



Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
Institut für Physik

Fortgeschrittenen- praktikum

Fassung vom 29.3.2021



Versuch B16: Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

1. Aufgaben

1. Nehmen Sie das Fluoreszenzspektrometer und den Einzelphotonenmessplatz in Betrieb
 1. Wählen Sie die Messparameter geeignet
 2. Vermessen Sie Spektrum und Fluoreszenzlebensdauer einer $5 \mu\text{M}$ Nafluorescein-Lösung
2. Bestimmung der Dynamik von Laserpulsen und Fluoresceinlösung
 1. Messen Sie die Instrumentenantwortfunktion (IRF)
 2. Vermessen Sie eine Lösung von $5 \mu\text{M}$ Natriumfluorescein in H_2O
 3. Bestimmen Sie Spektren und multiexponentielles Abklingverhalten von Natriumfluorescein in H_2O durch einen Fit.
3. Fluoreszenzquenching durch Halogenidionen
 1. Erstellen Sie ein Pipettierschema zur Herstellung von Lösungen mit fester Fluoresceinkonzentration ($5 \mu\text{M}$) und variabler Halogenidionenkonzentration.
 2. Ermitteln Sie die spektralen und zeitlichen Veränderungen bei Zugabe von Kaliumchlorid (KCl), Kaliumbromid (KBr) und Kaliumiodid (KI) bei einer finalen Konzentration von $200 - 2000 \text{ mM}$ in geeigneten Schritten.

3. Bestimmen Sie die Veränderungen der Fluoreszenzlebensdauer und –intensität quantitativ
4. Stellen Sie die Ergebnisse durch einen Stern-Volmer-Plot dar, bestimmen Sie die Art des Quenchings (statisch, dynamisch oder gemischt) und berechnen Sie die Stern-Volmer-Konstante (dynamisches Quenching) bzw. Gleichgewichtskonstante für die Komplexbildung (statisches Quenching).

2. Kontrollfragen

Wie entsteht Fluoreszenz? Was versteht man unter Stokes-Shift?

Wie kann man die Fluoreszenzquantenausbeute berechnen?

Was versteht man unter Fluoreszenzquenching?

Wie äußern sich dynamisches und statisches Quenching?

Wie kann das zeitliche Abklingverhalten der Fluoreszenz bestimmt werden?

Wie funktioniert die Methode der Einzelphotonenzählung (SPC)

Was versteht man unter einem Time-to-Amplitude-Konverter und einem Constant-Fraction-Discriminator?

Welche Faktoren bestimmen die Lebensdauer angeregter elektronischer Zustände in Molekülen?

Wie kommt Farbigkeit zu Stande?

Welche Bedeutung hat das Pi-Elektronensystem für die Farbigkeit?

Welche Verbreiterungsmechanismen kennen Sie bei optischen Spektren?

Welche dieser Mechanismen kommen bei der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie zum Tragen (spektral, zeitlich)?

Mit welcher Repetitionsrate würden Sie die Probe anregen und warum?

Was passiert, wenn die Repetitionsrate zu hoch oder zu niedrig ist?

Gliederung

1. Aufgaben
2. Kontrollfragen
3. Kurzbeschreibung – Ziel des Versuchs
4. Grundlagen
 1. Absorption und Emission
 2. Elektronenübergänge im Molekül
5. Dynamische und statische Fluoreszenzlöschung
 1. Dynamische Fluoreszenzlöschung
 2. Statische Fluoreszenzlöschung
 3. Kombination aus statischer und Dynamischer Fluoreszenzlöschung
6. Fluoreszenzspektroskopie mit Zeitkorrelierter-Einzelphotonenzählung
7. Versuchsaufbau

3. Kurzbeschreibung – Ziel des Versuchs

In dem vorliegenden Experiment soll die Fluoreszenz des Farbstoffs Fluorescein untersucht werden. Hierzu wird das Fluoreszenzspektrum sowie die Fluoreszenzlebensdauer in Abhängigkeit der Konzentration von Halogenidionen mittels zeitaufgelöster Einzelphotonenzählung gemessen und dabei insbesondere der Einfluss der Halogenid-Anionen auf die Fluoreszenz unter die Lupe genommen. Die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie ist eine verbreitete Methode zur Analyse der Eigenschaften elektronisch angeregter Zustände von Farbstoffmolekülen und insbesondere von Prozessen, die sich auf der Zeitskala der Lebensdauer fluoreszierender Zustände (Nanosekunden) abspielen. Dazu zählen Wechselwirkungen fluoreszierender Moleküle mit anderen, Stöße, Konformationsänderungen aber auch Anregungsenergie- und Elektronentransferprozesse. Durch Kollision von Molekülen oder durch direkte, zeitlich stabile Interaktionen, kann es jedoch zu einer Löschung der Fluoreszenz kommen (Fluoreszenzquenching). Sind Kollisionen beteiligt, spricht man von dynamischem oder kollisionalem Quenching (dynamische Fluoreszenzlöschung). Wird die Fluoreszenz dagegen durch stabile Interaktion mit anderen Molekülen (z.B. Komplexbildung, kovalente Bindung) gelöscht, spricht man von statischem Quenching (statische Fluoreszenzlöschung). Ziel ist die Anwendung und das grundlegende Verständnis der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie zur Untersuchung von dynamischer und statischer Fluoreszenzlöschung.

4. Grundlagen

Zur Untersuchung der Wechselwirkung von Licht und Materie kann die Absorption und Emission bestimmter Moleküle oder Atome gemessen werden. Aus den gewonnenen Spektren können Rückschlüsse über eine unbekannte Probe gezogen werden, beispielsweise über die innere Struktur und Zusammensetzung. Die Spektroskopie liefert Informationen über die elektronische Struktur der beteiligten Moleküle und Atome. Durch

zeitaufgelöste Spektroskopie können auch dynamische Prozesse untersucht werden.

Die Fluoreszenzspektroskopie organischer Moleküle arbeitet hauptsächlich im sichtbaren Spektralbereich. Mit dieser Methode werden die Fluoreszenzeigenschaften von Fluorophoren ausgenutzt.

4.1. Absorption und Emission

Die Absorption elektromagnetischer Strahlung regt Moleküle innerhalb von 10^{-15} s in einen energetisch höheren Zustand an. Dieser angeregte Zustand kann durch die Emission eines Fluoreszenzphotons, welches mit einer größeren Wellenlänge, also einer kleineren Energie abgestrahlt wird, relaxieren. Die Fluoreszenz ist im Gegensatz zur Absorption in den roten Wellenlängenbereich verschoben (Stokes-Shift). Bei Übergängen zwischen zwei Zuständen eines molekularen Systems wird bei Absorption oder Emission meist nur ein Lichtquant ausgetauscht. Das bedeutet, es können nur diejenigen Photonen übertragen werden, deren gesamte Energie nach der Bohrschen Frequenzbedingung der Energiedifferenz ΔE zwischen dem Grundzustand S_0 und dem angeregten Zustand entspricht:

$$\Delta E = h \cdot \nu$$

Dabei ist h das Plancksche Wirkungsquantum und ν die Frequenz der elektromagnetischen Welle, die sich aus der folgenden elementaren Gleichung ergibt:

$$c = \lambda \cdot \nu$$

c ist die Lichtgeschwindigkeit und λ die Wellenlänge.

Demnach ist Fluoreszenz die spontane Emission von Licht aus einem optisch angeregten Niveau beim Übergang in einen energetisch tieferen Zustand. Beim Übergang entspricht die Wellenlänge λ der Energiedifferenz ΔE , gemäß:

$$\lambda = \frac{h \cdot c}{\Delta E'}$$

Die Dynamik der Fluoreszenzintensität nach einem Anregungsblitz folgt im einfachsten Fall einem exponentiellen Gesetz:

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-t/\tau}$$

I_0 ist die Fluoreszenzintensität unmittelbar nach dem Anregungsblitz und τ die Lebensdauer des angeregten Zustands.

4.2. Elektronenübergänge im Molekül

Die meisten organischen Moleküle haben eine gerade Anzahl von Elektronen, deren Spins paarweise antiparallel ausgerichtet sind. Da Fluoreszenzübergänge spinerlaubt sein müssen, folgen sie der Auswahlregel $\Delta S = 0$. Nach Absorption kommt es im Allgemeinen zu keiner Spinänderung. Die Spins bleiben antiparallel. Ferner können Moleküle mit gerader Anzahl von Elektronen neben Singulettzuständen (S_1, S_2, \dots) auch in Triplettzuständen (T_1, T_2, \dots) vorliegen. Bei einem Singulettzustand ist der Gesamtspin S null und die Multiplizität (Ausrichtungsmöglichkeiten des Spins) eins. Ein Triplettzustand dagegen hat einen Gesamtspin von eins und eine Multiplizität von drei. Die Multiplizität M ergibt sich quantenmechanisch aus den magnetischen (l) Quantenzahlen, die für eine Hauptquantenzahl n von $-n \dots n$ laufen. Es handelt sich um die Einstellmöglichkeiten des Spinvektors zu einer ausgewählten räumlichen Achse:

$$M = 2S + 1$$

Ein typisches Termschema ist in Form eines Jabłoński-Diagramms in Abb. 1 dargestellt. Dieses geht auf den polnischen Wissenschaftler Aleksander Jabłoński zurück, der es in den 1930er Jahren erstmals

einführte, um Absorptions- und Emissionsphänomene zu erklären.¹ Die Absorption (A) erfolgt im Zeitbereich von 10^{-15} s und geht bei Raumtemperatur und in Lösung vom niedrigsten Schwingungszustand des S_0 -Grundzustands aus. Neben der Fluoreszenz (F) kann es allerdings auch zu strahlungslosen Prozessen kommen, beispielsweise der Inneren Konversion (internal conversion, IC). Darunter versteht man eine Schwingungsrelaxation (Wärmeentwicklung). Der Prozess der Interkonversion (intersystem crossing, ISC) ist eine weitere Möglichkeit für eine Relaxation. Hierbei handelt es sich um einen strahlungslosen Übergang vom angeregten Singulettzustand in einen Triplettzustand. In diesem Fall (ISC) kommt es zu einer Spinumkehr, und antiparallele Spins richten sich parallel aus. Da ein solcher Prozess quantenmechanisch verboten ist, findet er nur mit geringer Wahrscheinlichkeit statt. Es gibt jedoch Systeme, bei denen angeregte Triplettzustände relativ stark bevölkert werden, z.B. bei Chlorophyllen in der Photosynthese. Die Lebensdauer der Triplettzustände ist stark erhöht, da bei der Relaxation eine erneute Spinumkehr nötig ist (Auswahlregel $\Delta S = 0$). Strahlungslose Relaxationsprozesse aus dem angeregten Zustand können durch sogenannte Fluoreszenzlöscher (Quencher) zusätzlich gefördert werden.

¹ Aleksander Jabłoński: „Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes“ Nature 131:839-840, 1931.

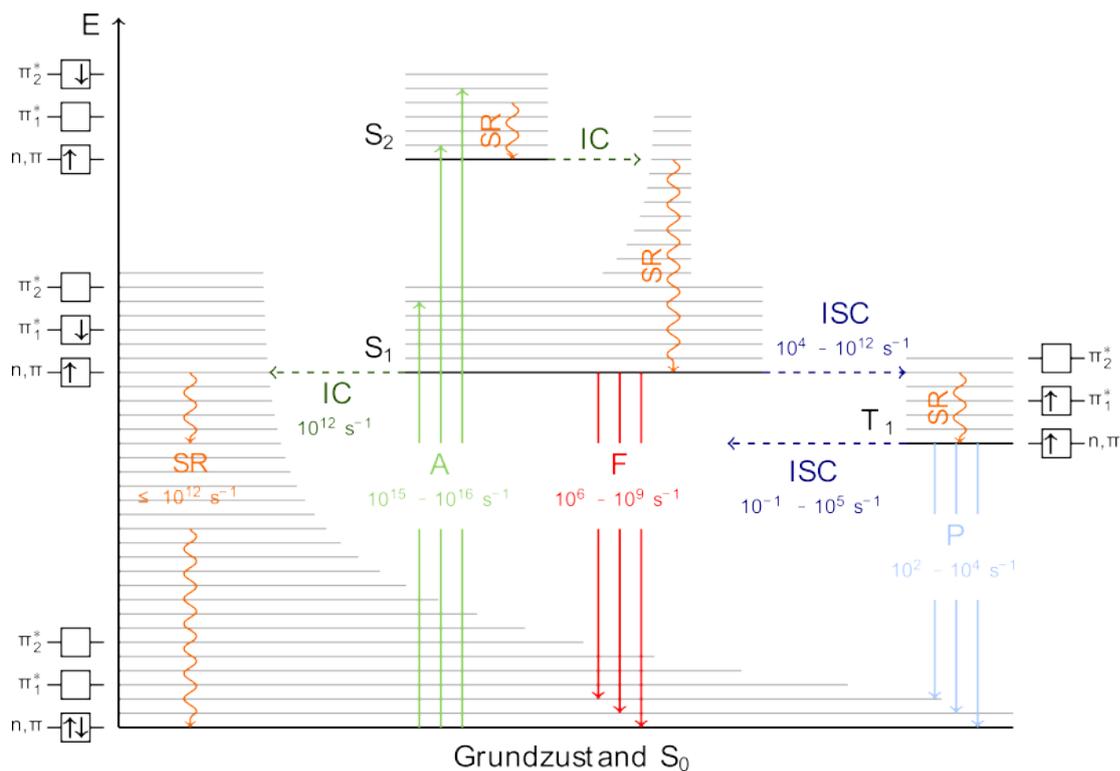


Abbildung 1: Das Jabłoński-Diagramm mit möglichen Elektronenübergängen stellt ein typisches Termschema zur Erläuterung der wichtigsten strahlenden und strahlungslosen Prozesse für ein Molekül mit Singulett- und Triplett-System dar. Die Anordnung der Spins in den Singulett- und Triplettzuständen ist an den Rändern links und rechts in einfacher Vektordarstellung angegeben. Nach Absorption (A) eines Photons erfolgt zunächst eine Schwingungsrelaxation (SR), die der Inneren Konversion gleichgesetzt werden kann (IC=SR), in den niedrigsten Schwingungszustand des niedrigsten elektronisch angeregten Singulettzustands S_1 . Auch wenn die initiale Anregung in den S_2 - oder einen höher angeregten Singulettzustand erfolgt, kehrt das System zunächst strahlungslos über Schwingungsrelaxation (SR, IC) in den S_1 -Zustand zurück und die Emission (Fluoreszenz F) erfolgt aus dem niedrigsten Schwingungszustand des niedrigsten elektronisch angeregten Singulettzustands S_1 . Diese empirische Regel wird als Kasha-Regel² (Kasha's Rule) bezeichnet, von der es nur wenige Ausnahmen gibt. Die Interkombination (ISC) sowie der strahlende Übergang zwischen den beiden Systemen (Phosphoreszenz P) sind quantenmechanisch mehr oder weniger stark verboten. Innere Umwandlung (SR, IC), d.h. Vibrationsrelaxation, und Interkombination (ISC) sind strahlungslose Prozesse. Modifiziert nach Haken und Wolf (2006).³

Die Phosphoreszenz (P) entsteht bei einem Übergang von einem energiereichen Triplettzustand in den Singulettzustand. Da hier eine erneute Spinumkehr nötig ist, ist die Lebensdauer der Triplettzustände viel

² Michael Kasha: „Characterization of electronic transitions in complex molecules” Discussions of the Faraday Society 9, 14-19, 1950.

³ Hermann Haken, Hans Christian Wolf: „Atomphysik und Quantenchemie“ 5. Aufl., 535 S., Springer, Berlin Heidelberg, 2006.

größer als die der Singulettzustände. Die Phosphoreszenz klingt dadurch wesentlich langsamer ab, was das lange Nachleuchten phosphoreszierender Stoffe erklärt.

In welchen Schwingungszustand der einzelne Fluorophor nun relaxiert, beschreibt das Franck-Condon-Prinzip (Abb. 2). Wird ein Elektron eines Moleküls angeregt (blauer Pfeil in Abb. 2), so ändert sich dadurch seine Potentialkurve. Das bedeutet, ein Übergang zweier Zustände wird durch einen Sprung zwischen zwei Potentialkurven dargestellt. Dabei erfolgt der Sprung quasi senkrecht und am wahrscheinlichsten zwischen den Scheitelpunkten beider beteiligter Schwingungs-Wellenfunktionen, da dort, quantenmechanisch betrachtet, das größte Überlappintegral für den Anregungsprozess vorliegt.

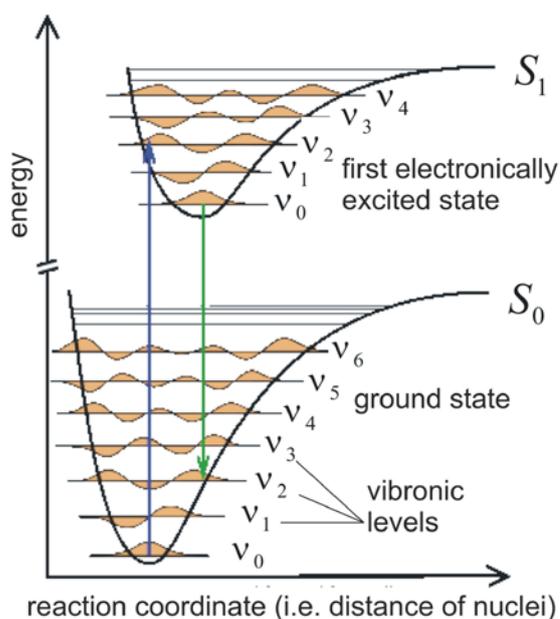


Abbildung 2: Schematische Illustration des Franck-Condon-Prinzips. Dargestellt sind die Potentialkurven des elektronischen Grund (S_0)- und des ersten angeregten Zustands (S_1) eines anharmonischen Oszillators entlang der Kernkoordinaten mit verschiedenen Schwingungsenergieniveaus ($v_0 \dots v_6$). Die Schwingungs-Wellenfunktionen sind farblich angedeutet. Die elektronische Anregung erfolgt so schnell ($10^{-16} \dots 10^{-15}$ s), dass sich während des Übergangs der Kernabstand nicht ändert. Die wahrscheinlichsten elektronischen Übergänge finden zwischen Zuständen mit ähnlicher Kernkonfiguration und mit ähnlichem Schwingungsverhalten statt. Quantenmechanisch ist der Überlapp der Schwingungs-Wellenfunktionen in den elektronischen Zuständen die entscheidende Größe für die Wahrscheinlichkeit des

Übergangs. Quelle: Mark M. Samoza, Eigenes Werk, gemeinfrei nach Lizenz CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=33461268>.

Bei der Rückkehr des Moleküls in den Grundzustand durch Fluoreszenz kommt erneut das Franck-Condon-Prinzip zum Tragen (grüner Pfeil in Abb. 2), und der Übergang erfolgt wiederum vertikal vom niedrigsten Schwingungszustand des elektronisch angeregten Zustands in den Schwingungszustand des Grundzustands mit dem größten Überlappungsintegral. Die resultierenden Intensitäten der Übergangsprozesse bei der Absorption und Fluoreszenz sind schematisch als „Banden“ in Abb. 3 dargestellt. Ein derartiges Bandenspektrum kann bei Fluoreszenzfarbstoffen in Lösung aufgrund von Linienverbreiterungsprozessen und molekularen Stößen nicht beobachtet werden, man erhält eher relativ grob strukturierte Absorptions- und Emissionsspektren. Aufgrund der Energieverlustprozesse (Schwingungsrelaxation nach Anregung) kommt es zu einer Rotverschiebung des Emissionsspektrums, die als Stokessche Verschiebung (Stokes-Shift) bezeichnet wird. Man kann sich dies derart vorstellen, dass bei Anregung die Molekülgeometrie durch die Trägheit des nuklearen Gerüsts erhalten bleibt, was dem senkrechten Übergang in Abb. 2 entspricht. Durch die Veränderung des elektrischen Feldes in einem gekoppelten System aus geladenen Massepunkten kommt es dadurch jedoch faktisch zur Besetzung eines höheren Schwingungsniveaus als $v'' = 0$ und das Kerngerüst wird in Schwingung versetzt.

Prinzipiell können Absorptions- und Emissionsspektrum nur bei der Wellenlänge des 0-0-Übergangs (für die Vibrationsniveaus v'') überlappen, da dieser den niederenergetischsten Anregungsvorgang bzw. den Emissionsvorgang mit der höchstmöglichen Energie darstellt. Häufig erkennt man zwischen Absorptions- und Emissionsspektrum eine Spiegel-Symmetrie zum 0-0 Übergang. Allerdings entspricht die Schwingungs-Feinstruktur des *Absorptionsspektrums* der Schwingungsstruktur des

angeregten Zustands, während des Emissionsspektrums die Schwingungsstruktur des Grundzustands abbildet. Eine Symmetrie kann deshalb nur dann auftreten, wenn sich die Schwingungsstrukturen von Grund- und angeregtem Zustand zu mindest ähneln.

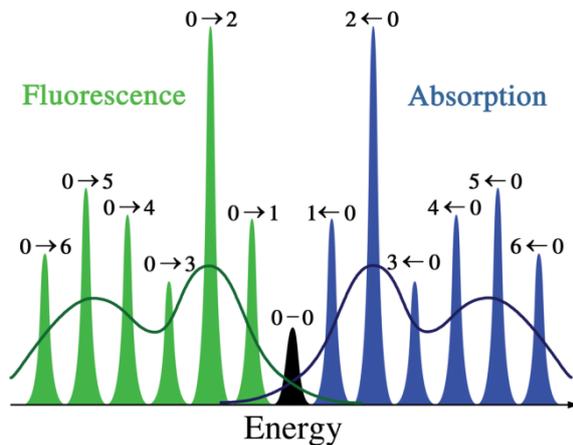


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Intensitäten der Absorptions- (blau) und Emissionsbanden (grün) auf der Basis des Franck-Condon-Prinzips aus Abb. 2. Der tatsächliche Verlauf der Spektren aufgrund von Linienverbreiterungsprozessen ist durch die durchgezogenen Linien dargestellt. Absorptions- und Fluoreszenzspektrum können prinzipiell im Bereich des 0-0-Übergangs überlappen, wenn nicht zusätzlich Lösungsmittelrelaxation auftritt (Abb. 4). Quelle: Mark M. Somoza, Eigenes Werk, gemeinfrei nach Lizenz CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=749702>.

Die Wahrscheinlichkeit, mit der ein angeregter Zustand fluoresziert, wird Fluoreszenzquantenausbeute genannt, die maximal den Wert 1 annehmen kann. Nach dem Jabłoński-Diagramm kann der angeregte Zustand über mehrere Kanäle zerfallen. Somit enthält die Ratengleichung für die zeitliche Änderung des Erwartungswerts der Besetzung des angeregten Zustands $\langle S_1 \rangle$ mehrere Ratenkonstanten (k) (Siehe Abb. 1):

$$\frac{d\langle S_1 \rangle}{dt} = -(k_F + k_{IC} + k_{ISC}) \cdot \langle S_1 \rangle$$

Die Fluoreszenzquantenausbeute Θ_F ist das Verhältnis der Fluoreszenzzerfallsrate zur Summe der Ratenkonstanten aller möglichen Relaxationsprozesse:

$$\Theta_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}} \quad \text{mit} \quad k_F = \frac{1}{\tau_0}$$

τ_0 entspricht der natürlichen Lebensdauer beziehungsweise der Strahlungslebensdauer des Fluorophors. Für die mittlere

Fluoreszenzlebensdauer (Lebensdauer des angeregten Zustands) gilt dann:

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}}$$

und für die Fluoreszenzquantenausbeute:

$$\Theta_F = \frac{\tau}{\tau_0}$$

Liegen die Farbstoffmoleküle isoliert vor, so klingt die Fluoreszenz, die proportional zu $\langle S_1 \rangle$ ist, im einfachsten Fall nach einer e-Funktion ab:

$$\begin{aligned} \frac{d\langle S_1 \rangle}{dt} &= -(k_F + k_{IC} + k_{ISC}) \cdot \langle S_1 \rangle \\ \Rightarrow \langle S_1 \rangle_{(t)} &= \langle S_1 \rangle_{(0)} \cdot e^{-(k_F + k_{IC} + k_{ISC})t} \end{aligned}$$

Es ist zu beachten, dass der Fluoreszenzzerfall auch multiexponentiell abklingen kann. Gerade bei statischem Quenching, wie z.B. durch den Energietransfer in der Photosynthese, kann es zu einem gekoppelten System kommen, dessen Fluoreszenz durch ein System aus gekoppelten linearen Differentialgleichungen mit konstanten Koeffizienten beschrieben wird. Die Lösung dieses Systems ist multiexponentiell. Die Fluoreszenz verändert sich dann zeitlich gemäß einer Summe diskreter Exponentialfunktionen mit den Amplituden A_i und den Lebensdauern τ_i :

$$F_{(t)} = \sum_i A_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}}$$

Die Fluoreszenzlebensdauer ist für jedes Molekül oder komplexes System eine charakteristische Größe und hängt im Allgemeinen stark von den äußeren Bedingungen, wie z.B. vom verwendeten Lösemittel, ab.

5. Dynamische und Statische Fluoreszenzlöschung

Wie schon oben im Jabłoński-Diagramm gezeigt, gibt es verschiedene Prozesse, um den angeregten Zustand zu entvölkern und damit die Fluoreszenzintensität zu verringern. Neben der Abschwächung der Fluoreszenz kommt es auch zu einer Verkürzung der beobachteten Lebensdauer. Diese Prozesse werden allgemein als Fluoreszenzlöschung (Fluoreszenzquenching) bezeichnet.

5.1. Dynamische Fluoreszenzlöschung

Die dynamische Fluoreszenzlöschung wird auch als Stoßlöschung („collisional quenching“) bezeichnet und beruht auf der Wechselwirkung eines Fluorophors im angeregten Zustand F^* mit einem Löschermolekül Q (Abb. 4).

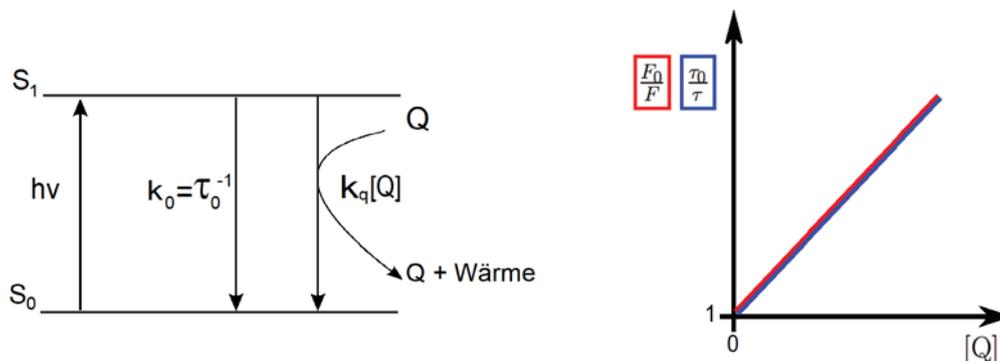


Abbildung 4: (links) Prinzip der dynamischen Fluoreszenzlöschung. Befindet sich ein Fluorophor F im angeregten Zustand, kann er durch Kollision mit einem Löschmolekül Q strahlungslos in den Grundzustand zurückkehren. (rechts) Stern-Volmer-Diagramm. Aufgetragen sind die relative Fluoreszenzintensität F_0/F bzw. die relative Fluoreszenzlebensdauer τ_0/τ gegen die Konzentration der Löschermoleküle.

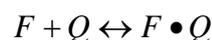
Befindet sich ein Fluorophor F zum Zeitpunkt des Stoßes mit einem Löschmolekül Q im angeregten Zustand F^* , erfolgt ein strahlungsloser Übergang in den Grundzustand. Dieser Prozess verkürzt die Lebensdauer des Fluorophors und kann unter Zuhilfenahme der **Stern-Volmer-Gleichung für den dynamischen Löschprozess** wie folgt beschrieben werden:

$$\frac{[F^*]_0}{[F^*]} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + K_D \cdot [Q]$$

In dieser Gleichung bezeichnen $[F^*]_0$ und $[F^*]$ die Konzentrationen angeregter Moleküle in Ab- bzw. Anwesenheit des Quenchers, die wiederum mit den Fluoreszenzintensitäten F bzw. F_0 identifiziert werden. τ und τ_0 sind die Lebensdauern in An- bzw. Abwesenheit von Löschermolekülen, k_q ist die bimolekulare Löschkonstante und K_D die Stern-Volmer-Konstante. Um die bimolekulare Löschkonstante k_q bestimmen zu können, muss die Fluoreszenzintensität bzw. die Fluoreszenzlebensdauer in Abhängigkeit der Löschermolekülkonzentration $[Q]$ gemessen und gemäß der Stern-Volmer-Gleichung aufgetragen werden. Hier ergibt sich bei einer rein dynamischen Fluoreszenzlöschung für beide Fälle eine Gerade, deren Steigung der Stern-Volmer-Konstanten K_D entspricht (siehe Abb. 4 rechts).

5.2. Statische Fluoreszenzlöschung

Bei der statischen Fluoreszenzlöschung bildet sich zwischen dem Fluorophor F (im Grundzustand) und dem Löschermolekül (Quencher) Q ein Komplex $F \cdot Q$, welcher selbst nicht fluoresziert (Abb. 5):



Dieser Komplex kehrt nach Anregung mit hoher Wahrscheinlichkeit strahlungslos in den Grundzustand zurück. Nimmt man an, dass all jene Farbstoffmoleküle, die mit einem Quencher komplexiert sind, gar keine

Fluoreszenz mehr emittieren, während die freien Farbstoffmoleküle von den anwesenden Quenchern unbeeinflusst sind, so wird bei der statischen Löschung nur die Anzahl fluoreszierenden Moleküle reduziert, nicht aber die Fluoreszenzlebensdauer verkürzt.

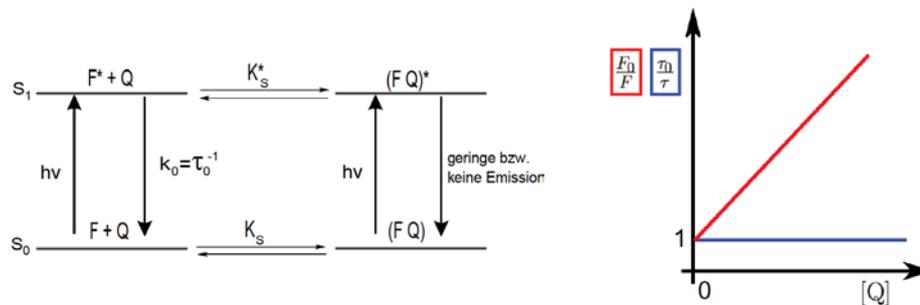


Abbildung 5: (links) Prinzip der statischen Fluoreszenzlöschung. In diesem Fall verbindet sich das Löschermolekül Q mit dem Fluorophor F zu einem nichtfluoreszierenden Komplex. (rechts) Stern-Volmer-Diagramm. Aufgetragen sind die relative Fluoreszenzintensität F_0/F bzw. die relative Fluoreszenzlebensdauer τ_0/τ gegen die Löschermolekül-Konzentration.

Die thermodynamischen Gleichgewichtskonstante K_S für die Komplexbildung ergibt sich nach dem Massenwirkungsgesetz wie folgt:

$$K_S = \frac{[F \cdot Q]}{[F] \cdot [Q]}$$

Dabei stellt $[F \cdot Q]$ die Konzentration der Komplexe von Fluorophoren und Löschermolekülen dar und $[F]$ bzw. $[Q]$ die Konzentrationen der freien Moleküle. Der verbleibende Fluoreszenzanteil F/F_0 ergibt sich aus dem Anteil der Fluorophore, die nicht in einen Komplex eingebunden sind. Zusätzlich gilt für Gesamtkonzentration der Fluorophore $[F]_0$:

$$[F]_0 = [F] + [F \cdot Q]$$

Durch Einsetzen in die Gleichung für K_S ergibt sich:

$$K_S = \frac{[F]_0 - [F]}{[F] \cdot [Q]} = \frac{[F]_0}{[F] \cdot [Q]} - \frac{1}{[Q]}$$

Durch Umstellen der Gleichung nach $[F]_0/[F]$ ergibt sich die **Stern-Volmer-Gleichung für die statische Fluoreszenzlöschung:**

$$\frac{[F]_0}{[F]} = 1 + K_S \cdot [Q]$$

Dabei wird vorausgesetzt, dass die Fluoreszenzintensität F in Anwesenheit (bzw. F_0 in Abwesenheit) des Quenchers proportional zur Konzentration $[F]$ (bzw. $[F]_0$) ist. Damit wird ersichtlich, dass die Gleichungen für die statische und die dynamische Fluoreszenzlöschung sehr ähnlich sind und die gleiche lineare Abhängigkeit von der Quencherkonzentration aufweisen. An die Stelle der Quencherkonstanten K_D im dynamischen Fall tritt im statischen Fall die Massenwirkungskonstante der Komplexbildung K_S . Statisches und dynamisches Quenching lassen sich also nicht anhand der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von $[Q]$ unterscheiden. Allerdings gilt im Fall des statischen Quenchings für die Fluoreszenzlebensdauern

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1$$

da beim statischen Quenching die Lebensdauer des angeregten Zustands nicht beeinflusst wird, sondern nur die Fluoreszenzintensität durch den Einfluss auf die Konzentration freier Fluorophore. Die verbleibenden, nicht an den Quencher gebundenen, Fluoreszenzmoleküle fluoreszieren mit der gleichen Fluoreszenzlebensdauer wie die gesamte Lösung vor Zugabe der Quencher.

Daher lassen sich statische und dynamische Fluoreszenzlöschung anhand der Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von der Quencherkonzentration unterscheiden.

5.3. Kombination aus dynamischer und statischer Fluoreszenzlöschung

In den meisten Fällen erfolgt die Fluoreszenzlöschung nicht über einen Mechanismus, dynamische- und statische Fluoreszenzlöschung können gleichzeitig auftreten. Für diesen Fall gilt die folgende abgewandelte Stern-Volmer-Gleichung:

$$\frac{[F]_0}{[F]} = (1 + K_D \cdot [Q]) \cdot (1 + K_S \cdot [Q]) = \frac{\tau_0}{\tau} \cdot (1 + K_S \cdot [Q])$$

Hier stellt der Ausdruck $(1 + K_S \cdot [Q])$ ein Maß für den Anteil der Moleküle dar, die im Grundzustand nicht an einen Komplexpartner gebunden sind. Dieser Term bestimmt die maximal mögliche Fluoreszenzintensität. Der andere Klammerausdruck $(1 + K_D \cdot [Q])$ gibt an, wie die verbleibenden Moleküle, die zur Fluoreszenz angeregt werden können, im angeregten Zustand durch kollisionale Prozesse gelöscht werden.

$$\text{Es gilt hier außerdem: } \frac{[F]_0}{[F]} > \frac{\tau_0}{\tau} > 1$$

Daher muss das Verhältnis der Lebensdauern bei der kombinierten Löschung zwischen dem Wert für die dynamische und die statische Löschung liegen. Die modifizierte Stern-Volmer-Gleichung liefert für das Verhältnis $[F]_0/[F]$ im Allgemeinen einen nichtlinearen Verlauf der Kurve im Stern-Volmer-Diagramm (Abb. 6). Die Stern-Volmer-Auftragung der relativen Fluoreszenzlebensdauern τ_0/τ ist dagegen linear, hat aber eine Steigung < 1 .

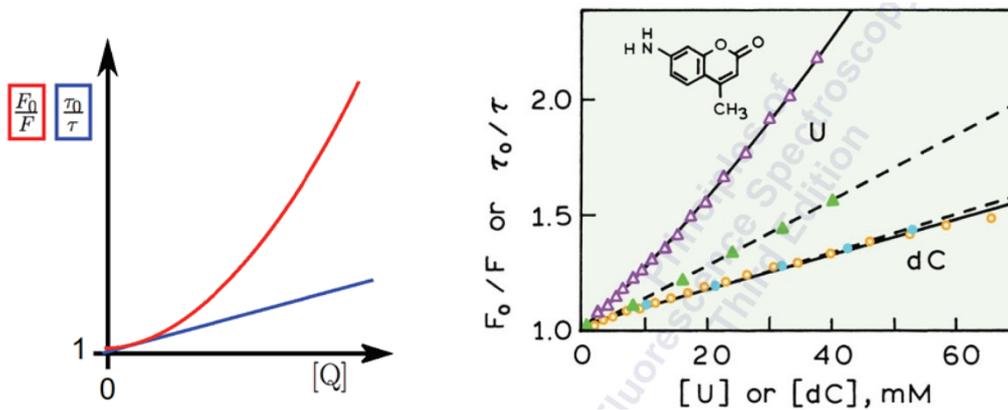


Abbildung 6: (links) Schematisches Stern-Volmer-Diagramm für eine Kombination aus dynamischer und statischer Fluoreszenzlöschung. Aufgetragen sind die relative Fluoreszenzintensität F_0/F bzw. die relative Fluoreszenzlebensdauer τ_0/τ gegen die Löscherkonzentration. In diesem Fall handelt es sich nicht mehr um einen einfachen linearen Zusammenhang für die Fluoreszenzintensität. (rechts) Beispiel für ein nichtlineares Stern-Volmer-Diagramm für die Löschung von Coumarin C-120 durch Uridin (U, violett) sowie der lineare Verlauf der relativen Lebensdauern (grün). Im Gegensatz dazu ist das Stern-Volmer-Diagramm für den Löschprozess durch Desoxy-Cytidin (dC) sowohl für die relativen Fluoreszenzintensitäten (gelb), als auch die relativen Lebensdauern (hellblau) linear, hierfür liegt reines kollisionales Quenching vor.⁴

Die modifizierte Stern-Volmer-Gleichung für das Verhältnis $[F]_0/[F]$ kann durch eine einfache Umformung linearisiert werden:

$$\frac{[F]_0}{[F]} = (1 + K_D \cdot [Q]) \cdot (1 + K_S \cdot [Q]) = 1 + (K_S + K_D) \cdot [Q] + K_D \cdot K_S \cdot [Q]^2$$

$$\left(\frac{[F]_0}{[F]} - 1 \right) \cdot \frac{1}{[Q]} = (K_S + K_D) + K_D \cdot K_S \cdot [Q]$$

Aus der Steigung kann das Produkt $K_D \cdot K_S$ und aus dem y-Achsenabschnitt die Summe $K_D + K_S$ bestimmt werden (zwei Gleichungen, zwei Unbekannte). Abb. 7 zeigt ein Beispiel für eine derartige Auftragung für das Quenching von Coumarin-120 durch Uridin/desoxy-Cytosin:

⁴ Joseph R. Lakowicz „Principles of Fluorescence Spectroscopy”, Springer, New York, 3. Aufl., 954 S. (2006).

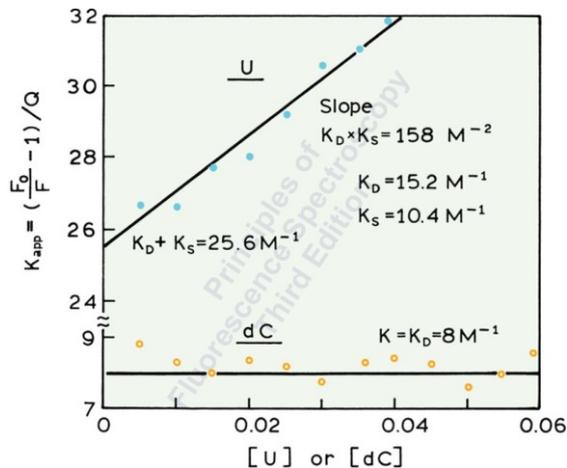


Abbildung 7: Modifiziertes Stern-Volmer-Diagramm für das System von Coumarin C-120 aus Abb. 6. In der linearisierten Darstellung liegen die Datenpunkte für das Quenching durch Uridin (U) auf einer Geraden, während die desoxy-Cytidin-Daten (dC) praktisch konstant sind.⁵

6. Fluoreszenzspektroskopie mit Zeitkorrelierter-Einzelphotonenzählung

Die Methode der Zeitkorrelierten-Einzelphotonenzählung („Time-Correlated Single Photon Counting“ – TCSPC) beruht auf der Zählung einzelner Photonen. Dabei wird die Probe mit kurzen Laserpulsen und hohen Wiederholungsfrequenzen (> 1 MHz) angeregt und das erste eintreffende Fluoreszenzphoton nach einem Anregungspuls detektiert. Das erste ankommende Photon startet den Time-to-Amplitude-Converter (TAC), dieser wird durch den nächsten ankommenden Anregungspuls wieder gestoppt. Der TAC gibt einen Spannungspuls aus, der proportional zur Zeitverzögerung zwischen Photonenankunft und Laserpuls ist. Dieses Signal wird dann von einem Analog-Digital-Wandler (ADC) in den jeweiligen Zeitkanal einsortiert und in einem Histogramm aufsummiert (siehe Abb. 8 und Abb. 9).

Mathematisch bedeutet der Messprozess die Faltung des zu messenden Signals mit der Impulsantwort-Funktion der Messelektronik (IRF). Um das zu messende Signal exakt zu rekonstruieren, muss es über eine mathematische Entfaltung der Impulsantwort-Funktion aus dem Messsignal berechnet werden.

⁵ Joseph R. Lakowicz: „Principles of Fluorescence Spectroscopy“, Springer, New York, 3. Aufl., 954 S. (2006).

Idealerweise entspricht die IRF der Reaktion eines linearen, zeitinvarianten Messsystems auf eine Diracsche δ - („Delta)-Funktion (unendlich kurzes Signal mit auf 1 normiertem Integral). Um also die IRF zu bestimmen, müsste man ein δ -funktionsartiges Signal in die Messapparatur einspeisen und das daraus resultierende Messsignal bestimmen. Da in der Praxis eine derartige Signalquelle nicht verfügbar ist, benutzt man das schnellste und kürzestmögliche Signal, das verfügbar ist. Dies stellt das Streusignal der gepulsten Laserquelle dar, welches ca. 50-100 ps lang ist. Als Streuquelle kann man einen konventionellen nicht fluoreszierenden (bzw. sehr schnell abklingenden) Farbstoff oder ein streuendes Medium wie eine Emulsion verwenden. Die IRF beschreibt die effektive Auflösung der Apparatur und spiegelt die Breite des verwendeten Anregungspulses sowie Streuungen elektrischer Signale durch die verwendete Elektronik bzw. Lichtstreuungen in der Apparatur durch vorhandene Optiken wider (Abb. 8).

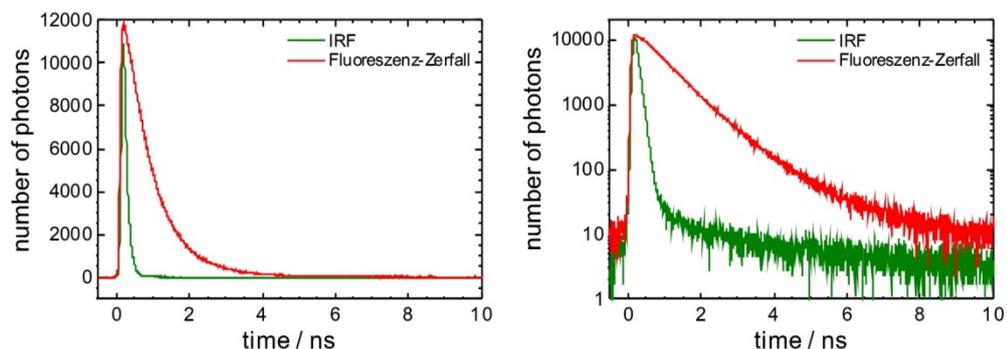


Abbildung 8: Instrumental Response Function (IRF, grün) und typische Fluoreszenzzerfallskurve (rot) aus einem TCSPC-Experiment. Im linken Teil der Abbildung sind die Signale auf einer linearen Skala dargestellt, typische Fluoreszenzzerfallskurven werden jedoch wie auf der rechten Seite halblogarithmisch aufgetragen, so dass exponentielle Komponenten des Messsignals als Geraden erkennbar sind.

Abb. 9 zeigt, wie beim SPC der Messvorgang so oft wiederholt wird, bis das Signal-Rausch-Verhältnis hinreichend gut ist. Wie zu sehen ist, entspricht die gemessene Häufigkeitsverteilung der auftretenden Zeitabschnitte zwischen Anregung und Detektion dem zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzkinetik.

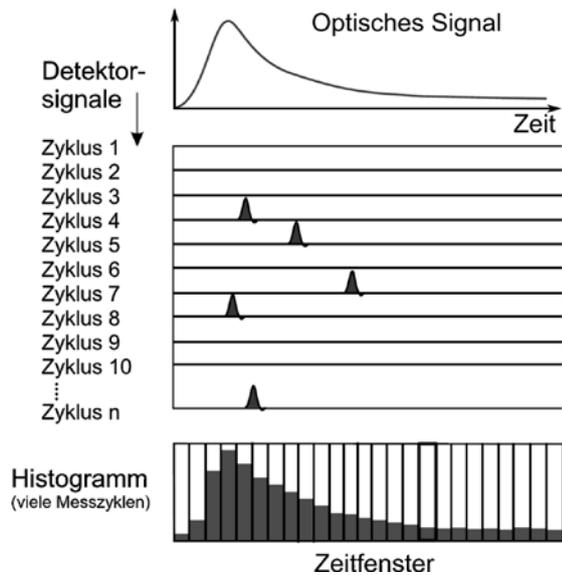


Abbildung 9: Prinzip der TCSPC Messungen. Die Photonenankunftszeiten mehrerer Zyklen werden in einem Histogramm aufsummiert.

7. Versuchsaufbau:

Für die Anregung der verschiedenen Proben steht ein gepulster Diodenlaser mit einer Anregungswellenlänge von 470 nm zur Verfügung. Die Repetitionsrate des Lasers kann variabel eingestellt werden mit Pulsdauern im ps-Bereich. Zur Abschwächung des Anregungslaserlichts stehen Graufilter zur Verfügung (Abb. 10)

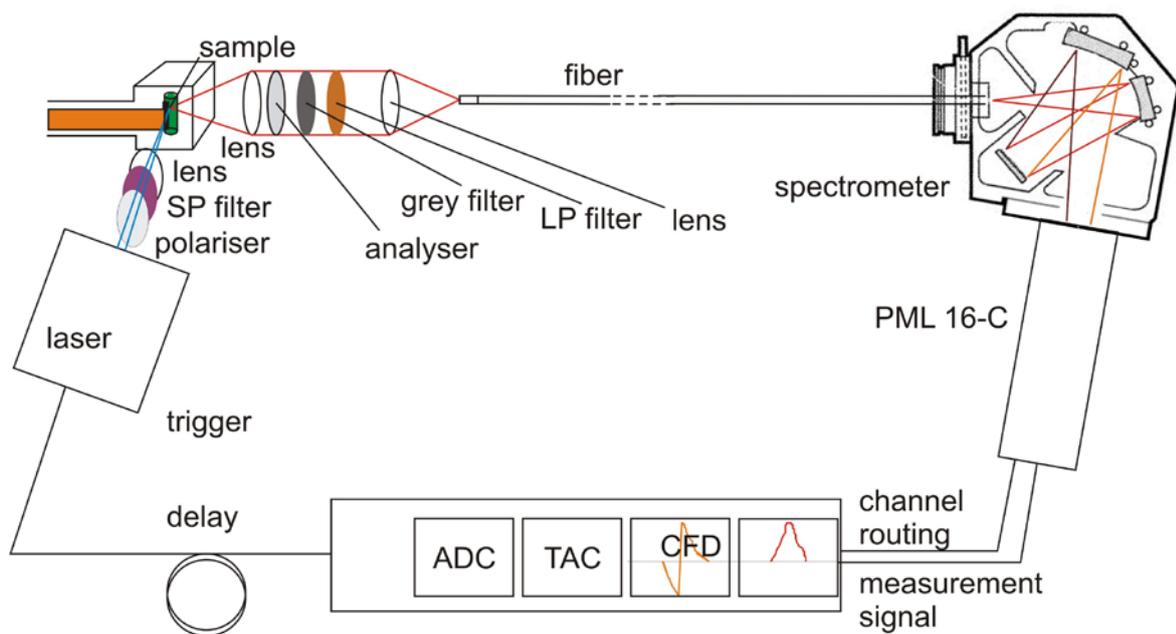


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

Sicherheitshinweis: Keinesfalls dürfen Zählraten über $1 \cdot 10^6$ eingestellt werden. Dies würde den PML-16C beschädigen. In den Anregungslaser darf nie direkt hineingesehen werden. Armbanduhren und Ringe sowie andere spiegelnde Gegenstände an Fingern, Händen oder Handgelenk sind abzulegen, um unkontrollierte Reflexionen der Laserstrahlung beim Justieren zu vermeiden.

Die zu untersuchende biologische Probe befindet sich in einer Küvette und wird mit einem gepulsten Diodenlaser zur Fluoreszenz angeregt.

Es wird eine hohe aber nicht zu hohe Repetitionsrate, also eine hohe Pulsfolge verwendet, um die Messdauer verkürzen zu können. Bei zu hohen Raten ist die Fluoreszenz des vorherigen Pulses noch nicht vollständig abgeklungen und es kommt zum Pile-Up.

Die Glasküvette wird in einen Küvettenhalter hineingestellt. Durch seitliche Fenster im Küvettenhalter kann die Probe angeregt werden. Die richtige Konzentration der Probe ist von entscheidender Bedeutung. Eine zu hohe Konzentration der Probe kann zu Reabsorptionseffekten führen und eine zu stark verdünnte Probe macht sich in einer zu niedrigen Zählrate bemerkbar. Des weiteren sollte die Probe am äußersten Rand der Küvette angeregt werden, um Reabsorptionseffekte zu vermeiden^{6, 7}

Eine Abbildungsoptik aus 2 Linsen hat die Aufgabe, das gesammelte Licht der Probe auf den 1 mm großen Eintrittsbereich einer Glasfaser, die zum Eintrittsspalt des Spektrometers führt zu fokussieren. Der angeregte Bereich in der Küvette, sowie die Faserendfläche müssen dabei jeweils im

⁶ T. Förster "Fluoreszenz organischer Verbindungen", Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen (1982)

Fokus der ersten bzw. der zweiten Linse stehen. Die Küvette ist dabei fest positioniert und das Linsensystem kann in alle drei Raumrichtungen bewegt werden. Zwischen die Linsen können außerdem noch Farbfilter zur Streulichtunterdrückung und Graufilter zur Intensitätsabschwächung verwendet werden. Polarisatoren und Analysatoren dienen für polarisationsaufgelöste Messungen und ein Kurzpassfilter (SP) kann eingesetzt werden, um Laserfluoreszenz zu unterdrücken.

Nach Passieren der Fluoreszenzphotonen durch den Eintrittsspalt gelangen diese im Spektrometer auf einen Parabolspiegel und von diesem parallel auf das Gitter. Hier wird das Licht gebeugt. Anschließend werden die Photonen auf die Photokathode fokussiert und die ausgelösten Elektronen werden im Photomultiplier verstärkt.

Ein konventioneller Photomultiplier ist eine evakuierte Röhre, in der sich die Photokathode und eine Anode befindet, sowie dazwischen liegende Dynoden. Dabei wird über eine anliegende Spannung ein elektrisches Feld aufgebaut, welches ein an der Kathode herausgeschlagenes Elektron auf die erste Dynode beschleunigt, dort weitere Elektronen herausschlägt bis schließlich ein Elektronenstrom zur Anode gelangt. Es kann ein Verstärkungsfaktor bis zu 10^6 erreicht werden.

Der Elektronenpuls wird an der letzten Dynode abgegriffen. Die an der Anode ankommenden Pulse werden an die Verarbeitungselektronik weitergeleitet.

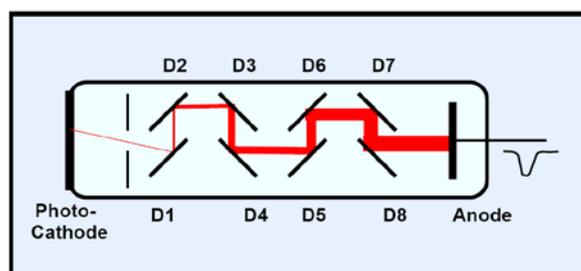


Abbildung 11: **Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus**⁸

⁷ T. Förster, „Intramolecular energy transfer and fluorescence“. Ann. Phys. , 2: 55 (1948)

⁸ Becker & Hickl, PML 16C user handbook

Jeder Photomultiplier hat eine gewisse Dunkelzählrate, die hauptsächlich in der Elektronik durch thermisches Rauschen entsteht.

Funktionsweise des TCSPC-Moduls

Die klassische Methode des TCSPC basiert auf der Detektion einzelner Photonen aus einem periodischen Lichtsignal (repetierende Anregung) und der Messung der Zeit zwischen Anregung und Ankunft des ersten Fluoreszenzphotons.

Ein auf die Dynode auftreffendes Photon löst ein Elektron aus. Dieses Elektron wird verstärkt. Die Elektronenwolke wird detektiert und dient als Zeit-Start-Signal. Das Zeit-Stop-Signal wird vom Laser als Trigger geliefert.

Die verstärkten Pulse werden in dem TCSPC-Modul über Constant Fraction Diskriminatoren (CFD), Time to Amplituden Converter (TAC), bis hin zum Vielkanalanalysator für die Zeitmessung weitergeleitet.

Sobald ein Puls den Constant Fraction Diskriminator (CFD) des TCSPC-Moduls erreicht, wird außerdem ein Zeit-Start-Signal am Time to Amplituden Converter (TAC) gestartet. Die Spannung am TAC steigt, bis über ein Referenzsignal das Stop-Signal kommt. Der Referenzpuls kommt direkt vom Laser-Trigger. Im Modul wird er SYNC genannt.

Literatur:

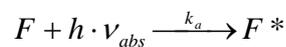
- Christian Gerthsen (Hrsg. Helmut Vogel), Gerthsen Physik
- Wolfgang Demtröder, Laserspektroskopie
- Wolfgang Demtröder, Molekülphysik
- Aleksander Jabłoński: „Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes“ Nature 131:839-840, 1931.
- Michael Kasha: „Characterization of electronic transitions in complex molecules“ Discussions of the Faraday Society 9, 14-19, 1950.
- Hermann Haken, Hans Christian Wolf: „Atomphysik und Quantenchemie“ 5. Aufl., 535 S., Springer, Berlin Heidelberg, 2006
- Joseph R. Lakowicz., „Principles of Fluorescence spectroscopy“, New York, 2006
- Theodor Förster “Fluoreszenz organischer Verbindungen”, Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen (1982)

- Theodor Förster, „Intramolecular energy transfer and fluorescence“. Ann. Phys. , 2: 55 (1948)
- Becker & Hickl, PML 16C user handbook

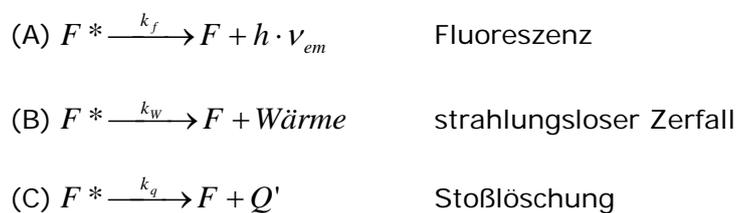
Anhang

Herleitung der Stern-Volmer-Gleichung

Ein Fluorophor F geht durch Absorption eines Photons in den angeregten Zustand F^* über. Hierfür gilt:



wobei k_a die Geschwindigkeitskonstante der Absorption ist, mit der der Fluorophor vom Grund- in den angeregten Zustand überführt wird. Aus dem angeregten Zustand kann der Fluorophor über verschiedene Wege in den Grundzustand zurückkehren:



Hierbei sind k_f und k_W Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung (Einheit: s^{-1}) für den radiativen Zerfall (Fluoreszenz) bzw. den nicht-radiativen Zerfall („innere Konversion“). Demgegenüber stellt k_q eine Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung dar (Einheit: $M^{-1} \cdot s^{-1}$). Die Quantenausbeute eines Prozesses ist allgemein definiert als

$$\Phi = \frac{\text{Anzahl der Moleküle, die einem bestimmten Vorgang unterliegen}}{\text{Anzahl der Quanten, die von dem System absorbiert werden}}$$

Die Fluoreszenzquantenausbeute ist dann:

$$\Phi = \frac{I_{em}}{I_{abs}} = \frac{k_f \cdot [F^*]}{k_a \cdot \varphi \cdot [F]}$$

Hierbei ist I_{em} die Anzahl der durch Fluoreszenz emittierten Photonen pro Zeiteinheit und I_{abs} die Anzahl der vom Fluorophor aufgenommenen Photonen pro Zeiteinheit. Die Anzahl emittierter Photonen ergibt sich wiederum aus dem Produkt der Anzahl (Konzentration) der Fluorophore im angeregten Zustand $[F^*]$ und der Geschwindigkeitskonstanten des Fluoreszenzprozesses k_f . Analog ergibt sich die Anzahl der absorbierten Photonen durch das Produkt aus der Anzahl (Konzentration) der Fluorophore im Grundzustand $[F]$, der Photonenstromdichte φ und der Geschwindigkeitskonstanten für den Absorptionsprozess k_a .

Das System von Differentialgleichungen für das System aus angeregten Fluorophoren F^* und Fluorophoren im Grundzustand F lautet:

$$\frac{d[F]}{dt} = -k_a \cdot \varphi \cdot [F] + k_f \cdot [F^*] + k_w \cdot [F^*] + k_q \cdot [Q] \cdot [F^*]$$

$$\frac{d[F^*]}{dt} = k_a \cdot \varphi \cdot [F] - k_f \cdot [F^*] - k_w \cdot [F^*] - k_q \cdot [Q] \cdot [F^*]$$

Im stationären Zustand verschwinden die beiden Ableitungen:

$$\frac{d[F]}{dt} = \frac{d[F^*]}{dt} = 0$$

Damit erhält man:

$$k_f \cdot [F^*] + k_w \cdot [F^*] + k_q \cdot [Q] \cdot [F^*] = k_a \cdot \varphi \cdot [F] = I_a$$

Im Gleichgewichtszustand ist also die Anzahl der absorbierten Photonen pro Zeiteinheit gleich der Summe aller Zerfallsprozesse des angeregten Zustands. Setzt man diese Ergebnisse in die Definition der Fluoreszenz-Quantenausbeute ein, erhält man:

$$\Phi = \frac{k_f \cdot [F^*]}{k_f \cdot [F^*] + k_w \cdot [F^*] + k_q \cdot [Q] \cdot [F^*]} = \frac{k_f}{k_f + k_w + k_q \cdot [Q]}$$

Der Zusammenhang

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + k_w + k_q \cdot [Q]}$$

folgt auch unmittelbar aus der Formel die Fluoreszenzquantenausbeute, wenn man noch annimmt, dass durch $[Q]$ ein zusätzlicher Relaxationskanal eröffnet wird.

Die Fluoreszenzquantenausbeute des Fluorophors Φ_0 in Abwesenheit der Löschermoleküle ($[Q]=0$) ist dann gegeben durch:

$$\Phi_0 = \frac{k_f}{k_f + k_w}$$

Bildet man das Verhältnis Φ_0/Φ , so ergibt sich:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{k_f + k_w + k_q \cdot [Q]}{k_f + k_w} = 1 + \frac{k_q \cdot [Q]}{k_q + k_w}$$

Andererseits ist bekannt, dass die Fluoreszenzlebensdauer τ des angeregten Zustands in Anwesenheit der Löschermoleküle durch die reziproke Summe der Geschwindigkeitskonstanten k_f , k_w und $k_q \cdot [Q]$ gegeben ist:

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_w + k_q \cdot [Q]}$$

Für die Fluoreszenzlebensdauer in Abwesenheit der Löschermoleküle τ_0 gilt analog:

$$\tau_0 = \frac{1}{k_f + k_w}$$

Somit lässt sich das Verhältnis Φ_0/Φ wie folgt schreiben:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{\tau_0}{\tau} = \frac{k_f + k_w + k_q \cdot [Q]}{k_f + k_w} = 1 + \frac{1}{\underbrace{k_q + k_w}_{\tau_0}} \cdot k_q \cdot [Q]$$

$$\boxed{\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + \tau_0 \cdot k_q \cdot [Q] = 1 + K_D \cdot [Q]} \text{ die Stern-Volmer-Gleichung}$$

mit $\boxed{K_D = K_{SV} = \tau_0 \cdot k_q}$ als Stern-Volmer-Konstante

Die bimolekulare Quenchingkonstante (auch mit K_{SV} bezeichnet) kann auch als

$$k_q = \gamma \cdot k_0$$

dargestellt werden, wobei k_0 die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante für Kollisionen und γ die Effizienz des Löschprozesses ist. k_0 gibt also an, mit welcher Wahrscheinlichkeit das Fluorophormolekül und das Quencher-molekül miteinander kollidieren. k_0 kann mittels der Einstein-Smoluchowski-Gleichung berechnet werden:

$$k_{diff} = N_A \cdot 4\pi \cdot (r_A + r_B) \cdot (D_A + D_B)$$

Diese stellt einen Zusammenhang zwischen der diffusiven Kollisionsrate k_{diff} und den Diffusionskonstanten zweier Stoßpartner A und B her (r_A und r_B sind die effektiven Radien der Stoßpartner und N_A ist die Avogadro-Zahl).

Bei einem Abstand $r_{AB} = r_A + r_B$ von 5 Å und typischen Diffusionskonstanten von $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ($10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) ergibt sich eine diffusive Kollisionskonstante von $7.2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \approx 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Der Wert $k_{diff} \approx 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ entspricht von der Größenordnung her der **maximal möglichen Geschwindigkeitskonstante einer diffusionskontrollierten Reaktion**. Im Falle des Fluoreszenz-Quenchings entspricht k_{diff} naturgemäß k_0 , der bimolekularen Geschwindigkeitskonstante für kollisionales Quenching. Der Effizienzparameter γ wird eingeführt, da nicht jeder Stoß zu einem Löschprozess führt.

Fluorescein

Fluorescein wurde zuerst von Adolf von Baeyer synthetisiert (1871) und zählt zu den am weitesten verbreiteten und bekanntesten Fluoreszenzfarbstoffen.

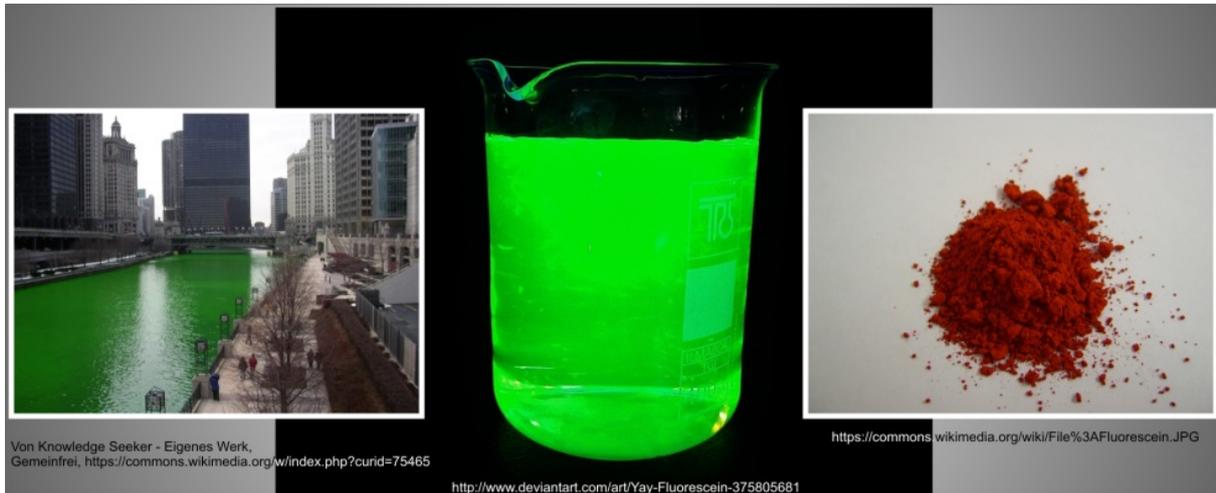


Abbildung A1: Fluorescein am St. Patrick's Day im Chicago-River (links), unter Bestrahlung mit UV-Licht in wässriger Lösung (Mitte), oder als getrocknetes Pulver (rechts).

Es zählt zu den Triphenylmethanfarbstoffen und unterscheidet sich von z.B. Phenolphthalein nur aufgrund der Verbrückung von zweien seiner Phenolringe durch ein Sauerstoffatom, was zu einem Xanthen-Grundgerüst führt. Fluorescein kann aus Phthalsäureanhydrid und Resorcinol (1,3-Dihydroxyphenol oder Resorcin) in Gegenwart von Zinkchlorid durch eine Friedel-Crafts-Reaktion gewonnen werden (Abb. A2). Weil es in seiner Farbe und Fluoreszenz dem damals noch weit verbreiteten Uranglas (ein Glas mit Uranoxidverbindungen zur Farbgebung, hergestellt in böhmischen Glashütten) glich, wurde das Natriumsalz des Fluoresceins bis in die neuere Zeit auch „Uranin“ genannt (z.B. in der wichtigen Arbeit von Gaviola und Pringsheim über die Fluoreszenzanisotropie⁹) Der chemische Name lautet 3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one.

In der Kurzbezeichnung „Fluorescein“ steht „Fluo“ für die Fluoreszenz und „rescein“ für das bei der Synthese verwendete Resorcin.

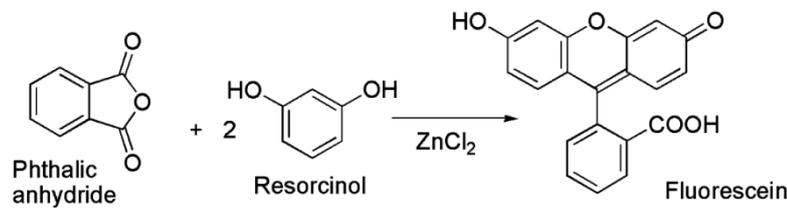


Abbildung A2: Synthetische Darstellung von Fluorescein.

Fluorescein ist einer der gebräuchlichsten Fluoreszenzfarbstoffe, es ist relativ preiswert, nicht patentiert und erlaubt eine Reihe von Derivatisierungen zur Konjugation mit funktionellen Gruppen (Amin, Sulfhydryl, Maleimid). Der Farbstoff ist nicht besonders stabil gegenüber Photodegradation, besonders in Gegenwart von Sauerstoff

Fluorescein hat ein breites Anwendungsspektrum und gilt als biologisch unbedenklich. Aufgrund seiner wasserfärbenden Wirkung und des hochempfindlichen Nachweises durch Fluoreszenz wird es z.B. als Signal bei Notwasserungen nach Schiffbrüchen eingesetzt (pro 100 g Uranin wird eine Meeresfläche von ca. 4000 m² auffällig gefärbt), aber auch in Badezusätzen, Shampoos und Schaumbädern, oder Kühlmitteln für Automotoren, um Leckagen leicht finden zu können. Hydrogeologen setzen es Fließgewässern zu, um z.B. unterirdische Wasserläufe oder Grundwasserströme nachzuweisen (z.B. historisch die Donauversickerung bei Immendingen 1877). Zu Dekorationszwecken findet Fluorescein sich in Leuchtfarben. Aufgrund seines „giftigen“ Aussehens, wurde der Chicago River jährlich zum St. Patrick's Day mit „Uranin“ eingefärbt. Eine kleine Show mit wissenschaftlichem Vortrag zum Thema Fluoreszenz wird von

⁹ Ramón Enrique Gaviola, Peter Pringsheim: „Über den Einfluß der Konzentration auf die Polarisation der Fluoreszenz von Farbstofflösungen“ Z. Physik 24:24-36 (1924). doi:10.1007/BF01327227

Dr. Franz-Josef Schmitt jährlich auf dem Festival für Freunde (www.festivalfuerfreunde.de) veranstaltet (Siehe Abb. A3)



Abb. A3 Dr. Franz-Josef Schmitt beim Experimentieren mit Fluorescein