

Während der Anregung absorbieren die Moleküle im energetischen Grundzustand ein Photon und springen in höhere Schwingungsniveaus angeregter Singulett-Zustände. Diese Anregung ist verantwortlich für Absorptionsspektren im UV- und sichtbaren Bereich. Die Absorption des Photons ist hoch spezifisch und findet in Zeitbereichen von etwa 10^{-15} s statt.

Als Photonenquelle dienen externe Lichtquellen wie Quecksilber-Lampen oder Laser.

Die Anregung wird gefolgt von einem Zurückspringen auf niedrigere Schwingungsniveaus (Schwingungsrelaxation, VR) des jeweiligen angeregten Zustands.

Der angeregte Zustand selbst hat eine bestimmte Lebensdauer.

Nun relaxieren diese angeregten Zustände in Lösung sehr schnell (10^{-12} s) in die *Boltzmann*-Verteilung der Schwingungszustände des ersten elektronisch angeregten Singulett-Zustands S_1 (*Kasha-Regel* [Kasha 1950]). Diese strahlungslose Relaxation (internal conversion, IC) verläuft isoenergetisch aufgrund vibronischer Kopplung zwischen Schwingungsniveaus eines elektronisch angeregten Singulett-Zustands und Schwingungsniveaus eines niedrigeren Singulett-Zustands. Durch Wechselwirkungen mit benachbarten Lösemittelmolekülen verliert das Molekül Schwingungsenergie.

Die Geometrie des Fluoreszenzfarbstoffs unterscheidet sich zwischen angeregtem und Grundzustand, einige Bindungslängen und -winkel sind verändert (*Franck-Condon*-Prinzip).

Aus dem angeregten Zustand kehrt der Farbstoff in höhere Schwingungsniveaus des elektronischen Grundzustands zurück, indem ein Photon ausgesandt wird, was als Fluoreszenz ($\tau \approx 10^{-8}$ s) zu beobachten ist. Während der Fluoreszenz-Emission bleibt die Spin-Multiplizität erhalten. Außerdem kann eine strahlungslose Deaktivierung vom angeregten zum Grundzustand (internal conversion, IC), wie oben beschrieben, stattfinden.

Die Energie des emittierten Photons hängt direkt von der Energiedifferenz des oberen zum unteren Endniveau zum Zeitpunkt der Emission ab. Das untere Niveau ist nicht unbedingt der Grundzustand, sondern kann einer der angeregten Schwingungszustände sein, von dem das Elektron durch Relaxation (vibrational relaxation, VR) wieder bis in den S_0 -Zustand gelangt.

Photoemission ist ein unimolekularer Vorgang mit erster Ordnung bezüglich der Konzentration des angeregten Zustands. Die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz liegt typischerweise in der Größenordnung von $10^7 \dots 10^9$ s⁻¹.

1.1.2 Stokes-Verschiebung und Lösemittelrelaxation

Als *Stokes-Verschiebung* bezeichnet man den Unterschied in den Wellenlängenmaxima von Absorptions- und Emissionsspektrum. Im Gegensatz zur Fluoreszenz von Atomen in der Gasphase zeigen Moleküle unter gleichen Bedingungen eine energetische Verschiebung der Fluoreszenzübergänge hin zu größeren Wellenlängen relativ zu ihren Absorptionsübergängen.

Strickler und *Berg* gaben 1962 eine Gleichung

$$\tau = \tau_0 \cdot \phi \quad (1.1.2-1)$$

für die Lebensdauer an und wiesen darauf hin, dass nur Atome scharfe Absorptionslinien besitzen, ihre Gleichung also nur unter der Annahme gilt, dass Absorption und Emission bei gleicher Wellenlänge erfolgen. Sie verwendeten die *Boltzmann-Verteilung* für 2 Energieniveaus

$$\frac{N_1}{N_2} = e^{-\frac{h\nu_{1-2}}{kT}} \quad (1.1.2-2)$$

Die Absorption erfolgt in angeregte Schwingungsniveaus. In kondensierter Phase kommt es durch Energieverlust zur Relaxation in das unterste Schwingungsniveau [Strickler 1962].

Moleküle bestehen aus zahlreichen Atomen und besitzen deshalb Schwingungs- und Rotationsniveaus, die für die *Stokes-Verschiebung* in der Gasphase verantwortlich sind. Das Resultat ist eine Vielzahl eng beieinander liegender Übergänge, welche durch Wechselwirkungen zwischen den Farbstoff- und den Lösemittelmolekülen zu ausgedehnten Absorptions- bzw. Fluoreszenzbanden verbreitert werden.

Außerdem besitzt jedes Farbstoffmolekül in Lösung eine leicht unterschiedlich strukturierte Solvathülle von Lösemittelmolekülen, so dass für jedes Farbstoffmolekül aufgrund der unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen Farbstoffmolekül und den Lösemittelmolekülen der Solvathülle ein etwas unterschiedliches Spektrum resultiert.

Die Verschiebung der Fluoreszenzbande zu längeren Wellenlängen im Vergleich zu der Absorptionsbande hat zwei Ursachen. Zum einen relaxieren die angeregten Singulett-Zustände schnell durch strahlungslose Prozesse in die *Boltzmann-Verteilung* des S_1 -Zustands, von dem aus in der Regel die Fluoreszenz erfolgt (*Kasha-Regel* [Kasha 1950]). Diese schnelle Relaxation geschieht intramolekular durch Umverteilung der Rotations- und Schwingungsenergie und intermolekular durch Stöße. Somit besitzt das aus dem S_1 -Zustand emittierte Fluoreszenzphoton eine geringere Energie als das zuvor absorbierte Photon.

Zusätzlich trägt in Lösung die Relaxation der dem Farbstoffmolekül benachbarten Lösemittelmoleküle zur *Stokes-Verschiebung* bei.

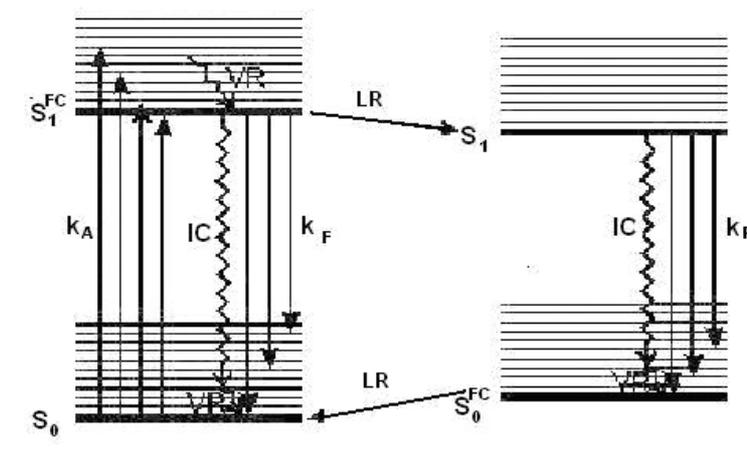


Abbildung 1.1.2-1: vereinfachtes Energieniveauschema mit Lösemittelrelaxation

Im Grundzustand (S_0) befindet sich ein Farbstoffmolekül mit den ihm umgebenden Lösemittelmolekülen im thermischen Gleichgewicht. Die Absorption eines Photons überführt dieses Farbstoffmolekül innerhalb von ca. 10^{-15} s in einen angeregten Zustand, wobei sich auf dieser Zeitskala nur die Elektronenverteilung ändert und die Kernkoordinaten konstant bleiben (*Franck-Condon-Prinzip*). Entsprechend schnell werden die Elektronenverteilungen der umgebenden Lösemittelmoleküle polarisiert. Mit der Anregung ist im allgemeinen auch eine Änderung des Dipolmoments verbunden. Die mit der Anregung erreichte „*Franck-Condon-Konfiguration*“ des angeregten Zustands (S_1^{FC}) relaxiert strahlungslos innerhalb von ca. 10^{-12} s in die *Boltzmann-Verteilung* des S_1 -Zustands. Aufgrund des veränderten Dipolmoments des angeregten Zustands befinden sich die umgebenden Lösemittelmoleküle hinsichtlich der Orientierung ihrer Dipolmomente nicht im thermischen Gleichgewicht mit dem angeregten Farbstoffmolekül. Innerhalb von ca. 10^{-11} s erreichen die Lösemittelmoleküle durch Umorientierung (Drehung) das thermische Gleichgewicht mit dem angeregten Farbstoff. Diese Lösemittelrelaxation (LR) senkt die Energie des angeregten Zustands ab. Da die Fluoreszenz mit ca. 10^{-8} s langsamer ist als die Relaxation, verschiebt sich das Fluoreszenzspektrum mit zunehmender Zeit nach der Anregung hin zu längeren Wellenlängen (*Solvatochromie*). Der Fluoreszenzübergang erfolgt nach dem *Franck-Condon-Prinzip* vertikal in den Grundzustand (S_0^{FC}). Dieser besitzt jedoch die Kernkoordinaten des S_1 -Zustands sowie die entsprechende Orientierung der Lösemittelmoleküle und ist wiederum nicht im thermischen Gleichgewicht mit den umgebenden Lösemittelmolekülen, was eine höhere Energie relativ zum im thermischen Gleichgewicht befindlichen Grundzustand bedeutet.

1.1.3 Anisotropie

Wird eine Farbstofflösung mit linear polarisiertem Licht angeregt, so ist die Fluoreszenzpolarisierung aufgrund der bei der Absorption stattfindenden Photo-selektion durch die relativen Orientierungen der Übergangsmomente der Absorption und der Emission sowie durch die *Brown'sche* Rotationsbewegung der Farbstoffmoleküle beeinflusst. Meist wird zur Beschreibung der Polarisierungseffekte statt der Polarisierung P die Anisotropie r benutzt. In den Gleichungen 1.1.3-1a und 1.1.3-1b sind beide Größen als Funktion der zur Anregungspolarisationsrichtung parallel (\parallel) bzw. senkrecht polarisiert (\perp) gemessenen Fluoreszenzintensitäten dargestellt.

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad \text{bzw.} \quad r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (1.1.3-1a, b)$$

Der elektrische Dipol des Fluorophors muss nicht genau mit der z -Achse ausgerichtet sein, um linear polarisiertes Licht entlang dieser Achse absorbieren zu können (Abbildung 1.1.3-1). Die Wahrscheinlichkeit, mit der das Fluorophor linear polarisiertes Licht absorbiert, ist proportional zu $\cos^2\theta$, wobei θ der Winkel ist, den die Dipole bei der Absorption mit der z -Achse bilden. Diese $\cos^2\theta$ -Verteilung ist außerdem abhängig von der Wahrscheinlichkeit, dass das Molekül den Winkel θ mit der z -Achse bildet.

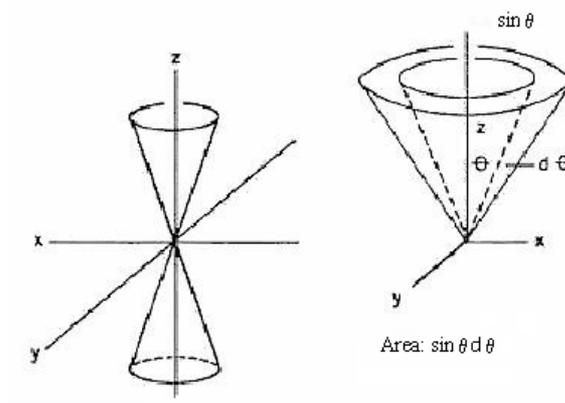


Abbildung 1.1.3-1: Photoselektion und Wahrscheinlichkeitsverteilung von Fluorophoren.

Photoselektion bezeichnet das Phänomen, dass man bei der Anregung mittels entlang der z -Achse polarisierten Lichtes selektiv Fluorophore erhält mit symmetrischer Verteilung um die z -Achse. Die Zahl der Moleküle mit einem Winkel zwischen θ und $\theta + d\theta$ ist proportional zu $\sin\theta d\theta$. Somit ist bei Anregung mit vertikal

polarisiertem Licht die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Moleküle gegeben durch $F(\theta)d\theta = \cos^2\theta \sin\theta d\theta$.

Der maximale Wert für die Anisotropie ist 0,4; er entspricht einer kollearen Ausrichtung der Absorptions- und Emissionsdipole in Abwesenheit weiterer depolarisierender Einflüsse.

Die Absorptions- und Emissionsdipole der Fluorophore sind im allgemeinen nicht kollearen, sondern bilden in der Ebene der Fluorophore den Winkel α zueinander. Die beobachtete Anisotropie ergibt sich aus dem Produkt der Abnahme der Anisotropie gemäß der Photoselktion (2/5) und ihrer Abnahme, verursacht durch die Winkeländerung zwischen den Dipolen:

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{2} \right) \quad (1.1.3-2)$$

Die Terme r_0 und P_0 beziehen sich hierbei auf Systeme, die keinen weiteren depolarisierenden Einflüssen ausgesetzt sind. Die r_0 -Werte einer isotropen Lösung liegen zwischen $-0,2 \leq r_0 \leq 0,4$ bzw. $-0,33 \leq P_0 \leq 0,5$.

Ein kompletter Verlust der Anisotropie tritt auch ein, wenn Fluoreszenzintensität unter einer Polarisation von $\alpha = 54,7^\circ$ („magic angle“) zur Anregungspolarisation gemessen wird. Hier besitzen Anisotropie und Polarisation den Wert Null. Für Winkel größer $54,7^\circ$ werden r_0 und P_0 negativ, die maximalen negativen Werte konnten für den Winkel $\alpha = 90^\circ$ gefunden werden.

Da sich die Orientierung des Absorptionsdipols in Abhängigkeit von der Absorptionsbande ändert, variiert auch der Winkel α und somit r_0 mit der Wellenlänge der Anregung.

Die Abhängigkeit von r von der Rotationsbewegung des Fluorophors wird durch die *Perrin-Gleichung*

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \left(\frac{\tau}{\phi} \right) \quad (1.1.3-3)$$

näher beschrieben, wobei τ die Fluoreszenzlebensdauer und ϕ die Rotationskorrelationszeit sind. Für Werte von $\phi \gg \tau$ (stark viskose Lösung) strebt der Quotient r_0/r , also die beobachtete Anisotropie, gegen r_0 . Im umgekehrten Fall, wenn $\phi \ll \tau$ (verdünnte, nicht viskose Lösung), strebt die Anisotropie gegen Null. Es ist keine Anisotropie messbar ($I_{\parallel} = I_{\perp}$ und $r = 0$), man spricht von Depolarisation. Das heißt, je kleiner die Fluoreszenzlebensdauer und je größer die Rotationskorrelationszeiten sind, desto größer ist die Anisotropie.

1.1.4 Fluoreszenzlebensdauer und Fluoreszenzquantenausbeute

1.1.4.1 Fluoreszenzlebensdauer

Da das Farbstoffmolekül aus dem S_1 -Zustand fluoresziert (*Kasha-Regel*), entspricht die Fluoreszenzkinetik der Kinetik des S_1 -Zustands und ist unabhängig von der Anregungswellenlänge (*Vavilov-Regel* [Birks 1970]). Wird eine Farbstofflösung mit einem infinitesimal kurzen Lichtpuls (δ -Puls) angeregt, so beträgt die Konzentration der instantan erzeugten, angeregten Farbstoffmoleküle $[F_0^*]$ (in mol l^{-1}). Diese relaxieren in den Grundzustand gemäß Gleichung 1.1.4.1-1:

$$\frac{d[F_0^*]}{dt} = -k[F^*(t)], \quad (1.1.4.1-1)$$

das heißt, die differentielle Abnahme der Konzentration angeregter Moleküle ist proportional zur augenblicklich vorhandenen Konzentration $[F^*(t)]$. Die Proportionalitätskonstante k entspricht der Fluoreszenzabklinggeschwindigkeit, die sich additiv aus den einzelnen Relaxationsgeschwindigkeiten des S_1 -Zustands, der Fluoreszenzgeschwindigkeit k_f , der Internal-conversion-Geschwindigkeit k_{IC} und der Intersystem-crossing-Geschwindigkeit k_{ISC} , zusammensetzt.

$$k = k_f + k_{IC} + k_{ISC} \quad (1.1.4.1-2)$$

Das zeitliche Verhalten der Konzentration angeregter Moleküle ergibt sich nach Integration mit der Nebenbedingung $[F^*(t=0)] = [F_0^*]$:

$$[F^*(t)] = [F_0^*]e^{-kt} \quad (1.1.4.1-3)$$

Experimentell erfasst wird jedoch nicht die Konzentration der angeregten Moleküle, sondern deren Fluoreszenzintensität $I_F(t)$, das heißt, die Anzahl der pro Sekunde und pro Fläche von der Farbstofflösung emittierten Photonen. Die Fluoreszenzintensität $I_F(t)$ ist proportional zur Konzentration der angeregten Moleküle $[F^*(t)]$:

$$I_F(t) = k_f[F^*(t)], \quad (1.1.4.1-4)$$

mit der Fluoreszenzgeschwindigkeit k_f als Proportionalitätskonstante. Die Proportionalitätskonstante ist die Fluoreszenzgeschwindigkeit k_f (natürliche Strahlungsgeschwindigkeit), da nur angeregte Moleküle zur Fluoreszenzintensität beitragen, die nicht strahlungslos relaxieren. So ergeben sich für die Abnahme

$$\frac{dI_F(t)}{dt} = -kI_F(t) = k_f \frac{d[F^*(t)]}{dt} \quad (1.1.4.1-5)$$

bzw. für den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität.

Die Fluoreszenzlebensdauer τ entspricht der Zeit, nach der die Konzentration des angeregten Zustands $[F^*(t)]$ bzw. die Fluoreszenzintensität $I_F(t)$ auf den e -ten Teil ($1/e \approx 0,3679$) ihres Anfangswertes abgesunken ist:

$$\tau = \frac{1}{k} = \frac{1}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}} \quad (1.1.4.1-6)$$

Zudem repräsentiert die Fluoreszenzlebensdauer die mittlere Verweilzeit $\langle \tau \rangle$ eines Farbstoffmoleküls im angeregten Zustand.

Wechselwirkungen (z.B. Fluoreszenzlöschung) mit der molekularen Umgebung können zu komplexeren Fluoreszenzkinetiken führen. Das Fluoreszenzabklingverhalten der Farbstofflösung setzt sich aus der Überlagerung mehrerer Exponentialfunktionen

$$I_F(t) = \sum_i A_i e^{-k_i t} \quad (1.1.4.1-7)$$

mit $\sum_i A_i = 1$ zusammen.

Prinzipiell lässt sich jedes gemessene Abklingverhalten der Fluoreszenzintensität durch eine Überlagerung von Exponentialfunktionen darstellen. Die durch Datenanpassung (Fit) bestimmten Parameter, die Amplituden A_i und die Fluoreszenzgeschwindigkeiten k_i bzw. Fluoreszenzlebensdauern τ_i , besitzen nicht unbedingt eine physikalisch-chemische Bedeutung, sie müssen nicht mit den spektroskopischen Eigenschaften des untersuchten Systems in Beziehung stehen. Sie sind primär nur das Ergebnis eines mathematischen Optimierungsproblems. Eine physikalisch-chemische Bedeutung bekommen die erhaltenen Parameter A_i und τ_i erst, wenn ein physikalisch-chemisches Modell sie stützt. Das ist zum Beispiel der Fall, wenn i verschiedene, nicht miteinander wechselwirkende Fluorophore zur Fluoreszenz beitragen. Fluorophore können in diesem Zusammenhang verschiedene Farbstoffmoleküle und/oder Farbstoffmoleküle in unterschiedlichen molekularen Umgebungen sein.

Die Fluoreszenzlebensdauer ist empfindlich auf verschiedene chemische und physikalische Faktoren wie pH-Wert, O_2 -Gehalt, Temperatur, Kationen (z.B. Ca^{2+}), Polarität, Bindung an Makromoleküle, Elektronentransfer, Löschmoleküle. Sie ist aber recht unempfindlich gegenüber der Konzentration, z.B. hohe Verdünnung [Lakowicz 1992]. Jedoch tritt bei höheren Konzentrationen Reabsorption und Reemission auf, was die Lebensdauer τ verlängert.

1.1.4.2 Fluoreszenzintensität

Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur Gesamtheit der von einer Probe abgegebenen Photonen. Man erhält also ein Maß für die Fluoreszenzintensität, indem man $I_F(t)$ über die Zeit integriert. Stellt man die Fluoreszenzabklingkurve durch eine Schar von monoexponentiellen Abfällen

$$I_F(t) = \sum_i A_i e^{-k_i t} \quad (1.1.4.2-1)$$

dar, ergibt sich für die Intensität F nach einer δ -Puls-Anregung:

$$F \propto \int_0^{\infty} I_F(t) dt = \int_0^{\infty} \sum_i A_i e^{-k_i t} dt = \sum_i A_i \tau_i \quad (1.1.4.2-2)$$

Außerdem ist die Fluoreszenzintensität auch proportional zur Intensität des absorbierten Lichts, wobei die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F die Proportionalitätskonstante ist:

$$F = \Phi_F I_A \quad (1.1.4.2-3)$$

Die absorbierte Lichtintensität ist schwer direkt zu messen. Zweckmäßiger ist es, die Ausgangsintensität I_0 und die Intensität nach Durchstrahlen der Lösung I_T (transmittierte Intensität) zu bestimmen, wobei sich aus der Differenz $I_0 - I_T$ die absorbierte Lichtintensität I_A ergibt:

$$F = \Phi_F (I_0 - I_T) = I_0 \Phi_F \left(\frac{I_0 - I_T}{I_0} \right) \quad (1.1.4.2-4)$$

Der Bruch I_T / I_0 ist für niedrige Konzentrationen mit Hilfe des *Lambert-Beer-Gesetzes*

$$A(\lambda) = \log_{10} \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} = \varepsilon(\lambda) c_i d \quad (1.1.4.2-5)$$

zu substituieren:

$$F = \Phi_F I_0 \left(1 - 10^{-\varepsilon(\lambda) c d} \right) \quad (1.1.4.2-6)$$

Für niedrige Konzentrationen ist die Fluoreszenzintensität F also proportional zur Intensität des Anregungslichtes I_0 und zur Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F . Nach Umformungen ergibt sich die Beziehung

$$F \approx 2,303 \Phi_F I_0 \varepsilon(\lambda) c d, \quad (1.1.4.2-7)$$

aus der erkennbar ist, dass für niedrige Konzentrationen an Fluorophoren die Absorption (bzw. optische Dichte $OD = \varepsilon(\lambda) c d$) und die Fluoreszenzintensität F einander ungefähr proportional sind.

Da die Fluoreszenz immer aus dem S_1 -Singulett-Zustand erfolgt und damit eine höherenergetische Anregung keine Änderung der Fluoreszenzeigenschaften verursachen sollte (*Vavilov-Regel*), ist die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F von der Anregungswellenlänge λ_A unabhängig. Wenn man die Anregungsintensität I_0 , die Konzentration c und die Absorptionsstrecke d konstant hält, ist der Verlauf der Fluoreszenzintensität F proportional dem Verlauf der Absorption, jeweils in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge λ_A . Es gilt also, dass die auf gleiche Höhe normierte Absorptions- und Anregungsspektren identisch sind für Lösungen,

die lediglich einen Fluorophor enthalten. Existieren in einer Lösung mehrere Fluorophore, die sich entweder in ihrem Absorptions- oder Emissionsspektrum unterscheiden und nicht die gleiche Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F besitzen, so treten Abweichungen zwischen dem Absorptions- und Anregungsspektrum auf. Umgekehrt lässt sich natürlich auch aus Abweichungen zwischen dem Absorptions- und Anregungsspektrum folgern, dass mehrere fluoreszierende Spezies vorliegen oder dass eine Spezies nicht nur aus ihrem S_1 -Singulett-Zustand fluoresziert.

1.1.4.3 Fluoreszenzquantenausbeute

Die Analyse fluoreszenzspektroskopischer Experimente erfordert, die „Stärke“ der Fluoreszenz quantifizieren zu können. Im allgemeinen dient die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F als quantitatives Maß der Fluoreszenz einer Farbstofflösung. Sie ist definiert als Verhältnis der Anzahl der emittierten Photonen N_F zur Anzahl der absorbierten Photonen N_A , unabhängig von deren Energie (Wellenlänge).

$$\Phi_F = \frac{N_F}{N_A} \quad (1.1.4.3-1)$$

Aufgrund der strahlungslosen Relaxationsprozesse des S_1 -Zustands ist $N_A > N_F$ und somit $\Phi_F < 1$. Da jedes von einem Molekül absorbierte Photon bei elektronischer Anregung dieses letztlich in den S_1 -Zustand anregt, ist die Fluoreszenzquantenausbeute auch durch

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k} = \frac{k_F}{k_F + k_{nr}} = k_F \tau = \frac{\tau}{\tau_F} \quad (1.1.4.3-2)$$

(mit $k_{nr} = k_{IC} + k_{ISC}$) gegeben, dem Verhältnis aus der Fluoreszenzgeschwindigkeit („natürliche“ Fluoreszenzgeschwindigkeit) k_F und der Fluoreszenzabklinggeschwindigkeit k ($k_F < k$). Die entsprechenden Fluoreszenzlebensdauern sind τ_F und τ ($\tau_F > \tau$). Die Geschwindigkeit k_{nr} der strahlungslosen Deaktivierung des S_1 -Zustands setzt sich im einfachsten Fall aus der Internal-conversion- k_{IC} und der Intersystem-crossing-Geschwindigkeit k_{ISC} zusammen.

Die Fluoreszenzquantenausbeute beträgt für Rhodamine und Oxazine in etwa $\phi = 0,9$.

1.1.4.4 Fluoreszenzgeschwindigkeit und „natürliche“ Lebensdauer

Neben den Geschwindigkeiten der strahlungslosen Prozesse (k_{IC} , k_{ISC}) ist vor allem die Fluoreszenzgeschwindigkeit k_F für das Verständnis der photophysikalischen

Prozesse innerhalb eines Moleküls von Bedeutung. Diese Geschwindigkeiten bestimmen sowohl die Fluoreszenzquantenausbeute als auch die Fluoreszenzlebensdauer. Dient die Fluoreszenzlebensdauer als Informationsträger für die Diagnostik farbstoffmarkierter Biomoleküle, sollte darüber hinaus die „natürliche“ Fluoreszenzlebensdauer τ_F bekannt sein. Sie stellt eine obere Grenze der Fluoreszenzlebensdauer dar und entspricht der Fluoreszenzlebensdauer bei Abwesenheit aller strahlungslosen Prozesse. Die „natürliche“ Fluoreszenzgeschwindigkeit k_F und die damit verbundene Fluoreszenzlebensdauer τ_F leiteten *Strickler* und *Berg* aus dem Zusammenhang zwischen Lichtabsorption und Lichtemission her [Strickler 1962].

$$k_F = 2,88 \cdot 10^{-12} n^2 \langle \tilde{\nu}_F^{-3} \rangle_{av}^{-1} \int \frac{\varepsilon(\tilde{\nu})}{\tilde{\nu}} d\tilde{\nu} \quad (1.1.4.4-1)$$

$$\text{mit } \langle \tilde{\nu}_f^{-3} \rangle_{av}^{-1} = \frac{\int F(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}}{\int \frac{F(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}}{\tilde{\nu}^3}}$$

In dieser *Strickler-Berg-Beziehung* sind n der Brechungsindex des Lösemittels, $\tilde{\nu}$ die Wellenzahl (in cm^{-1}), ε der molare dekadische Extinktionskoeffizient (in $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) und F die stationäre Fluoreszenzintensität. Die Integrale sind über die Hauptabsorptions- bzw. Fluoreszenzbande zu berechnen. Mit Hilfe der *Strickler-Berg-Beziehung* kann der Effekt der molekularen Umgebung auf die Fluoreszenzgeschwindigkeit sowie die „natürliche“ Fluoreszenzlebensdauer abgeschätzt werden.

1.1.5 Fluoreszenzlöschung

Unter Fluoreszenzlöschung versteht man jeden molekularen Prozess, der eine Reduzierung der Fluoreszenzintensität des betrachteten Systems bewirkt. Molekulare Prozesse, die zur Löschung der Fluoreszenz führen, können Energietransfer, Stoßlöschung, chemische Reaktionen aus dem S_1 -Zustand und Komplexbildung im Grundzustand und angeregten Zustand sein.

Beim **Energietransfer** überträgt ein angeregtes Farbstoffmolekül F^* (Donor) seine Anregungsenergie strahlungslos über einen Dipol-Dipol-Mechanismus (*Förster-Transfer*) auf ein geeignetes, in der Nähe befindliches Akzeptor-Molekül.



Für einen Energietransfer muss das Fluoreszenzspektrum des Donormoleküls (Farbstoffmolekül) F mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptor-Moleküls A überlappen [Förster 1948] [Förster 1951].

Bei der **Stoßlöschung**, auch als **dynamische Löschung** bezeichnet, wird die Anregungsenergie des Farbstoffmoleküls F^* durch einen diffusiven Zusammenstoß

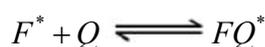
mit einem geeigneten Molekül, Ion oder Atom Q auf dieses übertragen. Nach dem Stoß besitzt die Spezies Q erhöhte Translations-, Rotations- oder Schwingungsenergie ($Q \rightarrow Q'$)



Der einfachste Fall der Fluoreszenzlöschung durch **Komplexierung** ist die **statische Löschung** mittels Grundzustandskomplexierung. Hierbei bildet das anzuregende Farbstoffmolekül F mit einem geeigneten Molekül Q einen im Grundzustand stabilen Komplex FQ. Dieser Komplex FQ kann zwar angeregt werden, er fluoresziert jedoch nicht.

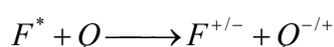
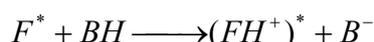


Aufgrund des Gleichgewichts im Grundzustand zwischen Farbstoffmolekül F und Molekül Q auf der einen und Komplex FQ auf der anderen Seite, vermindert sich die Anzahl der in der Lösung befindlichen, zur Fluoreszenz anregbaren Moleküle F. Komplexiert das Molekül Q das Farbstoffmolekül im angeregten Zustand (F^*), spricht man von **Exciplex-Bildung** (excited complex).



Der gebildete Exciplex FQ^* ist nur im angeregten Zustand stabil und zerfällt strahlend und/oder strahlungslos in den jeweiligen Grundzustand der Moleküle F und Q.

Auch **chemische Reaktionen** können den S_1 -Zustand strahlungslos deaktivieren. Hier sind vor allem Umlagerungs-, Protonentransfer- und Elektronentransferreaktionen zu nennen. Diese Reaktionen sind als strahlungslose Konkurrenzprozesse zur Fluoreszenz aus dem S_1 -Zustand von Bedeutung.



Neben dem Studium prinzipieller Phänomene lohnt die Untersuchung der Fluoreszenzlöschung im Hinblick auf biochemische Anwendungen.

Im folgenden werden die dynamische und die statische Fluoreszenzlöschung behandelt. Nachfolgend wird ein umfassenderes Modell zur Fluoreszenzlöschung beschrieben.

Diffusionskontrollierte, bimolekulare Geschwindigkeit

Für intermolekulare Löschexperimente lässt sich die Stoßzahl Z eines Farbstoffmoleküls F mit einem Löschmolekül Q leicht angeben. Die Stoßzahl Z (in s^{-1}) ist proportional zur Konzentration der Löschmoleküle [Q] (in $mol\ l^{-1}$) sowie zur diffusionskontrollierten, bimolekularen Geschwindigkeit k_{diff} ($l\ mol^{-1}\ s^{-1}$).

$$Z = k_{diff}[Q] \quad (1.1.5-1)$$

Die diffusionskontrollierte, bimolekulare Geschwindigkeit k_{diff} kann mit der *Smoluchowski-Gleichung* [Smoluchowski 1917] [Sveshnikoff 1935] [Birks 1973] berechnet werden. Befindet sich innerhalb des Radius R_0 um das Farbstoffmolekül F kein Löschmolekül Q, besteht ein Konzentrationsgradient bezüglich Q. Den Fluss von Q in die durch F und R_0 definierte Kugel beschreibt das *Zweite Fick-Diffusionsgesetz*

$$\frac{\partial[Q]}{\partial t} = D_{F,Q} \nabla^2[Q]. \quad (1.1.5-2)$$

Der Radius R_0 entspricht dem Stoßabstand.

Mit der Nebenbedingung, dass auf der Oberfläche der durch F und R_0 beschriebenen Kugel $[Q] = 0$ gilt, liefert die Lösung von obiger Gleichung die *Smoluchowski-Gleichung*:

$$k_{diff} = k(t) = 4\pi R_0 D_{F,Q} N' \left(1 + \frac{R_0}{\sqrt{\pi D_{F,Q} t}} \right) \quad (1.1.5-3)$$

mit k_{diff} in $l \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Die Lösung dieser Gleichung ergibt den Fluss

$$\Phi_Q = k(t) [Q], \quad (1.1.5-4)$$

wobei $[Q]$ die Konzentration von Q in mol l^{-1} ist.

Der Diffusionskoeffizient $D_{F,Q}$ berücksichtigt durch $D_{F,Q} = D_F + D_Q$ die simultane Diffusion beider Spezies F und Q, wobei D_F und D_Q die Diffusionskoeffizienten der Moleküle F bzw. Q sind. Um mit letzterer Gleichung k_{diff} (in $l \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) zu erhalten, werden R_0 in cm und $D_{F,Q}$ in $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ eingesetzt, wobei $N' = N_A/1000$ ($N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) verwendet wird. Der Stoßabstand ergibt sich aus der Summe der Molekülradien (*van-der-Waals-Radien*) von F und Q: $R_0 = R_F + R_Q$. Die Diffusionskoeffizienten D_i (i: F, Q) sind entweder experimentell oder theoretisch durch die *Stokes-Einstein-Gleichung*

$$D_i = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_i} \quad (1.1.5-5)$$

(in $\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$) mit der Lösemittelviskosität η und dem *van-der-Waals-Radius* R_i (in m) bestimmbar, wobei T die Temperatur und k_B die *Boltzmann-Konstante* ($k_B = 1,3806 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) sind.

Unter Vernachlässigung des zeitabhängigen (transienten) Terms erhält man

$$k_{diff} = 4\pi R_0 D_{F,Q} N' \quad (1.1.5-6)$$

(in $l \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) zur Abschätzung der diffusionskontrollierten, bimolekularen Geschwindigkeit.

Für annähernd gleich große Moleküle F und Q ($R \approx R_F \approx R_Q$) ist mit der *Stokes-Einstein*-Gleichung die diffusionskontrollierte, bimolekulare Geschwindigkeit von der Molekülgröße unabhängig:

$$k_{diff} = \frac{8000RT}{3\eta} \quad (1.1.5-7)$$

(in $l \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

Bei Raumtemperatur beträgt die diffusionskontrollierte, bimolekulare Geschwindigkeit in Wasser ($\eta = 1 \text{ mPa s}$) $k_{diff} \approx 6,5 \cdot 10^9 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Da im allgemeinen nicht jeder Stoß zwischen dem Farbstoffmolekül F und dem Molekül Q „reaktiv“ im Sinne der dynamischen Fluoreszenzlöschung bzw. der Bildung eines Grundzustandskomplexes ist, ist die entsprechend beobachtete Geschwindigkeit k_q geringer als k_{diff} . In Gleichung

$$k_q = \gamma k_{diff} \quad (1.1.5-8)$$

gibt γ den Anteil der „reaktiven“ Stöße an.

Die im folgenden beschriebenen Modelle der Fluoreszenzlöschung gelten für den Fall schwacher Anregung, das heißt, nur ein geringer Bruchteil der vorhandenen Farbstoffmoleküle absorbiert das Anregungslicht und gelangt in den angeregten Zustand. Dadurch ändert sich in guter Näherung die Konzentration der Farbstoffmoleküle im Grundzustand nicht.

Es treten durch die Anregung auch Sättigungseffekte auf.

1.1.5.1 Dynamische Löschung

Relaxiert ein angeregtes Farbstoffmolekül F^* strahlungslos aus dem S_1 -Zustand durch einen Stoß mit einem geeigneten Löschmolekül Q, spricht man von dynamischer Fluoreszenzlöschung. In Abbildung 1.1.5.1-1 ist die dynamische Löschung schematisch dargestellt.

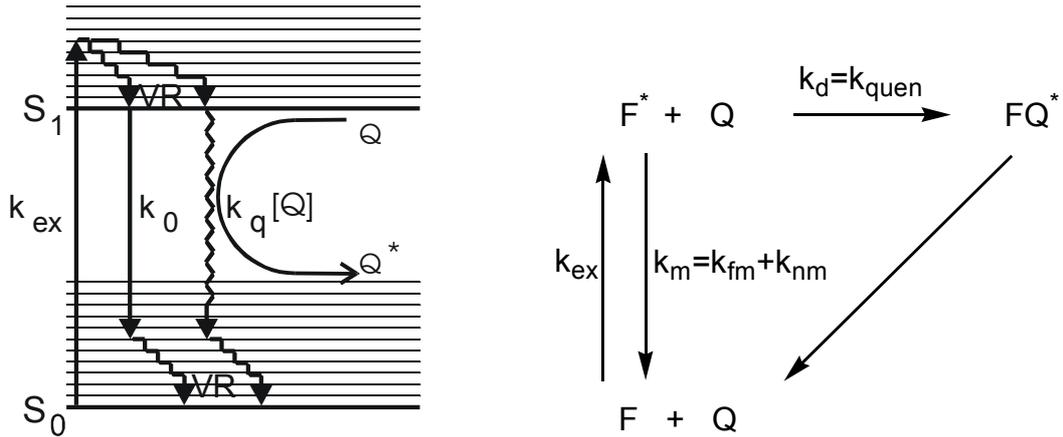


Abbildung 1.1.5.1-1: Vereinfachtes Energieschema und Reaktionsschema der dynamischen Löschung („Stoßlöschung“) eines Fluorophors aus dem ersten elektronisch angeregten Singulett-Zustand S_1 durch ein Löschmolekül Q .

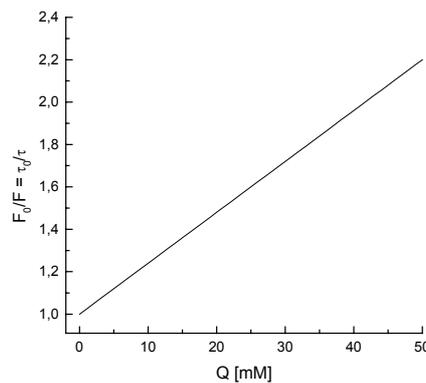


Abbildung 1.1.5.1-2: Dynamische Löschung eines Fluoreszenzfarbstoffes im ersten angeregten Singulett-Zustand S_1 (F^*) durch Löschmoleküle Q . Verlauf von F_0/F und τ_0/τ nach Gleichung 1.1.5.1-14 mit $\tau_0 = 4 \text{ ns}$ und $k_{q,dyn} = 6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Für die Kinetik der Konzentration des S_1 -Zustands $[F^*]$ gilt

$$\frac{d[F^*]}{dt} = -k[F^*] + I_{ex}(t) \quad (1.1.5.1-1)$$

in Abwesenheit bzw.

$$\frac{d[F^*]}{dt} = -(k + k_{q,dyn}[Q])[F^*] + I_{ex}(t) \quad (1.1.5.1-2)$$

in Anwesenheit von Löschmolekülen. k entspricht nach $k = k_f + k_{IC} + k_{ISC}$ (Gl. 1.1.4.1-2) der Fluoreszenzabklinggeschwindigkeit der reinen Farbstofflösung unter sonst gleichen Bedingungen. Die zeitabhängige Anregungsintensität ist durch $I_{ex}(t)$ dargestellt.

Erfolgt die Anregung mit einem δ -Puls ($I_{ex}(t) = I_{ex}(0)$), so liefert die Integration der beiden Gleichungen unter der Nebenbedingung $[F^*(t=0)] = [F_0^*]$ folgende Konzentrations- bzw. Fluoreszenzintensitätsverläufe:

$$[F^*(t)] = [F_0^*] e^{-kt} \quad (1.1.5.1-3)$$

$$I_F(t) = k_F [F^*(t)] = k_F [F_0^*] e^{-kt} \quad (1.1.5.1-4)$$

$$[F^*(t)] = [F_0^*] e^{-(k+k_{q,dyn}[Q])t} \quad (1.1.5.1-5)$$

$$I_F(t) = k_F [F^*(t)] = k_F [F_0^*] e^{-(k+k_{q,dyn}[Q])t} \quad (1.1.5.1-6)$$

Bei Anwesenheit von Löschmolekülen Q relaxiert der S_1 -Zustand neben den in k enthaltenen Prozessen zusätzlich durch Stöße mit der Stoßkonstante $k_{qu} = k_{q,dyn} [Q]$ in den Grundzustand (F). Beim Stoß bildet sich ein Begegnungskomplex FQ^* , der schnell in die Grundzustandsmoleküle zerfällt.

Für das Verhältnis der Fluoreszenzabklinggeschwindigkeiten mit und ohne Löschmolekül folgt:

$$\frac{k + k_{q,dyn}[Q]}{k} = 1 + \tau_0 k_{q,dyn}[Q] = \frac{\tau_0}{\tau} \quad (1.1.5.1-7),$$

mit den Fluoreszenzabklingzeiten $\tau = (k + k_{q,dyn}[Q])^{-1}$ mit Löschmolekül und $\tau = k^{-1}$ ohne Löschmolekül. Mit Hilfe dieser Gleichung kann die Geschwindigkeit der dynamischen Fluoreszenzlöschung $k_{q,dyn}$ aus den bei verschiedenen Löschmolekülkonzentrationen gemessenen Fluoreszenzlebensdauern bestimmt werden. Die Gleichung ist die *Stern-Volmer*-Gleichung für die dynamische Fluoreszenzlöschung (Stoßlöschung). Durch Auftragung von τ_0 / τ gegen $[Q]$ erhält man aus der Geradensteigung, die der *Stern-Volmer*-Konstanten $K_D = \tau_0 k_{q,dyn}$ entspricht, die Geschwindigkeit der dynamischen Fluoreszenzlöschung $k_{q,dyn}$.

Neben der Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer erniedrigt die dynamische Fluoreszenzlöschung die Fluoreszenzintensität I_F und damit die Zählrate beim zeitkorrelierten Einzelphotonenzählen, wie

$$I_F(t) = k_F [F^*(t)] = k_F [F_0^*] e^{-(k+k_{q,dyn}[Q])t} \quad (1.1.5.1-8)$$

veranschaulicht. Unter stationären Bedingungen ($I_{ex}(t) = I_{ex}$, $-d[F^*]/dt = 0$) folgt aus Gleichung 1.1.5.1-1 bzw. 1.1.5.1-2:

$$0 = k[F^*] - I_{ex} \quad (1.1.5.1-9)$$

$$0 = (k + k_{q,dyn}[Q])[F^*] - I_{ex} \quad (1.1.5.1-10)$$

Durch Umformung nach $[F^*]$ und Multiplikation mit der Fluoreszenzgeschwindigkeit k_f erhält man die jeweilige stationäre Fluoreszenzintensität $F = k_f [F^*]$ ohne (F_0) und mit Löschmolekülen (F).

$$F_0 = \frac{I_{ex}}{k} \quad (1.1.5.1-11)$$

$$F = \frac{I_{ex}}{k + k_{q,dyn}[Q]} \quad (1.1.5.1-12)$$

Bei gleicher Anregungsintensität liefert die Division von Gleichung 1.1.5.1-11 mit 1.1.5.1-12 die *Stern-Volmer*-Gleichung (1.1.5.1-13) für den stationären Fall. Für dynamische Löschung ist Gleichung 1.1.5.1-13 identisch mit Gleichung 1.1.5.1-7. Somit kann im Falle rein dynamischer Fluoreszenzlöschung die gleiche Information (dynamische Löschkonstante $k_{q,dyn}$) mittels stationärer bzw. zeitaufgelöster Fluoreszenzexperimente gewonnen werden.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + \tau_0 k_{q,dyn}[Q] = \frac{\tau_0}{\tau} \quad (1.1.5.1-13)$$

1.1.5.2 Statische Löschung

Bei statischer Löschung bildet sich zwischen Farbstoffmolekül F und Löschmolekül Q im Grundzustand ein Komplex FQ aus, der Licht absorbieren kann, aber keinerlei Fluoreszenz zeigt. Abbildung 1.1.5.2-1 zeigt schematisch die statische Löschung. Im Grundzustand befinden sich Komplex FQ-, Farbstoff F- und Löschmoleküle Q im thermodynamischen Gleichgewicht. Die Komplexbildungskonstante (Assoziationskonstante) K_g ist gegeben durch

$$K_g = \frac{[FQ]}{[F][Q]} \quad (1.1.5.2-1)$$

Bei Anwesenheit von Löschmolekülen der Konzentration [Q] reduziert die Komplexbildung die Konzentration des freien, nicht komplexierten Farbstoffs auf $[F] = [F]_0 - [FQ]$, wobei $[F]_0$ die Anfangskonzentration des Farbstoffs ist. Sowohl der Farbstoff als auch der Komplex werden durch Lichtabsorption angeregt, jedoch zeigt nur der Farbstoff Fluoreszenz. Der angeregte Komplex FQ^* zerfällt sehr schnell (instantan) strahlungslos (k_{nc}) in den Grundzustand. Eine Fluoreszenz des angeregten Komplexes ist nicht vorhanden bzw. auf der Zeitskala des Experimentes nicht nachweisbar. Die Grundzustandskomplexierung beeinflusst nicht die Fluoreszenzkinetik des freien Farbstoffs ($\tau_0 / \tau = 1$), die durch $[F^*(t)] = [F_0^*] e^{-kt}$ beschrieben wird. Jedoch ändert sie die stationäre Fluoreszenzintensität.

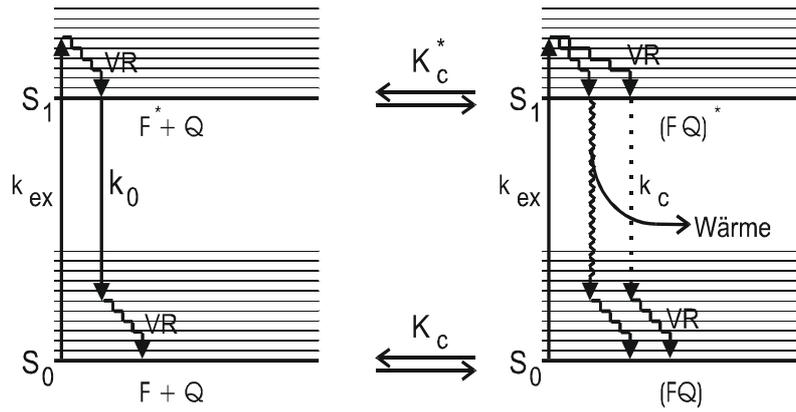


Abbildung 1.1.5.2-1: Vereinfachtes Energieschema der statischen Löschung eines Fluorophors durch Bildung eines Grundzustandskomplexes zwischen Fluorophor und Löschmolekül Q.

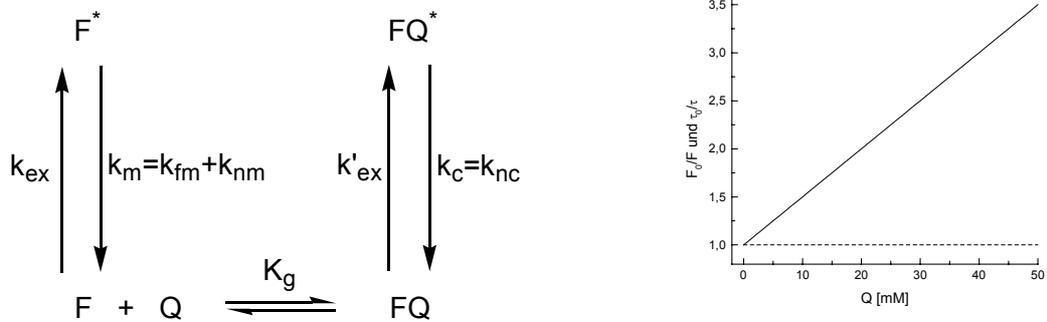


Abbildung 1.1.5.2-2: Statische Löschung eines Fluoreszenzfarbstoffes durch Bildung eines nichtfluoreszierenden Grundzustandskomplex mit einem Löschmolekül Q. Links: Reaktionsschema. Rechts: Verlauf von F_0/F (—) nach Gleichung 1.1.5.2-3 und $\tau_0/\tau = 1$ (- - -) mit $K_S = 50 M^{-1}$.

Aus der Massenbilanz des Farbstoffs $[F]_0 = [F] + [FQ]$ und der Komplexbildungskonstante ergibt sich über

$$K_g = \frac{[F]_0 - [F]}{[F][Q]} \tag{1.1.5.2-2}$$

der folgende Ausdruck für das Konzentrationsverhältnis des nicht komplexierten, fluoreszierenden Farbstoffs unter stationären Bedingungen:

$$\frac{[F]_0}{[F]} = 1 + K_g [Q] \tag{1.1.5.2-3}$$

Da der Komplex nicht fluoresziert, ist die jeweilige stationäre Fluoreszenzintensität der Lösung proportional zur entsprechenden Konzentration des freien Farbstoffs. Man erhält für das Verhältnis der stationären Fluoreszenzintensitäten ohne F_0 und mit Löschmolekülen Q:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_g [Q] = 1 + K_s [Q] \tag{1.1.5.2-4}$$

Die Komplexbildungskonstante K_g kann im Falle rein statischer Löschung durch lineare Auftragung der *Stern-Volmer*-Gleichung (1.1.5.2-3) aus der Geradensteigung erhalten werden. Die statische *Stern-Volmer*-Konstante K_S ist mit der Komplexbildungskonstanten K_G identisch.

1.1.5.3 Kombinierte statische und dynamische Löschung

Häufig wird ein Farbstoff sowohl dynamisch als auch statisch in seiner Fluoreszenz gelöscht. Dies ist in Abbildung 1.1.5.3-1 schematisch dargestellt. Die Komplexbildung eines Teils der ursprünglich vorhandenen Farbstoffmoleküle im Grundzustand durch Löschmoleküle Q nach Gleichung 1.1.5.2-1 reduziert die Zahl der freien, fluoreszenzfähigen Farbstoffmoleküle um den Faktor

$$\alpha = [F] / [F]_0 = (1 + K_g [Q])^{-1} \quad (1.1.5.3-1)$$

(vergleiche Gleichung 1.1.5.2-3).

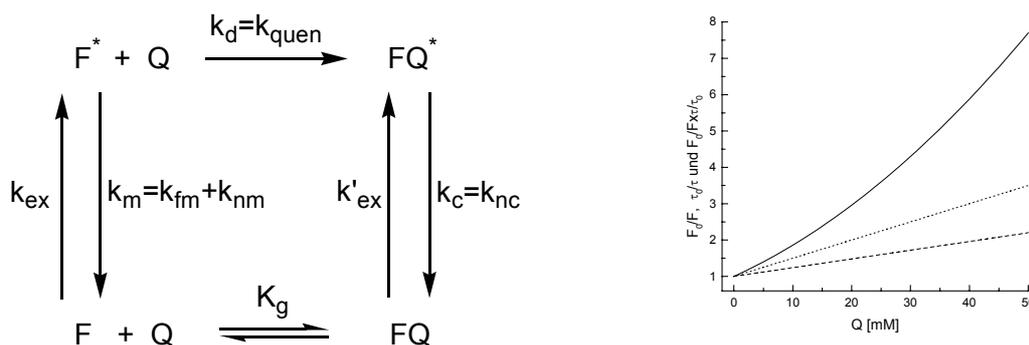


Abbildung 1.1.5.3-1: Statische und dynamische Löschung eines Fluoreszenzfarbstoffes durch Bildung eines nichtfluoreszierenden Grundzustandskomplex mit einem Löschmolekül Q sowie Stoßlöschung des angeregten Farbstoffmoleküls F^* durch Löschmoleküle Q . Links: Reaktionsschema. Rechts: Verlauf von F_0/F (—) nach Gleichung 1.1.5.2-4, τ_0/τ nach Gleichung 1.1.5.1-14 (- - -) und $F_0/Fx \cdot \tau/\tau_0 = 1 + K_S [Q]$ (.....) mit $\tau_0 = 4 \text{ ns}$ und $k_{q,dyn} = 6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $K_S = 50 \text{ M}^{-1}$.

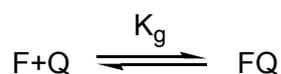
Für eine dynamische Löschung (mit der Geschwindigkeit $k_{quen} = k_{q,dyn} [Q]$) steht eine um den Faktor α geringere Konzentration an Farbstoffmolekülen für die Anregung in den S_1 -Zustand und damit zur Fluoreszenz und deren dynamischer Löschung zur Verfügung (Gleichung 1.1.5.2-4). Für das Verhältnis der stationären Fluoreszenzintensitäten ohne F_0 und mit Löschmolekülen Q gilt somit:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_g [Q]) (1 + \tau_0 k_{q,dyn} [Q]) = (1 + K_g [Q]) \frac{\tau_0}{\tau} \quad (1.1.5.3-2)$$

Im Falle kombinierter statischer und dynamischer Löschung hängt nach Gleichung 1.1.5.3-2 das Verhältnis der stationären Fluoreszenzintensitäten (F_0 / F) quadratisch von der Löschmolekülkonzentration ab, deutlich sichtbar in der zur Ordinate konkaven Abweichen vom linearen Verlauf. Der dynamische Anteil der beobachteten Fluoreszenzlöschung ($\tau_0 / \tau = 1 + \tau_0 k_{q,dyn} [Q]$) kann mit Hilfe von zeitaufgelösten Experimenten bestimmt werden.

1.1.6 Grundzustandskomplexierung

Die Gleichgewichtskonstante K_g des im Grundzustand vorhandenen Gleichgewichts zwischen Farbstoffmolekül F und Löschmolekül Q auf der einen Seite und Farbstoff-Löschmoleküle-Komplex FQ auf der anderen Seite bestimmt man mit einer spektrometrischen Titration. Ausgehend vom Absorptionsspektrum der reinen Farbstofflösung werden die entsprechenden Absorptionsspektren nach definierter Löschmolekül-Zugabe in Abhängigkeit von der jeweiligen Löschmolekül-Konzentration gemessen.



Die Gleichgewichtskonstante K_g ist durch Gleichung 2.3.16 gegeben:

$$K_g = \frac{[FQ]}{[F][Q]} \quad (1.1.5.2-1)$$

Für die Absorption des reinen Farbstoffs $A_0(\lambda)$ mit der Anfangskonzentration $[F]_0$ gilt:

$$A_0(\lambda) = \varepsilon_F(\lambda)[F]_0 d \quad (1.1.6-1).$$

Existiert im gesamten Absorptionsspektrum ein Bereich, bei dem nur der Farbstoff und der Komplex, nicht aber der Löschmoleküle zur Gesamtabsorption $A(\lambda)$ beitragen, gibt Gleichung 1.1.6-2 für diesen Bereich die Gesamtabsorption an. Die von der Löschmolekül-Konzentration abhängigen Absorptionen von Farbstoff $A_F(\lambda) = \varepsilon_F(\lambda) [F] d$ und Komplex $A_{FQ}(\lambda) = \varepsilon_{FQ}(\lambda) [FQ] d$ addieren sich zur Gesamtabsorption $A(\lambda)$.

$$A(\lambda) = \varepsilon_F(\lambda) [F] d + \varepsilon_{FQ}(\lambda) [FQ] d \quad (1.1.6-2)$$

Dabei sind $[F]$ und $[FQ]$ die Gleichgewichtskonzentrationen von Farbstoff und Komplex, die sich nach Gleichung 1.1.5.2-1 einstellen, wenn zu einer reinen Farbstofflösung der Konzentration $[F]_0$ Löschmoleküle entsprechend einer Ausgangskonzentration $[Q]_0$ zugegeben wird. Die zugehörigen Extinktionskoeffizienten sind $\varepsilon_F(\lambda)$ bzw. $\varepsilon_{FQ}(\lambda)$, und die Schichtdicke ist d . Für „kleine“ Gleichgewichtskonstanten kann für $[F]_0 \ll [Q]_0$ angenommen werden, dass sich die

Löschmolekül-Konzentration durch die Komplexbildung nicht ändert. Die Löschmolekül-Konzentration $[Q]$ im Gleichgewicht entspricht somit der Ausgangskonzentration $[Q]_0$ der Löschmoleküle. Das heißt, es gilt $[Q] \approx [Q]_0$. Mit den Gleichungen 1.1.6-1 und 1.1.6-2 folgt für das Verhältnis A / A_0 der Absorptionen der Lösung mit Farbstoff und Löschmolekülen zur reinen Farbstofflösung die Gleichung 1.1.6-3.

$$\frac{A(\lambda)}{A_0(\lambda)} = \frac{\varepsilon_F(\lambda) [F] d + \varepsilon_{FQ}(\lambda) [FQ] d}{\varepsilon_F(\lambda) [F]_0 d} \quad (1.1.6-3)$$

Mit Gleichung 1.1.5.2-1 kann die Konzentration des Komplexes $[FQ]$ ersetzt werden.

$$\frac{A(\lambda)}{A_0(\lambda)} = \frac{[F]}{[F]_0} \left(1 + \frac{\varepsilon_{FQ}(\lambda)}{\varepsilon_F(\lambda)} K_g [Q] \right) \quad (1.1.6-4)$$

Anhand von Gleichung 2.3.16 wird auch das Konzentrationsverhältnis $[F] / [F]_0$ mit $1 / (1 + K_g [Q])$ ersetzt.

$$\frac{A(\lambda)}{A_0(\lambda)} = \frac{1}{1 + K_g [Q]} \left(1 + \frac{\varepsilon_{FQ}(\lambda)}{\varepsilon_F(\lambda)} K_g [Q] \right) \quad (1.1.6-5)$$

Durch Umformen ergibt sich die von *Nash* [Nash 1960] hergeleitete Beziehung (Gleichung 1.1.6-6) für die spektrometrische Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten K_g der oben aufgeführten Gleichgewichtsreaktion.

$$\frac{1}{[Q]} = \left(K_g - \frac{\varepsilon_{FQ}(\lambda)}{\varepsilon_F(\lambda)} K_g \right) \frac{A_0(\lambda)}{A_0(\lambda) - A(\lambda)} - K_g \quad (1.1.6-6)$$

Durch Auftragen von $1 / [Q]$ gegen $A_0(\lambda) / (A_0(\lambda) - A(\lambda))$ erhält man aufgrund der Linearität von Gleichung 1.1.6-6 die Gleichgewichtskonstante K_g direkt aus dem Achsenabschnitt. Somit kann aus der Geradensteigung das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{FQ}(\lambda) / \varepsilon_F(\lambda)$ von Komplex FQ zu Farbstoff F bestimmt werden. Da der Extinktionskoeffizient zumindest bei der Wellenlänge der langwelligsten Absorption bekannt ist, kann dieser aufgrund des Absorptionsspektrums bei jeder Wellenlänge angegeben werden. Mit der Kenntnis des Verhältnisses $\varepsilon_{FQ}(\lambda) / \varepsilon_F(\lambda)$ kann das Absorptionsspektrum des Komplexes $A_{FQ}(\lambda)$ berechnet werden. Die Kombination der Gleichungen 1.1.6-2 und 1.1.5.2-1 liefert die Absorption des Komplexes $A_{FQ}(\lambda)$ im Gleichgewicht.

$$A_{FQ}(\lambda) = A(\lambda) - \frac{A_0(\lambda)}{1 + K_g [Q]} = \varepsilon_{FQ}(\lambda) [FQ] d \quad (1.1.6-7)$$

Bei bekanntem Absorptionsspektrum der reinen Farbstofflösung lässt sich durch Messung der Gleichgewichtskonstanten der Grundzustandskomplexierung des Farbstoffs F durch die Löschmoleküle Q das Absorptionsspektrum des Komplexes FQ ermitteln.

1.1.7 Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer

Die nach Ankopplung an Tryptophan-haltige Peptide oder durch Zugabe von Tryptophan beobachtete Fluoreszenzlöschung wird einer Elektronentransferreaktion zugeschrieben. Die Thermodynamik stützt das Modell des Elektronentransfers zwischen Tryptophan und angeregten Farbstoffmolekülen.

Dieser Abschnitt skizziert die thermodynamischen und die kinetischen Aspekte des photoinduzierten Elektronentransfers.

1.1.7.1 Thermodynamik des photoinduzierten Elektronentransfers

Beim photoinduzierten Elektronentransfer findet die Elektronentransferreaktion (Redoxreaktion) intermolekular zwischen zwei Molekülen oder intramolekular zwischen zwei Teilmolekülen statt, wobei eines zuvor durch Absorption von Licht in den ersten angeregten Zustand überführt wurde, während sich das andere im Grundzustand befindet. Ein im S_1 -Zustand befindliches Molekül besitzt im Vergleich zu seinem Grundzustand neben spektroskopischen Unterschieden veränderte Redox-eigenschaften und kann über einen Elektronentransfer strahlungslos in einen anderen Zustand reagieren. Die veränderten Redox-eigenschaften sind in Abbildung 1.1.7.1-1 schematisch dargestellt.

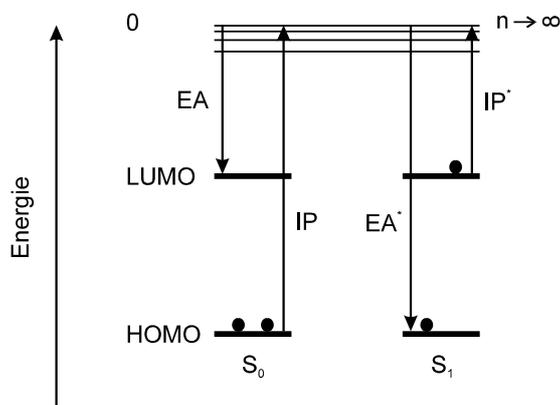


Abbildung 1.1.7.1-1: Vergleich der Redox-eigenschaften eines Moleküls im Grundzustand S_0 und im ersten angeregten Zustand S_1 .

Die Lichtabsorption hebt ein Elektron aus dem HOMO (höchstes besetztes Molekül-orbital) in das LUMO (niedrigstes unbesetztes Molekül-orbital) an. Das Molekül befindet sich nun im ersten angeregten Zustand S_1 . Die im Grundzustand als HOMO und LUMO bezeichneten Molekül-orbitale sind nach der Anregung jeweils mit einem Elektron besetzt. Dadurch wird bei der Anlagerung eines Elektrons aus unendlicher

Entfernung mehr Energie frei als beim entsprechenden Prozess im Grundzustand. Für die Elektronenaffinitäten im S_0 - und S_1 -Zustand gilt $EA > EA^*$, wobei $EA, EA^* < 0$ sind. Die Ionisierung, das heißt die Entfernung eines Elektrons, erfordert wie in Abbildung 1.1.7.1-1 dargestellt im S_1 -Zustand eine geringere Energie als im Grundzustand ($IP > IP^*$). Ein Molekül im S_1 -Zustand wird somit um die Energiedifferenz $E_{0,0}$ zwischen $S_0(v=0)$ - und $S_1(v=0)$ -Zustand sowohl leichter reduziert als auch oxidiert. Die Übergangsenergie $E_{0,0}$ ist der Mittelwert aus der Photonenenergie des langwelligsten Absorptionsmaximums und des kurzwelligsten Emissionsmaximums [Grabowski 1976]. Für die Redoxpotentiale des angeregten Farbstoffes gilt:

$$E_{Ox}^0 = E^0(F^+ / F^*) = E^0(F^+ / F) - E_{0,0} \quad (1.1.7.1-1)$$

$$E_{Red}^0 = E^0(F^* / F^-) = E^0(F / F^-) + E_{0,0} \quad (1.1.7.1-2)$$

Der Ablauf einer Redoxreaktion hängt von den Redoxeigenschaften der Reaktionspartner ab. Wie in Abbildung 1.1.7.1-2 dargestellt, oxidiert ein Akzeptor-Molekül A ein angeregtes Farbstoffmolekül F^* , während ein Donormolekül D es reduziert.

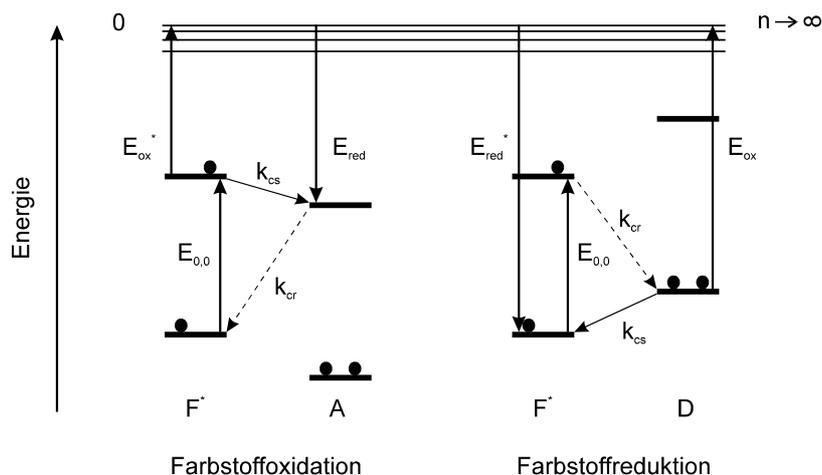


Abbildung 1.1.7.1-2: Energieschema für den photoinduzierten Elektronentransfer zwischen einem angeregten Farbstoffmolekül F^* und einem Akzeptor-Molekül A bzw. einem Donormolekül D.

Der Ablauf der Elektronentransferreaktion hängt von der Freien Reaktionsenthalpie der Ladungstrennung (charge separation) ΔG_{cs}^0 ab. In der Gasphase bestimmt die Elektronenaffinität und die Ionisierungsenergie des Donor-Akzeptor-Paares ΔG_{cs}^0 . Beim photoinduzierten Elektronentransfer verändert die Übergangsenergie $E_{0,0}$ des angeregten Moleküls ΔG_{cs}^0 zusätzlich. In Lösung müssen statt der Ionisierungsenergie und der Elektronenaffinität entsprechend die elektrochemischen Oxidations- und Reduktionspotentiale, welche die Solvatationsterme ($\Delta G_{D^+}^0, \Delta G_{A^-}^0$) der

entstandenen Ionen (D^+ , A^-) enthalten, verwendet werden [Julliard 1983] [Chanon 1988] [Tanner 1989] [Kavarnos 1993].

$$IP = E^0(D^+ / D) - \Delta G_{D^+}^0 + const. \quad (1.1.7.1-3)$$

$$EA = E^0(A / A^-) + \Delta G_{A^-}^0 + const. \quad (1.1.7.1-4)$$

Die Freie Reaktionsenthalpie der Ladungstrennung ΔG_{cs}^0 nach der Farbstoffanregung kann mit der *Rehm-Weller*-Gleichung (1.1.7.1-5) berechnet werden [Rehm 1969]. Für $\Delta G_{cs} < 0$ läuft die Reaktion spontan ab.

$$\Delta G_{cs}^0 = E_{Ox}^0 - E_{Red}^0 - E_{0,0} + \Delta G_{solv}^0 \quad (1.1.7.1-5)$$

Für eine Farbstoffoxidation ist $E_{Ox}^0 = E^0(F^+ / F)$ und $E_{Red}^0 = E^0(A / A^-)$.

Für eine Farbstoffreduktion ist $E_{Ox}^0 = E^0(D^+ / D)$ und $E_{Red}^0 = E^0(F / F^-)$.

Der Term ΔG_{solv}^0 beinhaltet das *Coulomb*-Potential zwischen D^+ und A^- sowie Korrekturen bezüglich der Lösemittelpolarität, falls die Redoxpotentiale nicht im gleichen Lösemittel bestimmt wurden, in dem ΔG_{cs}^0 des photoinduzierten Elektronentransfer berechnet werden soll [Weller 1982].

1.1.7.2 Kinetische Aspekte des photoinduzierten Elektronentransfers

Intermolekularer Fall

Die kinetischen Aspekte des intermolekularen photoinduzierten Elektronentransfer zwischen einem angeregtem Akzeptor-Molekül A^* und einem Donormolekül D sind in Abbildung 1.1.7.2-1 schematisch dargestellt.

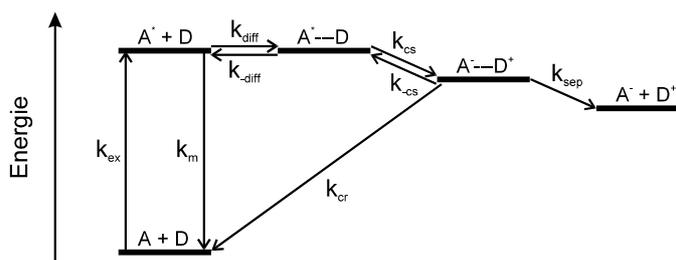


Abbildung 1.1.7.1-2: Energieschema für den intermolekularen photoinduzierten Elektronentransfer zwischen einem angeregtem Akzeptor-Molekül A^* und einem Donormolekül D .

Mit der farbstoffeigenen (vergleiche Abbildung 1.1.5.1-2), unimolekularen Relaxation k_m des S_1 -Zustands konkurriert die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante k_q der Stoßlöschung des angeregten Farbstoffs A^* durch Löschmoleküle D . Hierzu müssen die Stoßpartner A^* und D über Diffusion zu einem Begegnungskomplex $A^* \cdots D$ innerhalb eines Solvenskäfigs zusammentreffen. Der Zentren-

abstand der Moleküle innerhalb diese Komplexes beträgt typischerweise ca. 7 Å entsprechend dem Kontaktabstand sphärischer Moleküle mit einem Radius von 3...4 Å. Planare Moleküle können bedingt durch ihre Geometrie einen kürzeren Abstand zueinander einnehmen. Während der Lebensdauer des Begegnungskomplexes $A^* \cdots D$ von ca. $10^{-9} \dots 10^{-10}$ s ereignen sich zahlreiche Stöße zwischen den beiden Molekülen A^* und D , die reaktiv oder dissoziativ sein können [Kavarnos 1993].

Die für die Stoßlöschung erforderliche Begegnung erfolgt bimolekular aufgrund der Diffusion beider Moleküle mit der Geschwindigkeit k_{diff} . Der entstandene Begegnungskomplex $A^* \cdots D$ kann nun wieder in seine Vorläufermoleküle A^* und D mit der Dissoziationskonstante k_{-diff} zerfallen, oder es findet innerhalb des Begegnungskomplexes ein Elektronentransfer zu einem ladungstrennten Komplex $A^- \cdots D^+$ mit der Geschwindigkeit k_{cs} statt. Im Falle von Abbildung 1.1.7.1-2 ist das Löschmolekül der Elektronendonator und das angeregte Farbstoffmolekül der Elektronenakzeptor. Der Komplex $A^- \cdots D^+$ kann bezüglich der Ladungstrennung mit der Geschwindigkeit k_{cr} in den Grundzustand rekombinieren (charge recombination) oder in die getrennten Ionen $A^- + D^+$ mit der Geschwindigkeit k_{sep} dissoziieren.

Die Kinetik des S_1 -Zustands des Farbstoffs beschreibt Gleichung 1.1.7.2-1.

$$-\frac{d[A^*(t)]}{dt} = k_m[A^*(t)] + k_{diff}[D][A^*(t)] - k_{-diff}[A^* \cdots D(t)] - I_{ex}(t) \quad (1.1.7.2-1)$$

Mit der Annahme der Quasistationarität für den Begegnungskomplex $A^* \cdots D$ und den ladungstrennten Komplex $A^- \cdots D^+$ folgt eine Löschgeschwindigkeit k_q (Gleichung 1.1.7.2-3), für die Gleichung 1.1.7.2-1 in 1.1.7.2-2 umgeschrieben werden kann.

$$-\frac{d[A^*(t)]}{dt} = k_m[A^*(t)] + k_q[D][A^*(t)] - I_{ex}(t) \quad (1.1.7.2-2)$$

$$k_q = \frac{k_{diff}}{1 + \frac{k_{-diff}}{k_{cs}} \left(1 + \frac{k_{-cs}}{k_{sep} + k_{cr}} \right)} \quad (1.1.7.2-3)$$

Die dem Geschwindigkeitskoeffizienten der *Stern-Volmer*-Gleichung (1.1.5.1-14) der dynamischen Fluoreszenzlöschung entsprechende Löschgeschwindigkeit k_q gibt lediglich an, wie schnell das angeregte Farbstoffmolekül A^* gelöscht wird. Sie kann jedoch im Hinblick auf den Mechanismus der Reaktion eine unterschiedliche Bedeutung haben [Becker 1991]. Aufgrund der Geschwindigkeit photochemischer Reaktionen muss die Diffusion der beteiligten Moleküle zum Begegnungskomplex im Mechanismus und damit in der Löschgeschwindigkeit einbezogen sein, da die eigentliche Löschung innerhalb des Begegnungskomplexes erfolgt (vergleiche Gleichung 1.1.7.2-3).

Verläuft der Elektronenrücktransfer k_{-cs} langsamer als die Ladungsrekombination k_{cr} bzw. die Dissoziation k_{sep} in $A^- + D^+$, vereinfacht sich Gleichung 1.1.7.2-3 mit $k_{-cs} \ll k_{cr}, k_{sep}$ zu

$$k_q = \frac{k_{diff} k_{cs}}{k_{-diff} + k_{cs}} \quad (1.1.7.2-4)$$

Für Gleichung 1.1.7.2-4 lassen sich zwei extreme Fälle bezüglich der Geschwindigkeitskonstanten k_{cr} und k_{diff} unterscheiden.

$$k_q = \frac{k_{diff} k_{cs}}{k_{-diff}} = K_{eq} k_{cs} \quad (1.1.7.2-5)$$

für $k_{cs} \ll k_{-diff}$.

$$k_q = k_{diff} \quad (1.1.7.2-6)$$

für $k_{cs} \gg k_{-diff}$.

Im ersten Fall hängt die bimolekulare Löschgeschwindigkeit k_q im wesentlichen von der Elektronentransfergeschwindigkeit k_{cs} ab (Gleichung 1.1.7.2-5). Die Gleichgewichtskonstante $K_{eq} = k_{diff} / k_{-diff}$ beschreibt nur das der Elektronentransferreaktion vorgelagerte schnelle Gleichgewicht der Moleküle A^* und D zum Begegnungskomplex $A^* \cdots D$. Geschwindigkeitsbestimmend ist allein der Elektronentransferschritt mit der Geschwindigkeit k_{cs} . Die Löschreaktion verläuft reaktionskontrolliert. Die Geschwindigkeit ($K_{eq} k_{cs}$) kann aus der experimentell bestimmten bimolekularen Löschgeschwindigkeit $k_{q,dyn}$ der *Stern-Volmer*-Gleichung (1.1.5.1-14) und der nach Gleichung 1.1.5-6 oder 1.1.5-7 bestimmten Diffusionsgeschwindigkeit k_{diff} berechnet werden, da mit Gleichung 1.1.7.2-4 und 1.1.5.1-14 folgt:

$$\frac{1}{k_{q,dyn}} = \frac{1}{k_q} = \frac{1}{k_{diff}} + \frac{1}{K_{eq} k_{cs}} \quad (1.1.7.2-7)$$

Im zweiten Fall verläuft die Löschreaktion diffusionskontrolliert. Die Löschgeschwindigkeit k_q entspricht der Diffusionsgeschwindigkeit k_{diff} , da der Elektronentransferschritt innerhalb des Begegnungskomplexes sehr viel schneller ist als seine Dissoziation in A^* und D . Die Diffusionsgeschwindigkeit geben die Gleichungen 1.1.5-6 und 1.1.5-7 an.

Intramolekularer Fall

Löscht ein photoinduzierter Elektronentransfer an einem intramolekularen System $A \cdots D$ die Fluoreszenz, so muss das in Abbildung 1.1.7.1-2 dargestellte Reaktionsschema modifiziert werden. Im Falle eines starren Systems $A \cdots D$ entfällt der Diffusionsschritt zwischen Akzeptor und Donor. Es kann kein Begegnungskomplex,

wie im intermolekularen Fall, gebildet werden. Dieser Fall ist in Abbildung 1.1.7.2-2 schematisch dargestellt.

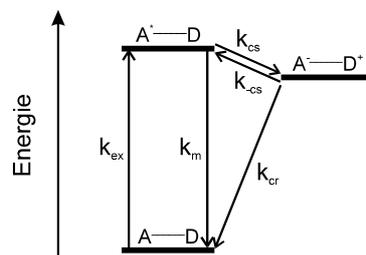


Abbildung 1.1.7.2-2: Energieschema für den intramolekularen photoinduzierten Elektronentransfer in einem starren Akzeptor-Donor-System A---D, wobei der Akzeptor durch Lichtabsorption angeregt wird.

Sind dagegen Akzeptor und Donor miteinander flexibel verbrückt, können sich beide einander über Konformationsänderungen nähern. Die Geschwindigkeitskonstanten k_{diff} und $k_{-\text{diff}}$ sind deshalb im Reaktionsschema der Abbildung 1.1.7.2-1 durch die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten k_{kon} und $k_{-\text{kon}}$ der Konformationsänderungen zwischen den Extremkonformationen der getrennten A—D und der angenäherten, wechselwirkenden Konformation A-D zu ersetzen (vergleiche Abbildung 1.1.7.2-3).

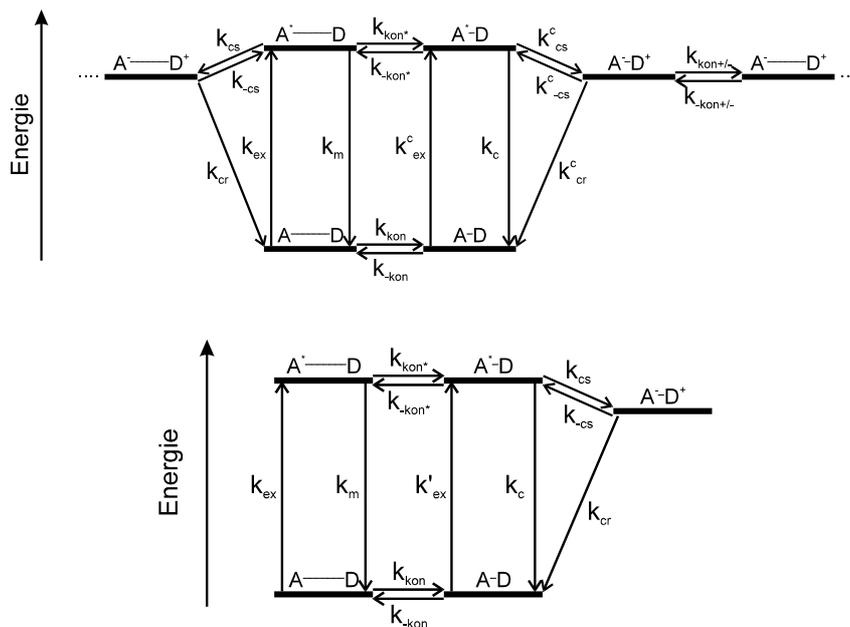


Abbildung 1.1.7.2-3: Energieschema für den intramolekularen, photoinduzierten Elektronentransfer in einem flexiblen Akzeptor-Donor-System A---D, wobei der Akzeptor durch Lichtabsorption angeregt wird. Oben: allgemeiner Fall zweier sowohl im S₀- als auch im S₁-Zustand ineinander umwandelbarer Konformere. Im angeregten Zustand S₁ zeigen beide Konformere Fluoreszenz, die jeweils durch Elektronentransfer gelöscht werden kann. Auch die jeweils aus dem Elektronentransfer entstandenen ladungstrennten Konformere können sich ineinander umwandeln. Unten: vereinfachter Fall, bei dem innerhalb des Konformers mit dem größeren Donor-Akzeptor-Abstand kein Elektronentransfer stattfindet. Weiterhin zerfällt der ladungstrennte Zustand schnell, so dass keine weitere Separierung der Ladungen aufgrund einer Konformationsumwandlung erfolgen kann.

Für die Kinetik des S₁-Zustands der getrennten Konformation A—D gilt analog zu Gleichung 1.1.7.2-1:

$$\frac{d[A^* \text{---} D(t)]}{dt} = -k_m[A^* \text{---} D(t)] - k_{kon^*}[A^* \text{---} D(t)] + k_{-kon^*}[A^* - D(t)] + I_{ex}(t) \tag{1.1.7.2-8}$$

Elektronentransfer-Geschwindigkeit

Die Elektronentransfer-Geschwindigkeit k_{cs} lässt sich in geschwindigkeitsbestimmende Schritte der Kern- und der elektronischen Faktoren zerlegen. Erstere beinhalten die Kernbewegung, letztere die elektronischen Wechselwirkungen zwischen Donor und Akzeptor des Elektronentransfers. Beide Faktoren sind für k_{cs} geschwindigkeitsbestimmend. Gleichung 1.1.7.2-9 beschreibt die Geschwindigkeit des Elektronentransfers als Produkt aus der Frequenz der Kernschwingungen ν_n , des elektronischen κ_e und des vibratorischen Transferkoeffizienten κ_n .

$$k_{cs} = \nu_n \kappa_n \kappa_e \tag{1.1.7.2-9}$$

Die Frequenz der Kernschwingungen ν_n beträgt ca. $10^{-12} \dots 10^{-14} \text{ s}^{-1}$. Die Transferkoeffizienten κ_e und κ_n sind dimensionslos und liegen zwischen Null und Eins [Ebersson 1982] [Kavarnos 1993]. Nach der klassischen Theorie des Elektronentransfers [Marcus 1956] können in Lösung elektronische Barrieren vernachlässigt werden, und es ist $\kappa_e = 1$. Der quantenmechanische Ansatz berücksichtigt elektronische Barrieren ($\kappa < 1$). Nach der *Marcus*-Theorie wird der Kernfaktor κ_n in Form von Gleichung 1.1.7.2-10 angegeben.

$$\kappa_n = e^{\left(\frac{\Delta G_{cs}^*}{RT}\right)} \quad (1.1.7.2-10)$$

Mit der Freien Enthalpie der Aktivierung der Elektronentransferreaktion ΔG_{cs}^* folgt Gleichung 1.1.7.2-11 für die Elektronentransfargeschwindigkeit k_{cs} nach der klassischen Theorie von *Marcus*.

$$k_{cs} = \nu_n e^{\left(\frac{\Delta G_{cs}^*}{RT}\right)} \quad (1.1.7.2-11)$$

Eine umfangreiche Abhandlung zum intramolekularen Energietransfer zwischen zwei Farbstoffsystemen findet man in einem Übersichtsartikel von *Speiser* [Speiser 1996].

1.1.8 Farbstoffdimere

Wörz und Scheibe [Wörz 1969] untersuchten Farbstoff der Trimethincyanin-Reihe. Sie fanden, dass nur all-trans-Isomere dimerisieren, cis-Isomere nicht.

Sie versuchten eine Einteilung der Aggregationstendenz aufgrund der Farbstoffbeweglichkeit:

- „loose“: Torsionen und Schwingungen erfolgen leicht. Deshalb findet man schlechtes Aggregationsverhalten.
- „compact“: Gibt es Verzahnungen verschiedener Gruppen eines Moleküls, findet man sehr hohe Aggregationstendenz.
- „crowded“: Große Substituenten im Farbstoffmolekül machen eine ebene Struktur unmöglich. Das führt zur Behinderung des Aneinanderlegens der Moleküle. Dadurch findet man sehr schlechte Aggregationstendenz.

Auch hydrophobe Wechselwirkungen haben Einfluss auf die innere Beweglichkeit und somit auf die Aggregationstendenz.

Während der Annäherung der Farbstoffe bei der Aggregation kommt es zur Aufspaltung des ersten angeregten Zustands (*Davidov*-Aufspaltung). Dimerisierung führt zur Aufspaltung in einen längerwelligen und einen kürzerwelligen Term. Aus Symmetriegründen ist nur der kürzerwellige Term in Absorptionsspektren sichtbar (D-Bande). Zusätzliche Substituenten führen zu einer Symmetriestörung, wodurch (vor allem bei tiefen Temperaturen) der langwellige Übergang schwach erkennbar wird. Bei weiterer Aggregation kommt es zur Aufspaltung des ersten angeregten Zustands in ein breites Band. Wenn die Symmetrie erhalten bleibt, nennt man es H-Bande. Der Übergang zur kurzwelligen Seite ist erlaubt, zur langwelligen Seite fällt das Übergangsmoment ab. Durch elektrostatische oder sterische Einflüsse erhält man beliebige unsymmetrische Strukturen, wodurch der Übergang zur langwelligen Seite des Bandes erlaubt wird. Die resultierende, schmale, langwellige Absorptionsbande nennt man J-Bande.

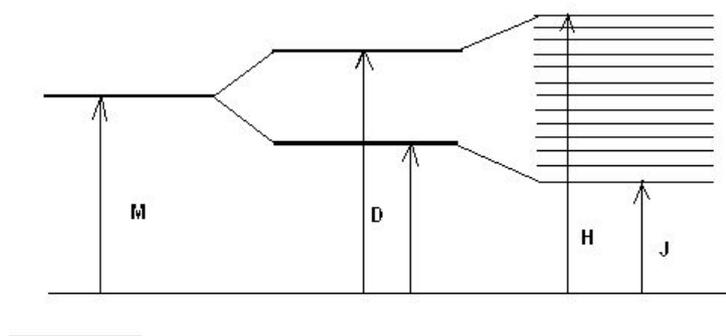


Abbildung 1.1.8-1: Schema der Term aufspaltung und Übergänge bei Farbstoffdimeren-Bildung nach Wörz & Scheibe. (M: Monomer; D: Dimerenband mit λ_{kurz} neben: λ_{lang} (bei tiefen Temperaturen); H: H-Aggregat mit λ_{kurz} (Symmetriefall); J: J-Aggregat mit $\lambda_{kurz,schmal}$ (unsymmetrischer Fall))

Durch Verzerrung der monomolekularen Schicht (senkrechte Moleküle) bilden sich J-Aggregate. Diese J-Aggregate haben in Lösung wohl Helix-Struktur. H-Aggregate liegen parallel und nicht verschoben, meist nur in Lösung vor. H-Aggregate bilden sich aus Lösung auf Oberflächen und können sich in J-Aggregate umwandeln. Teilweise findet man eine niedermolekulare Schicht von waagerechten H-Aggregaten. Die Absorptionswellenlänge λ_H wird größer durch abnehmende Aggregation, Dimeren- und Trimerenbildung.

In den H-Aggregaten liegen die Farbstoffe parallel, direkt nebeneinander; das Absorptionsmaximum liegt bei kürzeren Wellenlängen (Rot-Verschiebung), die Fluoreszenz ist vollständig gelöscht. In J-Aggregaten liegen die Moleküle parallel,

verschoben (treppenförmig) nebeneinander; die Absorptionsmaxima sind zu höheren Wellenlängen verschoben (Blau-Verschiebung).

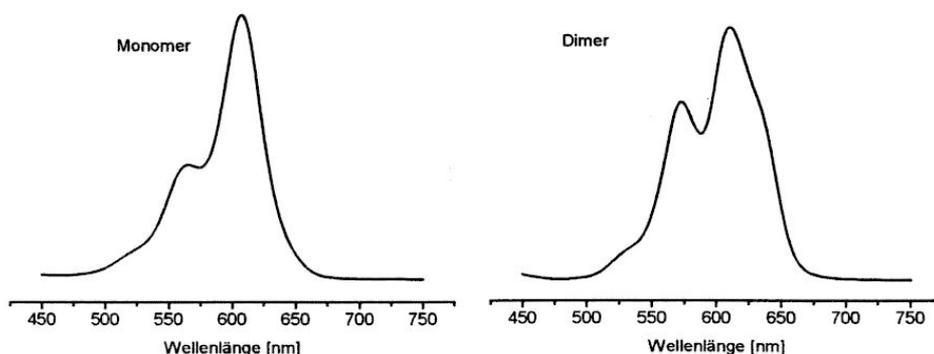


Abbildung 1.1.8-2: Beispiel von Mono- und Dimerenspektren des Rhodamin-Farbstoffs JA133 in Lösung.

Bei unterschiedlichen Farbstoffspezies müssen zusätzlich photoinduzierte Elektronentransfermechanismen in Betracht gezogen werden [Lieberwirth 1997].

Arbeloa et al. beschreiben die Dimerisierung von neutralen und kationischen Formen von Rhodamin B [Arbeloa 1982].

1.1.9 FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer)

Die Gleichungen für den resonanten Energietransfer wurden bereits 1948 von Förster entwickelt [Förster 1948]. Diese Energieübertragung ist strahlungslos und beruht auf einer weitreichenden Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Die Messung der Geschwindigkeiten dieser Energieübertragung stellt ein Mittel zur Bestimmung molekularer Distanzen (zwischen Akzeptor und Donor) im Bereich von 1...10 nm bzw. 10...100 Å dar.

Der Formalismus nach Förster basiert auf der Annahme, dass Akzeptor und Donor bezüglich der Zeitskala der Lebensdauer des angeregten Zustands als stationär angesehen werden können. Dadurch ist der Abstand zwischen Akzeptor und Donor konstant und muss nicht als Variable mit einbezogen werden. Ein weiterer Punkt ist, dass der Übergang unter Erhaltung der Gesamtenergie vonstatten geht. Das bedeutet, dass die Energie des angeregten elektronischen Zustands des Akzeptor-Moleküls gleich oder kleiner als die Energie des angeregten elektronischen Zustands des Donor-Moleküls sein muss. Die nach dem Übergang überschüssige elektronische Energie wird zum Beispiel in Form von Schwingungsenergie abgebaut.

Der Resonanzprozess steht in Konkurrenz mit anderen Deaktivierungsprozessen des angeregten Zustands des Donors, einschließlich der Fluoreszenz. Die Geschwindigkeit für den Resonanzprozess ergibt sich unter der Voraussetzung, dass die Wechselwirkung zwischen Akzeptor und Donor rein dipolar ist und dass eine Überlappung zwischen elektronischen Wellenfunktionen des Akzeptors und Donors ausgeschlossen werden kann, nach Förster zu:

$$k_T = \frac{9(\ln 10)\kappa^2 Q_d J}{128\pi^5 n^4 N_A \tau_d R^6} \quad (1.1.9-1)$$

Hierbei ist κ^2 der Orientierungsfaktor für Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, der vom Winkel zwischen dem Dipolmoment von Akzeptor und Donor bestimmt wird, Q_d die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors bei Abwesenheit des Akzeptors, n der Brechungsindex des Mediums zwischen Akzeptor und Donor, N_A die Avogadro-Zahl, τ_d die Fluoreszenzlebensdauer des Donor bei Abwesenheit des Akzeptors, R der Abstand zwischen Akzeptor und Donor und J das normalisierte Überlappungsintegral, das folgendermaßen definiert ist:

$$J = \frac{\int F_d(\lambda) \varepsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int F_d(\lambda) d\lambda} \quad (1.1.9-2)$$

Hier ist $F_d(\lambda)$ die Fluoreszenzintensität des Donor unter Abwesenheit des Akzeptors bei der Wellenlänge λ , und $\varepsilon_a(\lambda)$ ist der molare Absorptionskoeffizient des Akzeptors bei der Wellenlänge λ . Gleichung 1.1.9-1 ist unabhängig davon gültig, ob Donor und Akzeptor identisch sind und ob die Spektren dieser Moleküle Schwingungsstrukturen aufweisen. Gleichung 1.1.9-2 repräsentiert die Überlappung des Emissionsspektrums des Donor mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors, modifiziert mit λ^4 .

Eine alternative Gleichung zur Bestimmung der Geschwindigkeit des Resonanz-Energietransfers ist:

$$k_T = \left(\frac{1}{\tau_d} \right) \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (1.1.9-3)$$

R_0 ist hier der Förster-Abstand, bei dem 50% der Anregungsenergie auf den Akzeptor übertragen wird. Beim Abstand R_0 ist die Wahrscheinlichkeit für eine Deaktivierung des Donor durch FRET gleich der Wahrscheinlichkeit für eine Deaktivierung des Donor durch einen anderen Prozess, der auch in Abwesenheit des Akzeptor stattfinden könnte.

Eine weitere Größe, die Verwendung findet, ist die Effizienz der Energieübertragung E . Diese wird wie folgt definiert:

$$E = \frac{k_T}{k_T + k_f + k'} \quad (1.1.9-4)$$

k_f ist die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz und k' die Summe der Geschwindigkeitskonstanten aller anderen Deaktivierungsprozesse. Aus Gleichung 1.1.9-3 und 1.1.9-4 ergibt sich auch eine Abhängigkeit von E vom Förster-Abstand und dem tatsächliche Abstand zwischen Akzeptor und Donor:

$$E = \frac{R_0^6}{(R_0^6 + R^6)} \quad (1.1.9-5)$$

Wichtig zur Berechnungen von FRET ist auch der Orientierungsfaktor κ^2 . Dieser lässt sich bei feststehender Orientierung nach folgender Formel berechnen:

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_d \cos\theta_a)^2 \quad (1.1.9-6)$$

Hierbei ist θ_T der Winkel zwischen dem Emissionsdipol des Donor und dem Absorptionsdipol des Akzeptor, θ_d und θ_a sind jeweils die Winkel zwischen dem Verbindungsvektor zwischen Donor und Akzeptor sowie dem Vektor des Emissions- bzw. Absorptionsdipols.

Nehmen Akzeptor und Donor während der Lebensdauer des angeregten Zustands alle möglichen Orientierungen ein (freie Beweglichkeit), so ergibt sich ein Wert für κ^2 von $2/3$ [Förster 1948].

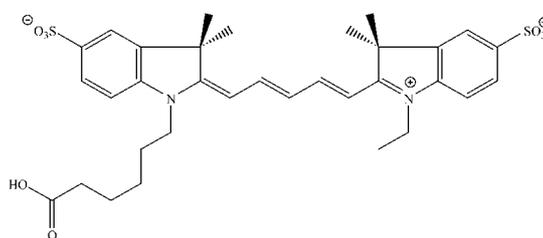
1.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Ausgegangen wurde in der Entwicklung von Rhodamin-Farbstoffen (wie Rhodamin 6G oder Rhodamin B), deren o-Carboxyphenyl-Gruppe nahezu senkrecht zur Ebene des Chromophorgerüsts steht [Arden 1989] [Arden 1991] [Arden-Jacob 1992] [Arden-Jacob 1997] [Drexhage 1973] [Sauer 1993] [Sauer 1993 a] [Sauer 1995] [Sauer 1995 a]. Durch Austausch dieser Gruppe durch Phenylsubstituenten mit kleinen Atomen (Wasserstoff, Fluor) in Ortho-Position entstehen die Rosamine, deren Phenyl-Ring sich nach elektronischer Anregung nahezu coplanar zum Chromophorgerüst stellen kann. Dadurch ist eine günstigere Überlappung der Molekülorbitale von Phenylring und Chromophorgerüst (Elektronen-Delokalisierung) möglich, wodurch Ladung ausgetauscht werden kann. Dadurch resultiert dann ein tieferliegender Charge-transfer-Zustand. Von da aus erfolgt strahlungslose Deaktivierung in den Grundzustand, wodurch sowohl die Fluoreszenzlebensdauer als auch die Quantenausbeute reduziert werden. Die Geschwindigkeit dieser Deaktivierung wird durch die Donor/Akzeptor-Stärke der Phenylsubstituenten gesteuert.

Die Rosamine haben gleiche Absorptions- und Emissionsmaxima wie die Rhodamine, aber reduzierte Fluoreszenzlebensdauern und –quantenausbeuten. Durch Steuerung oben genannter Faktoren lassen sich die Verweilzeiten der Farbstoffe im ersten angeregten Zustand steuern.

Bei Verwendung genügend langwellig absorbierender Farbstoffe kann man zur Anregung kostengünstige Dioden-Laser verwenden, mit denen sich die Rhodamin- und Oxazin-Derivate im roten Bereich des Spektrums [Sauer 1993] anregen lassen.

Mit Extinktionskoeffizienten um $\epsilon = 10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, ihrer planaren Struktur und Rigidität sowie ihrem Absorptionsbereich bei Wellenlängen von Dioden-Lasern eignen sich Oxazin-, Rhodamin-, Rosamin-, Pyronin- und Polymethin- (Carbo-cyanin-) Farbstoffe besonders als Fluoreszenzfarbstoffe.



Cy5

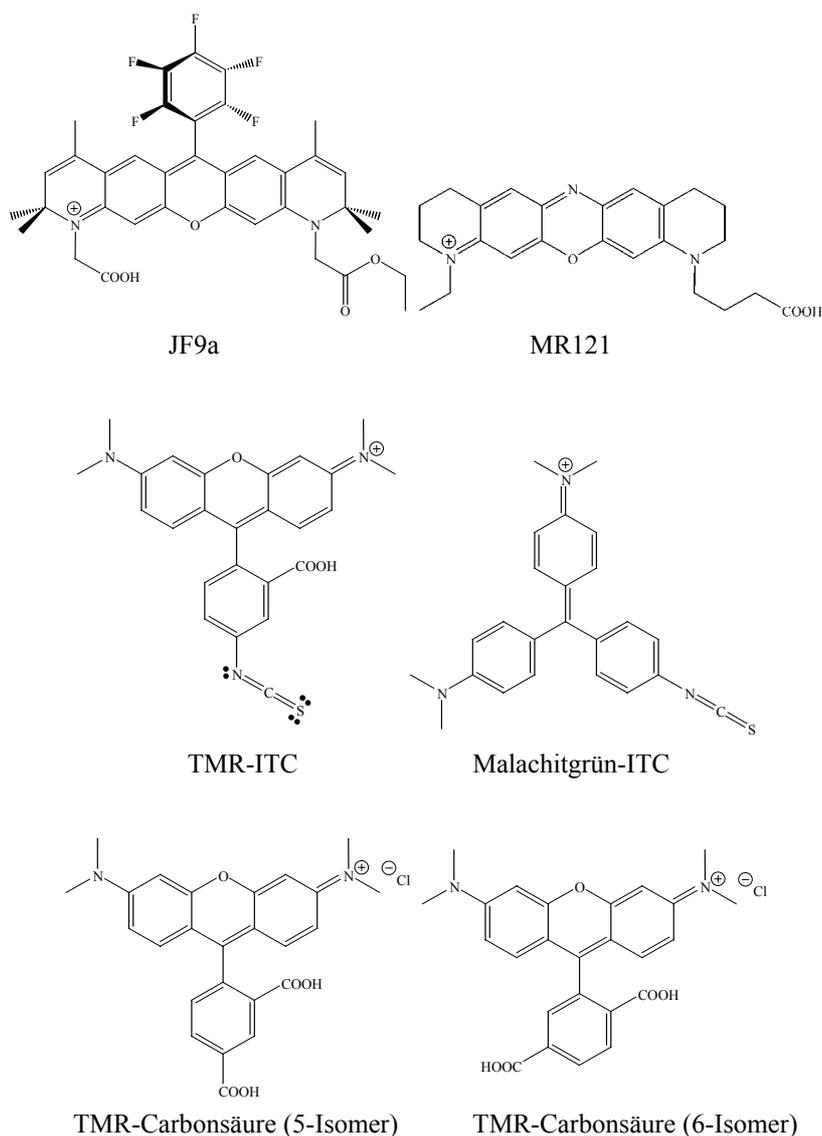


Abbildung 1.2-1: Farbstoffe der beschriebenen Klassen, die in dieser Arbeit Verwendung fanden: Der Carbocyanin-Farbstoff Cy5 ($C_{33}H_{39}N_2O_8S_2^-$; $M = 655,803$), der Rhodamin-Farbstoff JF9a ($C_{37}H_{34}F_5N_2O_5^+$; $M = 681,668$) und der Oxazin-Farbstoff MR121 ($C_{24}H_{28}N_3O_3^+$; $M = 406,498$), der Rhodamin-Farbstoff TMR-ITC ($C_{25}H_{22}N_3O_3S^+$; $M = 444,527$) und der der Triphenylmethanfarbstoff Malachitgrün-ITC ($C_{24}H_{24}N_3S^+$; $M = 386,534$), sowie die 5- und 6-Isomere von Tetramethylrhodamin-Carbonsäure ($C_{25}H_{23}N_2O_5^+$, $M = 431,461$).

Aus der Gruppe der Carbocyanin-Farbstoffe wurde Cy5 verwendet, da er durch seine spektroskopischen Eigenschaften, zusammen mit seiner guten Kopplungsfähigkeit als NHS-Ester zur Anwendung prädestiniert ist.

1.3 Aminosäuren und Peptide

Die Aminosäuren, 2-Aminocarbonsäuren, sind die Bausteine der Peptide und Proteine. Von den natürlich vorkommenden Aminosäuren sind nur 20, die proteinogenen Aminosäuren, regelmäßig in Proteinen zu finden, weil sie im genetischen Code berücksichtigt sind. Viele weitere Aminosäuren entstehen durch enzymatische Umwandlung der proteinogenen Formen oder am Polypeptid durch posttranslationale Modifizierungen. Die proteinogenen Aminosäuren sind in der folgenden Übersicht zusammengestellt [Koolman 1994].

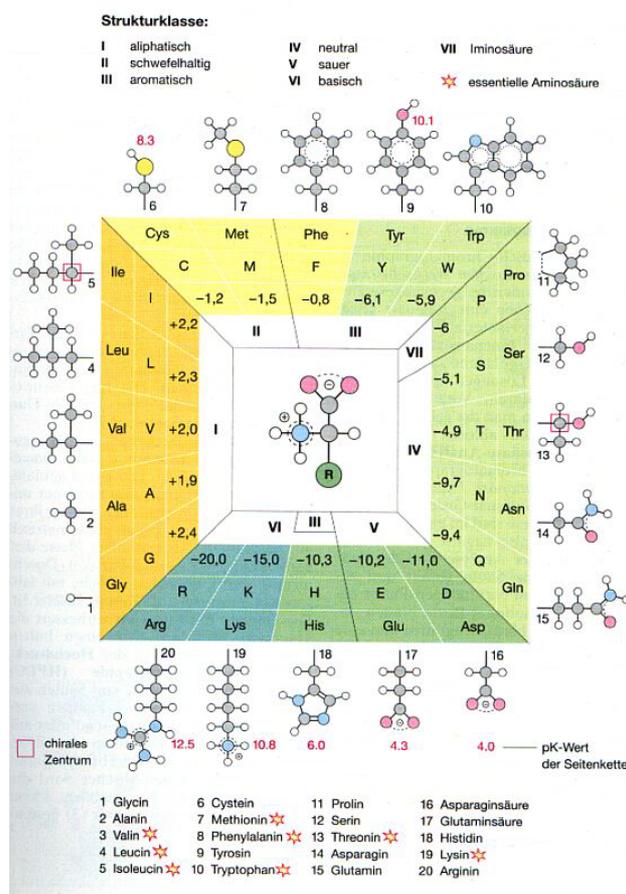


Abbildung 1.3-1: Proteinogene Aminosäuren: Struktur der Seitenketten, pK-Werte der geladenen Aminosäuren, Polaritäten.

In allen Aminosäuren außer Glycin trägt das Kohlenstoff-Atom C-2, oder C α , vier verschiedene Substituenten: die Carboxylat-Gruppe, die Amino-Funktion, ein H-Atom und den jeweiligen Seitenkettenrest R. An einem solchen chiralen Zentrum sind zwei verschiedene Anordnungen, Konfigurationen, möglich. Diese Enantiomere verhalten sich wie Bild und Spiegelbild. In der Natur findet man fast ausschließlich die L-Enantiomeren der Aminosäuren.

Nur L-Aminosäuren sind biologisch wirksam. Deshalb stellt man Aminosäuren biologisch mit Hilfe mutierter Mikroorganismen her.

Als proteinogene Aminosäuren bezeichnet man diejenigen 20 Aminosäuren, die durch Translation in Proteine eingebaut werden können.

Die aromatischen Aminosäuren enthalten mesomeriestabilisierte Ringsysteme in der Seitenkette. Tyrosin mit seiner phenolischen Hydroxygruppe und Tryptophan zeigen als einzige Aminosäuren starke Lichtabsorption im UV-Bereich zwischen 250 und 300 nm. Dies wird zur photometrischen Bestimmung von Proteinen genutzt. Nur die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan zeigen genügend Fluoreszenzintensität, um direkt in Lösung gemessen werden zu können. Die Fluoreszenz von Proteinen mit diesen Aminosäuren ist ein hoch spezifisches und empfindliches Instrument, um Struktur und Konformation zu studieren. Typische Werte für Lebenszeiten des angeregten Zustands liegen bei 2,6 ns für Tryptophan und 3,6 ns für Tyrosin.

Eine Sonderstellung unter den Aminosäuren nimmt das Prolin ein. Seine Seitenkette bildet zusammen mit dem α -C-Atom und der α -Aminogruppe einen Fünfring. Deshalb ist Prolin eigentlich keine Amino-, sondern eine Iminosäure. Aufgrund ihrer Ringstruktur führen Prolin-Reste in Peptiden und Proteinen zum Abknicken der Peptid-Kette.

Jeder Organismus enthält Tausende verschiedener Proteine mit unterschiedlichen Aufgaben. Die Funktionen der Proteine kann man in folgende Gruppen einteilen: Strukturbildung und -erhaltung (z.B. α -Keratin, Collagen, Seiden-Fibroin, Histone des Chromatins), Transport (z.B. Hämoglobin der Erythrocyten, Serum-Albumin, Ionenkanäle als Membran-Proteine), Schutz und Abwehr (z.B. Immunoglobulin G, Fibrinogen), Steuerung und Regelung (z.B. Proteohormon Insulin und Insulin-Rezeptor, DNS-bindendes Protein Katabolit-Aktivator-Protein), Katalyse (z.B. Enzyme Lactat-Dehydrogenase und Glutamin-Synthetase), Bewegung (z.B. Actin und Myosin) und Speicherung (Speicherproteine wie die Muskelproteine).

Die Aminosäuren als Bausteine der Peptide und Proteine sind durch Säureamid-Bindungen zwischen Carboxy- und Aminogruppen miteinander verknüpft. Diese Peptid-Bindung ist eben und mesomeriestabilisiert und „nicht frei drehbar“.

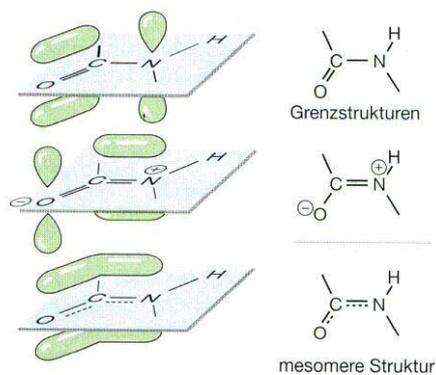


Abbildung 1.3-2: Peptid-Bindung und deren mesomere Grenzstrukturen.

Wegen der eingeschränkten Drehbarkeit der C-N-Bindung sind nur Rotationen um die N-C_α- und die C_α-C-Bindung in Peptiden und Proteinen möglich. Daraus resultieren die Sekundär-Strukturen, die durch H-Brücken innerhalb der Kette oder zu Nachbarketten stabilisiert werden. Die häufigsten, natürlichen Strukturen sind die rechtsgängige α-Helix, die linksgängige Collagen-Helix, antiparallele (β_a) und parallele (β_p) Faltblatt-Strukturen, β-Schleifen (Typen I und II).

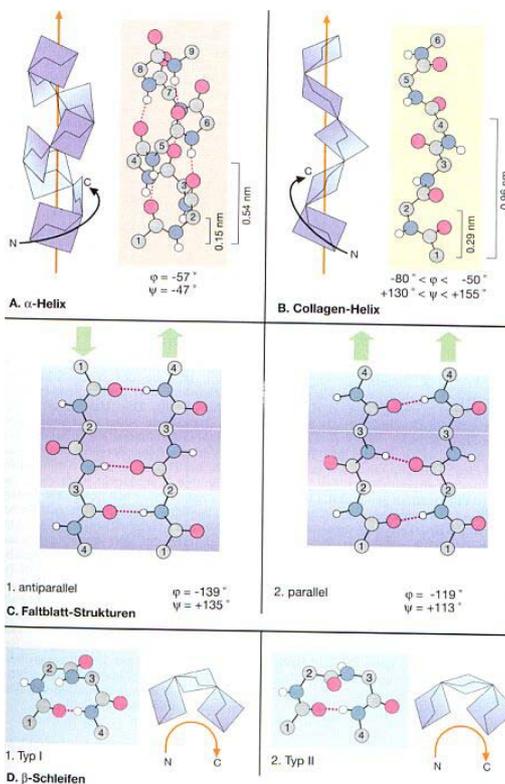


Abbildung 1.3-3: Sekundärstrukturen von Peptiden.

Die dreidimensional gefaltete, biologisch aktive Konformation eines Proteins bezeichnet man als Tertiär-Struktur. Häufig lagern sich einzelne Proteinmoleküle durch nichtkovalente Wechselwirkungen zu symmetrischen Quartär-Komplexen, sogenannte Oligomere mit ihren Untereinheiten, zusammen. Sekundär-, Tertiär- und Quartär-Struktur der meisten Proteine bilden sich nach der Synthese spontan aus. Offenbar ist die Information für die biologisch aktive – native – Konformation bereits in deren Aminosäure-Sequenz kodiert.

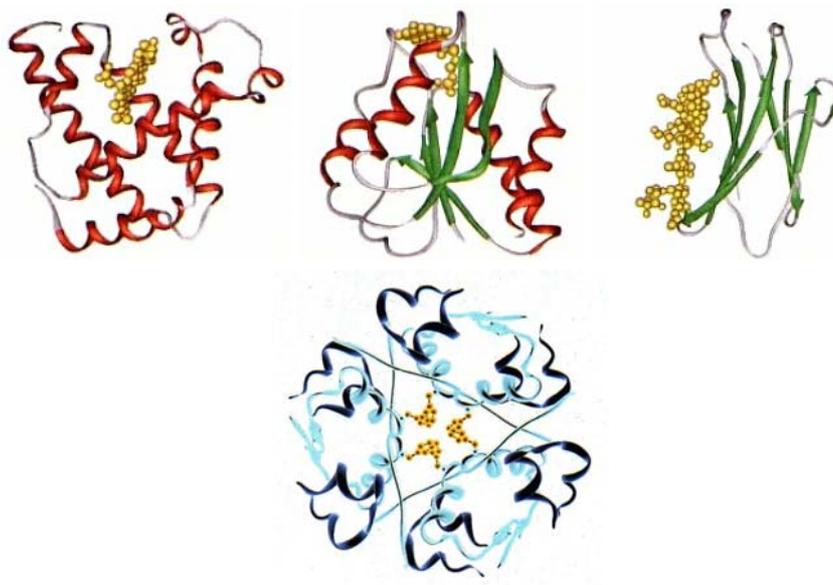


Abbildung 1.3-4: Oben: Tertiärstrukturen von Myoglobin, Flavodoxin und IgG (CH₂-Domäne); Unten: Insulin (Hexamer); Zu sehen sind die helicalen und Faltblatt- sowie ungeordnete Domänen. Gelb sind Oligosaccharid-Bestandteile markiert.

