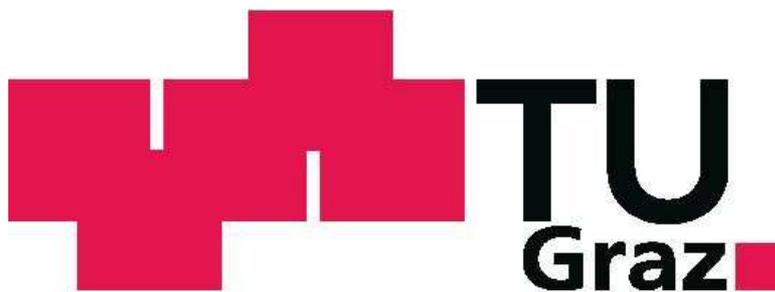


Alwin SCHÜLLER

**Untersuchung von alternativen Lichtquellen-Konzepten
für die HTRF[®]-Messung des Mikrotiterplatten-Readers
Infinite[®] M1000**

Diplomarbeit/Masterarbeit



Institut für Medizintechnik
Technische Universität Graz
Kronsgasse 5, A-8010 Graz

Vorstand: Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Rudolf Stollberger

Betreuer: Dipl.-Chemiker Dr. Friedrich Menges

Begutachter: Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Hermann Scharfetter

Graz, (Mai, 2012)

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am
(Unterschrift)

Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei der Firma Tecan Austria GmbH in Grödig bedanken, die mir diese interessante Diplomarbeit ermöglicht hat. Hauptverantwortlich dafür war Herr Dipl.-Ing. (FH) Markus Schürf, der für mich auch in der Abteilung Forschung & Entwicklung die nötigen Rahmenbedingungen geschaffen hat. Einen großen Dank richte ich weiters an meinen Betreuer Dipl.-Chemiker Dr. Friedrich Menges, der mich immer engagiert und freundlich unterstützt hat und an all die anderen Mitarbeiter bei Tecan, die mich tatkräftig während meiner Diplomarbeit unterstützt haben.

Auch meinem Betreuer an der TU Graz, Herrn Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Hermann Scharfetter, der sich immer für mich Zeit genommen hat, bin ich zu Dank verpflichtet.

Ein großes Dankeschön gilt auch meiner Familie für die unentwegte Unterstützung und der Ermöglichung meiner Ausbildung.

Doch am meisten möchte ich mich bei meiner Freundin Astrid bedanken, die immer für mich da war, und ist, und ihr deshalb auch diese Arbeit widmen und sagen: Danke Astrid!

Untersuchung von alternativen Lichtquellen-Konzepten für die HTRF[®]- Messung des Mikrotiterplatten-Readers Infinite[®] M1000

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, die Homogeneous Time-Resolved Fluorescence (HTRF[®]) -Performance im Mikrotiterplatten-Reader Infinite M1000 mit Monochromatoren für die Firma Tecan zu verbessern. Das Hauptaugenmerk liegt auf der Erhöhung der Signalstärke der zu messenden HTRF[®]-Assays durch mehr Lichtenergie an der Assayprobe. Dabei soll die aktuelle verbesserungswürdige Performance der Anregungsseite, die aus einer Xe-Blitzlampe mit einem dahinter liegenden Doppelmonochromator besteht, mittels alternativen Anregungskonzepte verbessert werden. Dabei spielten die Qualitätsverbesserung, der Aufwand und die Integrierbarkeit der Anregungsquellen und deren Messaufbau eine Rolle. Zu diesem Zweck wurden eine UV-LED als Anregungsquelle und Xe-Blitzlampenlösungen mit einem Filter anstelle des Doppelmonochromators getestet.

Nach der Einarbeitung in die Funktionen des Gerätes Infinite[®] M1000, in die HTRF[®]-Theorie und in den zu messenden Assay, wurden das Messsystem und die zu erreichenden Parameter definiert. Dabei spielten auch die Elektronik und Firmware des Gerätes eine Rolle. Die benötigte Optik wurde ebenfalls definiert und aufgebaut. Während des Projektes sollten auch weitere Optionen untersucht werden, die zu einer Verbesserung der HTRF[®]-Performance des M1000 Gerätes führen könnten.

Die Ergebnisse zeigen bei den UV-LED-Messungen keine klare Verbesserung, da die Leistungen der UV-LEDs noch zu gering sind. Die Messungen, mit den Blitzlampenmodulen und vor allem mit der 40 W Blitzlampe, ergaben Verbesserungen hinsichtlich der Messvarianz und der detektierten Signalstärke.

Im Zuge dieser Arbeit wurden einige Möglichkeiten getestet, von denen einige zu Verbesserungen des Messmodus führten, die in die zukünftige Entwicklung des Gerätes Einfluss nehmen werden.

Schlüsselwörter: HTRF[®], Infinite[®] M1000, UV-LED, optische Anregung, Signalstärke;

Analysis of alternative light source concepts for the HTRF[®] measurement of the microplate reader Infinite[®] M1000

Abstract

The aim of this thesis is the improvement of the homogeneous time resolved fluorescence (HTRF[®]) performance of the Infinite[®] M1000 microplate reader with monochromators from the company Tecan. The main focus was laid on increasing the signal strength of the measured HTRF[®] assay, by sending more light energy to the assay sample. In doing so, the current performance of the excitation side, consisting of a flash lamp coupled to a double monochromator, should be improved by using a different light source concept. Therefore the improvement of quality, the effort and the integration of the excitation source into the reader, as well as the measurement set-up are the important factors considered in this work. To this end a UV-LED and Xe-flash lamp solutions with a filter instead of the double monochromator were investigated.

After familiarization with the functions of the Infinite[®] M1000 reader, the HTRF[®] theory and the measured HTRF[®] assay, the measurement system and the parameters to be optimized had to be defined. The design comprised also the necessary electronics and firmware as well as the required optic elements which had to be designed.

During the project, other options which could lead to an improvement of the HTRF[®] performance of the Infinite[®] M1000 reader also had to be considered and investigated.

The results of the UV-LED measurements do not show a clear improvement, as the light power of UV-LEDs are still too low. The measurements conducted with the flash lamp modules and especially with the flash lamp (40 W), show improvement of the variance of the measurement as well as the detected signal strength of the HTRF[®] measurement.

In the course of this work several possibilities were tested and some of them lead to improvements in the measurement method, which will influence the future developments of the device.

Keywords: HTRF[®], Infinite[®] M1000, UV-LED, optical excitation, signal strength;

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
2	Grundlagen der HTRF [®] -Technologie und -Messung.....	11
2.1	HTRF [®] -Theorie.....	11
2.1.1	Biochemische Grundlagen	11
2.1.2	Messmethodik	16
2.2	Infinite [®] M1000 Grundlagen.....	22
2.2.1	Infinite [®] M1000 Monochromatoren.....	24
2.2.2	Software für den Infinite [®] M1000.....	25
2.2.3	HTRF [®] -Messung mit dem Infinite [®] M1000	27
3	Methoden.....	29
3.1	Messung mit einer UV-LED als Anregungsquelle	33
3.1.1	Elektronik/Firmware der UV-LED	36
3.1.2	Messung mit einer Lichtfaseroptik.....	44
3.1.3	Messung mit einer Freistrahloptik.....	49
3.2	Messung mit einem Blitzlampenmodul als Anregungsquelle.....	54
3.2.1	Elektronik/Firmware des Blitzlampenmoduls.....	55
3.2.2	Messung mit einer Lichtfaseroptik.....	58
4	Ergebnisse	63
4.1	Messeinstellungen und Optimierungen	63
4.2	Messungen mit einer UV-LED als Anregungsquelle.....	67
4.3	Messungen mit einer Blitzlampe als Anregungsquelle	71
5	Diskussion	74
6	Literaturverzeichnis.....	79
7	Abbildungsverzeichnis	81
8	Tabellenverzeichnis.....	83

Abkürzungen

CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor
CV	Variationskoeffizient
DeltaF- HighC	gewichteter Signalwert bei hohem FRET
DeltaF- LowC	gewichteter Signalwert bei niedrigem FRET
Eu	Europium
FET	Feldeffekttransistor
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
HighC	Signal bei hohem FRET
HTRF [®]	homogeneous time resolved fluorescence
HTS	Hochdurchsatz-Screening
IC	integrierten Schaltkreis
LED	Leuchtdiode
LowC	Signal bei niedrigen FRET
PW	Pulsbreite oder Pulsdauer
PWM	Pulsweitenmodulation
RCK	HTRF [®] Reader Control Kit
RTN	Return
Std0	Standard 0 (Signal ohne FRET)
S/B	Signal zu Hintergrund Verhältnis
Tb	Terbium
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRF	Time-Resolved Fluorescence
TR-FRET	Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer
TTL	Transistor-Transistor-Logik
UV	Ultraviolett
Xe	Xenon

1 Einleitung

Die HTRF[®] (Homogeneous Time-Resolved Fluorescence) -Technologie hat ihren Anfang genommen mit den Forschungen von Prof. Jean-Marie Lehn's, der sich mit den Metallen der seltenen Erden beschäftigt hat und darum auch 1987 den Nobelpreis der Chemie erhielt.

Seither ist die von der Firma Cisbio entwickelte HTRF[®]-Technologie eine sehr oft verwendete Messmethode und besitzt unzählige verschiedene Anwendungen wie Medikamentenstudien, Protein-Protein oder Liganden-Rezeptor Interaktionen, Enzymaktivitäten usw. [1] Sie ist zum Beispiel die am häufigsten genutzte generische Assay-Technologie für die Messungen von Analyten in einem homogenen Aufbau, was ideal für Medikamentenstudien mit Hochdurchsatz-Screening (HTS) ist [2], oder ein ideale Messmethode beim Untersuchen des Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α). [3]

Darum ist es für Mikrotiterplatten-Reader, wie dem von der Firma Tecan entwickelten Infinite[®] M1000, sehr wichtig, einen gut funktionierenden HTRF[®]-Messmodus anbieten zu können. Das besondere am Infinite[®] M1000 im Vergleich zu den restlichen Mikrotiterplatten-Readern mit geeigneter HTRF[®]-Performance ist, dass dieser mit Monochromatoren und nicht mit Filtern arbeitet, da dies ein Universalgerät ist und daher besonders flexibel und vielseitig eingesetzt werden kann. Tecans premium Quad4 Monochromator[™] Technologie ist patentiert und sorgt für die ausgezeichnete Hintergrundblockung und Vielseitigkeit des Infinite[®] M1000. [4] Diese Besonderheit ist aber auch gleichzeitig das Problem bei der HTRF[®]-Messmethode. Da durch die beiden verwendeten Doppelmonochromatoren sehr wenig Lichtenergie zur Probe bzw. zum Photomultiplier gelangt, kann die HTRF[®]-Performance mit den am Markt konkurrierenden Filtergeräten wie zum Beispiel dem Infinite[®] F500 auch von der Firma Tecan produziert, bezüglich Messvarianz und Signalstärke nicht mithalten. Das Hauptproblem entsteht dadurch, dass bei zu geringem Anregungslicht das emittierte Signal des Assay sehr gering ist, und dadurch die Verstärkung (Gain) des Photomultipliers am Maximum anstehen kann und die Messung dadurch verfälscht wird. Allgemein gilt es, ein zu geringes Anregungslicht für die HTRF[®]-Messung zu vermeiden, das sich durch eine sehr hohe Verstärkung am PMT ein zu geringes Signal der Probe zeigt, wodurch Quantenrauschen entsteht und dadurch die Varianz der Messung und die Anzahl der benötigten Blitze pro Messung (Mittelungen) und damit auch die Messzeit, steigen. Also ist die Performance des Infinite[®] M1000 im Bezug auf die Messvarianz und Messzeit der Konkurrenz unterlegen. Das Signal/Blank Verhältnis und die Kontrollwerte des HTRF[®] Reader Control Kit besitzen im

Vergleich zu Filtergeräten ähnlich gute Werte. In Tabelle 1 sind die Probleme des zu geringen Anregungslichts des Infinite[®] M1000 im Vergleich zu den anderen Mikrotiterplatten-Readern zu erkennen.

Tabelle 1: Vergleich der Performance des Infinite[®] M1000 mit dem F500 von Tecan und einem Reader der Konkurrenz der auch mit Filtern die Wellenlängen selektiert.

		S/B	CV Std0	DeltaF lowC	DeltaF highC	Zeit
Konkurrenz Reader	10 flashes	148	2,89	38	1172	2:50 min
Infinite F500	10 flashes	172	1,61	32	1031	4:15 min
Infinite M1000	50 flashes	174	4,9	28	972	7:39 min

Die Messzeit des Infinite[®] M1000 bei 10 flashes liegt nur bei 2:20 min und er wäre somit der schnellste der verglichenen Reader, aber der Infinite[®] M1000 benötigt ungefähr 50 flashes damit der Variationskoeffizient (CV) noch im zulässigen Bereich, siehe Kapitel 2.1.2, liegt.

Aus diesem Grund sollen im Rahmen dieser Arbeit die Möglichkeiten einer HTRF[®]-Performance Verbesserung für den Infinite[®] M1000 getestet werden. Dabei soll aus Aufwands- und Kostengründen nur die Anregungsseite geändert werden, da die Messeinheiten des Gerätes nicht verändert werden soll. Das Hauptaugenmerk soll auf das Testen einer UV-LED als neue Anregungsquelle gelegt werden, da sich die Verfügbarkeit leistungsstarker LEDs stark verbessert hat. In den letzten Jahren hat sich die Leistung der UV-LEDs ungefähr verdoppelt und diese gelten daher als Zukunftsmarkt für Lichtquellen.

Kapitel 2 beschreibt die Grundlagen der HTRF[®]-Messung und den zu testenden Assay „HTRF[®] Reader Control Kit“ (RCK) und deren Anwendung im Mikrotiterplatten-Reader Infinite[®] M1000. Im Kapitel 3 werden die Methoden angeführt, die getestet wurden, um eine mögliche Verbesserung der HTRF[®]-Performance zu ermöglichen. Dabei wurde die bereits im Vorfeld dieser Arbeit ausgesuchte UV-LED getestet und überprüft. Die Ansteuerung und die optische Anbindung der UV-LED sollten konzipiert und aufgebaut werden. Da die UV-LED noch neu am Markt ist, gab es keine klaren Betriebsgrenzen, sodass diese mittels Tests erst ausgelotet werden mussten. Danach wurde die UV-LED in einen vorhandenen Messmodus im Gerät implementiert. Dabei war dieser so zu verändern, dass eine Messung am Assay mit der UV-LED möglich war. Für diesen Aufbau wurden die Elektronik und die Firmware verändert

bzw. angepasst. Es sollte ein Vergleich zu der ursprünglichen HTRF[®]-Performance des Infinite[®] M1000 durchgeführt werden.

Als zweite mögliche Anregungsquelle wurde ein Xe-Blitzlampenmodul getestet. Wichtig dabei war, dass das Blitzlampenmodul klein und kompakt sein musste, um für einen möglichen späteren Einbau im Seriengerät geeignet zu sein. Auch bei dem Blitzlampenmodul musste ein geeignetes Elektronik- und Optik- Konzept erstellt werden.

Die Ergebnisse dieser Messungen werden in Kapitel 4 erläutert. Es sind sowohl Ergebnisse über die verschiedenen Einstellungen und Optikaufbauten sowie über den eigentlichen HTRF[®]-Performance Vergleich der mittels RCK durchgeführt wurde zu sehen. Hierbei war es wichtig, alle involvierten Parameter und Einstellungen zu berücksichtigen.

Die daraus gezogenen Schlüsse und Erkenntnisse werden in Kapitel 5 aufgeführt und besprochen. Dabei werden auch Möglichkeiten für zukünftige Änderungen der HTRF[®]-Messung im Infinite[®] M1000 aufgezeigt, sowie nötige Entwicklungsschritte zur Leistungssteigerung der Anregungsquellen für eine zukünftige Nutzung dargelegt.

2 Grundlagen der HTRF[®]-Technologie und -Messung

Im folgenden Kapitel werden die Grundlagen für die Messung von HTRF[®] im Allgemeinen und speziell für den Mikrotiterplatten-Reader Infinite[®] M1000 erläutert. Dabei ist es wichtig, das biochemische Verhalten des Assays und den dazu passenden Messmodus zu verstehen.

2.1 HTRF[®]-Theorie

Die Bezeichnung HTRF[®] ist ein Markenname der Firma Cisbio Bioassays und ist eine Technologie, die auf dem TR-FRET Prinzip basiert. Die HTRF[®]-Technologie entstand durch die großen Fortschritte in der Fluoreszenztechnologie und aus dem Bedürfnis des Marktes nach einer nicht isotopischen homogenen Technik für alle Anwendungen im Life Science-Bereich zur Untersuchung von biomolekularen Bindungen. Die HTRF[®]-Technologie ist von Cisbio mit mehreren Patenten geschützt. Darunter fallen nicht nur Wissen über die Metalle der seltenen Erde (Lanthanoide) sondern auch methodologisches (methodisches) Wissen. Heutzutage gehört Cisbio zu den führenden Herstellern von TR-FRET Lösungen und bietet eine riesige Palette an verschiedenen Assays an.

2.1.1 Biochemische Grundlagen

Da HTRF[®] nur ein Markenname von Cisbio für ihre TR-FRET Lösung ist, kann man auch von TR-FRET-Technik sprechen.

This combination brings together the low background benefits of TRF with the homogeneous assay format of FRET. This powerful combination provides significant benefits to drug discovery researchers including assay flexibility, reliability, increased assay sensitivity, higher throughput and fewer false positive/false negative results. [5]

Bei TRF handelt es sich um eine Time-Resolved-Fluoreszenzmessung. Im Gegenteil zu gewöhnlichen Fluorophoren, die eine Lebensdauer von mehreren Nanosekunden besitzen, haben TRF-Fluorophore für die Time-Resolved Fluoreszenzmessung von Cisbio eine Lebensdauer bis zu einen Zeitraum von wenigen Millisekunden. Dies ist durch die besondere Fähigkeit der Metalle der seltenen Erden, auch Lanthanoide bezeichnet, möglich welche diese langlebige Fluoreszenzmission als besondere Eigenschaft besitzen. Die Signalmessung in

einem TRF-Assay erfolgt üblicherweise erst nach einer gewissen lag-time, einer Wartezeit nach der Anregung. Kurzlebige Hintergrundsignale, die z.B. vom Plattenmaterial und Flüssigkomponenten der Messchemie kommen und das Ergebnis unspezifisch verfälschen können, werden somit von der Messung ausgeschlossen, während das eigentliche Nutzsignal, das ausschließlich von den langlebigen Fluorophoren kommt, erst nach der lag-time gemessen wird. Die resultierende Reduktion des Assay-Hintergrunds führt zu einer massiven Verbesserung der Sensitivität der TRF-Technik.

Die FRET- (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) Technik hat ihre Besonderheit in der Energieübertragung von einem Molekül zum anderen. Das durch Licht angeregte und auch sendende Molekül wird dabei als Donor bezeichnet, während das Energie annehmende Molekül Akzeptor genannt wird. Um einen Energietransfer zu bewerkstelligen, ist es wichtig, dass das Emissionsspektrum des Donors mit dem Exzitationsspektrum des Akzeptors überlappt, wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist. Zusätzlich ist eine örtliche Nähe von ca. 10-100 Å (etwa 1-10 nm), also eine tatsächliche molekulare Bindung vonnöten, um einen Energietransfer vom Donor zum Akzeptor zuzulassen. Damit werden nur Bindungen sichtbar gemacht, bei denen der Akzeptor Fluoreszenzlicht bei einer bestimmten Wellenlänge emittiert, d.h. es müssen beide Bindungspartner die richtigen Fluorophore besitzen, damit es zu einem detektierbaren Energietransfer kommt.

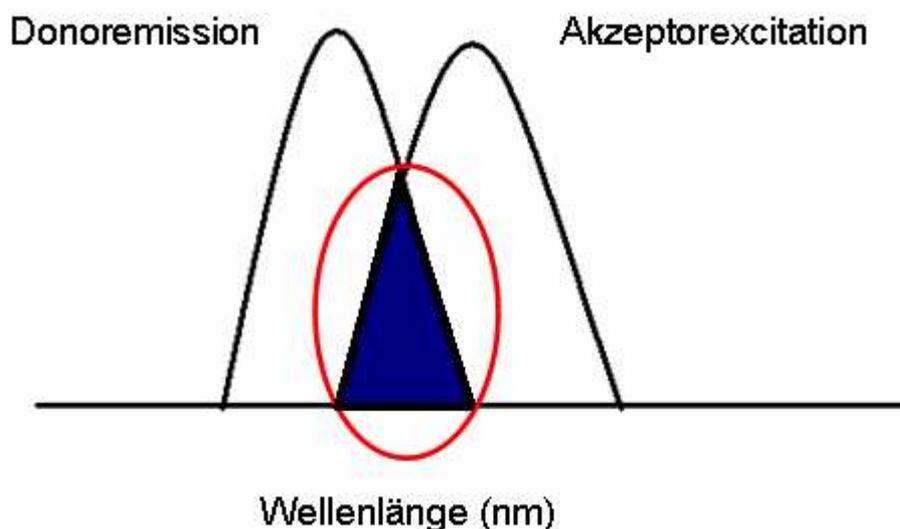


Abbildung 1: Überlappende Spektren der Donoremission und der Akzeptoranregung

Bei HTRF[®] also TR- FRET werden die positiven Aspekte der beiden Phänomene, d.h. die hohe Sensitivität von TRF und die hohe Spezifität von FRET, miteinander verbunden.

Somit bekommt man ein langlebiges und stabiles Fluoreszenzsignal, das Rückschlüsse auf die Menge der untersuchten Bindungen in der Probe erlaubt, und daher sehr spezifisch ist. Bei HTRF[®] werden als Donor Europium (Eu) und Terbium (Tb) aus der Gruppe der Lanthanoide verwendet, wobei Europium als der häufiger benutzte Donor gilt.

Die Anregungswellenlängen für den Donor sind für Europium ~317 nm und für Terbium ~337 nm. Das Fluorophor des Donors emittiert bei ~620 nm und der Akzeptor bei ~665 nm, siehe Abbildung 2.

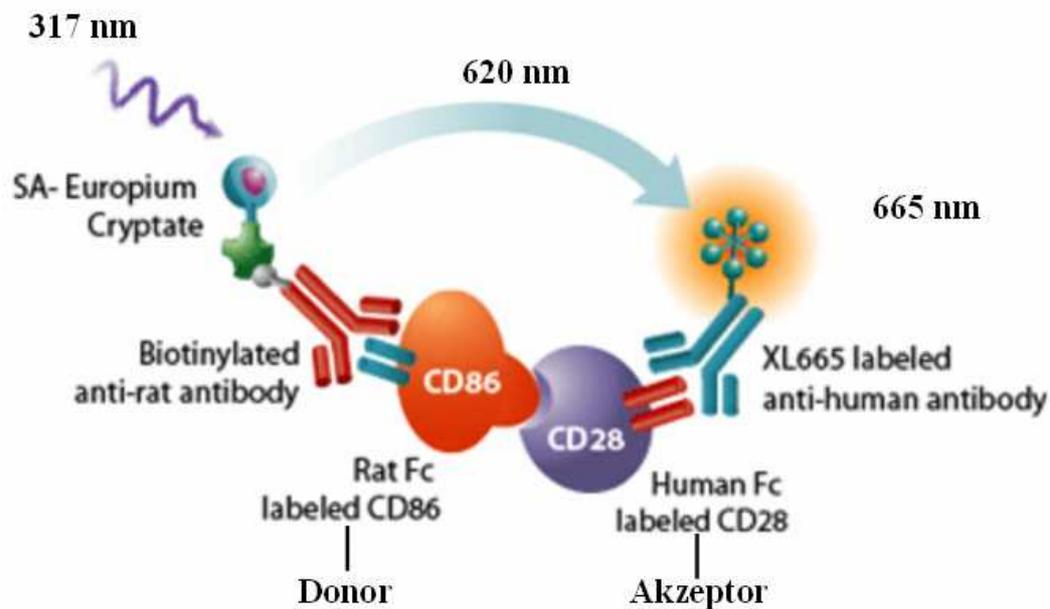


Abbildung 2: Ablauf der Signalentstehung bei Donor- Akzeptorbindung des HTRF[®]-Assays am Beispiel einer Bindung der Oberflächenmoleküle CD86 und CD28 [5]¹

Die dazugehörigen Emissionsspektren für Europium und Terbium als Donor- und XL665 als Akzeptor-Fluorophor sind in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt. Europium und XL665 sind die meist verwendeten in der HTRF[®]-Chemie und daher auch in dieser Arbeit die überwiegend benutzten Stoffe. Dabei ist zu erwähnen, dass das Europium als Eu^{3+} -Kation verwendet wird und in einem Kryptat eingebettet ist. Das Eu^{3+} -Kation ist somit das Zentralatom in einem Molekülkomplex, wobei die Kryptat-Bestandteile für die Absorption

¹ Grafik basiert auf Quelle [5] wurde jedoch zum besseren Verständnis ergänzt.

bzw. Anregung verantwortlich sind. Diese Struktur verleiht dem Europium-Kryptat die Stabilität und somit auch die Langlebigkeit.

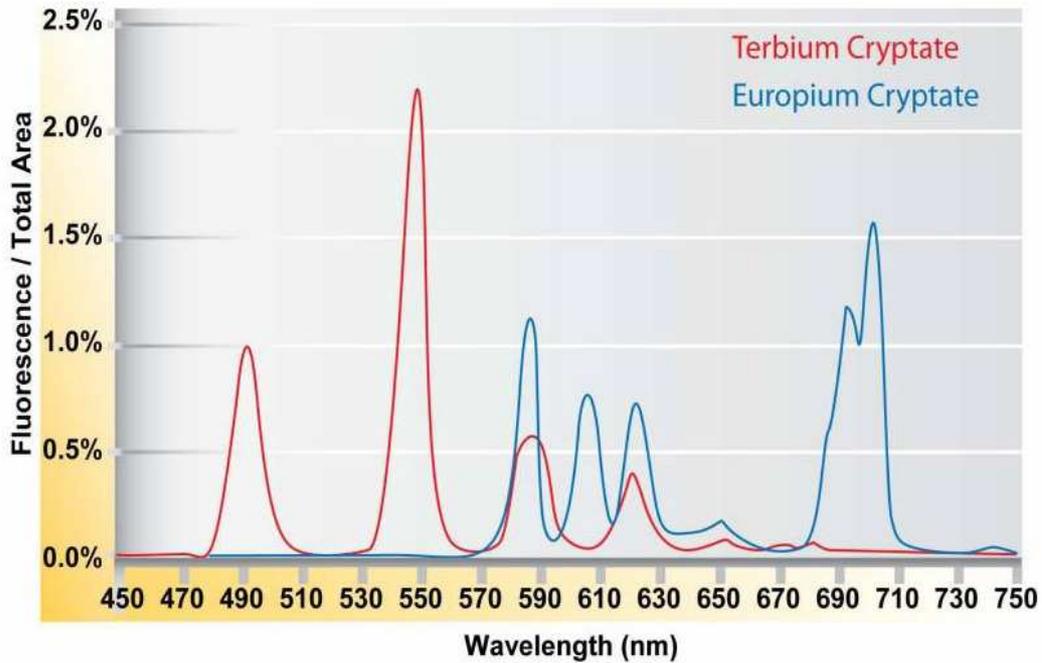


Abbildung 3: Emissionsspektrum von Europium und Terbium Kryptat [2]

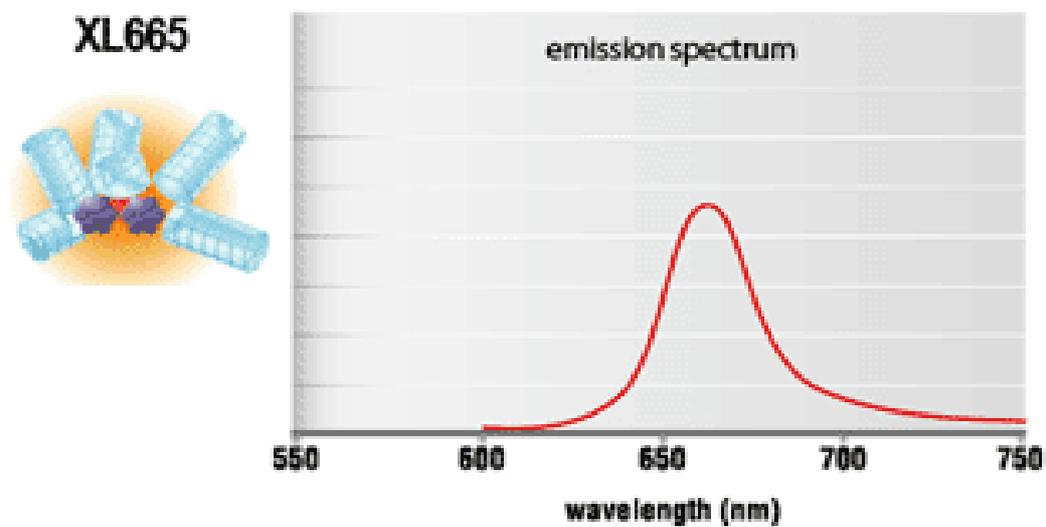


Abbildung 4: XL665 (Akzeptorfluorophor) Struktur und Emissionsspektrum [6]

Die Fluoreszenz-Lebensdauern dieser beiden Fluorophore, die auch im HTRF[®] Reader Control Kit verwendet werden, sind ganz entscheidend und wurden daher auch genau untersucht.

Die Fluoreszenz-Lebensdauer des Europium-Kryptats als Donor ist ungefähr 1200 μs lang, den Verlauf der Signale sieht man in Abbildung 5. Die Lebensdauer des Signals, das der Akzeptor bei einer Bindung und dem damit verbundenen Energietransfer emittiert, ist in Abbildung 6 gezeigt und besitzt nur eine Lebensdauer von ca. 600 μs . Dadurch ist zu erkennen, dass vom Akzeptor, das sowohl geringste als auch kurzlebigste der zu detektierenden Signale kommt.

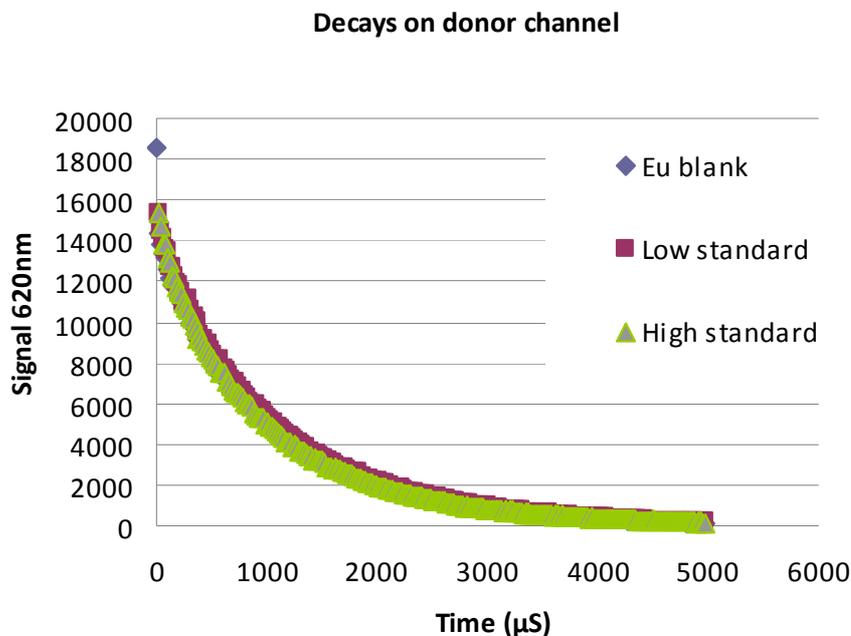


Abbildung 5: Signalverlauf des Donors über die Zeit, Daten von der Firma Cisbio zur Verfügung gestellt

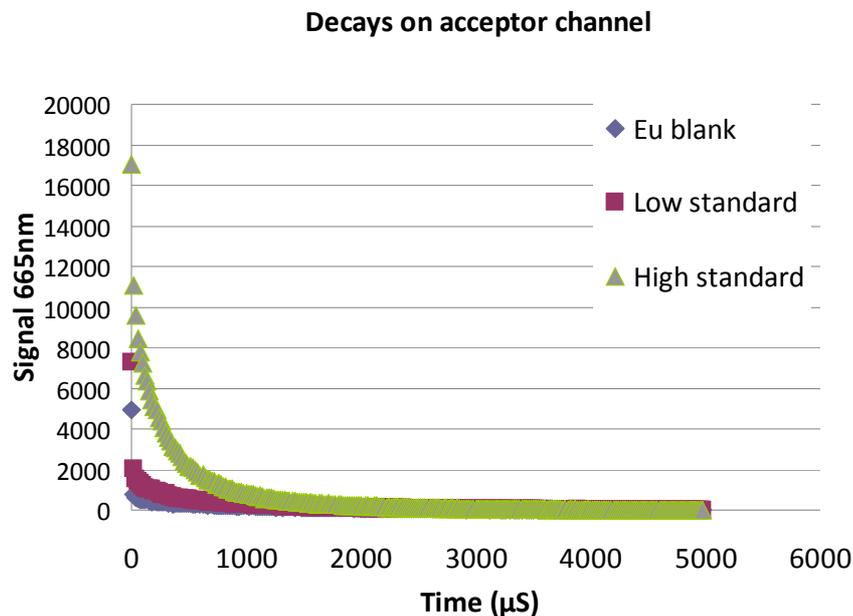


Abbildung 6: Signalverlauf des Akzeptors über die Zeit, Daten von der Firma Cisbio zur Verfügung gestellt

Aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenz-Lebensdauern muss man sich bei Messungen an die kürzere Lebensdauer des Akzeptorsignals anpassen. Beide Abbildungen über die genauen Lebenszeiten wurden von der Firma Cisbio auf Anfrage zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Messmethodik

Die Messmethodik ergibt sich aus den biochemischen Eigenschaften des HTRF[®]-Assays.

Die aktuelle zeitliche Messabfolge für HTRF[®]-Messungen sieht in der Regel so aus (siehe Abbildung 7):

1. Eine kurze Anregung meist mit einer Blitzlampe.
2. Eine Wartezeit, auch lag-time genannt, um den Einfluss des Hintergrundes und das Nachleuchten der Blitzlampe zu minimieren.
3. Die Messzeit, auch integration-time genannt, die für die Signalgewinnung verantwortlich ist.
4. Neuer Anregungspuls, durch die Anregungsquelle und durch die Messfrequenz vorgegeben.

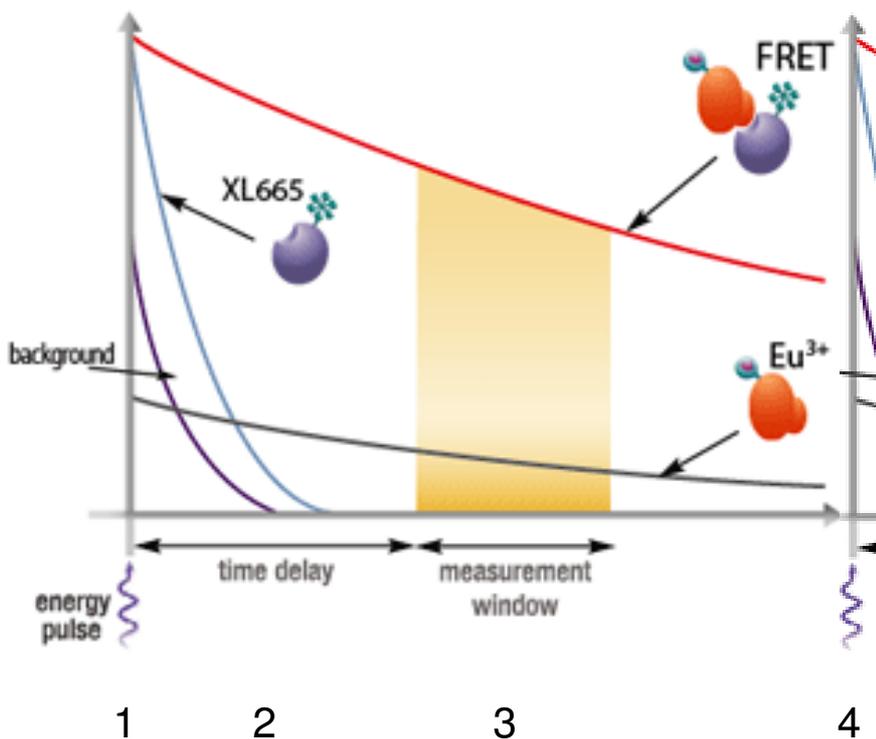


Abbildung 7: zeitliche Messabfolge eines HTRF[®]-Signals [2]²

Das Messprinzip ergibt sich aus dem langen, stabilen Fluoreszenzsignal. Man wählt die Wartezeit solange, bis der Hintergrund (auch Blank genannt), keine wichtige Rolle mehr spielt (vollständig abgeklungen ist), da das Signal/Blank Verhältnis groß genug ist. Die Messzeit wird dann so groß gewählt, dass einerseits genügend gemessene Signale generiert werden, da über die Zeit integriert wird, und andererseits klein genug, um nur die hohen Signalwerte zu erfassen. Die Messwiederholzeit wird durch die Messfrequenz bestimmt, dabei müssen sowohl die hardwaretechnischen Beschränkungen der Anregungsquelle (in der Regel: Blitzlampe) berücksichtigt werden, als auch die gesamte Abklingzeit des Assays, damit keine Messverfälschungen verursacht werden.

Cisbio Bioassays has developed a unique ratiometric measurement of two emission wavelengths (patent US 5,527,684 and foreign equivalents) that corrects for well-to-well variability and signal quenching from assay components and medium variability. Emissions at 620nm (donor fluor) are used as an internal reference while emissions at 665nm (acceptor fluor) are used as an indicator of the biological reaction being assessed. [6]

Die HTRF[®]-Messung ist eine ratiometrische Messung, die sich aus den beiden emittierten Energien bei den verschiedenen Wellenlängen des Donors und Akzeptors zusammensetzt.

² Grafik basiert auf Quelle [2] wurde jedoch zum besseren Verständnis ergänzt.

Das heißt es wird eine Messung bei einer Wellenlänge von 620 nm zur Detektion des Donorsignals durchgeführt. Bei dieser Messung wird kein FRET, sondern nur die Emission des ungebundenen Donors detektiert. Danach wird eine Messung bei der Wellenlänge von 665 nm zur Ermittlung des Akzeptorsignals durchgeführt.

Aus diesen beiden Messungen wird das Verhältnis Akzeptorsignal/Donorsignal gebildet. Dadurch gleicht man Ungleichheiten zwischen den einzelnen Proben (well to well) sowie unterschiedlichen Signalverluste und Variationen im Medium selbst aus. In Abbildung 8 kann man gut erkennen, dass trotz unterschiedlicher Transmission das gleiche Verhältnis entsteht und sich dadurch eine leicht reproduzierbare und robuste Messung bewerkstelligen lässt.

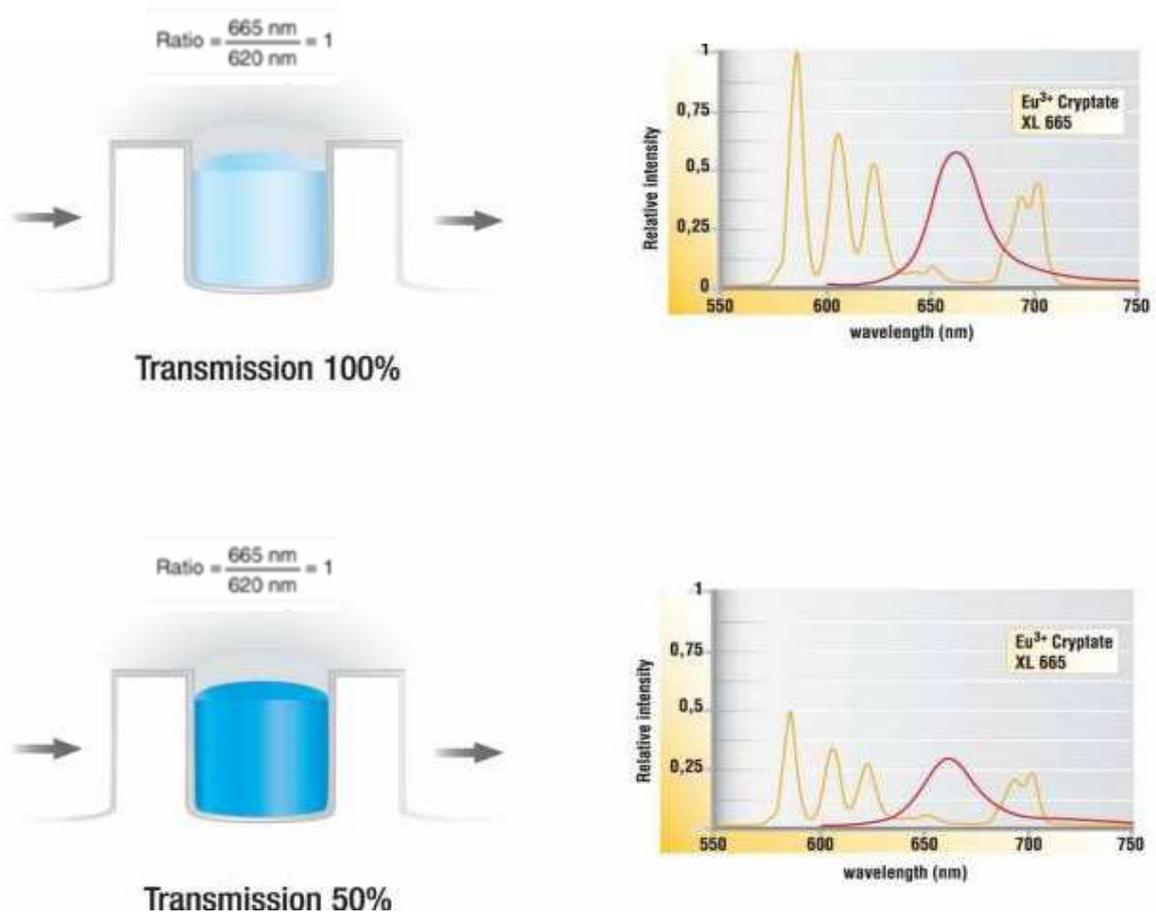


Abbildung 8: Messung bei 620 nm für Donorsignal (kein FRET) und 665 nm für Akzeptorsignal (FRET), dabei bleibt das Verhältnis (Akzeptor/Donor) trotz unterschiedlicher Transmission gleich [7]

Aus diesem Verhältnis lassen sich die wichtigsten Qualitätskennzahlen berechnen. Dabei werden vier Qualitätskennzahlen in dieser Arbeit besonders hervorgehoben:

1, Signal/Blank:

Beschreibt das Verhältnis zwischen dem Nutz-Signal und dem Hintergrundsignal (z.B. Rauschen)

2, DeltaF- LowC

Diese Kennzahl gibt in Prozent an, wie weit sich ein Signal durch niedriges FRET das vom Akzeptor bei 665 nm emittiert wird, vom Referenzsignal (Standard 0) sich abhebt.

3, HighF- HighC

Dieser Wert gibt bei einem Signal durch hohen FRET, das vom Akzeptor bei 665 nm emittiert wird, in Prozent an wie weit dieses vom Referenzsignal (Standard 0) unterscheidbar ist.

4, CV-Wert Standard 0

Gibt den Variationskoeffizient in Prozent zwischen den einzelnen Messungen über die Standard 0 Messreihe an.

Um diese Werte zu kontrollieren, gibt es von der Firma Cisbio einen Kontroll-Assay „HTRF[®] Reader Control Kit“, den bei Tecan jedes Gerät bei der Fertigung bzw. Ausgangskontrolle messen muss, falls es für die HTRF[®]-Messung zertifiziert ist. Dabei werden die vier oben genannten Qualitätskennzahlen überprüft. Auf dem HTRF[®] Reader Control Kit basieren in dieser Arbeit alle späteren Qualitätsvergleiche. Dieser HTRF[®] Reader Control Kit wird in einer 96 Well Platte mit folgendem Inhalt gemessen, siehe Abbildung 9.

<>	1	2	3	4	5	6	7	8
A	620C	Std 0	Low C	High C	Blk	XL665	CryB	
B								
C								
D								
E								
F								
G								
H								

620C = 620nm Kontrolle, nur Donor
Std 0 = Standard 0, Negative Kontrolle (kein FRET)
Low C = Low control/calibrator (niedriger FRET)
High C = High control/calibrator (maximum FRET)
Blk = Buffer Blank
XL665 = XL665 blank
CryB = Cryptate blank

Abbildung 9: Aufbau und Komponenten eines HTRF[®] Reader Control Kit

Aus den daraus gewonnenen Signalen werden die Qualitätskennzahlen folgendermaßen errechnet. Dabei müssen die vorgegebenen Grenzen eingehalten werden, damit das Gerät für die Firma Cisbio, auf dem Markt, als HTRF[®] fähig gilt.

$$\underline{S/B \geq 40}$$

$$S/B = \mu_{620} / \mu_{\text{Buffer}} \quad (1)$$

$$\underline{\Delta F\text{- LowC} \geq 15\%}$$

$$\Delta_{R\text{-Low}} = \mu_{\text{LowC-ratio}} / \mu_{\text{Std0-ratio}} \quad (2)$$

$$\Delta_{F\text{-Low}} = \Delta_{R\text{-Low}} / (\mu_{\text{Std0-ratio}} * 100) \quad (3)$$

$$\underline{\Delta F\text{- HighC} \geq 600\%}$$

$$\Delta_{R\text{-High}} = \mu_{\text{HighC-ratio}} / \mu_{\text{Std0-ratio}} \quad (4)$$

$$\Delta_{F\text{-High}} = \Delta_{R\text{-High}} / (\mu_{\text{Std0-ratio}} * 100) \quad (5)$$

$$\underline{CV\text{- Std0} \leq 10\%}$$

$$CV_{\text{Std0}} = \delta_{\text{Std0-ratio}} / (\mu_{\text{Std0-ratio}} * 100) \quad (6)$$

$$\text{Ratio} = \text{Werte der 665nm Messung} / (\text{Werte der 620nm Messung} * 10000) \quad (7)$$

S/B...	Signal/BlankVerhältnis
μ_{620} ...	Mittelwert vom 620 nm Kontrolle Signal (Spalte1)
μ_{Buffer} ...	Mittelwert vom Buffer Blank (Spalte6)
$\mu_{\text{LowC-ratio}}$...	Mittelwert von Signal LowC (Spalte 4 <i>Ratio</i>)
$\mu_{\text{HighC-ratio}}$...	Mittelwert von Signal HighC (Spalte 5 <i>Ratio</i>)
$\mu_{\text{Std0-ratio}}$...	Mittelwert von Std0 (Spalte 2&3 <i>Ratio</i>)
$\delta_{\text{Std0-ratio}}$...	Standardabweichung von Std0 (Spalte 2&3 <i>Ratio</i>)
CV_{Std0} ...	Variationskoeffizient der Standard 0 Messung
$\Delta_{\text{R-Low}}$...	Mittelwertverhältnis zwischen LowC und Standard 0 Signal
$\Delta_{\text{F-Low}}$...	Prozentuale Darstellung der Abweichung des LowC vom Standard 0 Signal
$\Delta_{\text{R-High}}$...	Mittelwertverhältnis zwischen HighC und Standard 0 Signal
$\Delta_{\text{F-High}}$...	Prozentuale Darstellung der Abweichung des HighC vom Standard 0 Signal

Die Formeln 1-7 dienen zur Veranschaulichung der Berechnungen der Qualitätskennzahlen aus einem gemessenen Reader Control Kit, das die Zertifizierungsgrundlage ist. Das bedeutet falls eine der von Cisbio angegeben Grenzen nicht erfüllt wird, darf das gemessene Gerät nicht den „HTRF[®] ready“-Aufkleber führen und ist damit nicht HTRF[®] zertifiziert. Da der Infinite[®] M1000 als ganze Geräteserie „HTRF[®] ready“ zertifiziert ist, dürfte selbst ein einziges Gerät bei einer Überschreitung der Grenzwerte nicht verkauft werden.

Die Spalten XL665 Blank (Spalte 7) und Kryptat Blank (Spalte 8) dienen zur Überprüfung durch die Firma Cisbio, um auf den möglichen Fehler zu schließen, falls bei der Messung des HTRF[®] Reader Control Kit eine fehlerhafte Messung zustande kommt bzw. die Kriterien nicht erfüllt werden.

2.2 Infinite[®] M1000 Grundlagen

Der Tecan Infinite[®] M1000 ist ein multifunktionaler Mikrotiterplatten-Reader, der eine hohe Effizienz für die überwiegende Mehrheit der heutigen Mikrotiterplatten-Anwendungen und -Forschungen besitzt. Der Infinite[®] M1000 ist ein Monochromator-Gerät, in dem die Exzitations- und Emissionswellenlängen und deren Bandbreiten mittels Doppelmonochromatoren und nicht mittels Wellenlängenfiltern eingestellt werden. Durch die Doppelmonochromatoren kann der Benutzer alle Wellenlängen von 230 bis 850 nm mit einer maximalen Bandbreite von 20 nm sowohl zur Anregung als auch zur Detektion frei einstellen, das Monochromatorsystem aus beweglichen Gittern und Schlitzen wird dann automatisch auf die gewählten Wellenlängen eingestellt. Darüber hinaus wird das Streulicht dramatisch gesenkt und damit die Messung sensitiver. Einzig die Transmission des Lichtes ist bei einem Doppelmonochromator weit aus geringer als bei einem einfachen Filter. Neben den Messmodulen für Absorption und Fluoreszenz-Intensität mit der Messmöglichkeit HTRF[®], ermöglicht der Infinite[®] M1000 zusätzlich die Messung von Fluoreszenzpolarisation und Lumineszenz. Der Infinite[®] M1000 ist auch Roboter-kompatibel und bietet eine integrierte Stapler-Option sowie ein externes Injektor- Modul.

Das voll ausgestattete Instrument (alle installierten Optionen) bietet folgende Messverfahren:

- Multichannel Absorption
- Absorptionsscan
- Fluoreszenzintensität Top, Bottom, zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung (HTRF[®])
- Fluoreszenzscan
- Fluoreszenzpolarisation
- Lumineszenz
- Mehrfarben-Lumineszenz
- Shaking und Temperieren

Der Infinite[®] M1000 wird für unzählige Applikationen wie zum Beispiel Hochdurchsatz-Screening, Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien, DNA / RNA-Quantifizierung und vielen mehr verwendet. [8]

Jede Standard-Mikrotiterplatte vom 6 bis 1536 Well-Format mit einer maximalen Plattenhöhe von 23,5 mm inkl. Deckel kann mit jedem der oben genannten Messverfahren gemessen werden. Das Umschalten zwischen den einzelnen Messverfahren und die Ausrichtung der Optik auf die verschiedenen Plattenformate sind vollständig automatisiert.

2.2.1 Infinite[®] M1000 Monochromatoren

Das Monochromatorensystem im Infinite[®] M1000 wird auch als Premium Quad4 Monochromators[™] bezeichnet. Diese Technologie verwendet zwei Exzitationsmonochromatoren und zwei Emissionsmonochromatoren zur Wellenlängen- und Bandbreiten-Einstellung sowohl für die Anregung als für die Detektion. Durch die patentgeschützte Technologie ist es möglich, die Bandbreiten unabhängig voneinander sowohl für Anregung als auch Emission in 1 nm Schrittweiten einzustellen bis zu einem maximalen Bandbreite von 20 nm. Der große Vorteil liegt daher in der Flexibilität, die es ermöglicht unzähliger verschiedener Anwendungen ohne manuelles Filtertauschen schnell und unkompliziert durchzuführen. Mit Hilfe der Durchlassspalten ist die Streulichtblockung ausgesprochen effektiv und erlaubt sehr präzise Wellenlängeneinstellungen. Doch auch die Intensität bei gewünschter Wellenlänge wird stärker gedämpft als bei herkömmlichen Filtern und führt dazu, dass die benötigte Lichtenergie der Anregungsquelle groß genug sein muss um die notwendige Anregungsenergie der Probe zu gewährleisten. Der Doppelmonochromatoraufbau wie in Abbildung 10 dargestellt, besteht aus einer Kondensoroptik zur Fokussierung, aus drei Durchlassspalten, dabei limitiert der erste die Bandbreite, der zweite kommt nach dem ersten Monochromatorgitter, das das Licht wellenlängenabhängig reflektiert, und lässt nur die gewünschte Wellenlänge durch. Danach kommt ein weiteres Monochromatorgitter für die weitere Reduzierung des Streulichts, da der letzte Durchlassspalt wiederum nur die gewünschte Wellenlänge durchlässt.

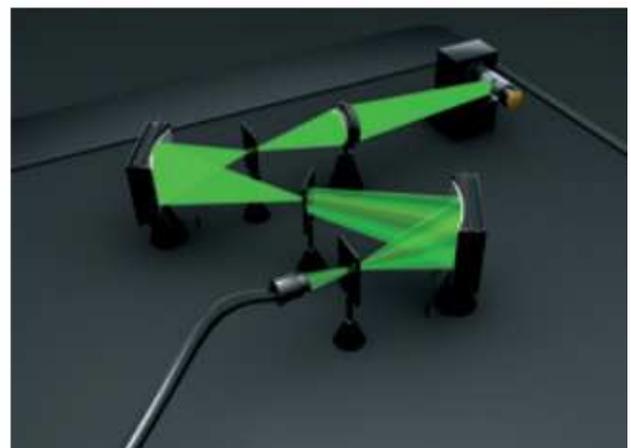


Abbildung 10: Aufbau des Premium Quad4 Monochromators[™] im Infinite[®] M1000, Exzitationsseite links und Emissionseite rechts [9]

2.2.2 Software für den Infinite[®] M1000

Um mit dem Gerät Infinite[®] M1000 arbeiten zu können, hat Tecan eine eigene Software für alle Mikrotiterplatten-Reader der Infinite[®]-Serie entwickelt. Diese Software nennt sich i-control[™] und wird mit jedem Gerät mitgeliefert. Dabei handelt es sich um eine einfach zu handhabende Software, die dem Benutzer erlaubt, für jede Anwendung seinen eigenen Workflow zu definieren. Jeder Workflow kann sehr einfach durch Drag & Drop der verschiedenen Prozesse (Messelemente) erstellt werden. Auch diverse Parameter und Einstellungen können verändert werden, wie zum Beispiel Wellenlänge, Frequenz, Mikrotiterplattentyp und vieles mehr. Die Workflows können gespeichert werden, damit diese einfach wieder benutzt werden können und somit eine Sammlung an individuell benötigten Workflows angelegt werden kann.

Die Daten werden in Windows[®] kompatiblen Formaten ausgegeben, in der Regel als Excel[®] Format. In Abbildung 11 sieht man einen Screenshot der Benutzeroberfläche des Programms i-control[™]. Auf der linken Seite sind die möglichen Prozesse die man auswählen kann zu erkennen und im Hauptfenster ist oben die zu verwendende Mikrotiterplatte auszuwählen und darunter der aktuelle Workflow mit den ausgewählten oder vorgefertigten Prozessen zu sehen. [10] In diesem Beispiel ist die als Vorlage gespeicherte Workflow HTRF[®]-Messung eines Reader Control Kit dargestellt. Dabei sieht man den ersten Prozess des Workflows, nämlich die Donormessung mit allen Einstellungen, die zur Verfügung stehen. Einige dieser Einstellungen sind ganz besonders hervorzuheben, da diese in dieser Arbeit noch oft angesprochen werden.

Die Wellenlängen und Bandbreiten für Emission und Anregung können aufgrund der verwendeten Monochromatoren flexibel eingestellt werden und sind für die HTRF[®]-Messung sehr wichtig. Dazu kommen die schon erwähnten Einstellungen der Wartezeit (lag-time) und Messzeit (integration-time) die von großer Bedeutung sind. Die Einstellungen automatische bzw. optimale oder manuelle Verstärkung (Gain) und z-Position Einstellungen sind nicht so entscheidend. Aber für direkte Vergleiche zwischen Messungen ist die manuelle Einstellung von Vorteil, da so fixe Werte eingestellt werden können. Die Frequenz der Blitzwiederholung ist standardmäßig auf 100 Hz eingestellt, kann aber auf 400 Hz umgestellt werden, was eine Verringerung der Blitzlampenausgangsenergie auf ein Viertel bedeuten würde und daher für die HTRF[®]-Messung nicht in Frage kommt.

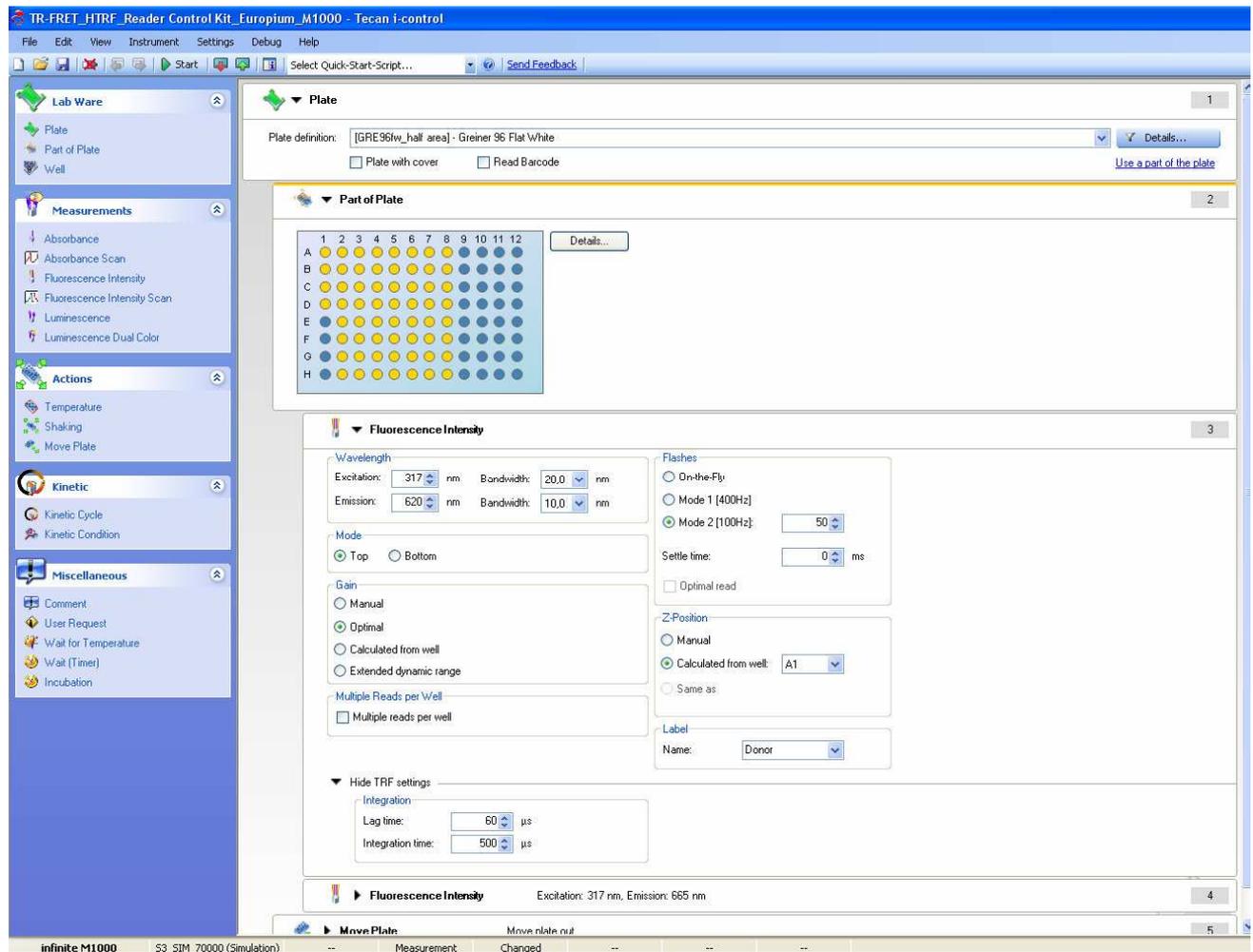


Abbildung 11: Screenshot des verwendeten Mess-Workflows für HTRF[®] RCK-Messungen für den Infinite[®] M1000

2.2.3 HTRF[®]-Messung mit dem Infinite[®] M1000

Die Anregungsseite des M1000 besteht bei dem Fluoreszenzintensität Top Messverfahren bzw. bei der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung HTRF[®], aus einer Blitzlampe mit nachgeschaltetem Doppelmonochromator zur Wellenlängen- und Bandbreiten-Einstellung. Vom Doppelmonochromator-Ausgang wird mittels einer Y-Lichtfaser das Anregungslicht zur Probe befördert. Das von der Probe emittierte Licht wird wieder in die Lichtfaser zurückgeschickt. Da es sich um eine Y-Lichtfaser handelt kann nun das Licht zu dem emissionsseitigen Doppelmonochromator und von dort zum Photomultiplier (PMT) befördert werden, siehe Abbildung 12. Durch die Doppelmonochromatoren auf der Anregungs- und Emissionsseite, sind flexible Wellenlängeneinstellungen ohne manuelles Filtertauschen möglich. Da aber bei einer HTRF[®]-Messung sehr viel Anregungsenergie gebraucht wird und auch sehr kleine Signalunterschiede detektiert werden sollen, ist die schwache Transmission eines Doppelmonochromators für die HTRF[®]-Messung ein Nachteil gegenüber Filtergeräten.

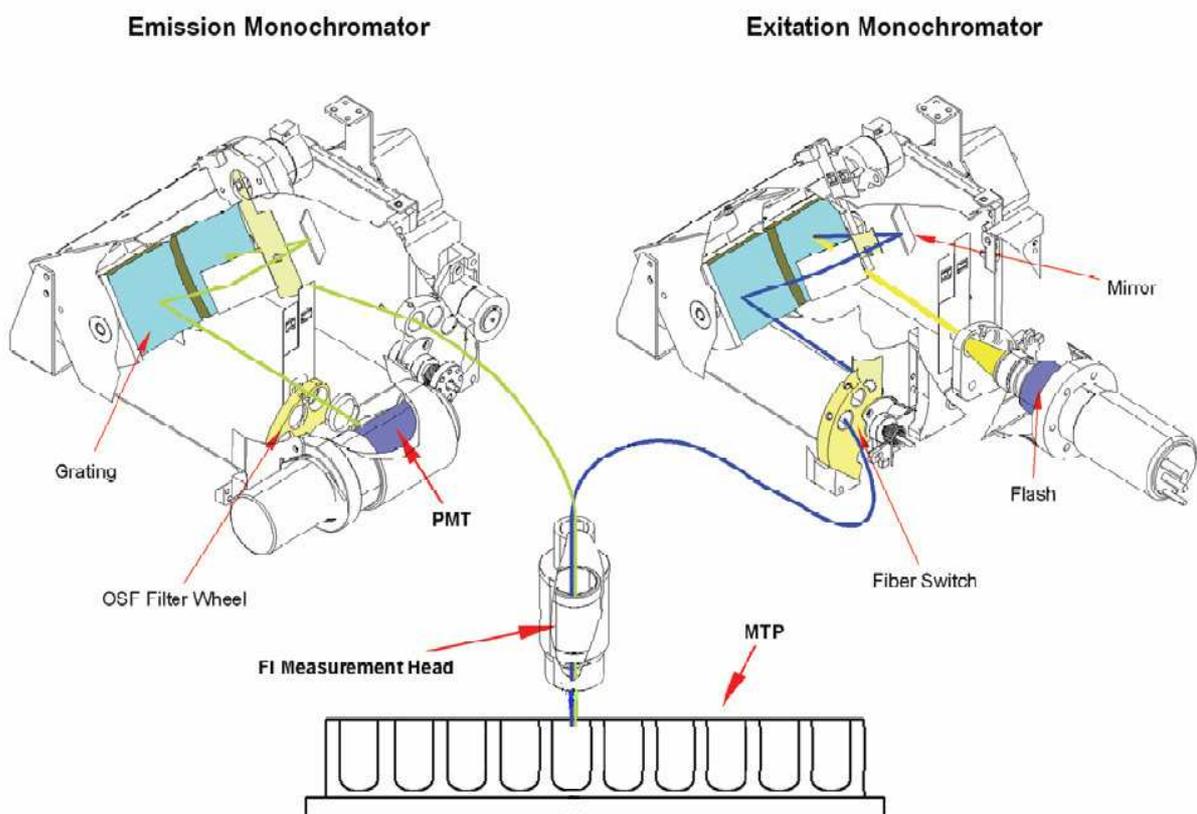


Abbildung 12: Lichtweg bei einer HTRF[®]-Messung über die Doppelmonochromatoren [11]

Bei der HTRF[®]-Messung wird zuerst das Donorsignal bei einer Wellenlänge von 620 ± 10 nm detektiert und danach das Akzeptorsignal bei 665 ± 10 nm. Somit wird die ganze Mikrotiterplatte zweimal durchgemessen. Die verwendete Xe-Blitzlampe am M1000 besitzt eine Leistung von 40 W und wird in der Regel mit 100 Hz betrieben. Dabei kann die Messung der Mikrotiterplatte mit einer unterschiedlichen Anzahl von Blitzen pro Well durchgeführt werden. Je mehr Blitze pro Well man verwendet, umso niedriger wird der Variationskoeffizient der Messung innerhalb der Wells mit Replikaten einer Konzentration, da aufgrund der höheren Anzahl an Blitzen auch die Anzahl der gemittelten Messwerte steigt. Allerdings wird die Messdauer dadurch länger. Die Varianz der Messung ist darüber hinaus zum größten Teil von der Signalstärke die am Photomultiplier ankommt, abhängig. Je mehr Signal auf den Photomultiplier trifft, desto niedriger ist die nötige Verstärkung am Photomultiplier und das Verhältnis der ausgegebenen Counts pro detektiertem Photon am PMT. Das bedeutet je kleiner die Verstärkung und damit die Countzahl/Photon, desto kleiner auch die Varianz der Messung, welche ein sehr wichtiges Kriterium bei der HTRF[®]-Messung wie auch bei den meisten anderen Messungen, ist.

3 Methoden

Die möglichen Methoden zur Umsetzung einer Verbesserung der HTRF[®]-Performance wurden durch die Firma Tecan vorgegeben und durch das Gerät selbst stark beschränkt. Zum einen musste die wirtschaftliche Seite für eine mögliche zukünftige Fertigung berücksichtigt werden, zum anderen ist der vorhandene Platz für weitere Module im Infinite[®] M1000 bereits sehr knapp bemessen. Damit keine großen Umbauten am Gerät stattfinden mussten und der Aufwand im Rahmen blieb, wurde beschlossen, nur die Anregungsseite des Messsystems HTRF[®] zu ändern. Das aktuelle Messsystem des Infinite[®] M1000 wurde in Kapitel 2.2.3 erläutert. Dadurch wurden der Lichtpfad von der Probe weg bis zum Photomultiplier und auch der Photomultiplier selbst nicht verändert. Daher wird in der Methodik nur auf die Anregungsquelle selbst und den optischen Weg zur Probe sowie die unterschiedlichen Messparametern eingegangen.

Der Anregungsdoppelmonochromator, der für die niedrige Lichtenergie an der Probe hauptverantwortlich ist, soll durch ein Filter ersetzt werden. Besonderes Augenmerk soll auf eine UV-LED als Anregungsquelle gelegt werden, da die Firma Tecan sich dadurch eine kostengünstige und vor allem einfache Integration verspricht, falls eine UV-LED die HTRF[®]-Performance steigern würde. Dabei wurden zwei unterschiedliche Lichteinkopplungspfade gewählt. Zuerst wurde das UV Licht der LED mittels einer Quarzfasern in die Probe eingestrahlt, da diese leicht und flexibel ins Gerät eingebaut werden konnte. Als zweiter Messaufbau für die UV-LED wurde eine Freistrahloptik mit einem dichroitischen Spiegel und einer Linse aufgebaut, um mehr Licht zur Probe zu bekommen als mit der Lichtfaseroptik. Da es bereits einen Messmodus (Fluoreszenz-Polarisation) mit verschiedenen LEDs gab, bot sich eine Abänderung dieses Aufbaues für die Versuchsreihe mit Freistrahloptik an. Dadurch musste kein eigenes provisorisches Modul überlegt werden.

Als Alternative für die UV-LED wurden noch kleine kompakte Xe-Blitzlampenmodule als Anregungsquelle getestet, weil diese sich für einen möglichen Einbau in das Gerät eignen. Dabei erhoffte man sich trotz der geringeren Leistung im Vergleich zu der aktuellen Blitzlampe, die im Gerät eingebaut ist, eine höhere Anregungsintensität an der Probe, da statt des Doppelmonochromators nur ein Filter zur Wellenlängenselektion dienen würde. Damit würde man den Anregungsdoppelmonochromator des Universalgerätes, der eine starke Lichtdämpfung besitzt, umgehen. Für eine Blitzlampe mit Freistrahloptikaufbau müsste ein eigenes Modul entwickelt, konstruiert, gebaut und getestet werden, was aus Zeitgründen nicht

möglich war. Aber durch den Vergleich zwischen Freistrahloptik und Lichtfasereinkopplung bei der UV-LED Messung, können Rückschlüsse auf die mögliche Performance mit einer Xe-Blitzlampe bei direkter Lichteinstrahlung auf die Probe gezogen werden.

Da das Ziel eine Verbesserung der HTRF[®]-Performance war, wurden alle Messergebnisse mit den aktuellen Messwerten des Infinite[®] M1000 verglichen. Dabei wurden die Lichtenergien der Anregung die zur Probe gelangten, aber hauptsächlich die Qualitätskennzahlen der HTRF[®]-Messung die durch den RCK gewonnen wurden, verglichen.

In der Methodik wurden die beiden verschiedenen Anregungsquellen in Unterkapiteln unterteilt, wobei diese weiters durch den optischen Messaufbau untergliedert wurden. Auch Elektronik, Messparametereinstellungen und Firmware Änderungen sind wichtige Punkte die in der Methodik behandelt werden. „Unter Firmware (von engl. „firm“ = fest) versteht man Software, die in elektronische Geräte eingebettet ist“. [12] Also handelt es sich um eine fix integrierte Software in einem Gerät wobei das eine nicht ohne das andere funktioniert.

Als Voraussetzung für die HTRF[®]-Messungen waren weit reichende Grundkenntnisse des HTRF[®]-Messablaufes und auch über den RCK Assay, der in Kapitel 2 besprochen wurde, von Nöten.

Die ersten durchgeführten Tests beschäftigten sich mit dem Verstehen des Assays. Dabei wurden die Spektren der Assaykomponenten aufgenommen, um die optimalen Anregungswellenlängen und Detektionswellenlängen herauszufinden und zusätzlich auch die Theorie zum HTRF[®]-Assay detailliert zu überprüfen.

Darüber hinaus war es auch sehr wichtig, die Messparameter, die durch die Software i-control[™] einzustellen sind, zu verstehen und deren Einfluss auf die HTRF[®]-Messung abzubilden. Diese Messeinstellungen (siehe Auflistung), wurden variiert, um bei jedem Messaufbau das Optimum zu finden und auch allgemeine für alle Messungen gültige Verbesserungen zu erkennen. Eine Möglichkeit für die Grundeinstellung wird von der Firma Cisbio, als Hilfestellung aufgezeigt. Darum wurde bei der Variierung der Einstellungen und deren Verständnis mit der Firma Cisbio direkt zusammen gearbeitet.

Die aktuellen Messeinstellungen der HTRF[®]-Messung im Infinite[®] M1000 und somit die Messeinstellungen mit denen jede Messung der neuen Messaufbauten verglichen werden soll, sind:

1, Anregungswellenlänge:	317 nm ± 20 nm
2, Emissionswellenlänge erster Messung (Donor):	620 nm ± 10 nm
3, Emissionswellenlänge zweite Messung (Akzeptor):	665 nm ± 10 nm
4, Blitzwiederholungs-Frequenz:	100 Hz
5, Flashes:	50
6, Wartezeit (lag-time):	60 µs
7, Messzeit (integration-time):	500 µs

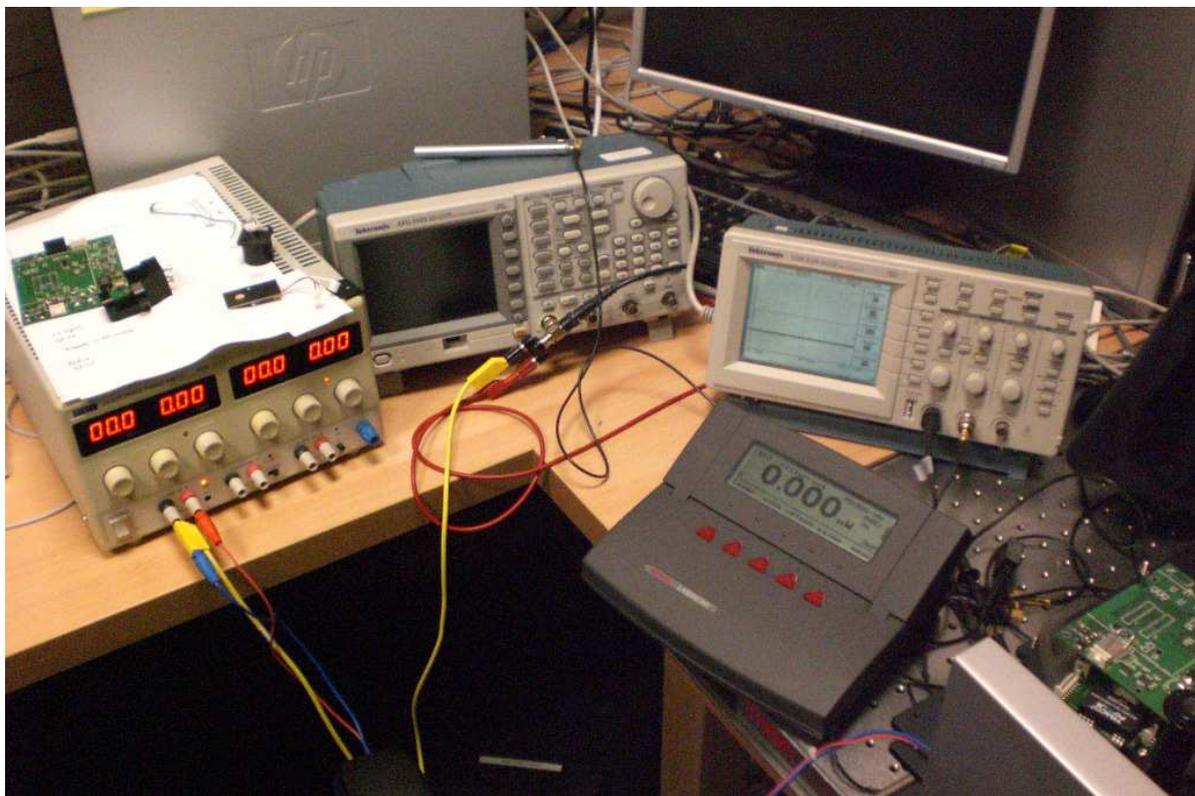
Die Regulierung der z-Position und die Verstärkung (Gain) des Photomultipliers sind zwei weitere mögliche Einstellungsoptionen, diese wurden aber meist auf Optimum eingestellt. Das heißt, das Gerät errechnet selbst den besten Wert für die Messung. Für direkte Vergleiche zwischen zwei Messungen wurden z-Position und Gain über die Option „manuell“ gleich eingestellt, dabei orientierte man sich nach dem optimalen Wertebereich um eine qualitativ aussagekräftige Messung zu bekommen.

Die nötige bzw. optimale Verstärkung der Messung ist der Indikator für die Lichtintensität mit der das Assay angeregt wird, da diese mit steigendem Signal am PMT fällt.

Der Infinite[®] M1000 war durch das direkte Messen der RCK Assays ein sehr gut geeignetes Messgerät für die Performance-Bewertung, da sofort durch Auswertung des RCK die Probleme, Schwächen und Stärken des Aufbaues offen gelegt wurden. Neben dem Infinite[®] M1000 selbst wurden auch noch andere Messgeräte (siehe Tabelle 2 und Abbildung 13) verwendet. Diese dienten vor allem für die Vorbereitung der Messungen und der Verifizierung der Optik und Anregungsquellen.

Tabelle 2: Verwendete Messmittel und deren Funktionen

Gerätebezeichnung:	Firma:	Seriennr.:	Funktion:
USB 4000 Spektrometer	Ocean Optics	1008006434	Spektrometer
AFG 3102	Tektronix	C022188	Funktionsgenerator
EX 354T Triple Power Supply	TTi - Thurlby Thandar Instruments	106885	Netzteil
TDS 210	Tektronix	B095067	Oszilloskop
MetraHit 28s TRMS- Multimeter	Gossen Metrawatt	B0402	Multimeter
OPHIR Laserstar	OPHIR	86201	Leistung- und Energiesmessgerät
→ Messkopf: PD10-SH	OPHIR	121673	Leistung- und Energiesmessgerät
→ Messkopf: PD300-UV-SH	OPHIR	117231	Leistung- und Energiesmessgerät

**Abbildung 13: von links nach rechts: Netzteil, Funktionsgenerator, Oszilloskop und das Leistungsmessgerät aus Tabelle 2**

3.1 Messung mit einer UV-LED als Anregungsquelle

Die verwendete UV-LED ist von der Firma SETi Sensor Electronic Technology, Inc. mit der Bezeichnung UVClean[®] 315 BL TO39. Diese LED emittiert Licht bei ungefähr 312 nm mit ca. 15 nm Bandbreite. Da am Beginn des Projektes auch der Hersteller noch keine genauen Betriebsgrenzen für diese UV-LED nennen konnte, da diese noch nicht offiziell am Markt war, mussten die möglichen Betriebsgrenzen erst ermittelt werden. Als Vorgabe bzw. Richtwert wurden 300 mA bei 6,5 V und einer realen Leistung von ca. 5,2 mW angegeben. Das entspricht einem äußerst niedrigen Wirkungsgrad von ca. 0,25 %. Das bedeutet, dass die LED eine sehr starke Wärmeentwicklung hat und darum musste sorgfältig und behutsam beim Ermitteln der Betriebsgrenzen vorgegangen werden. In Abbildung 14 ist die Strom-Spannungskurve der UV-LED aufgezeichnet.

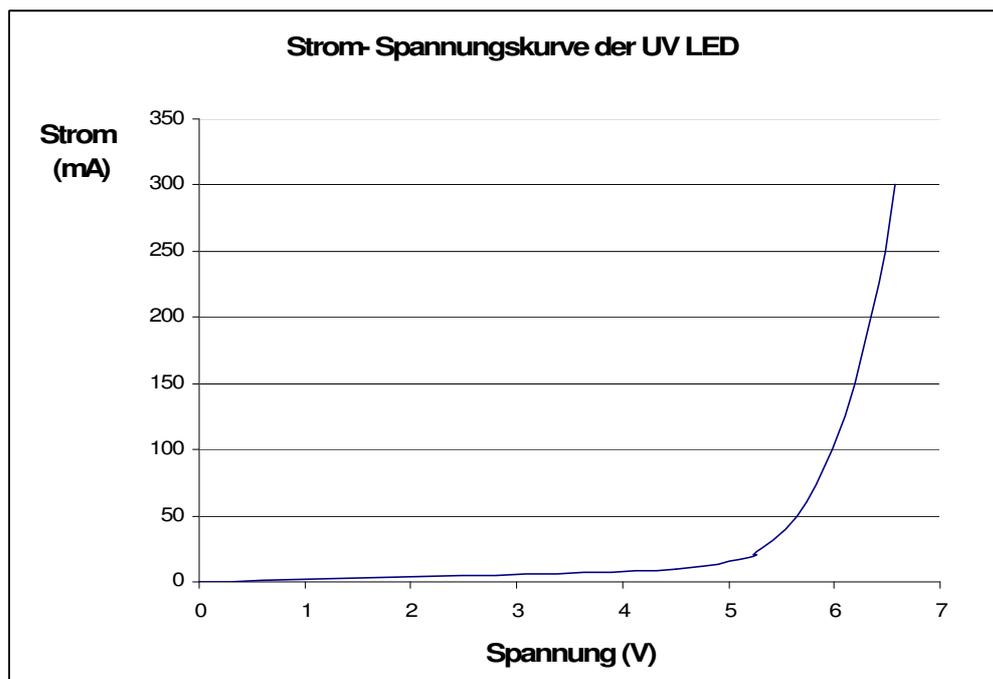


Abbildung 14: Strom- Spannungsverlauf der UV-LED

Die Grundidee bestand darin, die UV-LED gepulst zu betreiben. Da man bei der HTRF[®]-Messung ein sehr langlebiges Signal misst, wurde von einem möglichen Duty-Cycle oder auch Tastgrad von 50 % ausgegangen. Somit könnte die LED mit einer höheren Spitzenleistung betrieben werden, da sie durch die Ruhephasen weniger heiß wird. Die 50% Duty-Cycle Idee, die die Firma Tecan vorgegeben hatte, musste aber verworfen und der Duty-

Cycle stark reduziert werden, da die genaue Lebenszeit des Akzeptorsignals, welches halb so lange ist wie das Donorsignal, siehe Kapitel 2.1.1, erst während den ersten Tests geklärt wurde. Da keine genauen Daten über die Fluoreszenz-Lebensdauer des HTRF-Donors und Akzeptors am Beginn des Projektes zur Verfügung standen, wurden diese während den ersten Messungen und mit Hilfe von cisbio genau ermittelt. Da die Lebensdauer für das Signal des Akzeptors nur $600 \mu\text{s}$ ist, und alleine die Messzeit $\sim 500 \mu\text{s}$ betragen musste, waren keine langen Pulsbreiten mehr möglich. Zum Einen würde die Signalenergie des Akzeptors im Assays bei Erhöhung der Pulsdauern nicht mehr steigen, da genau soviel zerfällt wie neu angeregt wird. Dies bedeutet das, das Akzeptorsignal im Vergleich zum Donorsignal und zum LED-Lichtimpuls bei höher werdender Pulsdauer weniger bis gar nicht mehr steigt (siehe Abbildung 15), und zum anderen sinkt die Nachweisgrenze für das Akzeptorsignal, da das Donorsignal sehr bestimmend wird. Weiters ist das Akzeptorsignal das wichtigste zu messende Signal, da dieses die Information über die Bindungen beinhaltet, und auch das am schwächste Signal des Assays ist. Deshalb ist eine lange Anregung zu vermeiden. Somit musste versucht werden in möglichst kurzen Pulsbreiten viel Energie unterzubringen. Je geringer die Pulsdauer der UV-LED war, desto höher konnte die Stromversorgung gewählt werden.

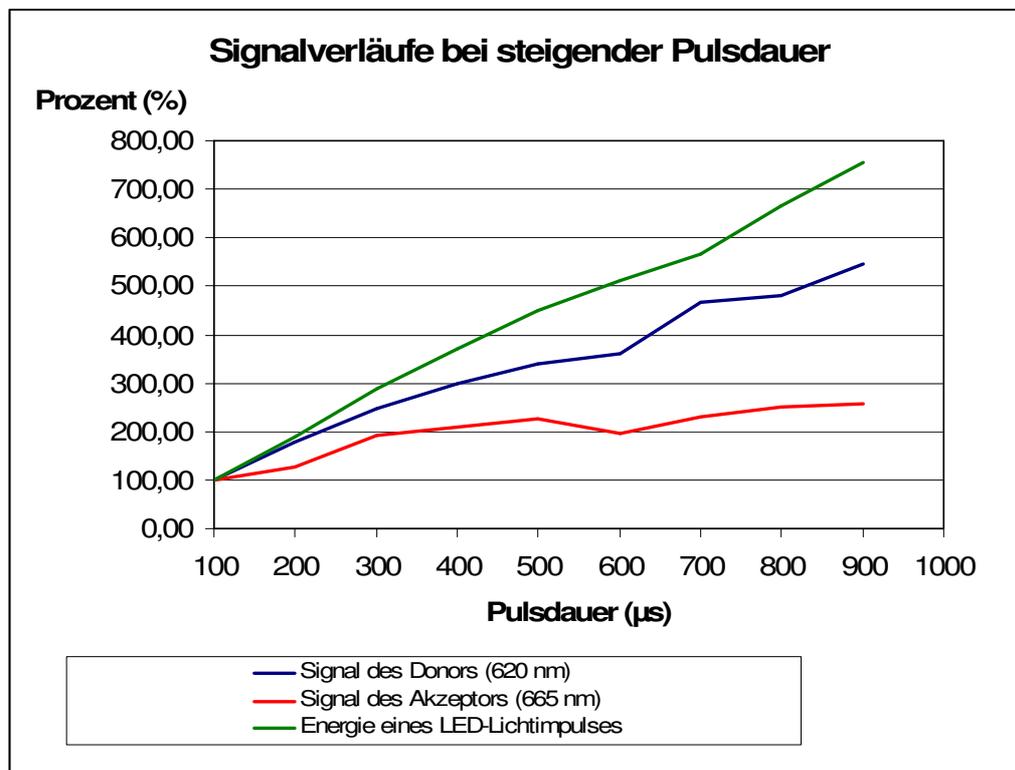


Abbildung 15: Signalverläufe bei steigender Pulsdauer

In der Abbildung 15 werden die Signalstärken bzw. Energiewerte im prozentuellen Verhältnis zur Messung bei einer Pulsdauer von 100 μs , gesetzt, um die Steigung des Signals bei höheren Pulsbreiten übersichtlich darzustellen.

Die Versorgung der UV-LED wurde weitest möglich ausgereizt um alle Möglichkeiten der UV-LED auszuschöpfen. Dies bedeutete einen angelegten Strom von bis zu 5 A an der UV-LED bei einem Duty-Cycle von 1 % und 2 %, das entspricht 100 μs bzw. 200 μs bei einer Blitzwiederholungsfrequenz von 100 Hz.

3.1.1 Elektronik/Firmware der UV-LED

Für die Ansteuerung der UV-LED musste eine Platine gefertigt werden. Dabei wurden zuerst drei Konstantstromquellenvarianten getestet, um die Einschalt- und Ausschaltzeiten zu vergleichen siehe Abbildung 16. Mit dieser Schaltung ist es möglich mittels externer Signaleinspeisung mittels TTL (Transistor-Transistor-Logik) drei verschiedene Stromquellenvarianten zu testen. Dieser Aufbau wurde am Beginn der Schaltungsplanung durchgeführt und daher nicht mit der schlussendlich, benutzten Stromversorgung. Trotzdem wurde die ausgewählte Variante auch für die benutzte Stromversorgung verwendet und modifiziert. Die beiden FETs am Eingang dienen zum einen als Inverter und zum anderen als zu- und wegschalten der Steuerspannung für die Stromquelle.

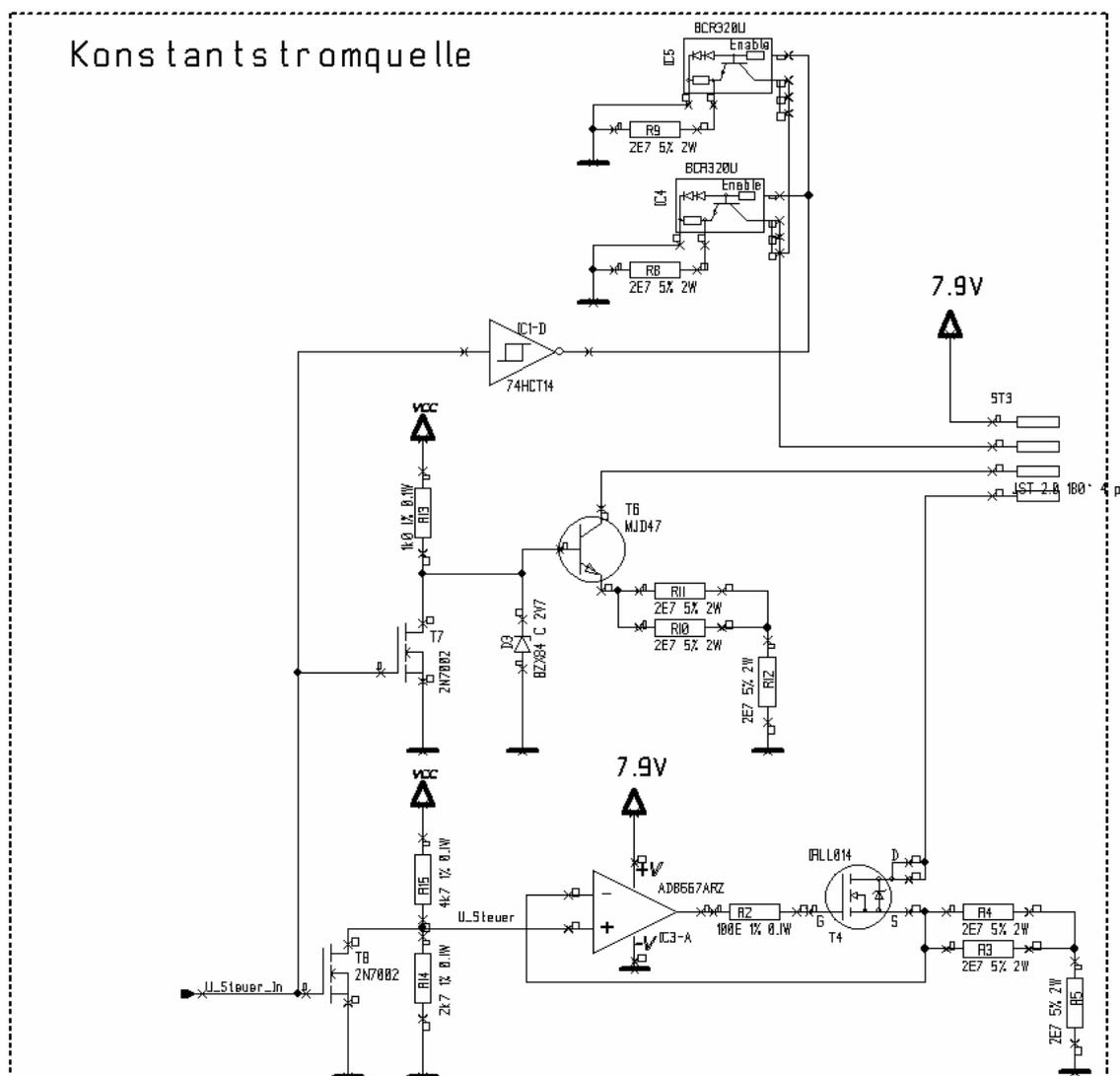


Abbildung 16: Schaltplan zum Testen der verschiedenen Stromquellen

- 1, Ein BCR320 Chip als fertigen Treiber mit integrierten Schaltkreis (IC)
- 2, Ein Transistor mit vorgeschalteter Z-Diode
- 3, Ein Operationsverstärker mit FET

Es wurde die dritte Variante gewählt, da diese schnelle Ein- und Ausschaltzeiten erreichte und zur weiteren Implementierung in das bestehende Gerät, und in eine zukünftige mögliche Integration, sich am besten eignete. Da mit einem Operationsverstärker die Schwankungen der Basis- Emitter- Spannung keinen Einfluss haben, ist die Schaltung mit dem Operationsverstärker zu bevorzugen. Zusätzlich hat der FET gegen den Transistor den Vorteil, dass die Schaltung (3) unabhängiger gegen Bauteiltoleranzen ist als die Schaltung (2) mit einem Transistor. [13] Der BCR320 LED Driver von der Firma Infineon schaffte die geforderte Stromstärke nicht, da diese während der LED-Tests immer höher wurde, wurde diese Möglichkeit schnell verworfen.

In Abbildung 17 sind das Triggersignal und die Ein- und Ausschaltzeiten der ausgewählten Operationsverstärkerschaltung mit einem Oszilloskop aufgenommen, dargestellt.

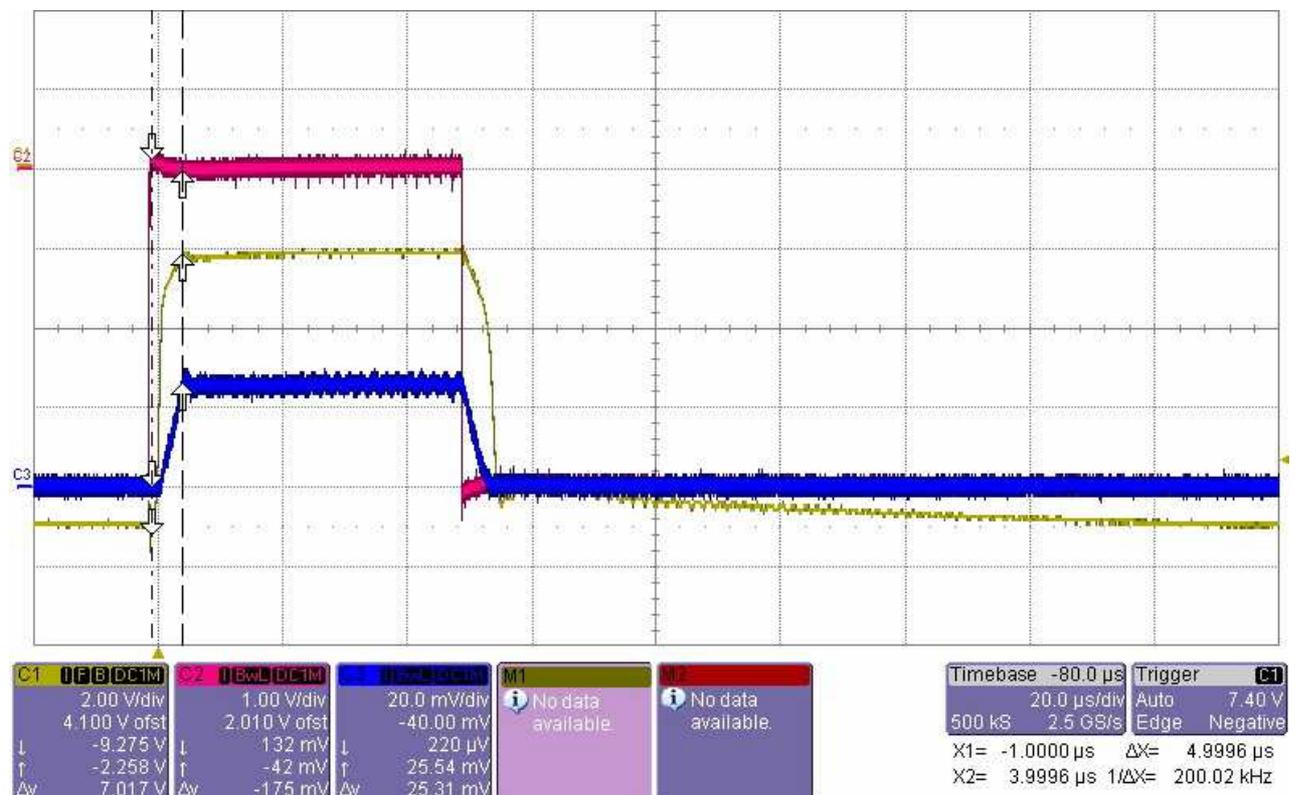


Abbildung 17: Ein- und Ausschaltverhalten der Elektronik und UV-LED bei der ausgewählten Operationsverstärkerschaltung

In Abbildung 18 ist das Einschaltverhalten noch etwas genauer dargestellt, da die Zeitachse auf $1 \mu\text{s}$ pro Kästchen definiert ist.

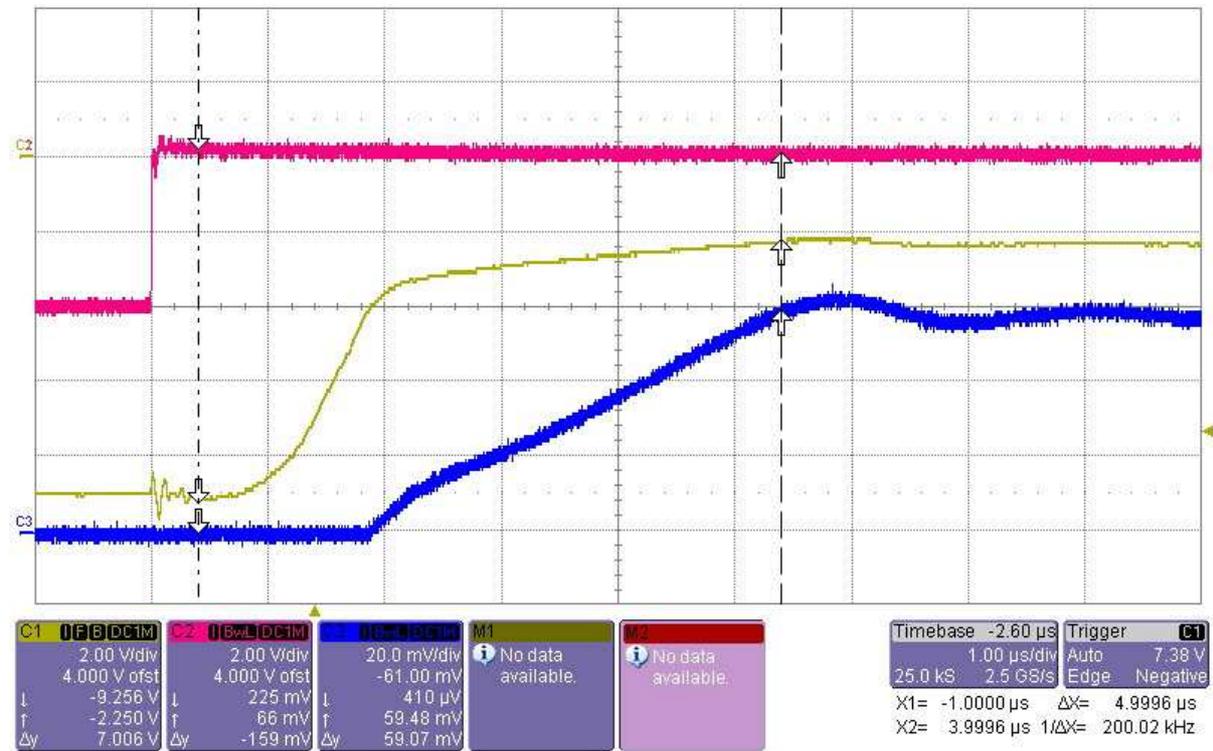


Abbildung 18: Einschaltverhalten der Elektronik und UV-LED bei der ausgewählten Operationsverstärkerschaltung

Die rote Linie ist das Triggersignal, die gelbe Linie ist die Spannung die über die UV-LED abfällt und die blaue Linie ist das Lichtsignal der UV-LED, das mit einem einfachen Photodiodenaufbau gemessen wurde. Man erkennt in Abbildung 17, dass die Ein- und Ausschaltzeit der Spannung ungefähr $5 \mu\text{s}$ und das Licht der UV-LED ca. $3 \mu\text{s}$ beträgt. In Abbildung 18 erkennt man die Verzögerung zwischen dem angelegten Triggerimpuls und dem leuchten der UV-LED von ungefähr $2 \mu\text{s}$.

Um die Versorgungsspannung zu erzeugen wurde ein „TPS5430 high- output- current PWM converter“ von Texas Instruments verwendet da dieser 3 A kontinuierlichen Ausgangsstrom besitzt und damit hohe Spannungen verwirklicht. Die Schaltung für die Spannungsversorgung ist in Abbildung 19 abgebildet. Damit werden die von der UV-LED benötigten 8 V bei 5 A einwandfrei bereitgestellt werden. Dabei wurde die Versorgungsspannung auf 14,6 V erhöht.

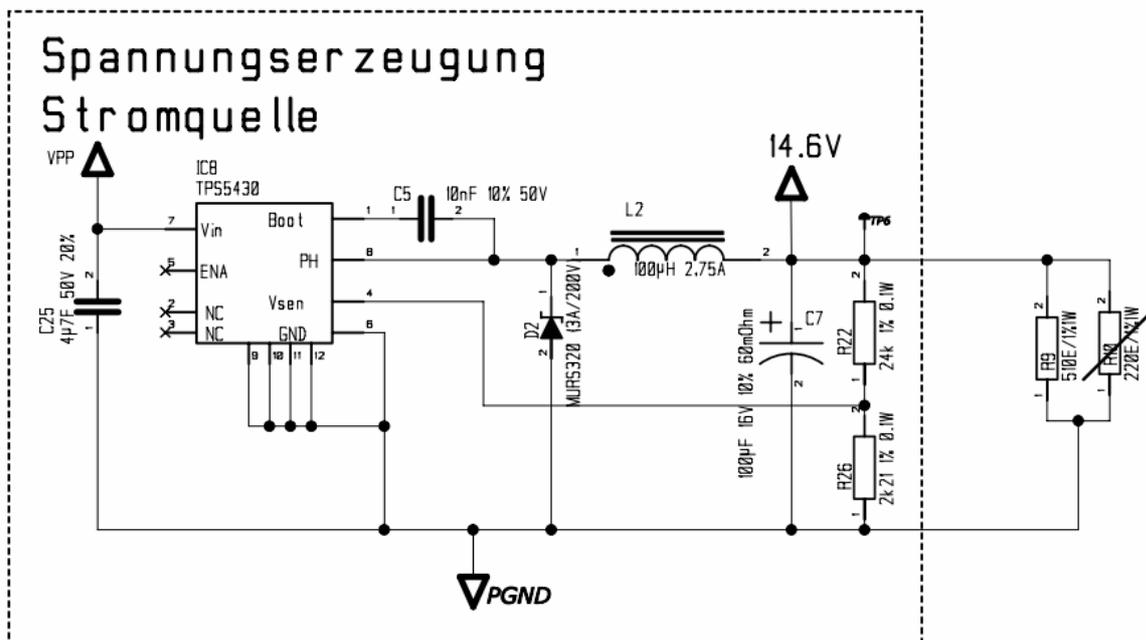


Abbildung 19: Schaltplan der Spannungsversorgung für 14,6 V Versorgungsspannung

Der Widerstand R_9 dient als permanente Belastung des Schaltkreises zur Leistungsaufnahme, damit der Schaltregler IC_8 nicht von keiner Belastung auf 3 A schalten muss. Somit wurde ein besseres Einschaltverhalten erreicht. Aufgrund der vorgegebenen Versorgungsspannung ergeben sich die anderen Bauteilwerte. Die Formeln dafür sind im TPS5430 Pulsweitenmodulation Konverter Datenblatt im Anhang zu entnehmen.

Der Widerstand R_{10} wurde nicht bestückt und wurde deshalb im Schaltplan durchgestrichen. Zusätzlich musste das Triggersignal von der Mainplatine des Infinite[®] M1000 übernommen werden, damit die Messzeitpunkte der Detektion mit der UV-LED Einschaltzeit abgestimmt werden konnte. Dabei musste die Pulsbreite variabel gestaltet werden um verschiedenen Pulsbreiten für die UV-LED testen zu können. Dies wurde mit einem Potentiometer verwirklicht. Auch der Strom der an der UV-LED anliegt sollte mit Widerständen veränderbar sein. Damit ergab sich der Schaltplan aus Abbildung 20, der aus der Verwertung des einkommenden Triggersignals und dem Potentiometer am Beginn sowie mit der Konstantstromquelle mit Operationsverstärker und FET kurz vor der UV-LED besteht.

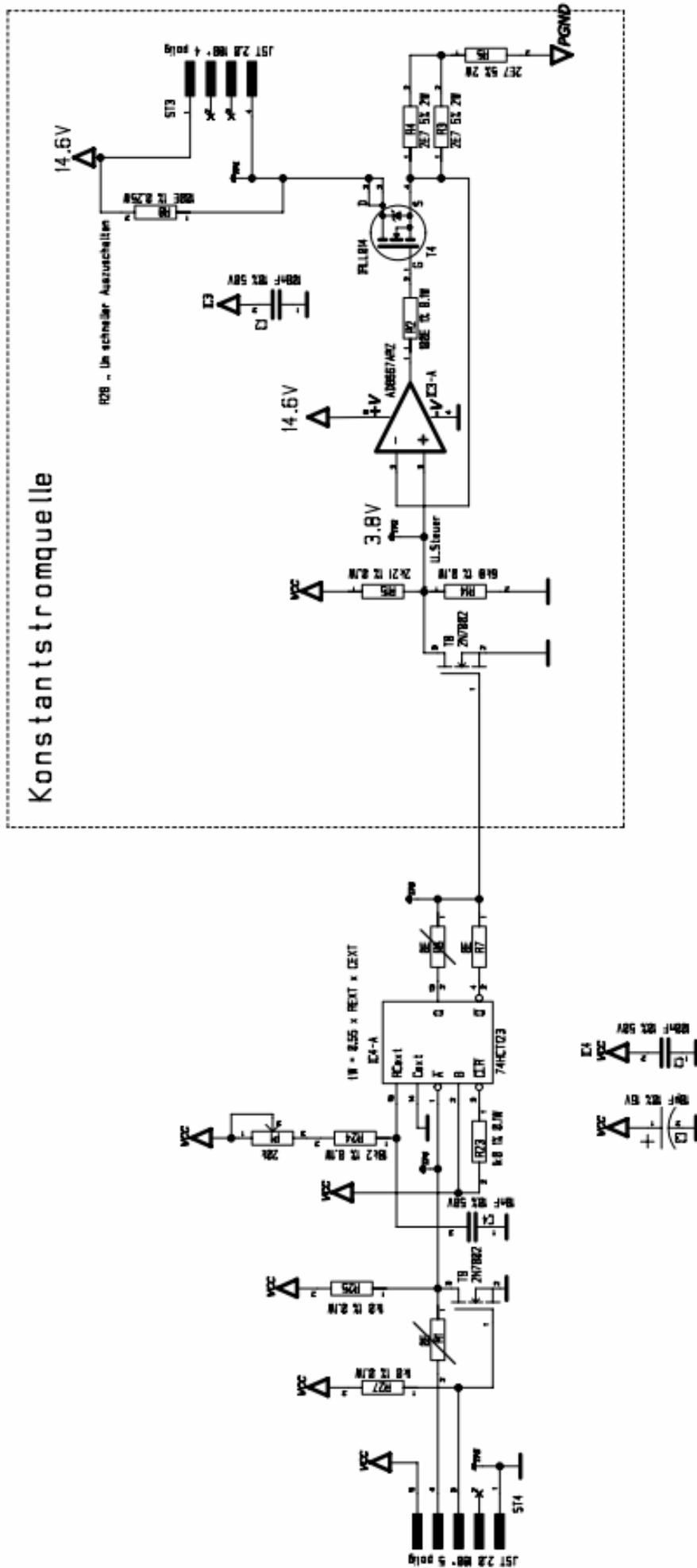


Abbildung 20: Schaltplan der Platine, die für die UV LED Ansteuerung verwendet wurde

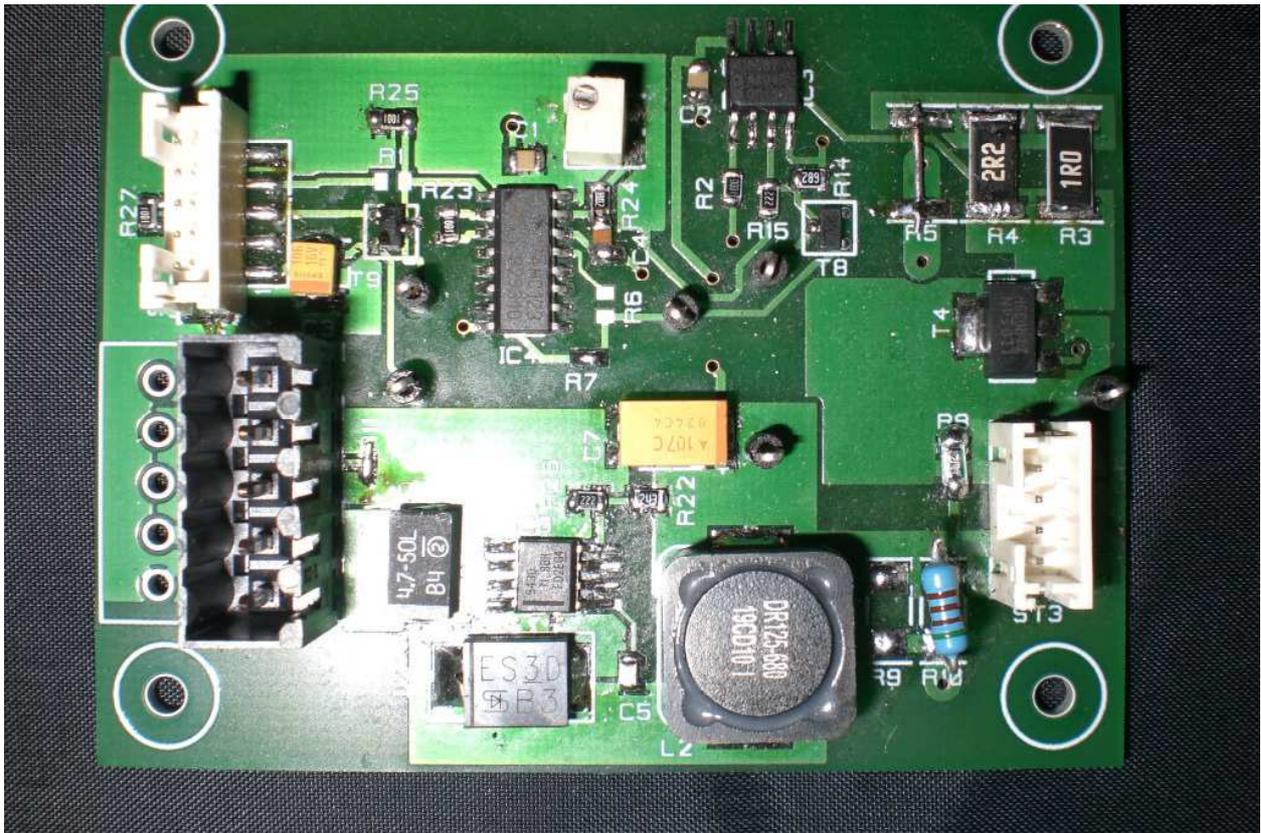


Abbildung 21: Foto der Platine, die für die UV-LED Ansteuerung verwendet wurde

Zum Schaltplan:

Über die Widerstände R_3 , R_4 und R_5 kann der Strom nach Formel 9 an der UV-LED geändert werden. Dabei wird über R_{13} und R_{14} die über die Widerstände R_3 , R_4 und R_5 anliegende Spannung laut Formel 8, eingestellt.

$$V_{\text{ein}} = V_{\text{cc}} * R_{14} / R_{14} + R_{13} \quad (8)$$

$$I_{\text{LED}} = V_{\text{ein}} / ((R_4 * R_3 / R_4 + R_3) + R_5) \quad (9)$$

V_{ein} ... Spannung die am positiven Eingang am Operationsverstärker anliegt

V_{cc} ... Versorgungsspannung

I_{LED} ... Strom an der LED

Das Potentiometer ist in Abbildung 20 mit der Bezeichnung P_1 markiert. Vor dem Potentiometer ist auch noch ein fixer Widerstand R_{24} eingebaut um eine Mindestpulsbreite bereitzustellen, zum einen weil es nicht nötig ist, unter diese geringe Pulsbreite von ca. $40 \mu\text{s}$ zu gehen und zum anderen als Schutz vor unbeabsichtigtem minimieren des

Widerstandswertes des Potentiometers. Dabei ergibt sich die Pulsbreite, wie in Formel 10 dargestellt, aus einer vom Potentiometer vorgegebenen Konstanten k aus Datenblatt (des 74HC123 ICs siehe Anhang), dem Widerstand des Potentiometer R_{ext} , plus dem fixen Widerstand R_{24} und der Kapazität C_{ext} .

$$T_w = k * (R_{\text{ext}} + R_{24}) * C_{\text{ext}} \quad (10)$$

T_w ... Pulsbreite des Triggersignals

k ... Konstante von V_{cc} abhängig

Auch auf das Triggersignal musste aufgepasst werden, damit der Triggerimpuls richtig an der UV-LED anliegt, und nicht invertiert. Ansonsten würde auch hier eine Gefahr des Überhitzens der UV-LED bestehen. Der 74HC123 (Dual retriggerable monostable multivibrator with reset) HCT-CMOS der Firma NXP Semiconductors hat einen normalen und einen invertierten Ausgang zum Umschalten, falls das Triggersignal durch einen Beschaltungsfehler invertiert an der UV-LED ankommen würde.

Der Parallelwiderstand R_8 zur UV-LED soll dafür sorgen, dass beim Ausschalten des Pulses die Spannung schneller abgebaut wird, da bei ausgeschalteten FET T_4 sich die Senke (Drain) auf einen „floatenden“ (unbestimmten) Pegel befindet, weil dieser Punkt sehr hochohmig ist. Das Datenblatt zum IC ist im Anhang zu finden.

In Abbildung 21 ist die angefertigte Platine zu sehen. Die Platine wurde mit verschiedenen Messpunkten ausgestattet, um das Signal überprüfen und die Fehlersuche beschleunigen zu können. Die Widerstände R_3 , R_4 und R_5 wurden größer ausgeführt, um sie leichter umlöten zu können, da diese den an der UV-LED anliegenden Strom bestimmen und dieser mit der eingestellten Pulsdauer zu ändern war. Das Potentiometer ist mit einem Drehknopf zur Widerstandsänderung und damit Pulsdaueränderung ausgestattet. Daher musste die genaue Pulsdauer mit Hilfe eines Oszilloskops eingestellt werden, da dieses die Pulsdauer am Messpunkt nach dem CMOS darstellen konnte, ohne die UV-LED betreiben zu müssen.

Die gerätespezifische Software also auch Firmware genannt musste kaum verändert werden, da der bereits vorhandene Messmodus verwendet werden konnte. Bei der Freistrahloptik musste die Positionierung geändert werden, da ansonsten das Licht der UV-LED mittels Freistrahloptik auf eine andere Position auf der Probe als mit der ursprünglichen eingestellten

Quarzfaseroptik einstrahlen würde. Für verschiedene Frequenztests musste die Firmware auch leicht angepasst werden, da standardmäßig nur 100 Hz und 400 Hz einzustellen sind.

Die Befehle für die Änderungen in der Firmware werden nicht explizit angeführt, da diese zu spezifisch sind.

Um die UV-LED umfangreich hinsichtlich der Frage zu testen, ob diese die aktuelle HTRF[®]-Performance des Infinite[®] M1000 Gerätes verbessert, wurden zwei unterschiedliche Messaufbauten realisiert. Dabei unterscheidet sich vor allem der Optikaufbau, aber auch die genauen Messeinstellungen für beide Messaufbauten werden darin behandelt, da diese jeweils leicht angepasst wurden.

3.1.2 Messung mit einer Lichtfaseroptik

Die verwendete UVClean[®] 315 BL TO39 LED besitzt bereits eine Balllinse zur Fokussierung der Lichtstrahlen, die vom Chip in alle Richtungen einer Halbkugel strahlen. Durch die Balllinse ergibt sich der in Abbildung 22 gezeigte Strahlenverlauf für die LED. Der experimentell ermittelte Fokus liegt in 16 mm Abstand von der LED und stimmt mit den Angaben der Firma SETi überein. Die Intensitätsverteilung wird in Abbildung 23 gezeigt, dabei ist die zentrale, fokussierte Abstrahlung nach vorne deutlich erkennbar.

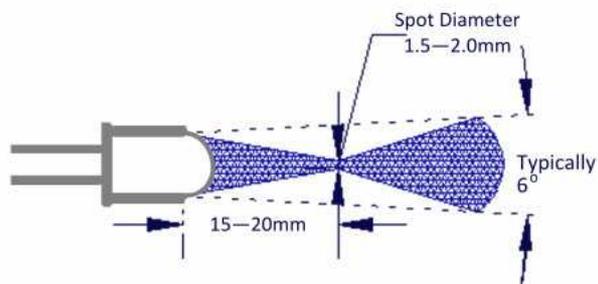


Abbildung 22: Strahlencharakteristik der UV-LED mit Balllinse [14]

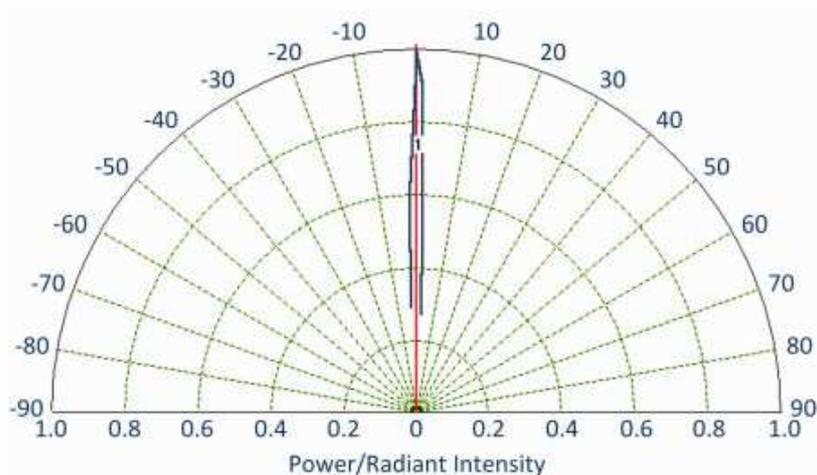


Abbildung 23: Abstrahlwinkel der UV-LED mit Balllinse [14]

Da die UV-LED mit Balllinse bereits eine sehr gute Fokussierung besitzt und auch der Einstrahlwinkel für die Einkopplung in eine Quarzfasern passend ist, wurden keine zusätzlichen Linsen benötigt. „Die numerische Apertur (NA) beschreibt das Vermögen eines

optischen Elements, Licht zu fokussieren“ [15], und ist bei der verwendeten Quarzfasern mit 0,22 angegeben. Daher ergibt sich aus den Formeln 11 und 12 ein Winkel von $12,7^\circ$, der nicht überschritten werden darf, um eine optimale Einkopplung zu gewährleisten. [16] Mit der Formel 13 wurde der Winkel der LED berechnet. Dafür wurden die Variablen r und L über mehrere Messpunkte experimentell, mittels visueller Hilfsmittel (z.B. Millimeterpapier), ermittelt. Der daraus errechnete Winkel betrug ca. 9° .

$$NA = n \cdot \sin(\Phi) \quad (11)$$

$$\Phi = \sin^{-1}(NA / n) \quad (12)$$

$$\Phi = \tan^{-1}(r / L) \quad (13)$$

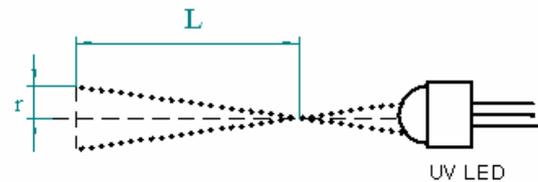
NA... Numerische Apertur

n ... Brechungsindex (Luft wird als 1 angenommen)

Φ ... Einstrahlwinkel

r ... Radius des Bildfleckes

L ... Abstand vom Fokus zum Bild



Der schematische Aufbau der Lichtfaseroptik ist in Abbildung 24 dargestellt. Da dies ein rein schematischer Aufbau ist, stimmen die Maßstäbe nicht exakt überein. Die dick gezeichneten Linien beschreiben jene Elemente, die neu in den bereits vorhandenen Messaufbau integriert wurden. Die punktierten Linien symbolisieren den Weg des Lichts von der UV-LED zur Probe. Da diese Arbeit sich nur mit den Änderungen des Messaufbaues befasst, wird auch nur auf diese Elemente genauer eingegangen. Es musste darauf geachtet werden, dass alle verwendeten Komponenten für UV-Licht geeignet sind. Das bedeutet, die verwendeten Linsen, Filter und Lichtfasern mussten aus Quarz anstatt aus Glas sein. Da dies bereits im bestehenden Gerät der Fall war, musste keine der bestehenden Optikkomponenten ersetzt werden. Wie aus der Abbildung 24 ersichtlich ist, wurde nur die UV-LED und ein zusätzlicher Filter für den geänderten Optikaufbau benötigt. Das Filter dient zur zusätzlichen Hintergrundblockung, die mit der LED alleine zu niedrig wäre, da die LED auch schwache Lichtanteile in höheren Wellenlängen emittierte. Da die Emissionsmessung erst bei 620 nm und 665 nm vorgenommen wird, konnte ein sehr breitbandiges Filter verwendet werden. In Abbildung 25 ist das Transmissionspektrum des verwendeten 335 ± 60 nm Filter dargestellt. Die verwendeten Filter waren von der Firma Newport und aus der Corion Stabilife® Serie.

Die UV-LED wurde so positioniert, dass die Fasereinkopplung direkt nach dem Fokus vonstatten ging, da dort der Brennfleck klein genug war. Die Einkopplungsfläche der Faser war rechteckig und betrug ca. 2,5 x 4 mm. Der Lichtfleckdurchmesser im Fokus der UV-LED war zwischen 1,5 und 2 mm. Die Positionierung wurde mit Versuchen optimiert, bei denen die am Ausgang der Quarzfaser ankommende Lichtenergie mit einem OPHIR Energiemessgerät gemessen wurde. Der Abstand der UV-LED zur Quarzfaser betrug bei optimaler Lichteinkopplung ungefähr 18 mm.

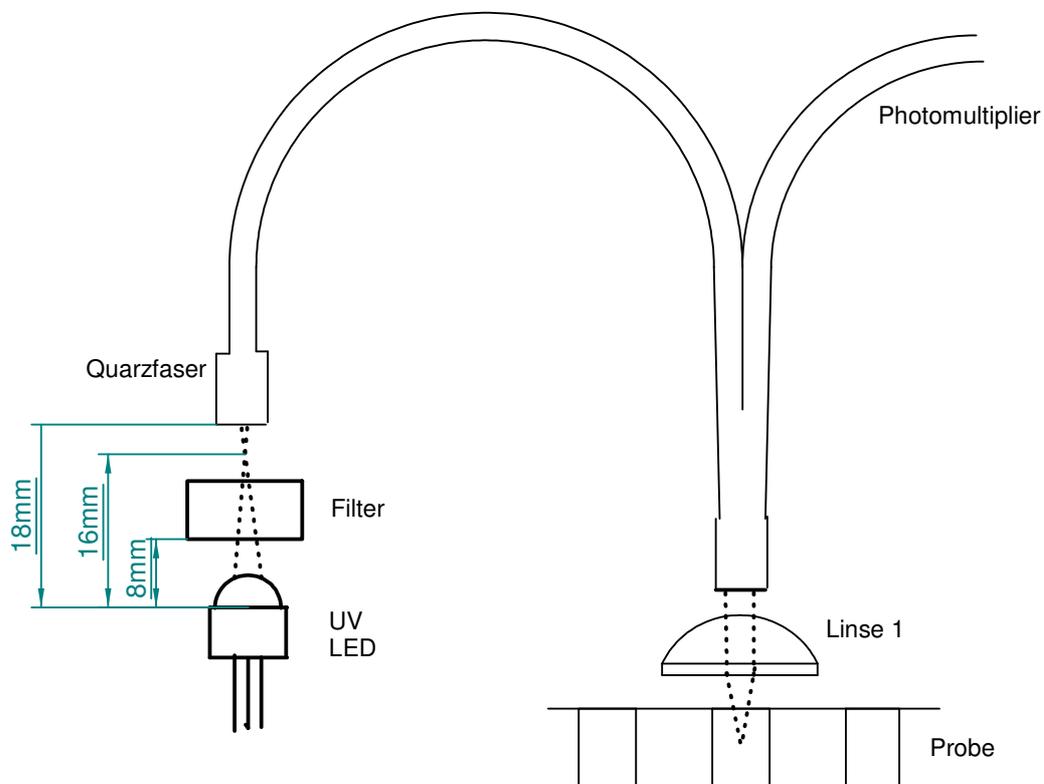


Abbildung 24: Schematische Darstellung des Lichtfaseroptikaufbaus

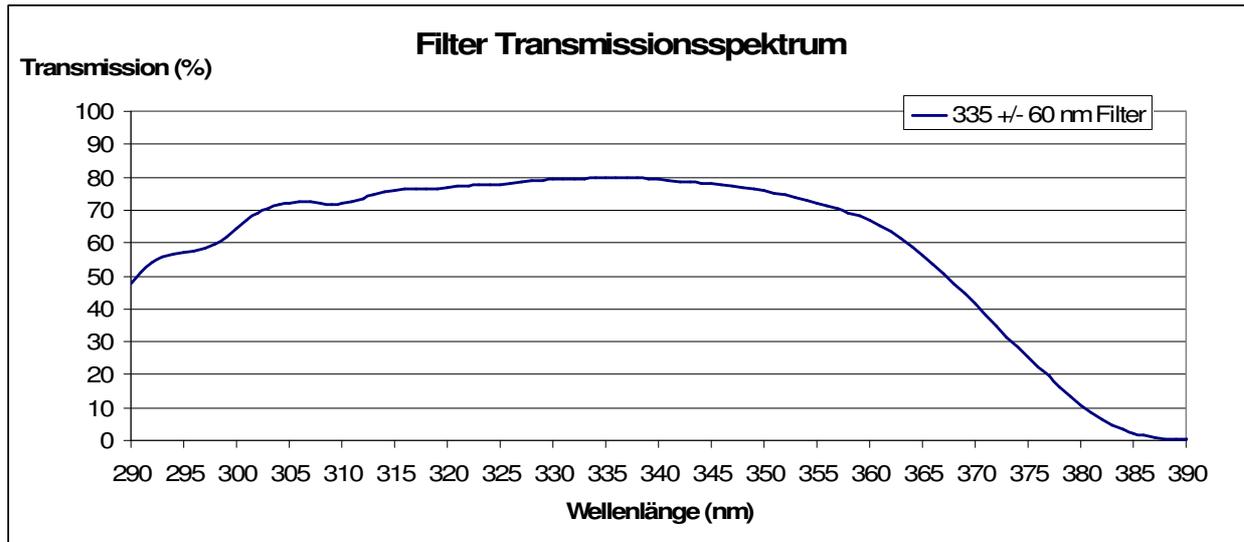


Abbildung 25: Transmissionsspektrum des verwendeten 335 ± 60 nm Filter

Der Nachteil bei dieser Methode ist die benötigte Y- Faser, da diese zwei geteilt sein muss, um Anregungs- und Emissionslicht transportieren zu können. So ergibt sich ein Verlust von ca. 50% an Lichtleistung. Vorteilhaft ist der einfache Aufbau, sodass sich die Faser leicht integrieren und einbauen lässt, wie in Abbildung 26 zu sehen ist. Dabei sieht man das provisorische Modul zum Testen, mit einem großen Kühlkörper gegen die Überhitzung und zur mechanischen Stabilisation der UV-LED. Die UV-LED ist ganz im Modul integriert und mögliche kleine Öffnungen wurden mit schwarzem Isolierband verklebt um kein störendes Hintergrundlicht in den Messaufbau zu bekommen. Aus demselben Grund wurde bei allen Messungen das Gerät mit einem schwarzen Tuch überdeckt und das Raumlicht gedimmt.

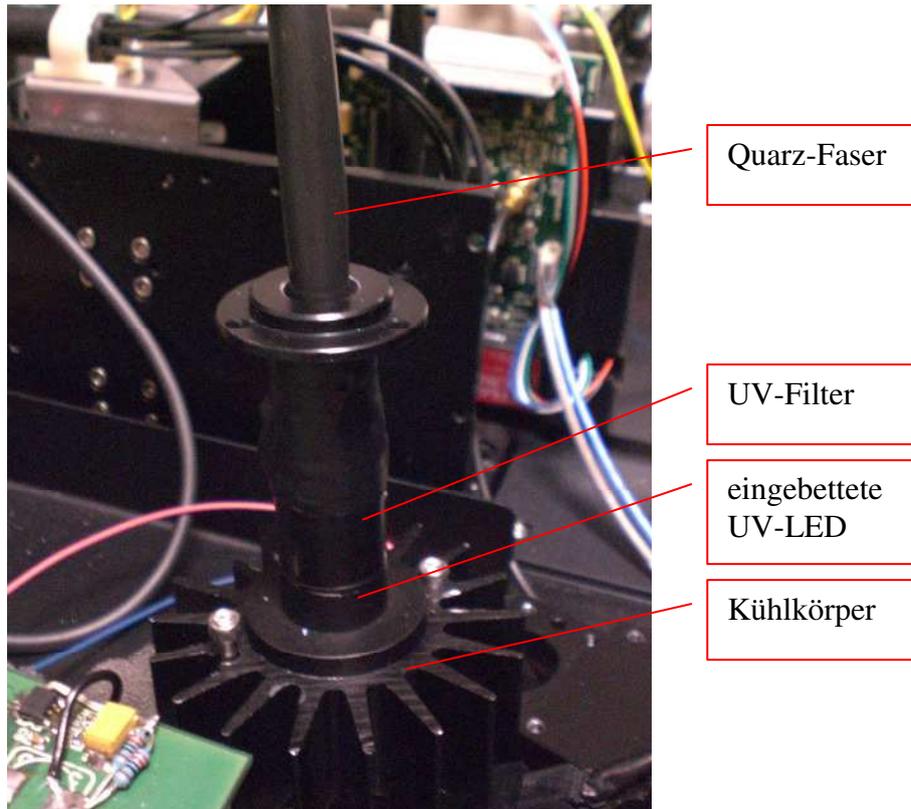


Abbildung 26: Provisorisches Messmodul für die Messung mit Lichtfaseroptik

Die Messeinstellungen der HTRF[®]-Messung mit der UV-LED mit Lichtfaseroptik änderten sich vor allem durch die Anpassung der lag-time, da dort die Pulsdauer mit einberechnet wird. Die Anregungswellenlänge wurde nun von der LED bestimmt und nicht mehr durch einen Monochromator eingestellt.

Die weiteren Parameter wurden belassen, da diese für die Messung gut passten und auch ein guter Vergleich zur ursprünglichen HTRF[®]-Performance möglich war. Dadurch ergaben sich folgende Messeinstellungen:

1, Anregungswellenlänge: (über UV-LED und Filter vorgegeben)	312 nm ± 15 nm
2, Emissionswellenlänge erster Messung (Donor):	620 nm ± 10 nm
3, Emissionswellenlänge erster Messung (Akzeptor):	665 nm ± 10 nm
4, Blitzwiederholungs-Frequenz:	100 Hz
5, Flashes:	50
6, Wartezeit (lag-time):	$T_w + 60 \mu\text{s}$
7, Messzeit (integration-time):	500 μs
T_w ... Pulsdauer	

3.1.3 Messung mit einer Freistrahloptik

Bei der Messung mit einer Freistrahloptik wurde dieselbe UV-LED benutzt, für die Fokussierung und den Abstrahlwinkel gelten dieselben Eigenschaften wie in Kapitel 3.1.1. Der optische Aufbau der Freistrahloptik ist etwas komplexer. Zusätzlich zum Filter wird eine Linse benötigt, die den Lichtstrahl annähernd parallelisiert und den Lichtpunkt am dichroitischen Spiegel klein hält. Zusätzlich musste auch ein geeigneter dichroitischer Spiegel gefunden werden, welcher das Anregungslicht im UV Bereich reflektiert und das emittierte Licht von 620 nm und 665 nm durchlässt. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 27 zu sehen, dabei sind die dick gekennzeichneten Komponenten wieder die neu in den bereits vorhandenen Messmodus (Fluoreszenz Polarisation Messung) eingebauten Veränderungen. Die punktierten Linien zeigen wieder den Weg des Lichts von der UV-LED zur Probe und die strichlierte Linie zeigt schematisch den Weg des emittierten Lichtes der Probe zum Detektor.

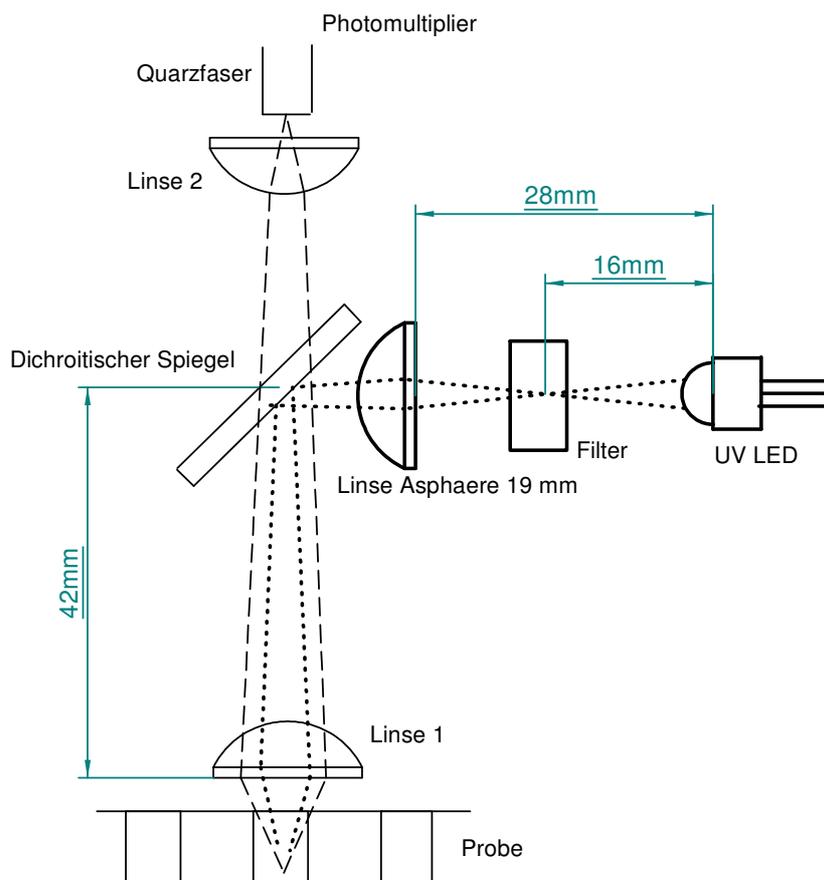


Abbildung 27: Schematische Darstellung des Messaufbaues mit Freistrahloptik

Das verwendete Filter ist das gleiche wie im lichtfaseroptischen Aufbau. Sein Transmissionsspektrum ist in Abbildung 25 bereits dargestellt. Als Linse wurde eine asphärische Linse mit einem Durchmesser von 19 mm und einer Dicke von 7 mm aus „fused silica“, eine Art Quarzglas, von der Firma Tafelmaier verwendet. Bei dieser Linse handelt es sich um eine in Geräten und für Testzwecke oft verwendete Linse. Darum ist diese Linse in der FRED Optical Engineering Software von der Firma Photon Engineering, die von der Firma Tecan oft für optische Simulationen benutzt wird, bereits vorhanden. Dies ist ein großer Vorteil im Vergleich zu anderen Linsen die nicht in der Software abgespeichert sind, wie zum Beispiel die verwendete Kondensorlinse beim Blitzlampenmodulaufbau, da damit die Brennweiten und somit der Abstand mit dem die asphärische Linse einzubauen war direkt aus dem Programm entnommen werden konnte und nicht extra berechnet werden musste. Somit konnte die für den freistrahloptischen Aufbau ausgewählte Linse mittels der FRED Optical Engineering Software mit einer UV Lichteinstrahlung, die der UV-LED nachempfunden ist, simuliert werden.

„FRED ist eine virtuelle 3D CAD- Umgebung in der die Anwender optische Systeme für Anwendungen wie Beleuchtung, Faser- Kopplungs- Berechnungen, Geist- und Streulicht-Simulation und weiteres vor der Fertigung simulieren und optimieren können.“ [17] Mit Hilfe dieser Software konnte die Linse so angeordnet werden, dass ein passender Lichtstrahl zur Probe gelangt. Die Bedingungen für die Anordnung waren zum einen soviel Licht wie möglich mit der ersten asphärischen Linse einzufangen und so zu Bündeln, dass der Brennpunkt am dichroitischen Spiegel ca. 2 mm war. Da die Einstrahlung nicht ganz parallel sein sollte um wieder einen breiteren Brennpunkt von ungefähr 4 mm an der Linse 1, die schon fix im Modul im Abstand von 42 mm zum Spiegel eingebaut war, zu erreichen. Damit wurde eine gute Fokussierung in die Probe ermöglicht. In Abbildung 28 sieht man einen Screenshot des Zeichnungsfensters aus der FRED Optical Engineering Software. Durch die Simulation ergab sich ein Abstand der Linse zur UV-LED von ca. 28 mm. Dieser Abstand wurde durch Versuche überprüft und optimiert. Dabei wurde die am Assay ankommende Lichtenergie der UV-LED optimiert, die mit einem OPHIR Leistungs- und Energiemesswerkzeug gemessen wurde.

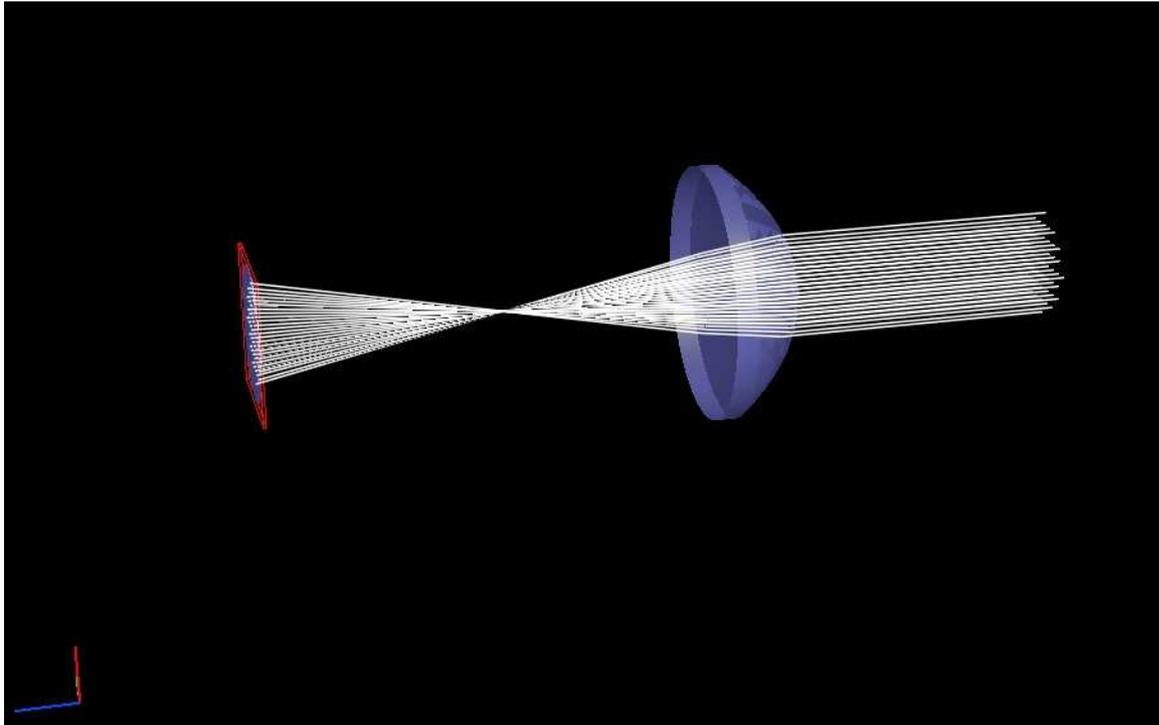


Abbildung 28: Ein Ausschnitt aus der FRED Optical Software mit der der Linsenabstand ermittelt wurde

Um einen geeigneten dichroitischen Spiegel zu finden, wurden die Transmissionsspektren der vorhandenen dichroitischen Spiegel durchsucht, um einen zu finden, der bei kurzen Wellenlängen bis mindestens 400 nm reflektiert und bei langen Wellenlängen ab ca. 500 nm das Licht durchlässt. Diese Bedingungen wurden von einem dichroitischen Spiegel im bereits vorhandenen Modul perfekt erfüllt, siehe Abbildung 29. Bei dem verwendeten dichroitischen Spiegel liegt die Grenzwellenlänge bei ungefähr 500 nm, was für die HTRF[®]-Messungen der optimalen Mitte zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge entspricht.

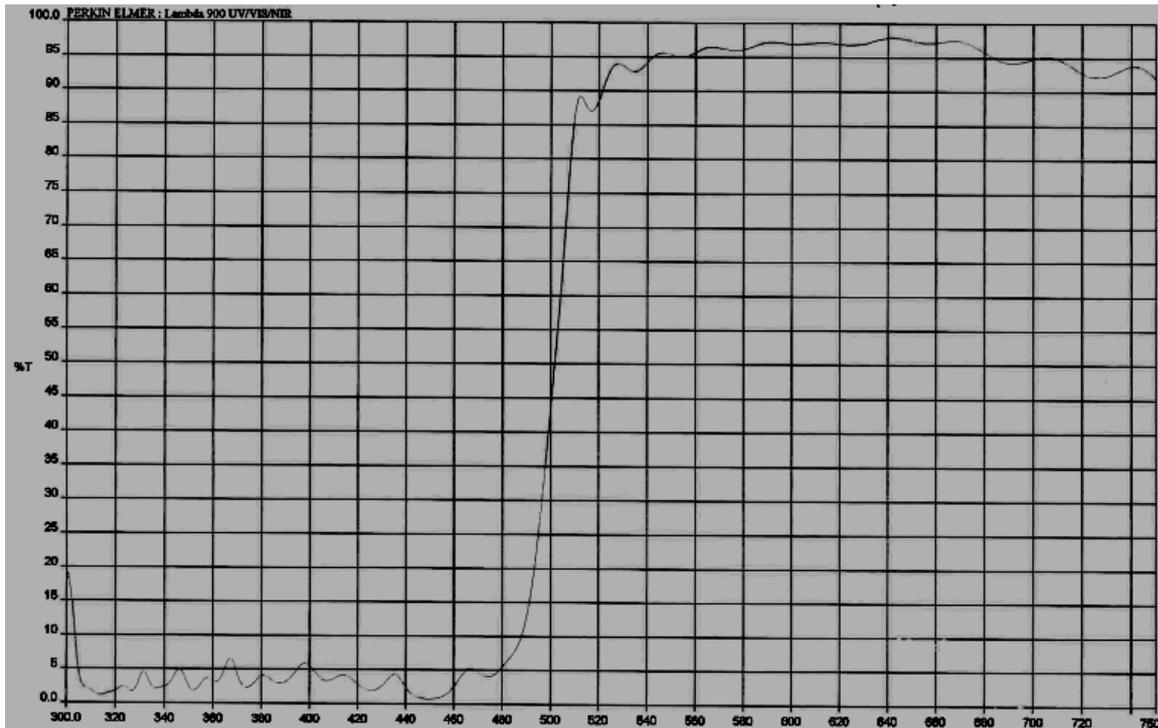


Abbildung 29: Transmissionsspektrum des dichroitischen Spiegels [18]

In Abbildung 30 sind die einzelnen Bauteile des Moduls zu erkennen. Man sieht, dass dabei nur eine Position von den vier möglichen im Modul umgebaut wurde, nämlich die mit dem passenden dichroitischen Spiegel. In Bauteil 1 ist die UV-LED eingebaut. Zusätzlich sind auch wieder Kühlkörper am hinteren Ende der UV-LED angebracht. Anstatt des Filters, wie bei den restlichen drei Positionen, wurde die asphärische Linse in die Ausgangsöffnung eingebaut. Der Bauteil 2, der bewegliche Teil des Moduls, wurde auch modifiziert. In den Schlitten, der zwischen LED und Linse des Bauteils 1 passt, wurde das 335 ± 60 nm Filter eingebaut. Die Beweglichkeit des Moduls war nicht nötig, da nur eine Position genutzt wurde. Bauteil 3 besteht aus den dichroitischen Spiegeln von denen nur der passende benutzt wurde. Dieses Bauteil wurde so belassen und wurde an Bauteil 1 angeschraubt. Danach wurden die verbundenen Bauteile 1 und 3 in Bauteil 2 über mit Kugeln geführten Führungen hineingeschoben. Die Positionierung des Bauteils 2 erfolgte manuell.

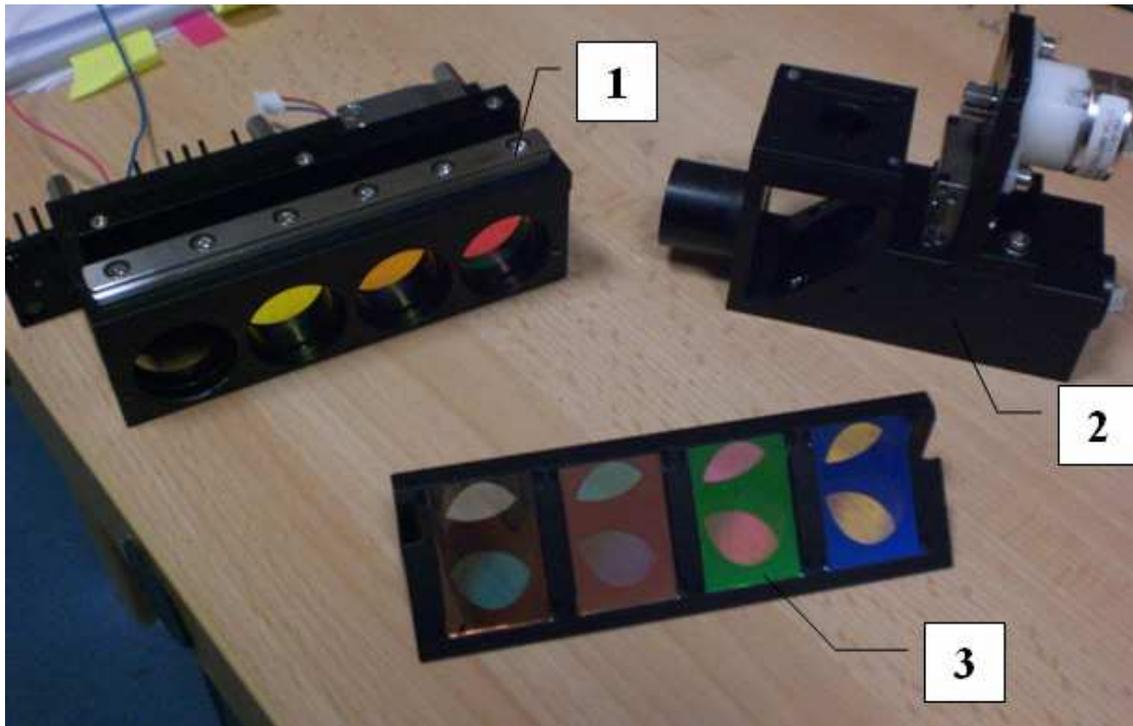


Abbildung 30: Die drei Bauteile für den Messaufbau des Freistrahloptikmoduls

Die Messeinstellungen der HTRF[®]-Messung mit der UV-LED mit Freistrahloptik wurden im Vergleich zu denen der Lichtfaseroptik kaum verändert. Die lag-time konnte aufgrund des zusätzlichen dichroitischen Spiegels um 10 μs gesenkt werden. Auch eine 400 Hz Messung war möglich, da ein wenig mehr Lichtenergie zur Probe gelangte und somit nicht ganz so lange Pulsdauern benötigt wurden und daher die Überhitzungsgefahr der LED niedriger war. Die verwendeten Messeinstellungen für die HTRF[®]-Messung mit der UV-LED mit Freistrahloptik waren:

1, Anregungswellenlänge: (über UV-LED und Filter vorgegeben)	312 nm \pm 15 nm
2, Emissionswellenlänge erster Messung (Donor):	620 nm \pm 10 nm
3, Emissionswellenlänge erster Messung (Akzeptor):	665 nm \pm 10 nm
4, Blitzwiederholungs-Frequenz:	100 Hz / 400 Hz
5, Flashes:	50
6, Wartezeit (lag-time):	$T_w + 50 \mu\text{s}$
7, Messzeit (integration-time):	500 μs
T_w ... Pulsdauer	

3.2 Messung mit einem Blitzlampenmodul als Anregungsquelle

Um zusätzliche Lichtquellen-Konzepten für die Verbesserung der HTRF[®]-Messmethode im Infinite[®] M1000 zu untersuchen, wurde auch eine Xe-Blitzlampe als Anregungsquelle verwendet. Das Blitzlampenmodul wurde als weitere Alternative zur aktuellen Lichtquelle im Infinite[®] M1000 angedacht und diente auch zum Vergleichen dieser beiden Anregungsquellen und der bereits getesteten UV-LED, da diese unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Als Anregungsquelle werden Blitzlampenmodule verwendet, die durch ihre kleine Bauform und dem integrierten Netzteil für einen Einbau in das Gerät gut geeignet waren. Darüber hinaus war ein Blitzlampenmodul für zukünftige Entwicklungen der HTRF[®]-Messmethode im Infinite[®] M1000 durchaus interessant, da ein Vergleich zur aktuellen Blitzlampe im Infinite[®] M1000 Schlüsse über Änderungen des aktuellen Messmodus ermöglicht.

Die beiden Blitzlampenmodule mit der höchsten Ausgangsleistung, waren eine 5 W high energy Xe-Blitzlampe L1131X-Y1-000 von Hamamatsu und eine 10 W Xe-Blitzlampe PAX-1001-3 von Excelitas. Beide Blitzlampen besitzen eine Lampeneingangsenergie von ~100 mJ/Puls, der Unterschied ist, dass die 10 W Xe-Blitzlampe von Excelitas auch mit ~100 Hz betrieben werden konnte, die 5 W Xe-Blitzlampe von Hamamatsu jedoch nur mit 50 Hz, siehe Tabelle 3

Tabelle 3: Vergleich der beiden verfügbaren Blitzlampenmodule

Model Nr.:	Hauptentlade-Kapazität (µF)	Hauptentlade-Spannung (V)	Lampeneingangs-Energie (mJ)	Maximal-Frequenz (Hz)	Lampeneingangs-Leistung (W)
L1131X-Y1-000	0,2	1000	100	50	5
PAX-1001-3	0,22	1000	110	91	10

$$E = 0,5 * C * V^2 \quad (14)$$

E... Lampeneingangsenergie

C... Hauptentladekapazität

V... Hauptentladespannung

In Formel 14 ist der Zusammenhang zwischen Energie und Entladespannung angeführt.

Für die Messungen mit dem Blitzlampenmodul wurde aufgrund der höheren Frequenz bei etwas mehr Energie, die PAX-1001-3 Blitzlampe von Excelitas verwendet.

Da die Blitzlampenmodule aufgrund ihrer kleinen Bauform nicht die Leistungswerte der aktuellen im Infinite[®] M1000 benutzten 40 W Blitzlampe erreichen, wurde auch diese getestet, um den Unterschied der Transmission zwischen Filter und Doppelmonochromator zu sehen und das gesamte Potential der Blitzlampe als Anregungsquelle zu zeigen. Bei diesem Test wurde der Doppelmonochromator ausgebaut und ein Filter zwischen Blitzlampe und Lichtfaser positioniert. Dabei wurde die Linse an der Blitzlampe belassen und das Filter vor die Fokussierung des Lichtstrahles gesetzt. Die Lichtfaser wurde in geringem Abstand hinter den Fokus, an dem sich sonst der Monochromatoreingangsschlitz befindet, positioniert. Dieser Aufbau wurde so gewählt, da platztechnisch im Gerät keine eigene Optik konstruiert werden konnte.

Im Gegensatz zu den Blitzlampenmodultests wurde dieser Aufbau mit der aktuellen 40 W Blitzlampe des Gerätes als Vergleichsmessung für weitere Möglichkeiten der Blitzlampe durchgeführt. Denn als permanenter Einbau in den Infinite[®] M1000 wäre eine zweite derartig große Blitzlampe mit Netzteil nicht möglich und den Exzitationsdoppelmonochromator auszubauen würde das Universalgerät zweckendfremden, da das Gerät für alle anderen Funktionen einen Monochromator an der Anregungsseite braucht. Die im Gerät verwendete 40 W Blitzlampe ist vom Typ FX-1161 von Excelitas und hat eine Lampeneingangsenergie von ca. 400 mJ, bei maximal 100 Hz.

3.2.1 Elektronik/Firmware des Blitzlampenmoduls

Für die Ansteuerung des Blitzlampenmoduls musste ein Kabel angepasst werden, das die Versorgungsanschlüsse der aktuellen im Gerät vorhandenen Blitzlampe verwendet um so die Versorgungsspannung, die Referenzspannung und das Triggersignal für das Blitzlampenmodul passend zur Verfügung zu stellen. Dabei wurde das Kabel an den Versorgungssteckplatz an der Hauptplatine am Gerät angesteckt und die Kabelanordnung so verändert, dass sie für das Blitzlampenmodul geeignet war, siehe Abbildung 31.

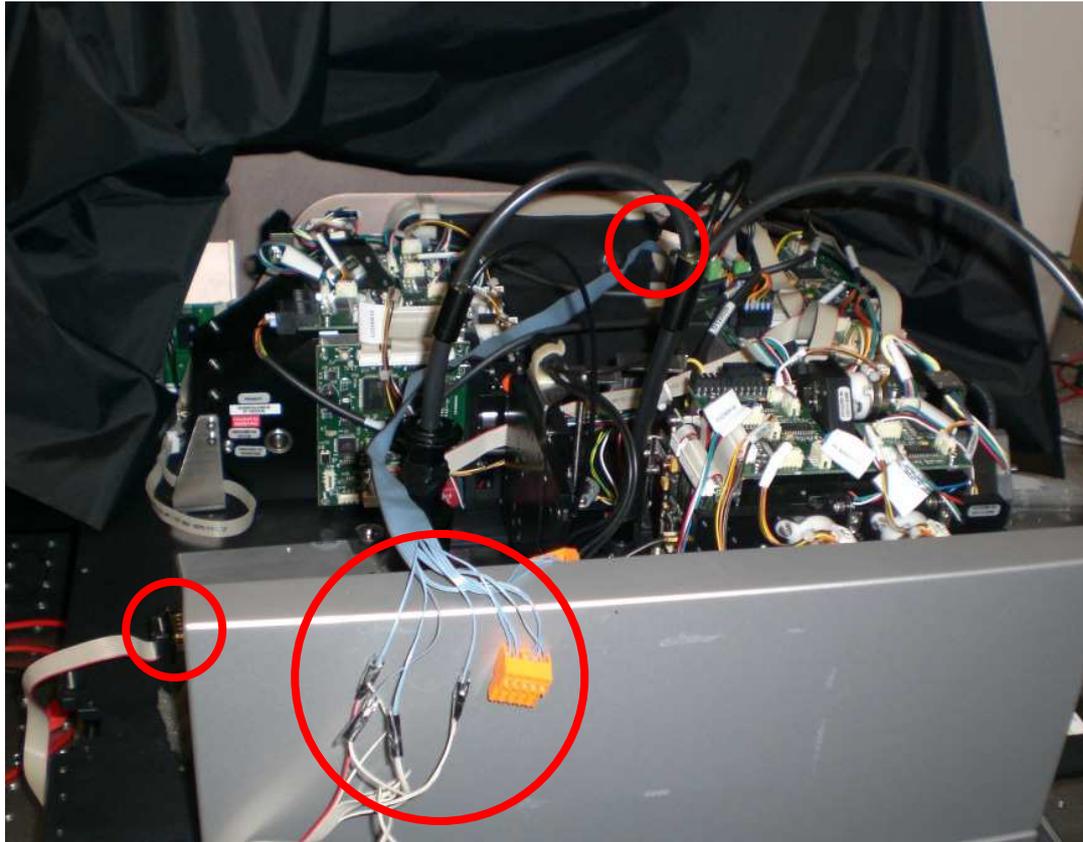


Abbildung 31: Versorgung des Blitzlampenmoduls mit der Hauptplatine im Gerät über ein modifiziertes Kabel (rot eingekreist)

Tabelle 4: Pinbelegung vom Hauptplatinen Board und den Blitzlampenmodul und die nötige Veränderung des Bandleitungskabels.

Steckplatz an der Hauptplatine		Kabelverteilung:	Steckplatz am Blitzlampenmodul	
Nr.:	Funktion:		Nr.:	Funktion:
1	Vin +		1	Vin +
2	Vin +		2	Vin +
3	Vin +		3	Vref
4	Vin RTN		4	Trigger RTN
5	Vin RTN		5	Trigger
6	Vin RTN		6	Vin RTN
7	Trigger		7	Vin RTN
8	Vref RTN		8	Vref RTN
9	Vref		9	Keine Verbindung

In Tabelle 4 sind die Pinbelegungen für das Bandleitungskabel, das die Blitzlampenversorgung von der Hauptplatine des Gerätes übermittelt, auf der linken Seite gezeigt, und auf der rechten Seite sind die Pinbelegungen aufgelistet, die das Blitzlampenmodul benötigt. Dabei ist darauf zu achten, wie das Kabel verändert wurde um

eine richtige Versorgung zu bewerkstelligen. Auf einer Seite des Kabels ist ein RS-232 Stecker angebracht, der für das Blitzlampenmodul nötig ist, und auf der anderen Seite ist ein 12 poliger Molex-Picoflex-Stecker, den man für die Platine benötigt, angebracht worden. Da die Spannungen, die von der Hauptplatine zur Verfügung gestellt wurden, für das Blitzlampenmodul nicht verändert werden mussten, war kein weiterer Eingriff von Nöten. Die Versorgungsspannung kann vom Blitzlampenmodul über einen Drehregler auch intern geregelt werden. Da das Blitzlampenmodul in der Regel mit maximaler Spannung betrieben wurde, war eine Regelung nicht nötig.

Die Positionseinstellungen der Lichteinkopplung mussten wieder auf Lichtfasereinkopplung in der Firmware verändert werden, damit das richtig Well angeregt wird.

3.2.2 Messung mit einer Lichtfaseroptik

Die Messungen mit einem Xe-Blitzlampenmodul als Anregungsquelle werden nur mit einer Quarzfaseroptik durchgeführt, da ein Freistrahloptikaufbau im Infinite[®] M1000 aus Platzgründen nicht möglich war. Die Lichtintensität, die an die Probe gelangte, hing zum einen von dem Blitzlampenmodul selbst und zum anderen auch vom optischen Aufbau ab. Der optische Aufbau ist in Abbildung 32 schematisch dargestellt.

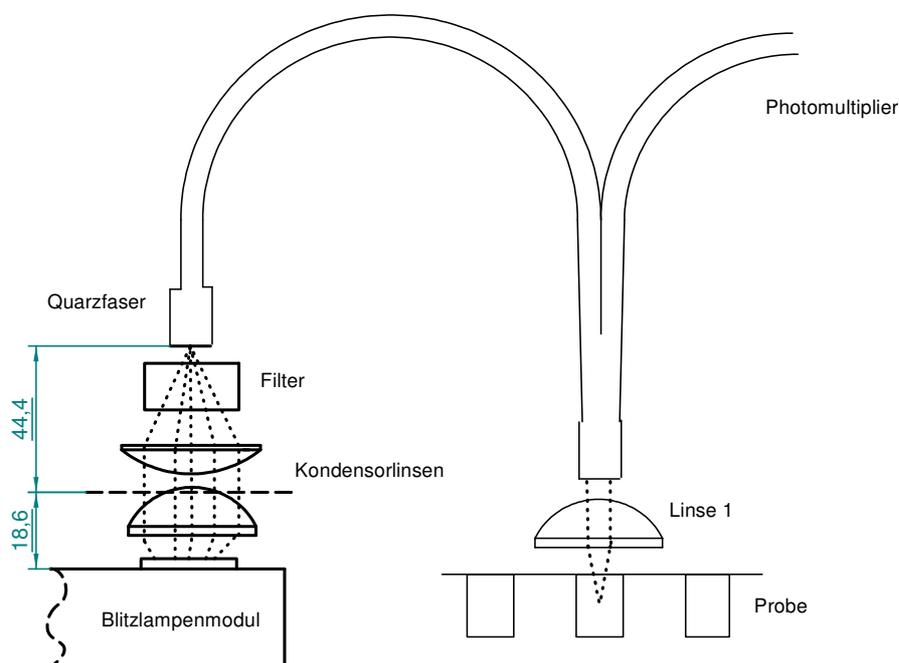


Abbildung 32: Schematische Darstellung des Messaufbaues des Blitzlampenmoduls

Der Aufbau ist dem Messaufbau der UV-LED mit Lichtfasereinkopplung sehr ähnlich. Der Hauptunterschied ist, dass das Licht der UV-LED durch die bereits integrierte Balllinse schon gebündelt wird und das Licht der Blitzlampe mit zusätzlichen Linsen gebündelt werden musste.

Das verwendete Filter ist dabei die Komponente, welche die Lichtintensität an der Probe am meisten verändern konnte, unter der Voraussetzung, dass das Linsensystem und die Einkopplung in die Faser bereits optimiert sind.

Deshalb wurden bei den Messungen mit einem Blitzlampenmodul zwei verschiedene Filter getestet, siehe Abbildung 33. Es wurde ein 320 ± 25 nm Filter, wie in von der Firma

produzierten Filtergeräten für die HTRF[®]-Messung benutzt wird, sowie das schon bei den UV-LED Messungen verwendete 335 ± 60 nm Filter benutzt.

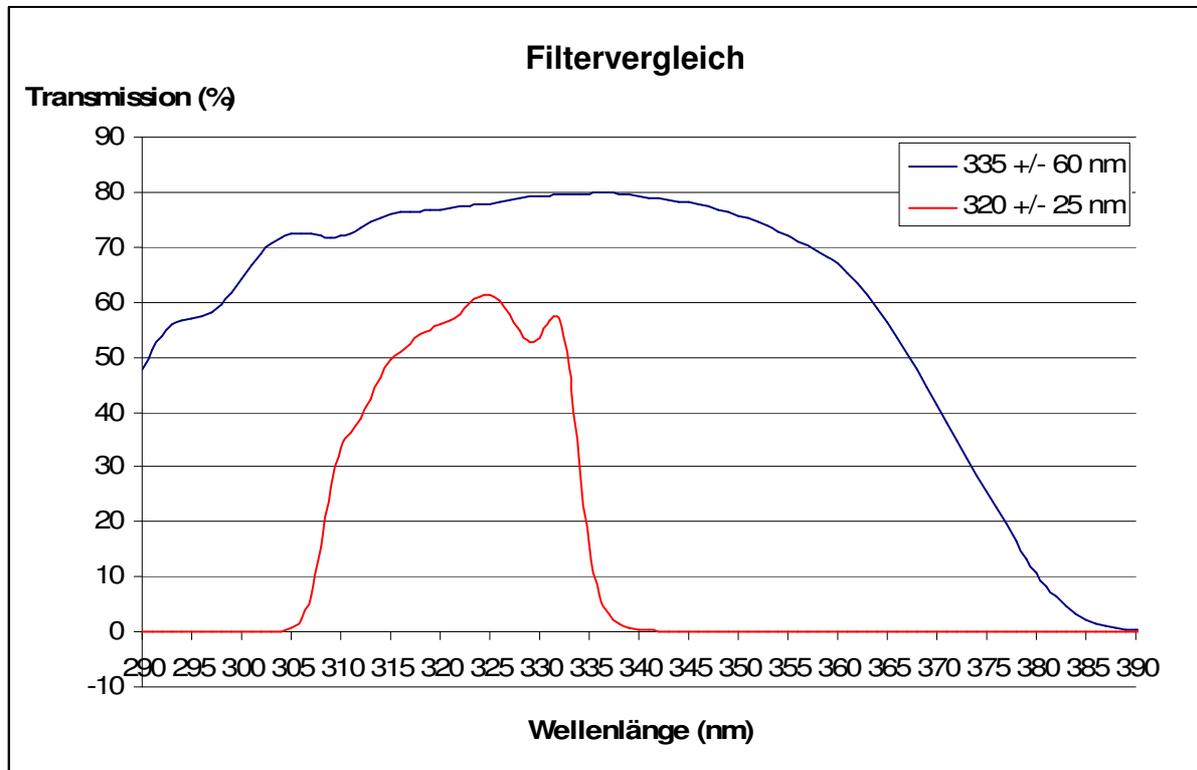


Abbildung 33: Vergleich der Transmissionsspektren der beiden getesteten Filter.

Wie in Abbildung 33 deutlich zu erkennen ist, lässt das 335 ± 60 nm Filter viel mehr Licht durch, da es eine höhere Transmissionsrate hat und auch ein viel breiteres Wellenlängenspektrum durchlässt. Die Anregungsempfindlichkeit des Assays liegt ungefähr zwischen 290 und 350 nm, was mit diesem Filter gut abgedeckt wird. Es kommt allerdings auch mehr Hintergrundsignal am PMT durch das breite Anregungsspektrum an. Dies ist aber nicht ausschlaggebend, da das emittierte Signal des Assays erst bei 620 nm bzw. 665 nm gemessen wird und dieses auch entsprechend höher ist. Aus diesem Grund hat sich das 335 ± 60 nm Filter als das geeignetere Filter herausgestellt.

Als Linsen wurden beim Optikaufbau für das Blitzlampenmodule eine asphärische und eine sphärische Sammellinse als Kondensoren benutzt. Die asphärische Linse hat einen Durchmesser von 19 mm und eine Dicke von 7 mm und die sphärische Linse einen Durchmesser von 21 mm und eine Dicke von 4,1 mm. In Abbildung 34 ist ein Ausschnitt der dazugehörigen Zeichnung zu sehen. Dieser Kondensator stand nicht in der FRED Optical Engineering Software zu Verfügung, da dieser Kondensator in keinem aktuellen Gerät benutzt

wird. Die unten angeführte Abbildung 34 zeigt die verwendete Kondensorlinse. Dabei wurden die Brennweiten und die Vergrößerung der Linse aus den Herstellerzeichnungen entnommen und rechnerisch an die Wellenlänge des Lichtes angepasst.

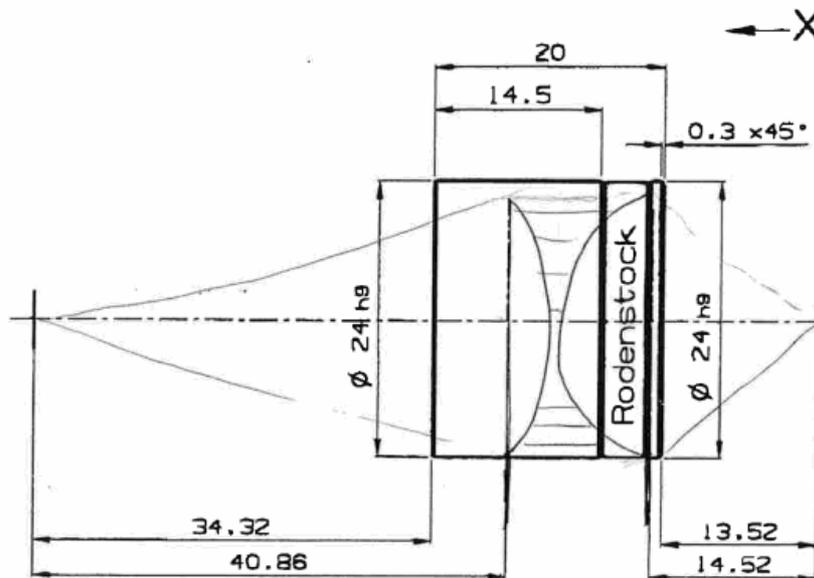


Abbildung 34: Ausschnitt aus der Kondensorlinsezeichnung, wobei rechts die Quelle und links das Objekt liegen [19]

Der Lampenkondensator 45,8 / 19,2 von Rodenstock ist durch seine zwei Linsen etwas teurer als eine einzelne Sammellinse, dafür besitzt er eine bessere Abbildung und kann sehr nahe am Blitzlampenmodul positioniert werden. Ein Kondensator wäre nicht unbedingt nötig, da dieser aber mehr Lichtleistung in den Fokuspunkt bringt und zur Verfügung stand, wurde dieses Linsensystem gewählt. Der Wert 45,8 ist die Bildweite und 19,2 die vorgegebene Objektweite für eine Wellenlänge von 560 nm. Dabei muss der veränderte Brechungsindex bei der benötigten UV-Wellenlänge noch berücksichtigt werden. In Abbildung 35 sieht man, dass im UV-Bereich um 300 nm der Brechungsindex von 1,46(sichtbares Licht) auf 1,48 steigt. Mit Formel 15 wird die Veränderung der Brennweiten berechnet. Es ergibt sich eine Brennweitenverkürzung um 3 % der angegebenen Brennweiten. Somit ist die Bildweite 44,4 mm und die Objektweite 18,6 mm für den Wellenlängenbereich des UV-Lichts. Mit Formel 16 lässt sich die Vergrößerung berechnen, die den gerundeten Faktor 2,39 besitzt. Da der Lichtbogen der Blitzlampe 1 mm lang und ca. 0,5 mm breit ist, ist dieses Linsensystem für die Lichtfaser mit 4 mm Länge und 2,5 mm Breite gut geeignet. Auch der Einfallswinkel auf die Faser muss wie schon bei der UV-LED unter $12,7^\circ$ ($NA = 0,22$) liegen. Der Winkel für die

Lichteinkopplung in die Lichtfaser errechnet sich mit Formel 17 und ergibt sich bei einer Bildweite von 44,4 mm und dem verwendeten Durchmesser von 19 mm auf etwa 12 °. Also ist eine Einkopplung in die Quarzfaser unter Berücksichtigung des UV-Wellenlängenbereiches problemlos möglich. Auch bei diesem Messaufbau wurde der Abstand der Linse zur Blitzlampe zum errechneten Wert, durch Leistungsmessungen des Anregungslichts am Ort der Probe optimiert.

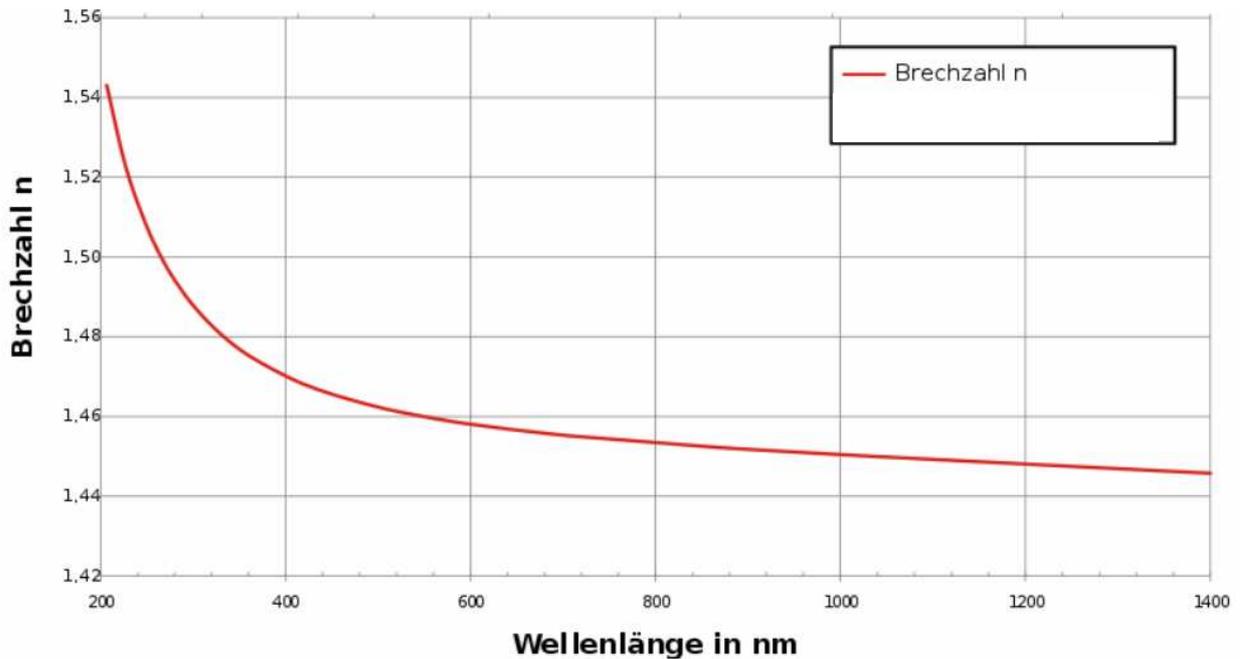


Abbildung 35: Brechungsindex von Quarzglas in Abhängigkeit von der Wellenlänge [20]

$$f = r * n_1 / (n_1 * n_2) \quad (15)$$

$$M = S_1 / S_2 \quad (16)$$

$$\Phi = \tan^{-1} (r / S_2) \quad (17)$$

f... Brennweite

n_1 ... Brechungsindex der Quarzglas-Linse je nach Wellenlänge

n_2 ... Brechungsindex der Luft (als 1 angenommen)

M... Vergrößerungsfaktor

S_1 ... Objektweite

S_2 ... Bildweite

Φ ... Einstrahlwinkel

r... Radius der Linse

Für die HTRF[®]-Messung mit dem Blitzlampenmodul wurden die Messeinstellungen stärker verändert. Da die Blitzlampenenergie pro Zeit viel größer als die der UV-LED ist, war auch der Hintergrund der sich am Messsignal zeigte viel stärker. Da das verwendete Filter eine weitaus geringere Blockung als der Doppelmonochromator besitzt, musste die lag-time von 60 μ s auf ungefähr 150 μ s erhöht werden.

Um die längere lag-time zu kompensieren, wurde die Bandbreite bei der Messung des Akzeptorsignals von 10 auf 8 nm verringert. Dadurch konnte der Signal/Blank-Abfall über die längere lag-time durch eine schmalbandigere Messung kompensiert werden. Eine Bandbreitenverkleinerung wurde nicht bei jeder Messung gemacht, da dies nicht immer nötig war und eine kleine Bandbreite den großen Nachteil einer höheren Verstärkung des PMT, das ja vermieden werden sollte, mit sich bringt. Durch die Bandbreitenverkleinerung musste im Vergleich zu den anderen Messaufbauten die Lichtintensität an der Probe noch etwas höher sein, um dieselbe Verstärkung zu erreichen. Die Anregungswellenlänge wurde durch das verwendete Filter vorgegeben.

1, Anregungswellenlänge: (über UV-LED und Filter vorgegeben)	335 nm \pm 60 nm
2, Emissionswellenlänge erster Messung (Donor):	620 nm \pm 10 nm
3, Emissionswellenlänge erster Messung (Akzeptor):	665 nm \pm 8 nm
4, Blitzwiederholungs-Frequenz:	100 Hz
5, Flashes:	50
6, Wartezeit (lag-time):	150 μ s
7, Messzeit (integration-time):	500 μ s

4 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden alle relevanten Ergebnisse dargelegt und zusammengefasst dargestellt. Die daraus resultierende Schlussfolgerung erfolgt im Kapitel Diskussion.

Da die erste Aufgabe war, das Verständnis für die HTRF[®]-Technologie und deren Messmethode am Infinite[®] M1000 zu erlangen, werden auch allgemeine Ergebnisse und Erkenntnisse über die Messeinstellungen präsentiert. Zusätzlich werden die Ergebnisse für die beiden verschiedenen Anregungsquellen angegeben. Bei den UV-LED Messungen wurde in den Methoden zwischen Freistrahloptik und Lichtfaseroptik unterschieden und die Blitzlampenmessungen wurden mit zwei unterschiedlichen Filtern durchgeführt. Die Unterschiede und Vergleiche werden hier ebenfalls dargestellt. Der daraus entstehende Unterschied zum herkömmlichen Gerät mit dem Anregungsdoppelmonochromator ist für die Einschätzung der HTRF[®]-Messperformance entscheidend und wird in diesem Kapitel so prägnant wie möglich dargestellt. Auch die Ergebnisse der Messung mit der 40 W Xe-Blitzlampe des Gerätes selbst, mit einem Filter statt des Doppelmonochromators für die Wellenlängenselektion und Blockung, werden hier angegeben.

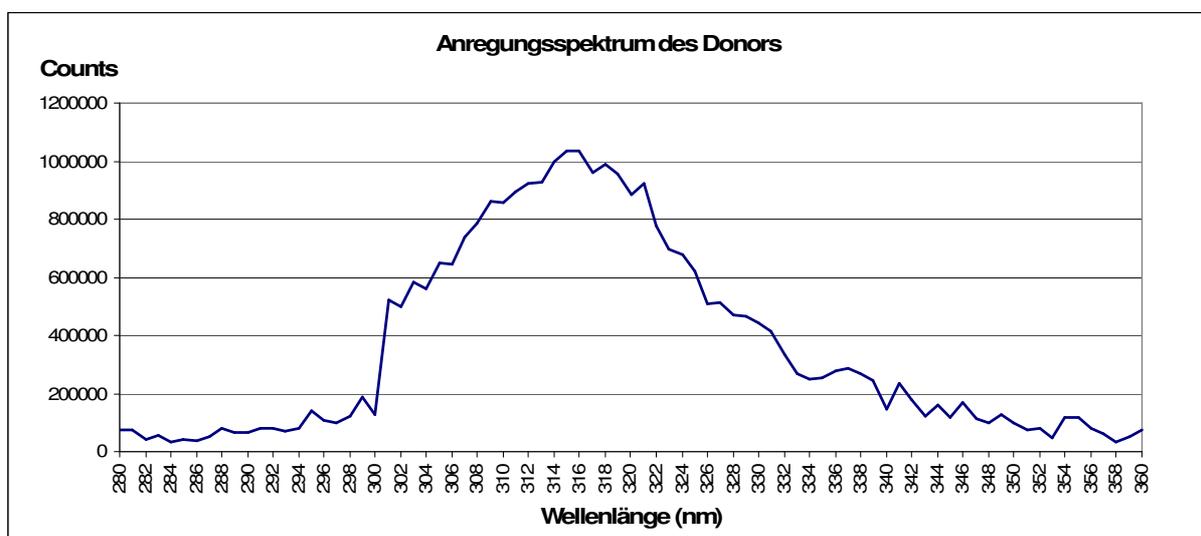
4.1 Messeinstellungen und Optimierungen

Da die Messeinstellungen einen großen Einfluss auf die HTRF[®]-Messungen haben, wurden diese verändert und getestet. Dabei war es vor allem wichtig, zu verstehen, wie die verschiedenen Einstellungen die Messparameter, also die Messperformance beeinflussen. In Tabelle 5 sind die Zusammenhänge aufgezeigt. Der Pfeil deutet an ob der Wert steigt oder fällt. Rot steht für eine Verschlechterung und Grün für eine Verbesserung. Dabei ist gut zu sehen wie das Hauptproblem, die zu geringe Probenanregung und der damit verbundene zu hohe Gainwert des PMT, den CV-Wert beeinflusst. Dieser wurde durch mehr Blitze (flashes) pro Messung so beeinflusst, dass er den erforderlichen Grenzwert nicht überschritt, was sich durch eine längere Messzeit bemerkbar machte. Diese Tabelle ist allgemein gültig, jedoch kann der Einfluss, je nach dem Parameterbereich in dem die Einstellungen geändert werden (z.B.: Frequenzbereich) oder der Assay-Beschaffenheit, variieren, was keine allgemeine quantitative Aussage zulässt.

Tabelle 5: Parameter, die durch die verschiedenen Messeinstellungen beeinflusst werden

Parameter	Gain	S/B	Low & High-C	CV & Std	Messdauer
lag time ↑	↑	↑	↓	↑	-
integration time ↑	↓	-	↓	↓	-
Pulsdauer ↑	↑	↑	↓	↑	-
Frequenz ↑	-	↓	↓	-	↓
Flashes ↑	-	-	-	↓	↑

Zusätzlich zu den in Tabelle 5 gezeigten Messeinstellungen können auch die Wellenlängen und deren Bandbreiten für die Detektion verändert werden. Eine Bandbreitenverringerng brachte bessere Low- und High-Kontrollwerte, aber auch eine Erhöhung der nötigen Verstärkung des PMT und der damit verbunden Steigerung der Messstreuung mit sich, da eine höhere nötige Verstärkung ein geringeres Signal am PMT bedeutet. Die verwendeten Wellenlängen sind vom Assay abhängig. Die Anregungswellenlänge wird von der Anregungsquelle und dem benutzen Filter vorgegeben. Um die Anregungsquellen genau vergleichen zu können, müssen das Anregungsspektrum mit dem Absorptionsspektrum des HTRF[®]-Donors verglichen werden, da die Energie des Anregungslichtes alleine keine Aussage über das emittierte Signal gibt.

**Abbildung 36: Anregungsspektrum des Donorsignals**

Somit führen Anregungswellenlängen zwischen 310 und 320 nm zu mehr Signal als außerhalb dieses Bereichs liegende, wie in Abbildung 36 genau zu sehen ist.

Bei der aktuellen HTRF[®] Messung ergibt sich eine Lichtenergie an der Probe von 4 μJ in einem Wellenlängenbereich von 300 bis 330 nm, die durch die alternativen Lichtquellen-Konzepte verbessert werden sollte. Der Wellenlängenbereich wurde so gewählt, dass es den Wellenlängenbereich der stärksten Anregung (siehe Abbildung 36) widerspiegelt, um einen möglichst guten Vergleich zwischen den verschiedenen Lichtquellen-Konzepten zu haben.

Auch die Emission von Donor und Akzeptor wurden überprüft. Dabei ist besonders das Emissionsspektrum des Donors aufgefallen. Denn wie schon im Kapitel 2.1.1 gezeigt, ergaben sich mehrere Emissions-Peaks. In Abbildung 37 ist dies veranschaulicht, wobei zu bemerken ist, dass die 586 nm Peaks höher sind als die regulär gemessenen 620 nm Peaks.

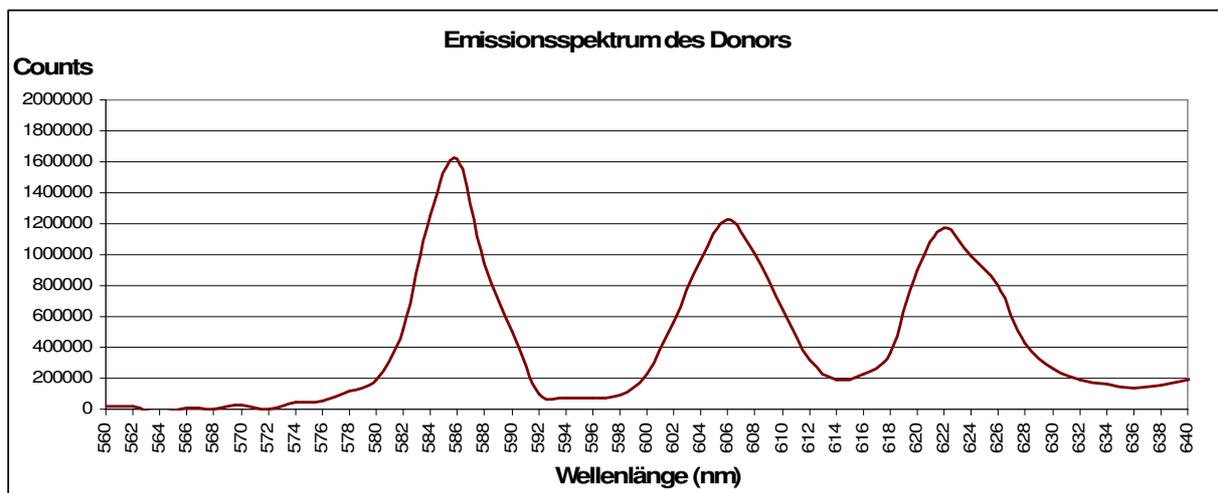
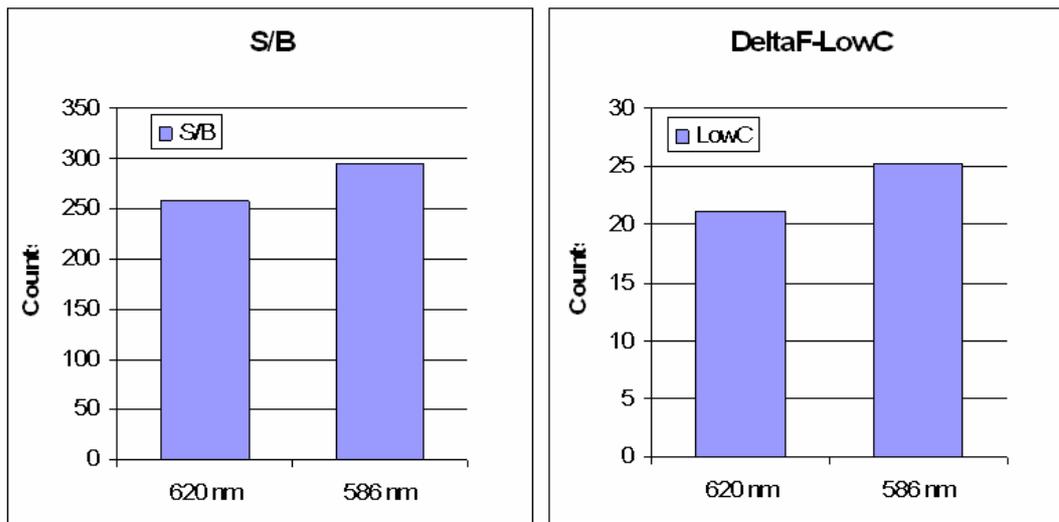


Abbildung 37: Emissionsspektrum des Donors

Um diese Signalerhöhung bei einer Messung bei 586 nm des Donorsignals zu untermauern, wurde auch ein Test mit dem RCK durchgeführt. Diese Testmessung ergab eine Verkleinerung der Verstärkung des PMT bei der Donormessung und ein verbessertes Signal/Blank Verhältnis, sowie ein verbessertes Low-Kontrollsignal der gesamten Messung. Bei dieser Testmessung wurde lediglich die Signaldetektion des Donors von 620 nm auf 586 nm verändert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 dargestellt. Es ergab sich aber keine Verbesserung des problematischeren, weil höheren, Gainwerts der Akzeptormessung.



Qualitätskennzahlen: S/B +15%; LowC +19%; HighC & CV ~1%

Abbildung 38: Verbesserung der HTRF[®]-Messung durch Änderung der Detektionswellenlänge auf 586 nm

4.2 Messungen mit einer UV-LED als Anregungsquelle

Die Energiewerte pro Pulsdauer sind entscheidend bei der Bewertung der Lichtquelle.

In Abbildung 39 sieht man die Abhängigkeit der Lichtenergie von der Pulsdauer, mit der die Probe angeregt wird bei einem angelegten Strom an der LED von 1 A. Dabei ist ein beinahe lineares Verhalten zu sehen, das durch die höhere Wärmeerzeugung und Abfall des Wirkungsgrades bei höheren Pulsbreite leicht abflacht.

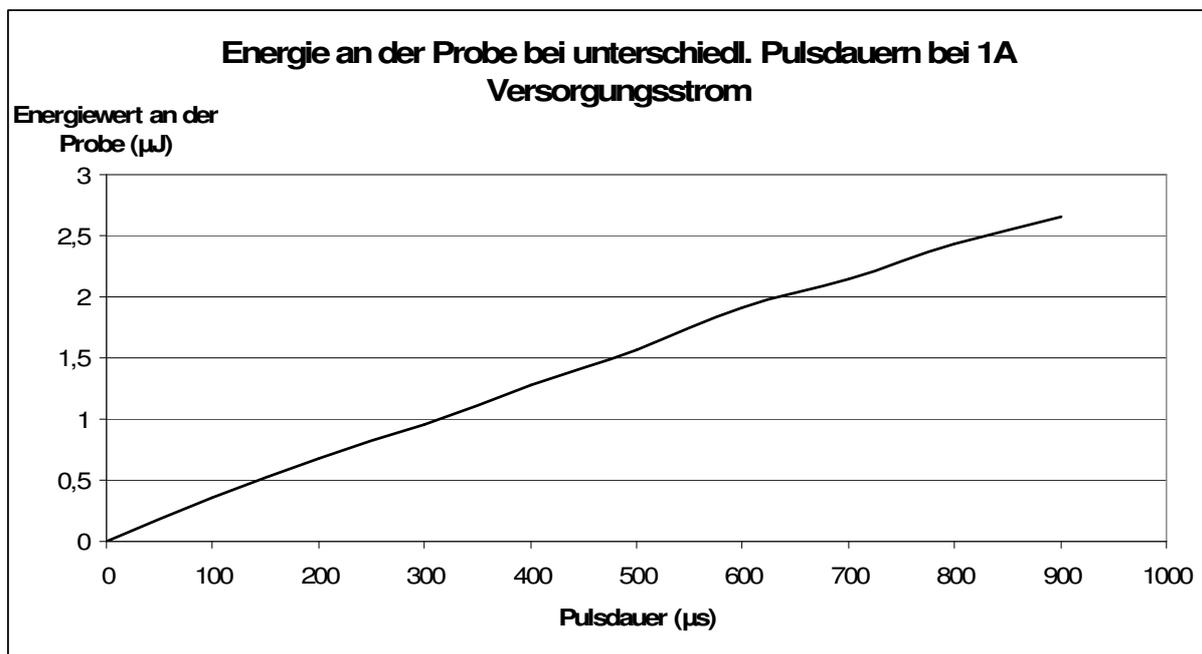


Abbildung 39: Puls-Energiewerte bei unterschiedlichen Pulsdauern der UV-LED

Messungen mit hoher Pulsbreite sind wegen der Lebensdauer von ca. 600 μs des Akzeptorsignals, wie bereits in Kapitel 3.1 besprochen, nicht geeignet. Darum wurde der Strom an der LED auf 5 A erhöht und die Pulsbreite für die UV-LED gekürzt, um somit wieder die maximale Leistung aus der LED herauszuholen. In Abbildung 40 sind die Energiewerte bei 100 und 200 μs Pulsdauer (PW) dargestellt. Diese Energiewerte sind absolute Obergrenze dessen, was mit der Messung mit der UV-LED zu verwirklichen war und wurden bereits mit der besser geeigneten Freistrahloptik realisiert. Da bei Tests mit einer Pulsdauer über 200 μs oder mit einer höheren Frequenz als 100 Hz die UV-LED bei 5 A Überhitzungsausfälle aufwies, wurde dies als Limit festgelegt. Somit ist zu erkennen, dass die geforderten 4 μJ des aktuellen Systems nicht ganz erreicht werden.

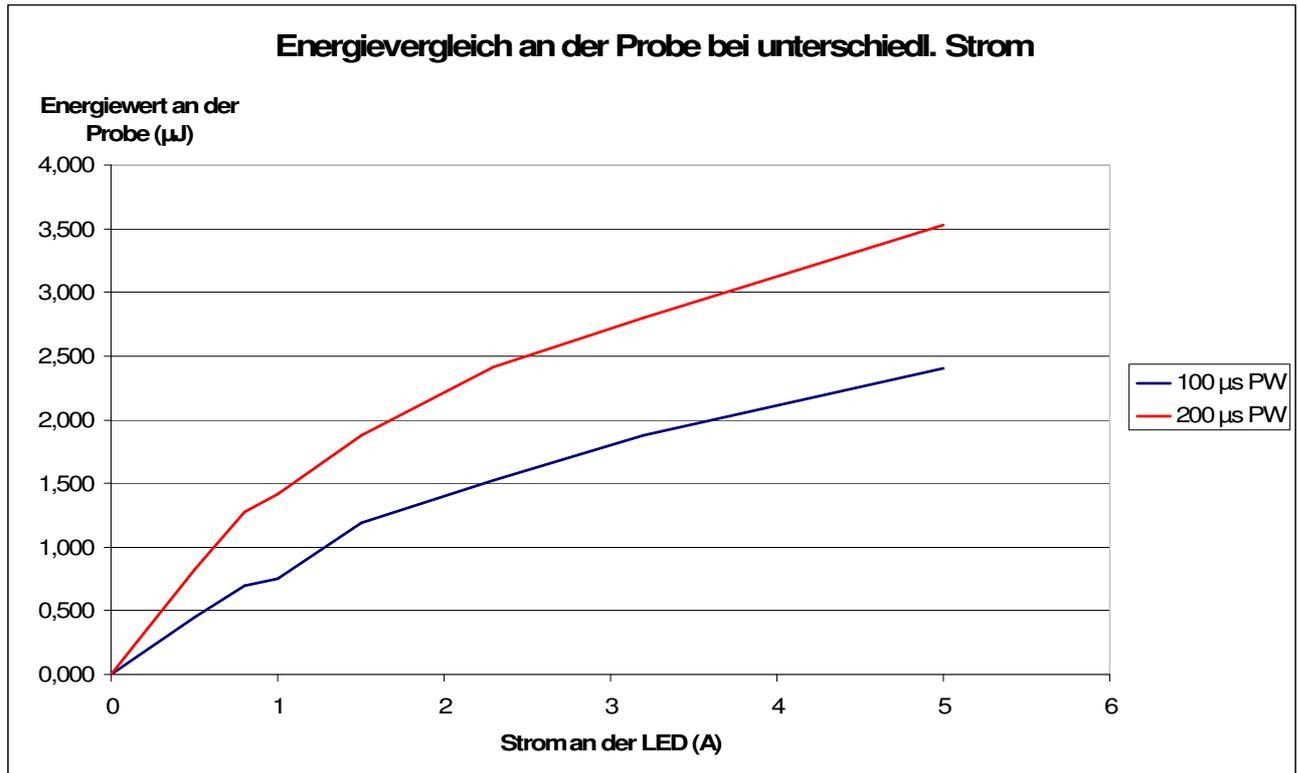


Abbildung 40: Energiewerte bei unterschiedlichem durch die UV-LED geschickten Strom

Die Freistrahloptik stellte sich als bessere Variante gegenüber der Lichtfaseroptik dar. In Tabelle 6 ist die Lichtausbeute durch die Freistrahloptik und durch die Lichtfaseroptik aufgezeigt.

Tabelle 6: Vergleichswerte der Lichttransmission zwischen Freistrahloptik und Lichtfaseroptik

	Freistrahloptik	Lichtfaseroptik
Filtertransmission	~0,7	~0,7
Optikdurchlass	~0,9	~0,95
Lichtfaserdurchlass		~0,6
Gesamttransmission:	~0,6 (60%)	~0,4 (40%)

Mit Optikdurchlass ist die Lichttransmission der nicht explizit aufgeführten Komponenten gemeint, wie der verwendeten Linsen und des dichroitischen Spiegels. Der große Vorteil der Freistrahloptik entsteht durch das Weglassen der Lichtfaser, dabei ist der Optikaufbau aber

etwas komplizierter und platzaufwendiger. Damit befördert der Freistrahloptikaufbau ungefähr 1,5 x soviel an Licht zur Probe wie der Lichtfaseraufbau.

In Tabelle 7 werden die vier Qualitätskennzahlen des Reader Control Kit, die in Kapitel 2.1.2 besprochen wurden, mit der ursprünglichen Messung verglichen. Als ursprüngliche Messung ist die HTRF[®]-Messung des unmodifizierten Infinite[®] M1000 gemeint. Diese Messungen sind alle mit dem gleichen RCK Assay durchgeführt worden, das bedeutet, in jeder einzelnen Messreihe wurde nur eine RCK Assay-Platte benutzt, um einen assayunabhängigen Vergleich zu erhalten. Die UV-LED wurde bei allen Messungen mit 5 A versorgt, um die Pulsbreite des Anregungslichtes und dem Optikaufbau direkt vergleichbar zu halten. Bei den angegebenen Messwerten sind nicht die absoluten Werte entscheidend, sondern das Verhältnis zur herkömmlichen HTRF[®]-Messung mit dem unmodifizierten Infinite[®] M1000, da es um eine Verbesserung der Performance geht. Die Messung ist mit weißen Hintergrund angegeben und dient als Vergleich, wobei alle anderen Messungen mit grün für besser, gelb für ähnlich gut und rot für schlechter bewertet sind. Zusätzlich gibt es noch einen orange und dunkelgrünen Farbton, um eine genauere Darstellung zu ermöglichen siehe Tabelle 8. Die Bewertung der Messergebnisse ist ein absoluter Vergleich der Mittelwerte der Messreihen. Die Standardabweichungen sind auch klassifiziert dienen aber lediglich gemeinsam mit dem Mittelwert der CV–Std0 Werten als Maß der Streuung.

Tabelle 7: Vergleich zwischen Freistrahloptik und Lichtfaseroptik

Messungen:	Signal/Blank		DeltaF-LowC		DeltaF-HighC		CV - Std0		
	Average	Stdv	Average	Stdv	Aver.	Stdv	Aver.	Stdv	
ursprünglicher Infinite [®] M1000	282,01	30,49	29,23	3,10	894,53	18,42	4,88	0,83	
FI 200PW	327,34	105,52	25,83	3,81	724,74	31,12	9,97	1,29	hoher Gain&Wärme (CV,Stdv,S/B), lange Pulsdauer (Low-HighC)
FP 200PW	627,61	141,30	26,75	3,41	792,23	27,94	6,41	1,49	lange Pulsdauer (Low-HighC), Wärme (Stdv,CV)
FP 100PW	393,45	65,85	28,57	2,86	849,47	20,61	7,47	0,98	hoher Gain (CV,S/B)

Tabelle 8: Farbkodierung um den Vergleich zur aktuellen Performance zu veranschaulichen

Farbe:	Bedeutung:
Hellgrün	Über 30 % besser
Dunkelgrün	10 – 30 % besser
Gelb	$\pm 10 \%$
Orange	10 – 30 % schlechter
Rot	Über 30 % schlechter

Bei alle Messreihen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet und für jede Qualitätskennzahl angegeben.

In der letzten Spalte stehen die Probleme, die zu den schlechten Werten der Messreihe geführt haben. Die verwendete Verstärkung (Gain) wird nicht explizit angegeben, da diese nur bei einer PW von 200 μs gleich oder ähnlich hoch wie bei der ursprünglichen Messung war. Bei allen anderen Messungen war er zu hoch und somit wird er in der letzten Spalte als Problem angegeben.

Die erste Messung wurde mit dem unveränderten Infinite[®] M1000 durchgeführt. Als erste Vergleichsmessung ist die UV-LED Messung mit Lichtfaseroptik angeführt. Diese wurde nur bei einer Pulsbreite von 200 μs angeführt, weil höhere Pulsbreiten nicht möglich waren ohne die LED zu zerstören und niedrigere Pulsdauern noch schlechtere Ergebnisse bewirkt. Das Wärmeproblem bezieht sich auf die Erhitzung der UV-LED während des Messdurchlaufes einer Platte und kann dadurch nicht durch die ratiometrische Messauswertung behoben werden.

Die Messreihen mit der Freistrahloptik ergaben bessere Ergebnisse, da diese mehr Anregungslicht zur Probe durchließ. Darum werden hier Messungen mit 200 μs und 100 μs Pulsbreite angegeben, mit denen gute Ergebnisse erzielt wurden.

Um auch die Erhöhung der Frequenz und die dabei mögliche Erhöhung der Anzahl der Blitze pro Messung (Mittelungen) ohne Zeitverlust zu vergleichen, wurden weitere Messreihen durchgeführt.

Das Problem hierbei war, dass diese Messungen nur mit 50 μs Pulsbreite bei einer 5 A Versorgung der LED möglich waren und daher alle Messungen am unteren Limit der Anregungsintensität, das heißt mit maximaler Verstärkung des Photomultiplieres durchgeführt werden mussten. Diese Messungen wurden alle mit Freistrahloptik durchgeführt und sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Performance-Änderung wurde wie in Tabelle 8 farblich dargestellt.

Tabelle 9: Abhängigkeit der vier Qualitätskennzahlen des RCK von Frequenz und Flashanzahl

Messungen:	Signal/Blank		DeltaF-LowC		DeltaF-HighC		CV - Std0		
	Average	Stdv	Average	Stdv	Aver.	Stdv	Aver.	Stdv	
Fl...mit Lichtfaser FP...Freistrahloptik									
ursprünglicher Infinite [®] M1000	282,01	30,49	29,23	3,10	894,53	18,42	4,88	0,83	
FP 50PW/100HZ	310,49	112,59	25,30	4,11	769,05	43,04	9,59	2,10	sehr hoher Gain(CV,Stdv,S/B, Low-HighC)(alles)
FP 50PW/400HZ	281,19	52,75	21,06	3,97	701,69	28,99	9,02	1,53	sehr hoher Gain&Wärme (CV,Stdv,S/B,Low- HighC)(alles)
50PW/400HZ/100fl	295,36	53,35	22,05	2,99	702,65	23,26	6,67	0,56	sehr hoher Gain&Wärme(alles) aber 100flashes(Stdv,CV)

Da für die Messreihen aus Tabelle 7 und Tabelle 9 die UV-LED mit dem maximal verträglichen Strom betrieben wurde und auch der Optikaufbau optimiert wurde, beschreiben diese Ergebnisse das Vermögen einer UV-LED zur Steigerung der HTRF[®]-Performance im Infinite[®] M1000 sehr gut.

4.3 Messungen mit einer Blitzlampe als Anregungsquelle

Zuerst werden wieder die Ergebnisse der Lichtenergie mit der Blitzlampe zu dem unmodifizierten Gerät verglichen. Dabei sollten die ca. 4 μJ des aktuellen Infinite[®] M1000 HTRF[®]-Messsystems übertroffen werden.

Diese 4 μJ in einem Wellenlängenbereich von 300 bis 330 nm, der laut Anregungsspektrum (siehe Abbildung 36) das meiste Signal emittiert, kommen durch eine mit 40 W betriebene Blitzlampe und einen Doppelmonochromator zur Wellenlängenselektion zu Stande. Das als Anregungsquelle verwendete Xe-Blitzlampenmodul wird zwar mit nur maximal 10 W betrieben, sollte aber durch die Verwendung eines Filters anstelle des Monochromators eine ähnlich hohe Lichtenergie zur Probe bringen. Die Lichtenergie bei dem verwendeten 320 ± 25 nm Filter, betrug allerdings nur ungefähr 3,4 μJ im Messbereich von 300- 330 nm. Bei dem zweiten verwendeten Filter mit 335 ± 60 nm Transmissionswellenlänge ergab sich eine Energie von ca. 5,3 μJ im Messbereich von 300 – 330 nm. Das 335 ± 60 nm Filter wurde für weitere Messungen verwendet, da dieses sowohl eine höhere Transmission hat als auch mehr Anregungswellenlängen des Donors durchlässt. In Tabelle 10 werden die Qualitätskennzahlen der Messungen mit dem Xe-Blitzlampenmodul und beiden verwendeten Filtern mit der ursprünglichen Performance des Infinite[®] M1000 verglichen.

Tabelle 10: Vergleichsmessungen mit dem Blitzlampenmodul und den beiden unterschiedlichen Filtern

Blitzlampenmodul:	Signal/Blank	DeltaF-LowC	DeltaF-HighC	CV - Std0	Gain
	Average	Average	Average	Average	Donor / Akzeptor
ursprünglicher Infinite® M1000	277,06	30,46	1027,38	4,91	171 / 192
335 +/- 60 nm Filter	307,45	24,81	814,36	4,26	148 / 181
320 +/- 25 nm Filter	226,23	25,84	784,51	6,09	181 / 204

Dabei wurde bei den Messeinstellungen für das Xe-Blitzlampenmodul die Wartezeit (lag-time) auf 150 μ s anstatt der ursprünglichen 60 μ s eingestellt. Dies war notwendig da sonst das Signal/Blank Verhältnis unakzeptabel wurde. Die Vergleichswerte zur aktuellen Performance sind wie in Tabelle 8 farbkodiert, da der Unterschied zur aktuellen Geräteperformance ausschlaggebend ist. Zusätzlich wird die Verstärkung des PMT mit abgebildet, da diese ein sehr wichtiger Faktor ist und bei den Blitzlampenmodultests auch zu einer Verbesserung führte.

Da es so kleine kompakte Blitzlampenmodule momentan nur mit geringer Leistung am Markt gibt, wurde, um den Vergleich zu vervollständigen und zu zeigen was möglich wäre, die 40 W Xe-Blitzlampe mit den zur Verfügung stehenden Filtern getestet. Tabelle 11 zeigt die Zusammenfassung dieser Tests. Dabei konnte eine Wartezeit von 120 μ s eingestellt werden und die Akzeptorbandbreite wurde von 10 auf 8 nm geändert, da genug Lichtenergie zur Probenanregung bereit stand. Bei dem 335 \pm 60 nm Filter wurde auch ein Test mit 10 Flashes (Blitze) pro Messung durchgeführt. Diese Messung ist zwischen Faktor 2 und 4 schneller, je nach Wellanzahl der Platte und Einstellungen.

Tabelle 11: Vergleichsmessungen mit der 40 W Geräteblitzlampe mit den beiden unterschiedlichen Filtern

Messungen mit 40 W Blitzlampe des Gerätes	Signal/Blank		DeltaF-LowC		DeltaF-HighC		CV - Std0		Gain Donor / Akzeptor
	Average	Stdv	Average	Stdv	Average	Stdv	Average	Stdv	
ursprünglicher Infinite [®] M1000	298,90	12,75	28,06	2,65	901,23	18,70	4,30	0,33	170 / 197
belassene Blitzlampe mit 320 +/- 25 nm Filter	232,00	9,13	25,89	0,83	817,48	14,44	3,50	0,42	155 / 191
belassene Blitzlampe mit 335 +/- 60 nm Filter	258,18	3,96	27,97	0,49	889,94	9,21	2,01	0,27	123 / 166
belassene Blitzlampe mit 335 +/- 60 nm Filter bei 10 statt 50 flashes	252,30	11,50	26,00	2,44	873,48	15,11	4,74	0,32	123 / 167

Die Werte in Tabelle 11 wurden wieder mit der aktuellen Performance der HTRF[®]-Messung im Infinite[®] M1000 verglichen und farbkodiert gleich Tabelle 8.

Die Energiewerte werden wieder im Wellenlängenbereich von 300 bis 330 nm angegeben um einen guten Vergleich zwischen den Anwendungen zu haben. Die Xe-Blitzlampe mit dem 320 ± 25 nm Filter hat ca. 4,9 µJ Lichtenergie an der Probe im vorgegebenen Wellenlängenbereich. Beim 335 ± 60 nm Filter zeigt das Gerät ungefähr 8,1 µJ an. Zusätzlich wird durch die längere Wartezeit bis zur Detektion, die bei den Blitzlampentests nötig ist, das emittierte Signal schwächer. Bei beiden Messreihen sieht man sehr deutlich, dass die Verstärkung am PMT gefallen ist und das trotz längerer Wartezeit und kleiner Bandbreite der Emissionswellenlänge des Akzeptorsignals. Das Ergebnis dieser Messreihen hat sich zum unmodifizierten Gerät verbessert.

5 Diskussion

Da die HTRF[®]-Technologie sehr wichtig ist und deren Stellenwert in den nächsten Jahren weiter steigen wird, ist die stetige Verbesserung und Anpassung der HTRF[®]-Messmethode unausweichlich. Darum sind auch das Verständnis der Parameter und deren Einfluss auf die Messung, sowie das Wissen über das Potential verschiedener Anregungsquellen auf die HTRF[®]-Messung von hohem Wert für die Firma Tecan.

Einige Möglichkeiten für eine HTRF[®]-Performance Verbesserung für den Infinite[®] M1000 wurden entdeckt und überprüft. Dabei hat sich zwar keine Möglichkeit zur sofortigen, kostengünstigen Steigerung der Performance ergeben, aber im Rahmen dieser Arbeit werden einige Verbesserungsmöglichkeiten aufgezeigt, welche dem Infinite[®] M1000 und anderen Mikrotiterplatten-Reader mit Monochromatoren in der weiteren Entwicklung nützlich sein werden. Es wurden Verbesserungsmöglichkeiten für allgemeine Messeinstellungen sowie durch Änderung der Anregungsquelle und des Optikpfades entdeckt und verifiziert.

Die Messeinstellungen zu überprüfen und experimentell zu verändern war sehr wichtig, um den Messmodus und den verwendeten Assay besser zu verstehen. Durch das genaue Anregungsspektrum des Donors lässt sich die Wellenlänge für mögliche Filter besser bestimmen. Beim Emissionsspektrum des Donors wurde der Emissionssignal-Peak bei 586 nm noch einmal genau angesehen und mit Messungen des RCKs untersucht. Dabei wurde, wie in Abbildung 38 dargestellt, eine Verbesserung der Messung ermöglicht. Dabei handelt es sich aber nur um eine Verbesserung der Donormessung, die zwar einen positiven Einfluss auf die gesamte ratiometrische Auswertung hat, allerdings nicht für die im Infinite[®] M1000 problematische Akzeptormessung. Dabei wurde von der Firma cisbio bestätigt, dass eine 586 nm Donormessung ein höheres Signal liefert und die ursprüngliche 620 nm Messung aus historischen Gründen noch Bestand hat. Jedoch muss bei zellulären Proben bei der 586 nm Donormessung mit einem höheren Hintergrundsignal gerechnet werden. Zelluläre Assays konnten auf Grund von zu hohen Kosten nicht überprüft werden. Auch in Publikationen sind HTRF[®]-Messungen zu finden, die das Donorsignal bei 586 nm Wellenlänge messen. Beim Hochdurchsatz-Screening für niedermolekulare Inhibitoren von Mint1-PDZ-Domänen wurde die Donoremission beispielsweise bei 590 nm gemessen. [21]

Die UV-LED als Anregungsquelle hat keine sehr überzeugenden Messergebnisse geliefert. Dabei besteht das große Problem darin, dass am Beginn des Projektes die Fluoreszenz-Lebensdauer des Akzeptorsignals für gleich lang wie die des Donors, welches von den Herstellern immer angegeben wird, angenommen wurde. Darum sind die HTRF[®]-Messungen

mit langen Pulsdauern (über 200 μs) nicht gut geeignet. Da die UV-LED im Vergleich zur Xe-Blitzlampe wenig Energie pro Zeit emittiert, muss dies gerade durch längere Pulsbreiten kompensiert werden. Ein Vergleich von UV-LED und Blitzlampe ist in Tabelle 12 dargestellt, um den Unterschied der beiden Lichtquellen zu verdeutlichen. Um gleichviel Energie/Puls zu erzeugen, ist mehr als die 1000fache Pulsdauer erforderlich. Der Wellenlängenbereich der Messung war wieder auf 300 bis 330 nm festgelegt. Mit den Blitzlampenmodulen wurden ähnlich gute Ergebnisse erzielt wie mit dem unmodifizierten Gerät (siehe Tabelle 10). Dadurch ist es nicht möglich eine Entwicklung eines eigenen Blitzlampenanregungsmoduls für die HTRF[®]-Messung zu vertreten. Dennoch ist die Performance schon um einiges besser im Vergleich zu dem Messaufbau mit einer UV-LED als Anregungsquelle. Somit verspricht diese Option aktuell mehr Potential. Jedoch für weitere Entwicklungen ist die UV-LED durch ihre schnelle technische Entwicklung durchaus zu berücksichtigen.

Um eine noch bessere Möglichkeit als die Blitzlampenmodule zu zeigen, wurde auch eine Messreihe mit der 40 W Xe-Blitzlampe die bereits im Gerät vorhanden war, aber anstelle des Anregungsdoppelmonochromator mit einem Filter für die Wellenlängenselektion, durchgeführt..

Tabelle 12: Vergleichswerte zwischen Blitzlampe und UV-LED

	40 W Blitzlampe (M1000)	UV-LED (1A)
Pulsdauer	1 μs	1000 μs
Energie/Puls	$\sim 4 \mu\text{J}$	$\sim 3 \mu\text{J}$
Leistung	$\sim 4 \text{ W}$	$\sim 0,003 \text{ W}$

UV-LED

Durch das kurzlebige Akzeptorsignal musste versucht werden, soviel Lichtenergie wie möglich in möglichst kurzer Pulsdauer zu emittieren. Wie in Tabelle 12 gezeigt, ist eine UV-LED aber nicht dafür ausgelegt, da diese nur geringe Leistungen besitzen. Um die UV-LED aber in Hinblick auf die HTRF[®]-Messungen vollständig einschätzen zu können, wurde diese mit 5 A Strom versorgt und am absoluten Maximum betrieben, um dadurch die bestmögliche Performance zu erzielen. Die Ergebnisse der Tabelle 7 zeigen sehr gut, dass bei Pulsbreiten von 100 und 200 μs durchaus Potential für die Zukunft besteht. Doch um wirklich Einsatz in einem Gerät wie dem Infinite[®] M1000 zu finden, müsste sich die Lichtleistung der UV-LED mindestens verdoppeln, um die Entwicklungskosten einer solchen Erweiterung zu

rechtfertigen. Da sich die emittierte Leistung zwischen 2009 bis 2011 ungefähr verdoppelt hat, ist diese Möglichkeit in ein paar Jahren sicher wieder interessant. [22]

Eine Verdoppelung bedeutet eine Lichtenergie von über 6 μJ für einen freistrahloptischen Einbau und über 10 μJ für eine Lichtfasereinkopplung an der Probe. Das würde für eine Freistrahloptik eine Lichtleistung von über 120 mW der UV-LED bei einer maximalen Pulsbreite von 100 μs bedeuten.

Der freistrahloptische Aufbau ist zwar ein wenig aufwendiger, war aber durch das bereits vorhandene Modul im Gerät und den geringen Platzbedarf der UV-LED, leicht zu verwirklichen. Da die Quarzfaser nur etwa 60 % des eingekoppelten Lichts durchlässt, ist die Freistrahloptik zu bevorzugen, wie auch die Tabelle 6 zeigt.

Die Messungen mit einer Quarzfaser für die Lichteinkopplung zur Probe waren schwierig durchzuführen, da bei einem nicht optimalen zusammengestellten Messassay zuwenig Signal emittiert wird und die Verstärkung des PMT über das Maximum gehen müsste. Dies ist problematisch, da bei zuwenig Signal der CV-Wert steigt und damit die Reproduzierbarkeit der Messung sinkt und bei maximaler angelegten Spannung am PMT das Probensignal nicht mehr korrekt gemessen werden kann. Deshalb war das Absenken der Verstärkung des Photomultipliers durch mehr Signal das wichtigste Ziel. Dies konnte mit der UV-LED in keiner Messung überzeugend erreicht werden. Die Vorteile der UV-LED lagen in der flexiblen Ansteuerung. Dabei konnten Pulsbreite, Versorgungsstrom und Blitzwiederholungs-Frequenz weitgehend variiert werden. Somit könnte die Messdauer durch Erhöhung der Frequenz verkürzt werden und dabei die Anzahl der Blitze (Flashes) pro Messung erhöht werden, um eine höhere Anzahl an Mittelungen und somit eine kleinere Varianz zu erhalten. Auch ein hohes Signal/Blank Verhältnis gehört zu den Vorteilen der UV-LED, da die Nachleuchtdauer kürzer ist. Damit verbunden wird auch eine niedrigere Wartezeit bis zur Messung benötigt, was die Werte Low- und High-Control verbessert. Jedoch ist die emittierte Lichtenergie pro Zeit der UV-LED beim aktuellen Stand der Technik zu niedrig. Ein weiterer Nachteil ist die unflexible Anregungswellenlänge der Probe, die durch die LED fix vorgegeben ist. Da es von der Firma cisbio auch andere verwendete Kryptate als Donor gibt, ist eine flexible Anregungswellenlängen wie beim Monochromator oder wechselnden Filterschlitten mit Blitzlampe von Vorteil.

Blitzlampenmodul

Da die UV-LED nicht die gewünschte Verbesserung der HTRF[®]-Performance brachte, wurde auch ein Xe-Blitzlampenmodul als Anregungsquelle getestet. Es war der nächste logische Schritt, da die Blitzlampe viel Energie pro Zeit, sprich Leistung, abgibt. Es wurde ein Blitzlampenmodul verwendet, dies bedeutet Netzteil und Blitzlampe in einem kleinen kompakten Gehäuse vereint, weil ansonsten der Platzbedarf zu hoch wäre. Da die Lichteinkopplung gleich funktionierte wie bei dem aktuellen HTRF[®]-Messmodus musste anstelle des Monochromators nur eine Linse und ein Filter vor die verwendete Quarzfasern platziert werden. Das dafür verwendete Filter ergab sich aus Vergleichstests. Die Ergebnisse in Tabelle 10 zeigen, dass das verwendete 335 ± 60 nm Filter mit dem 10 W Xe-Blitzlampenmodul gute Ergebnisse erzielt. Nachteilig sind die längeren Wartezeiten bei den Blitzlampentests mit nur einem Filter im Gegensatz zu einem Monochromator, der den Hintergrund besser blockt. Dadurch erhöht sich die lag-time von 60 μ s auf einen Wert zwischen 120 und 150 μ s, je nach Blitzlampe und Messung. Dadurch sind auch die schlechteren Werte von DeltaF-LowC, und DeltaF-HighC zu erklären, die bei höherer Wartezeit stärker abklingen. Da auch das Akzeptorsignal schneller abfällt als das des Donors werden die Low- und High-Kontrollwerte über die ratiometrische Auswertung kleiner. Vorteilhafter ist der breite Wellenlängenbereich des Anregungslichtes, so dass auch verschiedene HTRF[®]-Fluorophore angeregt werden könnten.

40 W Blitzlampe

Da für ein Monochromatorgerät eine sehr starke Probenanregung erforderlich ist, weil die Emissionsseite des Messsystems einen Doppelmonochromator zur Wellenlängenselektion besitzt, wurde eine Messreihe mit der 40 W Xe-Blitzlampe des Gerätes selbst durchgeführt. Dabei wurde der Doppelmonochromator der Exzitationsseite entfernt und durch ein Linsensystem und ein Filter ersetzt. Dieser Aufbau ist als ergänzendes Modul wegen seiner Größe nicht geeignet. Allerdings ist für zukünftige Entwicklungsideen wie zweier Lichtpfade, wobei einer in den Doppelmonochromator führt und einer durch ein Filter führt und für die HTRF[®]-Messung vorgesehen, ist eine Messreihe mit der aktuellen 40 W Xe-Blitzlampe interessant und aussagekräftig. In Tabelle 11 ist diese Messreihe mit der 40 W Xe-Blitzlampe gezeigt. Man sieht eine deutliche Verbesserung des Gain Wertes und damit verbunden eine deutliche Verbesserung der Messvarianz und der Standardabweichungen. Die DeltaF-LowC, und DeltaF-HighC Werte sind wieder etwas niedriger, konnten aber durch die Bandbreitenverkleinerung sehr nahe zu den Werten der ursprünglichen HTRF[®]-Performance

gebracht werden. Das Signal/Blank Verhältnis ist ebenfalls minimal schlechter geworden. Dieses kann durch minimale Verlängerung der Wartezeit verbessert werden, aber da diese leichte Verschlechterung kein Problem für die HTRF[®]-Messung darstellt, wurde auf die Änderung verzichtet. Das Hauptproblem, der zu geringe Lichtenergie an der Probe und der damit verbundenen zu hohen Verstärkung am PMT und daraus resultierenden schlechten CV-Werte, die wiederum mehrere Blitze pro Messung nötig machten um überhaupt in dem erlaubten Bereich des CV-Wertes zu gelangen, wurde mit der 40 W Xe-Blitzlampe ausgeräumt. Wie in Tabelle 11 in der letzten Zeile gezeigt ist, kann auch die Messzeit durch weniger Blitze pro Messung bei gleichzeitiger besserer Performance deutlich gesenkt werden. Zusätzlich ist noch anzumerken, dass bei einer Freistrahloptik eine weitere Lichtenergiesteigerung um den Faktor 1,5 im Vergleich zur getesteten Fasereinkopplung erreicht wird. Der Optikaufbau konnte durch Platzmangel nicht optimal ausgeführt werden und hat daher ebenfalls Verbesserungspotential.

Somit ist die Methode mit einer starken Blitzlampe und Filter auf der Anregungsseite für ein Messgerät wie den Infinite[®] M1000 mit Doppelmonochromator an der Emissionsseite am besten geeignet. Doch leider erfordert eine solche Änderung im Gerät einen sehr hohen Entwicklungs- und Kosteneinsatz. Jedoch für zukünftige Entwicklungen am Infinite[®] M1000 und anderen Geräten mit Monochromatoren werden die Erkenntnisse und angegebenen Mindestanforderungen für die UV-LED in dieser Arbeit als eine wertvolle Hilfestellung und Entscheidungsstütze dienen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] “Homogeneous Time Resolved Fluorescence (HTRF[®]) – A Reference Technology Dedicated to Drug Screening” François Degorce
<http://www.iptonline.com/articles/public/CISOLART.pdf> [21.3.2012]
- [2] Degorce F, Card A, Soh S, Trinquet E, Knapik GP, Xie B: HTRF: A Technology Tailored for Drug Discovery –A Review of Theoretical Aspects and Recent Applications. *Journal of Current Chemical Genomics* 3: 22–32 (2009)
- [3] Leister KP, Huang R, Goodwin BL, Chen A, Austin CP, Xia M: Two High Throughput Screen Assays for Measurement of TNF- α in THP-1 Cells. *Journal of Current Chemical Genomics* 5: 21–29 (2011)
- [4] “Tecan’s new Infinite[®] M1000 – the future of microplate detection has just arrived” European pharmaceutical review, kdm communications limited
<http://www.europeanpharmaceuticalreview.com/7323/news/featured-news/tecans-new-infinite%C2%AE-m1000-%E2%80%93-the-future-of-microplate-detection-has-just-arrived/> [25.3.2012]
- [5] „TR-FRET Basics“ Cisbio Bioassays
http://www.htrf.com/technology/htrftheory/tr_basics/#principles [25.3.2012]
- [6] „HTRF[®] Ratio & Data Reduction“ Cisbio Bioassays
http://www.htrf.com/technology/htrfmeasurement/radio_data_reduction/ [25.3.2012]
- [7] „Homogeneous Time-Resolved Fluorescence“ HTRF[®] application note, Cisbio Bioassays
<http://www.htrf.com/documents/AN-htrf-methodological-Part1-and-2.pdf> [25.3.2012]
- [8] „Infinite[®] M1000 PRO - top class microplate reader with premium Quad4 Monochromators™“ Tecan
<http://www.tecan.com/platform/apps/product/index.asp?MenuID=3789&ID=8038&Menu=1&Item=21.2.10.8> [25.3.2012]
- [9] „Premium Quad4 Monochromators™ technology for microplate readers“ Tecan
<http://www.tecan.com/platform/apps/product/index.asp?MenuID=3793&ID=8042&Menu=1&Item=21.2.10.8> [25.3.2012]
- [10] “i-control™ – Microplate Reader Software“ Tecan
<http://www.tecan.com/platform/apps/product/index.asp?MenuID=1817&ID=1924&Menu=1&Item=21.2.10.8.7> [25.3.2012]
- [11] Technical Manual for infinite[®] M1000, No. 30036267 Rev No. 1.0, Tecan (2008)
- [12] „Firmware“ Wikipedia- Die freie Enzyklopädie
<http://de.wikipedia.org/wiki/Firmware> [25.3.2012]

- [13] Tietze U, Schenk C: *Halbleiter-Schaltungstechnik*. Berlin - Heidelberg, Springer Verlag (2002) S. 795-802
- [14] „Ball Lens (BL)” Sensor Electronic Technology, Inc. (SETi) <http://www.s-et.com/spec-sheets/ball-lens.pdf> [25.3.2012]
- [15] „Numerische Apertur“ Wikipedia- Die freie Enzyklopädie http://de.wikipedia.org/wiki/Numerische_Apertur [25.3.2012]
- [16] Bille J, Schlegel W: *Medizinische Physik 3: Medizinische Laserphysik*. Berlin - Heidelberg, Springer Verlag (2005) S. 40-43
- [17] „FRED“ Wikipedia- Die freie Enzyklopädie <http://de.wikipedia.org/wiki/FRED> [25.3.2012]
- [18] „Transmissionsspektrum“ Dünnschicht-Technik GmbH, Tafelmair (2002)
- [19] „Konstruktionszeichnung Fluoreszenz-Kondensator“ Rodenstock (1998)
- [20] „Dispersion“ Brechungsindex von Quarzglas in Abhängigkeit von der Wellenlänge, Wikipedia- Die freie Enzyklopädie http://de.wikipedia.org/wiki/Dispersion_%28Physik%29 [25.3.2012]
- [21] Chen X, Longgood JC, Michnoff C, Wei S, Frantz DE, Bezprozvanny L: High-throughput screen for small molecule inhibitors of Mint1-PDZ domains. *Journal of Assay and Drug Development Technologies* 5(6):769-83 (2007)
- [22] „UV-LED market“ Shenzhen Lamplic Technology Co., Ltd <http://www.uvledcn.com/news/25.html> [25.3.2012]
- Mathis G: HTRF[®] Technology. *Journal of Biomolecular Screening* 4: 309 (1999)
- Gabourdes M, Bourguine V, Mathis G, Bazin H, Alpha-Bazin B: A homogeneous time-resolved fluorescence detection of telomerase activity. *Journal of Analytical Biochemistry* 1;333(1):105-13 (2004)
- Hüser J: *High-throughput screening in drug discovery*. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA S. 120-122 (2006)
- Vogel HG: *Drug discovery and evaluation: pharmacological assays*. Berlin –Heidelberg, Springer Verlag Seite 9-14 (2002)
- Periasamy A, Day RN: *Molecular imaging: FRET microscopy and spectroscopy*. New York, Oxford University Press Inc (2005)
- Mathis G: Probing molecular interactions with homogeneous techniques based on rare earth cryptates and fluorescence energy transfer. *Journal of Clinical Chemistry* 41(9):1391-7 (1995)

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überlappende Spektren der Donoremission und der Akzeptoranregung.....	12
Abbildung 2: Ablauf der Signalentstehung bei Donor- Akzeptorbindung des HTRF [®] -Assays am Beispiel einer Bindung der Oberflächenmoleküle CD86 und CD28 [5].....	13
Abbildung 3: Emissionsspektrum von Europium und Terbium Kryptat [2].....	14
Abbildung 4: XL665 (Akzeptorfluorophor) Struktur und Emissionsspektrum [6].....	14
Abbildung 5: Signalverlauf des Donors über die Zeit, Daten von der Firma Cisbio zur Verfügung gestellt	15
Abbildung 6: Signalverlauf des Akzeptors über die Zeit, Daten von der Firma Cisbio zur Verfügung gestellt	16
Abbildung 7: zeitliche Messabfolge eines HTRF [®] -Signals [2]	17
Abbildung 8: Messung bei 620 nm für Donorsignal (kein FRET) und 665 nm für Akzeptorsignal (FRET), dabei bleibt das Verhältnis (Akzeptor/Donor) trotz unterschiedlicher Transmission gleich [7]	18
Abbildung 9: Aufbau und Komponenten eines HTRF [®] Reader Control Kit	20
Abbildung 10: Aufbau des Premium Quad4 Monochomators [™] im Infinite [®] M1000, Exzitationsseite links und Emissionseite rechts [9]	24
Abbildung 11: Screenshot des verwendeten Mess-Workflows für HTRF [®] RCK-Messungen für den Infinite [®] M1000	26
Abbildung 12: Lichtweg bei einer HTRF [®] -Messung über die Doppelmonochromatoren [11]	27
Abbildung 13: von links nach rechts: Netzteil, Funktionsgenerator, Oszilloskop und das Leistungsmessgerät aus Tabelle 2	32
Abbildung 14: Strom- Spannungsverlauf der UV-LED.....	33
Abbildung 15: Signalverläufe bei steigender Pulsdauer	34
Abbildung 16: Schaltplan zum Testen der verschiedenen Stromquellen.....	36
Abbildung 17: Ein- und Ausschaltverhalten der Elektronik und UV-LED bei der ausgewählten Operationsverstärkungsschaltung	37
Abbildung 18: Einschaltverhalten der Elektronik und UV-LED bei der ausgewählten Operationsverstärkungsschaltung.....	38
Abbildung 19: Schaltplan der Spannungsversorgung für 14,6 V Versorgungsspannung.....	39
Abbildung 20: Schaltplan der Platine, die für die UV-LED Ansteuerung verwendet	40
Abbildung 21: Foto der Platine, die für die UV-LED Ansteuerung verwendet wurde.....	41

Abbildung 22: Strahlencharakteristik der UV-LED mit Balllinse [14]	44
Abbildung 23: Abstrahlwinkel der UV-LED mit Balllinse [14].....	44
Abbildung 24: Schematische Darstellung des Lichtfaseroptikaufbaus.....	46
Abbildung 25: Transmissionsspektrum des verwendeten 335 ± 60 nm Filter.....	47
Abbildung 26: Provisorisches Messmodul für die Messung mit Lichtfaseroptik.....	48
Abbildung 27: Schematische Darstellung des Messaufbaues mit Freistrahloptik	49
Abbildung 28: Ein Ausschnitt aus der FRED Optical Software mit der der Linsenabstand ermittelt wurde	51
Abbildung 29: Transmissionsspektrum des dichroitischen Spiegels [18]	52
Abbildung 30: Die drei Bauteile für den Messaufbau des Freistrahloptikmoduls.....	53
Abbildung 31: Versorgung des Blitzlampenmoduls mit der Hauptplatine im Gerät über ein modifiziertes Kabel (rot eingekreist).....	56
Abbildung 32: Schematische Darstellung des Messaufbaues des Blitzlampenmoduls	58
Abbildung 33: Vergleich der Transmissionsspektren der beiden getesteten Filter.....	59
Abbildung 34: Ausschnitt aus der Kondensorlinsezeichnung, wobei rechts die Quelle und links das Objekt liegen [19]	60
Abbildung 35: Brechungsindex von Quarzglas in Abhängigkeit von der Wellenlänge [20]...	61
Abbildung 36: Anregungsspektrum des Donorsignals	64
Abbildung 37: Emissionsspektrum des Donors	65
Abbildung 38: Verbesserung der HTRF [®] -Messung durch Änderung der Detektionswellenlänge auf 586 nm.....	66
Abbildung 39: Puls-Energiewerte bei unterschiedlichen Pulsdauern der UV-LED	67
Abbildung 40: Energiewerte bei unterschiedlichem durch die UV-LED geschickten Strom..	68

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der Performance des Infinite [®] M1000 mit dem F500 von Tecan und einem Reader der Konkurrenz der auch mit Filtern die Wellenlängen selektiert. ...	9
Tabelle 2: Verwendete Messmittel und deren Funktionen.....	32
Tabelle 3: Vergleich der beiden verfügbaren Blitzlampenmodule	54
Tabelle 4: Pinbelegung vom Hauptplatinen Board und den Blitzlampenmodul und die nötige Veränderung des Bandleitungskabels.	56
Tabelle 5: Parameter, die durch die verschiedenen Messeinstellungen beeinflusst werden	64
Tabelle 6: Vergleichswerte der Lichttransmission zwischen Freistrahloptik und Lichtfaseroptik	68
Tabelle 7: Vergleich zwischen Freistrahloptik und Lichtfaseroptik	69
Tabelle 8: Farbkodierung um den Vergleich zur aktuellen Performance zu veranschaulichen	70
Tabelle 9: Abhängigkeit der vier Qualitätskennzahlen des RCK von Frequenz und Flashanzahl.....	71
Tabelle 10: Vergleichsmessungen mit dem Blitzlampenmodul und den beiden unterschiedlichen Filtern	72
Tabelle 11: Vergleichsmessungen mit der 40 W Geräteblitzlampe mit den beiden unterschiedlichen Filtern	73
Tabelle 12: Vergleichswerte zwischen Blitzlampe und UV-LED	75

Anhang:

- Blitzlampenmodul (10W) PAX-Serie von Excelitas
- Blitzlampenmodul (5W) L1131-Serie von Hamamatsu
- Blitzlampe (40W) 1100-Serie von Excelitas
- PMT R9110 von Hamamatsu
- 74HC123 von NXP Semiconductors
- TPS5430 von Texas Instruments

PAX-10™

10-Watt Precision-Aligned Pulsed Xenon Light Source



Overview

The PAX-10™ by Excelitas is a Precision-Aligned Pulsed Xenon Light Sources offering a full 10 Watts of power. It's compact design integrates the flash lamp, trigger circuit, and power supply in an EMI-suppressant enclosure.

The PAX-10 features a pre-aligned arc position precisely located relative to a datum feature on the mounting surface of the case. This pre-aligned arc position allows for “plug and play” field replacement, eliminating alignment time and reducing OEMs’ costs and machine down time.

The PAX-10 utilizes Excelitas’ reliable pulsed Xenon flashlamp technology, delivering high radiant intensity over a continuous spectrum from the ultraviolet to the infrared. It provides a long life rating of over a billion flashes and is available in two arc orientations with user-selectable analog or digital intensity control.

The PAX family is the ideal pulsed Xenon light source for clinical diagnostics, invitro diagnostics, life sciences, drug discovery, proteomics, and analytical instrumentation applications.

PRODUCT NOTE

PAX Family of Precision-Aligned Xenon Light Sources

Features and Benefits

- Precision alignment-arc position precisely located (+/- 0.05 mm, 0.002 inches) relative to datum feature on the mounting surface
- Ease of installation and convenient “plug and play” field replacement
- 10 Watts average power
- Long life: >1.0 x 10⁹ flashes
- Spectral range from 120 to 2000+ nm
- Available in two arc orientations
- Integrated package—flash lamp, trigger circuit and power supply, all in a robust EMI suppressant enclosure
- Flexible mounting
- User selectable analog or digital intensity control
- CE Marked and RoHS compliant

Applications

- Absorption analysis
- Immunoassay modules
- Fluorimetry
- Spectroradiometry
- Liquid chromatography
- Colorimetry
- UV/VIS/NIR applications

Input Specifications

Parameter	Specification
Voltage	11-28 VDC
DC Current	2 A maximum
Inrush Current	4 A peak maximum
Trigger ¹	+5 V, 20-50 mA peak input, 10-100 μ s pulse width, leading edge trigger
Vref (Vo/Vref = 210)	1.9 to 4.76 VDC or 12 bit serial interface
Analog or digital control	External switch selectable
Internal/External Intensity Adjust	External switch selectable
Input Connector	9-pin D-sub

NOTE 1: Optically Isolated: Internal series resistor = 150 Ω

Part Number Configuration PAX-10AB-C*

A = Arc Orientation	0 - vertical 1 - horizontal
B = Lamp Type	1 - 1.5 mm arc length, 225 - 2000+ nm 2 - 1.5 mm arc length, 190 - 2000+ nm 3 - 1.5 mm arc length, 120 - 2000+ nm 4 - 3.0 mm arc length, 225 - 2000+ nm 5 - 3.0 mm arc length, 190 - 2000+ nm 6 - 3.0 mm arc length, 120 - 2000+ nm
C = Discharge Capacitor	1 - 0.10 μ F 2 - 0.15 μ F 3 - 0.22 μ F 4 - 0.33 μ F

*** Part Number Example:**
PAX-10 03-1 = vertical arc,
1.5 mm arc length with
120 nm cutoff and 0.10 μ F capacitor

Electrical Output

Parameter	Specification
Main Discharge Voltage	400-1000 VDC +/- 2%
Power	10 Watts
Standard Discharge Capacitors	0.10, 0.15, 0.22, 0.33 μ F
Flash Rate (Hz)	Fmax = 10/E where E = 1/2CV ²

Light Output

Parameter	Specification
Spectral Range	120-2000 + nm
Stability ²	< 1% CV
Life time	> 1 x 10 ⁹ Flashes

NOTE 2: Operating conditions: 0.33 μ F discharge capacitor. 1000 VDC discharge voltage. 10 Hz flash rate.

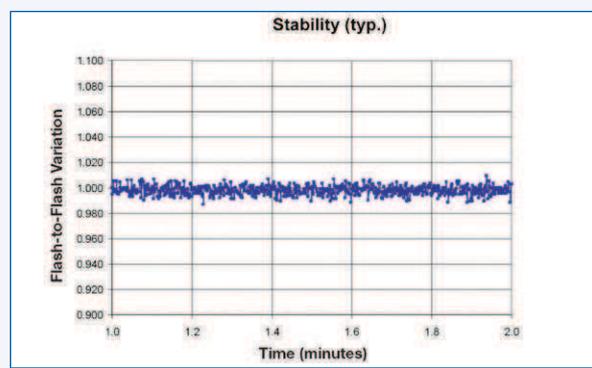
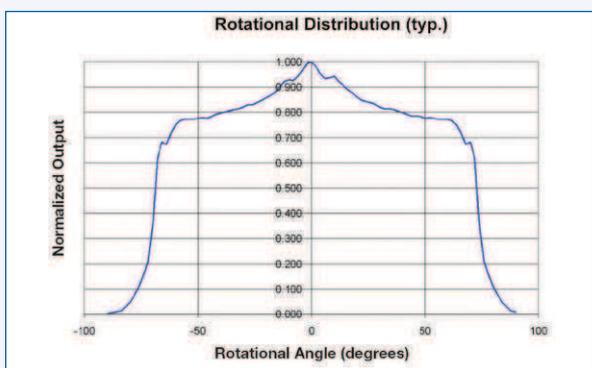
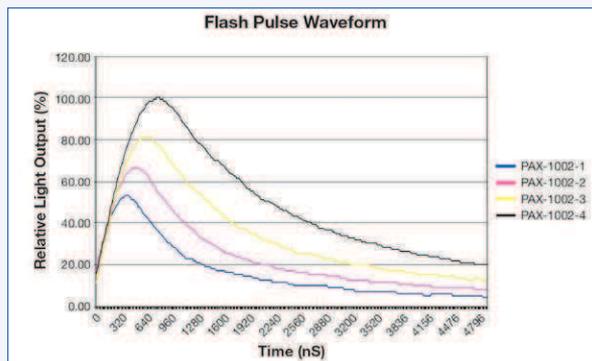
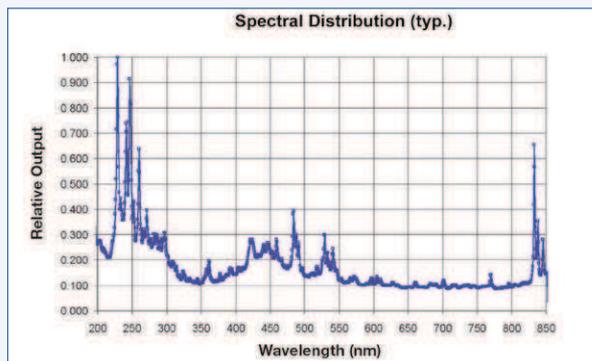
Environmental

Parameter	Specification
Operating temperature	0 to 40 °C
Storage temperature	-40 to 90 °C
Humidity	95% RH, non-condensing
Safety Compliance	CE Marked

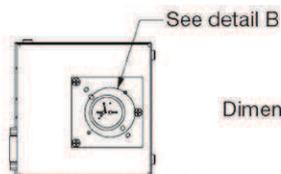
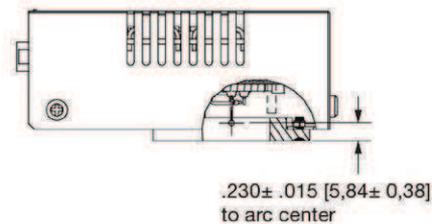
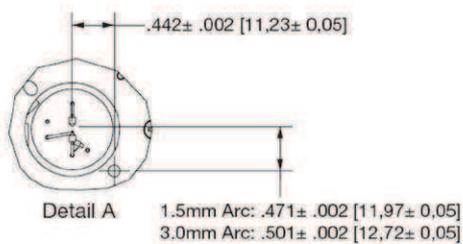
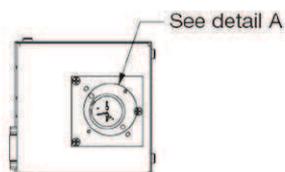
Operating Conditions

Part Number	Main Discharge Capacitor (μ F)	Main Discharge Voltage (V)	Maximum Input Energy per Flash (mJ)	Maximum Repetition Rate (Hz)	Maximum Average Power (W)
PAX-10AB-1	0.10	400	8	1250	10
		600	18	556	
		1000	50	200	
PAX-10AB-2	0.15	400	12	833	10
		600	27	370	
		1000	75	133	
PAX-10AB-3	0.22	400	17.6	568	10
		600	39.6	252	
		1000	110	91	
PAX-10AB-4	0.33	400	26.4	378	10
		600	59.4	168	
		1000	165	60	

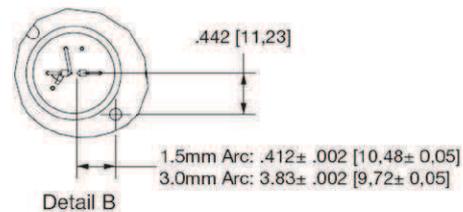
Characteristics



PAX-10 Precision Arc Alignment



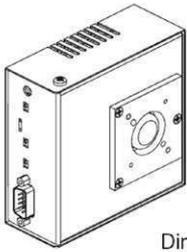
Dimensions: in [mm]



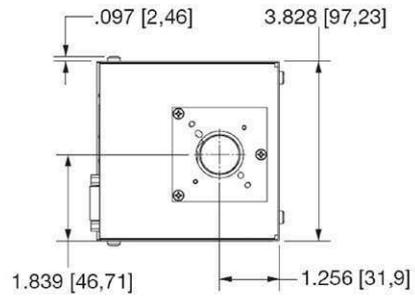
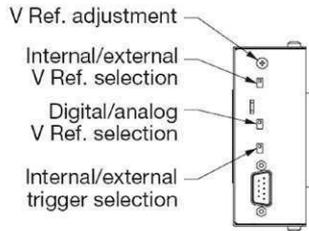
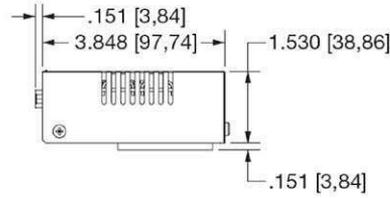
Notes

1. Precision mounting requires dowel pins (pin to protrude .150"±.025, pinØ.1250/.1255).
2. Mounting kit available as an accessory.
3. Alignment provided from pin center to theoretical intersection of electrode tip.

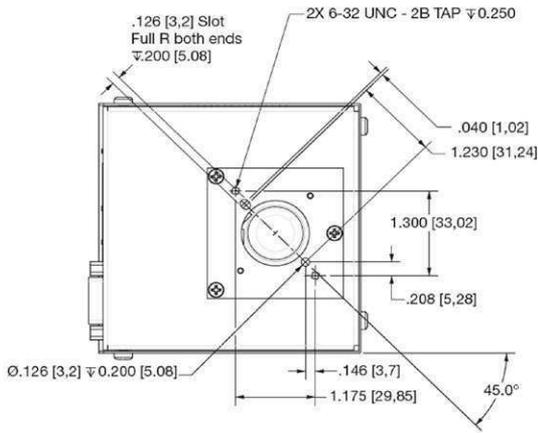
Mechanical Outline



Dimensions: in [mm]



Mechanical Dimensions



Ordering Information

Excelitas has designed an easy to use Evaluation Kit for testing the PAX-10 in your application.

To request additional information, receive a quote, or place an order for the PAX-10, please contact your Customer Support team or visit our website at www.excelitas.com.

All values are nominal; specifications are subject to change without notice.

Excelitas Technologies
 35 Congress Street
 Salem, Massachusetts 01970 USA
 Telephone: (+1) 978.745.3200
 Toll free: (+1) 800.950.3441
 Fax: (+1) 978.745.0894
generalinquiries@excelitas.com
www.excelitas.com

Excelitas Technologies GmbH & Co. KG
 Wenzel-Jaksch-Str. 31
 D-65199 Wiesbaden
 Germany
 Telephone: (+49) 611 492 430
 Fax: (+49) 611 492 165

**Asia Headquarters
 Excelitas Technologies**
 47 Ayer Rajah Crescent #06-12
 Singapore 139947
 Telephone: (+65) 6775-2022
 Fax: (+65) 6775-1008



For a complete listing of our global offices, visit www.excelitas.com/ContactUs

Copyright ©2011 Excelitas Technologies Corp. All rights reserved. Excelitas® is a registered trademark of Excelitas Technologies Corp. All other trademarks are the property of their respective owners. Excelitas reserves the right to change this document at any time without notice and disclaims liability for editorial, pictorial or typographical errors.

LAMP

COMPACT 5 W XENON FLASH LAMP MODULES



①: L9455/L9456 series (side-on type) ②: L11035/L11036 series (head-on type) ③: L11316/L11317 series (high output type)
④: L9455/L9456 series (SMA fiber adapter type) ⑤: L9455/L9456 series (High precision type) ⑥: L9455/L9456 series (Silent type)
* SMA fiber is optional (sold separately).

OVERVIEW

Hamamatsu offers compact xenon flash lamp modules containing a 5 W xenon flash lamp along with its power supply and trigger socket. Up to 5 W of energy can be input, which is the maximum among lamp modules of this size. These xenon flash lamp modules also deliver high stability and long service life making them ideal as a light source for water quality and atmosphere analyzers.

Different types of lamp modules are provided: the L9455/L9456 series side-on type, the L11035/L11036 series head-on type, and the L11316/L11317 series with higher light output twice that of the other lamp modules currently in use.

Also offered are the SMA fiber adapter type, silent type, and high precision type.

APPLICATIONS

- Blood analyzers
- Air pollution analysis
- Microplate readers
- Semiconductor inspection
- Laboratory testing
- Water quality and pollution analysis
- Fluorescence spectrophotometers
- Light sources for image processing

FEATURES

* For more details check the specifications for each series.

- High stability... 1.5 % CV or less
- Long life... 1×10^9 flashes or more
- Compact size
- Repetitive emission frequency... 530 Hz Max.
- Broad radiant spectrum
 - ... Covers from UV to near IR
- Compatible with SMA fibers
 - ... No lens design required
- Silent type
 - ... Audible noise reduced to 1/10 or less
- High precision type
 - ... ± 0.05 mm precision
- Internal EMC noise filter
 - ... Electromagnetic noise reduced to CISPR 11 Class B

HAMAMATSU

Highly stable type for analytical instruments

TYPE NUMBER GUIDE

L9455 - **0** **1** - **0** **1** **1**
 ① ② ③ ④ ⑤ ⑥

L11035 - **0** **3** - **0** **1** **1**
 ① ② ③ ④ ⑤ ⑥*

*④, ⑤ and ⑥ are omitted in case of "0".

① Type No.

Type No.	Arc size	Type	Maximum input
L9455	1.5 mm	Side-on	50 mJ
L9456	3.0 mm		
L11035	1.5 mm	Head-on	50 mJ
L11036	3.0 mm		

* Types with an arc size of 3.0 mm are not available as a module ② with an SMA fiber adaptor.

② Module types

Suffix	Type
0	Standard
1	SMA fiber adaptor
2 *	Silent
4 *	High precision

*: Make to order

③ Main discharge capacitance

Suffix	Capacitance
1	0.22 μ F
2	0.11 μ F
3	0.047 μ F
4	0.28 μ F

④ Lamp window material

Suffix	Window material (emission spectral range)
0	UV glass (185 nm to 2000 nm)
1 *	Borosilicate glass (280 nm to 2000 nm)
2 *	Synthetic silica (160 nm to 2000 nm)

*: Make to order

⑤ EMC noise filter

Suffix	Noise filter
0	Not included
1 *	Included

*: Make to order

⑥ Lamp electrode angle (with respect to longitudinal direction of package)

Suffix	Electrode angle
0	0 ° (vertical)
1 *	90 ° (horizontal)

*: Make to order

SPECIFICATIONS

Parameter	L9455 series L11035 series	L9456 series L11036 series	Unit
Arc size	1.5	3.0	mm
Window material	UV glass / borosilicate glass / synthetic silica		—
Spectral range of light output	UV glass	185 to 2000	nm
	Borosilicate glass	280 to 2000	
	Synthetic silica	160 to 2000	
Main discharge voltage variable range *1	400 to 600		V
Main discharge capacitor *2	0.047 / 0.11 / 0.22 / 0.28		μ F
Maximum input energy (per flash) *3	See operating condition table.		—
Maximum average input (continuous) *4	5		W
Light output stability (Max.) *5	2.0	1.5	% CV
Guaranteed life *6	1 \times 10 ⁹		flashes
Input voltage range	11 to 28		V
Input current	1		A
Inrush current	4		A
Trigger input	Rectangular wave 5 V to 10 V; pulse width must be 10 μ s or more. *7		—
Trigger input impedance	330		Ω
Cooling method	Not required *8		—
Weight (standard type: L9455-01)	Approx. 170		g
Operating ambient temperature	0 to +40		°C
Storage ambient temperature	-40 to +90		°C
Storage ambient humidity	Below 95 *9		% RH
Electromagnetic environmental compatibility	Without noise filter	EN61326-1: 2006 Group 1, Class A	—
	With noise filter	EN61326-1: 2006 Group 1, Class B	

NOTE:

- *1 Internal: Adjustable with variable trimmer.
External: Variable with control voltage from 3.2 V to 4.8 V.
- *2 Installed at time of shipment (refer to the above lineups).
- *3 Maximum lamp input energy (per flash)
 $E=1/2 CV^2$
E: Maximum lamp input energy (J)
V: Main discharge voltage (V)
C: Main discharge capacitance (F)
- *4 Maximum average lamp input (continuous)
 $W=E \times f$
f: Lamp emission repetition frequency (Hz)
- *5 Light output stability is given by:
Light output stability (% CV) =
light output standard deviation /
average light output \times 100
- *6 At 5 W operation
- *7 Only for external control;
synchronized with rising edge.
- *8 Cooling is required when the package temperature exceeds 50 °C during operation.
- *9 No condensation

VIBRATION AND SHOCK RESISTANCE

Resistance to vibration: 5 Hz to 200 Hz, 15 m/s²

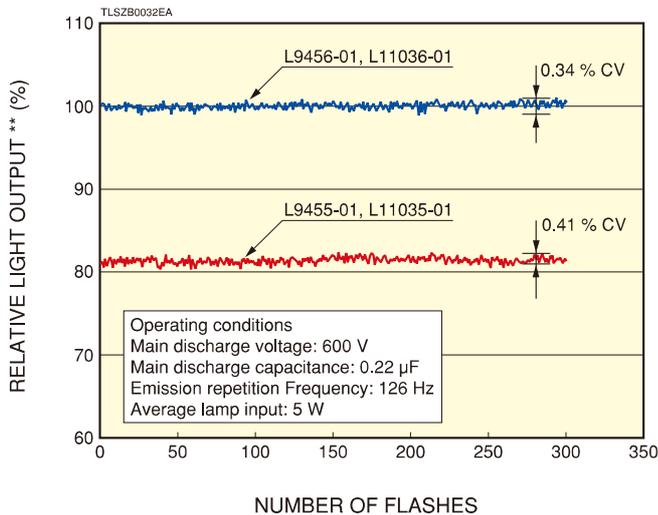
Resistance to shock: 500 m/s²

OPERATING CONDITIONS

Type No.	Main discharge capacitor (μF)	Main discharge voltage (V)	Maximum input energy [per flash] (mJ)	Maximum repetition rate (Hz)	Maximum input (W)
L945□ - □1 type L1103□ - □1 type	0.22	400	17.6	284	5.0
		500	27.5	182	5.0
		600	39.6	126	5.0
L945□ - □2 type L1103□ - □2 type	0.11	400	8.8	530	4.7
		500	13.8	362	5.0
		600	19.8	252	5.0
L945□ - □3 type L1103□ - □3 type	0.047	400	3.8	530	2.0
		500	5.9	530	3.1
		600	8.5	530	4.5
L945□ - □4 type L1103□ - □4 type	0.28	400	22.4	223	5.0
		500	35.0	142	5.0
		600	50.4	100	5.0

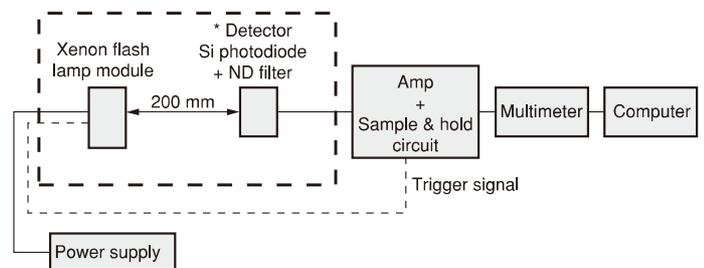
CHARACTERISTICS

●Light output stability * (typical initial value)



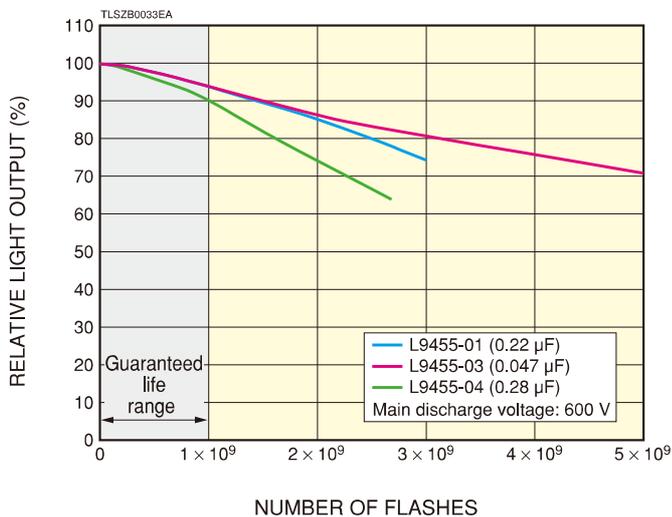
* Light output stability (% CV) = light output standard deviation / average light output × 100
** Output value with average light output of L9456-01 set to 100%.

Measurement block diagram

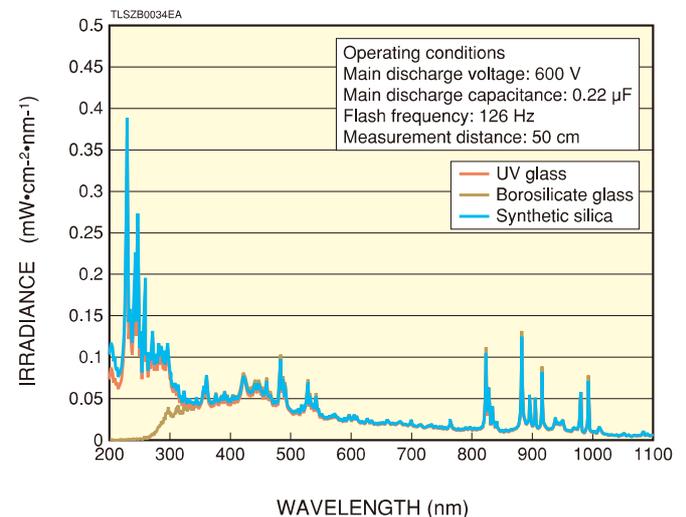


TLSZC0009EA

●Life characteristics



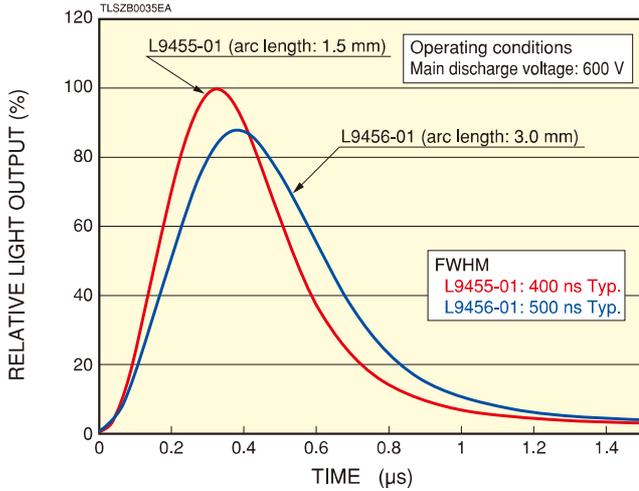
●Emission spectrum (L9455-01 series)



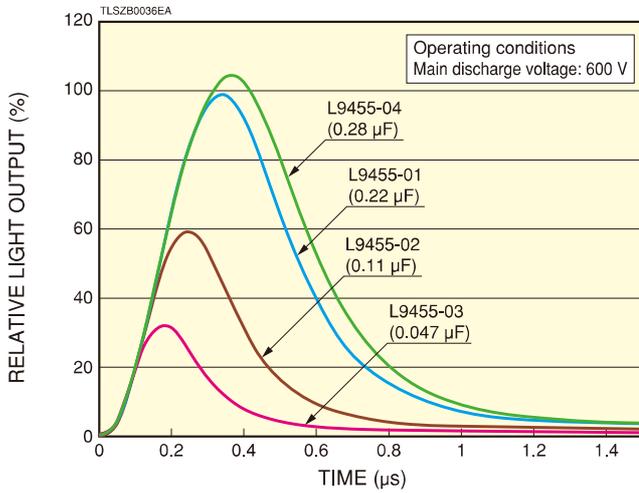
CHARACTERISTICS

● Emission pulse waveform

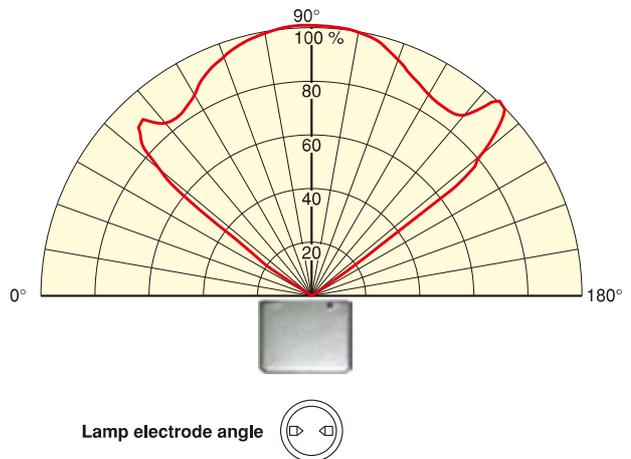
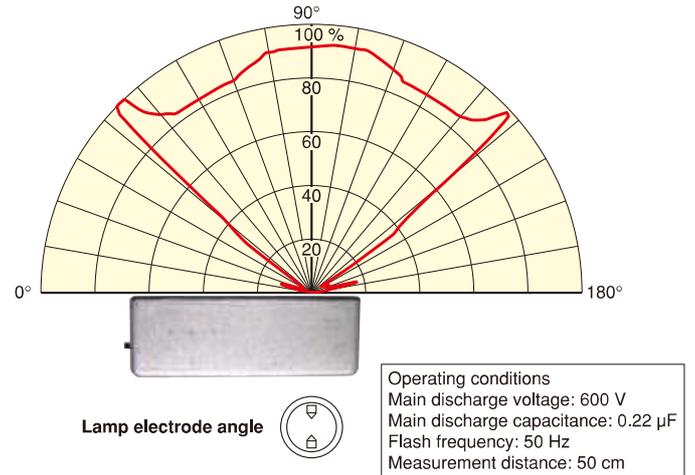
Waveform difference by arc length



Waveform difference by main discharge capacitance



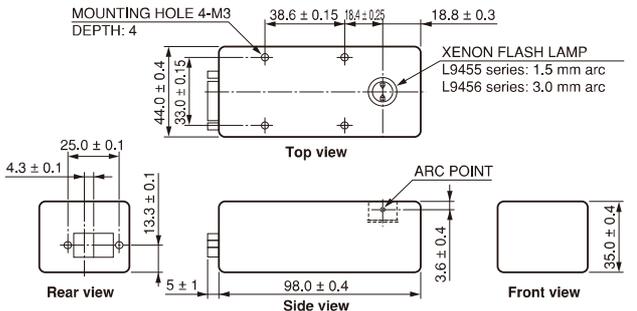
● Emitted light distribution (L9455/L9456 series)



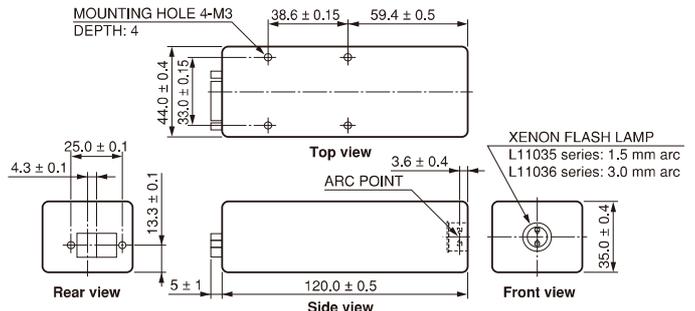
DIMENSIONAL OUTLINES (unit: mm)

Standard type

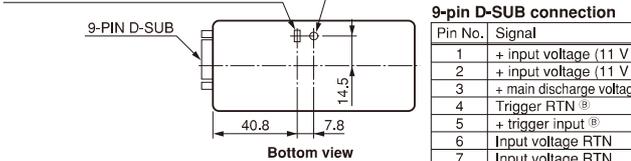
● L9455-0□ series, L9456-0□ series



● L11035-0□ series, L11036-0□ series



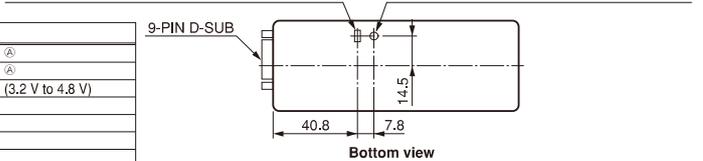
INTERNAL/EXTERNAL SELECTOR SWITCH FOR MAIN DISCHARGE VOLTAGE



Pin No.	Signal
1	+ input voltage (11 V to 28 V) [Ⓐ]
2	+ input voltage (11 V to 28 V) [Ⓐ]
3	+ main discharge voltage control (3.2 V to 4.8 V)
4	Trigger RTN [Ⓑ]
5	+ trigger input [Ⓑ]
6	Input voltage RTN
7	Input voltage RTN
8	Main discharge voltage control RTN
9	No connection

[Ⓐ] Input current: 1 A, Inrush current: 4 A
[Ⓑ] Trigger input: 5 V to 10 V rectangular waveform (pulse width: 10 μs or more)
Package must be grounded, for example, by using an M3 screw for mounting holes.

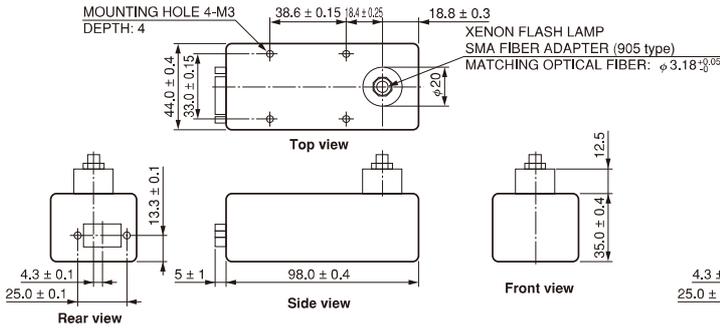
INTERNAL/EXTERNAL SELECTOR SWITCH FOR MAIN DISCHARGE VOLTAGE



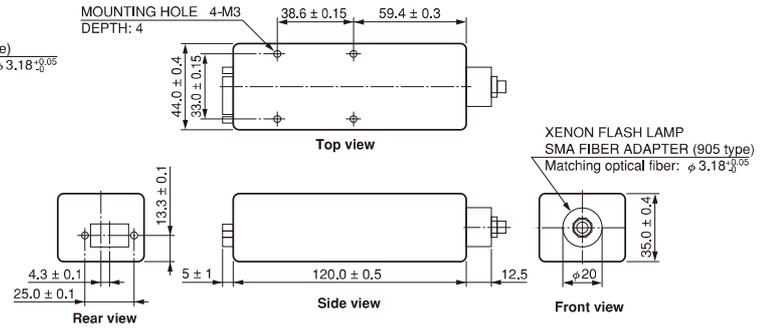
DIMENSIONAL OUTLINES (unit: mm)

SMA fiber adapter type

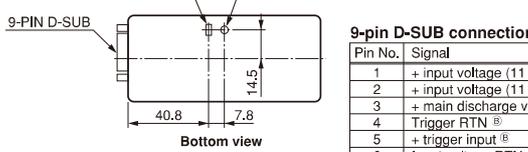
●L9455-1□ series



●L11035-1□ series



INTERNAL/EXTERNAL SELECTOR SWITCH FOR MAIN DISCHARGE VOLTAGE

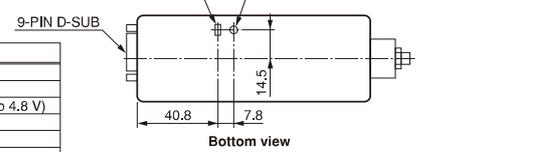


9-pin D-SUB connection

Pin No.	Signal
1	+ input voltage (11 V to 28 V) [Ⓐ]
2	+ input voltage (11 V to 28 V) [Ⓐ]
3	+ main discharge voltage control (3.2 V to 4.8 V)
4	Trigger RTN [Ⓑ]
5	+ trigger input [Ⓑ]
6	Input voltage RTN
7	Input voltage RTN
8	Main discharge voltage control RTN
9	No connection

[Ⓐ] Input current: 1 A, Inrush current: 4 A
[Ⓑ] Trigger input: 5 V to 10 V rectangular waveform (pulse width: 10 μs or more)
 Package must be grounded, for example, by using an M3 screw for mounting holes.

INTERNAL/EXTERNAL SELECTOR SWITCH FOR MAIN DISCHARGE VOLTAGE

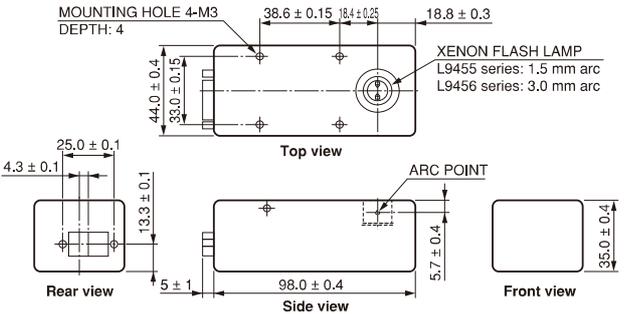


TLSXA0107ED

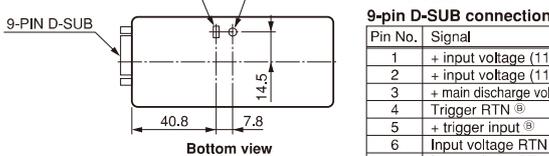
TLSZA0010EB

Silent type Emitting points are different.

●L9455-2□ series, L9456-2□ series



INTERNAL/EXTERNAL SELECTOR SWITCH FOR MAIN DISCHARGE VOLTAGE



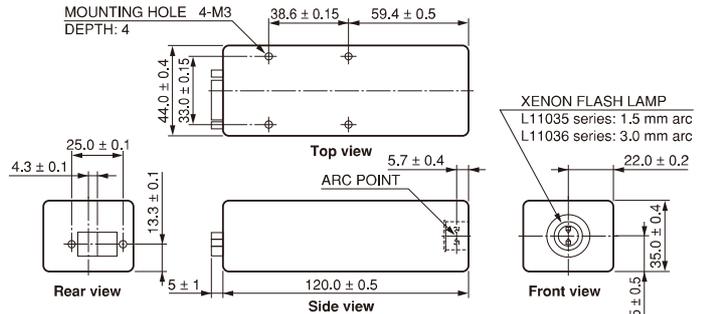
9-pin D-SUB connection

Pin No.	Signal
1	+ input voltage (11 V to 28 V) [Ⓐ]
2	+ input voltage (11 V to 28 V) [Ⓐ]
3	+ main discharge voltage control (3.2 V to 4.8 V)
4	Trigger RTN [Ⓑ]
5	+ trigger input [Ⓑ]
6	Input voltage RTN
7	Input voltage RTN
8	Main discharge voltage control RTN
9	No connection

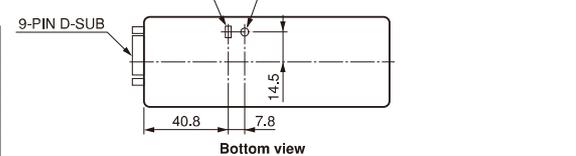
[Ⓐ] Input current: 1 A, Inrush current: 4 A
[Ⓑ] Trigger input: 5 V to 10 V rectangular waveform (pulse width: 10 μs or more)
 Package must be grounded, for example, by using an M3 screw for mounting holes.

TLSZA0014EA

●L11035-2□ series, L11036-2□ series



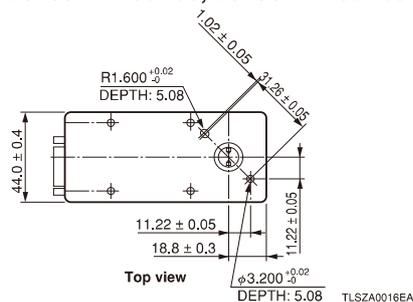
INTERNAL/EXTERNAL SELECTOR SWITCH FOR MAIN DISCHARGE VOLTAGE



TLSZA0015EA

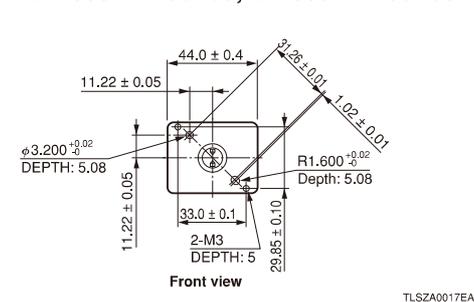
High precision type Positioning pins are provided in the lamp position.

●L9455-4□ series, L9456-4□ series



TLSZA0016EA

●L11035-4□ series, L11036-4□ series



TLSZA0017EA

High output type

TYPE NUMBER GUIDE

L11316 - 4 1 - 0 1 1
 ① ② ③ ④ ⑤ ⑥

L11317 - 0 1 - 1
 ① ② ③ ④ ⑤* ⑥*

*④, ⑤ and ⑥ are omitted in case of "0".

① Type No.

Type No.	Arc size	Type	Maximum input
L11316	1.5 mm	High output	100 mJ
L11317	3.0 mm		

*The L11317 is not available as a module ② with an SMA fiber adapter.

② Module types

Suffix	Type
0	Standard
1	SMA fiber adapter
2*	Silent
4*	High precision

*: Make to order

③ Main discharge capacitance

Suffix	Capacitance
1	0.2 μF
2	0.1 μF

④ Lamp window material

Suffix	Window material (emission spectral range)
0	UV glass (185 nm to 2000 nm)
1*	Borosilicate glass (280 nm to 2000 nm)
2*	Synthetic silica (160 nm to 2000 nm)

*: Make to order

⑤ EMC noise filter

Suffix	Noise filter
0	Not included
1*	Included

*: Make to order

⑥ Lamp electrode angle (with respect to longitudinal direction of package)

Suffix	Electrode angle
0	0° (vertical)
1*	90° (horizontal)

*: Make to order

SPECIFICATIONS

Parameter	L11316 series	L11317 series	Unit
Arc size	1.5	3.0	mm
Window material	UV glass / borosilicate glass / synthetic silica		—
Spectral range of light output	UV glass	185 to 2000	nm
	Borosilicate glass	280 to 2000	
	Synthetic silica	160 to 2000	
Main discharge voltage	Internal	650 to 1000	V
Main discharge voltage variable range *1	External	500 to 1000	
Main discharge capacitance *2	0.1 / 0.2		μF
Maximum input energy (per flash) *3	See operating condition table.		J
Maximum average input (continuous) *4	5		W
Light output stability (Max.) *5	3.0	2.5	% CV
Guaranteed life *6	5 × 10 ⁸		flashes
Input voltage range	21.6 to 26.4		V
Input current	0.75		A
Inrush current	3		A
Trigger input	Rectangular waveform 5 V to 10 V; pulse width must be 10 μs or more *7		—
Trigger input impedance	330		Ω
Cooling method	Not required *8		—
Mass (standard type: L11316-01)	Approx. 560		g
Operating ambient temperature	0 to +40		°C
Storage ambient temperature	-40 to +90		°C
Storage ambient humidity	Below 95 *9		% RH
Electromagnetic environmental compatibility	Without noise filter	EN61326-1: 2006 Group 1, Class A	
	With noise filter	EN61326-1: 2006 Group 1, Class B	

NOTE:

- *1 Internal: Adjustable with variable trimmer.
External: Variable with control voltage from 2.44 V to 4.88 V.
- *2 Installed at time of shipment (refer to the above lineups).
- *3 Maximum lamp input energy (per flash)
 $E=1/2 CV^2$
E: Maximum lamp input energy (J)
V: Main discharge voltage (V)
C: Main discharge capacitance (F)
- *4 Maximum average lamp input (continuous)
 $W=E \times f$
f: Lamp emission repetition frequency (Hz)
- *5 Light output stability is given by:
Light output stability (% CV) = light output standard deviation / average light output × 100
- *6 At 5 W operation
- *7 Only for external control; synchronized with rising edge.
- *8 Cooling is required when the package temperature exceeds 50 °C during operation.
- *9 No condensation

VIBRATION AND SHOCK RESISTANCE

Resistance to vibration: 5 Hz to 200 Hz, 15 m/s²

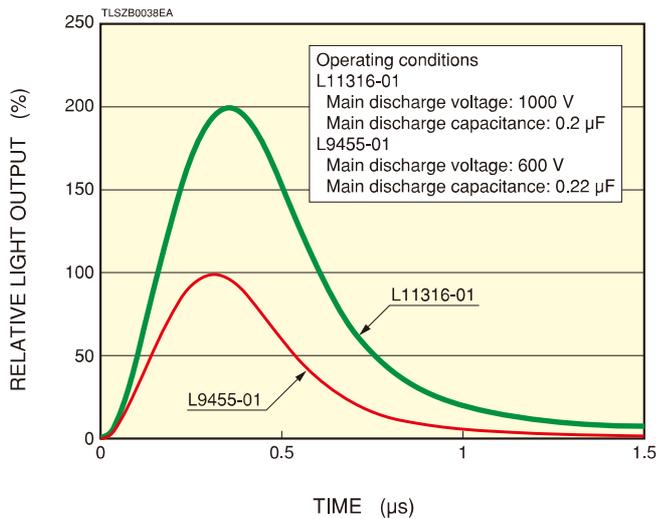
Resistance to shock: 500 m/s²

OPERATING CONDITIONS

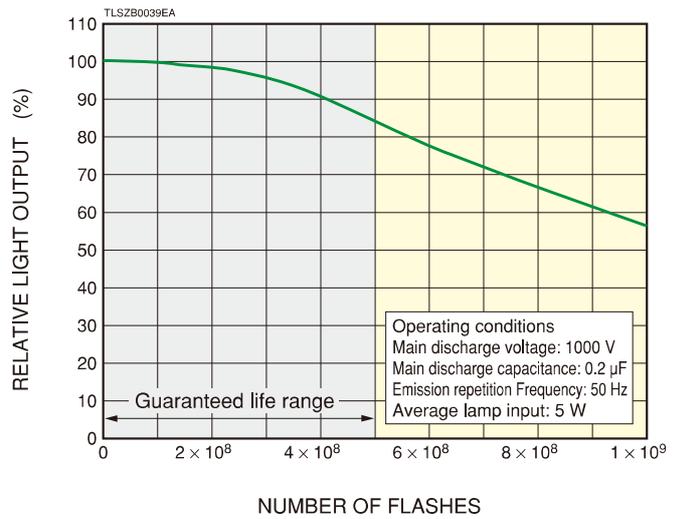
Type No.	Main discharge capacitor (μF)	Main discharge voltage (V)	Maximum input energy [per flash] (mJ)	Maximum repetition rate (Hz)	Maximum input (W)
L1131□-□1 type	0.2	500	25.0	200	5.0
		700	49.0	102	5.0
		1000	100.0	50	5.0
L1131□-□2 type	0.1	500	12.5	400	5.0
		700	24.5	204	5.0
		1000	50.0	100	5.0

CHARACTERISTICS

●Emission pulse waveform



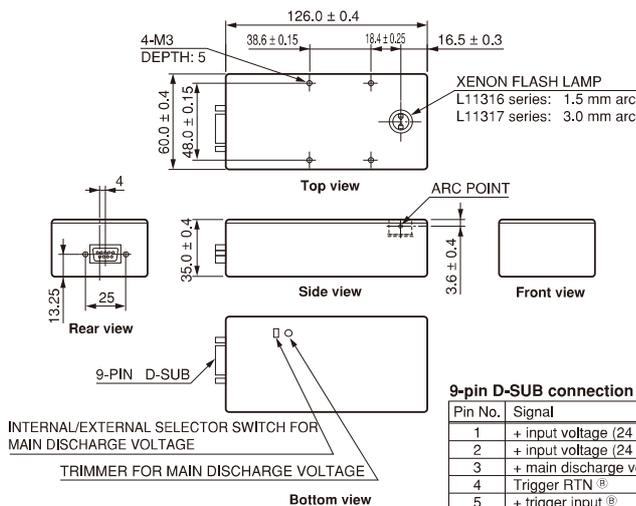
●Life characteristics (L11316-01)



DIMENSIONAL OUTLINES (unit: mm)

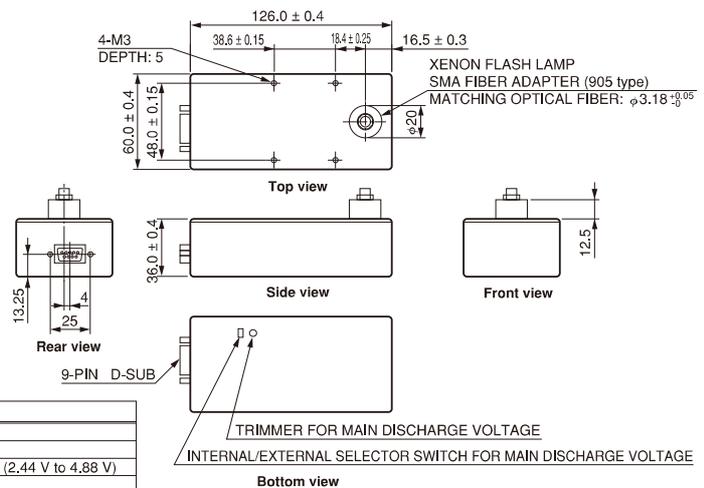
Standard type

●L11316-0□ series, L11317-0□ series



SMA fiber adapter type

●L11316-1□ series



9-pin D-SUB connection

Pin No.	Signal
1	+ input voltage (24 V ± 2.4 V) [Ⓐ]
2	+ input voltage (24 V ± 2.4 V) [Ⓐ]
3	+ main discharge voltage control (2.44 V to 4.88 V)
4	Trigger RTN [Ⓑ]
5	+ trigger input [Ⓑ]
6	Input voltage RTN
7	Input voltage RTN
8	Main discharge voltage control RTN
9	No connection

[Ⓐ] Input current: 0.75 A, Inrush current: 3 A

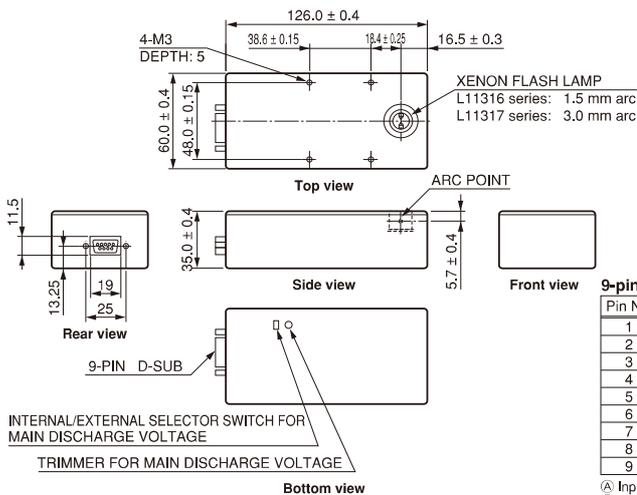
[Ⓑ] Trigger input: 5 V to 10 V rectangular waveform (pulse width: 10 ms or more)

Package must be grounded, for example, by using an M3 screw for mounting holes.

DIMENSIONAL OUTLINES (unit: mm)

Silent type Emitting points are different.

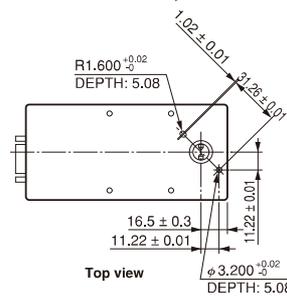
● L11316-2□ series, L11317-2□ series



High precision type

Positioning guides are provided in the lamp position.

● L11316-4□ series, L11317-4□ series



9-pin D-SUB connection

Pin No.	Signal
1	+ input voltage (24 V ± 2.4 V) ^(A)
2	+ input voltage (24 V ± 2.4 V) ^(A)
3	+ main discharge voltage control (2.44 V to 4.88 V)
4	Trigger RTN ^(B)
5	+ trigger input ^(B)
6	Input voltage RTN
7	Input voltage RTN
8	Main-discharge-voltage control RTN
9	No connection

^(A) Input current: 0.75 A, Inrush current: 3 A
^(B) Trigger input: 5 V to 10 V rectangular waveform (pulse width: 10 ms or more)
 Package must be grounded, for example, by using an M3 screw for mounting holes.

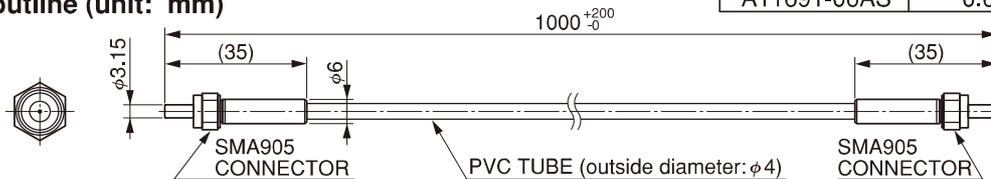
TLSZA0021EA

RELATED PRODUCTS

UV-resistant light guide (sold separately)

These light guides have SMA905 optical fiber connectors at both ends and are designed to minimize loss of UV transmittance. On synthetic silica lamp modules, use the A11691-06AS as a light guide.

Dimensional outline (unit: mm)



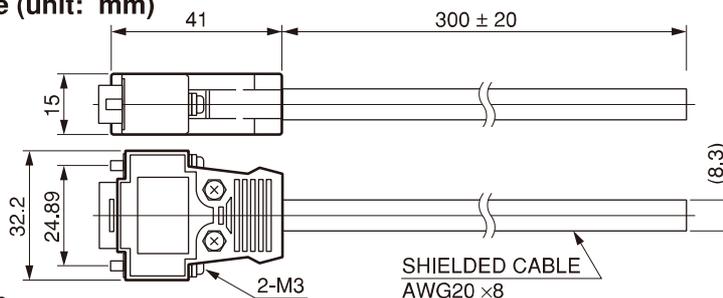
TLSZA0021EA

Type No.	Core diameter	Length
A7969-06AS	0.6 mm	1.0 m
A7969-08AS	0.8 mm	
A11691-06AS	0.6 mm	

Shield cable with D-sub input connector A11690 (sold separately)

Besides grounding the module case, properly shielding the cable is important to reduce noise in xenon flash lamp modules. The A11690 is a shielded cable with a D-sub input connector that is extremely effective in reducing noise. Standard cable length is 300 mm but other lengths are available on request. Please consult our sales office if needed.

Dimensional outline (unit: mm)



1. Brown : + input voltage
2. Red : + input voltage
3. Blue : + main discharge voltage control
4. Yellow : Trigger RTN.
5. Green : + trigger input
6. White : Input voltage RTN
7. Black : Input voltage RTN
8. Gray : Main-discharge-voltage control RTN

* Patent pending; 2 patents

TLSZA0023EA

Subject to local technical requirements and regulations, availability of products included in this promotional material may vary. Please consult with our sales office.

Information furnished by HAMAMATSU is believed to be reliable. However, no responsibility is assumed for possible inaccuracies or omissions. Specifications are subject to change without notice. No patent rights are granted to any of the circuit described herein. ©2010 Hamamatsu Photonics K. K.

HAMAMATSU

WEB SITE www.hamamatsu.com

HAMAMATSU PHOTONICS K. K., Electron Tube Division

314-5, Shimokanzo, Iwata City, Shizuoka Pref., 438-0193, Japan, Telephone: (81)539/62-5248, Fax: (81)539/62-2205

U.S.A.: Hamamatsu Corporation: 360 Foothill Road, P.O. Box 6910, Bridgewater, N.J. 08807-0910, U.S.A., Telephone: (1)908-231-0960, Fax: (1)908-231-1218, E-mail: usa@hamamatsu.com

Germany: Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH: Arzbergerstr. 10, D-82211 Herrsching am Ammersee, Germany, Telephone: (49)8152-375-0, Fax: (49)8152-2658, E-mail: info@hamamatsu.de

France: Hamamatsu Photonics France S.A.R.L., 19, Rue du Saule Trapu, Parc du Moulin de Massy, 91882 Massy Cedex, France, Telephone: (33)1 69 53 71 00, Fax: (33)1 69 53 71 10, E-mail: infos@hamamatsu.fr

United Kingdom: Hamamatsu Photonics UK Limited: 2 Howard Court, 10 Tewin Road, Welwyn Garden City, Hertfordshire AL7 1BW, United Kingdom, Telephone: 44-(0)1707-294888, Fax: 44-(0)1707-325777, E-mail: info@hamamatsu.co.uk

North Europe: Hamamatsu Photonics Norden AB: Smidesvägän 12, SE-171-41 SOLNA, Sweden, Telephone: (46)8-509-031-00, Fax: (46)8-509-031-01, E-mail: info@hamamatsu.se

Italy: Hamamatsu Photonics Italia S.R.L.: Strada della Mola, 1/E 20020 Arese (Milano), Italy, Telephone: (39)02-935 81 733, Fax: (39)02-935 81 741, E-mail: info@hamamatsu.it

TLSZ1006E01
OCT. 2010 WD



1100 Series High-Stability Short Arc Xenon Flashlamps



FX-1100 Series Flashlamps from Excelitas provide exceptional arc stability.

The 1100 Series Short Arc Xenon Flashlamps from Excelitas Technologies are unconfined arc flashlamps which produce microsecond duration pulses of broadband light of high radiant intensities. Capable of operating at high repetition rates, these small flashlamps generate light over a continuous spectrum from ultraviolet to infrared. Exceptional arc stability and life characteristics will make the 1100 Series Flashlamps indispensable in precision photometry, radiometry, and spectroradiometry. When coupled with the 1100 Series Trigger Modules and highly regulated-low ripple power supplies, the short arc flashlamps make ideal sources of pulsed light for clinical and invitro diagnostics, life sciences, drug discovery, proteomics, analytical instrumentation, and machine vision applications.

The 1100 Series offer a broad range of lamps that range in power from 10 Watt glass-bodied lamps to 20 Watt metal can lamps. The FX-1160 Series metal can lamp also uses an internal, hemi-spherical reflector to increase usable light output by more than 40% over non-reflector lamps. All these lamps, when mated with the appropriate trigger module and power supply, will provide lighting solutions for the most demanding applications.

www.excelitas.com

Key Features

- Exceptional arc stability
- High radiant intensity
- Continuous spectrum UV-VIS-NIR
- Long life
- High repetition flash rates
- Low heat radiation
- Microsecond flash durations
- Various envelope features
- Now warm up period
- High efficiency in the UV and blue
- Simple fiber optic coupling
- Small size

Applications

- Absorption analysis
- Immunoassay modules
- Fluorimetry
- Spectroradiometry
- Liquid and gas chromatography
- Colorimetry
- UV/VIS/NIR applications
- Machine vision

1100 Series

High-Stability Short Arc Xenon Flashlamps

1100 Series

Type	Arc Length (mm)	Spectral Distribution (nm)	Window Material	Energy per Flash ¹ (joules)	Average Power (watts) ²	Voltage (Vdc)	Flash Rate ³ (Hz)	Life ⁴ (flashes)	Jitter (ns)	Stability ⁵	Power Supply	LitePac Type
Glass-Body												
FX-1101	1.5	225-1100+	Borosilicate	0.15 max	10	350-1000	300	>1x10 ⁹	<200	<1%CV	PS-1105	FYD-1101
FX-1102		190-1100+	UV Glass								PS-1110	FYD-1101B
FX-1103		120-1100+	MgF ₂									
FX-1104	3.0	225-1100+	Borosilicate	0.15 max	10	350-1000	300	>1x10 ⁹	<200	<1%CV	PS-1105	FYD-1101
FX-1105		190-1100+	UV Glass								PS-1110	FYD-1101B
FX-1106		120-1100+	MgF ₂									
Metal Can												
FX-1150	1.5	225-1100+	Borosilicate	0.50 max	20	350-1000	300	>1x10 ⁹	<200	<1%CV	PS-1120	FYD-1150
FX-1151		190-1100+	UV Glass									FYD-1150B
FX-1152		120-1100+	MgF ₂									
FX-1153	3.0	225-1100+	Borosilicate	0.50 max	20	350-1000	300	>1x10 ⁹	<200	<1%CV	PS-1120	FYD-1150
FX-1154		190-1100+	UV Glass									FYD-1150B
FX-1155		120-1100+	MgF ₂									
Metal Can with Reflector⁶												
FX-1160	1.5	225-1100+	Borosilicate	0.50 max	20	350-1000	300	>1x10 ⁹	<200	<1%CV	PS-1120	FYD-1150
FX-1161		190-1100+	UV Glass									FYD-1150B
FX-1162		120-1100+	MgF ₂									
FX-1163	3.0	225-1100+	Borosilicate	0.50 max	20	350-1000	300	>1x10 ⁹	<200	<1%CV	PS-1120	FYD-1150
FX-1164		190-1100+	UV Glass									FYD-1150B
FX-1165		120-1100+	MgF ₂									

¹ Input Energy or $E = 1/2CV^2$, where E = Discharge Energy (Joules), C = Discharge Capacitor Value, and V = Discharge Voltage.

² Maximum Average Power or $P_{AVE} = EF$, where E = Discharge Energy and F = Rate of flashes per second. NOTE: Additional cooling required when operation above 40Watts

³ Flash rate must be set so as not to exceed 10/20 Watts Average Power.

⁴ Life is primarily a function of input energy per flash ($E=1/2CV^2$) but is also influenced by average power and peak current. See curves on following page for typical lamp performance.

⁵ Typical for most operating conditions. Lamp output stability is dependent on a number of variable including input energy, flash rate, optics design, trigger module and power supply

⁶ The hemispherical reflector internal to the FX-1160 should not be confused with competitive types employing paraboloids or ellipsoids in which all of the forward direct light is non-recoverable and becomes a serious source of optical scattering. Excelitas' FX-1160 has an electrode orientation which does not block the forward light emission and therefore does not cause a "black hole" in the output beam profile. The optical design of the FX-1160 is ideal for use with lenses and fiber bundles, and provides the additional advantage of reduced optical noise by preventing back-plane scattering caused by the pin base.

CAUTION! Care should be taken when inserting or removing lamps from their sockets. Excessive side force placed on the pins of the lamp could cause the seal around the pins to crack and the lamp to leak resulting in lamp failure.

CAUTION! *Glass Lamps* - Caution should be taken not to mount or attached any type of hardware to the body of lamp. This could cause the lamp to crack.

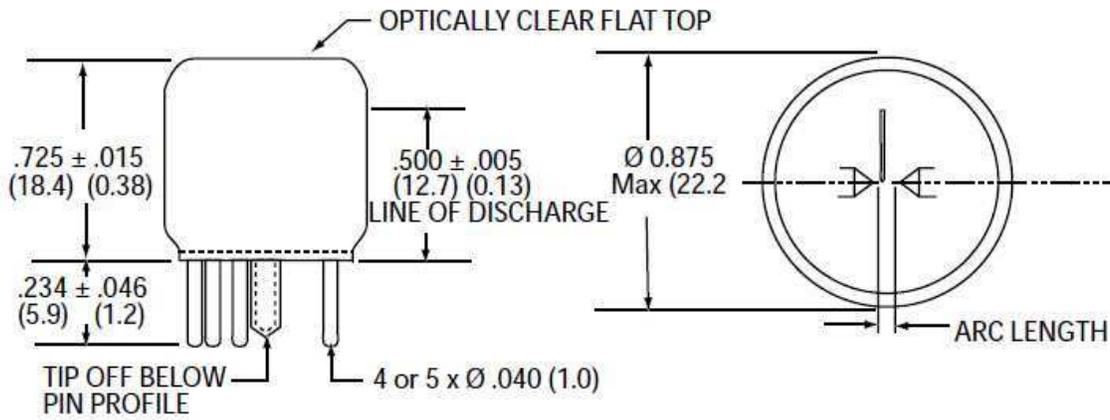
CAUTION! *Metal Can Lamps* - Caution needs to be taken not put excessive or uneven force on the body of the lamp. This can cause failures with the glass to metal seals. Please consult an application engineer for suggestions on lamp mounting.

1100 Series

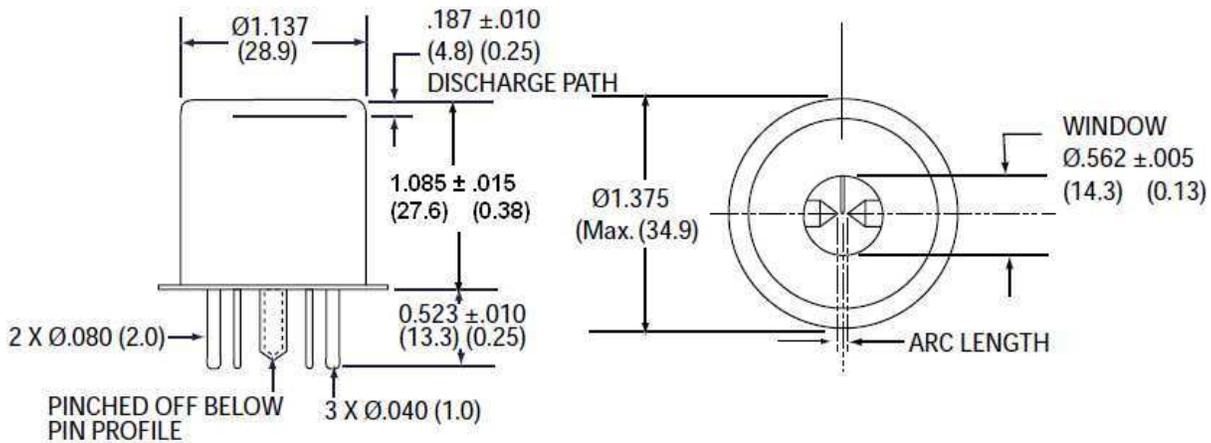
High-Stability Short Arc Xenon Flashlamps

Mechanical Dimensions

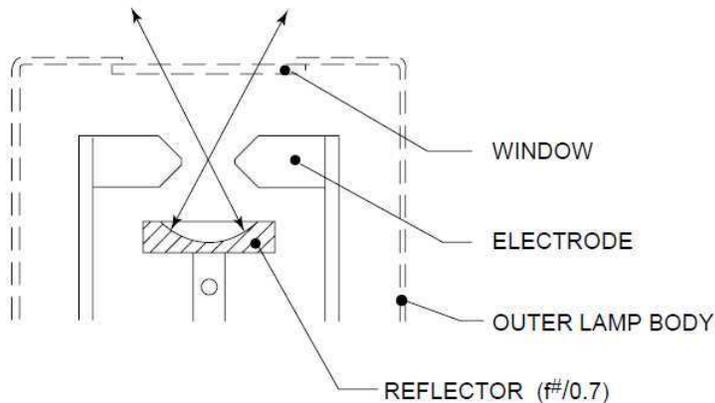
FX-1100 Outline



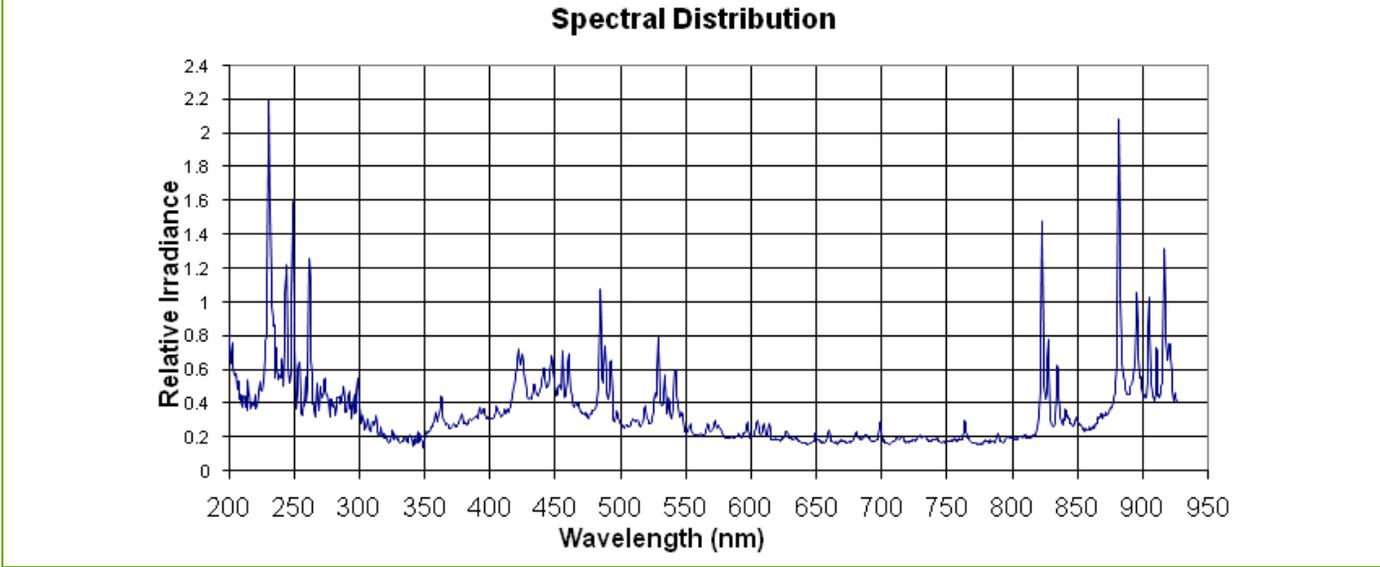
FX-1150 & FX-1160 Outline



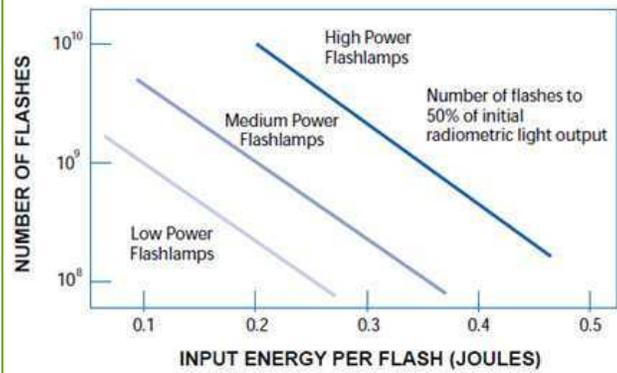
FX-1160 Optical Profile



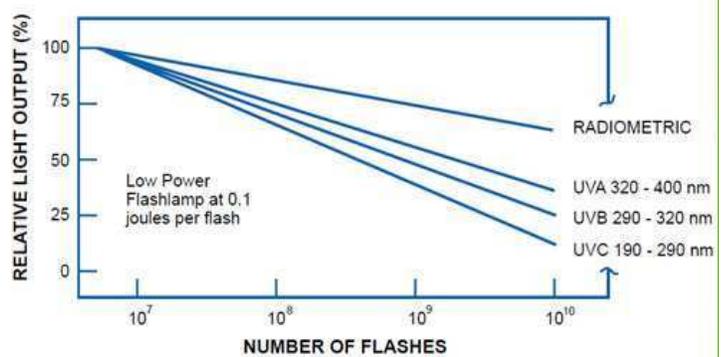
Spectral Distribution



Life vs. Input Energy



Life vs. Wavelength



1100 Series

High-Stability Short Arc Xenon Flashlamps

Circuit Equations

$E = \frac{1}{2} CV^2$	where: E = Discharge energy (joules)
	C = Capacitance (microfarads)
	V = Discharge voltage (kilovolts)
$P_{AVG} = E F$	P_{AVG} = Average power (watts)
	E = Discharge energy (joules)
	F = Flash rate (pulses per second)
$I_{PK} = \sqrt{V(C/L)^{\frac{1}{2}}}$	I_{PK} = Peak discharge current (keep below 1000 amps)
	L = Circuit inductance (use 0.5 μ H for best approximation)
$t_{1/3} = \pi (LC)^{\frac{1}{2}}$	$t_{1/3}$ = Pulse width at 1/3 peak.

NOTE: All values are nominal; specifications subject to change without notice.

About Excelitas Technologies

Excelitas Technologies is a global technology leader focused on delivering innovative, customized solutions to meet the lighting, detection and other high-performance technology needs of OEM customers.

From medical lighting to analytical instrumentation, clinical diagnostics, industrial, safety and security, and aerospace and defense applications, Excelitas Technologies is committed to enabling our customers' success in their specialty end-markets. Excelitas Technologies has approximately 3,000 employees in North America, Europe and Asia, serving customers across the world.

Excelitas Technologies
35 Congress Street
Salem, Massachusetts
01970 USA
Telephone: (+1) 978.745.3200
Toll free: (+1) 800.950.3441
Fax: (+1) 978.745.0894

**Excelitas Technologies
LED Solutions, Inc.**
160 E. Marquardt Drive
Wheeling, Illinois
60090 USA
Telephone: (+1) 847.537.4277
Fax: (+1) 847.537.4785

**Excelitas Technologies
Illumination, Inc.**
44370 Christy Street
Fremont, California
94538-3180 USA
Telephone: (+1) 510.979.6500
Toll-free: (+1) 800.775.6786
Fax: (+1) 510.687.1140

**Excelitas Technologies
Elcos GmbH**
Luitpoldstrasse 6
Pfaffenhofen, 85276
Germany
Telephone: (+49) 8441.8917.0
Fax: (+49) 8441.7191.0

**Excelitas Technologies Shenzhen Co., Ltd.
Wearnes Technology Center**
No.10 Kefa Road, Science & Industry Park
Nanshan District,
Shenzhen, Guangdong
P.R. of China 518057
Telephone: +86 2655 3861
Fax: +86 755 2661 7311

For a complete listing of our global offices, visit www.excelitas.com/ContactUs

© 2011 Excelitas Technologies Corp. All rights reserved. The Excelitas logo and design are registered trademarks of Excelitas Technologies Corp. All other trademarks not owned by Excelitas Technologies or its subsidiaries that are depicted herein are the property of their respective owners. Excelitas reserves the right to change this document at any time without notice and disclaims liability for editorial, pictorial or typographical errors.



High Sensitivity and Lower Dark Current Wide Spectral Range with Low ENI, 8 mm × 6 mm Photocathode Size

FEATURES

- Low Dark Current 5 nA (after 30 minutes)
- Wide Spectral Response 185 nm to 900 nm
- High Cathode Sensitivity
 - Luminous 525 $\mu\text{A}/\text{lm}$
 - Radiant at 450 nm 90 mA/W
 - QE at 450 nm 24.8 %
- High Anode Sensitivity (at 1000 V)
 - Luminous 10 000 A/lm
- High Signal to Noise Ratio

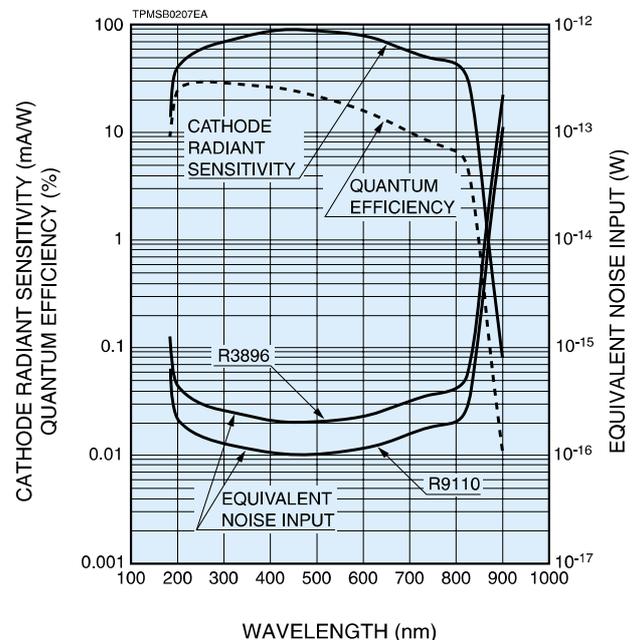
The R9110 is a 28 mm (1-1/8 inch) diameter, 9-stage, side-on type photomultiplier tube having an extended red multialkali photocathode same as the R3896. The R9110 features very low dark current, extremely high quantum efficiency, high gain, good S/N ratio and wide spectral response from UV to near infrared. The R9110 is directly pin compatible with the R3896.



GENERAL

Parameter		Description/Value	Unit
Spectral Response		185 to 900	nm
Peak Wavelength		450	nm
Photocathode	Material	Multialkali	—
	Minimum Effective Area	8 × 6	mm
Window Material		UV glass	—
Dynode	Secondary Emitting Surface	Multialkali	—
	Structure	Circular-cage	—
	Number of Stages	9	—
Direct Interelectrode Capacitances	Anode to Last Dynode	Approx. 4	pF
	Anode to All Other Electrodes	Approx. 6	pF
Base		11-pin base JEDEC No. B11-88	—
Weight		Approx. 46	g
Operating Ambient Temperature		-30 to +50	°C
Storage Temperature		-30 to +50	°C
Suitable Socket		E678-11A (Sold Separately)	—
Suitable Socket Assembly		E717-63 (Sold Separately)	—
		E717-74 (Sold Separately)	—

Figure 1: Typical Spectral Response and Equivalent Noise Input



Subject to local technical requirements and regulations, availability of products included in this promotional material may vary. Please consult with our sales office. Information furnished by HAMAMATSU is believed to be reliable. However, no responsibility is assumed for possible inaccuracies or omissions. Specifications are subject to change without notice. No patent rights are granted to any of the circuits described herein. ©2006 Hamamatsu Photonics K.K.

PHOTOMULTIPLIER TUBE R9110

MAXIMUM RATINGS (Absolute Maximum Values at 25 °C)

Parameter		Value	Unit
Supply Voltage	Between Anode and Cathode	1250	V
	Between Anode and Last Dynode	250	V
Average Anode Current ^A		0.1	mA

CHARACTERISTICS (at 25 °C)

Parameter		Min.	Typ.	Max.	Unit	
Cathode Sensitivity	Quantum Efficiency	at 254 nm	—	29.3	—	%
		at 450 nm	—	24.8	—	%
		at 633 nm	—	14.3	—	%
		at 852 nm	—	0.73	—	%
	Luminous ^B		400	525	—	μA/lm
	Radiant	at 254 nm	—	60	—	mA/W
		at 450 nm	—	90	—	mA/W
		at 633 nm	—	73	—	mA/W
at 852 nm		—	5.0	—	mA/W	
Red/White Ratio ^C		—	0.4	—	—	
Blue Sensitivity Index ^D		—	15	—	—	
Anode Sensitivity	Luminous ^E	4000	10 000	—	A/lm	
Gain ^E		—	1.9×10^7	—	—	
Anode Dark Current ^F (After 30 min Storage in Darkness)		—	5	15	nA	
Time Response	Anode Pulse Rise Time ^G		—	2.2	—	ns
	Electron Transit Time ^H		—	22	—	ns
	Transit Time Spread (TTS) ^I		—	1.2	—	ns
Anode Current Stability ^J	Light Hysteresis		—	0.1	—	%
	Voltage Hysteresis		—	1.0	—	%

NOTES

- A: Averaged over any interval of 30 seconds maximum.
- B: The light source is a tungsten filament lamp operated at a distribution temperature of 2856K. Supply voltage is 100 volts between the cathode and all other electrodes connected together as anode.
- C: Red/White ratio is the quotient of the cathode current measured using a red filter(Toshiba R-68) interposed between the light source and the tube by the cathode current measured with the filter removed under the same conditions as Note B.
- D: The value is cathode output current when a blue filter(Corning CS 5-58 polished to 1/2 stock thickness) is interposed between the light source and the tube under the same condition as Note B.
- E: Measured with the same light source as Note B and with the voltage distribution ratio shown in Table 1 below.

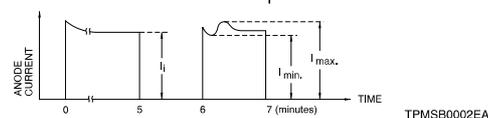
Table 1: Voltage Distribution Ratio

Electrodes	K	Dy1	Dy2	Dy3	Dy4	Dy5	Dy6	Dy7	Dy8	Dy9	P
Distribution Ratio	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Supply Voltage: 1000 V, K: Cathode, Dy: Dynode, P: Anode

- F: Measured with the same supply voltage and voltage distribution ratio as Note E after removal of light.
- G: The rise time is the time for the output pulse to rise from 10% to 90% of the peak amplitude when the entire photocathode is illuminated by a delta function light pulse.
- H: The electron transit time is the interval between the arrival of delta function light pulse at the entrance window of the tube and the time when the anode output reaches the peak amplitude. In measurement, the whole photocathode is illuminated.
- I: Also called transit time jitter. This is the fluctuation in electron transit time between individual pulses in the single photoelectron mode, and may be defined as the FWHM of the frequency distribution of electron transit times
- J: Hysteresis is temporary instability in anode current after light and voltage are applied.

$$\text{Hysteresis} = \frac{I_{\text{max.}} - I_{\text{min.}}}{I_i} \times 100 (\%)$$



(1) Light Hysteresis

The tube is operated at 750 volts with an anode current of 1 microampere for 5 minutes. The light is then removed from the tube for a minute. The tube is then re-illuminated by the previous light level for a minute to measure the variation.

(2) Voltage Hysteresis

The tube is operated at 300 volts with an anode current of 0.1 micro-ampere for 5 minutes. The light is then removed from the tube and the supply voltage is quickly increased to 800 volts. After a minute, the supply voltage is then reduced to the previous value and the tube is re-illuminated for a minute to measure the variation.

VOLTAGE DISTRIBUTION RATIO

Electrodes	K	Dy1	Dy2	Dy3	Dy4	Dy5	Dy6	Dy7	Dy8	Dy9	P
Distribution Ratio	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

K: Cathode, Dy: Dynode, P: Anode

NOTE: For a high speed pulse measurement, below voltage divider ratio is recommended.

Electrodes	K	Dy1	Dy2	Dy3	Dy4	Dy5	Dy6	Dy7	Dy8	Dy9	P
Distribution Ratio	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1

Figure 2: Anode Luminous Sensitivity and Gain Characteristics

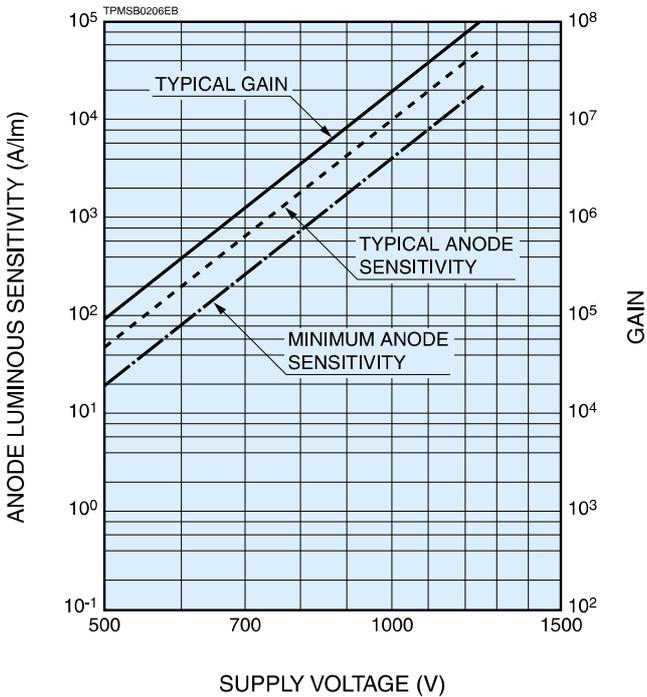
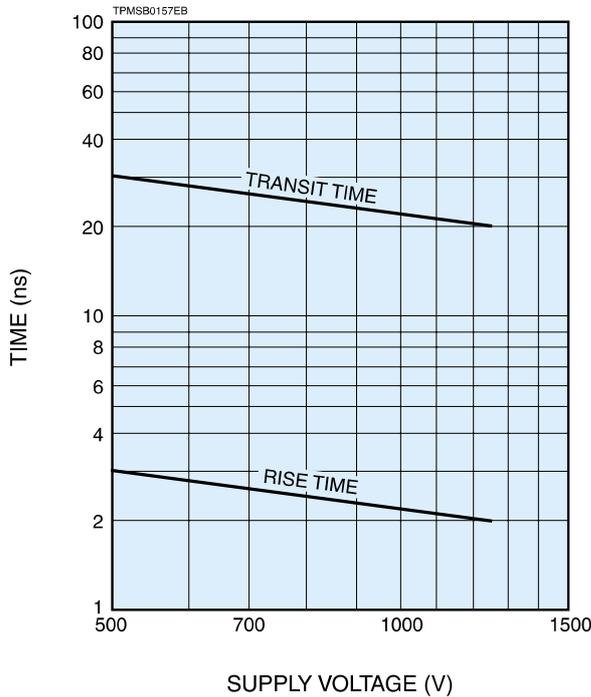
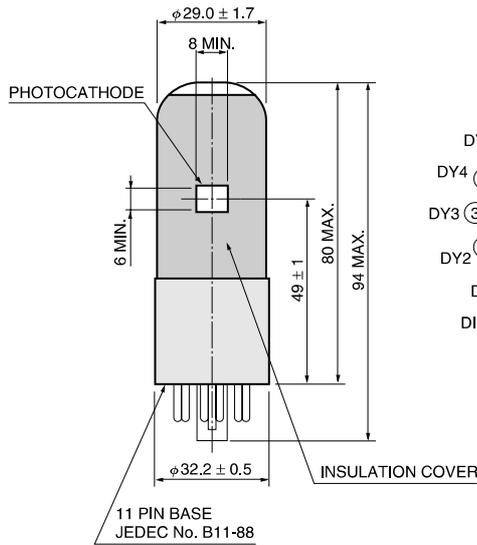


Figure 3: Typical Time Response



PHOTOMULTIPLIER TUBE R9110

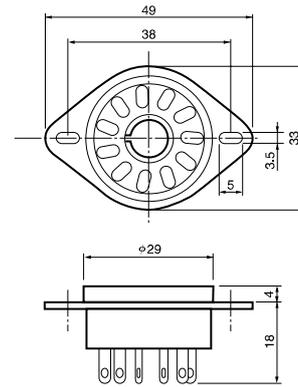
Figure 4: Dimensional Outline and Basing Diagram (Unit: mm)



TPMSA0016EC

Figure 5: Socket (Unit: mm) Sold Separately

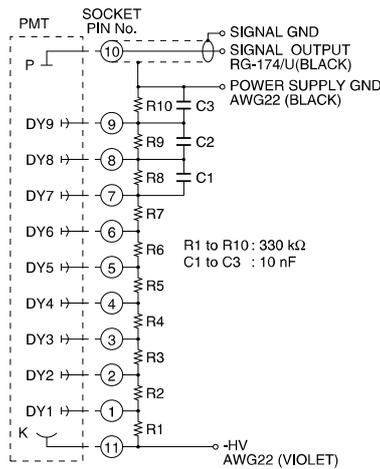
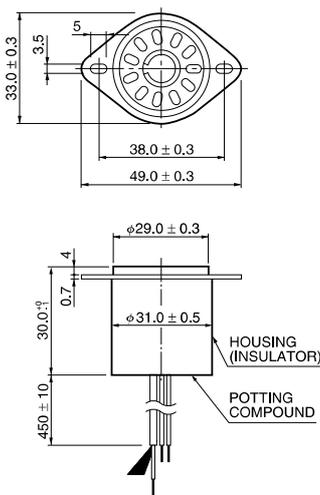
E678-11A



TACCA0064EA

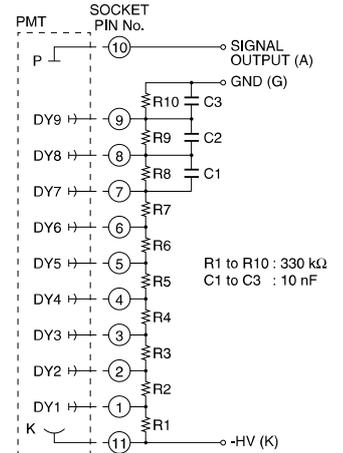
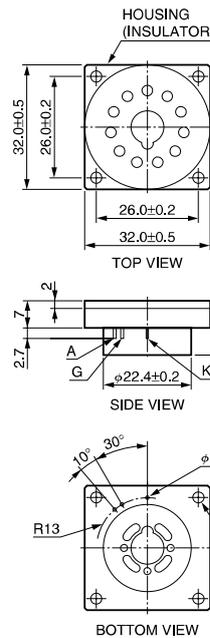
Figure 6: D Type Socket Assembly (Unit: mm) Sold Separately

E717-63



TACCA0002EH

E717-74



* Wiring diagram applies when -HV is supplied.
To supply +HV, connect the pin "G" to +HV, and the pin "K" to the GND.

TACCA0277EA

* Hamamatsu also provides C4900 series compact high voltage power supplies and C6270 series DP type socket assemblies which incorporate a DC to DC converter type high voltage power supply.

Warning—Personal Safety Hazards
Electrical Shock—Operating voltages applied to this device present a shock hazard.

HAMAMATSU

WEB SITE www.hamamatsu.com

HAMAMATSU PHOTONICS K.K., Electron Tube Division

314-5, Shimokanzo, Iwata City, Shizuoka Pref., 438-0193, Japan, Telephone: (81)539/62-5248, Fax: (81)539/62-2205

U.S.A.: Hamamatsu Corporation, 360 Foothill Road, P. O. Box 6910, Bridgewater, N.J. 08807-0910, U.S.A., Telephone: (1)908-231-0960, Fax: (1)908-231-1218 E-mail: usa@hamamatsu.com

Germany: Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Arzbergerstr. 10, D-82211 Herrsching am Ammersee, Germany, Telephone: (49)8152-375-0, Fax: (49)8152-2658 E-mail: info@hamamatsu.de

France: Hamamatsu Photonics France S.A.R.L., 19, Rue du Saule Trapu, Parc du Moulin de Massy, 91882 Massy Cedex, France, Telephone: (33)1 69 53 71 00, Fax: (33)1 69 53 71 10 E-mail: infos@hamamatsu.fr

United Kingdom: Hamamatsu Photonics UK Limited, 2 Howard Court, 10 Tewin Road Welwyn Garden City Hertfordshire AL7 1BW, United Kingdom, Telephone: 44-(0)1707-294888, Fax: 44-(0)1707-325777 E-mail: info@hamamatsu.co.uk

North Europe: Hamamatsu Photonics Norden AB, Smidesvägen 12, SE-171-41 SOLNA, Sweden, Telephone: (46)8-509-031-00, Fax: (46)8-509-031-01 E-mail: info@hamamatsu.se

Italy: Hamamatsu Photonics Italia: S.R.L., Strada della Moia, 1/E, 20020 Arese, (Milano), Italy, Telephone: (39)02-935 81 733, Fax: (39)02-935 81 741 E-mail: info@hamamatsu.it

TPMS1072E02
JUL. 2006. IP

74HC123; 74HCT123

Dual retriggerable monostable multivibrator with reset

Rev. 7 — 25 August 2011

Product data sheet

1. General description

The 74HC123; 74HCT123 are high-speed Si-gate CMOS devices and are pin compatible with Low-power Schottky TTL (LSTTL). They are specified in compliance with JEDEC standard no. 7A.

The 74HC123; 74HCT123 are dual retriggerable monostable multivibrators with output pulse width control by three methods:

1. The basic pulse is programmed by selection of an external resistor (R_{EXT}) and capacitor (C_{EXT}).
2. Once triggered, the basic output pulse width may be extended by retriggering the gated active LOW-going edge input ($n\bar{A}$) or the active HIGH-going edge input (nB). By repeating this process, the output pulse period ($nQ = HIGH$, $n\bar{Q} = LOW$) can be made as long as desired. Alternatively an output delay can be terminated at any time by a LOW-going edge on input $n\bar{RD}$, which also inhibits the triggering.
3. An internal connection from $n\bar{RD}$ to the input gates makes it possible to trigger the circuit by a HIGH-going signal at input $n\bar{RD}$ as shown in the function table.

Schmitt-trigger action in the $n\bar{A}$ and nB inputs, makes the circuit highly tolerant to slower input rise and fall times.

The 74HC123; 74HCT123 are identical to the 74HC423; 74HCT423 but can be triggered via the reset input.

2. Features and benefits

- DC triggered from active HIGH or active LOW inputs
- Retriggerable for very long pulses up to 100 % duty factor
- Direct reset terminates output pulse
- Schmitt-trigger action on all inputs except for the reset input
- ESD protection:
 - ◆ HBM JESD22-A114F exceeds 2000 V
 - ◆ MM JESD22-A115-A exceeds 200 V
- Specified from $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $+85\text{ }^{\circ}\text{C}$ and from $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $+125\text{ }^{\circ}\text{C}$



3. Ordering information

Table 1. Ordering information

Type number	Package			Version
	Temperature range	Name	Description	
74HC123N 74HCT123N	-40 °C to +125 °C	DIP16	plastic dual in-line package; 16 leads (300 mil)	SOT38-4
74HC123D 74HCT123D	-40 °C to +125 °C	SO16	plastic small outline package; 16 leads; body width 3.9 mm	SOT109-1
74HC123DB 74HCT123DB	-40 °C to +125 °C	SSOP16	plastic shrink small outline package; 16 leads; body width 5.3 mm	SOT338-1
74HC123PW 74HCT123PW	-40 °C to +125 °C	TSSOP16	plastic thin shrink small outline package; 16 leads; body width 4.4 mm	SOT403-1
74HC123BQ	-40 °C to +125 °C	DHVQFN16	plastic dual in-line compatible thermal enhanced very thin quad flat package; no leads; 16 terminals; body 2.5 × 3.5 × 0.85 mm	SOT763-1

4. Functional diagram

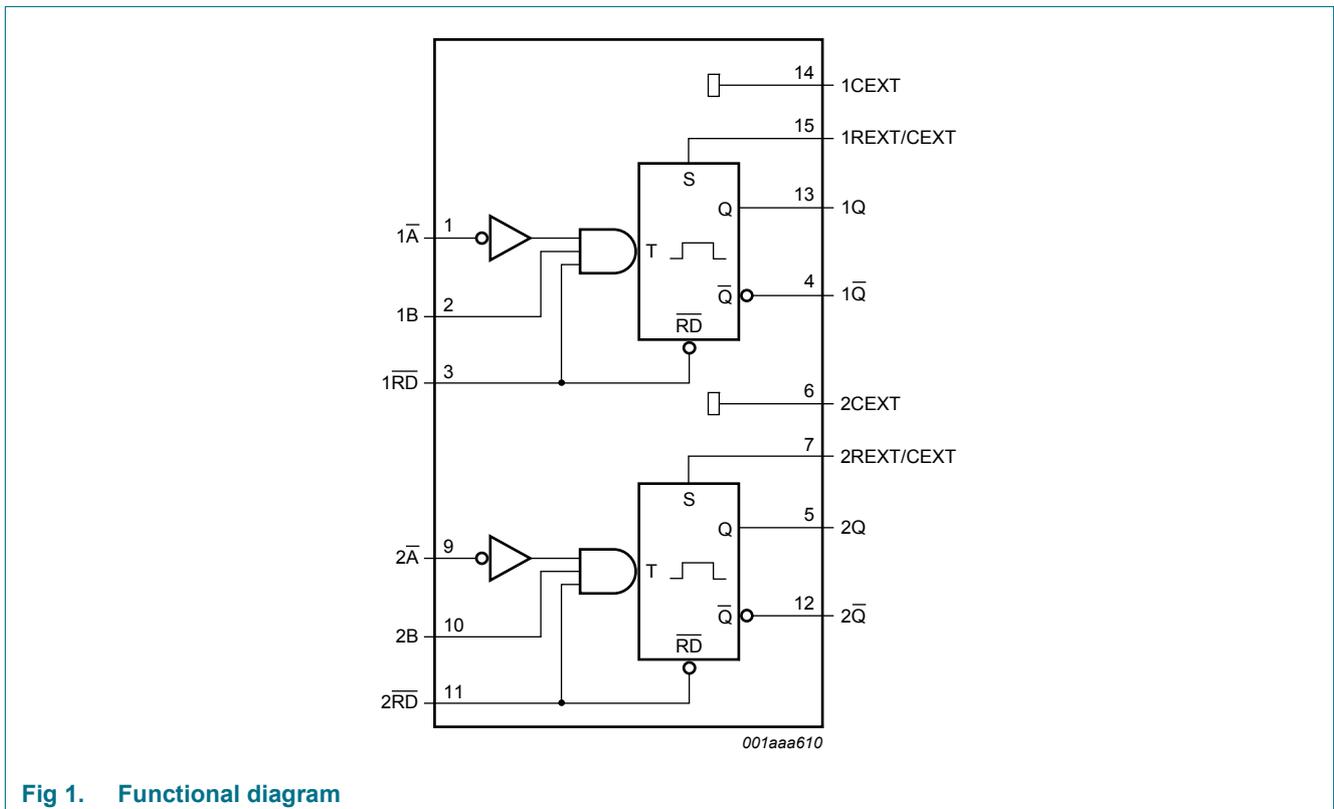


Fig 1. Functional diagram

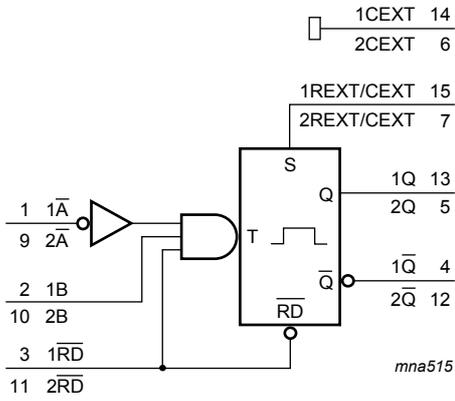


Fig 2. Logic symbol

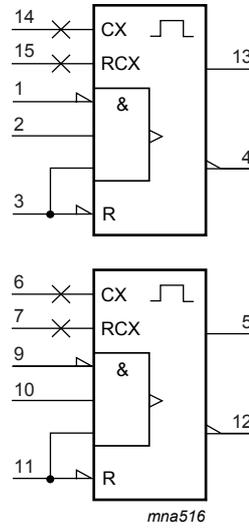


Fig 3. IEC logic symbol

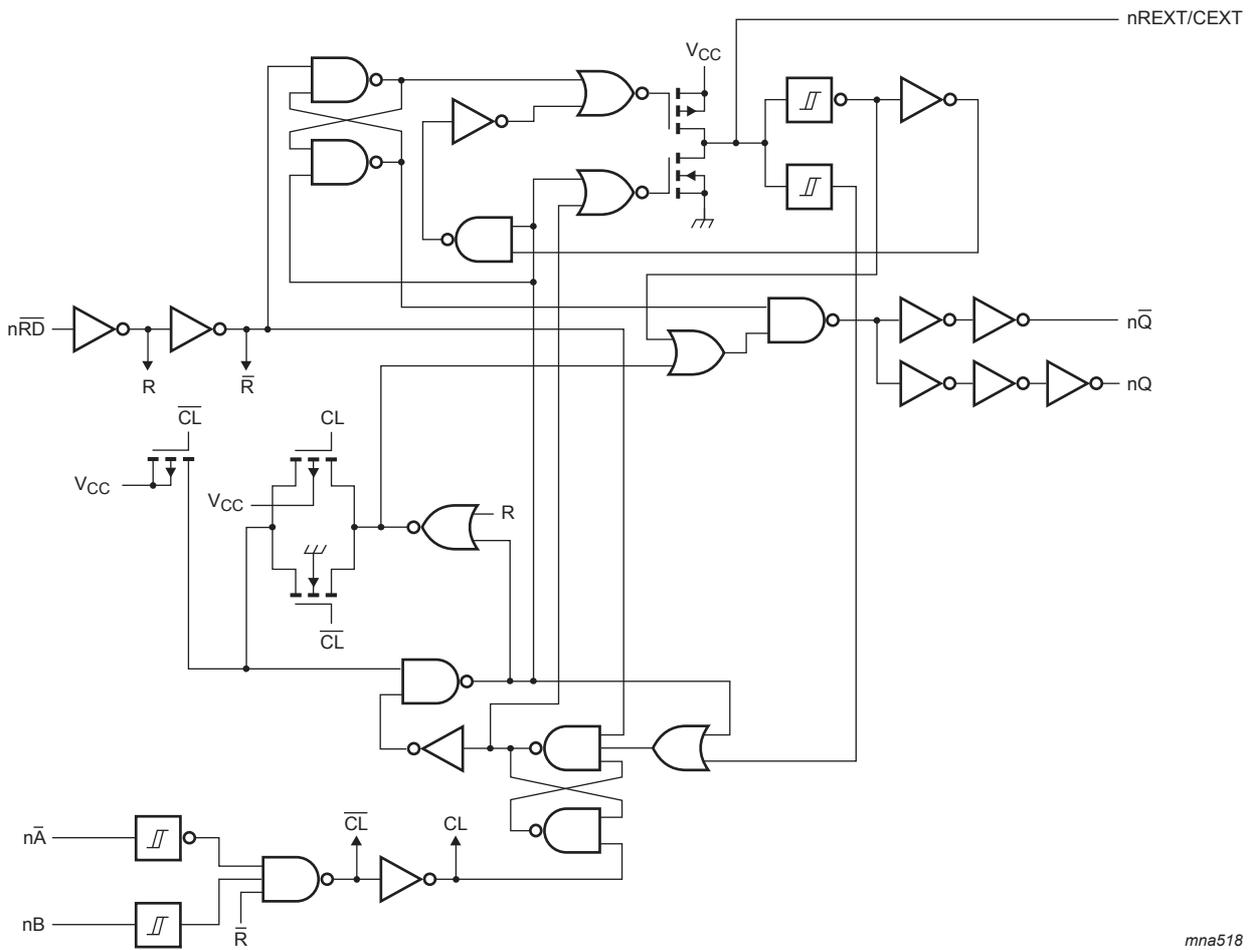
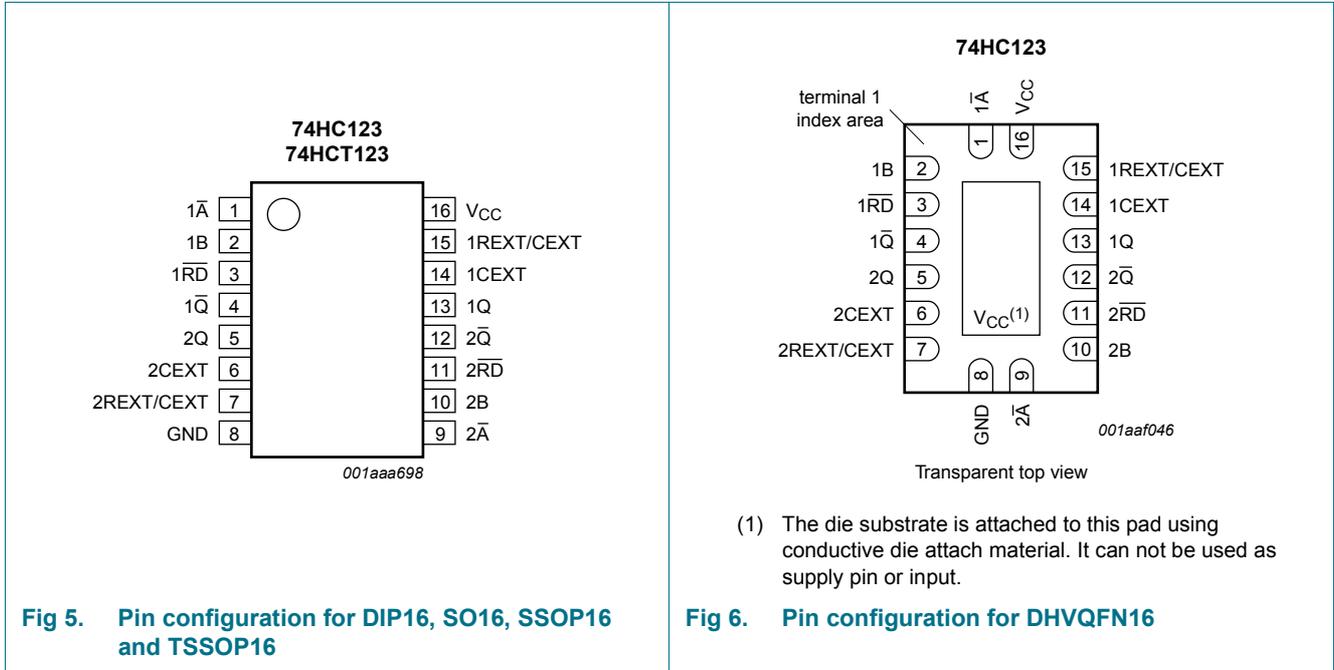


Fig 4. Logic diagram

5. Pinning information

5.1 Pinning



5.2 Pin description

Table 2. Pin description

Symbol	Pin	Description
$1\bar{A}$	1	negative-edge triggered input 1
1B	2	positive-edge triggered input 1
$1\bar{RD}$	3	direct reset LOW and positive-edge triggered input 1
$1\bar{Q}$	4	active LOW output 1
2Q	5	active HIGH output 2
2CEXT	6	external capacitor connection 2
2REXT/CEXT	7	external resistor and capacitor connection 2
GND	8	ground (0 V)
$2\bar{A}$	9	negative-edge triggered input 2
2B	10	positive-edge triggered input 2
$2\bar{RD}$	11	direct reset LOW and positive-edge triggered input 2
$2\bar{Q}$	12	active LOW output 2
1Q	13	active HIGH output 1
1CEXT	14	external capacitor connection 1
1REXT/CEXT	15	external resistor and capacitor connection 1
V _{CC}	16	supply voltage

6. Functional description

Table 3. Function table^[1]

Input			Output	
nRD	nA	nB	nQ	nQ
L	X	X	L	H
X	H	X	L ^[2]	H ^[2]
X	X	L	L ^[2]	H ^[2]
H	L	↑		
H	↓	H		
↑	L	H		

[1] H = HIGH voltage level; L = LOW voltage level; X = don't care; ↑ = LOW-to-HIGH transition; ↓ = HIGH-to-LOW transition;

 = one HIGH level output pulse;  = one LOW level output pulse.

[2] If the monostable was triggered before this condition was established, the pulse will continue as programmed.

7. Limiting values

Table 4. Limiting values

In accordance with the Absolute Maximum Rating System (IEC 60134). Voltages are referenced to GND (ground = 0 V).

Symbol	Parameter	Conditions	Min	Max	Unit
V _{CC}	supply voltage		-0.5	+7	V
I _{IK}	input clamping current	V _I < -0.5 V or V _I > V _{CC} + 0.5 V	-	±20	mA
I _{OK}	output clamping current	V _O < -0.5 V or V _O > V _{CC} + 0.5 V	-	±20	mA
I _O	output current	except for pins nREXT/CEXT; V _O = -0.5 V to (V _{CC} + 0.5 V)	-	±25	mA
I _{CC}	supply current		-	50	mA
I _{GND}	ground current		-	-50	mA
T _{stg}	storage temperature		-65	+150	°C
P _{tot}	total power dissipation				
	DIP16 package		^[1] -	750	mW
	SO16 package		^[2] -	500	mW
	SSOP16 package		^[3] -	500	mW
	TSSOP16 package		^[3] -	500	mW
	DHVQFN16 package		^[4] -	500	mW

[1] For DIP16 package: P_{tot} derates linearly with 12 mW/K above 70 °C.

[2] For SO16 package: P_{tot} derates linearly with 8 mW/K above 70 °C.

[3] For SSOP16 and TSSOP16 packages: P_{tot} derates linearly with 5.5 mW/K above 60 °C.

[4] For DHVQFN16 package: P_{tot} derates linearly with 4.5 mW/K above 60 °C.

8. Recommended operating conditions

Table 5. Recommended operating conditions

Symbol	Parameter	Conditions	74HC123			74HCT123			Unit
			Min	Typ	Max	Min	Typ	Max	
V _{CC}	supply voltage		2.0	5.0	6.0	4.5	5.0	5.5	V
V _I	input voltage		0	-	V _{CC}	0	-	V _{CC}	V
V _O	output voltage		0	-	V _{CC}	0	-	V _{CC}	V
Δt/ΔV	input transition rise and fall rate	nRD input							
		V _{CC} = 2.0 V	-	-	625	-	-	-	ns/V
		V _{CC} = 4.5 V	-	1.67	139	-	1.67	139	ns/V
		V _{CC} = 6.0 V	-	-	83	-	-	-	ns/V
T _{amb}	ambient temperature		-40	+25	+125	-40	+25	+125	°C

9. Static characteristics

Table 6. Static characteristics

At recommended operating conditions; voltages are referenced to GND (ground = 0 V).

Symbol	Parameter	Conditions	25 °C			-40 °C to +85 °C		-40 °C to +125 °C		Unit
			Min	Typ	Max	Min	Max	Min	Max	
74HC123										
V _{IH}	HIGH-level input voltage	V _{CC} = 2.0 V	1.5	1.2	-	1.5	-	1.5	-	V
		V _{CC} = 4.5 V	3.15	2.4	-	3.15	-	3.15	-	V
		V _{CC} = 6.0 V	4.2	3.2	-	4.2	-	4.2	-	V
V _{IL}	LOW-level input voltage	V _{CC} = 2.0 V	-	0.8	0.5	-	0.5	-	0.5	V
		V _{CC} = 4.5 V	-	2.1	1.35	-	1.35	-	1.35	V
		V _{CC} = 6.0 V	-	2.8	1.8	-	1.8	-	1.8	V
V _{OH}	HIGH-level output voltage	V _I = V _{IH} or V _{IL}								
		I _O = -20 μA; V _{CC} = 2.0 V	1.9	2.0	-	1.9	-	1.9	-	V
		I _O = -20 μA; V _{CC} = 4.5 V	4.4	4.5	-	4.4	-	4.4	-	V
		I _O = -20 μA; V _{CC} = 6.0 V	5.9	6.0	-	5.9	-	5.9	-	V
		I _O = -4 mA; V _{CC} = 4.5 V	3.98	4.32	-	3.84	-	3.7	-	V
V _{OL}	LOW-level output voltage	V _I = V _{IH} or V _{IL}								
		I _O = 20 μA; V _{CC} = 2.0 V	-	0	0.1	-	0.1	-	0.1	V
		I _O = 20 μA; V _{CC} = 4.5 V	-	0	0.1	-	0.1	-	0.1	V
		I _O = 20 μA; V _{CC} = 6.0 V	-	0	0.1	-	0.1	-	0.1	V
		I _O = 4 mA; V _{CC} = 4.5 V	-	0.15	0.26	-	0.33	-	0.4	V
I _I	input leakage current	I _O = 5.2 mA; V _{CC} = 6.0 V	-	0.16	0.26	-	0.33	-	0.4	V
		V _I = V _{CC} or GND; V _{CC} = 6.0 V	-	-	±0.1	-	±1.0	-	±1.0	μA
I _{CC}	supply current	V _I = V _{CC} or GND; I _O = 0 A; V _{CC} = 6.0 V	-	-	8.0	-	80	-	160	μA

Table 6. Static characteristics ...continued

At recommended operating conditions; voltages are referenced to GND (ground = 0 V).

Symbol	Parameter	Conditions	25 °C			-40 °C to +85 °C		-40 °C to +125 °C		Unit
			Min	Typ	Max	Min	Max	Min	Max	
C _I	input capacitance		-	3.5	-	-	-	-	-	pF
74HCT123										
V _{IH}	HIGH-level input voltage	V _{CC} = 4.5 V to 5.5 V	2.0	1.6	-	2.0	-	2.0	-	V
V _{IL}	LOW-level input voltage	V _{CC} = 4.5 V to 5.5 V	-	1.2	0.8	-	0.8	-	0.8	V
V _{OH}	HIGH-level output voltage	V _I = V _{IH} or V _{IL} ; V _{CC} = 4.5 V								
		I _O = -20 μA	4.4	4.5	-	4.4	-	4.4	-	V
		I _O = -4 mA	3.98	4.32	-	3.84	-	3.7	-	V
V _{OL}	LOW-level output voltage	V _I = V _{IH} or V _{IL} ; V _{CC} = 4.5 V								
		I _O = 20 μA	-	0	0.1	-	0.1	-	0.1	V
		I _O = 4.0 mA	-	0.15	0.26	-	0.33	-	0.4	V
I _I	input leakage current	V _I = V _{CC} or GND; V _{CC} = 5.5 V	-	-	±0.1	-	±1.0	-	±1.0	μA
I _{CC}	supply current	V _I = V _{CC} or GND; I _O = 0 A; V _{CC} = 5.5 V	-	-	8.0	-	80	-	160	μA
ΔI _{CC}	additional supply current	per input pin; I _O = 0 A; V _I = V _{CC} - 2.1 V; other inputs at V _{CC} or GND; V _{CC} = 4.5 V to 5.5 V								
		pins n \bar{A} , nB	-	35	125	-	160	-	170	μA
		pin n \bar{RD}	-	50	180	-	225	-	245	μA
C _I	input capacitance		-	3.5	-	-	-	-	-	pF

10. Dynamic characteristics

Table 7. Dynamic characteristics

Voltages are referenced to GND (ground = 0 V); C_L = 50 pF unless otherwise specified; for test circuit see Figure 12.

Symbol	Parameter	Conditions	25 °C			-40 °C to +85 °C		-40 °C to +125 °C		Unit
			Min	Typ	Max	Min	Max	Min	Max	
74HC123										
t _{pd}	propagation delay	nRD, nA, nB to nQ or nQ̄; [1] C _{EXT} = 0 pF; R _{EXT} = 5 kΩ; see Figure 9								
		V _{CC} = 2.0 V	-	83	255	-	320	-	385	ns
		V _{CC} = 4.5 V	-	30	51	-	64	-	77	ns
		V _{CC} = 5 V; C _L = 15 pF	-	26	-	-	-	-	-	ns
		V _{CC} = 6.0 V	-	24	43	-	54	-	65	ns
		nRD (reset) to nQ or nQ̄; C _{EXT} = 0 pF; R _{EXT} = 5 kΩ; see Figure 9								
		V _{CC} = 2.0 V	-	66	215	-	270	-	325	ns
		V _{CC} = 4.5 V	-	24	43	-	54	-	65	ns
t _t	transition time	see Figure 9 [1]								
		V _{CC} = 2.0 V	-	19	75	-	95	-	110	ns
		V _{CC} = 4.5 V	-	7	15	-	19	-	22	ns
		V _{CC} = 6.0 V	-	6	13	-	16	-	19	ns
t _w	pulse width	nA LOW; see Figure 10								
		V _{CC} = 2.0 V	100	8	-	125	-	150	-	ns
		V _{CC} = 4.5 V	20	3	-	25	-	30	-	ns
		V _{CC} = 6.0 V	17	2	-	21	-	26	-	ns
		nB HIGH; see Figure 10								
		V _{CC} = 2.0 V	100	17	-	125	-	150	-	ns
		V _{CC} = 4.5 V	20	6	-	25	-	30	-	ns
		V _{CC} = 6.0 V	17	5	-	21	-	26	-	ns
		nRD LOW; see Figure 11								
		V _{CC} = 2.0 V	100	14	-	125	-	150	-	ns
		V _{CC} = 4.5 V	20	5	-	25	-	30	-	ns
		V _{CC} = 6.0 V	17	4	-	21	-	26	-	ns
		nQ HIGH and nQ̄ LOW; [2] V _{CC} = 5.0 V; see Figure 10 and 11								
		C _{EXT} = 100 nF; R _{EXT} = 10 kΩ	-	450	-	-	-	-	-	μs
		C _{EXT} = 0 pF; R _{EXT} = 5 kΩ	-	75	-	-	-	-	-	ns

Table 7. Dynamic characteristics ...continued

Voltages are referenced to GND (ground = 0 V); $C_L = 50 \text{ pF}$ unless otherwise specified; for test circuit see [Figure 12](#).

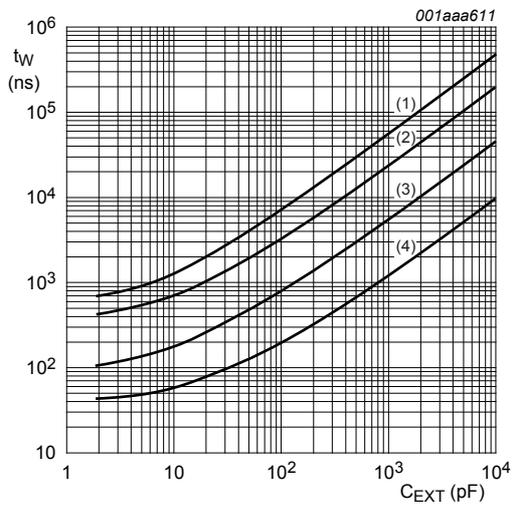
Symbol	Parameter	Conditions	25 °C			-40 °C to +85 °C		-40 °C to +125 °C		Unit	
			Min	Typ	Max	Min	Max	Min	Max		
t_{trig}	retrigger time	\overline{nA} , nB; $C_{\text{EXT}} = 0 \text{ pF}$; $R_{\text{EXT}} = 5 \text{ k}\Omega$; $V_{\text{CC}} = 5.0 \text{ V}$; see Figure 10	3 4	-	110	-	-	-	-	ns	
R_{EXT}	external timing resistor	see Figure 7									
		$V_{\text{CC}} = 2.0 \text{ V}$	10	-	1000	-	-	-	-	k Ω	
		$V_{\text{CC}} = 5.0 \text{ V}$	2	-	1000	-	-	-	-	k Ω	
C_{EXT}	external timing capacitor	$V_{\text{CC}} = 5.0 \text{ V}$; see Figure 7	4	-	-	-	-	-	-	pF	
C_{PD}	power dissipation capacitance	per monostable; $V_I = \text{GND to } V_{\text{CC}}$	5	-	54	-	-	-	-	pF	
74HCT123											
t_{PHL}	HIGH to LOW propagation delay	\overline{nRD} , \overline{nA} , nB to nQ or \overline{nQ} ; $C_{\text{EXT}} = 0 \text{ pF}$; $R_{\text{EXT}} = 5 \text{ k}\Omega$; see Figure 9									
		$V_{\text{CC}} = 4.5 \text{ V}$	-	30	51	-	64	-	77	ns	
		$V_{\text{CC}} = 5 \text{ V}$; $C_L = 15 \text{ pF}$	-	26	-	-	-	-	-	-	ns
		\overline{nRD} (reset) to nQ or \overline{nQ} ; $C_{\text{EXT}} = 0 \text{ pF}$; $R_{\text{EXT}} = 5 \text{ k}\Omega$; see Figure 9									
		$V_{\text{CC}} = 4.5 \text{ V}$	-	27	46	-	58	-	69	ns	
		$V_{\text{CC}} = 5 \text{ V}$; $C_L = 15 \text{ pF}$	-	23	-	-	-	-	-	-	ns
t_{PLH}	LOW to HIGH propagation delay	\overline{nRD} , \overline{nA} , nB to nQ or \overline{nQ} ; $C_{\text{EXT}} = 0 \text{ pF}$; $R_{\text{EXT}} = 5 \text{ k}\Omega$; see Figure 9									
		$V_{\text{CC}} = 4.5 \text{ V}$	-	28	51	-	64	-	77	ns	
		$V_{\text{CC}} = 5 \text{ V}$; $C_L = 15 \text{ pF}$	-	26	-	-	-	-	-	-	ns
		\overline{nRD} (reset) to nQ or \overline{nQ} ; $C_{\text{EXT}} = 0 \text{ pF}$; $R_{\text{EXT}} = 5 \text{ k}\Omega$; see Figure 9									
		$V_{\text{CC}} = 4.5 \text{ V}$	-	23	46	-	58	-	69	ns	
		$V_{\text{CC}} = 5 \text{ V}$; $C_L = 15 \text{ pF}$	-	23	-	-	-	-	-	-	ns
t_t	transition time	$V_{\text{CC}} = 4.5 \text{ V}$; see Figure 9	1	-	7	15	-	19	-	22	ns

Table 7. Dynamic characteristics ...continued

Voltages are referenced to GND (ground = 0 V); C_L = 50 pF unless otherwise specified; for test circuit see [Figure 12](#).

Symbol	Parameter	Conditions	25 °C			-40 °C to +85 °C		-40 °C to +125 °C		Unit
			Min	Typ	Max	Min	Max	Min	Max	
t _w	pulse width	V _{CC} = 4.5 V								
		nA LOW; see Figure 10	20	3	-	25	-	30	-	ns
		nB HIGH; see Figure 10	20	5	-	25	-	30	-	ns
		nRD LOW; see Figure 11	20	7	-	25	-	30	-	ns
		nQ HIGH and nQ LOW; [2] V _{CC} = 5.0 V; see Figure 10 and 11								
t _{trig}	retrigger time	C _{EXT} = 100 nF; R _{EXT} = 10 kΩ	-	450	-	-	-	-	-	μs
		C _{EXT} = 0 pF; R _{EXT} = 5 kΩ	-	75	-	-	-	-	-	ns
t _{trig}	retrigger time	nA, nB; C _{EXT} = 0 pF; [3][4] R _{EXT} = 5 kΩ; V _{CC} = 5.0 V; see Figure 10	-	110	-	-	-	-	-	ns
R _{EXT}	external timing resistor	V _{CC} = 5.0 V; see Figure 7	2	-	1000	-	-	-	-	kΩ
C _{EXT}	external timing capacitor	V _{CC} = 5.0 V; see Figure 7 [4]	-	-	-	-	-	-	-	pF
C _{PD}	power dissipation capacitance	per monostable; V _I = GND to V _{CC} [5]	-	56	-	-	-	-	-	pF

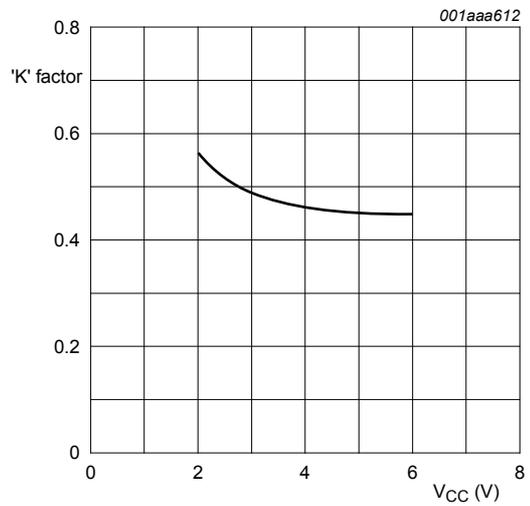
- [1] t_{pd} is the same as t_{PHL} and t_{PLH}; t_i is the same as t_{THL} and t_{TLH}
- [2] For other R_{EXT} and C_{EXT} combinations see [Figure 7](#). If C_{EXT} > 10 nF, the next formula is valid.
t_w = K × R_{EXT} × C_{EXT}, where:
t_w = typical output pulse width in ns;
R_{EXT} = external resistor in kΩ;
C_{EXT} = external capacitor in pF;
K = constant = 0.45 for V_{CC} = 5.0 V and 0.55 for V_{CC} = 2.0 V.
The inherent test jig and pin capacitance at pins 15 and 7 (nREXT/CEXT) is approximately 7 pF.
- [3] The time to retrigger the monostable multivibrator depends on the values of R_{EXT} and C_{EXT}. The output pulse width will only be extended when the time between the active-going edges of the trigger input pulses meets the minimum retrigger time. If C_{EXT} > 10 pF, the next formula (at V_{CC} = 5.0 V) for the setup time of a retrigger pulse is valid:
t_{trig} = 30 + 0.19 × R_{EXT} × C_{EXT}^{0.9} + 13 × R_{EXT}^{1.05}, where:
t_{trig} = retrigger time in ns;
C_{EXT} = external capacitor in pF; R_{EXT} = external resistor in kΩ.
The inherent test jig and pin capacitance at pins 15 and 7 (nREXT/CEXT) is 7 pF.
- [4] When the device is powered-up, initiate the device via a reset pulse, when C_{EXT} < 50 pF.
- [5] C_{PD} is used to determine the dynamic power dissipation (P_D in μW).
P_D = C_{PD} × V_{CC}² × f_i + Σ(C_L × V_{CC}² × f_o) + 0.75 × C_{EXT} × V_{CC}² × f_o + D × 16 × V_{CC} where:
f_i = input frequency in MHz;
f_o = output frequency in MHz;
D = duty factor in %;
C_L = output load capacitance in pF;
V_{CC} = supply voltage in V;
C_{EXT} = timing capacitance in pF;
Σ(C_L × V_{CC}² × f_o) sum of outputs.



$V_{CC} = 5.0\text{ V}; T_{amb} = 25\text{ }^\circ\text{C}.$

- (1) $R_{EXT} = 100\text{ k}\Omega$
- (2) $R_{EXT} = 50\text{ k}\Omega$
- (3) $R_{EXT} = 10\text{ k}\Omega$
- (4) $R_{EXT} = 2\text{ k}\Omega$

Fig 7. Typical output pulse width as a function of the external capacitor value

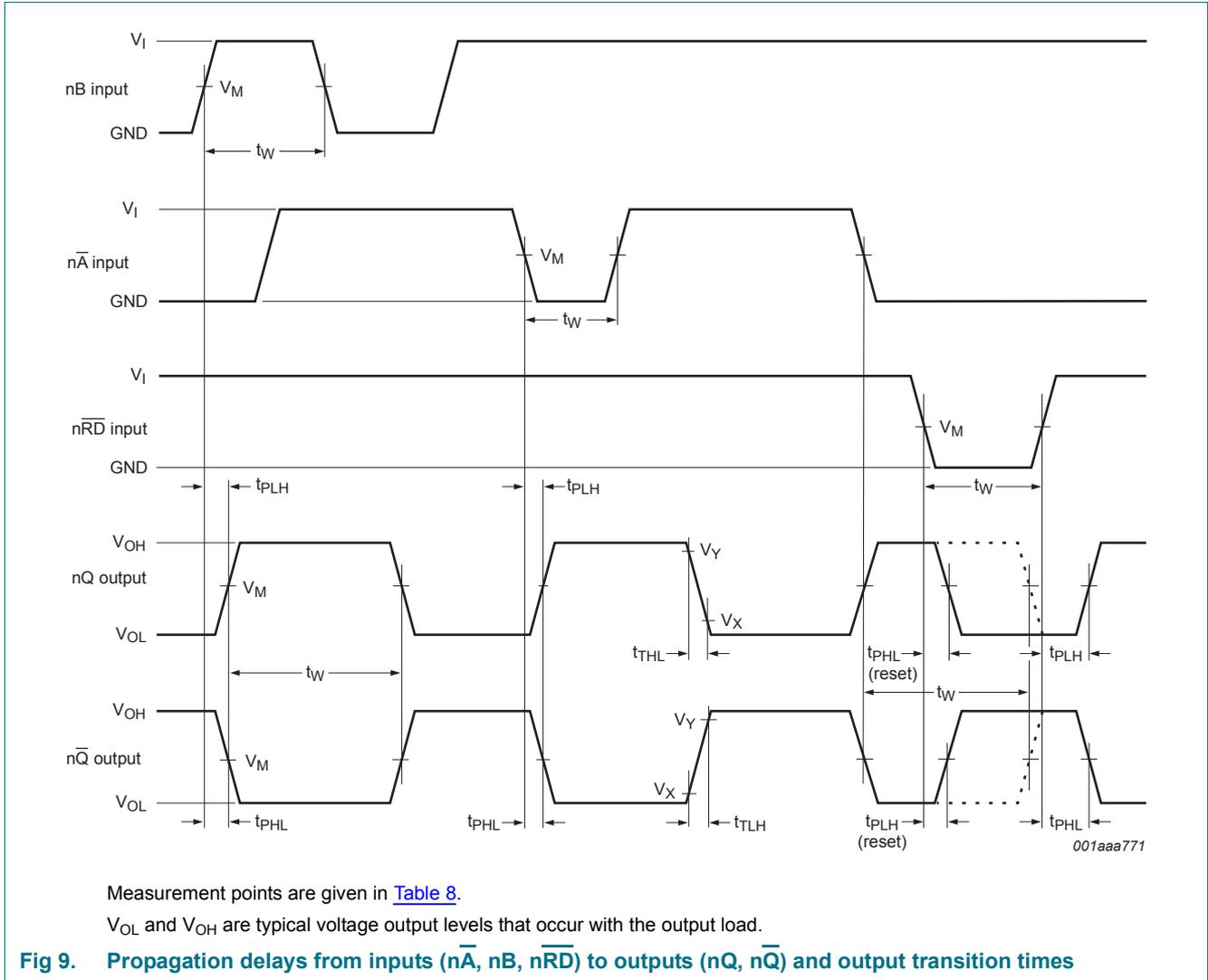


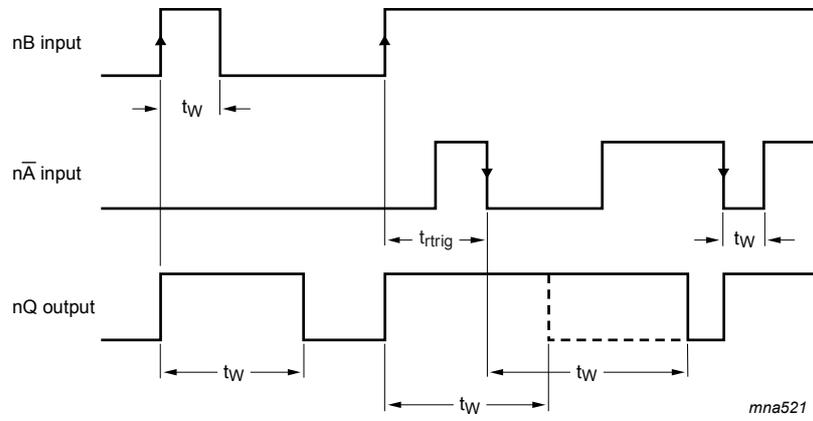
$C_{EXT} = 10\text{ nF}; R_{EXT} = 10\text{ k}\Omega\text{ to }100\text{ k}\Omega.$

$T_{amb} = 25\text{ }^\circ\text{C}.$

Fig 8. 74HC123 typical 'K' factor as function of V_{CC}

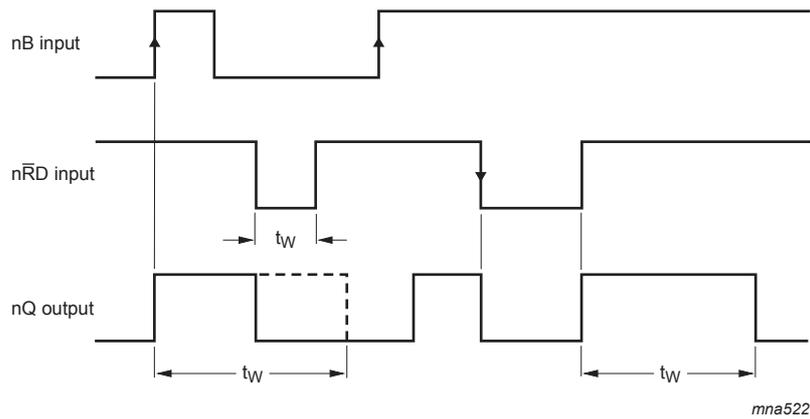
11. Waveforms





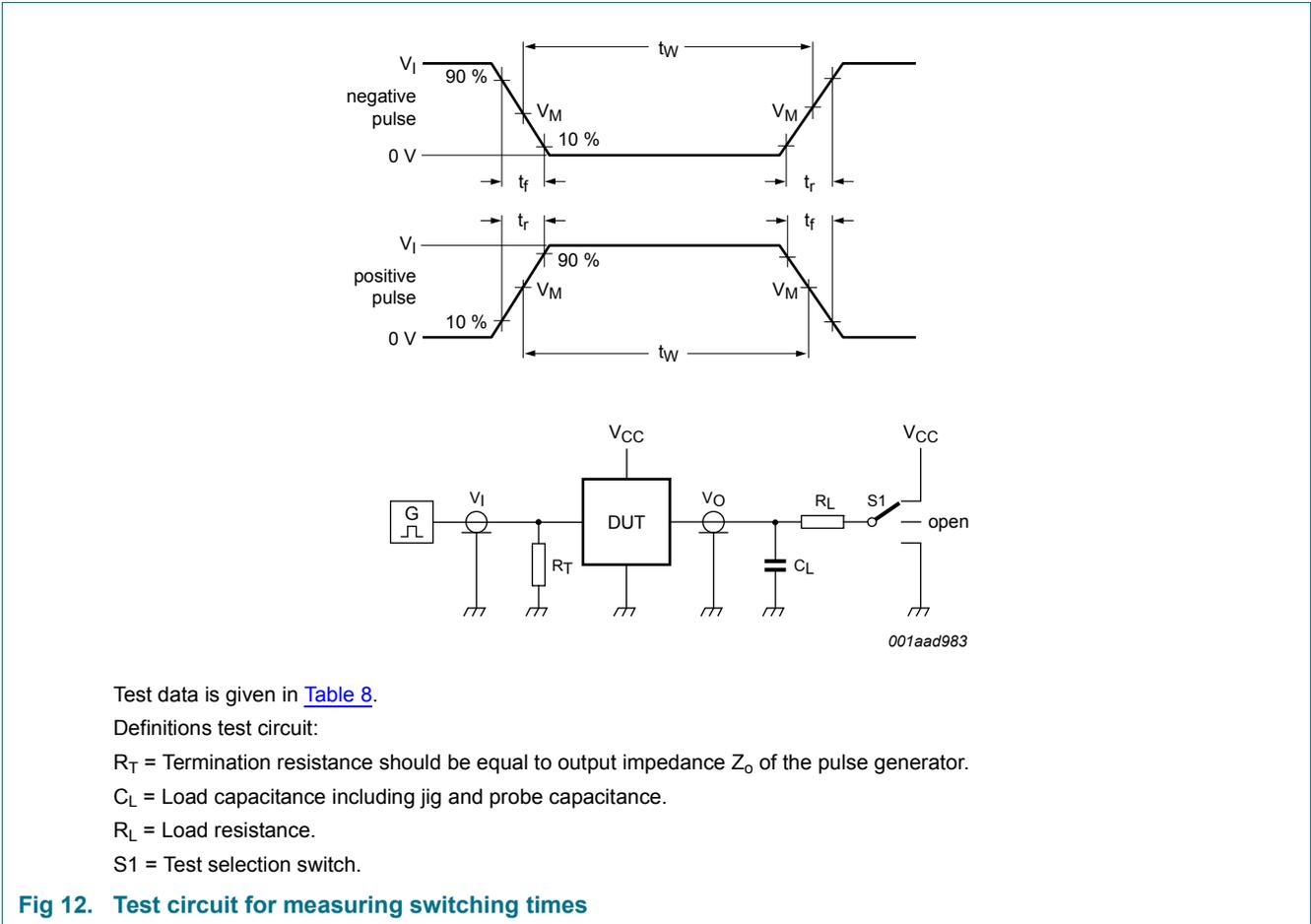
$n\overline{RD} = \text{HIGH}$

Fig 10. Output pulse control using retrigger pulse



$n\overline{A} = \text{LOW}$

Fig 11. Output pulse control using reset input $n\overline{RD}$



Test data is given in [Table 8](#).

Definitions test circuit:

R_T = Termination resistance should be equal to output impedance Z_o of the pulse generator.

C_L = Load capacitance including jig and probe capacitance.

R_L = Load resistance.

S1 = Test selection switch.

Fig 12. Test circuit for measuring switching times

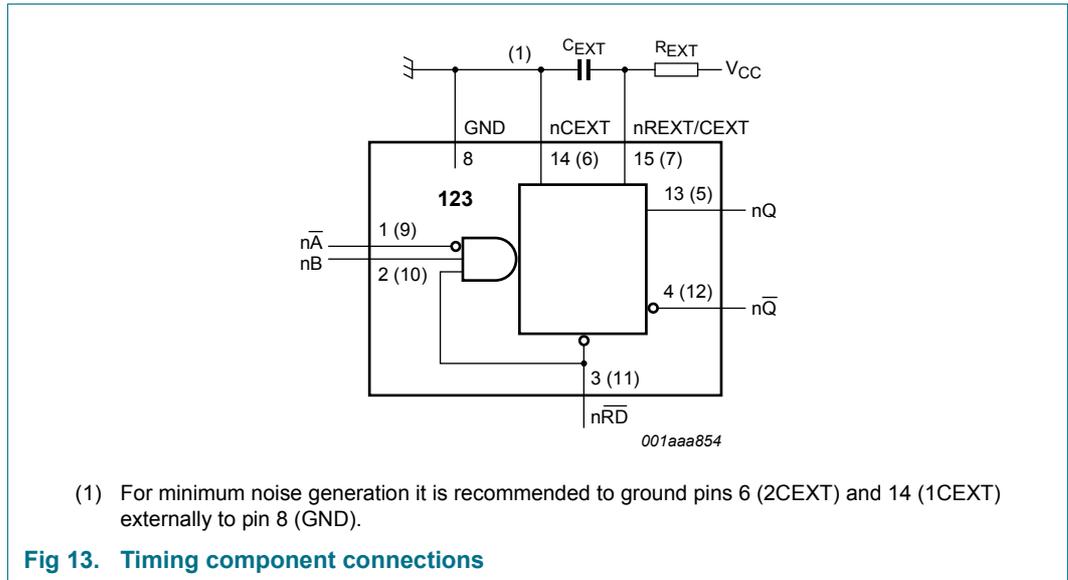
Table 8. Test data

Type	Input		Load		S1 position
	V_I	t_r, t_f	C_L	R_L	t_{PHL}, t_{PLH}
74HC123	V_{CC}	6 ns	15 pF, 50 pF	1 k Ω	open
74HCT123	3 V	6 ns	15 pF, 50 pF	1 k Ω	open

12. Application information

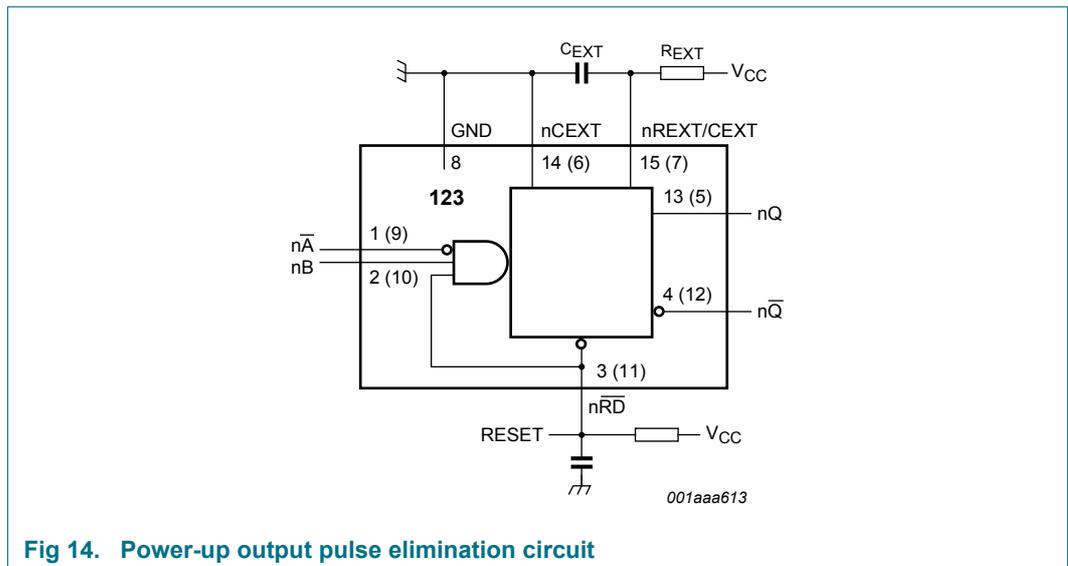
12.1 Timing component connections

The basic output pulse width is essentially determined by the values of the external timing components R_{EXT} and C_{EXT} .



12.2 Power-up considerations

When the monostable is powered-up it may produce an output pulse, with a pulse width defined by the values of R_{EXT} and C_{EXT} . This output pulse can be eliminated using the circuit shown in [Figure 14](#).



12.3 Power-down considerations

A large capacitor C_{EXT} may cause problems when powering-down the monostable due to the energy stored in this capacitor. When a system containing this device is powered-down or a rapid decrease of V_{CC} to zero occurs, the monostable may sustain damage, due to the capacitor discharging through the input protection diodes. To avoid this possibility, use a damping diode (D_{EXT}) preferably a germanium or Schottky type diode able to withstand large current surges and connect as shown in [Figure 15](#).

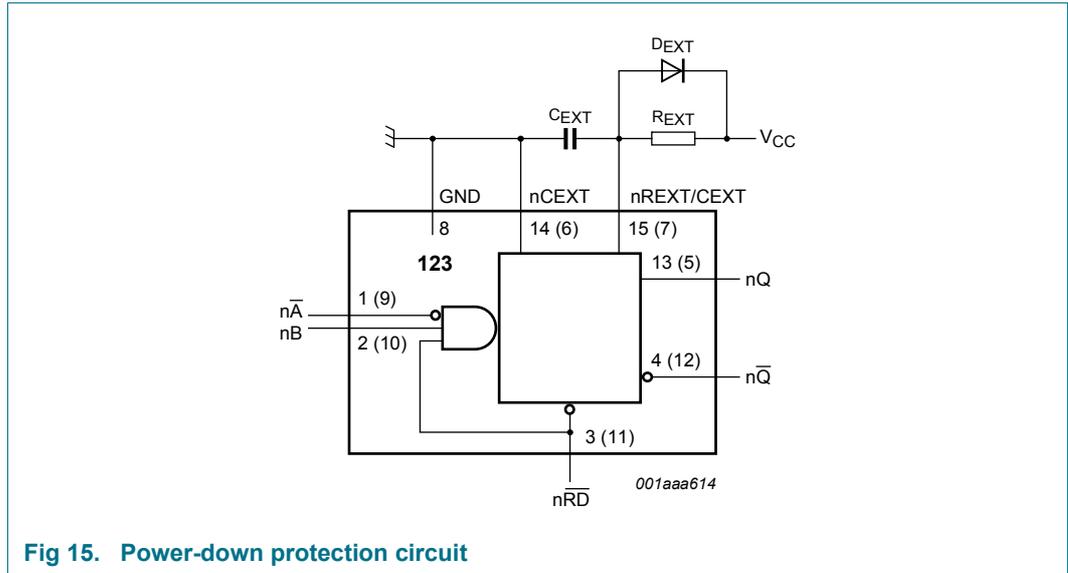


Fig 15. Power-down protection circuit

13. Package outline

DIP16: plastic dual in-line package; 16 leads (300 mil)

SOT38-4

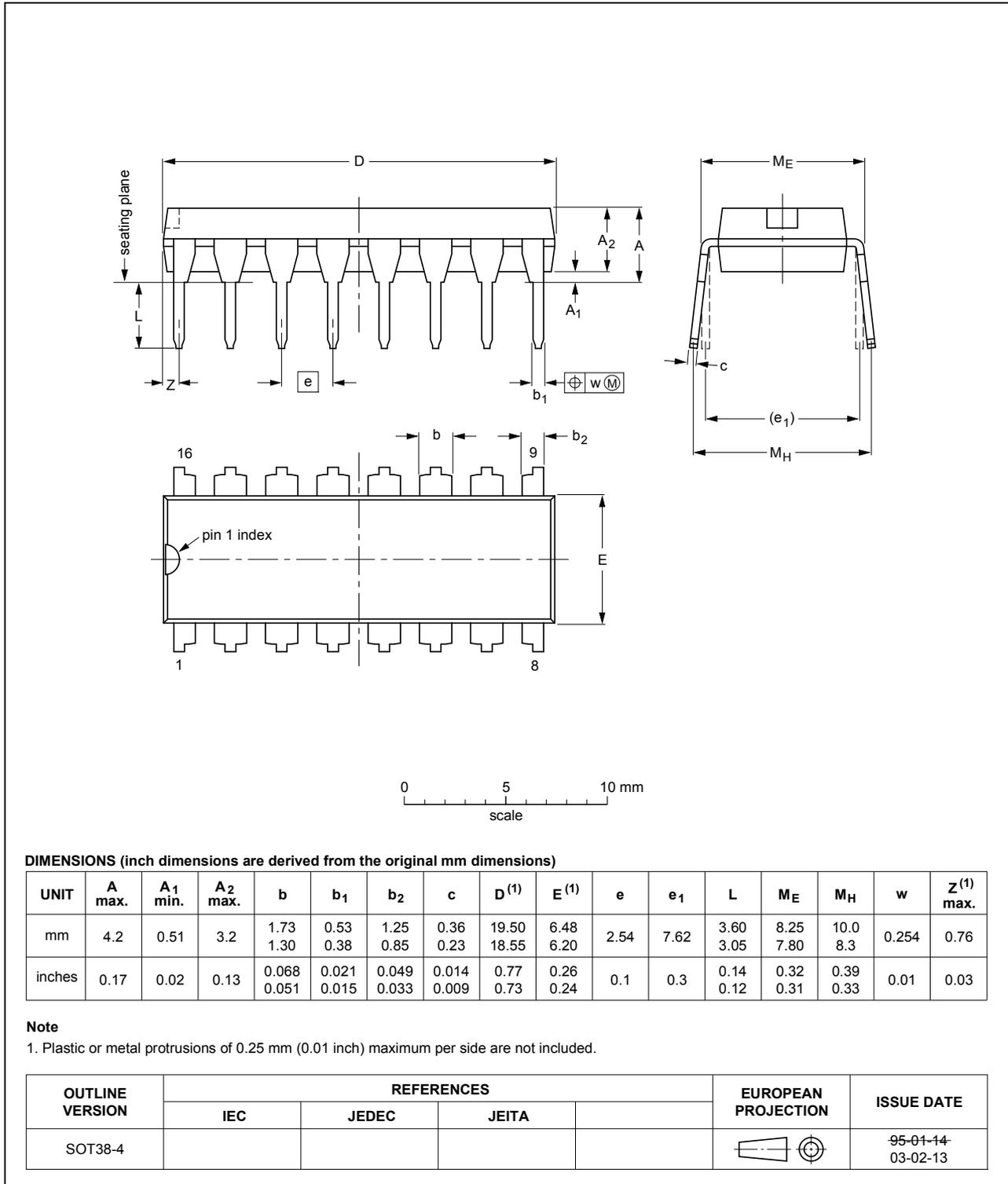


Fig 16. Package outline SOT38-4 (DIP16)

SO16: plastic small outline package; 16 leads; body width 3.9 mm

SOT109-1

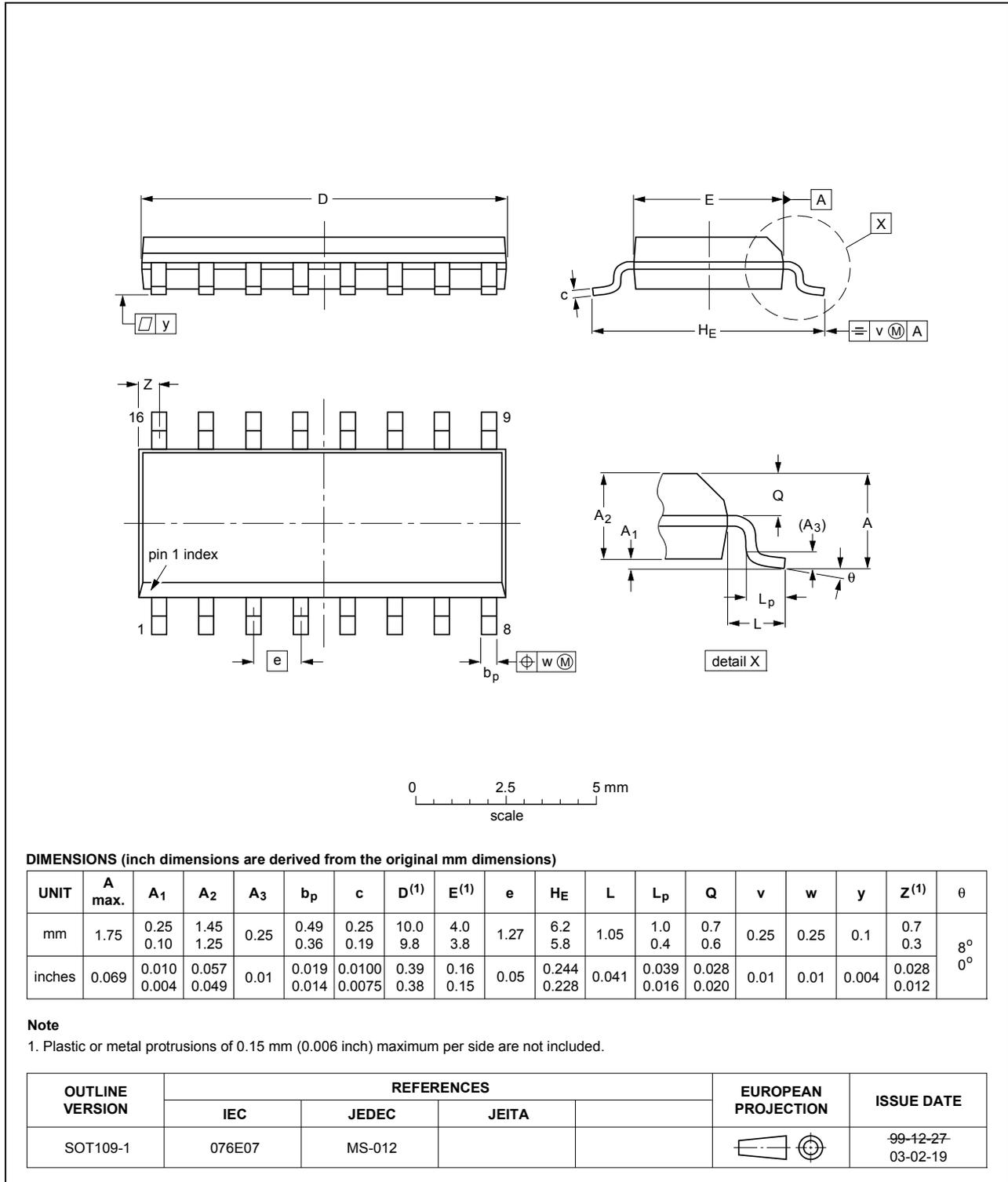


Fig 17. Package outline SOT109-1 (SO16)

SSOP16: plastic shrink small outline package; 16 leads; body width 5.3 mm

SOT338-1

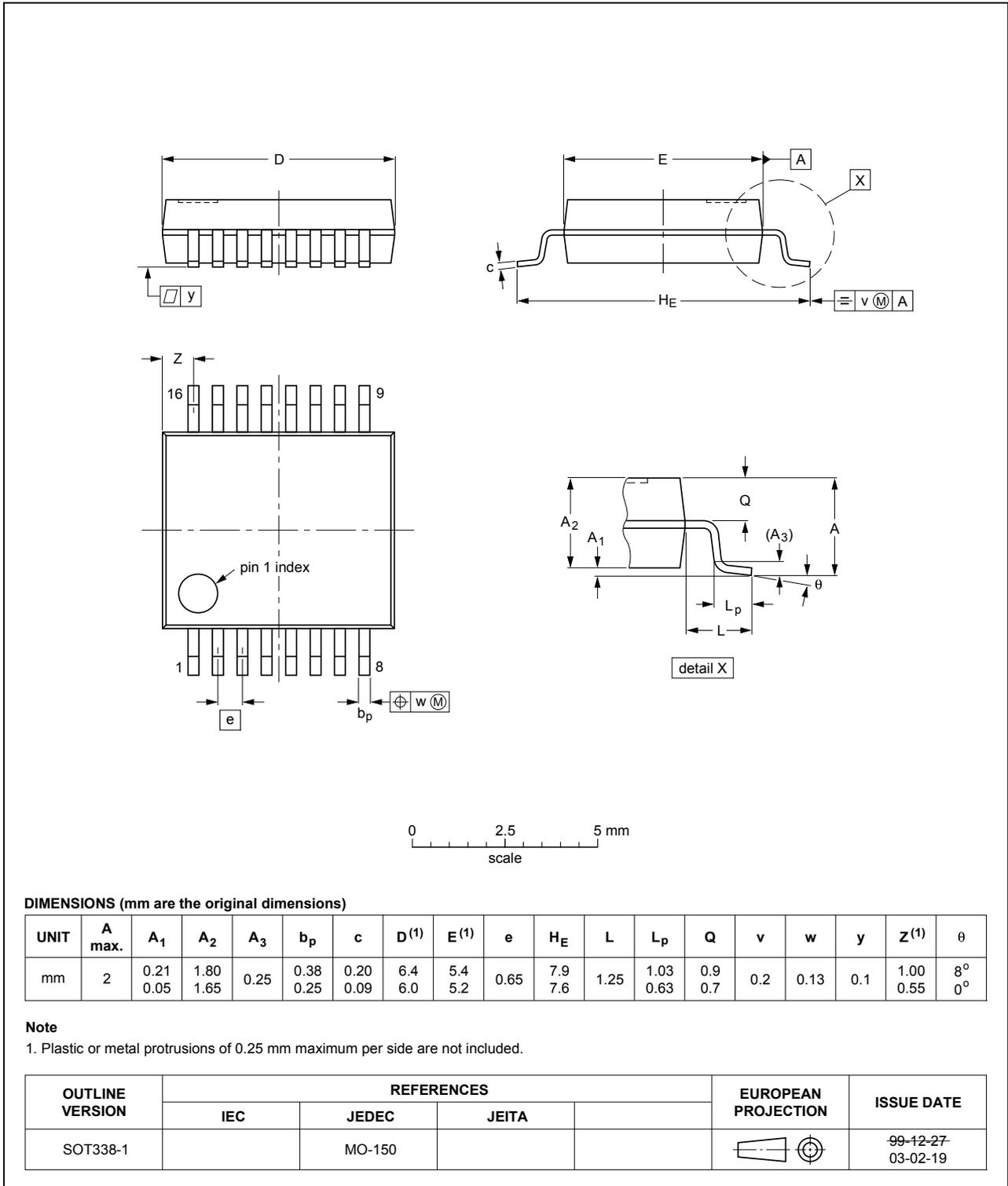


Fig 18. Package outline SOT338-1 (SSOP16)

TSSOP16: plastic thin shrink small outline package; 16 leads; body width 4.4 mm

SOT403-1

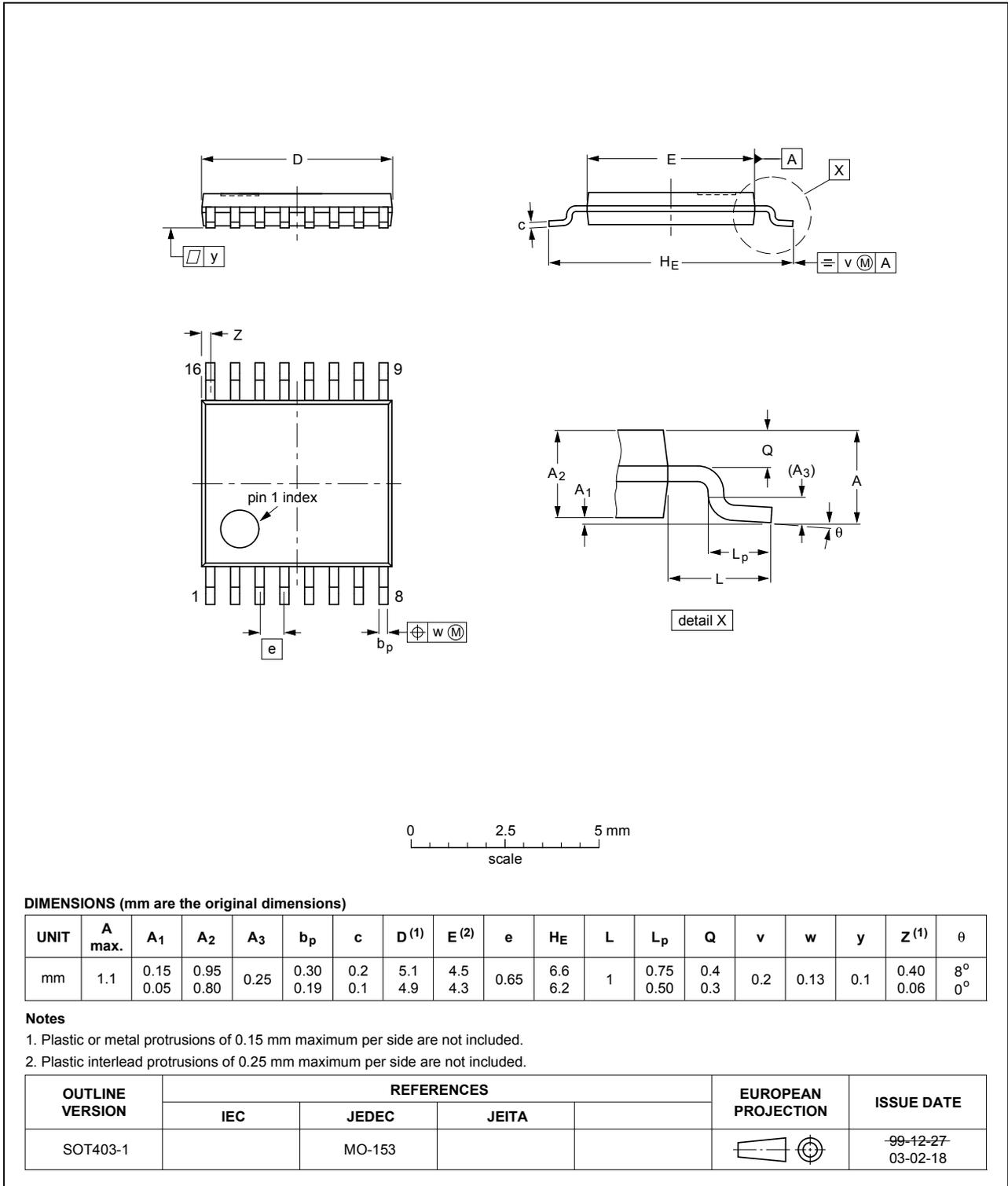


Fig 19. Package outline SOT403-1 (TSSOP16)

DHVQFN16: plastic dual in-line compatible thermal enhanced very thin quad flat package; no leads; 16 terminals; body 2.5 x 3.5 x 0.85 mm

SOT763-1

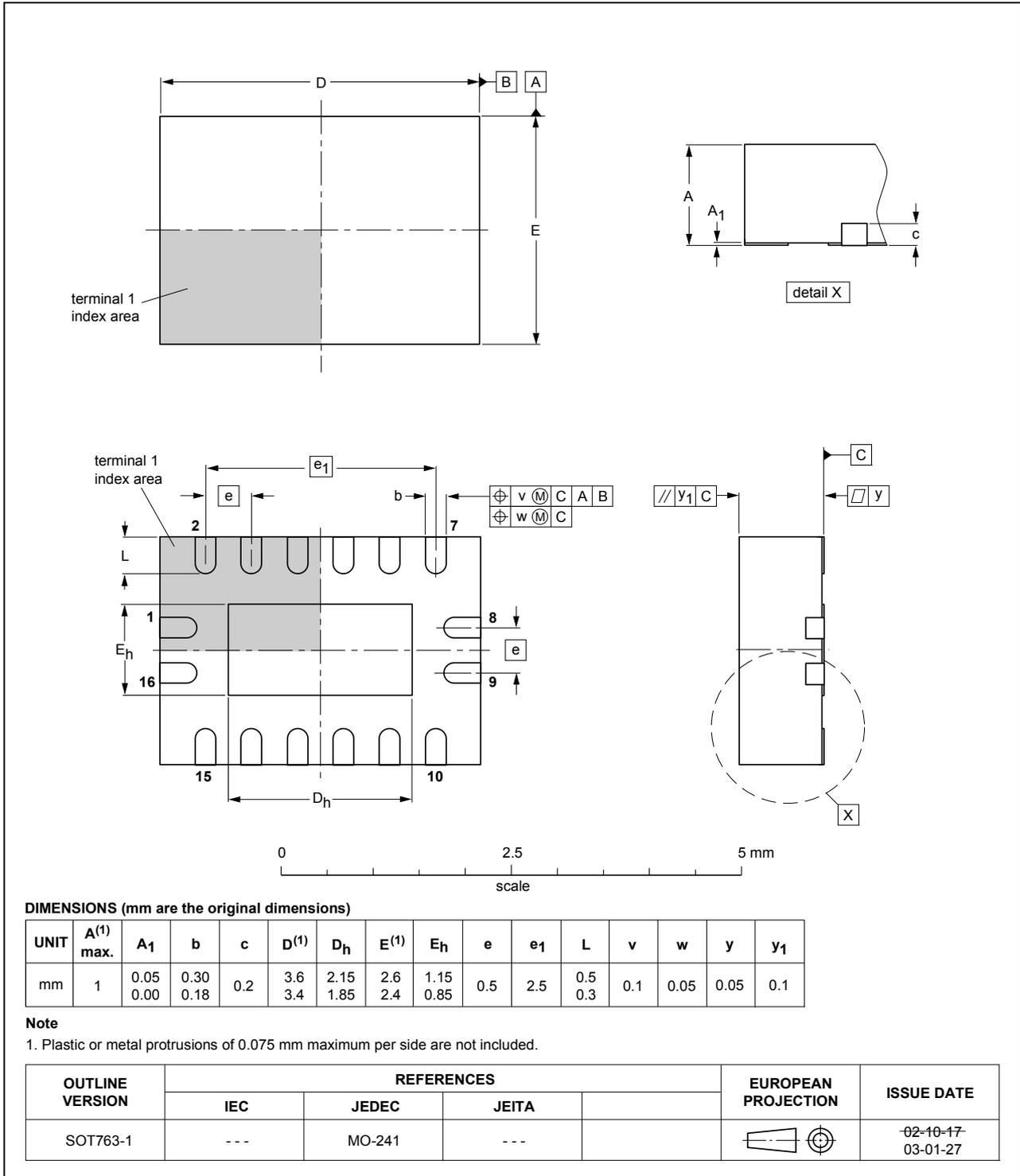


Fig 20. Package outline SOT763-1 (DHVQFN16)

14. Abbreviations

Table 9. Abbreviations

Acronym	Abbreviation
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor
DUT	Device Under Test
ESD	ElectroStatic Discharge
HBM	Human Body Model
LSTTL	Low-power Schottky Transistor-Transistor Logic
MM	Machine Model

15. Revision history

Table 10. Revision history

Document ID	Release date	Data sheet status	Change notice	Supersedes
74HC_HCT123 v.7	20110825	Product data sheet	-	74HC_HCT123 v.6
Modifications:	<ul style="list-style-type: none"> Waveform figure 9 updated (errata). 			
74HC_HCT123 v.6	20110314	Product data sheet	-	74HC_HCT123 v.5
74HC_HCT123 v.5	20090713	Product data sheet	-	74HC_HCT123 v.4
74HC_HCT123 v.4	20060616	Product data sheet	-	74HC_HCT123 v.3
74HC_HCT123 v.3	20040511	Product specification	-	74HC_HCT123_CNV v.2
74HC_HCT123_CNV v.2	19980708	Product specification	-	-

16. Legal information

16.1 Data sheet status

Document status ^{[1][2]}	Product status ^[3]	Definition
Objective [short] data sheet	Development	This document contains data from the objective specification for product development.
Preliminary [short] data sheet	Qualification	This document contains data from the preliminary specification.
Product [short] data sheet	Production	This document contains the product specification.

[1] Please consult the most recently issued document before initiating or completing a design.

[2] The term 'short data sheet' is explained in section "Definitions".

[3] The product status of device(s) described in this document may have changed since this document was published and may differ in case of multiple devices. The latest product status information is available on the Internet at URL <http://www.nxp.com>.

16.2 Definitions

Draft — The document is a draft version only. The content is still under internal review and subject to formal approval, which may result in modifications or additions. NXP Semiconductors does not give any representations or warranties as to the accuracy or completeness of information included herein and shall have no liability for the consequences of use of such information.

Short data sheet — A short data sheet is an extract from a full data sheet with the same product type number(s) and title. A short data sheet is intended for quick reference only and should not be relied upon to contain detailed and full information. For detailed and full information see the relevant full data sheet, which is available on request via the local NXP Semiconductors sales office. In case of any inconsistency or conflict with the short data sheet, the full data sheet shall prevail.

Product specification — The information and data provided in a Product data sheet shall define the specification of the product as agreed between NXP Semiconductors and its customer, unless NXP Semiconductors and customer have explicitly agreed otherwise in writing. In no event however, shall an agreement be valid in which the NXP Semiconductors product is deemed to offer functions and qualities beyond those described in the Product data sheet.

16.3 Disclaimers

Limited warranty and liability — Information in this document is believed to be accurate and reliable. However, NXP Semiconductors does not give any representations or warranties, expressed or implied, as to the accuracy or completeness of such information and shall have no liability for the consequences of use of such information.

In no event shall NXP Semiconductors be liable for any indirect, incidental, punitive, special or consequential damages (including - without limitation - lost profits, lost savings, business interruption, costs related to the removal or replacement of any products or rework charges) whether or not such damages are based on tort (including negligence), warranty, breach of contract or any other legal theory.

Notwithstanding any damages that customer might incur for any reason whatsoever, NXP Semiconductors' aggregate and cumulative liability towards customer for the products described herein shall be limited in accordance with the *Terms and conditions of commercial sale* of NXP Semiconductors.

Right to make changes — NXP Semiconductors reserves the right to make changes to information published in this document, including without limitation specifications and product descriptions, at any time and without notice. This document supersedes and replaces all information supplied prior to the publication hereof.

Suitability for use in automotive applications — This NXP Semiconductors product has been qualified for use in automotive applications. The product is not designed, authorized or warranted to be

suitable for use in medical, military, aircraft, space or life support equipment, nor in applications where failure or malfunction of an NXP Semiconductors product can reasonably be expected to result in personal injury, death or severe property or environmental damage. NXP Semiconductors accepts no liability for inclusion and/or use of NXP Semiconductors products in such equipment or applications and therefore such inclusion and/or use is at the customer's own risk.

Applications — Applications that are described herein for any of these products are for illustrative purposes only. NXP Semiconductors makes no representation or warranty that such applications will be suitable for the specified use without further testing or modification.

Customers are responsible for the design and operation of their applications and products using NXP Semiconductors products, and NXP Semiconductors accepts no liability for any assistance with applications or customer product design. It is customer's sole responsibility to determine whether the NXP Semiconductors product is suitable and fit for the customer's applications and products planned, as well as for the planned application and use of customer's third party customer(s). Customers should provide appropriate design and operating safeguards to minimize the risks associated with their applications and products.

NXP Semiconductors does not accept any liability related to any default, damage, costs or problem which is based on any weakness or default in the customer's applications or products, or the application or use by customer's third party customer(s). Customer is responsible for doing all necessary testing for the customer's applications and products using NXP Semiconductors products in order to avoid a default of the applications and the products or of the application or use by customer's third party customer(s). NXP does not accept any liability in this respect.

Limiting values — Stress above one or more limiting values (as defined in the Absolute Maximum Ratings System of IEC 60134) will cause permanent damage to the device. Limiting values are stress ratings only and (proper) operation of the device at these or any other conditions above those given in the Recommended operating conditions section (if present) or the Characteristics sections of this document is not warranted. Constant or repeated exposure to limiting values will permanently and irreversibly affect the quality and reliability of the device.

Terms and conditions of commercial sale — NXP Semiconductors products are sold subject to the general terms and conditions of commercial sale, as published at <http://www.nxp.com/profile/terms>, unless otherwise agreed in a valid written individual agreement. In case an individual agreement is concluded only the terms and conditions of the respective agreement shall apply. NXP Semiconductors hereby expressly objects to applying the customer's general terms and conditions with regard to the purchase of NXP Semiconductors products by customer.

No offer to sell or license — Nothing in this document may be interpreted or construed as an offer to sell products that is open for acceptance or the grant, conveyance or implication of any license under any copyrights, patents or other industrial or intellectual property rights.

Export control — This document as well as the item(s) described herein may be subject to export control regulations. Export might require a prior authorization from national authorities.

16.4 Trademarks

Notice: All referenced brands, product names, service names and trademarks are the property of their respective owners.

17. Contact information

For more information, please visit: <http://www.nxp.com>

For sales office addresses, please send an email to: salesaddresses@nxp.com

18. Contents

1	General description	1
2	Features and benefits	1
3	Ordering information	2
4	Functional diagram	2
5	Pinning information	4
5.1	Pinning	4
5.2	Pin description	4
6	Functional description	5
7	Limiting values	5
8	Recommended operating conditions	6
9	Static characteristics	6
10	Dynamic characteristics	8
11	Waveforms	12
12	Application information	15
12.1	Timing component connections	15
12.2	Power-up considerations	15
12.3	Power-down considerations	16
13	Package outline	17
14	Abbreviations	22
15	Revision history	22
16	Legal information	23
16.1	Data sheet status	23
16.2	Definitions	23
16.3	Disclaimers	23
16.4	Trademarks	24
17	Contact information	24
18	Contents	25

Please be aware that important notices concerning this document and the product(s) described herein, have been included in section 'Legal information'.

© NXP B.V. 2011.

All rights reserved.

For more information, please visit: <http://www.nxp.com>

For sales office addresses, please send an email to: salesaddresses@nxp.com

Date of release: 25 August 2011

Document identifier: 74HC_HCT123



3-A, WIDE INPUT RANGE, STEP-DOWN SWIFT™ CONVERTER

FEATURES

- **Wide Input Voltage Range:**
 - TPS5430: 5.5 V to 36 V
 - TPS5431: 5.5 V to 23 V
- **Up to 3-A Continuous (4-A Peak) Output Current**
- **High Efficiency up to 95% Enabled by 110-mΩ Integrated MOSFET Switch**
- **Wide Output Voltage Range: Adjustable Down to 1.22 V with 1.5% Initial Accuracy**
- **Internal Compensation Minimizes External Parts Count**
- **Fixed 500 kHz Switching Frequency for Small Filter Size**
- **Improved Line Regulation and Transient Response by Input Voltage Feed Forward**
- **System Protected by Overcurrent Limiting, Overvoltage Protection and Thermal Shutdown**
- **–40°C to 125°C Operating Junction Temperature Range**
- **Available in Small Thermally Enhanced 8-Pin SOIC PowerPAD™ Package**
- **For SWIFT™ Documentation, Application Notes and Design Software, See the TI Website at www.ti.com/swift**

APPLICATIONS

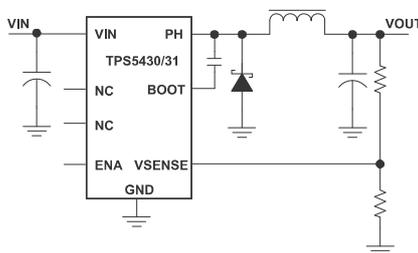
- **Consumer: Set-top Box, DVD, LCD Displays**
- **Industrial and Car Audio Power Supplies**
- **Battery Chargers, High Power LED Supply**
- **12-V/24-V Distributed Power Systems**

DESCRIPTION

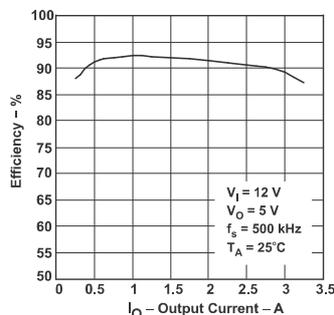
As a member of the SWIFT™ family of DC/DC regulators, the TPS5430/TPS5431 is a high-output-current PWM converter that integrates a low resistance high side N-channel MOSFET. Included on the substrate with the listed features are a high performance voltage error amplifier that provides tight voltage regulation accuracy under transient conditions; an undervoltage-lockout circuit to prevent start-up until the input voltage reaches 5.5 V; an internally set slow-start circuit to limit inrush currents; and a voltage feed-forward circuit to improve the transient response. Using the ENA pin, shutdown supply current is reduced to 18 μA typically. Other features include an active-high enable, overcurrent limiting, overvoltage protection and thermal shutdown. To reduce design complexity and external component count, the TPS5430/TPS5431 feedback loop is internally compensated. The TPS5431 is intended to operate from power rails up to 23 V. The TPS5430 regulates a wide variety of power sources including 24-V bus.

The TPS5430/TPS5431 device is available in a thermally enhanced, easy to use 8-pin SOIC PowerPAD™ package. TI provides evaluation modules and the SWIFT™ Designer software tool to aid in quickly achieving high-performance power supply designs to meet aggressive equipment development cycles.

Simplified Schematic



Efficiency vs Output Current



Please be aware that an important notice concerning availability, standard warranty, and use in critical applications of Texas Instruments semiconductor products and disclaimers thereto appears at the end of this data sheet.

SWIFT, PowerPAD are trademarks of Texas Instruments.



These devices have limited built-in ESD protection. The leads should be shorted together or the device placed in conductive foam during storage or handling to prevent electrostatic damage to the MOS gates.

ORDERING INFORMATION

T _J	INPUT VOLTAGE	OUTPUT VOLTAGE	PACKAGE ⁽¹⁾	PART NUMBER
–40°C to 125°C	5.5 V to 36 V	Adjustable to 1.22 V	Thermally Enhanced SOIC (DDA) ⁽²⁾	TPS5430DDA
–40°C to 125°C	5.5 V to 23 V	Adjustable to 1.22 V	Thermally Enhanced SOIC (DDA) ⁽²⁾	TPS5431DDA

- (1) For the most current package and ordering information, see the *Package Option Addendum* at the end of this document, or see the TI web site at www.ti.com.
- (2) The DDA package is also available taped and reeled. Add an R suffix to the device type (i.e., TPS5430DDAR). See applications section of data sheet for PowerPAD™ drawing and layout information.

ABSOLUTE MAXIMUM RATINGS

over operating free-air temperature range (unless otherwise noted) ⁽¹⁾⁽²⁾

			VALUE	UNIT	
V _I	Input voltage range	TPS5430	VIN	–0.3 to 40 ⁽³⁾	V
			BOOT	–0.3 to 50	
			PH (steady-state)	–0.6 to 40 ⁽³⁾	
		TPS5431	VIN	–0.3 to 25	
			BOOT	–0.3 to 35	
			PH (steady-state)	–0.6 to 25	
			ENA	–0.3 to 7	
			BOOT-PH	10	
			VSENSE	–0.3 to 3	
			PH (transient < 10 ns)	–1.2	
I _O	Source current	PH	Internally Limited		
I _{lkg}	Leakage current	PH	10	μA	
T _J	Operating virtual junction temperature range		–40 to 150	°C	
T _{stg}	Storage temperature		–65 to 150	°C	

- (1) Stresses beyond those listed under *absolute maximum ratings* may cause permanent damage to the device. These are stress ratings only and functional operation of the device at these or any other conditions beyond those indicated under *recommended operating conditions* is not implied. Exposure to absolute-maximum-rated conditions for extended periods may affect device reliability.
- (2) All voltage values are with respect to network ground terminal.
- (3) Approaching the absolute maximum rating for the VIN pin may cause the voltage on the PH pin to exceed the absolute maximum rating.

DISSIPATION RATINGS⁽¹⁾⁽²⁾

PACKAGE	THERMAL IMPEDANCE JUNCTION-TO-AMBIENT
8 Pin DDA (2-layer board with solder) ⁽³⁾	33°C/W
8 Pin DDA (4-layer board with solder) ⁽⁴⁾	26°C/W

- (1) Maximum power dissipation may be limited by overcurrent protection.
- (2) Power rating at a specific ambient temperature T_A should be determined with a junction temperature of 125°C. This is the point where distortion starts to substantially increase. Thermal management of the final PCB should strive to keep the junction temperature at or below 125°C for best performance and long-term reliability. See *Thermal Calculations* in applications section of this data sheet for more information.
- (3) Test board conditions:
 - a. 3 in x 3 in, 2 layers, thickness: 0.062 inch.
 - b. 2 oz. copper traces located on the top and bottom of the PCB.
 - c. 6 thermal vias in the PowerPAD area under the device package.
- (4) Test board conditions:
 - a. 3 in x 3 in, 4 layers, thickness: 0.062 inch.
 - b. 2 oz. copper traces located on the top and bottom of the PCB.
 - c. 2 oz. copper ground planes on the 2 internal layers.
 - d. 6 thermal vias in the PowerPAD area under the device package.

RECOMMENDED OPERATING CONDITIONS

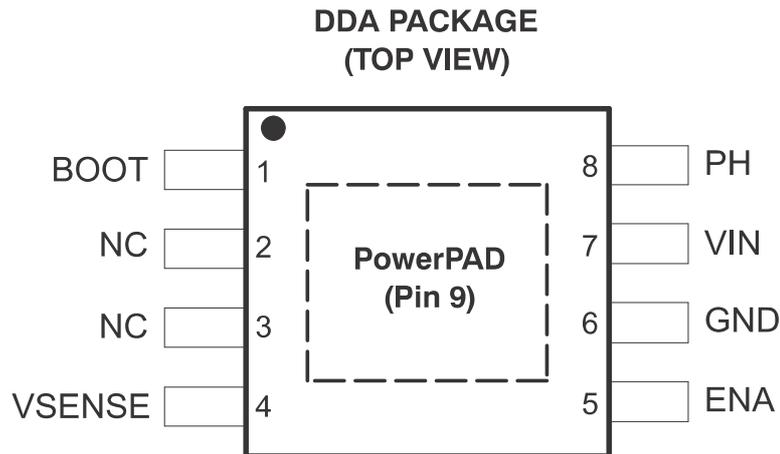
		MIN	NOM	MAX	UNIT
VIN	Input voltage range	TPS5430	5.5	36	V
		TPS5431	5.5	23	
T _J	Operating junction temperature	-40		125	°C

ELECTRICAL CHARACTERISTICS

 T_J = -40°C to 125°C, VIN = 12.0 V (unless otherwise noted)

PARAMETER	TEST CONDITIONS	MIN	TYP	MAX	UNIT
SUPPLY VOLTAGE (VIN PIN)					
I _Q	Quiescent current VSENSE = 2 V, Not switching, PH pin open Shutdown, ENA = 0 V		3	4.4	mA
			18	50	μA
UNDERVOLTAGE LOCK OUT (UVLO)					
	Start threshold voltage, UVLO		5.3	5.5	V
	Hysteresis voltage, UVLO		330		mV
VOLTAGE REFERENCE					
Voltage reference accuracy	T _J = 25°C	1.202	1.221	1.239	V
	I _O = 0 A – 3 A	1.196	1.221	1.245	
OSCILLATOR					
	Internally set free-running frequency	400	500	600	kHz
	Minimum controllable on time		150	200	ns
	Maximum duty cycle	87	89		%
ENABLE (ENA PIN)					
	Start threshold voltage, ENA			1.3	V
	Stop threshold voltage, ENA	0.5			V
	Hysteresis voltage, ENA		450		mV
	Internal slow-start time (0~100%)	6.6	8	10	ms
CURRENT LIMIT					
	Current limit	4	5	6	A
	Current limit hiccup time	13	16	20	ms
THERMAL SHUTDOWN					
	Thermal shutdown trip point	135	162		°C
	Thermal shutdown hysteresis		14		°C
OUTPUT MOSFET					
r _{DS(on)}	High-side power MOSFET switch VIN = 5.5 V		150		mΩ
			110	230	

PIN ASSIGNMENTS



TERMINAL FUNCTIONS

TERMINAL		DESCRIPTION
NAME	NO.	
BOOT	1	Boost capacitor for the high-side FET gate driver. Connect 0.01 μ F low ESR capacitor from BOOT pin to PH pin.
NC	2, 3	Not connected internally.
VSENSE	4	Feedback voltage for the regulator. Connect to output voltage divider.
ENA	5	On/off control. Below 0.5 V, the device stops switching. Float the pin to enable.
GND	6	Ground. Connect to PowerPAD.
VIN	7	Input supply voltage. Bypass VIN pin to GND pin close to device package with a high quality, low ESR ceramic capacitor.
PH	8	Source of the high side power MOSFET. Connected to external inductor and diode.
PowerPAD	9	GND pin must be connected to the exposed pad for proper operation.

TYPICAL CHARACTERISTICS

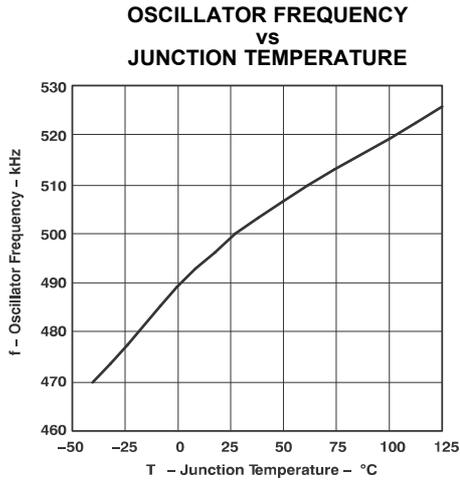


Figure 1.

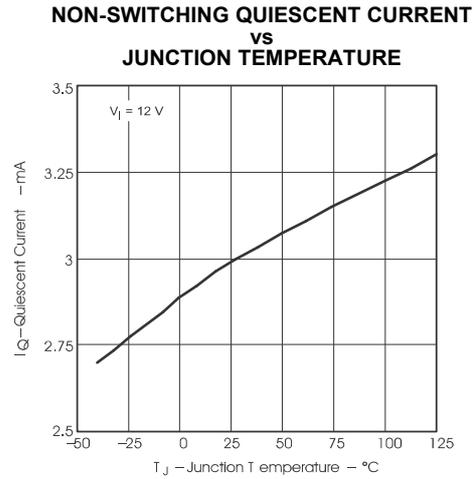


Figure 2.

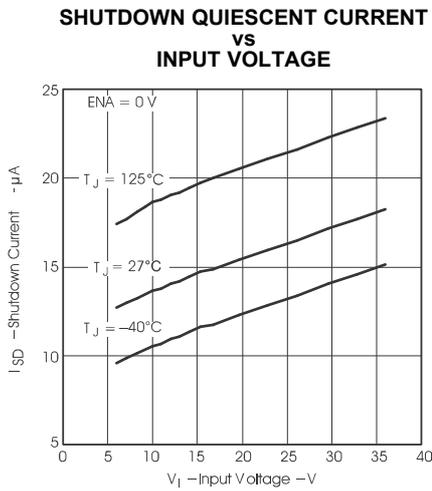


Figure 3.

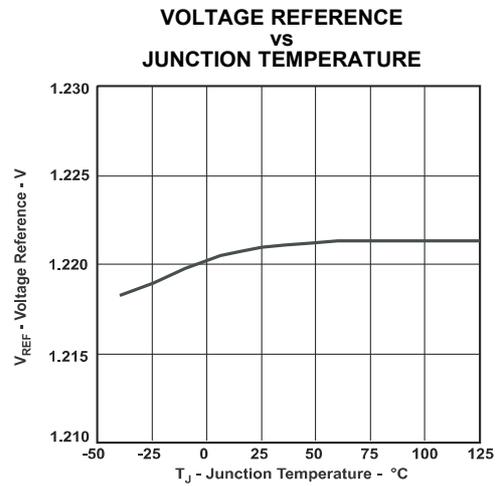


Figure 4.

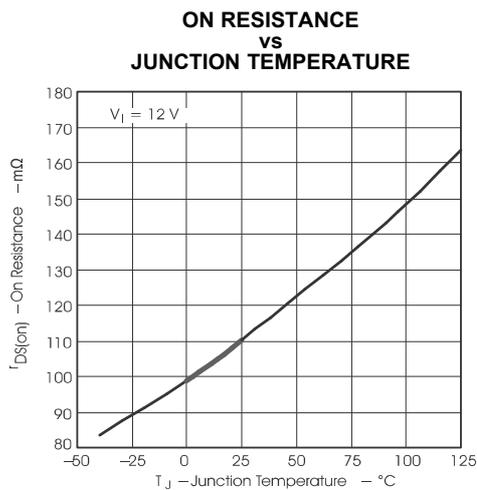


Figure 5.

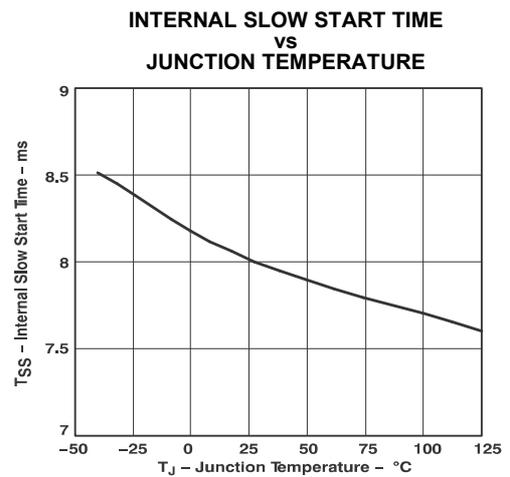


Figure 6.

TYPICAL CHARACTERISTICS (continued)

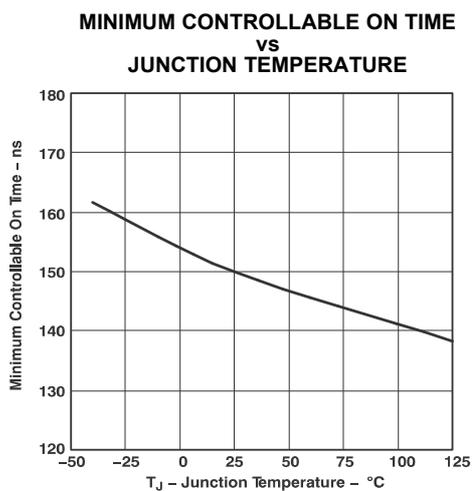


Figure 7.

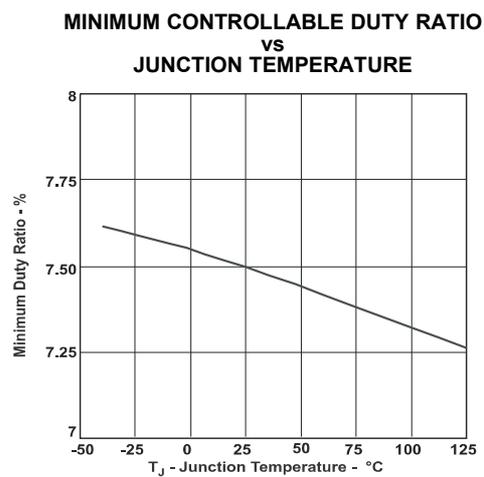
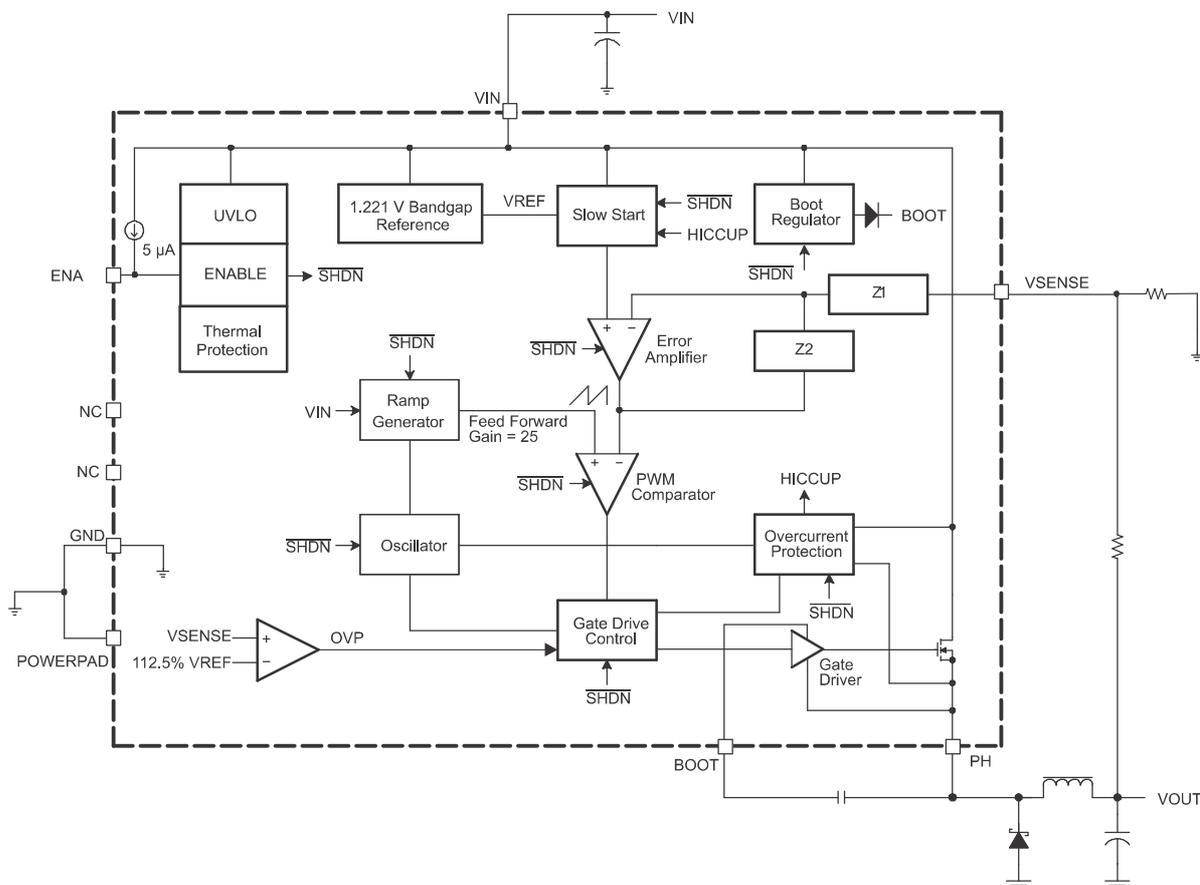


Figure 8.

APPLICATION INFORMATION

FUNCTIONAL BLOCK DIAGRAM



DETAILED DESCRIPTION

Oscillator Frequency

The internal free running oscillator sets the PWM switching frequency at 500 kHz. The 500 kHz switching frequency allows less output inductance for the same output ripple requirement resulting in a smaller output inductor.

Voltage Reference

The voltage reference system produces a precision reference signal by scaling the output of a temperature stable bandgap circuit. The bandgap and scaling circuits are trimmed during production testing to an output of 1.221 V at room temperature.

Enable (ENA) and Internal Slow Start

The ENA pin provides electrical on/off control of the regulator. Once the ENA pin voltage exceeds the threshold voltage, the regulator starts operation and the internal slow start begins to ramp. If the ENA pin voltage is pulled below the threshold voltage, the regulator stops switching and the internal slow start resets. Connecting the pin to ground or to any voltage less than 0.5 V will disable the regulator and activate the shutdown mode. The quiescent current of the TPS5430/TPS5431 in shutdown mode is typically 18 μ A.

The ENA pin has an internal pullup current source, allowing the user to float the ENA pin. If an application requires controlling the ENA pin, use open drain or open collector output logic to interface with the pin. To limit the start-up inrush current, an internal slow-start circuit is used to ramp up the reference voltage from 0 V to its final value, linearly. The internal slow start time is 8 ms typically.

APPLICATION INFORMATION (continued)

Undervoltage Lockout (UVLO)

The TPS5430/TPS5431 incorporates an undervoltage lockout circuit to keep the device disabled when VIN (the input voltage) is below the UVLO start voltage threshold. During power up, internal circuits are held inactive and the internal slow start is grouded until VIN exceeds the UVLO start threshold voltage. Once the UVLO start threshold voltage is reached, the internal slow start is released and device start-up begins. The device operates until VIN falls below the UVLO stop threshold voltage. The typical hysteresis in the UVLO comparator is 330 mV.

Boost Capacitor (BOOT)

Connect a 0.01 μ F low-ESR ceramic capacitor between the BOOT pin and PH pin. This capacitor provides the gate drive voltage for the high-side MOSFET. X7R or X5R grade dielectrics are recommended due to their stable values over temperature.

Output Feedback (VSENSE) and Internal Compensation

The output voltage of the regulator is set by feeding back the center point voltage of an external resistor divider network to the VSENSE pin. In steady-state operation, the VSENSE pin voltage should be equal to the voltage reference 1.221 V.

The TPS5430/TPS5431 implements internal compensation to simplify the regulator design. Since the TPS5430/TPS5431 uses voltage mode control, a type 3 compensation network has been designed on chip to provide a high crossover frequency and a high phase margin for good stability. See the *Internal Compensation Network* in the applications section for more details.

Voltage Feed Forward

The internal voltage feed forward provides a constant dc power stage gain despite any variations with the input voltage. This greatly simplifies the stability analysis and improves the transient response. Voltage feed forward varies the peak ramp voltage inversely with the input voltage so that the modulator and power stage gain are constant at the feed forward gain, i.e.

$$\text{Feed Forward Gain} = \frac{V_{IN}}{\text{Ramp}_{\text{pk-pk}}} \quad (1)$$

The typical feed forward gain of TPS5430/TPS5431 is 25.

Pulse-Width-Modulation (PWM) Control

The regulator employs a fixed frequency pulse-width-modulator (PWM) control method. First, the feedback voltage (VSENSE pin voltage) is compared to the constant voltage reference by the high gain error amplifier and compensation network to produce an error voltage. Then, the error voltage is compared to the ramp voltage by the PWM comparator. In this way, the error voltage magnitude is converted to a pulse width which is the duty cycle. Finally, the PWM output is fed into the gate drive circuit to control the on-time of the high-side MOSFET.

Overcurrent Limiting

Overcurrent limiting is implemented by sensing the drain-to-source voltage across the high-side MOSFET. The drain to source voltage is then compared to a voltage level representing the overcurrent threshold limit. If the drain-to-source voltage exceeds the overcurrent threshold limit, the overcurrent indicator is set true. The system will ignore the overcurrent indicator for the leading edge blanking time at the beginning of each cycle to avoid any turn-on noise glitches.

Once overcurrent indicator is set true, overcurrent limiting is triggered. The high-side MOSFET is turned off for the rest of the cycle after a propagation delay. The overcurrent limiting mode is called cycle-by-cycle current limiting.

APPLICATION INFORMATION (continued)

Sometimes under serious overload conditions such as short-circuit, the overcurrent runaway may still happen when using cycle-by-cycle current limiting. A second mode of current limiting is used, i.e. hiccup mode overcurrent limiting. During hiccup mode overcurrent limiting, the voltage reference is grounded and the high-side MOSFET is turned off for the hiccup time. Once the hiccup time duration is complete, the regulator restarts under control of the slow start circuit.

Overvoltage Protection

The TPS5430/TPS5431 has an overvoltage protection (OVP) circuit to minimize voltage overshoot when recovering from output fault conditions. The OVP circuit includes an overvoltage comparator to compare the VSENSE pin voltage and a threshold of $112.5\% \times V_{REF}$. Once the VSENSE pin voltage is higher than the threshold, the high-side MOSFET will be forced off. When the VSENSE pin voltage drops lower than the threshold, the high-side MOSFET will be enabled again.

Thermal Shutdown

The TPS5430/TPS5431 protects itself from overheating with an internal thermal shutdown circuit. If the junction temperature exceeds the thermal shutdown trip point, the voltage reference is grounded and the high-side MOSFET is turned off. The part is restarted under control of the slow start circuit automatically when the junction temperature drops 14°C below the thermal shutdown trip point.

PCB Layout

Connect a low ESR ceramic bypass capacitor to the VIN pin. Care should be taken to minimize the loop area formed by the bypass capacitor connections, the VIN pin, and the TPS5430/TPS5431 ground pin. The best way to do this is to extend the top side ground area from under the device adjacent to the VIN trace, and place the bypass capacitor as close as possible to the VIN pin. The minimum recommended bypass capacitance is $4.7 \mu\text{F}$ ceramic with a X5R or X7R dielectric.

There should be a ground area on the top layer directly underneath the IC, with an exposed area for connection to the PowerPAD. Use vias to connect this ground area to any internal ground planes. Use additional vias at the ground side of the input and output filter capacitors as well. The GND pin should be tied to the PCB ground by connecting it to the ground area under the device as shown below.

The PH pin should be routed to the output inductor, catch diode and boot capacitor. Since the PH connection is the switching node, the inductor should be located very close to the PH pin and the area of the PCB conductor minimized to prevent excessive capacitive coupling. The catch diode should also be placed close to the device to minimize the output current loop area. Connect the boot capacitor between the phase node and the BOOT pin as shown. Keep the boot capacitor close to the IC and minimize the conductor trace lengths. The component placements and connections shown work well, but other connection routings may also be effective.

Connect the output filter capacitor(s) as shown between the VOUT trace and GND. It is important to keep the loop formed by the PH pin, Lout, Cout and GND as small as is practical.

Connect the VOUT trace to the VSENSE pin using the resistor divider network to set the output voltage. Do not route this trace too close to the PH trace. Due to the size of the IC package and the device pin-out, the trace may need to be routed under the output capacitor. Alternately, the routing may be done on an alternate layer if a trace under the output capacitor is not desired.

If using the grounding scheme shown in [Figure 9](#), use a via connection to a different layer to route to the ENA pin.

APPLICATION INFORMATION (continued)

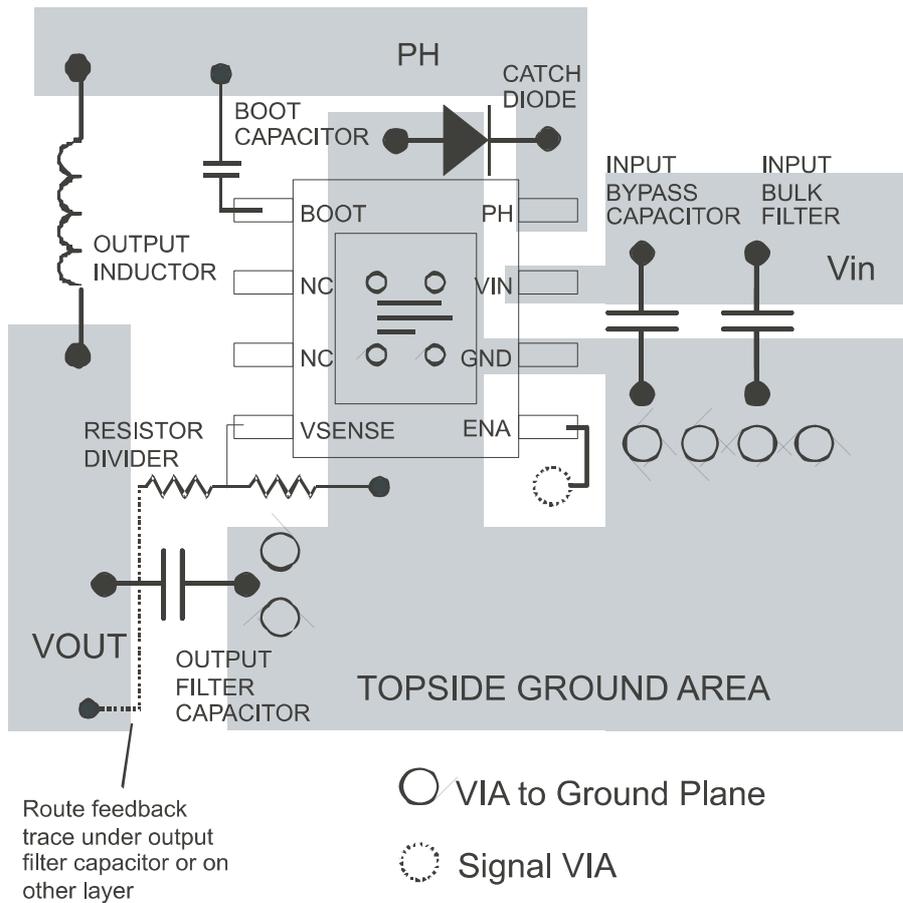
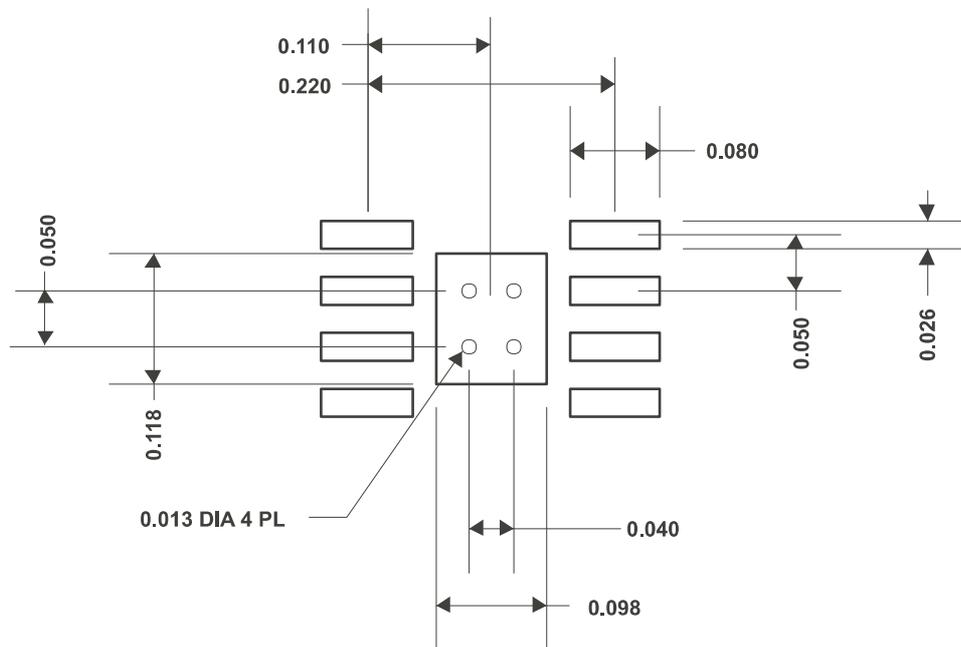


Figure 9. Design Layout

APPLICATION INFORMATION (continued)



All dimensions in inches

Figure 10. TPS5430 Land Pattern

Application Circuits

Figure 11 shows the schematic for a typical TPS5430 application. The TPS5430 can provide up to 3-A output current at a nominal output voltage of 5 V. For proper thermal performance, the exposed PowerPAD™ underneath the device must be soldered down to the printed-circuit board.

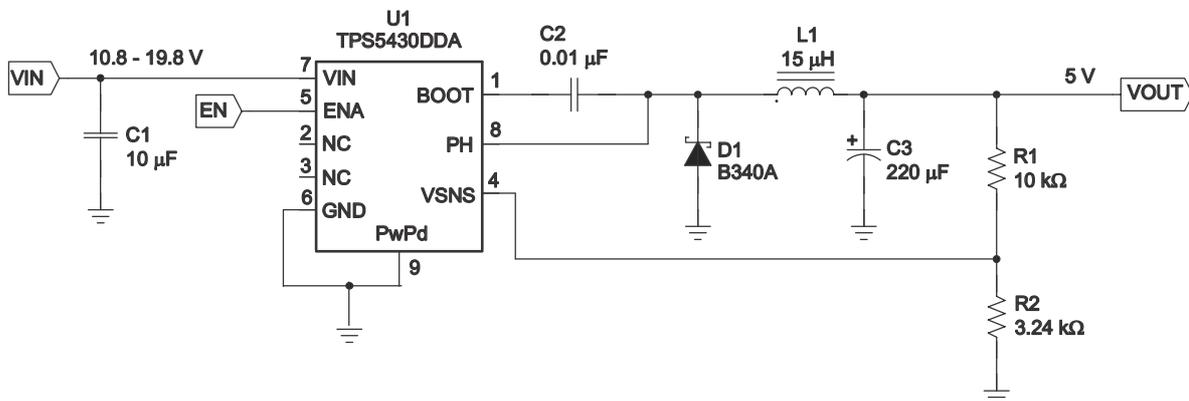


Figure 11. Application Circuit, 12-V to 5.0-V

Design Procedure

The following design procedure can be used to select component values for the TPS5430. Alternately, the SWIFT™ Designer Software may be used to generate a complete design. The SWIFT™ Designer Software uses an iterative design procedure and accesses a comprehensive database of components when generating a design. This section presents a simplified discussion of the design process.

APPLICATION INFORMATION (continued)

To begin the design process a few parameters must be decided upon. The designer needs to know the following:

- Input voltage range
- Output voltage
- Input ripple voltage
- Output ripple voltage
- Output current rating
- Operating frequency

Design Parameters

For this design example, use the following as the input parameters:

DESIGN PARAMETER ⁽¹⁾	EXAMPLE VALUE
Input voltage range	10.8 V to 19.8 V
Output voltage	5 V
Input ripple voltage	300 mV
Output ripple voltage	30 mV
Output current rating	3 A
Operating frequency	500 kHz

(1) As an additional constraint, the design is set up to be small size and low component height.

Switching Frequency

The switching frequency for the TPS5430 is internally set to 500 kHz. It is not possible to adjust the switching frequency.

Input Capacitors

The TPS5430 requires an input decoupling capacitor and, depending on the application, a bulk input capacitor. The recommended value for the decoupling capacitor, C1, is 10 µF. A high quality ceramic type X5R or X7R is required. For some applications, a smaller value decoupling capacitor may be used, so long as the input voltage and current ripple ratings are not exceeded. The voltage rating must be greater than the maximum input voltage, including ripple.

This input ripple voltage can be approximated by [Equation 2](#) :

$$\Delta V_{IN} = \frac{I_{OUT(MAX)} \times 0.25}{C_{BULK} \times f_{SW}} + (I_{OUT(MAX)} \times ESR_{MAX}) \quad (2)$$

Where $I_{OUT(MAX)}$ is the maximum load current, f_{SW} is the switching frequency, C_{IN} is the input capacitor value and ESR_{MAX} is the maximum series resistance of the input capacitor.

The maximum RMS ripple current also needs to be checked. For worst case conditions, this can be approximated by [Equation 3](#) :

$$I_{CIN} = \frac{I_{OUT(MAX)}}{2} \quad (3)$$

In this case the input ripple voltage would be 156 mV and the RMS ripple current would be 1.5 A. The maximum voltage across the input capacitors would be $V_{IN\ max} + \Delta V_{IN}/2$. The chosen input decoupling capacitor is rated for 25 V and the ripple current capacity is greater than 3 A, providing ample margin. It is very important that the maximum ratings for voltage and current are not exceeded under any circumstance.

Additionally some bulk capacitance may be needed, especially if the TPS5430 circuit is not located within about 2 inches from the input voltage source. The value for this capacitor is not critical but it also should be rated to handle the maximum input voltage including ripple voltage and should filter the output so that input ripple voltage is acceptable.

Output Filter Components

Two components need to be selected for the output filter, L1 and C2. Since the TPS5430 is an internally compensated device, a limited range of filter component types and values can be supported.

Inductor Selection

To calculate the minimum value of the output inductor, use [Equation 4](#):

$$L_{\text{MIN}} = \frac{V_{\text{OUT(MAX)}} \times (V_{\text{IN(MAX)}} - V_{\text{OUT}})}{V_{\text{IN(max)}} \times K_{\text{IND}} \times I_{\text{OUT}} \times F_{\text{SW}}} \quad (4)$$

K_{IND} is a coefficient that represents the amount of inductor ripple current relative to the maximum output current. Three things need to be considered when determining the amount of ripple current in the inductor: the peak to peak ripple current affects the output ripple voltage amplitude, the ripple current affects the peak switch current and the amount of ripple current determines at what point the circuit becomes discontinuous. For designs using the TPS5430, K_{IND} of 0.2 to 0.3 yields good results. Low output ripple voltages can be obtained when paired with the proper output capacitor, the peak switch current will be well below the current limit set point and relatively low load currents can be sourced before discontinuous operation.

For this design example use $K_{\text{IND}} = 0.2$ and the minimum inductor value is calculated to be 12.5 μH . The next highest standard value is 15 μH , which is used in this design.

For the output filter inductor it is important that the RMS current and saturation current ratings not be exceeded. The RMS inductor current can be found from [Equation 5](#):

$$I_{\text{L(RMS)}} = \sqrt{I_{\text{OUT(MAX)}}^2 + \frac{1}{12} \times \left(\frac{V_{\text{OUT}} \times (V_{\text{IN(MAX)}} - V_{\text{OUT}})}{V_{\text{IN(MAX)}} \times L_{\text{OUT}} \times F_{\text{SW}} \times 0.8} \right)^2} \quad (5)$$

and the peak inductor current can be determined with [Equation 6](#):

$$I_{\text{L(PK)}} = I_{\text{OUT(MAX)}} + \frac{V_{\text{OUT}} \times (V_{\text{IN(MAX)}} - V_{\text{OUT}})}{1.6 \times V_{\text{IN(MAX)}} \times L_{\text{OUT}} \times F_{\text{SW}}} \quad (6)$$

For this design, the RMS inductor current is 3.003 A, and the peak inductor current is 3.31 A. The chosen inductor is a Sumida CDRH104R-150 15 μH . It has a saturation current rating of 3.4 A and a RMS current rating of 3.6 A, easily meeting these requirements. A lesser rated inductor could be used, however this device was chosen because of its low profile component height. In general, inductor values for use with the TPS5430 are in the range of 10 μH to 100 μH .

Capacitor Selection

The important design factors for the output capacitor are dc voltage rating, ripple current rating, and equivalent series resistance (ESR). The dc voltage and ripple current ratings cannot be exceeded. The ESR is important because along with the inductor ripple current it determines the amount of output ripple voltage. The actual value of the output capacitor is not critical, but some practical limits do exist. Consider the relationship between the desired closed loop crossover frequency of the design and LC corner frequency of the output filter. Due to the design of the internal compensation, it is desirable to keep the closed loop crossover frequency in the range 3 kHz to 30 kHz as this frequency range has adequate phase boost to allow for stable operation. For this design example, it is assumed that the intended closed loop crossover frequency will be between 2590 Hz and 24 kHz and also below the ESR zero of the output capacitor. Under these conditions the closed loop crossover frequency is related to the LC corner frequency by:

$$f_{\text{CO}} = \frac{f_{\text{LC}}^2}{85 V_{\text{OUT}}} \quad (7)$$

And the desired output capacitor value for the output filter to:

$$C_{OUT} = \frac{1}{3357 \times L_{OUT} \times f_{CO} \times V_{OUT}} \quad (8)$$

For a desired crossover of 18 kHz and a 15- μ H inductor, the calculated value for the output capacitor is 220 μ F. The capacitor type should be chosen so that the ESR zero is above the loop crossover. The maximum ESR should be:

$$ESR_{MAX} = \frac{1}{2\pi \times C_{OUT} \times f_{CO}} \quad (9)$$

The maximum ESR of the output capacitor also determines the amount of output ripple as specified in the initial design parameters. The output ripple voltage is the inductor ripple current times the ESR of the output filter. Check that the maximum specified ESR as listed in the capacitor data sheet results in an acceptable output ripple voltage:

$$V_{PP} (MAX) = \frac{ESR_{MAX} \times V_{OUT} \times (V_{IN(MAX)} - V_{OUT})}{N_C \times V_{IN(MAX)} \times L_{OUT} \times F_{SW}} \quad (10)$$

Where:

ΔV_{PP} is the desired peak-to-peak output ripple.

N_C is the number of parallel output capacitors.

F_{SW} is the switching frequency.

For this design example, a single 220- μ F output capacitor is chosen for C3. The calculated RMS ripple current is 143 mA and the maximum ESR required is 40 m Ω . A capacitor that meets these requirements is a Sanyo Poscap 10TPB220M, rated at 10 V with a maximum ESR of 40 m Ω and a ripple current rating of 3 A. An additional small 0.1- μ F ceramic bypass capacitor may also be used, but is not included in this design.

The minimum ESR of the output capacitor should also be considered. For good phase margin, the ESR zero when the ESR is at a minimum should not be too far above the internal compensation poles at 24 kHz and 54 kHz.

The selected output capacitor must also be rated for a voltage greater than the desired output voltage plus one half the ripple voltage. Any derating amount must also be included. The maximum RMS ripple current in the output capacitor is given by [Equation 11](#):

$$I_{COUT(RMS)} = \frac{1}{\sqrt{12}} \times \left[\frac{V_{OUT} \times (V_{IN(MAX)} - V_{OUT})}{V_{IN(MAX)} \times L_{OUT} \times F_{SW} \times N_C} \right] \quad (11)$$

Where:

N_C is the number of output capacitors in parallel.

F_{SW} is the switching frequency.

Other capacitor types can be used with the TPS5430, depending on the needs of the application.

Output Voltage Setpoint

The output voltage of the TPS5430 is set by a resistor divider (R1 and R2) from the output to the VSENSE pin. Calculate the R2 resistor value for the output voltage of 5 V using [Equation 12](#):

$$R2 = \frac{R1 \times 1.221}{V_{OUT} - 1.221} \quad (12)$$

For any TPS5430 design, start with an R1 value of 10 k Ω . R2 is then 3.24 k Ω .

Boot Capacitor

The boot capacitor should be 0.01 μ F.

Catch Diode

The TPS5430 is designed to operate using an external catch diode between PH and GND. The selected diode must meet the absolute maximum ratings for the application: Reverse voltage must be higher than the maximum voltage at the PH pin, which is $V_{INMAX} + 0.5\text{ V}$. Peak current must be greater than I_{OUTMAX} plus on half the peak to peak inductor current. Forward voltage drop should be small for higher efficiencies. It is important to note that the catch diode conduction time is typically longer than the high-side FET on time, so attention paid to diode parameters can make a marked improvement in overall efficiency. Additionally, check that the device chosen is capable of dissipating the power losses. For this design, a Diodes, Inc. B340A is chosen, with a reverse voltage of 40 V, forward current of 3 A, and a forward voltage drop of 0.5 V.

Additional Circuits

Figure 12 and Figure 13 show application circuits using wide input voltage ranges. The design parameters are similar to those given for the design example, with a larger value output inductor and a lower closed loop crossover frequency.

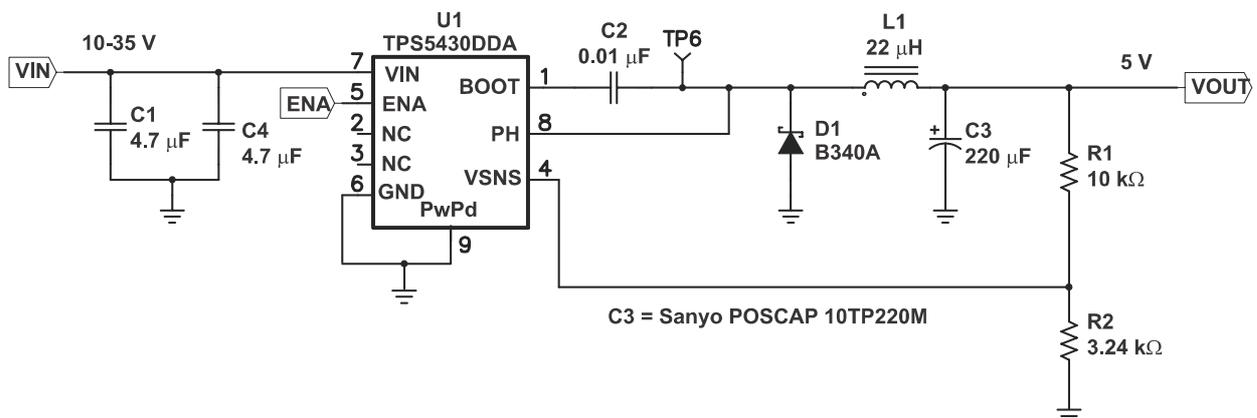


Figure 12. 10–35 V Input to 5 V Output Application Circuit

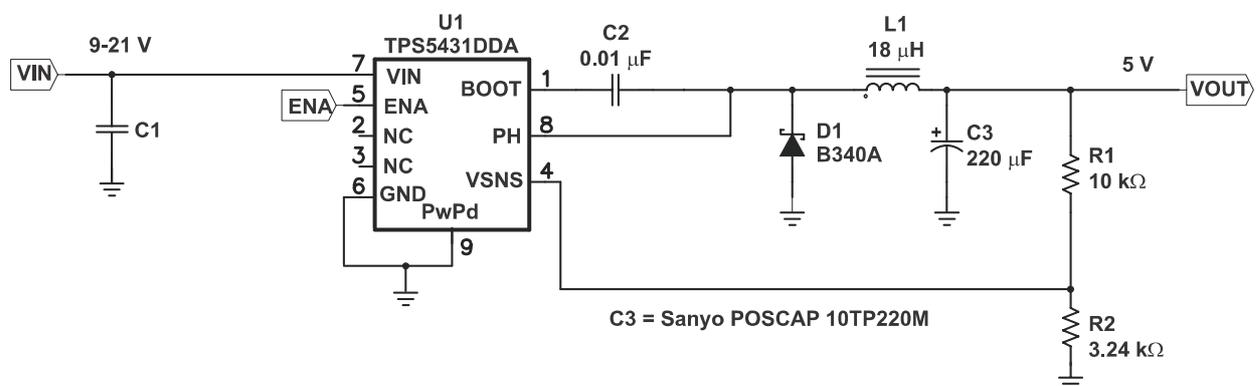


Figure 13. 9–21 V Input to 5 V Output Application Circuit

Circuit Using Ceramic Output Filter Capacitors

Figure 14 shows an application circuit using all ceramic capacitors for the input and output filters which generates a 3.3-V output from a 10-V to 24-V input. The design procedure is similar to those given for the design example, except for the selection of the output filter capacitor values and the design of the additional compensation components required to stabilize the circuit.

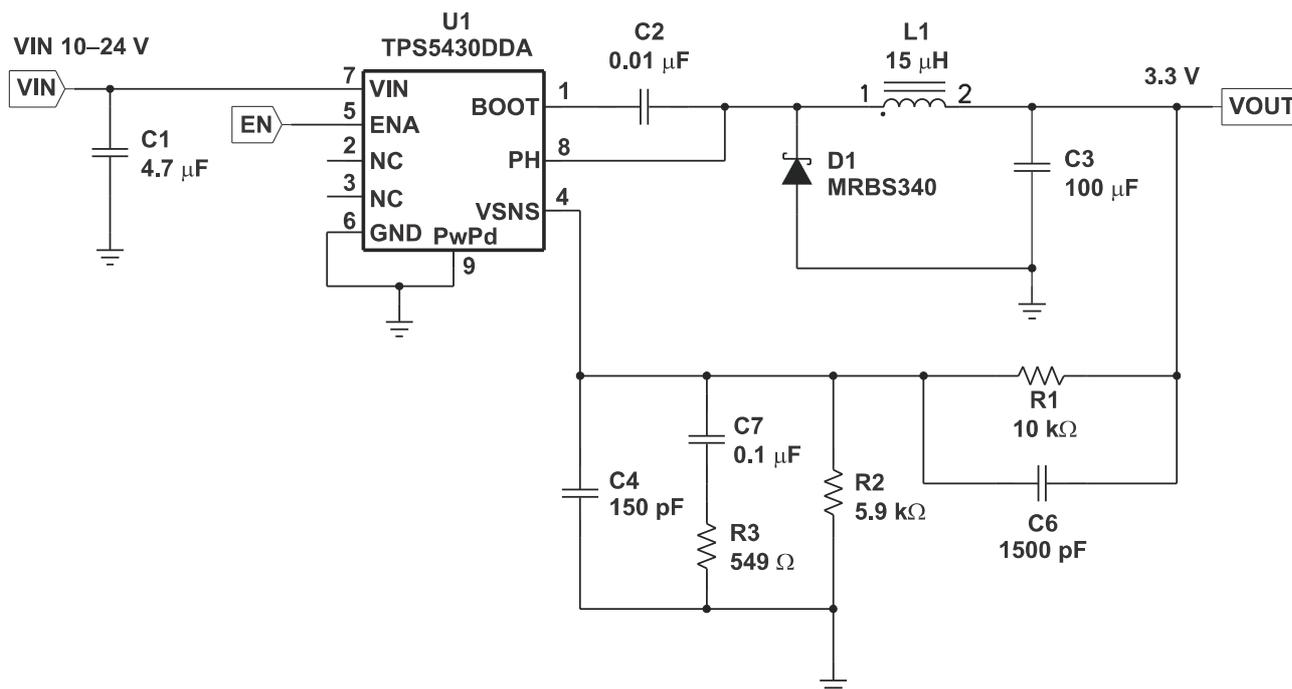


Figure 14. Ceramic Output Filter Capacitors Circuit

Output Filter Component Selection

Using Equation 11, the minimum inductor value is 12 μH. A value of 15 μH is chosen for this design.

When using ceramic output filter capacitors, the recommended LC resonant frequency should be no more than 7 kHz. Since the output inductor is already selected at 15 μH, this limits the minimum output capacitor value to:

$$C_O (\text{MIN}) \geq \frac{1}{(2\pi \times 7000)^2 \times L_O} \quad (13)$$

The minimum capacitor value is calculated to be 34 μF. For this circuit a larger value of capacitor yields better transient response. A single 100-μF output capacitor is used for C3. It is important to note that the actual capacitance of ceramic capacitors decreases with applied voltage. In this example, the output voltage is set to 3.3 V, minimizing this effect.

External Compensation Network

When using ceramic output capacitors, additional circuitry is required to stabilize the closed loop system. For this circuit, the external components are R3, C4, C6, and C7. To determine the value of these components, first calculate the LC resonant frequency of the output filter:

$$F_{LC} = \frac{1}{2\pi \sqrt{L_O \times C_O (\text{EFF})}} \quad (14)$$

For this example the effective resonant frequency is calculated as 4109 Hz

The network composed of R1, R2, R3, C5, C6, and C7 has two poles and two zeros that are used to tailor the overall response of the feedback network to accommodate the use of the ceramic output capacitors. The pole and zero locations are given by the following equations:

$$F_{p1} = 500000 \times \frac{V_O}{F_{LC}} \quad (15)$$

$$F_{z1} = 0.7 \times F_{LC} \quad (16)$$

$$F_{z2} = 2.5 \times F_{LC} \quad (17)$$

The final pole is located at a frequency too high to be of concern. The second zero, Fz2 as defined by Equation 17 uses 2.5 for the frequency multiplier. In some cases this may need to be slightly higher or lower. Values in the range of 2.3 to 2.7 work well. The values for R1 and R2 are fixed by the 3.3-V output voltage as calculated using Equation 12. For this design R1 = 10 kΩ and R2 = 5.90 kΩ. With Fp1 = 401 Hz, Fz1 = 2876 Hz and Fz2 = 10.3 kHz, the values of R3, C6 and C7 are determined using Equation 18, Equation 19, and Equation 20:

$$C7 = \frac{1}{2\pi \times F_{p1} \times (R1 \parallel R2)} \quad (18)$$

$$R3 = \frac{1}{2\pi \times F_{z1} \times C7} \quad (19)$$

$$C6 = \frac{1}{2\pi \times F_{z2} \times R1} \quad (20)$$

For this design, using the closest standard values, C7 is 0.1 μF, R3 is 549 Ω, and C6 is 1500 pF. C4 is added to improve load regulation performance. It is effectively in parallel with C6 in the location of the second pole frequency, so it should be small in relationship to C6. C4 should be less than 1/10 the value of C6. For this example, 150 pF works well.

For additional information on external compensation of the TPS5430, TPS5431 or other wide voltage range SWIFT devices, see [SLVA237 Using TPS5410/20/30/31 With Aluminum/Ceramic Output Capacitors](#)

ADVANCED INFORMATION

Output Voltage Limitations

Due to the internal design of the TPS5430, there are both upper and lower output voltage limits for any given input voltage. The upper limit of the output voltage set point is constrained by the maximum duty cycle of 87% and is given by:

$$V_{OUTMAX} = 0.87 \times \left((V_{INMIN} - I_{OMAX} \times 0.230) + V_D \right) - (I_{OMAX} \times R_L) - V_D \quad (21)$$

Where

V_{INMIN} = minimum input voltage

I_{OMAX} = maximum load current

V_D = catch diode forward voltage.

R_L = output inductor series resistance.

This equation assumes maximum on resistance for the internal high side FET.

The lower limit is constrained by the minimum controllable on time which may be as high as 200 ns. The approximate minimum output voltage for a given input voltage and minimum load current is given by:

$$V_{OUTMIN} = 0.12 \times \left((V_{INMAX} - I_{OMIN} \times 0.110) + V_D \right) - (I_{OMIN} \times R_L) - V_D \quad (22)$$

Where

V_{INMAX} = maximum input voltage

I_{OMIN} = minimum load current

V_D = catch diode forward voltage.

R_L = output inductor series resistance.

This equation assumes nominal on resistance for the high side FET and accounts for worst case variation of operating frequency set point. Any design operating near the operational limits of the device should be carefully checked to assure proper functionality.

Internal Compensation Network

The design equations given in the example circuit can be used to generate circuits using the TPS5430/TPS5431. These designs are based on certain assumptions and will tend to always select output capacitors within a limited range of ESR values. If a different capacitor type is desired, it may be possible to fit one to the internal compensation of the TPS5430/TPS5431. Equation 23 gives the nominal frequency response of the internal voltage-mode type III compensation network:

$$H(s) = \frac{\left(1 + \frac{s}{2\pi \times Fz1}\right) \times \left(1 + \frac{s}{2\pi \times Fz2}\right)}{\left(\frac{s}{2\pi \times Fp0}\right) \times \left(1 + \frac{s}{2\pi \times Fp1}\right) \times \left(1 + \frac{s}{2\pi \times Fp2}\right) \times \left(1 + \frac{s}{2\pi \times Fp3}\right)} \quad (23)$$

Where

Fp0 = 2165 Hz, Fz1 = 2170 Hz, Fz2 = 2590 Hz

Fp1 = 24 kHz, Fp2 = 54 kHz, Fp3 = 440 kHz

Fp3 represents the non-ideal parasitics effect.

Using this information along with the desired output voltage, feed forward gain and output filter characteristics, the closed loop transfer function can be derived.

Thermal Calculations

The following formulas show how to estimate the device power dissipation under continuous conduction mode operations. They should not be used if the device is working at light loads in the discontinuous conduction mode.

Conduction Loss: $P_{con} = I_{OUT}^2 \times R_{ds(on)} \times V_{OUT}/V_{IN}$

Switching Loss: $P_{sw} = V_{IN} \times I_{OUT} \times 0.01$

Quiescent Current Loss: $P_q = V_{IN} \times 0.01$

Total Loss: $P_{tot} = P_{con} + P_{sw} + P_q$

Given $T_A \Rightarrow$ Estimated Junction Temperature: $T_J = T_A + R_{th} \times P_{tot}$

Given $T_{JMAX} = 125^\circ C \Rightarrow$ Estimated Maximum Ambient Temperature: $T_{AMAX} = T_{JMAX} - R_{th} \times P_{tot}$

PERFORMANCE GRAPHS

The performance graphs (Figure 15 through Figure 21) are applicable to the circuit in Figure 11. $T_a = 25\text{ }^\circ\text{C}$. unless otherwise specified.

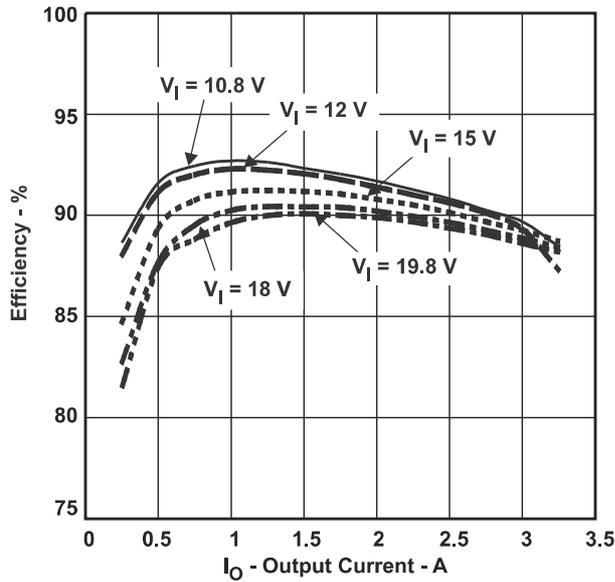


Figure 15. Efficiency vs. Output Current

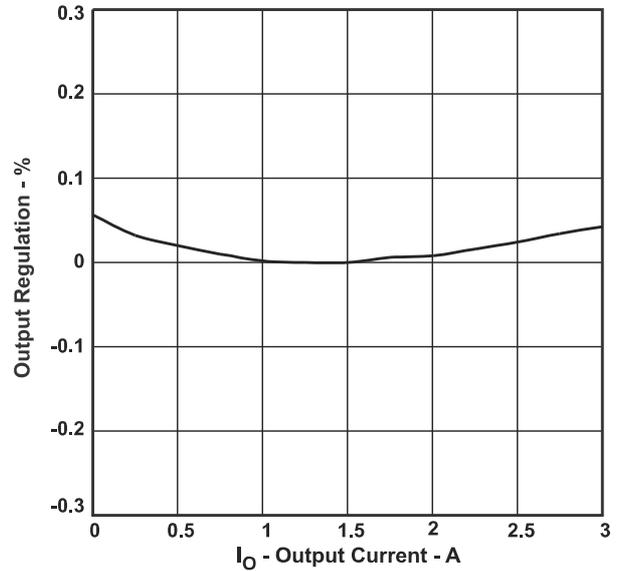


Figure 16. Output Regulation % vs. Output Current

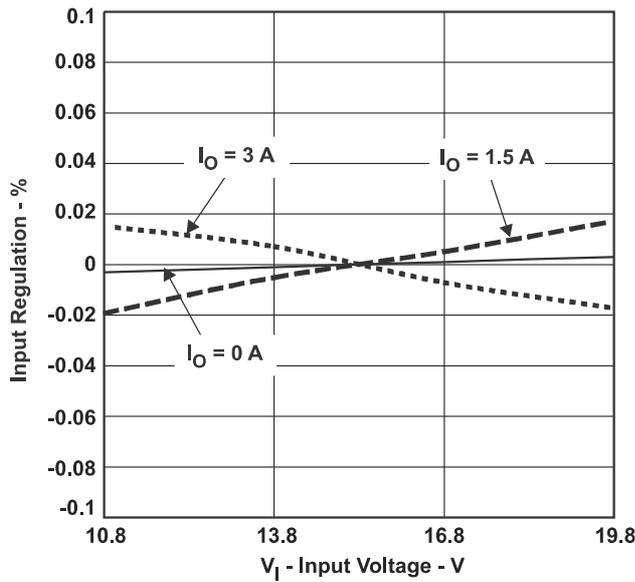


Figure 17. Input Regulation % vs. Input Voltage

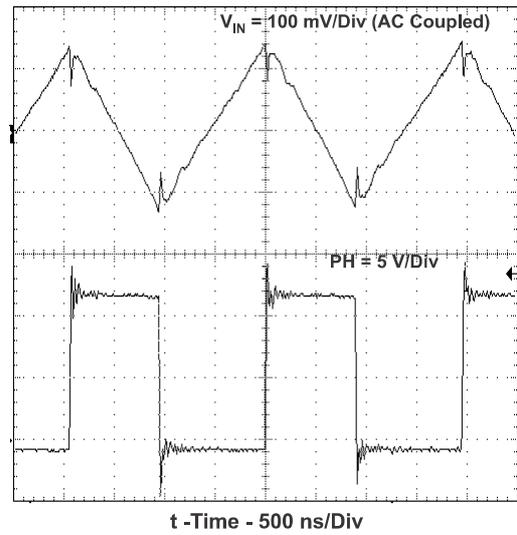


Figure 18. Input Voltage Ripple and PH Node, $I_o = 3\text{ A}$.

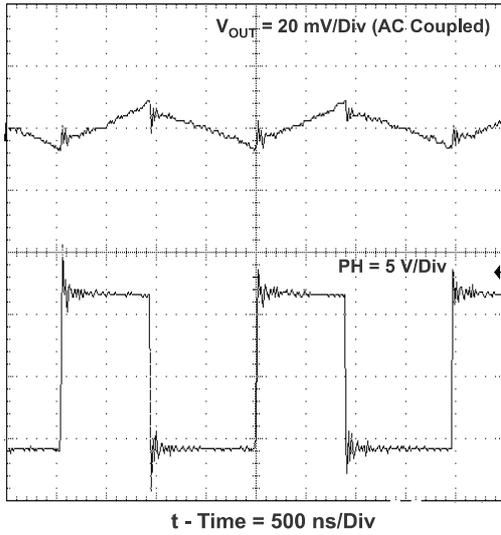


Figure 19. Output Voltage Ripple and PH Node, $I_o = 3 \text{ A}$

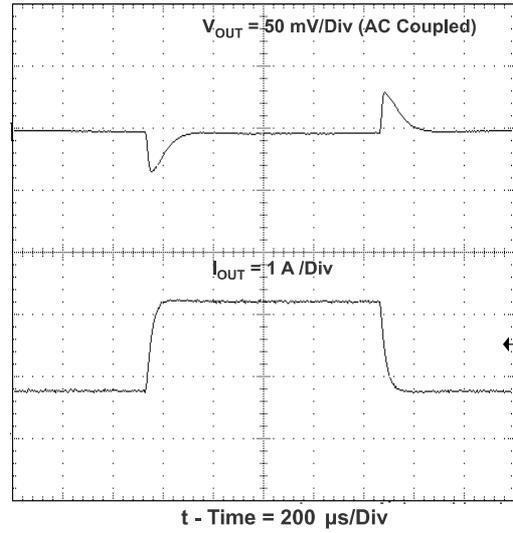


Figure 20. Transient Response, I_o Step 0.75 to 2.25 A.

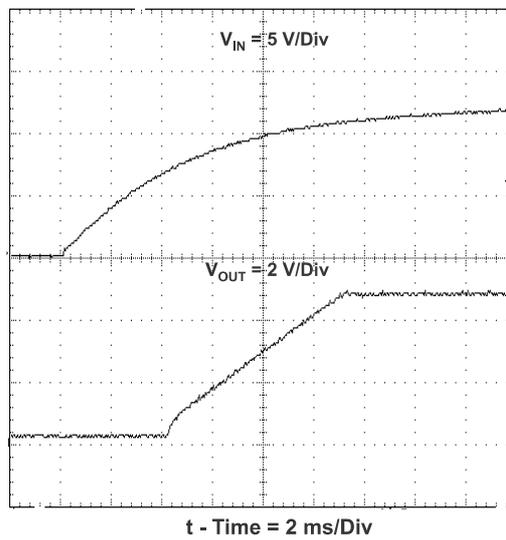


Figure 21. Startup Waveform, V_{in} and V_{out} .