



ОБНАРУЖЕНИЕ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА

Б.Санджинетти, Ф.Ричоу, С.Нонель, Дж. Босо,
ID Quantique, Женева

Описана процедура детектирования флуоресценции синглетного кислорода с помощью детектора, изготовленного компанией ID Quantique (IDQ). Показано, как благодаря совместному действию детектора ID230 и логического элемента ID800, преобразовывающего время в цифровой код, удается повысить чувствительность детектирования.

Дозиметрические измерения синглетного кислорода при помощи детектирования его люминесценции на длине волны 1270 нм представляют довольно сложную задачу. Во-первых, этот процесс имеет крайне низкую эффективность и, следовательно, интенсивность светового излучения очень слабая. Для подобных задач традиционно использовали фотоумножители (ФЭУ). Однако, эти устройства имеют низкую эффективность и высокий уровень шума, они чувствительны к фоновой засветке и не работают с оптоволокном, что ограничивает их применение в некоторых конструкциях. В последнее время созданы сверхпроводящие нанопроводные детекторы, в которых достигнут достаточно низкий уровень шума при непосредственном обнаружении люминесценции синглетного кислорода. Но и они имеют свои недостатки, заключающиеся в необходимости предварительного криогенного охлаждения и обладанием, к сожалению, небольшой активной площадью размером около 100 мкм² (одномодовое оптоволокно). С другой стороны, созданный датчик ID230 обеспечивает такой же низкий уровень шума, имеет КПД почти 30%, не требует криогенного охлаждения и работает с многомодовым оптоволокном, поэтому площадь участка регистрации фотоны 10000 мкм². То есть принимаемый сигнал оказывается в 100 раз сильнее, чем в случае использования нанопроводов в качестве детектора синглетного кислорода.

СИНГЛЕТНЫЙ КИСЛОРОД

Синглетный кислород представляет собой высоко активные формы кислорода (рис.1)

SINGLET OXYGEN DETECTION

B. Sanguinetti, Senior Researcher, GAP Geneva (Geneva Applied Physics) & Product manager, ID Quantique;
F. Richou, Sales Engineer, ID Quantique; S. Nonell, Professor Uni Ramon; G. Boso, Post Doc, GAP Geneva

This Paper describes how singlet oxygen fluorescence can be observed and quantified using an ID230 detector, made by ID Quantique, together with an ID800 time-to-digital converter.

The dosimetry of singlet-oxygen, through its luminescence at 1270nm, is a challenging task due to the low efficiency of the process and consequently extremely low light emission levels. Photomultipliers have traditionally been used for this purpose but these devices have low efficiencies, high noise and are sensitive to ambient light and are not fiber-coupled, precluding their use in some scenarios. More recently, superconducting nanowire detectors have achieved sufficiently low noise to directly detect singlet-oxygen luminescence, but have the disadvantage of requiring advanced cryogenic cooling and having a small active area of approximately 100µm² (single-mode fibre). On the other hand, the ID230 offers the same low noise, efficiencies of up to 30%, does not require cryogenic cooling and works with multimode fibers, resulting in a collection area of 10'000µm², and therefore a 100x stronger observed signal.

SINGLET OXYGEN

Singlet oxygen is a highly reactive oxygen species (Fig.1), and plays an important role in several fields: physics, chemistry, biology, atmospheric science and medicine, and in particular in photo-dynamic therapy [1]. Direct detection of singlet-oxygen is done through its phosphorescence, although this emission is extremely weak, it remains the preferred method of detection, as it provides artifact-free data and instant results.

THE ID230 DETECTOR

Until recently, near infrared (NIR) single photon avalanche photodiodes have had noise levels of several thousand counts per second (cps) for single-mode (9µm) fiber detectors, and more for devices with

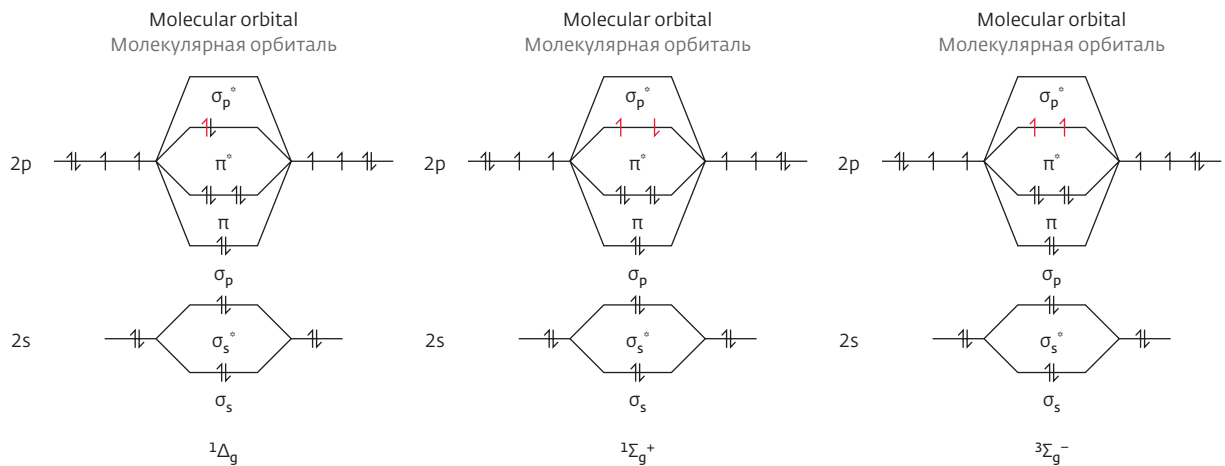


Рис.1. Схема молекулярных орбиталей или три электронные конфигурации молекулярного кислорода, O₂. Слева направо: возбужденное состояние синглетного кислорода $1\Delta_g$, возбужденное состояние синглетного кислорода $1\Sigma_g^+$, триплетное основное состояние $3\Sigma_g^-$. Молекулярная орбиталь 1s опущена для простоты. Обратите внимание, что состояния отличаются только спином и размещением двух вырожденных антисвязывающих πg-орбиталей кислорода. Источник: Википедия/Анджело Фрай

Fig. 1. Molecular orbital scheme or the three electronic configurations of molecular oxygen, O₂. Shown from left to right are: The singlet oxygen $1\Delta_g$ excited state, the singlet oxygen $1\Sigma_g^+$ excited state, and the triplet ground state $3\Sigma_g^-$. The 1s molecular orbital is omitted for simplicity. Note that the states only differ in the spin and the occupancy of oxygen's two degenerate antibonding πg-orbitals. Source: Wikipedia / Angelo Frei

и играет важную роль в исследованиях, проводимых в области физики, химии, биологии, науках об атмосфере, в медицине, в частности в фотодинамической терапии. Методы фотодинамической терапии опираются на фотоактивацию светочувствительных лекарственных средств для селективного лечения некоторых типов патологии, связанных с опухолями, кожными и сосудистыми заболеваниями и бактериальными инфекциями [1]. Прямое обнаружение синглетного кислорода осуществляется при помощи его фосфоресценции. Хотя такое излучение является весьма слабым, этому способу обнаружения синглетного кислорода отдается предпочтение, поскольку результат предоставляется мгновенно и данные не зависят от присутствия иных артефактов.

ДЕТЕКТОР ID230

До недавнего времени однофотонные лавинные фотодиоды в ближнем ИК-диапазоне имели уровень шума величиной нескольких тысяч импульсов в секунду (имп/с) для детекторов с одномодовым (9 мкм) оптоволоконном. Для устройств с оптоволоконном, имеющим сердцевину большого диаметра, шум достигал

large-core fibers. The ID230 is a breakthrough in detector technology, with <20 Hz cps noise in the ULN version, and fibers with a core diameter of up to 100μm. Fiber detectors are practical for several reasons: they allow to eliminate noise by having well-defined acceptance angles and positions and offer superior flexibility in the experimental layout, allowing the fiber to be moved freely for in-vivo experiments. An optical fiber can also collect light efficiently by being placed inside a sample.

Singlet-oxygen fluorescence is often detected after an excitation by a strong laser pulse, which can "blind" the detector for a few microseconds. To prevent the "blinding" from the excitation pulse, it is possible to modify the ID230 to accept a Gate signal, which ensures that the detector is off during the excitation pulse, and that it is turned on shortly (few hundred ns) after. This modification can be done on customer request.

The ID230 detector takes a single or multimode fiber as input, with an FC/PC connector. It outputs an electrical signal (LVTTTL) over an SMA connector. An optional gate input may be added on special request, allowing the detector to be turned off during laser excitation [2].

еще большей величины. Детектор ID230 – это настоящий прорыв в технологии изготовления детекторов, благодаря тому, что уровень шума в нем снижен до величин, меньших 20 имп/с (вариант конструкции датчика с оптоволоком, диаметр сердцевины которого не превышает 100 мкм) [2]. Оптоволоконные детекторы достаточно практичны по нескольким причинам: они позволяют устранить шум при наличии точно определенной входной угловой апертуры и известного положения и обеспечивают превосходную гибкость при установке в экспериментальной системе. Оптическое волокно может также эффективно собирать излучение даже, будучи помещенным внутри исследуемого образца.

Флуоресценция синглетного кислорода часто обнаруживается после возбуждения образца сильным лазерным импульсом, который может "ослепить" детектор на несколько микросекунд. Для того, чтобы предотвратить "ослепление" из-за действия импульса возбуждения, можно модифицировать детектор ID230 для приема сигнала, дополнив его логическим элементом. Этот элемент гарантирует, что детектор будет выключен в момент действия импульса возбуждения и, наоборот, – будет быстро включен (через несколько сотен наносекунд) после импульса возбуждения. Такая дополнительная модификация (рис.2) датчика может быть выполнена по запросу заказчика.



Рис.2. Детектор ID230 соединяется с одномодовым или многомодовым оптоволоком с помощью FC/PC-разъема
Fig. 2 The ID230 detector takes a single or multimode fiber as input, with an FC/PC connector.

ID220 AND ID210 DETECTORS

For experiments where the extreme low noise of the ID230 is not necessary, two other IDQ detectors are suitable: the ID220, which is similar to the

Сравнение параметров детекторов
 Название

	ID230	ID220	Фотоумножитель Photomultiplier
Соединение Coupling	Многомодовое оптоволоконно (NA = 0,275) Multimode fiber (NA=0.275)	Многомодовое оптоволоконно (NA = 0,275) Multimode fiber (NA=0.275)	Свободное пространство Free-space
Эффективность обнаружения Detection efficiency	>25%	>20%	>1%
Темновая скорость счета Dark count rate	<25/с	<1000/с	25000—250000/с
Диаметр активной площади Diameter of active area	65 мкм (оптоволоконно) 65 μm (fiber)	65 мкм (оптоволоконно) 65 μm (fiber)	18 мм
Максимальная скорость счета Maximum count rate	100000/с	100000/с	25000000/с
Разрешающая способность во времени Timing resolution	150 пс	200 пс	350 пс



ДЕТЕКТОРЫ ID220 И ID210

Для экспериментов, проведение которых не требует использования детектора с крайне низким шумом, который обеспечивает датчик ID230, компания IDQ выпускает два типа других детекторов. Это детектор ID220, который похож на ID230, однако, обладает уровнем шума 1000 имп/с (он подходит для компаний-изготовителей комплексного оборудования), и детектор ID210, который также имеет более высокий уровень шума, но способен очень быстро откликаться на импульсное управление (время нарастания по логическому элементу <1 нс). Такой логический элемент может быть использован для выключения детектора при подаче лазерного возбуждающего импульса и его включении сразу после импульса. Разработанное управление позволяет устранить первоначальный "всплеск" обнаруженных фотонов, который может возникать в связи с быстро затухающей флуоресценцией.

СРАВНЕНИЕ ДЕТЕКТОРОВ ПРОИЗВОДСТВА КОМПАНИИ "ID QUANTIQUE" С ФЭУ

Часто для измерений синглетного кислорода используются ФЭУ. Отметим, что они имеют

ID230 but with noise levels of 1000 cps, is suitable for OEM applications, and the ID210 which also has higher noise levels, but can be gated very fast (<1ns gate rise-time). This gate can be used to turn off the detector during laser excitation and shortly after, to eliminate the initial "spike" in detected photons which can arise from fast-decaying fluorescence.

ID QUANTIQUE DETECTORS VS PHOTOMULTIPLIERS

Often, photomultipliers are used in Singlet-oxygen measurements. They have a large diameter active area and low quantum efficiency of order 2%, as well as a high noise (dark count) rate. ID Quantique detectors have 65µm fiber input, higher efficiency and much lower noise. The table below summarizes the differences between types of detectors.

ADVANTAGES OF FIBER-COUPLED DETECTORS

Experimental noise is not solely determined by detector noise: to achieve high-sensitivity experiments, the detector must be isolated from

большой диаметр активной площади и низкую квантовую эффективность порядка 2%, а также высокий уровень шума (темновая скорость счета). Детекторы производства компании "ID Quantique" обладают соединением с входным волокном 65 мкм, более высокой эффективностью и более низким уровнем шума. В таблице ниже приведены различия между типами детекторов.

ПРЕИМУЩЕСТВА ДЕТЕКТОРОВ С ОПТОВОЛОКОННЫМ СОЕДИНЕНИЕМ

В эксперименте шум определяется не только исключительно собственными шумами детектора, в суммарный шум вносят дополнения флуктуации внешней среды. Для их исключения с целью получения высокочувствительных экспериментальных результатов детектор должен быть изолирован от шумов окружающей среды. Детекторы с большой активной площадью, такие как ФЭУ, будут чувствительны к окружающему фоновому освещению, нежелательной флуоресценции от оптических элементов и деталей системы, которые не вовлечены в исследование.

С другой стороны, детектор с оптоволоконным соединением имеет небольшую активную площадь (сердцевина оптоволоконка), а также точно определенную числовую апертуру. В таком случае, можно использовать объектив для проекции (фокусировки) только части исследуемой системы на оптоволоконно, ограничивая большую часть окружающего шума и сомнительной флуоресценции. Этот факт, наряду с чрезвычайно низкой темновой скоростью счета и высокой эффективностью обнаружения, позволяет осуществлять эксперименты с чувствительностью на несколько порядков выше, чем это было возможно в более ранних экспериментах.

СОЕДИНЕНИЕ С МНОГОМОДОВЫМ ОПТОВОЛОКНОМ

Попадание флуоресцентного излучения синглетного кислорода в оптоволоконно осуществляется путем проецирования "объекта", то есть объема образца, освещаемого возбуждающим лазерным импульсом, на сердечник оптоволоконка. Такая про-

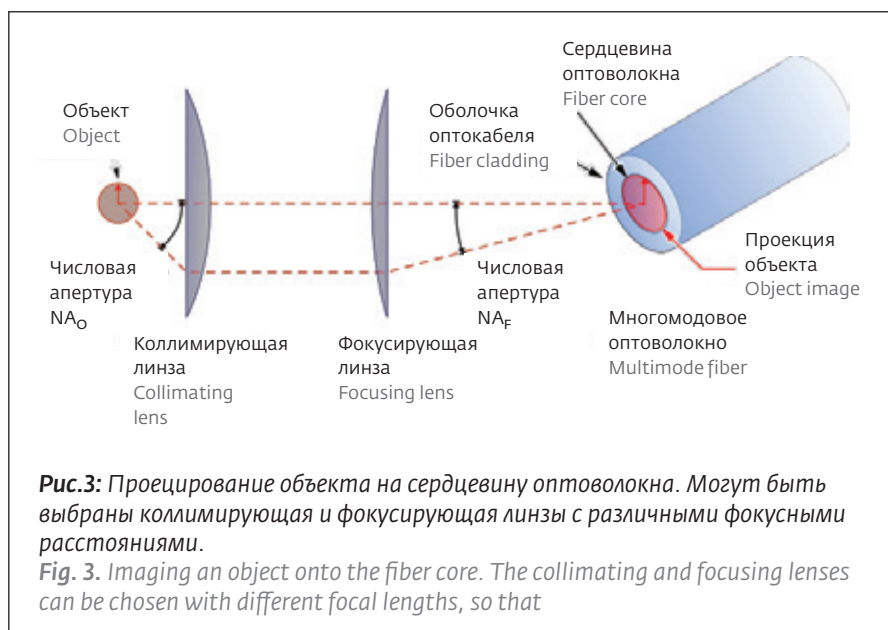


Рис.3: Проецирование объекта на сердцевину оптоволоконка. Могут быть выбраны коллимирующая и фокусирующая линзы с различными фокусными расстояниями.

Fig. 3. Imaging an object onto the fiber core. The collimating and focusing lenses can be chosen with different focal lengths, so that

environmental noise. Detectors with a large active area, such as photomultipliers, will be sensitive to ambient light, undesired fluorescence from optical elements and parts of the system which are not being investigated.

A fiber coupled-detector, on the other hand, has a small active area (fiber core), and a well determined numerical aperture. It is then possible to use a lens to image (focus) only the part of the system under investigation onto the fiber, rejecting a large part of ambient noise and spurious fluorescence. This, together with the extremely low dark count rates, and high detection efficiencies, enables experiments which are several orders of magnitude more sensitive than what could previously be achieved.

COUPLING INTO MULTIMODE FIBER

Coupling the Singlet Oxygen fluorescence light to fiber is done by imaging the "object", i.e. the volume illuminated by the excitation laser, onto the fiber core. This can be done with two lenses, as shown in Fig. 3. The first lens collimates the beam so that several optical elements, such as filters, can be placed along the beam path.

The second lens focuses the beam onto the fiber core. If the object (illuminated volume) is smaller or larger than that of the fiber core (62.5 μm), it can be magnified or reduced by choosing collimating and focusing lenses of different focal lengths. For example, if the object has a diameter of 30 μm, one would chose a collimating lens with a focal length of ½ that

екция может быть осуществлена с помощью двух линз (рис.3). Первая линза – коллиматор. Параллельный световой пучок, прошедший сквозь него, проходит далее сквозь несколько оптических элементов в виде фильтров, которые при необходимости могут быть размещены вдоль траектории луча.

Вторая линза предназначена для фокусировки излучения в рабочую плоскость сечения сердцевины оптоволокон. Если объект (освещаемый объем) меньше или больше объема сердцевины оптоволокон (62,5 мкм), площадь сечения пучка, попадающего на рабочую площадку оптоволокон, может быть увеличена или уменьшена подбором фокусных расстояний коллимирующей и фокусирующей линз. Например, если объект имеет диаметр 30 мкм, можно использовать коллимирующую линзу с фокусным расстоянием, равным половине фокусного расстояния фокусирующей линзы. То есть, имеем коллимирующую линзу с фокусным расстоянием $f_c = 40$ мм, тогда фокусное расстояние фокусирующей линзы $f_f = 80$ мм. Диаметр линзы выбирается таким образом, чтобы использовать полную числовую апертуру оптоволокон ($NA_F = 0,275$).

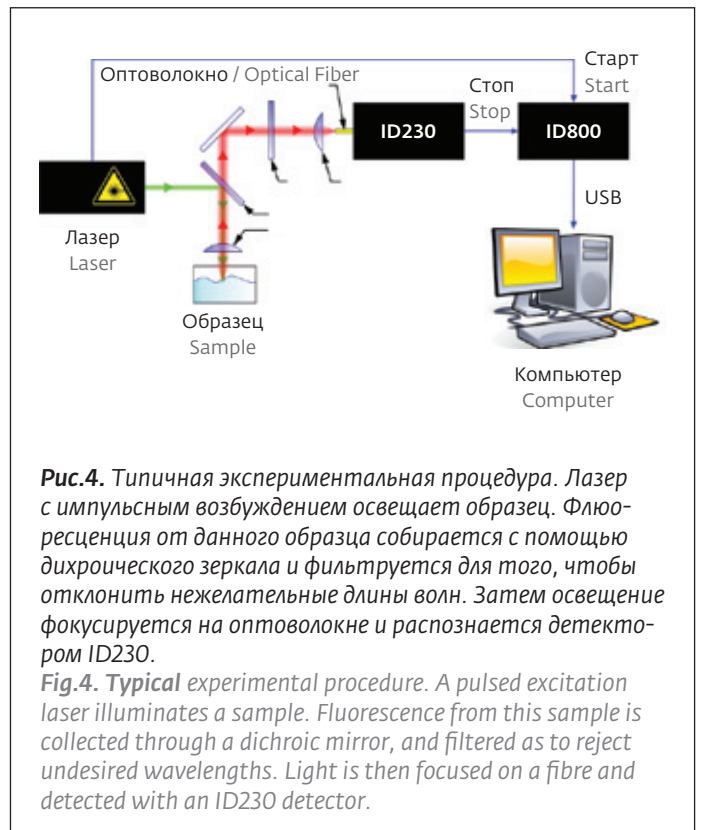


Рис.4. Типичная экспериментальная процедура. Лазер с импульсным возбуждением освещает образец. Флуоресценция от данного образца собирается с помощью дихроического зеркала и фильтруется для того, чтобы отклонить нежелательные длины волн. Затем освещение фокусируется на оптоволоконне и распознается детектором ID230.

Fig.4. Typical experimental procedure. A pulsed excitation laser illuminates a sample. Fluorescence from this sample is collected through a dichroic mirror, and filtered as to reject undesired wavelengths. Light is then focused on a fibre and detected with an ID230 detector.

Радиус фокусирующей линзы R_f должен удовлетворять условию: $R_f > f_f \cdot NA$. Откуда получаем: $R_f > 80 \cdot 0,275 = 22$ [мм]. Если в схеме эксперимента объект исследования нужно разместить ближе к датчику, то используют линзы меньшего размера (R_f) с более короткими фокусными расстояниями (f_f).

Для регулировки и проверки эксперимента лазер может быть подсоединен к оптоволокну вместо детектора, так что его излучение может быть распространено обратным образом вдоль оптоволокну и сфокусировано на образце. Такое действовать гарантирует качественную и простую регулировку.

ЭКСПЕРИМЕНТ

Типичная экспериментальная схема для процедуры регистрации синглетного кислорода изображена на рис.4. Импульсный зеленый лазер освещает образец, который вырабатывает синглетный кислород. Флуоресценция от исследуемого образца с помощью дихроичного зеркала (дихроичное зеркало отражает излучения только определенной длины волны) фильтруется для того, чтобы отвести нежелательное свечение. Флуоресцентные фотоны фокусируются на сердцевину оптоволокну и регистрируются с помощью детектора ID230.

Задержка между освещением от импульсного лазерного излучателя и обнаружением фотонов измеряется при помощи преобразователя "время - цифровой код" ID800 и передается на компьютер для формирования гистограммы (рис.5). Подробную информацию в отношении данного эксперимента можно найти в работе [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Zuluaga M.F., Gabriel D., Lange N. Enhanced prostate cancer targeting by modified protease sensitive photosensitizer prodrugs. – Mol. Pharm., 2012, v.9 (6), p.1570–1579.
2. Korzh B., Lunghi T., Kuzmenko K., Boso G., Zbinden H. Afterpulsing studies of low-noise InGaAs/InP single-photon negative-feedback avalanche diodes. – J. Mod. Opt., 2015, v. 62 (14), p.1151–1157.
3. Boso G., Ke D., Korzh B., Bouilloux J., Lange N., Zbinden H. Time-resolved singlet-oxygen luminescence detection with an efficient and practical semiconductor single-photon detector. – Biomedical optics express 224/DOI:10.1364/BOE.7.000211.

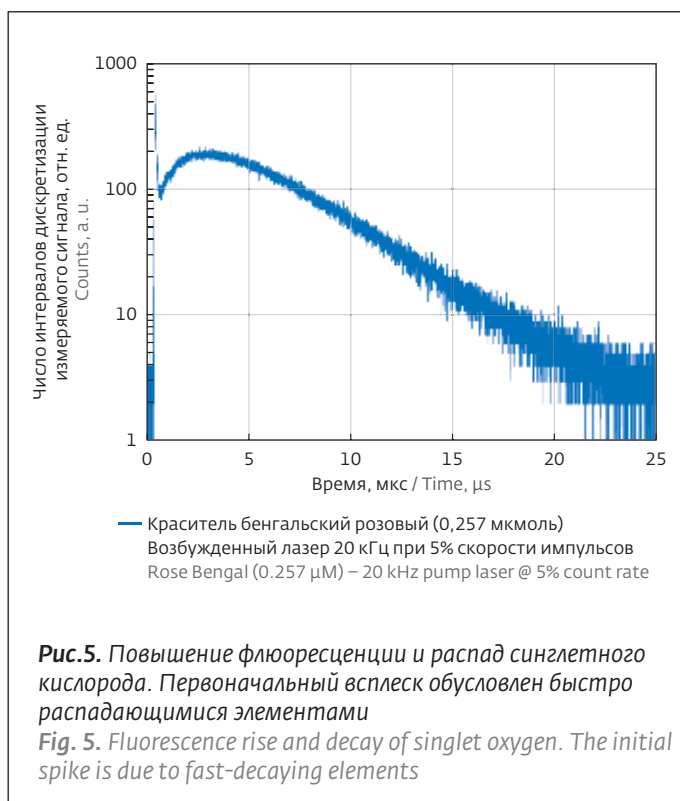


Рис.5. Повышение флуоресценции и распад синглетного кислорода. Первоначальный всплеск обусловлен быстро распадающимися элементами

Fig. 5. Fluorescence rise and decay of singlet oxygen. The initial spike is due to fast-decaying elements

of the focusing lens, e.g. a $f=40$ mm collimating lens and $f=80$ mm focusing lens. The diameter of the lenses is chosen to make use of the full NA of the fiber ($NA=0.275$). The lens radius R should be $R > f \times NA$, which is $R > 80\text{mm} \times 0.275 = 22\text{mm}$. Smaller lenses, with shorter focus distances, can be used if it is possible to place them closer to the object.

To align the experiment, a laser can be connected to the fiber instead of the detector, so that it can be back-propagated along the fiber, and focused onto the sample. This will guarantee good and easy alignment.

EXPERIMENT

A typical experimental procedure (courtesy of Gianluca Boso, University of Geneva), is shown in Fig. 4. A pulsed green laser illuminates a sample, generating singlet oxygen. Fluorescence from this sample is collected via a dichroic mirror, and filtered as to reject unwanted light. Fluorescence photons are focused onto the fiber core and detected with an ID230 detector.

The delay between the laser pulse illumination and photon detection is measured with an ID800 Time-To-Digital converter, and transferred to a computer to generate a histogram (Fig. 5). The full details of this experiment can be found in [3].