

Fluoreszenzspektroskopie
als neue Meßmethode zur höchstempfindlichen
Untersuchung transienter Zustände

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Martin Heupel

aus Siegen

eingereicht beim Fachbereich 8
der Universität-Gesamthochschule Siegen

Siegen 2000

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1996 bis Oktober 2000 an der Universität-Gesamthochschule Siegen im Fach Physikalische Chemie unter der Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. Erwin Thiel durchgeführt.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Erwin Thiel danke ich in mehrerlei Hinsicht: Zum einen für die Themenstellung, die finanzielle Unterstützung, den gewährten Freiraum und die stete Bereitschaft zur Diskussion. Zum anderen gilt ihm mein Dank für 4 ½ Jahre Lebensschule, in der ich weit mehr als physikalisch-chemische Zusammenhänge gelernt habe.

Ebenso gilt mein Dank den Kollegen aus der Physikalischen Chemie für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere danke ich Herrn Ingo Gregor für die Programmierung einer Auswertesoftware und vielerlei wissenschaftliche Hilfestellungen, Diskussionen über Fotografie und Star Trek, Herrn Rainer Bornemann für die Fähigkeit „verschollene“ Geräte aufzufinden und Herrn René Püschl für die Diskussion zwischen werdenden Vätern. Weiterhin danke ich meinem Bruder Michael, der mir während der Promotion immer unterstützend zur Seite stand, sei es in wissenschaftlichen oder persönlichen Fragestellungen. Als ehemaligem Kollegen danke ich auch Herrn Dr. Ralf Menzel, der mich in die Technik des Transientenspektrometers eingeführt hat.

Für die Bereitstellung von Farbstoffen danke ich Herrn Dr. Vinod Subramaniam vom Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen, Herrn Prof. Müllen vom Max Planck Institut für Polymerforschung in Mainz, Herrn Prof. Salbeck von der Universität Duisburg, Herrn Prof. Fromherz vom Max Planck Institut für Neuro- und Membranphysik in Martinsried und Frau Dr. Jutta Arden von der Universität-Gesamthochschule Siegen. Weiterhin danke ich Dieter Gaumann, Günther Neumann, Bernd Meyer und Peter Rickert für die sorgfältige Herstellung mechanischer und elektronischer Bauteile.

Dem Graduiertenkolleg „Chemische Reaktivität und molekulare Ordnung“ danke ich für die finanzielle Unterstützung, die im Rahmen eines Promotionsstipendiums gewährt wurde.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter, ohne deren Unterstützung und Fürsorge meine Arbeit nicht möglich gewesen wäre und meiner Freundin und zukünftigen Frau Eva Weber, die mir gezeigt hat, daß Chemie und Wissenschaft nicht das ganze Leben ausmachen.

Meinem lieben Vater gewidmet,
der den Tag der Promotion leider nicht mehr miterleben durfte.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeines	1
1.2	Problemstellung	2
2	Das Transientenspektrometer – Verfahren zur Untersuchung angeregter Zustände	4
2.1	Meßprinzip	4
2.2	Meßaufbau	5
2.3	Theorie	6
2.3.1	Bestimmung der Triplett-Lebensdauer τ_T	10
2.3.2	Bestimmung der Besetzung des S_1 - und des T_1 -Zustandes ($c_1(x, y)$ und $c_T(x, y)$)	11
2.3.2.1	Besetzung des T_1 -Zustandes	11
2.3.2.2	Besetzung des S_1 -Zustandes	12
2.3.3	Ratenkonstante für Intersystem-Crossing k_{ST}	12
2.3.4	Auswertung eines Meßsignals	12
2.3.4.1	Anisotropieeffekt	13
2.4	Vor und Nachteile der „Jet-Meßmethode“	14
3	Verbesserung der Jet-Meßmethode – Die Rotationsküvette	17
3.1	Die Rotationsküvette	17
3.1.1	Montage der Verbindungselemente	18
3.1.2	Auswuchten der Küvette	20
3.1.2.1	Justage der Küvette bezüglich der Motorwelle	20
3.1.2.2	Unwucht der Rotationsküvette radial zur Motorwelle	21
3.1.3	Befüllung und Reinigung der Proben-Spuren	22
3.1.3.1	Befüllung	22
3.1.3.2	Reinigung	22
3.1.4	Bestimmung der Probengeschwindigkeit v_{Probe}	22
3.1.5	Problem der Kreisbewegung	23
3.1.5.1	Berechnung der Abweichung von der linearen vertikalen Bewegung	23
3.1.5.2	Auffinden des optimalen Anregungsortes	24
3.2	Überprüfen des neuen Systems	27

3.2.1	Vergleich zwischen Messungen mit Rotationsküvette und Flüssigkeitsjet	28
3.2.2	Vergleich zwischen Messungen in innerer und äußerer Proben-Spur	29
3.2.3	Problem des geringen Probenvolumens	33
3.2.4	Einsatz niederviskoser Lösungsmittel	37
3.2.5	Variation der Probengeschwindigkeit v_{Probe}	38
3.3	Zusammenfassung	40
4	Anwendung der neuen Rotationsküvetten-Technik	42
4.1	Probenvorbereitung	42
4.2	Ausbleichmessungen von Rhodamin 6G in verschiedenen Lösungsmitteln	42
4.3	Einfluß von gelöstem Sauerstoff auf Intersystem-Crossing und Triplett-Lebensdauer von Rhodamin 6G	46
4.3.1	Apparatur zur Einstellung definierter Gasgemische aus Stickstoff und Sauerstoff	46
4.3.2	Herstellen einer mit einem Gasgemisch gesättigten Farbstofflösung	47
4.3.3	Überprüfung der Luftdichtigkeit der Proben-Spuren	48
4.3.4	Ausbleichmessungen in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration	52
4.4	Einfluß des Bromierungsgrades bei Perylenfarbstoffen	60
4.5	Bedeutung der Parameter k_{ST} und τ_{T} für den Einsatz von Fluoreszenzsonden	63
4.5.1	Theorie	64
4.5.2	Ausbleichmessungen mit biologisch und medizinisch relevanten Farbstoffen.	67
4.6	Zusammenfassung	71
5	Neues Meßkonzept: Fluoreszenzreduktion	73
5.1	Meßprinzip der Fluoreszenzreduktion	73
5.1.1	Fluoreszenzreduktion	73
5.1.2	Meßprinzip und Aufbau	74
5.2	Theorie	78
5.3	Durchführung einer Messung	82
5.4	Überprüfung der neuen Meßtechnik	84
5.4.1	Abhängigkeit des Meßsignals von der Farbstoffkonzentration	84
5.4.2	Vergleich mit Ausbleichmessungen	90
5.4.2.1	Vergleich der nach beiden Methoden erhaltenen Ergebnisse	90

5.4.2.2	Untersuchung der Wellenlängenabhängigkeit von Fluoreszenzreduktions- und Ausbleichmeßmethode bei Rhodamin 6G in Ethylenglykol	92
5.4.3	Vergleich mit verwandten Meßmethoden	95
5.5	Zusammenfassung	96
6	Anwendung der Fluoreszenzreduktionsmessung	97
6.1	Fluoreszenzreduktionsmessungen in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration	97
6.2	Einfluß des Bromierungsgrades bei Perylenfarbstoffen	100
6.3	Molekulare Parameter von EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)	102
6.4	Untersuchungen an „molekularen Voltmetern“	107
6.5	Untersuchungen an Farbstoffen für den sogenannten „Plastiklaser“	112
6.5.1	Aufgetretene Schwierigkeiten bei der Messung mit UV-Licht	116
6.6	Zusammenfassung	117
7	Photostabilitätsmessungen	119
7.1	Durchführung der Messungen	119
7.2	Auswertung der Absorptionsdaten	122
7.3	Ergebnis	124
8	Zusammenfassung	126
9	Anhang	130
9.1	Übersichtstabelle aller ermittelten molekularen Parameter	130
9.2	Absorptions- und Fluoreszenzspektren der verwendeten Farbstoffe	135
9.3	Zeitabhängige Absorptionsdaten aus Kapitel 7	161
9.3.1	Lösungsmittel Chloroform	162
9.3.2	Lösungsmittel wassergesättigtes Chloroform	166

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Farbstoffe – wer kommt heutzutage nicht täglich mit ihnen in Kontakt? In nahezu allen Gegenständen des täglichen Lebens sind sie enthalten, um unsere Umwelt freundlich und bunt zu gestalten: in Autolacken, Kleidung, Möbeln, Spielzeug und vielem mehr. Farbstoffe erfüllen aber auch andere wichtige Funktionen. Wer kennt nicht die warnende rote Farbe von Verkehrszeichen und die leuchtend rote Farbe von Feuerwehrfahrzeugen? Man erkennt schnell, daß die heutige Welt ohne Farbstoffe grau und eintönig wäre.

Neben diesen alltäglichen werden immer mehr spezialisierte Anwendungen entwickelt, die auf einer besonderen Eigenschaft der Farbstoffe beruhen: Fluoreszenz. Die Eigenschaft, absorbiertes Licht wieder in Form von Licht auszusenden, zeigt sich nur bei wenigen der vielen tausend bekannten Farbstoffstrukturen in ausgeprägter Weise. Man spricht von einer hohen Fluoreszenzquantenausbeute. Farbstoffe mit dieser speziellen Eigenschaft eignen sich in besonderem Maße zum Einsatz in vielen Gebieten, wie z.B. Erzeugung kurzer Lichtpulse [1, 2], aktives Medium in Farbstofflasern [3, 4, 5], Lichtsammler in Solarzellen [6], Fluoreszenzimmunoassays [7], um nur einige zu nennen. In welcher technischen Sparte ein Farbstoff auch eingesetzt wird, er erfüllt immer eine sehr spezielle Aufgabe, für die ganz spezielle Eigenschaften nötig sind. Zu den wichtigsten zählen die Lichteinheit (Photostabilität), wie erwähnt die Fluoreszenzquantenausbeute, die Lebensdauern angeregter Zustände, die Übergangswahrscheinlichkeiten in transiente Zustände sowie die Absorptions- und Emissionswellenlängen. Nun stellt sich natürlich die Frage, wie man einerseits Farbstoffe finden kann, die genau vorbestimmte Eigenschaften aufweisen sollen und wie man andererseits diese Eigenschaften mißt.

In der Vergangenheit beruhte das Auffinden geeigneter Farbstoffe zumeist auf dem Zufallsprinzip, d.h. man untersuchte eine möglichst große Anzahl Farbstoffproben. Viel einfacher wäre es, wenn man auf eine Systematik zurückgreifen könnte, die den Zusammenhang zwischen Molekülstruktur und Moleküleigenschaften aufzeigt. Doch auch nach mehreren Jahrzehnten der Forschung auf dem Gebiet der Farbstoffe ist dies nur in Ansätzen gelungen. Dies liegt zu einem großen Teil an der Schwierigkeit, die verschiedenen Molekülparameter zu messen. Geht es um Eigenschaften wie Photostabilität, Absorption,

Fluoreszenz und Fluoreszenzquantenausbeute, so stehen hierzu kommerzielle Geräte zur Verfügung, die schnell und reproduzierbar Ergebnisse liefern. Was allerdings die Bestimmung der Eigenschaften von elektronisch angeregten Zuständen betrifft, ist man auf Blitzlicht- bzw. Laserphotolyse-Methoden angewiesen [8, 9, 10, 11, 12, 13]. Leider findet man in der Literatur oft widersprüchliche Aussagen über angeregte Zustände. Selbst bei dem bekanntesten Laserfarbstoff Rhodamin 6G streuen die Werte z. B. für Intersystem-Crossing Ratenkonstante und Triplett-Lebensdauer in luftgesättigter ethanolischer Lösung von $4.2 \cdot 10^5$ bis $2.8 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$, bzw. zwischen 50 ns und 4 μs [14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21]. E. Thiel entwickelte eine Meßapparatur [22] – das sogenannte Transientenspektrometer - die es erlaubt, sehr präzise Informationen über angeregte Zustände von Farbstoffmolekülen zu erhalten. Mit der sehr genauen Messung der Eigenschaften angeregter Zustände kann nun der Zusammenhang zwischen Molekülstruktur und den daraus resultierenden Eigenschaften untersucht werden. Das Ziel all dieser Untersuchungen ist das Verständnis der Ursache, warum sich ein bestimmter Farbstoff so und nicht anders verhält und welche strukturelle Modifikation einzuführen ist, um einen Molekülparameter in einer ganz bestimmten Weise zu beeinflussen. Der Traum eines jeden Farbstoffchemikers ist es sicherlich, von einer auf einem Stück Papier skizzierten Strukturformel auf die molekularen Eigenschaften schließen zu können.

1.2 Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit wird zum einen die technische Weiterentwicklung des in [22] beschriebenen Transientenspektrometers dargestellt. Dieses nutze die Farbe, genauer gesagt die Absorption, als Eigenschaft der Farbstoffe zur Bestimmung der Meßdaten. Auf dieser Grundlage aufbauend soll zum anderen eine neue Meßtechnik etabliert werden. Diese nutzt die Fluoreszenz als Meßgröße.

Die technische Weiterentwicklung soll den Anwendungsbereich des Spektrometers wesentlich erweitern. So war bisher der Einsatz von viskosen Lösungsmitteln wie Ethylenglykol Voraussetzung für die Messung transienter Zustände [23]. Zusätzlich konnten Menge und Zusammensetzung von gelösten Gasmischen im Lösungsmittel nur sehr eingeschränkt eingestellt werden. Dies stellt eine erhebliche Begrenzung des Meßsystems dar.

Weiterhin weist die zu Grunde liegende Meßmethode Grenzen in der Auswertung der gewonnenen Meßsignale auf, wenn Absorptionen angeregter Zustände oder von

Photoprodukten im Bereich der Meßwellenlänge auftreten (s. Kapitel 4.4). Messungen dieser Art lassen sich nicht oder nicht eindeutig auswerten. Daher wird in einem weiteren Teil der Dissertation die Entwicklung eines neuen Meßverfahrens dargestellt, das auf der Fluoreszenz als Meßgröße beruht und gegen die beschriebenen Störungen von Natur aus unempfindlich ist.

Mit Hilfe dieser beiden Entwicklungen sollen Messungen an Laser- und Fluoreszenzfarbstoffen vorgenommen werden. Die Auswahl orientiert sich einerseits an der Unterstützung aktueller Forschungsgebiete und andererseits an grundlegenden Fragen bezüglich inter- und intramolekularen Löschprozessen und der Bestimmung der Eigenschaften transienter Zustände.

2 Das Transientenspektrometer – Verfahren zur Untersuchung angeregter Zustände

E. Thiel entwickelte eine Meßmethode – das sogenannte Transientenspektrometer - zur Untersuchung schwach besetzter angeregter elektronischer Zustände [22]. Diese wurde von R. Menzel weiterentwickelt und für die Anwendbarkeit auf stark fluoreszierende Laserfarbstoffe optimiert [24]. Meßprinzip und Meßverfahren sollen im folgenden kurz dargestellt werden.

2.1 Meßprinzip

Das Prinzip der Messung beruht darauf, daß verschiedene elektronische Zustände eines Moleküls zumeist auch unterschiedliche Absorptionseigenschaften aufweisen. Dies läßt sich in folgender Weise zur Untersuchung angeregter Zustände nutzen. Wie in Abbildung 2.1 dargestellt, bewegt sich die zu untersuchende Probe in Form eines Flüssigkeitsfilms mit der Geschwindigkeit v_{Probe} in x-Richtung. Mit einem fokussierten kontinuierlichen Anregungslaserstrahl, dessen Wellenlänge λ_A im Absorptionsbereich der Probe liegen muß, wird ein Teil der Probenmoleküle in angeregte Zustände gebracht. Diese Moleküle gelangen bei ausreichend hoher Lebensdauer des angeregten Zustandes durch die Bewegung der Probe in den Fokusbereich eines zweiten Laserstrahls (Wellenlänge λ_M), der zur Messung verwendet wird. Die nun aus einer Mischung aus Molekülen in Grund- und angeregten Zuständen bestehende Probe weist im allgemeinen eine gegenüber einer unbestrahlten Probe veränderte Absorption auf. Somit tritt eine Differenz in der Transmission für den Meßlaserstrahl M zwischen einer angeregten und einer nicht angeregten Probe auf. Diese Differenz enthält Informationen über die Eigenschaften angeregter Zustände. Die Messung bei unterschiedlichen Abständen Δx zwischen Anregungs- und Meßort erlaubt bei bekanntem v_{Probe} eine Bestimmung der Lebensdauern angeregter Zustände.

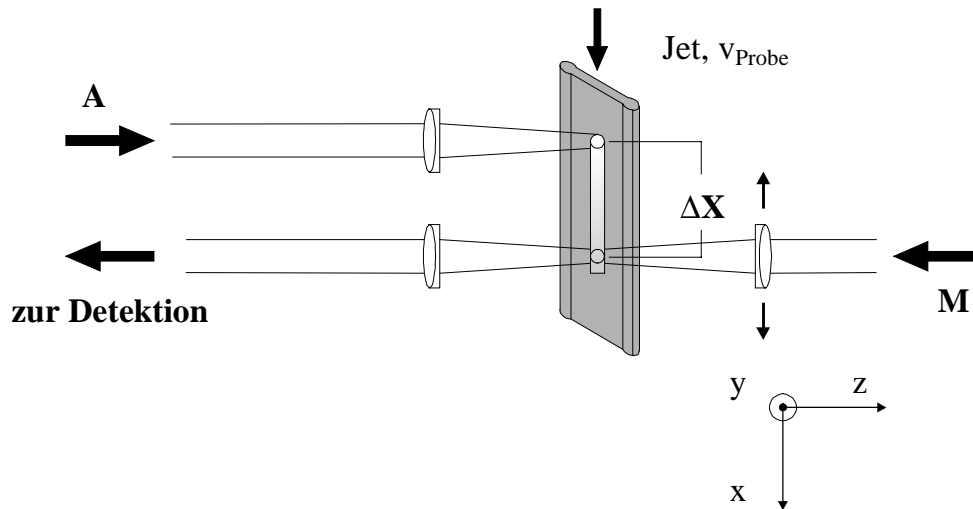


Abbildung 2.1 Meßprinzip des Transientenspektrometers; A – Anregungsstrahl, M – Meßstrahl, v_{Probe} – Probengeschwindigkeit. Der Jet ist hier perspektivisch in der Seitenansicht dargestellt.

2.2 Meßaufbau

Der experimentelle Aufbau ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

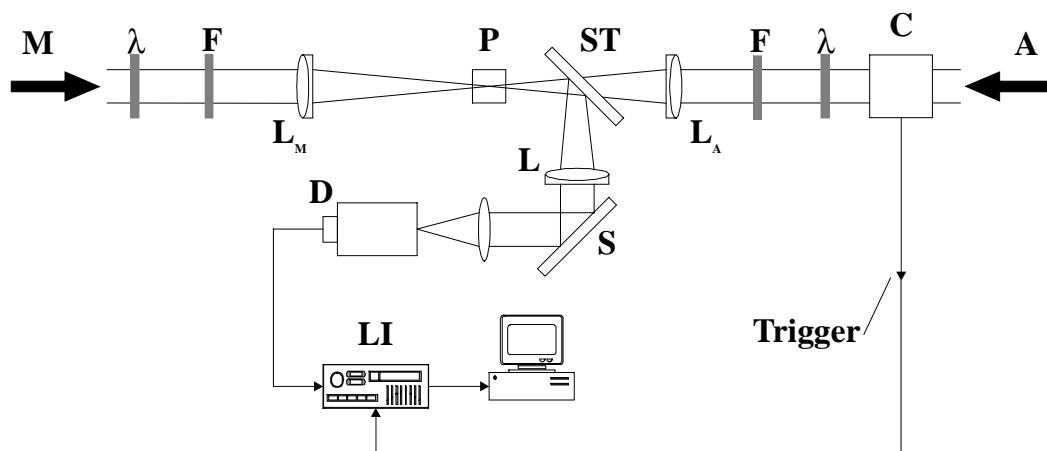


Abbildung 2.2 Meßaufbau des Transientenspektrometers; P – Probe, A – Anregungsstrahl, M – Meßstrahl, C – Chopper, L_A und L_M – Achromaten (Brennweite: 60mm), L – Achromat (Brennweite: 100 mm), S – Spiegel, ST – Strahlteiler, D – Detektor (Monochromator mit Photodiode), LI – Lock-In-Verstärker (Model 5101, Fa. EG&G), λ – $\lambda/2$ -Platte (low order, Fa. Halle), F – Polarisationsfilter.

Durch die beiden Achromaten L_A und L_M werden der Anregungs- und der Meßlaserstrahl in der Weise in die Probe fokussiert, daß die beiden Laserfoki beim Abstand $\Delta x = 0$ (s. Abbildung 2.1) maximal überlappen. Durch das Verstellen der Linse L_A um den Abstand Δx mittels eines Schrittmotors (Linearmeßtisch, Modell LM 60, 50 mm Hub, 2-Ph-SM 440, Fa. Owis) erreicht man dieselbe Verschiebung des Laserfokus in der Probe. Bei kleinen

Werten für Δx (bis 2 mm) können dabei Abbildungsfehler vernachlässigt werden. Die Probenführung – der sogenannte „Jet“ – wird dadurch erzeugt, daß die zu untersuchende Farbstofflösung durch eine Düse gepreßt und so ein dünner Flüssigkeitsfilm gebildet wird. Bei der Verwendung von ausreichend viskosen Lösungsmitteln (zumeist Ethylenglykol) bildet sich dadurch ein Film mit parallelen Grenzflächen, der die für die Messung notwendige optische Qualität aufweist. Die verwendete Düse wurde einem Farbstofflaser (CR 599, Fa. Coherent Radiation) entnommen.

Durch die Modulation des Anregungslichtes und die phasenrichtige Detektion des Meßsignals kann das Signal-zu-Rausch-Verhältnis so weit erhöht werden, daß auch geringste Besetzungen angeregter Zustände detektiert werden können (relative Meßempfindlichkeit von 10^{-5}). Das Modulieren des Anregungslichtes wird durch einen Chopper (Modell 650/651, Fa. EG&G) bewerkstelligt. Die übliche Frequenz liegt dabei bei ca. 1 kHz. Das eigentliche Meßsignal ist durch die Änderung der Meßlichtintensität ΔI im Verhältnis zur Gesamtintensität I gegeben. Dabei wird ΔI durch die Änderung der Transmission für den Meßlaserstrahl M hervorgerufen, bedingt durch das Ein- und Ausschalten des Anregungslaserstrahls (s. Kapitel 2.1). Die Aufnahme der experimentellen Daten wurde mit einem PC gesteuert (M20 Schrittmotorkarte, AD-Wandlerkarte ASO 1600, Fa. Keithley). Als Lichtquellen dienten ein Krypton-Ionen-Laser (CR 3000K, Fa. Coherent Radiation), zwei Argon-Ionen-Laser (Innova 300 bzw. 3000, Fa. Coherent Radiation), ein Farbstofflaser (CR 599, Fa. Coherent Radiation) und ein Helium-Neon-Laser (Fa. Melles Griot, Mod. 3225H-PC). Zur Detektion des Meßsignals wurde das Meßlicht durch einen Raumfilter und einen Monochromator (H20 IR, Fa. Jobin Yvon) auf eine Si-Photodiode (Model 404, Fa. Spectra Physics) abgebildet und das Signal über einen Stromverstärker (427 current amplifier, Fa. Keithley) an den Lock-In-Verstärker (Model 5101, Fa. EG&G) weitergeleitet. Die genaue Beschreibung des Aufbaus findet sich in [25].

2.3 Theorie

Die theoretische Beschreibung der Meßsignale ist ausführlich in [22] beschrieben. An dieser Stelle sollen nur die zur Auswertung wesentlichen Zusammenhänge kurz zusammengefaßt werden.

Zur Beschreibung der elektronischen Zustände eines Farbstoffmoleküls und den möglichen elektronischen Übergängen verwendet man zumeist ein sogenanntes Jablonski-Diagramm:

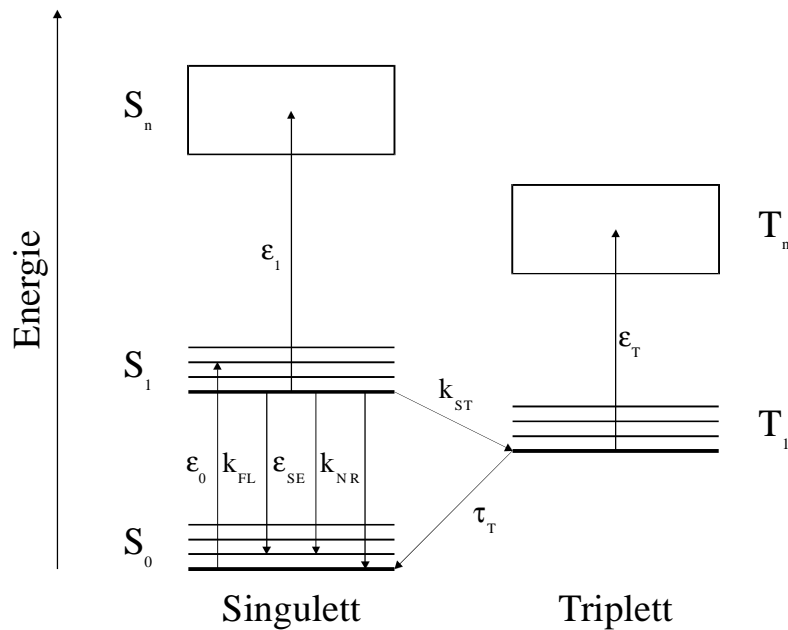


Abbildung 2.3 Jablonski-Diagramm;
 S_0 – Singulett-Grundzustand, S_1 – erster angeregter Singulett-Zustand, T_1 – Triplett-Zustand, S_n u. T_n – höher angeregte Triplett-Zustände, k_{FL} – Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz, k_{SE} – Geschwindigkeitskonstante der stimulierten Emission, k_{NR} – Geschwindigkeitskonstante der strahlungslosen Desaktivierung, k_{ST} – Ratenkonstante für Intersystem-Crossing, τ_T – Triplett-Lebensdauer, ϵ_0 – Extinktionskoeffizient der Grundzustands-Absorption, ϵ_1 – Extinktionskoeffizient der S_1 - S_n -Absorption, ϵ_T – Extinktionskoeffizient der Triplett-Triplett-Absorption.

Wie bereits in Kapitel 2.1 dargestellt, wird durch das Einschalten des Anregungslasers die Transmission der Probe für den Meßlaserstrahl verändert. Der Lock-In-Verstärker filtert bei phasenrichtiger Detektion die Differenz ΔI zwischen der Meßlichtintensität bei eingeschaltetem (I') und ausgeschaltetem Anregungsstrahl (I) heraus. Die eigentliche Meßgröße ergibt sich gemäß:

$$\frac{\Delta I}{I} = \frac{I' - I}{I} \quad 2.1$$

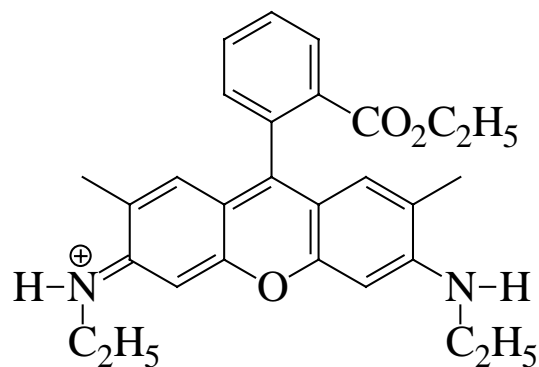
Diese Meßgröße kann

- positiv sein, wenn die angeregten Zustände einen kleineren Extinktionskoeffizienten für Absorption aufweisen als der Grundzustand, oder
- negativ sein, wenn die angeregten Zustände einen größeren Extinktionskoeffizienten für Absorption aufweisen als der Grundzustand, oder

- c) null sein, wenn die angeregten Zustände dieselben Extinktionskoeffizienten für Absorption aufweisen wie der Grundzustand.

Im Fall a) spricht man von sogenannten „Ausbleichmessungen“, da die Absorption der Probe durch Fehlen von Molekülen im Grundzustand abnimmt – die Probe bleicht aus. Dies tritt zumeist dann auf, wenn die Wellenlänge des Meßlaserstrahls im Bereich der Hauptabsorptionbande liegt. Fall b) beschreibt die sogenannten „transienten Absorptionsmessungen“. Hier befindet sich die Wellenlänge des Meßlaserstrahls im Absorptionsbereich transienter Zustände, an denen die Probe gewöhnlich keine oder nur eine sehr geringe Absorption im Grundzustand aufweist. Fall c) beschreibt die Situation, in denen die Absorptionen aus Grund- und angeregtem Zustand identisch sind.

In Abbildung 2.4 und Abbildung 2.5 ist ein typisches Meßsignal einer Ausbleichmessung von Rhodamin 6G in Ethylenglykol dargestellt, das mit der Kapitel 2.1 und 2.2 beschriebenen Meßmethode aufgenommen wurde.



Rhodamin 6G

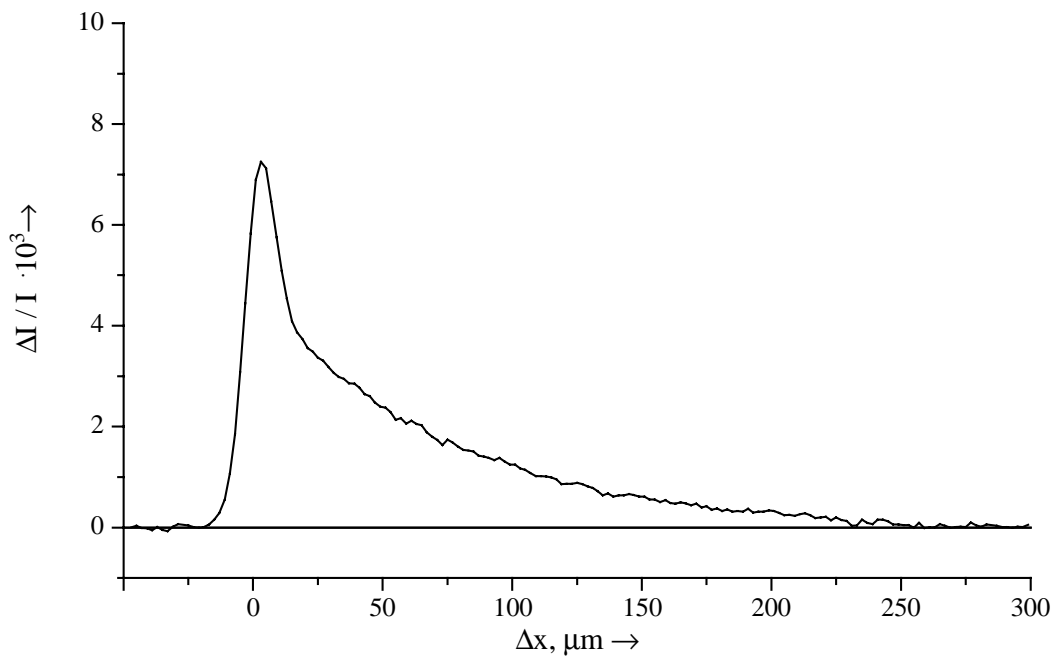


Abbildung 2.4 *Typisches Meßsignal; Rhodamin 6G in Ethylenglykol, 80 mW Anregungsleistung (514,5 nm), 5 mW Meßleistung (514,5 nm).*

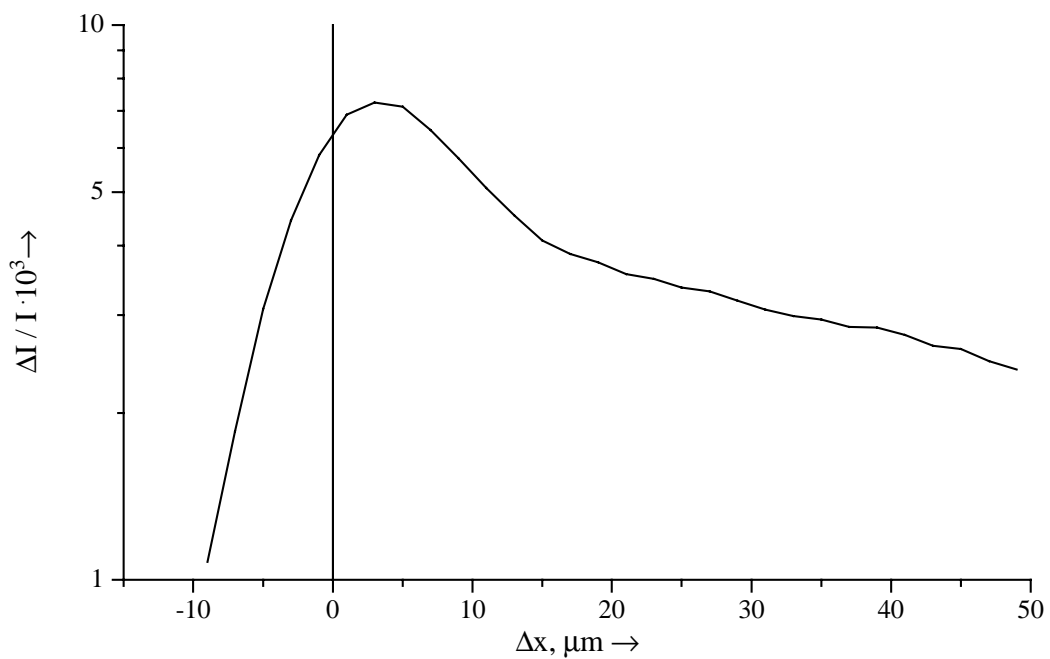


Abbildung 2.5 *Vergrößerte Darstellung der Abbildung 2.4.*

Das Erscheinungsbild des Meßsignals resultiert aus der teilweisen Entvölkerung des Grundzustandes. Hierbei ist von Bedeutung, ob die dem Grundzustand entzogenen Moleküle

kurz- oder langlebige angeregte Zustände besetzen. Die Besetzung des kurzlebigen S_1 -Zustandes ergibt einen symmetrischen Anteil des Meßsignals. Die Halbwertsbreite wird dabei durch den Laserfokus bestimmt, da die Lebensdauer des S_1 -Zustandes (ns-Bereich) wesentlich kürzer ist als die Zeit, in der die Farbstoffmoleküle den Fokus des Anregungslasers passieren (Fokus ca. $10\ \mu\text{m}$, v_{Probe} ca. $10 - 15\ \text{m/s}$). Dagegen werden Moleküle in langlebigen Zuständen, wie z.B. der Triplett-Zustand, aus dem Fokus des Anregungslasers herausgetragen. Dies ergibt einen asymmetrischen Signalanteil. Die Überlagerung beider Anteile ergibt das Meßsignal, dessen Maximum nicht bei $\Delta x = 0$ liegt (s. Abbildung 2.5). Dies erklärt sich durch die Akkumulation von Molekülen in langlebigen angeregten Zuständen, während die Probe den Fokus des Anregungslasers passiert.

Die theoretische Berechnung des Meßsignals ergibt sich folgendermaßen:

$$\frac{\Delta I}{I} = 10^{d[c_1(x,y) \cdot (\epsilon_0 + \epsilon_{SE} - \epsilon_1) + c_T(x,y) \cdot (\epsilon_0 - \epsilon_T)]} - 1 \quad 2.2$$

Man erkennt, daß alle in Abbildung 2.3 dargestellten Prozesse Einfluß auf das Meßsignal nehmen.

Aus dem Meßsignal lassen sich folgende Informationen über angeregte Zustände gewinnen:

- 1) Triplett-Lebensdauer τ_T
- 2) Konzentration an Molekülen im ersten angeregten Singulett-Zustand S_1 ($c_1(x, y)$) und im Triplett-Zustand T_1 ($c_T(x, y)$)
- 3) Ratenkonstante für Intersystem-Crossing k_{ST}

2.3.1 Bestimmung der Triplett-Lebensdauer τ_T

Sobald die beiden Foki von Anregungs- und Meßlaserstrahl nicht mehr überlappen, ist der erste angeregte Singulett-Zustand, bedingt durch seine kurze Lebensdauer, nicht mehr bevölkert ($c_1(x, y) = 0$). Für diesen Sonderfall vereinfacht sich Gleichung 2.2 zu:

$$\frac{\Delta I}{I} = 10^{d \cdot c_T(x,y) \cdot (\epsilon_0 - \epsilon_T)} - 1 \quad 2.3$$

Wie in [25] näher beschrieben läßt sich dieser Ausdruck für $\epsilon_0 \gg \epsilon_T$ folgendermaßen umformen:

$$\ln\left(\frac{\Delta I}{I}\right) = \text{const} - \frac{1}{\tau_T \cdot v_{\text{Probe}}} \cdot x \quad 2.4$$

Damit erhält man bei einer logarithmischen Auftragung des Meßsignals gegen den Ort x eine Gerade, aus dessen Steigung sich die Triplet-Lebensdauer gewinnen läßt.

2.3.2 Bestimmung der Besetzung des S_1 - und des T_1 -Zustandes ($c_1(x, y)$ und $c_T(x, y)$)

2.3.2.1 Besetzung des T_1 -Zustandes

Aus Gleichung 2.3 erhält man mit $\epsilon_0 \gg \epsilon_T$

$$c_T(x_0, y_0) = \frac{1}{I \cdot \epsilon_0} \cdot \log\left(\frac{\Delta I(x_0, y_0)}{I} + 1\right) \quad 2.5$$

Diese Beziehung liefert die Besetzung des Triplet-Zustandes für nicht überlappende Foki von Anregungs- und Meßlaserstrahl. Mit Gleichung 2.5 läßt sich die Besetzung des Triplet-Zustandes bei exakt überlappenden Foki ($c_T(0,0)$) berechnen, welche zur Bestimmung der Intersystem-Crossing Ratenkonstante (s. Kapitel 2.3.3) benötigt wird:

$$\frac{c_T(x,0)}{c_T(0,0)} = \frac{2\omega^5 \cdot \sinh^2\left(\frac{\gamma\pi}{\omega}\right)}{\left(\frac{3}{2}\gamma^2 + \omega^2\right) \cdot (\gamma^2 + \omega^2) \cdot \gamma\pi - \omega^5 \exp\left(-\frac{\gamma\pi}{\omega}\right) \cdot \sinh^2\left(\frac{\gamma\pi}{\omega}\right)} \cdot \exp(-\gamma \cdot x_0) \quad 2.6$$

Die Größen γ und ω sind folgendermaßen gegeben:

$$\gamma = \frac{1}{v_{\text{Probe}} \cdot \tau_T}, \quad \omega = \frac{\sqrt{\pi}}{a} \quad 2.7$$

Hierbei beschreibt v_{Probe} wiederum die Probengeschwindigkeit, τ_T die Triplet-Lebensdauer und a den Durchmesser des Laserfokus, der für Anregungs- und Meßlaserstrahl identisch angenommen wird.

2.3.2.2 Besetzung des S_1 -Zustandes

Für die Besetzung des S_1 -Zustandes gilt folgende Beziehung:

$$c_1(0,0) \cdot (\epsilon_0 + \epsilon_{SE} - \epsilon_1) + c_T(0,0) \cdot (\epsilon_0 - \epsilon_T) = \frac{1}{I} \cdot \log\left(\frac{\Delta I(0,0)}{I} + 1\right) \quad 2.8$$

Diese läßt sich unter den Annahmen $\epsilon_0 \gg \epsilon_T$, $\epsilon_0 \gg \epsilon_{SE}$ und $\epsilon_0 \gg \epsilon_1$ vereinfachen:

$$c_1(0,0) = \frac{1}{I\epsilon_0} \cdot \log\left(\frac{\Delta I(0,0)}{I} + 1\right) - c_T(0,0) \quad 2.9$$

Durch die Gleichungen 2.5 und 2.6 ist man nun in der Lage, die Besetzung des ersten angeregten Singulett-Zustandes bei exakt überlappenden Laserfoki zu berechnen.

2.3.3 Ratenkonstante für Intersystem-Crossing k_{ST}

Für die Intersystem-Crossing Ratenkonstante läßt sich folgende Beziehung herleiten:

$$c_T(0,0) = c_1(0,0) \cdot k_{ST} \cdot \tau_T \cdot M \quad 2.10$$

Der Faktor M ist eine dimensionslose Größe und ergibt sich für identische Foki a für Anregungs- und Meßlaserstrahl zu:

$$M = \frac{2}{3} \cdot \left[1 + \frac{\gamma^2}{2(\gamma^2 + \omega^2)} - \frac{\omega^5}{\pi\gamma(\gamma^2 + \omega^2)^2} \cdot \exp\left(-\frac{\pi\gamma}{\omega}\right) \cdot \sinh\left(\frac{\pi\gamma}{\omega}\right) \right] \quad 2.11$$

Die Größen γ und ω sind in Gleichung 2.7 beschrieben.

2.3.4 Auswertung eines Meßsignals

Zur Auswertung werden die Parameter, die für die Gleichungen 2.6 und 2.9 nötig sind, an das Meßsignal angefitet, d.h., man setzt das Signal aus den Anteilen zusammen, die durch die S_1 - und T_1 -Besetzung hervorgerufen werden. Als Ergebnis erhält man den Laserfokus a, die Konzentrationen von Molekülen im ersten angeregten Singulett-Zustand c_1 und im Triplett-Zustand c_T , die Ratenkonstante für Intersystem-Crossing k_{ST} und den dimensionslosen Faktor M. Hierbei muß betont werden, daß die Auswertung nur dann richtige Werte liefern kann, wenn erstens die Laserfoki für Anregung und Messung identisch eingestellt werden und zweitens die Annahmen $\epsilon_0 \gg \epsilon_T$, ϵ_{SE} , ϵ_1 zutreffen. Liegt die Meßwellenlänge im Bereich der Hauptabsorptionsbande, so dürften diese Voraussetzungen erfüllt sein [22].

2.3.4.1 Anisotropieeffekt

Bei der Beurteilung der Auswertung muß der sogenannte Anisotropieeffekt berücksichtigt werden. Dieser beschreibt die durch eine polarisierte Bestrahlung auftretende nicht gleichmäßige Orientierung angeregter Moleküle. Die Anisotropie wird bestimmt durch die Polarisationsrichtung des eingestrahlten Lichtes, das Übergangsdipolmoment der absorbierenden Moleküle und deren Rotationsgeschwindigkeit und der Lebensdauer der angeregten Zustände. Dieser wirkt die Molekularbewegung entgegen, d.h. die Anisotropie klingt mit der Zeit ab. Daher muß in die Auswertung die Polarisationsrichtung von Anregungs- und Meßlaserstrahl mit einbezogen werden. Eine genaue Betrachtung der Auswirkung der Anisotropie auf die Messung transienter Zustände mit dem Transientenspektrometer findet sich in [24]. Eine wesentliche Aussage betrifft die Bestimmung der Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} . Danach erhält man unterschiedliche Meßgrößen für parallel (k_{ST}^{\parallel}) und senkrecht (k_{ST}^{\perp}) zueinander polarisierte Anregungs- und Meßlaserstrahlen. Je viskoser das Lösungsmittel ist, desto größer wird der Quotient $k_{ST}^{\perp}/k_{ST}^{\parallel}$. Aus diesen Meßgrößen läßt sich die Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} nach den folgenden Beziehungen bestimmen:

$$\text{Mit} \quad r = \frac{c_1^{\parallel} - c_1^{\perp}}{c_1^{\parallel} + 2k_1^{\perp}} \quad 2.12$$

und Gleichung 2.10 erhält man:

$$r = \frac{k_{ST}^{\perp} - k_{ST}^{\parallel}}{k_{ST}^{\perp} + 2k_{ST}^{\parallel}} \quad 2.13$$

Die Größen $c_T(0,0)$, M und τ_T sind nicht anisotropieabhängig [24].

Für k_{ST} gilt schließlich:

$$k_{ST} = (1 - r) \cdot k_{ST}^{\perp} = (1 + 2r) \cdot k_{ST}^{\parallel} \quad 2.14$$

- | | | |
|-----|----------------------|---|
| mit | k_{ST} | – Intersystem-Crossing Ratenkonstante |
| | k_{ST}^{\parallel} | – Meßgröße bei paralleler Ausrichtung der
Polarisationsrichtungen von Anregungs- und Meßlaserstrahl |
| | k_{ST}^{\perp} | – Meßgröße bei senkrechter Ausrichtung der
Polarisationsrichtungen von Anregungs- und Meßlaserstrahl |

c_1^{\parallel}	– Besetzung des S_1 -Zustandes bei paralleler Ausrichtung der Polarisationsrichtungen von Anregungs- und Meßlaserstrahl
c_1^{\perp}	– Besetzung des S_1 -Zustandes bei senkrechter Ausrichtung der Polarisationsrichtungen von Anregungs- und Meßlaserstrahl
r	– Anisotropie

Zur Bestimmung der Intersystem-Crossing Ratenkonstante müssen demzufolge zwei Messungen durchgeführt werden, bei der einmal die Polarisationsrichtungen von Anregungs- und Meßlaserstrahl senkrecht und einmal parallel zueinander ausgerichtet sind. Dies läßt sich durch die Kombination von $\lambda/2$ -Plättchen mit Polarisationsfiltern leicht bewerkstelligen (s. Abbildung 2.2).

An dieser Stelle sei betont, daß es sich bei den Meßgrößen k_{ST}^{\parallel} und k_{ST}^{\perp} nicht um verschiedene Intersystem-Crossing Ratenkonstanten handelt, denn diese ist eine Moleküleigenschaft und nicht abhängig von der Meßmethode. Sehr wohl läßt sich durch die Bestimmung von k_{ST}^{\parallel} oder k_{ST}^{\perp} die Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} abschätzen.

2.4 Vor und Nachteile der „Jet-Meßmethode“

Die „Jet-Meßmethode“ zeichnet sich durch verschiedene Vor- aber auch Nachteile aus.

Zu den Vorteilen zählen:

- 1) Eigenschaften angeregter Zuständen meßbar (Abklingdauer, Absorptionskoeffizienten, Übergangswahrscheinlichkeiten)
- 2) hohe Meßgenauigkeit (relative Meßgenauigkeit bis zu 10^{-5})
- 3) großes Signal-zu-Rausch-Verhältnis durch Kombination von cw-Laser mit Lock-In-Technik
- 4) Messungen von photoinstabilen Farbstoffen möglich (s.u.)
- 5) leichte Beimischung von Gasen in die Farbstofflösung (s.u.)

Zur Erklärung der Punkte 4) und 5) muß der Aufbau näher erklärt werden. Die durch die feine Düse gepreßte Farbstofflösung (s. Kapitel 2.2) wird mit einem kleinen Trichter aufgefangen,

einem Vorratsgefäß zugeführt und von dort wieder zur Düse gepumpt. Das Gesamtvolumen der Lösung beträgt ca. 50 ml. Bedingt durch dieses große Gesamtvolumen ist es möglich, auch photoinstabile Farbstoffe zu messen, da im allgemeinen zum Ausbleichen der gesamten Lösung eine wesentlich längere Zeit benötigt wird, als für die jeweilige Messung. Entstehen allerdings Photoprodukte, die bei der Meßwellenlänge absorbieren, kann auch ein geringer Prozentsatz an photozerstörten Farbstoffmolekülen die Messung verfälschen (s. Nachteile). Das beschriebene Vorratsgefäß ist so gearbeitet, daß während der Messungen Beimengungen zur Farbstofflösung möglich sind. Dadurch lassen sich sowohl Gase als auch beliebige chemische Zusätze der Farbstofflösung zugeben.

Zu den Nachteilen zählen:

- 1) Auswertung der Messung ist nur richtig für $\epsilon_0 \gg \epsilon_T, \epsilon_{SE}, \epsilon_1$. Dabei sind die Werte der einzelnen Extinktionskoeffizienten zusätzlich oft nicht bekannt.
- 2) Absorptionen aus angeregten Zuständen - von der Probe selbst oder von Photoprodukten - können die Messung stören oder sogar verhindern.
- 3) Die Probengeschwindigkeit kann nur in einem sehr engen Rahmen eingestellt werden (ca. 10 – 15 m/s).
- 4) Die zeitliche Auflösung bei der „Jet-Meßmethode“ liegt – bedingt durch die geringe Probengeschwindigkeit – bei ca. 0.7 μ s.
- 5) Durch das große Probenvolumen muß eine große Menge an Farbstoff eingesetzt werden, um eine Messung möglich zu machen. Dies ist besonders bei wertvollen Proben von großem Nachteil.
- 6) Die Meßintensität muß wesentlich geringer gewählt werden als die Anregungsintensität, da sonst die Verteilung der Moleküle auf die verschiedenen elektronischen Zustände verändert würde. Da photoinstabile Proben eine geringe Anregungsintensität erfordern, kann hier eine Messung erheblich erschwert werden.
- 7) Der Gasgehalt der Probe kann nur sehr ungenau eingestellt werden.
- 8) Es ist keine Referenzmessung möglich (s.u.).

- 9) Das Austauschen der Probe gegen eine andere ist sehr aufwendig (intensives Spülen des Jet-Systems, um sicherzustellen, daß keine Proben-Reste die nächste Messung verfälschen).
- 10) Es sind nur Lösungsmittel mit einer ausreichend hohen Viskosität verwendbar, da ansonsten kein Flüssigkeitsfilm gebildet werden kann, der den optischen Anforderungen genügt.

Punkt 8) beschreibt die Schwierigkeit, die häufig bei einer neuen Justage des Systems bei einer neuen Farbstoffklasse auftritt. Trotz gewissenhafter Justage ist es manchmal nicht möglich, ein Meßsignal zu erhalten. Dabei stellt sich dann die Frage, ob dies an einer falschen Justage liegt, oder ob das Fehlen eines Meßsignals bereits das Ergebnis darstellt. Wäre eine Referenzmessung mit einer Farbstoffprobe möglich, die bei den eingestellten Parametern ein Meßsignal liefert, so wäre ein sofortiges Unterscheiden zwischen Ergebnis und ungenügender Justage möglich. Dies ist bei der Jet-Meßmethode nur sehr eingeschränkt möglich, da nach einer Referenzmessung das System zunächst wieder für die neue Probe vorbereitet werden müßte.

3 Verbesserung der Jet-Meßmethode – Die Rotationsküvette

Im Kapitel 2 wurde mit dem Transientenspektrometer ein Meßsystem vorgestellt, daß zuverlässig und sehr präzise Informationen über angeregte Zustände liefert. Ebenso wurden die Einschränkungen aufgezählt, die die universelle Anwendbarkeit begrenzen. Die entscheidendsten apparativen Einschränkungen ergeben sich durch die Verwendung der Jet-Technik, die eine Begrenzung auf viskose Lösungsmittel, eine nahezu invariable Probengeschwindigkeit und die fehlende Möglichkeit einer Referenzmessung bedingt. Besonders der Einfluß verschiedener Lösungsmittel auf die Eigenschaften angeregter Zustände kann durch das Meßsystem nicht untersucht werden. Ebenso dürfen die auftretenden Abklingdauern nicht zu gering sein, da sie ansonsten nicht meßbar sind.

Mit

$$\tau_{\min} = \frac{\Phi}{v_{\text{Probe}}} \quad 3.1$$

ergibt sich aus dem Durchmesser des Laserfokus Φ (ca. $10 \mu\text{m}$) und der Probengeschwindigkeit v_{Probe} (maximal 15 m/s) die Zeitauflösung $\tau_{\text{Min.}}$ zu $0.67 \mu\text{s}$. Zuletzt liefern insbesondere Referenzmessungen oftmals wertvolle Informationen, wenn man verschiedene Proben unter identischen Bedingungen direkt miteinander vergleichen will. Um das Meßsystem weiterzuentwickeln, wurde die sogenannte Rotationsküvette entworfen. In den folgenden Kapiteln wird das weiterentwickelte Meßsystem vorgestellt.

3.1 Die Rotationsküvette

In Zusammenarbeit mit der Firma Hellma wurde eine Quarzglasküvette entwickelt, die zwei konzentrische Probenkammern enthält. Die sogenannte Rotationsküvette ist in Abbildung 3.1 dargestellt, wobei links eine Aufsicht und rechts eine Seitenansicht gezeigt ist. Die folgende Übersicht enthält die experimentell wesentlichen geometrischen Daten:

Durchmesser der Küvette:	150 mm
Durchmesser der äußeren Proben-Spur:	130 – 140 mm
Durchmesser der inneren Proben-Spur:	105 – 115 mm
Schichtdicke der Proben-Spuren:	0.2 mm

Durchmesser der Einfüll-Öffnungen: 5 mm
Volumen der Proben-Spuren: innen: 0.35 ml, außen: 0.42 ml

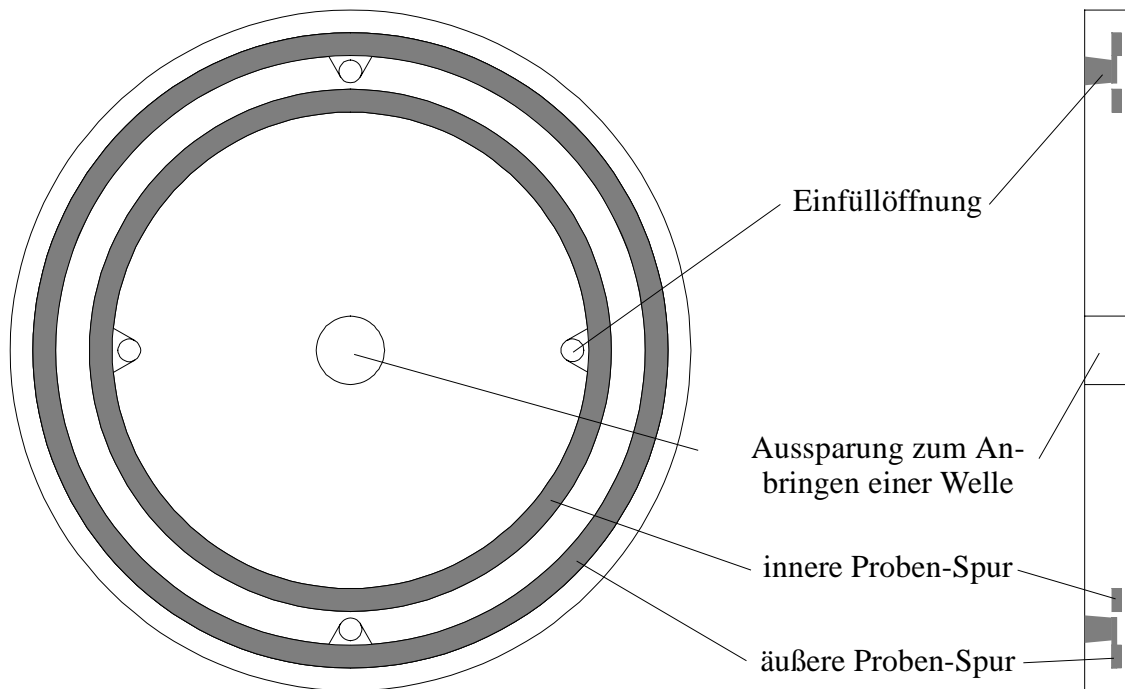


Abbildung 3.1 Rotationsküvette; Die Abbildung zeigt eine vereinfachte schematische Zeichnung. Die linke Zeichnung ist maßstabgetreu. Die Probenkammer der rechten Zeichnung sind zur besseren Ansicht verstärkt dargestellt.

Die runde Aussparung in der Mitte der Küvette dient dem Anbringen einer Motorwelle. Mit einem Elektromotor (Typ SA 2444 S BL2, Fa. Faulhaber) ist man in der Lage, die Rotationsküvette mit einer Frequenz von bis zu 170 Hz rotieren zu lassen. Somit lassen sich Probengeschwindigkeiten von bis zu 70 m/s erreichen. Damit ergibt sich eine Zeitauflösung von 140 ns mit der Rotationsküvette gegenüber 0.67 μ s mit der Jet-Technik.

3.1.1 Montage der Verbindungselemente

Um die Rotationsküvette mit dem Motor zu verbinden, mußten entsprechende Werkstücke aus Aluminium entworfen werden. Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3 zeigen die maßstabgetreuen Zeichnungen.

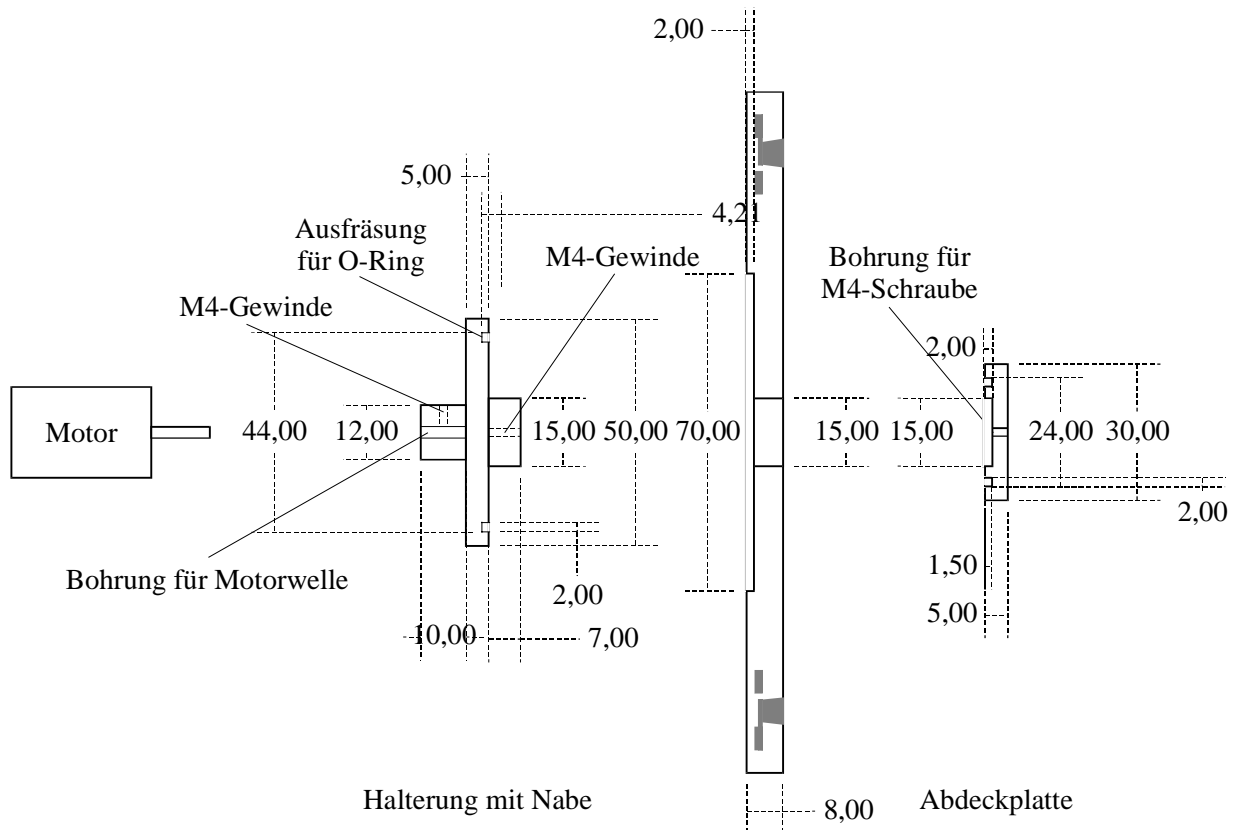


Abbildung 3.2 Verbindungselemente zwischen Rotationsküvette und Antriebsmotor.

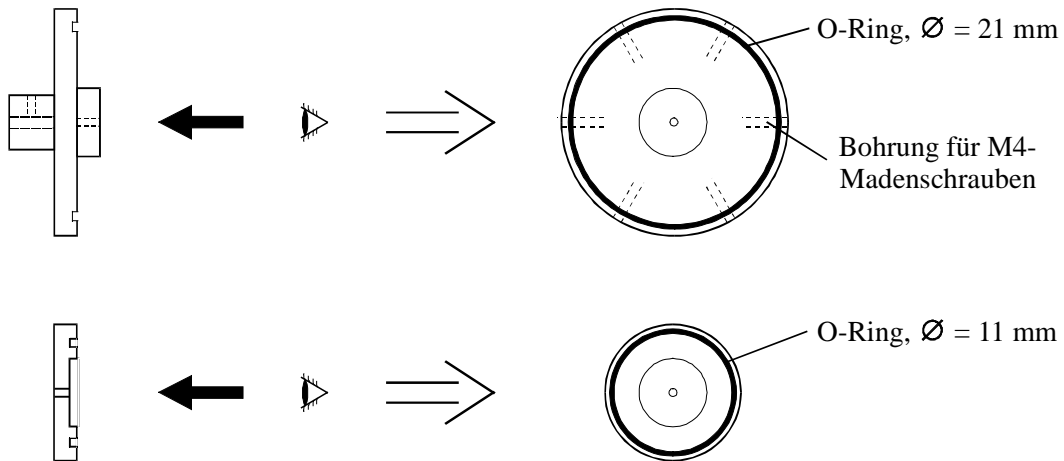


Abbildung 3.3 Seiten- und Aufsicht von Halterung und Abdeckplatte.

Abbildung 3.4 zeigt die Rotationsküvette nach Montage der Verbindungselemente im Idealfall (s. Kapitel 3.1.2).

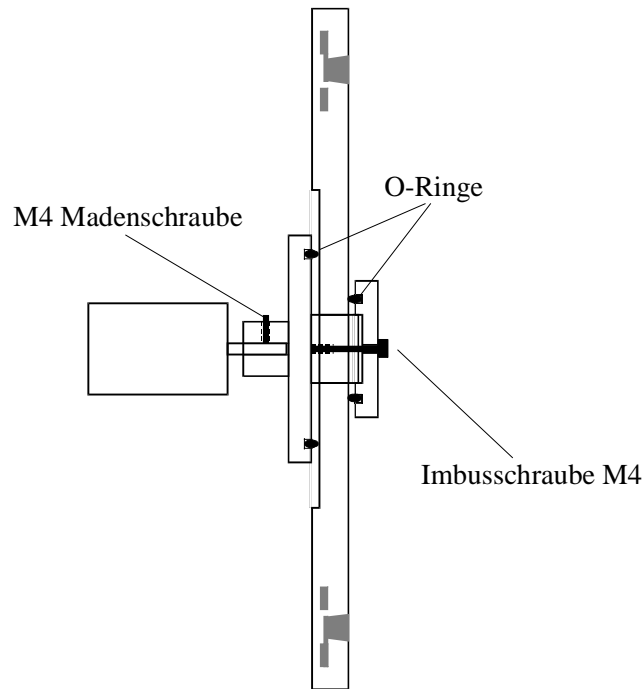


Abbildung 3.4 Rotationsküvette nach erfolgter Montage der Verbindungselemente, nicht maßstabsgetreu.

Zuletzt muß der Motor in eine Halterung eingefügt werden, um die Küvette im Strahlengang justieren zu können.

3.1.2 Auswuchten der Küvette

Um die Küvette als Probenführung im Transientenspektrometer verwenden zu können, müssen nach der Montage der Verbindungselemente zwei Fein-Justagen vorgenommen werden.

3.1.2.1 Justage der Küvette bezüglich der Motorwelle

Zunächst muß sichergestellt werden, daß die Rotationsküvette exakt senkrecht zur Motorwelle ausgerichtet ist. Abbildung 3.5 zeigt den gegenteiligen Fall. Diese „Unwucht“ läßt sich mit einer Meßuhr bestimmen. Es hat sich als zweckmäßig und dauerhaft erwiesen, diese Unwucht durch Unterlegen von Teflonband zwischen Rotationsküvette und Halterung auszugleichen. Mit dieser Methode läßt sich die Unwucht auf weniger als 0.1 mm eingrenzen.

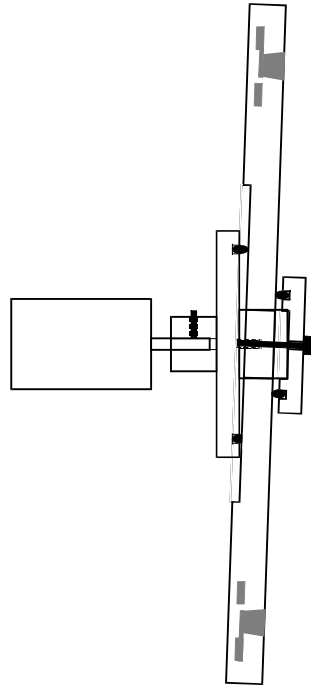


Abbildung 3.5 Die Rotationsküvette liegt schief auf der Welle.

3.1.2.2 Unwucht der Rotationsküvette radial zur Motorwelle

Da die Masse des rotierenden Systems (Küvette mit Halterung und Abdeckplatte) zumeist nicht exakt rotationssymmetrisch verteilt ist, treten beim Drehen des Systems radiale Unwuchten auf. Auf diese Weise erhält man ein schwingfähiges System mit den entsprechenden Eigenfrequenzen. Um die auftretende Unwucht ausgleichen zu können, wurden in die Halterung 6 Bohrungen für M4-Madenschrauben angebracht (s. Abbildung 3.3). Die Detektion der Unwucht wurde durch Anbringen eines Piezo-Elementes (HVPZT-Translator P-17810, Fa. Physik Instrumente) unterhalb des Motors in der dafür vorgesehenen Halterung sichergestellt. Das beim Drehen durch das Piezo-Element hervorgebrachte Signal wurde mit einem Stromverstärker (SR 570, Stanford Research Systems) verstärkt und mit einem Lock-In Verstärker (SR 830, Fa. Stanford Research Systems) verarbeitet. Das dazu notwendige Triggersignal wurde folgendermaßen generiert. Die Rotationsküvette wurde auf der einen Hälfte schwarz getönt und mit einem HeNe-Laser durchleuchtet. Der Laserstrahl wurde dabei auf eine Si-Diode (Model 404, Fa. Spectra Physics) gerichtet. Dieses modulierte Signal wurde als Trigger für den Lock-In Verstärker verwendet. Das durch den Lock-In Verstärker erhaltene Signal wurde dann durch Verdrehen der 6 Madenschrauben schrittweise verringert, bis eine weitere Verringerung der Unwucht durch Drehen der Schrauben nicht mehr möglich war. Die auftretende Unwucht ist, wie bereits angeführt, drehfrequenzabhängig.

Der Vorgang des Auswuchtens wurde bei der Frequenz begonnen, bei der die Unwucht am geringsten war, und bei der Frequenz der stärksten Unwucht beendet. Dadurch konnte sichergestellt werden, daß das „Unwucht-Signal“ bei jeder Frequenz detektiert werden konnte.

3.1.3 Befüllung und Reinigung der Proben-Spuren

3.1.3.1 Befüllung

Die Befüllung einer Proben-Spur kann ohne weitere technische Geräte erfolgen. Dazu wird die Rotationsküvette horizontal gelagert und die zu verwendende Lösung mit einer Pipette in eine Einfüllöffnung getropft. Durch Adhäsionskräfte wird die Lösung blasenfrei in die Spur „gesaugt“. Dieser Vorgang geschieht um so schneller, je geringer die Viskosität der Lösung ist. Bei viskosen Lösungsmitteln, wie z.B. Ethylenglykol, kann dieser Vorgang mehrere Minuten dauern. Zur Beschleunigung des Vorgangs kann mit einem Pipettenhütchen bei der zweiten Einfüllöffnung ein Unterdruck erzeugt werden. Dabei muß darauf geachtet werden, daß immer genügend Lösung in der gegenüberliegenden Einfüllöffnung vorhanden ist, da ansonsten Blasen in die Spur gesaugt werden.

3.1.3.2 Reinigung

Zur Reinigung der Proben-Spur wird mittels einer Wasserstrahlpumpe und einem PE-Schlauch die Lösung aus der Spur entfernt. Anschließend saugt man zur Reinigung Ethanol und Aceton durch die Spur, um sämtliche Reste der zuvor verwendeten Farbstofflösung zu entfernen. Ist eine Reinigung auf diese Weise nicht möglich, so hat sich das Einfüllen von Chromschwefelsäure über Nacht mit anschließender Reinigung bewährt.

3.1.4 Bestimmung der Probengeschwindigkeit v_{Probe}

Zur Bestimmung der Probengeschwindigkeit v_{Probe} verschiebt man die Rotationsküvette im Strahlengang des Transientenspektrometers in der Weise, daß der Meßlaserstrahl durch die Einfüllöffnungen verläuft. Das dadurch modulierte Signal kann man auf einem Oszillograph auswerten und so die Umdrehungsfrequenz und gleichzeitig auch die Probengeschwindigkeit in der jeweiligen Spur bestimmen.

3.1.5 Problem der Kreisbewegung

Da die zu untersuchende Farbstofflösung durch die Rotationsküvette auf einer Kreisbahn bewegt wird, muß untersucht werden, inwieweit dadurch eine störende Abweichung von einer linearen vertikalen Bewegung, wie es im Jet-System zuvor der Fall war, auftritt. Diese kann einerseits berechnet, andererseits durch eine Messung untersucht werden.

3.1.5.1 Berechnung der Abweichung von der linearen vertikalen Bewegung

Zur Berechnung der Abweichung Δy werden die minimalen Radien r_{Min} der beiden Proben-Spuren herangezogen, da bei diesen Δy maximal bezüglich der jeweiligen Spur wird:

$$r_{\text{Min, innen}} = 5.25 \text{ cm}, r_{\text{Min, außen}} = 6.5 \text{ cm}$$

Abbildung 3.6 zeigt zur Veranschaulichung die beschriebene Abweichung Δy .

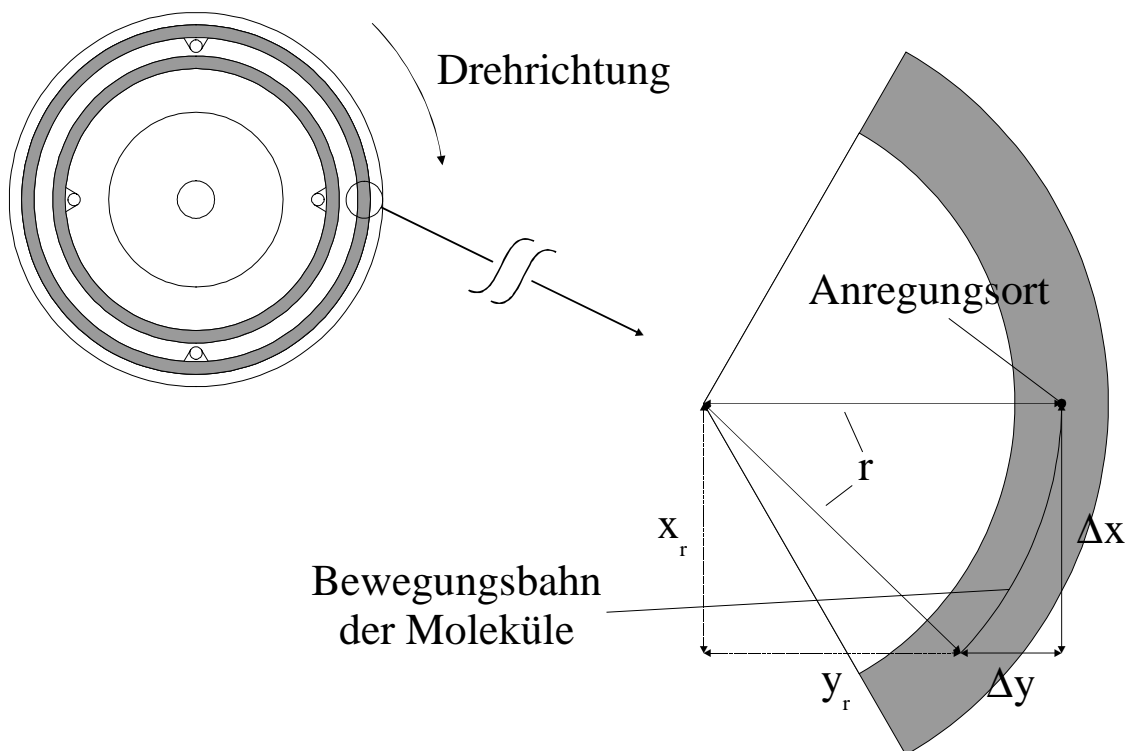


Abbildung 3.6 Abweichung Δy durch Kreisbewegung.

Zur Berechnung verwendet man die Kreisgleichung:

$$x_r^2 + y_r^2 = r^2 \tag{3.2}$$

Weiterhin gilt:
$$y_r + \Delta y = r \quad 3.3$$

Somit erhält man für die Abweichung Δy :

$$\Delta y = r - \sqrt{r^2 - x_r^2} \quad 3.4$$

Bei Messungen mit dem Transientenspektrometer betragen die Abstände Δx maximal 300 μm . Somit ergibt sich für Δy ($x_r = 300 \mu\text{m}$):

$$r_{\text{Min,innen}} = 5.25 \text{ cm} \rightarrow \Delta y = 0.86 \mu\text{m}$$

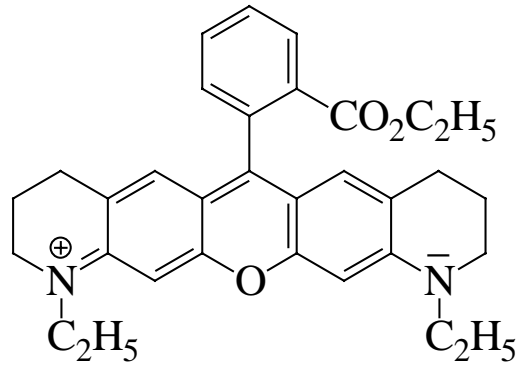
$$r_{\text{Min,außen}} = 6.5 \text{ cm} \rightarrow \Delta y = 0.69 \mu\text{m}$$

Bei einer Abtastung der angeregten Moleküle mit einem Meßlaserstrahl, der auf ca. 8-10 μm fokussiert ist, sind somit Abweichungen von weniger als 1 μm vernachlässigbar. Voraussetzung dafür ist, daß die Anregung an einem geeigneten Ort der Proben-Spur erfolgt. Eine Möglichkeit ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Hier befindet sich der Anregungsfokus vertikal auf halber Höhe der Rotationsküvette. Moleküle, die sich in einem Bereich von $\Delta x = \pm 300 \mu\text{m}$ um den Anregungsort befinden, bewegen sich nahezu ausschließlich in vertikaler Richtung. Somit läßt sich die Rotationsküvette problemlos als Probenführung einsetzen.

3.1.5.2 Auffinden des optimalen Anregungsortes

Die Berechnung aus Kapitel 3.1.5.1 hat gezeigt, daß bei der Wahl eines geeigneten Anregungsortes eine nahezu vertikale Bewegung der Moleküle vorliegt. Um die Rotationsküvette in der dazu notwendigen Weise im Strahlengang zu justieren, werden Messungen durchgeführt, die die Verteilung der angeregten Moleküle in x- und y-Richtung zeigen (sogenannte „2D-Messungen“). Dazu wird die Probe nicht nur in x- sondern auch in y-Richtung (s. Abbildung 2.1) mit dem Meßlaserstrahl abgetastet. Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8 zeigen eine Messung (DR 25 in Ethylenglykol), bei der die Rotationsküvette nicht in der optimalen Höhe im Strahlengang positioniert ist. Man sieht deutlich die Abweichung des Signal-Maximums in y-Richtung. Nach der Einstellung einer nahezu optimalen Position der Rotationsküvette im Strahlengang erhält man eine Messung, die durch die Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10 dargestellt ist. Hier verläuft das Maximum des Signals

nahezu parallel zur y-Achse. Die korrekte Höhen-Justage der Rotationsküvette im Strahlengang ist Voraussetzung für die Durchführung von Messungen, die mit der Jet-Technik vergleichbar sind.



DR 25

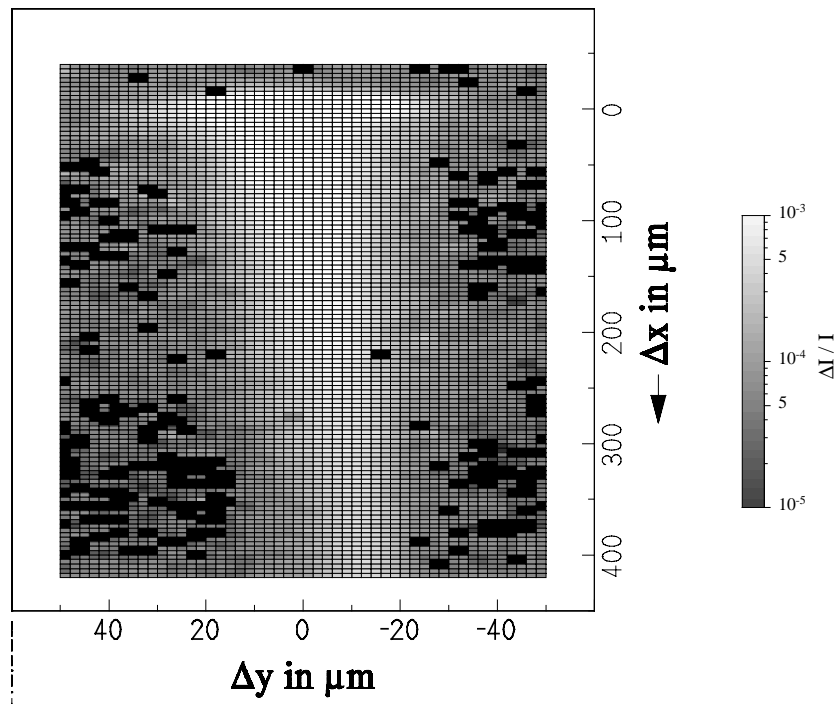


Abbildung 3.7 Die Höhe der Rotationsküvette ist nicht optimal im Strahlengang ausgerichtet; Ausbleichmessung von DR 25 in Ethylenglykol.

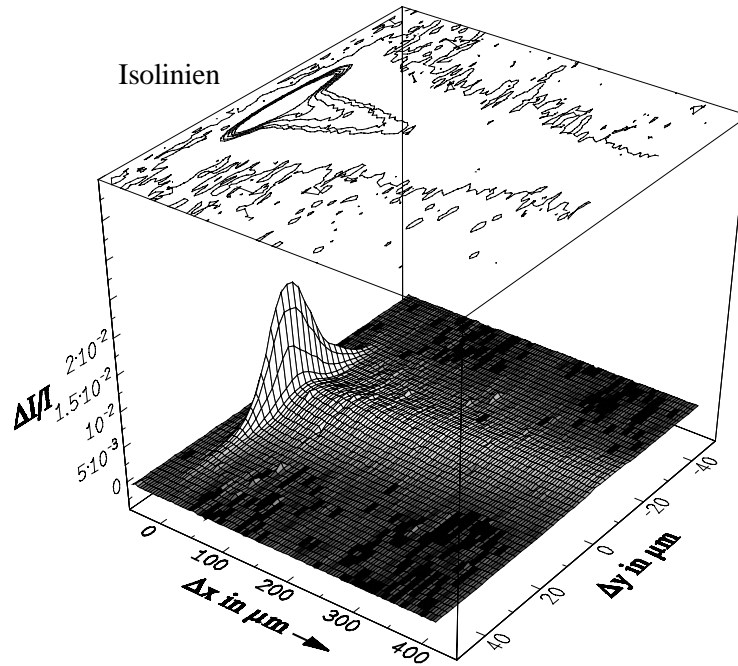


Abbildung 3.8 3D-Darstellung der Messung aus Abbildung 3.7; Zusätzlich sind Isolinien eingezeichnet, die den Verlauf des Signal-Maximums verdeutlichen sollen.

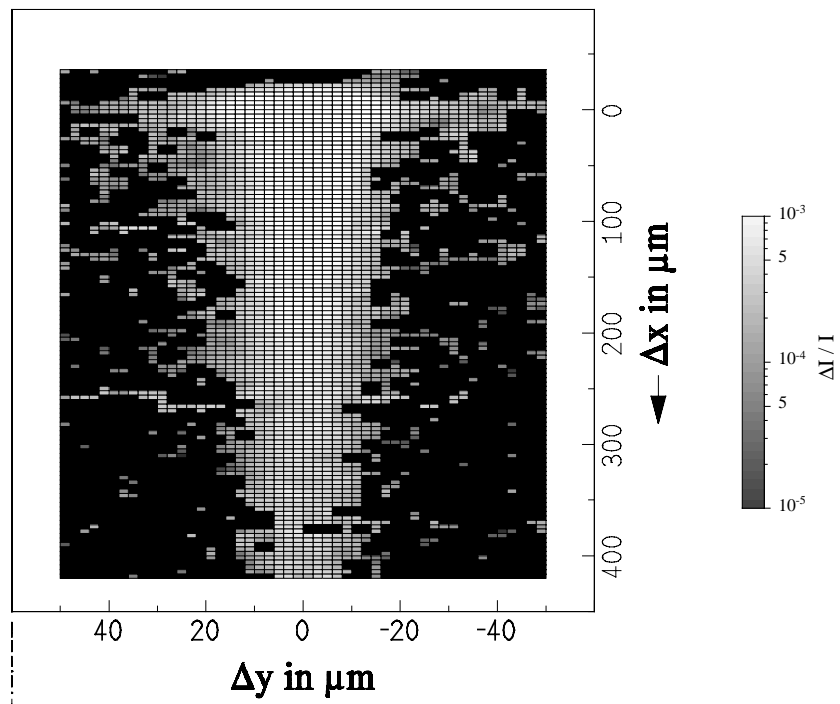


Abbildung 3.9 Die Höhe der Rotationsküvette ist nahezu optimal im Strahlengang ausgerichtet; Ausbleichmessung von DR 25 in Ethylenglykol.

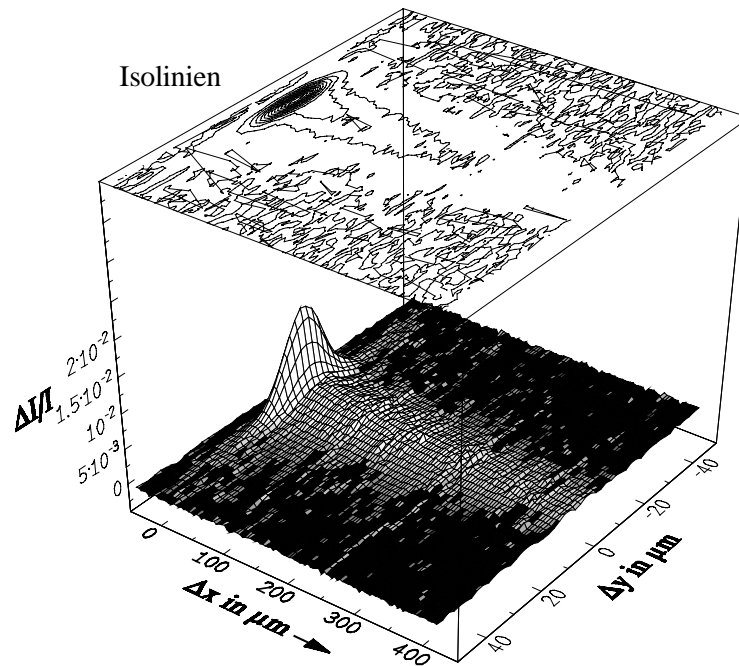


Abbildung 3.10 3D-Darstellung der Messung aus Abbildung 3.9; Zusätzlich sind Isolinien eingezeichnet, die den Verlauf des Signal-Maximums verdeutlichen sollen.

3.2 Überprüfen des neuen Systems

Bevor die neue Rotationsküvetten-Technik genutzt werden kann, muß das System anhand von Probemessungen überprüft werden. Die folgenden Fragestellungen müssen dazu beantwortet werden.

- 1) Liefern Messungen, die mit der Rotationsküvette durchgeführt werden, die gleichen Ergebnisse, wie Messungen mit der Jet-Technik?
- 2) Liefern Messungen in den beiden Spuren der Rotationsküvette die gleichen Ergebnisse? Lassen sich also die beiden Spuren zur Durchführung von Referenzmessungen nutzen?
- 3) Wie verhält sich die Signalthöhe $\Delta I/I$ am Signal-Maximum beim Vergleich der beiden Spuren?
- 4) Liefern die beiden Spuren das gleiche Verhalten für 2D-Messungen (vgl. 3.1.5.2)?
- 5) Wird die Meßzeit durch das geringe Probenvolumen eingeschränkt?

- 6) Ist der Einsatz niederviskoser Lösungsmittel unproblematisch?
- 7) Ergibt sich bei Variation der Probengeschwindigkeit ein konstanter Wert für die Abklingdauer und die Intersystem-Crossing Ratenkonstante?

3.2.1 Vergleich zwischen Messungen mit Rotationsküvette und Flüssigkeitsjet

Zur Überprüfung, ob beide Verfahren die gleichen Ergebnisse liefern, wurden Ausbleichmessungen von Rhodamin 6G in Ethylenglykol durchgeführt. Zu diesem Farbstoff liegen in [22, 24, 25] Vergleichswerte mit dem Jet-System vor. Abbildung 3.11 zeigt eine Messung mit dem neuen Rotationsküvetten-System, während Tabelle 3.1 die Ergebnisse gegenüberstellt. Dabei muß beachtet werden, daß bei der Rotationsküvetten-Technik die Messung mit paralleler Ausrichtung der Polarisationsrichtungen von Anregungs- und Meßlaserstrahl durchgeführt wurde. Die so ermittelte Meßgröße k_{ST}^{\parallel} (vgl. Kap. 2.3.4.1) ist nach [24] in Ethylenglykol um 30 % geringer als die Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} . Dieser Faktor ist in Tabelle 3.1 berücksichtigt. Die Ergebnisse zeigen, daß die mit der Rotationsküvetten-Technik erhaltenen Ergebnisse gut mit den Werten übereinstimmen, die mit der Jet-Technik gewonnen wurden. Der Ersatz des Flüssigkeitsjets durch die Rotationsküvette ist somit gerechtfertigt.

Tabelle 3.1 Gegenüberstellung der Meßergebnisse für Rotationsküvetten- und Jet-Technik für Rhodamin 6G in Ethylenglykol.

	Rotationsküvette	Jet nach [22]	Jet nach [24]	Jet nach [25]
k_{ST} in 10^5 s^{-1}	7.4 ¹	7.5	6.4	7.6
τ_T in μs	5.1	5	4.5	4.6

¹ – vergleiche Übersichtstabelle im Anhang

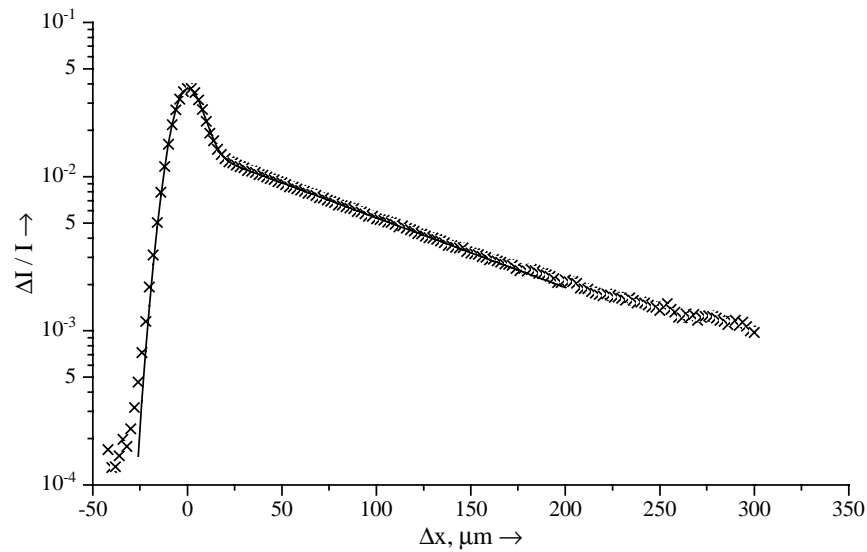


Abbildung 3.11 Messung mit dem neuen Rotationsküvetten-System; x – Messung, - - Fit, Rhodamin 6G in Ethylenglykol, Anregung: 514.5 nm (120 mW, vertikal polarisiert), Messung: 533 nm (10 mW, vertikal polarisiert), Extinktionen (0.2 mm): 533 nm – 1.4, 514.5 nm – 0.7, $v_{Probe} = 14.3$ m/s (äußere Spur).

3.2.2 Vergleich zwischen Messungen in innerer und äußerer Proben-Spur

Einer der genannten Vorteile der Rotationsküvetten-Technik soll darin bestehen, daß die Möglichkeit der Referenzmessung gegeben ist. Dazu muß sichergestellt sein, daß Messungen in innerer und äußerer Proben-Spur mit identischen Proben die gleichen Ergebnisse liefern. Um dies zu überprüfen wurden wiederum Ausbleichmessungen mit Rhodamin 6G in Ethylenglykol in beiden Proben-Spuren durchgeführt. Folgende Fragen sollen dabei beantwortet werden:

- 1) Erhält man trotz der unterschiedlichen Probengeschwindigkeiten v_{Probe} in den beiden Proben-Spuren (um möglichst wenige Meßparameter zu verändern wurde bei den Vergleichsmessungen die Rotationsfrequenz der Rotationsküvette nicht verändert) die gleichen Werte für die Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} und die Triplett-Lebensdauer τ_T ?
- 2) Bleibt beim Wechsel der Proben-Spur durch Verschieben der Rotationsküvette im Strahlengang die Fokussierung der Laserstrahlen (Parameter a) gleich?
- 3) Ergibt der Vergleich der Signalmaxima ($\Delta I/I_{max}$) ein Verhalten, welches man für unterschiedliche Probengeschwindigkeiten bei identischer Probe erwartet?

- 4) Erhält man in beiden Proben-Spuren vergleichbare 2D-Messungen (vgl. Kapitel 3.1.5.2)?

In Abbildung 3.12 ist der direkte Vergleich der Messungen in innerer und äußerer Spur gezeigt. Die Meßergebnisse sind in Tabelle 3.2 zusammengefaßt.

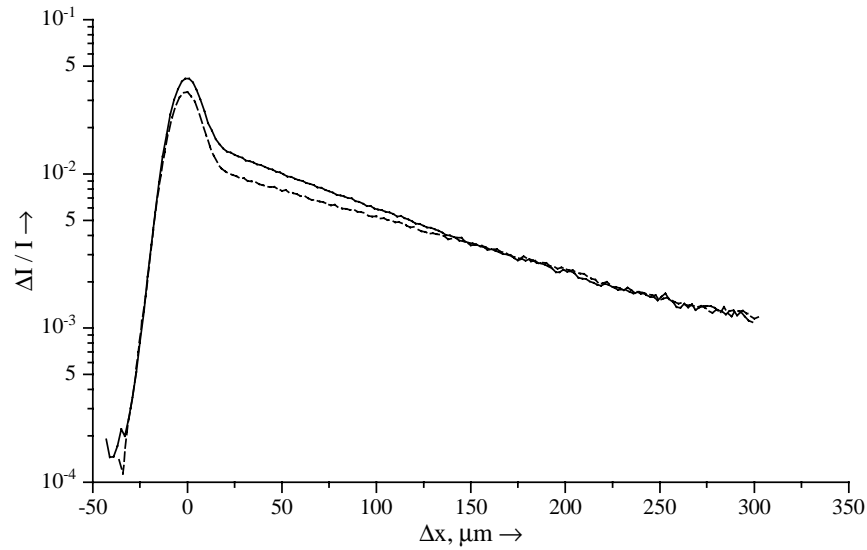


Abbildung 3.12 Ausbleichmessungen Rhodamin 6G in Ethylenglykol in innerer (–) und äußerer (---) Proben-Spur; Anregung: 514.5 nm (120 mW, vertikal polarisiert), Messung: 533 nm (10 mW, vertikal polarisiert), Extinktionen (0.2 mm): 533 nm – 1.4, 514.5 nm – 0.7, Rotationsfrequenz: 54 Hz.

Tabelle 3.2 Vergleich der Meßergebnisse von Rhodamin 6G in Ethylenglykol von innerer mit äußerer Proben-Spur.

Proben-Spur / Durchmesser	Rotationsfrequenz	v_{Probe}	k_{ST}	τ_{T}	$\Delta I/I_{\text{max}}$	a
	Hz	m/s	10^5 s^{-1}	μs	10^{-2}	μm
innen / 11 cm	54	18.7	7.3	5.2	4.1	10.9
außen / 13.5 cm		22.9	7.1	5.4	3.4	11.1

Anhand dieser Ergebnisse lassen sich die ersten drei Fragen positiv beantworten. Die Meßergebnisse, die man für k_{ST} , τ_T und a mit den beiden Proben-Spuren erhält, sind nahezu identisch. Auch der Vergleich der Signalmaxima zeigt das Verhalten, das nach der aufgestellten Theorie (s. Kapitel 2.3) zu erwarten ist. Demnach ist die Besetzung des S_1 -Zustandes wie erwartet unabhängig von der im Experiment erreichbaren Probengeschwindigkeit. Die Besetzung des T_1 -Zustandes dagegen ist direkt proportional zur Probengeschwindigkeit. Damit erhält man ebenfalls eine direkte Proportionalität zwischen dem Meßsignal $\Delta I/I$ und der Probengeschwindigkeit v_{Probe} : Je kleiner die Probengeschwindigkeit ist, desto größer wird das Signalmaximum bei der Ausbleichmessung. Das Verhältnis der Probengeschwindigkeiten in innerer und äußerer Proben-Spur bei gleicher Rotationsfrequenz ergibt sich aus den unterschiedlichen Radien. Dabei wurde für beide Proben-Spuren der mittlere Radius angenommen (s. Zeichnung in Abbildung 3.2):

$$\frac{v_{Probe,außen}}{v_{Probe,innen}} = \frac{r_{außen}}{r_{innen}} = \frac{13.5}{11} = 1.23 \quad 3.3$$

Somit müßte das Signalmaximum in der inneren Proben-Spur um 23 % größer sein als in der äußeren, wenn man Messungen mit identischen Proben bei konstanter Rotationsfrequenz durchführt. Aus Tabelle 3.2 geht hervor, daß das in der inneren Proben-Spur bestimmte Signalmaximum um 21 % größer ist, als das in der äußeren Spur bestimmte. Dieser Wert stimmt sehr gut mit der Theorie überein.

Die in beiden Proben-Spuren durchgeführten 2D-Messungen sind in Abbildung 3.13 bis Abbildung 3.16 dargestellt. Auch hier zeigt sich, daß man mit beiden Proben-Spuren gleiche Ergebnisse erhält (selbstverständlich unterscheiden sich die beiden Messungen durch die Probengeschwindigkeit). Als Ergebnis läßt sich somit festhalten, daß durch das Rotationsküvetten-System die Möglichkeit der Referenzmessungen gegeben ist.

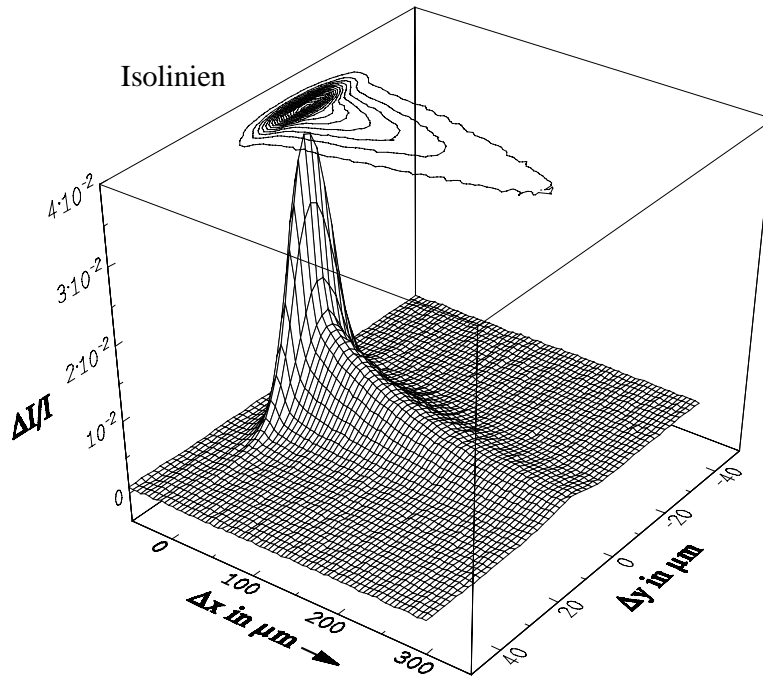


Abbildung 3.13 2D-Ausbleichmessung von Rhodamin 6G in Ethylenglykol; Parameter s. Abbildung 3.12; innere Proben-Spur, $v_{Probe} = 18.7$ m/s.

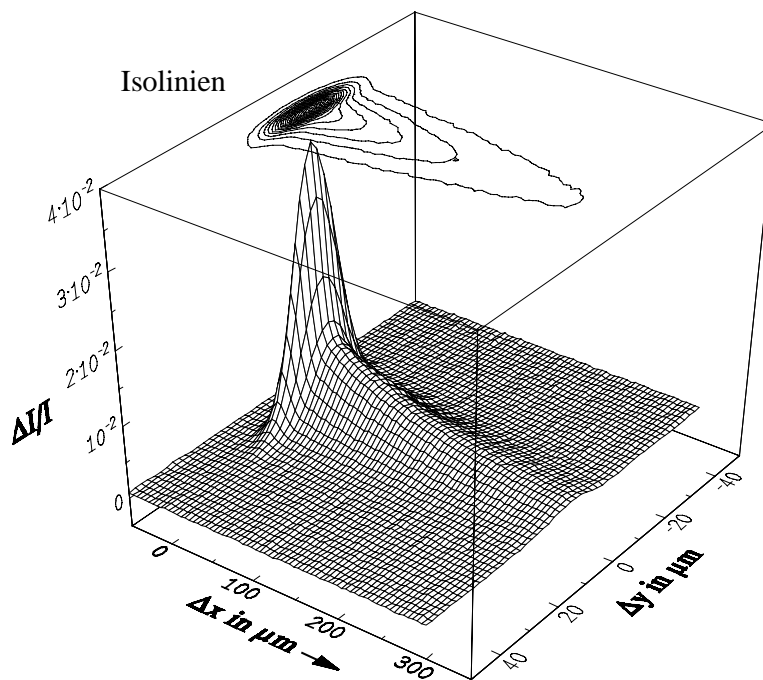


Abbildung 3.14 2D-Ausbleichmessung von Rhodamin 6G in Ethylenglykol; Parameter s. Abbildung 3.12; äußere Proben-Spur, $v_{Probe} = 22.9$ m/s.

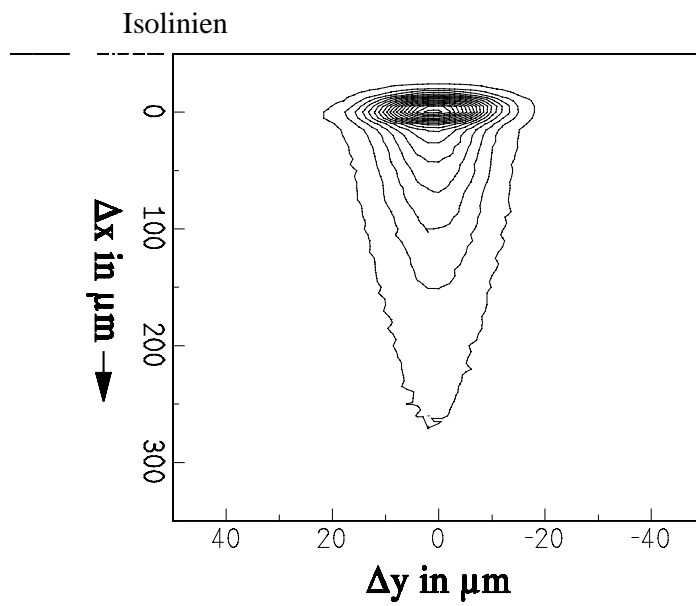


Abbildung 3.15 Isoliniendarstellung von Abbildung 3.13.

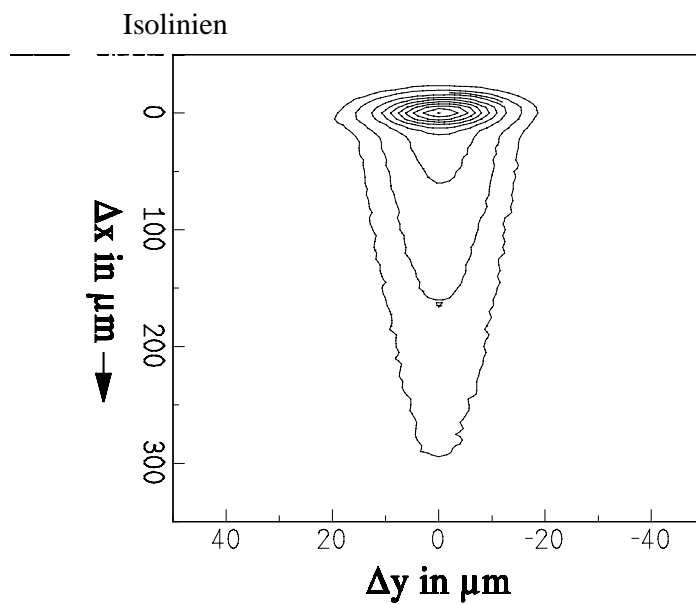


Abbildung 3.16 Isoliniendarstellung von Abbildung 3.14.

3.2.3 Problem des geringen Probenvolumens

Das bei den Vorteilen der Rotationsküvette diskutierte geringe Probenvolumen hat bei Proben, die eine geringe Photostabilität aufweisen, Nachteile. Hier kann die gesamte Probe

wesentlich schneller photozerstört werden als bei dem verhältnismäßig großen Probenvolumen von ca. 50 ml beim Jet-System. Die folgenden Messungen sollen dieses Problem untersuchen. Untersucht wurde eine Lösung von Rhodamin 6G in Ethylenglykol, die in beide Proben-Spuren eingefüllt wurde. Nach jeweils einem Zeitintervall von 30 Minuten wurden in einem Zeitraum von 4 Stunden insgesamt 9 Ausbleichmessungen in beiden Proben-Spuren durchgeführt. Die äußere Proben-Spur wurde während der 4 Stunden durchgehend der Laserstrahlung ausgesetzt (mit Ausnahme der zu vernachlässigenden Meßzeit für die innere Proben-Spur), während dies in der inneren Spur nur während der jeweiligen Ausbleichmessungen der Fall war. Durch den direkten Vergleich mit den Ergebnissen der inneren Proben-Spur soll sichergestellt werden, daß zwischen der Dauerbestrahlung und anderen Ursachen für etwaige Veränderungen der Meßergebnisse unterschieden werden kann. Abbildung 3.17 und Abbildung 3.18 zeigen die Ergebnisse für innere und äußere Proben-Spur. Zur besseren Übersicht sind nur jeweils 5 der 9 durchgeführten Ausbleichmessungen dargestellt.

Man erkennt deutlich, daß die Messungen in der inneren Spur innerhalb der 4 Stunden identisch sind. Dagegen ist in der äußeren Proben-Spur eine deutliche Veränderung der Meßergebnisse mit zunehmender Bestrahlungszeit zu erkennen. Zusätzlich ließ sich bei genauerer Betrachtung erkennen, daß sich nach 4 Stunden Bestrahlung eine Spur in die Proben-Lösung „gebrannt“ hatte. Diese zeichnete sich durch eine geringere Färbung gegenüber den anderen Bereichen der Proben-Spur aus. Diese Beobachtung spiegelt sich in den ermittelten Molekülparametern τ_T und k_{ST} wieder. Die Abklingdauer des Triplet-Zustandes nimmt mit der Zeit der Bestrahlung der Probe zu. Da allgemein angenommen wird, daß der Triplet-Zustand durch molekularen Sauerstoff gelöscht wird [22, 26], kann man folgende Erklärung für das beobachtete Verhalten heranziehen. Die angeregten Rhodamin 6G-Moleküle werden durch eine Reaktion mit Sauerstoff photozerstört. Dadurch verarmt die Proben-Lösung an Sauerstoff, der durch die Einfüllöffnung nur gering oder gar nicht nachgeliefert werden kann. Dadurch wird die Triplet-Lebensdauer τ_T erhöht. Im Gegensatz zur Triplet-Lebensdauer nimmt der Wert für die Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} in der äußeren Proben-Spur mit der Zeit ab. Auch dies läßt sich mit der Verarmung der Proben-Lösung an Sauerstoff erklären. Nach [22, 27, 28, 29] ist die Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} proportional zur Konzentration an molekularem Sauerstoff in der Proben-Lösung. Demnach führt die Verarmung an Sauerstoff zu einer Verminderung von k_{ST} .

In der Tabelle 3.3 sind die Ergebnisse aller Ausbleichmessungen aufgeführt. Zusätzlich ist dort der ermittelte Wert für die Größe des Laserfokus a angegeben. Dieser soll dokumentieren, daß sich während der Meßzeit von 4 Stunden keine Änderungen an der optischen Justage ergeben haben.

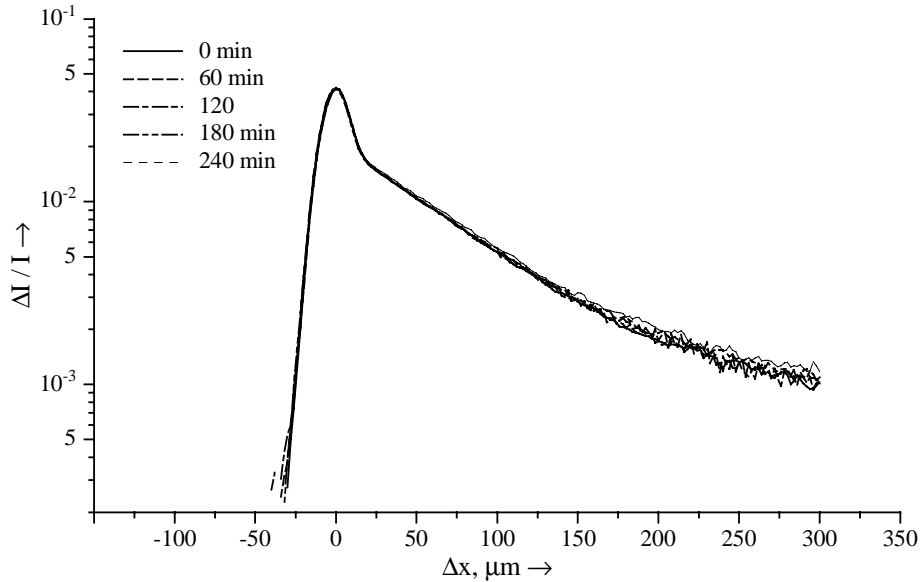


Abbildung 3.17 Zeitabhängige Ausbleichmessungen mit Rhodamin 6G in Ethylenglykol (innere Spur); Anregung: 514.5 nm (120 mW, vertikal polarisiert), Messung: 533 nm (10 mW, vertikal polarisiert), Extinktionen (0.2 mm): 533 nm – 1.4, 514.5 nm – 0.7, $v_{\text{Probe}} = 14.2$ m/s.

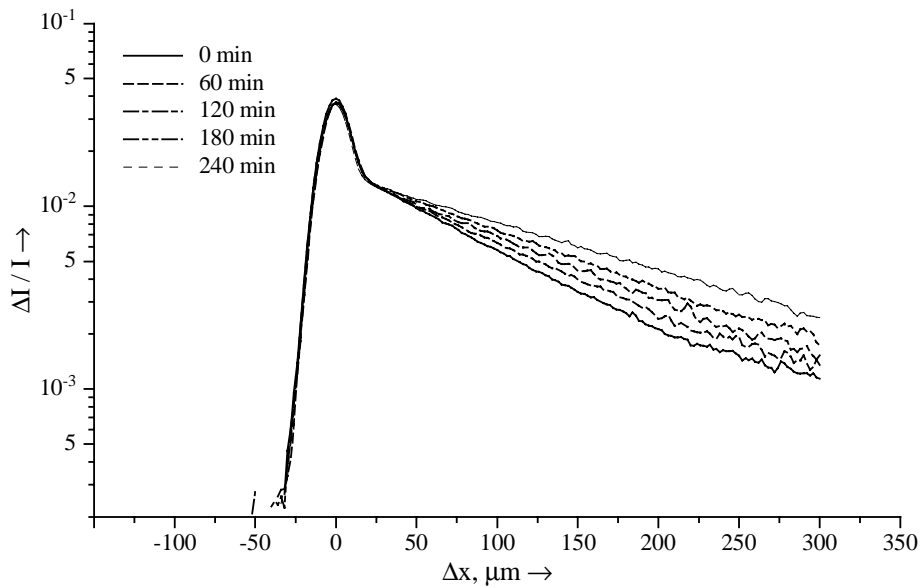


Abbildung 3.18 Zeitabhängige Ausbleichmessungen mit Rhodamin 6G in Ethylenglykol (äußere Spur); $v_{\text{Probe}} = 17.5$ m/s, weitere Meßparameter s. Abbildung 3.17.

Tabelle 3.3 Zusammenfassung der zeitabhängigen Ausbleichmessungen mit Rhodamin 6G in Ethylenglykol (Meßparameter s. Abbildung 3.17).

Proben-Spur	Zeit in Minuten	τ_T in μs	k_{ST} in s^{-1}	a in μm
innen (ohne Dauerbestrahlung)	0	5.2	7	11.7
	30	5.3	6.9	11.7
	60	5.2	7.1	11.7
	90	5.4	6.7	11.7
	120	5.3	7	11.8
	150	5.2	7	11.7
	180	5.4	6.9	11.6
	210	5.4	7	11.7
	240	5.3	7	11.7
außen (mit Dauerbestrahlung)	0	5.4	6.9	11.8
	30	5.8	6.9	11.8
	60	6.2	6.7	11.9
	90	6.5	6.7	11.8
	120	7.1	6.4	11.9
	150	7.5	6.4	12
	180	7.8	6.4	12
	210	8.8	6.3	11.8
	240	9.6	6.3	11.9

Mit den ermittelten Ergebnissen lassen sich folgende Aussagen treffen. Ausbleichmessungen mit photostabilen Laserfarbstoffen wie Rhodamin 6G lassen sich bei den gewählten Meßparametern nach spätestens 30 Minuten Dauerbestrahlung nicht mehr reproduzieren. Daher sollte in jedem Fall eine Ausbleichmessung eine möglichst kleine Zeitspanne beanspruchen. Die wiederholten Messungen in der inneren Spur haben gezeigt, daß mehrfache Messungen, die jeweils ca. 1-2 Minuten dauern, keine Probleme bezüglich der Photostabilität aufwerfen. Um die Zeitspanne für eine Messung zu erhöhen, wurde die Positionierung der Rotationsküvette im Strahlengang mit einem Linearmeßtisch (Modell LM 60, Fa. Owis) vorgenommen. Dieser konnte mit einer Steuereinheit programmiert werden. Damit ist es möglich, die Rotationsküvette während einer Messung horizontal innerhalb der gewählten Proben-Spur und senkrecht zur Einstrahlrichtung hin- und her zu bewegen und so

das gesamte Volumen der Proben-Spur zu bestrahlen. Da dadurch der Durchmesser der Kreisbewegung und somit auch die Probengeschwindigkeit während einer Messung permanent in geringem Maße verändert wurde, wurde als Mittelpunkt der Bewegung die Mitte der jeweiligen Proben-Spur gewählt. Als Durchmesser zur Bestimmung der Probengeschwindigkeit v_{Probe} diente der mittlere Proben-Spur-Durchmesser (innere Proben-Spur: 11 cm, äußere Proben-Spur: 13.5 cm).

3.2.4 Einsatz niederviskoser Lösungsmittel

Ein weiterer Vorteil der Rotationsküvetten-Technik wurde mit dem Einsatz nahezu beliebiger Lösungsmittel genannt. Durch die Messung von Rhodamin 6G in Ethanol soll dies stellvertretend für niederviskose Lösungsmittel überprüft werden. Abbildung 3.19 zeigt die entsprechend Ausbleichmessung. Im Gegensatz zu den Messungen in Ethylenglykol ist in niederviskosen Lösungsmitteln wie Ethanol kein Unterschied zwischen den Meßgrößen $k_{\text{ST}}^{\parallel}$ und k_{ST}^{\perp} meßbar, d.h., der Zahlenwert von $k_{\text{ST}}^{\parallel}$ und k_{ST}^{\perp} ist dementsprechend identisch mit dem der Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} (vgl. Kapitel 2.3.4.1). Die Ausbleichmessung ergibt, daß Rhodamin 6G in Ethanol eine wesentlich geringere Triplett-Lebensdauer und eine größere Ratenkonstante für Intersystem-Crossing als in Ethylenglykol aufweist. Gleichzeitig wird deutlich, daß der Einsatz von Ethanol als Lösungsmittel keine Schwierigkeiten aufwirft. Allerdings muß die Probengeschwindigkeit v_{Probe} stark erhöht werden, um die kurze Triplett-Lebensdauer bestimmen zu können. Man erhält:

Rhodamin 6G in Ethanol: $k_{\text{ST}} = 2.5 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$, $\tau_{\text{T}} = 390 \text{ ns}$

(Vergleiche Übersichtstabelle im Anhang)

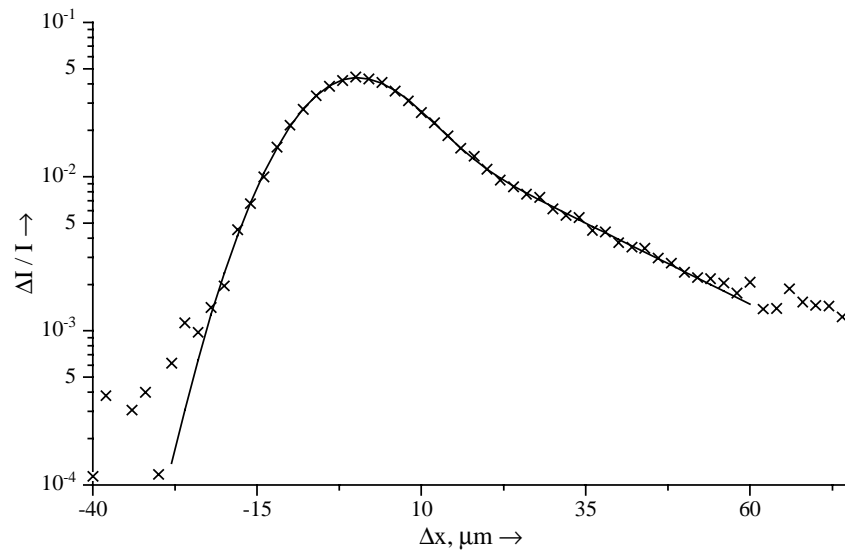


Abbildung 3.19 Ausbleichmessung von Rhodamin 6G in Ethanol; x – Messung, – – Fit, Anregung: 530.9 nm (80 mW, horizontal polarisiert), Messung: 514.5 nm (5 mW, horizontal polarisiert), Extinktionen (0.2 mm): 530.9 nm – 1.14, 514.5 nm – 0.63, $v_{\text{Probe}} = 53.3$ m/s.

Beim Einsatz von Lösungsmitteln mit hohem Dampfdruck muß darauf geachtet werden, daß die Probelösung während einer Messung nicht verdampft. Dies kann dadurch verhindert werden, daß die Einfüllöffnungen durch speziell angefertigte Stopfen verschlossen werden. Durch dieses Verschließen der Proben-Spur ist es nun auch möglich, Probelösungen einzufüllen, die z.B. durch das Spülen mit einer bestimmten Gasmischung auf einen genau bestimmten Sauerstoffgehalt eingestellt wurden. Das Verschließen verhindert dabei einen Austausch mit der herrschenden Atmosphäre. Diese Anwendung wird in Kapitel 4 genauer beschrieben.

3.2.5 Variation der Probengeschwindigkeit v_{Probe}

Um zu überprüfen, ob durch die Variation der Probengeschwindigkeit unterschiedliche Werte für die Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} und die Triplett-Lebensdauer τ_{T} erhalten werden, wurde eine Lösung von DR 25 in Ethylenglykol untersucht. Dabei wurde die Probengeschwindigkeit in einem Bereich zwischen 17 und 47 m/s variiert. Abbildung 3.20 zeigt die Ausbleichmessungen als Funktion des Ortes, Abbildung 3.21 zeigt die Ergebnisse nach Umrechnung auf die Zeit als x-Koordinate. Die Tabelle 3.4 faßt die Ergebnisse zusammen.

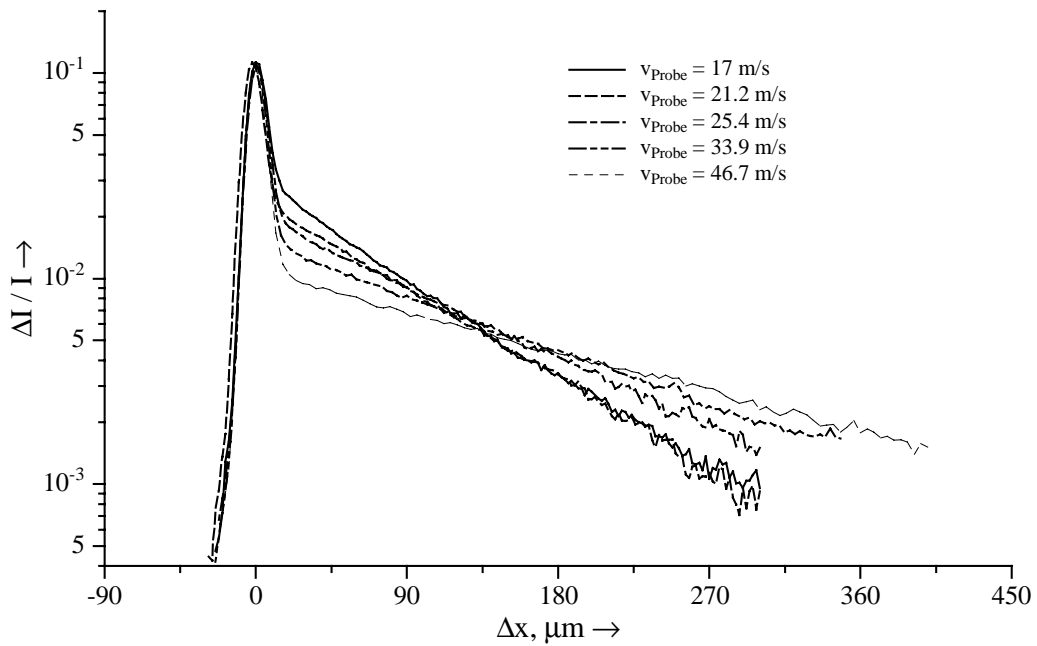


Abbildung 3.20 Ausbleichmessung von DR 25 in Ethylenglykol; Anregung: 568.2 nm (180 mW, horizontal polarisiert), Messung: 550 nm (9 mW, horizontal polarisiert), Extinktionen (0.2mm): 568.2 nm – 0.64, 550 nm – 0.3.

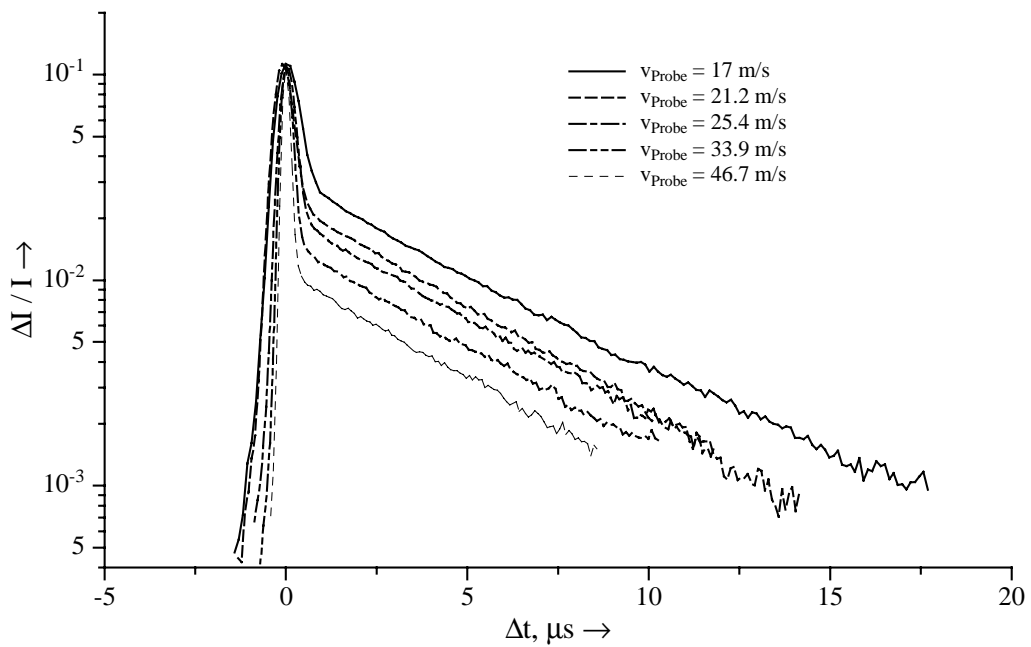


Abbildung 3.21 Darstellung der Ausbleichmessungen aus Abbildung 3.20 umgerechnet auf die Zeit als x-Koordinate.

Tabelle 3.4 Ergebnisse der Ausbleichmessungen von DR 25 in Ethylenglykol. Meßparameter s. Abbildung 3.20.

v_{Probe} in m/s	k_{ST} in 10^5 s^{-1}	τ_{T} , in μs
17 m/s	6.3	4.6
21.2	6	4.2
25.4	6	4.4
33.9	5.9	4.2
46.7	6	4.2

vergleiche Übersichtstabelle im Anhang

Wie zu erwarten liefern alle Messungen im Rahmen der Meßgenauigkeit identische Ergebnisse. Gleichzeitig erkennt man, daß sich bei Erhöhung der Probengeschwindigkeit weniger Moleküle im Triplet-Zustand akkumulieren können. Dies zeigt sich an kleineren Werten für $\Delta I/I$ beim Triplet-Anteil des Meßsignals. Für die Anwendbarkeit des Rotationsküvetten-Systems ergeben die Messungen, daß eine Ausbleichmessung bei jeder beliebigen Probengeschwindigkeit durchgeführt werden kann.

3.3 Zusammenfassung

Im vorliegenden Kapitel wurde mit der Rotationsküvette eine Weiterentwicklung des in Kapitel 2 beschriebenen Transientenspektrometers vorgestellt. Es wurde beschrieben, wie die Rotationsküvette für den Einsatz als Probenführung vorbereitet, befüllt und gereinigt wird. Es wurden erste Probemessungen durchgeführt, die zur Überprüfung der Anwendbarkeit des neuen Systems dienten. Dabei zeigte sich, daß mit der neuen Rotationsküvetten-Technik Meßergebnisse, die mit der Jet-Technik erzielt wurden, problemlos reproduziert werden können. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß sich die zwei in der Rotationsküvette eingearbeiteten Proben-Spuren für direkte Referenzmessungen verwenden lassen. Durch die konzentrischen runden Proben-Spuren ergaben sich zwei Probleme. Zum einen bewegen sich die Moleküle im untersuchten vertikalen Meßbereich von ca. 300 μm nicht exakt geradlinig. Sowohl die Berechnung als auch die Überprüfung durch 2D-Messung nach erfolgter Justage der Rotationsküvette im Strahlengang zeigten, daß die Abweichung von der geradlinigen Bewegung vernachlässigbar ist. Zum anderen ergeben sich durch das geringe Probenvolumen Schwierigkeiten bei Messungen mit photoinstabilen Proben. Die Überprüfung dieses Sachverhaltes ergab, daß durch eine Beschränkung auf eine kurze Meßzeit und durch die Programmierung einer Hin- und Herbewegung der Rotationsküvette im Strahlengang dieses

Problem minimiert werden kann. Bei der Variation der Probengeschwindigkeit hat sich gezeigt, daß dies keinen Einfluß auf die Bestimmung der Parameter τ_T und k_{ST} ausübt. Messungen mit dem neuen Rotationsküvetten-System können somit bei Probengeschwindigkeiten von bis zu 70 m/s durchgeführt werden. Zuletzt konnte gezeigt werden, daß der Einsatz niederviskoser Lösungsmittel problemlos möglich ist. Dabei läßt sich das Verdampfen von Lösungsmitteln mit hohem Dampfdruck durch das Verschließen der Einfüllöffnungen mit speziell angefertigten Stopfen verhindern. Somit steht mit der Rotationsküvetten-Technik ein verbessertes Meßsystem zur Verfügung, das die folgenden Vorteile gegenüber der alten Jet-Technik aufweist:

- 1) Die Probengeschwindigkeit ist in einem Bereich bis ca. 70 m/s beliebig einstellbar. Dadurch erhält man eine verbesserte zeitliche Auflösung τ_{Min} von ca. 100-200 ns (gegenüber 0.7 μ s mit der Jet-Technik).
- 2) Durch die beiden in die Rotationsküvette eingearbeiteten Proben-Spuren sind Referenzmessungen möglich.
- 3) Durch das geringe Volumen der Proben-Spuren (ca. 0.5 ml, Schichtdicke: 0.2 mm) ist eine um den Faktor 200 geringere Probenmenge als bei der Jet-Technik (ca. 50 ml, Schichtdicke: 0.1 mm) für eine Ausbleichmessung notwendig. z. B. Rhodamin 6G: Küvetten-Technik – ca. 0.1 mg, Jet-Technik – ca. 20 mg.
- 4) Der Austausch einer Proben-Lösung läßt sich sehr schnell durchführen.
- 5) Es lassen sich nahezu alle Lösungsmittel einsetzen.
- 6) Der Gasgehalt der Proben-Lösungen läßt sich einstellen.

4 Anwendung der neuen Rotationsküvetten-Technik

Nachdem im Kapitel 3 die Anwendbarkeit der neuen Rotationsküvetten-Technik überprüft worden ist, sollen im vorliegenden Kapitel Messungen vorgestellt werden, die in dieser Form mit der Jet-Technik nicht möglich waren. Zunächst werden Ausbleichmessungen von Laserfarbstoffen in niederviskosen Lösungsmitteln dargestellt. In diesen Lösungsmitteln liegen bis jetzt keine Daten über angeregte Zustände selbst für einen so intensiv untersuchten Farbstoff wie Rhodamin 6G vor. Weiterhin wird der Einfluß des Sauerstoffgehaltes des Lösungsmittels auf die Intersystem-Crossing Ratenkonstante und die Triplett-Lebensdauer untersucht. Zuletzt wird das Meßprinzip kritisch untersucht und erste Überlegungen für ein auf Fluoreszenz beruhendes Meßverfahren dargestellt.

4.1 Probenvorbereitung

Da es sich bei dem beschriebenen Transientenspektrometer um ein hochempfindliches Meßgerät für transiente Zustände handelt, ist es notwendig, die zu untersuchenden Farbstofflösungen sorgfältig herzustellen. Dabei ist zum einen darauf zu achten, daß die verwendeten Farbstoffproben eine möglichst hohe Reinheit aufweisen, da bereits geringe Verunreinigungen die Meßergebnisse verfälschen können. Die Reinheit der Proben wurde chromatographisch überprüft. Die in den weiteren Kapiteln aufgeführten Farbstoffe wiesen keine signifikanten Verunreinigungen auf. Weiterhin muß darauf geachtet werden, daß ebenso die verwendeten Lösungsmittel keine Verunreinigungen enthalten. Daher wurden ausschließlich hochreine Lösungsmittel verwendet. Gegebenenfalls wurden die Lösungsmittel destilliert. Nach der Herstellung einer Farbstofflösung wurden die Proben filtriert (CHROMAFIL Einmalfilter, Typ O-45/25, Porendurchmesser 0.45 µm, Fa. Macherey-Nagel). Die aufgeführten Messungen wurden bei Raumtemperatur (20°C) durchgeführt.

4.2 Ausbleichmessungen von Rhodamin 6G in verschiedenen Lösungsmitteln

Neben dem für die Jet-Technik üblichen Lösungsmittel Ethylenglykol (p.A., Fa. Merck) wurden anhand der Rotationsküvetten-Technik vier weitere, niederviskose Lösungsmittel für die Ausbleichmessung von Rhodamin 6G (Radiant Dyes) eingesetzt: Ethanol, Acetonitril, Chloroform (alle UVASOL, Fa. Merck) und Wasser (tridestilliert). In Abbildung 4.1 sind die vier Ausbleichmessungen dargestellt. Zur besseren Übersicht sind die Signalmaxima auf

einen einheitlichen Wert von $\Delta I/I = 0.1$ skaliert. Tabelle 4.1 und 4.1.1 zeigen die Meßergebnisse und die experimentellen Parameter.

Man erkennt, daß nur die Ausbleichmessungen in Ethylenglykol, Ethanol und Acetonitril eine eindeutige Auswertung zulassen, da hier deutlich das exponentielle Abklingen des Triplet-Zustandes zu erkennen ist. Bei der Messung in Chloroform erhält man keinen monoexponentiellen Zusammenhang. Daher enthält die Tabelle 4.1 keine Werte für k_{ST} und τ_T (dies wird in Kapitel 6.5 nachgeholt). Die Ursache für dieses Verhalten in Chloroform ist ungeklärt. Weiterhin beobachtet man bei Ausbleichmessungen von Rhodamin 6G in Chloroform eine stark reduzierte Photostabilität. Während mehrfach wiederholte Messungen in Ethylenglykol keine Auswirkung auf die Meßergebnisse haben, zeigen sich bei Chloroform als Lösungsmittel schnell Änderungen des Meßsignals. Hierbei äußern sich diese Veränderungen im Gegensatz zu den in Kapitel 3.2.3 beobachteten Verlängerungen der Triplet-Lebensdauer zusätzlich in einer kontinuierlichen Verringerung des Meßsignals. Die Ursache für dieses Verhalten ist bislang unbekannt. Nach [30] ergeben sich mit Chloroform als Lösungsmittel bei Ausbleichmessungen anderer Laserfarbstoffe ebenfalls Schwierigkeiten der beschriebenen Art. Im Gegensatz zu Chloroform ist die Auswertung der Ausbleichmessung in Wasser durch das stark verrauschte Signal problematisch. Ursache hierfür ist die sehr geringe Extinktion der Lösung in der Proben-Spur (Dicke: 0,2 mm), die einer Absorption von 1.4 % entspricht. Da sich bei höheren Konzentrationen in Wasser Dimere von Rhodamin 6G bilden, lassen sich keine höheren Extinktionen für die Messung einstellen, da dann die Ergebnisse verfälscht würden. Bei den Messungen in Chloroform und Wasser zeigen sich die Nachteile des Meßverfahrens des Transientenspektrometers. Einerseits stören die Absorptionen angeregter Zustände bei der Meßwellenlänge. Andererseits sollte die Konzentration der zu untersuchenden Probelösung nicht zu gering sein, um möglichst rauscharm messen zu können. Zwar läßt sich das Rauschen durch Anpassen verschiedener Parameter des Lock-In Verstärkers und in der Software zur Aufnahme der Meßdaten verringern, doch erhöht dies die Meßzeit. Dies führt wiederum bei photoinstabilen Proben zur Photozerstörung.

Wie in den vorangegangenen Kapiteln wird auch in Tabelle 4.1 die Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} aufgeführt, die aus den jeweiligen Meßgrößen (k_{ST}^{\parallel} oder k_{ST}^{\perp}) unter Berücksichtigung der in den verschiedenen Lösungsmitteln auftretenden Anisotropie berechnet wurde. In Ethylenglykol ergab sich der Faktor $k_{ST}^{\parallel}/k_{ST}$ zu 0.7, in Wasser zu 0.8,

während in niederviskosen Lösungsmitteln wie Ethanol, Acetonitril und Chloroform dieser gleich 1 ist (es tritt keine meßbare Anisotropie auf).

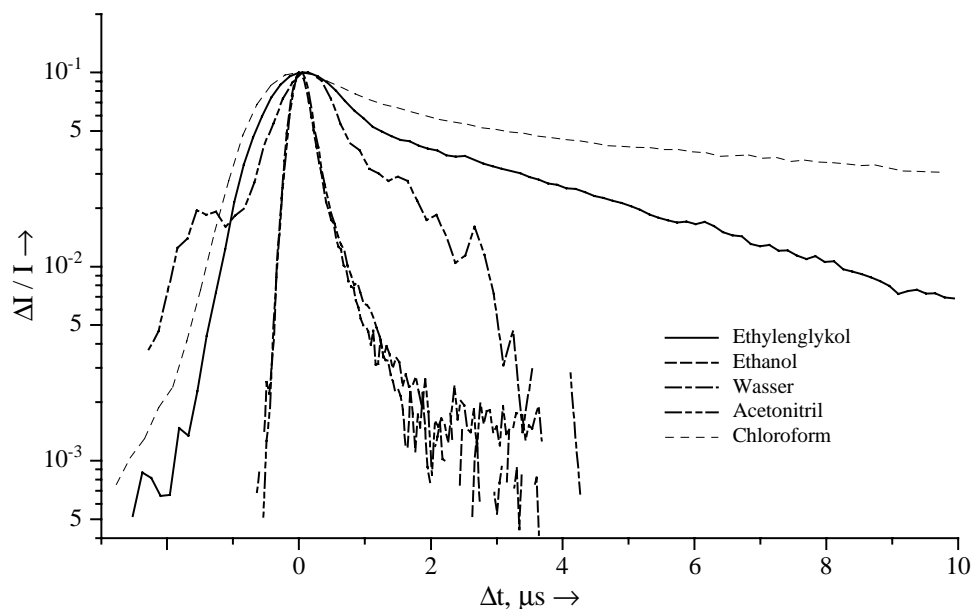


Abbildung 4.1 Ausbleichmessungen von Rhodamin 6G in verschiedenen Lösungsmitteln; experimentelle Daten s. Tabelle 4.1.

Tabelle 4.1 Meßergebnisse und experimentelle Daten für die Ausbleichmessungen von Rhodamin 6G in verschiedenen Lösungsmitteln.

Lösungs- mittel	k_{ST}	τ_T	v_{Probe}	Anregung			Messung		
	$10^5 s^{-1}$	μs	m/s	λ nm	Leistung mW	Polari- sation	λ nm	Leistung mW	Polari- sation
Ethylenglykol	8.3	4.35	14.3	530.9	90	horizontal	514.5	25	horizontal
Ethanol	25	0.4	53.3	530.9	80	horizontal	514.5	5	horizontal
Wasser	8.8	1.9	20.6	530.9	80	horizontal	514.5	5	horizontal
Acetonitril	13	0.6	40.7	520.8	60	horizontal	514.5	10	vertikal
Chloroform	?	?	14.1	530.9	80	horizontal	514.5	4	vertikal

vergleiche Übersichtstabelle im Anhang

Tabelle 4.1.1 Extinktionen der verwendeten Rhodamin 6G-Lösungen.

Lösungsmittel	Extinktion an der Anregungswellenlänge (0.2 mm)	Extinktion an der Meßwellenlänge (0.2 mm)
Ethylenglykol	0.99	0.49
Ethanol	1.1	0.63
Wasser	0.006	0.0046
Acetonitril	0.64	0.52
Chloroform	1	0.72

In Kapitel 3.2.3 wurde bereits darauf verwiesen, daß sowohl die Ratenkonstante für Intersystem-Crossing k_{ST} als auch die Triplett-Lebensdauer τ_T von der Sauerstoffkonzentration in der Lösung abhängig sind. Demnach sollten sich die in den jeweiligen Lösungsmitteln bestimmten Werte für k_{ST} und τ_T in den Sauerstofflöslichkeiten der betreffenden Lösungsmittel widerspiegeln. In Tabelle 4.2 sind die Sauerstoffkonzentrationen der jeweiligen luftgesättigten Lösungsmittel mit den ermittelten Werten für k_{ST} und τ_T gegenübergestellt.

Tabelle 4.2 Gegenüberstellung der Sauerstoffkonzentrationen mit den ermittelten Molekülparametern von Rhodamin 6G in verschiedenen Lösungsmitteln.

Lösungsmittel	Sauerstoffkonzentration [O ₂] bei Luftsättigung in 10 ⁻³ mol/l [31]	k_{ST} in 10 ⁵ s ⁻¹	τ_T in μ s
Ethylenglykol	0.12	8.3	4.3
Wasser	0.29	8.8	1.5
Acetonitril	1.9	13	0.5
Ethanol	2.1	25	0.4

vergleiche Übersichtstabelle im Anhang

Zwar werden die Verhältnisse der Sauerstoffkonzentrationen nicht exakt durch die Werte für k_{ST} und τ_T wiedergegeben. Doch die Reihenfolge der Werte stimmt mit denen der Sauerstofflöslichkeit überein. So ergibt sich z.B. für Rhodamin 6G in Ethylenglykol, in dem die geringste Sauerstoffkonzentration bei Luftsättigung vorliegt, entsprechend die längste Triplett-Lebensdauer, da hier die Löschung des Triplett-Zustandes durch molekularen Sauerstoff am geringsten ist. Bei Ethanol erhält man die höchste Sauerstoffkonzentration.

Dementsprechend weist Rhodamin 6G in diesem Lösungsmittel die kleinste Triplett-Lebensdauer auf. Zusammenfassend zeigt sich also, daß molekularer Sauerstoff eine entscheidende Rolle bei der Löschung des Triplett-Zustandes von Rhodamin 6G spielt. Im folgenden Kapitel wird der Einfluß von molekularem Sauerstoff auf die molekularen Parameter k_{ST} und τ_T genauer untersucht.

4.3 Einfluß von gelöstem Sauerstoff auf Intersystem-Crossing und Triplett-Lebensdauer von Rhodamin 6G

In [22, 25] wurden bereits Messungen zur Sauerstoffabhängigkeit der Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} und der Triplett-Lebensdauer τ_T vorgestellt. Allerdings mußte dort auf die Jet-Technik zurückgegriffen werden. Diese Technik ließ nur drei Meßpunkte zu, die zusätzlich durch direkten Atmosphärenkontakt verfälscht wurden. Durch Spülen der umgepumpten Farbstofflösung mit Stickstoff oder Sauerstoff erhielt man nahezu stickstoff- bzw. sauerstoff-gesättigte Lösungen. Ohne Spülen der Farbstofflösung erhielt man entsprechend eine luftgesättigte Lösung. Die Einstellung anderer Sauerstoffkonzentrationen war hier nicht möglich, so daß eine Auswertung der gewonnenen Daten mit drei Meßpunkten vorgenommen werden mußte. Anhand der neuen Rotationsküvetten-Technik lassen sich nun beliebige Sauerstoffkonzentrationen im Rahmen der maximalen Löslichkeit einstellen. Um eine Farbstofflösung mit einem definierten Gasgemisch zu spülen, wurde zunächst eine entsprechende Apparatur aufgebaut, da kommerzielle Geräte sehr kostspielig sind.

4.3.1 Apparatur zur Einstellung definierter Gasgemische aus Stickstoff und Sauerstoff

Abbildung 4.2 zeigt eine Apparatur zur Herstellung von Gasgemischen aus Sauerstoff und Stickstoff. Zwei Gasströme - Stickstoff und Sauerstoff – werden über ein Y-Verbindungsstück vereinigt und über einen Dreiwegehahn durch eine Waschflasche in einen Dreihalskolben geleitet. Diese Waschflasche enthält das gleiche Lösungsmittel, in welchem die Farbstoffprobe gelöst ist. Durch das Hindurchleiten des Gasstromes durch die Farbstofflösung wird diese mit dem Gasgemisch gesättigt. Anschließend wird der Gasstrom durch eine zweite Waschflasche geleitet, die ebenfalls das verwendete Lösungsmittel enthält. Durch eine Pipette kann die mit dem Gasgemisch gesättigte Farbstofflösung aus dem Dreihalskolben entnommen werden. Die beiden Waschflaschen dienen zur Sättigung der Gasatmosphäre mit dem verwendeten Lösungsmittel. Dadurch kann ein schnelles Verdampfen des Lösungsmittels aus dem Dreihalskolben verhindert werden. Dies ist

besonders bei Lösungsmitteln mit hohem Dampfdruck erforderlich. Um einer etwaigen Abkühlung der Farbstofflösung bei Verdampfung des Lösungsmittels entgegenzuwirken, tauchen die beiden Waschflaschen und der Dreihalskolben in ein Temperierbad ein. Auf diese Weise kann die Farbstofflösung auf Raumtemperatur temperiert werden. Die Zusammensetzung des Gasgemisches kann durch die Einstellungen an den Rotametern (Sauerstoff: Meßrohr L25/1000-12750, für Stickstoff umgerechnet: Meßrohr L25/1000-12585, Fa. Rota Yokogawa) vorgenommen werden. Diese regeln die Menge des durchströmenden Gasvolumens in l/h.

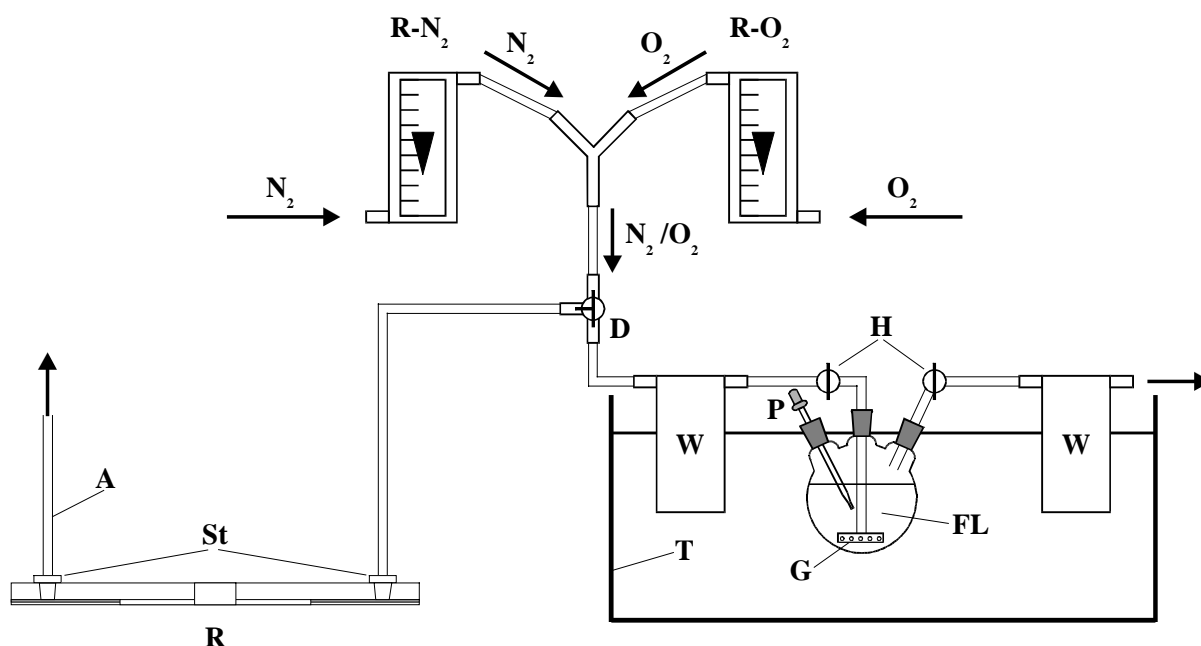


Abbildung 4.2 Apparatur zur Gasgemischherstellung; $R-N_2$ – Rotameter für Stickstoff, $R-O_2$ – Rotameter für Sauerstoff, D – Dreiwegehahn, W – Waschflasche, P – Pipette, St – durchbohrte Stopfen, R – Rotationsküvette, H – Zweiwegehahn, FL – Farbstofflösung, G – Glasfritte zum Durchleiten von Gas, T – Temperierbad, A – Abführschlauch.

4.3.2 Herstellen einer mit einem Gasgemisch gesättigten Farbstofflösung

Im folgenden wird das prinzipielle Vorgehen zur Herstellung einer mit einem Gasgemisch gesättigten Farbstofflösung beschrieben.

Zunächst wird die Farbstofflösung in den gereinigten Dreihalskolben eingefüllt. Anschließend werden die für die jeweilige Gasmischung notwendigen Flußraten an den beiden Rotametern eingestellt. Der Dreiwegehahn wird so eingestellt, daß das Gasgemisch durch die Waschflaschen und den Dreihalskolben geleitet wird. Zur Sättigung der Farbstofflösung wird das Durchleiten für 15 Minuten fortgesetzt. Danach wird der Dreiwegehahn so eingestellt, daß

der Gasstrom sowohl durch den Dreihalskolben als auch durch einen weiteren Schlauch verläuft. Die Zweiwegehähne (s. Abbildung 4.2) werden zuge dreht, so daß die Gasatmosphäre im Dreihalskolben verbleibt. Der nun durch den zusätzlichen Schlauch verlaufende Gaststrom wird zum Spülen der Rotationsküvette genutzt. Dadurch ist gewährleistet, daß in der verwendeten Proben-Spur die gleiche Gasatmosphäre herrscht wie in dem Dreihalskolben. Durch das Aufsetzen eines Abfuhrschlauches gemäß Abbildung 4.2 wird verhindert, daß Luft schnell zurück in die Proben-Spur gelangen kann. Vor dem Aufziehen der Farbstofflösung mit der Pipette ragt deren Ende noch nicht in die Farbstofflösung ein. Dadurch ist es möglich, auch den Luftraum der leeren Pipette mit dem Gasgemisch zu füllen. Nach dem Aufziehen und dem Einfüllen der Farbstofflösung in die Proben-Spur wird diese sofort mit Stopfen luftdicht verschlossen und die Messung mit dem Transientenspektrometer unmittelbar darauf durchgeführt. Durch dieses Vorgehen wird weitestgehend verhindert, daß die Farbstofflösung in Kontakt mit der Laborluft kommt und die Konzentrationen an gelösten Gasen verändert werden.

4.3.3 Überprüfung der Luftdichtigkeit der Proben-Spuren

Neben der richtigen Einstellung der Gasgemische muß sichergestellt sein, daß während einer Messung kein Kontakt der verwendeten Farbstofflösung mit der Laborluft herrscht, da ansonsten die Konzentration an Sauerstoff in der Lösung verändert werden kann. Daher wurden Ausbleichmessungen von Rhodamin 6G in stickstoffgesättigtem Ethylenglykol bzw. Ethanol durchgeführt, wobei in die innere und äußere Proben-Spur identische Lösungen eingefüllt wurden. Die innere Spur wurde mit Stopfen verschlossen, während die äußere Spur nicht verschlossen wurde. Dadurch konnte direkt verglichen werden, wie schnell sich die Sauerstoffkonzentration der Farbstofflösung der der Laborluft angleicht und ob die verwendeten Stopfen eine Proben-Spur luftdicht abschließen. Die Ausbleichmessungen wurden in regelmäßigen Zeitabständen wiederholt und miteinander verglichen. In Abbildung 4.3 bis Abbildung 4.6 sind die erhaltenen Ergebnisse für Ethylenglykol und Ethanol als Lösungsmittel mit und ohne Verschluß der Proben-Spuren dargestellt.

Bei stickstoffgesättigtem Ethylenglykol als Lösungsmittel erkennt man, daß sowohl bei verschlossener wie unverschlossener Proben-Spur immer die gleichen Ergebnisse erhalten wurden. Offensichtlich ist ein Transport von Sauerstoff in die rotierende Proben-Spur nur in sehr geringem, nicht meßbarem Maße möglich. Bei stickstoffgesättigtem Ethanol als Lösungsmittel ist dieser Sachverhalt anders. Hier erkennt man bei nicht verschlossener

Proben-Spur bereits nach wenigen Minuten einen deutlichen Effekt. Durch nachgelieferten Sauerstoff wird die Triplet-Lebensdauer verringert. Nach ca. 50 Minuten nimmt die Farbstofflösung die der Laborluft entsprechende Sauerstoffkonzentration an. Zusätzlich verdampft Ethanol aus der Proben-Spur. Bei verschlossener Proben-Spur dagegen zeigt sich, daß die Triplet-Lebensdauer in einem Zeitraum von ca. 70 Minuten nahezu konstant bleibt. Hier wird keine Verringerung der Triplet-Lebensdauer beobachtet. Die auftretende geringe Verlängerung der Triplet-Lebensdauer ist vermutlich auf Photodissoziation zurückzuführen (vgl. Kapitel 3.2.3). Somit zeigt sich, daß die Proben-Spuren mit den angefertigten Stopfen ausreichend luftdicht verschlossen werden können und Messungen in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration des Lösungsmittels durchführbar sind.

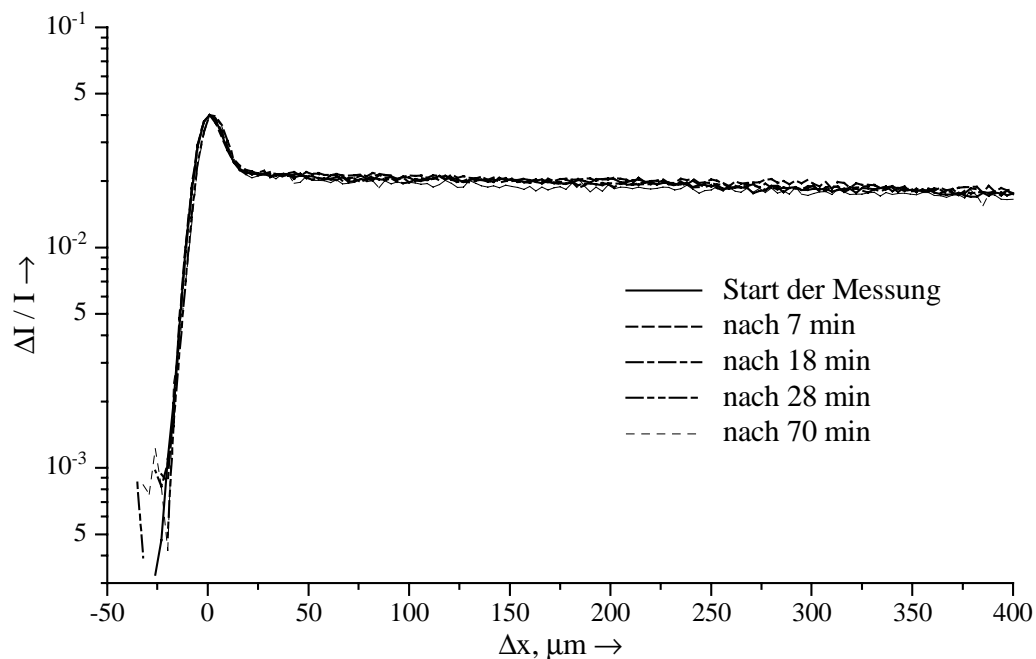


Abbildung 4.3 Ausbleichmessungen von Rhodamin 6G in stickstoffgesättigtem Ethylenglykol bei verschlossener innerer Proben-Spur; Anregung: 530.9 nm (80 mW, horizontal polarisiert), Messung: 514.5 nm (10 mW, vertikal polarisiert), Extinktion (0.2 mm): 530.9 nm – 1, 514.5 nm – 0.48, $v_{\text{Probe}} = 13.9$ m/s.

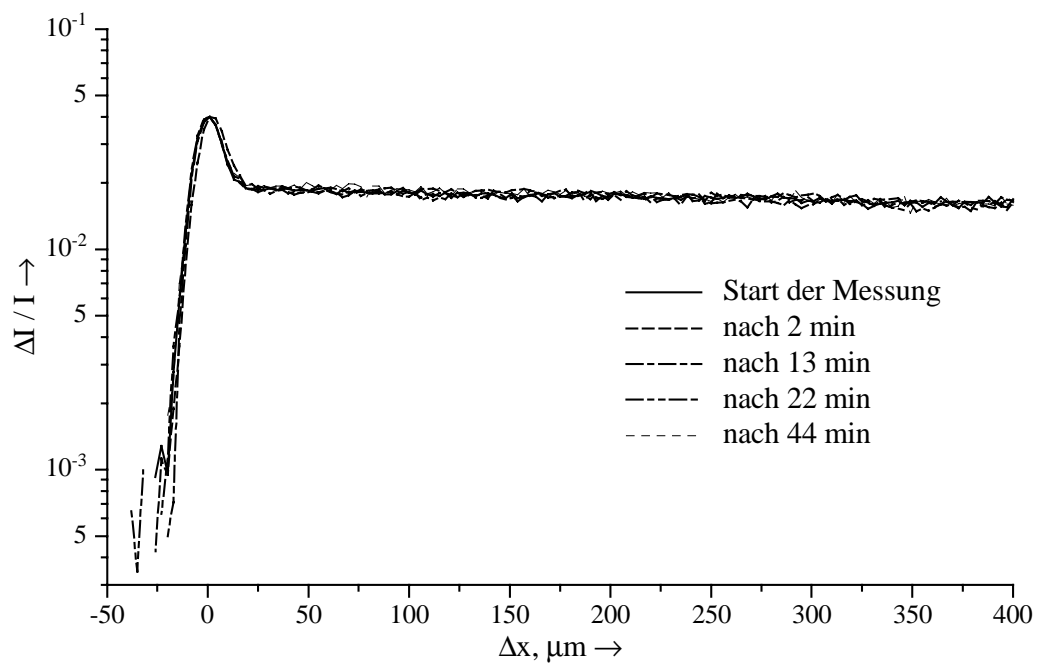


Abbildung 4.4 Ausbleichmessungen von Rhodamin 6G in Ethylenglykol bei nicht verschlossener äußerer Proben-Spur ; Anregung: 530.9 nm (80 mW, horizontal polarisiert), Messung: 514.5 nm (10 mW, vertikal polarisiert), Extinktion (0.2 mm): 530.9 nm – 1, 514.5 nm – 0.48, $v_{Probe} = 17.1$ m/s.

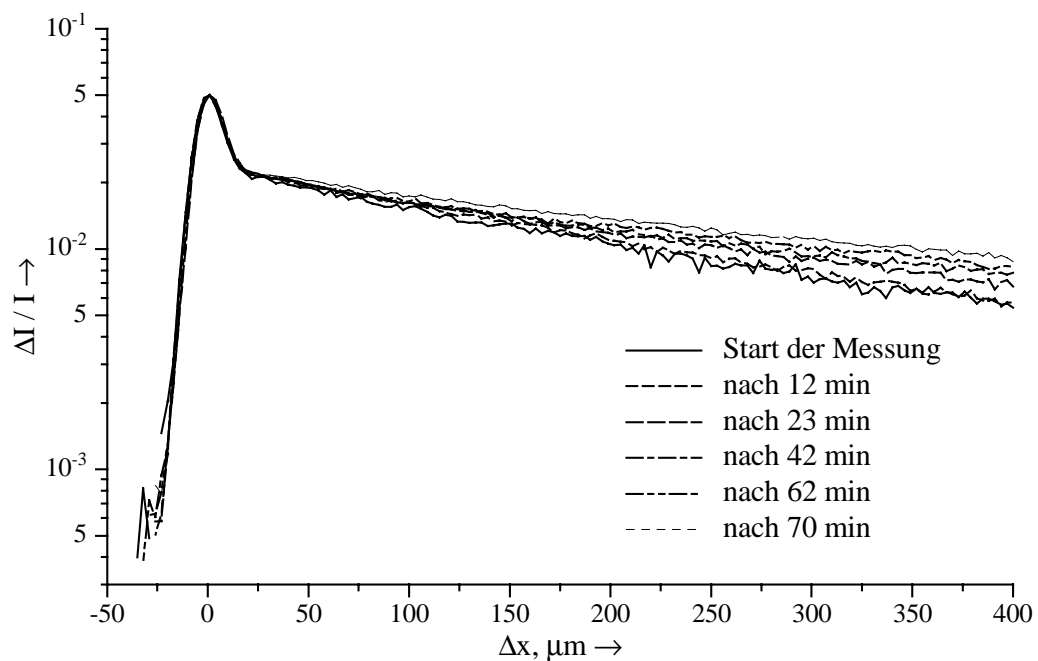


Abbildung 4.5 Ausbleichmessungen von Rhodamin 6G in Ethanol bei verschlossener innerer Proben-Spur; Anregung: 530.9 nm (80 mW, horizontal polarisiert), Messung: 514.5 nm (10 mW, vertikal polarisiert), Extinktion (0.2 mm): 530.9 nm – 1, 514.5 nm – 0.53, $v_{Probe} = 14.1$ m/s.

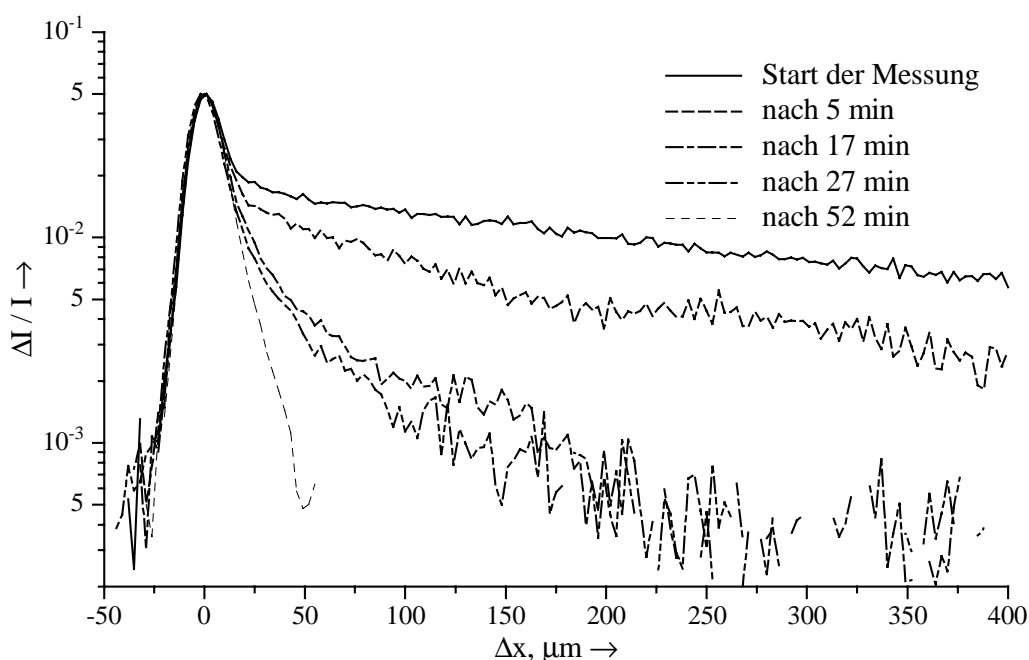


Abbildung 4.6 Ausbleichmessungen von Rhodamin 6G in Ethanol bei nicht verschlossener äußerer Proben-Spur; Anregung: 530.9 nm (80 mW, horizontal polarisiert), Messung: 514.5 nm (10 mW, vertikal polarisiert), Extinktion (0.2 mm): 530.9 nm – 1, 514.5 nm – 0.53, $v_{Probe} = 17.3$ m/s.

Die aus den durchgeführten Messungen erhaltenen molekularen Parameter für Rhodamin 6G in stickstoffgesättigten Lösungsmitteln sind in Tabelle 4.3 zusammengefaßt. Dabei ist die Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} in Ethylenglykol über den Faktor $k_{ST}^{\perp}/k_{ST} = 1.23$ [24] bestimmt worden.

Tabelle 4.3 Molekulare Parameter von Rhodamin 6G in stickstoffgesättigten Lösungsmitteln.

Rhodamin 6G in stickstoffgesättigtem...	$k_{ST}, 10^5 \text{ s}^{-1}$	$\tau_T, \mu\text{s}$
Ethylenglykol	5.4	145
Ethanol	5.4	16

vergleiche Übersichtstabelle im Anhang

Bei der Betrachtung der molekularen Parameter von Rhodamin 6G in nahezu sauerstofffreien Lösungsmitteln muß folgendes berücksichtigt werden. Es ist sicherlich nicht möglich, durch das Spülen mit reinem Stickstoff jeglichen Sauerstoff aus einem Lösungsmittel zu vertreiben.

Besonders das Umfüllen der Lösung in die Küvette ist dabei ein kritischer Moment, da hier die Farbstofflösung mit der umgebenden Luft in Kontakt tritt. Daher ist es nicht verwunderlich, daß die Reproduktion speziell dieser Messungen problematisch ist, da bereits kleinste Mengen Sauerstoff die Triplett-Lebensdauer erheblich verringern können. Dies ist von besonderer Bedeutung, wenn sich Sauerstoff sehr schnell in dem betreffenden Lösungsmittel löst. In Kapitel 4.3.4 werden bei der Auswertung der sauerstoffabhängigen Ausbleichmessungen geringere Triplett-Lebensdauern für sauerstofffreie Farbstofflösungen von Rhodamin 6G in Ethanol bzw. Ethylenglykol erhalten. Hier wird deutlich, daß bei der Durchführung der in Abbildung 4.3 bis Abbildung 4.6 dargestellten Messungen das Vertreiben des Sauerstoffs aus den Lösungsmitteln besonders gut gelungen ist. Eine Verbesserung des in Kapitel 4.3.2 beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Farbstofflösungen mit definierten Sauerstoffkonzentrationen ist durch die Verwendung einer luftdichten Box denkbar, die mit dem gleichen Gasgemisch gefüllt ist, das zum Spülen der jeweiligen Farbstofflösung verwendet werden soll. In dieser Box würde dann der gesamte Prozeß der Gasgemischherstellung, der Spülung der Farbstofflösung und der Befüllung der Rotationsküvette durchgeführt. Dadurch wäre eine nahezu sichere Einstellung von Sauerstoffkonzentrationen in Farbstofflösungen denkbar. Allerdings ist diese Methode wesentlich aufwendiger und für die schwerpunktmäßige Arbeit mit sauerstoffabhängigen Messungen angebracht.

4.3.4 Ausbleichmessungen in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration

Der Einfluß des gelösten Sauerstoffs auf die Triplett-Lebensdauer τ_T und die Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} von Rhodamin 6G wurde in drei verschiedenen Lösungsmitteln untersucht: Ethylenglykol, Ethanol und Acetonitril. Eine weitere Messung in Wasser ist in Kapitel 6.1 aufgeführt. Für alle genannten Lösungsmittel wurden sechs bzw. fünf Gasgemische aus Sauerstoff und Stickstoff (0, 20, 40, 60, 80 und 100 % Sauerstoff) mit dem in Kapitel 4.3.2 beschriebenen Verfahren eingestellt. Gemäß den verschiedenen Löslichkeiten für Sauerstoff ergaben sich jeweils sechs (fünf) verschiedene Konzentrationen an gelöstem Sauerstoff im jeweiligen Lösungsmittel. Tabelle 4.4 zeigt die maximalen Sauerstofflöslichkeiten in den genannten Lösungsmitteln [31].

Tabelle 4.4 Maximale Sauerstofflöslichkeiten in verschiedenen Lösungsmitteln.

Lösungsmittel	Sauerstoffkonzentration [O ₂] bei Sauerstoffsättigung in 10 ⁻³ mol/l [31]
Ethylenglykol	0.58 (20°C)
Wasser	1.39 (20°C)
Acetonitril	9.1 (24°C)
Ethanol	10.1 (20°C)

Abbildung 4.7 bis Abbildung 4.9 zeigen die Ausbleichmessungen in den verschiedenen Lösungsmitteln. Da jede einzelne Messung zum Erzielen einer optimalen Zeitauflösung mit einer dementsprechend angepaßten Probengeschwindigkeit durchgeführt wurde, sind die Meßsignale in die Zeitdomäne umgerechnet worden, um einen direkten Vergleich ziehen zu können.

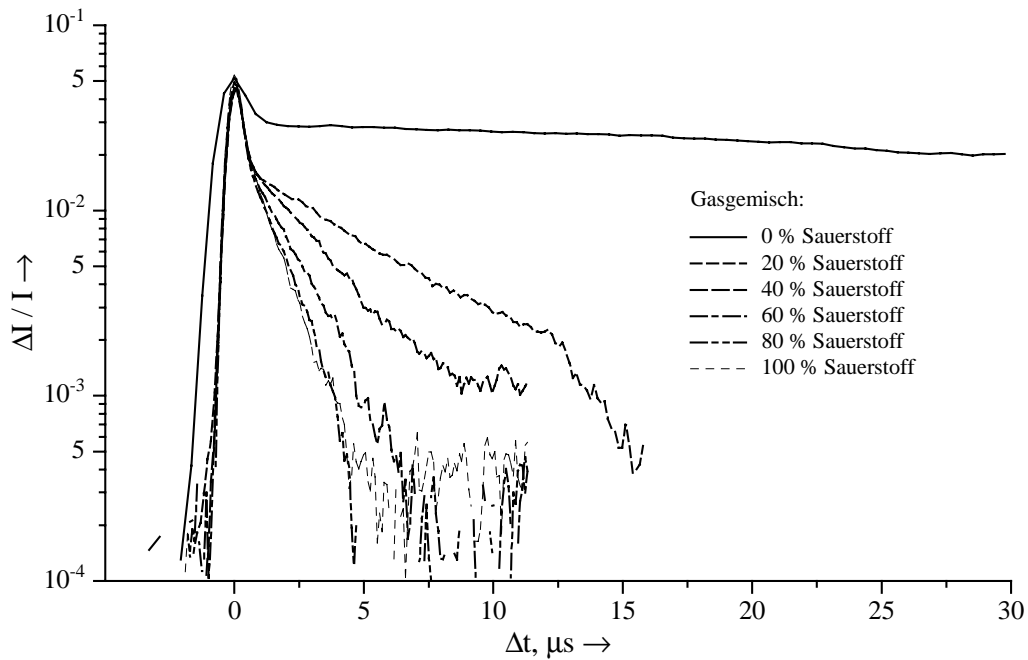


Abbildung 4.7 Ausbleichmessung von Rhodamin 6G in Ethylenglykol in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration; Anregung: 514.5 nm (110 mW, horizontal polarisiert), Messung: 514.5 nm (5 mW, vertikal polarisiert), Extinktion (0.2 mm): 514.5 nm – 0.5, v_{Probe} : 12 – 22 m/s.

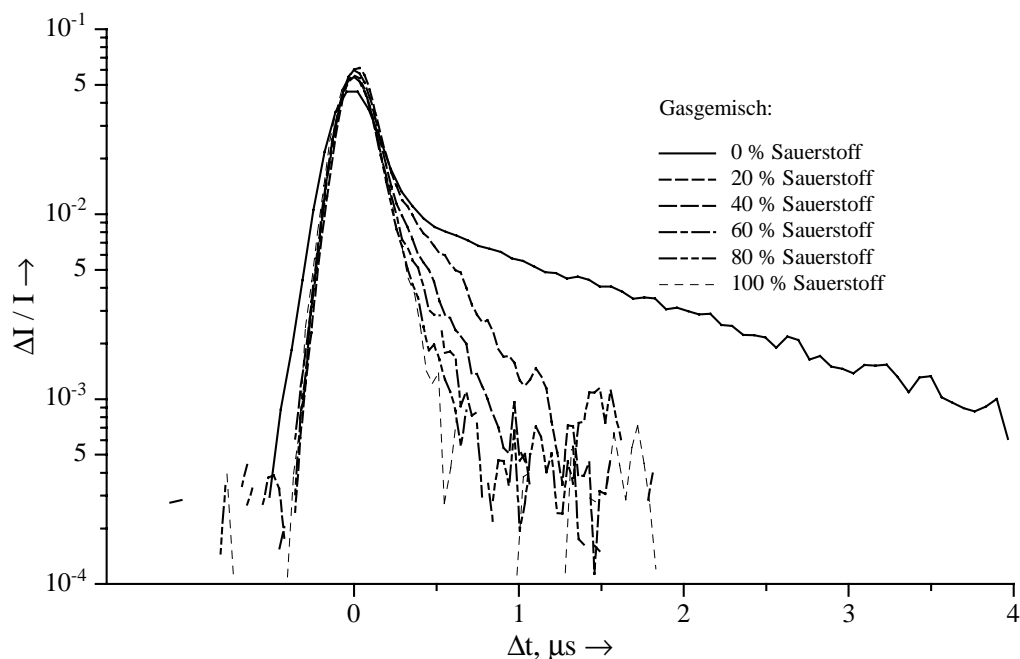


Abbildung 4.8 Ausbleichmessung von Rhodamin 6G in Ethanol in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration; Anregung: 514.5 nm (100 mW, horizontal polarisiert), Messung: 514.5 nm (5 mW, vertikal polarisiert), Extinktion (0.2 mm): 514.5 nm – 0.7, v_{Probe} : 45 – 62 m/s.

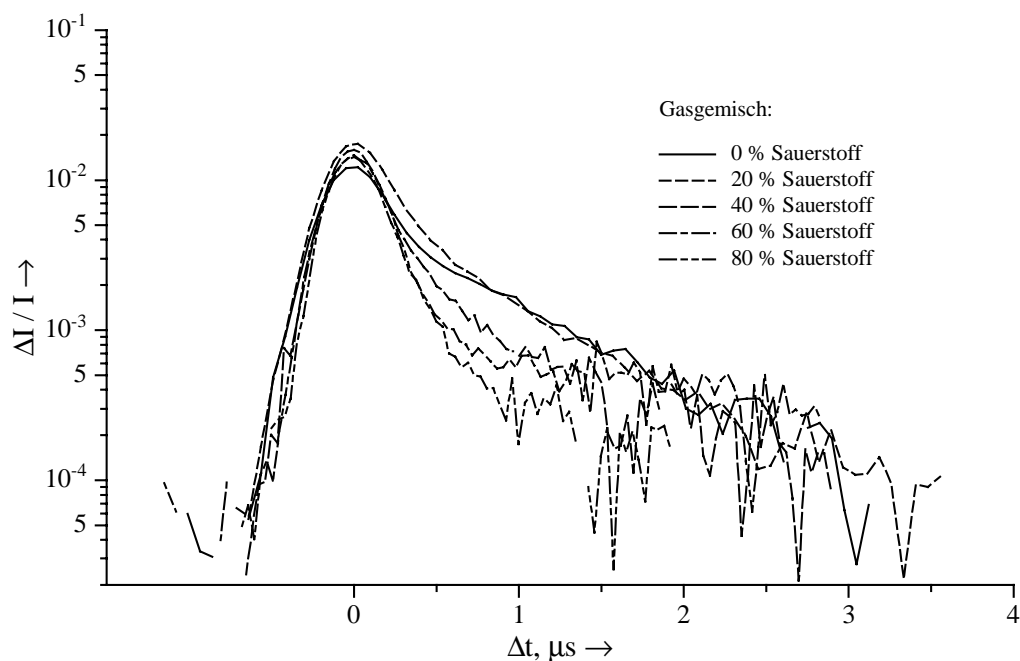


Abbildung 4.9 Ausbleichmessung von Rhodamin 6G in Acetonitril in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration; Anregung: 520.8 nm (60 mW, horizontal polarisiert), Messung: 514.5 nm (10 mW, vertikal polarisiert), Extinktionen (0.2 mm): 520.8 nm – 0.64, 514.5 nm – 0.52, v_{Probe} : 41 – 53 m/s.

In Tabelle 4.5 sind die ermittelten molekularen Parameter zusammengefaßt. Zusätzlich sind dort die entsprechenden Sauerstoffkonzentrationen im jeweiligen Lösungsmittel aufgeführt. Dabei wurde die Gültigkeit des Henry-Daltonschen Gesetzes vorausgesetzt. Dieses sagt aus, daß bei einer gegebenen Temperatur das in einer bestimmten Flüssigkeitsmenge gelöste Gasvolumen dem Partialdruck des Gases in der Gasphase proportional ist.

Tabelle 4.5 Molekulare Parameter von Rhodamin 6G in verschiedenen Lösungsmitteln bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen.

Lösungsmittel	Sauerstoffgehalt des Gasgemisches %	Sauerstoffkonzentration im Lösungsmittel [31] mmol/l	k_{ST} 10^5 s^{-1}	τ_T μs	$1/\tau_T$ 10^6 s^{-1}
Ethylenglykol	0	0	5.7	90	0.011
	20	0.12	6.6	5	0.2
	40	0.23	7.6	2.8	0.36
	60	0.35	9.3	1.7	0.59
	80	0.46	11.4	1.3	0.79
	100	0.58	13.6	1	1
Ethanol	0	0	8.5	1.5	0.67
	20	2	23	0.35	2.9
	40	4	30	0.23	4.3
	60	6.1	33	0.2	5
	80	8.1	43	0.15	6.7
	100	10.1	62	0.12	8.3
Acetonitril	0	0	15.4	0.77	1.3
	20	1.8	15.9	0.56	1.8
	40	3.6	19.1	0.4	2.5
	60	5.5	18.5	0.3	3.3
	80	7.3	21.6	0.26	3.8

vergleiche Übersichtstabelle im Anhang

Vergleicht man die Werte der molekularen Parameter von Rhodamin 6G bei einer Gasmischung von 20 % Sauerstoff und 80 % Stickstoff mit denen bei luftgesättigten Lösungen (Luft sollte ebenfalls ca. 20 % Sauerstoff enthalten) in den entsprechenden Lösungsmitteln, so erkennt man eine gute Übereinstimmung (s. Tabelle 4.2). Dies zeigt, daß die Apparatur zur Herstellung der Gasgemische mit ausreichender Genauigkeit verwendet

werden kann. Weiterhin sieht man, wie in Kapitel 4.2 bereits angeführt, daß hohe Sauerstoffkonzentrationen im Lösungsmittel zu kurzen Triplet-Lebensdauern und erhöhten Intersystem-Crossing Ratenkonstanten des Laserfarbstoffes führen. Bei der Diskussion der erhaltenen Meßergebnisse muß betont werden, daß die Genauigkeit der Werte für die Intersystem-Crossing Ratenkonstante maßgeblich durch eine möglichst genaue Ermittlung der Triplet-Lebensdauer bestimmt wird. Bei einer Ausbleichmessung, bei der die Triplet-Lebensdauer nur ungenau bestimmt werden kann, ist eine Abweichung in der resultierenden Intersystem-Crossing Ratenkonstante von ca. 30 % zu berücksichtigen.

In [22, 26, 25] sind die theoretischen Zusammenhänge zwischen Intersystem-Crossing Ratenkonstante bzw. der Triplet-Lebensdauer und der Sauerstoffkonzentration dargelegt. Demnach gehorcht die Triplet-Löschung durch Sauerstoff einer Reaktion 2. Ordnung, was zu folgender Abhängigkeit führt:

$$\frac{1}{\tau_T} = \frac{1}{\tau_{T,0}} + k_L \cdot c(O_2) \quad 4.1$$

Durch eine Auftragung von $1/\tau_T$ gegen die Sauerstoffkonzentration im Lösungsmittel, bzw. dem Sauerstoffanteil des Gasgemisches bei Gültigkeit des Henry-Daltonschen Gesetzes, sollte eine Gerade erhalten werden, aus deren Steigung die Löschkonstante k_L ermittelt werden kann. Für die Intersystem-Crossing Ratenkonstante wird folgender Zusammenhang angenommen [22, 26, 25]:

$$k_{ST} = k_{ST}^0 + k_q \cdot c(O_2) \quad 4.2$$

Hier erhält man bei der Auftragung der Intersystem-Crossing Ratenkonstante gegen die Sauerstoffkonzentration im Lösungsmittel eine Gerade, aus der dann analog die Löschkonstante k_q ermittelt werden kann. Abbildung 4.10 bis Abbildung 4.13 zeigen die ermittelten Ergebnisse. Dabei ist einmal der Sauerstoffanteil des Gasgemisches in Prozent und einmal die berechnete Sauerstoffkonzentration im jeweiligen Lösungsmittel als Abszisse gewählt worden. Die daraus gewonnenen Daten sind in Tabelle 4.6 zusammengefaßt.

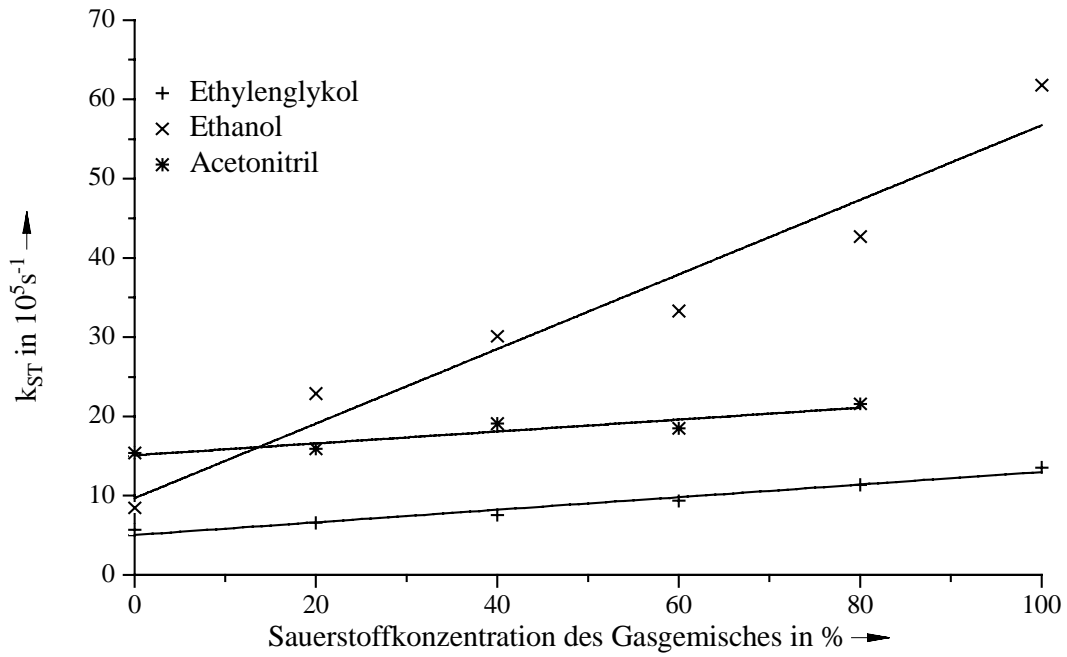


Abbildung 4.10 Intersystem-Crossing Ratenkonstante von Rhodamin 6G in Abhängigkeit vom Sauerstoffanteil des Gasmisches.

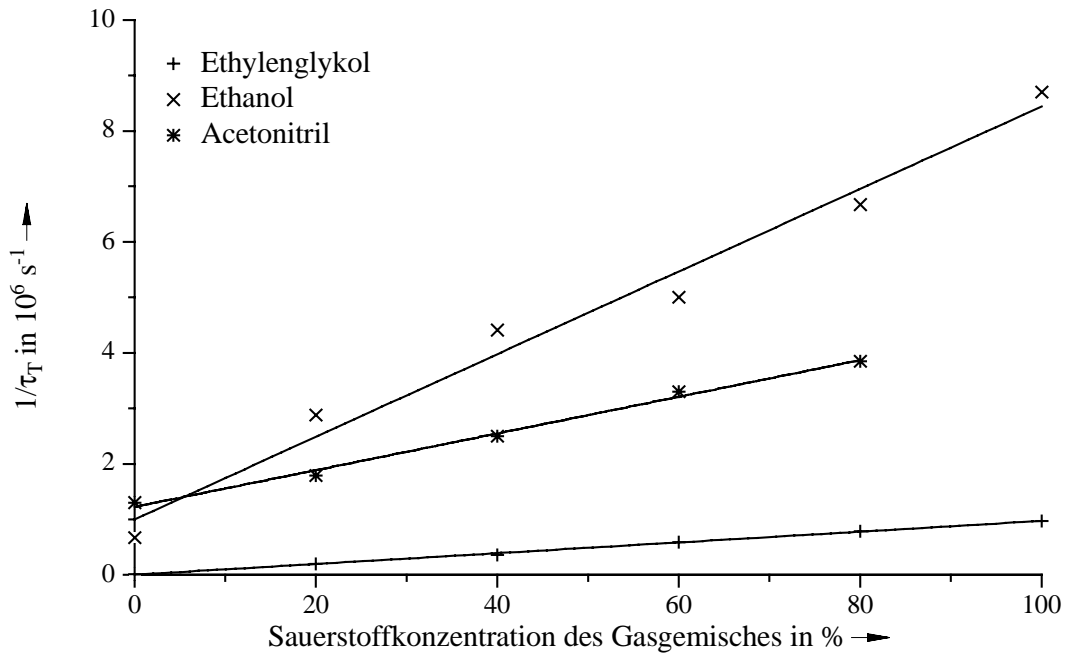


Abbildung 4.11 Triplett-Lebensdauer von Rhodamin 6G in Abhängigkeit vom Sauerstoffanteil des Gasmisches.

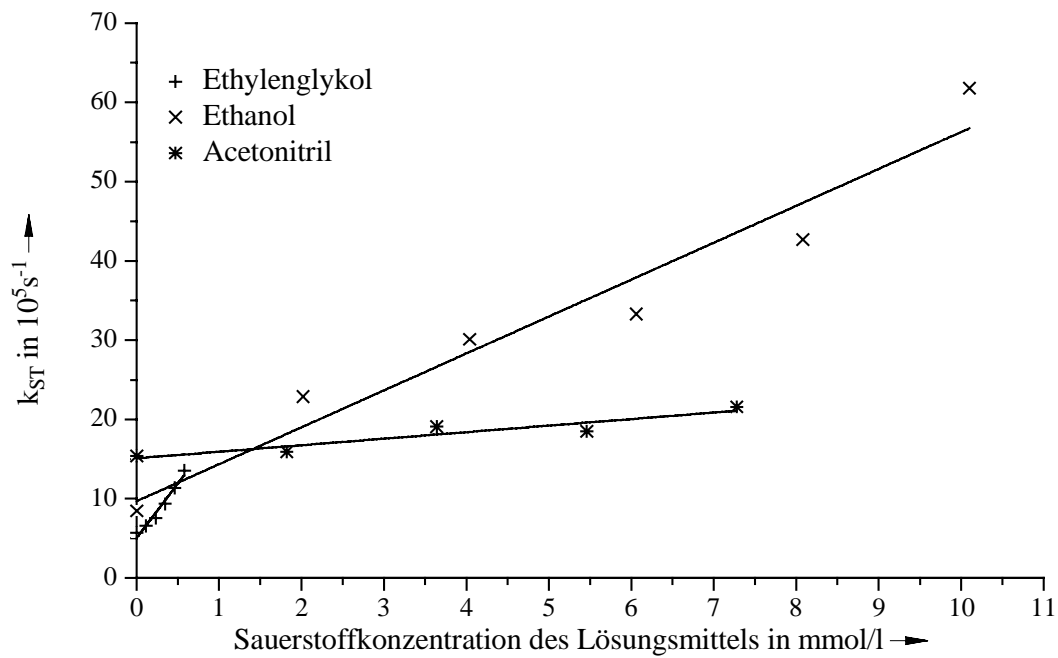


Abbildung 4.12 Intersystem-Crossing Ratenkonstante von Rhodamin 6G in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration des Lösungsmittels.

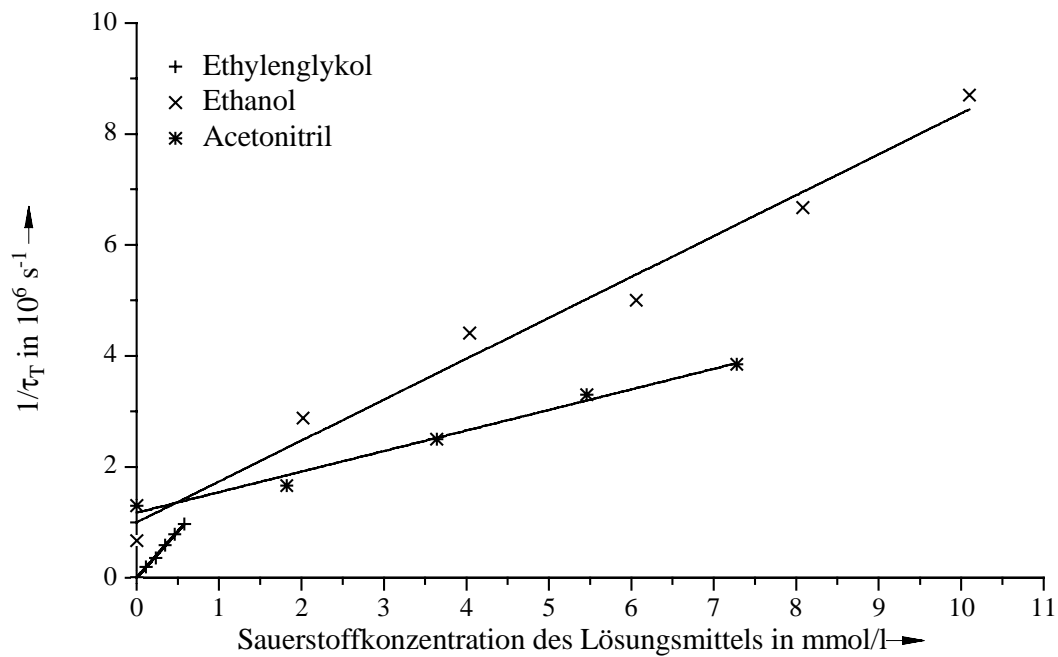


Abbildung 4.13 Triplet-Lebensdauer von Rhodamin 6G in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration des Lösungsmittels.

Tabelle 4.6 Ermittelte Werte für k_L und k_q von Rhodamin 6G in verschiedenen Lösungsmitteln.

Lösungsmittel	$k_{ST} = k_{ST}^0 + k_q \cdot c(O_2)$ ¹		$\frac{1}{\tau_T} = \frac{1}{\tau_{T,0}} + k_L \cdot c(O_2)$	
	$k_{ST}^0, 10^5 \text{ s}^{-1}$	$k_q, 10^8 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{s})$	$\tau_{T,0}, \mu\text{s}$	$k_L, 10^8 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{s})$
Ethylenglykol	5.1	13.7	465	16.7
Acetonitril	15.1	0.8	0.9	3.7
Ethanol	9.7	4.7	1	7.4

¹ – vergleiche Übersichtstabelle im Anhang

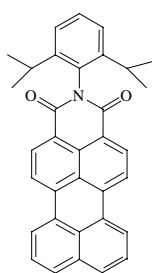
Man erkennt, daß sich Rhodamin 6G in Ethylenglykol deutlich anders verhält als in den anderen beiden Lösungsmitteln. In Ethylenglykol ist die Abhängigkeit der Intersystem-Crossing Ratenkonstante und der Triplett-Lebensdauer von der Sauerstoffkonzentration wesentlich stärker ausgebildet als in Ethanol und Acetonitril. Der ermittelte Wert für k_L von $1.7 \cdot 10^9 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{s})$ stimmt mit dem in [22] bestimmten Wert von $1.3 \cdot 10^9 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{s})$ gut überein. Die Größe von k_q ist jedoch um einen Faktor 14 größer als in [22] ($0.95 \cdot 10^8 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{s})$). Dabei ist zu berücksichtigen, daß bei den Messungen in [22] die Sauerstoffkonzentration nur sehr ungenau eingestellt werden konnten. Die daraus resultierenden Abweichungen der zu bestimmenden Triplett-Lebensdauern beeinflussen die berechneten Werte für k_{ST} erheblich. Daher ist es nicht verwunderlich, daß die Daten einer Meßreihe von Ausbleichmessungen einerseits einen sehr ähnlichen Wert für k_L liefern und andererseits einen um den Faktor 14 zu kleinen Wert für k_q . Da in [22] die Jet-Technik angewendet wurde, liegen dort keine Vergleichswerte für Acetonitril und Ethanol vor, da diese Lösungsmittel eine zu niedrige Viskosität aufweisen. Eine weitere Auffälligkeit zeigt Rhodamin 6G in Acetonitril mit einem sehr geringen Einfluß der Sauerstoffkonzentration auf die Intersystem-Crossing Ratenkonstante. Die Ursache hierfür ist noch ungeklärt. Auffällig ist weiterhin der Unterschied bei den durch Abwesenheit von Sauerstoff maximal erreichbaren Triplett-Lebensdauern $\tau_{T,0}$. Hier ergibt sich durch eine lineare Regression der ermittelten Daten in Ethylenglykol ein Wert von ca. $500 \mu\text{s}$ gegenüber von rund $1 \mu\text{s}$ bei Acetonitril und Ethanol. Bei den in Kapitel 4.3.3 vorgestellten Messungen von Rhodamin 6G in sauerstofffreien Lösungsmitteln ergaben sich in Ethylenglykol $145 \mu\text{s}$ und in Ethanol $16 \mu\text{s}$. Während der Meßwert für sauerstofffreies Ethylenglykol gut mit dem in Tabelle 4.5 aufgeführten Wert ($90 \mu\text{s}$) übereinstimmt, weicht der für sauerstofffreies Ethanol erheblich ab (16 gegenüber $1.5 \mu\text{s}$). Doch selbst bei der Berücksichtigung dieses Wertes als fester Achsenabschnitt erhält man eine nur geringe Erhöhung der Löschkonstante k_L von $7.4 \cdot 10^8 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{s})$ auf $8.6 \cdot 10^8 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{s})$.

Der Vergleich der maximalen Triplett-Lebensdauern $\tau_{T,0}$ deutet darauf hin, daß in Acetonitril und Ethanol weitere effiziente Löschprozesse zur Deaktivierung des Triplett-Zustandes vorhanden sein müssen. Die in Kapitel 4.3.3 ermittelten Werte für k_{ST}^0 in sauerstofffreien Lösungsmitteln ergeben im Falle von Ethylenglykol mit $5.4 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ (s. Tabelle 4.3) wiederum eine sehr gute Übereinstimmung mit dem aus der linearen Regression gewonnenen Wert für k_{ST}^0 ($5.1 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$). Im Falle von Ethanol unterscheiden sich die Werte um den Faktor zwei ($5.4 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ aus Kapitel 4.3.3 bzw. $9.7 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ aus der linearen Regression). Eine Berücksichtigung des k_{ST} -Wertes von $5.4 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ für Rhodamin 6G in sauerstofffreiem Ethanol für die lineare Regression liefert wiederum mit einer Löschkonstante k_q von $4.90 \cdot 10^8 \text{ l}/(\text{mol} \cdot \text{s})$, bzw. einer maximalen Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST}^0 von $8.1 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ nur geringe Änderungen gegenüber den in Tabelle 4.6 aufgeführten Werten.

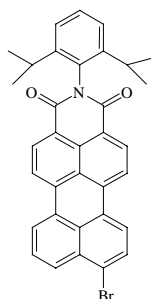
Zuletzt ist die hohe Löschkonstante k_{ST}^0 für Rhodamin 6G in Acetonitril auffällig. Auch die Ursache für diesen Befund ist ungeklärt.

4.4 Einfluß des Bromierungsgrades bei Perylenfarbstoffen

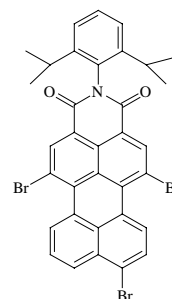
Die neue Rotationsküvetten-Technik ist natürlich nicht auf die Messung von Rhodamin-Farbstoffen eingeschränkt. Es wurden weitere Farbstoffe untersucht, die in aktuellen Forschungsbereichen Verwendung finden. Zu diesen gehören Perylenfarbstoffe, die in der letzten Zeit durch ihren Einsatz im Bereich der Licht emittierenden Polymere bekannt geworden sind [32, 33]:



Stb 1



Stb 2



Stb 3

In Abbildung 4.14 bis Abbildung 4.16 sind die Messungen von drei verwandten Perylenfarbstoffen (Stb 1, Stb 2, Stb 3) in Acetonitril aufgeführt, die sich nur durch den Grad der Bromierung unterscheiden. Bei allen Farbstofflösungen war die im Vergleich zu Rhodamin 6G geringe Photostabilität auffällig, die die Durchführung der Messungen sehr erschwerte. Um reproduzierbar messen zu können, mußten die Ausbleichmessungen schnell durchgeführt werden, damit durch die eintretende Photozerstörung die Messung nicht verfälscht wurde. Das dadurch schlechte Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist bei allen Messungen zu erkennen. Man sieht, daß die Ausbleichmessungen sowohl für Stb1 als auch für Stb2 keine auswertbaren Meßsignale liefern. Bei Stb1 erhält man kein exponentielles Abklingen des Meßsignals. Bei Stb2 wird das Ausbleichsignal bei $\Delta x = 25 \mu\text{m}$ negativ (durchgezogene Linie in Abbildung 4.15), was eine erhöhte Absorption bei eingeschaltetem Anregungslaser anzeigt (s. Kapitel 2.3). Eine erneute Ausbleichmessung von Stb2 in Acetonitril (gestrichelte Linie in Abbildung 4.15) zeigt, daß die auftretende Absorption bei Erhöhung der Meßwellenlänge zunimmt. Da im allgemeinen Triplet-Absorptionen langwellig gegenüber dem Absorptionsmaximum des Grundzustandes verschoben sind, liegt die Vermutung nahe, daß die genannte Ausbleichmessung durch eine Triplet-Absorption gestört wird. Somit kann an dieser Stelle nicht weiter von „Ausbleichmessung“ im Sinne von Kapitel 2.3 gesprochen werden. Eine Aussage über die Intersystem-Crossing Ratenkonstante ist dementsprechend nicht möglich. Ein exponentieller Fit des Absorptionssignals liefert für den Triplet-Zustand von Stb2 in Acetonitril eine Lebensdauer τ_T von 210 ns.

Wie in Abbildung 4.16 zu sehen ist, erhält man für Stb3 in Acetonitril ein Meßsignal, das nach der Theorie der Ausbleichmessungen auswertbar ist. Dieses ist, wie bei den Messungen zuvor, mit starkem Rauschen behaftet. Hier erhält man für die Triplet-Lebensdauer τ_T einen Näherungswert von 250 bis 450 ns. Ein genauerer Wert läßt sich an dieser Stelle nicht angeben, da durch das starke Rauschen mehrere Möglichkeiten zum Anfitzen einer Triplet-Lebensdauer gegeben sind. Für die Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} (die in Acetonitril den gleichen Zahlenwert wie die erhaltene Meßgröße k_{ST}^\perp aufweist) liefert die Auswertung Werte von $2.3 \cdot 10^6$ bis $4.3 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$. Da zwei von den drei durchgeführten Messungen keine Aussagen über die molekularen Parameter der Farbstoffe lieferten, ist hier keine Aussage über den Einfluß des Bromierungsgrades auf die Eigenschaften angeregter Zustände des verwendeten Perylengrundgerüsts möglich.

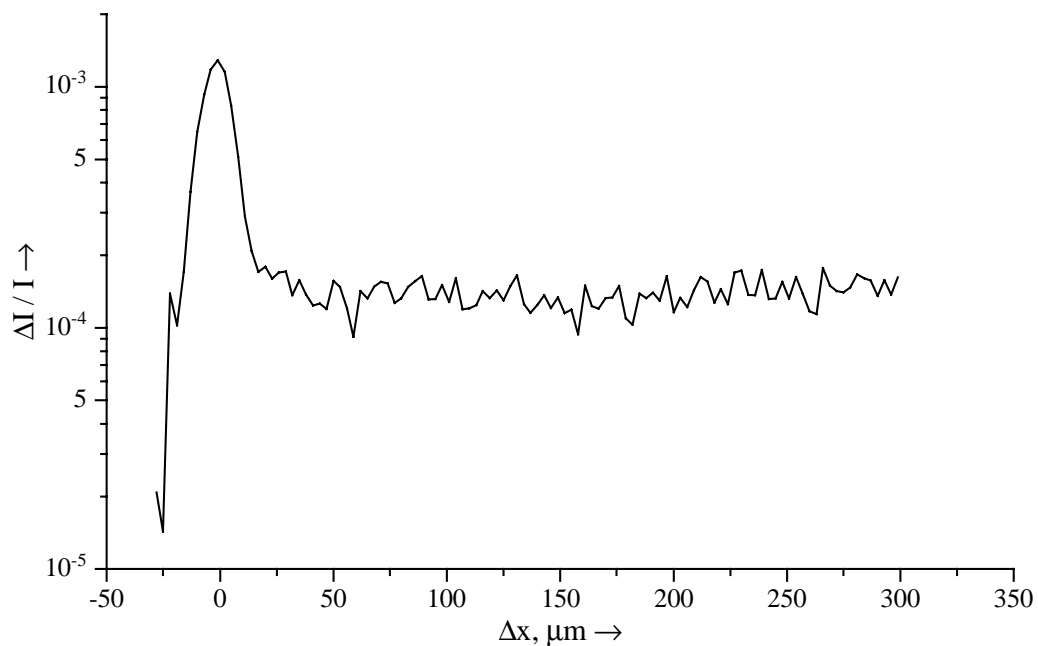


Abbildung 4.14 Ausbleichmessung von *Stb1* in Acetonitril; Anregung: 520.8 nm (100 mW, horizontal polarisiert), Messung: 488 nm (10 mW, vertikal polarisiert), Extinktionen (0.2 mm): 520.8 nm – 0.1, 488 nm – 0.19, v_{Probe} – 17.9 m/s.

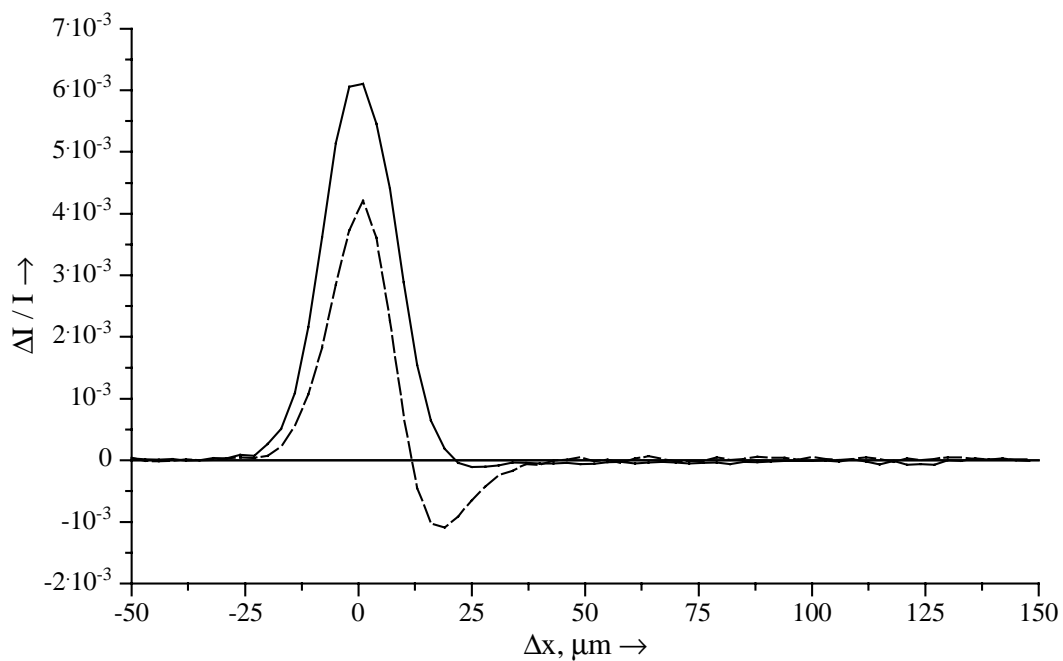


Abbildung 4.15 Ausbleichmessung von *Stb2* in Acetonitril; Anregung: 520.8 nm (120 mW, horizontal polarisiert), Messung: --- 488 nm (5 mW, vertikal polarisiert), – 476.5 nm (15 mW, vertikal polarisiert), Extinktionen (0.2 mm): 520.8 nm – 0.6, 488 nm – 0.74, 476.5 nm – 0.64, v_{Probe} – 29.7 m/s.

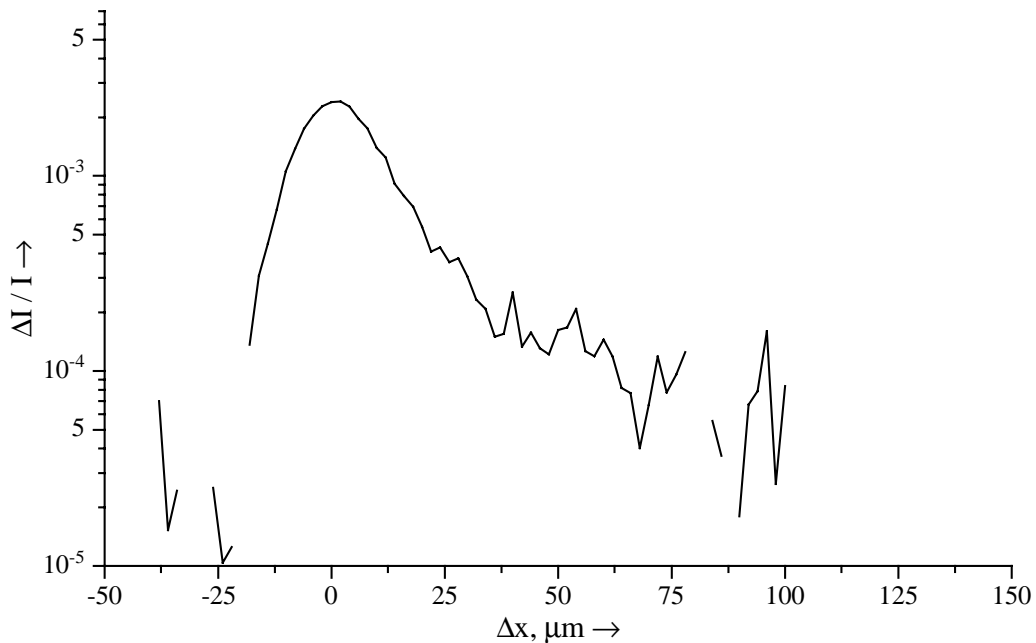


Abbildung 4.16 Ausbleichmessung von Stb3 in Acetonitril; Anregung: 520.8 nm (80 mW, horizontal polarisiert), Messung: 476.5 nm (10 mW, vertikal polarisiert), Extinktionen (0.2 mm): 520.8 nm – 0.2, 476.5 nm – 0.17, v_{probe} – 56.2 m/s.

4.5 Bedeutung der Parameter k_{ST} und τ_T für den Einsatz von Fluoreszenzsonden

Bei der Auswahl geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe für aktuelle technische [3, 4, 34, 35] und medizinische [36] Anwendungen, wie z.B. der Markierung von Biomolekülen mit Fluoreszenzsonden, zieht man häufig eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute als Auswahlkriterium heran. Dies soll garantieren, daß die gewählten Farbstoffe bei Bestrahlung mit einer möglichst hohen Intensität fluoreszieren. Dabei wird häufig die Bedeutung des folgenden Prozesses unterschätzt: Moleküle, die sich noch in transienten Zuständen befinden, können nicht fluoreszieren. Während der Lebensdauer dieses transienten Zustandes gehen Anregungsphotonen „verloren“ und die Fluoreszenzintensität wird vermindert. Dies spielt bei der Verwendung von Lampen als Lichtquelle keine oder eine nur geringe Rolle, da die Lichtintensität im allgemeinen gering ist. Bei der Verwendung von intensiven Lichtquellen wie Lasern kann der beschriebene Prozeß nicht mehr vernachlässigt werden. Dabei finden Laser in besonderem Maße immer mehr Verwendung in modernen Untersuchungsmethoden. In diesem Kapitel wird beschrieben, wie das Ausmaß dieser Fluoreszenzreduktion anhand der Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} und der Triplett-Lebensdauer τ_T berechnet werden

kann. Mit der vorgestellten Theorie wird der Grundstein für ein neues, auf Fluoreszenz basierendes Meßverfahren gelegt.

4.5.1 Theorie

Um die Fluoreszenzintensität I_{fl} zu berechnen, die von einer Farbstofflösung emittiert wird, ist es zweckmäßig, die Konzentration an Molekülen im emittierenden Zustand (hier der erste angeregte Singulett-Zustand S_1) zu ermitteln, da diese proportional zur Fluoreszenzintensität ist:

$$I_{fl} \propto c_1 \quad 4.3$$

Im Falle einer kontinuierlich bestrahlten Farbstofflösung ist die Ratengleichung für den ersten angeregten Singulett- (S_1) und den niedrigsten Triplett-Zustand (T_1) im Gleichgewichtszustand gegeben durch [37]:

$$\frac{dc_1}{dt} = 0 = \frac{I_{ex} F \epsilon_0 c_0 d \ln 10}{N_A V} - \frac{1}{\tau_1} c_1 \quad 4.4$$

$$\frac{dc_T}{dt} = 0 = c_1 k_{ST} - \frac{1}{\tau_T} c_T \quad 4.5$$

Dabei ist Gleichung 4.4 nur gültig für $\epsilon_0 \cdot c_0 \cdot d \ll 1$ und Abwesenheit von Absorptionen aus angeregten Zuständen. Mit der Einwaagekonzentration c

$$c = c_0 + c_1 + c_T \quad 4.6$$

erhält man aus den Gleichungen 4.4 und 4.5 schließlich:

$$c_1 = \frac{c \left(\frac{\tau_1}{\Delta t} \right)}{1 + c \left(\frac{\tau_1}{\Delta t} \right) \cdot (1 + k_{ST} \tau_T)} \quad 4.7$$

mit

$$\Delta t = \frac{N_A F h c_L}{P \lambda \epsilon_0 \ln 10} \quad 4.8$$

Die in den Gleichungen 4.4 bis 4.8 verwendeten Variablen stellen folgende Größen dar:

c_0	- Konzentration an Molekülen im Grundzustand
c_1	- Konzentration an Molekülen im S_1 -Zustand
c_T	- Konzentration an Molekülen im T_1 -Zustand
c_L	- Lichtgeschwindigkeit
ϵ_0	- molarer dekadischer Extinktionskoeffizient des Grundzustandes an der Anregungswellenlänge
τ_1	- Lebensdauer des S_1 -Zustandes
k_{ST}	- Intersystem-Crossing Ratenkonstante
I_{ex}	- Anzahl Anregungsphotonen pro s und cm^2
F	- Querschnitt des Anregungsfokus
d	- Schichtdicke
V	- Anregungsvolumen
N_A	- Avogadrokonstante
h	- Planckkonstante
P	- Anregungsleistung
λ	- Anregungswellenlänge

Die Variable Δt stellt den mittleren Zeitraum zwischen zwei Absorptionsprozessen eines Farbstoffmoleküls im Grundzustand dar. Anhand von Gleichung 4.7 erkennt man den Einfluß des nicht emittierenden Triplett-Zustandes. Wird das Produkt aus k_{ST} und τ_T größer, so wird die Konzentration c_1 herabgesetzt, was gleichbedeutend mit einer Verringerung der Fluoreszenzintensität I_{fl} ist (s. Gleichung 4.3). Die maximal erreichbare Fluoreszenzintensität I_{fl}^0 bei konstanter Anregungsintensität ergibt sich bei Nichtbesetzung des Triplett-Zustandes ($k_{ST} \cdot \tau_T = 0$).

Man erhält:

$$c_1^0 = \frac{c \left(\frac{\tau_1}{\Delta t} \right)}{1 + c \left(\frac{\tau_1}{\Delta t} \right)} \quad 4.9$$

Setzt man die Gleichungen 4.7 und 4.9 ins Verhältnis, so ergibt sich für die relative Fluoreszenzreduktion:

$$\frac{I_{fl}}{I_{fl}^0} = \frac{\frac{\tau_1}{\Delta t}}{1 + \frac{\tau_1}{\Delta t} \cdot (1 + k_{ST}\tau_T)} \quad 4.10$$

Gleichung 4.9 läßt sich folgendermaßen interpretieren. Für das Nichtvorhandensein von Intersystem-Crossing ist jedes Farbstoffmolekül in der Lage, in Abständen seiner Fluoreszenzlebensdauer τ_1 Fluoreszenzphotonen zu emittieren. Der Übergang in den Triplett-Zustand führt dazu, daß sich das Zeitintervall zwischen zwei Fluoreszenzphotonen im Mittel um den Faktor $(1+k_{ST}\tau_T)$ verlängert. In Abbildung 4.17 ist die nach Gleichung 4.10 berechnete relative Fluoreszenzreduktion dargestellt. Die für einen auf einen Querschnitt von $4 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2$ fokussierten Laserstrahl der Leistung 1 W bzw. 10 mW berechneten Zeitintervalle Δt ergeben sich nach Gleichung 4.8 mit den in Abbildung 4.17 aufgeführten Parametern zu $4.2 \cdot 10^{-11} \text{ s}$ bzw. $4.2 \cdot 10^{-9} \text{ s}$.

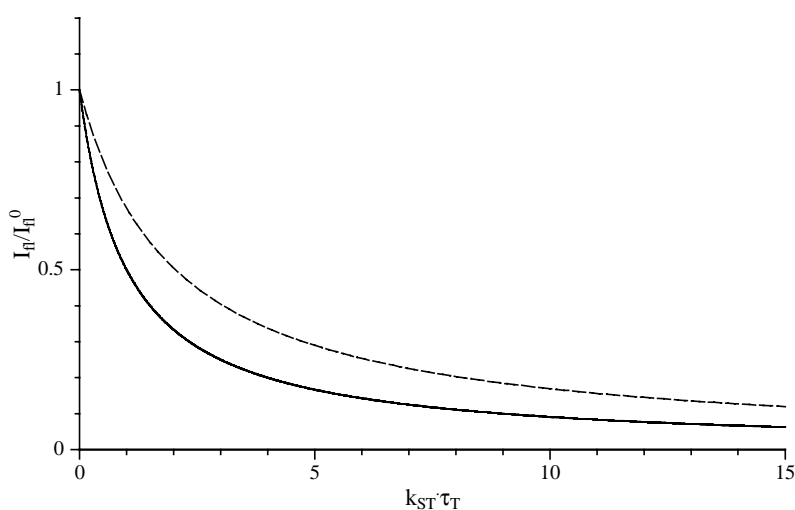
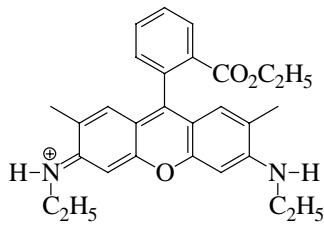


Abbildung 4.17 Nach Gleichung 4.10 berechneter Einfluß von $k_{ST} \tau_T$ auf die relative Fluoreszenzreduktion; $P = 10 \text{ mW}$ (---), bzw. 1 W (—), $F = 4 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2$, $\epsilon = 10^5 \text{ l/(mol}\cdot\text{cm)}$, $\lambda = 500 \text{ nm}$.

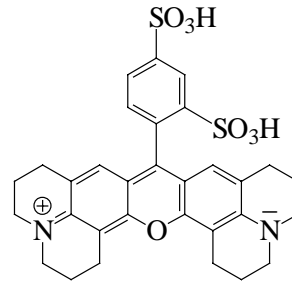
Es sei daran erinnert, daß das Produkt aus k_{ST} und τ_T bei Rhodamin 6G in Ethylenglykol bei ca. vier liegt. Anhand von Abbildung 4.17 erkennt man deutlich, daß die vorgestellte Berechnung selbst bei einer recht geringen Laserleistung von 10 mW eine erhebliche Fluoreszenzreduktion beschreibt.

4.5.2 Ausbleichmessungen mit biologisch und medizinisch relevanten Farbstoffen.

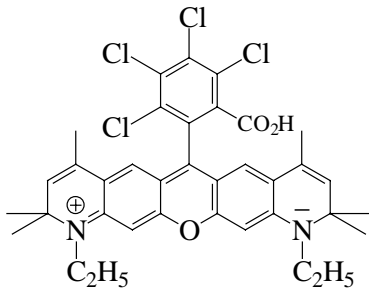
Um zu zeigen, daß die beschriebene Reduktion der Fluoreszenz auch bei Farbstoffen, die in Biologie und Medizin ihren Einsatz finden, ein erhebliches Ausmaß hat, wurden folgende Farbstoffe ausgewählt: JA 22, JA 26 (beide hergestellt im Labor von Prof. Dr. K. H. Drexhage, Universität Siegen), Rhodamin 6G und Sulforhodamin 101 (Fa. ACROS, laser grade, freie Säure) [38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46]:



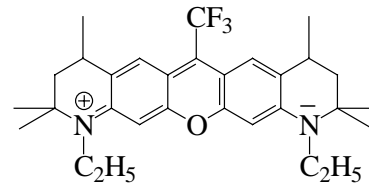
Rhodamin 6G



Sulforhodamin 101



JA 22



JA 26

Als Lösungsmittel wurden Ethylenglykol (destilliert), Ethanol (destilliert) und Wasser (tridestilliert) verwendet. Bei den Messungen mit JA 22 und 26 wurde dem jeweiligen Lösungsmittel Trifluoressigsäure (2 ml auf 100 ml Lösungsmittel) und bei den Messungen mit Sulforhodamin 101 Triethylamin (2 ml auf 100 ml Lösungsmittel) zugesetzt, um einen definierten Zustand der Farbstoffmoleküle zu garantieren. Tabelle 4.7 faßt die experimentellen Daten zusammen. Da alle Messungen mehrfach reproduziert wurden, werden teilweise Wertebereiche angegeben, wenn die experimentellen Parameter variierten.

Tabelle 4.7 Meßparameter für die durchgeführten Messungen.

	Rhodamin 6G			Sulforhodamin 101			JA 22		JA 26		
	EG	Et	H ₂ O	EG	Et	H ₂ O	EG	Et	EG	Et	
V _{Probe} , m/s	14.3	53.3	20.6	22.2	34-41	20-35	17-25	29-47	22-32	46-59	
A	λ , nm	530.9	530.9	530.9	568.2	568.2	568.2	647.1	647.1	647.1	647.1
	P, mW	90	80	80	90	46	114	120	130	130	130
	E	0.99	1.14	0.006	0.72	0.71	0.83	0.94	0.2	0.93	0.46
M	λ , nm	514.5	514.5	514.5	584	574	580	618	618	627	627
	P, mW	5	5	5	8	8	15	20	5	11	12
	E	0.49	0.63	0.005	1.5	0.86	1.3	0.94	1.2	0.94	0.67

A – Anregung, M – Messung, λ – Wellenlänge, P – Leistung, E – Extinktion bei λ auf 0.2 mm,
EG – Ethylenglykol, Et – Ethanol,

Tabelle 4.8 zeigt die gewonnenen Meßergebnisse, die sich aus Messungen für senkrechte und parallele Ausrichtung von Anregungs- und Meßlaserstrahl ergaben (vgl. Kapitel 2.3.4.1).

Tabelle 4.8 Meßergebnisse

	Ethylenglykol			Ethanol			Wasser		
	k_{ST} $10^5 s^{-1}$	τ_T μs	$k_{ST} \cdot \tau_T$	k_{ST} $10^5 s^{-1}$	τ_T μs	$k_{ST} \cdot \tau_T$	k_{ST} $10^5 s^{-1}$	τ_T μs	$k_{ST} \cdot \tau_T$
Rhodamin 6G	8.3	4.6	3.8	23	0.39	0.9	8.8	1.9	1.7
Sulforhodamin 101	3.7	9	3.3	24	0.63	1.5	3.2	4.8	1.5
JA 22	17	5.8	9.9	16	1.1	1.8	-	-	-
JA 26	3.2	4.4	1.4	7.1	0.55	0.4	-	-	-

vergleiche Übersichtstabelle im Anhang

In Abbildung 4.18 bis Abbildung 4.20 sind die Messungen getrennt nach Lösungsmittel dargestellt. Zur Übersichtlichkeit wurden die Signalmaxima auf die selben Wertepaare skaliert ($\Delta x(\max) = 2 \mu m$, $\Delta I/I(\max) = 0.1$).

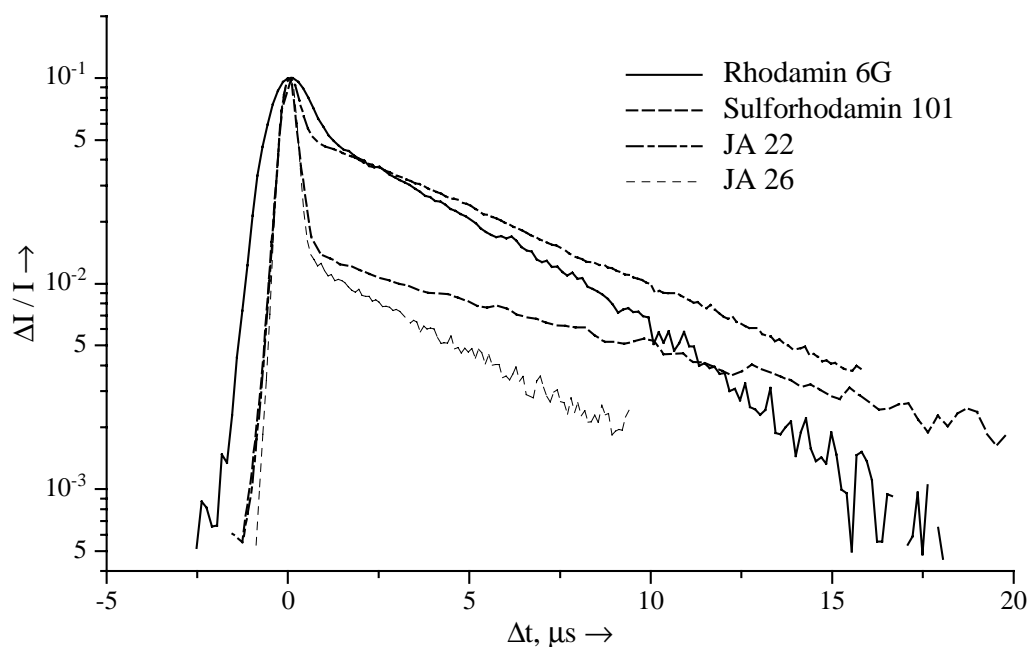


Abbildung 4.18 Ausbleichmessungen in Ethylenglykol; Parameter s. Tab. 4.7.

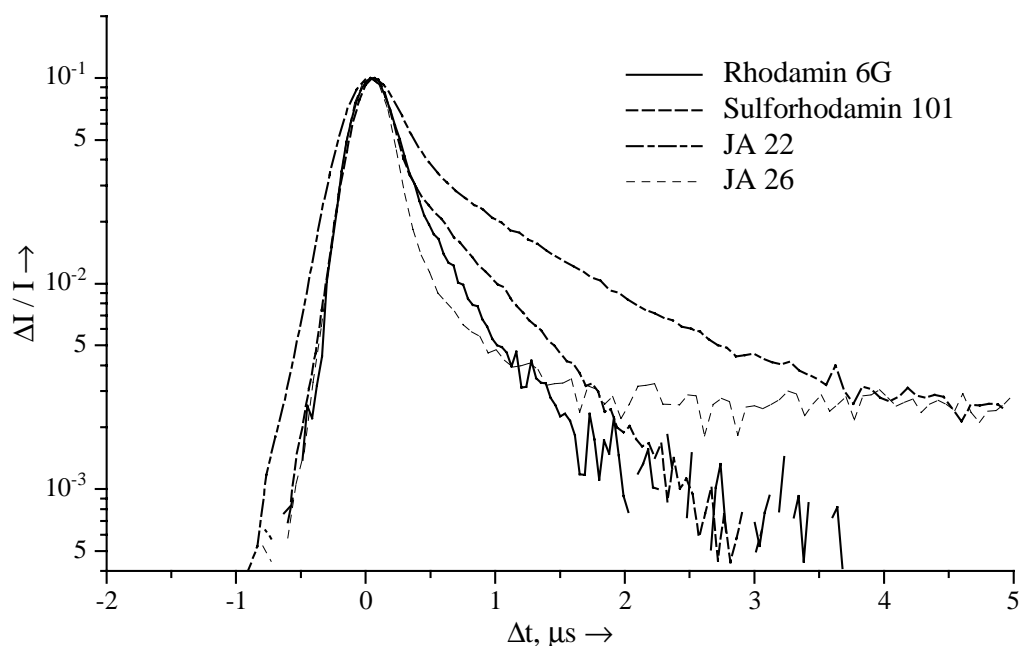


Abbildung 4.19 Ausbleichmessungen in Ethanol; Parameter s. Tab. 4.7.

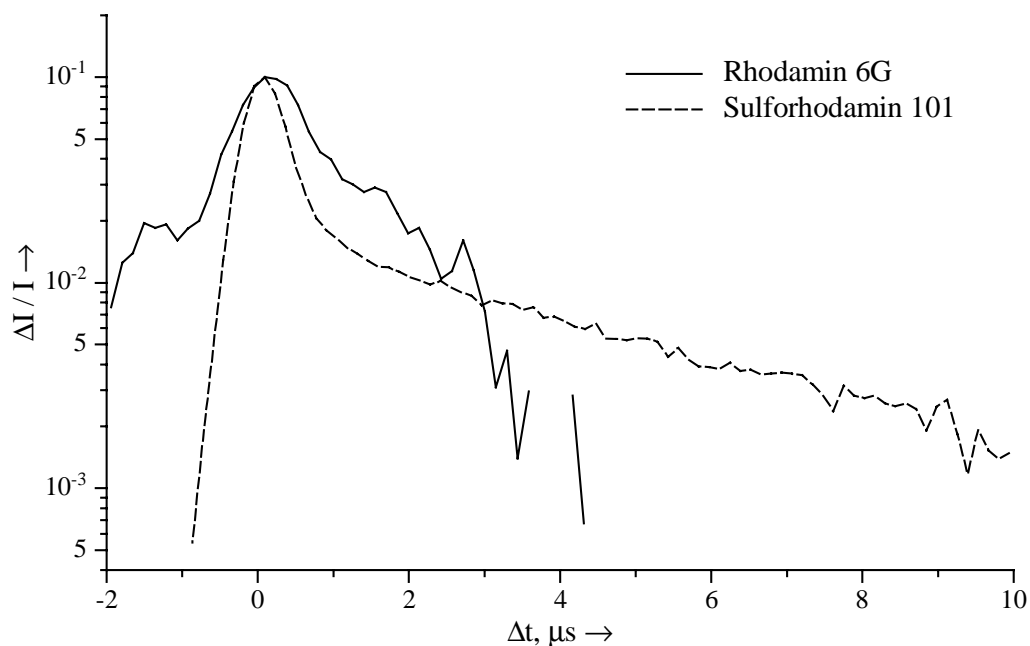


Abbildung 4.20 Ausbleichmessungen in Wasser; Parameter s. Tab. 4.7.

Anhand der theoretischen Abschätzung und den ermittelten molekularen Parametern ist für die verwendeten Farbstoffproben teilweise eine erhebliche Reduktion der Fluoreszenz bei kontinuierlicher Bestrahlung zu erwarten. Dies zeigt, daß der Effekt der Fluoreszenzreduktion

bei der Auswahl von geeigneten Laserfarbstoffen nicht vernachlässigt werden darf, wenn mit intensiven Lichtquellen wie Lasern angeregt und gleichzeitig eine hohe Fluoreszenzintensität gewünscht wird.

Auffällig ist der große Unterschied in der Intersystem-Crossing Ratenkonstante zwischen JA 22 und JA 26 in Ethylenglykol. Beide Farbstoffe weisen am zentralen Kohlenstoffatom elektronegative Substituenten auf. Jedoch bewirkt die gegenüber dem 2,3,4,5-Tetrachloro-*bezo*oesäurerest wesentlich kleinere Trifluormethylgruppe eine Verringerung der Intersystem-Crossing Ratenkonstante um den Faktor 4-5.

4.6 Zusammenfassung

Im Kapitel 4 wurde beschrieben, wie die neue Rotationsküvetten-Technik zur Durchführung von Ausbleichmessungen herangezogen wurde. Es konnte gezeigt werden, daß die Rotationsküvette hervorragend geeignet ist, um Messungen mit Farbstoffproben in beliebigen Lösungsmitteln durchzuführen. Die verschiedenen Triplett-Lebensdauern von Rhodamin 6G in unterschiedlichen Lösungsmitteln korrelierten dabei qualitativ mit der Menge an gelösten Sauerstoff im jeweiligen Lösungsmittel. Quantitativ stimmten die ermittelten Triplett-Lebensdauern jedoch nicht mit den theoretisch bei diffusionskontrollierter Löschung des Triplett-Zustandes zu erwartenden Werten für die jeweiligen Sauerstoffkonzentrationen überein. Dies traf in gleicher Weise auf die Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} zu.

Zur genaueren Untersuchung des Einflusses von molekularem Sauerstoff auf die molekularen Parameter k_{ST} und τ_T wurde ein Apparat zur Herstellung definierter Gasgemische aus Sauerstoff und Stickstoff entwickelt. Mit diesen Gasgemischen konnten anschließend unterschiedliche Konzentrationen an Sauerstoff im jeweiligen Lösungsmittel eingestellt werden. Die korrekte Arbeitsweise der Apparatur konnte durch den vergleichenden Einsatz von luftgesättigten Farbstofflösungen und solchen, die mit einem Gasgemisch aus 20 % Sauerstoff und 80 % Stickstoff gespült wurden, nachgewiesen werden. Weiterhin konnte durch die zeitabhängige Messung der Triplett-Lebensdauer von stickstoffgesättigten Farbstofflösungen in verschlossenen Proben-Spuren gezeigt werden, daß die Gaskonzentration in einem für Ausbleichmessungen ausreichend langem Zeitraum konstant blieb. Die Ermittlung der sauerstoffabhängigen Parameter $k_{ST}(O_2)$ und $\tau_T(O_2)$ für Rhodamin 6G in Ethylenglykol, Ethanol und Acetonitril zeigte, daß sowohl in Ethanol, als auch in Acetonitril neben der Triplett-Löschung durch Sauerstoff weitere effiziente Lösprozesse

vorliegen müssen. Weiterhin ergab sich für Rhodamin 6G in Ethylenglykol eine wesentlich stärkere Abhängigkeit der Intersystem-Crossing Ratenkonstante von der Sauerstoffkonzentration als in Ethanol und Acetonitril.

Bei Ausbleichmessung von Rhodamin 6G in Chloroform, sowie von Perylenfarbstoffen in Acetonitril, zeigte sich, daß das beschriebene Meßverfahren bei auftretenden Absorptionen transienter Zustände an der Meßwellenlänge keine auswertbaren Ergebnisse liefert, bzw. liefern kann. Des weiteren führten Ausbleichmessungen von Rhodamin 6G in Wasser zu stark verrauschten Meßsignalen. Dies war durch die geringe Konzentration der Farbstofflösung bedingt, welche wiederum zur Ausschließung von Dimeren-Bildung notwendig war. Anhand dieser Messungen wurde deutlich, daß das bisher verwendete Meßverfahren sehr stark durch die notwendige Erfüllung von Nebenbedingungen (keine transienten Absorptionen bei der Meßwellenlänge, keine zu geringen Extinktionen der Farbstofflösungen an der Pumpwellenlänge) eingeschränkt wird.

Zuletzt wurde der Einfluß der molekularen Parameter k_{ST} und τ_T auf die Verringerung der Fluoreszenz bei kontinuierlich bestrahlten Farbstoffproben dargestellt. Hierbei zeigte sich, daß der Triplettzustand einen nicht zu vernachlässigenden Einfluß auf die zu erreichende Fluoreszenzintensität ausübt.

Im folgenden Kapitel wird beschrieben, wie man die Fluoreszenzreduktion gezielt zur Bestimmung der Parameter k_{ST} und τ_T heranziehen kann. Weiterhin wird gezeigt, daß dieses neue Meßprinzip unempfindlich gegenüber transienten Absorptionen bei der Meßwellenlänge ist und gleichzeitig bei minimalen Extinktionen an der Anregungswellenlänge arbeitet, womit die beiden wesentlichen Einschränkungen der Ausbleichmessungen ausgeschlossen werden.

5 Neues Meßkonzept: Fluoreszenzreduktion

Im vorangegangenen Kapitel wurden zuletzt die Nachteile der Ausbleichmeßmethode dargestellt. Gleichzeitig wurde eine auf Fluoreszenz begründete Meßmethode angesprochen, die diese Nachteile nicht aufweisen sollte. Im folgenden sollen das Prinzip der Fluoreszenzreduktion, die zugrunde liegende Theorie, die Überprüfung der neuen Meßmethode und schließlich die Nutzung der neuen Technik zur Bestimmung der molekularen Parameter k_{ST} und τ_T besprochen werden.

5.1 Meßprinzip der Fluoreszenzreduktion

5.1.1 Fluoreszenzreduktion

Ein Farbstoff, der optisch angeregt wird, emittiert Fluoreszenz entsprechend seiner Fluoreszenzquantenausbeute. Solange die Anregung nicht zu intensiv wird, verhält sich die hervorgerufene Fluoreszenzintensität proportional zur Anregungsintensität. Ab einer bestimmten Anregungsintensität geht diese Proportionalität verloren. Die Abbildung 5.1 zeigt schematisch diesen Sachverhalt. Man sieht, wie die Fluoreszenzintensität bei steigender Anregungsintensität immer stärker von der Proportionalität abweicht. Die Ursache für dieses Verhalten ist bei verdünnten Lösungen (Extinktion an der Anregungswellenlänge $\ll 1$) durch das Ausbleichen des elektronischen Grundzustandes gegeben. D.h., daß sich bei zunehmender Anregungsintensität immer mehr Moleküle in angeregten Zuständen, sowohl im S_1 - als auch im T_1 -Zustand, befinden, wodurch der Grundzustand entvölkert wird. Die dadurch hervorgerufenen Abnahme der Grundzustandsabsorption hat die beschriebene Verringerung der Fluoreszenzintensität zur Folge. Das Ausmaß dieser Fluoreszenzreduktion ΔI_{F1} enthält demnach die Information über die Besetzung des ersten angeregten Singulett-Zustandes S_1 und des Triplett-Zustandes T_1 . Somit wird deutlich, daß durch die Messung der Größe ΔI_{F1} die Bestimmung der Größe k_{ST} möglich sein sollte, ebenso wie die Triplett-Lebensdauer τ_T , wenn die Messung analog zum Ausbleichverfahren zeitaufgelöst durchgeführt wird. Naturgemäß tritt die beschriebene Verringerung der Fluoreszenz erst bei sehr hohen Anregungsintensitäten deutlich zutage, was bei photoinstabilen Farbstoffen zu Problemen führt, da diese während einer Messung photozerstört werden können. Um also die Fluoreszenzreduktion zur Bestimmung molekularer Parameter heranziehen zu können, muß ein Meßverfahren entwickelt werden, daß die Bestimmung von ΔI_{F1} schon bei geringen Anregungsleistungen

ermöglicht. Wie bei der herkömmlichen Ausbleichmessung bietet sich auch hier die Lock-In Technik an. Wie sich später zeigen wird, muß diese Technik noch geringfügig modifiziert werden, um für die Bestimmung der Fluoreszenzreduktion eingesetzt werden zu können.

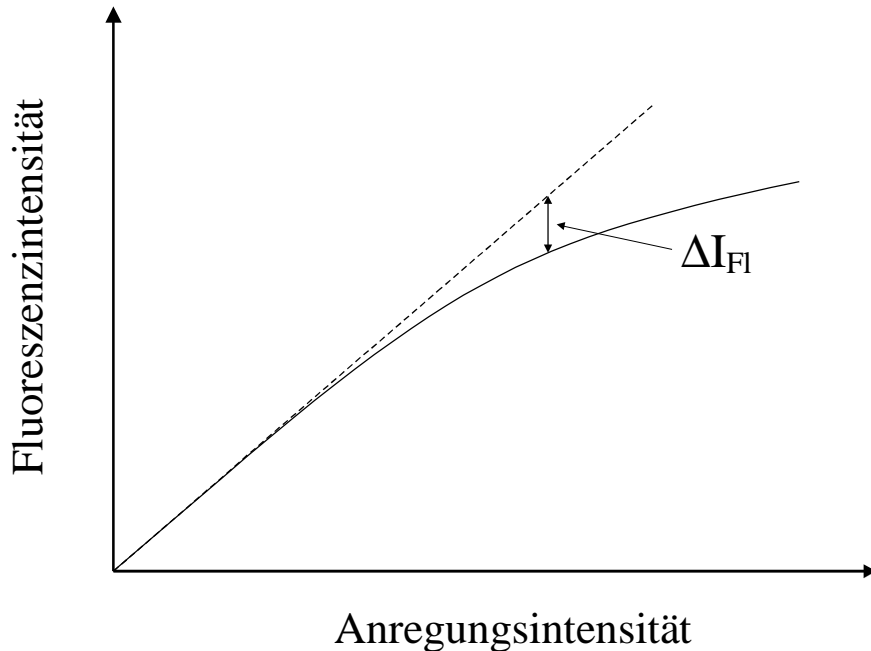


Abbildung 5.1 Schematische Darstellung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Anregungsintensität; – Fluoreszenzintensität, --- Fluoreszenzintensität ohne Fluoreszenzreduktion.

5.1.2 Meßprinzip und Aufbau

In Abbildung 5.2 ist schematisch dargestellt, wie sich die Fluoreszenzreduktion zu einem Meßprinzip umsetzen läßt. Die in der Rotationsküvette bewegte Farbstofflösung ist grau schattiert dargestellt. Wird die Probe mit einem Laserstrahl A angeregt, so emittiert diese eine der Anregungsintensität entsprechende Fluoreszenz (Fall ①). Bestrahlt man zusätzlich die Probe mit einem zweiten Laserstrahl B der selben Intensität wie A an einem horizontal und vertikal versetzten Ort, so daß die Laserfoki nicht überlappen (Fall ②), so erhält man insgesamt die doppelte Fluoreszenzintensität wie im Fall ①. Befinden sich die Laserfoki untereinander (Fall ③), so erhält man eine gegenüber Fall ② um ΔI_{FI} verminderte Fluoreszenzintensität, wenn Moleküle in transienten Zuständen aus dem Anregungsfokus des Laserstrahls A in den von Laserstrahl B transportiert werden und somit dort den Grundzustand zum Teil entvölkern (s. Kapitel 5.1.1).

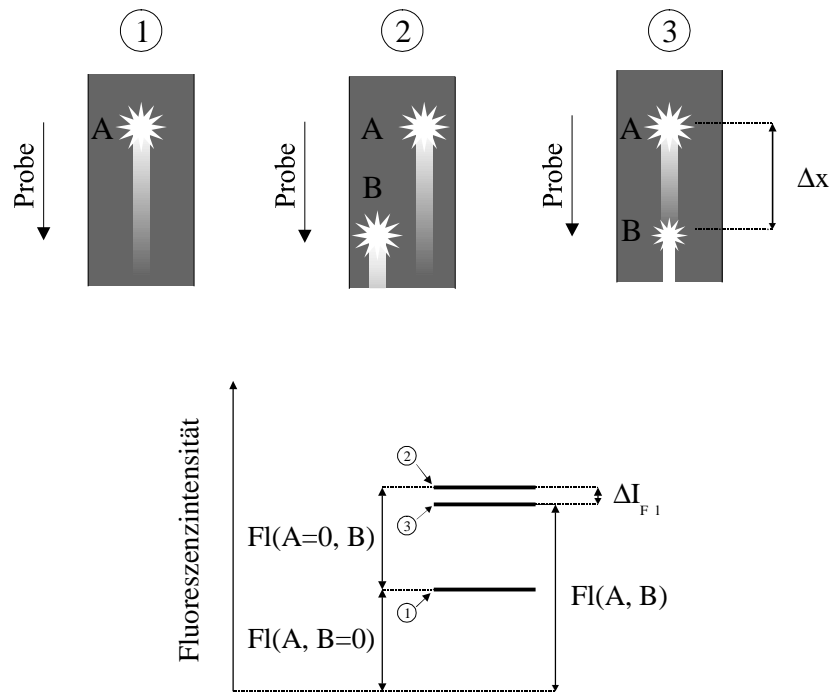


Abbildung 5.2 Schematische Darstellung des Meßprinzips;
 A – 1. Anregungslaser 1, B – 2. Anregungslaser; $Fl(\dots)$ – Fluoreszenzintensität;
 ΔI_{Fl} – Größe der Fluoreszenzreduktion.

In einem ersten Vorversuch, zu dem die bestehende Apparatur der Ausbleichmessungen verwendet werden konnte, sollte überprüft werden, ob die Verringerung der Fluoreszenz durch die Besetzung transienter Zustände meßbar ist. Dazu wurde eine Lösung von Rhodamin 6G in Ethylenglykol in die Rotationsküvette gefüllt und diese in den Strahlengang des Transientenspektrometers gebracht. Die Fluoreszenz, die durch die beiden Laserstrahlen (hier A und M, s. Abbildung 2.2) hervorgerufen wird, wurde mit einer Linse gesammelt und mit einer weiteren Linse auf einen Detektor vergrößert abgebildet. Abbildung 5.3 zeigt den schematischen Aufbau dieses Vorversuches. Der Abstand Δx der beiden Laserfoki wird so gewählt, daß die Abbildung des variablen Laserspots nicht auf die aktive Detektorfläche gelangt. Durch die Ausblendung der Fluoreszenz, die durch den variablen Laserfokus hervorgerufen wird, gelingt es so, nur die durch den ortsfesten Laserstrahl hervorgerufene Fluoreszenz zu detektieren. In Abhängigkeit vom Abstand Δx wird anschließend der der Fluoreszenzintensität entsprechende Detektorstrom notiert. Die Ergebnisse dieses Vorversuches zeigten eine meßbare Abnahme der Fluoreszenz bei Verringerung des Abstandes Δx . Allerdings ließ sich die Triplett-Lebensdauer mit dieser Methode nur annähernd bestimmen, zumal eine möglichst vollständige Ausblendung von Fluoreszenz mittels einer Blende nur für große Abstände Δx möglich war. Zusätzlich ist es mit diesem Vorgehen nicht möglich, die Verringerung der Fluoreszenz bei überlappenden Laserfoki zu

bestimmen. Allerdings zeigte dieser Vorversuch, daß eine Bestimmung der Fluoreszenzreduktion prinzipiell möglich ist.

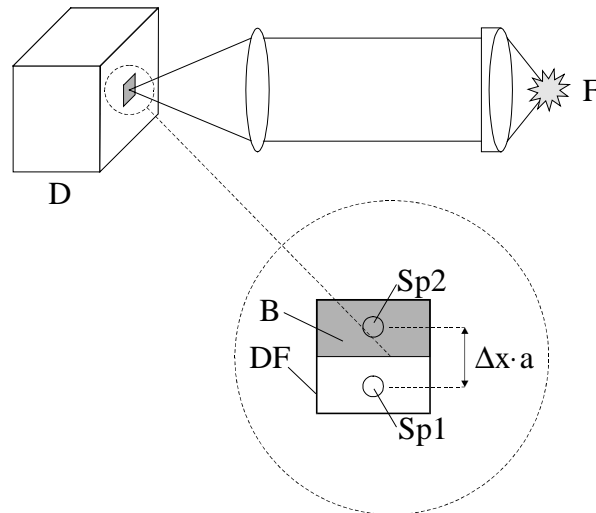


Abbildung 5.3 Vorversuch zur Messung der Fluoreszenzreduktion; F – durch die Laserstrahlen hervorgerufene Fluoreszenz, D – Detektor, $Sp1$ – ortsfester Laserspot, $Sp2$ – variabler Laserspot, B – mechanische Blende, DF – aktive Detektorfläche, a – Vergrößerungsfaktor.

Daher wurde der Versuchsaufbau in der Weise verbessert, daß die Fluoreszenzreduktion für jeden Abstand Δx meßbar ist. Abbildung 5.4 zeigt den abgeänderten Aufbau, ausgehend von der in Kapitel 2.2 in der Abbildung 2.2 dargestellten Apparatur.

Die Optik zur Bestimmung der transmittierten Meßlichtintensität wurde entfernt und durch einen Aufbau zum Sammeln der emittierten Fluoreszenz ersetzt. Zusätzlich werden nun beide Anregungslaserstrahlen mittels Choppern moduliert (s.u.). Das grau schattierte Element, bestehend aus zwei Linsen, einem Pinhole und dem Detektor, dient zur Detektion der Fluoreszenz und unterdrückt den störenden Einfluß des Umgebungslichtes. Dabei darf das Pinhole nicht zu klein gewählt werden, da die von beiden Laserspots hervorgerufene Fluoreszenz bei allen Abständen Δx gesammelt werden muß. D.h., die Abbildung der räumlich getrennten Laserspots auf das Pinhole darf für keinen Wert von Δx die Fläche des Pinhole überschreiten. Zum Abtrennen des Anregungslichtes dient hierbei ein Kantenfilter. Ansonsten kann der Aufbau für die Durchführung von Ausbleichmessungen weiter verwendet werden (vgl. Abbildung 2.1 und Abbildung 2.2).

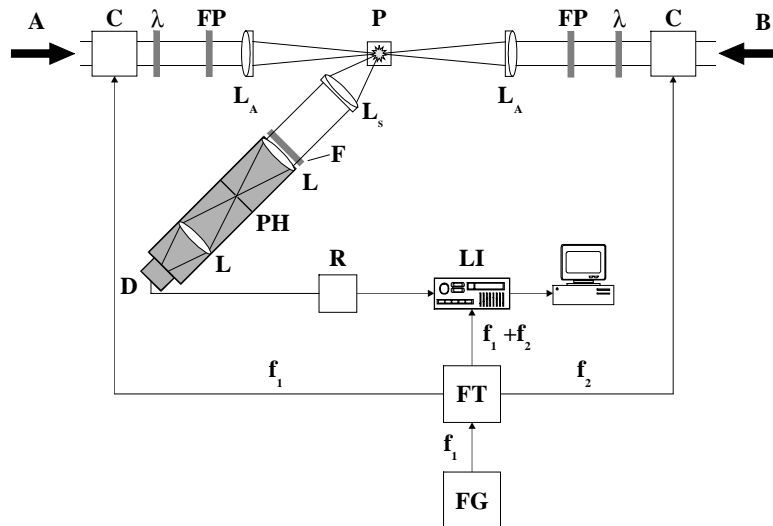


Abbildung 5.4 *Meßaufbau zur Bestimmung der Fluoreszenzreduktion; P – Probe, A, B – Anregungsstrahlen, C – synchronisierbare Chopper (Modell 650/651, Fa. EG&G), L_A – Achromaten (Brennweite: 60mm), L_S – Achromat (Brennweite: 40 mm), L – Sammellinse, PH – Pinhole (Durchmesser: 2mm), D – Detektor (Photomultiplier, Typ H5784, Fa. Hamamatsu), R – paralleler, variabler Widerstand, LI – Lock-In Verstärker (Model 5101, Fa. EG&G), FG – Frequenzgenerator, FT – Frequenzteiler, λ – $\lambda/2$ -Platte (low order, Fa. Halle), FP – Polarisationsfilter, F – Kantenfilter, f_1 , f_2 , f_{1+2} – Modulationsfrequenzen.*

Die in Kapitel 2.2 beschriebene Lock-In Technik kann zur Bestimmung der Fluoreszenzreduktion ΔI_{FI} mehr verwendet werden. Bei den Ausbleichmessungen konnte durch das Zerhacken des Anregungslichtes die Modulation auf das transmittierte Meßlicht übertragen und die Meßgröße ΔI durch phasenrichtige Detektion direkt bestimmt werden („Modulationstransfer-Technik“). Hier ist es möglich, ein sehr geringes Meßsignal von einem intensiven Trägersignal zu trennen. Wendet man die gleiche Technik zur Bestimmung der Fluoreszenzreduktion an, so erhält man als Ergebnis die Fluoreszenzintensität, die durch beide Laserstrahlen hervorgerufen wird, vermindert um den Betrag ΔI_{FI} in Abhängigkeit vom Abstand Δx der beiden Laserfoki. Dies gleicht dem Versuch, Ausbleichmessungen ohne Lock-In Technik durchzuführen und ist meßtechnisch nicht möglich. Um das Ausmaß der Fluoreszenzreduktion dennoch bestimmen zu können, moduliert man beide Anregungslaserstrahlen A und B mit unterschiedlichen Frequenzen f_1 bzw. f_2 . Das Meßsignal wird auch hier mit einem Lock-In Verstärker phasenrichtig detektiert, allerdings bei der Summenfrequenz f_1+f_2 . Die genaue Beschreibung dieser Doppel-Chopp-Technik findet sich in [47]. Darin wird gezeigt, daß bei der Summen- und der Differenzfrequenz f_1+f_2 bzw. f_1-f_2 ausschließlich Meßlicht-Komponenten detektiert werden, die durch die Besetzung transienter Zustände hervorgerufen werden. Auf diese Weise läßt sich die Fluoreszenzreduktion ΔI_{FI} hintergrundfrei bestimmen. Bei der Auswahl der Frequenzen f_1 und f_2 muß darauf geachtet

werden, daß weder Obertöne ($n \cdot f_1$, bzw. $n \cdot f_2$, n ganze positive Zahlen), noch durch mechanische Fehler der Chopper hervorgerufenen Frequenzen die Summenfrequenz ergeben. Die Messung selbst wird analog zu den Ausbleichmessungen durchgeführt. Ein Unterschied besteht darin, daß der Abstand Δx zwischen den beiden Spots der Anregungslaser symmetrisch gewählt wird. Wurde der Meßbereich bei einer typischen Ausbleichmessung von $\Delta x = -50-300 \mu\text{m}$ gewählt, so wird nun der Meßbereich typischerweise von -300 bis $+300 \mu\text{m}$ eingestellt. Als Ergebnis erhält man ein symmetrisches Meßsignal, das das exponentielle Abklingen des Triplett-Zustandes und die aus den Ausbleichmessungen bekannte „Singulett-Beule“ aufweist.

5.2 Theorie

Um die von einer Farbstofflösung ausgesendete Fluoreszenz beschreiben zu können, muß man die Besetzung des ersten angeregten Singulett-Zustandes S_1 berechnen. Dazu werden die folgenden Ratengleichungen aufgestellt:

$$\frac{dc_1}{dt} = k_1 \cdot c_0(x) \cdot f(a) - \frac{c_1(x)}{\tau_1} \quad 5.1$$

$$\frac{dc_T}{dt} = c_1(x) \cdot k_{ST} - \frac{c_T(x)}{\tau_T} \quad 5.2$$

$$k_1 = \frac{\ln 10 \cdot \epsilon_0}{N_A}, \quad f(a) = I_A e^{-\frac{x^2}{a_A^2}} + I_B e^{-\frac{(x-\Delta x)^2}{a_B^2}} \quad 5.3$$

Berücksichtigt man dann die Einwaagekonzentration c

$$c = c_0(x) + c_1(x) + c_T(x) \quad 5.4$$

so erhält man schließlich:

$$\frac{dc_1}{dt} = k_1 \cdot (c - c_T(x)) \cdot f(a) - c_1(x) \cdot \left(\frac{1}{\tau_1} + k_1 \cdot f(a) \right) \quad 5.5$$

mit

c_0	-	Konzentration an Molekülen im Grundzustand
c_1	-	Konzentration an Molekülen im S_1 -Zustand
c_T	-	Konzentration an Molekülen im T_1 -Zustand

ϵ_0	- molarer dekadischer Extinktionskoeffizient des Grundzustandes an der Anregungswellenlänge
τ_1	- Lebensdauer des S_1 -Zustandes
τ_T	- Lebensdauer des T_1 -Zustandes
x	- Ort
Δx	- Verschiebung des Anregungsspot von B gegenüber A
k_{ST}	- Intersystem-Crossing Ratenkonstante
k_1	- Absorptionsquerschnitt
$f(a)$	- Anzahl Anregungsphotonen pro s und cm^2 durch die Anregungslaser A und B am Ort x , bzw. $x+\Delta x$
I_A, I_B	- Intensitäten der Laserstrahlen A und B in $1/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$
a_A, a_B	- Radius der Laserfoki A und B
N_A	- Avogadrokonstante

Mit den Gleichungen 5.2 und 5.5 sind die Besetzungszahlen des S_1 - und des T_1 -Zustandes in Abhängigkeit vom Ort x gegeben. Die aufgeführten Überlegungen gelten jedoch nur für verdünnte Lösungen, d.h., wenn die Extinktion der Farbstofflösung an der Anregungswellenlänge wesentlich kleiner als 1 ist. Ansonsten läßt sich die Anregungsintensität nicht als nahezu konstant beim Durchtritt durch die Farbstofflösung annehmen. Bei den Ausbleichmessungen erhielt man als Meßsignal das Verhältnis aus transmittierter Meßleistung bei eingeschaltetem und bei ausgeschaltetem Anregungslaser:

$$\frac{\Delta I}{I} = 10^{d \cdot c_T(x,y) \cdot (\epsilon_0 - \epsilon_T)} - 1 \quad 2.3$$

Im Falle der Fluoreszenzreduktionsmessung vergleicht man die Fluoreszenzreduktion ΔI_{FI} mit der Gesamtfluoreszenz, die durch die beiden Anregungslaser hervorgerufen wird. Für die um ΔI_{FI} verringerte Gesamtfluoreszenz $FL^*(\Delta x)$ (Fall ③ in Abbildung 5.2) gilt:

$$FL^*(\Delta x) = FI(A) + FI(B) - \Delta I_{FI}(\Delta x) \quad 5.6$$

- mit
- | | |
|---------|---|
| $FI(A)$ | - Fluoreszenz, die durch den Anregungslaser A hervorgerufen wird; der Anregungslaser B ist dabei ausgeschaltet. |
| $FI(B)$ | - Fluoreszenz, die durch den Anregungslaser B hervorgerufen wird; der Anregungslaser A ist dabei ausgeschaltet. |

Für ΔI_{Fl} gilt somit:

$$\Delta I_{\text{Fl}}(\Delta x) = (\text{Fl}(\text{A}) + \text{Fl}(\text{B})) - \text{Fl}^*(\Delta x) \quad 5.7$$

Das Meßsignal ergibt sich zu:

$$\begin{aligned} \frac{\Delta I}{I} &= \frac{\Delta I_{\text{Fl}}(\Delta x)}{\text{Fl}(\text{A}) + \text{Fl}(\text{B})} = \frac{\text{Fl}(\text{A}) + \text{Fl}(\text{B}) - \text{Fl}^*(\Delta x)}{\text{Fl}(\text{A}) + \text{Fl}(\text{B})} \\ &= 1 - \frac{\text{Fl}^*(\Delta x)}{\text{Fl}(\text{A}) \cdot \left(1 + \frac{\text{Fl}(\text{A})}{\text{Fl}(\text{B})}\right)} \end{aligned} \quad 5.8$$

Abbildung 5.5 und Abbildung 5.6 zeigen mit der dargestellten Theorie berechnete Meßsignale.

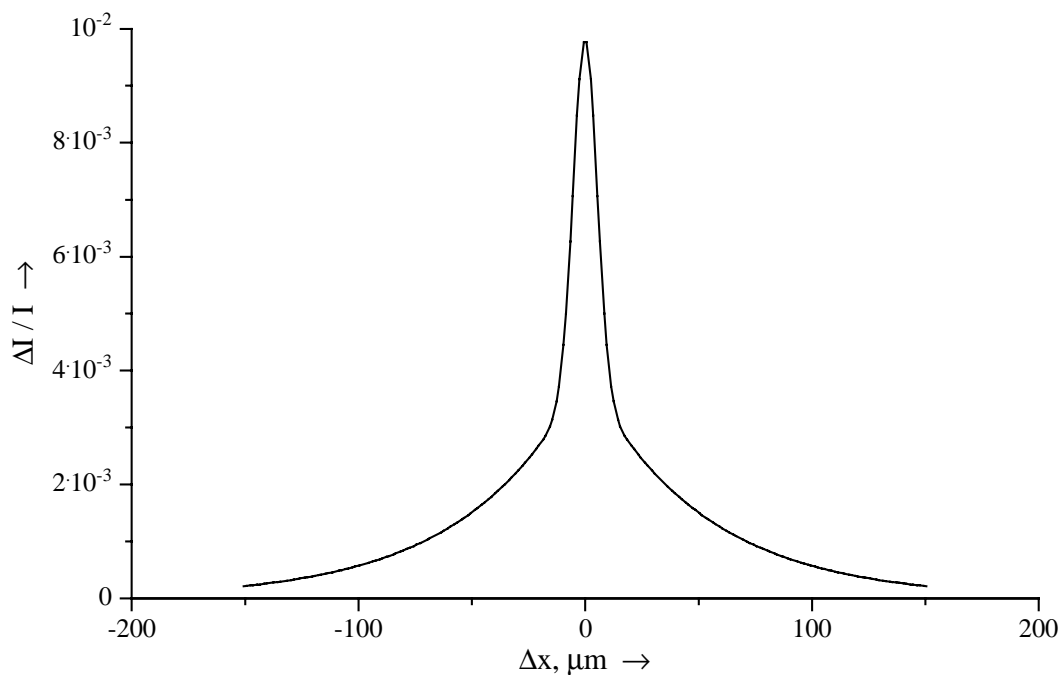


Abbildung 5.5 Berechnetes Meßsignal für Fluoreszenzreduktion ($k_{ST} = 7.5 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$, $\tau_T = 4.3 \text{ } \mu\text{s}$, $a = 7.5 \text{ } \mu\text{m}$).

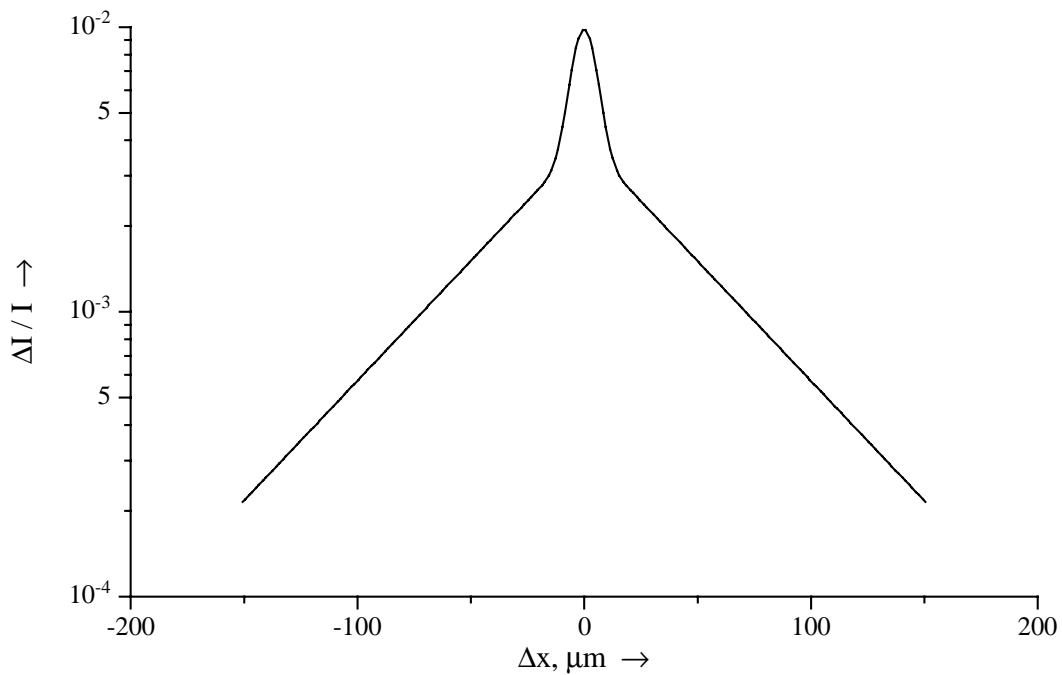


Abbildung 5.6 Logarithmische Darstellung der Abbildung 5.5.

Die Größe ΔI_{FI} wird, wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben, durch phasenrichtige Detektion bei der Summenfrequenz f_1+f_2 bestimmt. Zur Auswertung eines Meßsignals werden die Ratengleichungen mittels eines Programms numerisch gelöst. Über die Parameter a_A (die Foki der beiden Anregungslaserstrahlen A und B werden als identisch angenommen) und k_{ST} wird das Fitsignal an das Meßsignal angeglichen. Über das exponentielle Abklingen des Meßsignals läßt sich bei bekanntem v_{Probe} analog zur Ausbleichmessung die Triplet-Lebensdauer τ_T bestimmen. Somit erhält man aus einer Messung der Fluoreszenzreduktion die Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} , die Triplet-Lebensdauer τ_T und den Querschnitt der Laserfoki.

Anhand der angestellten Überlegungen läßt sich nun auch erkennen, warum das neue Meßsystem gegenüber Absorptionen im Bereich der Anregungswellenlänge unempfindlich ist. Bei der Durchführung von Fluoreszenzreduktionsmessungen müssen verdünnte Lösungen eingesetzt werden (Extinktion auf 0.2 mm an der Anregungswellenlänge $\ll 1$). D.h., daß nahezu alle Anregungsphotonen „ungenutzt“ die Farbstofflösung passieren. Der eigentliche Meßeffect wird von sehr wenigen Photonen hervorgerufen, die die Farbstofflösung zur Fluoreszenz anregen. Treten nun Absorptionen im Bereich der Anregungswellenlänge auf, so stehen immer noch genügend Photonen zum Erzielen des Meßeffectes zur Verfügung. Es spielt keine Rolle, ob Photonen „ungenutzt“ die Farbstofflösung passieren, oder ob sie dabei

durch Verunreinigungen oder transiente Zustände absorbiert werden. Solange alle auftretenden Absorptionsprozesse eine Gesamtextinktion $\ll 1$ ergeben, wird immer ein unverfälschtes Meßsignal erhalten werden.

5.3 Durchführung einer Messung

Die Gleichung 5.8 vereinfacht sich bei gleichen Fluoreszenzintensitäten $Fl(A)$ und $Fl(B)$ zu:

$$\frac{\Delta I_{Fl}(\Delta x)}{Fl(A) + Fl(B)} = 1 - \frac{Fl^*(\Delta x)}{2 \cdot Fl(A)} \quad 5.9$$

Dementsprechend ist es sinnvoll, die Laserintensitäten auf identische Werte abzugleichen. Die Einstellung der Anregungs- und damit der Fluoreszenzintensitäten wird dabei durch die Kombination von $\lambda/2$ -Plättchen mit Polarisationsfiltern vorgenommen (s. Abbildung 5.4). Dabei wird für alle Messungen eine senkrechte Ausrichtung der Polarisationsrichtungen zueinander gewählt (Anregungslaserstrahl A senkrecht, Anregungslaserstrahl B horizontal polarisiert). Zunächst wird der Abstand Δx der beiden Laserfoki auf Null eingestellt. Anschließend wird ein Anregungslaserstrahl ausgeblendet, so daß die auf den Detektor abgebildete Fluoreszenz nur noch von einem Anregungslaserstrahl hervorgerufen wird. Diese wird durch Drehen eines $\lambda/2$ -Plättchens auf einen beliebigen Wert eingestellt (dabei muß selbstverständlich die Empfindlichkeit des Detektors berücksichtigt werden), den man mit einem Oszillographen kontrolliert. Danach wird dieser Laserstrahl ebenfalls ausgeblendet und anschließend der zweite Laserstrahl analog auf die gleiche Intensität durch Drehen des zweiten Polarisationsfilters eingestellt. Auf diese Weise lassen sich die Intensitäten der beiden Anregungslaserstrahlen angleichen. Als Gesamtfluoreszenzintensität verwendet man dann nahezu den doppelten Wert, den man auf einem Oszillographen für einen Laserstrahl abliest. Voraussetzung für das Abgleichen der Anregungsintensitäten über die detektierte Fluoreszenz ist, daß die mit unterschiedlichen Frequenzen f_1 bzw. f_2 modulierten Fluoreszenzsignale die gleiche Verstärkung durch das System Photomultiplier \leftrightarrow Oszillograph erfahren. Dies wird durch den parallel geschalteten Vorwiderstand (s. Abbildung 5.4) gewährleistet. Die Transmission des elektronischen Tiefpasses, dargestellt durch den Oszillographen, wird dadurch zu großen Frequenzen hin erweitert. Weiterhin wird durch die Ausdehnung des Transmissionsbereiches sichergestellt, daß das Meßsignal, das bei der Summenfrequenz f_1+f_2 detektiert wird, durch den Tiefpaß gelangt.

Nach dem Abgleichen der Laserintensitäten muß, wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben, sichergestellt werden, daß die beiden Laserfoki genau auf das Pinhole des Raumfilters abgebildet werden und so die durch die beiden Anregungslaser hervorgerufene Fluoreszenz für alle Werte von Δx auf den Detektor gelangen kann. Dazu wird die Abbildung des ortsfesten Laserfokus (Anregungslaser A) in die Mitte des Pinholes justiert. Zur Überprüfung der Justage wird nun die Modulation des ortsfesten Anregungsstrahls ausgeschaltet und die Modulationsfrequenz des variablen Anregungsstrahls (B) als Trigger für den Lock-In Verstärker verwendet. Somit wird nur noch die Fluoreszenz, die durch den modulierten Anregungsstrahl B hervorgerufen wird, phasenrichtig detektiert. Mit diesen Einstellungen wird nun eine Messung der Fluoreszenz im Bereich Δx von -300 bis $+300 \mu\text{m}$ durchgeführt. Anhand dieser Messung kann genau beobachtet werden, ob und wie stark das Pinhole Fluoreszenz ausblendet. Abbildung 5.7 zeigt schematisch, wie ein solches Meßsignal aussehen kann. Als Meßsignal wurde hier der Quotient aus Fluoreszenzintensität, die durch den Anregungslaser B hervorgerufen wird, und der Gesamtfluoreszenzintensität verwendet. Bei gleichen Anregungsintensitäten der Laser A und B sollte ein Wert von 0.5 erhalten werden. Da die Linse L_S (s. Abbildung 5.4) nur einen Bruchteil der in den ganzen Raum ausgestrahlten Fluoreszenz „einfangen“ kann, ist eine Verringerung der Fluoreszenz, die auf den Detektor gelangt, bei Verschiebung des Anregungsfokus um Δx unumgänglich. Da die maximale Verschiebung Δx jedoch nur $\pm 300 \mu\text{m}$ beträgt, ist diese Verringerung vernachlässigbar. Diese Vorbereitungen sind für die Durchführung von Fluoreszenzreduktionsmessungen notwendig, da ansonsten unsymmetrische Meßsignale erhalten werden können, die eine Auswertung erschweren. Ist die Justage optimal, erfolgt die eigentliche Messung der Fluoreszenzreduktion.

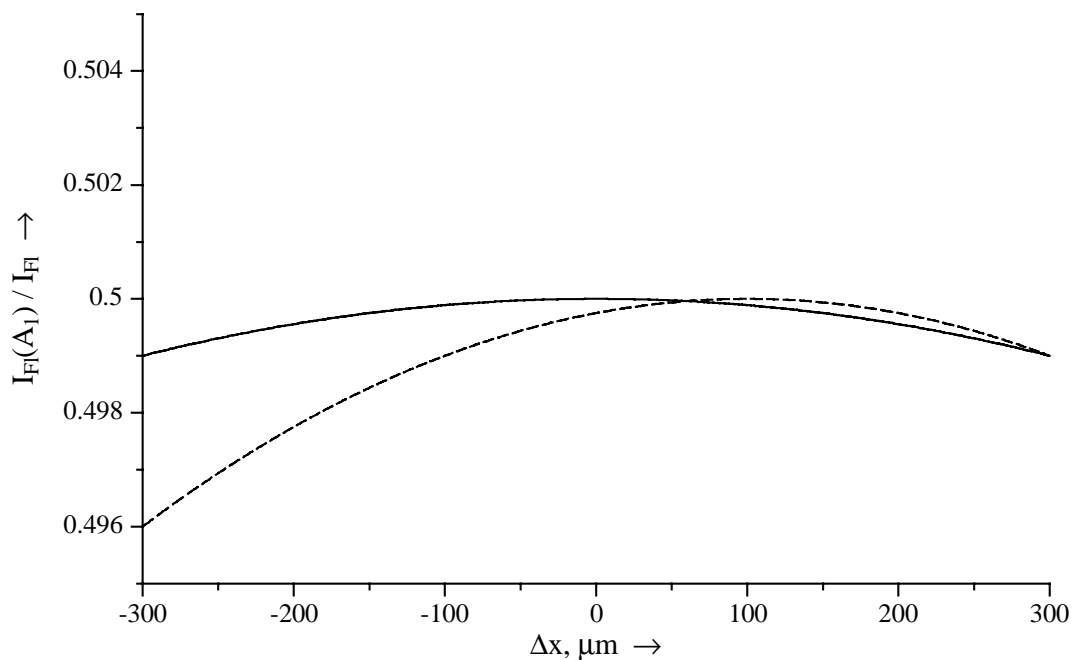


Abbildung 5.7 Überprüfung der Justage des Pinholes im Raumfilter; – durch Anregungslaser B generierte Fluoreszenz gelangt nahezu ohne Ablendung auf den Detektor, --- Fluoreszenz wird durch das Pinhole abgelenkt.

5.4 Überprüfung der neuen Meßtechnik

5.4.1 Abhängigkeit des Meßsignals von der Farbstoffkonzentration

Die in Kapitel 5.2 angestellten Überlegungen zur Auswertung von Fluoreszenzreduktions-Meßsignalen hat zu der Voraussetzung geführt, daß die verwendeten Farbstofflösungen an der Anregungswellenlänge eine geringe Extinktion in der gewählten Schichtdicke (Rotationsküvette: 0.2 mm, Jet: 0.1 mm) aufweisen müssen. Um experimentell zu überprüfen, welche Extinktion maximal vorliegen darf, damit die erhaltenen Meßsignale in der vorgestellten Weise ausgewertet werden können, wurden Fluoreszenzreduktionsmessungen von Rhodamin 6G in Ethylenglykol in Abhängigkeit von der Konzentration durchgeführt. Dabei wurde auf die Jet-Technik zurückgegriffen. Hierbei konnte durch Zugabe von Lösungsmittel in den Vorratsbehälter (vgl. Kapitel 2.4) die Konzentration der verwendeten Farbstofflösung kontinuierlich verringert werden. Durch dieses Vorgehen wurde sichergestellt, daß kein optisches Element im Strahlengang bewegt werden mußte und die erhaltenen Ergebnisse ausschließlich auf die Verringerung der Konzentration zurückzuführen sind. Die zu der jeweiligen Messung zugehörige Extinktion wurde durch Entnahme von

Proben zur Messung in einem Spektrometer bestimmt. Da während der Messungen die Laserleistungen konstant gehalten wurden, verringerte sich durch die Verdünnung der Farbstofflösung ebenfalls die erzielte Gesamtfluoreszenzintensität. Dies wurde durch Erhöhen der am Photomultiplier anliegenden Verstärkerspannung ausgeglichen, so daß der Photomultiplier bei jeder Messung den gleichen Detektorstrom lieferte. Somit können die erhaltenen Meßsignale direkt miteinander verglichen werden. In Abbildung 5.8 bis Abbildung 5.11 sind die Meßergebnisse dargestellt. Man erkennt, daß die gewonnenen Meßsignale exakt die vorausberechnete Gestalt aufweisen und die erwartete Konzentrationsabhängigkeit aufweisen. Es ist bemerkenswert, daß die Fluoreszenzreduktion auf 10^{-4} genau gemessen werden kann (s.a. Messungen aus Kapitel 6). Die geringste Konzentration, bei der in dieser Meßreihe ein Fluoreszenzreduktionsmeßsignal gemessen wurde, betrug 10^{-3} mmol/l.

Abbildung 5.8 zeigt deutlich, wie das Meßsignal bei abnehmender Extinktion stetig ansteigt. In Abbildung 5.9 ist zu erkennen, daß sich ab der Unterschreitung einer Extinktion von 0.034 bei der Anregungswellenlänge und der Schichtdicke der Probe das Meßsignal im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht mehr ändert. Zur Verdeutlichung dieses Verhaltens wurden die Maxima der Meßsignale in den beiden folgenden Abbildungen auf 1 skaliert. In Abbildung 5.12 sind die Maxima der Meßsignale als Funktion der Absorption dargestellt. Man erkennt, daß bei abnehmender Absorption das Maximum $\Delta I_{FI}/I_{FI}$ bis zum Erreichen eines Plateaus ansteigt und dann konstant bleibt. Um Meßsignale aus Fluoreszenzreduktionsmessungen nach der in Kapitel 5.2 angeführten Theorie auswerten zu können, müssen die Konzentrationen der verwendeten Farbstofflösungen folglich in einem Bereich liegen, die einer Extinktion kleiner als 0.03 an der jeweiligen Anregungswellenlänge und der gewählten Schichtdicke (Jet: 0.1 mm, Rotationsküvette: 0.2 mm) entsprechen. In Tabelle 5.1 sind die Meßergebnisse zusammengestellt.

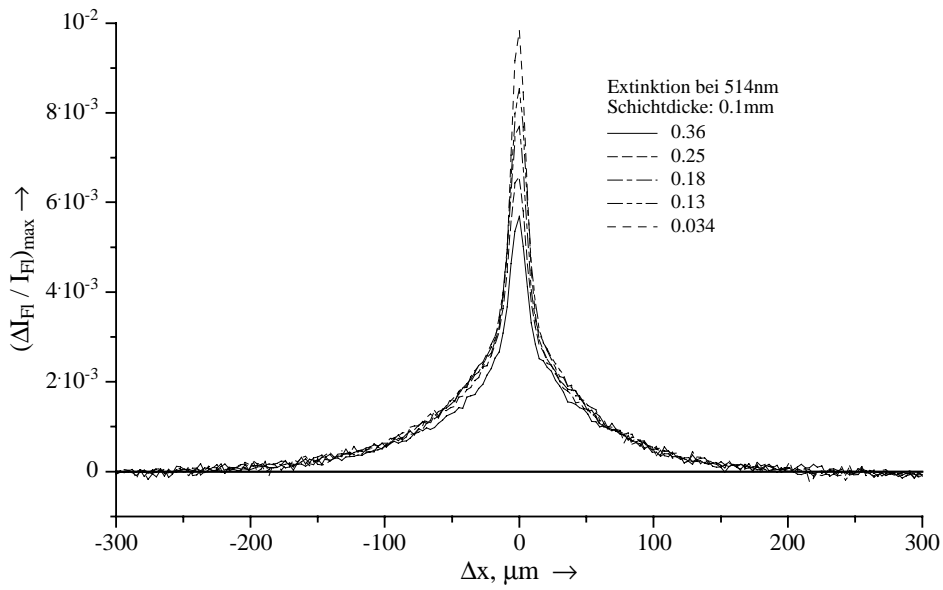


Abbildung 5.8 Fluoreszenzreduktionsmessung von Rhodamin 6G in Ethylenglykol in Abhängigkeit von der Konzentration der Farbstofflösung (Jet-Technik); Anregung: 514.5 nm (jeweils 230 mW, senkrecht zueinander polarisiert), Extinktionen (514.5 nm, 0.1 mm): 0.034 – 0.36, $v_{Probe} = 12$ m/s.

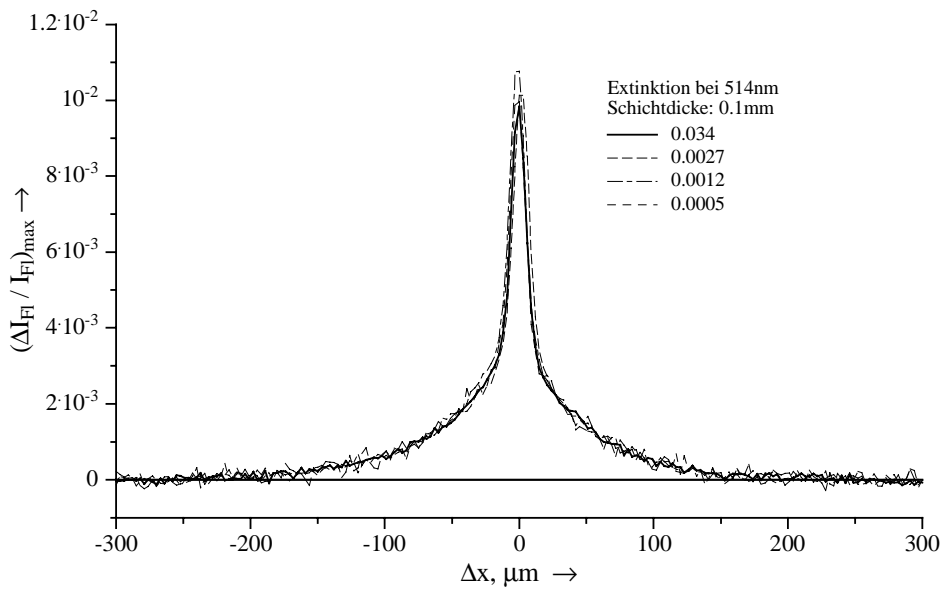


Abbildung 5.9 Fluoreszenzreduktionsmessung von Rhodamin 6G in Ethylenglykol in Abhängigkeit von der Konzentration der Farbstofflösung (Jet-Technik); Anregung: 514.5 nm (jeweils 230 mW, senkrecht zueinander polarisiert), Extinktionen (514.5 nm, 0.1 mm): 0.0005 – 0.034, $v_{Probe} = 12$ m/s.

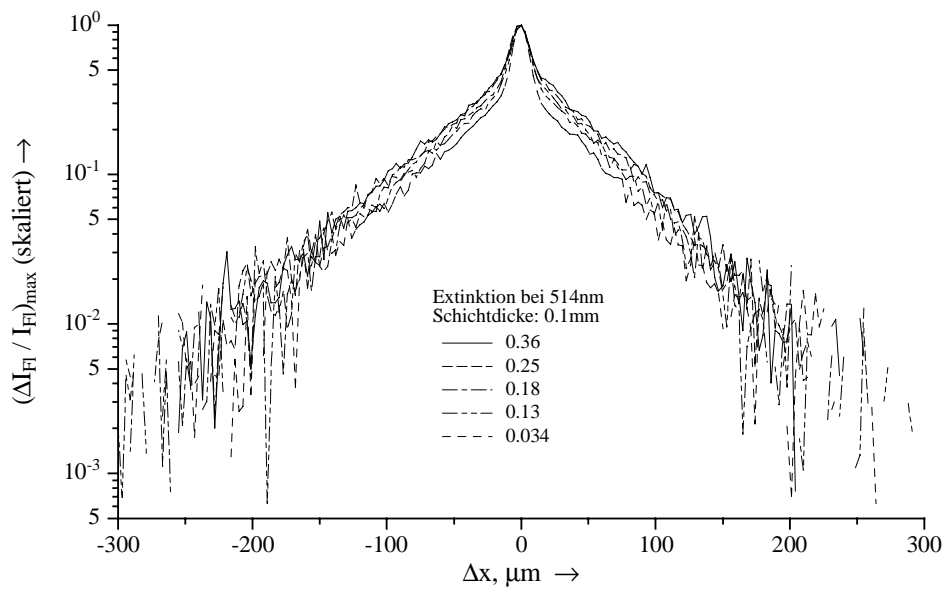


Abbildung 5.10 Fluoreszenzreduktionsmessung von Rhodamin 6G in Ethylenglykol in Abhängigkeit von der Konzentration der Farbstofflösung (Jet-Technik); Anregung: 514.5 nm (jeweils 230 mW, senkrecht zueinander polarisiert), Extinktionen (514.5 nm, 0.1 mm): 0.034 – 0.36, $v_{Probe} = 12$ m/s, Maxima auf 1 skaliert.

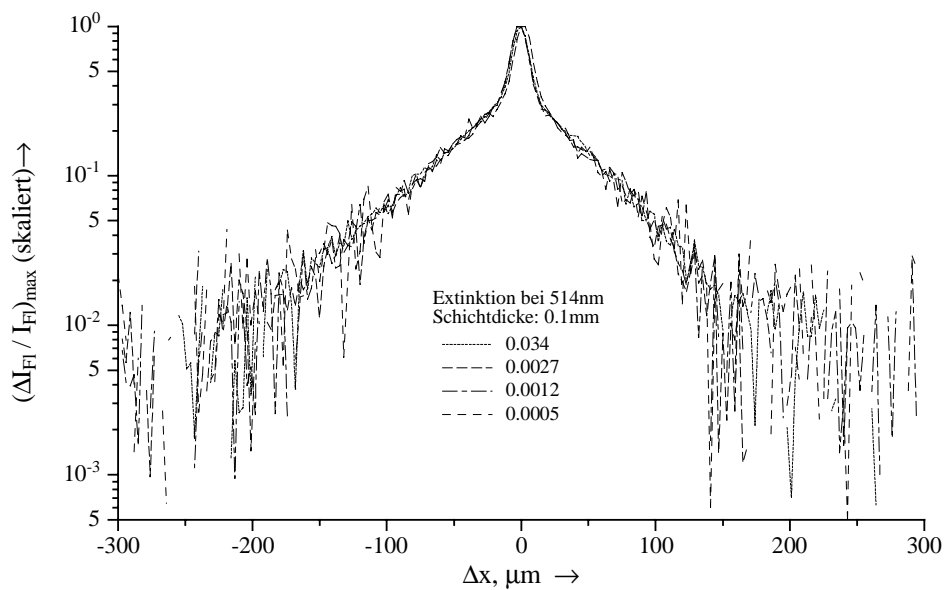


Abbildung 5.11 Fluoreszenzreduktionsmessung von Rhodamin 6G in Ethylenglykol in Abhängigkeit von der Konzentration der Farbstofflösung (Jet-Technik); Anregung: 514.5 nm (jeweils 230 mW, senkrecht zueinander polarisiert), Extinktionen (514.5 nm, 0.1 mm): 0.0005 – 0.034, $v_{Probe} = 12$ m/s, Maxima auf 1 skaliert.

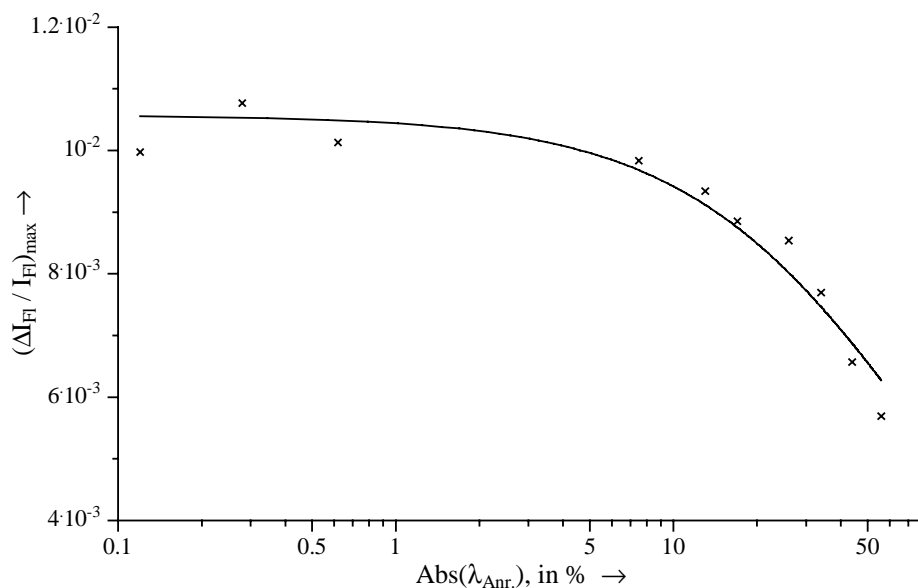


Abbildung 5.12 Abhängigkeit des Signalmaximums $\Delta I_{Fl}/I_{Fl}$ von der Absorption der Lösung; Meßparameter s. Abbildung 5.10, – wahrscheinlicher Funktionsverlauf.

Tabelle 5.1 Zusammenfassung der Meßergebnisse der konzentrationsabhängigen Fluoreszenzreduktionsmessungen.

Konzentration mmol/l	Extinktion 514.5 nm, d = 0.1 mm	Absorption (%) 514.5 nm, d = 0.1 mm	($\Delta I_{Fl} / I_{Fl}$) _{max} ‰
0.72	0.36	56.3	5.7
0.5	0.25	43.8	6.6
0.36	0.18	33.9	7.7
0.26	0.13	25.9	8.5
$6.8 \cdot 10^{-2}$	0.034	7.5	9.8
$5.4 \cdot 10^{-3}$	0.0027	0.62	10.1
$2.4 \cdot 10^{-3}$	0.0012	0.28	10.7
$1 \cdot 10^{-3}$	0.0005	0.12	10

Zur Erklärung dieses Sachverhaltes können folgende Überlegungen herangezogen werden. Durch das starke Verdünnen einer Farbstofflösung kann man dafür sorgen, daß ein Photon, das die Probe durchquert, maximal ein Farbstoffmolekül passiert. Wenn dieses Molekül das Photon absorbiert und ein weiteres Photon innerhalb der Lebensdauer des Farbstoffmoleküls

im angeregten Zustand diese Stelle passiert, so erfolgt kein weiterer Absorptionsprozeß, der zur Fluoreszenz führt. Im Falle hoher Konzentrationen liegen viele Farbstoffmoleküle in der Ausbreitungsrichtung eines Photons durch die Farbstofflösung. Wird nun ein Molekül durch Absorption in einen angeregten Zustand gebracht, so kann ein weiteres Photon zwar dieses Molekül innerhalb der Lebensdauer des transienten Zustandes passieren, wird jedoch von einem dahinter liegenden Farbstoffmolekül absorbiert. Dies führt gemäß der Fluoreszenzquantenausbeute zur Emission von Fluoreszenz. Folglich wurde hier durch die Besetzung des transienten Zustandes die Fluoreszenz nicht verringert, man erhält ein geringeres Fluoreszenzreduktionssignal. In Abbildung 5.13 ist dieses Verhalten graphisch dargestellt.

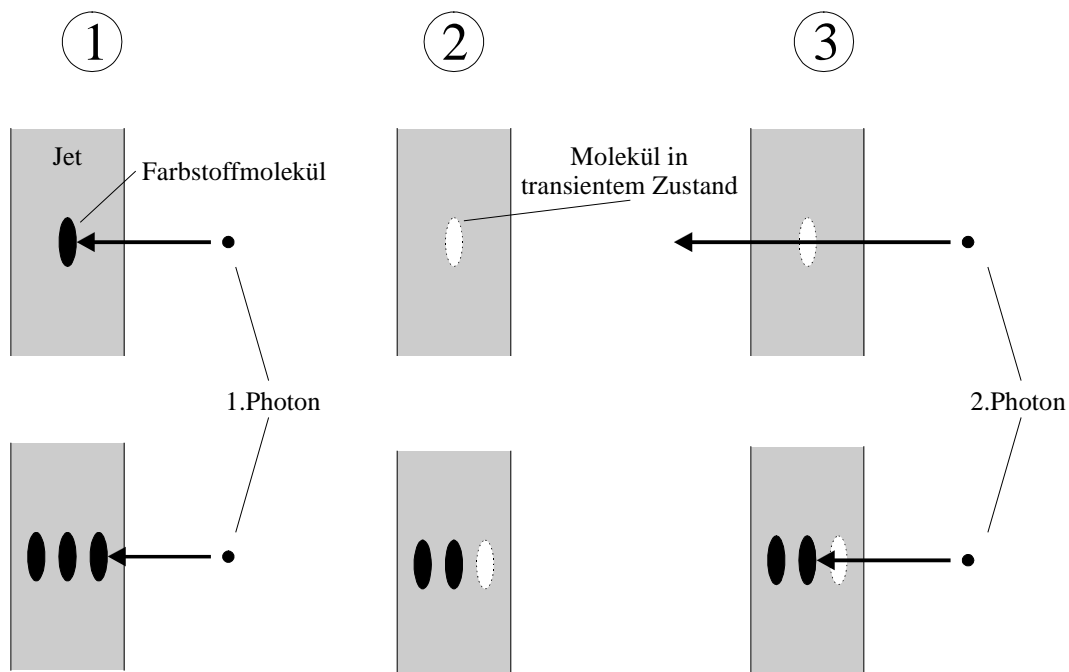


Abbildung 5.13 Fluoreszenzreduktion bei Farbstofflösungen mit geringer und hoher Konzentration.

Natürlich enthalten auch Meßsignale aus Fluoreszenzreduktionsmessungen an Farbstofflösungen hoher Konzentration dieselben Informationen über transienten Zustände wie Messungen an verdünnten Lösungen. Diese lassen sich jedoch nicht mit der in Kapitel 5.2 vorgestellten Theorie auswerten.

5.4.2 Vergleich mit Ausbleichmessungen

5.4.2.1 Vergleich der nach beiden Methoden erhaltenen Ergebnisse

Zur Überprüfung des neuen Meßsystems wurden Messungen von Rhodamin 6G in Ethylenglykol durchgeführt, um die Meßergebnisse mit den aus Ausbleichmessungen gewonnenen Daten zu vergleichen. Um diesen Vergleich möglichst unter identischen Bedingungen für die Ausbleich- und Fluoreszenzreduktionsmessung ziehen zu können, wurde der Meßaufbau in der Weise variiert, daß beide Meßsysteme nebeneinander zum Einsatz kommen konnten. Somit wurde verhindert, daß der Vergleich der gewonnenen Daten durch veränderte Justage verfälscht werden konnte. Dabei wurde auch hier auf die Jet-Technik zurückgegriffen. Diese läßt es zu, zunächst eine für Ausbleichmessungen ausreichend konzentrierte Farbstofflösung zu verwenden und anschließend durch Verdünnung eine Lösung für Fluoreszenzreduktionsmessungen herzustellen (vgl. Kapitel 5.4.1). Abbildung 5.14 zeigt die zunächst durchgeführte Ausbleichmessung, Abbildung 5.15 die nach Verdünnung der Lösung anschließende Fluoreszenzreduktionsmessung. Tabelle 5.2 vergleicht die erhaltenen Werte aus Ausbleich- und Fluoreszenzreduktionsmessung.

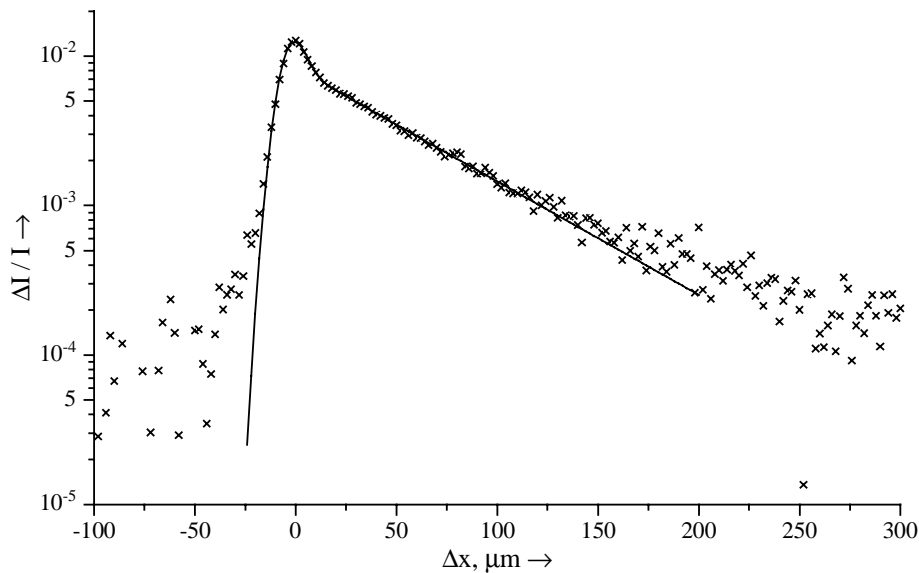


Abbildung 5.14 Ausbleichmessung von Rhodamin 6G in Ethylenglykol (Jet-Technik); x – Messung, – – Fit, Anregung: 514.5 nm (230 mW, vertikal polarisiert), Messung: 514.5 nm (10 mW, horizontal polarisiert), Extinktion (0.1 mm): 514.5 nm – 0.36, v_{Probe} – 12 m/s.

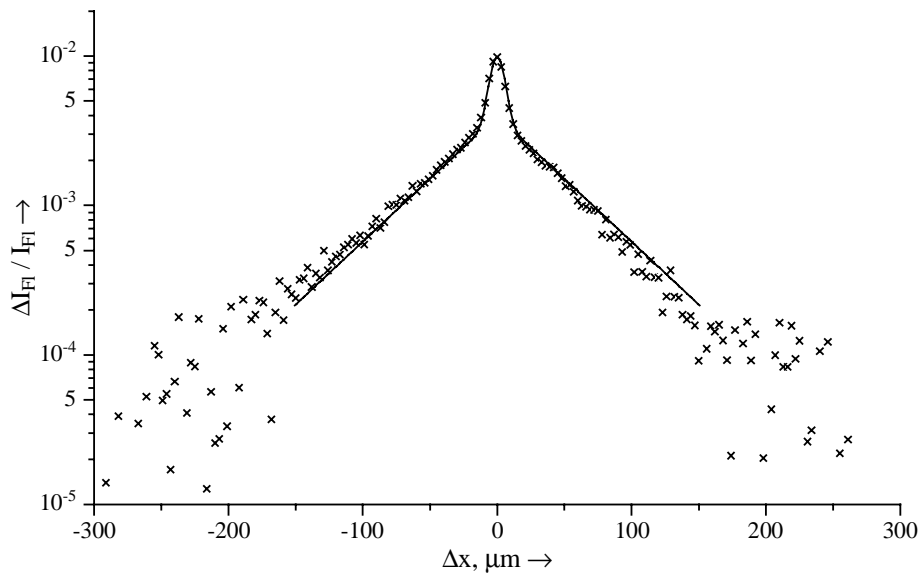


Abbildung 5.15 Fluoreszenzreduktionsmessung von Rhodamin 6G in Ethylenglykol (Jet-Technik); x – Messung, – – Fit, Anregung: 514.5 nm (jeweils 230 mW), Extinktion (0.1 mm): 514.5 nm – 0.034, $v_{probe} = 12$ m/s.

Tabelle 5.2 Molekulare Parameter von Rhodamin 6G in Ethylenglykol gewonnen aus Ausbleich- und Fluoreszenzreduktionsmessung.

	Ausbleichmessung	Fluoreszenzreduktionsmessung
$k_{ST}, 10^6 \text{ s}^{-1}$ ¹	1.1	0.98
$\tau_T, \mu\text{s}$	4.8	4.3

¹ – vergleiche Übersichtstabelle im Anhang

Man sieht, daß die Werte sehr gut miteinander übereinstimmen. Somit kann das neue Meßsystem zur Bestimmung der molekularen Parameter eingesetzt werden. Weitergehende Überprüfungen, wie z. B. der Einfluß der Rotationsgeschwindigkeit usw., sind an dieser Stelle nicht mehr nötig, da dies bereits bei der Einführung der neuen Rotationsküvetten-Technik eingehend untersucht wurde (vgl. Kapitel 3.2).

Die in Tabelle 5.2 aufgeführten Werte für die Intersystem-Crossing Ratenkonstante sind größer als die in Kapitel 3 gezeigten Ergebnisse. Dies läßt sich folgendermaßen erklären: Zur Auswertung der Fluoreszenzreduktions-Meßsignale mußte ein numerisches Fitprogramm

entwickelt werden [48]. Mit diesem Programm lassen sich sowohl Ausbleich-, als auch Fluoreszenzreduktionsmessungen auswerten. Dabei stellte sich heraus, daß die in Kapitel 2.3 für Ausbleichmessungen unter gewissen Bedingungen zu nutzende analytische cos-Näherung [22] um einen Faktor von ca. 1.4 zu kleine Intersystem-Crossing Ratenkonstanten liefert. Daher sind im Anhang alle Ergebnisse in einer zusammenfassenden Tabelle aufgeführt, in der ausschließlich die exakte numerische Auswertung zu Grunde gelegt ist. Nach wie vor muß bei der Bestimmung der Intersystem-Crossing Ratenkonstanten die im jeweiligen Lösungsmittel auftretende Anisotropie berücksichtigt werden, wenn diese aus den Meßgrößen k_{ST}^{\perp} oder k_{ST}^{\parallel} abgeleitet werden.

5.4.2.2 Untersuchung der Wellenlängenabhängigkeit von Fluoreszenzreduktions- und Ausbleichmeßmethode bei Rhodamin 6G in Ethylenglykol

In [48] wurden die transienten Absorptionen von Rhodamin 6G in Ethylenglykol untersucht. Dabei ergab sich, daß im Wellenlängenbereich um 480 nm kein Ausbleichsignal erhalten wird, da sich dort Absorptionen aus dem elektronischen Grundzustand und transienten Zuständen die Waage halten. Somit erfährt der Meßlaserstrahl beim Durchtritt durch die angeregte Probe die gleiche Absorption, wie beim Durchtritt durch die Probe im Grundzustand. Da die Fluoreszenzreduktions-Meßmethode gegenüber transienten Absorptionen unempfindlich ist, sollten Fluoreszenzreduktionsmessungen im Wellenlängenbereich um 480 nm Meßsignale liefern, während Ausbleichmessungen keine oder durch transiente Absorptionen verfälschte Meßsignale ergeben sollten. Wie bereits in Kapitel 5.4.2.1 beschrieben kamen auch hier wiederum beide Meßsysteme nebeneinander zum Einsatz. Hier wurde jedoch auf die Rotationsküvette als Probenführung zurückgegriffen, da diese sich für den direkten Vergleich von zwei Messungen hervorragend eignet. Daher wurden in einer ersten Meßreihe Fluoreszenzreduktions- und Ausbleichmessungen direkt miteinander verglichen, indem in die beiden Proben-Spuren einmal eine verdünnte Lösung (für die Fluoreszenzreduktionsmessung) und einmal eine konzentrierte Lösung (für die Ausbleichmessung) von Rhodamin 6G in Ethylenglykol eingefüllt wurde. Anschließend wurden Messungen bei 514.5, 501.7, 488 und schließlich 476.5 nm durchgeführt. Dabei wurden bei beiden Meßmethoden beide Laserstrahlen moduliert und das Meßsignal phasenrichtig bei der Summenfrequenz detektiert. Ebenso wie die Fluoreszenzreduktionsmessung lassen sich auch Ausbleichmessungen mit der Doppel-Chopp-Technik durchführen. Bei den Ausbleichmessungen wurde hierbei für Anregungs- und Meßlaserstrahl die selbe

Laserwellenlänge verwendet. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um möglichst wenige Parameter beim Wechsel zwischen Fluoreszenzreduktions- und Ausbleichmeßmethode zu verändern. In Tabelle 5.3 sind die apparativen Parameter zusammengefaßt.

Tabelle 5.3 Apparative Parameter für die Fluoreszenzreduktions- und Ausbleichmessungen von Rhodamin 6G in Ethylenglykol.

Meßmethode	Wellenlänge	Anregung		Messung		Extinktion 0.2 mm
		Leistung mW	Polarisation	Leistung mW	Polarisation	
Ausbleich	514.5	130	horizontal	20	vertikal	0.54
	501.7	60		20		0.36
	488	180		20		0.24
	476.5	180		60		0.13
Fluoreszenz- reduktion	514.5	130	horizontal	130	vertikal	0.1
	501.7	60		60		0.07
	488	180		180		0.05
	476.5	180		180		0.13

In Abbildung 5.16 und Abbildung 5.17 sind die Ausbleich- und Fluoreszenzreduktionsmessungen dargestellt. Bei den Ausbleichmessungen wurde dabei eine lineare Ordinate gewählt, da das Meßsignal bei 475.5 nm negative Werte enthält. Um die Meßsignale besser miteinander vergleichen zu können, wurden diese einerseits in die Zeitdomäne umgerechnet und andererseits auf 1 skaliert.

Man sieht deutlich, wie die Abklingdauer bei den Ausbleichmessungen bei abnehmender Meßwellenlänge kontinuierlich zunimmt. Die Ursache für dieses Verhalten ist ungeklärt. Sicher ist, daß die Zunahme der Triplett-Lebensdauer nicht durch Photozerstörung erklärt werden kann, da sich nach der Durchführung aller Untersuchungen bei einer abschließenden Ausbleichmessung bei 514.5 nm für den Triplett-Zustand erneut eine Lebensdauer von 5.5 μ s ergab. Das Fehlen eines Ausbleichsignals bei 476.5 nm bestätigt die Messungen in [48]. Im Gegensatz dazu liefern die Fluoreszenzreduktionsmessungen unabhängig von der Anregungswellenlänge im Rahmen der Meßgenauigkeit immer die gleichen Meßsignale.

Dies unterstreicht eindrucksvoll den Vorteil der Fluoreszenzreduktions- gegenüber der Ausbleichmeßmethode. In Tabelle 5.4 sind die ermittelten Ergebnisse zusammengefaßt.

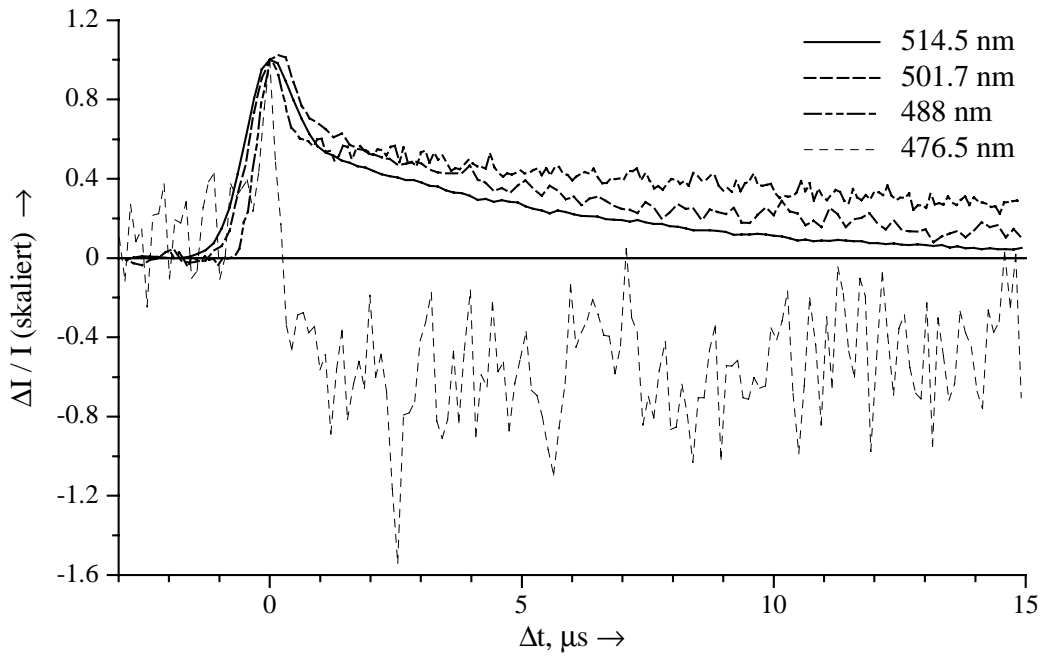


Abbildung 5.16 Ausbleichmessungen von Rhodamin 6G in Ethylenglykol bei verschiedenen Wellenlängen; Meßparameter s. Tab. 5.3, v_{Probe} : 13 – 23 m/s.

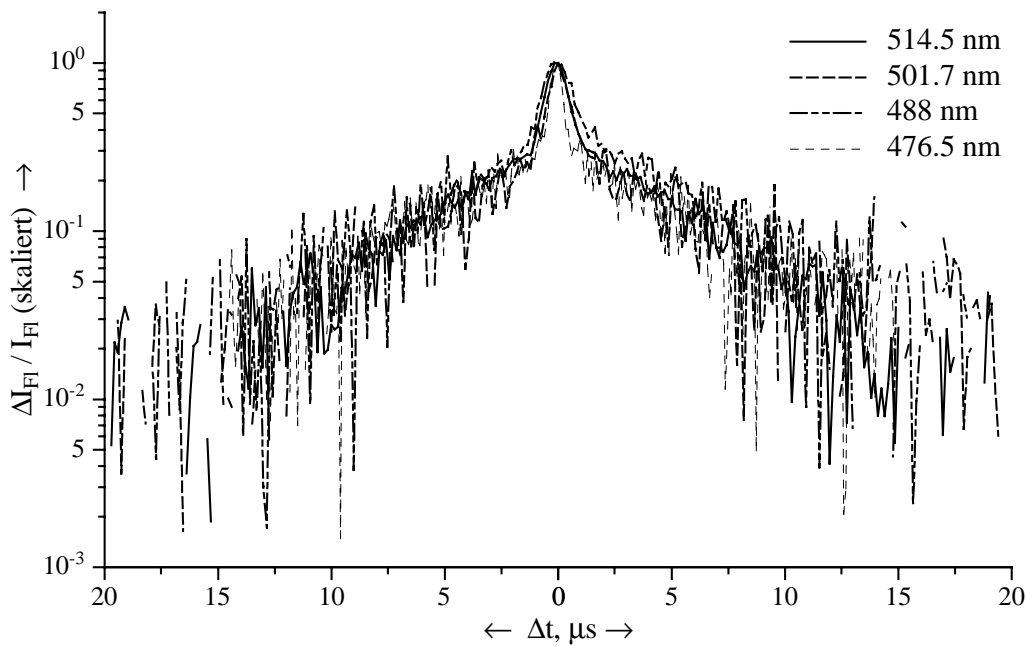


Abbildung 5.17 Fluoreszenzreduktionsmessungen von Rhodamin 6G in Ethylenglykol bei verschiedenen Wellenlängen; Meßparameter s. Tab. 5.3, v_{Probe} : 13 – 23 m/s.

Tabelle 5.4 Ermittelte molekulare Parameter für Rhodamin 6G in Ethylenglykol mit Fluoreszenzreduktions- und Ausbleichmeßmethode.

Meßmethode	Wellenlänge nm	τ_T in ns	k_{ST} ¹ in 10^5 s^{-1}
Ausbleich	514.5	5.8	10.3
	501.7	7.2	11.5
	488	16	17.3
	476.5	?	?
Fluoreszenzreduktion	514.5	5.1	9.8
	501.7	5.5	8.9
	488	5.8	8.1
	476.5	5.5	12

¹ – vergleiche Übersichtstabelle im Anhang

Anhand der Ergebnisse sieht man, wie bei den Ausbleichmessungen die Werte für Triplett-Lebensdauer und Intersystem-Crossing Ratenkonstante bei abnehmender Wellenlänge kontinuierlich zunehmen, bis schließlich bei 476.5 nm keine Auswertung mehr möglich ist. Da es sich bei beiden Größen um molekulare Parameter handelt, die nicht von der Meßmethode abhängig sind, wird somit deutlich, daß die Ausbleichmessungen bei der beschriebenen Abnahme der Meßwellenlänge keine richtigen Ergebnisse mehr liefern, bzw. daß es sich nicht mehr um Ausbleichmessungen im Sinne von Kapitel 2.3 handeln kann. Im Gegensatz dazu liefern die Fluoreszenzreduktionsmessungen im Rahmen der Meßgenauigkeit immer die gleichen Ergebnisse, wie dies für einen molekularen Parameter zu erwarten ist. Gleichzeitig stimmen diese mit den bei 514.5 nm mit der Ausbleichmeßmethode bestimmten Werten überein.

5.4.3 Vergleich mit verwandten Meßmethoden

In [49] wird eine Meßmethode beschrieben, die ebenfalls auf der Bestimmung von verringerter Fluoreszenzintensität beruht. Hierbei wird eine Farbstoffprobe durch einen ersten Laserpuls angeregt und die hervorgerufene Fluoreszenzintensität gemessen. Ein zweiter Laserpuls, der nach einem definierten Zeitraum Δt auf die Probe trifft, ruft ebenfalls eine bestimmte Fluoreszenzintensität hervor, die gemessen wird. Durch den Vergleich der Differenz dieser beiden Intensitäten mit der Fluoreszenzintensität, die durch den ersten Laserpuls hervorgerufen wurde, kann die Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} bestimmt

werden. Allerdings liefern diese Messungen keine Aussagen über die Triplett-Lebensdauer der Farbstoffproben. Nach [49] ergibt sich für Rhodamin 6G in Ethanol eine Intersystem-Crossing Ratenkonstante von $<1.8 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$. Dies stimmt mit dem in Kapitel 4.2 genannten Wert von $2.5 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ sehr gut überein.

5.5 Zusammenfassung

Im vorangegangenen Kapitel wurde eine neue, auf Fluoreszenz basierende Meßmethode vorgestellt. Diese beruht auf der Messung der Fluoreszenzverringerng, die bei der Besetzung transienter Zustände auftritt. Im Gegensatz zu den Ausbleichmessungen ist hier die Modulation beider Anregungslaserstrahlen nötig. Es stellte sich heraus, daß die Fluoreszenzreduktion auf 10^{-4} genau bestimmt werden kann. Eine solche Genauigkeit wurde bisher in keiner Veröffentlichung beschrieben. Durch den direkten Vergleich zwischen Ausbleich- und Fluoreszenzreduktionsmessungen konnte gezeigt werden, daß die neue Meßmethode nicht durch Absorptionen von Verunreinigungen bzw. Photoprodukten gestört wird. Dies stellt eine wesentliche Weiterentwicklung dar, da im allgemeinen nicht sichergestellt werden kann, daß die für eine Ausbleichmessung nötigen Voraussetzungen ($\epsilon_0 \gg \epsilon_T, \epsilon_{SE}, \epsilon_1$) erfüllt sind.

Bei der neuen Meßmethode werden Farbstofflösungen eingesetzt, die eine Extinktion von ca. 0.03 bei der jeweiligen Anregungswellenlänge aufweisen. Diese wurde durch konzentrationsabhängige Fluoreszenzreduktionsmessungen ermittelt. Die mit der neuen Meßmethode ermittelten molekularen Parameter von Rhodamin 6G in Ethylenglykol wurden mit denen aus Ausbleich- und einer verwandten Meßmethode gewonnenen Daten verglichen. Es zeigte sich, daß das neue Meßsystem Ergebnisse in sehr guter Übereinstimmung mit anderen Methoden liefert.

6 Anwendung der Fluoreszenzreduktionsmessung

In diesem Kapitel werden Messungen vorgestellt, die im Rahmen der vorliegenden Fluoreszenzreduktions-Meßmethode durchgeführt wurden. Dabei sollen einerseits Ergebnisse gezeigt werden, die mit Ausbleichmessungen nicht hätten erzielt werden können. Andererseits sollen Messungen mit Farbstoffen aus aktuellen Forschungsrichtungen die universelle Nutzung der neuen Meßmethode aufzeigen.

6.1 Fluoreszenzreduktionsmessungen in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration

In Kapitel 4.3.4 wurden Ausbleichmessungen von Rhodamin 6G in verschiedenen Lösungsmitteln vorgestellt, die in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration durchgeführt wurden. Wasser konnte dabei nicht als Lösungsmittel eingesetzt werden, da Rhodamin 6G hier schon bei geringen Konzentrationen Dimere bildet. Da Ausbleichmessungen bei kleinen Extinktionen der Farbstofflösung ein geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis liefern, wurden keine Messungen in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration des Lösungsmittels durchgeführt. In Abbildung 4.1 ist eine Ausbleichmessung von Rhodamin 6G in Wasser gezeigt. Man erkennt deutlich das stark verrauschte Signal, das nur eine ungenaue Auswertung zuläßt. Fluoreszenzreduktionsmessungen dagegen lassen sich besonders gut bei geringen Extinktionen an der Anregungswellenlänge durchführen. Die Kombination der Rotationsküvetten-Technik und der neuen Fluoreszenzreduktions-Meßmethode erlauben es nun, die molekularen Parameter von Rhodamin 6G in Wasser in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration des Lösungsmittels zu bestimmen. Abbildung 6.1 zeigt die durchgeführten Messungen. Wie auch schon in Kapitel 4.3.4 wurden die Meßsignale in die Zeitdomäne umgerechnet, da jede Messung zum Erzielen einer optimalen Zeitauflösung mit einer dementsprechend angepaßten Probengeschwindigkeit durchgeführt wurde. Dies ermöglicht einen direkten Vergleich der verschiedenen Messungen in einer Abbildung. Man erkennt den starken Einfluß des gelösten Sauerstoffs auf die Triplet-Lebensdauer τ_T , ebenso wie auf die Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} . In Tabelle 6.1 sind die ermittelten molekularen Parameter zusammengefaßt. Dabei wurde bei der Bestimmung der Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} aus der Meßgröße k_{ST}^\perp ein Faktor k_{ST}^\perp/k_{ST} von 1.15 für Wasser als Lösungsmittel berücksichtigt. Dabei muß beim Vergleich der Intersystem-Crossing Ratenkonstanten mit den in Kapitel 4.3.4 ermittelten Werten für andere Lösungsmittel darauf geachtet werden, daß die mit Ausbleichmessungen ermittelten Daten bedingt durch die

analytische cos-Näherung (s. Kapitel 5.4.2.1) um den Faktor $1/1.4$ (s. Kapitel 5.4.2.1) kleiner sind.

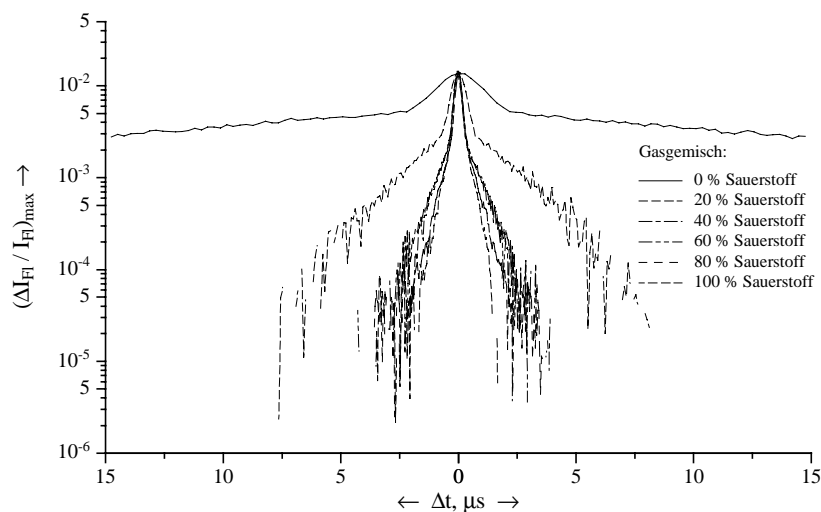


Abbildung 6.1 Fluoreszenzreduktionsmessungen von Rhodamin 6G in Wasser bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen; Anregung: 514.5 nm (jeweils 100 mW, senkrecht zueinander polarisiert), Extinktion (0.2 mm): 514.5 nm – 0.53, v_{Probe} : 7 – 57 m/s.

Tabelle 6.1 Molekulare Parameter von Rhodamin 6G in Wasser bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen.

Sauerstoffgehalt des Gasgemisches %	Sauerstoffkonzentration im Lösungsmittel [31] mmol/l	k_{ST}^1 10^5 s^{-1}	τ_{T} μs	$1/\tau_{\text{T}}$ 10^6 s^{-1}
0	0	7.3	18.8	0.053
20	0.28	9.7	1.86	0.54
40	0.56	20.2	0.65	1.53
60	0.83	23.6	0.58	1.73
80	1.11	29.6	0.42	2.41
100	1.39	37	0.33	3.07

¹ – vergleiche Übersichtstabelle im Anhang

Die in Kapitel 4.2 angeführte Ausbleichmessung von Rhodamin 6G in luftgesättigtem Wasser ergab eine Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} von $8.8 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ und eine Triplet-Lebensdauer τ_{T} von $1.9 \mu\text{s}$. Die mit der Ausbleichmethode bestimmten molekularen Parameter sind dabei stärker fehlerbehaftet, da das Meßsignal stark verrauscht war. Somit

ergibt sich unter Berücksichtigung des Faktors 1.4 (s. Kapitel 5.4.2.1) eine gute Übereinstimmung der nach beiden Methoden ermittelten molekularen Parameter.

Wie in Kapitel 4.3.4 soll auch hier der quantitative Zusammenhang zwischen Sauerstoffkonzentration im Lösungsmittel und den Größen k_{ST} , bzw. τ_T , bestimmt werden: Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.2 zusammengefasst, wobei zum Vergleich ebenfalls die Ergebnisse der Ausbleichmessungen in Ethylenglykol, Ethanol und Acetonitril aufgeführt sind. Abbildung 6.2 und Abbildung 6.3 zeigen die graphische Auftragung.

Tabelle 6.2 Ermittelte Werte für k_L und k_q von Rhodamin 6G in verschiedenen Lösungsmitteln.

Lösungsmittel	$k_{ST} = k_{ST}^0 + k_q \cdot c(O_2)$		$\frac{1}{\tau_T} = \frac{1}{\tau_{T,0}} + k_L \cdot c(O_2)$	
	$k_{ST}^0, 10^5 s^{-1}$	$k_q, 10^8 l/(mol \cdot s)$	$\tau_{T,0}, \mu s$	$k_L, 10^8 l/(mol \cdot s)$
Ethylenglykol ¹	8.8	23.8	465	16.7
Wasser	6.1	21.8	17	21.5
Acetonitril ¹	21.4	1.1	0.9	3.7
Ethanol ¹	13.7	6.6	1	7.4

vergleiche Übersichtstabelle im Anhang; ¹ – die aus Tab. 4.6 übernommenen Werte für k_{ST}^0 und k_q sind zum besseren Vergleich mit dem Faktor 1.4 multipliziert (s. Kapitel 5.4.2.1).

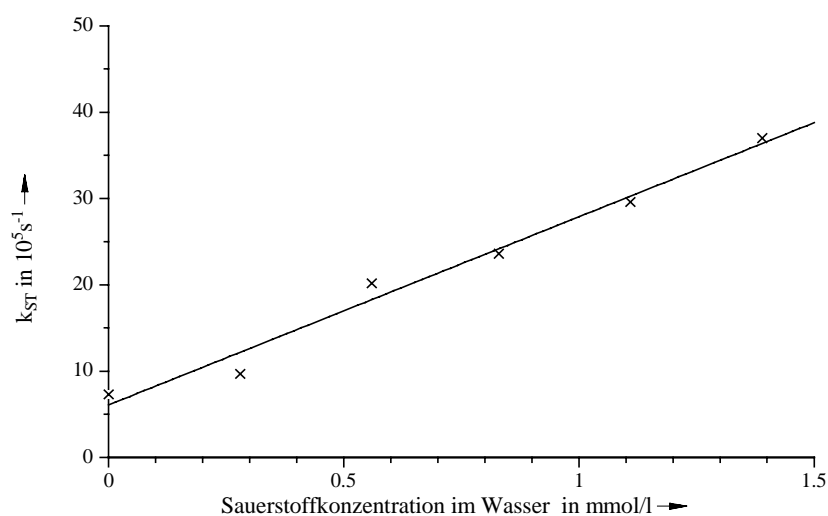


Abbildung 6.2 Intersystem-Crossing Ratenkonstante von Rhodamin 6G in Wasser in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration des Lösungsmittels.

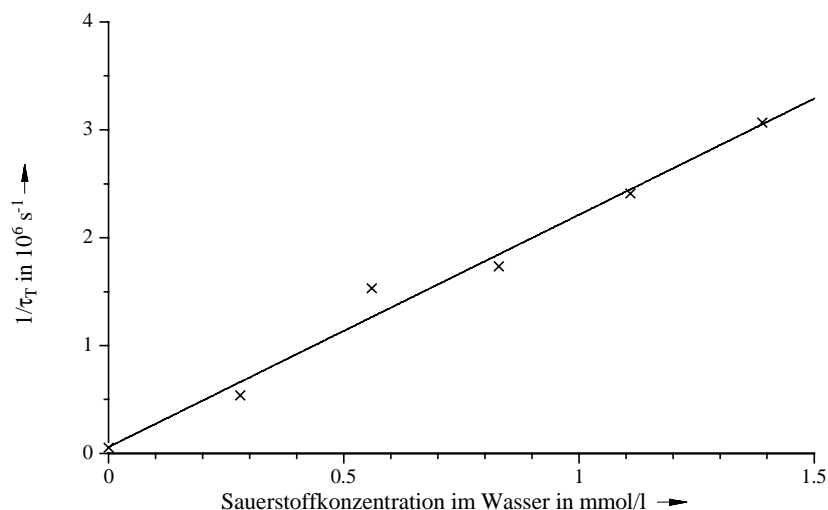


Abbildung 6.3 Triplet-Lebensdauer von Rhodamin 6G in Wasser in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration des Lösungsmittels.

Man sieht, daß sich für Rhodamin 6G in Wasser eine ähnlich große Abhängigkeit der Intersystem-Crossing Ratenkonstante von der Sauerstoffkonzentration wie in Ethylenglykol ergibt. Die Abhängigkeit der Triplet-Lebensdauer ist dabei in Wasser stärker ausgeprägt als in Ethylenglykol. Wie in Acetonitril und Ethanol müssen auch in Wasser zusätzliche effektive Prozesse zur Löschung des Triplet-Zustandes vorliegen, da bei Stickstoffsättigung lediglich eine Triplet-Lebensdauer von ca. 20 μs erreicht wird.

6.2 Einfluß des Bromierungsgrades bei Perylenfarbstoffen

In Kapitel 4.4 wurden Ausbleichmessungen von unterschiedlich stark bromierten Perylenfarbstoffen angeführt. Wie bereits beschrieben, sind Perylenfarbstoffe in der letzten Zeit durch ihren Einsatz im Bereich der Licht emittierenden Polymere bekannt geworden [32, 33]. Bei den Untersuchungen hatte sich gezeigt, daß offensichtlich Absorptionen transienter Zustände im Wellenlängenbereich des Meßlaserstrahls die Auswertung der erhaltenen Meßsignale störten bzw. unmöglich machten. Da die Fluoreszenzreduktions-Meßmethode durch solche Absorptionen nicht gestört wird, sollte es nun möglich sein, den Effekt der Bromierung bei den genannten Perylenfarbstoffen zu untersuchen. Abbildung 6.4 zeigt die durchgeführten Messungen in 1,2-Dichlorethan. Da die unterschiedlichen Messungen mit verschiedenen Probengeschwindigkeiten durchgeführt wurden, sind die Meßsignale in die Zeitdomäne umgerechnet worden, damit diese direkt miteinander verglichen werden können.

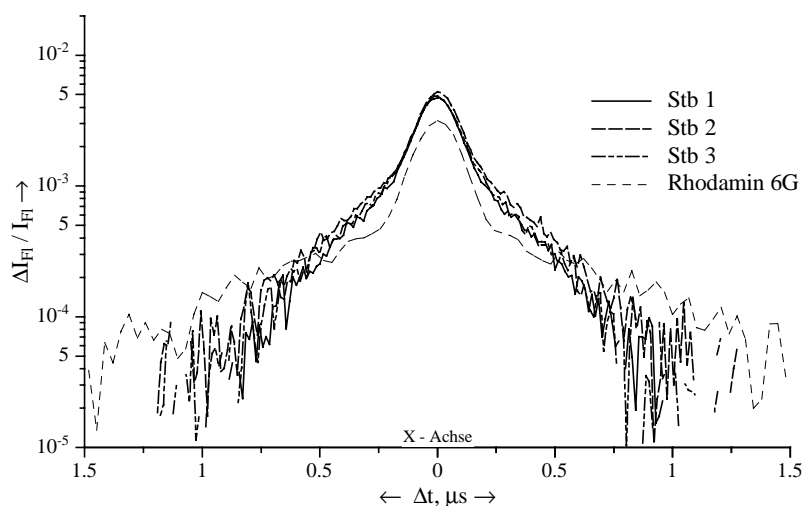


Abbildung 6.4 Fluoreszenzreduktionsmessungen von Rhodamin 6G und verschiedenen Perylenfarbstoffen in 1,2-Dichlorethan; Anregung: 488 nm (jeweils 100 mW, senkrecht zueinander polarisiert), Extinktion (0.2 mm): 488 nm – für alle Proben $9.7 \cdot 10^{-3}$.

Die Abbildung zeigt deutlich, daß der Bromierungsgrad nahezu keine Auswirkung auf die erhaltenen Meßsignale hat. Dies verdeutlicht Tabelle 6.3, die die erhaltenen molekularen Parameter zusammenfaßt. Da in 1,2-Dichlorethan keine meßbare Anisotropie auftritt, ergibt sich für die Intersystem-Crossing Ratenkonstante und die Meßgröße k_{ST}^{\perp} der gleiche Zahlenwert.

Tabelle 6.3 Molekulare Parameter von Perylenfarbstoffen unterschiedlichen Bromierungsgrades und Rhodamin 6G in 1,2-Dichlorethan.

Farbstoff	Anzahl Bromatome	τ_T in ns	k_{ST} in 10^5 s^{-1}
Stb1	0	230	82
Stb2	1	260	86
Stb3	3	240	88
Rhodamin 6G	0	590	24

vergleiche Übersichtstabelle im Anhang

Im Rahmen der Meßungenauigkeit ergeben sich für alle drei Perylenfarbstoffe identische Werte, sowohl für die Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} , als auch für die Triplett-

Lebensdauer τ_T . Dieses Ergebnis verwundert zunächst, da der sogenannte innermolekulare Schweratomeffekt für die zunehmende Bromierung einen Anstieg der Intersystem-Crossing Ratenkonstanten beschreibt [50]. Bromsubstituierte Perylene weisen jedoch auf Grund der Energielücke zwischen fluoreszierendem Zustand und dem nächsten Triplett-Zustand keinen Schweratomeffekt auf. [51], was durch die erhaltenen Ergebnisse bestätigt wird.

Die dargestellten Ergebnisse dokumentieren eindrucksvoll, daß Fluoreszenzreduktionsmessungen im Gegensatz zu den in Kapitel 4.4 gezeigten Ausbleichmessungen keinerlei Störungen durch transiente Absorptionen unterliegen. Somit stellen die durchgeführten Fluoreszenzreduktionsmessungen eine Bestätigung für die Unempfindlichkeit der neuen Meßmethode gegenüber transienten Absorptionen im betrachteten Wellenlängenbereich dar.

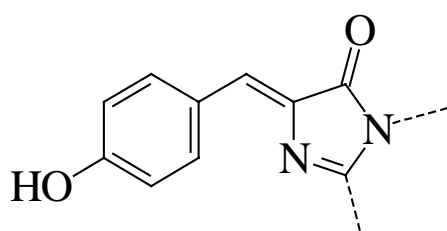
Weiterhin wurden in Kapitel 4.2 Ausbleichmessungen von Rhodamin 6G in verschiedenen Lösungsmitteln vorgestellt. Dabei ergab sich eine qualitative Korrelation zwischen der Konzentration an Sauerstoff im Lösungsmittel und den molekularen Parametern. Die Ergebnisse für die molekularen Parameter von Rhodamin 6G in 1,2-Dichlorethan reihen sich sehr gut in diese Korrelation ein, da sich die Sauerstofflöslichkeit in 1,2-Dichlorethan in der gleichen Größenordnung wie die in Ethanol und Acetonitril bewegt (abgeschätzt über die Sauerstofflöslichkeit in Dichlormethan [31]: 10.7 mmol/l).

6.3 Molekulare Parameter von EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)

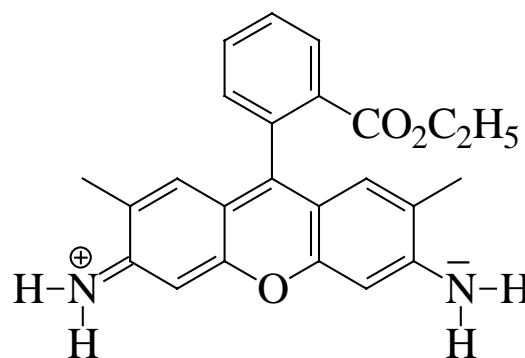
In den vergangenen 4 Jahren entwickelte sich das grün fluoreszierende Protein (GFP) zu einem der meist untersuchten Proteine in der Biochemie und Zellbiologie [52]. Da GFP für viele Anwendungen, wie z.B. als aktiver Indikator mittels Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) verwendet wird, sind Eigenschaften der angeregten Zustände von großer Bedeutung.

Trotz einer immer weiter ansteigenden Anzahl von Veröffentlichungen gibt es jedoch nur wenig Informationen über angeregte Zustände von GFP. Verlässliche Aussagen über die Besetzung des Triplett-Zustandes sowie dessen Lebensdauer stehen bislang nicht zur Verfügung. Zusätzlich ist die Herstellung einer konzentrierten Lösung von GFP sehr kostspielig, so daß Messungen nur in stark verdünnten Lösungen möglich sind. Da die Fluoreszenz sehr empfindlich gemessen werden kann, bietet sich die Fluoreszenzreduktions-Meßmethode für erste Untersuchungen der angeregten Zustände von GFP an.

Als Probe wurde eine Lösung von EGFP in 10 mM Tris-Puffer bei pH 8 verwendet. EGFP stellt eine Mutante von GFP dar, die im Gegensatz zu GFP nur ein Absorptionsmaximum aufweist. Diese wurde am Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen von Dr. Vinod Subramaniam hergestellt. Bei der Arbeit mit biologischen Proben muß besonders auf sterile Arbeitsgeräte geachtet werden, damit das Protein nicht zerstört wird. Zusätzlich müssen die Proben kühl gelagert werden. Um möglichst viele Messungen durchführen zu können, wurde die Probe stark verdünnt, so daß sich bei einer Schichtdicke von 0.2 mm und einer Anregungswellenlänge von 488 nm (Absorptionsmaximum der Probe) eine Extinktion $\ll 0.01$ ergab. Da der exakte Wert nicht von Bedeutung war, wurde die Extinktion nicht genauer bestimmt, um die Probe nicht unnötig mit Glasgeräten (Quarzglasküvetten) in Kontakt zu bringen. Weiterhin muß besonders darauf geachtet werden, daß die Proben-Spuren gründlich gereinigt werden, da sonst leicht die Fluoreszenz der stark verdünnten EGFP-Lösung durch die von Farbstoffresten übertroffen werden kann. Als Referenzfarbstofflösung wurde die veresterte Form von Rhodamin 110 in destilliertem Wasser verwendet, die ebenfalls bei 488 nm einen hohen Extinktionskoeffizienten aufweist. In eine Spur der Rotationsküvette wurde die Rhodamin 110-Lösung und in die zweite Spur die EGFP-Lösung eingefüllt. Abbildung 6.5 zeigt ein Meßsignal von EGFP im beschriebenen Puffer, Abbildung 6.6 die dazugehörige Referenzmessung von Rhodamin 110 in destilliertem Wasser.



Chromophor von EGFP



Rhodamin 110, veresterte Form

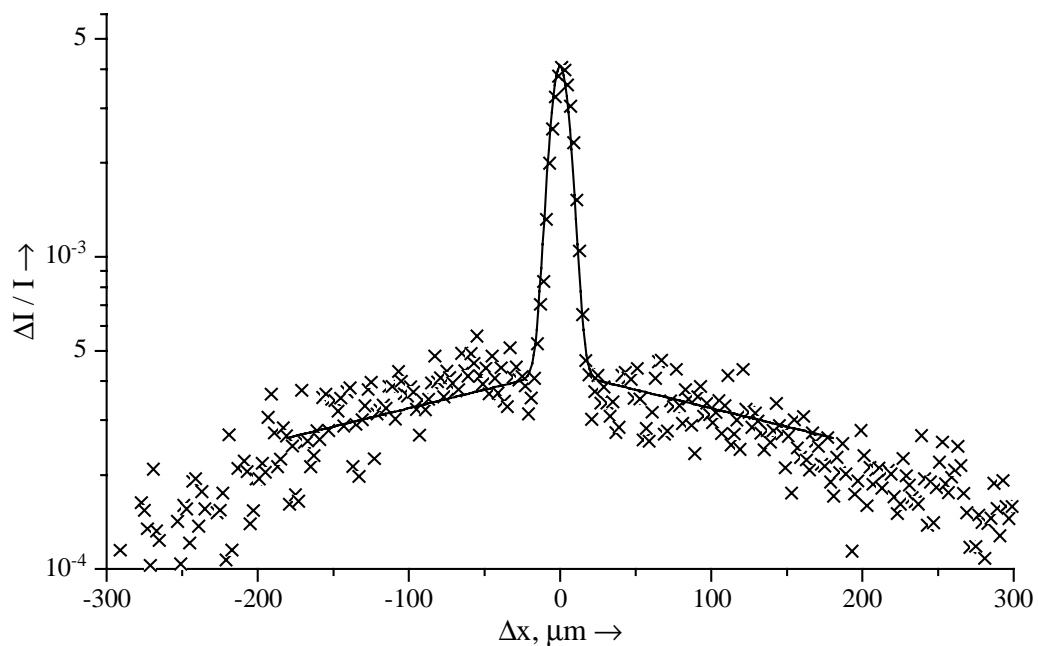


Abbildung 6.5 Fluoreszenzreduktionsmessungen von EGFP in 10mM Tris-Puffer (pH 8); Anregung: 488 nm (jeweils 70 mW, senkrecht zueinander polarisiert), Extinktion (0.2 mm): 488 nm \ll 0.01, v_{Probe} = 18.3 m/s.

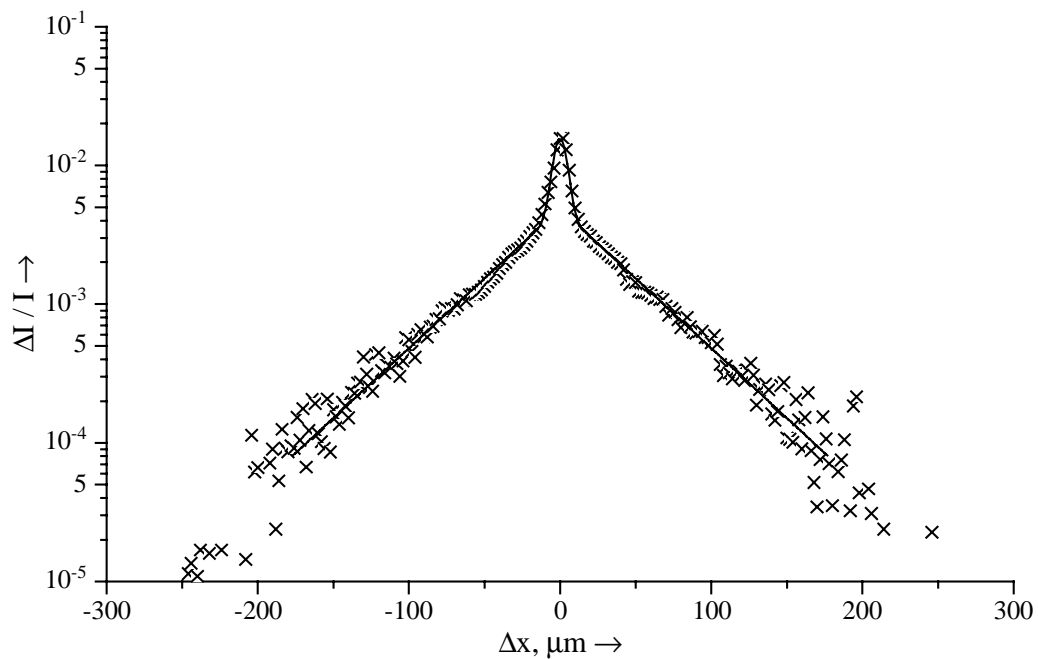


Abbildung 6.6 Fluoreszenzreduktionsmessungen von Rhodamin 110 in destilliertem Wasser; Anregung: 488 nm (jeweils 70 mW, senkrecht zueinander polarisiert), Extinktion (0.2 mm): 488 nm = 0.01, v_{Probe} = 20.6 m/s.

Das Meßsignal von EGFP zeigt deutlich einen transienten Zustand. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob es sich bei dem beobachteten Zustand um den Triplett-Zustand von EGFP handelt, wurden weitere Messungen durchgeführt, bei denen der Sauerstoffgehalt des Lösungsmittels variiert wurde. Dabei muß beachtet werden, daß das Sättigen mit einer Gasmischung hier nur durch Überleiten eines Gasstromes über die zu verwendende Lösung geschehen darf, da ansonsten das Biomolekül EGFP denaturiert werden kann. Unter Beachtung dieser Maßnahmen wurden EGFP-Lösungen hergestellt, die an Sauerstoff, bzw. Stickstoff gesättigt waren. Diese Messungen sind in Abbildung 6.7 dargestellt. Man erkennt, daß Sauerstoff die Lebensdauer des transienten Zustandes verkürzt, während man bei Abwesenheit von Sauerstoff eine gegenüber Luftsättigung erhöhte Lebensdauer erhält. Dies legt die Annahme nahe, daß es sich bei dem beobachteten Zustand um den Triplett-Zustand handeln muß. Somit wird deutlich, daß es mit der neuen Fluoreszenzreduktions-Meßmethode erstmals gelungen ist, den Triplett-Zustand von EGFP in einer luftgesättigten Pufferlösung nachzuweisen. Was die Auswertung des Meßsignals für die sauerstoffgesättigte EGFP-Lösung betrifft, so läßt sich dieses durch das auftretende starke Rauschen nicht eindeutig auswerten. Es läßt sich jedoch die Aussage treffen, daß die Triplett-Lebensdauer in sauerstoffgesättigter Lösung nicht größer als $10\ \mu\text{s}$ und die Intersystem-Crossing Ratenkonstante größer als $2 \cdot 10^5\ \text{s}^{-1}$ ist. Somit läßt sich der Einfluß von Sauerstoff auf die molekularen Parameter deutlich zeigen. In Tabelle 6.4 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Tabelle 6.4 Zusammenfassung der Meßergebnisse von EGFP in 10 mM Tris-Puffer (pH 8) und Rhodamin 110 in destilliertem Wasser.

Farbstoff	Lösungsmittel	τ_T in μs	k_{ST} in $10^5\ \text{s}^{-1}$
EGFP	sauerstoffgesättigt	< 10	> 2
	luftgesättigt	23	2.4
	stickstoffgesättigt	33	2
Rhodamin 110, verestert	luftgesättigt	2.1	13.9

vergleiche Übersichtstabelle im Anhang

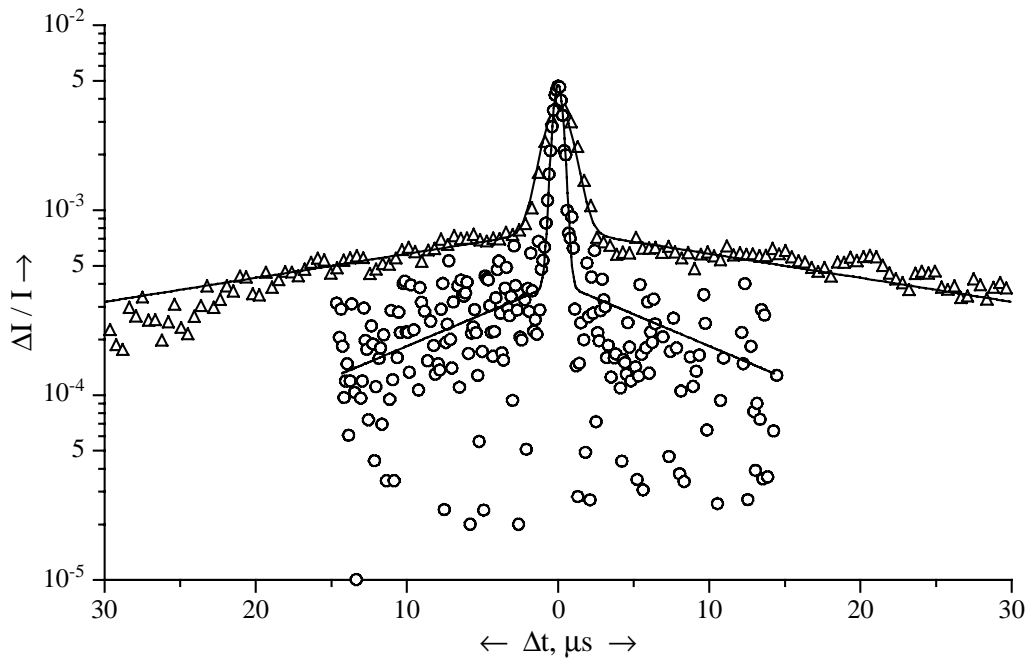


Abbildung 6.7 Fluoreszenzreduktionsmessungen von EGFP in 10mM Tris-Puffer (pH 8); Anregung: 488 nm (jeweils 70 mW, senkrecht zueinander polarisiert), Δ – stickstoffgesättigte Lösung, o – sauerstoffgesättigte Lösung, – – Fit, Extinktion (0.2 mm): 488 nm – $\ll 0.01$, v_{Probe} : 7 – 20 m/s.

Aus den Daten für luft- und stickstoffgesättigte Lösungen lassen sich die Löschkonstanten k_L und k_q und die Größen k_{ST}^0 und $\tau_{T,0}$ abschätzen (vgl. Kapitel 6.1), wobei für die Sauerstofflöslichkeit im verwendeten Puffer die von reinem Wasser als Näherung angenommen wurde. Man erhält:

$$k_{ST} = k_{ST}^0 + k_q \cdot c(O_2) \qquad \frac{1}{\tau_T} = \frac{1}{\tau_{T,0}} + k_L \cdot c(O_2)$$

$k_{ST}^0, 10^5 \text{ s}^{-1}$	$k_q, 10^8 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{s})$	$\tau_{T,0}, \mu\text{s}$	$k_L, 10^8 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{s})$
2	1.4	33	0.4

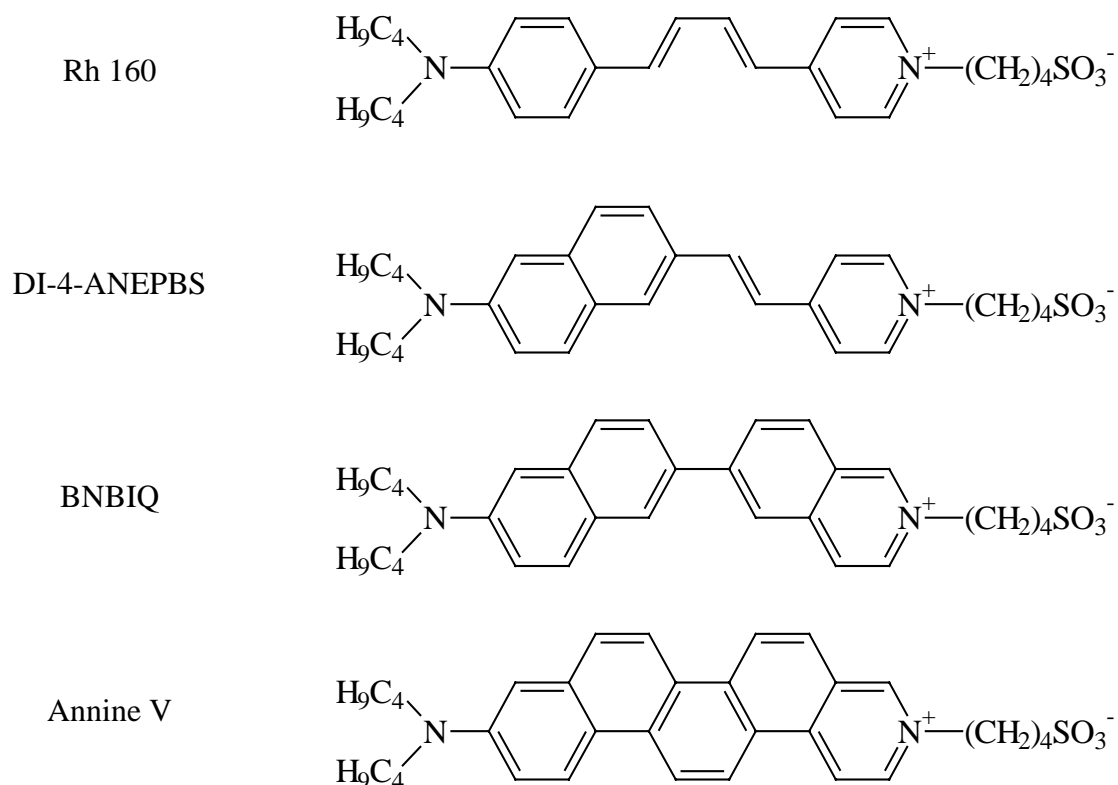
Offensichtlich hat die Erhöhung des Sauerstoffgehalts des Lösungsmittels nur einen geringen Einfluß auf die molekularen Parameter von EGFP. Dies ließe sich mit der Abschirmung des eigentlichen Chromophors durch die Proteinhülle erklären. Als Ergebnis der Untersuchungen läßt sich zusammenfassen, daß EGFP mit ca. 23 μs eine verhältnismäßig lange Triplettlebensdauer aufweist. Mit $2.4 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ weist EGFP gleichzeitig eine sehr niedrige Intersystem-Crossing Ratenkonstante auf.

Weiterhin zeigen die Messungen, daß die Fluoreszenzreduktions-Meßmethode selbst bei großen Verdünnungen und sehr geringen Intersystem-Crossing Ratenkonstanten angewendet werden kann.

6.4 Untersuchungen an „molekularen Voltmetern“

In der Arbeitsgruppe von Prof. Fromherz am Max Planck Institut für Neuro- und Membranphysik in Martinsried werden Cyanin-Farbstoffmoleküle untersucht, die spannungsabhängige Fluoreszenzeigenschaften aufweisen [53]. Durch das Einbringen dieser Sensor-Moleküle in Zellmembranen soll die Aktivität dieser Zellen untersucht werden. Dabei wirken verschiedene dieser Sensor-Moleküle zelltoxisch. Dies könnte mit der toxischen Wirkung von Singulett-Sauerstoff erklärt werden, der bei der Löschung des Triplett-Zustandes durch Triplett-Sauerstoff entsteht. Somit ist die Kenntnis der Eigenschaften der angeregten Zustände „molekularer Voltmeter“ von großer Bedeutung. Sollten z.B. die verwendeten Farbstoffmoleküle eine große Intersystem-Crossing Ratenkonstante aufweisen, so würde dies den Erklärungsansatz für die Zelltoxizität stützen.

Bei den Messungen ergab sich, daß die in Chloroform gelösten Farbstoffe eine sehr geringe Photostabilität aufweisen. Dies zeigte sich daran, daß sich bereits nach kurzer Meßzeit (< 1 min.) eine ausgebleichte Spur innerhalb der Proben-Spur bildete. Um diese Spurenbildung zu verringern, wurde die Rotationsküvette während einer Messung kontinuierlich horizontal hin- und her bewegt (vgl. Kapitel 3.2.3). Trotzdem wurde bei den Messungen folgender Effekt beobachtet. Eine Messung – sei es eine Ausbleich- oder eine Fluoreszenzreduktionsmessung – besteht aus mehreren „Scans“, in denen das Meßsignal im gewählten Δx -Bereich bestimmt wird. Die Mittelung dieser „Scans“ ergibt das eigentliche Meßergebnis, wobei das Rauschen durch die Mittelung minimiert wird. Durch die geringe Photostabilität nahm das Meßsignal von einem Scan zum nächsten ab. Da die Messungen mit einem sehr starken Rauschen behaftet waren, war die Durchführung mehrerer Scans zum Erhalten eines auswertbaren Meßsignals notwendig. Daher wurden mehrere Einzelmessungen durchgeführt, die als Mittel das Meßsignal ergaben. Dieses Vorgehen birgt den Vorteil, daß durch das neue Ausrichten der Laserfoki vor einer Einzelmessungen das Meßsignal wieder maximiert werden kann. Dieses Vorgehen stellt einen Erfahrungswert dar.



In Abbildung 6.8 bis Abbildung 6.11 sind die durchgeführten Messungen dargestellt. Trotz der beschriebenen Methode waren die erhaltenen Meßsignale stark verrauscht. Dabei stellte sich Annine V als der stabilste Farbstoff in Chloroform heraus. Dementsprechend ist das zugehörige Meßsignal am geringsten mit Rauschen behaftet. Als Referenzmessung wurde Rhodamin 6G in Chloroform verwendet. Die entsprechende Fluoreszenzreduktionsmessung ist in Abbildung 6.12 dargestellt. Tabelle 6.5 faßt die ermittelten molekularen Parameter zusammen. Bei der Messung von Rhodamin 6G zeigt sich erneut der Vorteil der Fluoreszenzreduktions- gegenüber der Ausbleichmeßmethode. Im Gegensatz zu der in Kapitel 4.2 angeführten Ausbleichmessung von Rhodamin 6G in Chloroform, erhält man bei der Fluoreszenzreduktionsmessung ein monoexponentielles Abklingen des Triplett-Zustandes. Die in Tabelle 4.2 fehlenden Angaben für Chloroform als Lösungsmittel können nun also nachgetragen werden. Wie schon bei 1,2-Dichlormethan tritt auch in Chloroform keine meßbare Anisotropie auf. Man kann also den Zahlenwert der bestimmten Meßgröße k_{ST}^{\perp} für die Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} übernehmen.

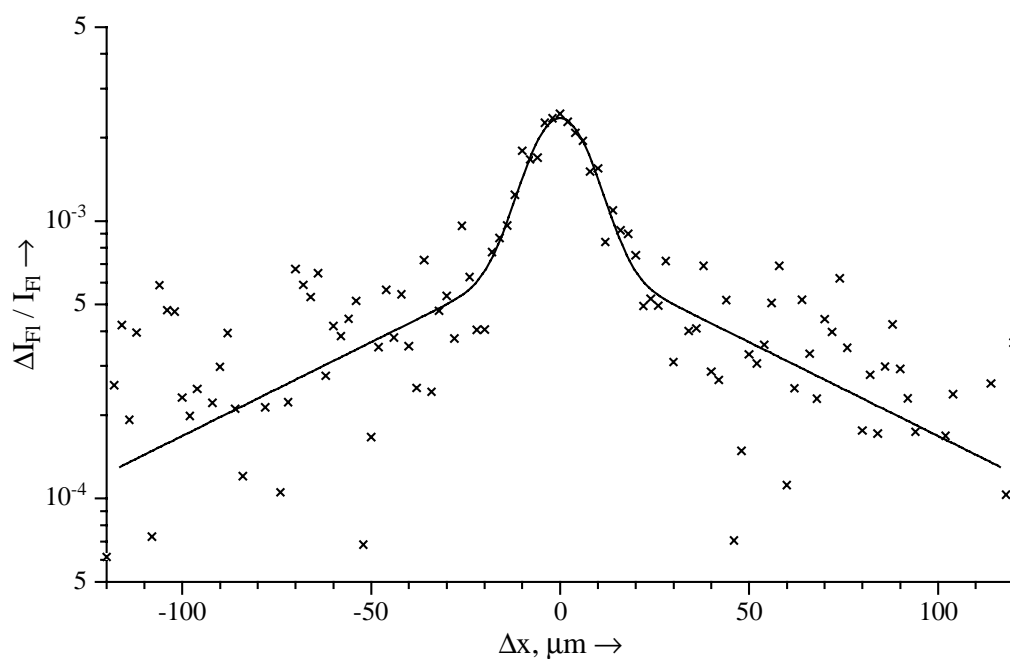


Abbildung 6.8 Fluoreszenzreduktionsmessung von Rh 160 in Chloroform; Anregung: 514.5 nm (jeweils 80 mW, senkrecht zueinander polarisiert), x – Meßsignal, – – Fit, Extinktion (0.2 mm): 514.5 nm – 0.08, v_{Probe} – 51.9 m/s.

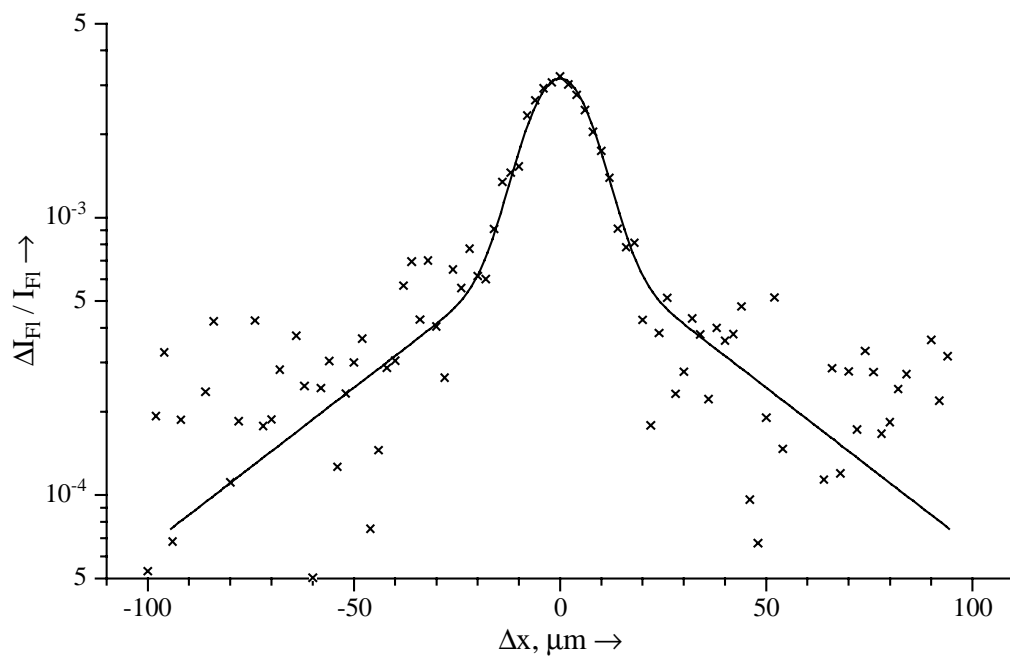


Abbildung 6.9 Fluoreszenzreduktionsmessung von DI-4-ANEPBS in Chloroform; Anregung: 514.5 nm (jeweils 80 mW, senkrecht zueinander polarisiert), x – Meßsignal, – – Fit, Extinktion (0.2 mm): 514.5 nm – 0.08, v_{Probe} – 51.9 m/s.

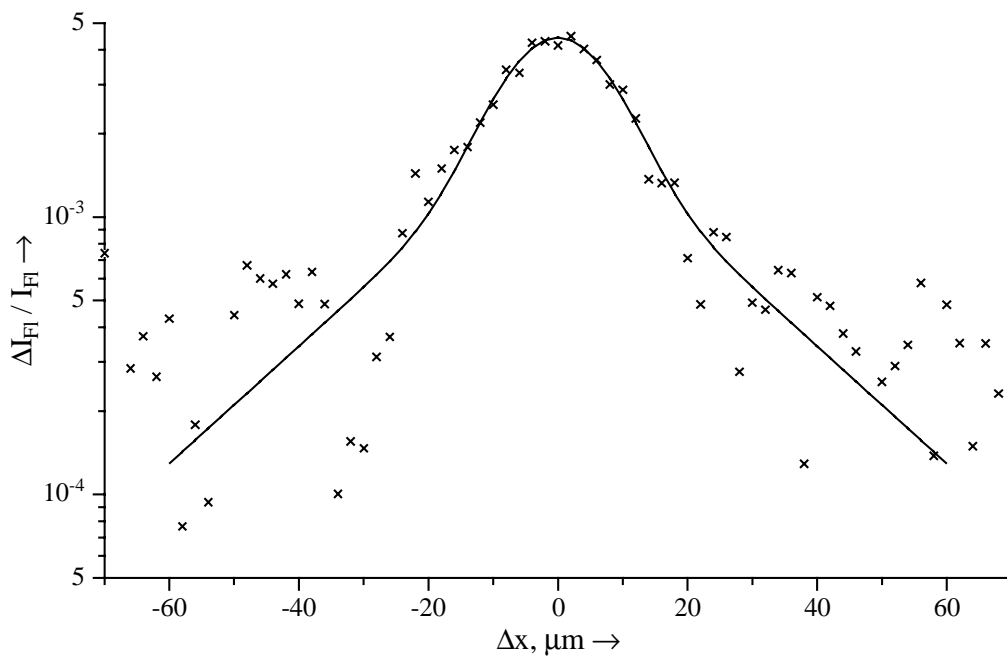


Abbildung 6.10 Fluoreszenzreduktionsmessung von BNBIQ in Chloroform; Anregung: 514.5 nm (jeweils 80 mW, senkrecht zueinander polarisiert), x – Meßsignal, – – Fit, Extinktion (0.2 mm): 514.5 nm – 0.08, v_{Probe} – 51.9 m/s.

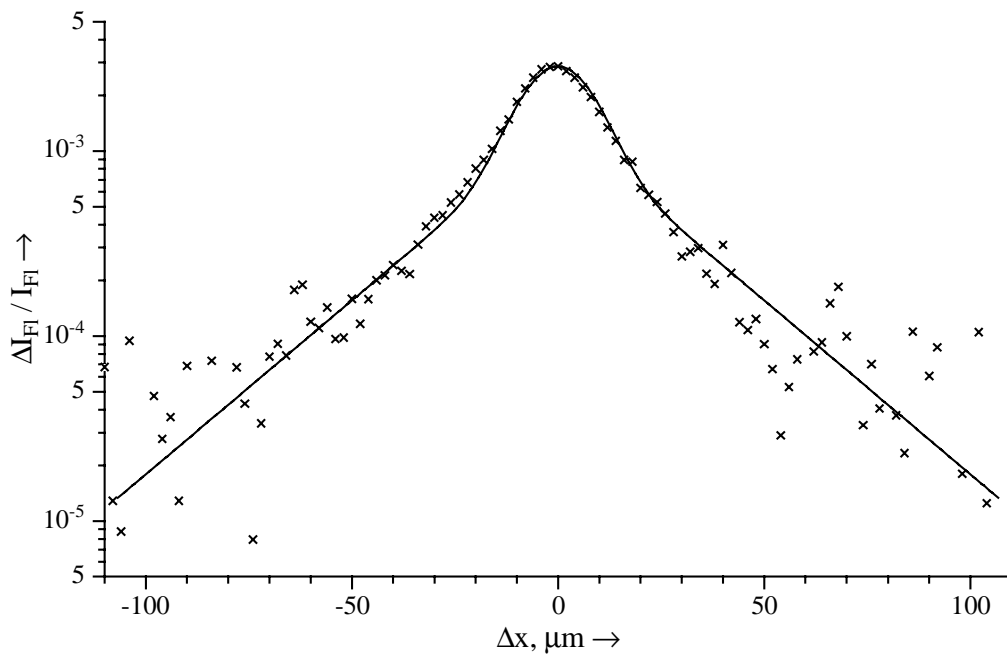


Abbildung 6.11 Fluoreszenzreduktionsmessung von Annine V in Chloroform; Anregung: 514.5 nm (jeweils 70 mW, senkrecht zueinander polarisiert), x – Meßsignal, – – Fit, Extinktion (0.2 mm): 514.5 nm – 0.08, v_{Probe} – 52.8 m/s.

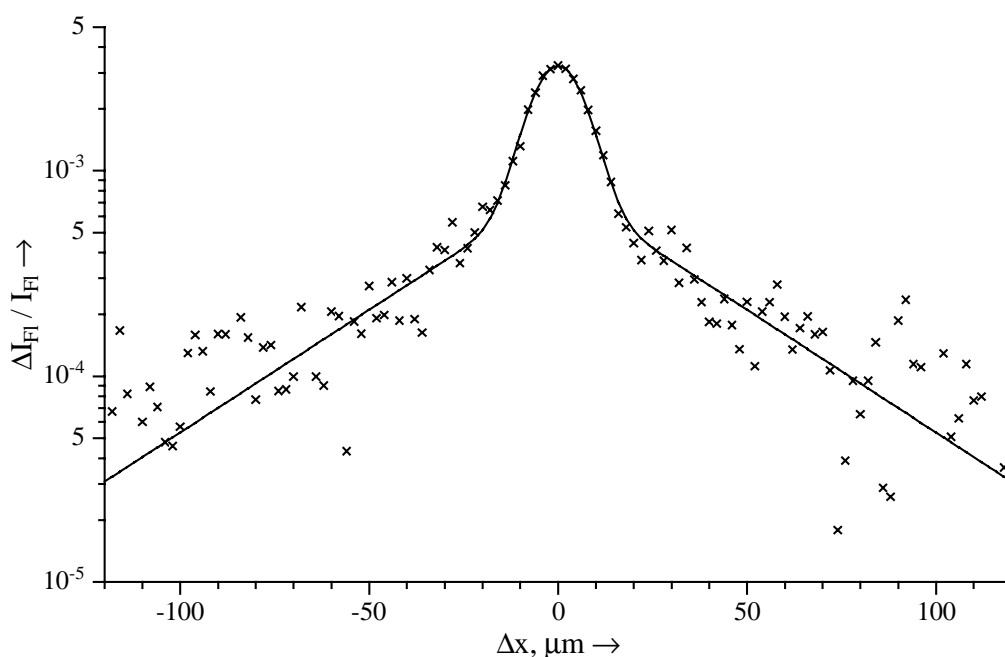


Abbildung 6.12 Fluoreszenzreduktionsmessung von Rhodamin 6G in Chloroform; Anregung: 514.5 nm (jeweils 80 mW, senkrecht zueinander polarisiert), x – Meßsignal, – – Fit, Extinktion (0.2 mm): 514.5 nm – 0.08, v_{probe} – 51.9 m/s.

Tabelle 6.5 Molekulare Parameter der „molekularen Voltmeter“ und Rhodamin 6G in Chloroform.

Farbstoff	τ_T in ns	k_{ST} in 10^5 s^{-1}
Rh 160	1.2	40
DI-4-ANEPBS	0.73	20
BNBIQ	0.4	40
Annine V	0.45	30
Rhodamin 6G	0.7	20

vergleiche Übersichtstabelle im Anhang

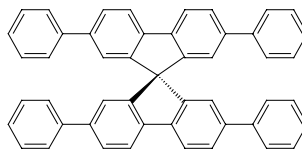
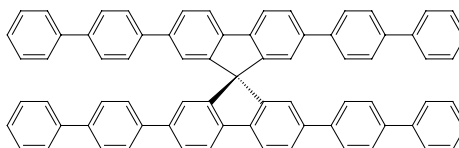
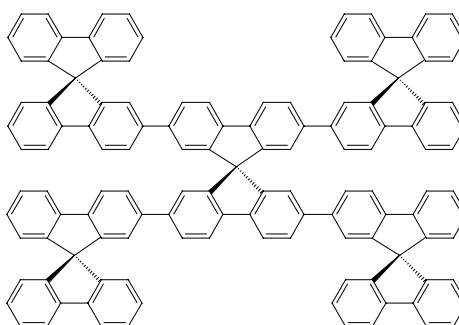
Da die erhaltenen Meßsignale - bedingt durch die geringe Photostabilität - zum Teil stark verrauscht sind, können die Triplett-Lebensdauern nicht exakt bestimmt werden, wodurch auch die Intersystem-Crossing Ratenkonstanten fehlerbehaftet sind. Daher ist eine Diskussion über den Zusammenhang zwischen Farbstoffstruktur und molekularen Parametern wenig sinnvoll. Nach den Ergebnissen, die in Tabelle 6.5 dargestellt sind, ließe sich eine Triplett-

Lebensdauer ableiten, die mit zunehmender Flexibilität im chromophoren System des Farbstoffmoleküls ansteigt. Gleichzeitig gäbe es keinen direkten Zusammenhang zwischen Struktur und Intersystem-Crossing Ratenkonstante. Die abgeleiteten Intersystem-Crossing Ratenkonstanten liegen in der gleichen Größenordnung wie die von Rhodamin 6G in Chloroform. Absolut betrachtet läßt sich dies jedoch kaum als Erklärung für die beobachtete Zelltoxizität heranziehen. Die beobachtete geringe Photostabilität der „molekularen Voltmeter“ wird in Kapitel 7 genauer untersucht.

Die für Rhodamin 6G in Chloroform bestimmten molekularen Parameter reihen sich wiederum gut in die in Tabelle 4.2 zusammengefaßten Ergebnisse ein, wenn man für k_{ST} den Faktor 1.4 (s. Kapitel 5.4.2.1) beim Vergleich zwischen Ausbleich- und Fluoreszenzreduktions-Meßmethode berücksichtigt. Mit einer Sauerstoffkonzentration von 2.3 mmol/l bei Luftatmosphäre erwartet man eine Triplett-Lebensdauer und eine Intersystem-Crossing Ratenkonstante, die im Bereich der Werte für Rhodamin 6G in Acetonitril oder Ethanol liegen (τ_T : 0.4 – 0.5 μ s, k_{ST} : 18-35 $\cdot 10^5$ s⁻¹).

6.5 Untersuchungen an Farbstoffen für den sogenannten „Plastiklaser“

Ein Nachteil von Lasern besteht vornehmlich in der geringen Anzahl der verfügbaren Laserlinien. Um dieses Problem zu umgehen wurde der Farbstofflaser entwickelt, der in einem größeren Spektralbereich abstimmbar ist. Allerdings benötigt man zum Pumpen dieses Lasers ebenfalls einen intensiven Laserstrahl. Dieses System ist zwar variabel, jedoch sehr unhandlich. Ziel aktueller Forschung ist es daher, einen elektrisch gepumpten Laser zu entwickeln, der gleichzeitig miniaturisiert gebaut werden kann. Dazu ist es notwendig, das aktive Medium, das bei den Farbstofflasern aus einer viskosen Farbstofflösung besteht, abzuändern. Für einen miniaturisierten Aufbau bietet sich daher ein festes Material an, in dem das eigentlich aktive Medium eingebettet ist. Zur Zeit werden unterschiedliche Polymere untersucht, die zur Herstellung des aktiven Mediums herangezogen werden sollen. Ziel der Entwicklung ist die Herstellung eines sogenannten Plastiklasers, der die Eigenschaften eines herkömmlichen Farbstofflasers aufweisen soll. Als mögliche Farbstoffe für diesen neuen Lasertyp werden unter anderem Spiroverbindungen untersucht [54], die Elektrolumineszenz aufweisen. Auch hier ist die Kenntnis der molekularen Eigenschaften dieser Farbstoffe von großem Interesse.

Spiro-4 Φ Spiro-6 Φ 4-Spiro²

Um bereits durchgeführte Ausbleichmessungen zu überprüfen [55], wurde Dichlormethan als Lösungsmittel für die Durchführung der Fluoreszenzreduktionsmessungen ausgewählt. Die Ausbleichmessungen ergaben bi- und sogar triexponentielle Abklingverhalten der Spiroverbindungen. In Abbildung 6.13 bis Abbildung 6.15 sind die Fluoreszenzreduktionsmessungen dargestellt. Man erkennt auch hier deutlich mehrere Abklingdauern. Die verschiedenen Abklingdauern sind in den Abbildungen durch durchgezogene Linien verdeutlicht. In Tabelle 6.6 sind die ermittelten Lebensdauern aufgeführt. Zusätzlich wurden die Meßsignale im Bereich der kurzen Lebenszeiten zur Bestimmung der Übergangsraten k_{12} ausgewertet. Da nicht klar ist, um welchen Zustand, bzw. um welche Zustände, es sich handelt, wird in diesem Zusammenhang konsequenterweise nicht von k_{ST} gesprochen. Diese Werte sind ebenfalls in der Tabelle 6.6 dargestellt.

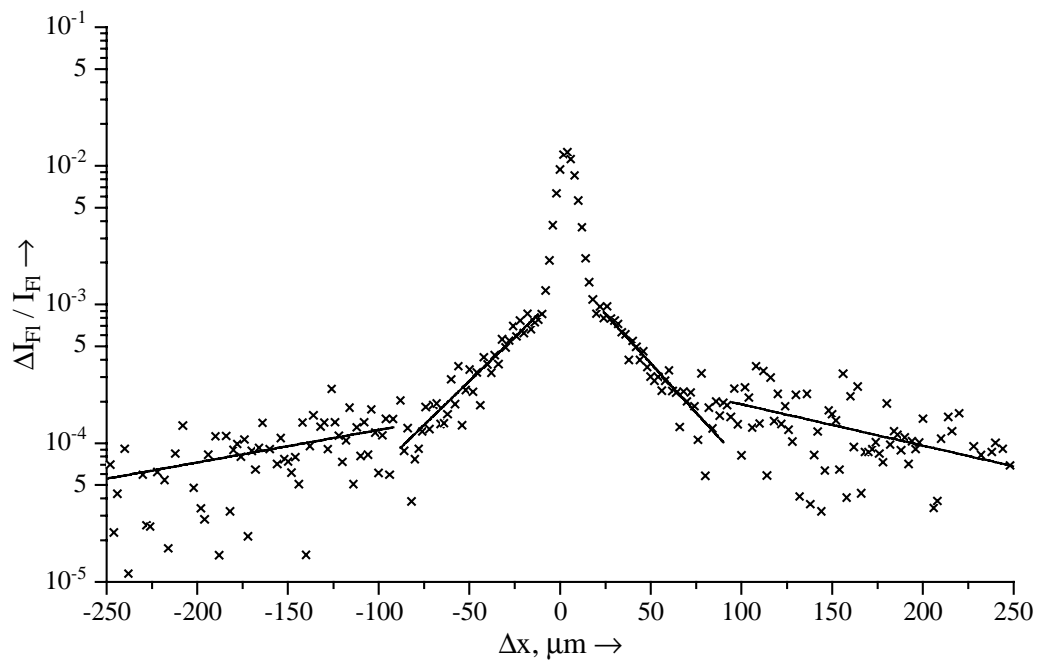


Abbildung 6.13 Fluoreszenzreduktionsmessung von Spiro-4 Φ in Dichlormethan; Anregung: 363.8 nm (jeweils 3 mW, senkrecht zueinander polarisiert), x – Meßsignal, – – Markierung der Abklingdauern, Extinktion (0.2 mm): 363.8 nm – 0.09, v_{Probe} – 21 m/s.

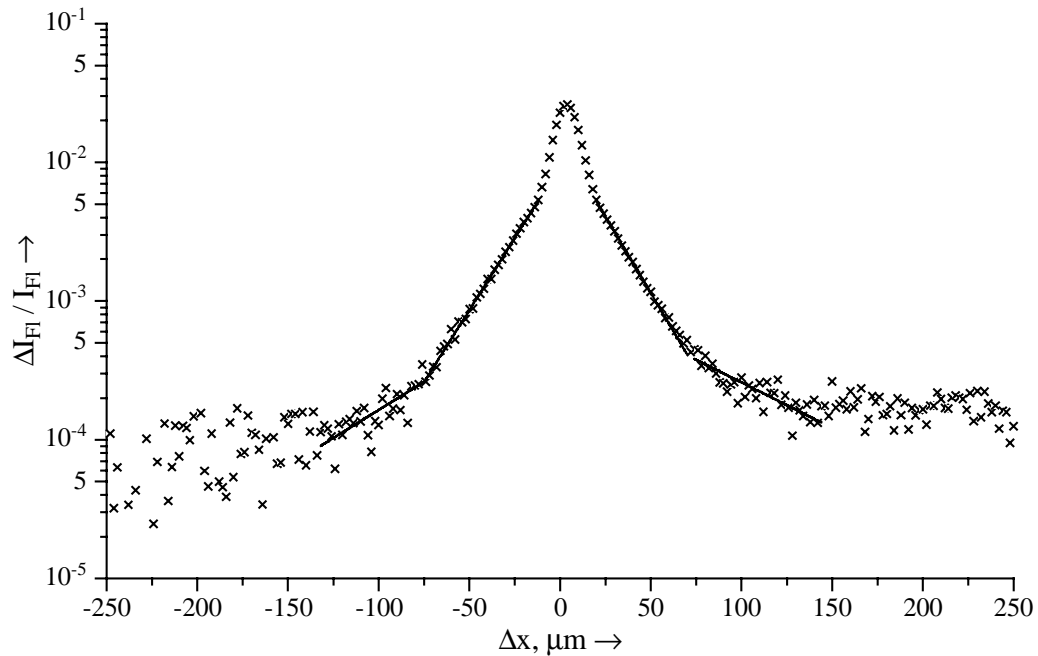


Abbildung 6.14 Fluoreszenzreduktionsmessung von Spiro-6 Φ in Dichlormethan; Anregung: 363.8 nm (jeweils 3 mW, senkrecht zueinander polarisiert), x – Meßsignal, – – Markierung der Abklingdauern, Extinktion (0.2 mm): 363.8 nm – 0.01, v_{Probe} – 21 m/s.

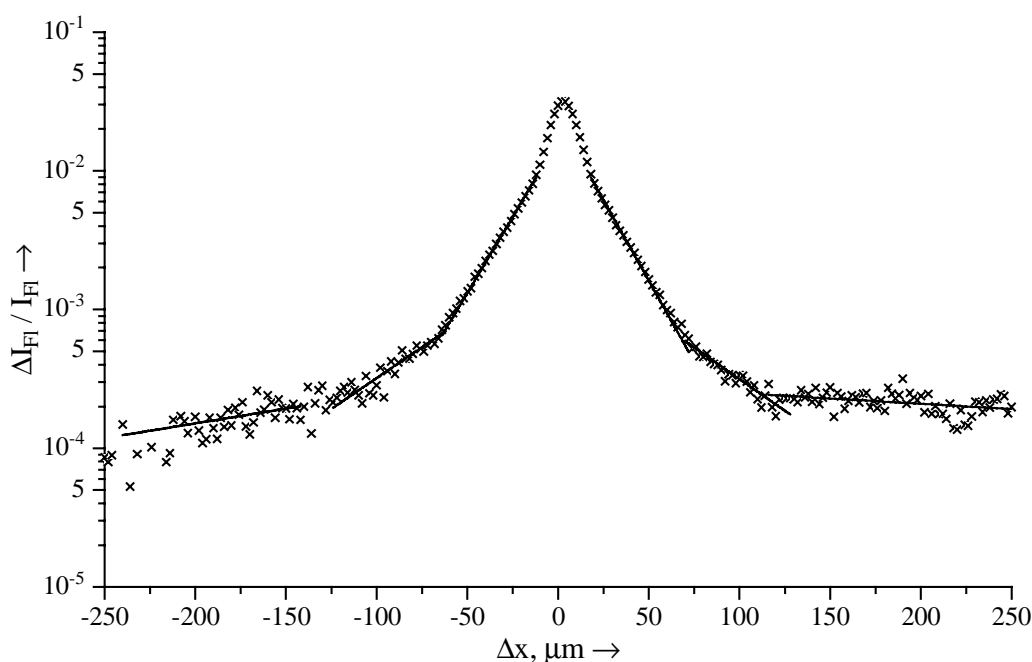


Abbildung 6.15 Fluoreszenzreduktionsmessung von 4-Spiro² in Dichlormethan; Anregung: 363.8 nm (jeweils 3 mW, senkrecht zueinander polarisiert), x – Meßsignal, – – Markierung der Abklingdauern, Extinktion (0.2 mm): 363.8 nm – 0.01, $v_{Probe} = 20$ m/s.

Tabelle 6.6 Übergangsratenkonstanten und gemessene Lebensdauern der Spiroverbindungen in Dichlormethan.

Farbstoff	τ_1 μs	τ_2 μs	τ_3 μs	k_{12} (für τ_1) in 10^5 s^{-1}
Spiro-4 Φ	1.4	4 – 6	-	4.7
Spiro-6 Φ	1	1.3 – 1.9	-	18
4-Spiro ²	1	1.9 – 2.3	10	28

vergleiche Übersichtstabelle im Anhang

Bei der Betrachtung der Meßsignale erkennt man, daß sich die kurze Lebensdauer bei allen drei Proben eindeutig bestimmen läßt. Dagegen hängen die Werte für die längeren Lebensdauern von dem Δx -Bereich ab, den man zur Bestimmung heranzieht. Trotzdem lassen sich Bereiche unterschiedlicher Lebensdauern deutlich unterscheiden.

Durch die eindeutige Bestimmung der kurzen Lebensdauern τ_1 sind auch die damit bestimmten Übergangsraten k_{12} sehr genau. Demnach scheint die Übergangsrate mit der

Größe des Moleküls zu korrelieren. Über die Art dieses transienten Zustandes lassen sich hier keine Aussagen treffen.

Da bei Spiro-6 Φ und 4-Spiro² hohe Übergangsraten auftreten, sind diese in Bezug auf diese Eigenschaft für den Einsatz als Laserfarbstoff vermutlich weniger geeignet als Spiro-4 Φ , da der Übergang in einen langlebigen Zustand einen wesentlichen Verlustprozeß im Laserbetrieb darstellt.

Zuletzt wird wiederum die große Leistungsfähigkeit der Meßmethode unterstrichen, da selbst Messungen mit einer Laserleistung von nur 3 mW und einer Extinktion von ca. 0.01 problemlos durchzuführen waren (s. Abbildungen).

6.5.1 Aufgetretene Schwierigkeiten bei der Messung mit UV-Licht

Zur Durchführung der Fluoreszenzreduktionsmessungen mit den angeführten Spiroverbindungen war es notwendig, UV-Licht zu verwenden. Da für diese Wellenlänge kein Laserfarbstoff vorlag, der im Bereich von 370 nm eine starke Absorptionsbande aufweist, wurde Rhodamin 6G in Dichlormethan als Referenzfarbstoff verwendet. Bei der Durchführung der Messungen traten allerdings unerwartete Phänomene auf, die eine Auswertung der erhaltenen Meßsignale verhinderte. In Abbildung 6.16 ist ein Meßergebnis als Beispiel aufgeführt.

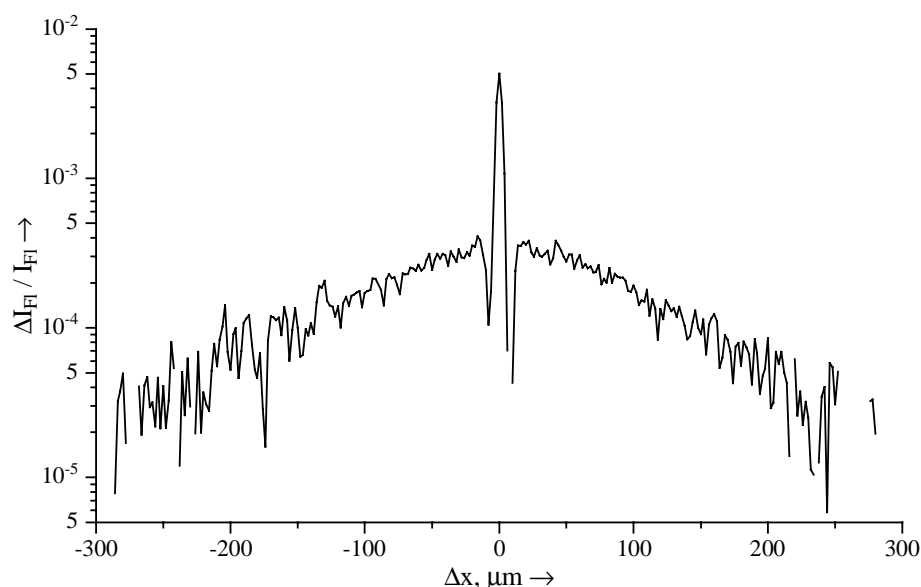


Abbildung 6.16 Fluoreszenzreduktionsmessung von Rhodamin 6G in Dichlormethan; Anregung: 367.8 nm.

Im Bereich überlappender Laserfoki kam es reproduzierbar zu einem „Durchschwingen“ des Meßsignals. Dieses Verhalten ließ sich nicht auf einen Justage-Fehler zurückführen, zumal die durchgeführten Messungen mit den Spiroverbindungen keinerlei Probleme ergaben. Lediglich das Ausmaß des „Durchschwingens“ ließ sich durch Verändern der Meßparameter beeinflussen. Die Ursache für diesen Sachverhalt konnte nicht geklärt werden. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Absorptionsprozessen der Spiroverbindungen und Rhodamin 6G liegt in dem dadurch erreichten angeregten Zustand. Während bei den Spiroverbindungen durch eine Absorption bei 368 nm der erste angeregte Zustand erreicht wird, gelangt ein Rhodamin 6G-Molekül durch die Absorption bei dieser Wellenlänge in höher angeregte Zustände. Ob dies allerdings das beschriebene „Durchschwingen“ des Meßsignals erklären kann, ist fraglich. Es wäre für zukünftige Untersuchungen sicherlich interessant, dieses Phänomen näher zu untersuchen. Dies war im Rahmen der vorliegenden Dissertation allerdings nicht mehr möglich.

6.6 Zusammenfassung

Im vorangegangenen Kapitel wurde anhand mehrerer Messungen gezeigt, wie die neue Fluoreszenzreduktions-Meßmethode auch dann Meßergebnisse liefert, wenn die Ausbleichmeßmethode nicht mehr angewendet werden kann. Weiterhin wurden Meßergebnisse aus aktuellen Forschungsrichtungen vorgestellt.

Bei Fluoreszenzreduktionsmessungen von Rhodamin 6G in Wasser ergab sich die bisher größte beobachtete Abhängigkeit der Triplet-Lebensdauer τ_T von der Sauerstoffkonzentration im Lösungsmittel. Zusätzlich wurde, wie bereits für Acetonitril und Ethanol, festgestellt, daß neben der Löschung durch Sauerstoff weitere effiziente Löschprozesse den Triplet-Zustand entvölkern.

Durch die Untersuchung unterschiedlich bromierter Perylenfarbstoffe konnten frühere Ergebnisse bestätigt werden. Diese sagten aus, daß bei Perylenfarbstoffen die Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} unabhängig vom Grad der Bromierung ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß die bei Ausbleichmessungen dieser Farbstoffe beobachteten transienten Absorptionen die Fluoreszenzreduktionsmessungen nicht stören.

Als bekanntester Vertreter aktueller Untersuchungen der Biochemie wurde das Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) untersucht. Hierbei konnte ein transientser Zustand

detektiert werden, der mit einer sehr geringen Übergangswahrscheinlichkeit bevölkert wird. Durch die beobachtete Sauerstoffabhängigkeit dieser Lebensdauer wurde auf den Triplett-Zustand geschlossen. Mit 21 μs zeigt dieser eine verhältnismäßig hohe Lebensdauer bei Luftsättigung des Lösungsmittels. Im Vergleich dazu zeigt Rhodamin 110 (verestert) eine Triplett-Lebensdauer von 2.1 μs . Neben der geringen Sauerstoffabhängigkeit der Triplett-Lebensdauer wurde für die Intersystem-Crossing Ratenkonstante keine Abhängigkeit festgestellt.

Untersuchungen von „molekularen Voltmetern“ – Moleküle aus der Klasse der Cyanin-Farbstoffe – sollten Auskunft darüber geben, ob die beobachtete Zelltoxizität auf eine erhöhte Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST} zurückzuführen sei. Diese würde über die Desaktivierung des Triplett-Zustandes zu einer erhöhten Produktion von Singulett-Sauerstoff führen, der als Zellgift bekannt ist. Die Messungen ergaben keine signifikante Erhöhung von k_{ST} .

Die für die Entwicklung des „Plastiklasers“ als Laserfarbstoffe in Frage kommenden Spiroverbindungen zeigten in ersten Ausbleichmessungen mehr exponentielles Abklingverhalten. Fluoreszenzreduktionsmessungen bestätigten diesen Befund. Bei der Berücksichtigung der ermittelten Intersystem-Crossing Ratenkonstanten stellte sich das kleinste Molekül Spiro-4 Φ als das geeignetste für den Einsatz als Laserfarbstoff heraus.

Bei den Messungen mit EGFP und den Spiroverbindungen zeigte sich die große Leistungsfähigkeit des Fluoreszenzreduktions-Meßverfahrens. Selbst bei geringsten Extinktionen und Laserleistungen liefert dieses Meßsystem sehr gute Ergebnisse.

Bei der Verwendung von UV-Licht ergaben sich Schwierigkeiten bei Messungen mit Rhodamin 6G in Ethylenglykol. Das beobachtete „Durchschwingen“ des Meßsignals im Bereich überlappender Laserfoki konnte im Rahmen der Dissertation nicht mehr geklärt werden.

7 Photostabilitätsmessungen

In Kapitel 6.4 wurden Untersuchungen von Cyanin-Farbstoffen durchgeführt, die durch ihre spannungsabhängigen Fluoreszenzeigenschaften [53] als sogenannte „molekulare Voltmeter“ Verwendung finden. Durch das Einbringen dieser Sensor-Moleküle in Zellmembranen soll die Aktivität dieser Zellen untersucht werden. Bei der Untersuchung der Farbstoffe stellte sich eine geringe Photostabilität in Chloroform heraus, wobei Annine V die größte Photostabilität aufzuweisen schien. Dies wurde aus der Beobachtung geschlossen, daß bei der Durchführung der Fluoreszenzreduktionsmessungen mit Annine V die geringsten Probleme auftraten. Bei den anderen Farbstofflösungen konnte dagegen bereits nach kurzer Zeit eine ausgebleichte Spur in der Proben-Spur der Rotationsküvette beobachtet werden. Da bislang keine Messung der Photostabilität dieser Farbstoffe vorliegen, soll im folgenden an Hand einfacher Experimente und Auswertung eine Photostabilität der Proben abgeleitet werden.

Dazu wurden in Rücksprache mit Prof. Fromherz Farbstofflösungen in Chloroform und in wassergesättigtem Chloroform durchgeführt. Dabei soll wassergesättigtes Chloroform die Verhältnisse in lebenden Zellen am besten annähern.

7.1 Durchführung der Messungen

Die vier in Kapitel 6.4 untersuchten Farbstoffe (Rh 160, DI-4-ANEPBS, BNBIQ und Annine V) wurden in Chloroform bzw. wassergesättigtem Chloroform gelöst. Dabei wurde in Chloroform für jeden Farbstoff eine Extinktion von ca. 1.9 und in wassergesättigtem Chloroform eine Extinktion von ca. 0.33 in einer 1 cm Küvette bei 488 nm eingestellt. Die geringere Extinktion in wassergesättigtem Chloroform ergab sich durch die im Vergleich zu Chloroform stark verminderte Löslichkeit der Farbstoffe.

Zur Untersuchung der Photostabilität wurden jeweils 3 ml der entsprechenden Farbstofflösung in eine kommerzielle 1 cm-Quarzglasküvette (Fa. Hellma) gefüllt. Anschließend wurde diese Lösung bei 488 nm und einer Laserleistung von 1.5 Watt bestrahlt. Die Lösung wurde zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Bestrahlung gerührt. Nach dem Verstreichen einer festgelegten Zeitspanne Δt wurde die Bestrahlung unterbrochen und die Quarzglasküvette in ein Spektralphotometer (Lambda 19, Fa. Perkin Elmer) eingesetzt. Anschließend wurde die Absorption im Bereich von 200 bis 700 nm gemessen. Daraufhin wurde die Probe für eine weitere Zeitspanne bestrahlt. Dieses Vorgehen wurde solange

wiederholt, bis die Probe vollständig ausgebleicht war. In Abbildung 7.1 bis Abbildung 7.4 sind die bestrahlungszeitabhängigen Absorptionsspektren dargestellt.

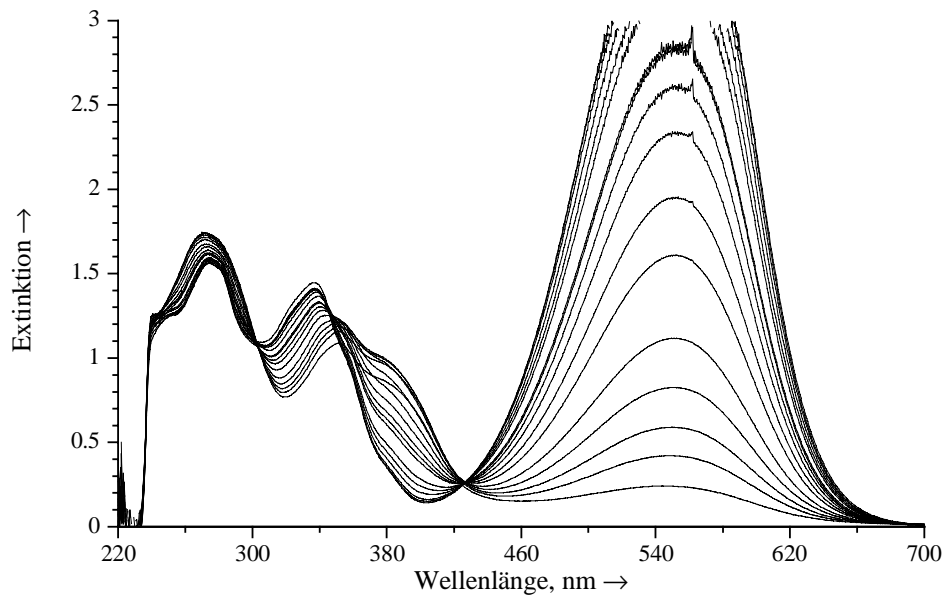


Abbildung 7.1 Absorptionsspektren von Rh 160 in Chloroform in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit (488 nm, 1.5 W); Messungen nach 0, 1, 2, 4, 6, 8, 13, 14, 16, 19, 23, 27, 33, 37, 41, 45 und 53 Minuten Bestrahlungszeit, Schichtdicke: 1 cm.

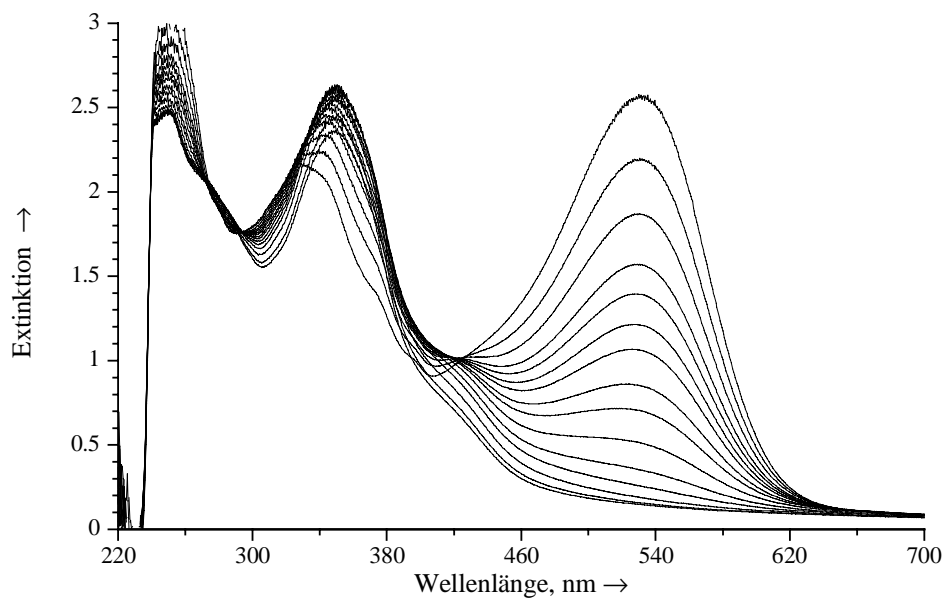


Abbildung 7.2 Absorptionsspektren von DI-4 ANEPBS in Chloroform in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit (488 nm, 1.5 W); Messungen nach 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 7, 10, 13, 18, 23 und 30 Minuten Bestrahlungszeit, Schichtdicke: 1 cm.

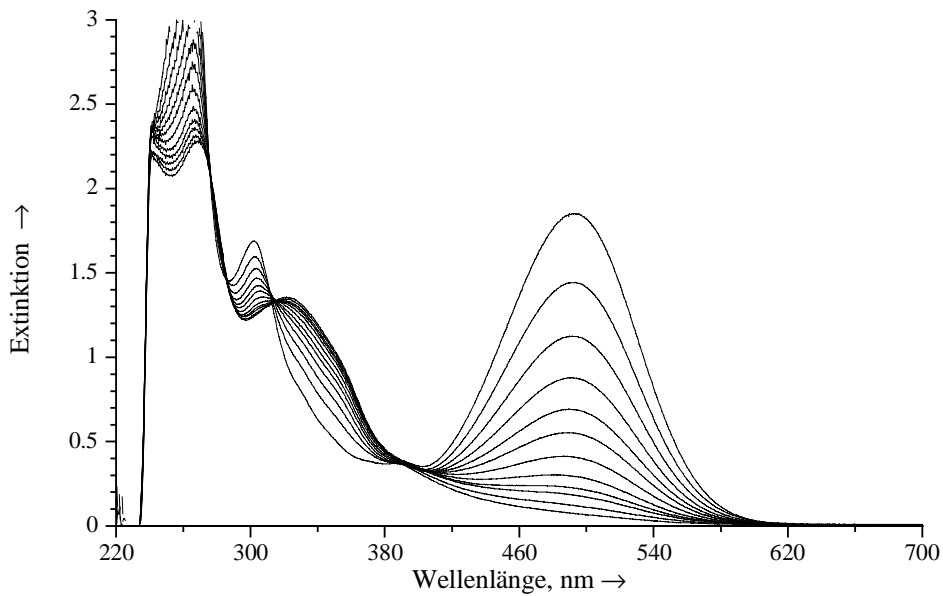


Abbildung 7.3 Absorptionsspektren von BNBIQ in Chloroform in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit (488 nm, 1.5 W); Messungen nach 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3.25, 4.25, 5.25, 6.25, 8.25 und 11.25 Minuten Bestrahlungszeit, Schichtdicke: 1 cm.

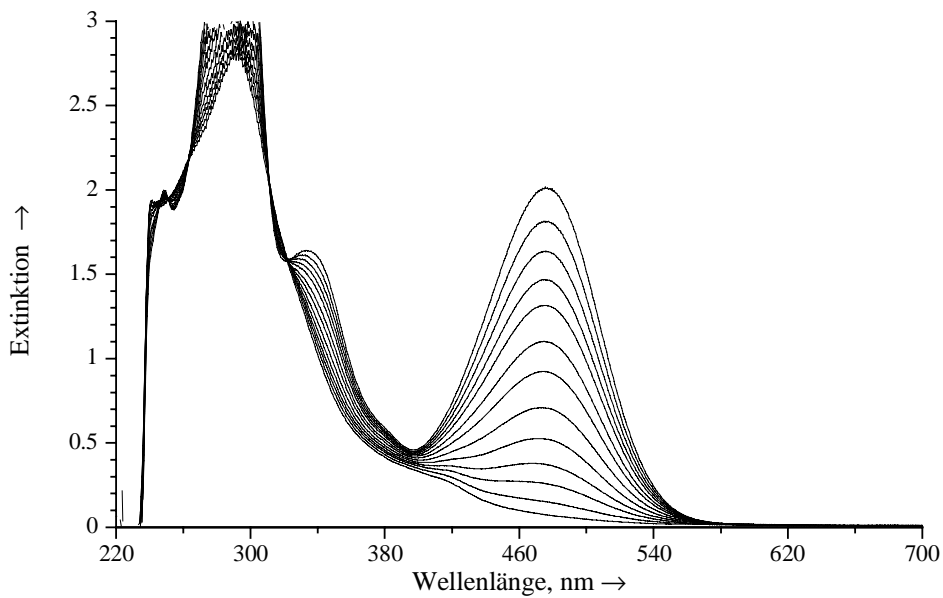


Abbildung 7.4 Absorptionsspektren von Annine V in Chloroform in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit (488 nm, 1.5 W); Messungen nach 0,0.5, 1, 1.5, 2, 2.75, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 9 und 12 Minuten Bestrahlungszeit, Schichtdicke: 1 cm.

Die in wassergesättigtem Chloroform durchgeführten Messungen sind denen in Chloroform sehr ähnlich und werden deshalb nicht explizit dargestellt.

7.2 Auswertung der Absorptionsdaten

Die bis zum Erreichen des Ausbleichens benötigte Zeit sagt noch nichts über die Photostabilität des jeweiligen Farbstoffs aus, da sich die Absorptionsspektren in Form und spektraler Lage unterscheiden. Um daher die Photostabilität anhand der Konzentrationsabnahme beurteilen zu können, muß zunächst der Extinktionskoeffizient bei der betrachteten Laserwellenlänge berücksichtigt werden:

$$\frac{dE}{dt} = \frac{d(\varepsilon \cdot c \cdot d)}{dt} \quad 7.1$$

$$\frac{1}{\varepsilon \cdot d} \cdot \frac{dE}{dt} = \frac{dc}{dt} \quad 7.2$$

mit	E	- Extinktion
	ε	- molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
	c	- Konzentration
	d	- Schichtdicke

Um die jeweiligen Extinktionskoeffizienten abzuschätzen, wurde angenommen, daß bei allen überprüften Farbstoffen am Absorptionsmaximum $\varepsilon = 1 \cdot 10^5$ l/(mol·cm) gilt. Um nun letztendlich die Photostabilität bewerten zu können, muß eine Wellenlänge ausgesucht werden, bei der gebildete Abbauprodukte nicht absorbieren. Da bei der Photozerstörung im allgemeinen der Chromophor abgebaut wird und die Wellenlänge des Absorptionsmaximums mit der Größe des chromophoren Systems abnimmt, wurde eine gegenüber dem Absorptionsmaximum bathochrom verschobene Meßwellenlänge λ_{Mess} für die verschiedenen Proben ausgesucht. Gleichzeitig sollte die Extinktion an dieser Meßwellenlänge nicht zu gering sein. Als Kompromiß zwischen diesen beiden Bedingungen wurde folgendes Kriterium gewählt:

$$E(\lambda_{\text{Mess}}) = \frac{1}{2} E_{\text{max}}, \lambda_{\text{Mess}} > \lambda_{\text{Max}} \quad 7.3$$

Um die so ermittelten Konzentrationsabnahmen dc/dt der untersuchten Farbstoffe miteinander vergleichen zu können, müssen diese auf die jeweils absorbierte Laserleistung bezogen

werden. Zusätzlich muß berücksichtigt werden, daß durch die Photozerstörung der Probe die Absorption ebenfalls eine zeitabhängige Größe ist.

$$\frac{1}{\epsilon \cdot d} \cdot \frac{1}{A(t) \cdot P} \frac{dE}{dt} = \left(\frac{dc}{dt} \right)_{\text{abs}} \quad 7.4$$

mit $A(t)$ - zeitabhängige Absorption

P - Laserleistung

$\left(\frac{dc}{dt} \right)_{\text{abs}}$ - auf die Laserleistung bezogene Konzentrationsänderung

Um die exakte absorbierte Laserleistung zu erhalten, muß die Größe $[(dA/dt) \cdot \text{Laserleistung}]$ über den Bestrahlungszeitraum Δt integriert werden. Zur Vereinfachung wird hier der Mittelwert aus zwei aufeinanderfolgenden Absorptionswerten $[(A_i + A_{i+1})/2]$ zur Bestimmung der absorbierten Laserleistung $A(t) \cdot P$ herangezogen. Die aus den zeitabhängigen Absorptionsdaten gewonnenen Daten und die daraus berechneten Werte sind im Anhang aufgeführt. Abbildung 7.5 und Abbildung 7.6 zeigen die auf die Laserleistung bezogene Konzentrationsänderung in Abhängigkeit von der Zeit.

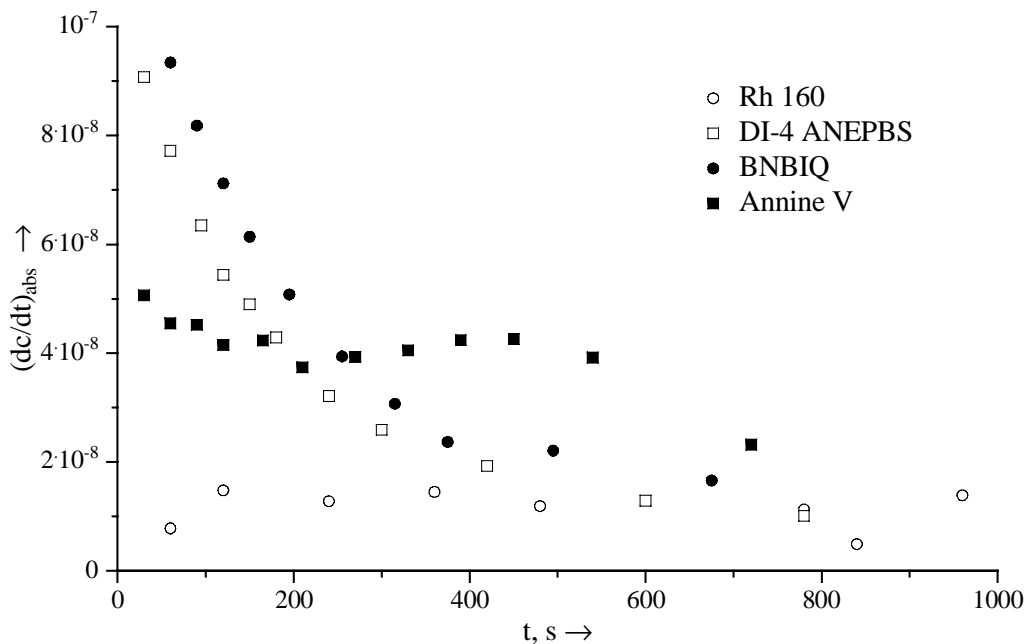


Abbildung 7.5 Auf die absorbierte Laserleistung bezogene Konzentrationsänderung in Chloroform.

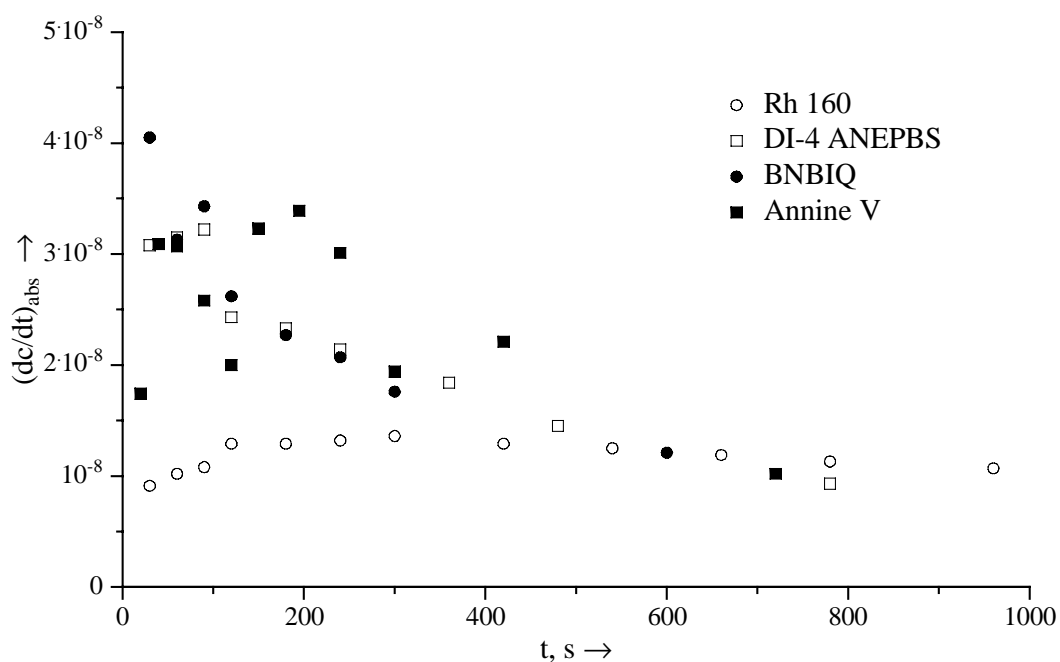


Abbildung 7.6 Auf die absorbierte Laserleistung bezogene Konzentrationsänderung in wassergesättigtem Chloroform.

7.3 Ergebnis

Bei der beschriebenen Auswertung erwartet man eine von der Zeit unabhängige Konzentrationsänderung, wenn die Quantenausbeute für Photozerstörung nicht zeitabhängig ist. Dieses Verhalten beobachtet man in beiden Lösungsmitteln sehr gut für Rh 160 und näherungsweise für Annine V, wobei diese gleichzeitig die jeweils photostabilsten Farbstoffe darstellen. Bei DI-4 ANEPBS und BNBIQ tritt dagegen eine schnelle Abnahme der auf die absorbierte Laserleistung bezogenen Konzentrationsänderung auf. Die Begründung für diesen Effekt konnte im Rahmen der Dissertation nicht gegeben werden. Als Erklärung könnten Absorptionen von Abbauprodukten im Bereich der Anregungswellenlänge herangezogen werden. Ein anderer Ansatzpunkt ist die durch die Abbauprodukte veränderte chemische Umgebung des jeweiligen Farbstoffes, die die Quantenausbeute für Photozerstörung ändern könnte. Dabei würde man allerdings einen mit dem Ausmaß der Photozerstörung ansteigenden Einfluß erwarten.

Die Untersuchungen zeigen jedoch deutlich, daß Rh 160 und Annine V eine gegenüber DI-4 ANEPBS und BNBIQ größere Photostabilität aufweisen. Gleichzeitig sind die in

wassergesättigtem Chloroform erhaltenen Photostabilitäten geringfügig höher als in Chloroform.

Dieses Ergebnis stimmt nur teilweise mit dem bei den Fluoreszenzreduktionsmessungen beobachtetem Verhalten der Farbstoffe überein. Hier stellte sich Annine V phänomenologisch als der weitaus photostabilste Farbstoff heraus. Ein Erklärungsversuch für die auftretenden Abweichungen bezieht sich auf eine möglicherweise vorliegende starke Abhängigkeit der Quantenausbeute für Photozerstörung von der Bestrahlungsintensität. Da sich die Bestrahlungsintensitäten bei den Photostabilitäts- und den Fluoreszenzreduktionsmessungen stark unterscheiden, ist ein Unterschied in den beobachteten Photostabilitäten denkbar.

8 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es einerseits, durch die Etablierung der sogenannten Rotationsküvetten-Technik den Anwendungsbereich eines bestehenden Transientenspektrometers erheblich zu erweitern. Das zugrunde liegende Meßsystem zeigte dabei Nachteile auf. Diese sollten durch die Entwicklung eines neuen Meßprinzips aufgehoben werden, um so Untersuchungen an Fluoreszenzfarbstoffen durchführen zu können, die zur Zeit in aktuellen Forschungsrichtungen ihren Einsatz finden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Weiterentwicklung eines Transientenspektrometers vorgestellt, mit Hilfe dessen durch Absorptionsmessungen die Triplett-Lebensdauer und die Intersystem-Crossing Ratenkonstante von organischen Farbstoffen bestimmt werden können. Der Anwendungsbereich des „alten“ Spektrometers war durch die Nutzung der Jet-Technik eingeschränkt. So war es nicht möglich, die Probengeschwindigkeit in einem größeren Bereich als 10-15 m/s einzustellen. Dadurch ergab sich eine zeitliche Auflösung von $> 0.7 \mu\text{s}$. Das für die Jet-Technik notwendige große Probenvolumen von ca. 50 ml war besonders bei wertvollen Proben von großem Nachteil. Messungen mit sehr niedrig konzentrierten Lösungen waren durch ein geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis problematisch, Untersuchungen in Abhängigkeit vom Gasgehalt des Lösungsmittels waren nur ungenau durchführbar. Es wurde gezeigt, wie diese Einschränkungen durch die Nutzung der Rotationsküvetten-Technik aufgehoben und wie die neue Technik in das bereits bestehende Transientenspektrometer integriert werden konnte. Durch die geschilderten Neuerungen sind nun Messungen mit einer zeitlichen Auflösung von $> 100 \text{ ns}$ in nahezu beliebigen Lösungsmitteln mit einstellbarem Gasgehalt durchführbar. Im folgenden wurde die Überprüfung der neuen Meßtechnik dargestellt. Durch den direkten Vergleich der Ergebnisse, die mit Jet-Technik auf der einen, und der Rotationsküvetten-Technik auf der anderen Seite erhalten wurden, konnte die Funktionstüchtigkeit letzterer nachgewiesen werden. Das Vorhandensein zweier Proben-Spuren in der Rotationsküvette sollte das direkte Vergleichen zweier Farbstofflösungen ermöglichen. Der Vergleich der Meßergebnisse in innerer und äußerer Proben-Spur konnte dies erwartungsgemäß bestätigen. Zuletzt konnte gezeigt werden, daß nahezu beliebige Lösungsmittel verwendbar und die Meßergebnisse unabhängig von der gewählten Probengeschwindigkeit sind. Das geringe Volumen einer Proben-Spur bedingte naturgemäß ein schnelleres Ausbleichen der untersuchten Farbstofflösung. Das Ausmaß des Ausbleichens konnte dabei durch eine spezielle Meßtechnik minimiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden neue Untersuchungen transienter Zustände von Rhodamin 6G sowie in Zusammenarbeit mit Prof. Müllen vom Max Planck Institut für Polymerforschung in Mainz an Perylenfarbstoffen vorgestellt. Im Fall von Rhodamin 6G konnten Messungen in niederviskosen Lösungsmitteln durchgeführt werden, die bislang mit der Jet-Technik nicht möglich waren. Weiterhin wurde der Einfluß der Sauerstoffkonzentration im Lösungsmittel auf die molekularen Parameter untersucht. Die zu diesem Zweck aufgebaute Apparatur zur Einstellung von Stickstoff-Sauerstoff-Gemischen ermöglichte es, die Sauerstoffkonzentrationen in einer Farbstofflösung gezielt zu variieren. Die Messungen bestätigten, daß Sauerstoff den maßgeblichen Faktor bei der Löschung des Triplett-Zustandes stellt. Weiterhin ergab sich, daß zusätzliche effiziente, nicht identifizierte Löschprozesse in Ethanol und Acetonitril vorliegen müssen. Beim Vergleich der unterschiedlichen Lösungsmittel ergab sich ein qualitativer Zusammenhang zwischen Sauerstofflöslichkeit und Triplett-Lebensdauer bzw. Intersystem-Crossing Ratenkonstante von Rhodamin 6G. Bei der Untersuchung von bromierten Perylenfarbstoffen ergaben sich durch transiente Absorptionen im Bereich der Wellenlänge des Meßlaserstrahls Meßsignale, die nicht mit der zugrundeliegenden Theorie ausgewertet werden konnten. Dies stellt ein prinzipielles Problem dar, da die Auswertung der Meßsignale nur bei Abwesenheit von transienten Absorptionen im Bereich der Meßwellenlänge möglich ist. Bei Messungen mit Farbstoffen, die in Biologie und Medizin ihren Einsatz finden, wurde aufgezeigt, daß durch die Besetzung transienter Zustände die Fluoreszenzintensität herabgesetzt wird, wenn intensive Lichtquellen zur Anregung der Farbstoffe verwendet werden. Das Ausmaß dieser Verringerung wurde anhand der Triplett-Lebensdauer und der Intersystem-Crossing Ratenkonstante abgeschätzt. Gleichzeitig wurde darauf verwiesen, daß durch die Bestimmung dieser „Fluoreszenzreduktion“ prinzipiell die Bestimmung der Triplett-Lebensdauer und der Intersystem-Crossing Ratenkonstante möglich sein sollte, wobei diese Messungen im Gegensatz zu den Ausbleichmessungen durch transiente Absorptionen nicht mehr gestört werden sollten.

Im dritten Teil wurde die Idee der Fluoreszenzreduktion aufgegriffen und ein neues Meßprinzip vorgestellt, das auf der Messung der Fluoreszenz beruht. Die dazu notwendigen Änderungen des Meßaufbaus im Transientenspektrometer wurden dargestellt. Durch die Entwicklung einer Theorie konnten die gewonnenen Meßsignale ausgewertet werden. Zur Überprüfung der neuen Meßmethode wurden Messungen mit Rhodamin 6G in Ethylenglykol durchgeführt und die erhaltenen molekularen Parameter mit den nach der alten Meßmethode

gewonnenen Daten verglichen. Durch die sehr gute Übereinstimmung der Werte konnte die Funktionstüchtigkeit der neuen Fluoreszenzreduktions-Meßmethode bestätigt werden. Beim Vergleich mit verwandten Meßmethoden ergaben sich ebenfalls gute Übereinstimmungen. Durch den direkten Vergleich zwischen Fluoreszenzreduktions- und Absorptionsmethode konnte gezeigt werden, daß die Messung der Fluoreszenzreduktion selbst dann noch möglich ist, wenn Absorptionsmessungen nicht mehr durchführbar sind – sei es durch eine zu geringe Konzentration der Farbstofflösung oder durch Absorptionen transienter Zustände.

Der vierte Teil der vorliegenden Arbeit stellte Messungen mit der neuen Fluoreszenzreduktions-Meßmethode vor. Hierbei wurden Farbstoffe aus aktuellen Forschungsgebieten und zusätzlich der Sauerstoffeinfluß auf die molekularen Parameter von Rhodamin 6G in Wasser untersucht. Um die Bildung von Dimeren zu verhindern mußte hierzu eine geringe Konzentration von Rhodamin 6G in Wasser eingestellt werden. Dies verhinderte bislang die Untersuchung mittels Absorptionsmessungen. Weiterhin wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Vinod Subramaniam vom Max Planck Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen Untersuchungen am „Enhanced Green Fluorescent Protein“ (EGFP) gezeigt. Es ergaben sich eine verhältnismäßig hohe Triplett-Lebensdauer und eine sehr geringe Intersystem-Crossing Ratenkonstante. Bislang sind keine Untersuchungen langlebiger transienter Zustände von EGFP veröffentlicht. Bei der Untersuchung unterschiedlich bromierter Perylenfarbstoffe konnten Ergebnisse bestätigt werden, denen zufolge der Bromierungsgrad keinen Einfluß auf die Intersystem-Crossing Ratenkonstante nimmt [51]. Weiterhin bestätigte sich, daß Fluoreszenzreduktionsmessungen nicht durch transiente Absorptionen gestört werden. In Zusammenarbeit mit Prof. Fromherz vom Max Planck Institut für Neuro- und Membranphysik in Martinsried wurde bei der Untersuchung sogenannter „molekularer Voltmeter“ – Cyaninfarbstoffe, die spannungsabhängige Fluoreszenzeigenschaften aufweisen - keine signifikant hohe Intersystem-Crossing Ratenkonstante festgestellt. Dies stand als Erklärung für die beobachtete Zelltoxizität in Frage. Gleichzeitig wurde teilweise eine sehr geringe Photostabilität beobachtet, die im letzten Teil der Arbeit genauer betrachtet wurde. Zuletzt wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Salbeck von der Universität Duisburg Farbstoffe untersucht, die als aktives Medium für den sogenannten Plastiklaser in Frage kommen, wobei sich in Bezug auf die Intersystem-Crossing Ratenkonstante das kleinste Molekül (Spiro-4Φ) als das geeignetste herausstellte.

Durch die Kombination der Absorptions- und der Fluoreszenzreduktions-Meßmethode steht nun eine Meßapparatur zur Verfügung, die Untersuchungen in beliebigen Lösungsmitteln in

sehr geringen Konzentrationen zuläßt. Es können wichtige molekulare Parameter angeregter Farbstoffe bestimmt werden, selbst wenn im Wellenlängenbereich des Meßlaserstrahls transiente Absorptionen vorliegen, wobei transiente Absorptionen nach wie vor gezielt mit der alten Meßmethode untersucht werden können.

9 Anhang

9.1 Übersichtstabelle aller ermittelten molekularen Parameter

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende molekulare Parameter bestimmt:

- Intersystem-Crossing Ratenkonstante k_{ST}
- Triplett-Lebensdauer τ_T
- k_q und k_{ST}^0 gemäß $k_{ST} = k_{ST}^0 + k_q \cdot c(O_2)$
- k_L und $\tau_{T,0}$ gemäß $\frac{1}{\tau_T} = \frac{1}{\tau_{T,0}} + k_L \cdot c(O_2)$

Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Werte beruhen auf der numerischen Auswertung von Ausbleich- und Fluoreszenzreduktionsmessungen (vgl. Kapitel 5.4.2.1).

Tabelle 9.1 Zusammenfassung aller ermittelten Daten für k_{ST} und τ_T (bzw. k_{12} und τ).

Farbstoff	Lösungsmittel		Meßmethode	Kapitel	k_{ST}	τ_T
					10^5 s^{-1}	μs
Rhodamin 6G	Ethylenglykol	luftgesättigt	Absorption	3.2.1	10.5	5.1
		luftgesättigt	Absorption	4.2	11.7	4.35
		stickstoffgesättigt	Absorption	4.3.3	7.6	145
		luftgesättigt	Absorption	4.5.2	11.7	4.6
		luftgesättigt	Fluoreszenz	5.4.2.1	9.8	4.3
		luftgesättigt	Absorption	5.4.2.1	11	4.8
		luftgesättigt	Absorption	5.4.2.2	10.3	5.8
		luftgesättigt	Fluoreszenz	5.4.2.2	9.7 ¹	5.5 ¹
	Ethanol	luftgesättigt	Absorption	3.2.4	35	0.39
		luftgesättigt	Absorption	4.2	35	0.4
		stickstoffgesättigt	Absorption	4.3.3	7.6	16
		luftgesättigt	Absorption	4.5.2	33	0.39
	Wasser	luftgesättigt	Absorption	4.2	12.4	1.9
		luftgesättigt	Absorption	4.5.2	12.4	1.9
		luftgesättigt	Fluoreszenz	6.1	9.7	1.9
	Acetonitril	luftgesättigt	Absorption	4.2	18.4	0.6
	Chloroform	luftgesättigt	Fluoreszenz	6.4	20	0.7
1,2-Dichlor-ethan	luftgesättigt	Fluoreszenz	6.2	24	0.59	
DR 25	Ethylenglykol	luftgesättigt	Absorption	3.2.5	8.5 ¹	4.3 ¹
SR 101	Ethylenglykol	luftgesättigt	Absorption	4.5.2	5.2	9
	Ethanol	luftgesättigt	Absorption	4.5.2	33.9	0.63
	Wasser	luftgesättigt	Absorption	4.5.2	4.5	4.8
JA 22	Ethylenglykol	luftgesättigt	Absorption	4.5.2	24	5.8
	Ethanol	luftgesättigt	Absorption	4.5.2	22.6	1.1
JA 26	Ethylenglykol	luftgesättigt	Absorption	4.5.2	4.5	4.4
	Ethanol	luftgesättigt	Absorption	4.5.2	10	0.55

(Weiterführung von Tabelle 9.1)

Farbstoff	Lösungsmittel		Meßmethode	Kapitel	k_{ST}	τ_T
					10^5 s^{-1}	μs
Stb 1	1,2-Dichlor-ethan	luftgesättigt	Fluoreszenz	6.2	82	0.23
Stb 2	1,2-Dichlor-ethan	luftgesättigt	Fluoreszenz	6.2	86	0.26
Stb 3	1,2-Dichlor-ethan	luftgesättigt	Fluoreszenz	6.2	88	0.24
EGFP	Tris Puffer	stickstoffgesättigt	Fluoreszenz	6.3	2	33
		luftgesättigt	Fluoreszenz	6.3	2.4	23
		sauerstoffgesättigt	Fluoreszenz	6.3	> 2	< 10
Rh110 verestert	Wasser	luftgesättigt	Fluoreszenz	6.3	13.9	2.1
Rh 160	Chloroform	luftgesättigt	Fluoreszenz	6.4	40	1.2
DI-4-ANEPBS	Chloroform	luftgesättigt	Fluoreszenz	6.4	20	0.73
BNBIQ	Chloroform	luftgesättigt	Fluoreszenz	6.4	40	0.4
Annine V	Chloroform	luftgesättigt	Fluoreszenz	6.4	30	0.45
Spiro-4 Φ	Dichlor-methan	luftgesättigt	Fluoreszenz	6.5	k_{12} (für τ_1) 4.7	τ_1 : 1.4
						τ_2 : 4–6
Spiro-6 Φ	Dichlor-methan	luftgesättigt	Fluoreszenz	6.5	k_{12} (für τ_1) 18	τ_1 : 1
						τ_2 : 1.3-1.9
4-Spiro ²	Dichlor-methan	luftgesättigt	Fluoreszenz	6.5	k_{12} (für τ_1) 28	τ_1 : 1
						τ_2 : 1.9-2.3
						τ_3 : 10

¹ – Mittelwert

Tabelle 9.2 Zusammenfassung der in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt ermittelten Daten für Rhodamin 6G.

Lösungsmittel	Sauerstoffgehalt des Gasgemisches %	Sauerstoffkonzentration im Lösungsmittel [31] mmol/l	k_{ST} 10^5 s^{-1}	τ_T μs
Ethylenglykol	0	0	8.1	90
	20	0.12	9.3	5
	40	0.23	10.7	2.8
	60	0.35	13.2	1.7
	80	0.46	16.1	1.3
	100	0.58	19.2	1
Ethanol	0	0	12	1.5
	20	2	32.5	0.35
	40	4	42.4	0.23
	60	6.1	46.7	0.2
	80	8.1	60.8	0.15
	100	10.1	87.7	0.12
Acetonitril	0	0	21.8	0.77
	20	1.8	22.5	0.56
	40	3.6	27	0.4
	60	5.5	26.2	0.3
	80	7.3	30.5	0.26
Wasser	0	0	7.3	18.8
	20	0.28	9.7	1.86
	40	0.56	20.2	0.65
	60	0.83	23.6	0.58
	80	1.11	29.6	0.42
	100	1.39	37	0.33

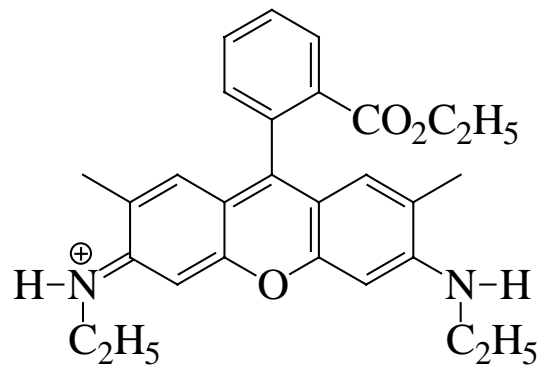
Tabelle 9.3 Zusammenfassung der ermittelten Daten für k_q , k_L , τ_T und $\tau_{T,0}$ für Rhodamin 6G.

Lösungsmittel	$k_{ST} = k_{ST}^0 + k_q \cdot c(O_2)$		$\frac{1}{\tau_T} = \frac{1}{\tau_{T,0}} + k_L \cdot c(O_2)$	
	$k_{ST}^0, 10^5 s^{-1}$	$k_q, 10^8 l/(mol \cdot s)$	$\tau_{T,0}, \mu s$	$k_L, 10^8 l/(mol \cdot s)$
Ethylenglykol	8.8	23.8	465	16.7
Wasser	6.1	21.8	17	21.5
Acetonitril	21.4	1.1	0.9	3.7
Ethanol	13.7	6.6	1	7.4

Tabelle 9.4 Zusammenfassung der ermittelten Daten für k_q , k_L , τ_T und $\tau_{T,0}$ für das Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)

$k_{ST} = k_{ST}^0 + k_q \cdot c(O_2)$		$\frac{1}{\tau_T} = \frac{1}{\tau_{T,0}} + k_L \cdot c(O_2)$	
$k_{ST}^0, 10^5 s^{-1}$	$k_q, 10^8 l/(mol \cdot s)$	$\tau_{T,0}, \mu s$	$k_L, 10^8 l/(mol \cdot s)$
2	1.4	33	0.4

9.2 Absorptions- und Fluoreszenzspektren der verwendeten Farbstoffe



Rhodamin 6G

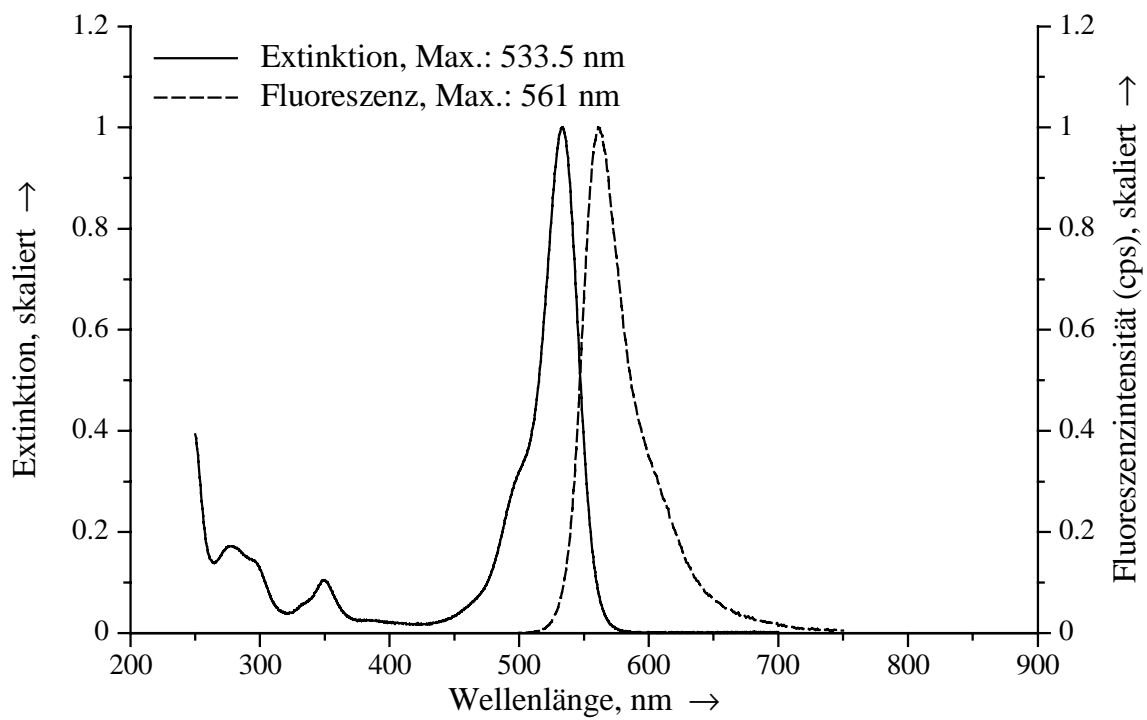
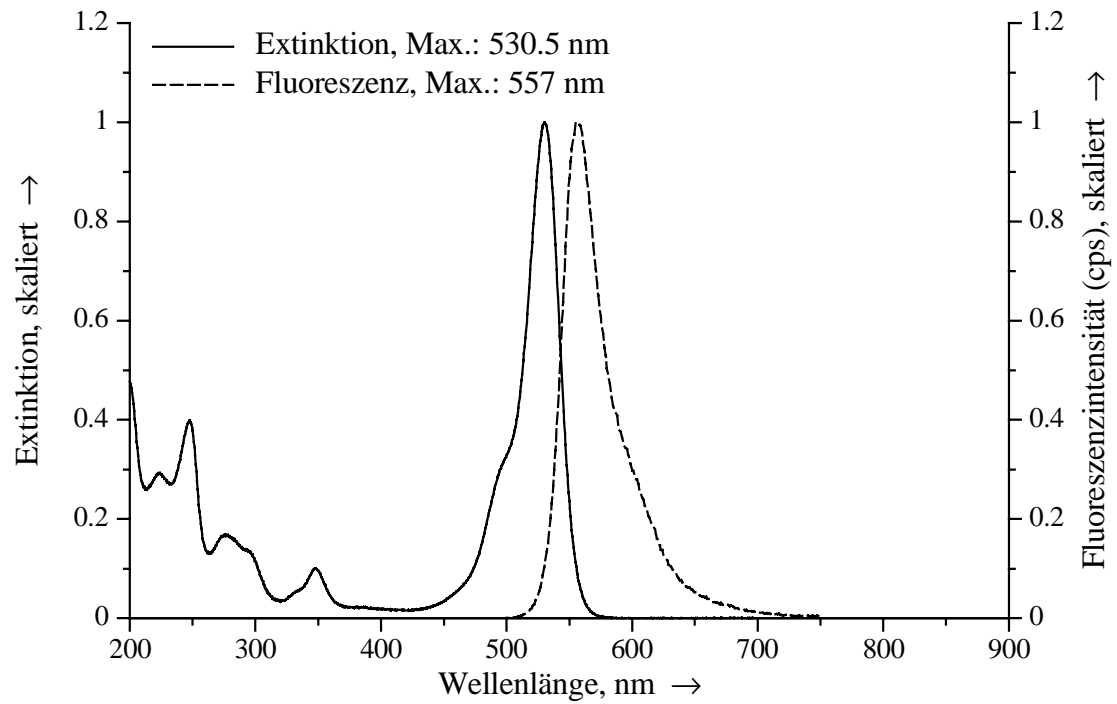
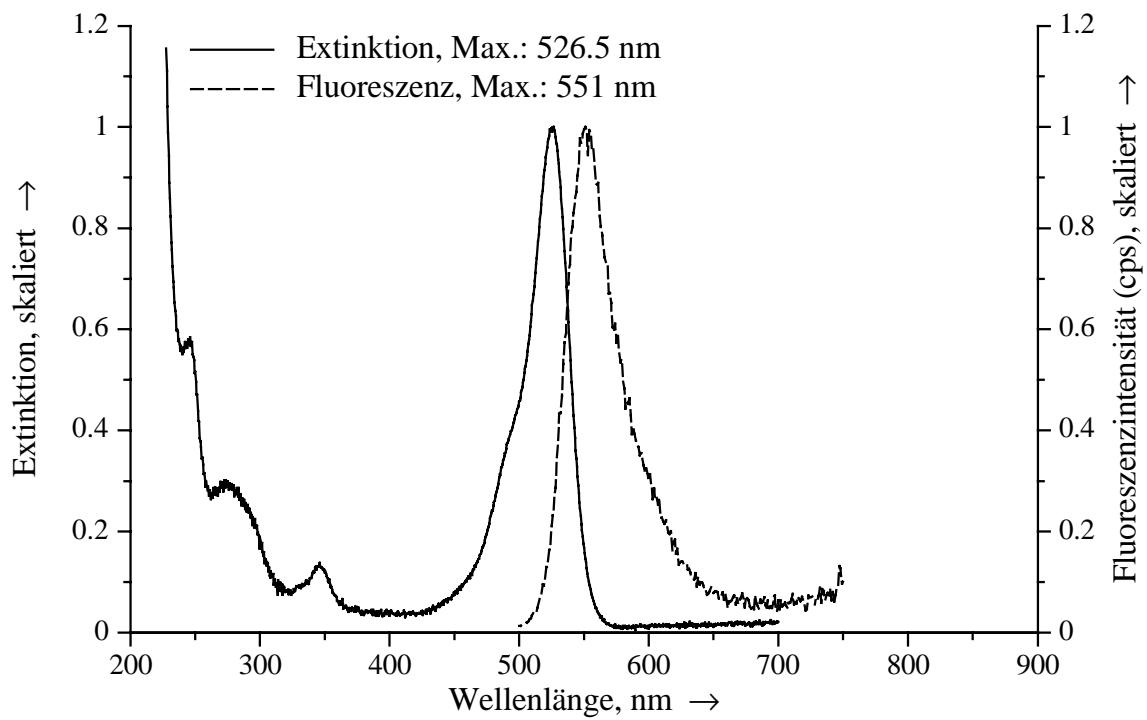


Abbildung 9.1 Rhodamin 6G in Ethylenglykol.

Abbildung 9.2 *Rhodamin 6G in Ethanol.*Abbildung 9.3 *Rhodamin 6G in Wasser.*

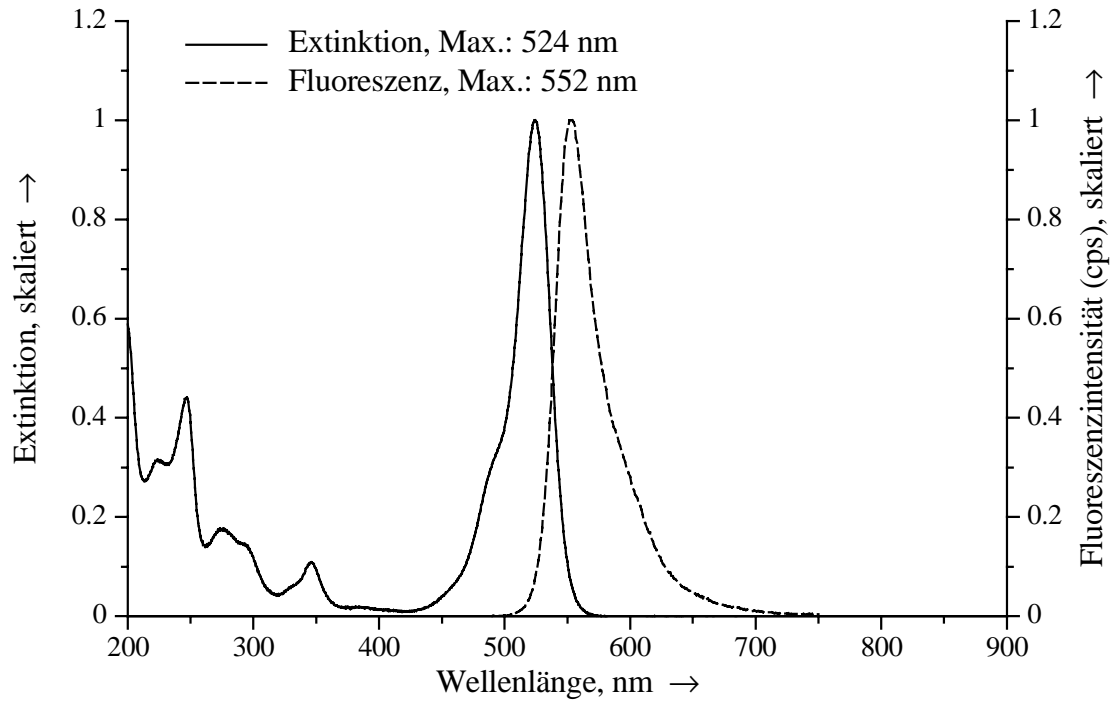


Abbildung 9.4 Rhodamin 6G in Acetonitril.

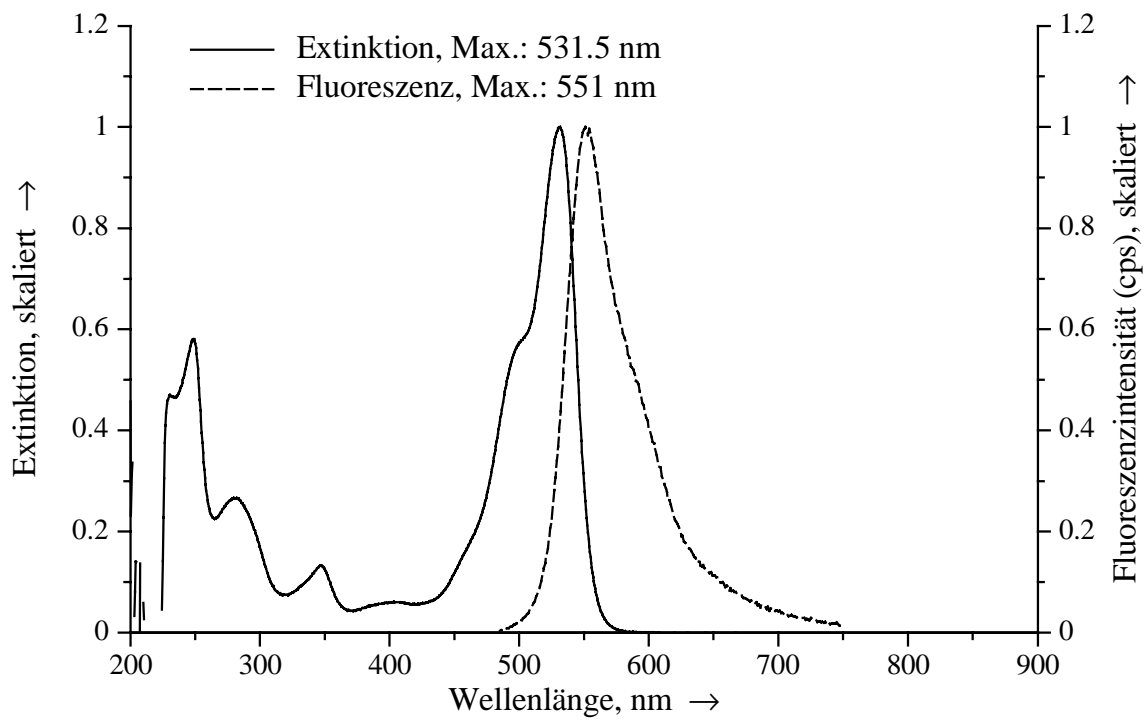


Abbildung 9.5 Rhodamin 6G in Chloroform.

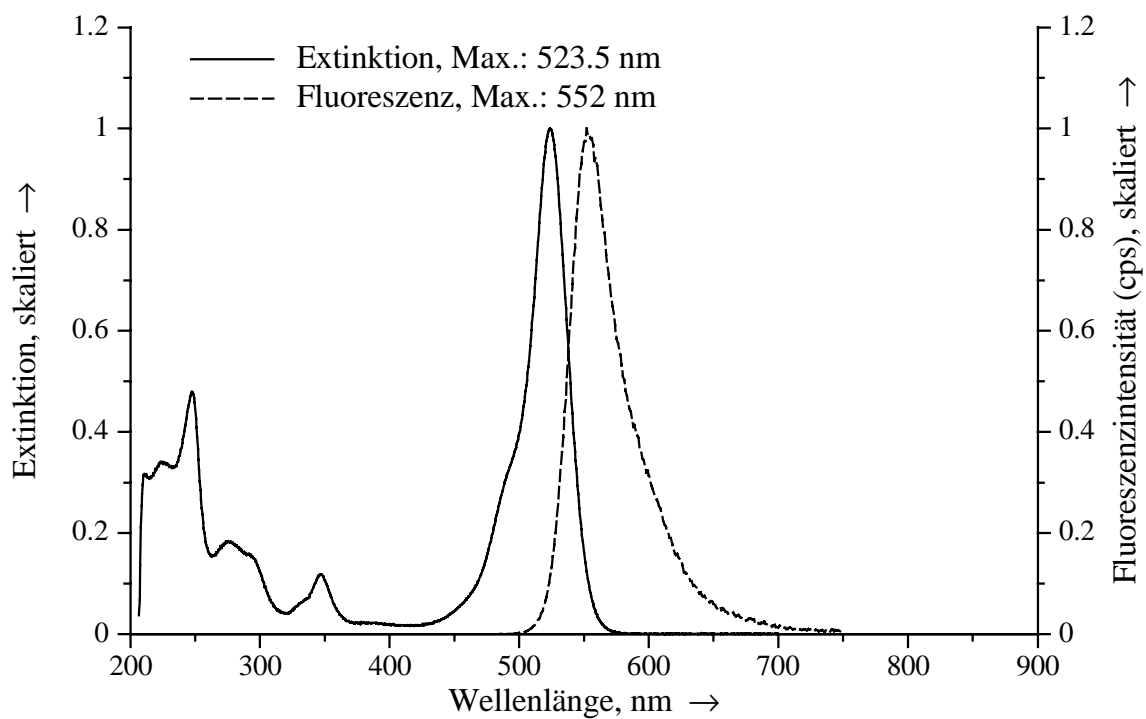


Abbildung 9.6 *Rhodamin 6G in 1,2-Dichlorethan.*

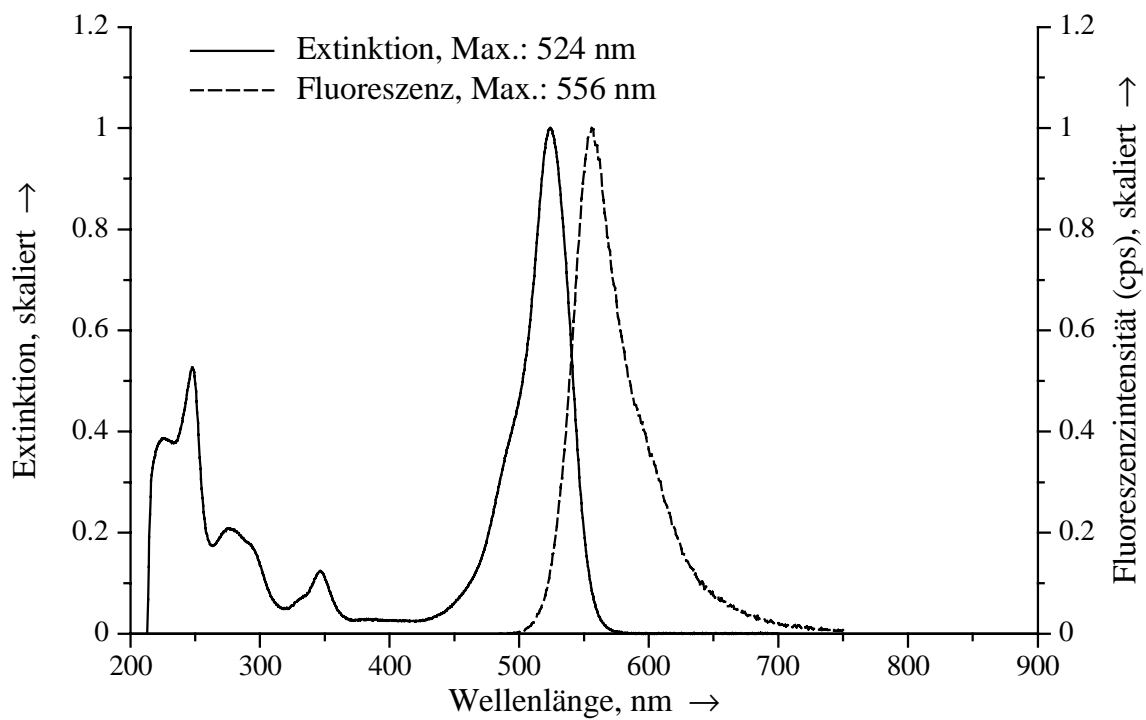
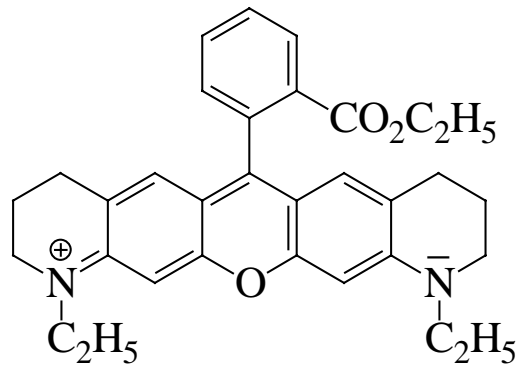


Abbildung 9.7 *Rhodamin 6G in Dichlormethan.*



DR 25

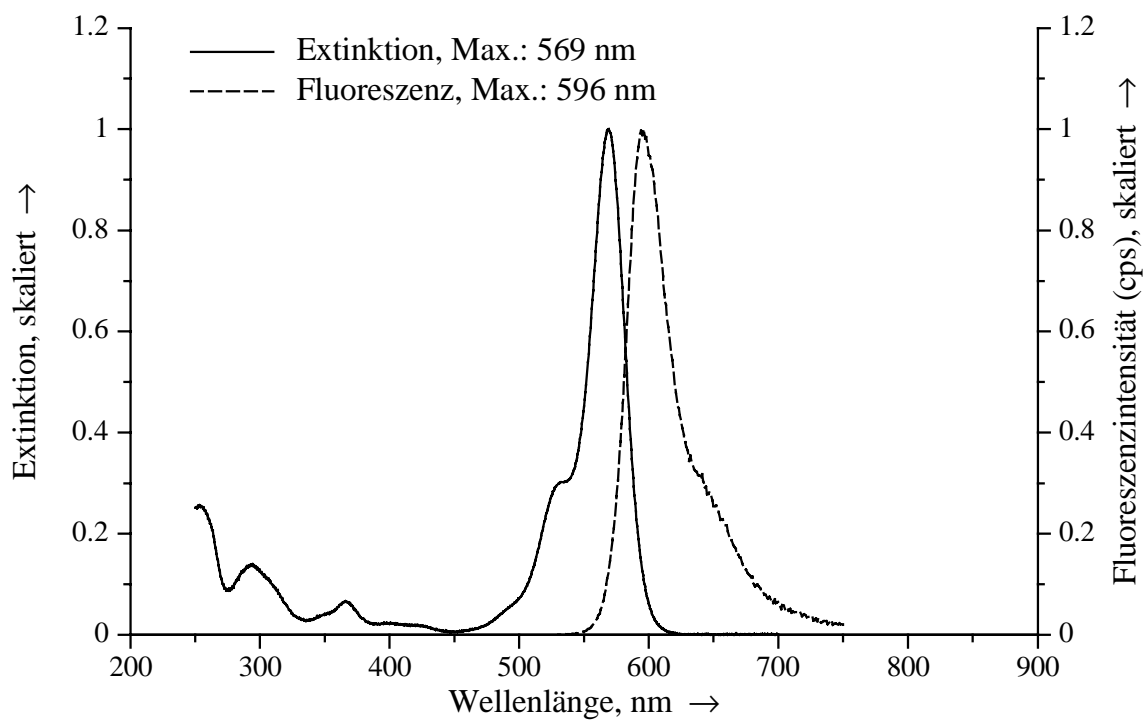
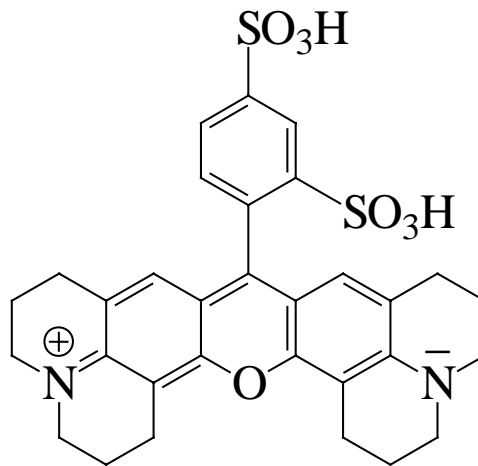


Abbildung 9.8 DR 25 in Ethylenglykol.



Sulforhodamin 101

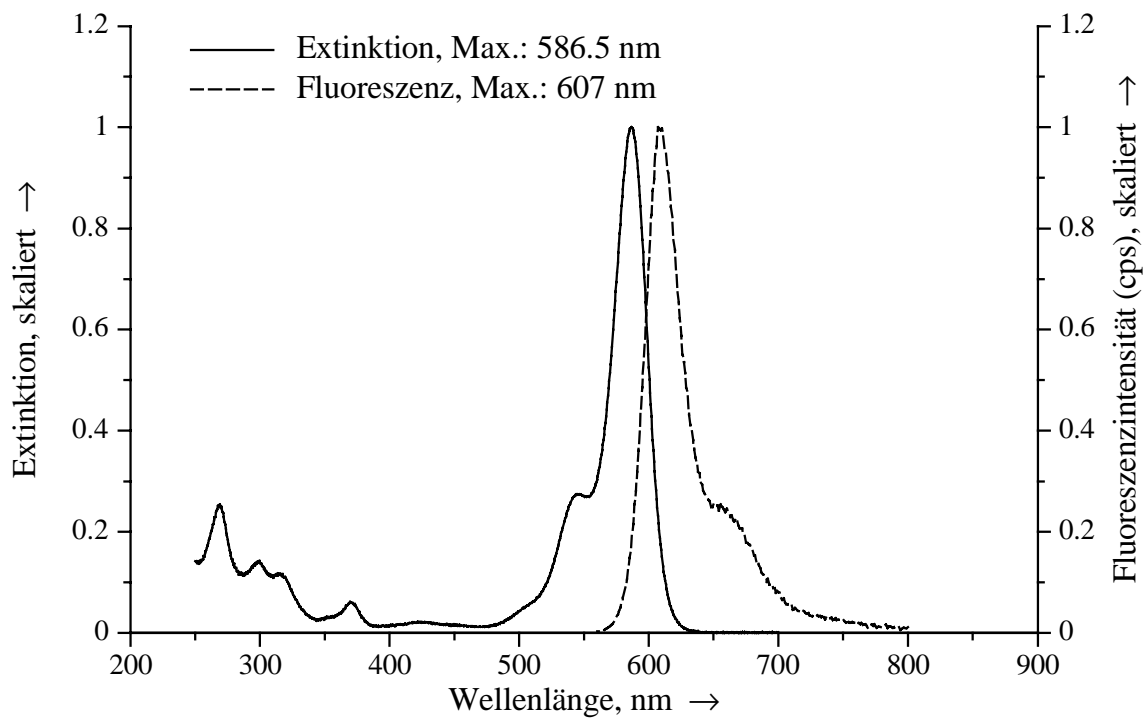


Abbildung 9.9 Sulforhodamin 101 in Ethylenglykol (angesäuert mit Trifluoressigsäure).

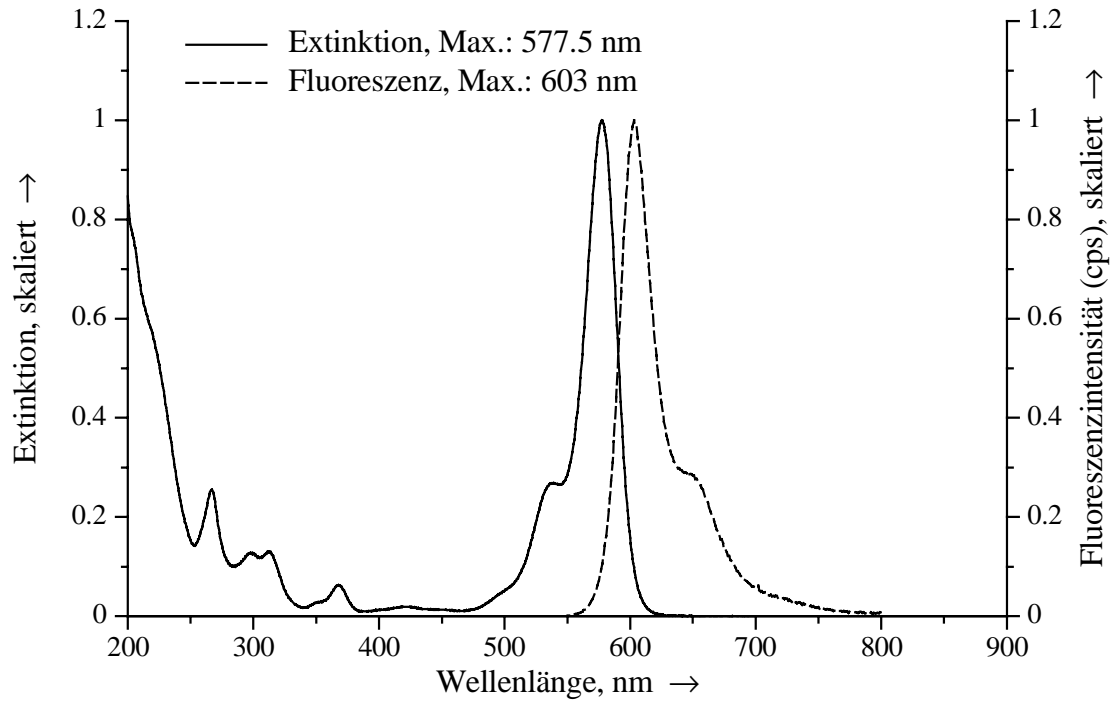


Abbildung 9.10 Sulforhodamin 101 in Ethanol (angesäuert mit Trifluoressigsäure).

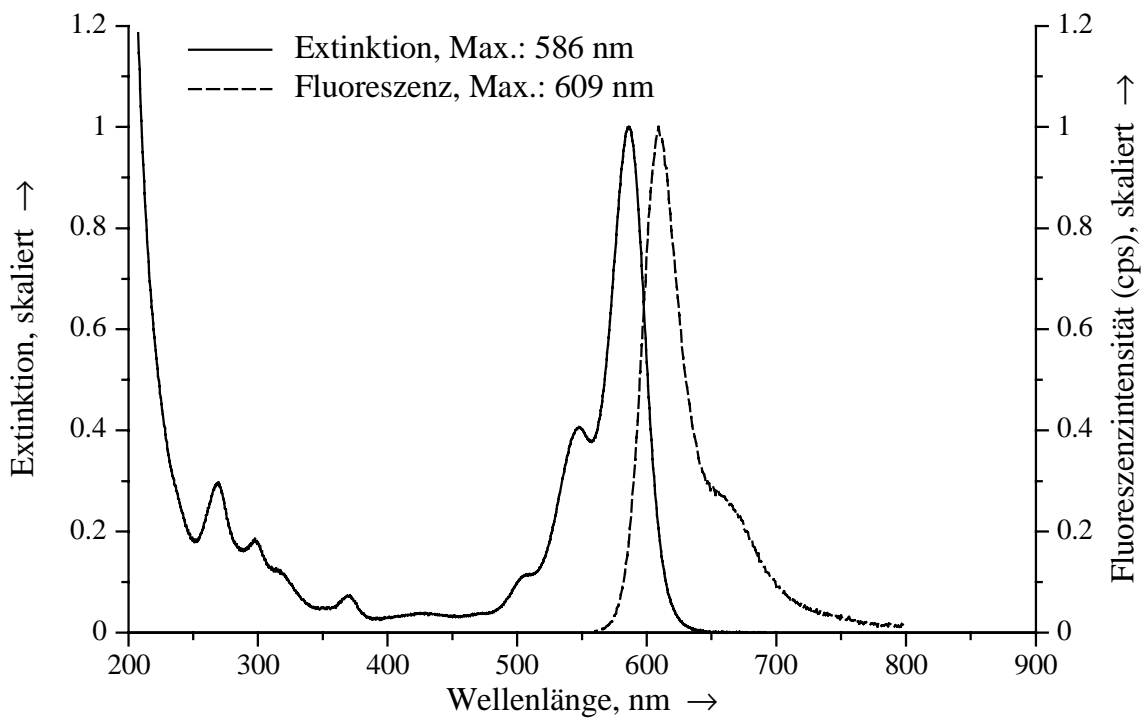
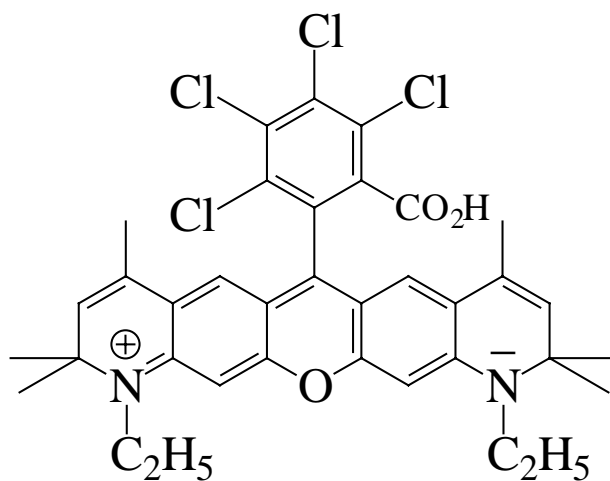


Abbildung 9.11 Sulforhodamin 101 in Wasser (angesäuert mit Trifluoressigsäure).



JA 22

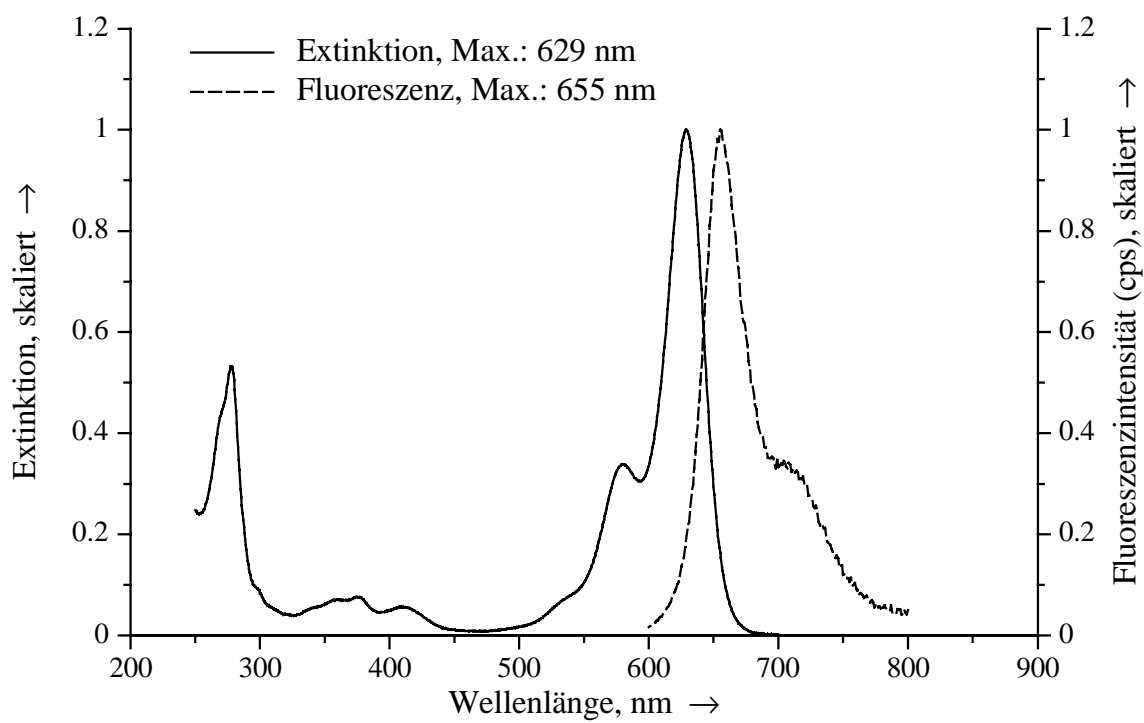


Abbildung 9.12 JA 22 in Ethylenglykol (angesäuert mit Trifluoressigsäure).

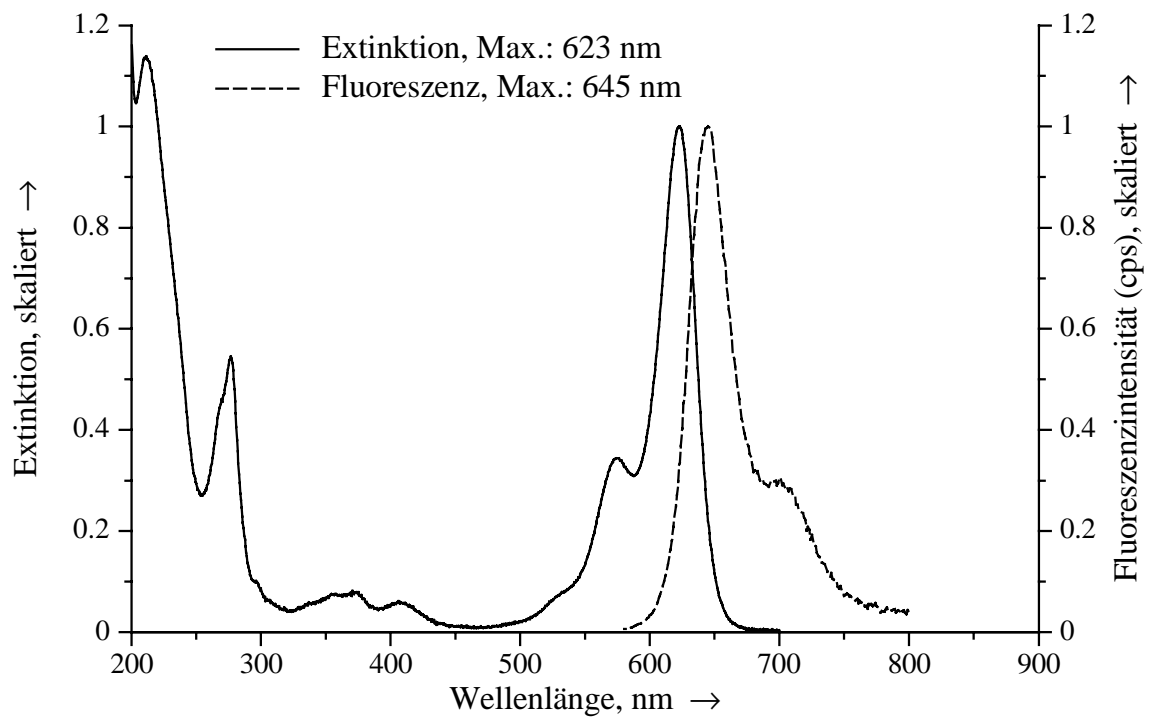
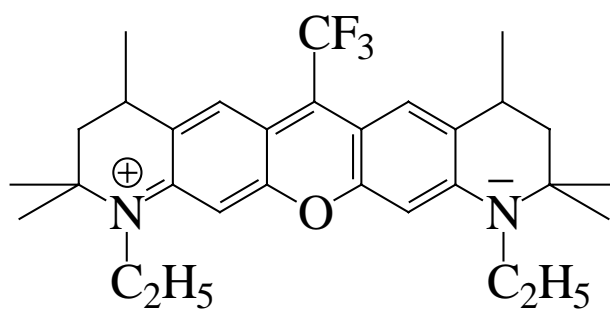


Abbildung 9.13 JA 22 in Ethanol (angesäuert mit Trifluoressigsäure).



JA 26

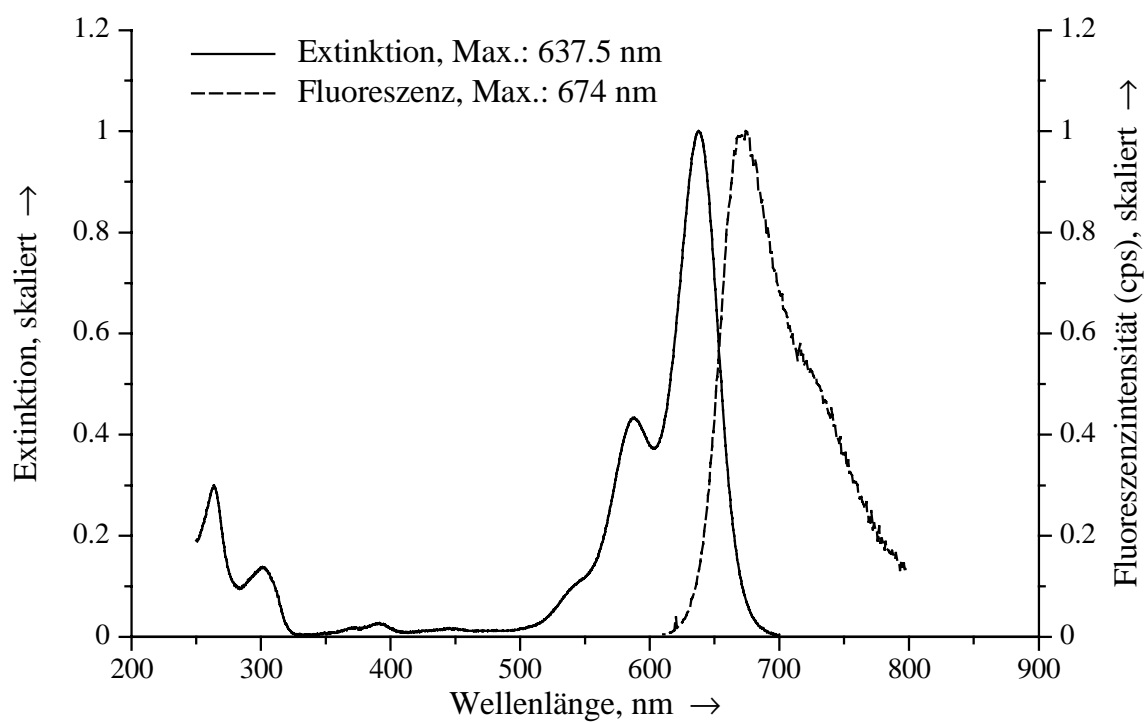


Abbildung 9.14 JA 26 in Ethylenglykol (angesäuert mit Trifluoressigsäure).

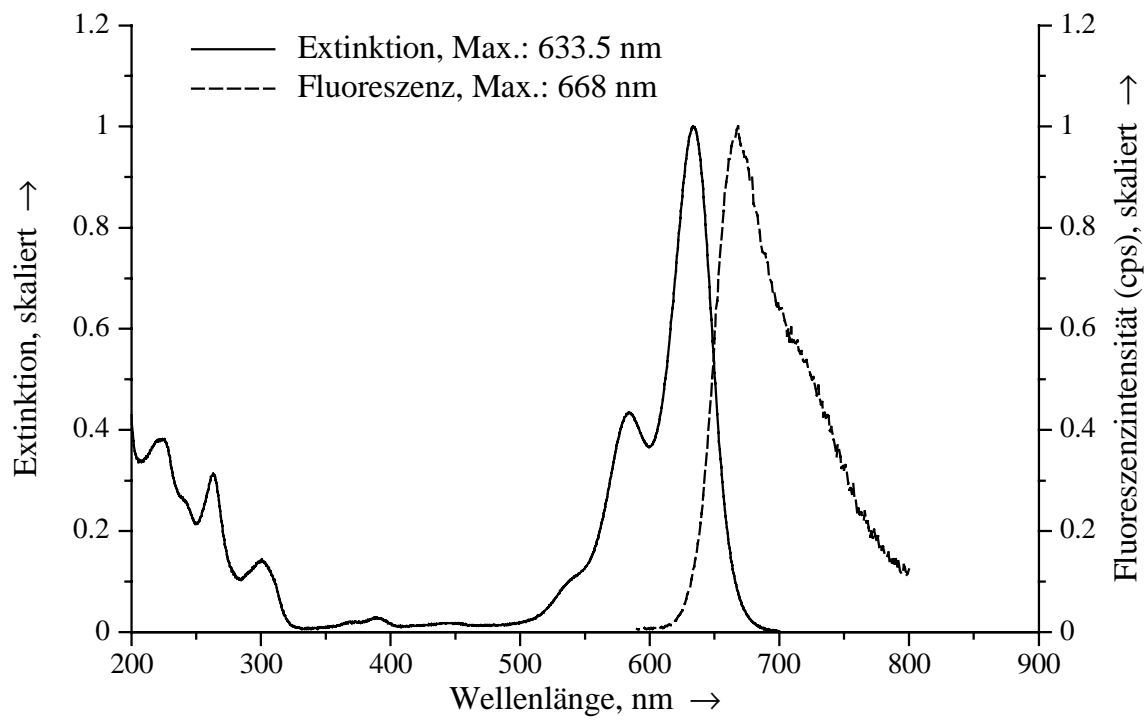
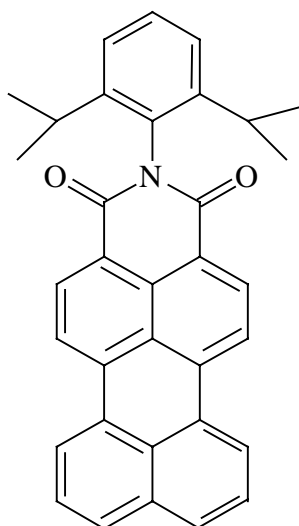


Abbildung 9.15 JA 26 in Ethanol (angesäuert mit Trifluoressigsäure).



Stb 1

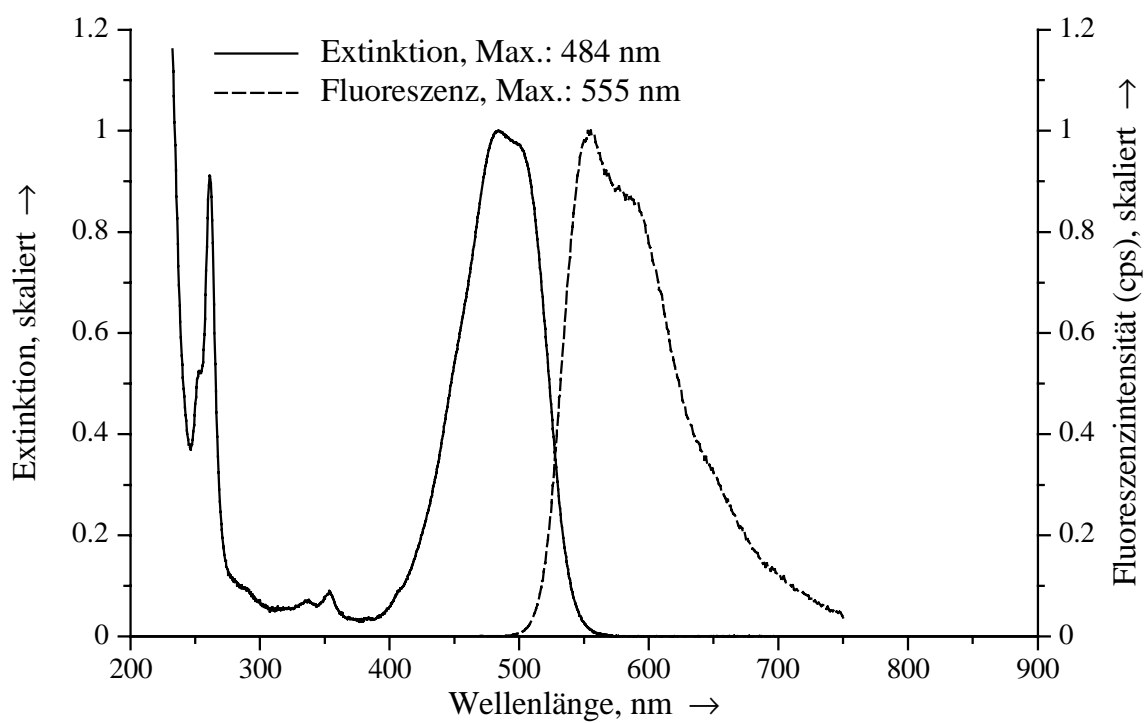


Abbildung 9.16 Stb1 in Acetonitril.

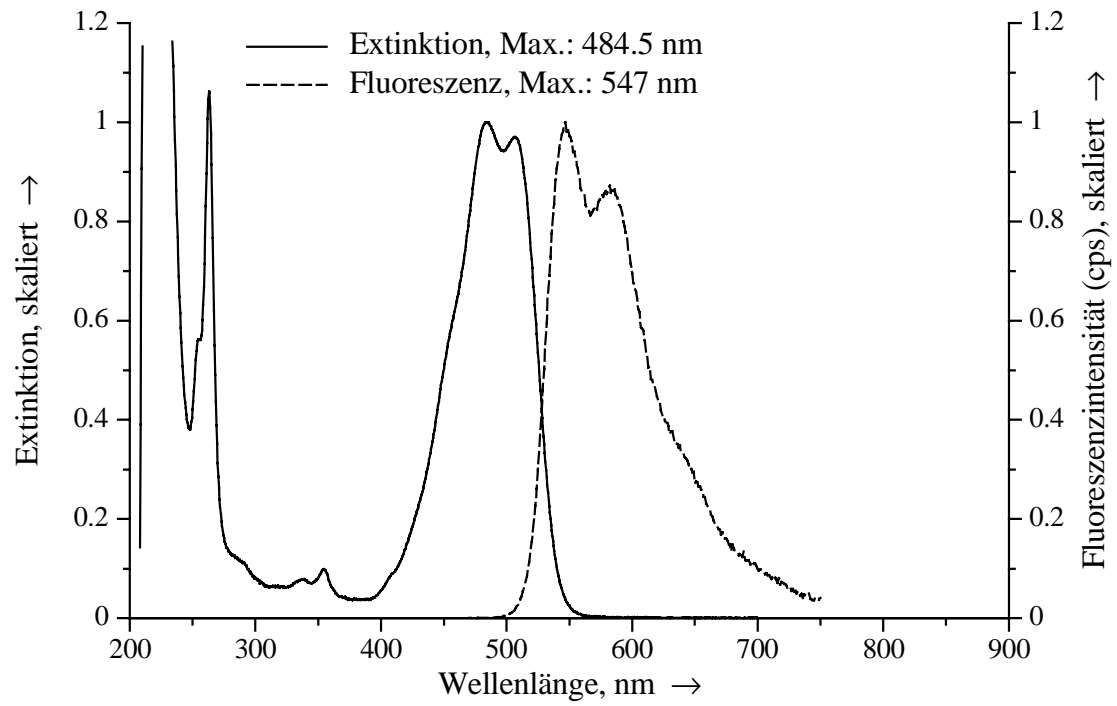
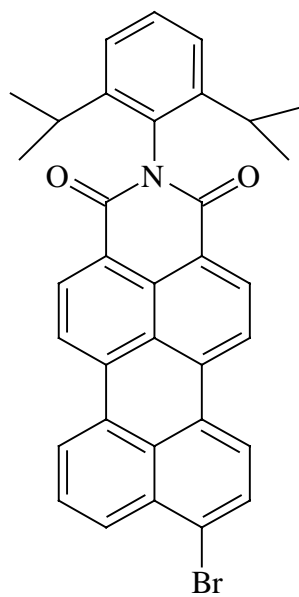


Abbildung 9.17 *Stb1* in 1,2-Dichlorethan.



Stb 2

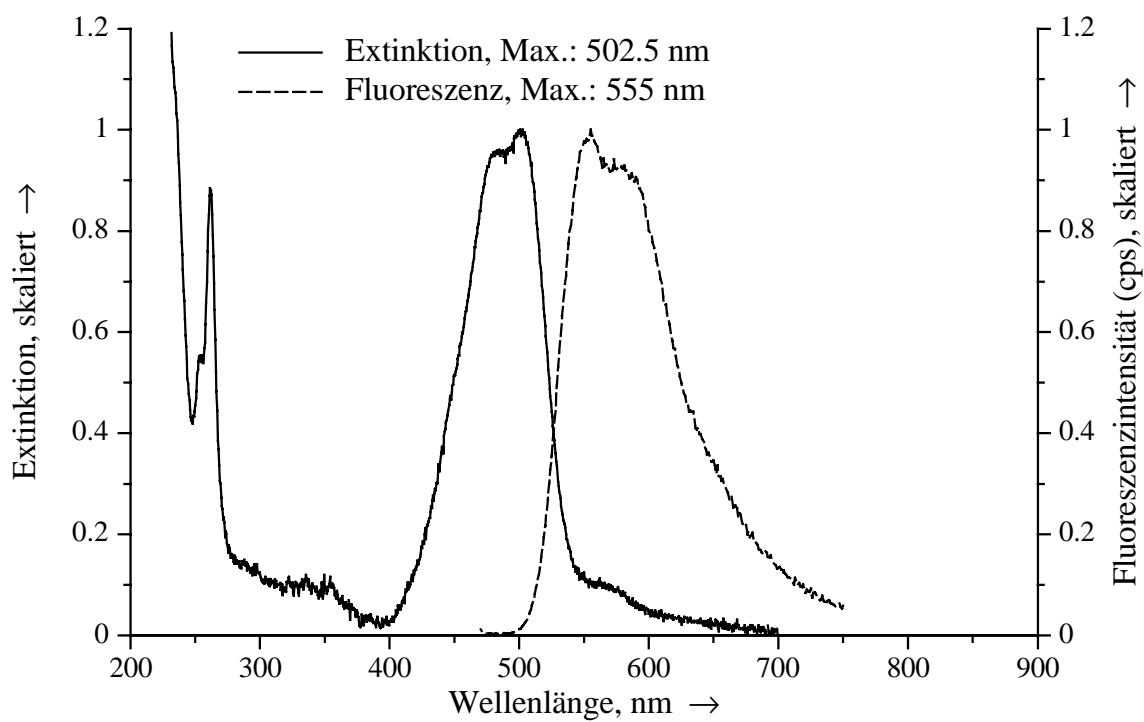


Abbildung 9.18 Stb2 in Acetonitril.

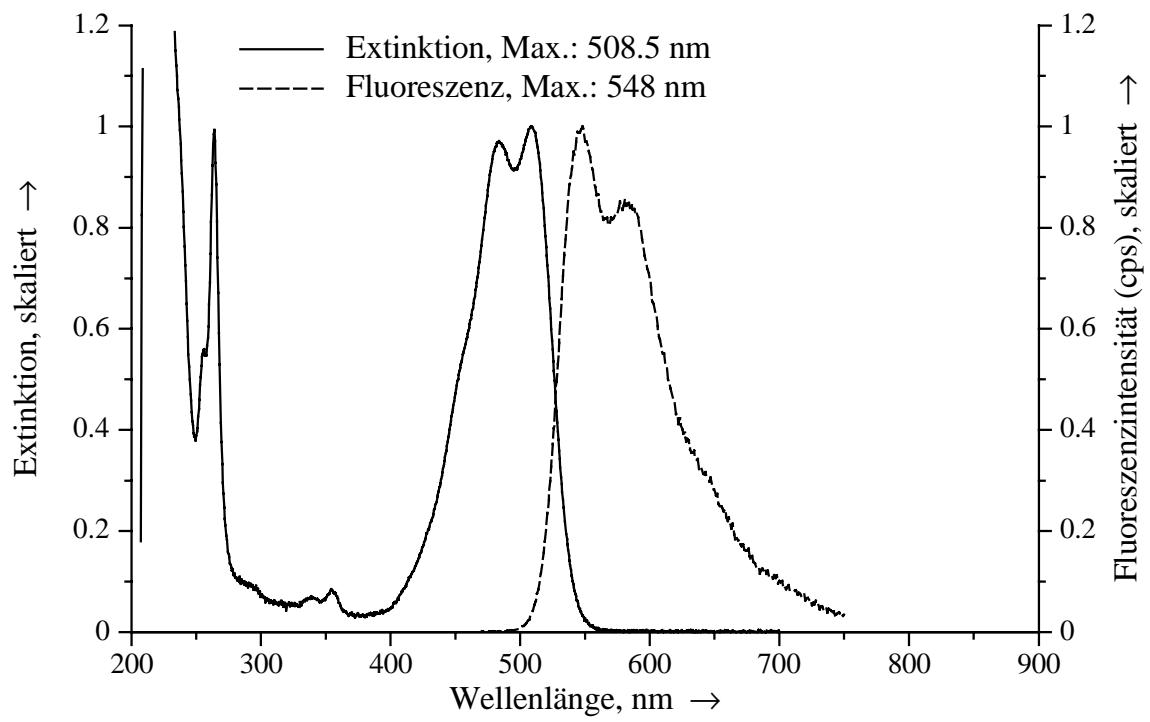
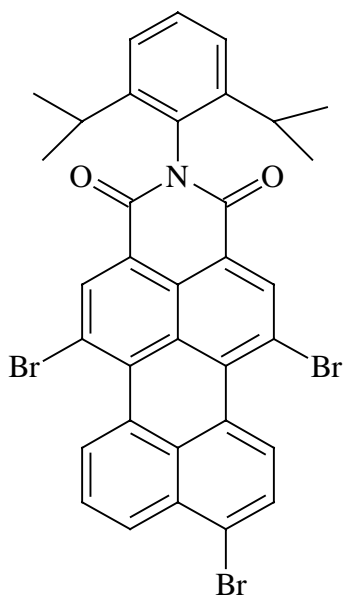


Abbildung 9.19 Stb2 in 1,2-Dichlorethan.



Stb 3

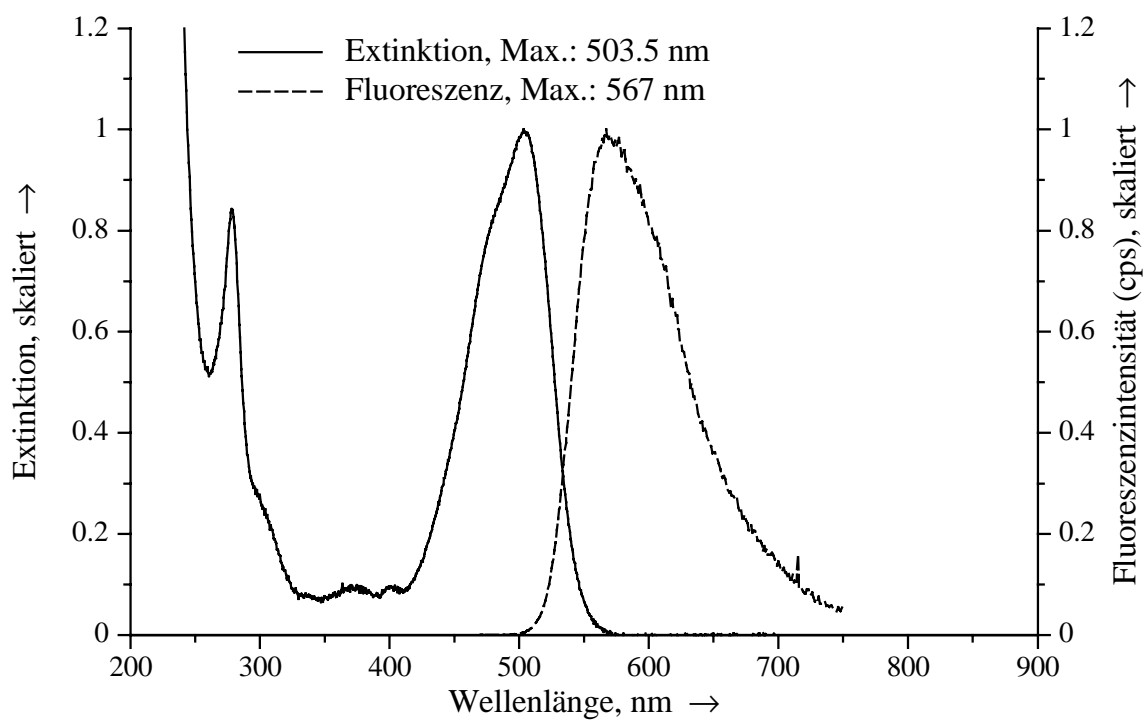


Abbildung 9.20 Stb3 in Acetonitril.

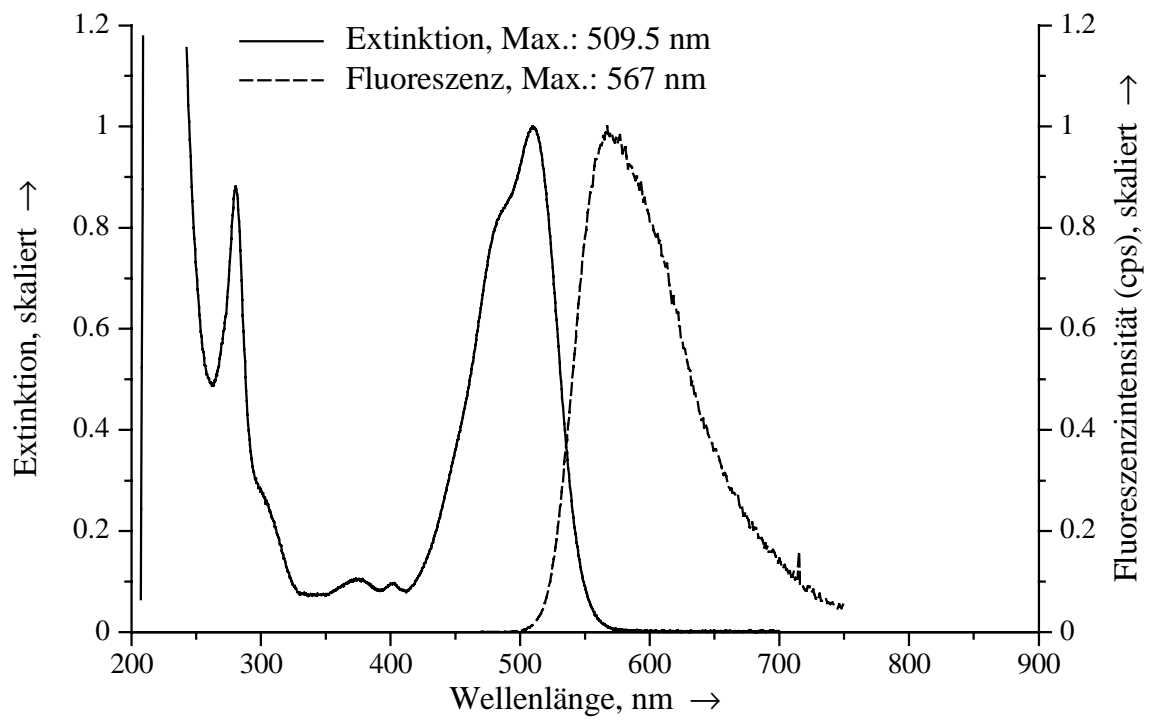
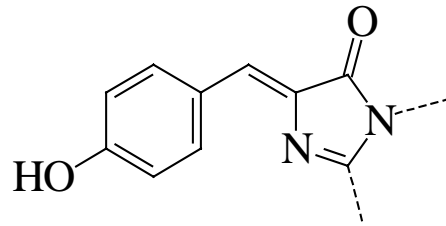


Abbildung 9.21 Stb3 in 1,2-Dichlorethan.



Chromophor des Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)

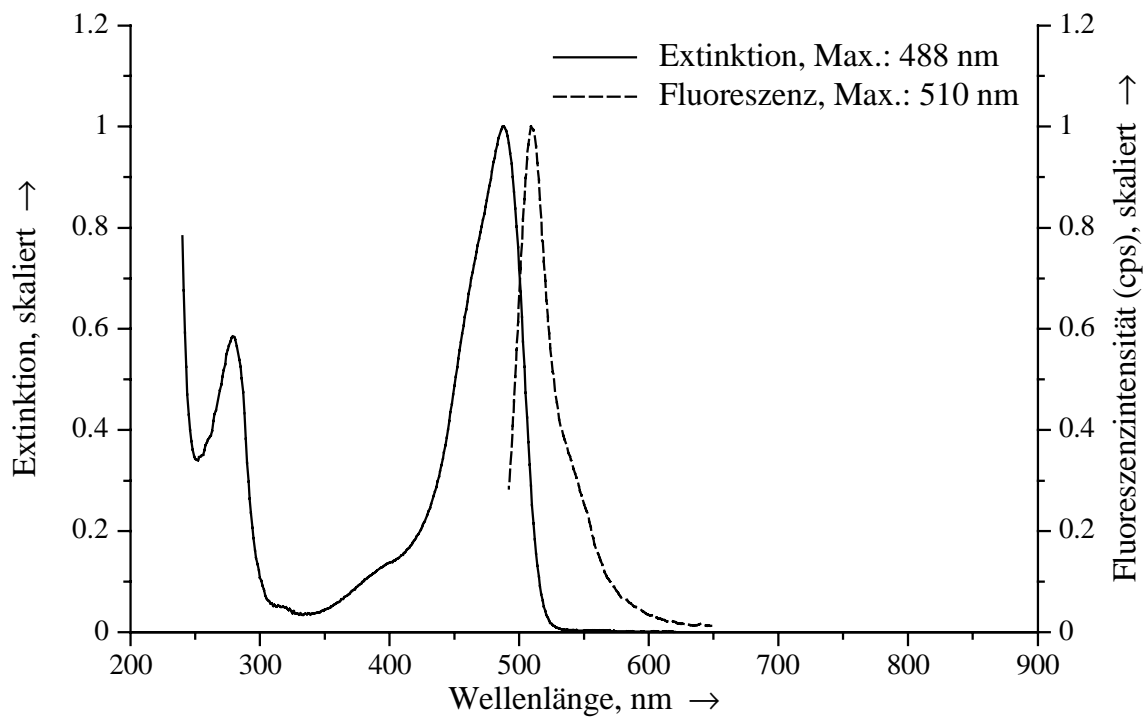
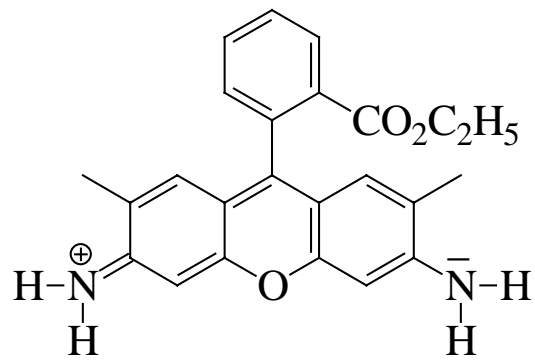


Abbildung 9.22 EGFP in Tris-Puffer (10mM, pH 8).



Rhodamin 110 (veresterte Form)

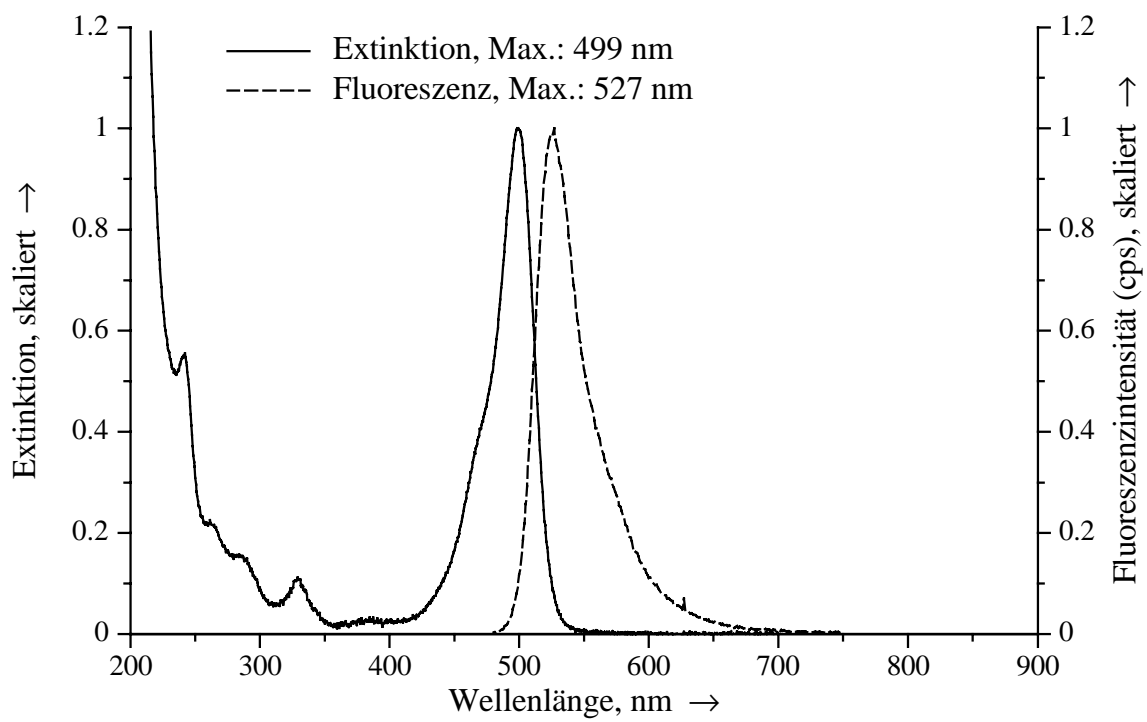
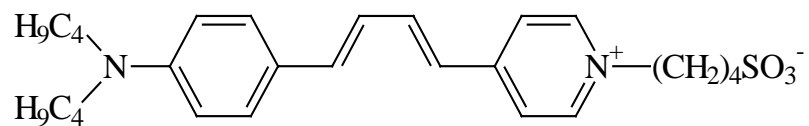


Abbildung 9.23 Rhodamin 110 (veresterte Form) in Wasser.



Rh 160

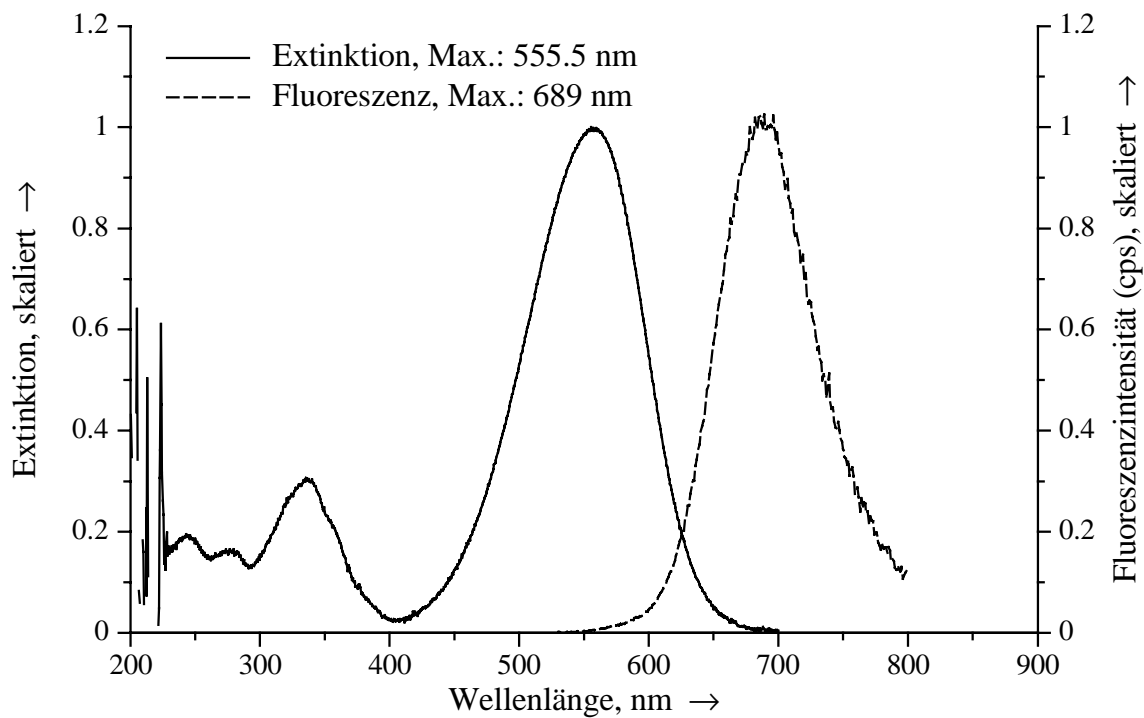
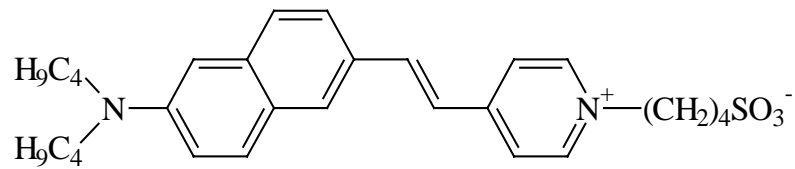


Abbildung 9.24 Rh 160 in Chloroform.



DI-4-ANEPBS

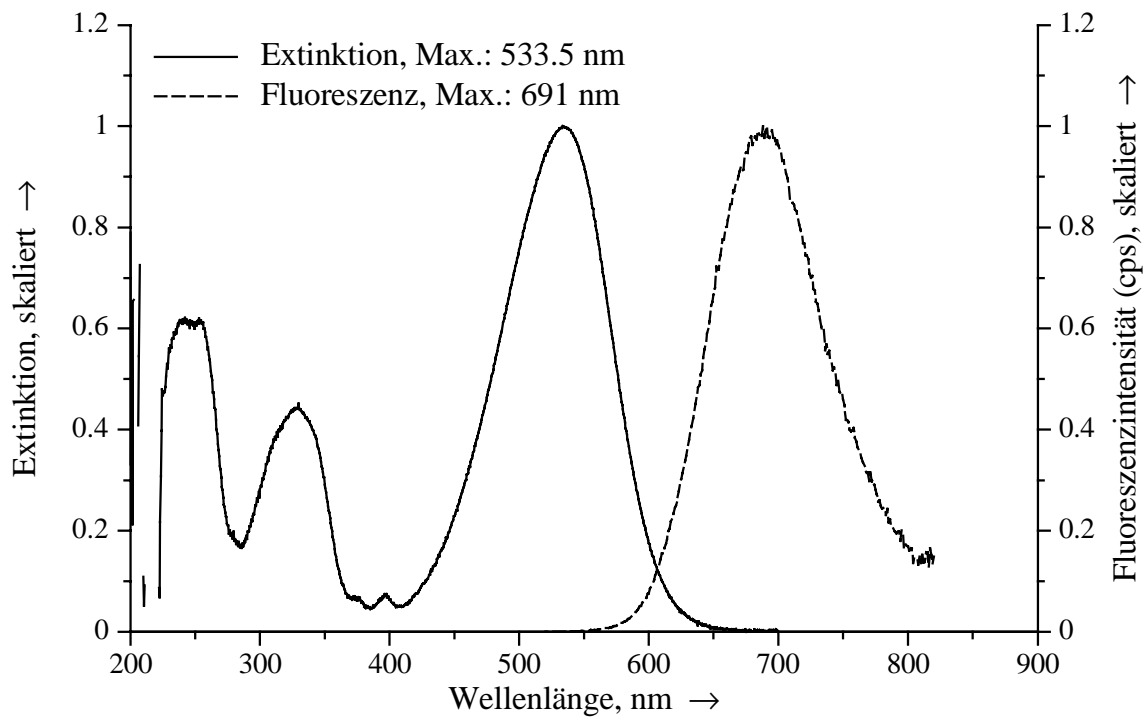
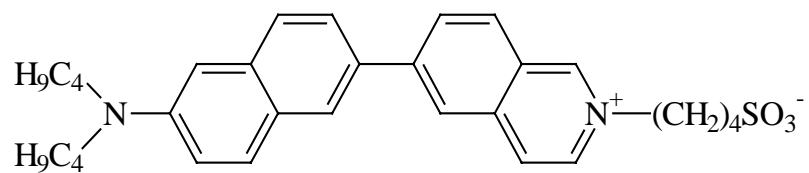


Abbildung 9.25 DI-4 ANEPBS in Chloroform.



BNBIQ

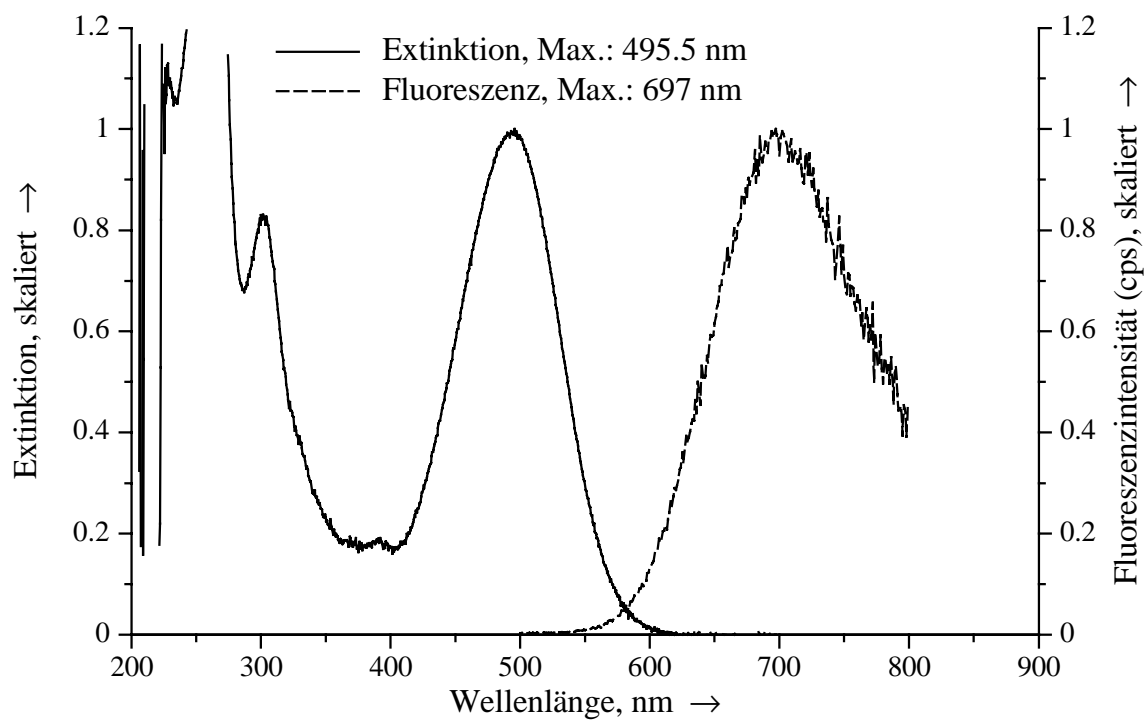
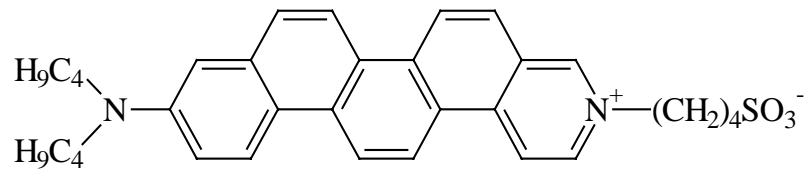


Abbildung 9.26 BNBIQ in Chloroform.



Annine V

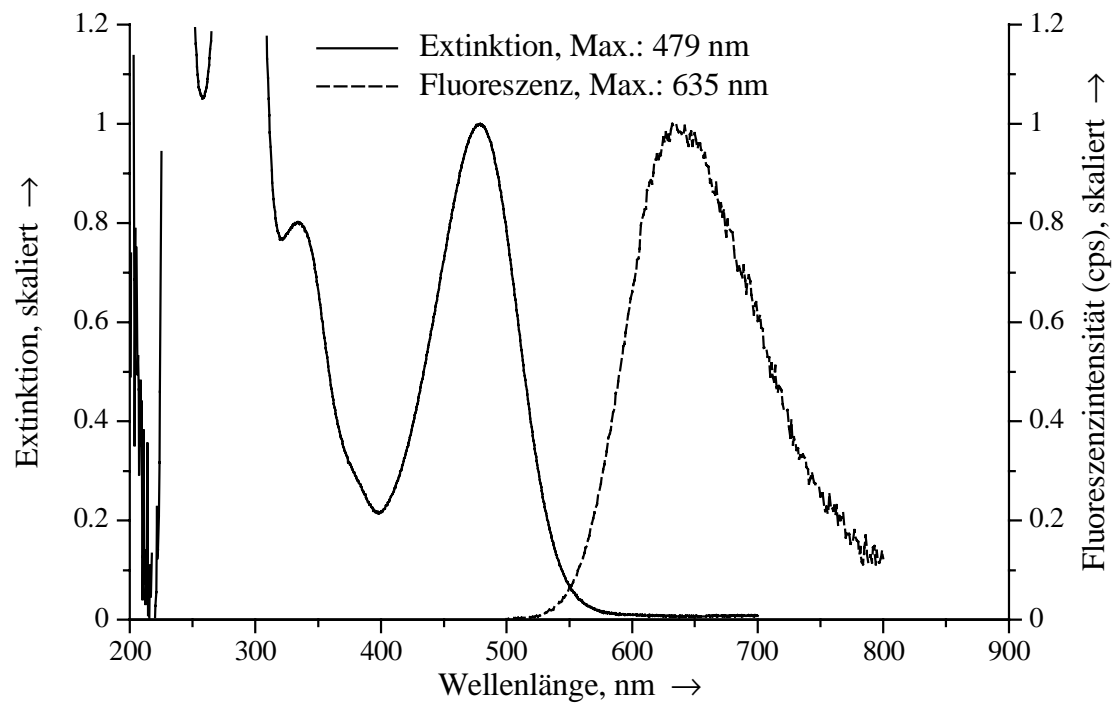
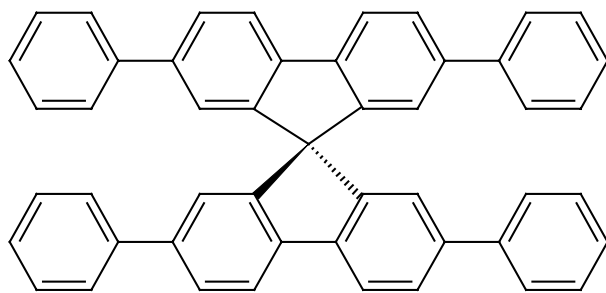


Abbildung 9.27 Annine V in Chloroform.



Spiro-4Φ

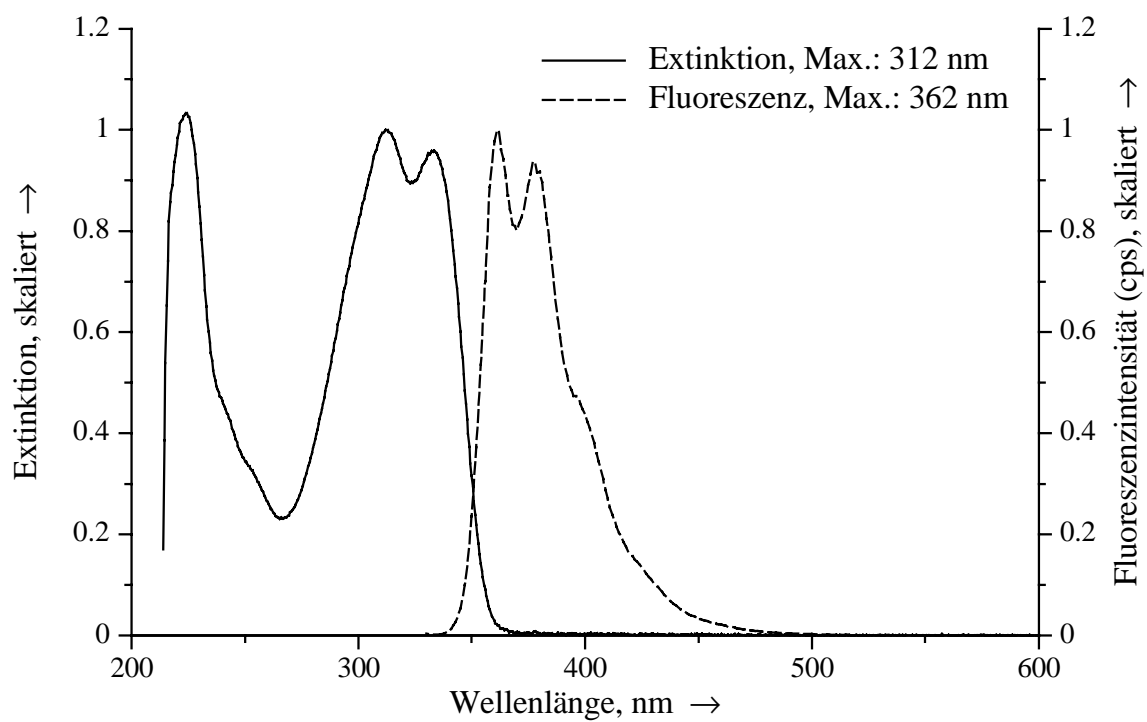
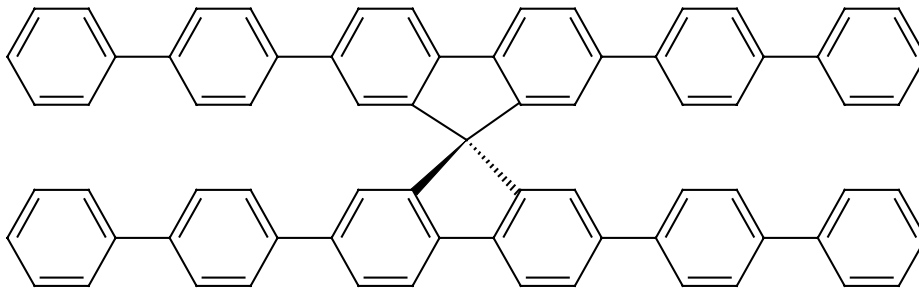


Abbildung 9.28 Spiro-4Φ in Dichlormethan.



Spiro-6Φ

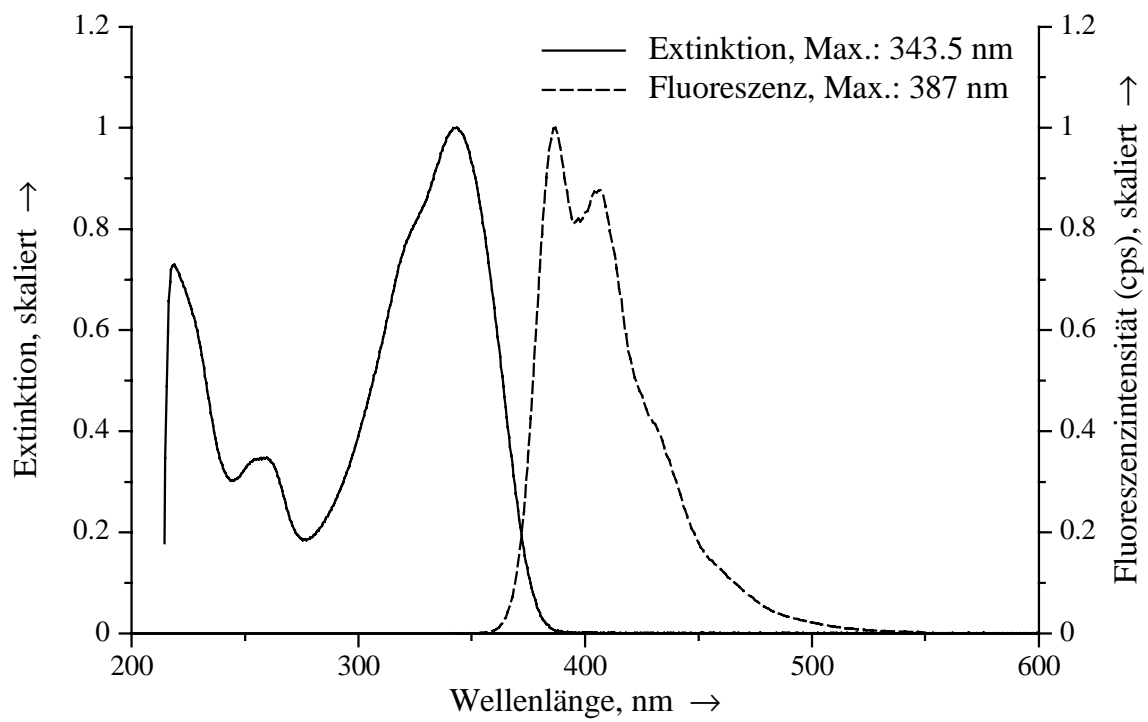
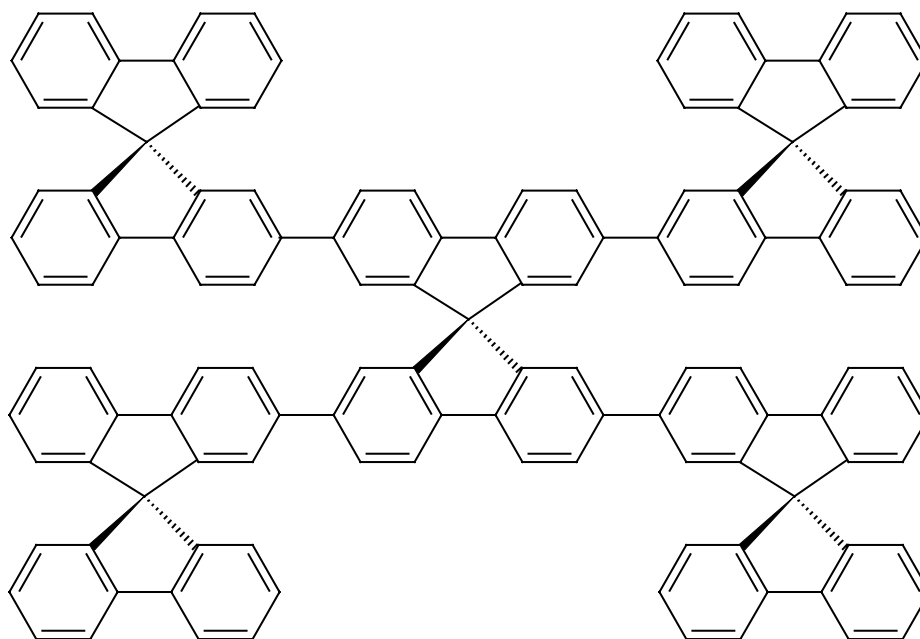
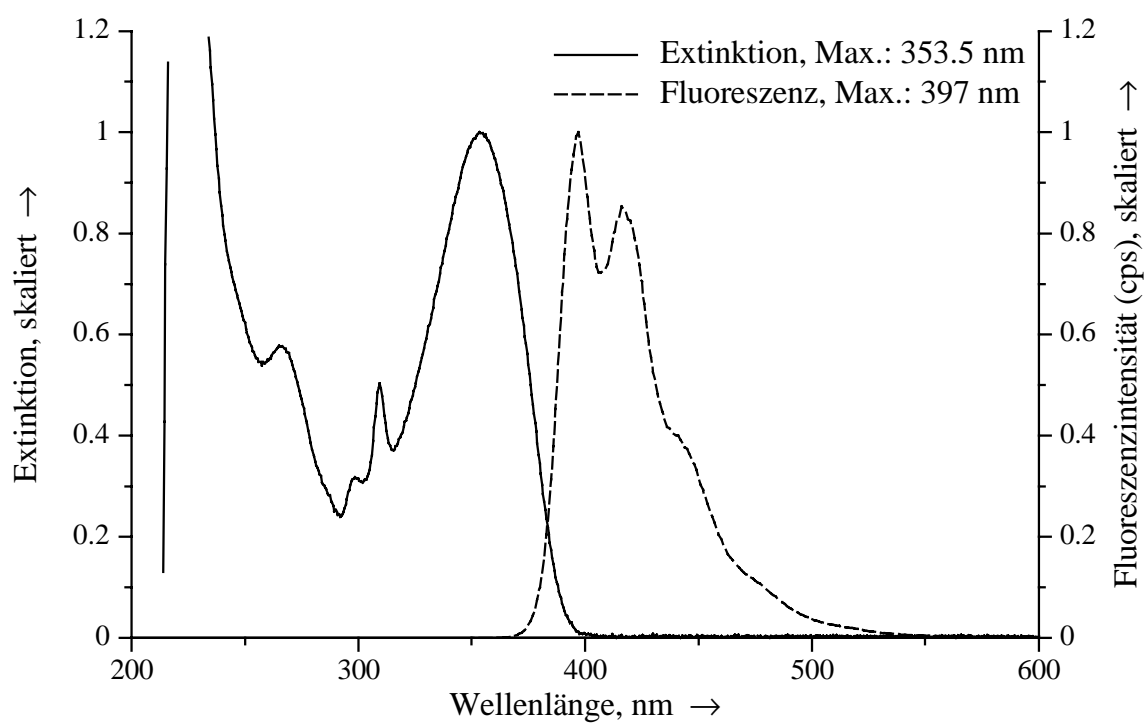


Abbildung 9.29 Spiro-6Φ in Dichlormethan.

4-Spiro²Abbildung 9.30 4-Spiro² in Dichlormethan.

9.3 Zeitabhängige Absorptionsdaten aus Kapitel 7

Im folgenden werden die aus den im Kapitel 7 dargestellten zeitabhängigen Absorptionsspektren gewonnenen Daten und die daraus berechneten Werte aufgeführt. Bei allen Experimenten wurden die Farbstofflösungen bei einer Wellenlänge von 488 nm mit einer Leistung P von 1.5 Watt bestrahlt. Die Schichtdicke der Küvette betrug 1 cm.

Folgende Parameter werden verwendet:

t	- Gesamtbestrahlungszeit
dt	- Zeitintervall zwischen zwei Absorptionsmessungen, $t_{i+1}-t_i$
E	- Extinktion an der Meßwellenlänge bei einer Schichtdicke d von 1 cm
d	- Schichtdicke in cm
P	- Laserleistung
A	- Aus E berechnete Absorption
A_{Mittel}	- Mittelwert aus zwei aufeinanderfolgenden Absorptionswerten
	$\frac{A_i + A_{i+1}}{2}$
$\left(\frac{dc}{dt}\right)_{\text{abs}}$	- auf die absorbierte Leistung bezogene Konzentrationsänderung
	$\frac{1}{\epsilon \cdot d \cdot A_{\text{Mittel}} \cdot P} \cdot \frac{dE}{dt} ; \text{ in } \frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}$

Die aus den Absorptionsspektren gewonnenen Daten sind in den folgenden Tabellen grau schattiert, die daraus für die Abbildung 7.5 und Abbildung 7.6 berechneten Werte umrandet dargestellt.

9.3.1 Lösungsmittel Chloroform

Tabelle 9.5 *Rh 160 in Chloroform.*Meßwellenlänge: 602 nm, $\epsilon(513 \text{ nm}): 4.97 \cdot 10^4 \text{ l}(\text{mol} \cdot \text{cm})$

t	dt	E	dE	A	A _{Mittel}	t	$\left(\frac{dc}{dt}\right)_{\text{abs}}$
s	s					s	$\frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}$
0		2,0968		0,992			
	60		0,0347		0,992	7,82E-09	60
60		2,0621		0,991			
	60		0,0658		0,991	1,48E-08	120
120		1,9963		0,990			
	120		0,1136		0,988	1,28E-08	240
240		1,8827		0,987			
	120		0,1281		0,985	1,45E-08	360
360		1,7546		0,982			
	120		0,1043		0,980	1,19E-08	480
480		1,6503		0,978			
	300		0,2455		0,969	1,13E-08	780
780		1,4048		0,961			
	60		0,0211		0,960	4,92E-09	840
840		1,3837		0,959			
	120		0,1186		0,952	1,39E-08	960
960		1,2651		0,946			
	180		0,1388		0,935	1,11E-08	1140
1140		1,1263		0,925			
	240		0,185		0,905	1,14E-08	1380
1380		0,9413		0,886			
	240		0,1633		0,859	1,06E-08	1620
1620		0,778		0,833			
	360		0,2308		0,775	1,11E-08	1980
1980		0,5472		0,716			
	240		0,1372		0,664	1,16E-08	2220
2220		0,41		0,611			
	240		0,1128		0,553	1,14E-08	2460
2460		0,2972		0,496			
	240		0,0811		0,444	1,02E-08	2700
2700		0,2161		0,392			
	480		0,0875		0,324	7,54E-09	3180

Tabelle 9.6 DI-4 ANEPBS in Chloroform.

Meßwellenlänge: 577.5 nm, $\epsilon(513 \text{ nm}): 4.96 \cdot 10^4 \text{ l}(\text{mol} \cdot \text{cm})$

t	dt	E	dE	A	A _{Mittel}	t	$\left(\frac{dc}{dt}\right)_{\text{abs}}$
s	s					s	$\frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}$
0		1,2764		0,947			
	30		0,1889		0,933	30	9,07E-08
30		1,0875		0,918			
	30		0,1551		0,901	60	7,72E-08
60		0,9324		0,883			
	35		0,1423		0,861	95	6,35E-08
95		0,7901		0,838			
	25		0,0831		0,821	120	5,44E-08
120		0,707		0,804			
	30		0,0855		0,782	150	4,90E-08
150		0,6215		0,761			
	30		0,0709		0,740	180	4,29E-08
180		0,5506		0,719			
	60		0,0979		0,683	240	3,21E-08
240		0,4527		0,647			
	60		0,0712		0,616	300	2,59E-08
300		0,3815		0,585			
	120		0,0921		0,535	420	1,93E-08
420		0,2894		0,486			
	180		0,0757		0,438	600	1,29E-08
600		0,2137		0,389			
	180		0,0478		0,353	780	1,01E-08
780		0,1659		0,318			
	300		0,034		0,290	1080	5,26E-09
1080		0,1319		0,262			
	420		0,0152		0,249	1500	1,96E-09
1500		0,1167		0,236			
	300		0,0049		0,231	1800	9,49E-10
1800		0,1118		0,227			

Tabelle 9.7 BNBIQ in Chloroform.

Meßwellenlänge: 536.5 nm, $\varepsilon(513 \text{ nm}): 4.99 \cdot 10^4 \text{ l}(\text{mol} \cdot \text{cm})$

t	dt	E	dE	A	A _{Mittel}	t	$\left(\frac{dc}{dt}\right)_{\text{abs}}$ $\frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}$
s	s					s	
0		0,9245		0,881			
	30		0,2072		0,845	30	1,09E-07
30		0,7173		0,808			
	30		0,1606		0,765	60	9,34E-08
60		0,5567		0,722			
	30		0,1243		0,676	90	8,18E-08
90		0,4324		0,631			
	30		0,0937		0,586	120	7,12E-08
120		0,3387		0,542			
	30		0,0692		0,502	150	6,14E-08
150		0,2695		0,462			
	45		0,071		0,415	195	5,08E-08
195		0,1985		0,367			
	60		0,0571		0,322	255	3,94E-08
255		0,1414		0,278			
	60		0,0342		0,248	315	3,07E-08
315		0,1072		0,219			
	60		0,0212		0,199	375	2,37E-08
375		0,086		0,180			
	120		0,0299		0,150	495	2,21E-08
495		0,0561		0,121			
	180		0,022		0,098	675	1,66E-08
675		0,0341		0,076			

Tabelle 9.8 Annine V in Chloroform.

Meßwellenlänge: 513 nm, $\epsilon(513 \text{ nm}): 4.97 \cdot 10^4 \text{ l}(\text{mol} \cdot \text{cm})$

t	dt	E	dE	A	A _{Mittel}	t	$\left(\frac{dc}{dt}\right)_{\text{abs}}$
s	s					s	$\frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}$
0		1		0,900			
	30		0,1004		0,887	30	5,06E-08
30		0,8996		0,874			
	30		0,0876		0,860	60	4,55E-08
60		0,812		0,846			
	30		0,0838		0,829	90	4,52E-08
90		0,7282		0,813			
	30		0,0738		0,796	120	4,15E-08
120		0,6544		0,778			
	45		0,106		0,748	165	4,23E-08
165		0,5484		0,717			
	45		0,086		0,686	210	3,74E-08
210		0,4624		0,655			
	60		0,1068		0,607	270	3,93E-08
270		0,3556		0,559			
	60		0,0918		0,507	330	4,05E-08
330		0,2638		0,455			
	60		0,0764		0,403	390	4,24E-08
390		0,1874		0,350			
	60		0,0579		0,304	450	4,26E-08
450		0,1295		0,258			
	90		0,0547		0,208	540	3,92E-08
540		0,0748		0,158			
	180		0,0374		0,120	720	2,32E-08
720		0,0374		0,083			

9.3.2 Lösungsmittel wassergesättigtes Chloroform

Tabelle 9.9 *Rh 160 in wassergesättigtem Chloroform.*Meßwellenlänge: 604 nm, $\epsilon(513 \text{ nm}): 5,01 \cdot 10^4 \text{ l}(\text{mol} \cdot \text{cm})$

t	dt	E	dE	A	A _{Mittel}	t	$\left(\frac{dc}{dt}\right)_{\text{abs}}$
s	s					s	$\frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}$
0		0,2728		0,466			
	30		0,0307		0,447	30	3,08E-08
30		0,2421		0,427			
	30		0,0286		0,408	60	3,15E-08
60		0,2135		0,388			
	30		0,0265		0,369	90	3,22E-08
90		0,187		0,350			
	30		0,0182		0,336	120	2,43E-08
120		0,1688		0,322			
	60		0,0308		0,297	180	2,33E-08
180		0,138		0,272			
	60		0,024		0,252	240	2,14E-08
240		0,114		0,231			
	120		0,0329		0,201	360	1,84E-08
360		0,0811		0,170			
	120		0,0195		0,151	480	1,45E-08
480		0,0616		0,132			
	300		0,0226		0,109	780	9,30E-09
780		0,039		0,086			

Tabelle 9.10 DI-4 ANEPBS in wassergesättigtem Chloroform.

Meßwellenlänge: 581.5 nm, $\epsilon(513 \text{ nm}): 4.95 \cdot 10^4 \text{ l}(\text{mol} \cdot \text{cm})$

t	dt	E	dE	A	A _{Mittel}	t	$\left(\frac{dc}{dt}\right)_{\text{abs}}$
s	s					s	$\frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}$
0		0,2728		0,466			
	30		0,0307		0,447	30	3,08E-08
30		0,2421		0,427			
	30		0,0286		0,408	60	3,15E-08
60		0,2135		0,388			
	30		0,0265		0,369	90	3,22E-08
90		0,187		0,350			
	30		0,0182		0,336	120	2,43E-08
120		0,1688		0,322			
	60		0,0308		0,297	180	2,33E-08
180		0,138		0,272			
	60		0,024		0,252	240	2,14E-08
240		0,114		0,231			
	120		0,0329		0,201	360	1,84E-08
360		0,0811		0,170			
	120		0,0195		0,151	480	1,45E-08
480		0,0616		0,132			
	300		0,0226		0,109	780	9,30E-09
780		0,039		0,086			

Tabelle 9.11 BNBIQ in wassergesättigtem Chloroform.

Meßwellenlänge: 540 nm, $\epsilon(513 \text{ nm}): 4,99 \cdot 10^4 \text{ l}(\text{mol} \cdot \text{cm})$

t	dt	E	dE	A	A _{Mittel}	t	$\left(\frac{dc}{dt}\right)_{\text{abs}}$
s	s					s	$\frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}$
0		0,1702		0,324			
	30		0,0275		0,302	30	4,05E-08
30		0,1427		0,280			
	30		0,0186		0,264	60	3,13E-08
60		0,1241		0,249			
	30		0,0179		0,233	90	3,43E-08
90		0,1062		0,217			
	30		0,0121		0,206	120	2,62E-08
120		0,0941		0,195			
	60		0,0181		0,178	180	2,27E-08
180		0,076		0,161			
	60		0,0137		0,147	240	2,07E-08
240		0,0623		0,134			
	60		0,0098		0,124	300	1,76E-08
300		0,0525		0,114			
	300		0,0241		0,089	600	1,21E-08
600		0,0284		0,063			

Tabelle 9.12 Annine V in wassergesättigtem Chloroform.

Meßwellenlänge: 516 nm, $\epsilon(513 \text{ nm}): 5.00 \cdot 10^4 \text{ l}(\text{mol} \cdot \text{cm})$

t	dt	E	dE	A	A _{Mittel}	t	$\left(\frac{dc}{dt}\right)_{\text{abs}}$
s	s					s	$\frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}$
0		0,1777		0,336			
	20		0,0086		0,329	20	1,74E-08
20		0,1691		0,323			
	20		0,0144		0,311	40	3,09E-08
40		0,1547		0,300			
	20		0,0133		0,289	60	3,07E-08
60		0,1414		0,278			
	30		0,0154		0,265	90	2,58E-08
90		0,126		0,252			
	30		0,0109		0,242	120	2,00E-08
120		0,1151		0,233			
	30		0,0159		0,219	150	3,23E-08
150		0,0992		0,204			
	45		0,0211		0,184	195	3,39E-08
195		0,0781		0,165			
	45		0,0152		0,150	240	3,01E-08
240		0,0629		0,135			
	60		0,0108		0,124	300	1,94E-08
300		0,0521		0,113			
	120		0,0186		0,094	420	2,21E-08
420		0,0335		0,074			
	300		0,0136		0,060	720	1,02E-08
720		0,0199		0,045			

Literaturverzeichnis

- [1] B. H. Soffer, *J. Appl. Phys.* **1964**, 35, 2551.
- [2] P.P. Sorokin, J. J. Luzzi, J. R. Lankard, G.D. Pettit, *IBM J. Res. Div.* **1964**, 8, 182.
- [3] M. Stucke, *Dye Lasers: 25 Years*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, **1992**.
- [4] F. P. Schäfer, *Dye Lasers*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, **1977**.
- [5] J. M. Yarborough, *Appl. Phys. Lett.* **1974**, 24, 629.
- [6] J. S. Batchelder, A. H. Zewail, T. Cole, *Appl. Opt.* **1979**, 18, 3090.
- [7] Y. Kanaoka, *Angew. Chem.* **1977**, 89, 142.
- [8] G. Beddard, *Rep. Prog. Phys.* **1993**, 56, 63.
- [9] J. B. Birks, *Organic Molecular Photophysics*, J. Wiley & Sons, London-New York-Toronto-Sydney **1973**.
- [10] N. J. Turro, *Modern Molecular Photochemistry*, The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc. Menlo Park, California **1978**.
- [11] I. Carmichael, G. L. Hug, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1986**, 15, 1.
- [12] I. Carmichael, G. L. Hug, *Appl. Spectros.* **1987**, 41, 1033.
- [13] R. Menzel in *Laser* (Hrsg.: H. Hohler), Vulkan Verlag, Essen **1988**, S. 342.
- [14] D. N. Dempster, T. Morrow, M.F. Quinn, *J. Photochem.* **1973/74**, 2, 343.
- [15] B.B. Snavey, *Proc. IEEE* **1969**, 57, 1374.
- [16] J. P. Webb, W. C. McColgin, O. G. Peterson, D. L. Stockman, J. H. Eberly, *J. Chem. Phys.* **1970**, 53, 4227.
- [17] A. N. Rubinov, T. I. Smolskaya, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1970**, 34, 1312.

-
- [18] F. C. Strome Jr., *IEEE J. Quant. Electron.* **1972**, QE-8, 98.
- [19] N. A. Borisevich, V.V. Grusinski, S. V. Davidov, *Quant. Electron.* **1974**, 1, 1717.
- [20] M. M. Asimov, V. N. Gavrilenko, A. N. Rubinov, *J. Lumin.* **1972**, 46, 527.
- [21] V. I. Tomin, B. A. Bushuk, A.N. Rubinov, *Opt. Spectrosc.* **1972**, 32, 527.
- [22] E. Thiel, *Eigenschaften angeregter Rhodamin-Farbstoffe und deren Wirkung im Farbstofflaser*, Habilitationsschrift, Universität Siegen, Shaker Verlag, **1995**, S. 27ff, 37ff, 42ff., 61,66, 70, 75, 79.
- [23] E. Thiel, K. H. Drexhage, *Chem. Phys. Letters* **1992**, 199, 329.
- [24] R. Menzel, *Einfluß der chemischen Struktur auf die Eigenschaften elektronisch angeregter Xanthenfarbstoffe*, Dissertation, Universität Siegen, Shaker Verlag **1998**, S. 7ff, 70, 118.
- [25] R. Menzel, *Absorptionsmessungen an angeregten Zuständen von Rhodaminfarbstoffen*, Diplomarbeit, Universität Siegen, **1994**, S. 41, 45ff, 102ff, 109, 113.
- [26] T. Förster, *Fluoreszenz organischer Verbindungen*, Nachdr. d. 1. Auflage, Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen, **1961**.
- [27] M. Klessinger, J. Michl, *Lichtabsorption und Photochemie organischer Moleküle*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, **1987**.
- [28] C. Grewer, H.-D. Brauer, *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 5001.
- [29] H.G.O. Becker, *Einführung in die Photochemie*, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, **1991**, S. 91.
- [30] Dr. Ralf Menzel, Privatmitteilung.
- [31] S. L. Murov, I. Carmichael, G. L. Hey, *Handbook of Photochemistry*, second edition, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, **1993**, S. 289.

- [32] Lee, S. K., Y. Zu, A. Herrmann, Y. Geerts, K. Müllen, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3513-3520.
- [33] Schneider, M., J. Hagen, D. Haarer, K. Müllen, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 351-354.
- [34] O. G. Peterson in *Methods of Experimental Physics* (Hrsg.: C. L. Tang), Academic Press, New York, **1979**.
- [35] F. J. Duarte, L. W. Hillman, *Dye Laser Principles*, Academic Press, New York, **1990**.
- [36] D. L. Taylor, A. S. Waggoner, R. M. Murphy, F. Lanni, R. R. Birge, *Application of Fluorescence in the Biomedical Sciences*, Alan R. Liss, New York, **1986**.
- [37] Ma. Heupel, E. Thiel, *Journal of Fluorescence* **1997**, *7*, No. 4, 371-375.
- [38] Steven A. Soper, E. Brooks Shera, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 432-437.
- [39] David A. Cremers, Richard A. Keller, *Applied Optics* **1981**, *20*, No 22, 3838-3847.
- [40] Norman J. Dovichi, John C. Martin, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 348-354.
- [41] Jerker Widengren, *Fluorescence Correlation Spectroscopy - Photophysical Aspects and Application*, Stockholm, **1996**.
- [42] Steven A. Soper, Lloyd M. Davies, E. Brooks Shera, *J. Opt. Soc. Am.* **1992**, *B 9*, No. 10, 1761-1769.
- [43] Dinh. C. Nguyen, Richard A. Keller, *J. Opt. Soc. Am.* **1987**, *B 4*, No. 2, 138-143.
- [44] M. Sauer, K. T. Han, R. Müller, A. Schulz, R. Tadday, S. Seeger, J. Wolfrum, J. Arden-Jacob, G. Deltau, N. J. Marx, K. H. Drexhage, *Journal of Fluorescence* **1993**, *3*, 131ff.
- [45] M. Sauer, K. T. Han, R. Müller, S. Nord, A. Schulz, S. Seeger, J. Wolfrum, J. Arden-Jacob, G. Deltau, N. J. Marx, C. Zander, K. H. Drexhage, *Journal of Fluorescence* **1995**, *5*, 247 ff.
- [46] J. Arden-Jacob, Dissertation, Shaker Verlag, Universität Siegen, **1993**.

- [47] I. Gregor, E. Thiel, *Applied Optics* **1999**, 38, No 36, 7468ff.
- [48] I. Gregor, *Aufbau eines Transientenspektrometers für den UV, VIS und NIR-Bereich*, Diplomarbeit, Universität Siegen, **1997**.
- [49] S. Reindl, A. Penzkofer, *Chemical Physics* **1996**, 213, 429-438.
- [50] J. B. Birks, *Photophysics of Aromatic Molecules*, Wiley-Verlag, London, **1970**.
- [51] H. Dreeskamp, E. Koch, M. Zander, *Chem. Phys. Lett.* **1975**, 31, 251.
- [52] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 509.
- [53] P. Fromherz, O. Schenk, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1191, 299.
- [54] N. Johannsson, D.A. dosSantos, S. Guo, J. Cornil, M. Fahlmann, J. Salbeck, H. Schenk, J.L. Bredas, W.R. Salaneck, *J. Chem. Phys.* **1997**, 107, 2542.
- [55] C. Riepe, Schwerpunktarbeit, Universität Siegen, **2000**.