

Protokoll zum Fortgeschrittenenpraktikumsversuch

Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung

WS 2016/2017

Verfasser 1:	Christoph Egerland
Verfasser 2:	Max Pfeifer
Versuchsdatum:	6.12.2016
Versuchsplatz:	NEW15 2'106
Betreuer:	Dr. Steffen Hackbarth

Abstract

Mit Hilfe der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC) wird in diesem Versuch die Fluoreszenzlebensdauer von Phäophorbid a in Ethanol-Wasser-Gemischen untersucht. Hierbei gehen wir insbesondere auf das Verhalten bei unterschiedlichen Konzentrationen, optischen Dichten und zusätzlichen Reaktionsagenten (Triton X-100) der Probe ein. Es werden Störeffekte (Peak Pile-Up, Reabsorption) behandelt und quantifiziert. Schließlich wird die Einbettung des Phäophorbid in Mizellen durch Messung der Anisotropie nachgewiesen.

Inhaltsverzeichnis

1	Materialien und Methoden	2
1.1	Versuchsaufbau	2
1.2	Versuchsmethode	2
2	Auswertung und Diskussion	3
2.1	Optimierung des Messplatzes	3
2.1.1	Apparatefunktion	4
2.1.2	Peak-Pile-Up-Effekt	4
2.1.3	Reabsorption	5
2.2	Fluoreszenzlebensdauer von Pheo	6
2.3	Pheo in versch. Ethanol-Wasser-Gemischen	6
2.4	Einbettung in Mizellen / Triton X-100	7
2.4.1	Wirkungsweise von Triton X-100	7
2.4.2	Anisotropie	8
3	Schlussfolgerungen	10
4	Anhang	11
5	Literatur	15

1 Materialien und Methoden

1.1 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau wird in [1] beschrieben:

”Der Laser emittiert einen gepulsten Laserstrahl, der auf einen halbdurchlässigen Spiegel trifft. Dieser teilt den Strahlenweg in zwei Komponenten. Der eine trifft auf eine Referenzdiode. Der andere wird mit Hilfe eines $\lambda/2$ -Plättchens und eines vertikal orientierten Polarisationsfilters abgeschwächt und trifft anschließend auf die Probe. [...] Bei dem Detektor handelt es sich um einen Photomultiplier dessen Pulse einen Constant Fraction Discriminator passieren müssen, um gemessen zu werden.”

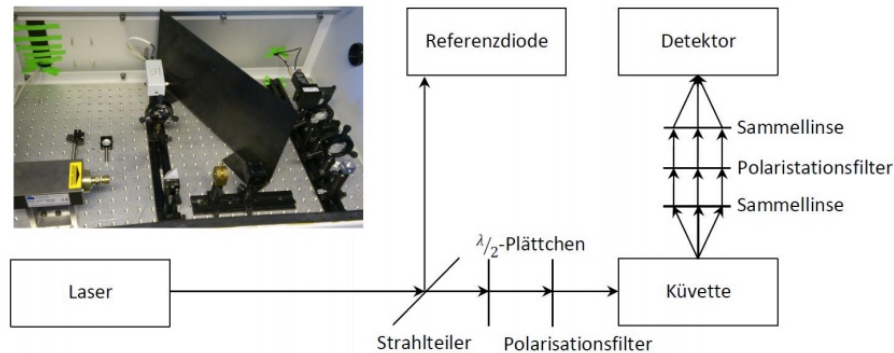


Abbildung 1: Versuchsaufbau

Die Messelektronik stammt von der Firma Becker und Hickl GmbH. Wir verwenden das Programm SPC300 dieser Firma.

1.2 Versuchsmethode

Die verwendete Versuchsmethode wird wie folgt in [1] beschrieben:

”Mit der TCSPC sollen strahlende optische Übergänge im Bereich vieler ps bis vieler ns untersucht werden. Nun entsteht aber wegen der Unschärferelation im Allgemeinen das Problem, nicht gleichzeitig schnell und genau messen zu können. Bei der TCSPC wird dieses Problem durch die Entkopplung von Detektion und Zeitmessung umgangen. Die Grundidee ist hierbei, dass sich eine Vielzahl identischer, nicht wechselwirkender Teilchen (oder Moleküle) statistisch genauso verhält wie ein einzelnes Teilchen (oder Molekül).”

2 Auswertung und Diskussion

2.1 Optimierung des Messplatzes

In diesem Versuchsteil wollen wir eine optimale Konfiguration (optimal bedeutet hier: höchstmögliches Signal-Rausch-Verhältnis SNR) erreichen. Wir setzen zunächst eine Streuküvette mit stark verdünntem Ludox ein, stellen die Detektorspannung auf $U_D = 800$ V und regeln die Laserintensität mit dem Polarisationsfilter so niedrig wie möglich. In Tabelle 1 ist das SNR für die verschiedenen Schwellwerte des Constant-Fraction-Discriminators (CFD) dargestellt. Wir erreichen das höchste SNR bei:

$$CFD_{opt} = 30$$

mV

CFD [mV]	Signal [Counts]	Rauschen [Counts]	SNR
5	-	-	-
10	45000	200	225
15	40000	50	800
20	30000	10	3000
25	25000	8	3125
30	20000	6	3333.3
35	15000	5	3000
40	12000	4	3000
45	8000	3	2666.7
50	5200	2	2600

Tabelle 1: Ermittlung des optimalen Schwellenwerts CFD bei $U = 800$ V

Nun variieren wir mit festem Schwellwert CFD_{opt} die Detektorspannung. In Tabelle 2 sehen wir analog zu Tabelle 1 die Detektorspannung und das daraus resultierende SNR. Wir finden:

$$U_{opt} = 800V$$

U[kV]	Signal[Counts]	Rauschen[Counts]	SNR
0.6	0	0	-
0.7	520	2	260
0.8	16000	5	3200
0.9	25000	8	3125
1.0	10000	5	2000

Tabelle 2: Ermittlung der optimalen Spannung bei $CFD_{opt} = 30$ mV

In den folgenden Versuchsteilen werden wir also stets die feste Konfiguration $CFD_{opt} = 30mV$ und $U_{opt} = 800V$ verwenden.

2.1.1 Apparatfunktion

Die aufgenommene Apparatfunktion der Streuküvette ist in Abbildung 2 dargestellt. Durch variieren der Countrate ergaben sich kleine Variationen in der Halbwertsbreite des Peaks, sowie veränderte Fluktuationen in der auslaufenden Kurve. Es wurde jene Countrate gewählt, bei der eine weitere Verringerung die Halbwertsbreite nicht weiter verringert. Am Graphen ist diese gut zu sehen:

$$\text{Countrate} \approx \mathcal{O}(10^4)$$

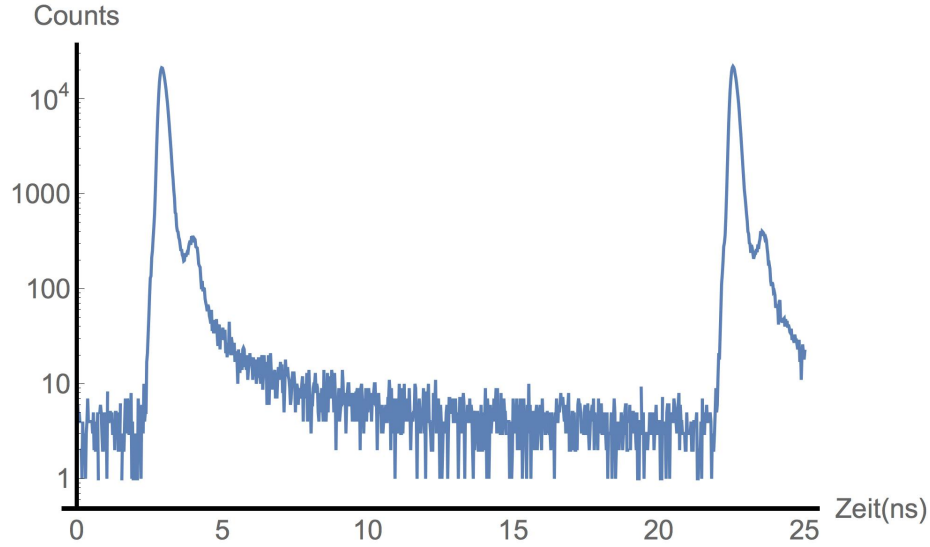


Abbildung 2: Apparatkurve

2.1.2 Peak-Pile-Up-Effekt

Unter dem Peak-Pile-Up-Effekt versteht man, dass zwei Photonen nicht als zwei separate Events registriert werden. Wir erwarten, dass bei höherer Laserintensität zum einen die Amplitude A größer wird und dass die Fluoreszenzlebensdauer t abnimmt, da es bei höheren Intensitäten wahrscheinlicher ist, dass zwei Photonen als ein Ereignis gezählt werden und somit nicht doppelt zur Kurve beitragen. Die Messung wurde mit einer Probe mit $OD = 0.1$ und verschiedenen Laserintensitäten durchgeführt.

Die Ergebnisse der Messung sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Fits zeigen eine gute Übereinstimmung zum Modell ($\chi^2 - \text{Werte} < 2.3$) und die oben beschriebenen Erwartungen werden bestätigt. Die Halbwertszeit nimmt mit zunehmender Intensität ab, die Amplitude steigt. Allerdings liegt die Schwankung lediglich in der Fehlerordnung (Diskussion in der Schlussfolgerung) und ist somit also zu vernachlässigen. Wir wählen $I = 77 \mu W$ als Laserintensität für die folgenden Versuche.

I[μW]	A[a.u.]	t[ns]	χ ²
15.9	0.19	5.44	1.42
77	0.19	5.42	1.42
79	1.06	5.38	2.06
91	1.24	5.44	2.24

Tabelle 3: Messung des Peak-Pile-Up-Effekts

2.1.3 Reabsorption

Für diesen Versuchsteil mussten zunächst 5 Proben mit verschiedener optischer Dichte im Bereich 0.1 - 1.5 hergestellt werden. Hierfür wurde auf der Grundlage, dass die optische Dichte eines Stoffes proportional zur Konzentration desselben ist, folgende Formel hergeleitet:

$$\omega = \frac{V_{Pheo}}{V_{Rest}} = \frac{OD_{Probe}}{OD_{Pheo} - OD_{Probe}} \quad (1)$$

Hierbei ist OD_x die optische Dichte des jeweiligen Stoffes. Für ein Probenvolumen von $2ml$ und eine optische Dichte des Phäophorbid a von $OD_{Pheo} = 2.4$ ergeben sich die Werte wie in Tabelle 4.

OD_{Probe}	ω	$V_{Pheo}[\mu l]$	$V_{Ethanol}[\mu l]$
0.1	1:23	87	1913
0.3	1:7	250	1750
0.7	7:17	583	1417
1.1	11:13	917	1083
1.5	5:3	1250	750

Tabelle 4: Mischung der Proben für verschiedene optische Dichten

Unter Reabsorption versteht man, dass ein absorbiertes und wieder abgestrahltes Photon erneut absorbiert und emittiert wird. Wir erwarten also, da bei höheren optischer Dichte die Wahrscheinlichkeit für einen solchen Fall höher ist, dass die Fluoreszenzlebensdauer bei höheren optischer Dichte steigt, da die Reabsorption (und Reemission) durch andere Fluorophore endliche Zeit in Anspruch nimmt. Die Ergebnisse der Messung befinden sich in Tabelle 5.

OD	A[a.u.]	t[ns]	χ ²
0.2	0.01	5.91	1.21
0.3	0.54	5.44	1.66
0.7	0.59	5.54	1.64
1.1	0.63	5.62	1.79
1.5	0.27	5.86	1.50

Tabelle 5: Messung Reabsorptionseffekt

Die Fits zeigen wieder gute Übereinstimmung mit dem Modell (χ^2 -Werte < 2) und unsere Erwartungen bestätigen sich deutlich. Die Fluoreszenzlebensdauer steigt bei höheren Dichte um bis zu 8% an. Im Folgenden werden wir also $OD = 0.2$ wählen.

2.2 Fluoreszenzlebensdauer von Pheo

Nun wird die Fluoreszenzlebensdauer bei den optimalen Einstellung bestimmt. Diese sind noch einmal zusammengefasst:

- CFD-Spannung: $CFD_{opt} = 30mV$
- Detektorspannung: $U_D = 800V$
- Laserintensität: $I = 77\mu W$
- optische Dichte der Probe: $OD = 0.2$

Die Fluoreszenzlebensdauer beträgt:

$$t = (5.9 \pm 0.1)ns$$

Diese stimmt sehr gut mit dem Referenzwert in [2] überein (ebenfalls $t = (5.9 \pm 0.1) ns$). Auch der χ^2 -Wert weist auf eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Modell hin.

2.3 Pheo in versch. Ethanol-Wasser-Gemischen

Für diesen Versuchsteil stellen wir 7 Proben mit verschiedenem Ethanol-Wasser-Verhältnis her. Wir setzen in unserer 2 ml Probe $V_{Pheo} = 1$ ml, so dass $V_{Rest} = 1$ ml. Mit $\omega = \frac{V_{Ethanol}}{V_{Rest}}$ erhalten wir:

ω	$V_{H_2O} [\mu l]$	$V_{Ethanol} [\mu l]$
5%	950	50
15%	850	150
30%	700	300
45%	550	450
60%	400	600
75%	250	750
100%	0	1000

Tabelle 6: Mischung für verschiedene Verhältnisse Ethanol:Wasser

Wir erwarten, dass bei höherem Anteil die Fluoreszenzlebensdauer sinkt, da Phäophorbid a schlecht wasserlöslich ist, im wässrigen Milieu also zur Aggregation neigt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 veranschaulicht. Man erkennt, dass die Fluoreszenzdauer sinkt, je höher der Anteil von Wasser bzw. umso niedriger der

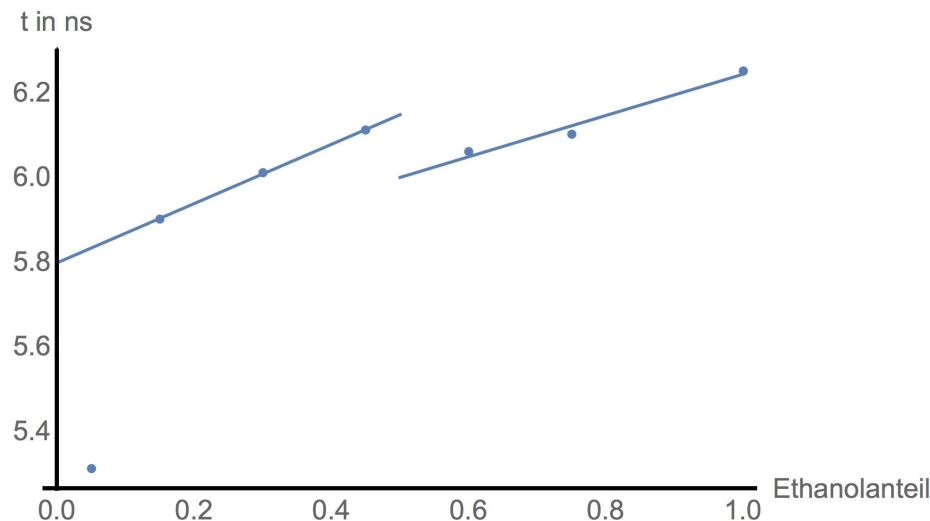


Abbildung 3: Messung der Fluoreszenzlebensdauer für verschiedene Ethanol-Wasser-Verhältnisse

Anteil von Ethanol ist. Hierbei fällt die Fluoreszenzdauer bei Wasseranteilen $> 50\%$ stärker ab, als bei Anteilen $< 50\%$. Der erste Messpunkt wurde bei der Regression nicht einbezogen. Seine Lage legt nahe, dass es sich um eine Fehlmessung handelt. Eine schlechte Entscheidung der Messenden war es, eine Probe mit $OD = 1.5$ für die Messung zu verwenden, wo doch in Abschnitt 2.1.3 festgestellt wurde, dass hier der Reabsorptionseffekt eine wesentliche Rolle spielt.

2.4 Einbettung in Mizellen / Triton X-100

2.4.1 Wirkungsweise von Triton X-100

”Triton X-100 ist ein Detergenz, welches Pheophorbid in Mizellen einbettet und so wasserlöslich macht.” ([1]) Wir geben nun zu der Probe mit höchstem Wasseranteil 2 Tropfen einer 10%igen Stammlösung Triton X-100 hinzu und erwarten, dass hierdurch (Mizellenbildung) die Fluoreszenzdauer wieder auf das optimale Niveau wie in Abschnitt 2.2 ansteigt.

Die Fluoreszenzlebensdauer ist, wie nach Erwartung angestiegen, allerdings über die Fluoreszenzdauer in 2.2 hinaus. Dies liegt daran, dass die Probe eine optische Dichte von $OD = 1.5$ hat. Der Reabsorptionseffekt trägt hier, wie in Abschnitt 2.1.3 gezeigt, eine tragende Rolle. Dies war eine für präzise Messergebnisse ungünstige Wahl der Experimentatoren. Ebenso schlägt sich dies in einem (im Vergleich zu allen anderen Fits) schlechten Chi2-Wert von $\chi^2 = 2.94$ nieder. Nichtsdestotrotz zeigt die Messung, dass Phäophorbid a durch das Triton X-100 wieder (besser) fluoresziert.

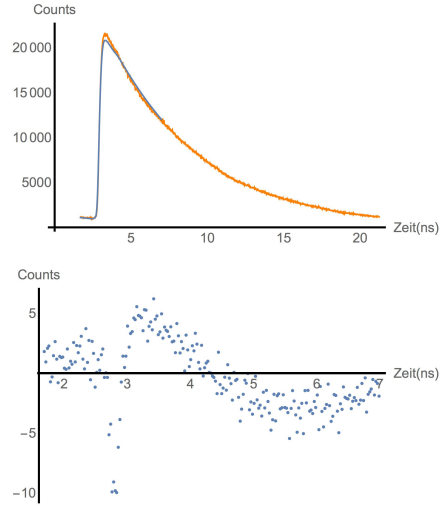


Abbildung 4: Messung der Fluoreszenzlebensdauer mit Triton X-100, $t = 5.97ns$, $A = 0.26[a.u.]$, $\chi^2 = 2.94$

2.4.2 Anisotropie

Werden Fluorophore mit linear polarisiertem Licht bestrahlt absorbieren bevorzugt Moleküle, bei denen der Winkel zwischen Übergangsdipolmoment und Polarisationssebene des einfallenden Lichts klein ist. Dies führt i.A. dazu, dass das durch Fluoreszenz emittierte Licht ebenso linear polarisiert ist - die sog. Fluoreszenzpolarisation. Diese intrinsische Anisotropie ist als Maß für den Grad der Polarisierung des Emissionslichts abhängig von den Intensitäten des parallel bzw. senkrecht polarisierten Fluoreszenzlichts:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Zur quantitativen Bestimmung werden jene Polarisationsintensitäten bei fester (linearer) Polarisierung des einfallenden Lichts gemessen. Die sog. Rotationsabklingzeit τ_{Rot} bestimmt gemäß eines exponentiellen Abfalls maßgeblich den zeitlichen Abfall der Anisotropie. Sie ist, neben der Viskosität und Temperatur, v.a. von der Molekülgröße (Volumen) abhängig. Es wurden zwei Proben untersucht: Phäo in Ethanol und Phäo in einem Wasser/Triton-Gemisch.

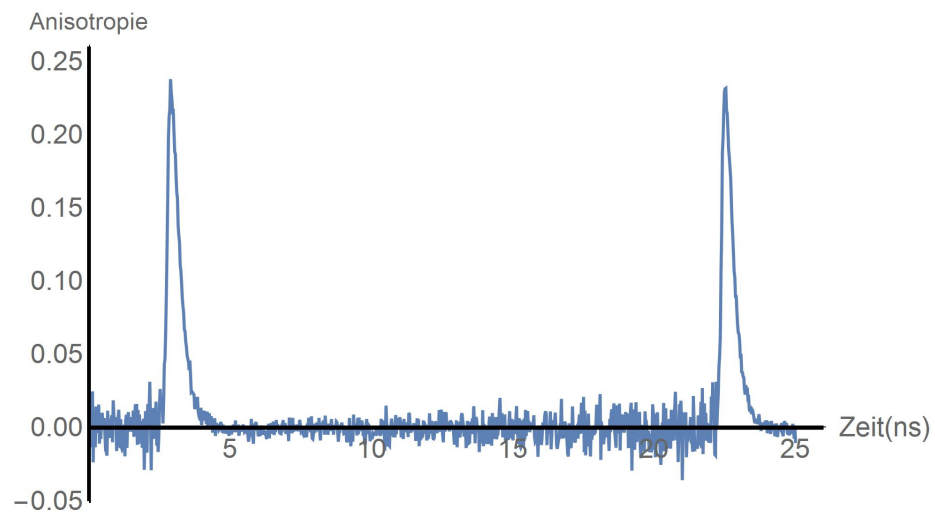


Abbildung 5: Messung der Anisotropie von Phäophorbid a mit Ethanol

Deutlich zu erkennen auf den Abb. 6 und 7 sind die beiden Anisotropie-Peaks bei den Fluoreszenzereignissen und der exponentielle Charakter des Abklingens der Anisotropie.

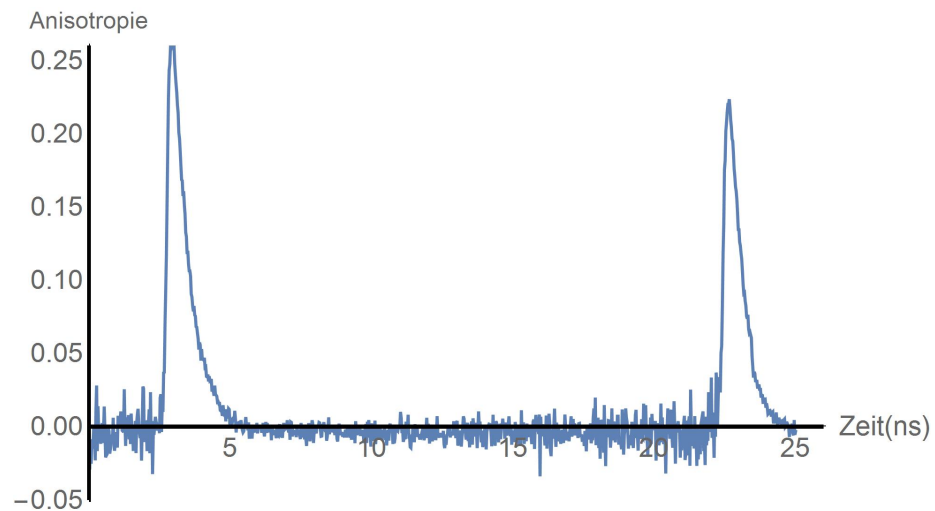


Abbildung 6: Messung der Anisotropie von Phäophorbid a mit einem Triton/Wasser-Gemisch

Den Erwartungen entsprechend ist die Abklingzeit der Anisotropie bei der Probe mit Ethanol (Abb. 5) kürzer als bei jener mit dem Triton/Wasser-Gemisch (Abb. 6). Die Rotationsabklingzeit τ_{Rot} nimmt gemäß

$$\tau_{Rot} = \frac{\eta V}{k_B T}$$

mit größerem Volumen zu, wohingegen die Anisotropieabklingzeit nach

$$r = c \cdot e^{-t/\tau_{Rot}} + d$$

invers proportional zur Rotationsabklingzeit ist. Das kürzere Abklingen der Anisotropie von Phäo in Wasser/Triton als in Ethanol spricht also für eine längere Rotationsabklingzeit und damit für ein größeres Volumen der fluoreszierenden Moleküle. Dies weist deutlich auf die erwartete Einbettung von Phäo in Mizellen im Wasser/Triton-Gemisch hin.

3 Schlussfolgerungen

Der ermittelte Basiswert für die Fluoreszenzlebensdauer von $t = (5.9 \pm 0.1)$ ns deckt sich genau mit dem Referenzwert aus [2] (S. 41, Tabelle). Die Unsicherheit der Zeitmessung wurde aufgrund des Fehlens von Angaben zu Geräteungenauigkeiten auf $\Delta t = 0,1$ ns abgeschätzt.

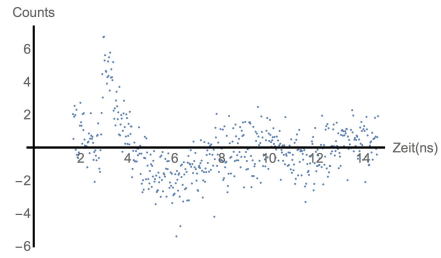
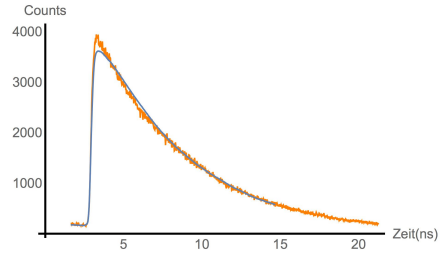
Die auftretenden Störeffekte (Peak-Pile-Up, Reabsorption) konnten qualitativ nachgewiesen werden.

Die im Rahmen der Untersuchungen zur Löslichkeit von Phäophorbid a in Wasser/Ethanol-Gemischen ermittelten Fluoreszenzlebensdauern (Abs. 2.3) zeigen deutlich die hydrophobe Eigenschaft des Fluorophors. Dabei hätte man bei der Probe mit maximalem Wasseranteil keine Fluoreszenz bzw. zumindest eine deutlich niedrigere Fluoreszenzlebensdauer erwartet. Jedoch verschwindet die Fluoreszenzlebensdauer aufgrund der ungünstigen Wahl der Volumenaufteilung in der Probe (1 ml Phäophorbid a, 1 ml Wasser/Ethanol) nicht.

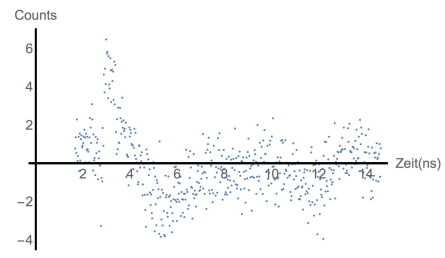
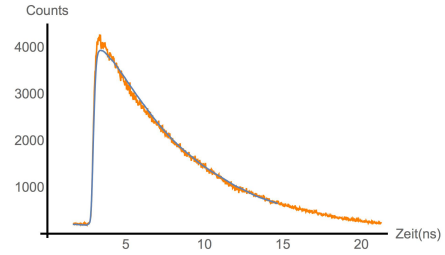
Die Zugabe von Triton X-100 zur Probe mit maximalem Wasseranteil lässt die Fluoreszenzlebensdauer ansteigen und entspricht damit den theoretischen Erwartungen (Mizellenbildung). Wie zuvor (Abs. 2.4.1) erwähnt, hätte die Verwendung einer Probe geringerer optischer Dichte geringere Reabsorptionseffekte und damit eine vom Referenzwert weniger abweichende Fluoreszenzlebensdauer ergeben.

Die Anisotropieverhalten von Phäo in Ethanol und Phäo in Triton X-100 (Abs. 2.4.2) lassen auf Mizellenbildung schließen.

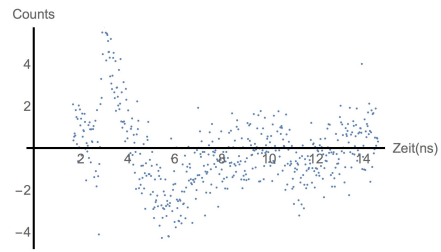
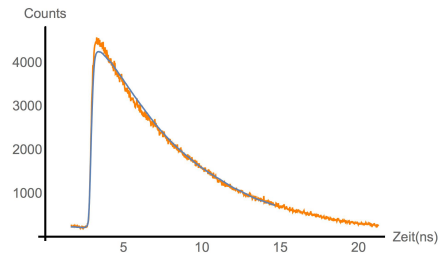
4 Anhang



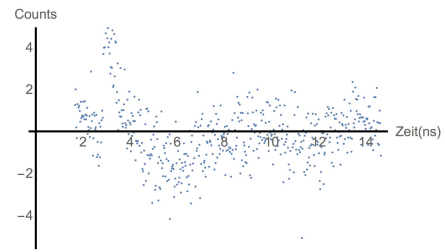
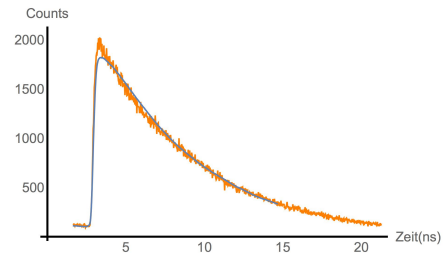
(a) $OD = 0.3, \chi^2=1.66$



(b) $OD = 0.7, \chi^2=1.64$

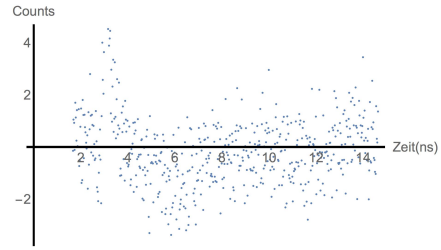
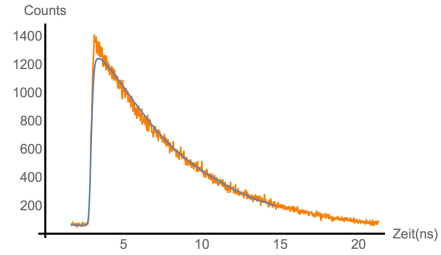


(c) $OD = 1.1, \chi^2=1.79$

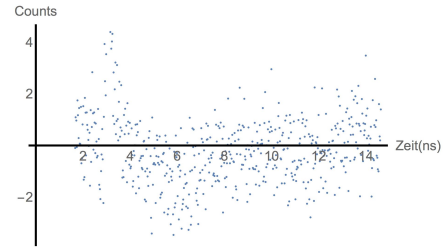
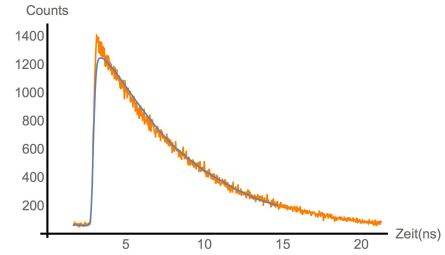


(d) $OD = 1.5, \chi^2=1.50$

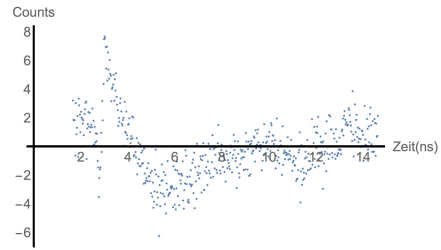
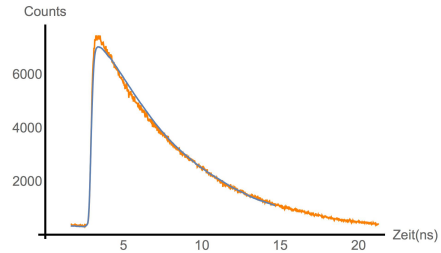
Abbildung 7: Fits und Residuen des Reabsorptionseffekt



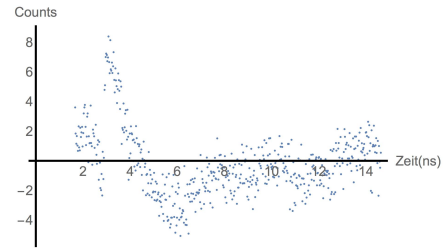
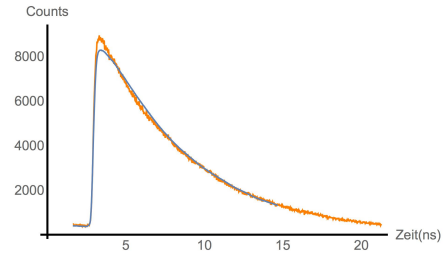
(a) $I = 15.09 \mu\text{W}$, $\chi^2=1.42$



(b) $I = 77 \mu\text{W}$, $\chi^2=1.42$



(c) $I = 79 \mu\text{W}$, $\chi^2=2.06$



(d) $I = 91 \mu\text{W}$, $\chi^2=2.44$

Abbildung 8: Fits und Residuen des Peak-Pile-Up-Effekts

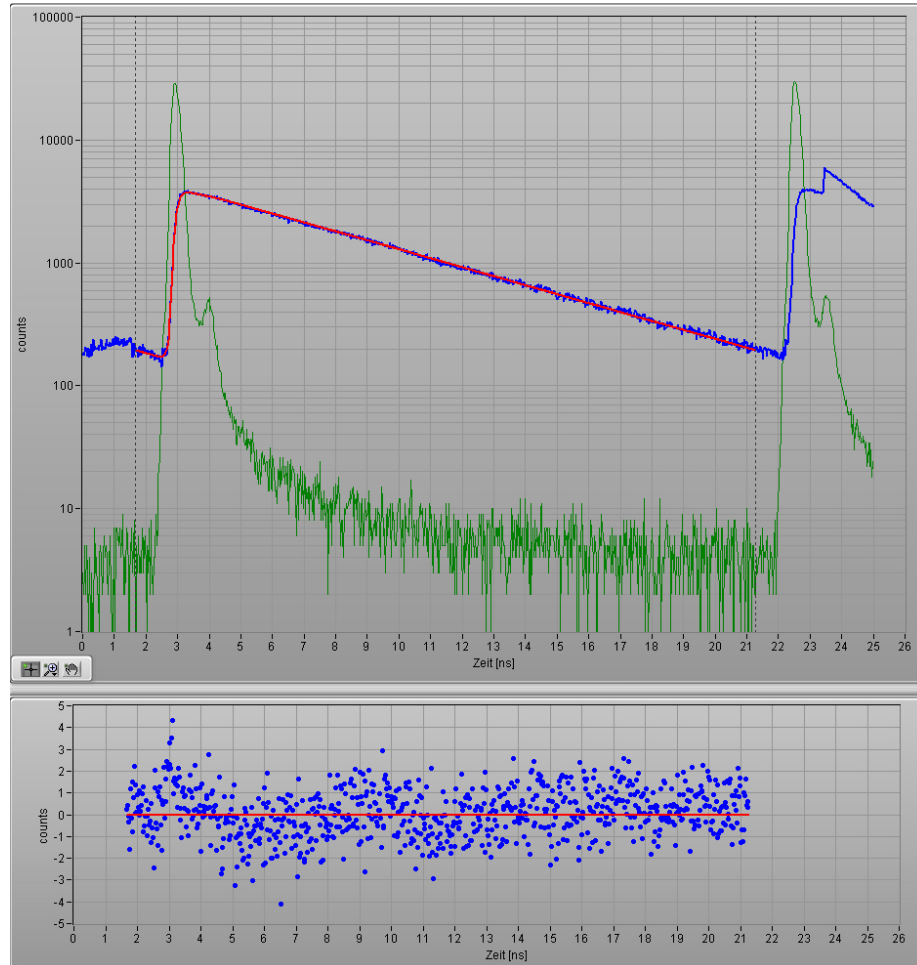


Abbildung 9: Mess- und Fitkurve für optimale Einstellung, Fitparameter: $t = 5.91\text{ns}$, $A = 0.001[a.u.]$, $\chi^2 = 1.24$

5 Literatur

- [1] Dr. Steffen Hackbarth: *Versuchsskript: Zeitkorrelierte Einzelphotonenmessung*
- [2] Röder et al.: *Photophysical properties of pheophorbide a in solution and in model membrane systems*