



FORTGESCHRITTENENPRAKTIKUM

Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung

Autoren:



Abstract

Fluoreszenz bezeichnet die Eigenschaft einiger Stoffe nach äußerer Anregung der Hüllenelektronen spontan Photonen zu emittieren. Hier wurde die Fluoreszenzlebensdauer des Farbstoffs Pheophorbid a mit zeitkorrelierter Einzelphotonenmessung untersucht.

Neben der Bestimmung der Lebensdauer zu $\tau_1 = (5,87 \pm 0,07) \text{ ns}$ wurden auch Störeffekte des Versuchsaufbaus, speziell Reabsorption und Peak-Pile-Up-Effekt qualitativ analysiert. Hier wurde nur Reabsorption experimentell beobachtet.

Zusätzlich wurde die Abhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs von der ihn umgebenden Lösung analysiert. In Wasser ist Fluoreszenz nicht mehr der dominante Abregungskanal, unter Zugabe von Triton X-100 kann dieser Effekt allerdings neutralisiert werden.

Letztlich konnte die Anisotropie der Fluoreszenz bei Anregung mit linear polarisiertem Licht beobachtet werden.

Versuchsdatum: 

Versuchsplatz: 

Abgabedatum: 

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Fluoreszenzlebensdauer	2
1.2	Störeffekte der Fluoreszenzspektroskopie	2
1.3	Fluoreszenz-Anisotropie	2
2	Materialien und Methoden	3
2.1	Versuchsaufbau	3
2.1.1	Pheophorbid a	3
2.1.2	Constant Fraction Discriminator	4
2.1.3	Verwendete Messgeräte, Proben und Software	4
2.2	Versuchsvorbereitung	5
2.2.1	Constant Fraction Discriminator	5
2.2.2	Rauschen	6
2.3	Apparatefunktion	6
2.4	Nichtlineares Fitting	7
3	Auswertung und Diskussion	8
3.1	Fluoreszenzlebensdauer	8
3.2	Störeffekte	9
3.2.1	Reabsorbtion	9
3.2.2	Peak-Pile-Up	10
3.3	Löslichkeit und Mizellenbildung	11
3.4	Anisotropie	13
4	Schlussfolgerungen	14
A	Anhang	16

1 Einleitung

1.1 Fluoreszenzlebensdauer

In diesem Versuch soll die Fluoreszenz von Pheophorbid a mit Hilfe einer zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC) untersucht werden. Die Fluoreszenz ist neben der Phosphoreszenz eine mögliche Form der Lumineszenz. Die Lumineszenz bezeichnet allgemein die spontane Emission eines Photons bei der Abregung eines Atoms oder Moleküls aus einem elektrisch angeregten Zustand. Die Übergänge bei der Fluoreszenz sind im Gegensatz zu denen der Phosphoreszenz spin erlaubt, d.h. die Übergänge erfolgen zwischen Zuständen gleichen Spins.

Da die Abstände der energetischen Niveaus sowie der zugehörigen Schwingungsniveaus mit abnehmender Anregungsenergie größer werden, ist die Lebensdauer von niedrigeren Anregungszuständen deutlich größer. Die Regel von Kasha besagt, dass Lumineszenz im Wesentlichen nur bei der Abregung aus dem niedrigsten angeregten Zustand möglich ist. Die Fluoreszenzlebensdauer ist definiert als die mittlere Zeit die ein Molekül im angeregten Zustand verbleibt, bevor es das Photon emittiert. Die Fluoreszenzlebensdauer des niedrigsten angeregten Zustandes kann einige Nanosekunden betragen während die Lebensdauer bei phosphoreszierenden Stoffen einige Sekunden bis Stunden betragen kann.

Bei diesem Versuch wurde die Fluoreszenzlebensdauer mit Hilfe einer TCSPC bestimmt. Diese Methode zeichnet sich dadurch aus, dass das Problem der Unschärferelation, nicht gleichzeitig schnell und genau messen zu können, umgangen werden kann. Die Grundidee ist hierbei, dass Detektion und Zeitmessung entkoppelt werden. Aufgrund des Gesetzes der großen Zahlen kann davon ausgegangen werden, dass eine Vielzahl von nicht wechselwirkenden identischen Teilchen sich genauso verhält, wie ein Einzelnes.

1.2 Störeffekte der Fluoreszenzspektroskopie

Bei der Messung der Fluoreszenzlebensdauer gibt es aufgrund der Methodik einige physikalische und statistische Effekte, welche die Messergebnisse verschlechtern können.

Bei der TCSPC wird davon ausgegangen, dass nur ein Photon pro Puls des verwendeten Lasers mit dem zu untersuchenden Stoff wechselwirkt. Wird mehr als nur ein Photon vom Stoff absorbiert und wieder emittiert, so kann aufgrund der Reaktions- und Totzeiten des Detektors nur das erste Photon detektiert werden und die gemessene Lebensdauer verringert systematisch. Dieser Effekt wird auch als Peak-Pile-Up bezeichnet. Es ist möglich, durch Verringerung der Laserintensität die Wechselwirkung mehrerer Photonen pro Puls äußerst unwahrscheinlich zu machen.

Ein weiterer Störeffekt ist die sogenannte Reabsorption. Dabei werden fluoreszierte Photonen erneut von anderen Molekülen absorbiert, wodurch die Lebensdauer systematisch zu groß bestimmt wird. Dem kann entgegengewirkt werden, indem eine Lösung geringer Konzentration des zu untersuchenden Stoffes verwendet wird.

1.3 Fluoreszenz-Anisotropie

Das Übergangsdipolmoment eines Fluorophors ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, ein Photon einer bestimmten Polarisation zu absorbieren bzw. emittieren. Dieses Dipolmoment hat eine definierte Orientierung im jeweiligen Molekül. Fluorophore absorbieren

bevorzugt Photonen, deren Polarisierung parallel zum Übergangsdipolmoment ist. In einer isotropen Lösung sind die Moleküle zufällig orientiert. Die selektive Absorption von Photonen bestimmter Polarisierung führt zu einer teilweise polarisierten Emission. Diese Anisotropie der Fluoreszenz kann durch

$$r = \left| \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \right| \quad (1)$$

berechnet werden, wobei I_{\parallel} und I_{\perp} die Fluoreszenzintensitäten der parallel und senkrecht zur Eingangspolarisation polarisierten Emission sind.

Es gibt Effekte, welche die gemessene Fluoreszenz-Anisotropie verringern. Der Wichtigste ist die sogenannte Rotationsdiffusion, durch welche während der Anregung eines Moleküls das Übergangsdipolmoment desselben um einen Winkel verdreht wird und somit die Anisotropie verringert. Die Rotationsgeschwindigkeit ist dabei vor allem von der Größe und dem das Molekül umgebenden Lösungsmittel abhängig. Die Korrelationszeit des Diffusionsprozesses ist dabei gegeben durch

$$\tau = \frac{\eta V}{k_B T}. \quad (2)$$

Diese gibt die Zeit an, welche ein Molekül braucht, um sich um einen bestimmten Winkel zu drehen (vgl. [4, S. 11 f.]).

2 Materialien und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Zur Anregung des Fluorophors wurde ein gepulster Laser verwendet. Der Laserstrahl wurde mit Hilfe eines Strahlteilers geteilt und der eine Teil mit einer Referenzdiode gemessen. Die Intensität des anderen Strahls konnte mit einer Kombination aus einem $\lambda/2$ -Plättchen und einem Polfilter eingestellt werden, bevor dieser auf die Küvette mit der zu untersuchenden Lösung traf. Hinter der Küvette konnte mit Hilfe einer Kombination aus zwei Sammellinsen und einem winkelverstellbaren Polfilter die Polarisierung der emittierten Photonen gefiltert werden bevor diese auf den Detektor trafen.¹

Bei der Zeitdifferenzmessung zwischen Referenzdiode und Detektor wurde die Messung mit dem Detektorpuls gestartet, um nur die Pulse zu messen, bei denen tatsächlich ein emittiertes Photon detektiert wurde (inverse TCSCP). Die Zeitmessung wurde mittels eines Zeit-zu-Amplituden-Konverters umgewandelt und von einem Vielkanalanalysator aufgezeichnet, der mit einem PC verbunden war.

2.1.1 Pheophorbid a

Bei dem hier untersuchten Fluorophor handelt es sich um Pheophorbid a², ein dem Chlorophyll ähnlichen Farbstoff. Pheophorbid a ist hydrophob, weshalb es in diesem Versuch meist in Ethanol gelöst wurde. Es ist nicht in Wasser löslich, in Wasser schließen sich die Moleküle zu Gruppen zusammen und verlieren ihre fluoreszierenden Eigenschaften größtenteils. Dies kann verhindert werden, indem zusätzlich ein nichtionisches Tensid zur Lösung hinzu gegeben wird, welches Mizellen um die Farbstoffmoleküle bildet und diese so in Wasser löslich macht. Mizellen sind selbstorganisierte Molekülanordnungen, bei denen

¹Skizze Versuchsaufbau siehe [3], Abbildung 1

²Strukturformel und normiertes Spektrum siehe [3], Abbildung 4

die hydrophilen Teile der Tenside zum Wasser und die hydrophoben Teile der Tenside zum Farbstoffmolekül gerichtet sind, wodurch jenes eingehüllt wird.

Die Konzentration des Farbstoffes im Lösungsmittel ist proportional zur optischen Dichte (OD)

$$\text{OD} = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right), \quad (3)$$

wobei I die hinter der Farbstofflösung gemessene Intensität und I_0 die hinter dem reinen Lösungsmittel gemessene Intensität ist.

2.1.2 Constant Fraction Discriminator

Trifft ein fluoresziertes Photon auf den Detektor, so wird das Signal in einen elektrischen Puls umgewandelt, welcher eine zeitliche Breite und eine bestimmte Intensität hat. Um Rauscheffekte zu unterdrücken und eine qualitativ vergleichbare Zuordnung eines Pulses zu einem Zeitpunkt zu erreichen, wurde ein Constant Fraction Discriminator (CFD) verwendet.

Zuerst filtert ein Diskriminator die Eingangspulse außerhalb eines bestimmten Spannungsintervalls heraus. Der CFD teilt die dann übrigbleibenden Pulse dann in zwei Teilpulse auf, verzögert den einen zeitlich und subtrahiert diesen mit verringerter Amplitude vom anderen. Hiermit wird elektronisch eine Art Differenzenquotient des ursprünglichen Pulses erzeugt, wodurch für verschiedene eingehende Pulse unterschiedlicher Intensität eine qualitativ vergleichbare Zeitzuordnung möglich ist, indem der Intensitätsnulldurchgang des so berechneten Pulses gemessen wird (vgl. auch [3]).

2.1.3 Verwendete Messgeräte, Proben und Software

Die Lichtquelle des Versuchs war ein BHLP-700 Pikosekunden-Diodenlaser der Firma Becker & Hickl, dessen Leistung nach Durchgang durch das $\lambda/2$ -Plättchen mit Hilfe eines digitalen Wattmeters kontrolliert wurde. Die Unsicherheit des Wattmeters wurde großzügig auf ein Digit bzw. $0,1 \mu\text{W}$ abgeschätzt. Die Detektion erfolgte dann mit Hilfe eines Hamamatsu H10721P-110 Photomultipliers (Photomultiplier Tube, PMT), dessen Beschleunigungsspannung mit einem HUB FGP 2011/KP Spannungsgenerator geregelt werden konnte.

Alle Proben wurden in Küvetten gleicher Art mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette vor Ort gemischt. Als Grundlage diente dabei eine Lösung unbekannten Mischungsverhältnisses aus Pheophorbid a und Ethanol, die dann mit unterschiedlichen Anteilen puren Ethanols und Wassers vermischt wurde. Die Unsicherheit der Pipette wurde auf Basis der am Versuchsplatz gemachten Angaben wie folgt abgeschätzt: für Transfers von $100 \mu\text{l}$ Lösung mit $\pm 0,3 \mu\text{l}$, für $400 \mu\text{l}$ und $500 \mu\text{l}$ mit $\pm 0,4 \mu\text{l}$ und für $1000 \mu\text{l}$ mit $\pm 0,9 \mu\text{l}$. Eine Übersicht über alle im Verlauf des Versuchs verwendeten Proben findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Proben mit ungefähren Angaben zu den Bestandteilen und der gemessenen optischen Dichte.

Probe	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	1-6	1-7	1-8	1-9
Ethanol [ul]	3000	2800	2800	2800	2158	1527	895	264	600
Pheo. a-Lösung [ul]	0	200	n.b.	200	842	1473	2105	2736	900
Wasser [ul]	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OD [-]	n.b.	0,18	0,17	0,11	0,65	1,02	1,46	1,73	1,16

Probe	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	2-6	2-7	2-8	2-9
Ethanol [ul]	2000	1400	2900	2400	1900	1400	900	400	0
Pheo. a-Lösung [ul]	0	100	100	100	100	100	100	100	100
Wasser [ul]	0	0	0	500	1000	1500	2000	2500	2900
OD [-]	n.b.	0,27	0,13	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Die Messkurven wurden vor Ort mit Hilfe des Messprogramms SPC300 von Becker & Hickl aufgenommen und später mit der in LabView an der Humboldt-Universität zu Berlin entwickelten Software TCSPC_V3.beta gefaltet und einem nichtlinearen Fit unterzogen. Die Ergebnisse wurden schließlich mit dem Programmpaket OriginPro 8.6 graphisch dargestellt.

2.2 Versuchsvorbereitung

Vor der Durchführung der eigentlichen Messungen am Fluorophor wurden die optimalen Parameter für den CFD bestimmt und die Spannung des im Detektor verbauten PMT so gewählt, dass sich ein optimales Verhältnis zwischen Signal und Rauschen (Signal-to-Noise-Ratio, SNR) einstellt. Schließlich wurde eine Küvette mit stark verdünntem Ludox als Streutarget verwendet, um die IRF des Systems aufzunehmen.

2.2.1 Constant Fraction Discriminator

Die untere Schwellspannung U_{schwell} des CFD konnte in der Software SPC300 angepasst werden, die obere Spannung wurde auf den Maximalwert gesetzt. Die Spannung sollte so gewählt werden, dass einerseits der Peak zur Analyse leicht erkennbar bleibt und keine Teile der Messkurven abgeschnitten werden, und andererseits das Rauschen möglichst minimiert wird.

Es wurde für jede Spannung das Verhältnis F:R der Fläche unter dem Peak F^3 zum durchschnittlichen Rauschen pro Kanal R nach folgender Formel bestimmt:

$$F = A \cdot \frac{\sqrt{\pi}}{2\sqrt{\ln 2}} \cdot \text{FWHM} \quad (4)$$

$$R = \frac{C - F}{1024} \quad (5)$$

$$F : R = \frac{F}{R} \quad (6)$$

Verwendet werden hier die vom Programm SPC300 ausgegebenen Werte für die jeweilige Messung: die Höhe des Peakmaximums A , die Halbwertsbreite des Peaks (FWHM) und

³Der Peak wurde hier als gaußförmig angenommen. In Wirklichkeit ist die Form deutlich komplexer, bleibt aber bei Variation von U_{schwell} weitgehend konstant. Die so berechneten Flächen bleiben also vergleichbar.

die Anzahl aller gemessenen Ereignisse C . Um das Rauschen pro Kanal zu berechnen wird durch die Kanalanzahl 1024 dividiert. Hohe Werte für F:R entsprechen einem gegenüber dem Rauschen deutlich differenzierten Peak. Testmessungen ohne Probe mit verschiedenen Spannungen ergaben das in Tabelle 2 dargestellte Bild:

Tabelle 2: Ermittlung des optimalen unteren Schwellwertes für den Diskriminator

U_{schwell} [mV]	5,00	10,67	15,69	21,33	30,43	40,78	50,20	60,24
Maximum A	50163	17067	12449	8118	3246	921	266	73
FWHM [ns]	-	0,55	0,55	0,53	0,53	0,52	0,48	0,34
Peakfläche F	-	10046	7264	4592	1819	508	135	26
Rauschen R	-	921	657	412	15	46	12	3
F:R	-	10,9	11,1	11,1	125,1	11,2	10,9	9,3

Der rechnerisch beste Wert ist hier bei 21,33 mV zu finden, allerdings zeigte eine optische Kontrolle, dass hier und bei größeren Spannungen bereits große Teile der Kurve abgeschnitten werden, so dass als Kompromiss für alle weiteren Messungen $U_{\text{schwell}} = 15,69 \text{ mV}$ gewählt wurde. Aufgrund der groben Abschätzungen wurde hier auf eine separate Fehlerrechnung verzichtet.

2.2.2 Rauschen

Eine weitere Störquelle des Experiments ist der verwendete PMT und die genutzte Beschleunigungsspannung zwischen seinen Dyoden U_{PMT} . Die SNR wurde hier bestimmt indem zuerst eine Messung ohne Probe und dann eine weitere Messung mit Probe durchgeführt wurde. Die Messung ohne Probe enthält nur das Hintergrundrauschen des Versuchsaufbaus. Variiert man diese Spannung ist es möglich, einen optimalen Wert für U_{PMT} zu finden, der die SNR maximiert:

$$\text{SNR} = \frac{C - C_0}{C_0} \quad (7)$$

In dieser Formel bezeichnet C die Anzahl aller gemessenen Ereignisse mit Probe und C_0 die Anzahl aller Ereignisse ohne Probe, also das Hintergrundrauschen. Für die überprüften Spannungen zwischen 0,60 V und 1,10 V ergibt sich das in Tabelle 3 aufgeführte Bild:

Tabelle 3: Abhängigkeit der SNR von der Beschleunigungsspannung des PMT

Spannung [V]	0,60	0,65	0,70	0,75	0,80	0,85	0,90	0,95	1,00	1,05	1,10
SNR [-]	1061	868	926	923	912	943	957	1035	870	826	825

Hier sind rechnerisch die Ergebnisse mit $U_{\text{PMT}} = 0,60 \text{ V}$ bzw. $0,95 \text{ V}$ optimal. Hier zeigte jedoch eine optische Kontrolle der Kurven, dass es zu Artefaktbildungen kommt (zur Illustration eines Artefakts bei zu hoher Spannung siehe Abbildung 1), weswegen für die weiteren Messungen $U_{\text{PMT}} = 0,80 \text{ V}$ gewählt wurde. Aufgrund der groben Abschätzungen wurde hier auf eine separate Fehlerrechnung verzichtet.

2.3 Apparatfunktion

Das Messsignal weicht teilweise erheblich vom theoretischen Signal ab. Dies liegt an verschiedenen Störeinflüssen, wie z.B. an der Pulsform des Lasers, dem unperfekten Lichtweg

oder der Breite des Detektors in der Messantwort. Aus diesem Grund wurde die Impulsantwort (Impulse Response Function, IRF) des Systems am Anfang gemessen und bei der Auswertung die Faltung des tatsächlichen Signals mit der IRF nach (8) betrachtet.

$$R(t) = \int_0^t L(t') T(t - t') dt' \quad (8)$$

Hierbei ist T das Fluoreszenzabklingen und L die IRF. Die Faltung wurde bei diesem Versuch mit Hilfe der Software SPC300 durchgeführt. Obwohl die IRF bei den verschiedenen Messungen geringfügig variieren kann, wurde die Apparatefunktion nur einmal aufgenommen, da der dadurch entstandene Fehler vernachlässigbar ist.

Zur Aufnahme der IRF wurden zuerst die oben bestimmten optimalen Parameter für den CFD und die Beschleunigungsspannung eingestellt. Dann wurde der Interferenzfilter vor dem PMT durch eine Lochblende ersetzt, um den Detektor für die Wellenlänge des Laserlichts empfindlich zu machen. Die genutzte Kurve ist in Abbildung 1 dargestellt.

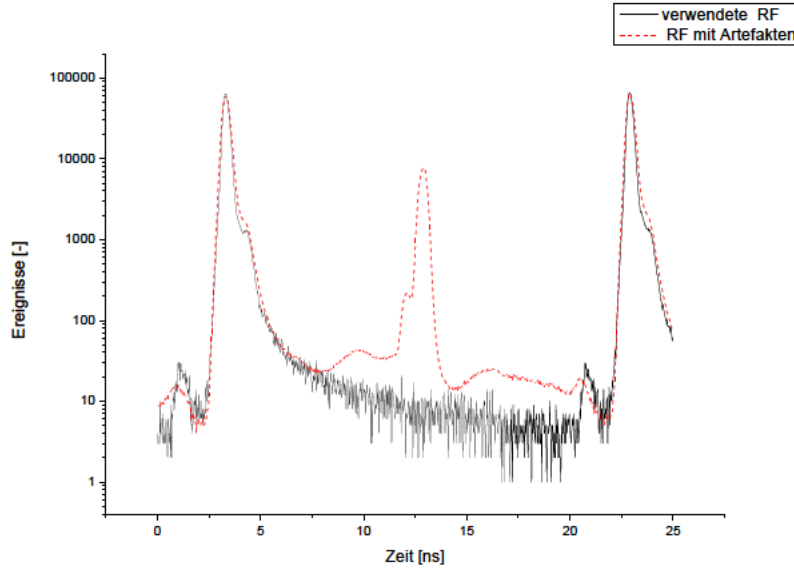


Abbildung 1: Tatsächlich verwendete Apparatefunktion (IRF)

2.4 Nichtlineares Fitting

Zur Analyse der Messdaten und Bestimmung der Lebensdauern wurde das bereitgestellte Programm TCSPC_V3_beta benutzt. Die programminterne Fit-Funktion führt einen nichtlinearen Zerfallsfit gemäß Formel (9) durch und versucht dabei, den χ^2 -Wert zu minimieren.

$$f(t) = \sum_i A_i e^{-t/\tau_i} \quad (9)$$

Hier bezeichnet A_i die zu der Lebensdauer τ_i zugehörige Amplitude. In allen Fällen wurde mit zwei Parametersets gearbeitet, also $i \in \{1, 2\}$, wobei der jeweils erste Parametersatz die physikalisch interessante Fluoreszenzlebensdauer beschreibt (siehe Abschnitt 3.1).

Wie von Becker empfohlen [2, S. 580 ff.] wurden vor der Durchführung des Fits zuerst

für jede Messreihe⁴ der optimale Offset bestimmt. Dazu wurde zuerst ein etwas größeres Analysefenster gewählt als eigentlich nötig, d.h. es wurden links neben dem Hauptpeak einige weitere Kanäle in den Fit einbezogen. Nach einem ersten groben Fit wurden dann alle übrigen Parameter (τ_i, A_i , Zeitshift) fixiert und der optimale Offset im Sinne eines minimierten χ^2 manuell gesucht [2, S. 582]. Schließlich wurde das Analysefenster wieder auf den optimalen Abstand verkleinert. Da alle Messreihen mit der gleichen IRF gefaltet werden ist es auch sinnvoll, den Zeitshift für jede Messreihe gesondert zu bestimmen. Dabei wurde ähnlich wie beim Offset vorgegangen, allerdings ohne Anpassung des Analysefensters.

Um die Unsicherheit der mit der programminternen Fit-Funktion bestimmten Werte für die Lebensdauern τ_i abschätzen zu können wurden alle Parameter fixiert und die τ_i manuell so weit nach oben und unten verändert, bis sich das optimale χ^2 um eins erhöht hatte. Bei Datensätzen mit asymmetrischer Unsicherheit wurde dann das Maximum im Sinne einer Größtfehlerabschätzung weiterverwendet.

3 Auswertung und Diskussion

3.1 Fluoreszenzlebensdauer

Zuerst wurde die Fluoreszenzlebensdauer des verwendeten Farbstoffs Pheophorbid a untersucht. Dazu wurden die Messdaten wie oben beschrieben aufgenommen, mit Hilfe der erwähnten Software mit der IRF gefaltet schließlich einem nichtlinearen Fit unterzogen. Eine Darstellung des Fits findet sich in Abbildung 2.

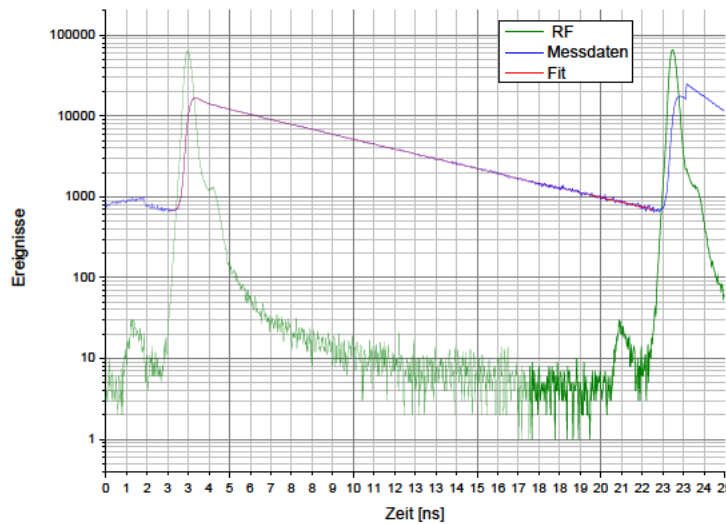


Abbildung 2: Fluoreszenzlebensdauer von Pheophorbid a. Der Fit liefert die Lebensdauern τ_1 und τ_2 mit $\chi^2 = 1,163$.

Bei der Analyse der Messdaten wurde deutlich, dass während des Versuchs ein zweiter Zerfallsprozess stattfand, denn erst der Fit mit zwei Parametersets brachte akzeptable

⁴Eine Messreihe enthält die jeweiligen Messungen zu Reabsorption, Peak-Pile-Up-Effekt, Mizellenbildung bzw. Anisotropie.

χ^2 -Werte. Becker empfiehlt in solchen Situationen ein "Trial-and-Error"-Verfahren [2, S. 584 f]:

A good fit is characterised by a χ^2 close to one, and residuals showing no noticeable systematic variations. [...] In most cases your decay curves will be fitted adequately by a single- or double-exponential model. If you define more exponential components than needed to fit the data you normally obtain two components of almost identical lifetime, or an extremely long lifetime component of very low amplitude.

Ein Fit mit drei Parametersets brachte hier keine besseren Ergebnisse.

Da den Experimentatoren keine physikalische Erklärung für den zweiten Zerfallsprozess τ_2 bekannt ist, und in [5] ein solcher bei ähnlichem Versuchsaufbau nicht erwähnt wird, ist davon auszugehen, dass es sich um einen systematischen Fehler handelt. Dieser ist entweder bedingt durch eine verunreinigte Probe oder nicht berücksichtigte Prozesse im Messaufbau selbst und wird daher im weiteren nicht weiter physikalisch interpretiert. Dies scheint gerechtfertigt, da die von der Software ermittelten wahrscheinlichen Amplituden des zweiten Zerfallsprozesses durchgehend deutlich kleiner als die des dominanten Prozesses waren.

Die Messung an Pheophorbid a ergab für die Lebensdauern

$$\tau_1 = (5,87 \pm 0,07) \text{ ns}$$

$$\tau_2 = (0,33 \pm 0,10) \text{ ns}.$$

Im Rahmen der Unsicherheit kann also der von Röder et al. in [5, S. 41] bestimmte Literaturwert von $\tau_1^{\text{Lit.}} = (5,9 \pm 0,1) \text{ ns}$ bestätigt werden.

3.2 Störeffekte

3.2.1 Reabsorbtion

Um den Effekt der Reabsorption nachweisen zu können wurden sechs Proben verschiedener Konzentration an Pheophorbid a mit einer optischen Dichte zwischen 0,1 und 1,5 gemessen und die jeweilige Lebensdauer bestimmt. Die optische Dichte wurde wie oben beschrieben durch Intensitätsmessungen ermittelt. Die Abhängigkeit der Lebensdauer von der gemessenen optischen Dichte ist in Tabelle 4 aufgeführt, die Fitkurven befinden sich im Anhang, Abbildung 8.

Tabelle 4: Abhängigkeit der Lebensdauer von der optischen Dichte OD der Probe zur Illustration des Reabsorptionseffekts

Probe	OD [-]	u_{OD}	τ_1 [ns]	u_{τ_1}	τ_2 [ns]	u_{τ_2}	red. χ^2
1-4	0,107	0,001	5,83	0,12	0,23	0,12	1,175
2-3	0,129	0,001	5,87	0,07	0,33	0,10	1,163
1-5	0,648	0,004	6,22	0,09	0,20	0,06	1,398
1-6	1,022	0,009	6,35	0,12	0,16	0,08	1,280
1-9	1,164	0,012	6,36	0,16	0,14	0,09	1,365
1-7	1,460	0,023	6,40	0,18	0,15	0,13	1,155

Eine graphische Darstellung findet sich in Abbildung 3:

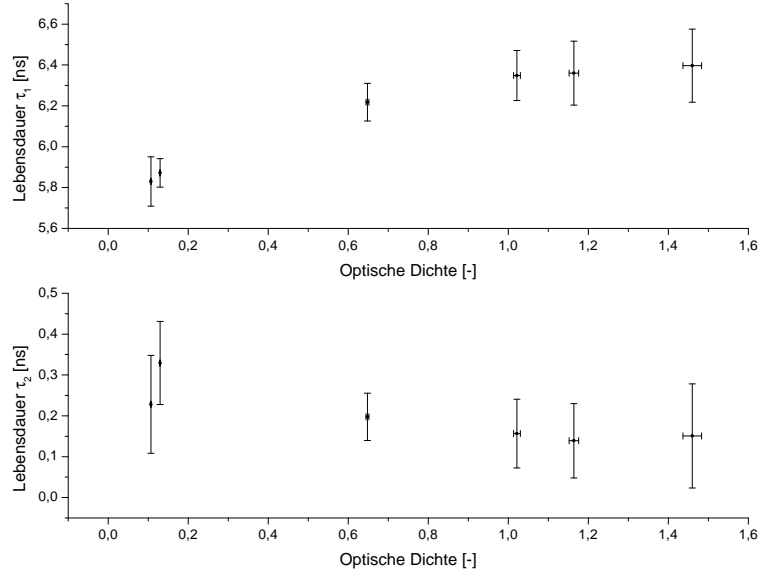


Abbildung 3: Abhängigkeit der Lebensdauer von der optischen Dichte OD der Probe zur Illustration des Reabsorptionseffekts

Wie zu erwarten wird die gemessene Lebensdauer τ_1 bei höherer Konzentration des Fluorophors größer. Durch die höhere Konzentration wird Reabsorption wahrscheinlicher, jede Reabsorption vergrößert dabei die Zeit bis zur Ankunft des Photons auf dem Detektor.

3.2.2 Peak-Pile-Up

Um den Peak-Pile-Up-Effekt nachzuweisen, wurden mehrere Messungen an der Probe 2-3 mit verschiedenen hohen Intensitäten des Lasers durchgeführt. Die Intensität wurde durch Drehung des $\lambda/2$ -Plättchens eingestellt und hinter der Küvette mit der untersuchten Probe mit Hilfe des Wattmeters bestimmt. Die Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenzlebensdauer von der Intensität des Laserstrahls ist in Tabelle 5 und Abbildung 4 dargestellt, die Fitkurven befinden sich im Anhang, Abbildung 9.

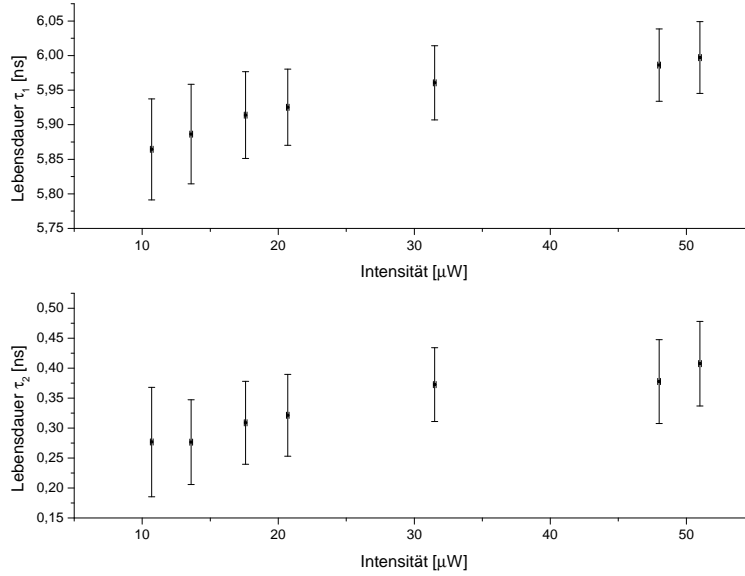


Abbildung 4: Abhängigkeit der Lebensdauer von der Intensität des Laserstrahls I zur Illustration des Peak-Pile-Up-Effekts

Es ist zu erwarten, dass die gemessene Lebensdauer mit zunehmender Intensität abnimmt, da wie oben erläutert beim Anregen mehrerer Moleküle nur das zuerst detektierte Photons gemessen wird. Dieser Effekt konnte für τ_1 nicht beobachtet werden. Die gemessenen Lebensdauern scheinen im Gegenteil bei erhöhten Intensitäten leicht zuzunehmen. Allerdings sind die Unsicherheiten so groß, dass sich die Fehlerintervalle aller Messungen überlappen und somit keine Abhängigkeit von der Laserintensität signifikant nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise ist die Intensität des verwendeten Lasers einfach zu gering, um den theoretisch erwarteten Effekt messen zu können.

Tabelle 5: Abhängigkeit der Lebensdauer von der Intensität des Laserstrahls I zur Illustration des Peak-Pile-Up-Effekts

Probe	I [μW]	u_I	τ_1 [ns]	u_{τ_1}	τ_2 [ns]	u_{τ_2}	red. χ^2
2-3	10,7	0,1	5,86	0,07	0,28	0,09	1,298
2-3	13,6	0,1	5,89	0,07	0,28	0,07	1,269
2-3	17,6	0,1	5,91	0,06	0,31	0,07	1,328
2-3	20,7	0,1	5,93	0,06	0,32	0,07	1,361
2-3	31,5	0,1	5,96	0,05	0,37	0,06	1,372
2-3	48,0	0,1	5,99	0,05	0,38	0,07	1,304
2-3	51,0	0,1	6,00	0,05	0,41	0,07	1,279

3.3 Löslichkeit und Mizellenbildung

Wie im Abschnitt 2.1.1 erläutert, ist das verwendete Fluorophor nicht in Wasser löslich und verliert dort seine fluoreszierenden Eigenschaften. Um dies zu untersuchen, wurden sechs Proben gleichen Volumenanteils an Pheophorbid a aber mit unterschiedlichem Wasseranteil gemessen und die Fluoreszenzlebensdauer bestimmt. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 6 dargestellt, die Fitkurven finden sich im Anhang, Abbildung 11.

Tabelle 6: Abhängigkeit der Lebensdauer vom Anteil Wassers W am Gesamtvolumen

Probe	W [%]	u_W	τ_1 [ns]	u_{τ_1}	τ_2 [ns]	u_{τ_2}	red. χ^2
2-3	0,00	0,00	5,94	0,07	0,31	0,08	1,273
2-4	16,67	0,03	5,94	0,07	0,42	0,09	1,353
2-5	33,33	0,06	5,96	0,07	0,48	0,09	1,206
2-6	50,00	0,09	5,84	0,08	0,45	0,08	1,286
2-7	66,67	0,12	5,27	0,11	0,37	0,11	2,227
2-9	96,67	0,18	4,06	0,27	0,32	0,30	1,104

Wie in Abbildung 5 ersichtlich ist, nimmt die Fluoreszenzlebensdauer τ_1 mit zunehmenden Wasseranteil ab. Besonders signifikant wird dieser Effekt ab einem Wasseranteil von ca. 50 Prozent. Dies stimmt sehr gut mit der Vorhersage von [3] überein. Physikalisch ist dies dadurch zu erklären, dass sich die hydrophoben Pheophorbid a-Moleküle in Wasser zu Gruppen zusammenschließen. Dadurch verschieben sich die Energieniveaus der Elektronen, die im gelösten Zustand (also bei einzelnen Farbstoff-Molekülen) durch den Laser angeregt werden, und die Fluoreszenz ist nicht mehr der dominante Entleerungskanal. Die gemessene Lebensdauer wird also nicht mehr vorwiegend durch Fluoreszenz bestimmt, sondern zunehmend durch andere Prozesse.

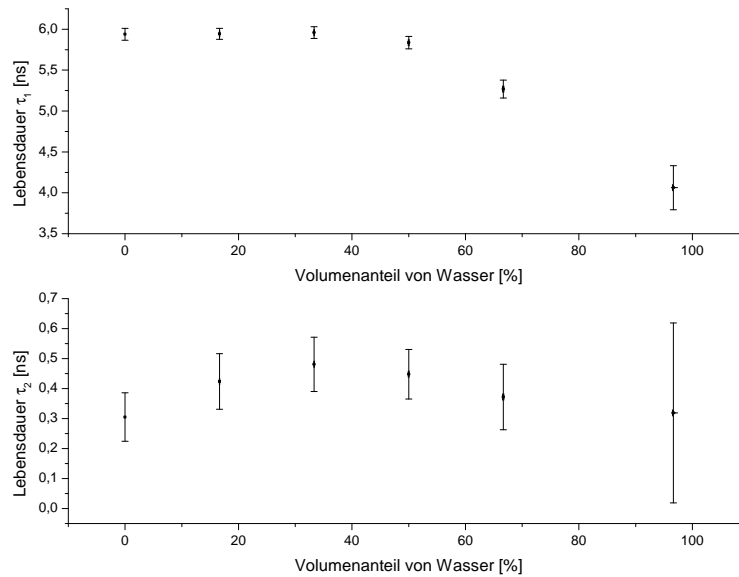


Abbildung 5: Lebensdauer τ_1 in Abhängigkeit des Volumenanteils von Wasser im Lösungsmittel

Nun wurde etwas Triton X-100 zur Probe mit dem größten Wasseranteil (2-9) gegeben und die Fluoreszenzlebensdauer erneut bestimmt. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 7 dargestellt. Bei Triton X-100 handelt es sich um ein nichtionisches Tensid. Bei der Zugabe bilden sich wie in Abschnitt 2.1.1 erläutert Mizellen um die einzelnen Pheophorbid-Moleküle, wodurch diese in Wasser löslich werden. Es ist daher zu erwarten, dass die gemessene Fluoreszenzlebensdauer wieder zunimmt und sich dem Wert des in reinem Ethanol gelösten Pheophorbid a annähert.

Dies konnte prinzipiell beobachtet werden. Die gemessene Lebensdauer der Probe mit rund

94% Wasseranteil steigt von $\tau_1 = (4,06 \pm 0,27) \text{ ns}$ auf $\tau_1 = (6,29 \pm 0,08) \text{ ns}$. Allerdings ist dieser Wert auch deutlich größer, als die gemessene Lebensdauer $\tau_1 = (5,94 \pm 0,07) \text{ ns}$ von Pheophorbid a in reinem Ethanol (Probe 2-3). Die Ursache für diese Abweichung konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden.

Tabelle 7: Lebensdauer in Wasserlösung mit und ohne Zugabe von Triton X-100 und Vergleichswert für Ethanollösung

Probe	W [%]	u_W	T [%]	u_T	τ_1 [ns]	u_{τ_1}	red. χ^2
2-9	94,16	0,18	0,00	0,00	4,06	0,27	1,098
2-9	94,16	0,17	2,60	0,01	6,29	0,08	1,173
2-3	0,00	0,00	0,00	0,00	5,94	0,07	1,273

3.4 Anisotropie

Um die Anisotropie der Fluoreszenz zu untersuchen, wurde die Fluoreszenzlebensdauer in Abhängigkeit von der Polarisation der emittierten Photonen gemessen. Hierzu wurde der winkelverstellbare Polfilter hinter der Küvette einmal parallel und einmal senkrecht zur Polarisation der Photonen vor der Küvette eingestellt. Mit (1) kann daraus die Anisotropie berechnet werden.

Die Messung wurde einmal für eine Probe mit in reinem Ethanol gelösten Pheophorbid a (2-3) und einmal für die Probe mit dem hohen Wasseranteil und Triton X-100 durchgeführt (2-9 mit Triton), die Fitkurven befinden sich im Anhang, Abbildung 10. Die Anisotropie wurde sowohl für die Messdaten, als auch für die aus dem nichtlinearen Fit gewonnenen Daten berechnet und in Abhängigkeit von der Zeit in den Abbildungen 6 und 7 graphisch dargestellt.

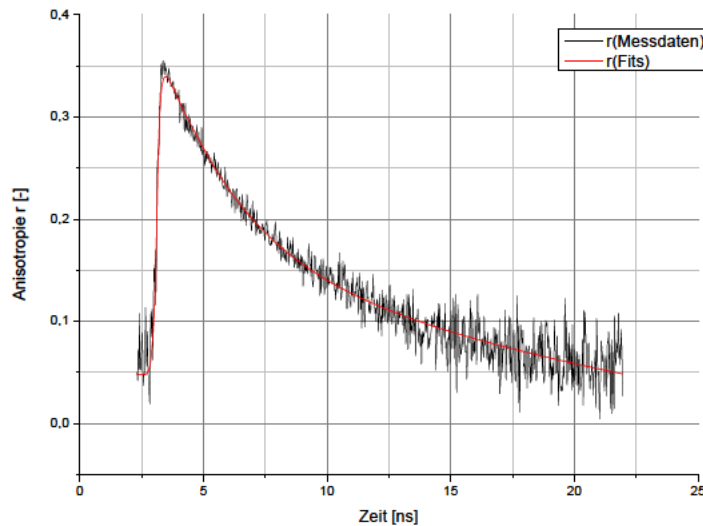


Abbildung 6: Anisotropie für Probe mit 2,6 % Triton und 94,2 % Wasser

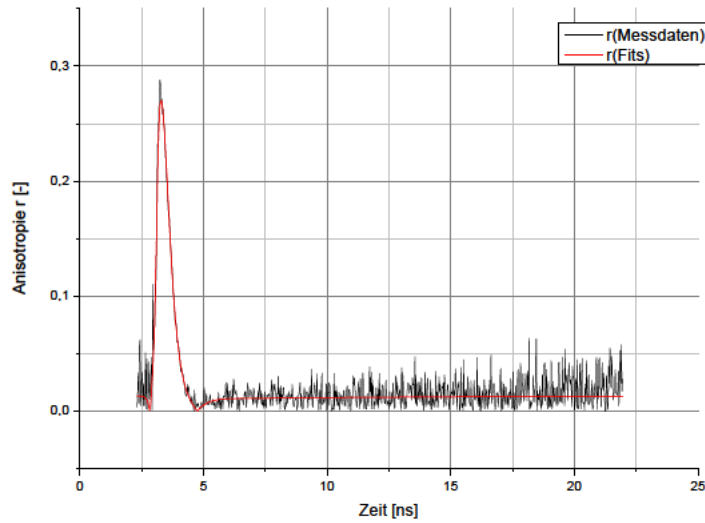


Abbildung 7: Anisotropie für Probe ohne Triton und Wasser

Wie erwartet nimmt die Anisotropie für die in Mizellen eingebetteten Farbstoff-Moleküle deutlich langsamer ab, da die Korrelationszeit der Rotationsdiffusion nach (2) proportional zum Volumen wächst und das Volumen der von Mizellen eingeschlossenen Farbstoff-Moleküle deutlich größer ist als ein einzelnes Molekül.

4 Schlussfolgerungen

Der in [5] genannte Wert für die Fluoreszenzlebensdauer τ_1 von Pheophorbid a konnte mit dem hier gefundenen Messergebnis von $\tau_1 = (5,87 \pm 0,07) \text{ ns}$ im Rahmen der Unsicherheit bestätigt werden. Dabei trat - wie auch in den folgenden Messreihen - eine zweite Abregung auf, deren physikalische Ursache aber nicht bestimmt werden konnte.

Die theoretisch auftretenden Störeffekte konnten nur teilweise nachgewiesen werden. Der für die Reabsorption vorausgesagte Effekt ist qualitativ deutlich sichtbar, wohingegen die Messreihe zum Peak-Pile-Up-Effekt nicht aussagekräftig ist. Dies liegt vermutlich an einer zu geringen Intensität des verwendeten Pulsasers.

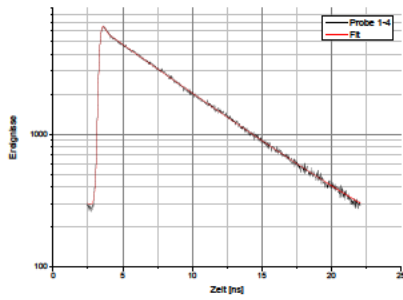
Die Untersuchungen zur Löslichkeit von Pheophorbid a in Wasser bestätigten die Vorhersagen aus der Theorie: ab etwa 50 Prozent Wasseranteil im Lösungsmittel nahm die gemessene Fluoreszenzlebensdauer stark ab, ein Anzeichen dafür, dass die Fluoreszenz nicht mehr den dominanten Entleerungskanal für die Abregung darstellt. Bei Zugabe von Triton X-100 und daraus folgender Mizellenbildung konnte dieser Effekt neutralisiert werden, die hier gemessene Lebensdauer nähert sich dann wieder der Situation ohne Wasser an.

Auch die Betrachtungen zur Anisotropie der Fluoreszenz bestätigten die Theorie. Insbesondere konnte nachgewiesen werden, dass die Anisotropie für Pheophorbid a in Ethanol deutlich schneller abklingt als bei in Mizellen organisiertem und in Wasser gelöstem Pheophorbid a. Dies liegt im größeren Volumen der Mizellen gegenüber einzelnen Farbstoff-Molekülen begründet, welches die Drehung der Moleküle verlangsamt.

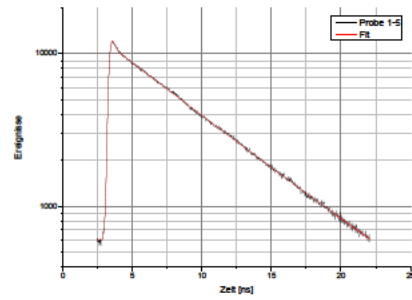
Literatur

- [1] Barlow, R. J. *Statistics: A Guide to the Use of Statistical Methods in the Physical Sciences*. Wiley, 1. Auflage, 1989.
- [2] Becker, W. *The bh TCSPC Handbook*. Becker & Hickl GmbH, 5. Auflage, Oktober 2012.
- [3] Budau, J. M. und St. Hackbarth. *Zeitkorellierte Einzelphotonenzählung - Versuchsskript*. Humboldt-Universität zu Berlin, 2013.
- [4] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York, 1983.
- [5] Röder, B., Th. Hanke, St. Oelckers, St. Hackbarth und Ch. Symietz. *Photophysical properties of pheophorbide a in solution and in model membrane systems*. J. Porphyrins Phthalocyanines 4, S. 37-44, 2000.

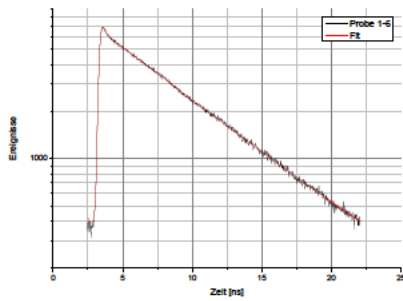
A Anhang



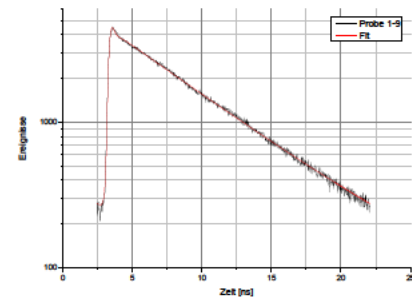
(a) Fit für $OD = 0,11$



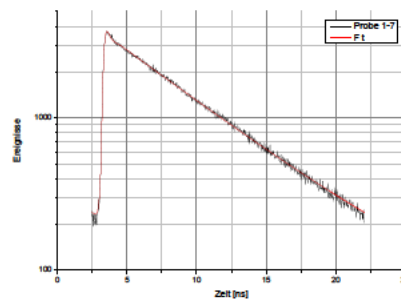
(b) Fit für $OD = 0,65$



(c) Fit für $OD = 1,02$

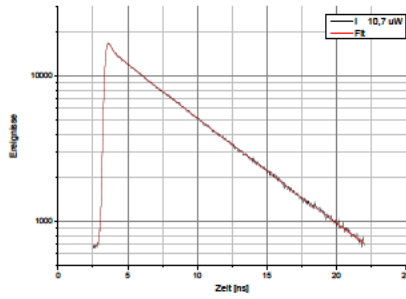


(d) Fit für $OD = 1,16$

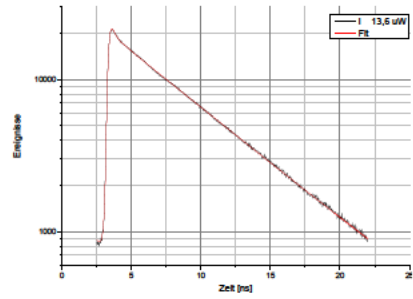


(e) Fit für $OD = 1,46$

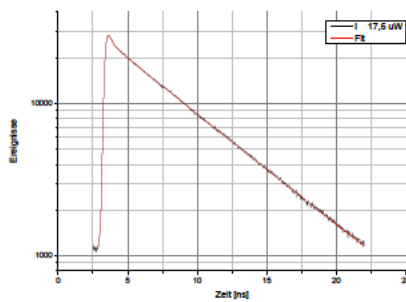
Abbildung 8: Fitkurven bei verschiedenen optischen Dichten zum Reabsorptionseffekt



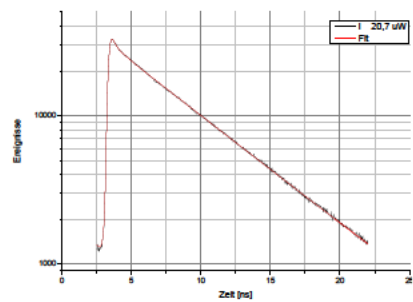
(a) Fit bei $I = 10,7 \mu\text{W}$



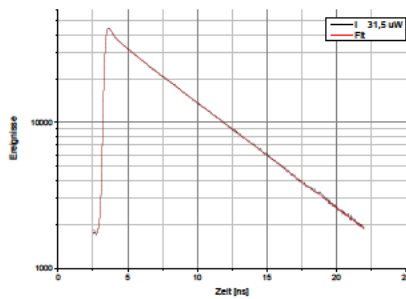
(b) Fit bei $I = 13,6 \mu\text{W}$



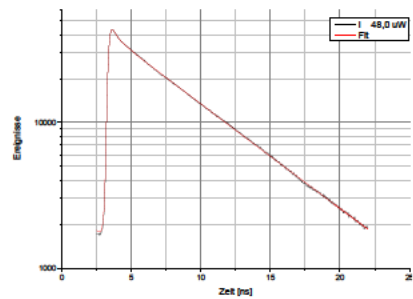
(c) Fit bei $I = 17,6 \mu\text{W}$



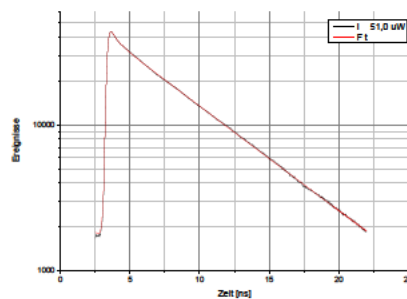
(d) Fit bei $I = 20,7 \mu\text{W}$



(e) Fit bei $I = 31,5 \mu\text{W}$

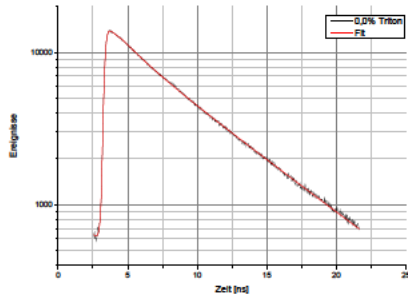


(f) Fit bei $I = 48,0 \mu\text{W}$

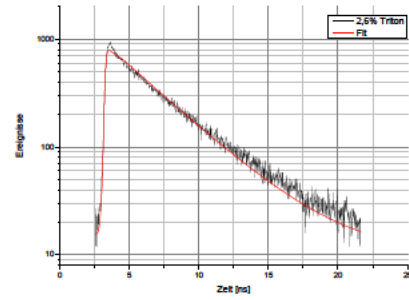


(g) Fit bei $I = 51,0 \mu\text{W}$

Abbildung 9: Fitkurven bei verschiedenen Intensitäten des Lasers zum Peak-Pile-Up-Effekt

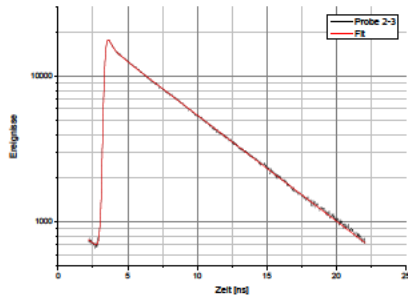


(a) Fit für Lösung ohne Triton

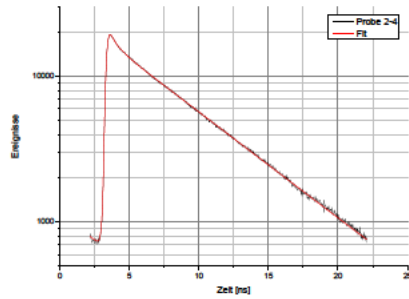


(b) Fit für Lösung mit geringem Tritonanteil

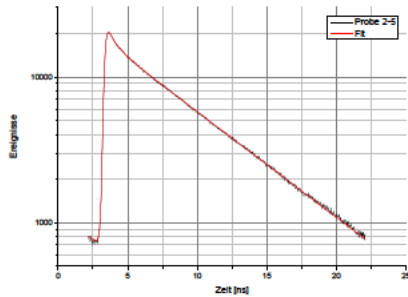
Abbildung 10: Fitkurven für Lösung mit und ohne Triton-Beimischung



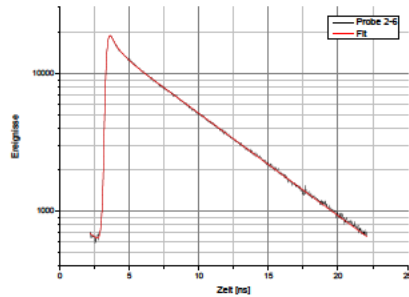
(a) Fit für $W = 0,0 \%$



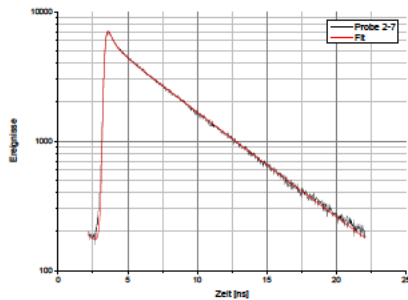
(b) Fit für $W = 16,7 \%$



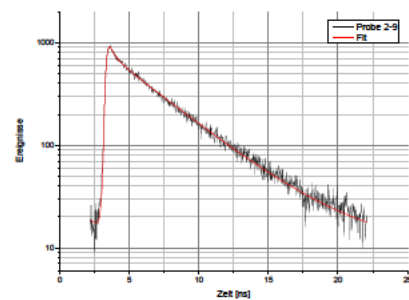
(c) Fit für $W = 33,3 \%$



(d) Fit für $W = 50,0 \%$



(e) Fit für $W = 66,7 \%$



(f) Fit für $W = 96,7 \%$

Abbildung 11: Fitkurven bei verschiedenen Wasseranteilen an der Gesamtlösung