. Klein, H. Kalt, A. Colsmann, U. Lemmer, *Solution processed small molecule organic interfacial layers for low dark current polymer photodiodes*, Organic Electronics 13, 2727-2732 (2012)
- J. Mescher, N. Christ, **S. W. Kettlitz**, A. Colsmann, U. Lemmer, *Influence of the spatial photocarrier generation profile on the performance of organic solar cells*, Applied Physics Letters 101, 073301 (2012)
- F. Nickel, M. Reinhard, Z. Zhang, A. Pütz, **S. W. Kettlitz**, U. Lemmer, A. Colsmann, *Solution processed sodium chloride interlayers for efficient electron extraction from polymer solar cells*, Applied Physics Letters 101, 053309 (2012)
- S. Valouch, M. Nintz, **S. W. Kettlitz**, N. S. Christ, U. Lemmer, *Thickness-Dependent Transient Photocurrent Response of Organic Photodiodes*, Photonics Technology Letters, IEEE 24, 596 -598 (2012)

- **S. W. Kettlitz**, S. Valouch, W. Sittel, U. Lemmer, *Flexible planar microfluidic chip employing a light emitting diode and a PIN-photodiode for portable flow cytometers*, Lab on a Chip 12, 197 (2012)
- S. Valouch, **S. W. Kettlitz**, N. Christ, S. Züfle, C. M. Ögün, M. Nintz, U. Lemmer, *Nanosecond response organic photodiodes: From device physics towards biosensor applications*, MRS Spring Meeting (2011)
- N. Christ, **S. W. Kettlitz**, S. Züfle, S. Valouch, U. Lemmer, *Nanosecond response of organic solar cells and photodiodes: Role of trap states*, Physical Review B 83, 195211 (2011)
- S. Züfle, N. Christ, **S. W. Kettlitz**, S. Valouch, U. Lemmer, *Influence of temperature-dependent mobilities on the nanosecond response of organic solar cells and photodetectors*, Applied Physics Letters 97, 063306 (2010)
- **S. W. Kettlitz**, S. Valouch, U. Lemmer, *Organic solar cell degradation probed by the nanosecond photoresponse*, Applied Physics A: Materials Science & Processing 99, 805 (2010)
- S. Valouch, C. M. Ögün, **S. W. Kettlitz**, S. Züfle, N. Christ, U. Lemmer, *Printed circuit board encapsulation and integration of high-speed polymer photodiodes*, Sensor Letters 8, 392 (2010)
- N. Christ, **S. W. Kettlitz**, S. Valouch, S. Züfle, C. Gärtner, M. Punke, U. Lemmer, *Nanosecond response of organic solar cells and photodetectors*, Journal of Applied Physics, Journal of Applied Physics 105, 104513-9 (2009)
- M. Punke, S. Valouch, **S. W. Kettlitz**, M. Gerken, U. Lemmer, *Optical Data Link Employing Organic Light-Emitting Diodes and Organic Photodiodes as Optoelectronic Components*, Journal of Light-wave Technology 26, 816-823 (2008)
- M. Punke, S. Valouch, **S. W. Kettlitz**, N. Christ, C. Gärtner, M. Gerken, U. Lemmer, *Dynamic characterization of organic bulk*

heterojunction photodetectors, Applied Physics Letters 91, 071118 (2007)

Konferenzbeiträge

- **S. W. Kettlitz**, J. Mescher, U. Lemmer, *Compensation for RC-effects in organic photodiodes with large sheet resistances*, 14th International Conference on Numerical Simulation of Optoelectronic Devices, NUSOD 6935414, 177-178(2014)
- **S. W. Kettlitz**, C. Moosmann, S. Valouch, U. Lemmer, *Fluorescence particle detection using microfluidics and planar optoelectronic elements*, Proceedings SPIE 9129, 91293W-91293W-8 (2014)
- **S. W. Kettlitz**, C. Moosmann, S. Valouch, U. Lemmer, *Particle detection from spatially modulated fluorescence signals*, Proceedings SPIE 9129, 91291B-91291B-10 (2014)

Vorträge auf internationalen Konferenzen

- **S. W. Kettlitz**, C. Moosmann, S. Valouch, U. Lemmer, *Particle detection from spatially modulated fluorescence signals*, SPIE 9129, Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care IV, 91291B (2014)
- **S. W. Kettlitz**, J. Mescher, U. Lemmer, *Compensation for RC-effects in organic photodiodes with large sheet resistances*, 14th International Conference on Numerical Simulation of Optoelectronic Devices NUSOD (2014)

Poster

- **S. W. Kettlitz**, C. Moosmann, S. Valouch, U. Lemmer, *Fluorescence particle detection using microfluidics and planar optoelectronic elements*, SPIE 9129, Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care IV, 91293W (2014)

Patente

- A. Gall, M. Gültig, **S. W. Kettlitz**, U. Lemmer, *Gewickeltes und gefaltetes thermoelektrisches System und Verfahren zu dessen Herstellung*, Patentanmeldungen: DE201210105086, WO2013185903, Erteilung: DE102012105086B4

Betreute studentische Arbeiten

- C. Hönes, „Untersuchung der Injektion von Ladungsträgern in organischen Photodioden“, Diplomarbeit, Physik (2012)
- C. Benea, „Optoelektronische Untersuchungen an hydrodynamisch fokussierten Mikropartikelströmen“, Bachelorarbeit, Elektrotechnik und Informationstechnik (2012)
- M. Nintz, „Dynamische Untersuchungen an organischen Fotodioden bei Variation der Absorberschichtdicke“, Studienarbeit, Elektrotechnik und Informationstechnik (2010)
- W. Sittel, „Herstellung und Bewertung von mikrofluidischen Strukturen zur hydrodynamischen, dreidimensionalen Fokussierung von Partikeln für Lab-on-Chip-Systeme“, Diplomarbeit, Maschinenbau, TU Braunschweig (2010)

Literaturverzeichnis

- [1] G. M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics," *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 368–373, 2006.
- [2] J. Godin, C.-H. Chen, S. H. Cho, W. Qiao, F. Tsai, and Y.-H. Lo, "Microfluidics and photonics for bio-system-on-a-chip: A review of advancements in technology towards a microfluidic flow cytometry chip," *Journal of biophotonics*, vol. 1, no. 5, pp. 355–376, 2008.
- [3] E. K. Sackmann, A. L. Fulton, and D. J. Beebe, "The present and future role of microfluidics in biomedical research," *Nature*, vol. 507, no. 7491, pp. 181–189, 2014.
- [4] R. Hoffman, "Flow cytometry: instrumentation, applications, future trends and limitations," *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements II*, vol. 6, pp. 307–342, 2008.
- [5] S. Kostner and M. Vellekoop, "Cell analysis in a microfluidic cytometer applying a DVD pickup head," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 132, no. 2, pp. 512–517, 2008.
- [6] D. Mark, S. Haeberle, G. Roth, F. von Stetten, and R. Zengerle, "Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications," *Chemical Society Reviews*, vol. 39, no. 3, pp. 1153–1182, 2010.
- [7] H. Dong, C. Li, Y. Zhang, X. Cao, and Y. Gan, "Screen-printed microfluidic device for electrochemical immunoassay.," *Lab on a Chip*, vol. 7, no. 12, pp. 1752–1758, 2007.
- [8] A. L. Vig, T. Mäkelä, P. Majander, V. Lambertini, J. Ahopelto, and A. Kristensen, "Roll-to-roll fabricated lab-on-a-chip devices,"

- Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 21, no. 3, p. 035006, 2011.
- [9] S. Forrest, P. Burrows, and M. Thompson, “The dawn of organic electronics,” *Spectrum, IEEE*, vol. 37, no. 8, pp. 29–34, 2000.
- [10] S. R. Forrest, “The path to ubiquitous and low-cost organic electronic appliances on plastic,” *Nature*, vol. 428, no. 6986, pp. 911–918, 2004.
- [11] P. Kopola, M. Tuomikoski, R. Suhonen, and A. Maaninen, “Gravure printed organic light emitting diodes for lighting applications,” *Thin Solid Films*, vol. 517, no. 19, pp. 5757–5762, 2009.
- [12] D.-H. Lee, J. Choi, H. Chae, C.-H. Chung, and S. Cho, “Screen-printed white OLED based on polystyrene as a host polymer,” *Current Applied Physics*, vol. 9, no. 1, pp. 161–164, 2009.
- [13] S. F. Tedde, J. Kern, T. Sterzl, J. Fürst, P. Lugli, and O. Hayden, “Fully spray coated organic photodiodes,” *Nano Letters*, vol. 9, no. 3, pp. 980–983, 2009.
- [14] S. Lilliu, M. Böberl, M. Sramek, S. F. Tedde, J. E. Macdonald, and O. Hayden, “Inkjet-printed organic photodiodes,” *Thin Solid Films*, vol. 520, no. 1, pp. 610–615, 2011.
- [15] J. R. Wojciechowski, L. C. Shriver-Lake, M. Y. Yamaguchi, E. Füreder, R. Pieler, M. Schamesberger, C. Winder, H. J. Prall, M. Sonnleitner, and F. S. Ligler, “Organic photodiodes for biosensor miniaturization,” *Analytical Chemistry*, vol. 81, no. 9, pp. 3455–3461, 2009.
- [16] F. C. Krebs, “Polymer solar cell modules prepared using roll-to-roll methods: Knife-over-edge coating, slot-die coating and screen printing,” *Solar Energy Materials and Solar Cells*, vol. 93, no. 4, pp. 465–475, 2009.
- [17] F. C. Krebs, T. Tromholt, and M. Jørgensen, “Upscaling of polymer solar cell fabrication using full roll-to-roll processing,” *Nanoscale*, vol. 2, no. 6, pp. 873–886, 2010.

- [18] J. L. Haynes, "Principles of flow cytometry," *Cytometry*, vol. 9, no. S3, pp. 7–17, 1988.
- [19] F. F. Mandy, M. Bergeron, and T. Minkus, "Principles of flow cytometry," *Transfusion science*, vol. 16, no. 4, pp. 303–314, 1995.
- [20] H. M. Shapiro, *Practical flow cytometry*. John Wiley & Sons, 2005.
- [21] S. C. Terry, J. H. Jerman, and J. B. Angell, "A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer," *Electron Devices, IEEE Transactions on*, vol. 26, no. 12, pp. 1880–1886, 1979.
- [22] E. Bassous, H. Taub, and L. Kuhn, "Ink jet printing nozzle arrays etched in silicon," *Applied Physics Letters*, vol. 31, no. 2, pp. 135–137, 1977.
- [23] K. E. Petersen, "Fabrication of an integrated, planar silicon ink-jet structure," *Electron Devices, IEEE Transactions on*, vol. 26, no. 12, pp. 1918–1920, 1979.
- [24] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, and G. M. Whitesides, "Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)," *Analytical Chemistry*, vol. 70, no. 23, pp. 4974–4984, 1998.
- [25] D. Sobek, A. Young, M. Gray, and S. Senturia, "A microfabricated flow chamber for optical measurements in fluids," in *Micro Electro Mechanical Systems, 1993, MEMS'93, Proceedings An Investigation of Micro Structures, Sensors, Actuators, Machines and Systems. IEEE.*, pp. 219–224, IEEE, 1993.
- [26] A. Wolff, I. Perch-Nielsen, U. Larsen, P. Friis, G. Goranovic, C. Poulsen, J. Kutter, and P. Telleman, "Integrating advanced functionality in a microfabricated high-throughput fluorescent-activated cell sorter," *Lab on a Chip*, vol. 3, no. 1, pp. 22–27, 2003.
- [27] M. L. Chabinyc, D. T. Chiu, J. C. McDonald, A. D. Stroock, J. F. Christian, A. M. Karger, and G. M. Whitesides, "An integrated fluorescence detection system in poly (dimethylsiloxane) for microfluidic

- applications,” *Analytical Chemistry*, vol. 73, no. 18, pp. 4491–4498, 2001.
- [28] Y. Tung, M. Zhang, C. Lin, K. Kurabayashi, and S. J. Skerlos, “PDMS-based opto-fluidic micro flow cytometer with two-color, multi-angle fluorescence detection capability using PIN photodiodes,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 98, no. 2-3, pp. 356–367, 2004.
- [29] J. Huang, R. Xia, Y. Kim, X. Wang, J. Dane, O. Hofmann, A. Mosley, A. J. de Mello, J. C. de Mello, and D. D. C. Bradley, “Patterning of organic devices by interlayer lithography,” *Journal of Materials Chemistry*, vol. 17, pp. 1043–1049, 2007.
- [30] J. Seo and L. P. Lee, “Disposable integrated microfluidics with self-aligned planar microlenses,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 99, no. 2-3, pp. 615–622, 2004.
- [31] S. K. Tang, C. A. Stan, and G. M. Whitesides, “Dynamically reconfigurable liquid-core liquid-cladding lens in a microfluidic channel,” *Lab on a Chip*, vol. 8, no. 3, pp. 395–401, 2008.
- [32] K. W. Ro, K. Lim, B. C. Shim, and J. H. Hahn, “Integrated light collimating system for extended optical-path-length absorbance detection in microchip-based capillary electrophoresis,” *Analytical chemistry*, vol. 77, no. 16, pp. 5160–5166, 2005.
- [33] H. B. Steen, “Noise, sensitivity, and resolution of flow cytometers,” *Cytometry*, vol. 13, no. 8, pp. 822–830, 1992.
- [34] D. Lee, J. Choi, H. Chae, C. Chung, and S. Cho, “Single-layer organic-light-emitting devices fabricated by screen printing method,” *Korean Journal of Chemical Engineering*, vol. 25, no. 1, pp. 176–180, 2008.
- [35] T. Aernouts, T. Aleksandrov, C. Girotto, J. Genoe, and J. Poortmans, “Polymer based organic solar cells using ink-jet printed active layers,” *Applied Physics Letters*, vol. 92, no. 3, pp. 033306–3, 2008.

- [36] A. J. Heeger, “Nobel lecture: Semiconducting and metallic polymers: The fourth generation of polymeric materials,” *Reviews of Modern Physics*, vol. 73, no. 3, pp. 681–700, 2001.
- [37] H. W. Kroto, A. Allaf, and S. Balm, “C60: Buckminsterfullerene,” *Chemical Reviews*, vol. 91, no. 6, pp. 1213–1235, 1991.
- [38] N. Thejo Kalyani and S. Dhoble, “Organic light emitting diodes: Energy saving lighting technology — a review,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 16, no. 5, pp. 2696–2723, 2012.
- [39] T. Ameri, N. Li, and C. J. Brabec, “Highly efficient organic tandem solar cells: a follow up review,” *Energy & Environmental Science*, vol. 6, no. 8, pp. 2390–2413, 2013.
- [40] B. A. Gregg and M. C. Hanna, “Comparing organic to inorganic photovoltaic cells: Theory, experiment, and simulation,” *Journal of Applied Physics*, vol. 93, no. 6, pp. 3605–3614, 2003.
- [41] W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, and B. P. Flannery, *Numerical recipes in FORTRAN. The art of scientific computing*. Cambridge University Press, 1992.
- [42] R. Blackman and J. Tukey, “Particular pairs of windows,” *The Measurement of Power Spectra, from the Point of View of Communications Engineering*, pp. 95–100, 1959.
- [43] N. Wiener, *Extrapolation, interpolation, and smoothing of stationary time series*. Wiley, New York, 1949.
- [44] H. W. Bode and C. E. Shannon, “A simplified derivation of linear least square smoothing and prediction theory,” *Proceedings of the IRE*, vol. 38, no. 4, pp. 417–425, 1950.
- [45] A. Adalan, T. Gigl, M. Fischer, and K. Witrisal, “A modular impulse radio ultra-wideband research; development platform for IEEE802.15.4a,” in *European Wireless Technology Conference, 2009.*, pp. 116–119, 2009.

- [46] V. Dizdarevic and K. Witrisal, "Statistical UWB range error model for the threshold leading edge detector," in *Information, Communications Signal Processing, 2007 6th International Conference on*, pp. 1–5, 2007.
- [47] H. Stanislaw and N. Todorov, "Calculation of signal detection theory measures," *Behavior Research Methods, Instruments, and Computers*, vol. 31, no. 1, pp. 137–149, 1999.
- [48] J. G. Graeme, *Photodiode amplifiers: op amp solutions*. McGraw Hill, 1996.
- [49] B. Oliver, "Thermal and quantum noise," *Proceedings of the IEEE*, vol. 53, no. 5, pp. 436–454, 1965.
- [50] G. S. He, H.-Y. Qin, and Q. Zheng, "Rayleigh, mie, and tyndall scatterings of polystyrene microspheres in water: Wavelength, size, and angle dependences," *Journal of Applied Physics*, vol. 105, no. 2, p. 023110, 2009.
- [51] B. Goldberg, "New computation of the mie scattering functions for spherical particles," *Journal of the Optical Society of America*, vol. 43, no. 12, pp. 1221–1222, 1953.
- [52] R. B. Penndorf, "New tables of total mie scattering coefficients for spherical particles of real refractive indexes ($1.33 \leq n \leq 1.50$)," *Journal of the Optical Society of America*, vol. 47, no. 11, pp. 1010–1014, 1957.
- [53] G. Mie, "Beiträge zur optik trüber medien, speziell kolloidaler metallösungen," *Annalen der Physik*, vol. 330, no. 3, pp. 377–445, 1908.
- [54] J. Tyndall, "On the blue colour of the sky, the polarization of skylight, and on the polarization of light by cloudy matter generally," *Proceedings of the Royal Society of London*, vol. 17, pp. 223–233, 1868.
- [55] J. Strutt, "XV. On the light from the sky, its polarization and colour," *Philosophical Magazine Series 4*, vol. 41, no. 271, pp. 107–120, 1871.

- [56] J. Strutt, “LVIII. On the scattering of light by small particles,” *Philosophical Magazine Series 4*, vol. 41, no. 275, pp. 447–454, 1871.
- [57] M. Berg, C. Sorensen, and A. Chakrabarti, “A new explanation of the extinction paradox,” *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, vol. 112, no. 7, pp. 1170–1181, 2011.
- [58] P. Latimer, “Light scattering and absorption as methods of studying cell population parameters,” *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, vol. 11, no. 1, pp. 129–150, 1982.
- [59] W. Eisert, “Cell differentiation based on absorption and scattering,” *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 27, no. 1, p. 404, 1979.
- [60] T. Maleki, T. Fricke, J. Quesenberry, P. Todd, and J. F. Leary, “Point-of-care, portable microfluidic blood analyzer system,” in *SPIE Proceedings*, vol. 8251, pp. 82510C–82510C–13, 2012.
- [61] T. Yamamoto, Y. Egawa, Y. Shirasawa, Y. Ozaki, K. Sato, Y. Yatomi, and H. Kume, “A laser light scattering in situ system for counting aggregates in blood platelet aggregation,” *Measurement Science and Technology*, vol. 6, no. 2, p. 174, 1995.
- [62] M. A. Yurkin, K. A. Semyanov, P. A. Tarasov, A. V. Chernyshev, A. G. Hoekstra, and V. P. Maltsev, “Experimental and theoretical study of light scattering by individual mature red blood cells by use of scanning flow cytometry and a discrete dipole approximation,” *Applied Optics*, vol. 44, no. 25, pp. 5249–5256, 2005.
- [63] M. Hammer, D. Schweitzer, B. Michel, E. Thamm, and A. Kolb, “Single Scattering by Red Blood Cells,” *Applied Optics*, vol. 37, pp. 7410–7418, 1998.
- [64] J. M. Steinke and A. P. Shepherd, “Comparison of Mie theory and the light scattering of red blood cells,” *Optical Society of America*, vol. 27, pp. 4027–4033, 1988.

- [65] S. V. Tsinoopoulos, E. J. Sellountos, and D. Polyzos, “Light scattering by aggregated red blood cells,” *Applied Optics*, vol. 41, no. 7, pp. 1408–1417, 2002.
- [66] A. Zharinov, P. Tarasov, A. Shvalov, K. Semyanov, D. R. van Bockstaele, and V. Maltsev, “A study of light scattering of mononuclear blood cells with scanning flow cytometry,” *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, vol. 102, no. 1, pp. 121–128, 2006.
- [67] J. Neukammer, C. Gohlke, A. Höpe, T. Wessel, and H. Rinneberg, “Angular distribution of light scattered by single biological cells and oriented particle agglomerates,” *Applied Optics*, vol. 42, no. 31, pp. 6388–6397, 2003.
- [68] H. Gotoh and H. Yagi, “Solid angle subtended by a rectangular slit,” *Nuclear Instruments and Methods*, vol. 96, no. 3, pp. 485–486, 1971.
- [69] S. Kokoschka, *Grundlagen der Lichttechnik*. Universität Karlsruhe, 2003.
- [70] T. S. Schaal, *Kommunikation über Beleuchtungselemente von Kraftfahrzeugen*. Göttingen: Cuvillier, 2005.
- [71] S. W. Kettlitz, S. Valouch, W. Sittel, and U. Lemmer, “Flexible planar microfluidic chip employing a light emitting diode and a PIN-photodiode for portable flow cytometers,” *Lab on a Chip*, vol. 12, pp. 197–203, 2012.
- [72] S. W. Kettlitz, C. Moosmann, S. Valouch, and U. Lemmer, “Fluorescence particle detection using microfluidics and planar optoelectronic elements,” in *SPIE Photonics Europe*, pp. 91293W–91293W, International Society for Optics and Photonics, 2014.
- [73] G. Janossy, I. V. Jani, M. Kahan, D. Barnett, F. Mandy, and H. Shapiro, “Precise CD4 t-cell counting using red diode laser excitation: For richer, for poorer,” *Cytometry*, vol. 50, no. 2, pp. 78–85, 2002.

- [74] R. C. Habbersett, M. A. Naivar, T. A. Woods, G. R. Goddard, and S. W. Graves, "Evaluation of a green laser pointer for flow cytometry," *Cytometry Part A*, vol. 71A, no. 10, pp. 809–817, 2007.
- [75] Y. Sun, A. Liu, P. Yap, and T. Ayi, "An integrated biophotonic and microfluidic chip for CD4 cell sorting applications," *International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, vol. 9, pp. 537–538, 2005.
- [76] Y. Kang, X. Wu, Y. Wang, and D. Li, "On-chip fluorescence-activated particle counting and sorting system," *Analytica Chimica Acta*, vol. 626, no. 1, pp. 97–103, 2008.
- [77] L. Novak, P. Neuzil, J. Pipper, Y. Zhang, and S. Lee, "An integrated fluorescence detection system for lab-on-a-chip applications.," *Lab on a Chip*, vol. 7, no. 1, pp. 27–29, 2007.
- [78] P. Kiesel, M. Bassler, M. Beck, and N. Johnson, "Spatially modulated fluorescence emission from moving particles," *Applied Physics Letters*, vol. 94, no. 4, p. 041107, 2009.
- [79] S. Joo, K. H. Kim, H. C. Kim, and T. D. Chung, "A portable microfluidic flow cytometer based on simultaneous detection of impedance and fluorescence," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 25, no. 6, pp. 1509–1515, 2010.
- [80] D. Jin, R. Connally, and J. Piper, "Practical time-gated luminescence flow cytometry. II: experimental evaluation using UV LED excitation," *Cytometry Part A*, vol. 71A, no. 10, pp. 797–808, 2007.
- [81] R. Hoffman and E. Chase, "Apparatus and method employing incoherent light emitting semiconductor devices as particle detection light sources in a flow cytometer," 2004.
- [82] Agilent, *Agilent 2100 Bioanalyzer: One Platform - Endless Possibilities*, 2011.
- [83] G. Ryu, J. Huang, O. Hofmann, C. A. Walshe, J. Y. Y. Sze, G. D. McClean, A. Mosley, S. J. Rattle, J. C. de Mello, A. J. de Mello, and D. D. C. Bradley, "Highly sensitive fluorescence detection system for

- microfluidic lab-on-a-chip,” *Lab on a Chip*, vol. 11, pp. 1664–1670, 2011.
- [84] F. Yang, X.-C. Li, W. Zhang, J.-B. Pan, and Z.-G. Chen, “A facile light-emitting-diode induced fluorescence detector coupled to an integrated microfluidic device for microchip electrophoresis,” *Talanta*, vol. 84, no. 4, pp. 1099–1106, 2011.
- [85] D. Xiao, L. Yan, H. Yuan, S. Zhao, X. Yang, and M. M. F. Choi, “CE with LED-based detection: An update,” *Electrophoresis*, vol. 30, no. 1, pp. 189–202, 2009.
- [86] C. Sluszný, Y. He, and E. S. Yeung, “Light-emitting diode-induced fluorescence detection of native proteins in capillary electrophoresis,” *Electrophoresis*, vol. 26, no. 21, pp. 4197–4203, 2005.
- [87] F. Yang, J. Pan, T. Zhang, and Q. Fang, “A low-cost light-emitting diode induced fluorescence detector for capillary electrophoresis based on an orthogonal optical arrangement,” *Talanta*, vol. 78, no. 3, pp. 1155–1158, 2009.
- [88] C. Liu, D. Cui, and X. Chen, “Development of an integrated direct-contacting optical-fiber microchip with light-emitting diode-induced fluorescence detection,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1170, no. 1-2, pp. 101–106, 2007.
- [89] N. Bao, Q. Zhang, J.-J. Xu, and H.-Y. Chen, “Fabrication of poly(dimethylsiloxane) microfluidic system based on masters directly printed with an office laser printer,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1089, no. 1-2, pp. 270–275, 2005.
- [90] C. E. Sims and N. L. Allbritton, “Analysis of single mammalian cells on-chip,” *Lab on a Chip*, vol. 7, no. 4, pp. 423–440, 2007.
- [91] D. Wlodkovic, J. Skommer, and Z. Darzynkiewicz, “Cytometry in cell necrobiology revisited. recent advances and new vistas,” *Cytometry Part A*, vol. 77A, no. 7, pp. 591–606, 2010.
- [92] A. Marchant, J. Duchow, J. Delville, and M. Goldman, “Lipopoly-saccharide induces up-regulation of CD14 molecule on monocytes

- in human whole blood,” *European Journal of Immunology*, vol. 22, no. 6, pp. 1663–1665, 1992.
- [93] X. Bossuyt, G. E. Marti, and T. A. Fleisher, “Comparative analysis of whole blood lysis methods for flow cytometry,” *Cytometry*, vol. 30, no. 3, pp. 124–133, 1997.
- [94] L. Wang, A. Gaigalas, F. Abbasi, and G. Marti, “Quantitating Fluorescence Intensity From Fluorophores: Practical Use of MESF Values,” *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, vol. 107, no. 4, pp. 339–354, 2002.
- [95] L. Ginaldi, M. De Martinis, E. Matutes, N. Farahat, R. Morilla, M. J. S. Dyer, and D. Catovsky, “Levels of expression of CD52 in normal and leukemic B and T cells: Correlation with in vivo therapeutic responses to Campath-1H,” *Leukemia Research*, vol. 22, no. 2, pp. 185–191, 1998.
- [96] E. Kang, S.-J. Shin, K. H. Lee, and S.-H. Lee, “Novel pdms cylindrical channels that generate coaxial flow, and application to fabrication of microfibers and particles,” *Lab on a Chip*, vol. 10, pp. 1856–1861, 2010.
- [97] A. S. Utada, E. Lorenceau, D. R. Link, P. D. Kaplan, H. A. Stone, and D. A. Weitz, “Monodisperse double emulsions generated from a microcapillary device,” *Science*, vol. 308, no. 5721, pp. 537–541, 2005.
- [98] W. Jeong, J. Kim, S. Kim, S. Lee, G. Mensing, and D. J. Beebe, “Hydrodynamic microfabrication via on the fly photopolymerization of microscale fibers and tubes,” *Lab on a Chip*, vol. 4, pp. 576–580, 2004.
- [99] C. Simonnet and A. Groisman, “High-throughput and high-resolution flow cytometry in molded microfluidic devices,” *Analytical Chemistry*, vol. 78, no. 16, pp. 5653–5663, 2006.
- [100] C. Simonnet and A. Groisman, “Two-dimensional hydrodynamic focusing in a simple microfluidic device,” *Applied Physics Letters*, vol. 87, no. 11, pp. 114104–3, 2005.

- [101] G. Hairer, G. Pärri, P. Svasek, A. Jachimowicz, and M. J. Vellekoop, "A novel coaxial sheath flow device for sample focusing," *Eleventh International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, 2007.
- [102] G. Hairer, G. Pärri, P. Svasek, A. Jachimowicz, and M. Vellekoop, "Investigations of micrometer sample stream profiles in a three-dimensional hydrodynamic focusing device," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 132, no. 2, pp. 518–524, 2008.
- [103] D. S. Kim, D. S. D. Kim, K. Han, and W. Yang, "An efficient 3-dimensional hydrodynamic focusing microfluidic device by means of locally increased aspect ratio," *Microelectronic Engineering*, vol. 86, no. 4-6, pp. 1343–1346, 2009.
- [104] A. Kummrow, J. Theisen, M. Frankowski, A. Tuchscheerer, H. Yildirim, K. Brattke, M. Schmidt, and J. Neukammer, "Microfluidic structures for flow cytometric analysis of hydrodynamically focussed blood cells fabricated by ultraprecision micromachining.," *Lab on a Chip*, vol. 9, no. 7, pp. 972–981, 2009.
- [105] C. C. Chang, Z. X. Huang, and R. J. Yang, "Three-dimensional hydrodynamic focusing in two-layer polydimethylsiloxane (PDMS) microchannels," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 17, no. 8, pp. 1479–1486, 2007.
- [106] G. Segre and A. Silberberg, "Radial particle displacements in poiseuille flow of suspensions," *Nature*, vol. 189, no. 4760, pp. 209–210, 1961.
- [107] R. Cox and S. Hsu, "The lateral migration of solid particles in a laminar flow near a plane," *International Journal of Multiphase Flow*, vol. 3, no. 3, pp. 201–222, 1977.
- [108] J.-P. Matas, J. F. Morris, and É. Guazzelli, "Inertial migration of rigid spherical particles in poiseuille flow," *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 515, pp. 171–195, 2004.

- [109] D. Di Carlo, D. Irimia, R. G. Tompkins, and M. Toner, "Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 48, pp. 18892–18897, 2007.
- [110] D. Di Carlo, J. F. Edd, K. J. Humphry, H. A. Stone, and M. Toner, "Particle segregation and dynamics in confined flows," *Physical Review Letters*, vol. 102, no. 9, pp. 094503–1 – 094503–4, 2009.
- [111] X. Mao, J. Waldeisen, and T. Huang, "Microfluidic drifting - implementing three-dimensional hydrodynamic focusing with a single-layer planar microfluidic device," *Lab on a Chip*, vol. 7, no. 10, pp. 1260–1262, 2007.
- [112] X. Mao, S. Lin, C. Dong, and T. Huang, "Single-layer planar on-chip flow cytometer using microfluidic drifting based three-dimensional (3D) hydrodynamic focusing," *Lab on a Chip*, vol. 9, no. 11, pp. 1583–1589, 2009.
- [113] M. G. Lee, S. Choi, and J.-K. Park, "Three-dimensional hydrodynamic focusing with a single sheath flow in a single-layer microfluidic device," *Lab on a Chip*, vol. 9, no. 21, pp. 3155–3160, 2009.
- [114] M. F. Weber, C. A. Stover, L. R. Gilbert, T. J. Nevitt, and A. J. Ouderkerk, "Giant birefringent optics in multilayer polymer mirrors," *Science*, vol. 287, no. 5462, pp. 2451–2456, 2000.
- [115] S. Valouch, C. Hönes, S. W. Kettlitz, N. Christ, H. Do, M. F. Klein, H. Kalt, A. Colsmann, and U. Lemmer, "Solution processed small molecule organic interfacial layers for low dark current polymer photodiodes," *Organic Electronics*, vol. 13, no. 11, pp. 2727–2732, 2012.
- [116] Philipslumileds, "Datasheet: Luxeon Rebel," 2009. <http://www.philips.com>.
- [117] Vishay, "Datenblatt: BPW34." <http://www.vishay.com>.

- [118] T. Hirano and T. Kuga, "Generation of weak sub-poissonian light by a high-efficiency light-emitting diode," *Quantum Electronics, IEEE Journal of*, vol. 31, no. 12, pp. 2236–2240, 1995.
- [119] J. A. Steinkamp, "A differential amplifier circuit for reducing noise in axial light loss measurements," *Cytometry*, vol. 4, no. 1, pp. 83–87, 1983.
- [120] L. Ke, X. Y. Zhao, R. Kumar, and S. J. Chua, "Low-frequency noise measurement and analysis in organic light-emitting diodes," *Electron Device Letters, IEEE*, vol. 27, no. 7, pp. 555–557, 2006.
- [121] L. Ke, X. Y. Zhao, R. S. Kumar, and S. J. Chua, "Low frequency optical noise from organic light emitting diode," *Solid-State Electronics*, vol. 52, no. 1, pp. 7–10, 2008.
- [122] V. N. Savvateev, A. V. Yakimov, D. Davidov, R. M. Pogreb, R. Neumann, and Y. Avny, "Degradation of nonencapsulated polymer-based light-emitting diodes: Noise and morphology," *Applied Physics Letters*, vol. 71, no. 23, pp. 3344–3346, 1997.
- [123] F. J. Di Bartolomeo, N. Ge, and C. A. Trinkle, "High-throughput creation of micropatterned PDMS surfaces using microscale dual roller casting," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 22, no. 11, p. 115013, 2012.
- [124] M.-E. Vlachopoulou, A. Tserepi, P. Pavli, P. Argitis, M. Sanopoulou, and K. Misiakos, "A low temperature surface modification assisted method for bonding plastic substrates," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 19, no. 1, p. 015007, 2009.
- [125] S. C. Hur, H. T. K. Tse, and D. Di Carlo, "Sheathless inertial cell ordering for extreme throughput flow cytometry," *Lab on a Chip*, vol. 10, pp. 274–280, 2010.
- [126] J. F. Edd, D. Di Carlo, K. J. Humphry, S. Koster, D. Irimia, D. A. Weitz, and M. Toner, "Controlled encapsulation of single-cells into monodisperse picolitre drops," *Lab on a Chip*, vol. 8, no. 8, pp. 1262–1264, 2008.

- [127] S. W. Kettlitz, S. Valouch, and U. Lemmer, "Statistics of particle detection from single-channel fluorescence signals for flow cytometric applications," *Instrumentation and Measurement, IEEE Transactions on*, vol. 62, no. 7, pp. 1960–1971, 2013.
- [128] F. De Bisschop, "Electronic gating for particle/cell counting and sizing, DSP-operated," *Instrumentation and Measurement, IEEE Transactions on*, vol. 58, no. 9, pp. 3159–3166, 2009.
- [129] D. Grimaldi, A. Palumbo, and S. Rapuano, "Hardware and software improvements in flow-cytometry measurements," *Measurement*, vol. 36, no. 2, pp. 111–119, 2004.
- [130] M. Rosenauer, W. Buchegger, I. Finoulst, P. Verhaert, and M. Vellekoop, "Miniaturized flow cytometer with 3D hydrodynamic particle focusing and integrated optical elements applying silicon photodiodes," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 10, pp. 761–771, 2011.
- [131] C. Song, T.-D. Luong, T. F. Kong, N.-T. Nguyen, and A. K. Asundi, "Disposable flow cytometer with high efficiency in particle counting and sizing using an optofluidic lens," *Optics Letters*, vol. 36, no. 5, pp. 657–659, 2011.
- [132] L. Li and T. P. Speed, "Parametric deconvolution of positive spike trains," *The Annals of Statistics*, vol. 28, no. 5, pp. 1279–1301, 2000.
- [133] M. O'Brien, A. Sinclair, and S. Kramer, "Recovery of a sparse spike time series by l_1 norm deconvolution," *Signal Processing, IEEE Transactions on*, vol. 42, no. 12, pp. 3353–3365, 1994.
- [134] A. Schwartzman, Y. Gavrilov, and R. J. Adler, "Multiple testing of local maxima for detection of peaks in 1D," *Annals of Statistics*, vol. 39, no. 6, pp. 3290–3319, 2011.
- [135] J. S. Morris, K. R. Coombes, J. Koomen, K. A. Baggerly, and R. Kobayashi, "Feature extraction and quantification for mass spectrometry in biomedical applications using the mean spectrum," *Bioinformatics*, vol. 21, no. 9, pp. 1764–1775, 2005.

- [136] J. Harezlak, M. C. Wu, M. Wang, A. Schwartzman, D. C. Christiani, and X. Lin, “Biomarker discovery for arsenic exposure using functional data. analysis and feature learning of mass spectrometry proteomic data,” *Journal of Proteome Research*, vol. 7, no. 1, pp. 217–224, 2008.
- [137] D. E. Cartwright and M. S. Longuet-Higgins, “The statistical distribution of the maxima of a random function,” *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, vol. 237, no. 1209, pp. 212–232, 1956.
- [138] A. J. den Dekker and A. van den Bos, “Resolution: a survey,” *Journal of the Optical Society of America A, Optics and Image Science*, vol. 14, no. 3, pp. 547–557, 1997.
- [139] Lord Rayleigh, “On the theory of optical images with special reference to the microscope,” *Philosophical Magazine*, vol. 42, pp. 167–195, 1896.
- [140] C. Sparrow, “On spectroscopic resolving power,” *The Astrophysical Journal*, vol. 44, pp. 76–86, 1916.
- [141] C. Snow, “Flow cytometer electronics,” *Cytometry Part A*, vol. 57A, no. 2, pp. 63–69, 2004.
- [142] R. W. M. Smith, I. L. Freeston, B. H. Brown, and A. M. Sinton, “Design of a phase-sensitive detector to maximize signal-to-noise ratio in the presence of Gaussian wideband noise,” *Measurement Science and Technology*, vol. 3, no. 11, p. 1054, 1992.
- [143] T. Lindmo and K. Fundingsrud, “Measurement of the distribution of time intervals between cell passages in flow cytometry as a method for the evaluation of sample preparation procedures,” *Cytometry*, vol. 2, no. 3, pp. 151–154, 1981.
- [144] W. B. Mercer, “Calibration of coulter counters for particles $\sim 1\mu$ in diameter,” *Review of Scientific Instruments*, vol. 37, no. 11, pp. 1515–1520, 1966.

- [145] J. F. Keijj, A. V. Rotterdam, A. C. Groenewegen, W. Stokdijk, and J. W. M. Visser, "Coincidence in high-speed flow cytometry: Models and measurements," *Cytometry*, vol. 12, no. 5, pp. 398–404, 1991.
- [146] D. R. Parks, M. Roederer, and W. A. Moore, "A new "logicle" display method avoids deceptive effects of logarithmic scaling for low signals and compensated data," *Cytometry Part A*, vol. 69A, no. 6, pp. 541–551, 2006.
- [147] S. W. Kettlitz, C. Moosmann, S. Valouch, and U. Lemmer, "Particle detection from spatially modulated fluorescence signals," in *SPIE Photonics Europe*, pp. 91291B–91291B, International Society for Optics and Photonics, 2014.
- [148] P. Kiesel, M. Beck, and N. Johnson, "Monitoring CD4 in whole blood with an opto-fluidic detector based on spatially modulated fluorescence emission," *Cytometry Part A*, vol. 79A, no. 4, pp. 317–324, 2011.
- [149] S. W. Kettlitz, C. Moosmann, S. Valouch, and U. Lemmer, "Sensitivity improvement in fluorescence-based particle detection," *Cytometry Part A*, vol. 85, no. 9, pp. 746–755, 2014.
- [150] E. S. Chase and R. A. Hoffman, "Resolution of dimly fluorescent particles: A practical measure of fluorescence sensitivity," *Cytometry*, vol. 33, no. 2, pp. 267–279, 1998.
- [151] P. R. Tapster, J. G. Rarity, and J. S. Satchell, "Generation of sub-poissonian light by high-efficiency light-emitting diodes," *EPL (Europhysics Letters)*, vol. 4, no. 3, pp. 293–299, 1987.
- [152] I. Thormählen, J. Straub, and U. Grigull, *Refractive index of water and its dependence on wavelength, temperature, and density*. American Chemical Society and the American Institute of Physics for the National Bureau of Standards, 1985.
- [153] C. L. Curl, C. J. Bellair, T. Harris, B. E. Allman, P. J. Harris, A. G. Stewart, A. Roberts, K. A. Nugent, and L. Delbridge, "Refractive index measurement in viable cells using quantitative phase-amplitude

- microscopy and confocal microscopy,” *Cytometry Part A*, vol. 65, no. 1, pp. 88–92, 2005.
- [154] X. Ma, J. Q. Lu, R. S. Brock, K. M. Jacobs, P. Yang, and X.-H. Hu, “Determination of complex refractive index of polystyrene microspheres from 370 to 1610 nm,” *Physics in Medicine and Biology*, vol. 48, no. 24, p. 4165, 2003.
- [155] S. Kettlitz, S. Valouch, and U. Lemmer, “Organic solar cell degradation probed by the nanosecond photoresponse,” *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, pp. 805–809, 2010.
- [156] M. Ramuz, L. Bürgi, C. Winnewisser, and P. Seitz, “High sensitivity organic photodiodes with low dark currents and increased lifetimes,” *Organic Electronics*, vol. 9, no. 3, pp. 369–376, 2008.
- [157] X. Gong, M. Tong, Y. Xia, W. Cai, J. S. Moon, Y. Cao, G. Yu, C. Shieh, B. Nilsson, and A. J. Heeger, “High-Detectivity polymer photodetectors with spectral response from 300 nm to 1450 nm,” *Science*, vol. 325, no. 5948, pp. 1665–1667, 2009.
- [158] H. Katsu, Y. Kawasugi, R. Yamada, and H. Tada, “Low frequency noise in organic solar cells,” in *Noise and Fluctuations (ICNF), 2011 21st International Conference on*, pp. 77–79, 2011.
- [159] A. A. S. Bhagat, S. S. Kuntaegowdanahalli, and I. Papautsky, “Enhanced particle filtration in straight microchannels using shear-modulated inertial migration,” *Physics of Fluids*, vol. 20, no. 10, p. 101702, 2008.
- [160] D. Di Carlo, J. F. Edd, D. Irimia, R. G. Tompkins, and M. Toner, “Equilibrium separation and filtration of particles using differential inertial focusing,” *Analytical Chemistry*, vol. 80, no. 6, pp. 2204–2211, 2008.
- [161] S. Valouch, M. Nintz, S. W. Kettlitz, N. S. Christ, and U. Lemmer, “Thickness-dependent transient photocurrent response of organic photodiodes,” *Photonics Technology Letters, IEEE*, vol. 24, no. 7, pp. 596–598, 2012.

- [162] S. W. Kettlitz, J. Mescher, N. S. Christ, M. Nintz, S. Valouch, A. Colsmann, and U. Lemmer, "Eliminating RC-effects in transient photocurrent measurements on organic photodiodes," *Photonics Technology Letters, IEEE*, vol. 25, no. 7, pp. 682–685, 2013.
- [163] J. Mescher, S. W. Kettlitz, A. Egel, C. Moosmann, N. S. Christ, S. Valouch, and U. Lemmer, "Rc-constant in organic photodiodes comprising electrodes with a significant sheet resistance," *Photonics Technology Letters, IEEE*, vol. 26, no. 6, pp. 579–582, 2014.
- [164] S. W. Kettlitz, J. Mescher, and U. Lemmer, "Compensation for re-effects in organic photodiodes with large sheet resistances," *NUSOD*, 2014.
- [165] M. Punke, S. Valouch, S. W. Kettlitz, M. Gerken, and U. Lemmer, "Optical Data Link Employing Organic Light-Emitting Diodes and Organic Photodiodes as Optoelectronic Components," *Journal of Lightwave Technology*, vol. 26, no. 7, pp. 816–823, 2008.
- [166] M. Punke, S. Valouch, S. Kettlitz, N. Christ, C. Gärtner, M. Gerken, and U. Lemmer, "Dynamic characterization of organic bulk heterojunction photodetectors," *Applied Physics Letters*, vol. 91, p. 071118, 2007.
- [167] N. S. Christ, S. W. Kettlitz, S. Valouch, S. Züfle, C. Gärtner, M. Punke, and U. Lemmer, "Nanosecond response of organic solar cells and photodetectors," *Journal of Applied Physics*, vol. 105, no. 10, p. 104513, 2009.
- [168] N. Christ, S. W. Kettlitz, S. Züfle, S. Valouch, and U. Lemmer, "Trap states limited nanosecond response of organic solar cells," in *10th International Conference on Numerical Simulation of Optoelectronic Devices, NUSOD 2010*, pp. 69–70, 2010.
- [169] S. Valouch, S. Kettlitz, C. Ögün, W. Sittel, N. Christ, S. Züfle, and U. Lemmer, "Organic photodiodes with fast photoresponse integrated on printed circuit boards for biochip applications," in *APS March Meeting 2010*, p. 10005, 2010.

- [170] S. Züfle, N. Christ, S. W. Kettlitz, S. Valouch, and U. Lemmer, “Influence of temperature-dependent mobilities on the nanosecond response of organic solar cells and photodetectors,” *Applied Physics Letters*, vol. 97, no. 6, pp. 063306–3, 2010.
- [171] N. Christ, S. W. Kettlitz, S. Züfle, S. Valouch, and U. Lemmer, “Nanosecond response of organic solar cells and photodiodes: Role of trap states,” *Physical Review B*, vol. 83, no. 19, p. 195211, 2011.
- [172] N. Christ, S. W. Kettlitz, S. Valouch, J. Mescher, M. Nintz, and U. Lemmer, “Intensity dependent but temperature independent charge carrier generation in organic photodiodes and solar cells,” *Organic Electronics*, vol. 14, no. 3, pp. 973–978, 2013.
- [173] T. Instruments, “Datasheet: TL071, TL071A, TL071B, TL072, TL072A, TL072B, TL074, TL074A, TL074B, LOW-NOISE JFET-INPUT OPERATIONAL AMPLIFIERS,” 2011. <http://www.ti.com>.
- [174] M. Glatthaar, M. Riede, N. Keegan, K. Sylvester-Hvid, B. Zimmermann, M. Niggemann, A. Hinsch, and A. Gombert, “Efficiency limiting factors of organic bulk heterojunction solar cells identified by electrical impedance spectroscopy,” *Solar Energy Materials and Solar Cells*, vol. 91, no. 5, pp. 390–393, 2007.
- [175] V. I. Arkhipov, V. A. Kolesnikov, and A. I. Rudenko, “Dispersive transport of charge carriers in polycrystalline pentacene layers,” *Journal of Physics D*, vol. 17, no. 6, p. 1241, 1984.
- [176] J. Keilson, “A review of transient behavior in regular diffusion and birth-death processes. part ii,” *Journal of Applied Probability*, vol. 2, no. 2, pp. 405–428, 1965.
- [177] K. Deng, P. Barooah, P. Mehta, and S. Meyn, “Building thermal model reduction via aggregation of states,” in *American Control Conference (ACC), 2010*, pp. 5118–5123, 2010.
- [178] G. Ullah, W. J. Bruno, and J. E. Pearson, “Simplification of reversible markov chains by removal of states with low equilibrium occupancy,” *Journal of Theoretical Biology*, vol. 311, no. 0, pp. 117–129, 2012.

- [179] A. Colsmann, F. Stenzel, G. Balthasar, H. Do, and U. Lemmer, "Plasma patterning of poly(3,4-ethylenedioxythiophene):poly(styrenesulfonate) anodes for efficient polymer solar cells," *Thin Solid Films*, vol. 517, no. 5, pp. 1750–1752, 2009.



Die Analyse von Mikropartikeln hat in Medizin, Biologie und Chemie eine große Bedeutung. Um zukünftige Anwendungsfelder abzudecken, sollen entsprechende Analysesysteme per Drucktechnologie hergestellt werden. Unter diesem Hinblick werden in dieser Arbeit neuartige optische Partikeldetektionssysteme auf Basis von Mikrofluidik und planaren Optiken entwickelt und eingehend untersucht. Da sich deren Funktionsweise von etablierten Partikeldetektionssystemen deutlich unterscheidet, erfolgt eine detaillierte Untersuchung der Signaleigenschaften und Fehlerstatistik. Damit wird in dieser Arbeit eine solide Grundlage für ein breites Anwendungsspektrum geschaffen.

