

**Steigerung der Signalstärke und der  
Photostabilität von Fluorophoren in der  
Einzelmolekülspektroskopie**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Daniela Pfiffi**

aus Landstuhl

Düsseldorf 2010



Aus dem Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie II  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Claus A.M. Seidel

Korreferent: PD Dr. Klaus Schaper

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2010



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>4</b>
2.1    Verwendete Chemikalien.....	4
2.2    Proben und Probenzubereitung .....	5
2.3    Cyclische Voltammetrie.....	9
2.4    Absorptionsspektroskopie.....	10
2.5    Fluoreszenzspektroskopie .....	10
2.6    Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie .....	11
2.7    Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie .....	11
2.8    Photozerstörungsmessung.....	12
<b>3. Theoretischer Teil.....</b>	<b>13</b>
3.1    Fluoreszenzeigenschaften von Molekülen.....	13
3.1.1    Fluoreszenzquantenausbeuten und -lebensdauern.....	15
3.2    Intermolekulare photophysikalische Prozesse nach elektronischer Anregung.....	16
3.2.1    Photoinduzierter Elektronentransfer.....	17
3.2.2    Energietransfer .....	19
3.2.3    Wechselwirkungen mit molekularem Sauerstoff .....	22
3.3    Das elektronische Zustandsmodell eines Fluoreszenzfarbstoffs.....	23
3.4    Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie .....	26
3.4.1    Die Korrelationsfunktion.....	27
3.4.2    Das Fluoreszenzsignal .....	29

3.5	Photostabilität .....	31
3.5.1	Kinetik der Photozerstörung.....	32
3.6	Design intramolekularer Photoprotektoren .....	34
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>35</b>
4.1	Übersicht über die Oxidations- und Reduktionspotentiale verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe und Additive .....	35
4.1.1	Nomenklatur der Radikale von Rhodamin 123 .....	36
4.1.2	Fluoreszenzfarbstoffe .....	36
4.1.3	Diphenylhexatriene .....	37
4.1.4	Azobenzole .....	39
4.1.5	Triplettlöcher und Antioxidantien .....	40
4.2	Diphenylhexatriene als Triplettlöcher für Rhodamine 123.....	41
4.2.1	Lage der Energieniveaus und spektroskopische Eigenschaften.....	41
4.2.2	Redoxeigenschaften der DPHs .....	43
4.2.3	Bestimmung der bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten der Triplettlöschung durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie.....	46
4.2.4	Zusammenfassung der Diphenylhexatriene .....	51
4.3	Einfluss von signalsteigernden Additiven auf die Photophysik von Rhodamin 123 .....	52
4.3.1	Cyclooctatetraen-Carbonsäure .....	52
4.3.2	Azobenzol-Derivate: Löschung von Triplet- und Radikalzuständen.....	55
4.3.3	Geschwindigkeitskonstante für Oxidationsprozesse.....	63
4.3.4	Steigerung der Photostabilität von Rhodamin 123 mit Azofarbstoffen .....	64
4.4	Untersuchung der triplettlöschenden Wirkung von AAZB bei weiteren Fluorophoren .....	69
4.5	Steigerung der Signalstärke bei fluoreszenzmarkierten Biomolekülen.....	73
4.6	Bichromophore .....	74
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>79</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>83</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>89</b>
7.1	Überblick über die verwendeten Gleichungen .....	89
7.1.1	Die Korrelationsfunktion (3.4-10).....	89
7.1.2	Die Fluoreszenzzählrate $F_{cpm}$ pro Molekül (3.4-12) .....	90

---

7.1.3	Amplitude und Korrelationszeitzeit des Radikalbunchingterms von $G_R(t_c)$ .	91
7.2	Abschätzung der mittleren Leistungsdichte $\langle I \rangle$ .....	91
7.3	Der Einfluss der Geschwindigkeitskonstante $k_{red}'$ der Löschung des Radikalkations auf die Amplitude $A_R$ des Bunchingterms .....	92
7.4	Diphenylhexatriene .....	94
7.4.1	Cyclische Voltammetrie .....	94
7.4.2	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie der DPHs.....	94
7.5	FCS-Messdaten von COC.....	98
7.6	FCS-Messdaten der Azobenzole.....	99
7.7	Vergleich der Ergebnisse aus den FCS- und $F_{cpm}$ -Analysen .....	99
7.8	Simulation der Fluoreszenzzählrate für Alexa 488.....	100
7.9	FCS-Messdaten der fluoreszenzmarkierten DNA-Proben.....	100
	<b>Danksagung.....</b>	<b>103</b>
	<b>Erklärung .....</b>	<b>105</b>
	<b>Publikationen .....</b>	<b>106</b>



# 1. Einleitung

Seit der ersten Detektion einzelner Moleküle mittels optischer Methoden<sup>1,2</sup> entwickelte sich die laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Spezifität zur einer der wichtigsten Techniken, um strukturelle und dynamische Prozesse in Biomolekülen zu untersuchen.<sup>3,4</sup> Im Gegensatz zu Ensemblemessungen bleibt bei Einzelmolekülexperimenten die Inhomogenität eines Signals erhalten und ermöglicht den Zugang zu Informationen über Struktur und Dynamik eines Systems auf molekularer Ebene.<sup>5</sup>

Hohe Signalstärken sind für Einzelmolekül-Fluoreszenzexperimente unerlässlich, um die notwendigen Informationen wie Scangeschwindigkeit oder Zeitauflösung zu erhalten. Auch für die hochauflösende Analyse von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer-Experimenten (FRET), wie sie zur Bestimmung von Abständen zwischen farbstoffmarkierten Positionen in Biomolekülen gebräuchlich sind, wird eine ausreichende Photonenzahl benötigt, die zur Reduktion des statistischen Photonenrauschens führt.<sup>6</sup> Die Suche nach der Optimierung des Fluoreszenzsignals ist speziell in Anwendungen wie die Einzelmoleküldetektion oder die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie unumgänglich, da hier das Fluoreszenzsignal nicht durch höhere Fluorophorkonzentrationen erreicht werden kann. Folglich müssen hohe Laserleistungen verwendet werden, wobei das dadurch maximal erreichbare Signal durch die Photophysik des Farbstoffs limitiert ist. Beim Einsatz von hohen Anregungsleistungsdichten in der konfokalen Mikroskopie wird bei

Fluoreszenzfarbstoffen wie Rhodaminen eine hohe Population verschiedener Dunkelzustände beobachtet, die eine Signalsättigung und eine irreversible Photozerstörung zur Folge haben.<sup>7</sup> Photozerstörungsreaktionen sind größtenteils auf eine erhöhte Reaktivität des Moleküls im angeregten Zustand zurückzuführen und skaliert daher mit der Anregungsintensität.<sup>8</sup>

In diesem Zusammenhang ist es wichtig, den Fluorophor hinsichtlich seiner Fluoreszenzzahlrate, der maximalen Beobachtungsdauer und der Photostabilität zu optimieren. Dabei ist die Auswahl der optimalen Konditionen schwierig. Die Charakterisierung der photophysikalischen und photochemischen Prozesse eines Fluoreszenzfarbstoffs ist dabei von großem Nutzen.

Zur Verbesserung der Signalstärke und Photostabilität wurden in der Vergangenheit unterschiedliche Strategien verfolgt, die hauptsächlich auf der Zugabe von chemischen Additiven beruhen, welche zur Deaktivierung der Dunkelzustände beitragen. Dazu gehören Antioxidantien, die zur Reduktion von photooxidierten Fluorophoren beitragen, Triplettlöscher, die den Triplettzustand über einen Energietransfermechanismus deaktivieren sowie eine Mischung aus Reduktions- und Oxidationsmitteln, wobei die Deaktivierung des Triplettzustand über einen zweistufigen Elektronentransfer erfolgt.<sup>9-12</sup> Das Hauptziel dieser Arbeit bestand darin, selektive Löschmoleküle zu finden, die die Lebensdauer der Dunkelzustände durch Energie- und/oder Elektronentransfermechanismen reduzieren. Wichtig dabei ist, dass bei der Löschung des Triplettzustands eine gleichzeitige Löschung des Singulettzustands vermieden wird, was im Fall einer Löschreaktion durch Energieübertragung durch den Einsatz von Additiven mit großen Singulett-Triplett-Energielücken erreicht wird. Weiterhin dürfen photochemisch induzierte bimolekulare Redoxprozesse, wie die Oxidation und die Reduktion des Fluorophors im angeregten Zustand, nicht stattfinden, da diese bestenfalls zum nicht erwünschten Löschen der Fluoreszenz und im schlimmsten Fall zur Zerstörung des Chromophors führen.

Kovalent gebundene Donor-Akzeptor-Systeme wurden schon früh zur Überprüfung der Theorie des Elektronen- und Energietransfers eingesetzt.<sup>13,14</sup> Später verlagerte sich der Schwerpunkt, das Design und die Synthese dieser Systeme wurde zum Mittel für die Identifikation von transienten molekularen Intermediaten und sehr schneller Transferprozesse in der Photosynthese.<sup>15</sup> Nur vereinzelt wurden Versuche unternommen, die intramolekularen Mechanismen kovalent gebundener Chromophore zur Optimierung des Fluoreszenzsignals und Verbesserung der Photostabilität anzupassen.<sup>16</sup>

Nach der detaillierten Charakterisierung der intermolekularen Wirkung der Additive auf den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 stellt diese Arbeit die Frage nach den intramolekularen Mechanismen, die durch kovalent an den Fluorophor gebundene Photoprotektoren hervorgerufen werden.

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) ist eine leistungsfähige Methode zur Untersuchung von photochemischen oder photophysikalischen Prozessen, die zu Fluktuationen im Fluoreszenzsignal führen.<sup>17,18</sup> Die Anpassung der Korrelationsfunktion des Fluoreszenzsignals liefert die charakteristischen Relaxationszeiten, die den kinetischen Prozess beschreiben. Fluktuationsprozesse von Fluoreszenzfarbstoffen auf unterschiedlichen Zeitskalen wie beispielsweise Translations- und Rotationsdiffusion,<sup>19</sup> chemische Reaktionen,<sup>20,21</sup> Triplettkinetik,<sup>22,23</sup> Ladungstransfer,<sup>24</sup> Isomerisierung,<sup>25</sup> und Photozerstörung<sup>7</sup> waren Gegenstand von FCS-Experimenten.

Diese Arbeit bedient sich u.a. der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie als Methode zur Untersuchung inter- und intramolekularen Wechselwirkungen zwischen einem Fluoreszenzfarbstoff und photoprotektiven Substanzen unterschiedlicher Verbindungsklassen. In intermolekularen Experimenten werden zunächst die detaillierten Elektronen- und Energietransferprozesse durch Zugabe des Additivs zum freien Farbstoff des Systems charakterisiert. Bei der Auswahl der Löschmoleküle bieten sich aufgrund ihrer großen Singulett-Triplett-Energielücken die aromatischen Pseudo-Carotinoide, Azobenzolderivate und ein wasserlösliches Cyclooctatetraenderivat an.

Da unter bestimmten Voraussetzungen die Zugabe von triplettlöschenden oder antioxidativen Substanzen aufgrund von Ladungstransferreaktionen durchaus auch nachteilige Effekte auf die Fluoreszenzzählrate haben können, werden zur Bewertung der verschiedenen Elektronentransferreaktionen die Reduktions- und Oxidationspotentiale der beteiligten Fluorophore und Additive mittels cyclischer Voltammetrie bestimmt.

FCS-Messungen erlaubt die Untersuchung der Löscheffizienz von Additiven auf die Dunkelzustände verschiedener Fluorophore sowie den Einfluss auf das Fluoreszenzsignal. Stationäre Photozerstörungsmessungen sollen die Auswirkung der Additive auf die Photostabilität analysieren und die detaillierten Kanäle der irreversiblen Ausbleichreaktionen aufklären. Fluoreszenzmarkierte DNA-Proben sollen die signalsteigernde Wirkung in biologischer Umgebung zeigen. Erste Proben von kovalent gebundenen Photoprotektoren werden fluoreszenzspektroskopisch auf ihre intramolekularen Wechselwirkungen hin untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Chemikalien

Alle eingesetzten Chemikalien wurden in den angegebenen Qualitäts- und Reinheitsstufen bei folgenden Firmen erworben:

Name	Hersteller	Reinheitsgrad
Aktivkohle	Merck	p.A.
Dinatriumhydrogenphosphat	Grüssing	p.A.
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem	p.A.
Hellmanex	Hellma	
Tetra-n-butylammonium-hexafluorophosphate (TBA PF <sub>6</sub> )	Fluka	puriss
Tetrahydrofuran (THF)	VWR	p.A.
Acetonitril (AN)	Sigma-Aldrich	wasserfrei
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich	wasserfrei
Ethanol (EtOH)	Merck	Uvasol
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich	z. S.
Schwefelsäure	VWR	p.A.
Diphenylhexatriene (DPH)	Biochimika	HPLC

Name	Hersteller	Reinheitsgrad
Cyclooctatetraen (COT)	Aldrich	98 %
ME	Fluka	p.A.
n-Propylgallat (nPG)	Fluka	HPLC
Vitamin C	Sigma	> 99 %
$\beta$ -Mercaptoethanolamin (MEA)	Sigma	> 98 %
Methyl Viologen	Aldrich	98 %
Argon	Air Liquide	5.0
Stickstoff	Air Liquide	5.0
Synthetische Luft	Air Liquide	5.0
Ferrocen	Alfa Aesar	z.S.
Trolox	Fluka	97 %

## 2.2 Proben und Probenzubereitung

### *Pufferreinigung*

Der Phosphatpuffer (25 mM Natriumphosphatpuffer, pH7) wurde mit Reinstwasser (Wasseraufbereitungssystem Arium 611VF, Sartorius, Göttingen) angesetzt. Um fluoreszierende Verunreinigungen zu entfernen, wurde der Puffer vor Gebrauch zunächst 5 min mit Aktivkohle gerührt und anschließend durch einen Spritzenvorsatz- Filter (0.2  $\mu$ m Porengröße, Schleicher&Schuell, Dassel) filtriert.

### *Fluoreszenzfarbstoffe*

In der folgenden Tabelle sind die Strukturformel, soweit bekannt, und die spektroskopischen Eigenschaften der verwendeten Fluorophore in Wasser aufgeführt.

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 2.2-1:** Strukturformeln, Extinktionskoeffizienten, Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorophore in Wasser.

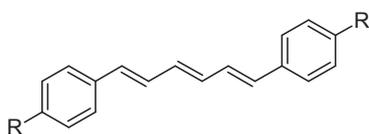
	Hersteller	$\epsilon$ / $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$\lambda_{ex}$ / nm	$\lambda_{em}$ / nm	
	Rh123	Sigma-Aldrich	0.70	500	525 <sup>e</sup>
	Rh110	Sigma-Aldrich	0.68	496	520 <sup>e</sup>
	Alexa 488	Invitrogen <sup>a</sup>	0.73	495	519 <sup>e</sup>
	Atto 590	Atto-Tec	1.2	594	624 <sup>f</sup>
	Atto Rho14 <sup>b</sup>	Atto-Tec	1.4	625	646 <sup>f</sup>
	Atto 647N <sup>c</sup>	Atto-Tec	1.5	644	669 <sup>f</sup>
	Atto 655 <sup>d</sup>	Atto-Tec	1.25	663	684 <sup>f</sup>
	Rh800	Sigma-Aldrich	0.89	682	712 <sup>g</sup>

<sup>a</sup> Hydrolisierter Alexa 488-Succinimidyl-Ester. <sup>b</sup> Strukturformel ähnlich, siehe Referenz<sup>26</sup>. <sup>c</sup> Strukturformel aus Referenz<sup>27</sup>. <sup>d</sup> Strukturformel ähnlich.<sup>28,29</sup> <sup>e</sup> Quelle siehe Referenz<sup>30</sup>. <sup>f</sup> Quelle: Atto-Tec. <sup>g</sup> In Methanol.

Die nachfolgenden Substanzen der Verbindungsklassen der Bichromophore, Azobenzole, Diphenylhexatriene und Cyclooctatetraene wurden im den Arbeitskreisen von PD Dr. K. Schaper und Prof. Dr. J.J. Müller am Institut für Organische und Makromolekulare Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf synthetisiert. Die Verbindung 4-(Phenylazo)benzoesäure (AZB) wurde von Aldrich (#479624) bezogen.

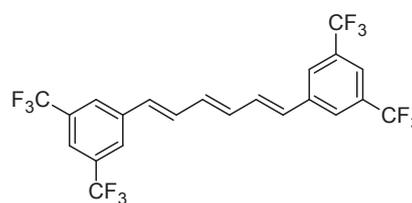
Die Lösungen der Additive wurden, wenn nicht anders vermerkt, vor jeder Messung frisch im entsprechenden Lösungsmittel bzw. gereinigten Puffer angesetzt und im Dunkeln aufbewahrt.

### Diphenylhexatriene (DPHs)



R =

-H	DPH
-F	F-DPH
-CN	CN-DPH
-NMe <sub>2</sub>	Me <sub>2</sub> N-DPH
-CF <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub> -DPH
-NMe <sub>2</sub> H <sup>+</sup>	HMe <sub>2</sub> N <sup>+</sup> -DPH
-OMe	MeO-DPH



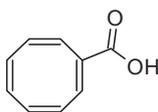
bis-CF<sub>3</sub>-DPH

DPH-Derivate mit Endgruppen unterschiedlicher elektronischer Eigenschaften (elektronenziehende und elektronenschiebende) wurden synthetisiert.

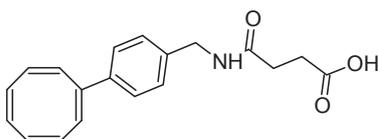
### Cyclooctatetraen



COT

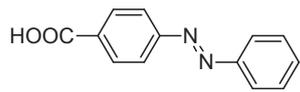


COC

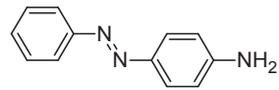


Mayer-COT

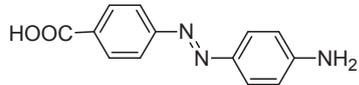
**Azobenzole**



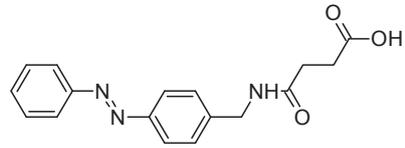
AZB



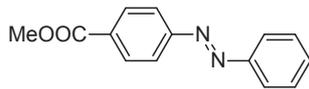
BB105



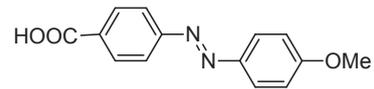
AAZB



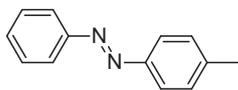
JS57



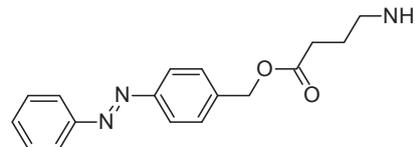
BB98



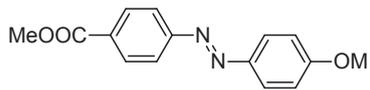
BB80



BB99

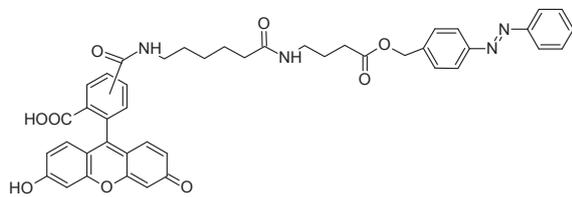


BB117

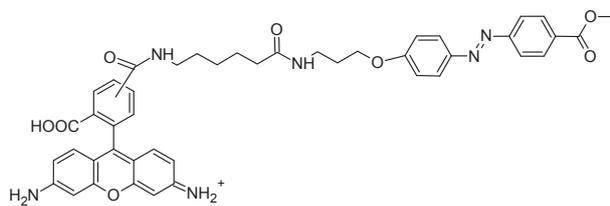


BB93

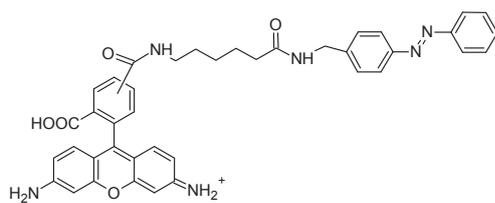
**Bichromophore**



BB130



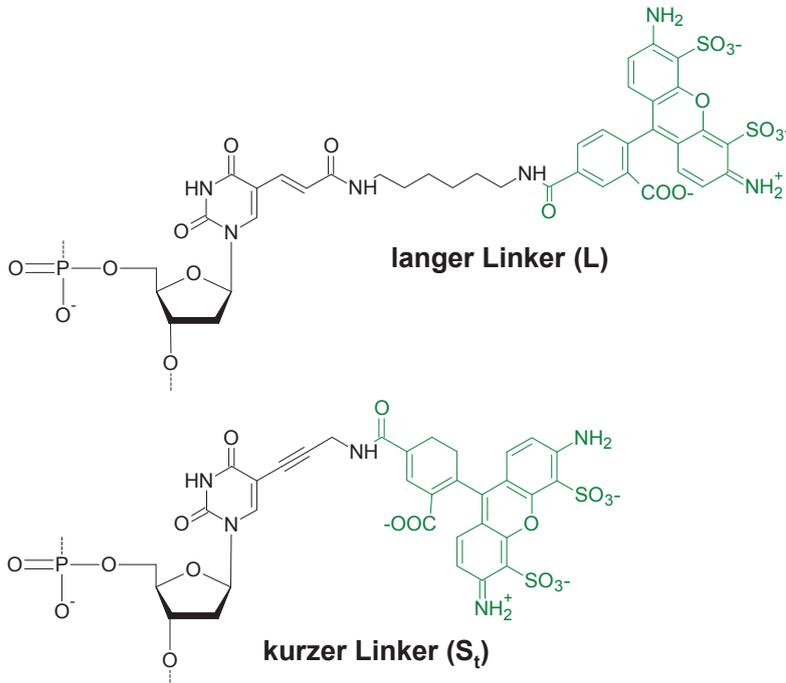
BB162



BB165

## DNA

Es wurden zwei fluoreszenzmarkierte DNA-Proben verwendet, die sich in der Länge des Linkers zwischen dem Fluorophor Alexa 488 und dem DNA-Rückgrat unterscheiden. Die Position des Fluorophors in der Sequenz ist grün hinterlegt.



5'-d(ACT GAT CG**T** AAG CTA CTG AAG CGT A)-3'  
 3'-d(TGA CTA GCA TTC GAT GAC TTC GCA T)-5'

## 2.3 Cyclische Voltammetrie

Um eine möglichst wasserfreie Messung zu gewährleisten, wurde die elektrochemische Messzelle heiß zusammgebaut und bis zum Erkalten mit trockenem Stickstoff gespült. 10 ml einer Leitsalz-Lösung (100 mM TBA PF<sub>6</sub>) im entsprechenden wasserfreien Lösungsmittel (N,N-Dimethylformamid (DMF), Sigma-Aldrich #227056 bzw. Acetonitril (AN), Sigma-Aldrich #271004) wurden zur Entfernung des gelösten Sauerstoffs im Messgefäß mit trockenem Stickstoff 15 min gespült. Die elektrochemische Messung wurde mit einem Potentiostat (Metrohm, AUTOLAB PGSTAT 20) und einer entsprechenden Software (GPES, Eco Chemie, Version 4.9) durchgeführt. Es wurde eine Drei-Elektroden-Anordnung in einer Messzelle mit einer Glas-Carbon-Elektrode (Metrohm, 6.1204.110) als Arbeitselektrode, einer Pt-Elektrode als Gegenelektrode und als Referenz eine Ag/AgCl

(Metrohm, 6.0726.100, 11040486), die mit einer 100 mM TBA PF<sub>6</sub> in AN gefüllt wurde, verwendet. Die Arbeitselektrode wurde vor jedem Lauf mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in Wasser poliert. Die Scangeschwindigkeit betrug 100 mV/s. Nach jeder Messung wurde das Potential von Ferrocen als Referenz bestimmt. Die angegebenen Potentiale wurden auf das Ferrocen-Potential von  $E_{ox} = 0.63$  V gegen die Standard-Wasserstoff-Elektrode bezogen.<sup>31</sup> Die Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen betrug 0.1 – 0.3 mM.

### 2.4 Absorptionsspektroskopie

Die Charakterisierung der optischen Übergänge im UV/Vis-Bereich erfolgte mit einem Spektralphotometer der Firma Varian (Modell Cary 300) in Quarzküvetten mit Schichtdicken von 0.2 bis 1 cm. Alle Messungen wurden bei einer Temperatur von 25 °C in Lösungsmittel mit spektroskopischem Reinheitsgrad durchgeführt.

### 2.5 Fluoreszenzspektroskopie

Die stationären Fluoreszenzmessungen wurden mit dem Fluoreszenzspektrometer Fluorolog-3 (Jobin Yvon) in Fluoreszenz-Küvetten aus Quarzglas bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt. Zur Vermeidung von Polarisierungseffekten wurden die Polarisatoren des Anregungsstrahlengangs auf 0 ° und des Emissionsstrahlengangs auf 54.7 ° eingestellt (magic angle). Als Lichtquelle diente eine Xenon-Lampe. Um Reabsorptionseffekte zu vermeiden, wurde der Konzentrationsbereich so gewählt, dass die Absorption der Probe den Wert 0.01 nicht überschreitet. Die Spektren wurden um das Signal einer Referenzdiode korrigiert, um die Schwankungen der Anregungsintensität zu kompensieren und zusätzlich erfolgte eine Korrektur der Spektren für die wellenlängenabhängige spektrale Sensitivität des Detektors. Zur Bestimmung der Quantenausbeuten diente DPH als Referenzsubstanz.<sup>32</sup>

## 2.6 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern wurden Fluoreszenzabklingkurven mittels zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung (TCSPC) an einer Data Station Hub der Firma Horiba Jobin Yvon gemessen. Dabei werden die registrierten Photonen in einem Häufigkeitshistogramm nach ihrer Ankunftszeit relativ zum Anregungspuls zusammengefasst, wobei das Messfenster durch die Repetitionsrate des Lasers vorgegeben ist.<sup>33,34</sup> Der zeitliche Abfall des Fluoreszenzsignals wird über das Anpassen einer Exponentialfunktion, welche die Entvölkerung des angeregten Zustandes beschreibt, sowie der Berücksichtigung der Gerätefunktion durch eine mathematische Faltung beschrieben.

## 2.7 Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) wurden an einem konfokalen, epi-illuminierten Mikroskop<sup>7</sup> durchgeführt. Die Proben wurden mit kontinuierlichem Licht der Wellenlänge 496.5 nm mit einem Argon-Ionen-Laser (Melles-Griot 35LAP431-230) angeregt. Das Anregungslicht wird über einen dichroitischen Strahlteiler (498 DCLP, AHF, Tübingen) in ein Wasserimmersions-Objektiv (UPLAPO 60 NA = 1.2, Olympus, Hamburg) eingekoppelt und in einer Probe fokussiert. Das Fluoreszenzsignal wird durch das gleiche Objektiv gesammelt, wobei der Strahlteiler das Anregungslicht abtrennt. Eine Tubuslinse bildet das Fluoreszenzlicht auf die Bildebene mit einer Lochblende (50  $\mu\text{m}$ ) ab, die das Anregungsvolumen in axialer Richtung begrenzt. So entsteht ein Detektionsvolumen von wenigen Femtolitern, wobei durch die Minimierung der Raman- und Rayleigh-Streuung ein hohes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis geschaffen wird<sup>35,19</sup>. Zur Eliminierung der Totzeit der Detektoren wurde das Signal durch einen Strahlteiler auf zwei Avalanche-Photodioden (Micro-Photon-Devices, PDM 50CT; Picoquant, Berlin bzw. Photon counting Module SPCM-AQR-14, Perkin Elmer) aufgeteilt. Um die Fluoreszenz von dem Rayleigh-Streulicht der Anregung und dem Raman-Streulicht des Lösungsmittels zu separieren, wurden vor jedem Detektor Fluoreszenzfilter (HQ 533/46, AHF) eingesetzt. Die Signale der beiden Detektoren wurden mit einem Hardware-Korrelator (ALV-5000, ALV-Laser, Langen, Deutschland) verarbeitet.

Die FCS-Messungen an Fluorophoren im roten Wellenlängenbereich wurden an dem konfokalen Mikroskop FluoView 1000 (Olympus, Hamburg) durchgeführt. Zur Abtrennung des Anregungslichts diente ein dichroitischer Strahlteiler (DM405/488/559/635), zusätzlich wurden vor jedem Detektor Fluoreszenzfilter (HQ 715/120, AHF) eingesetzt.

### ***Entgasung***

Um FCS-Messungen unter sauerstoffreduzierten bzw. sauerstofffreien Bedingungen durchführen zu können, wurden verschließbare Messzellen mit einem aufgeklebten Deckglas als Boden verwendet. Die Messlösung wurde mit dem entsprechenden Gas (Argon bzw. eine Mischung aus Stickstoff und synthetischer Luft) vor jeder Messung 15 min gespült. Während der Messung wurde das Gas über die Lösung geleitet. Zur Vermeidung von Konzentrationsänderung durch Verdampfen des Lösungsmittels wurde die Konzentration durch Absorptionsmessung nach der Entgasung bestimmt.

## **2.8 Photozerstörungsmessung**

Zur Messung der Photozerstörung wurde eine konstant temperierte und gerührte Farbstofflösung in einer Quarzküvette der Kantenlänge  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  mit kontinuierlichem Licht der Wellenlänge 496.5 nm mit einem Argon-Ionen-Laser (Innova Sabre, Coherent, Palo Alto, CA) angeregt. Die Fluoreszenz wurde durch einen entsprechenden Langpassfilter (OG15, Schott und HQ 555-105, AHF) vom Anregungs- und Streulicht getrennt und mit einer Silicium-Photodiode (S1226-8BQ, Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan) senkrecht zum Anregungsstrahlengang detektiert.<sup>7</sup>

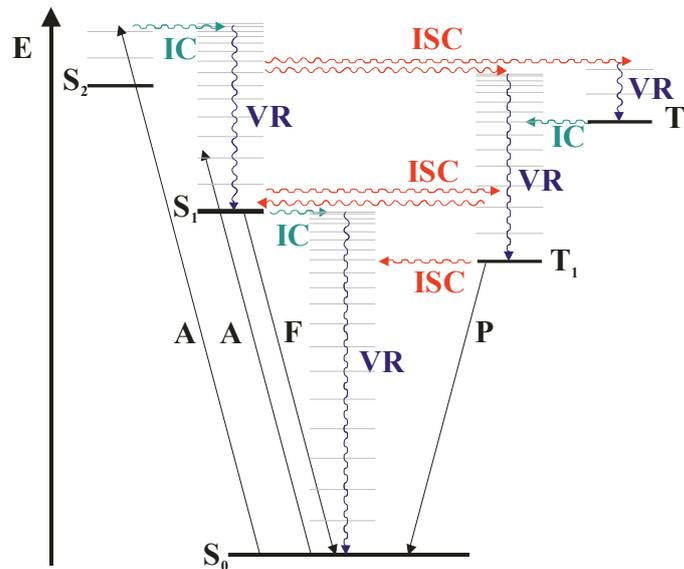
## 3. Theoretischer Teil

### 3.1 Fluoreszenzeigenschaften von Molekülen

In anschaulicher Weise lassen sich die verschiedenen photophysikalischen Prozesse anhand des in Abbildung 3.1-1 dargestellten Jablonski-Diagramms diskutieren.<sup>36</sup>

Der Singulettzustand  $S_0$ , die angeregten Singulett-Zustände  $S_1$  und  $S_2$  sowie die Triplettzustände  $T_1$  und  $T_2$  sind schematisch dargestellt. In jedem dieser elektronischen Energieniveaus kann der Fluorophor in einer Reihe verschiedener Schwingungsenergieniveaus existieren, die durch horizontale Linien dargestellt sind. Die Rotationsniveaus in den einzelnen Schwingungszuständen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht explizit angegeben. Da Schwingungswellenzahlen starrer Moleküle typischerweise im Bereich von  $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  liegen, ist die Energiedifferenz zwischen  $S_0$  und  $S_1$  zu groß, um eine thermische Population des  $S_1$ -Zustands bei Raumtemperatur zu erreichen. Aus diesem Grund wird die Fluoreszenz durch Lichtabsorption induziert. Die photophysikalischen Prozesse sind durch Pfeile angedeutet, wobei für die strahlungslosen Prozesse Wellenlinien verwendet werden. Durch die Absorption (A) eines Photons der Energie  $E_{ex} = hc / \lambda_{ex}$  wird das Molekül in einen höheren Schwingungszustand von  $S_1$  oder  $S_2$  angeregt. In flüssiger Lösung relaxiert es meist sehr schnell in den niedrigsten

Schwingungszustand von  $S_1$  (engl. *vibrational relaxation VR*,  $k_{VR} \approx 10^{-12} \text{ s}^{-1}$ ), wobei die Energie durch Stöße in Form von Wärme an das Lösungsmittel abgegeben wird.



**Abbildung 3.1-1:** Jablonski-Diagramm. Zustände:  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  Singulettzustand,  $T_1$ ,  $T_2$  Triplettzustand. Prozesse: A Absorption, F Fluoreszenz, P Phosphoreszenz, VR Schwingungsrelaxation, IC Innere Umwandlung, ISC Interkombinationsübergang.

Durch Abgabe eines Photons kann das Molekül in den Grundzustand  $S_0$  zurückkehren (F) oder durch einen Interkombinationsübergang (engl. *inter system crossing ISC*) in den Triplettzustand gelangen. Von dort kann wiederum nach einer Schwingungsrelaxation der Übergang in den Grundzustand durch Phosphoreszenz erfolgen. Die Geschwindigkeitskonstanten der Interkombinationsübergänge liegen bei  $k_{ISC} = 10^6 - 10^{11} \text{ s}^{-1}$  für  $S_1$ - $T_1$ -Übergänge und bei  $10^4 - 10^{-1} \text{ s}^{-1}$  für  $T_1$ - $S_0$ -Übergänge.

Strahlungslose Deaktivierung erfolgt durch innere Umwandlung unter Spinerhalt (engl. *internal conversion IC*) von allen angeregten Singulett-Zuständen  $S_n$  nach  $S_0$  mit Geschwindigkeitskonstanten von  $k_{IC} \approx 10^{12} - 10^{14} \text{ s}^{-1}$ . Der strahlungslose Übergang  $S_1 \rightarrow S_0$  ist dagegen mit  $k_{IC} \leq 10^8 \text{ s}^{-1}$  erheblich langsamer.

Die strahlungslosen Umwandlungen  $S_n \rightarrow S_1$  bzw.  $T_n \rightarrow T_1$  sind gewöhnlich so schnell, dass die Lebensdauern und Quantenausbeuten für die Emission aus höheren Zuständen meist sehr klein sind. Daher beobachtet man in den meisten Fällen fast ausschließlich die Lumineszenz vom tiefsten angeregten Zustand (*Regel von Kasha*).<sup>37</sup> Die Geschwindigkeit der Energieabgabe durch Emission ist im Allgemeinen nur für den tiefsten angeregten Singulett-Zustand  $S_1$  bzw. den tiefsten Triplett-Zustand  $T_1$  mit der strahlungslosen Deaktivierung vergleichbar. Diese Relaxation in die Zustände  $S_1$  bzw.  $T_1$  hat zur Folge,

dass die Intensitätsverteilung in den Fluoreszenz- und Phosphoreszenzspektren unabhängig von der Anregungswellenlänge ist.

### 3.1.1 Fluoreszenzquantenausbeuten und -lebensdauern

Die Fluoreszenzquantenausbeute und -lebensdauer sind die wichtigsten photophysikalischen Eigenschaften eines fluoreszierenden Moleküls. Die Fluoreszenzquantenausbeute ist definiert als das Verhältnis der Zahl aller emittierten Photonen zu der Zahl der absorbierten Photonen. Allgemeine Prozesse, die zur Entvölkerung des angeregten Zustands führen sind die Fluoreszenz und strahlungslose Deaktivierungen, wie die innere Umwandlung und die Interkombinationsübergänge. Mit den Geschwindigkeitskonstanten  $k_F$  und  $k_{nr}$  (nr: engl. *nonradiative*) dieser Prozesse gilt für die Fluoreszenzquantenausbeute:

$$\phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{nr}} = \frac{k_F}{k_0} \quad (3.1-1)$$

Die einfachste Methode zur Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute ist der Vergleich mit einem Fluoreszenzstandard mit bekannter Quantenausbeute.<sup>38</sup> Dabei wird die integrale Fluoreszenzintensität der Probe und die eines Standards gemessen. Um Reabsorptionseffekte zu vermeiden, werden die Lösungen auf eine optische Dichte  $< 0.1$  eingestellt. Die Quantenausbeute der unbekannt Substanz  $\Phi_x$  ergibt sich aus

$$\phi_x = \phi_R \frac{F_x}{F_R} \frac{a_R}{a_x} \frac{n_x^2}{n_R^2}, \quad (3.1-2)$$

wobei  $\Phi_R$  die Quantenausbeute der Referenz ist,  $F_R$  und  $F_x$  die integrierten Fluoreszenzintensitäten des Standards und der Probe,  $a_R$  und  $a_x$  die optischen Dichten des Standards und der Probe und  $n_R$  bzw.  $n_x$  die Brechungsindizes der Lösungsmittel.

Da die Fluoreszenzintensität von der Art der Küvette, der Anregungswellenlänge, der Intensität des einfallenden Lichts und der optischen Dichte abhängig ist, dürfen diese Parameter bei den Messungen nicht variiert werden. Werden die Konzentrationen der beiden Lösungen so angepasst, dass beide die gleiche optische Dichte an der Anregungswellenlänge besitzen, so vereinfacht sich Gleichung 3.1-2 zu:

$$\phi_x = \phi_R \frac{F_x}{F_R} \frac{n_x^2}{n_R^2} \quad (3.1-3)$$

Die Strahlungslebensdauer eines angeregten Zustands wird definiert durch die durchschnittliche Zeit, die ein Molekül im Anregungszustand verbringt, bevor es spontan in den Grundzustand zurückkehrt. In einem System aus einer großen Zahl von Teilchen folgt die zeitliche Abnahme der Emission einem Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung:

$$I = I_0 e^{-kt}, \quad (3.1-4)$$

wobei  $I_0$  und  $I$  die Intensitäten der emittierten Strahlung unmittelbar nach der Anregung und zu einer späteren Zeit  $t$  und  $k$  die Geschwindigkeitskonstante des Intensitätsabfalls darstellen. Die reziproke Größe der Geschwindigkeitskonstante

$$\tau = 1/k \quad (3.1-5)$$

bezeichnet man als mittlere Strahlungslebensdauer des angeregten Zustands. Diese ist nahezu temperaturunabhängig<sup>43</sup>, aber nicht unabhängig vom Lösungsmittel. Alle Prozesse, die zusätzlich zur spontanen Emission ablaufen, verkürzen die Strahlungslebensdauer und man erhält unter Berücksichtigung der strahlungslosen Deaktivierung die tatsächliche Lebensdauer  $\tau_0$ , die reziprok zur Geschwindigkeitskonstante  $k_0$  der Deaktivierung des  $S_1$ -Zustands ist.<sup>39</sup>

$$\tau_0 = 1/k_0. \quad (3.1-6)$$

Die verschiedenen Entvölkerungsprozesse sind in Abbildung 3.1-1 dargestellt. Die Zugabe von Löschmolekülen der Konzentration  $[Q]$  erhöht die Geschwindigkeitskonstante  $k_0'$  für die Entvölkerung des  $S_1$ -Zustands in Abhängigkeit von der bimolekularen Geschwindigkeitskonstante  $k_{qS}$  für die Löschung des  $S_1$ -Zustands und führt zu einer Verringerung der Lebensdauer  $\tau_0$  und der Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_{F(Q)}$ .

$$k_0' = k_0 + k_{qS}[Q] \quad (3.1-7)$$

$$\Phi_{F(Q)} = \frac{k_F}{k_0'} \quad (3.1-8)$$

### 3.2 Intermolekulare photophysikalische Prozesse nach elektronischer Anregung

Die Lebensdauer eines angeregten Zustands stellt das experimentelle Zeitfenster dar, in dem Prozesse mit vergleichbarer Dauer beobachtet werden können. Diese Deaktivierungsprozesse stehen in Konkurrenz zu den intramolekularen Relaxationswegen

wie der inneren Umwandlung und den Interkombinationsübergänge. Die Wechselwirkung des Moleküls  $F^*$  in einem Anregungszustand mit einem weiteren Molekül  $Q$  kann aus verschiedenen Wegen zur Löschung des ersten angeregten Singulett- ( $^1F^*$ ) oder Triplettzustands ( $^3F^*$ ) führen. Die wichtigsten intermolekularen photophysikalischen Prozesse zur Deaktivierung eines Moleküls sind in Tabelle 3.2-1 dargestellt. Im Falle des Energietransfers wird die Schreibweise  $D$  für Donor und  $A$  für Akzeptor verwendet.

**Tabelle 3.2-1:** Photophysikalische Prozesse eines Moleküls  $F$  im Anregungszustand mit einem Löschmolekül  $Q$  bzw. molekularem Sauerstoff.

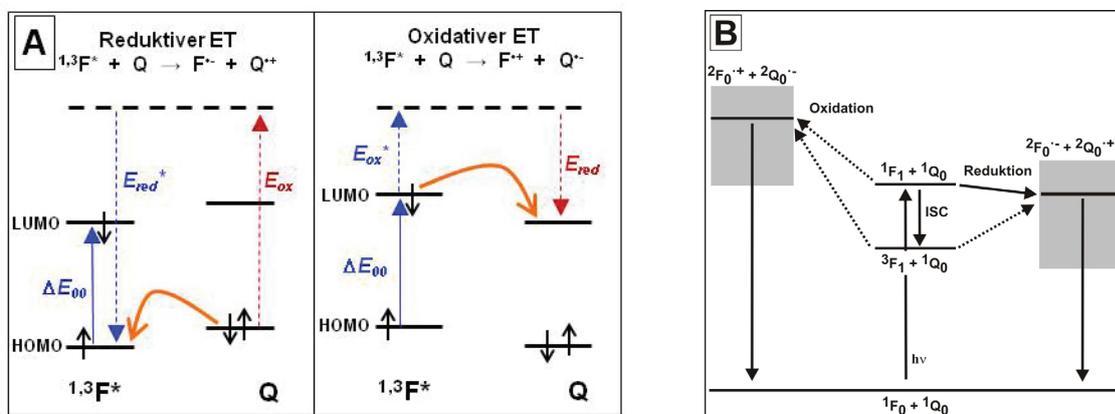
Photophysikalischer Prozess	Schema	
Elektronentransfer	$^1F^* + Q \rightarrow F^{\bullet+} + Q^{\bullet-}$	a
	$^1F^* + Q \rightarrow F^{\bullet-} + Q^{\bullet+}$	b
Excimerbildung	$^1F^* + ^1F \rightarrow ^1(FF)^*$	c
Exciplexbildung	$^1F^* + Q \rightarrow ^1(FQ)^*$	d
Protonentransfer	$FH^* + Q \rightarrow F^{\bullet-} + QH^+$	e
	$F^* + QH \rightarrow FH^{\bullet+} + Q^-$	f
Energietransfer	$^1D^* + ^1A \rightarrow ^1D + ^1A^*$	g
	$^3D^* + ^1A \rightarrow ^1D + ^3A^*$	h
	$^3D^* + ^3A \rightarrow ^1D + ^3A^*$	i
Löschreaktionen mit Sauerstoff $O_2$	$^1F^* + ^3O_2 \rightarrow ^3F^* + ^1O_2$	j
	$^3F^* + ^3O_2 \rightarrow ^1F + ^1O_2$	k
	$^3F^* + ^3O_2 \rightarrow ^1F + ^3O_2$	l

Durch die Anwesenheit eines Löschmoleküls  $Q$  (bzw. durch molekularen Sauerstoff oder eines Akzeptors  $A$ ) werden aufgrund der Konkurrenz zwischen den inneren Deaktivierungsprozesse und den oben aufgeführten intermolekularen Wechselwirkungen die charakteristischen Fluoreszenzeigenschaften des angeregten Moleküls beeinflusst. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität und der Fluoreszenzquantenausbeute bezeichnet man als Fluoreszenzlöschung.

### 3.2.1 Photoinduzierter Elektronentransfer

Die mit der elektronischen Anregung verbundene Umverteilung der Elektronen eines Moleküls wirkt sich auf alle physikalischen Parameter aus, insbesondere die Redoxeigenschaften. Elektronisch angeregte Moleküle sind sowohl stärkere Oxidations- als auch Reduktionsmittel. Die Begegnung eines angeregten Moleküls bzw. Fluorophors  $F^*$

mit einem Elektronendonator oder -akzeptor führt meist zur Bildung eines Kontaktionenpaares (engl. *contact ion pair*, CIP) oder zu solvensgetrennten Ionenpaaren (engl. *solvent-separated ion pair*,SSIP), je nachdem, ob der Elektronentransfer (ET) über eine gewisse Distanz hinweg erfolgt oder nur bei direktem Kontakt der beiden Reaktanden. Bei einem CIP handelt es sich um einen angeregten Komplex, einen sogenannten Exciplex.<sup>40</sup> Die Multiplizität dieses Exciplexes spiegelt die Multiplizität der Edukte wieder. Folgereaktionen des Radikationenpaares werden zusammenfassend als sekundäre Elektronentransferprozesse bezeichnet und beinhalten die Bildung freier Radikale durch Diffusion aus dem Solvenskäfig, die Rückkehr in den Grundzustand der neutralen Reaktanden (reversibler ET) und Interkombinationsübergänge.



**Abbildung 3.2-1:** (A) Reduktiver und oxidativer Elektronentransfer im angeregten Zustand. Nach Anregung des Farbstoffes F mit der Energie  $\Delta E_{00}$  folgt der Elektronentransfer (orangener Pfeil). (B) Darstellung des reduktiven und oxidativen Elektronentransfers. In diesem speziellen Fall kann lediglich eine Reduktion des Fluorophors  ${}^1F_1$  aus dem ersten angeregten Singulettzustand durch das Löschmolekül  ${}^1Q_0$  im Grundzustand stattfinden (Reduktion durchgezogener Pfeil), alle anderen Prozesse sind energetisch nicht möglich (gestrichelte Pfeile).

Photoinduzierte Elektronentransferreaktionen (Tabelle 3.2-1 Prozesse a und b) sind oft Ursache der Fluoreszenzlöschung. Abbildung 3.2-1 stellt den oxidativen und reduktiven Elektronentransfer zwischen einem angeregten Molekül  $F^*$  und einem Löschmolekül Q schematisch dar. Beim oxidativen Elektronentransfer wird der Fluorophor  $F^*$  oxidiert, der Löscher Q reagiert als Elektronenakzeptor und wird reduziert. Beim reduktiven Prozess wird  $F^*$  zum Elektronenakzeptor während Q oxidiert wird. Die experimentell nicht zugänglichen Potentiale  $E_{ox}^*$  und  $E_{red}^*$  der angeregten Zustände  $S_1$  und  $T_1$  können mit Hilfe der Grundzustandspotentiale und der Anregungsenergie des entsprechenden Zustands als  $E_{red}^* = E_{red} + \Delta E_{00}$  bzw.  $E_{ox}^* = E_{ox} - \Delta E_{00}$  ausgedrückt werden.

Die Berechnung der Änderung der freien Standardreaktionsenthalpie  $\Delta G_{ET}$  der beiden Elektronentransferprozesse erfolgt mit Hilfe der *Rehm-Weller-Gleichung*:<sup>41,42</sup>

$$\Delta G_{ET} = E_{ox} - E_{red} - \Delta E_{00} + \Delta G^0(\varepsilon) \quad (3.2-1)$$

Bei Reaktionen in Lösung wird die Bildung eines Ionenpaars von zwei stabilisierenden Wechselwirkungen begleitet: die Bildung zweier geladener Spezies in unmittelbarer Nähe verursacht eine Coulomb-Wechselwirkung, zusätzlich wird das Ionenpaar von Lösungsmittelmolekülen stabilisiert. Diese Effekte werden in dem zusätzlichen Term  $\Delta G^0(\varepsilon)$  berücksichtigt:

$$\Delta G^0(\varepsilon) = \underbrace{\frac{e^2}{4\pi\varepsilon_0 r_{ion}} \left( \frac{1}{\varepsilon_W} - \frac{1}{\varepsilon_{LM}} \right)}_{\text{Solvatation}} - \underbrace{\frac{e^2}{4\pi\varepsilon_0 \varepsilon_W a}}_{\text{Coulomb}}, \quad (3.2-2)$$

dabei ist  $e$  die Ladung eines Elektrons,  $\varepsilon_0$  die Dielektrizitätskonstante des Vakuums,  $r_{ion}$  der Ionenradius,  $\varepsilon_W$  bzw.  $\varepsilon_{LM}$  die Dielektrizitätskonstante von Wasser bzw. des organischen Lösungsmittels der elektrochemischen Potentialbestimmung und  $a$  der mittlere Abstand zwischen den Ladungszentren. Für DMF beispielsweise erhält man bei Verwendung der Parameter  $\varepsilon_{LM} = 37$  und  $r_{ion} = 3 \text{ \AA}$  eine Stabilisierungsenergie durch die Solvatation des Lösungsmittels von  $-0.068 \text{ eV}$ . Die Coulomb-Wechselwirkung zwischen den geladenen Radikalen ist in polaren Lösungsmitteln stark reduziert, sie beträgt in Wasser lediglich  $0.026 \text{ eV}$  ( $a = 7 \text{ \AA}$ ;  $\varepsilon_W = 78$ ). Der Beitrag des Coulomb-Terms entfällt, wenn die Gesamtladung des Ionenpaares während des ETs gleich bleibt (wenn beispielsweise das Kation reduziert wird, während das Lösungsmolekül zum Radikalkation oxidiert wird).

### 3.2.2 Energietransfer

Elektronisch angeregte Zustände und deren primäre Produkte sind hochreaktiv. Intermolekulare Prozesse, die nach einer Begegnung zwischen zwei Reaktanden in Lösung erfolgen, werden auch diffusions-kontrollierte Reaktionen genannt und sind in der Photochemie weitverbreitet. Dieses Kapitel behandelt sogenannte Energieübertragungsreaktionen, bei denen die Anregungsenergie eines Moleküls bzw. Farbstoffs im angeregten Zustand  $D^*$ , auch genannt Donor auf ein benachbartes Molekül A, den Akzeptor, übertragen wird (engl. *excitation energy transfer*, EET).



Hierbei wird zwischen strahlendem und strahlungslosem Energietransfer unterschieden:

Der strahlende Energietransfer entspricht der Emission eines Photons durch ein Molekül  $D^*$  und die anschließende Absorption dieses Photons durch ein Molekül  $A$ . Dieser Energietransfer tritt dann auf, wenn die mittlere Distanz zwischen Donor und Akzeptor größer als die Wellenlänge ist. Diese Geschwindigkeit des Energietransfers hängt von der spektralen Überlappung und der Konzentration der Reaktionspartner ab und setzt keine Interaktion zwischen  $D$  und  $A$  voraus.

Im Gegensatz dazu erfolgt der strahlungslose Energietransfer ohne die Emission eines Photons und erfolgt über Distanzen, die kleiner als die Wellenlänge sind. Die Voraussetzung für den strahlungslosen EET ist die Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors, sodass mehrere Schwingungsübergänge im Donor und im Akzeptor die gleiche Energie besitzen.

### 3.2.2.1 Theorie des strahlungslosen Energietransfers

Mit Hilfe der zeitabhängigen Störungstheorie kann die Geschwindigkeitskonstante  $k_{EET}$  des Energietransfers für einen Übergang von einem Ausgangszustand  $|i\rangle$  in einen Endzustand  $|f\rangle$  durch "Fermi's Goldene Regel" ausgedrückt werden.<sup>36,43,44</sup>

$$k_{EET} = \frac{2\pi}{\hbar} \rho \left| H_{fi} \right|^2 = \frac{2\pi}{\hbar} \rho \left\langle \Psi_i \left| H \right| \Psi_f \right\rangle^2, \quad (3.2-4)$$

wobei  $\Psi_i$  und  $\Psi_f$  die Wellenfunktionen des Ausgangszustands und des Endzustands sind;  $\rho$  die sogenannte Zustandsdichte, die die Anzahl der Schwingungsniveaus pro Energieeinheit im Endzustand angibt; der Störoperator  $\left| H_{fi} \right|^2$  beschreibt die Kopplung des Ausgangs- und Endzustands und enthält alle elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Elektronen und den Atomkernen des Donors und des Akzeptors. Unter der Annahme, dass beim EET nur zwei Elektronen, eins vom Donor und eins vom Akzeptor, involviert sind, lauten die antisymmetrischen Wellenfunktionen des Anfangs- und Endzustands:

$$\Psi_i = \frac{1}{\sqrt{2}} (\Psi_{D^*}(1)\Psi_A(2) - \Psi_{D^*}(2)\Psi_A(1)) \quad (3.2-5)$$

$$\Psi_f = \frac{1}{\sqrt{2}} (\Psi_D(1)\Psi_{A^*}(2) - \Psi_D(2)\Psi_{A^*}(1)) \quad (3.2-6)$$

Dabei beziehen sich die Nummern 1 und 2 auf die beiden Elektronen. Das Matrixelement des Störoperators lässt sich als Summe eines Coulomb- und eines Austauschterms schreiben:

$$H_{fi} = H_c + H_e$$

$$H_{fi} = \langle \Psi_{D^*}(1)\Psi_A(2) | H | \Psi_D(1)\Psi_{A^*}(2) \rangle - \langle \Psi_{D^*}(1)\Psi_A(2) | H | \Psi_D(2)\Psi_{A^*}(1) \rangle \quad (3.2-7)$$

Das Matrixelement für den Coulomb-Term  $H_c$  repräsentiert die elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Ladungsverteilungen und kann in einer Multipolentwicklung in eine Summe von Multipol-Multipol-Wechselwirkung aufgespalten werden, wird jedoch näherungsweise auf den ersten Dipol-Dipol-Term reduziert, der für erlaubte Übergänge und nicht zu kleine Abstände überwiegt.<sup>45,46</sup> Die Wechselwirkung zwischen den beiden elektrischen Dipolen mit den Übergangsmomenten  $\mu_A$  und  $\mu_D$  im Abstand  $r$  zueinander lässt sich durch

$$H_{c,Dipol-Dipol} \sim \frac{\mu_D \mu_A}{r^3} \quad (3.2-8)$$

auf experimentell bestimmbare Größen zurückführen. Diese Wechselwirkung wird als *Förster Resonanz-Energietransfer* (FRET) bezeichnet. Dieser Mechanismus basiert auf der Induktion eines Dipolmoments in A durch  $D^*$ , weshalb kein physikalischer Kontakt zwischen den beiden Reaktionspartnern notwendig ist.

Der Austauschterm  $H_e$  in Gleichung 3.2-7 gibt die elektronische Wechselwirkung zwischen den Ladungsverteilungen wieder und ist unabhängig von der Oszillatorstärke der beteiligten Übergänge. Voraussetzung dieses Elektronenaustausch-Mechanismus ist die Überlappung der Orbitale, die Moleküle D und A müssen also direkten Kontakt zueinander haben. Mit zunehmendem Abstand fällt die Austauschwechselwirkung exponentiell ab und erfolgt daher nur über kurze Abstände im Bereich des Kollisionsdurchmessers ( $< 10 \text{ \AA}$ ). Dieser Mechanismus wird auch *Dexter-Energietransfer* genannt.<sup>45,47</sup>

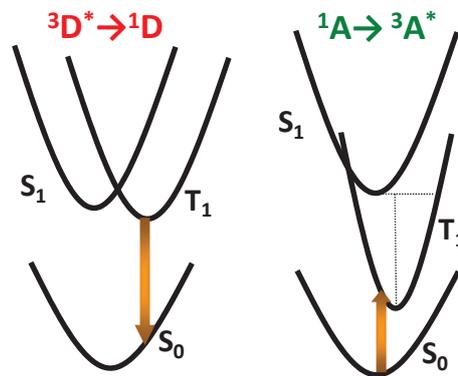
### 3.2.2.2 Triplet-Energietransfer

Unter Triplet-Energietransfer (TEET) versteht man die Übertragung von Anregungsenergie eines elektronisch angeregten Donors  $^3D^*$  im Tripletzustand auf einen Akzeptor  $^1A$  im Grundzustand:



Der TEET ist nach dem Dipol-Dipol-Mechanismus verboten, da das entsprechende Dipolübergangsmoment des Übergangs aus dem Singulett-Grundzustand von A in den ersten angeregten Tripletzustand  $T_1$  sehr gering ist. Nach dem Austauschmechanismus ist TEET spinerlaubt.

Um einen effektiven TEET zu erreichen, muss die Tripletenergie des Donors größer als die des Akzeptors sein und gleichzeitig soll eine gezielte Anregung des Donors möglich sein. Dies kann umgesetzt werden, indem der Akzeptor bei einer kürzeren Wellenlänge absorbiert und gleichzeitig eine große Energielücke zwischen dem ersten angeregten Singulett- und Tripletzustand ( $S_1$ - $T_1$ -Energielücke) aufweist.<sup>40</sup>



**Abbildung 3.2-2:** Energetische Lage der Zustände für einen Triplet-Triplet-Energietransfer.

In Systemen, bei denen die Struktur des relaxierten Tripletzustands des Akzeptors signifikant von dessen Grundzustand abweicht, wurden langsamere Geschwindigkeiten für den Energietransfer beobachtet, als nach der Theorie zu erwarten waren, wie beispielsweise im Fall des Stilbens. Aufgrund dieser Beobachtung folgten ausführliche Studien an verdrehten Tripletzustandsgeometrien von Stilben und verwandten Komponenten und der Ausdruck „*nicht-vertikaler Energietransfer*“ wurde geprägt, um diesen Mechanismus zu beschreiben.<sup>48-50</sup>

### 3.2.3 Wechselwirkungen mit molekularem Sauerstoff

Molekularer Sauerstoff spielt eine Schlüsselrolle in der Photochemie von Fluoreszenzfarbstoffen. Die Sauerstoffkonzentration in luftgesättigter wässriger Lösung beträgt 0.29 mM und 2.1 mM in luftgesättigter, ethanolischer Lösung.<sup>51</sup> Sauerstoff besitzt einen Tripletgrundzustand  $^3O_2$  (Termsymbol  $^3\Sigma_g^-$ ), die niedrigsten Singulettzustände liegen bei 0.99 eV (Termsymbol  $^1\Delta_g$ ) und 1.64 eV (Termsymbol  $^1\Sigma_g^+$ ).<sup>52-54</sup> Der höher

liegende Zustand  $^1\Sigma_g^+$  relaxiert in Lösung schnell zum langlebigen  $^1\Delta_g$ -Zustand, der als Singulett-Sauerstoff bezeichnet wird.<sup>40</sup>

In Anwesenheit eines elektronisch angeregten Farbstoffes im  $S_1$  oder  $T_1$  können verschiedene bimolekulare Löschprozesse mit Sauerstoff auftreten (Tabelle 3.2-1).

Aufgrund der niedrig liegenden Anregungszustände des omnipräsenten Sauerstoffs ist die Löschung von angeregten  $S_1$ - und  $T_1$ -Zuständen meist sehr effizient. Speziell der erste angeregte Triplettzustand wird in fast allen Fluoreszenzfarbstoffen in Anwesenheit von Sauerstoff gelöscht (Tabelle 3.2-1 k und l), wodurch der Fluorophor schneller aus dem Dunkelzustand relaxiert.<sup>8,22,55-59</sup> Dieser Prozess verläuft hauptsächlich über einen Energietransfermechanismus und nur unter bestimmten Umständen über Elektronentransfer.<sup>60</sup> Allerdings wird bei der Löschung von  $T_1$ -Zuständen von Rhodamin-Farbstoffen Singulett-Sauerstoff  $^1O_2$  produziert, der wiederum als hochreaktive Spezies zur irreversiblen Photozerstörung beiträgt.<sup>56,61-63</sup> Die Deaktivierung des  $S_1$ -Zustands in Rhodaminen durch molekularen Sauerstoff (Tabelle 3.2-1 j) ist zwar ein spinerlaubter Übergang, jedoch energetisch verboten. Die  $S_1$ - $T_1$ -Energilücke liegt bei Rhodaminen typischerweise bei 0.38 eV<sup>64</sup> und ist daher nicht ausreichend, um Sauerstoff in seinen  $S_1$ -Zustand anzuregen.

### 3.3 Kinetische Beschreibung des elektronischen Zustandsmodells eines Fluoreszenzfarbstoffs

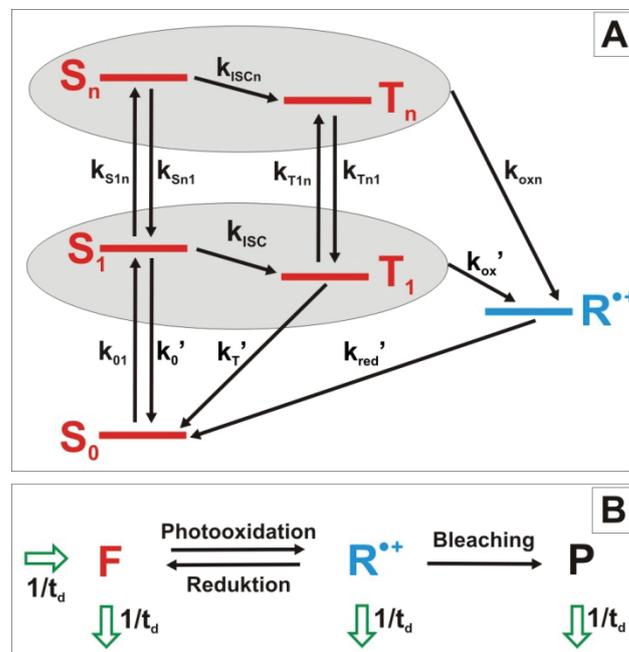
Das photophysikalische und photochemische Verhalten eines Farbstoffs kann im Rahmen eines elektronischen 5-Niveauschemas kinetisch beschrieben werden (Abbildung 3.3-1 A). Nach Absorption eines Photons geeigneter Wellenlänge erfolgt der Übergang des Fluorophors aus dem Grundzustand  $S_0$  in den ersten angeregten Zustand  $S_1$ , von wo ein Interkombinationsübergang in den ersten angeregten Triplettzustand  $T_1$  mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_{ISC}$  erfolgen kann.

Für Absorptionsprozesse ausgehend von einem elektronischen Zustand  $i$  in einen höher angeregten Zustand  $f$  kann die Geschwindigkeitskonstante der Absorption  $k_{(X)if}$  in allgemeiner Schreibweise definiert werden, wobei  $X = S$  oder  $T$ . Die Geschwindigkeitskonstante der Absorption von  $S_0$  nach  $S_1$  wird als  $k_{01}$  bezeichnet.  $k_{(X)if}$  ist

proportional zur mittleren Leistungsdichte  $\langle I \rangle$  im Detektionsvolumen und zum Absorptionsquerschnitt  $\sigma_{(X)if}$  bei der Anregungswellenlänge  $\lambda$ . Die inverse Photonenenergie  $\gamma$  wird durch das Planck'sche Wirkungsquantum  $h$  und der Lichtgeschwindigkeit  $c$  berechnet ( $\gamma = \lambda / hc$ ).

$$k_{(X)if} = \sigma_{(X)if} \gamma \langle I \rangle \quad (3.3-1)$$

Durch Absorption eines zweiten Photons können die höher angeregten Singulett- und Triplettzustände  $S_n$  und  $T_n$  bevölkert werden (Abbildung 3.3-1 A). Die Entvölkerung von  $S_n$  nach  $S_1$  und von  $T_n$  nach  $T_1$  wird durch die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{S_n1}$  bzw.  $k_{T_n1}$  beschrieben, die Geschwindigkeit des Interkombinationsübergangs höher angeregter Zustände durch  $k_{ISCn}$ .



**Abbildung 3.3-1:** Elektronisches Zustandsmodell eines Fluorophors zur Beschreibung seiner photophysikalischen Prozesse bei hohen Anregungsleistungen. Dabei wurden Photozerstörungsreaktionen über einen Radikalmechanismus aus den angeregten Singulett- ( $S_1$  und  $S_n$ ) und Triplettzuständen ( $T_1$  und  $T_n$ ) in Betracht gezogen. (A) Mikroskopische Beschreibung. (B) Photooxidations- und Reduktionsprozesse des Fluorophors zum Radikalkationenzustand  $R^{*+}$  und Photozerstörung zu den Produkten P.

Die Geschwindigkeitskonstanten für die Deaktivierung des  $S_1$ - und  $T_1$ -Zustands können durch Löschprozesse beeinflusst und somit die Lebensdauer dieser Zustände verändert werden. Befindet sich ein Löschmolekül der Konzentration  $[Q]$  in der Lösung, dessen Löscheffizienz durch die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{qS}$  für den  $S_1$ -Zustand und  $k_{qT}$  für den  $T_1$ -Zustand gegeben ist, so ergeben sich die Geschwindigkeitskonstanten  $k_0'$  und  $k_T'$  für die Deaktivierung des  $S_1$ - bzw. des  $T_1$ -Zustands zu:

$$k'_0 = k_0 + k_{qS} [Q] \quad \text{und} \quad (3.3-2)$$

$$k'_T = k_T + k_{qT} [Q]. \quad (3.3-3)$$

Im stationären Zustand sind die Besetzungswahrscheinlichkeiten der jeweiligen Zustände zeitlich konstant und es können stationäre Besetzungswahrscheinlichkeiten  $S_{0eq}$ ,  $S_{1eq}$ ,  $T_{1eq}$ ,  $S_{neq}$  und  $T_{neq}$  eingeführt werden. Die zeitlichen Ableitungen dieser stationären Besetzungswahrscheinlichkeiten sind Null. Mit der Bedingung  $S_0 + S_1 + T_1 + S_n + T_n = 1$  ergeben sich die stationären Besetzungswahrscheinlichkeiten. Dieses kinetische System wird zunächst nur auf die Zustände  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $T_1$ ,  $S_n$  und  $T_n$  beschränkt (Abbildung 3.3-1 A), die in Abbildung 3.3-1 B als formaler Gesamtzustand F bezeichnet werden.

$$\begin{aligned} S_{0eq} &= \frac{k_{Tn1} k_{Sn1} k'_T k'_0}{X}, \\ S_{1eq} &= \frac{k_{01}}{k'_0} S_{0eq}, \\ T_{1eq} &= \frac{k_{ISC}}{k'_T} S_{1eq}, \\ S_{neq} &= \frac{k_{1n}}{k_{Sn1}} S_{1eq}, \\ T_{neq} &= \frac{k_{T1n}}{k_{Tn1}} T_{1eq}, \end{aligned} \quad (3.3-4)$$

wobei

$$X = k_{Tn1} [k'_T (k_{Sn1} (k'_0 + k_{01}) + k_{01} k_{Sn1})] + (k_{T1n} + k_{Tn1}) (k_{ISC} k_{Sn1} k_{01}) \quad (3.3-5)$$

Im 5-Zustandsmodell des Fluorophors in Abbildung 3.3-1 A ist zusätzlich zu den Übergängen zwischen den elektronischen Zuständen, im Schema B zusammenfassend als rotes F dargestellt, ein weiterer Dunkelzustand des Moleküls enthalten. Dieser Dunkelzustand entsteht durch die Bildung eines Radikalkations  $R^{*+}$  des Fluorophors über einen photoinduzierten Ladungstransfer.

Der Farbstoff Rhodamin 123 liegt im Grundzustand als Kation vor ( $S_0 = \text{Rh123}^+$ ). Durch Photooxidation bildet sich demnach ein zweifach positiv geladenes Radikal ( $R^{*+} = \text{Rh123}^{2+}$ ). Das Radikalanion hingegen ist ein neutrales Radikal ( $R^{*-} = \text{Rh123}^{\bullet}$ ). Im Folgenden wird die allgemeine Schreibweise mit  $S_0$ ,  $R^{*+}$  und  $R^{*-}$  wie in Abbildung 3.3-1 verwendet, damit diese Nomenklatur allgemein gültig ist.<sup>82</sup>

Die Geschwindigkeitskonstante der Photooxidation  $k_{ox}$  kann als Summe der Geschwindigkeitskonstanten aller Oxidationsprozesse  $k_{ox}'$  aus den ersten angeregten Zuständen  $S_1$  und  $T_1$  und der Geschwindigkeitskonstante der Prozesse aus allen höher angeregten Zuständen  $k_{oxn}$  ausgedrückt werden:

$$k_{ox} = k_{oxS}S_{1eq} + k_{oxT}T_{1eq} + k_{oxSn}S_{neq} + k_{oxTn}T_{neq} + k_{ox(Q)}[Q]S_{1eq} = (k_{ox}' + k_{oxn}\langle I \rangle)S_{1eq} \quad (3.3-6)$$

Dabei beschreibt die Geschwindigkeitskonstante  $k_{ox(Q)}$  eine Reaktion mit einem Löschmolekül Q, die zusätzlich zur Photooxidation zur Bildung des Radikals führt. Die separierten Geschwindigkeitskonstanten der Oxidation  $k_{ox}'$  und  $k_{oxn}$  können mit den Gleichungen 3.3-4 unabhängig von den Besetzungswahrscheinlichkeiten ausgedrückt werden.

$$k_{ox}' = k_{oxS} + k_{oxT} \frac{k_{ISC}}{k_T'} + k_{ox(Q)}[Q] \quad (3.3-7)$$

$$k_{oxn} = \frac{k_{oxSn}}{k_{Sn1}} \sigma_{S1n} \gamma + \frac{k_{ISC}}{k_T'} \frac{k_{oxTn}}{k_{Tn1}} \sigma_{T1n} \gamma \quad (3.3-8)$$

In Anwesenheit eines Löschers mit geeigneten elektrochemischen Eigenschaften kann das Radikalkation über einen Elektronentransfer zurück in seinen Grundzustand reduziert werden, von wo aus der Fluorophor erneut am Anregungszyklus des 5-Niveau-Systems teilnehmen kann. Die Geschwindigkeitskonstante  $k_{qR}$  für die Löschung des Radikals  $R^{*+}$  zurück in den Grundzustand mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_{red}'$  ist abhängig von der Geschwindigkeitskonstante  $k_{red0}$  der Reduktion in Abwesenheit eines Löschers und der Konzentration  $[Q]$  der Löschmoleküle:

$$k_{red}' = k_{red0} + k_{qR}[Q] \quad (3.3-9)$$

### 3.4 Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Aufgrund der hohen Anzahl an Molekülen, die in herkömmlichen Ensemble-Messungen in Lösung zur Fluoreszenz beitragen, gehen Fluktuationen im Fluoreszenzsignal verloren. Diese Fluktuationen können durch eine Vielzahl an dynamischen Prozessen auf molekularem Niveau verursacht werden, wie die Änderungen der Fluorophorkonzentration aufgrund der Diffusion durch das Detektionsvolumen, Übergänge eines Moleküls in andere elektronische Zustände oder Wechselwirkungen mit der Umgebung. Kann die Detektion

der Fluoreszenz durch den Einsatz eines konfokalen Mikroskops auf die Fluoreszenzsignale weniger Moleküle eingeschränkt werden, werden kinetische Informationen auf molekularem Niveau zugänglich.

### 3.4.1 Die Korrelationsfunktion

Dynamische Prozesse, die mit Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften verbunden sind, verursachen Fluoreszenzfluktuationen, die in der Korrelationsfunktion zu einem Abfall mit einer für diesen Prozess charakteristischen Zeit führen. Das zeitabhängige Fluoreszenzsignal  $F(t) = \delta F(t) + \langle F \rangle$ , das durch Fluktuationen  $\delta F(t)$  um einen Mittelwert  $\langle F \rangle$  beschrieben werden kann, wird in Form einer normierten Autokorrelationsfunktion  $G(t_c)$  analysiert, wobei  $t_c$  die Korrelationszeit ist.  $\langle \dots \rangle$  steht hier für eine zeitliche Mittelung:<sup>17,18,20</sup>

$$G(t_c) = \frac{\langle F(t)F(t+t_c) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta F(t)\delta F(t+t_c) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (3.4-1)$$

Werden die Fluktuationen nur durch translative Diffusion einer fluoreszierenden Spezies verursacht, kann die Autokorrelationsfunktion  $G_{TD}(t_c)$  durch Gleichung (3.4-2) beschrieben werden, dabei ist  $N_F$  die mittlere Anzahl an fluoreszierenden Molekülen im Detektionsvolumen.<sup>22</sup>

$$G_{TD}(t_c) = 1 + \frac{1}{N_F} \cdot \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_d}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + (\omega_0 / z_0)^2 t_c / t_d}} \quad (3.4-2)$$

Für die räumliche Ausdehnung des Detektionsvolumens wird ein 3-dimensionales Gauss-Profil mit den  $1/e^2$ -Radii in radialer und axialer Richtung,  $\omega_0$  und  $z_0$ , angenommen. Die charakteristische Diffusionszeit  $t_d = \omega_0^2 / (4D)$  liefert bei bekanntem Diffusionskoeffizienten  $D$  des Fluorophors den fokalen Radius  $\omega_0$  des Experiments.

Ausgehend von einem elektronischen 3-Niveausystem eines Farbstoffs (entspricht der Reduzierung des Schemas in Abbildung 3.3-1 auf den Singulett-Grundzustand  $S_0$ , den ersten angeregten Singulettzustand  $S_1$  und den ersten angeregten Triplettzustand  $T_1$ ) kann die Photophysik des Farbstoffs im Hinblick auf dessen Triplettzustand untersucht werden, da ein im langlebigen  $T_1$ -Zustand befindliches Farbstoffmolekül nicht fluoreszieren kann und daher zu Fluktuationen in dem Fluoreszenzsignal führt. Allerdings hängt die Besetzungswahrscheinlichkeit  $T_1$  des Triplettzustands sehr stark von der

Anregungsleistung ab, und ist daher räumlich inhomogen und auf das Anregungsvolumen beschränkt. Die exakte Lösung des Problems in der FCS-Theorie ist in Referenz<sup>22</sup> gegeben. Als Näherung kann eine mittlere Besetzungswahrscheinlichkeit  $A_T$  über das Detektionsvolumen angenommen werden und die Korrelationsfunktion  $G_T(t_c)$  der Triplettkinetik kann durch folgende Gleichung beschrieben werden.<sup>22,65</sup>

$$G_T(t_c) = 1 + \frac{A_T}{1 - A_T} e^{-t_c/t_T} \quad (3.4-3)$$

Dabei ist  $A_T$  die mittlere Besetzungswahrscheinlichkeit des ersten angeregten Triplettzustands und  $t_T$  die Triplettkorrelationszeit. Unter Annahme des 3-Niveau-Systems können  $A_T$  und  $t_T$  als Gleichung 3.4-4 und 3.4-5 ausgedrückt werden.<sup>7,22,66</sup>

$$A_T = \frac{k_{ISC}k_{01}}{(k_{ISC} + k'_T)k_{01} + k'_T k'_0} \quad (3.4-4)$$

$$t_T = \frac{k_{01} + k'_0}{(k_{ISC} + k'_T)k_{01} + k'_T k'_0} \quad (3.4-5)$$

Im Fall der Bildung eines Radikalzustands, der einen zusätzlichen langlebigen Dunkelzustand darstellt, muss ein weiterer Bunchingterm  $G_R(t_c)$  betrachtet werden.<sup>10</sup>

$$G_R(t_c) = 1 + \frac{A_R}{1 - A_R} e^{-t_c/t_R} + \frac{A_B}{1 - A_B} e^{-t_c/t_B} \approx 1 + \frac{A_R}{1 - A_R} e^{-t_c/t_R} \quad (3.4-6)$$

$A_R$  und  $A_B$  sind die Radikalamplituden und  $t_R$  und  $t_B$  die zugehörigen Korrelationsamplituden der beiden Bunchingterme, die sich aus der Analyse der stationären Besetzungsbedingungen des elektronischen Zustandsmodells aus Abbildung 3.3-1 unter Berücksichtigung des Radikalzustands  $R^{*+}$  ergeben. Simulationen an FCS-Kurven zeigten, dass für die Amplituden  $A_B$  einen Wert von  $< 2\%$  und für die entsprechende Korrelationszeit  $t_B$  Zeiten von  $> 5$  ms erwartet werden kann. Dieser zweite Term trägt nur zu Korrelationsfunktionen bei, die unter experimentellen Bedingungen mit einem großen fokalen Volumen gemessen wurden. Da bei dem hier verwendeten experimentellen Aufbau (Abschnitt 2.7) Diffusionszeiten kleiner als 5 ms gemessen wurden, kann der Bunchingterm nicht beobachtet werden (siehe Anhang 7.1.3).

$$A_R = \frac{-\lambda_1(1 - F_{eq}) - k_{ox}}{(\lambda_2 - \lambda_1)F_{eq}} \quad (3.4-7)$$

$$t_R = -1/(\lambda_2 + 1/t_d) \approx 1/(k'_{red} + k_{ox}) \quad (3.4-8)$$

mit

$$\lambda_{1,2} = -1/t_d + \frac{1}{2} \left( -k'_{red} - k_{ox} - k_{bR} \pm \sqrt{k'^2_{red} + k^2_{ox} + k^2_{bR} - 2k_{ox}k_{bR} + 2k_{ox}k'_{red} + 2k'_{red}k_{bR}} \right) \quad (3.4-9)$$

Alle Prozesse, die die Fluoreszenz eines durch das fokale Volumen diffundierenden Moleküls beeinflussen, wie Triplett- oder Radikalkinetik, tragen als zusätzlicher Faktor zur Gesamtkorrelationsfunktion  $G(t_c)$  aus Gleichung 3.4-2 bei.<sup>7,67</sup>

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N_F} \cdot \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_d}} \cdot \frac{1}{\sqrt{\left(1 + (\omega_0 / z_0)^2 t_c / t_d\right)}} \left( 1 - A_T - A_R + A_T e^{-t_c/t_T} + A_R e^{-t_c/t_R} \right) \quad (3.4-10)$$

Anhang 7.1.1 liefert einen Überblick über alle Teilgleichungen und die darin enthaltenen Parameter.

### 3.4.2 Das Fluoreszenzsignal

Betrachtet man das vereinfachte Zustandsmodell aus Abbildung 3.3-1 B, kann aus den stationären Bedingungen des Fluorophors F, des Radikalkations  $R^{*+}$  und der möglichen Produkte P der Photozerstörung die stationäre Besetzungswahrscheinlichkeit  $F_{eq}$  des Fluorophors in den elektronischen Zuständen  $S_0, S_1, T_1, S_n$  und  $T_n$  berechnet werden.

$$F_{eq} = \left[ 1 + \frac{k_{ox}(1 + k_{bR} t_d)}{k'_{red} + k_{bR} + 1/t_d} \right]^{-1} \quad (3.4-11)$$

Dabei wird eine Austauschrate von  $1/t_d$  angenommen, mit der die Moleküle aus dem Detektionsvolumen hinaus diffundieren bzw. durch neue Moleküle aus der Lösung ersetzt werden.

Da nach der Regel von Kasha die Fluoreszenz nur aus dem ersten elektronisch angeregten Singulettzustand  $S_1$  erfolgt, ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur stationären Besetzungswahrscheinlichkeit  $S_{1eq}$  (Gleichung 3.3-4) des  $S_1$ -Zustands. Die Fluoreszenzzählrate  $F_{cpm}$ , also die Anzahl an pro Zeiteinheit emittierten Photonen, wird von der Geschwindigkeitskonstante  $k'_o$  für die Deaktivierung des  $S_1$ -Zustands, der Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_{F(Q)}$ , der Detektionseffizienz des experimentellen Aufbaus  $G_{Detect}$  und der Besetzungswahrscheinlichkeit  $F_{eq}$  der Moleküle im Zustand F bestimmt.

$$F_{cpm} = G_{Detect} \Phi_{F(Q)} k'_o S_{1eq} F_{eq} \quad (3.4-12)$$

Die stationären Besetzungswahrscheinlichkeiten  $F_{eq}$  und  $S_{1eq}$  in Gleichung 3.4-12 enthalten Geschwindigkeitskonstanten für die Übergänge zwischen den Zuständen und Absorptionsquerschnitte in die ersten und höher angeregten Zustände des Fluorophors.

Anhang 7.1.2 liefert einen Überblick über alle Teilgleichungen und die darin enthaltenen Parameter.

In der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie kann die Fluoreszenzrate  $F_{cpm}$  pro Molekül aus der mittleren Anzahl an Molekülen  $N_F$  im Detektionsvolumen, der Tripletamplitude  $A_T$  und der Radikalamplituden  $A_R$  berechnet werden. Dabei ist  $F$  das Fluoreszenzsignal.

$$F_{cpm} = \frac{F}{N_F} (1 - A_R - A_T) \quad (3.4-13)$$

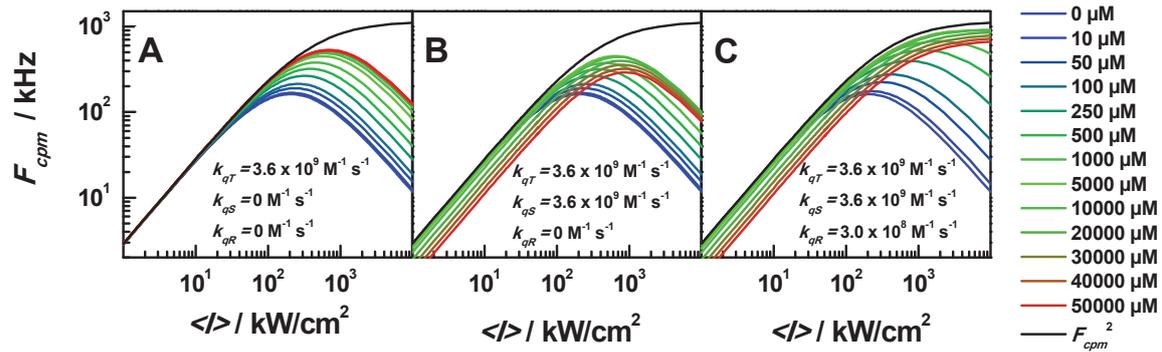
Bei der Anpassung von Gleichung 3.4-12 an die experimentell bestimmten Fluoreszenzzählraten  $F_{cpm}$  wurde als mittlere Anzahl an Molekülen  $N_F$  ein Mittelwert der Messungen bei niedrigen Leistungsdichten  $\langle I \rangle$  verwendet.

Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Anregungsleistungsdichte  $\langle I \rangle$  ist in Abbildung 3.4-1 anhand Gleichung 3.4-12 für einen Fluoreszenzfarbstoff mit charakteristischen photophysikalischen Parametern dargestellt. Als Referenz zur Simulation auf Basis des 5-Niveausystems ist das Signal  $F_{cpm}^2$  eines Fluorophors im 2-Niveausystem nach Gleichung 3.4-14 als schwarze Linie aufgetragen.

$$F_{cpm}^2 = G_{Detect} \Phi_{F(Q)} k'_0 \frac{k_{01}}{k_{01} + k'_0} \quad (3.4-14)$$

Nach einem linearen Bereich beginnt ab einer Leistungsdichte von ca.  $10^2$  die Sättigung der Fluoreszenzzählrate  $F_{cpm}^2$  des 2-Niveausystems (Abbildung 3.4-1 schwarze Linie). Werden in einem 5-Niveausystem die Dunkelzustände des Triplets  $T_1$  und des Radikalkations  $R^{*+}$  berücksichtigt (Abbildung 3.3-1), setzt die Sättigung des Signals bei deutlich geringeren Leistungsdichten ein (Abbildung 3.4-1 blaue Linie,  $[Q] = 0 \mu\text{M}$ ). Zusätzlich kann die maximal erreichbare Fluoreszenzintensität des theoretischen 2-Niveausystems nicht mehr erreicht werden. Interkombinationsübergänge und Oxidationsprozesse aus den ersten oder höher angeregten Singulett- und Triplettzuständen resultieren in der Bevölkung des langlebigen Triplett- und Radikalzustands des Fluorophors und führen zum Absinken der Zählrate.

Durch Zugabe eines reinen Triplettlöschers mit einer Geschwindigkeitskonstante von  $k_{qT} = 3.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  kann dieser Signalverlust verringert werden (Abbildung 3.4-1 A). Zusätzlich zu dem triplettlöschenden Charakter entvölkern viele Additive gleichzeitig den ersten angeregten Singulettzustand  $S_1$ .



**Abbildung 3.4-1:** Simulation der Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals  $F_{cpm}$  von der Anregungsleistung  $\langle I \rangle$  eines Fluorophors mit den photophysikalischen Eigenschaften  $\sigma_{0I} = 2.5 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ ;  $k_0 = 2.5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ ;  $\Phi_{F(0)} = 0.98$ ;  $k_{ISC} = 9.4 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_T = 4.3 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ;  $\sigma_{S1n} = 7.7 \times 10^{-18} \text{ cm}^2$ ;  $\sigma_{T1n} = 3.85 \times 10^{-17} \text{ cm}^2$ ;  $k_{S1n} = k_{T1n} = 5 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{ox'} = 200 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{oxn} = 0.11 \text{ cm}^2 \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{red0} = 9 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{bR} = 200 \text{ s}^{-1}$ . Weitere Parameter:  $\lambda_{ex} = 496.5 \text{ nm}$ ;  $\gamma = 2.5 \times 10^{18} \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ;  $G_{Detect} = 0.0047$ ;  $t_d = 117 \text{ ms}$ . Die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{qS}$ ,  $k_{qT}$  und  $k_{qR}$  des ersten angeregten Singulettzustands  $S_1$ , des Triplettzustands  $T_1$  und des Radikalzustands  $R^+$  sind in den Legenden gegeben. (A) Reine Triplettlöschung. (B) Triplett- und Singulettlöschung. (C) Triplett-, Singulett- und Radikallöschung. Als Referenz ist das Signal  $F_{cpm}^2$  eines Fluorophors im 2-Niveausystem als schwarze Linie dargestellt.

Abbildung 3.4-1 B zeigt das Fluoreszenzsignal eines Fluorophors in Anwesenheit eines Additivs, das gleichzeitig den  $T_1$ - und  $S_1$ -Zustand löscht ( $k_{qT} = k_{qS} = 3.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Aufgrund der deutlich kürzeren Lebensdauer von Singulettzuständen im Vergleich zu Triplettzuständen äußert sich die Singulettlöschung erst bei Konzentrationen im mM-Bereich. Bei weiterer Erhöhung der Konzentration dominiert die Fluoreszenzlöschung und das Signal sinkt. Zur optimalen Annäherung des Fluoreszenzsignals an das 2-Niveausystem muss zusätzlich zur Entvölkerung des ersten angeregten Triplettzustand auch das Radikalkation des Fluorophors in den Grundzustand zurück reduziert werden (Abbildung 3.4-1 C).

### 3.5 Photostabilität

Ein weiterer limitierender Faktor bei Fluoreszenzmessungen stellt die Photozerstörung (engl. *photobleaching*) dar, ein photochemischer Prozess, der das Molekül irreversibel in nichtfluoreszierende Produkte umwandelt. Photozerstörung wird vorwiegend durch molekularen Sauerstoff induzierte Oxidationsreaktionen aus elektronisch angeregten Zuständen verursacht.<sup>68,69</sup> Da die Zerstörungsreaktionen von den angeregten Zuständen ausgehen, ist die Geschwindigkeit der Photozerstörung abhängig von der Anregungsleistung.

Bei der Photozerstörung wird die Gesamtanzahl an Molekülen im Grundzustand durch eine photochemische Reaktion aus den angeregten Zuständen permanent reduziert. Die entstandenen Produkte nehmen nicht mehr am Anregungszyklus des Fluorophors teil und tragen deshalb nicht mehr zum Fluoreszenzsignal bei. Für die Einzelmoleküldetektion ist die Photozerstörung eine erhebliche Einschränkung auf dem Weg zu optimalen Ergebnissen, da bei dieser Anwendung möglichst viele Fluoreszenzphotonen von einem einzelnen Molekül gesammelt werden müssen. Photozerstörungsreaktionen limitieren die Maximalanzahl an von einem einzelnen Molekül emittierten Photonen. In bisherigen Arbeiten wurde die Photostabilität einiger Fluorophore bestimmt und gezielt versucht, deren Stabilität durch die Zugabe von Additiven zu erhöhen.<sup>8-10,67,70-72</sup>

### 3.5.1 Kinetik der Photozerstörung

Das Ausmaß der Photozerstörung eines Fluoreszenzfarbstoffs kann durch die Quantenausbeute  $\Phi_b$  der Photozerstörung ausgedrückt werden.<sup>73</sup>

$$\phi_b = \frac{\text{Anzahl der photozerstörten Moleküle}}{\text{Gesamtanzahl an absorbierten Photonen}} \quad (3.5-1)$$

Dabei beinhaltet die Gesamtanzahl an absorbierten Photonen auch diejenigen, die zum Übergang aus den ersten angeregten Zuständen in höher angeregte Zustände führt, von wo weitere Oxidationsreaktionen ausgehen können (Abbildung 3.3-1).<sup>7,74-76</sup>

Bei der stationären Messung der Photozerstörung kann die Zahl der irreversibel ausgebleichten Moleküle als Abnahme der Farbstoffkonzentration  $c(t)$  in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  gemessen werden. Die Photozerstörung kann als Reaktion Pseudo-1. Ordnung betrachtet werden, so dass der zeitliche Verlauf der Farbstoffkonzentration einem exponentiellen Zerfall folgt:

$$c(t) = c_0 e^{-k_z t} \quad (3.5-2)$$

$c_0$  ist die Anfangskonzentration zum Zeitpunkt  $t = 0$  und  $k_z$  die Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung. In stationären Photozerstörungsmessungen wird der zeitabhängige Zerfall der Fluoreszenzintensität  $F(t)$  einer Farbstofflösung bei Anregungsleistungen  $< 10^3 \text{ W/cm}^2$  gemessen:

$$F(t) = F_0 e^{-k_z t} = G_{\text{Detect}} \phi_{F(Q)} S_1 c_0 V k_0' e^{-k_z t} \quad (3.5-3)$$

Die Fluoreszenzintensität  $F(t)$  ist proportional zur Detektionseffizienz  $G_{\text{Detect}}$  des experimentellen Aufbaus, zur Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_{F(Q)}$ , zur Konzentration des

Fluorophors im  $S_1$  im Detektionsvolumen  $S_1 c_0$ , zum Anregungsvolumen  $V$  und zur Geschwindigkeitskonstante  $k_0'$  für die Entvölkerung des  $S_1$ -Zustands. Die Quantenausbeute der Photozerstörung  $\Phi_b$  kann anhand experimentell zugänglicher Parameter bestimmt werden:<sup>77</sup>

$$\phi_b = \frac{k_z}{k_{01}} = \frac{k_z V_{Fl}}{\sigma_{01} \gamma P d} \quad (3.5-4)$$

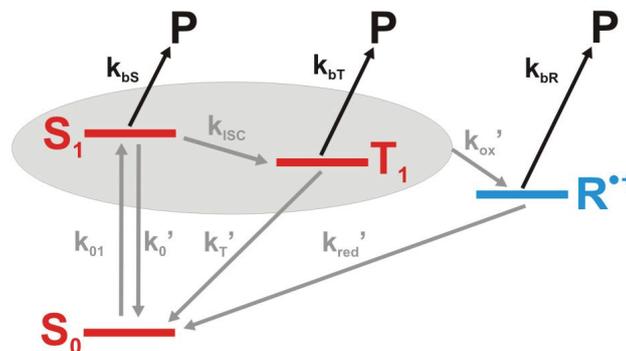
$V_{Fl}$  ist das Gesamtvolumen der Lösung in der Küvette,  $P$  die Laserleistung und  $d$  die Schichtdicke der Küvette. Aus der Quantenausbeute der Photozerstörung kann die Geschwindigkeitskonstante  $k_b$  der Photozerstörung bestimmt werden:

$$k_b = \phi_b k_0' \quad (3.5-5)$$

Die Anzahl der überlebten Absorptionszyklen eines Fluorophors ist durch den Kehrwert der Quantenausbeute  $\Phi_b$  gegeben.

$$\mu = \frac{1}{\phi_b} \quad (3.5-6)$$

Aufgrund der niedrigen Anregungsleistungsdichten, die bei diesen Messungen verwendet werden, kann die Besetzung der höher angeregten Zustände  $S_n$  und  $T_n$  vernachlässigt werden und ein vereinfachtes 3-Niveausystem mit Radikalbildung angenommen werden (Abbildung 3.5-1).



**Abbildung 3.5-1:** Möglichkeiten der irreversiblen Photozerstörung eines Farbstoffmoleküls im 3-Niveausystem mit Radikalbildung.

Die Photozerstörungsreaktion kann aus den angeregten  $S_1$ - und  $T_1$ -Zuständen und dem Radikalkation erfolgen. Die möglichen Zerstörungsreaktionen aus dem  $S_1$ -,  $T_1$ - und  $R^{*+}$ -Zustand können durch die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{bs}$ ,  $k_{bT}$  und  $k_{bR}$  charakterisiert werden. Da die Übergänge zwischen den Energieniveaus normalerweise in einem sehr viel schnelleren Zeitbereich ablaufen (Kapitel 3.1) als die Photozerstörung, kann die stationäre Populationsverteilung des vereinfachten 3-Niveau-Systems als zeitlich konstant angesehen

werden.<sup>7,77</sup> Der zeitliche Abfall der Farbstoffmolekülkonzentration kann dann mit Hilfe der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{bS}$ ,  $k_{bT}$  und  $k_{bR}$  als Geschwindigkeitskonstante  $k_b$  der Photozerstörung aus den angeregten  $S_1$ - und  $T_1$ -Zuständen und dem Radikalzustand ausgedrückt werden:

$$k_b = \left[ k_{bR} \frac{k_{ox}}{k'_{red}} + k_{bT} \frac{k_{ISC}}{k'_T} + k_{bS} \right] \frac{k_0}{k'_0} \quad (3.5-7)$$

In Anwesenheit von Substanzen, die die Photozerstörung beeinflussen können, wie beispielsweise molekularem Sauerstoff, muss die Abhängigkeit der einzelnen Geschwindigkeitskonstanten von der Konzentration des Lösers berücksichtigt werden. Aufgrund der niedrigen Leistungsdichten in Photozerstörungsmessungen und der daraus resultierenden geringen Besetzungswahrscheinlichkeit des Radikalzustands kann der Anteil der aus  $R^{*+}$  ausgebleichten Moleküle vernachlässigt werden.

$$k_b = \left[ (k_{bT} + k_{bT(Q)}[Q]) \frac{k_{ISC}}{k'_T} + (k_{bS} + k_{bS(Q)}[Q]) \right] \frac{k_0}{k'_0} \quad (3.5-8)$$

### 3.6 Design intramolekularer Photoprotektoren

Ein limitierender Faktor in der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie an biologischen Systemen ist die durch die Photostabilität limitierte Signalstärke des Fluoreszenzfarbstoffs. Eine Verbesserung der Photostabilität kann einerseits durch die Zugabe von Additiven, die Dunkelzustände des Fluorophors löschen, erzielt werden. Eine weitere Strategie stellt die interne Photostabilisierung dar.<sup>78,79</sup> Dabei werden photoprotektive Gruppen kovalent an den Fluorophor gebundene und zusammen mit dem Fluorophor bei der Fluoreszenzmarkierung in das biologische System eingeführt. Dadurch ist eine hohe örtliche Konzentration des Löschmoleküls gegeben. Gleichzeitig wird die Umgebung des Gesamtsystems nicht durch hohe Konzentrationen der Additive gestört.

Um einen effektiven intramolekularen Transfer der Triplettenergie des Fluorophors auf einen kovalent gebundenen Akzeptor zu gewährleisten, muss die Energie des Donors, in dem Fall der Fluorophor, über der des Akzeptors liegen. Gleichzeitig müssen Elektronentransferreaktionen, die zur Löschung des  $S_1$ -Zustands und somit der Fluoreszenz führen, vermieden werden.<sup>80</sup> Die freien Enthalpien der Elektronentransferprozesse können mit Hilfe der Rehm-Weller-Gleichung anhand der experimentellen Daten der separierten Chromophoren abgeschätzt werden.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Übersicht über die Oxidations- und Reduktionspotentiale verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe und Additive

Das folgende Kapitel gibt eine Übersicht über die elektrochemischen Potentiale verschiedener Fluorophore und Additive. Der Vergleich der Messwerte mit bekannten Literaturwerten gestaltet sich schwierig, da die Umrechnung zwischen den jeweils verwendeten Elektroden sowie die Kalibrierung der unterschiedlichen Apparaturen Fehler beinhalten. Zur eindeutigen Definition bietet sich die Bestimmung des Oxidationspotentials einer Referenzsubstanz an. Da das Oxidationspotential von Ferrocen eine relativ geringe Abhängigkeit von der Polarität des Lösungsmittels, der chemischen Zusammensetzung des Elektrolyten und des Materials der Arbeitselektrode zeigt, hat sich Ferrocen als Referenzsubstanz zur Kalibrierung von elektrochemischen Messungen etabliert.<sup>81</sup>

Bei der Bestimmung hier aufgeführten Daten erfolgte nach jeder Messung die Bestimmung des Ferrocen-Potentials in der dabei verwendeten Elektrolytlösung. Es wurde ein Oxidationspotential von  $E_{ox,Ag/AgCl}(FeCp_2^+/FeCp_2) = 0.42 \pm 0.02 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  gemessen. Die gemessenen Potentiale der Substanzen  $E_{x,Ag/AgCl}$  wurden anhand des experimentellen Werts für Ferrocen und dem Literaturwert von

$E_{ox,NHE}(FeCp_2^+/FeCp_2) = 0.63 \text{ V}$  vs. NHE umgerechnet, wodurch gleichzeitig die Umrechnung auf die Normalwasserstoffelektrode erfolgte.<sup>31</sup>

$$E_{x,NHE} = E_{x,Ag/AgCl} + [E_{ox,NHE}(FeCp_2^+/FeCp_2) - E_{ox,Ag/AgCl}(FeCp_2^+/FeCp_2)] \quad (4.1-1)$$

Dabei ist  $E_{x,NHE}$  das Oxidations- bzw. Reduktionspotential vs. NHE,  $E_{x,Ag/AgCl}$  der Messwert des Oxidations- bzw. Reduktionspotentials vs. Ag/AgCl,  $E_{ox,NHE}(FeCp_2^+/FeCp_2)$  der Literaturwert des Oxidationspotentials von Ferrocen vs. NHE und  $E_{ox,Ag/AgCl}(FeCp_2^+/FeCp_2)$  das gemessene Oxidationspotential von Ferrocen. Die Korrekturwerte liegen also im Bereich bei  $0.21 \pm 0.02 \text{ V}$ .

#### 4.1.1 Nomenklatur der Radikale von Rhodamin 123

Im Fall des in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffs Rhodamin 123 Hydrochlorid, der im Grundzustand kationisch ist ( $S_0 = Rh123^+$ ), handelt es sich beim dem durch Photooxidation gebildeten sogenannten Radikalkation tatsächlich um ein zweifach positiv geladenes Radikal ( $R^{*+} = Rh123^{*2+}$ ). Das Radikalanion hingegen ist ein neutrales Radikal ( $R^{*-} = Rh123^*$ ). Im Folgenden wird die allgemeine Schreibweise mit  $S_0$ ,  $R^{*+}$  und  $R^{*-}$  wie in Abbildung 3.3-1 verwendet, damit diese Nomenklatur für alle in dieser Arbeit untersuchten Farbstoffe angewendet werden kann.<sup>82</sup>

#### 4.1.2 Fluoreszenzfarbstoffe

In Tabelle 4.1-1 sind die elektrochemischen Daten von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen sowie die freie Standardreaktionsenthalpie für die reduktive Wirkung des Azobenzols AAZB auf den photooxidierten Radikalzustand des jeweiligen Fluorophors zusammengefasst.

Die hier aufgeführten experimentellen Daten für Rh123 und Rh6G stimmen sehr gut mit zuvor publizierten Daten überein.<sup>83,84</sup> Zu den in dieser Arbeit untersuchten Atto-Farbstoffen liegen lediglich Vergleichsdaten zu Atto 647N vor.<sup>28</sup> Diese Messungen wurden gegen die Kalomelektrode zitiert, der verwendete Umrechnungsfaktor auf NHE beträgt  $-0.25 \text{ V}$ .<sup>31</sup> Die hier aufgeführten Potentiale von Atto 647N weichen relativ stark von den Werten aus dieser Veröffentlichung ab ( $E_{ox} / E_{red} = 0.86 \text{ V} / -0.89 \text{ V}$  vs. NHE). Die Daten konnten jedoch in erneuten Messungen reproduziert werden und die CV-Peaks waren eindeutig.

**Tabelle 4.1-1:** Oxidations- und Reduktionspotentiale von Fluoreszenzfarbstoffen vs. NHE und freie Enthalpie  $\Delta G_{ET}$  der Elektronentransferreaktion zwischen dem photooxidierten Fluorophorradikal und dem Additiv AAZB.

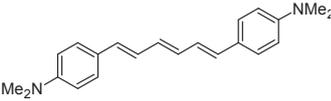
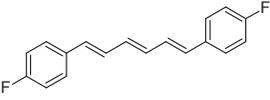
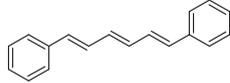
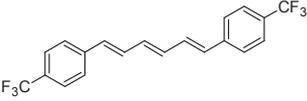
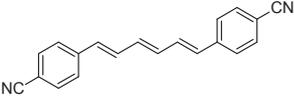
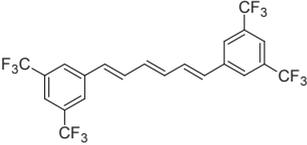
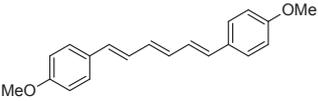
	$E_{ox} / \text{V vs. NHE}$ ( $E_{ox,Lit}$ ) <sup>b</sup>	$E_{red} / \text{V vs. NHE}$ ( $E_{red,Lit}$ ) <sup>b</sup>	$\Delta G_{ET,red} (\text{R}^{*+}) / \text{eV}$
Rh123	1.15 (1.27)	-0.67 (-0.60)	-0.03
Rh110 <sup>a</sup>	1.29	-0.61	-0.17
Rh6G	0.98 (0.92)	-0.75 (-0.88)	0.14
Atto 655	1.34	-0.26	-0.12
Atto 647N	1.09 (0.86)	-0.69 (-0.89)	0.03
Atto 590	1.24	-0.65	-0.12
Atto Rho14	1.27	-0.58	-0.15
Rh 800	1.23	-0.29	-0.10
Alexa 488	1.42	-1.09	-0.29

<sup>a</sup> Aus Referenz<sup>84</sup>. <sup>b</sup> Literaturwerte, siehe Text.

### 4.1.3 Diphenylhexatriene

Verschieden substituierte Diphenylhexatriene wurden hinsichtlich ihrer Redox Eigenschaften untersucht. Die gemessenen Potentiale sowie die anhand der Rehm-Weller-Gleichung (3.2-1) berechneten freien Enthalpien der Elektronenübertragungsreaktionen zwischen Rh123 und dem jeweiligen Additiv sind in diesem Abschnitt dargestellt.

**Tabelle 4.1-2:** Oxidations- und Reduktionspotentiale und freie Enthalpie der reduktiven Elektronentransferreaktionen zwischen Additiv und  $S_1$ ,  $T_1$  und Radikalzustand des Fluorophors Rh123. Alle oxidativen Prozesse sind endergonisch ( $\Delta G_{ET} > 0$ ) und deshalb in der Tabelle nicht angegeben. Zur Berechnung wurden die gemessenen Redoxpotentiale von Rh123 ( $E_{ox} = 1.15$  V vs. NHE und  $E_{red} = -0.67$  V vs. NHE), sowie die Energie des ersten angeregten Singulett- und Triplettzustands in Ethanol ( $E_S = 2.43$  eV und  $E_T = 1.90$  eV) verwendet. Der Beitrag des Coulomb-Terms wurde vernachlässigt.

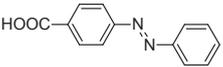
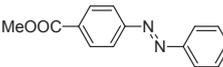
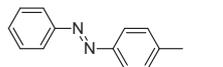
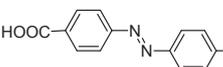
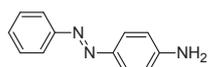
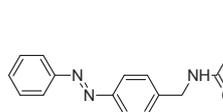
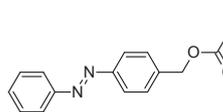
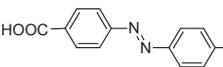
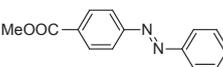
Additiv		$E_{ox}$	$E_{red}$	$\Delta G_{ET, red} / \text{eV}$		
		V vs. NHE		$S_1$	$T_1$	$R^+$
	Me <sub>2</sub> N-DPH	0.51 <sup>#</sup>	-1.98	-1.25	-0.72	-0.64
	F-DPH	1.20	-1.79	-0.56	-0.03	0.05
	DPH	1.22 (1.23) <sup>a</sup> (1.27) <sup>b</sup>	-1.77	-0.54	-0.01	0.07
	CF <sub>3</sub> -DPH	1.36	-1.56	-0.40	0.13	0.20
	CN-DPH	1.36	-1.35 <sup>#</sup>	-0.40	0.13	0.20
	bis-CF <sub>3</sub> -DPH	1.46	-1.50	-0.30	0.23	0.30
	MeO-DPH	0.93	-1.89	-0.83	-0.30	-0.33

Alle reversiblen Potentiale sind mit einem # gekennzeichnet. <sup>a</sup> Literaturwert aus Referenz <sup>85</sup>. <sup>b</sup> Literaturwert aus Referenz <sup>86</sup>.

#### 4.1.4 Azobenzole

Verschieden substituierte Azobenzolderivate wurden hinsichtlich ihrer Redoxeigenschaften untersucht. Die gemessenen Potentiale sowie die anhand der Rehm-Weller-Gleichung (3.2-1) berechnete freien Enthalpien der Elektronenübertragungsreaktionen zwischen Rh123 und dem jeweiligen Additiv sind in Tabelle 4.1-3 dargestellt.

**Tabelle 4.1-3:** Oxidations- und Reduktionspotentiale und freie Enthalpie  $\Delta G_{ET}$  der Elektronentransferreaktionen zwischen Azobenzolderivaten und  $S_1$ ,  $T_1$  und Radikalkation  $R^{+\bullet}$  des Fluorophors Rh123. Alle nicht aufgeführten Prozesse sind endergonisch ( $\Delta G_{ET} > 0$ ). Zur Berechnung wurden die gemessenen Redoxpotentiale von Rh123 ( $E_{ox} = 1.15$  V vs. NHE und  $E_{red} = -0.67$  V vs. NHE), sowie die Energie des ersten angeregten Singulett- und Triplettzustands in Wasser ( $E_s = 2.42$  eV und  $E_T = 1.92$  eV) verwendet. Der Coulomb-Terms wurde vernachlässigt.

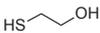
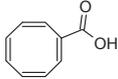
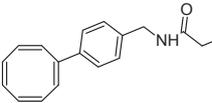
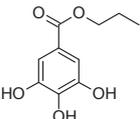
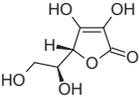
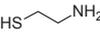
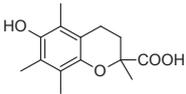
Additiv		$E_{ox}$	$E_{red}$	$\Delta G_{ET,red} / \text{eV}$			$\Delta G_{ET,ox} / \text{eV}$	
				V vs. NHE	$S_1$	$T_1$	$R^{+\bullet}$	$S_1$
	AZB	2.06	-0.81	0.31	0.81	0.91	-0.46	0.04
	BB98	2.06	-0.99	0.31	0.81	0.91	-0.28	0.22
	BB99	1.93	-1.29	0.18	0.68	0.78	0.02	0.52
	AAZB	1.12	-1.55	-0.63	-0.13	-0.03	0.28	0.78
	BB105	1.07	-1.54	-0.68	-0.18	-0.08	0.27	0.77
	JS57	2.03	-1.24	0.28	0.78	0.88	-0.03	0.47
	BB117	2.20 <sup>a</sup>	-1.21	0.45	0.95	1.05	-0.06	0.44
	BB80	1.31	-0.82	-0.45	0.06	0.16	-0.45	0.05
	BB93	1.34	-0.96	-0.42	0.09	0.19	-0.31	0.19

<sup>a</sup> Das Potential lag nicht im messbaren Bereich. Es wurde der Grenzwert des Messbereichs angenommen.

### 4.1.5 Triplettlöcher und Antioxidantien

Die elektrochemischen Potentiale von bekannten Triplettlöcher und Antioxidantien wurden untersucht. Die  $\Delta G_{ET}$ -Werte der Elektronentransferreaktionen wurden stellvertretend für den Fluorophor Rh123 berechnet (Tabelle 4.1-4).

**Tabelle 4.1-4:** Oxidations- und Reduktionspotentiale in DMF bzw. AN und freie Enthalpie  $\Delta G_{ET}$  der Elektronentransferreaktionen zwischen dem Additiv und dem  $S_1$ -,  $T_1$ - und Radikalzustand des Fluorophors Rh123. Alle nicht aufgeführten Prozesse sind endergonisch ( $\Delta G_{ET} > 0$ ). Zur Berechnung wurden die gemessenen Redoxpotentiale von Rh123 ( $E_{ox} = 1.15$  V vs. NHE und  $E_{red} = -0.61$  V vs. NHE), sowie die Energie des ersten angeregten Singulett- und Triplettzustands in Wasser ( $E_s = 2.42$  eV und  $E_T = 1.92$  eV) verwendet. Der Beitrag des Coulomb-Terms wurde vernachlässigt.

Additiv	$E_{ox}$	$E_{red}$	$\Delta G_{ET, red} / \text{eV}$			$\Delta G_{ET, ox} / \text{eV}$
			/ V vs. NHE	$S_1$	$T_1$	$R^{++}$
 ME	1.90	-2.33	0.15	0.65	0.75	1.06
 COT	1.76 <sup>a</sup> (1.67) <sup>b</sup>	-1.79	0.01	0.51	0.61	0.52
 COC	1.69	-1.30	-0.06	0.44	0.54	0.03
 Mayer-COT	1.62	-1.39	-0.13	0.37	0.47	0.12
 DABCO	1.02	-1.91	-0.73	-0.23	-0.13	0.64
 n-Propylgallat	0.95 (0.82) <sup>b</sup>	-2.25	-0.80	-0.30	-0.20	0.98
 Vitamin C	0.90 (0.86) <sup>b</sup>	-2.04	-0.85	-0.35	-0.25	0.77
 MEA	0.65	-2.16	-1.10	-0.60	-0.50	0.89
 Trolox	0.40 (0.32) <sup>b</sup>	-0.82	-1.35	-0.85	-0.75	-0.45

<sup>a</sup> Das Potential lag nicht im messbaren Bereich. Es wurde der Grenzwert des Messbereichs angenommen.

<sup>b</sup> Literaturwerte, siehe Text.

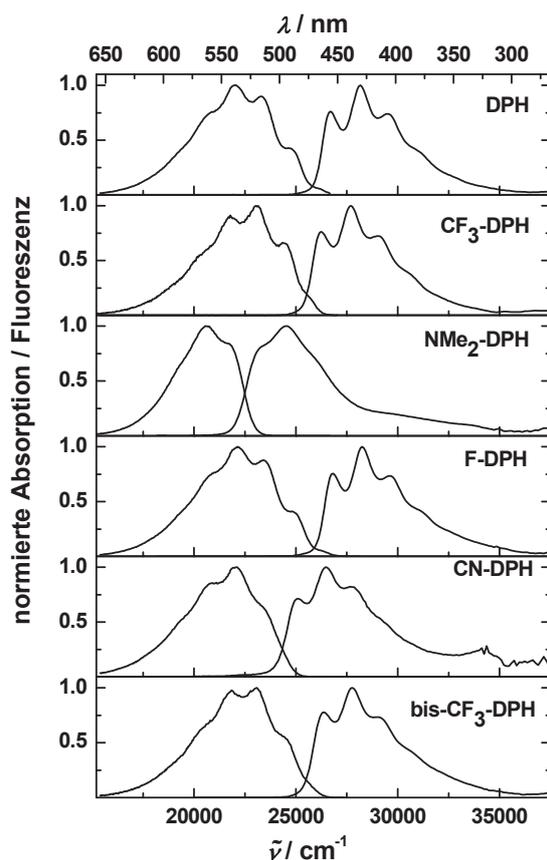
Vergleiche mit Literaturwerten von Vitamin C, n-Propylgallat<sup>93</sup>, Trolox<sup>94</sup> und COT<sup>87</sup> ergaben eine gute Übereinstimmung. Die Literaturwerte sind in Tabelle 4.1-4 in Klammern angegeben. Mit abnehmenden Oxidationspotentialen nimmt die reduktive Wirkung auf den Fluorophor zu, wobei die Reduktionskraft der verschiedenen Zustände in der Reihenfolge  $S_1 > T_1 > R^{*+}$  abnimmt. Demnach sind antioxidative Additive zugleich in der Lage, den Singulett- und Triplettzustand des Fluorophors zu reduzieren.

## 4.2 Diphenylhexatriene als Triplettlöcher für Rhodamine 123

Carotinoide mit 11 bis 13 Doppelbindungen sind natürliche Bestandteile in vielen photosynthetischen Systemen.<sup>88</sup> Neben Energietransferprozessen<sup>89</sup> und stabilisierender Funktion in Proteinkomplexen<sup>90</sup> besteht ihre wichtigste Aufgabe in der photoprotektiven Wirkung. Carotinoide besitzen niedrig liegende Triplettzustände und sind somit in der Lage den Triplettzustand von Chlorophyll zu löschen und die reaktive Singulett-Sauerstoffspezies zu deaktivieren.<sup>91</sup> Langkettige Carotinoide sind aufgrund ihres niedrig liegenden, optisch aktiven  $1^1B_u^+$  Singulettzustands ( $S_2$  oder  $S_3$ ) als Triplettlöcher für Fluoreszenzfarbstoffe nicht geeignet. Darüber hinaus kann auch der erste Singulettzustand ( $2^1A_g^-$ ) in Fluoreszenzlöschprozessen involviert sein.<sup>92-94</sup> Durch den Einsatz von aromatischen Pseudo-Carotinoiden mit kürzeren Konjugationslängen können die energetischen Lagen der elektronischen Zustände des Carotinoids an die des gewünschten Fluorophors angepasst werden, um die nötigen Löschprozesse zu ermöglichen. Durch die Substitution des aromatischen Systems mit Substituenten unterschiedlicher elektronischer Eigenschaften können zugleich die Redoxmechanismen gesteuert werden.

### 4.2.1 Lage der Energieniveaus und spektroskopische Eigenschaften

Zur Bestimmung der Lage der Energieniveaus wurden mittels Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie die Lage der Absorptions- und Emissionsmaxima einer Reihe von unterschiedlich substituierten Diphenylhexatrienen (DPHs) in THF und Ethanol untersucht.



**Abbildung 4.2-1:** Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Diphenylhexatriene in THF.

Die normierten Absorptions- und Fluoreszenzspektren in THF sind in Abbildung 4.2-1 dargestellt. Die gemessenen Absorptionsmaxima stimmen gut mit den DFT/MRCI-Rechnungen der vertikalen Absorptionsenergien überein.<sup>95</sup> Die Substitution des Phenylrings in meta- oder para-Position durch  $\text{CF}_3$ -Gruppen hat kaum Einfluss auf die elektronischen Spektren (Abbildung 4.2-1 und Tabelle 4.2-1). Die Einführung einer Dimethylamino- oder Cyano-Gruppe verursacht eine höhere Konjugationslänge und damit eine bathochrome Verschiebung im Vergleich zum nicht substituierten DPH. Um den Triplettzustand des Fluoreszenzfarbstoffs Rh123 zu löschen, muss zunächst ein Singulettenergietransfer (ET) der Anregungsenergie von Rh123 auf das Additiv vermieden werden. Aus dem Absorptions- und Fluoreszenzmaximum von Rh123 in Ethanol erhält man eine Singulettenergie von 2.38 eV. Diese Bedingung ist auch im Fall des DPHs mit der langwelligsten Absorptionsbande,  $\text{Me}_2\text{N-DPH}$  mit  $E_{0,0} = 3.06$  eV, erfüllt, d.h. der Singulett-ET von Rh123 auf alle untersuchten DPHs ist endergonisch.

**Tabelle 4.2-1:** Experimentell bestimmte spektroskopische Eigenschaften der DPHs.

	Absorption			Fluoreszenz	
	$\varepsilon / \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ <sup>a</sup>	$\Delta E_{max} / \text{eV}$ <sup>b</sup> ( $\lambda_{max} / \text{nm}$ )	$E_{0,0} / \text{eV}$ <sup>c</sup>	$\Delta E_{max} / \text{eV}$ <sup>b</sup> ( $\lambda_{max} / \text{nm}$ )	$\Phi_F$ <sup>b</sup>
DPH	78200	3.48 (356)	3.30	2.73 (455)	0.64
CF <sub>3</sub> -DPH	67600	3.44 (361)	3.26	2.86 (434)	0.11
Me <sub>2</sub> N-DPH	69300	3.06 (408)	2.94	2.55 (487)	0.33
F-DPH	59200	3.50 (354)	3.32	2.74 (452)	0.58
CN-DPH	42800	3.28 (378)	3.09	2.74 (453)	0.29
bis-CF <sub>3</sub> -DPH	62300	3.44 (360)	3.26	2.86 (433)	0.08

<sup>a</sup> Extinktionskoeffizienten in Ethanol. <sup>b</sup> Maxima der Absorptions- und Fluoreszenzspektren und Fluoreszenzquantenausbeuten in THF. Die Quantenausbeute von DPH wurde der Literatur entnommen und diente als Standard für die Bestimmung der Quantenausbeuten der anderen DPHs.<sup>32</sup> <sup>c</sup> Energie der Singulettzustände aus den 0,0-Übergängen der Multi-Gauß-Analysen der Schwingungsprogressionen.<sup>95</sup>

Aufgrund der geringen Absorptionsquerschnitte für die Anregung aus dem S<sub>0</sub> ist die Lage des Triplettzustands der DPHs und Fluorophoren experimentell sehr schwer zugänglich. Darum wurden zur Abschätzung des Triplettenergie transfers quantenmechanische Rechnungen herangezogen.<sup>95</sup> Im Rahmen der Genauigkeit dieser Rechnungen liegt die vertikale T<sub>1</sub>-Anregungsenergie aller DPHs im Bereich von  $E_T = 1.76 \pm 0.05$  eV in der Gasphase. Mittels Energietransferexperimenten in Lösung ist die Lage des T<sub>1</sub>-Zustands von DPH bestimmt worden ( $E_{T,solv} = 1.47 - 1.54$  eV)<sup>51,96,97</sup>, die gut mit den berechneten adiabatischen Anregungsenergien der DPHs übereinstimmt ( $E_T = 1.36 \pm 0.04$  eV). Die vertikale Emissionsenergie am Minimum der Triplettenergie von Rh123 in Ethanol beträgt 1.76 eV, die adiabatische T<sub>1</sub>-Emission 1.82 eV. Basierend auf dieser theoretischen Betrachtung der Lage der Energieniveaus sollte ein Triplettenergie transfer von Rh123 auf die DPHs möglich sein.

#### 4.2.2 Redox Eigenschaften der DPHs

Mittels cyclischer Voltammetrie wurden die Reduktions- und Oxidationspotentiale,  $E_{ox}$  und  $E_{red}$ , der DPHs in wasserfreiem Dimethylformamid gemessen. Stellvertretend für alle DPHs ist in Abbildung 4.2-2 ein Beispiel eines typischen Cyclovoltammogramms gezeigt (Messungen anderer DPHs siehe Anhang).

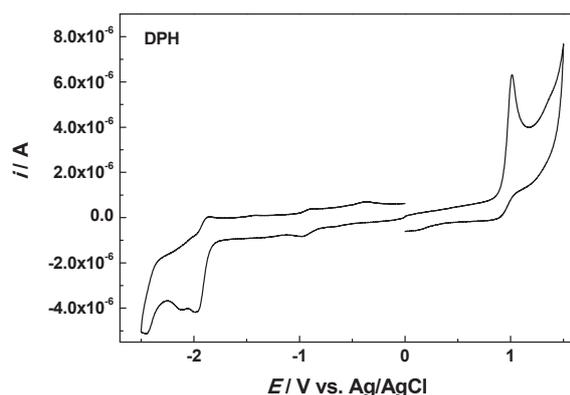


Abbildung 4.2-2: Cyclovoltammogramm von DPH in DMF.

Um die möglichen Elektronentransferreaktionen zwischen einem DPH-Derivat und Rh123 in den elektronischen Zuständen  $S_1$ ,  $T_1$  und dem Radikalkationenzustand  $R^{++}$  abzuschätzen, wurde die Änderung der freien Enthalpie  $\Delta G_{ET}$  der entsprechenden Reaktionen berechnet.

**Tabelle 4.2-2:** Oxidations- und Reduktionspotentiale und freie Enthalpien  $\Delta G_{ET,red}$  der reduktiven Elektronentransferreaktionen zwischen Additiv und  $S_1$ ,  $T_1$  und Radikalzustand des Fluorophors Rh123. Alle oxidativen Prozesse sind endergonisch ( $\Delta G_{ET} > 0$ ) und deshalb in der Tabelle nicht angegeben. Zur Berechnung wurden die gemessenen Redoxpotentiale von Rh123 ( $E_{ox} = 1.15$  V vs. NHE und  $E_{red} = -0.67$  V vs. NHE), sowie die Energie des ersten angeregten Singulett- und Triplettzustands in Ethanol ( $E_s = 2.43$  eV und  $E_T = 1.90$  eV) verwendet. Der Beitrag des Coulomb-Terms wurde vernachlässigt.

Additiv	$E_{ox}^a$	$E_{red}^a$	$\Delta G_{ET,red} / eV$			$k_{qT}$
	V vs. NHE		$S_1$	$T_1$	$R^{++}$	$10^9 M^{-1} s^{-1}$
Me <sub>2</sub> N-DPH	0.51 <sup>#</sup>	-1.98	-1.25	-0.72	-0.64	6±1 <sup>b</sup>
F-DPH	1.20	-1.79	-0.56	-0.03	0.05	2.9 ± 0.3
DPH	1.22	-1.77	-0.54	-0.01	0.07	4.9 ± 0.6
CF <sub>3</sub> -DPH	1.36	-1.56	-0.40	0.13	0.20	2.5 ± 0.2
CN-DPH	1.36	-1.35 <sup>#</sup>	-0.40	0.13	0.20	n.d.
bis-CF <sub>3</sub> -DPH	1.46	-1.50	-0.30	0.23	0.30	2.1 ± 0.7
MeO-DPH	0.93	-1.89	-0.83	-0.30	-0.33	n.d.

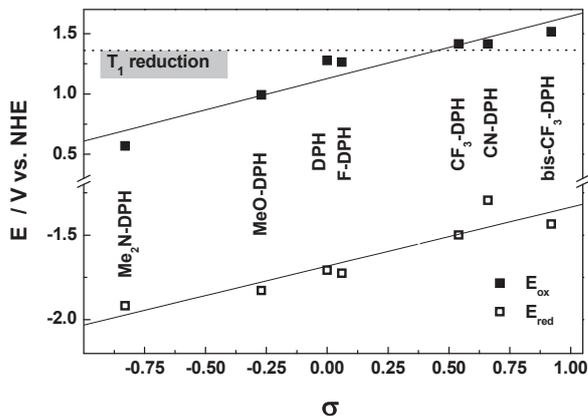
<sup>a</sup> Alle reversiblen Potentiale sind mit einem # gekennzeichnet. <sup>b</sup> Die Geschwindigkeitskonstante konnte aufgrund eines zusätzlichen Dunkelzustands lediglich grob abgeschätzt werden. Die Fehler bei den gemessenen Potentialen liegen bei  $< 0.05$  V, die der Geschwindigkeitskonstante für die Löschung bei  $\pm 0.3$ .

Da das Radikalkation  $R^{++}$  von Rh123 bei hohen Anregungsleistungen durch Zweiphotonenphotolyse entstehen kann, muss dieser Zustand ebenfalls betrachtet werden<sup>7</sup>. Entsprechend der Rehm-Weller-Gleichung (3.2-1) wurde  $\Delta G_{ET}$  auf Basis der gemessenen Redoxpotentiale und der Energien der beteiligten ersten angeregten Zustände berechnet<sup>98</sup>.

In Einzelmolekülexperimenten können bimolekulare Löschprozesse des ersten angeregten Singulett- bzw. Triplettzustands aufgrund der deutlich unterschiedlichen Lebensdauern der beiden Zustände durch Variation der Additivkonzentration direkt adressiert werden. Unter Annahme einer diffusions-kontrollierten Löschung mit einer Geschwindigkeitskonstante  $k_{diff} = 6.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  in Wasser<sup>51</sup> wird durch die Zugabe von ca. 100  $\mu\text{M}$  des Additivs die Geschwindigkeitskonstante  $k_T$  für die Deaktivierung des  $T_1$  von  $4 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$  auf  $10.5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$  verkürzt, während die Fluoreszenzlebensdauer von 4 ns auf 3.99 ns sinkt.

Die Triebkraft der Elektronentransferreaktionen aus dem  $T_1$  von Rh123 ist aufgrund der geringeren energetischen Lage des Zustands immer kleiner als die des Singulettzustands (Tabelle 4.2-2, Gleichung 3.2-1), was eine selektive Löschung des Triplettzustands durch einen Elektronentransfermechanismus unmöglich macht. Für alle oxidativen Prozesse aus den Anregungszuständen  $S_1$ ,  $T_1$  und dem photooxidierten Zustand  $R^{*+}$  von Rh123 wurden  $\Delta G_{ET}$ -Werte  $> 0$  gefunden. Aus diesem Grund werden in Tabelle 4.2-1 nur die  $\Delta G_{ET}$ -Werte der reduktiven Reaktionen aus diesen Zuständen gezeigt.

Betrachtet man die  $\Delta G_{ET}$  von Reaktionen des Rhodamins im  $S_1$ -Zustand, sind alle oben aufgeführten DPHs in der Lage, die Fluoreszenz von Rh123 zu löschen. In den FCS-Untersuchungen zur triplettlöschenden Eigenschaft (Kapitel 4.2.3) werden daher Konzentrationen verwendet, die im unteren mikromolaren Bereich liegen, wodurch ein Elektronentransfer mit dem kurzlebigen  $S_1$ -Zustand des Rhodamins verhindert wird.



**Abbildung 4.2-3:** Oxidations- und Reduktionspotentiale in DMF gegen die Hammett-Koeffizienten der DPHs. Die lineare Abhängigkeit zwischen den Potentialen und dem Hammett-Koeffizienten  $\sigma$  ist gegeben durch  $E_{ox} = 1.13 + 0.52 \times \sigma$  bzw.  $E_{red} = -1.68 + 0.35 \times \sigma$ . Die Reduktion des Triplettzustands von Rh123 durch ein DPH ist dann möglich, wenn dessen Oxidationspotential unterhalb der eingezeichneten Grenze (gepunktete Linie) liegt. Ein methoxy-substituiertes DPH-Derivat (MeO-DPH,  $E_{ox} / E_{red} = 0.99 \text{ V} / -1.83 \text{ V}$  vs. NHE) mit einem Hammett-Koeffizienten von -0.27 wurde zusätzlich aufgetragen, um den Hammett-Plot auf der Seite der elektronenschiebenden Gruppen zu vervollständigen.

Die Redoxpotentiale der DPHs und damit die treibende Kraft der Elektronentransferreaktion mit Rhodamin variiert stark mit den Substituenten am aromatischen Ring. Zur Verdeutlichung der Abhängigkeit vom elektronischen Charakter der Endgruppen wurden die Potentiale gegen die entsprechenden Hammett-Koeffizienten<sup>99</sup> aufgetragen (Abbildung 4.2-3) und eine gute lineare Korrelation gefunden. Oxidations- und Reduktionspotentiale werden gleichermaßen durch elektronenreiche Substituenten (Me<sub>2</sub>N-DPH) verringert und durch elektronenziehende Gruppen (CF<sub>3</sub>-DPH, CN-DPH, bis-CF<sub>3</sub>-DPH) erhöht.

Für jeden Elektronentransferprozess kann ein Grenzwert für das Oxidations- bzw. Reduktionspotential des DPHs ermittelt werden. Erreichen die Potentiale diesen Grenzwert, findet der Elektronentransfer zwischen Q und Rh123 statt. Um eine reduktive Reaktion des Rh123 zu vermeiden, müsste das Oxidationspotential des DPHs bei  $E_{ox} > 1.8 \text{ V}$  liegen, die Oxidation von Rh123 findet mit Additiven statt, deren Reduktionspotential größer als -1.2 eV sind.

Elektronenziehende Gruppen vermindern die Löschung durch reduktive Reaktionen, dennoch wären weit elektronenärmere Substituenten nötig, um die Löschung der Fluoreszenz zu verhindern. Vor allem durch die Verbindung Me<sub>2</sub>N-DPH kann der T<sub>1</sub>-Zustand von Rh123 effizient durch Elektronentransfer gelöscht werden, hingegen sollte beim bis-CF<sub>3</sub>-Derivat ein T<sub>1</sub>-Löschung über den Elektronentransfermechanismus nicht mehr möglich sein.

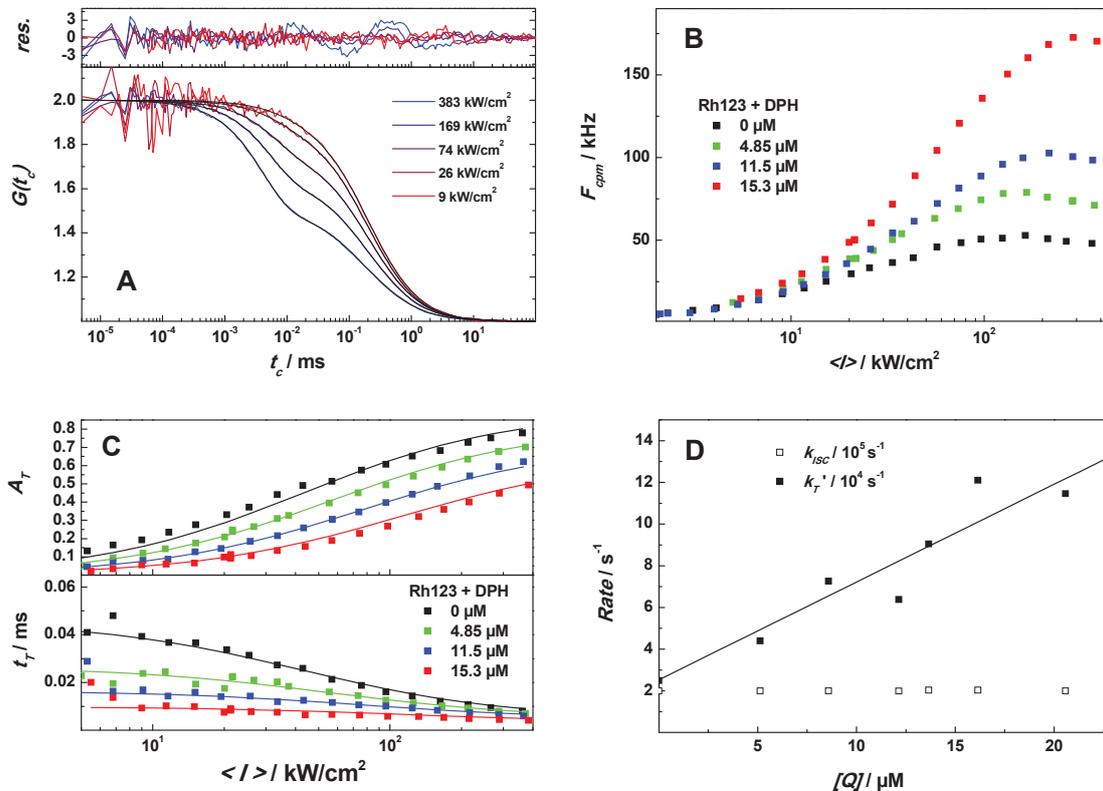
#### **4.2.3 Bestimmung der bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten der Triplettlöschung durch Fluoreszenzkorrelationspektroskopie**

Aufgrund der geringen Löslichkeit in Wasser wurden die FCS-Messungen zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für die Löschung des T<sub>1</sub> der DPHs in Ethanol durchgeführt. Da die Konzentration des gelösten Sauerstoffs in Ethanol mit  $[\text{O}_2] = 2.1 \text{ mM}$  deutlich über der von Wasser liegt ( $[\text{O}_2] = 0.29 \text{ mM}$ ), wird durch die triplettlöschende Eigenschaft des molekularen Sauerstoffs die Geschwindigkeitskonstante  $k_T'$  verstärkt und die stationäre Besetzungswahrscheinlichkeit des T<sub>1</sub> reduziert. Um eine ausreichende Population des T<sub>1</sub>-Zustands von Rhodamin zu erreichen, wäre eine sehr hohe Anregungsleistung nötig. Daher wurden die ethanolischen Lösungen mit einer definierten O<sub>2</sub>-N<sub>2</sub>-Gasmischung gesättigt, wodurch eine gezielte Verschiebung der Triplettparameter

zu den gewünschten Bedingungen möglich war. Die Sauerstoffkonzentration wurde von 20 % bei luftgesättigter Lösung auf näherungsweise 0.1 % reduziert. Die Bestimmung der Triplettparameter  $k_{ISC}$  und  $k_T'$  aus den leistungsabhängigen FCS-Messungen erfolgte nach Gleichung 3.4-4 und 3.4-5.

### DPH

Durch Variation der Anregungsleistung erhält man eine typische Serie von FCS-Kurven von Rh123 bei einer bestimmten Additivkonzentration. Abbildung 4.2-4 zeigt die normierten Korrelationsfunktionen von Rh123 in Ethanol mit einer DPH-Konzentration von  $15.3 \mu\text{M}$  bei verschiedenen Leistungsdichten  $\langle I \rangle$ .



**Abbildung 4.2-4:** (A) Normierte Korrelationskurven von Rh123 in Ethanol ( $[\text{O}_2] \sim 0.1\%$ ) und einer Konzentration von  $[Q] = 15.3 \mu\text{M}$  bei verschiedenen Anregungsleistungsdichten  $\langle I \rangle$ . (B) Zählrate pro Molekül  $F_{cpm}$ . (C) Auftragung der mittleren Besetzungswahrscheinlichkeit des Tripletzustands  $A_T$  und der Triplettkorrelationszeit  $t_T$  bei einer Konzentration von 0, 4.85, 11.5 und  $15.3 \mu\text{M}$  DPH gegen die Leistungsdichte. Durch die globale Anpassung der Triplettparameter an Gleichung 3.4-4 und 3.4-5 erhält man die Geschwindigkeitskonstante für Intersystemcrossing und die Geschwindigkeitskonstante für die Deaktivierung des Tripletzustands  $k_T'$  für die einzelnen Konzentrationen. (D) Die Steigung des linearen Zusammenhangs zwischen  $k_T'$  und  $[Q]$  ergibt die Geschwindigkeitskonstante für die Löschung des  $T_1$   $k_{qT} = 4.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

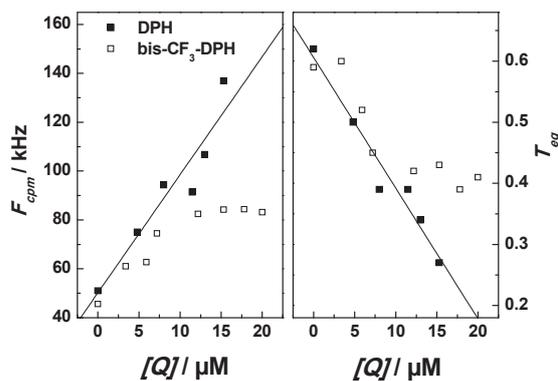
Die Korrelationskurven werden durch den theoretischen Ausdruck aus Gleichung 3.4-10 analysiert. Die Anpassung eines Diffusionsterms mit der charakteristischen Diffusionszeit  $t_D$  und einem Bunchingterm mit der Relaxationszeit  $t_T$  liefern gleichmäßig verteilte

Residuen für niedrige und mittlere Anregungsleistungen. Durch die Zugabe von DPH wird der Anteil an Molekülen im  $T_1$  reduziert, sowohl die Triplettamplitude  $A_T$  (Abbildung 4.2-4 C) als auch die Triplettkorrelationszeit  $t_T$  (Abbildung 4.2-4 D) nehmen mit steigender DPH-Konzentration ab. Durch eine globale Anpassung der Gleichungen 3.4-4 und 3.4-5 an die experimentellen Daten von  $A_T$  und  $t_T$  werden die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{ISC}$  und  $k_T'$  für Interkombinationsübergänge und die Deaktivierung des  $T_1$  für die verschiedenen DPH-Konzentrationen zugänglich. Wie nach Gleichung 3.3-3 zu erwarten ist, ist die Geschwindigkeitskonstante  $k_T'$  linear von der Konzentration  $[Q]$  des Additivs abhängig, während  $k_{ISC}$  konstant bleibt. Die Steigung der Gerade bestimmt die Geschwindigkeitskonstante für die Triplettlöschung durch DPH ( $k_{qT} = 4.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), die nahe an der diffusionskontrollierten Geschwindigkeitskonstante  $k_{diff} = 5.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  in Ethanol liegt.<sup>51</sup> Hierbei ist interessant, dass die Geschwindigkeitskonstante für Intersystemcrossing  $k_{ISC} = 2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$  unter sauerstoffreduzierten Bedingungen (0.1%  $\text{O}_2$ ) um einen Faktor 4.5 kleiner ist als in luftgesättigter Lösung. Auch in früheren Arbeiten wurde diese sauerstoffinduzierte Verstärkung der Interkombinationsübergänge beobachtet<sup>8,56,100,101</sup>, welche ein wichtiger Kanal für die Entstehung von reaktivem Singulett-Sauerstoff durch die Fluoreszenzlöschung von Rh123 darstellt. Für die weitere Diskussion der individuellen Löschmechanismen von  $S_1$  und  $T_1$  ist die Definition einer Quantenausbeute der Singulett- bzw. Triplettlöschung der Zustände X durch  $\Phi_{qX} = k_{qX}[Q]/(k_X + k_{qX}[Q])$  zweckmäßig. Dabei steht  $k_X$  für die Geschwindigkeitskonstante der Deaktivierung des jeweiligen Zustands und  $k_{qX}$  für die entsprechende bimolekulare Geschwindigkeitskonstante der Löschung des Zustands X. Für ein Löschmolekül mit einer diffusionskontrollierten Geschwindigkeitskonstante  $k_{diff}$  bei einer Konzentration  $[Q] = 10 \mu\text{M}$  und der Fluoreszenz- bzw. Triplettlebensdauer von Rh123,  $1/k_0 = 4 \text{ ns}$  und  $1/k_T = 40 \mu\text{s}$ , lässt sich eine Quantenausbeute für die  $S_1$ -Löschung von  $\Phi_{qS} = 0.02 \%$  und eine bedeutend höhere Quantenausbeute für die Löschung des  $T_1$  mit  $\Phi_{qT} = 68 \%$  berechnen. Diese selektive Löschung durch DPH bewirkt eine Steigerung der Fluoreszenzzählrate pro Molekül  $F_{cpm}$  und die Verminderung der Triplettpopulation  $A_T$  mit zunehmender DPH-Konzentration (Abbildung 4.2-4 B).

### ***Sonstige DPHs***

Neben dem unsubstituierten DPH wurden Moleküle mit Substituenten unterschiedlicher elektronischer Eigenschaften auf ihre triplettlöschende Wirkung hin untersucht ( $\text{CF}_3$ -DPH, F-DPH und bis- $\text{CF}_3$ -DPH siehe Anhang 7.4.2). In Tabelle 4.2-2 sind die

Geschwindigkeitskonstanten der Triplettlöschung dieser Verbindungen aufgeführt. Diese unterscheiden sich auch unter Annahme eines Messfehlers von 10 % um den Faktor 2 und zeigen einen systematischen Trend: Die Triplettlöschung ist umso weniger effizient, je größer das sterische Volumen oder die Elektronegativität der Endgruppen ist. Ein wichtiger Aspekt für die Anwendbarkeit der DPHs als photoprotektive Additive ist deren schlechte Löslichkeit. Im Fall des bis-CF<sub>3</sub>-DPH zeigt sich diese durch eine Sättigung des gewinnbringenden Effekts im Konzentrationsbereich über 10 µM. Das Fluoreszenzsignal von Rh123 lässt sich durch die Zugabe von bis-CF<sub>3</sub>-DPH nicht weiter steigern, gleichzeitig kann die Triplettpopulation nicht weiter verringert werden (Abbildung 4.2-5). Carotinoide und deren Derivate sind dafür bekannt, bereits bei niedrigen Konzentrationen Komplexe in polaren Lösungsmitteln zu bilden<sup>102</sup>. Daher sollten für weitere Studien DPH-Derivate ausgewählt werden, deren Substituenten die Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln oder Wasser verbessern.

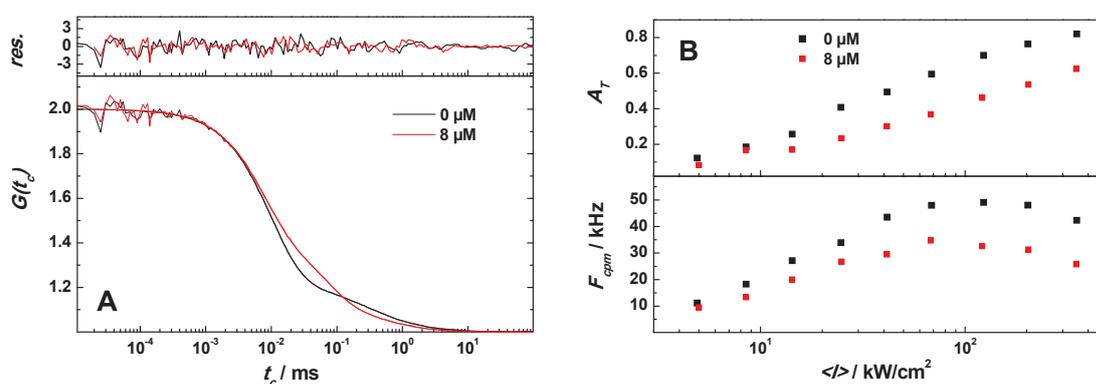


**Abbildung 4.2-5:** Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals  $F_{cpm}$  und der Triplettpopulation  $A_T$  von Rh123 von der Konzentration an DPH (■) und bis-CF<sub>3</sub>-DPH (□) bei einer Leistungsdichte von  $\langle I \rangle = 100 \text{ kW/cm}^2$ .

#### **Elektronenreiche DPHs: Me<sub>2</sub>N-DPH**

Abbildung 4.2-6 A zeigt die normierten FCS-Kurven von Rh123 in Ethanol bei einer Konzentration von 8 µM Me<sub>2</sub>N-DPH und einer Leistungsdichte von  $\langle I \rangle = 200 \text{ kW/cm}^2$ . Die gemessenen Korrelationskurven  $G(t_c)$  von Rh123 in Anwesenheit des DPH-Derivats konnten in diesem Fall nicht mit einem Bunchingterm für die Triplettkinetik angepasst werden. Zusätzlich wurde ein weiterer Fluktuationsprozess mit der Korrelationszeit  $t_R = 77 \text{ µs}$  und der Amplitude  $A_R = 0.30$  zur Beschreibung der experimentellen Daten benötigt. Die reduzierte Triplettamplitude  $A_T$  indiziert eine deutliche Triplettlöschung durch Me<sub>2</sub>N-DPH mit einer abgeschätzten Geschwindigkeitskonstante von ca.  $k_{qT} = 6 \pm 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Abbildung 4.2-6 B). Dennoch verringert sich bei Zugabe des

Aminoderivats die Fluoreszenzzählrate  $F_{cpm}$  von Rh123 (Abbildung 4.2-6 B), was sich durch einen reduktiven Elektronentransfer erklären lässt. Hinsichtlich der durch die elektrochemischen Eigenschaften bestimmten Elektronentransferreaktionen in Tabelle 4.2-2 ist eine Reduktion des Rh123 durch Me<sub>2</sub>N-DPH zu erwarten, wodurch langlebige Radikalanionen R<sup>•-</sup> gebildet werden.<sup>103</sup> Diese Bevölkerung eines zusätzlichen Dunkelzustands überwiegt die Triplettlöschung und reduziert somit die Zählrate.



**Abbildung 4.2-6:** (A) Normierte FCS-Messdaten von Rh123 in Ethanol bei  $\langle I \rangle = 200 \text{ kW/cm}^2$ . In Anwesenheit von  $8 \mu\text{M}$  Me<sub>2</sub>N-DPH wird ein zusätzlicher Bunchingterm zur Beschreibung der experimentellen Daten benötigt. Durch die Anpassung erhält man die gefitteten Parameter  $A_T = 0.76$  und  $t_T = 11 \mu\text{s}$  für Rh123 und  $A_T = 0.53$ ,  $t_T = 7.7 \mu\text{s}$ ,  $A_R = 0.30$  und  $t_R = 77 \mu\text{s}$  für Me<sub>2</sub>N-DPH. (B) Mittlerer Anteil an Molekülen im Triplettzustand  $A_T$  und Fluoreszenzsignal  $F_{cpm}$  als Funktion der Anregungsleistungsdichte.

Werden die elektronenschiebenden Dimethylaminogruppen durch elektronenziehende quaternäre Ammoniumgruppen ausgetauscht, verringern diese die Elektronendichte am DPH und wirken der reduzierenden Kraft entgegen. Gleichzeitig wird die Löslichkeit deutlich verbessert. Anhand des Hammettkoeffizienten für NH<sub>3</sub><sup>+</sup> ( $\sigma = 0.86$ ) und der Beziehung zu den Redoxpotentialen aus Abbildung 3.1-1 kann ein Oxidationspotential von  $E_{ox} = 1.58 \text{ eV}$  vs. NHE abgeschätzt werden, welches mit dem Potential von bis-CF<sub>3</sub>-DPH vergleichbar ist. Unter diesen Voraussetzungen sollte keine Triplettlöschung durch Elektronentransfer möglich sein.

Zwei DPH-Derivate mit quaternären Ammoniumgruppen wurden untersucht: (I) Zur Protonierung von Me<sub>2</sub>N-DPH wurde die Substanz in ethanolischen Lösung mit 1 % Schwefelsäure gelöst, wodurch HMe<sub>2</sub>N<sup>+</sup>-DPH entsteht. (II) Das alkylierte Derivat EtMe<sub>2</sub>N<sup>+</sup>-DPH wurde synthetisiert. Die bei Me<sub>2</sub>N-DPH beobachtete Rotverschiebung der Absorptionsbande zeigte sich bei beiden quaternären Ammoniumverbindungen nicht. Die UV/Vis-Spektren sind bezogen auf die Struktur und die Lage der Banden vergleichbar mit den Absorptionseigenschaften der anderen DPHs. Auch die aus quantenmechanischen Rechnungen erhaltene energetische Lage des T<sub>1</sub>-Zustands von HMe<sub>2</sub>N<sup>+</sup>-DPH liegt im

Bereich der restlichen Derivate ( $E_T = 1.75$  eV), weshalb ein Triplettenergietransfer aus energetischer Sicht stattfinden sollte. Überraschenderweise zeigen die FCS-Messungen jedoch keinen Einfluss von  $\text{HMe}_2\text{N}^+$ -DPH bzw.  $\text{EtMe}_2\text{N}^+$ -DPH auf die Signalstärke oder die Bevölkerung des Triplettzustands von Rh123. Zur Kontrolle wurden die FCS-Kurven von Rh123 in Ethanol und Ethanol mit 1 % Schwefelsäure verglichen. Die photophysikalischen Parameter von Rh123 ändern sich in saurer Umgebung nicht. Demzufolge ist wahrscheinlich die elektrostatische Abstoßung zwischen den positiven Ladungen des DPHs und der des Rhodamins Ursache der ausbleibenden Löschung.

#### 4.2.4 Zusammenfassung der Diphenylhexatriene

Diphenylhexatriene sind effiziente Triplettlöcher für den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 und löschen dessen  $T_1$  mit Geschwindigkeitskonstanten von 2.1 bis  $4.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Die möglichen Ursachen für die beobachteten Unterschiede in der triplettlöschenden Wirkung werfen die Frage nach dem detaillierten Mechanismus auf. Die beste Wirkung wurde mit DPH erzielt, während die Geschwindigkeitskonstanten mit größer werdenden Endgruppen und steigenden Oxidationspotentialen sinken. Es können zwei verschiedene Wege für die Deaktivierung des  $T_1$  durch die DPHs diskutiert werden<sup>49,104</sup>: Die aus DFT/MRCI-Rechnungen erhaltenen Energien der Triplettzustände erlauben die Annahme eines exergonischen Triplett-Triplett-Energietransfers vom Fluoreszenzfarbstoff zu den Diphenylhexatrienen. Zusätzlich können DPHs mit ausreichend reduzierendem Charakter den  $T_1$  des Fluorophors über einen Elektronentransfermechanismus<sup>105</sup> löschen (Tabelle 4.2-2). Beispielweise wurde bei  $\text{Me}_2\text{N}$ -DPH, das mit  $\Delta G_{ET} = -0.77$  eV eine deutliche Neigung zur Reduktionsreaktion mit dem  $T_1$  des Rh123 aufzeigt, eine signifikante Population eines neuen langlebigen Dunkelzustands in den FCS-Messungen gefunden. Bei diesem Dunkelzustand handelt es sich vermutlich um ein freies Radikal des Rhodamins.

Die Derivate DPH und F-DPH unterscheiden sich in ihrer Eigenschaft als Triplettlöcher, besitzen jedoch ähnliche elektrochemische Eigenschaften. Auch die quantenmechanische Berechnung der Energie der vertikalen Absorption vom  $S_0$ -Grundzustand zum ersten angeregten Triplettzustand lieferte für beide Verbindungen die gleichen Werte.<sup>95</sup> Daher müssen weitere Eigenschaften der Substituenten betrachtet werden, die Einfluss auf den Triplettenergietransfer haben können: (I) Unterschiedliche sterische Hinderung durch

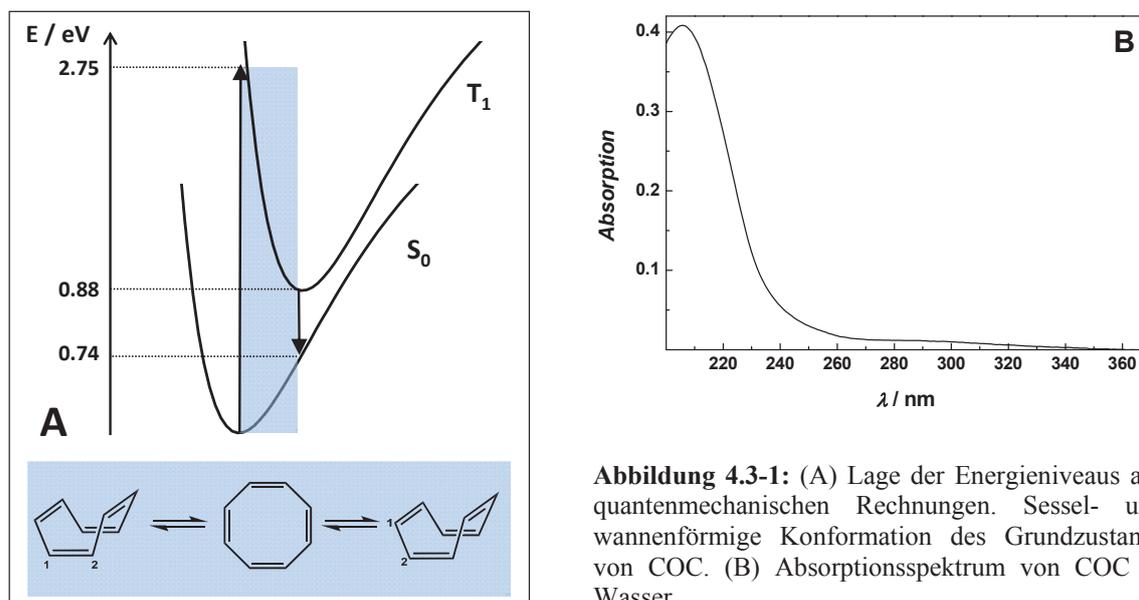
Endgruppen bei der Annäherung von Donor und Akzeptor,<sup>106,107</sup> (II) Änderung der Elektronendichte in den relevanten Orbitalen und dadurch in der Orbitalüberlappung,<sup>79</sup> oder (III) Einführung von intermolekularen Coulomb-Wechselwirkungen. Die sterisch aufwendigen CF<sub>3</sub>-Endgruppen beispielsweise können die Löscheffizienz bei CF<sub>3</sub>-DPH und bis-CF<sub>3</sub>-DPH reduzieren. Eine Coulomb-Abstoßung der beiden positiv geladenen Moleküle HMe<sub>2</sub>N<sup>+</sup>-DPH und Rh123 vergrößern deren Wechselwirkungsradius und die erforderliche Überlappung der Orbitale, die Voraussetzung für den Energietransferprozess ist, kann nicht mehr stattfinden. Zusammenfassend ist die Triplettlöschung von Rh123 durch Diphenylhexatriene ein kompliziertes Zusammenspiel von sterischen, elektronischen und Coulomb-Wechselwirkungen. Elektronenarme DPHs steigern das Fluoreszenzsignal von Rh123 durch Löschung der langlebigen Triplettpopulation und Vermeidung von Radikalbildung.

### 4.3 Einfluss von signalsteigernden Additiven auf die Photophysik von Rhodamin 123

#### 4.3.1 Cyclooctatetraen-Carbonsäure

Cyclooctatetraen (COT) ist ein cyclisches, sehr flexibles nichtaromatisches Polyen und ein wird als universeller Triplettlöcher eingesetzt, da es in der Lage ist, Triplettzustände mit Energien bis 1.74 eV zu löschen.<sup>108,109</sup> Auch zur Löschung von Triplettzuständen verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe wurde COT bereits eingesetzt.<sup>110</sup> Für die Triplettlöschung von Rh6G durch Cyclooctatetraen wurden Geschwindigkeitskonstanten von  $9.4 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  in Ethylenglykol<sup>111</sup> und  $1.0 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  in Ethanol gemessen.<sup>10</sup> Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde das Carbonsäurederivat COC von Cyclooctatetraen verwendet, wodurch FCS-Messungen an Rh123 in wässriger Lösung durchgeführt werden konnten. COC zeigt eine starke Absorptionsbande bei 208 nm und einen verbotenen Übergang bei 290 nm in wässriger Lösung (Abbildung 4.3-1 B). Die Lage der Energieniveaus aus den Absorptionsspektren stimmen gut mit den Ergebnissen aus DFT/MRCI-Rechnungen überein<sup>112</sup>, die am Institut für Theoretische Chemie und Computerchemie von Prof. Dr. C. Marian durchgeführt wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.3-1 A schematisch dargestellt.<sup>113</sup> Die vertikale Triplettenergie von COC

beträgt 2.75 eV. Zum Vergleich wurde für COT ein  $S_0$ - $T_1$ -Übergang mittels Elektronenspektroskopie von 2.82 eV bestimmt.<sup>114</sup>



Die Triplettenergie von Cyclooctatetraen hängt entscheidend von der Kerngeometrie ab. Die Fähigkeit, Triplettzustände mit einem weiten Energiebereich zu löschen, beruht auf der Flexibilität des Grundzustands. Die Grundzustandsgeometrie ändert sich aufgrund der thermischen Aktivierung der Bindungslängen und Torsionswinkel in eine planare Geometrie, wodurch die vertikale Triplettabsorptionsenergie stark variiert. Dieser Bereich ist in Abbildung 4.3-1 A blau markiert.<sup>50,115,116</sup>

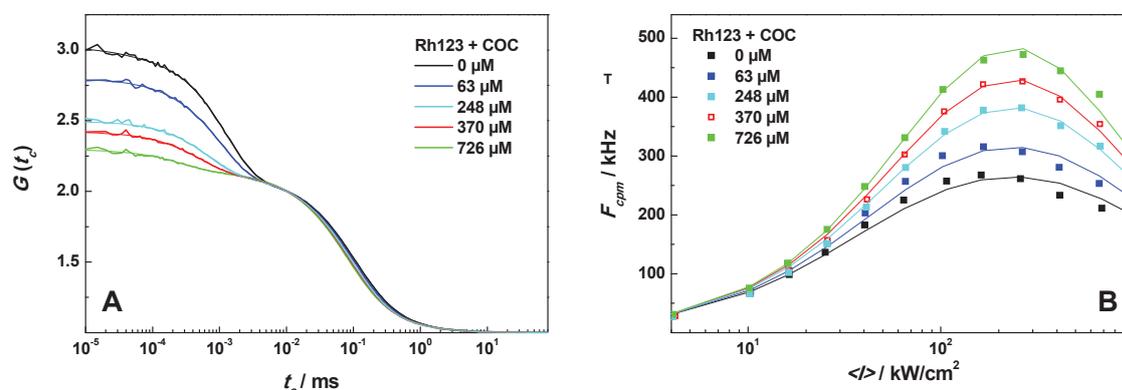
**Tabelle 4.3-1:** Oxidations- und Reduktionspotentiale in DMF bzw. AN und freie Enthalpie  $\Delta G_{ET}$  der Elektronentransferreaktionen zwischen dem Additiv und dem  $S_1$ -,  $T_1$ - und Radikalzustand des Fluorophors Rh123. Alle nicht aufgeführten Prozesse sind endergonisch ( $\Delta G_{ET} > 0$ ). Zur Berechnung wurden die gemessenen Redoxpotentiale von Rh123 ( $E_{ox} = 1.15$  V vs. NHE und  $E_{red} = -0.61$  V vs. NHE), sowie die Energie des ersten angeregten Singulett- und Triplettzustands in Wasser ( $E_s = 2.42$  eV und  $E_T = 1.92$  eV) verwendet. Der Beitrag des Coulomb-Terms wurde vernachlässigt.

Additiv	$E_{ox}$	$E_{red}$	$\Delta G_{ET, red} / \text{eV}$			$\Delta G_{ET, ox} / \text{eV}$
	/ V vs. NHE		$S_1$	$T_1$	$R^+$	$S_1$
COC	1.69	-1.30	-0.06	0.44	0.54	0.03
COT	(1.76)	-1.79	0.01	0.51	0.61	0.52

Zur Abschätzung von eventuellen Löschreaktionen *via* Elektronentransfermechanismen wurde die freie Enthalpie  $\Delta G_{ET}$  der verschiedenen Elektronentransferreaktionen aus den angeregten Zuständen von Rh123 mit Hilfe der experimentell bestimmten Redoxpotentiale

und den Energien der angeregten Zustände analog zu Kapitel 4.2.2 bestimmt (Tabelle 4.3-1). Alle Elektronentransferprozesse von COT und Rh123 sind endergonisch. Für das Carbonsäurederivat COC wurde ein  $\Delta G_{ET} = -0.06$  eV für die Reduktion des Singulettzustands von Rhodamin 123 gefunden.

Zur Bestimmung der triplettlöschenden Eigenschaft von COC wurden leistungsabhängige FCS-Messungen an Rh123 in Anwesenheit von COC durchgeführt. Die triplettlöschende Wirkung ist in den normierten Fluoreszenzkorrelationsfunktionen in Abbildung 4.3-2 an der Reduktion der Triplettamplitude im Zeitbereich von einigen  $\mu\text{s}$  deutlich zu sehen. Durch Auswertung der FCS-Daten analog zu Kapitel 4.2.3 erhält man die Geschwindigkeitskonstante für die Deaktivierung des Triplettzustands von Rh123 in Abwesenheit eines Additivs ( $k_T = 4.2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ), die Geschwindigkeitskonstante der Interkombinationsübergänge  $k_{ISC} = 7.6 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$  sowie die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante für die Löschung des  $T_1$  durch COC ( $k_{qT} = 2.5 \pm 0.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Durch die Löschung des  $T_1$ -Dunkelzustands ergibt sich eine Steigerung des Fluoreszenzsignals  $F_{cpm}$  pro Molekül am Maximum von 260 kHz auf 476 kHz bei einer COC-Konzentration von  $726 \mu\text{M}$  (Abbildung 4.3-2 B).



**Abbildung 4.3-2:** (A) Normierte FCS-Kurven von Rh123 in Anwesenheit des Cyclooctatetraen-Derivats COC bei einer Laserleistung von  $260 \text{ kW/cm}^2$ . (B) Fluoreszenzzählrate  $F_{cpm}$  pro Molekül von Rh123 bei Zugabe von COC. Die Anpassung der Daten erfolgte mit Gleichung 3.4-12, Diskussion siehe Kapitel 4.3.2.3.

Durch eine globale Anpassung der FCS-Kurven an Gleichung 3.4-10, die jeweils einen Bunchingterm für die Triplettkinetik und die Radikalkinetik berücksichtigt, lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{ox'}$  und  $k_{oxn}$  für Oxidationsreaktionen aus den ersten angeregten und den höher angeregten Zuständen, die Geschwindigkeitskonstante der Reduktion  $k_{red0}$ , die Geschwindigkeitskonstante für die Radikallöschung  $k_{qR}$  und die Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung  $k_{bR}$  bestimmen. Die farbstoffspezifischen Geschwindigkeitskonstanten für die photophysikalischen Prozesse des Fluorophors Rh123

sind in Tabelle 4.3-3 zusammengefasst. Diese Werte sind Mittelwerte aus den Anpassungen der leistungsabhängigen FCS-Kurven (Gleichung 3.4-10) und der Zählraten (Gleichung 3.4-12) der Additive COC, AZB und AAZB und werden in Kapitel 4.3.2.3 näher diskutiert. Für COC als Additiv wurde keine zusätzliche Radikallöschung festgestellt ( $k_{qR} = 0$ ). Die Geschwindigkeitskonstante  $k_{ox}'$  für Oxidationen aus den ersten angeregten Zuständen zeigt einen konzentrationsabhängigen Verlauf, bei dem ein Anstieg im Konzentrationsbereich  $[Q] > 0.5$  mM beobachtet wurde (Abbildung 4.3-8). In Hinsicht auf den schwach positiven  $\Delta G_{ET}$ -Wert für die Oxidation des  $S_1$ -Zustands von Rh123 durch COC (siehe Tabelle 4.3-1) deutet dies auf eine Verstärkung der Radikalkationbildung in Anwesenheit von COC hin. Für eine weitere Diskussion siehe Kapitel 4.3.3.

### **4.3.2 Azobenzol-Derivate: Löschung von Triplett- und Radikalzuständen**

Azobenzole wurden schon früh in Experimenten zum Triplettenergieübertrag als Akzeptoren verwendet.<sup>117</sup> Anhand dieser Experimente wurde die Lage des Triplettzustands von Azobenzol auf 1.5 eV geschätzt, was auch durch quantenmechanischen Rechnungen bestätigt wurde.<sup>118</sup> Durch die Substitution von Gruppen unterschiedlicher elektronischer Eigenschaften können sowohl Lagen der elektronischen Energieniveaus als auch die elektrochemischen Eigenschaften (siehe Kapitel 4.1.4) angepasst werden. Diese Eigenschaften sowie die niedrige Lage des Triplettzustand qualifizieren Azobenzolderivate als Triplettlöcher für Rhodamine.

#### **4.3.2.1 Elektrochemie**

Aus den gemessenen Reduktions- und Oxidationspotentialen der Additive und des Fluorophors wurde die freie Enthalpie  $\Delta G_{ET}$  der Elektronentransferreaktionen zwischen den beiden Reaktionspartnern berechnet. Dazu werden die Energien des Singulett- und Triplettzustands sowie des Radikalkations von Rh123 benötigt. Der 0-0-Übergang wurde aus dem Absorptions- und Emissionsmaximum von Rh123 in Wasser zu  $E_S = 2.42$  eV berechnet, die Triplettenergie  $E_T = 1.92$  eV resultiert aus DFT/MRCI-Rechnungen.<sup>119</sup> Bei der Wahl eines geeigneten Löschers können so unerwünschte Elektronenübertragungsreaktionen, die zur Löschung der Fluoreszenz führen, vorausgesagt und vermieden werden.

**Tabelle 4.3-2:** Oxidations- und Reduktionspotentiale und freie Enthalpie  $\Delta G_{ET}$  der Elektronentransferreaktionen zwischen dem Azobenzolderivat und dem  $S_1$ ,  $T_1$  und Radikalkation  $R^{*+}$  des Fluorophors Rh123. Alle nicht aufgeführten Prozesse sind endergonisch ( $\Delta G_{ET} > 0$ ). Zur Berechnung wurden die gemessenen Redoxpotentiale von Rh123 ( $E_{ox} = 1.15$  V vs. NHE und  $E_{red} = -0.67$  V vs. NHE), sowie die Energie des ersten angeregten Singulett- und Triplettzustands in Wasser ( $E_s = 2.42$  eV und  $E_T = 1.92$  eV) verwendet. Der Beitrag des Coulomb-Terms wurde aufgrund der gleichbleibenden Gesamtladung des Radikalionenpaars vernachlässigt.

Additiv	$E_o^a$	$E_{red}^a$	$\Delta G_{ET,red} / \text{eV}$			$\Delta G_{ET,ox} / \text{eV}$	
	V vs. NHE		$S_1$	$T_1$	$R^{*+}$	$S_1$	$T_1$
AZB	2.06	-0.81	0.31	0.81	0.91	-0.46	0.04
BB98	2.06	-0.99	0.31	0.81	0.91	-0.28	0.22
BB99	1.93	-1.29	0.18	0.68	0.78	0.02	0.52
AAZB	1.12	-1.55	-0.63	-0.13	-0.03	0.28	0.78
BB105	1.07	-1.54	-0.68	-0.18	-0.08	0.27	0.77

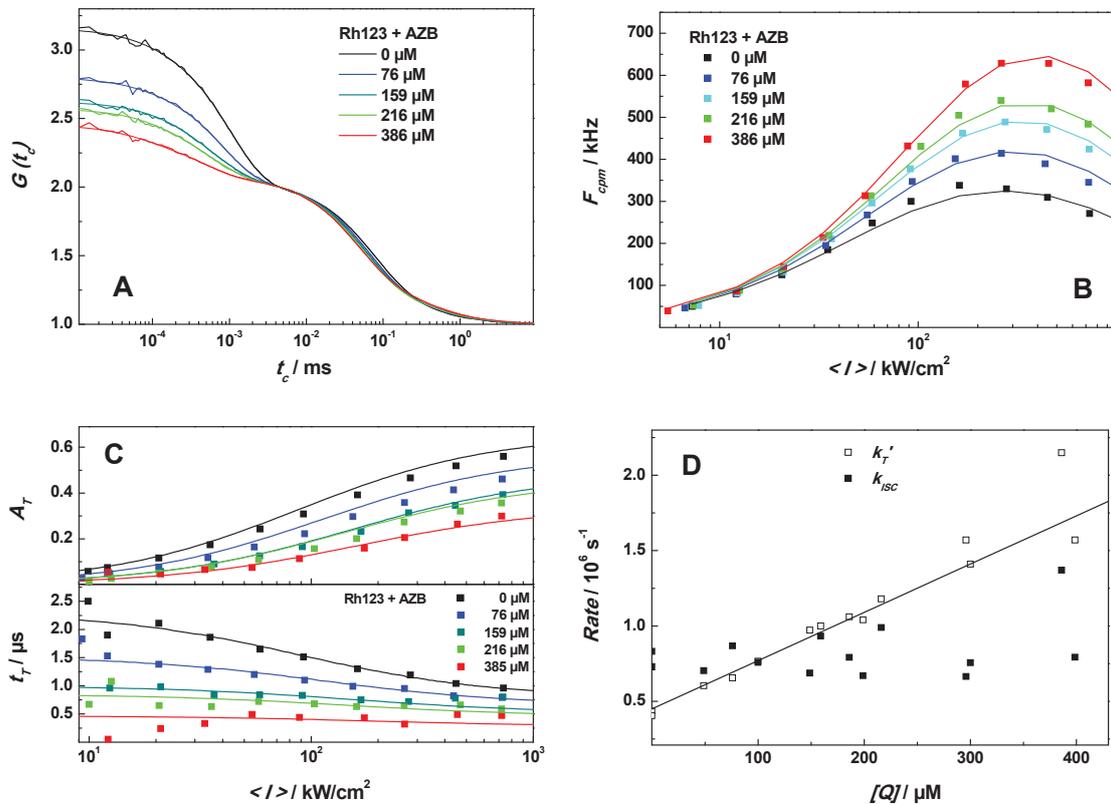
Tabelle 4.3-2 zeigt die Oxidations- und Reduktionspotentiale sowie die aus den Potentialen und der Energie der Anregungszustände berechneten freien Enthalpien  $\Delta G_{ET}$  des reduktiven Elektronentransfers mit Rh123 im  $S_1$ ,  $T_1$  und  $R^{*+}$ .

Aufgrund der hohen Oxidationspotentiale der säure- oder ester-substituierten Azobenzolderivate AZB und BB98 können alle reduktiven Prozesse des Rhodamins ausgeschlossen werden. BB99 erwies sich als einzige „inerte“ Verbindung bezüglich Elektronentransferreaktionen. Alle weiteren AZBs sollten in ausreichend hohen Konzentrationen als Fluoreszenzlöcher agieren, wobei AZB und BB98 oxidierend und beide Amino-Derivate reduzierend auf das angeregte Rh123 wirken. BB105, BB99 und BB98 wurden aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit ( $< 100 \mu\text{M}$ ) nicht zu FCS-Messungen herangezogen. AAZB und AZB wurden hinsichtlich ihrer Lösmechanismen fluoreszenzspektroskopisch untersucht.

#### 4.3.2.2 Löschung des Triplettzustands von Rhodamin 123

Die Effekte der Azobenzole auf den Triplettzustand von Rh123 wurden mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie untersucht. Dabei wurde bei variierenden Konzentrationen an Löschmolekülen eine Serie von FCS-Kurven von Rh123 in Abhängigkeit von der Anregungsleistung des Lasers gemessen (Abbildung 4.3-3). Ein Vergleich der normierten Korrelationskurven bei einer Leistungsdichte von  $450 \text{ kW/cm}^2$

und steigender AZB-Konzentration (Abbildung 4.3-3 A) zeigt einen deutlichen Effekt auf den Triplettbunchingterm von Rh123 im Zeitbereich von einigen Mikrosekunden. Die Anpassung der einzelnen FCS-Kurven an Gleichung 3.4-10 lieferte einen Diffusionsterm mit der charakteristischen Diffusionszeit  $t_d$  und zwei weitere Bunchingterme mit den Amplituden  $A_T$  und  $A_R$  und den Korrelationszeiten  $t_T$  und  $t_R$ . Die Triplettparameter  $A_T$  und  $t_T$  sind im Einsatz von Abbildung 4.3-3 C für jede Konzentration leistungsabhängig aufgetragen. Das Azobenzolderivat verringert mit zunehmender Konzentration die Bevölkerung des Triplettzustands von Rhodamin 123, die Triplettkorrelationszeit wird verkürzt.

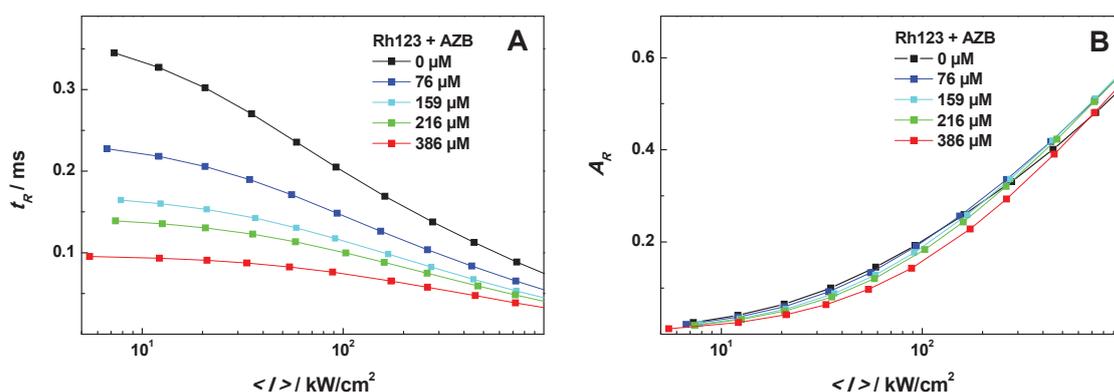


**Abbildung 4.3-3:** (A) Normierte FCS-Kurven von Rh123 in Anwesenheit des Azobenzols AZB bei einer Laserleistung von  $450 \text{ kW/cm}^2$ . (B) Fluoreszenzzählrate  $F_{cpm}$  pro Molekül von Rh123 bei Zugabe von AZB. (C) Triplettparameter in Abhängigkeit von der Anregungsleistung. Die Anpassungen der Triplettamplitude  $A_T$  und die Triplettkorrelationszeit  $t_T$  an die Gleichungen 3.4-4 und 3.4-5 sind als durchgezogene Linie dargestellt. (D) Geschwindigkeitskonstanten für Interkombinationsübergänge  $k_{ISC}$  und Triplettrelaxation  $k'_T$  in Abhängigkeit von der Additivkonzentration. Die Anpassung der Fluoreszenzzählrate erfolgte mit Gleichung 3.4-12, Diskussion siehe Kapitel 4.3.2.3.

Eine globale Anpassung von  $A_T$  und  $t_T$  als Funktion der Leistungsdichte  $\langle I \rangle$  an Gleichungen 3.4-4 und 3.4-5 liefert die Geschwindigkeitskonstante für Intersystemcrossing  $k_{ISC}$  und Triplettdeaktivierung  $k'_T$  für jede Additivkonzentration. Die Fluoreszenzlebensdauer wurde mittels TCSPC-Messungen gemessen. Die daraus

berechnete Geschwindigkeitskonstante für die Deaktivierung des ersten angeregten Singulettzustands  $S_1$  wurde auf  $2.5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$  fixiert. Für den reinen Farbstoff Rh123 in Phosphatpuffer erhält man so die Triplettparameter  $k_{ISC} = 7.6 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$  und  $k_T' = 4.2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$  (Tabelle 4.3-3).

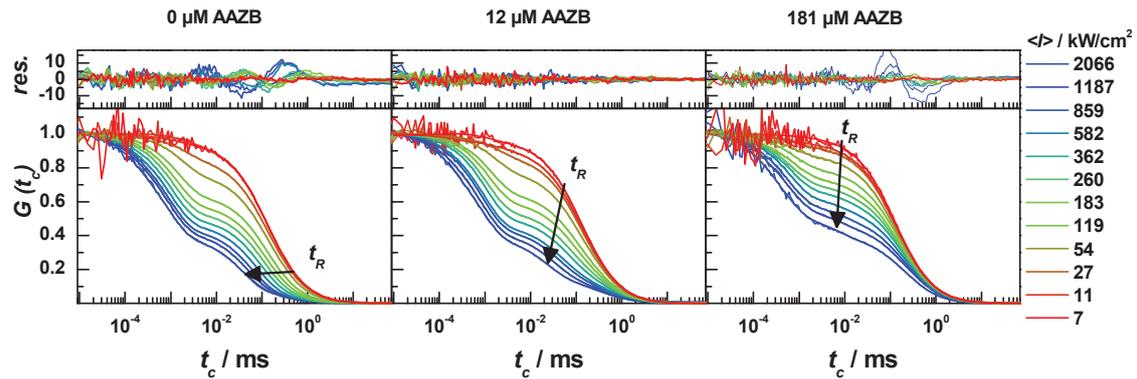
Die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{ISC}$  und  $k_T'$  von der Azobenzolkonzentration ist in Abbildung 4.3-3 D dargestellt. Die Deaktivierung des  $T_1$ -Zustands von Rh123 wird durch die Übertragung der Triplettenergie auf den Azofarbstoff erhöht. Lineare Regression der Geschwindigkeitskonstante  $k_T'$  entsprechend Gleichung 3.3-3 liefert die Geschwindigkeitskonstante der Triplettlösung  $k_{qT} = 3.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Die farbstoffspezifische Größe  $k_{ISC}$  bleibt bei variierender Konzentration an Löschmolekülen konstant. Die Amplitude  $A_R$  des Bunchingterms der Radikalkinetik wird von AZB nur wenig beeinflusst, wohingegen eine deutliche Verkürzung der zugehörigen Korrelationszeit  $t_R$  gefunden wurde (Abbildung 4.3-4). Näheres dazu siehe Anhang 7.3.



**Abbildung 4.3-4:** (A) Korrelationszeit  $t_R$  und (B) Amplitude  $A_R$  der Radikalkinetik von Rh123 in Anwesenheit von AZB. Die Anpassung der Daten erfolgte mit Gleichung 3.4-4 und 3.4-5, Kapitel 3.4.1, Ergebnisse siehe Kapitel 4.3.2.3.

### 4.3.2.3 Triplett- und Radikallösung

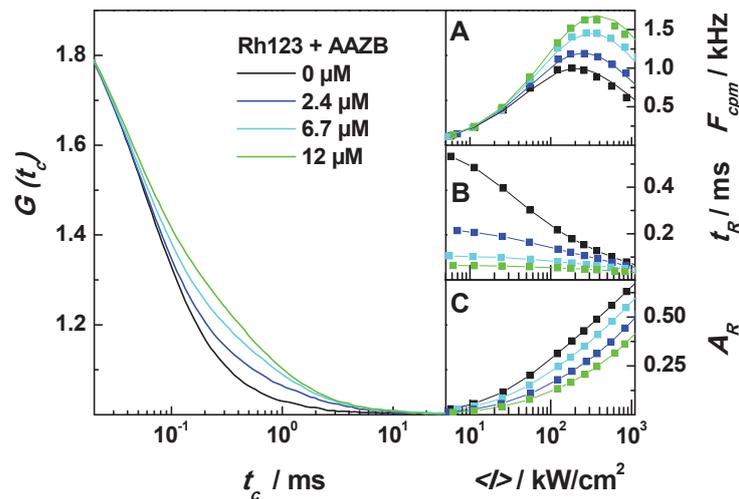
In Abbildung 4.3-5 sind die normierten Fluoreszenzkorrelationskurven von Rh123 bei drei verschiedenen Konzentrationen an AAZB (0; 12 und 181  $\mu\text{M}$ ) und unterschiedlicher Leistungsdichte  $\langle I \rangle$  aufgetragen. Die Analyse der Triplettparameter  $A_T$  und  $t_T$  liefert die Geschwindigkeitskonstante für die Triplettlösung durch AAZB ( $k_{qT} = 3.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; Tabelle 4.3-4; Auftragung der Triplettparameter in Abhängigkeit von der Laserleistung siehe Anhang 7.6). Zusätzlich zur Triplettkinetik wurde ein Radikalbunchingterm zur Anpassung der FCS-Kurven an Gleichung 3.4-10 benötigt.



**Abbildung 4.3-5:** Normierte Korrelationskurven von Rh123 mit AAZB bei steigender Laserleistung. Die schwarzen Pfeile zeigen den Verlauf der Radikalkorrelationszeit  $t_R$  bei steigender Laserleistung.

Im Fall des COC, das als reiner Triplettlöcher wirkt, sind Amplitude  $A_R$  und Korrelationszeit  $t_R$  nahezu unabhängig von der Additivkonzentration (Anhang 7.5). Dies trifft für AAZB nicht mehr zu. Sowohl Triplett- als auch Radikalparameter von Rh123 zeigen eine Abhängigkeit von der der Löschmolekülkonzentration.

Im Gegensatz zur Triplettkinetik, die erst bei Konzentrationen im Bereich von 20  $\mu\text{M}$  vom Additiv beeinflusst wird, ist die Radikalkinetik aufgrund der längeren Lebensdauer des Radikalkations deutlich empfindlicher in Bezug auf Additive mit reduzierender Wirkung. Bereits im unteren  $\mu\text{M}$ -Konzentrationsbereich wurde eine Verringerung der Radikalpopulation  $A_R$  und eine Verkürzung der Radikalkorrelationszeit  $t_R$  festgestellt (Abbildung 4.3-6 Einsatz).



**Abbildung 4.3-6:** Einfluss von mikromolaren Konzentrationen an AAZB auf die FCS-Kurven von Rh123 in Phosphatpuffer pH7 bei einer Leistungsdichte von  $\langle I \rangle = 850 \text{ kW/cm}^2$ . Einsatz: (A) Relatives Fluoreszenzsignal  $F_{cpm}$  pro Molekül, (B) Radikalkorrelationszeit  $t_R$  und (C) Radikalamplitude  $A_R$  aus einer globalen Anpassung der FCS-Kurven an Gleichung 3.4-10 in Abhängigkeit von der Leistungsdichte. Die Parameter aus der Anpassung stehen in Tab. 4.3-3 und 4.3-4.

Der von der Laserleistung und der Konzentration  $[Q]$  abhängige Zeitbereich, in dem der Radikalbunchingterm von Rh123 zu beobachten ist, ist in Abbildung 4.3-5 für die jeweilige Azobenzol-Konzentration mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Bei niedrigen Leistungsdichten (rote Kurven) wurde für Rh123 eine Radikalkorrelationszeit  $t_R$  von 520  $\mu\text{s}$  gefunden (Abbildung 4.3-5 links, Abbildung 4.3-6 Einsatz). Durch Zugabe des Azobenzols AAZB wird bei 12  $\mu\text{M}$  die Zeit  $t_R$  auf 50  $\mu\text{s}$  verkürzt, bei 181  $\mu\text{M}$  beträgt  $t_R$  nur noch 9  $\mu\text{s}$ .

Abhängig von der Konzentration  $[Q]$  überlagert sich der Zeitbereich der Radikalkorrelationszeit  $t_R$  mit dem der Diffusionszeit  $t_d$ . Durch eine globale Anpassung der leistungsabhängigen FCS-Kurven einer Messreihe an Gleichung 3.4-10, die die Geschwindigkeitskonstanten der Radikalkinetik enthält, konnten die beiden Korrelationszeiten separiert werden. Bei der Anpassung wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Oxidation  $k_{ox}'$  und  $k_{oxn}$ , der Photozerstörung  $k_{bR}$ , der Reduktion  $k_{red}'$  und der Radikallöschung  $k_{qR}$  für die FCS-Kurven bei verschiedenen Leistungen und Additivkonzentrationen global angepasst. Mit Hilfe dieser Methode konnte zwischen den beiden Prozessen, Diffusion des Moleküls durch das Detektionsvolumen mit der Diffusionszeit  $t_d$  und Oxidation und Reduktion von Rh123 mit der Korrelationszeit  $t_R$ , unterschieden werden. Aus den Messungen an Rhodamin 123 mit den Additiven COC, AZB und AAZB wurden die Geschwindigkeitskonstanten für die farbstoffspezifischen Prozesse des Fluorophors gemittelt (Tabelle 4.3-3).

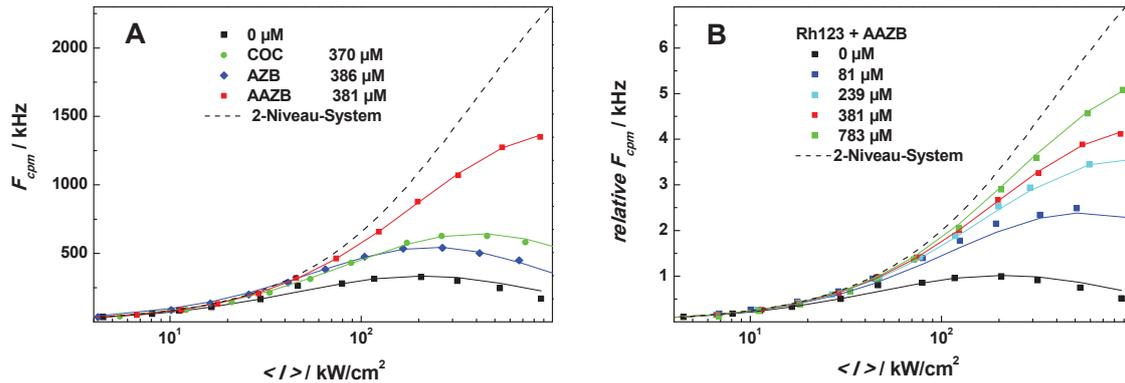
**Tabelle 4.3-3:** Farbstoffspezifische Geschwindigkeitskonstanten von Rh123 in Phosphatpuffer pH7 aus FCS-Messungen und Photostabilitätsuntersuchungen.

$k_T$	$k_{ISC}$	$k_{ox}$	$k_{oxn}$	$k_{red0}$	$k_{bR}$	$k_{oxS}$	$k_{oxT}$
$10^5 \text{ s}^{-1}$	$10^5 \text{ s}^{-1}$	$10^4 \text{ s}^{-1}$	$\text{cm}^2 \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$\text{s}^{-1}$	$\text{s}^{-1}$	$10^3 \text{ s}^{-1}$	$10^3 \text{ s}^{-1}$
4.2 <sup>a</sup>	7.6 <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>	0.042 <sup>b</sup>	1470 <sup>c</sup>	200 <sup>d</sup>	6.3 <sup>e</sup>	5.9 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Die Standardabweichung aus wiederholten Messungen variiert von 3 – 13 %. <sup>b</sup> Mittelwert aus der Anpassung der  $F_{cpm}$ -Plots und der FCS-Kurven.  $k_{oxn} = 0.058 \pm 0.012 \text{ cm}^2 \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ( $F_{cpm}$ );  $k_{oxn} = 0.026 \pm 0.009 \text{ cm}^2 \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (FCS). <sup>c</sup> Aus der Anpassung der Messungen bei niedriger AAZB-Konzentration. Für alle weiteren Analysen wurde dieser Parameter fixiert. <sup>d</sup> Der Wert kann zwischen 0 und 200  $\text{s}^{-1}$  fixiert werden, ohne die Fitqualität zu beeinflussen. <sup>e</sup> Die Standardabweichung aus der Anpassung der Messdaten lag bei 2 – 14 %.

Für Rh123 in Phosphatpuffer bei pH7 erhält man die Geschwindigkeitskonstante der Oxidation aus den ersten angeregten Zuständen  $S_1$  und  $T_1$  und der Oxidationen aus höher angeregten Zuständen sowie die Geschwindigkeitskonstante der Reduktion des Radikalkations in Abwesenheit eines Löschmoleküls (Tabelle 4.3-3; Abbildung 3.3-1). Da

die Photozerstörung aus dem Radikalzustand unbedeutend klein ist, wurde sie für die Anpassung auf einen maximalen Wert so fixiert, dass die Fitqualität nicht beeinflusst wird. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Deaktivierung des Radikalkations  $k_{red0}$  aus FCS-Messungen stimmt in etwa mit einem Literaturwerte aus Laserblitzlichtphotolyse-Experimenten überein.<sup>82</sup> Alle Geschwindigkeitskonstanten für Oxidations- und Reduktionsprozesse zeigten eine starke Abhängigkeit von Pufferkonzentration, Temperatur und Sauerstoffgehalt.



**Abbildung 4.3-7:** Fluoreszenzzählrate pro Molekül des Fluoreszenzfarbstoffes Rh123 in Abhängigkeit von der Laserleistung (A) in Anwesenheit von ca. 380  $\mu\text{M}$  der Additive COC, AZB oder AAZB und (B) bei Zugabe von AAZB. An die experimentelle ermittelten Daten (Punkte) wurden nach Gleichung 3.4-12 Fitkurven (durchgezogene Linien) angepasst, wobei folgende Parameter verwendet wurden:  $G_{Detect} = 0.0014$ ;  $\Phi_{F(0)} = 0.98$ ;  $k_0 = 2.5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_T = 4.2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{ISC} = 7.6 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ;  $t_d = 130 \mu\text{s}$ ;  $\gamma = 2.5 \times 10^{18} \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ;  $\sigma_{0I} = 2.6 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ ;  $k_{bR} = 200 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{red0} = 1470 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{oxn} = 0.042 \text{ cm}^2 \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . In beiden Abbildungen wurde das theoretische Signal eines 2-Niveausystems als gestrichelte Linie dargestellt.

In Abbildung 4.3-7 ist das Fluoreszenzsignal  $F_{cpm}$  pro Molekül von Rh123 als Funktion der Laserleistung mit den Additiven COC, AZB und AAZB in vergleichbaren Konzentrationen aufgetragen. Die Substanzen COC und AZB liefern bezüglich ihrer Eigenschaften als Triplettlöcher eine Steigerung der Signalstärke, die mit den entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten  $k_{qT}$  korreliert (Tabelle 4.3-4). Die beiden Azobenzolderivate zeigen vergleichbare Triplettlöscheffizienzen, AAZB verursacht jedoch eine signifikant höhere Signalsteigerung als AZB. Mit einer Konzentration von 380  $\mu\text{M}$  AZB bzw. AAZB kann das Signal, gemessen am jeweiligen Maximum, um einem Faktor 1.6 bzw. 4.0 erhöht werden (Abbildung 4.3-7 A). Die Verbesserung des Fluoreszenzsignals von Rh123 durch AAZB auf ca. 70 % des Signals eines Fluorophors im 2-Niveausystem kann mit einem Radikallöschprozess erklärt werden (Abbildung 4.3-7 B). Das Azobenzol reduziert in einem Elektronentransferprozess das Radikalkation des Rhodamins. Wie bereits in Kapitel 4.3.2.1 beschrieben, ist der reduktive Elektronentransfer zwischen  $R^{*+}$  und AAZB exergonisch (Tabelle 4.3-2). Die simultane Löschung der beiden Dunkelzustände  $T_1$  und

$R^{*+}$ , die nur für das Additiv AAZB beobachtet wurde, verursacht die größtmögliche Steigerung des Fluoreszenzsignals von Rh123, die auch bei Zugabe geringer Mengen an Additiv deutlich wird (Abbildung 4.3-6). Im Gegensatz dazu wird das Fluoreszenzsignal von Rh123 von mikromolaren Konzentrationen an COC und AZB nicht beeinflusst.

Die experimentellen Daten der Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals  $F_{cpm}$  von der Laserleistung können mit Gleichung 3.4-12 analysiert werden. Hierbei wird der Einfluss des Lösers auf die Bevölkerung des Radikalzustands in der Geschwindigkeitskonstante  $k_{red}'$  der Reduktion berücksichtigt, die u.a. von  $k_{qR}$  abhängt (Gleichung 3.3-9). Neben den Parametern, die die Oxidations- und Reduktionsprozesse beschreiben, ist die Zählrate von der Detektionseffizienz  $G_{Detect}$  des Aufbaus und von einigen farbstoffspezifischen Parametern abhängig (vergleiche Anhang 7.1.2). Die Singulettlöschung trägt bei den verwendeten niedrigen Konzentrationen im Rahmen der Messgenauigkeit nicht zur Verringerung des Fluoreszenzsignals bei und  $k_{qS}$  kann vernachlässigt werden.

**Tabelle 4.3-4:** Bimolekulare Geschwindigkeitskonstanten für die T<sub>1</sub>-Löschung von Rh123 in Phosphatpuffer pH7. Additivinduzierte Geschwindigkeitskonstanten der Reduktions-, Oxidations- und Photozerstörungsprozesse aus FCS- und stationären Photozerstörungsmessungen.

	$k_{qT}^a$	$k_{qR}^b$	$k_{ox(Q)}^c$	$k_{bs(Q)}^d$	$k_{bT(Q)}^d$
	$10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
COC	2.5	0	$2.6 \pm 1.6$	$9.7 \pm 1.4$	$17.3 \pm 4.7$
AZB	3.6	0.2	$15.0 \pm 1.8$	0	0
AAZB	3.9	6.2	0	0	0

<sup>a</sup> Aus FCS-Messungen. Der Fehler bei der Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Triplettlöschung liegt bei  $\pm 0.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . <sup>b</sup> Mittelwerte aus der Analyse der FCS-Messungen und der leistungsabhängigen Zählraten. <sup>c</sup> Aus der Anpassung der konzentrationsabhängigen Geschwindigkeitskonstante der Oxidation, siehe Kapitel 4.3.3. <sup>d</sup> Aus stationären Photozerstörungsmessungen, siehe Kapitel 4.3.4.

Die aus FCS-Analysen bestimmten Werte für  $k_{qT}$  (Tabelle 4.3-4) des jeweils verwendeten Löschmoleküls sowie die für Rh123 bekannten Parameter wurden für die Anpassung fixiert ( $\Phi_{F(0)} = 0.98$ ;  $k_0 = 2.5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_T = 4.2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{ISC} = 7.6 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ;  $t_d = 130 \text{ } \mu\text{s}$ ;  $\gamma = 2.5 \times 10^{18} \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ;  $\sigma_{0I} = 2.6 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ ). Der Absorptionsquerschnitt  $\sigma_{0I}$  für den Übergang vom S<sub>0</sub>-Grundzustand in den ersten angeregten S<sub>1</sub>-Zustand wurde anhand des Extinktionskoeffizienten von Rh123 für die Anregungswellenlänge von 496.5 nm berechnet. In Tabelle 4.3-3 sind die Geschwindigkeitskonstanten für Oxidation und Reduktion als Mittelwerte aus der Analyse der FCS-Kurven und der leistungsabhängigen

Zählraten für den Fluorophor zusammengefasst. Die theoretischen Anpassungen der Daten sind in Abbildung 4.3-7 als durchgezogene Linien dargestellt. Aus den Analysen der FCS-Messungen (Gleichung 3.4-10) und der Zählraten (Gleichung 3.4-12) erhält man die Geschwindigkeitskonstante für die Reduktion des Radikalkations  $R^{*+}$  durch AAZB von  $k_{qR} = 6.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

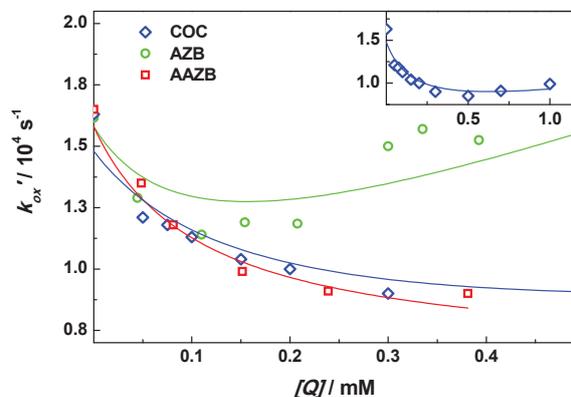
Überraschenderweise zeigt AZB eine Radikallöschung ( $k_{qR} = 0.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), obwohl dieser Prozess bezüglich der energetische Lage der Redoxpotentiale endergonisch sein sollte (Tabelle 4.3-2). Dieser Effekt kann durch äußerst geringe Mengen an reduzierenden Verunreinigungen in der Substanz hervorgerufen werden. Die Verbindung AZB wurde käuflich erworben und nicht weiter gereinigt. Für Löschreaktionen mit langlebigen Zuständen, wie der des Radikalkations, reichen Konzentrationen von einigen  $\mu\text{M}$  aus um eine reduktive Wirkung zu induzieren. Dies wurde bereits in Untersuchungen an AAZB gezeigt (Abbildung 4.3-6).

### 4.3.3 Geschwindigkeitskonstante für Oxidationsprozesse

Die globalen Analysen der FCS-Messungen nach Gleichung 3.4-10 liefern die Geschwindigkeitskonstante  $k_{ox}'$  für die Oxidation aus den ersten angeregten Zuständen  $S_1$  und  $T_1$  in Abhängigkeit von der Konzentration  $[Q]$  (Abbildung 4.3-8). Im Bereich bis  $100 \mu\text{M}$  haben alle Additive eine photoprotektive Wirkung auf Rh123 und verringern die Radikalbildung des reinen Farbstoffs. Durch die zunehmende Depopulation des Triplettzustands bei Erhöhung der Additivkonzentration finden weniger Oxidationsprozesse aus dem  $T_1$  statt und  $k_{ox}'$  sinkt (Gleichung 3.3-7). Eine weitere Erhöhung der Konzentration an AZB oder COC hat jedoch zur Folge, dass die Additive selbst die Bildung des Radikalkations von Rhodamin induzieren und  $k_{ox}'$  steigt. Dieser Prozess wird bei COC ab einer Konzentration von  $0.5 \text{ mM}$  sichtbar (Abbildung 4.3-8 Einsatz), AZB hingegen verstärkt die Oxidation von Rh123 bereits bei  $0.2 \text{ mM}$ . Hier findet ein oxidativer Elektronentransfer zwischen Rh123 im angeregten Zustand und dem Additiv statt. Die Abschätzung der freien Enthalpie  $\Delta G_{ET}$  der Elektronentransferprozesse mit der Rehm-Weller-Gleichung (3.2-1) bestätigt die oxidative Wirkung von AZB ( $\Delta G_{ET} = -0.46 \text{ eV}$  für Oxidationen aus dem  $S_1$  und  $0.01 \text{ eV}$  für Oxidationen aus dem  $T_1$ , siehe Tabelle 4.3-2). Für COC wurde ein leicht positiver  $\Delta G_{ET}$ -Wert gefunden (Tabelle 4.3-1).

Aufgrund der Vernachlässigung der Solvatationsenergie von  $-0.068$  eV kann der Elektronentransfer dennoch exergonisch sein und eine Reaktion stattfinden.

Durch eine Anpassung der Daten an Gleichung 3.3-7 können die Prozesse in Reaktionen aus dem  $S_1$ - und  $T_1$ -Zustand ( $k_{oxS}$  und  $k_{oxT}$ ) und in eine zusätzliche oxidierende Wirkung des Additivs, ausgedrückt durch die Geschwindigkeitskonstante  $k_{ox(Q)}$ , separiert werden.



**Abbildung 4.3-8:** Geschwindigkeitskonstanten der Oxidationsprozesse aus dem ersten angeregten Singulett- und Triplettzustand von Rh123 in Anwesenheit verschiedener Additive. Die Anpassung der Daten erfolgte mit Gleichung 3.3-7, Ergebnisse siehe Tabelle 4.3-4.

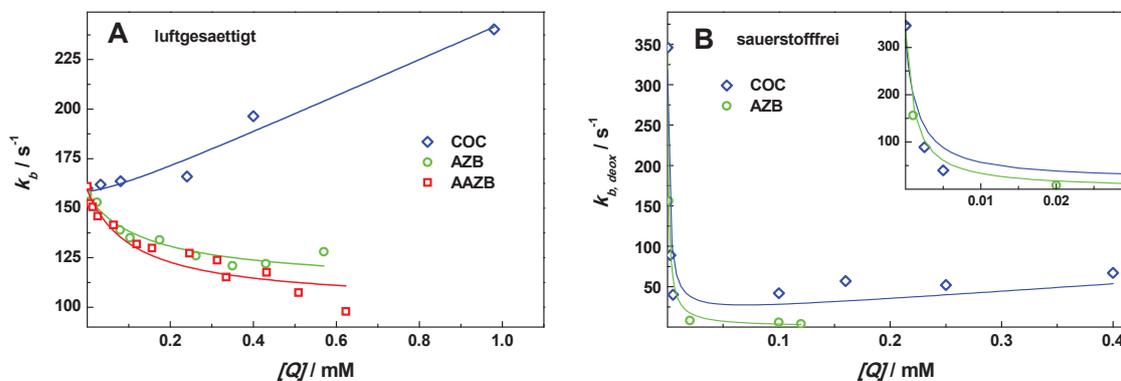
Die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{oxS}$  und  $k_{oxT}$  sind wiederum charakteristische Fluorophoreigenschaften und wurden bei der Anpassung für alle drei eingesetzten Additive global gefittet (Tabelle 4.3-3). Die Geschwindigkeitskonstante der Oxidation aus dem ersten angeregten Singulettzustand ( $k_{oxS} = 6300 \text{ s}^{-1}$ ) ist vergleichbar mit der des Triplettzustands von  $k_{oxT} = 5900 \text{ s}^{-1}$ . Für COC wurde ein relativ schwacher Einfluss auf die Oxidation von Rh123 festgestellt ( $k_{ox(Q)} = 2.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), für AZB wurde eine deutlich höhere Geschwindigkeitskonstante von  $k_{ox(Q)} = 1.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  gefunden. Da für AAZB auf Basis der elektrochemischen Daten kein oxidativer Effekt zu erwarten war, wurde  $k_{ox(Q)}$  auf null gesetzt (Tabelle 4.3-4).

#### 4.3.4 Steigerung der Photostabilität von Rhodamin 123 mit Azofarbstoffen

Aus der stationären Messung des exponentiellen Zerfalls der Fluoreszenzintensität kann die Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung  $k_b$  in Anwesenheit der verschiedenen Additive ermittelt werden (Abbildung 4.3-9 A). Da bei diesen Untersuchungen Leistungsdichten von  $< 10 \text{ W/cm}^2$  zur Anregung des Fluorophors eingesetzt wurden, können Übergänge in höher angeregte Zustände vernachlässigt werden. Zusätzlich wird

der Zustand des Radikalkations kaum bevölkert, dadurch wird die Wahrscheinlichkeit für die Photozerstörung aus  $R^{+}$  vernachlässigbar klein.

Abbildung 4.3-9 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der irreversiblen Photozerstörung von Rh123 für die Additive COC, AZB und AAZB. Durch die Zugabe eines Azobenzolderivats wird  $k_b$  deutlich reduziert. Hierbei sind keine nennenswerten Unterschiede zwischen dem Azobenzol mit triplettlöschendem Charakter AZB und dem Derivat mit triplett- und radikallöschenden Eigenschaften zu erkennen. Die Radikallöschung spielt hier aufgrund der niedrigen Population des Radikalzustands nur eine untergeordnete Rolle. Durch die zunehmende Entvölkerung des  $T_1$ -Zustands bei Erhöhung der Konzentration  $[Q]$  kann zwischen der Photozerstörung aus dem  $S_1$ - und  $T_1$ -Zustand unterschieden werden.



**Abbildung 4.3-9:** Geschwindigkeitskonstante  $k_b$  der Photozerstörung aus stationären Photozerstörungsmessungen in (A) luftgesättigtem und (B) sauerstofffreiem Phosphatpuffer bei pH7. Die Anpassungen der Daten an den theoretischen Ausdruck Gleichung 3.5-8 sind mit durchgezogenen Linien dargestellt, Ergebnisse siehe Tabelle 4.3-5.

Gleichung 3.5-8 liefert mit den Geschwindigkeitskonstanten  $k_{bS}$  und  $k_{bT}$  eine theoretische Beschreibung der Reaktionen aus dem  $S_1$  und  $T_1$  und einem durch die Löschmoleküle induzierten Beitrag  $k_{bX(Q)}$ , wobei  $X = S$  oder  $T$ .  $k_{bS}$  und  $k_{bT}$  stellen charakteristische Parameter des Fluorophors dar und wurden für AZB und AAZB global angepasst (Tabelle 4.3-5). Für die Veranschaulichung der individuellen Photozerstörungsmechanismen aus dem  $S_1$  und  $T_1$  ist die Definition einer Quantenausbeute  $\Phi_{bS}$  bzw.  $\Phi_{bT}$  der Photozerstörung aus den beiden Zuständen sinnvoll:

$$\phi_{bS} = k_{bS} / (k'_0 + k_{ISC} + k_{bS}) \quad (4.3-1)$$

$$\phi_{bT} = k_{bT} / (k'_T + k_{bT}) \quad (4.3-2)$$

Für die Quantenausbeute für irreversible Photozerstörung aus dem  $S_1$ -Zustand erhält man demnach  $\Phi_{bS} = 4.3 \times 10^{-7}$ , für den Reaktionsweg über den Tripletzustand

$\Phi_{bT} = 7.4 \times 10^{-5}$ . Der Triplettzustand ist demnach verstärkt in Photozerstörungsreaktionen involviert und die Löschung dieses Zustands trägt zur Photostabilisierung bei. Diese Wirkung wurde auch für die Photostabilität von Fluorescein und den Triplettlöcher MEA beobachtet.<sup>70</sup>

**Tabelle 4.3-5:** Farbstoffspezifische Geschwindigkeitskonstanten von Rh123 in Phosphatpuffer pH7 aus Photostabilitätsuntersuchungen.

luftgesättigt		sauerstofffrei			
$k_{bs}$	$k_{bT}$	$k_{bs}^0$	$k_{bT}^0$	$k_{qs}^{O_2}$	$k_{qt}^{O_2}$
s <sup>-1</sup>	s <sup>-1</sup>	s <sup>-1</sup>	s <sup>-1</sup>	10 <sup>4</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	10 <sup>4</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
108 <sup>a</sup>	31 <sup>a</sup>	0	6	35	9.7

<sup>a</sup> Die Standardabweichung aus der Anpassung der experimentellen Daten variiert von 2 – 14 %.

Im Gegensatz zu den Azobenzolen besitzt COC keine photoprotektive Wirkung auf Rh123, sondern verstärkt die Ausbleichreaktionen. Zur Anpassung der experimentellen Daten von COC wurden  $k_{bs}$  und  $k_{bT}$  auf die aus den Messungen an AZB und AAZB ermittelten Werte fixiert. Der Einfluss von COC auf die Geschwindigkeitskonstanten der Photozerstörung lässt sich mit Hilfe von  $k_{bs(Q)}$  und  $k_{bT(Q)}$  beschreiben (Tabelle 4.3-4).

Die durch COC verursachte verstärkte Photozerstörung kann hypothetisch durch einen Reaktionsmechanismus erklärt werden, der die Bildung eines Rhodamin-Radikalanions berücksichtigt.

Die Berechnung der freien Standardreaktionsenthalpie  $\Delta G_{CR}$  einer Ladungsrekombination (*charge recombination*, CR) eines solvatisierten Ionenpaars erfolgt analog zum ET nach der Rehm-Weller-Gleichung (3.2-1) berechnet werden. Die Energie des Singulettzustands kann als Summe aus  $\Delta G_{ET}$  des Elektronentransfer und  $\Delta G_{CR}$  der Ladungsrekombination betrachtet werden. Da der  $\Delta G_{ET}$ -Wert für die Reduktion des Rhodamins durch COC schwach negativ ist, erhält man also eine stark negative freie Enthalpie  $\Delta G_{CR}$  für die Ladungsrekombination. Die Geschwindigkeitskonstanten sind demnach klein und es entstehen langlebige Intermediate (*Marcus-Theorie, inverted region*).<sup>120-123</sup> Diese neigen zu sekundären Elektronentransferreaktionen und tragen auf diesem Weg zur irreversiblen Zerstörung des Fluorophors bei. Auch AAZB kann mit Rh123 einen reduktiven Elektronentransfer eingehen. Da die freie Enthalpie  $\Delta G_{ET}$  dieser Reaktion allerdings deutlich negativ ist (Tabelle 4.3-2), findet eine schnelle Rekombination statt und das Ionenpaar kann in den Grundzustand zurückkehren (reversibler ET).

#### 4.3.4.1 Der Einfluss von Sauerstoff auf die Ausbleichreaktionen

Bei den stationären Photostabilitätsuntersuchungen an Rh123 mit AZB und COC als Additive in sauerstofffreiem Phosphatpuffer wurde eine komplexe exponentielle Zerfallskinetik mit fluoreszierenden Intermediaten gemessen. Diese geringen Mengen an photooxidierten Produkten wurden nicht näher untersucht. Um die Zerfallskurven der Fluoreszenzintensität dennoch auswerten zu können, wurde jeweils der Mittelwert aus den Zerfallszeiten verwendet. Der freie Fluorophor Rh123 zeigt eine Geschwindigkeitskonstante für die Photozerstörung  $k_{b,deox}$  in sauerstofffreier Umgebung von  $346 \text{ s}^{-1}$  (Abbildung 4.3-9 B, zum Vergleich  $k_b = 160 \text{ s}^{-1}$  in luftgesättigter Umgebung). Zwei Effekte von molekularem Sauerstoff auf die Photophysik von Farbstoffen sind bekannt: (I) Unter Sauerstoffausschluss wurde eine Verringerung der Deaktivierungsrate des  $T_1$  von  $k_{T,deox} = 4000 \text{ s}^{-1}$  für Rh123 in wässriger Lösung festgestellt. Daraus wurde die Triplettlöscheffizienz von Sauerstoff an Rh123 ( $k_{qT} = 1.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) anhand von FCS-Messungen in luftgesättigtem bzw. entgastem Phosphatpuffer berechnet (Gleichung:  $k_T = k_{T,deox} + k_{qT} [O_2]$ ). Dieser Wert stimmt gut mit einem Literaturwert für Rh6G in Ethanol überein.<sup>111</sup> (II) Sauerstoff induziert eine Erhöhung der Interkombinationsübergänge in Rhodaminen. Basierend auf Literaturwerten zum Einfluss von Sauerstoff auf die Interkombinationsübergänge von Rh6G wurde ein Wert von  $2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$  für die Geschwindigkeitskonstante  $k_{ISC,deox}$  in Abwesenheit von Sauerstoff für die weiteren Betrachtungen angenommen.<sup>111</sup>

Für Rh123 in luftgesättigter Lösung ( $[O_2] = 290 \mu\text{M}$ ) wurden mit Gleichung 3.5-8 die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{bS}$  und  $k_{bT}$  für die Photozerstörung aus dem  $S_1$ - und  $T_1$ -Zustand ermittelt (vergleiche Kapitel 4.3.4). Werden nun ausschließlich die beiden oben beschriebenen Auswirkungen von Sauerstoff berücksichtigt, kann ein theoretischer Wert für  $k_{b,deox}$  berechnet werden. Durch Einsetzen der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{T,deox}$  und  $k_{ISC,deox}$  für entgaste Bedingungen und der Werte  $k_{bS}$  und  $k_{bT}$  aus Messungen in luftgesättigter Lösung in Gleichung 3.5-8 erhält man einen theoretischen Wert von  $k_{b,deox} = 1660 \text{ s}^{-1}$ . Die experimentell bestimmte Geschwindigkeitskonstante liegt aber deutlich unter diesem Wert ( $k_b = 346 \text{ s}^{-1}$ ). Folglich müssen zusätzliche Zerfallsreaktionen durch molekularen Sauerstoff oder Sauerstoffspezies auf  $k_{bS}$  und  $k_{bT}$  in Betracht gezogen werden, d.h. reaktive Sauerstoffspezies reagieren direkt mit dem angeregten Rhodamin.

Eine konzentrationsabhängige Reihe von  $k_b$ -Werten unter Ausschluss von Sauerstoff wurde an Gleichung 3.5-8 angepasst. Die experimentellen Daten sowie die angepassten Kurven sind in Abbildung 4.3-9 B aufgetragen. Hierbei wurden die in luftgesättigter Lösung bestimmten Werte für  $k_{qT}$ ,  $k_{bS(O)}$  und  $k_{bT(O)}$  fixiert und Triplettparameter  $k_T$  und  $k_{ISC}$  für sauerstofffreie Bedingungen eingesetzt ( $k_T = 4000 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{ISC} = 2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ).

Unter Ausschluss von Sauerstoff erhält man so eine Geschwindigkeitskonstante für Photozerstörungsreaktionen aus dem Tripletzustand von  $k_{bT}^0 = 6 \text{ s}^{-1}$ , die Geschwindigkeitskonstante für den Singulettkanal ist näherungsweise null. Der Einfluss von Sauerstoff bzw. Sauerstoffspezies auf die Geschwindigkeitskonstanten der Photozerstörung kann durch  $k_{bX} = k_{bX}^0 + k_{qX}^{O_2} [O_2]$  beschrieben werden, wobei X = S oder T.  $k_{bX}^0$  ist dabei die Geschwindigkeitskonstante in Abwesenheit von Sauerstoff,  $k_{qX}^{O_2}$  die durch Sauerstoff verursachte Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung und  $[O_2]$  die Sauerstoffkonzentration der Lösung. Anhand der bestimmten Werte bei zwei Sauerstoffkonzentrationen, 0 und  $290 \mu\text{M}$ ,<sup>51</sup> können die sauerstoffinduzierten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{qS}^{O_2} = 35 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und  $k_{qT}^{O_2} = 9.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  abgeschätzt werden (Tabelle 4.3-5). Zur Bewertung dieses Ergebnisses ist es zweckmäßig, die Quantenausbeute der Photozerstörung  $\Phi_{bS}^{O_2}$  bzw.  $\Phi_{bT}^{O_2}$  durch Sauerstoffspezies für den Singulett- bzw. Tripletzustand zu definieren:

$$\phi_{bS}^{O_2} = k_{qS}^{O_2} [O_2] / (k_{bS}^0 + k_{qS}^{O_2} [O_2]) \quad (4.3-3)$$

$$\phi_{bT}^{O_2} = k_{qT}^{O_2} [O_2] / (k_{bT}^0 + k_{qT}^{O_2} [O_2]) \quad (4.3-4)$$

Da unter Ausschluss von gelöstem Sauerstoff keine Photozerstörungsreaktionen aus dem Singulettzustand erfolgten ( $k_{bS}^0 = 0 \text{ s}^{-1}$ ), kann die Ursache der in luftgesättigter Lösung beobachteten Ausbleichreaktionen aus diesem Zustand praktisch vollständig auf Sauerstoffspezies zurückgeführt werden (d.h. die Quantenausbeute der Photozerstörung durch Sauerstoffspezies  $\Phi_{bS}^{O_2} = 1$ ). In luftgesättigter Lösung werden irreversiblen Ausbleichreaktionen aus dem Tripletzustand lediglich zu 82 % durch Sauerstoff verursacht.

#### 4.4 Untersuchung der triplettlöschenden Wirkung von AAZB bei weiteren Fluorophoren

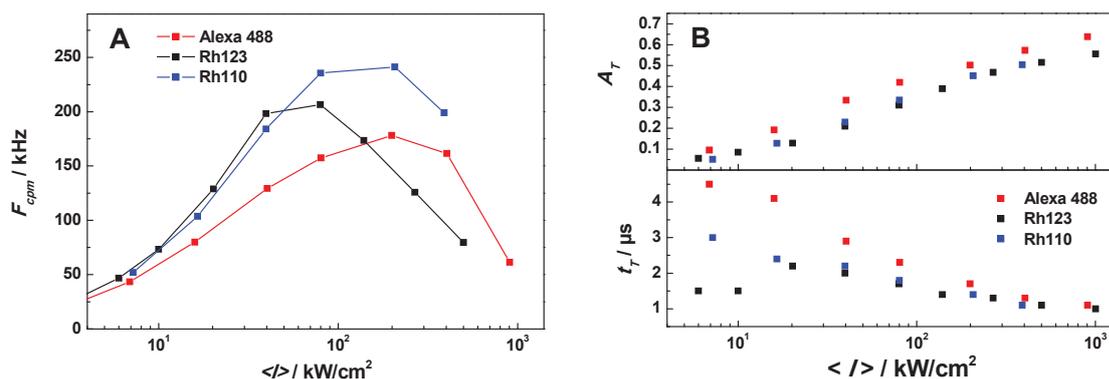
Die Steigerung der Signalstärke durch die Löschung von Triplet- und Radikalzuständen in Anwesenheit des Azobenzolderivats AAZB wurde an weiteren Fluoreszenzfarbstoffen untersucht. Dazu wurden leistungsabhängige FCS-Messungen in Phosphatpuffer bei pH7 durchgeführt. Hierbei stand vor allem die Frage im Vordergrund, inwieweit AAZB in der Lage ist, die Tripletzustände von Fluorophoren mit langwelligen Absorptionsbanden zu löschen.

**Tabelle 4.4-1:** Photophysikalische Parameter und bimolekulare Geschwindigkeitskonstanten für die Löschung des Tripletzustands des jeweiligen Fluorophors in Phosphatpuffer bei pH7 mit dem Additiv AAZB. Freie Enthalpie  $\Delta G_{ET,red}$  des reduktiven Elektronentransfers zwischen AAZB und dem Radikalkation  $R^{++}$  des Fluorophors. Die Fluorophore basieren auf unterschiedlichen chemischen Strukturen, die in die Klassen der Rhodamine (r), der Carbopyronine (c) und der Oxazine (o) unterteilt wurden.

Stoffklasse		$k_T$	$k_{ISC}$	$\sigma_{01}(\lambda_{ex})^a$	$k_{qT}$	$\Delta G_{ET,red}(R^{++})$
		$10^5 \text{ s}^{-1}$	$10^5 \text{ s}^{-1}$	$10^{-16} \text{ cm}^2 \text{ (nm)}$	$10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	eV
Rh123	r	4.2	7.6	2.60 (496)	$3.9 \pm 0.3$	-0.03
Rh110	r	3.3	7.6	2.62 (496)	b	-0.17
Alexa 488	r	2.1	12.0	2.61 (496)	$0.9 \pm 0.2$	-0.29
Atto 590	r	4.8	8.0	2.00 (559)	$2.6 \pm 0.2$	-0.12
Atto Rho14	r	3.1	3.4	3.27 (635)	$2.4 \pm 0.2$	-0.15
Atto 647N	c	3.3	2.5	4.43 (635)	$1.5 \pm 0.3$	0.03
Atto 655	o	4.0	1.4	2.85 (635)	c	-0.12

<sup>a</sup> Die Absorptionsquerschnitte  $\sigma_{01}$  wurden für die verwendete Anregungswellenlänge  $\lambda_{ex}$  mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten berechnet (Siehe Kapitel 2.2). <sup>b</sup> Wurde nicht untersucht. <sup>c</sup> Aufgrund der Überlagerung zweier Bunchingterme war eine Bestimmung von  $k_{qT}$  nicht möglich. Die zur FCS-Messung verwendeten Aufbauten, Filter und Strahlteiler für die Farbstoffe im roten und grünen Spektralbereich sind in Kapitel 2.7 aufgeführt.

Es sind nur wenige experimentelle Daten über die Lage der Tripletenergien von diesen Fluoreszenzfarbstoffen verfügbar.<sup>124-127</sup> Für einige Rhodamine wurde eine  $S_1$ - $T_1$ -Energilücke von durchschnittlich  $3100 \text{ cm}^{-1}$  bestimmt.<sup>64</sup> Basierend auf diesem Wert verschiebt sich die Lage des  $T_1$ -Zustands des Fluorophors in Abhängigkeit vom Singulettzustand. Für diese Untersuchung wurden daher hauptsächlich Atto-Farbstoffe mit zunehmend rotverschobenen Absorptionswellenlängen gewählt.



**Abbildung 4.4-1:** (A) Fluoreszenzzählrate  $F_{cpm}$  pro Molekül und (B) Triplettparameter aus FCS-Messungen an grünen Fluorophoren in Phosphatpuffer pH7.

Leistungsabhängige FCS-Messungen lieferten die photophysikalischen Geschwindigkeitskonstanten für die Deaktivierung des  $T_1$ -Zustands  $k_T$  und für Interkombinationsübergänge  $k_{ISC}$  der untersuchten Fluorophore (Tabelle 4.4-1). Abbildung 4.4-1 zeigt die Fluoreszenzzählraten pro Molekül und die Triplettparameter der drei Rhodaminfarbstoffe Rh123, Rh110 und Alexa 488 mit nicht-alkylierten Aminogruppen am Xantherengerüst. Die im Vergleich zu Rh123 und Rh110 deutlich erhöhte Geschwindigkeitskonstante für Intersystemcrossing von Alexa 488 wird durch einen Schweratomeffekt der Schwefelatome in den Sulfonsäuregruppen verursacht.<sup>43</sup> Gleichzeitig ist die Deaktivierung des Tripletzzustands sehr langsam, weshalb der Tripletzzustand bei Alexa 488 deutlich stärker bevölkert ist (Abbildung 4.4-1 B). Daraus resultiert die geringste Signalstärke im Vergleich zu den anderen grünfluoreszierenden Farbstoffen (Abbildung 4.4-1 A).

Die Geschwindigkeitskonstante  $k_{qT}$  für die bimolekulare Löschung des Tripletzzustandes von Alexa 488 durch den Löscher AAZB liegt mit  $0.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  deutlich unter der von Rh123. Im Gegensatz zum Fluorophor Rh123, der einen kationischen Grundzustand besitzt, trägt Alexa 488 zwei negative Ladungen, weshalb eine elektrostatische Abstoßung zwischen AAZB und dem Alexa-Farbstoff die für einen Triplettenenergieübertrag notwendige Annäherung der Reaktanden verhindert.

Die Reduktion des Radikalkations von Alexa 488 durch AAZB ist deutlich exergonisch ( $\Delta G_{ET} = -0.29 \text{ eV}$ , Tabelle 4.4-1). Da bei den Korrelationskurven von Alexa 488 nur bei extrem hohen Leistungen ein Radikalbunchingterm angepasst werden konnte, konnte keine globale Analyse der FCS-Daten analog zu Kapitel 4.3.2.3 zur Bestimmung der Löscheffizienz  $k_{qR}$  des Radikalkations durchgeführt werden. Die Fluoreszenzzählrate bei hohen Leistungsdichten weist kaum Sättigungseffekte auf, was auf eine gleichzeitige

Löschung des Triplett- und Radikalzustands durch AAZB schließen lässt (Abbildung 4.4-2). Zur Veranschaulichung wurde der theoretische Verlauf der Fluoreszenzzahlrate  $F_{cpm}$  unter Verwendung der Triplettparameter  $k_T$ ,  $k_{ISC}$  und  $k_{qT}$  ohne eine zusätzliche Radikallöschung ( $k_{qR} = 0$ ) anhand Gleichung 3.4-12 berechnet (Anhang 7.8; Abbildung 7.8-1) und zusammen mit den experimentellen Daten aufgetragen. Bei hohen Leistungsdichten  $> 200 \text{ kW/cm}^2$  kann das Signal nicht mehr mit einem Modell beschrieben werden, welches nur die Triplettlöschung berücksichtigt.

In weiteren Untersuchungen wurden Atto-Farbstoffe mit zunehmend rotverschobenen Absorptionswellenlängen untersucht. Falls die Triplettenergien dieser Farbstoffe relativ zu der Lage ihrer  $S_1$ -Zustände mit zunehmender Anregungswellenlänge abnehmen, sollte auch die Effizienz der Triplettlöschung sinken. Dieser Trend konnte in den Geschwindigkeitskonstanten  $k_{qT}$  des Triplettenergietransfers auf das Azobenzol AAZB beobachtet werden (Tabelle 4.4-1). Während für den kurzwelligsten Fluorophor Atto590 eine Geschwindigkeitskonstanten für die  $T_1$ -Löschung von  $2.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bestimmt wurde, sank  $k_{qT}$  mit zunehmender Absorptionswellenlänge des Farbstoffs. AAZB zeigte gegenüber Atto 647N nur noch eine Löscheffizienz von  $1.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

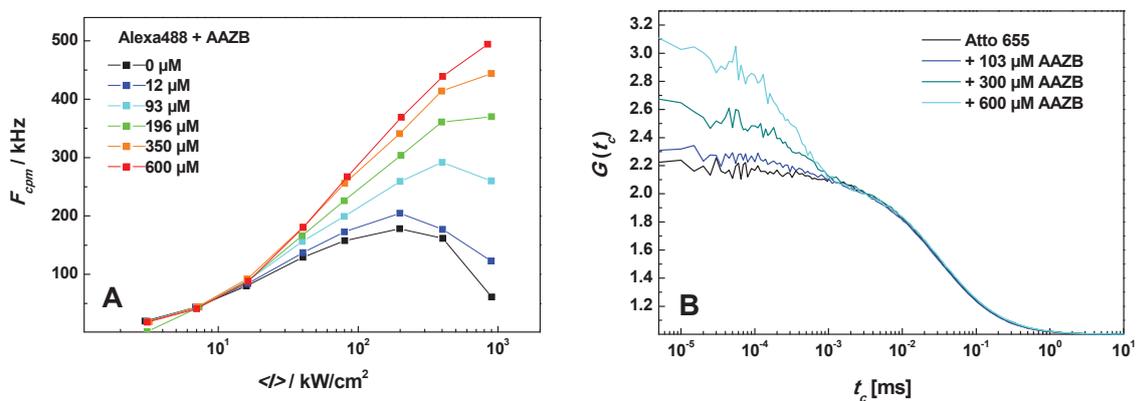
Beim Vergleich dieser Farbstoffreihe muss der Einfluss der unterschiedlichen Fluorophorgrößen auf die diffusionskontrollierte Geschwindigkeitskonstante  $k_{diff}$  diskutiert werden (Strukturformeln siehe Tabelle 2.2-1). Die diffusionskontrollierte Geschwindigkeitskonstante  $k_{diff}$  für die Begegnung von Fluorophor und Löschmolekül lässt sich aus der Avogadro-Konstante  $N_A$ , dem Radius  $R$  des Reaktionsvolumens von Farbstoff und Löschmolekül und dem Gesamtdiffusionskoeffizienten  $D$  der beiden Reaktionspartner ermitteln:

$$k_{diff} = 4\pi N_A D R \quad (4.4-1)$$

Der Radius  $R_F$  des Reaktionsvolumens des Farbstoffs kann mit der Stokes-Einstein-Beziehung  $D = kT/(6\pi\eta R_F)$  und den experimentell bestimmten Diffusionskoeffizienten  $D^{128,129}$  berechnet werden. Dabei ist  $k$  die Boltzmann-Konstante,  $\eta$  die Viskosität des Lösungsmittels und  $T$  die Temperatur. Beispielsweise bewirkt eine Erhöhung des Reaktionsvolumens des Fluorophors von  $5 \text{ \AA}$  auf  $5.5 \text{ \AA}$  eine Zunahme von  $k_{diff}$  um  $0.13 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Für die sterisch aufwändigeren Fluorophore Atto Rho14 und Atto 647N sind also geringfügig höhere diffusionskontrollierte Geschwindigkeitskonstanten zu erwarten. In diesem Zusammenhang kann der Abnahme der Löscheffizienz mit zunehmenden Absorptionswellenlängen in der Reihe Atto 590 >

Atto Rho14 > Atto 647N eine höhere Bedeutung beigemessen werden. Die Ursache hierfür kann auf die sinkenden Triplettenergien der Fluorophore zurückgeführt werden.

Der Farbstoff Atto 655 zeigte im Rahmen der maximalen Leistung des Anregungslasers eine sehr geringe Besetzungswahrscheinlichkeit des Triplettzustands. Dies ist auf die im Verhältnis zur den Intersystemcrossingübergängen relative hohe Geschwindigkeit der Triplettdeaktivierung ( $k_{ISC} = 1.4 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_T = 4 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ) zurückzuführen. Eine Auswertung der Geschwindigkeitskonstante der Triplettlöschung von Atto 655 war daher nicht möglich. Zudem trat bei der Zugabe des Additivs AAZB ein zusätzlicher konzentrationsabhängiger Bunchingterm auf, dessen Korrelationszeiten im Bereich der Triplettzeit liegen (Abbildung 4.4-2 B). Gleichzeitig wird die Fluoreszenz des Atto-Farbstoffs durch AAZB gelöscht. Dies lässt auf die Bildung eines weiteren Dunkelzustands schließen, der auf die Bildung von Grund- und Anregungszustandskomplexen mit anschließendem Elektronentransfer zurückzuführen ist.<sup>10,24</sup> Bei den Farbstoffen Atto 590, Atto Rho14 und Atto 647N wurden ebenfalls bei niedrigen Leistungsdichten und hohen Additivkonzentrationen (> 300  $\mu\text{M}$ ) ein durch Komplexbildung hervorgerufener Bunchingterm und eine Löschung des Fluoreszenzsignals beobachtet.

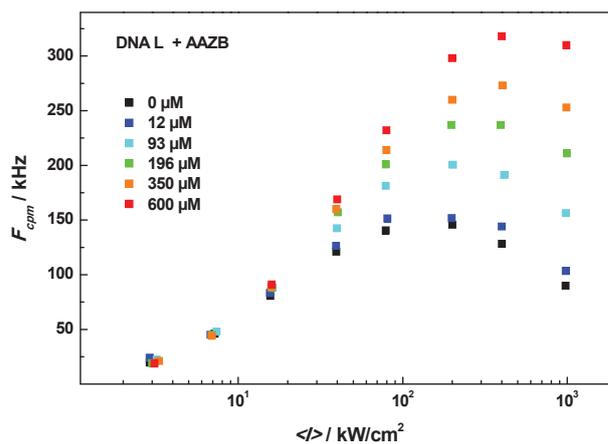


**Abbildung 4.4-2:** (A) Fluoreszenzzählrate pro Molekül des Fluoreszenzfarbstoffes Alexa 488 in Abhängigkeit von der Laserleistung in Anwesenheit des Additivs AAZB in Phosphatpuffer bei pH7. (B) Normierte Fluoreszenzkorrelationskurven von Atto 655 bei einer Leistungsdichte von  $23 \text{ kW/cm}^2$ . Die Zugabe von AAZB verursacht einen zusätzlichen Bunchingterm.

## 4.5 Steigerung der Signalstärke bei fluoreszenzmarkierten Biomolekülen

Die signalsteigernde Wirkung von Additiven auf die Fluoreszenz von markierten Biomolekülen wurde anhand von zwei doppelsträngigen Alexa 488-markierten DNA-Proben untersucht (Sequenz siehe Kapitel 2.2; Abbildung 4.5-1).

Für die FCS-Messungen wurden zwei Proben mit unterschiedlich langen Linkern zwischen dem DNA-Gerüst und dem Fluorophor gewählt. Bei der Probe mit dem kurzen Linker ( $S_t$ ) ist der Farbstoff über eine unflexible Propargyl-Gruppe an das DNA-Rückgrat gebunden. In dieser Probe trennen 4 Atome den Fluorophor von der DNA, während der lange Linker (L) aus insgesamt 11 Atomen besteht und eine bewegliche  $C_6$ -Alkylgruppe beinhaltet. Aufgrund des negativ geladenen Phosphat-Rückgrats der DNA unterscheidet sich die Umgebung dieses Systems stark von dem zuvor untersuchten freien Farbstoff.



**Abbildung 4.5-1:** Fluoreszenzzählrate  $F_{cpm}$  pro Molekül von Alexa 488-markierter DNA bei Zugabe des Additivs AAZB.

	$k_T$	$k_{ISC}$	$k_{qT}$
	$10^5 \text{ s}^{-1}$	$10^5 \text{ s}^{-1}$	$10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Alexa 488	2.1	12.0	$8.9 \pm 0.2$
DNA $S_t$	1.6	14.4	$4.1 \pm 0.7$
DNA L	1.5	16.0	$4.2 \pm 1.2$

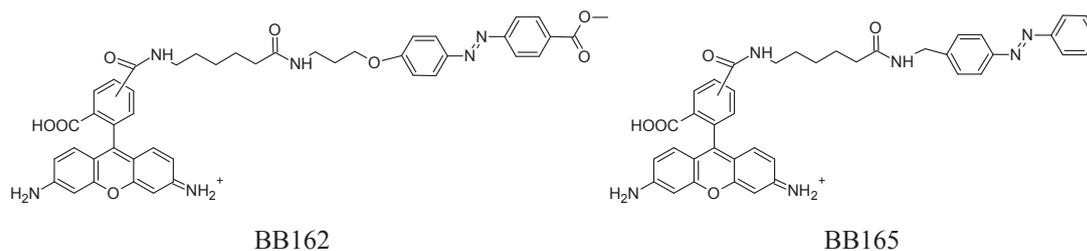
**Tabelle 4.5-1:** Triplettparameter und Geschwindigkeitskonstanten für die Löschung des Tripletzustands von AAZB an Alexa 488 und Alexa 488-markierter DNA unterschiedlicher Linkerlängen.

Durch die Anbindung des Farbstoffs an die DNA sinkt die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante  $k_{qT}$  von AAZB auf  $4.1$  bzw.  $4.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für die Probe mit dem kurzen ( $S_t$ ) bzw. langen (L) Linker (Tabelle 4.5-1). Da im Fall der DNA-Proben die statistischen Fehler bei der Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten relativ groß waren, ist der Unterschied zwischen dem langen und kurzen Linker nicht signifikant (Tabelle 4.5-1). Die Verringerung der  $T_1$ -Löscheffizienz von AAZB ist hier noch stärker

ausgeprägt und wird zusätzlich zur elektrostatischen Abstoßung durch sterische Abschirmung der Reaktionszentren durch das DNA-Gerüst hervorgerufen.

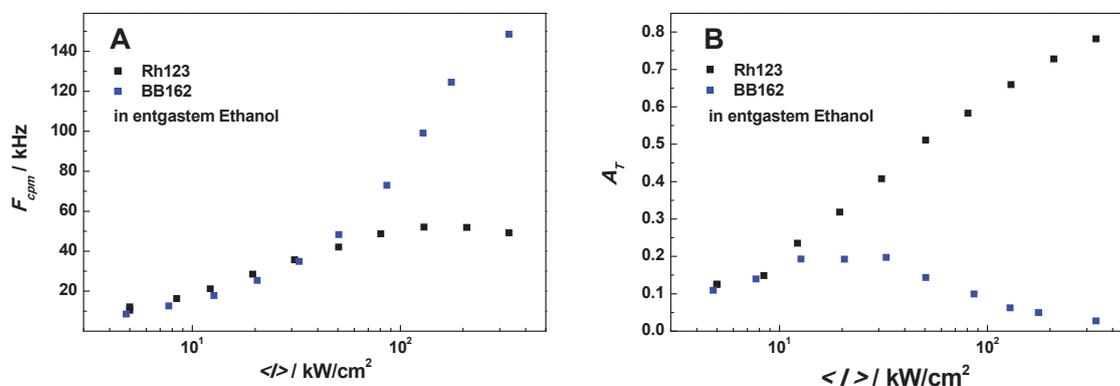
## 4.6 Bichromophore

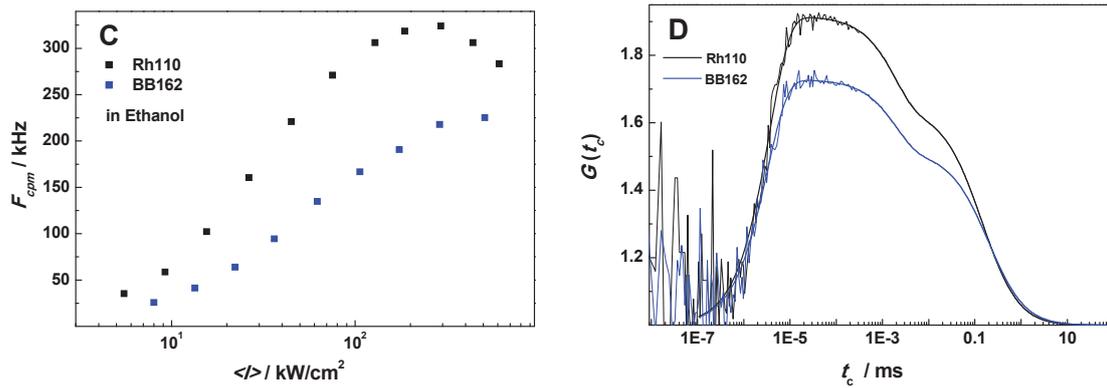
Um die Kopplungschemie und die Reinigungsprozeduren zu vertretbaren Kosten zu etablieren, wurden zunächst Bichromophore auf Basis des Fluoreszenzfarbstoffs Fluorescein untersucht. Die Fluoreszenz des Fluorescein-Fluorophors war im Konjugat BB130 stark gelöscht, gleichzeitig war der Triplettanteil stark reduziert. Bei den Untersuchungen zeigte es sich zudem, dass die Esterverknüpfung unter HPLC-Reinigungsbedingungen nicht stabil genug war. Daher wurde im Bichromophor BB162 als Fluorophor ein Rhodamin 110 verwendet und das Azobenzol über eine Amidbindung gekoppelt (Abbildung 4.6-1).



**Abbildung 4.6-1:** Strukturformel der Bichromophore.

BB162 wurde zunächst mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie in Ethanol und Wasser untersucht (Abbildung 4.6-2). Zur Prüfung der  $T_1$ -Löscheffizienz des gekoppelten AZBs wurden die Fluoreszenzeigenschaften in luftgesättigtem und in sauerstofffreiem Ethanol verglichen. Als Referenz diente der entsprechende freie Farbstoff.





**Abbildung 4.6-2:** (A) Fluoreszenzzählrate  $F_{cpm}$  pro Molekül und (B) Triplettamplitude  $A_T$  von BB162 und Rh123 in sauerstofffreiem Ethanol als Funktion der Anregungsleistung. (C) Fluoreszenzzählrate  $F_{cpm}$  pro Molekül von BB162 und Rh110 in luftgesättigtem Ethanol. (D) Fluoreszenzkorrelationskurve mit Antibunchingterm von Rh110 und BB162 in Wasser bei einer Leistungsdichte von  $100 \text{ kW/cm}^2$ . Die Anpassung der Kurve lieferten für Rh110 / BB162 die Parameter:  $t_d = 147 / 205 \text{ } \mu\text{s}$ ;  $A_T = 0.30 / 0.29$ ;  $t_T = 1.86 / 1.97 \text{ } \mu\text{s}$ ;  $\tau = 3.70 / 3.27 \text{ ns}$ .

In entgastem Ethanol zeigte der Bichromophor bei hohen Leistungsdichten eine deutlich Signalsteigerung (Abbildung 4.6-2 A). Steht aber der Luftsauerstoff als Triplettlöcher ebenso zur Verfügung (Abbildung 4.6-2 C), dann erreichte der freie Farbstoff eine höhere Zählrate, obwohl im Bichromophor die Triplettpopulation deutlich geringer war.

Die Messungen der Fluoreszenzabklingkurven mittels TCSPC zeigten ein komplexes Bild. Für BB162 in Ethanol wurden zur Beschreibung der Abklingkurven mindestens drei Zeiten  $\tau_i$  benötigt, diese können einer ungelöschten ( $\tau_1$ ) und zwei gelöschten Populationen ( $\tau_2$ ,  $\tau_3$ ) zugeordnet werden. Die experimentell bestimmte Fluoreszenzquantenausbeute des Bichromophors war deutlich kleiner, als von den Lebensdauern zu erwarten wäre (Tabelle 4.6-1). Im Vergleich dazu besitzt der freien Farbstoff Rh110 eine monoexponentielle Fluoreszenzabklingkurve mit einer Lebensdauer von  $3.8 \text{ ns}$ , die Fluoreszenzquantenausbeute beträgt  $0.92$ . Es ist bekannt, dass die Lebensdauermessungen mit einer begrenzten Zeitauflösung (hier ca.  $200 \text{ ps}$ ) stark gelöschte Population ( $\tau_3$ ) systematisch unterschätzen. Diese extrem effiziente Fluoreszenzlöschung deutet auf eine Komplexbildung der relativ hydrophoben Chromphore hin.

**Tabelle 4.6-1:** Fluoreszenzquantenausbeuten  $\Phi_F$ , Fluoreszenzlebensdauern  $\tau_i$  und die entsprechenden Speziesanteile  $x_i$  des Bichromophors BB162 in Wasser und Ethanol.

	$\Phi_F$	$\tau_i (x_i) / \text{ns} (\%)$		
Ethanol	0.34	3.86 (48.4)	1.43 (48.2)	0.36 (3.4)
Wasser	0.17	4.12 (89.8)	1.32 (8.2)	0.12 (2.0)

In Wasser betrug die stationäre Fluoreszenzquantenausbeute nur noch 0.17. Die noch stärkere Löschung des Azo-Konjugats BB162 spiegelt sich in den gemessenen Fluoreszenzlebensdauern auf den ersten Blick nicht wieder.

Dieser offensichtliche Widerspruch kann wie folgt erklärt werden. Bei der Mehrzahl der Moleküle muss der Fluorophor vollständig durch Komplexbildung gelöscht sein, so dass diese Spezies zu den Fluoreszenzlebensdauer- und FCS-Messungen praktisch nichts mehr beitragen kann. Diese Hypothese steht im Einklang mit den Beobachtungen, dass die langwelligste Absorptionsbande des Bichromophors extrem verbreitert ist und dass die Fluoreszenzquantenausbeute in Wasser am kleinsten ist. Die Bildung eines Komplexes mit einem hohen Charge-Transfer-Charakter ist auch hinsichtlich der Redoxpotentiale zu erwarten. Die Berechnung der freien Enthalpie des Elektronentransfers eines Bichromophors kann anhand der Daten des freien Farbstoffs Rh123 und des entsprechenden Azobenzols BB93 (Tabelle 4.1-3) erfolgen. Die  $\Delta G_{ET}$ -Werte lassen auf eine Fluoreszenzlöschung durch einen photoinduzierten Elektronentransfer schließen.

Um die signalsteigernde Wirkung eines Triplettenergie transfers vom Rhodamin zu einem kovalent gebundenen Azobenzol auszunutzen, muss ein intramolekularer Elektronentransfer vermieden werden. Dabei müssen die hohen lokalen Konzentrationen an Löschmolekülen in diesen Assoziaten berücksichtigt werden, wodurch im Gegensatz zu intermolekularen Systemen auch Löschreaktionen mit dem kurzlebigen Singulettzustand möglich sind.

Daher wurde bei der Synthese des Bichromophors BB165 ein Azobenzolderivat ausgewählt, das nicht in der Lage ist, die angeregten Zustände von Rhodamin zu oxidieren oder reduzieren (Tabelle 4.1-1 und Tabelle 4.1-3). FCS-Untersuchungen zeigten eine deutliche Verringerung der Triplettbevölkerung als auch der Fluoreszenzzählrate im Vergleich zum freien Farbstoff. Bei der Anpassung der experimentellen Daten wurde ein zusätzlicher Bunchingterm im Zeitbereich von ca. 0.5 ms und ein weiterer bei sehr kurzen Korrelationszeiten ( $10^{-5}$  ms) gefunden. Die hydrophobe Natur der Komponenten des Bichromophors begünstigt auch in diesem Molekül die Bildung von internen Komplexen, in denen die Fluoreszenz statisch als auch dynamisch gelöscht wird.<sup>10</sup> Zusätzlich wurde das Fluoreszenzsignal durch die Bildung von größeren Aggregaten gestört, die besonders bei niedrigen Leistungsdichten auftraten, wodurch weitere FCS-Messungen schwierig waren.

Eine weitere Charakterisierung sollte daher in einem Lösungsmittel höherer Polarität oder unter Verwendung von Tensiden stattfinden, um eine interne Komplexbildung der hydrophoben Chromophorassoziate zu verhindern.

Bei der Synthese von Fluorophoren mit integrierten Photostabilisatoren müssen bei der Auswahl der photoprotektiven Komponente vor allem zwei Aspekte berücksichtigt werden: die Depopulation des Triplettzustands muss durch eine ausreichend niedrige Triplettenergie des Akzeptors gewährleistet sein, gleichzeitig müssen Elektronentransferreaktionen durch die Abstimmung der Redoxpotentiale vermieden werden. Die Verwendung von starren Linkern sollte die Bildung von internen Aggregaten verhindern, die zur Löschung der Fluoreszenz führen.



## 5. Zusammenfassung

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Sensitivität entwickelte sich die laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie zu einer der wichtigsten Techniken bei der Detektion von einzelnen Molekülen. Hohe Signalstärken sind für Einzelmolekül-Fluoreszenzexperimente unerlässlich, da eine ausreichende Photonenzahl eine Voraussetzung für die hochauflösenden Analysen ist. Folglich werden oft hohe Laserleistungsdichten im Bereich von 100 bis 1000 kW/cm<sup>2</sup>, was in den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen Übergänge in verschiedenen Dunkelzuständen verstärkt. Die Signalstärke und Photostabilität der Fluorophore werden hauptsächlich durch die Population dieser nicht fluoreszierenden Zustände wie den Triplettzustand oder Radikalzustände limitiert. Wird die Population der beiden Zustände unterdrückt oder die Geschwindigkeitskonstante der Deaktivierung erhöht, kann der Farbstoff die theoretisch erreichbare Signalstärke eines 2-Niveausystems erreichen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden in der vorliegenden Arbeit neue Substanzen als Additive eingesetzt, die in der Lage sind, über Energie- und Elektronentransfermechanismen gleichzeitig beiden Dunkelzuständen löschen. Zur Klärung der verschiedenen Löschemanismen wurde zunächst der Farbstoff Rhodamin 123 eingehend untersucht, um anschließend die effektivsten Löscher an weiteren Fluoreszenzfarbstoffen zu testen .

### ***Diphenylhexatriene***

Die Diphenylhexatriene erwiesen sich als geeignete Triplettlöscher für Rhodamine 123. Durch eine relativ hohe Energielücke zwischen ersten angeregten Singulett- und Triplettzustand konnte ein effektiver Triplettenergieübertrag von Rhodamin erfolgen ohne dabei das Additiv direkt anzuregen. Das Fluoreszenzsignal wurde durch die Löschung des dunklen Triplettzustands erhöht. Vergleiche von Diphenylhexatrienen mit Substituenten unterschiedlicher elektronischer Eigenschaften zeigten, dass die Löschwirkung ein kompliziertes Zusammenspiel von sterischen, elektronischen und Coulomb-Wechselwirkungen ist.

### ***Cyclooctatetraen-Carbonsäure und Azobenzole***

Die Untersuchung der Wirkung weiterer Additiven erbrachte einen detaillierten Einblick in die photophysikalischen und photochemischen Prozesse des Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin 123 sowie in die unterschiedlichen Löschemanismen. Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie diente zur Analyse des Systems bei hohen Anregungsenergien und ermöglichte den Zugang zu photophysikalischen Prozessen wie die Photooxidation und Reduktion des Rhodamins durch antioxidativ wirkende Additive. Durch Cyclooctatetraen-Carbonsäure und Azobenzolderivate konnte die Bevölkerung des Triplettzustands von Rhodamin nahezu diffusionskontrolliert gelöscht und das Fluoreszenzsignal erhöht werden ( $k_{qT} = 3.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Das Additiv 4-[(4-Aminophenyl)diazanyl]benzoesäure (AAZB) zeigte zusätzlich zu einer sehr effizienten Triplettlöschung eine Reduktion des durch Photooxidation entstandenen Radikalkations von Rhodamin. Durch die gleichzeitige Löschung beider Dunkelzustände von Rhodamin 123 konnte durch die Zugabe dieses Additivs die maximale Steigerung der Fluoreszenzzählrate pro Molekül um einen Faktor 5 erreicht werden.

Im Unterschied zu früheren FCS-Studien erlaubte die gezielte Löschung des Triplettzustands die Bestimmung der zustandsspezifischen Reaktivität der einzelnen angeregten Zustände. Durch die detaillierte Analyse der konzentrationsabhängigen Oxidationsprozesse konnten die separaten Geschwindigkeitskonstanten der Oxidationsprozesse aus dem ersten angeregten Singulett- und Triplettzustand bestimmt werden. Dabei zeigten einige Löschmoleküle eine Neigung zu Elektronentransferreaktionen, die die Bildung von Radikalzuständen fördern.

Durch stationäre Photozerstörungsmessungen konnten verschiedenen Mechanismen, die zur irreversiblen Zerstörung des Rhodamins führen, untersucht werden. Durch Messungen in Abwesenheit von Luftsauerstoff konnte erstmals der Einfluss von gelöstem Sauerstoff auf die Photozerstörung quantifiziert werden. Molekularer Sauerstoff zeigt eine ambivalente Wirkung auf die Photostabilität von Rh123. Die Löschung des Triplettzustands erhöht einerseits die Photostabilität des Farbstoffs. Andererseits entsteht durch diesen Energietransfer hochreaktiver Singulett-Sauerstoff, der wiederum irreversible Zersetzungsreaktionen mit dem Farbstoff eingeht. Wurde der Triplettlöcher Sauerstoff durch Additive wie Azobenzole oder Cyclooctatetraen-Derivate ersetzt, konnte die Geschwindigkeit der Photozerstörung um einen Faktor 50 verringert werden.

### ***Steigerung der Signalstärke weiterer Fluorophore durch AAZB***

Eine deutlich verringerte Löscheffizienz wurde für den negativ geladenen Fluorophor Alexa 488 beobachtet, da die elektrostatische Abstoßung die Annäherung des Additivs verhindert. Anhand von fluoreszenzmarkierten DNA-Proben konnte die Anwendbarkeit der photoprotektive Additive auf biologische Systeme bestätigt werden.

Das Azobenzolderivat wurde außerdem an Akzeptorfarbstoffen getestet, die häufig zur Markierung von FRET-Proben verwendet werden, wie beispielsweise Atto 647N. AAZB zeigte auch bei diesen Farbstoffen mit niedrigeren Anregungsenergien und damit geringeren Triplettenergie eine gute Löscheffizienz.

### ***Bichromophore***

In Bichromophoren, in denen eine photoprotektive Gruppe kovalent an den Fluorophor gebunden wurde, konnte ein komplexer Mechanismus von Energie- und Elektronentransfer beobachtet werden. Die hydrophoben Bestandteile bildeten interne Komplexe, was zu einer statischen Löschung der Fluoreszenz führte. Dennoch wurde durch die Kopplung eines Azobenzolderivats an ein Rhodamin-Grundgerüst in sauerstofffreier Umgebung eine Signalsteigerung aufgrund eines intramolekularen Triplettenergietransfers beobachtet.

### ***Fazit***

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass beim Einsatz von photoprotektiven Additiven zur Steigerung des Fluoreszenzsignals verschiedene Elektronen- und Energietransferreaktionen berücksichtigt werden müssen. Bei der Auswahl eines geeigneten Löschmoleküls sind

detaillierte Kenntnisse über die photophysikalischen und photochemischen Prozesse des Fluoreszenzfarbstoffs erforderlich. Auf diese Art können durch Additive induzierte Übergänge in unerwünschte Dunkelzustände vermieden werden. Die untersuchten Systeme zeigten sowohl in biologischer Umgebung als auch bei gebräuchlichen Akzeptorfarbstoffen gute Effekte und eignen sich daher auch für den Einsatz in Einzelmolekül-FRET-Experimenten. Bei der Anwendung der photoprotektiven Effekte in einem intramolekularen System müssen zusätzlich zu den Aspekten der intermolekularen Experimente hydrophobe Wechselwirkungen durch beispielsweise die Verwendung von starren Linkern verhindert werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- (1) Hirschfeld, T. *Applied Optics* **1976**, *15*, 3135-3139.
- (2) Moerner, W. E.; Kador, L. *Physical Review Letters* **1989**, *62*, 2535-2538.
- (3) Moerner, W. E.; Fromm, D. P. *Review of Scientific Instruments* **2003**, *74*, 3597-3619.
- (4) Moerner, W. E.; Orrit, M. *Science* **1999**, *283*, 1670-1676.
- (5) Kühnemuth, R.; Seidel, C. A. M. *Single Molecules* **2001**, *2*, 251-254.
- (6) Kalinin, S.; Felekyan, S.; Antonik, M.; Seidel, C. A. M. *Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111*, 10253-10262.
- (7) Eggeling, C.; Widengren, J.; Rigler, R.; Seidel, C. A. M. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 2651-2659.
- (8) Eggeling, C.; Widengren, J.; Rigler, R.; Seidel, C. A. M. In *Applied fluorescence in chemistry, biology and medicine*; Springer: Berlin, 1999, p 193-240.
- (9) Tsien, R. Y.; Waggoner, A.; Pawley, J. B. In *Handbook of Biological Confocal Microscopy*; Plenum Press: New York, 1995, p 267-279.
- (10) Widengren, J.; Chmyrov, A.; Eggeling, C.; Lofdahl, P. A.; Seidel, C. A. M. *Journal of Physical Chemistry A* **2007**, *111*, 429-440.
- (11) Cordes, T.; Vogelsang, J.; Tinnefeld, P. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 5018-+.
- (12) Rasnik, I.; McKinney, S. A.; Ha, T. *Nature Methods* **2006**, *3*, 891-893.
- (13) Rauh, R. D.; Evans, T. R.; Leermakers, P. A. *Journal of the American Chemical Society* **1968**, *90*, 6897-6904.
- (14) Brunschwig, B. S.; Ehrenson, S.; Sutin, N. *Journal of Physical Chemistry* **1987**, *91*, 4714-4723.
- (15) Wasielewski, M. R. *Chemical Reviews* **1992**, *92*, 435-461.
- (16) He, T.; Songjie, Y. *Journal of Photochemistry and Photobiology, C: Photochemistry Reviews* **2002**, *3*, 67-76.

- (17) Magde, D.; Elson, E. L.; Webb, W. W. *Physical Review Letters* **1972**, *29*, 705-708.
- (18) Elson, E. L.; Magde, D. *Biopolymers* **1974**, *13*, 1-27.
- (19) Mets, Ü.; Rigler, R. *Journal of Fluorescence* **1994**, *4*, 259-264.
- (20) Magde, D.; Elson, E. L.; Webb, W. W. *Biopolymers* **1974**, *13*, 29-61.
- (21) Palmer III, A. G.; Thompson, N. L. *Biophysical Journal* **1987**, *51*, 339-343.
- (22) Widengren, J.; Mets, Ü.; Rigler, R. *Journal of Physical Chemistry* **1995**, *99*, 13368-13379.
- (23) Chmyrov, A.; Arden-Jacob, J.; Zilles, A.; Drexhage, K. H.; Widengren, J. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2008**, *7*, 1378-1385.
- (24) Widengren, J.; Dapprich, J.; Rigler, R. *Chemical Physics* **1997**, *216*, 417-426.
- (25) Widengren, J.; Schwille, P. *Journal of Physical Chemistry A* **2000**, *104*, 6416-6428.
- (26) Arden-Jacob, J.; Drexhage, K. H.; Hamers-Schneider, M.; Kemnitzer, N. U.; Zilles, A. 2004; Vol. DE10259374A1.
- (27) Eggeling, C.; Ringemann, C.; Medda, R.; Schwarzmann, G.; Sandhoff, K.; Polyakova, S.; Belov, V. N.; Hein, B.; von Middendorff, C.; Schonle, A.; Hell, S. W. *Nature* **2009**, *457*, 1159-1162.
- (28) Doose, S.; Neuweiler, H.; Sauer, M. *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 1389-1398.
- (29) Marme, N.; Knemeyer, J. P.; Sauer, M.; Wolfrum, J. *Bioconjugate Chemistry* **2003**, *14*, 1133-1139.
- (30) Eggeling, C. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, 1999.
- (31) Pavlishchuk, V. V.; Addison, A. W. *Inorganica Chimica Acta* **2000**, *298*, 97-102.
- (32) Dupuy, B.; Montagu, M. *Analyst* **1997**, *122*, 783-786.
- (33) Brand, L.; Eggeling, C.; Zander, C.; Drexhage, K. H.; Seidel, C. A. M. *Journal of Physical Chemistry A* **1997**, *101*, 4313-4321.
- (34) Brand, L. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, 1998.
- (35) Affleck, R. L.; Ambrose, W. P.; Demas, J. N.; Goodwin, P. M.; Schecker, J. A.; Wu, J. M.; Keller, R. A. *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 2270-2276.
- (36) Klessinger, M.; Michl, J. *Lichtabsorption und Photochemie organischer Moleküle*; VCH: Weinheim, 1989.
- (37) Kasha, M. *Discussion of the Faraday Society* **1950**, *9*, 14.
- (38) Demas, J. N. *Excited state lifetime measurement*; Academic Press: New York, 1983.
- (39) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Kluwer Academic/ Plenum Publishers: New York, 1999.
- (40) Klàn, P.; Wirz, J. *Photochemistry of Organic Compounds*; Wiley-Blackwell: West Sussex, 2009.
- (41) Rehm, D.; Weller, A. *Israel Journal of Chemistry* **1970**, *8*, 259-271.
- (42) Rehm, D.; Weller, A. *Zeitschrift für Physikalische Chemie-International Journal of Research in Physical Chemistry & Chemical Physics* **1970**, *69*, 183-200.
- (43) Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; Wiley-VCH Verlag Weinheim, 2002.
- (44) Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*; University Science Books: Mill Valley, CA, 1991.
- (45) Dexter, D. L. *Journal of Chemical Physics* **1953**, *21*, 836-850.
- (46) Förster, T. *Annalen der Physik* **1948**, *2*, 55-75.

- (47) Levy, S.-T.; Rubin, M. B.; Speiser, S. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1992**, *66*, 159-169.
- (48) Hammond, G. S.; Saltiel, J.; Bradshaw, J. S.; Turro, N. J.; Lamola, A. A.; Vogt, V.; Counsell, R. C.; Cowan, D. O.; Dalton, C. *Journal of the American Chemical Society* **1964**, *86*, 3197-3217.
- (49) Balzani, V.; Bolletta, F.; Scandola, F. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102*, 2152-2163.
- (50) Frutos, L. M.; Castano, O.; Merchan, M. *Journal of Physical Chemistry A* **2003**, *107*, 5472-5478.
- (51) Murov, S. L.; Carmichael, I.; Hug, G. L. *Handbook of Photochemistry*; Marcel Dekker Inc.: New York, 1993.
- (52) Kearns, D. R. *Chemical Reviews* **1971**, *71*, 395-427.
- (53) Herzberg, G. *Molecular Spectra and Molecular Structure*; Krieger Publ. Comp.: Malabar, 1989; Vol. I - III.
- (54) Wasserman, H. H.; Murray, R. W. *Singlet Oxygen*; Academic Press: New York, 1979.
- (55) Korobov, V. E.; Chibisov, A. K. *Journal of Photochemistry* **1978**, *9*, 411-424.
- (56) Stracke, F.; Heupel, M.; Thiel, E. *Journal of Photochemistry and Photobiology A Chemistry* **1999**, *126*, 51-58.
- (57) Hubner, C. G.; Renn, A.; Renge, I.; Wild, U. P. *Journal of Chemical Physics* **2001**, *115*, 9619-9622.
- (58) Renn, A.; Seelig, J.; Sandoghdar, V. *Molecular Physics* **2006**, *104*, 409-414.
- (59) Piwonski, H.; Kolos, R.; Meixner, A.; Sepiol, J. *Chemical Physics Letters* **2005**, *405*, 352-356.
- (60) Lambert, C. R.; Kochevar, I. E. *Photochemistry and Photobiology* **1997**, *66*, 15-25.
- (61) Gurinovich, S. P.; Petsol'd, O. M.; Byteva, I. M. *Biofizika* **1974**, *19*, 249-53.
- (62) Pal, P.; Zeng, H. L.; Durocher, G.; Girard, D.; Li, T. C.; Gupta, A. K.; Giasson, R.; Blanchard, L.; Gaboury, L.; Balassy, A.; Turmel, C.; Laperriere, A.; Villeneuve, L. *Photochemistry and Photobiology* **1996**, *63*, 161-168.
- (63) Morliere, P.; Santus, R.; Bazin, M.; Kohen, E.; Carillet, V.; Bon, F.; Rainasse, J.; Dubertret, L. *Photochemistry and Photobiology* **1990**, *52*, 703-710.
- (64) Menzel, R.; Bornemann, R.; Thiel, E. *Physical Chemistry Chemical Physics* **1999**, *1*, 2435-2440.
- (65) Widengren, J.; Rigler, R.; Mets, Ü. *Journal of Fluorescence* **1994**, *4*, 255-258.
- (66) Eggeling, C.; Volkmer, A.; Seidel, C. A. M. *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 791-804.
- (67) Widengren, J.; Rigler, R. *Bioimaging* **1996**, *4*, 149-157.
- (68) Christ, T.; Kulzer, F.; Bordat, P.; Basché, T. *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, *40*, 4192-4195.
- (69) Hoogenboom, J. P.; van Dijk, E. M. H. P.; Hernando, J.; van Hulst, N. F.; García-Parajó, M. F. *Physical Review Letters* **2005**, *95*, 097401.
- (70) Song, L.; Varma, C. A. G. O.; Verhoeven, J. W.; Tanke, H. J. *Biophysical Journal* **1996**, *70*, 2959-2968.
- (71) Clifford, J. N.; Bell, T. D. M.; Tinnefeld, P.; Heilemann, M.; Melnikov, S. M.; Hotta, J.; Sliwa, M.; Dedecker, P.; Sauer, M.; Hofkens, J.; Yeow, E. K. L. *Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111*, 6987-6991.

- (72) Vogelsang, J.; Cordes, T.; Forthmann, C.; Steinhauer, C.; Tinnefeld, P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 8107-8112.
- (73) Nikogosyan, D. N. *Laser Chemistry* **1987**, *7*, 29-34.
- (74) Khoroshilova, E. V.; Nikogosyan, D. N. *Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology* **1990**, *5*, 413-427.
- (75) Anbar, M.; Hart, E. J. *Journal of the American Chemical Society* **1964**, *86*, 5633-5637.
- (76) Reuther, A.; Nikogosyan, D. N.; Laubereau, A. *Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100*, 5570-5577.
- (77) Eggeling, C. Diplomarbeit, Georg-August-Universität Göttingen, 1996.
- (78) Menzel, R.; Thiel, E. *Journal of Physical Chemistry A* **1998**, *102*, 10916-10920.
- (79) Albinsson, B.; Mårtensson, J. *Journal of Photochemistry and Photobiology, C: Photochemistry Reviews* **2008**, *9*, 138-155.
- (80) Ueno, T.; Urano, Y.; Setsukinai, K.; Takakusa, H.; Kojima, H.; Kikuchi, K.; Ohkubo, K.; Fukuzumi, S.; Nagano, T. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 14079-14085.
- (81) Bao, D. D.; Millare, B.; Xia, W.; Steyer, B. G.; Gerasimenko, A. A.; Ferreira, A.; Contreras, A.; Vullev, V. I. *Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113*, 1259-1267.
- (82) Ferguson, M. W.; Beaumont, P. C.; Jones, S. E.; Navaratnam, S.; Parsons, B. J. *Physical Chemistry Chemical Physics* **1999**, *1*, 261-268.
- (83) Seidel, C. A. M.; Schulz, A.; Sauer, M. H. M. *Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100*, 5541-5553.
- (84) Fries, J. R., Universität-Gesamthochschule Siegen, 1998.
- (85) Fang, H. L. B.; Thrash, R. J.; Leroi, G. E. *Chemical Physics Letters* **1978**, *57*, 59-63.
- (86) Stanienda, A. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **1962**, *133*, 170.
- (87) Ebersson, L.; Nyberg, K. *Journal of the American Chemical Society* **1966**, *88*, 1686-1691.
- (88) Polívka, T.; Sundström, V. *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 2021-2071.
- (89) Mimuro, M.; Katoh, T. *Pure and Applied Chemistry* **1991**, *63*, 123-130.
- (90) Plumley, F. G.; Schmidt, G. W. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, *84*, 146-150.
- (91) Peterman, E. J. G.; Gradinaru, C. C.; Calkoen, F.; Borst, J. C.; van Grondelle, R.; van Amerongen, H. *Biochemistry* **1997**, *36*, 12208-12215.
- (92) Furuichi, K.; Sashima, T.; Koyama, Y. *Chemical Physics Letters* **2002**, *356*, 547-555.
- (93) Hilinski, E. F.; McGowan, W. M.; Sears, D. F.; Saltiel, J. *Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100*, 3308-3311.
- (94) Ye, J. F.; Chen, H.; Note, R.; Mizuseki, H.; Kawazoe, Y. *International Journal of Quantum Chemistry* **2007**, *107*, 2006-2014.
- (95) Pffiffi, D.; Bier, B.; Marian, C.; Schaper, K.; Seidel, C. A. M. *Journal of Physical Chemistry A* **2010**, *114*, 4099-4108.
- (96) Saltiel, J.; Crowder, J. M.; Wang, S. J. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 895-902.
- (97) Evans, D. F.; Tucker, J. N. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2* **1972**, *68*, 174-176.

- (98) Wardman, P. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **1989**, *18*, 1637-1756.
- (99) Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W. *Chemical Reviews* **1991**, *91*, 165-195.
- (100) Gregor, I.; Heupel, M.; Thiel, E. *Chemical Physics* **2001**, *272*, 185-197.
- (101) Schweitzer, C.; Schmidt, R. *Chemical Reviews* **2003**, *103*, 1685-1757.
- (102) Köpsel, C.; Moltgen, H.; Schuch, H.; Auweter, H.; Kleinermanns, K.; Martin, H. D.; Bettermann, H. *Journal of Molecular Structure* **2005**, *750*, 109-115.
- (103) Zondervan, R.; Kulzer, F.; Orlinskii, S. B.; Orrit, M. *Journal of Physical Chemistry A* **2003**, *107*, 6770-6776.
- (104) Nau, W. M.; Scaiano, J. C. *Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100*, 11360-11367.
- (105) Vogelsang, J.; Kasper, R.; Steinhauer, C.; Person, B.; Heilemann, M.; Sauer, M.; Tinnefeld, P. *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, *47*, 5465-5469.
- (106) Wamser, C. C.; Medary, R. T.; Kochevar, I. E.; Turro, N. J.; Chang, P. L. *Journal of the American Chemical Society* **1975**, *97*, 4864-4869.
- (107) Cheng, G.; Peng, X.; Hao, G.; Kennedy, V. O.; Ivanov, I. N.; Knappenberger, K.; Hill, T. J.; Rodgers, M. A. J.; Kenney, M. E. *Journal of Physical Chemistry A* **2003**, *107*, 3503-3514.
- (108) Duarte, F. J.; Hillman, L. W. *Dye Laser Principles*; Academic Press: New York, 1990.
- (109) Das, T. N.; Priyadarsini, K. I. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1994**, *90*, 963-968.
- (110) Pappalardo, R.; Samelson, H.; Lempicki, A. *Applied Physics Letters* **1970**, *16*(7), 267-269.
- (111) Heupel, M.; Gregor, I.; Becker, S.; Thiel, E. *International Journal of Photoenergy* **1999**, *1*, 165-172.
- (112) Die QM-Rechnungen wurde am Institut für Theoretische Chemie und Computerchemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von Prof. Dr. C. Marian durchgeführt.
- (113) Frutos, L. M.; Castano, O.; Andres, J. L.; Merchan, M.; Acuna, A. U. *Journal of Chemical Physics* **2004**, *120*, 1208-1216.
- (114) Frueholz, R. P.; Kuppermann, A. *Journal of Chemical Physics* **1978**, *69*, 3614-3621.
- (115) Klärner, F. G. *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, *40*, 3977-3981.
- (116) Wenthold, P. G.; Hrovat, D. A.; Borden, W. T.; Lineberger, W. C. *Science* **1996**, *272*, 1456-1459.
- (117) Monti, S.; Dellonte, S.; Bortolus, P. *Journal of Photochemistry* **1983**, *23*, 249-256.
- (118) Astrand, P. O.; Ramanujam, P. S.; Hvilsted, S.; Bak, K. L.; Sauer, S. P. A. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 3482-3487.
- (119) Die QM-Rechnungen an COC wurde am Institut für Theoretische Chemie und Computerchemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von Prof. Dr. C. Marian durchgeführt.
- (120) Marcus, R. A. *Journal of Chemical Physics* **1956**, *24*, 966-978.
- (121) Marcus, R. A. *Journal of Chemical Physics* **1965**, *43*, 2654-2657.
- (122) Marcus, R. A. *Angewandte Chemie* **1993**, *8*, 1161-1280.
- (123) Kavarnos, G. J.; Turro, N. J. *Chemical Reviews* **1986**, *86*, 401-449.
- (124) Kunavin, N. I.; Nurmukhametov, R. N.; Khachaturova, G. T. *Zhurnal Prikladnoi Spektroskopii* **1977**, *26*, 1023-1027.

- (125) Dempster, D. N.; Morrow, T.; Quinn, M. F. *Journal of Photochemistry* **1973**, 2, 343-359.
- (126) Dunne, A.; Quinn, M. F. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions* **1976**, I, 2289-2295.
- (127) Gollnick, K.; Franken, T.; Fouda, M. F. R.; Paur, H. R.; Held, S. *Journal of Photochemistry & Photobiology* **1992**, 12, 57-81.
- (128) Dertinger, T.; Pacheco, V.; von der Hocht, I.; Hartmann, R.; Gregor, I.; Enderlein, J. *ChemPhysChem* **2007**, 8, 433-443.
- (129) Müller, C. B.; Loman, A.; Pacheco, V.; Koberling, F.; Willbold, D.; Richtering, W.; Enderlein, J. *A Letters Journal Exploring The Frontiers of Physics* **2008**, 83, 46001.
- (130) Rigler, R.; Mets, Ü.; Widengren, J.; Kask, P. *European Biophysics Journal* **1993**, 22, 169-175.

## 7. Anhang

### 7.1 Überblick über die verwendeten Gleichungen

Dieses Kapitel liefert eine Übersicht über die Gleichung 3.4-10 und 3.4-12, die zur Anpassung der Korrelationsfunktion  $G(t_c)$  und der Fluoreszenzzählrate  $F_{cpm}$  pro Molekül verwendet wurden. Um einen besseren Überblick über die darin enthaltenen Parameter zu bekommen, sind alle Teilgleichungen aufgelistet, die zu den Gesamtgleichungen 3.4-10 und 3.4-12 beitragen.

#### 7.1.1 Die Korrelationsfunktion (3.4-10)

An die gemessenen FCS-Kurven wurde die Gleichung 3.4-10 angepasst.

$$G(t_c) = I + \frac{I}{N_F} \cdot \frac{I}{I + \frac{t_c}{t_d}} \cdot \frac{I}{\sqrt{\left(1 + (\omega_0 / z_0)^2 t_c / t_d\right)}} \left( I - A_T - A_R + A_T e^{-t_c / t_T} + A_R e^{-t_c / t_R} \right) \quad (3.4-10)$$

Darin enthalten sind die Beiträge der beiden Bunchingterme der Triplett- und Radikalkinetik, die in Tabelle 7.1-1 zusammengefasst sind.

**Tabelle 7.1-1:** Bunchingterme der Triplett- und Radikalkinetik.

Triplettkinetik	Radikalkinetik
$G_T(t_c) = 1 + \frac{A_T}{1 - A_T} e^{-t_c/t_T}$	$G_R(t_c) \approx 1 + \frac{A_R}{1 - A_R} e^{-t_c/t_R}$
$A_T = \frac{k_{ISC} k_{01}}{(k_{ISC} + k'_T) k_{01} + k'_T k'_0}$	$A_R = \frac{-\lambda_1(1 - F_{eq}) - k_{ox}}{(\lambda_2 - \lambda_1) F_{eq}}$
$t_T = \frac{k_{01} + k'_0}{(k_{ISC} + k'_T) k_{01} + k'_T k'_0}$	$t_R \approx 1/(k'_{red} + k_{ox})$
	$\lambda_{1,2} = -1/t_d + \frac{1}{2}(-k'_{red} - k_{ox} - k_{bR} \pm \sqrt{k'^2_{red} + k^2_{ox} + k^2_{bR} - 2k_{ox}k_{bR} + 2k_{ox}k'_{red} + 2k'_{red}k_{bR}})$
	$F_{eq} = \left[ 1 + \frac{k_{ox}(1 + k_{bR} t_d)}{k'_{red} + k_{bR} + 1/t_d} \right]^{-1}$

Die Geschwindigkeitskonstanten der Deaktivierung der Zustände  $S_1$ ,  $T_1$  und  $R^{+}$  sind anhängig von der Löschmolekülkonzentration  $[Q]$ :

$$k'_0 = k_0 + k_{qS} [Q]$$

$$k'_T = k_T + k_{qT} [Q]$$

$$k'_{red} = k_{red0} + k_{qR} [Q]$$

### 7.1.2 Die Fluoreszenzzählrate $F_{cpm}$ pro Molekül (3.4-12)

Die Abhängigkeit der Fluoreszenzzählrate pro Molekül wurde mit Gleichung 3.4-12 angepasst.

$$F_{cpm} = G_{Detect} \Phi_{F(Q)} k'_0 S_{1eq} F_{eq} \quad (3.4-12)$$

Darin enthalten sind die stationäre Besetzungswahrscheinlichkeit  $F_{eq}$  und  $S_{1eq}$  des Fluorophors in den elektronischen Zuständen  $S_0, S_1, T_1, S_n$  und  $T_n$  und des  $S_1$ -Zustands:

$$F_{eq} = \left[ 1 + \frac{k_{ox}(1 + k_{bR} t_d)}{k'_{red} + k_{bR} + 1/t_d} \right]^{-1}$$

$$S_{1eq} = \frac{k_{Tn1} k_{Sn1} k'_T k_{01}}{k_{Tn1} [k'_T (k_{Sn1} (k'_0 + k_{01}) + k_{01} k_{Sn1})] + (k_{T1n} + k_{Tn1}) (k_{ISC} k_{Sn1} k_{01})}$$

Um durch Lösungsmittel oder Additive verursachte Hintergrundsignale zu eliminieren, wurde zur Berechnung der  $F_{cpm}$  das gemessene Signal  $S$  mit Hilfe des Hintergrundsignals  $B$  und dem Korrekturfaktor  $f$  folgendermaßen korrigiert:

$$F_{cpm, \text{korrigiert}} = \frac{(S - B)(1 - A_T - A_R)}{N_F f} \quad (7.1-1)$$

$$f = \frac{(S/B)^2}{(S/B + 1)^2} \quad (7.1-2)$$

### 7.1.3 Amplitude und Korrelationszeitzeit des Radikalbunchingterms von $G_R(t_c)$

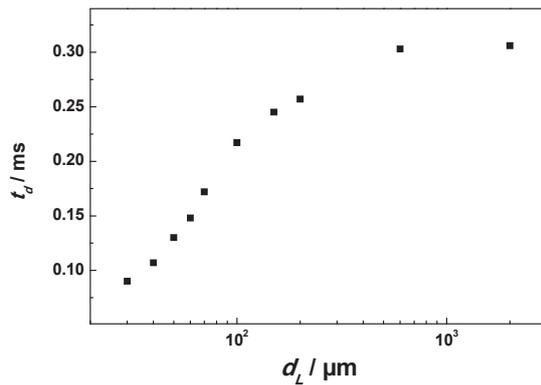
Für die zweite Amplitude  $A_B$  des Radikalbunchingterms  $G_R(t_c)$  kann ein Wert von  $< 2\%$  erwartet werden, die Korrelationszeit  $t_B$  liegt mit ca. 5 ms außerhalb des Messbereichs, der durch die Diffusionszeit vorgegeben wird.

$$A_B = \frac{\lambda_2(1 - F_{eq}) + k_{ox}}{(\lambda_2 - \lambda_1)F_{eq}} \quad (7.1-3)$$

$$t_B = -1/(\lambda_1 + 1/t_d) \quad (7.1-4)$$

## 7.2 Abschätzung der mittleren Leistungsdichte $\langle I \rangle$

Die mittlere Leistungsdichte  $\langle I \rangle$  kann unter der Annahme eines Gauss-Lorentz-förmigen Strahlprofils abgeschätzt werden.<sup>130</sup> Der  $1/e^2$ -Radius in radialer Richtung  $\omega_0 = 0.65 \mu\text{m}$  wurde aus der gemessenen Diffusionszeit  $t_d = 0.3 \text{ ms}$  für Rh123 unter Verwendung einer Lochblende mit ausreichend großem Durchmesser  $d_L$  mit dem Diffusionskoeffizienten  $D = 3.5 \pm 0.3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  berechnet.



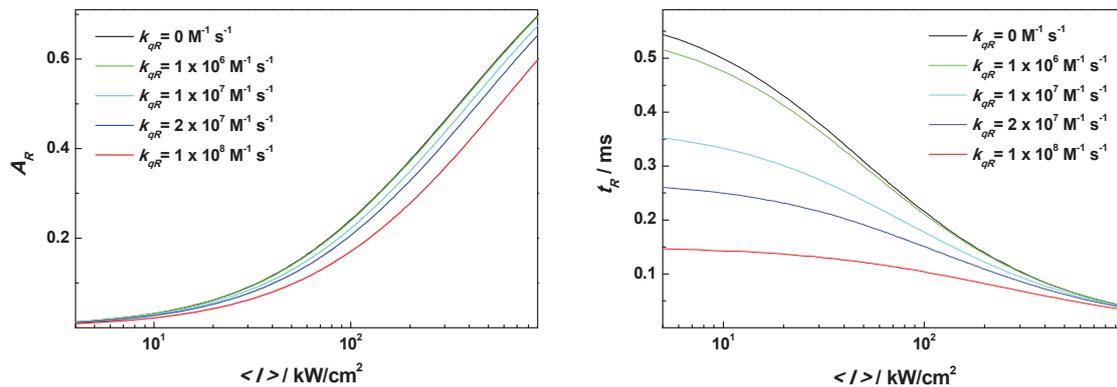
**Abbildung 7.2-1:** Charakteristische Diffusionszeit  $t_d$  von Rhodamin 123 in Abhängigkeit vom Durchmesser  $d_L$  der verwendeten Lochblende.

Die Detektionseffizienz (*photon collection efficiency* CEF) ist in Referenz<sup>130</sup> beschrieben. Zur Berechnung wurden folgende Parameter verwendet: Größe der Lochblende =  $50\mu\text{m}$ ; NA = 1.2; Auflösungsgrenze =  $0.2\mu\text{m}$ . Unter Vernachlässigung der optischen Sättigung ist die Helligkeit  $Q$  eines Moleküls proportional zu  $I$  und CEF. Zur Bestimmung der mittleren Leistungsdichte  $\langle I \rangle$  in den FCS-Messungen wurden die Beiträge der Korrelationskurven proportional zu  $Q^2$  gewertet, dadurch wurde die Gewichtung  $Q^2 = I^2 \text{ CEF}^2$  verwendet. Die numerische Integration von  $\langle I \rangle = \langle IQ^2 \rangle / \langle Q^2 \rangle$  ergibt für die Leistungsdichte  $\langle I \rangle \cong 0.75 I_0$ , wobei  $I_0$  die Leistungsdichte im Fokussmittelpunkt ist.

### 7.3 Der Einfluss der Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{red}'}$ der Löschung des Radikalkations auf die Amplitude $A_R$ des Bunchingterms

Anhand der Größenordnung der in Kapitel 4.3.2 ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für Rhodamin 123 und dem Löschmolekül AZB lässt sich die Auswirkung der

Geschwindigkeitskonstante  $k_{qR}$  auf die Radikalamplitude graphisch veranschaulichen.



**Abbildung 7.3-1:** Theoretische Abhängigkeit der Radikalamplitude  $A_R$  von der Leistungsdichte bei verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{qR}$  für die Löschung des Radikals.

In Abbildung 7.3-1 wurde die Amplitude  $A_R$  und die Korrelationszeit  $t_R$  des Radikalbunchingterms bei einer Additivkonzentration von  $100 \mu\text{M}$  für verschiedene  $k_{qR}$  gegen die Laserleistung aufgetragen. Alle weiteren Parameter, die zur Berechnung nötig sind, wurden aus den Ergebnissen der FCS-Messung an Rh123 und AZB übernommen. Aus dieser Darstellung wird ersichtlich, dass Änderungen in der Geschwindigkeitskonstante  $k_{qR}$  erst ab einem Wert von  $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  die Amplitude deutlich senken, die Korrelationszeit  $t_R$  jedoch schon bei  $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

## 7.4 Diphenylhexatriene

### 7.4.1 Cyclische Voltammetrie

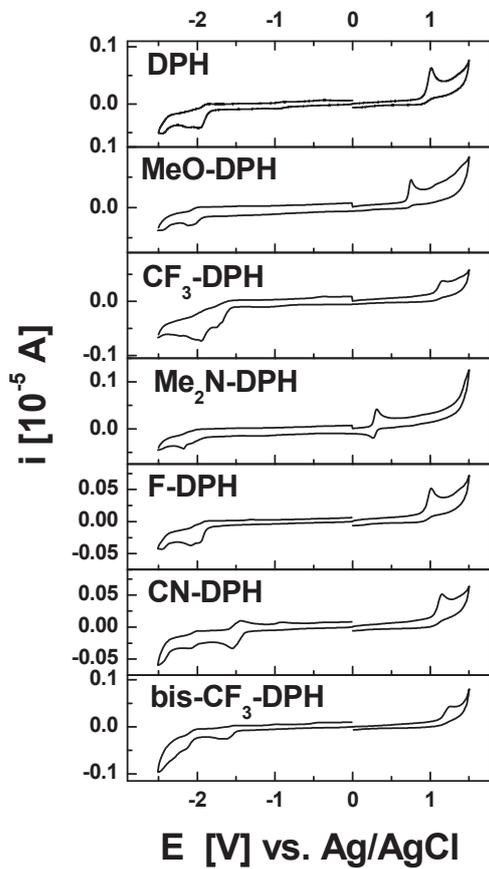
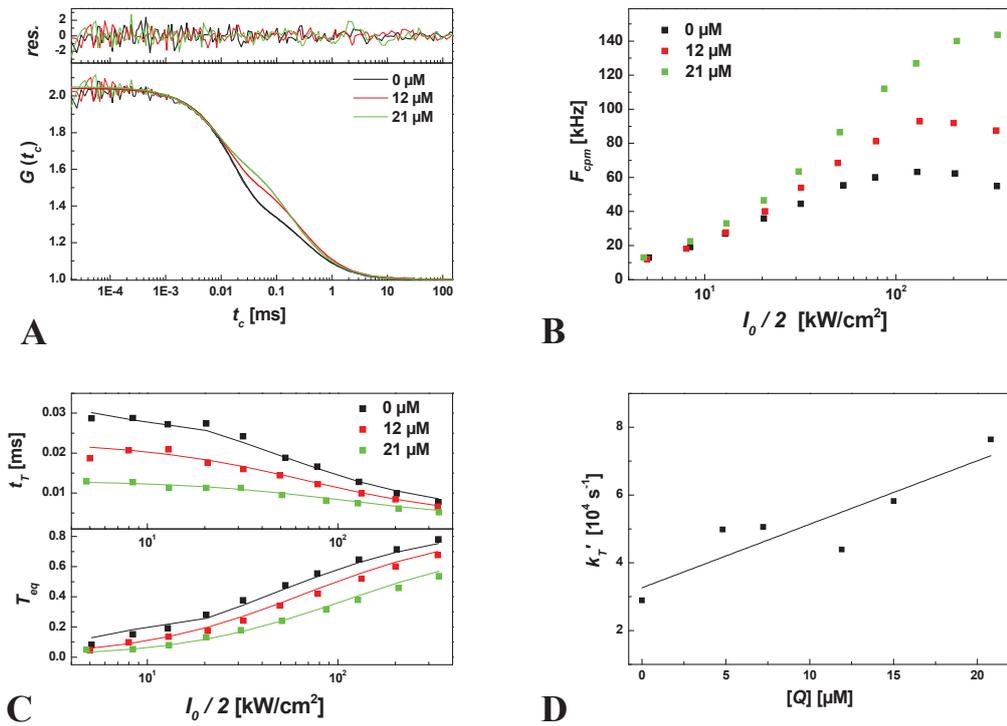


Abbildung 7.4-1: Cyclovoltammogramme der DPHs.

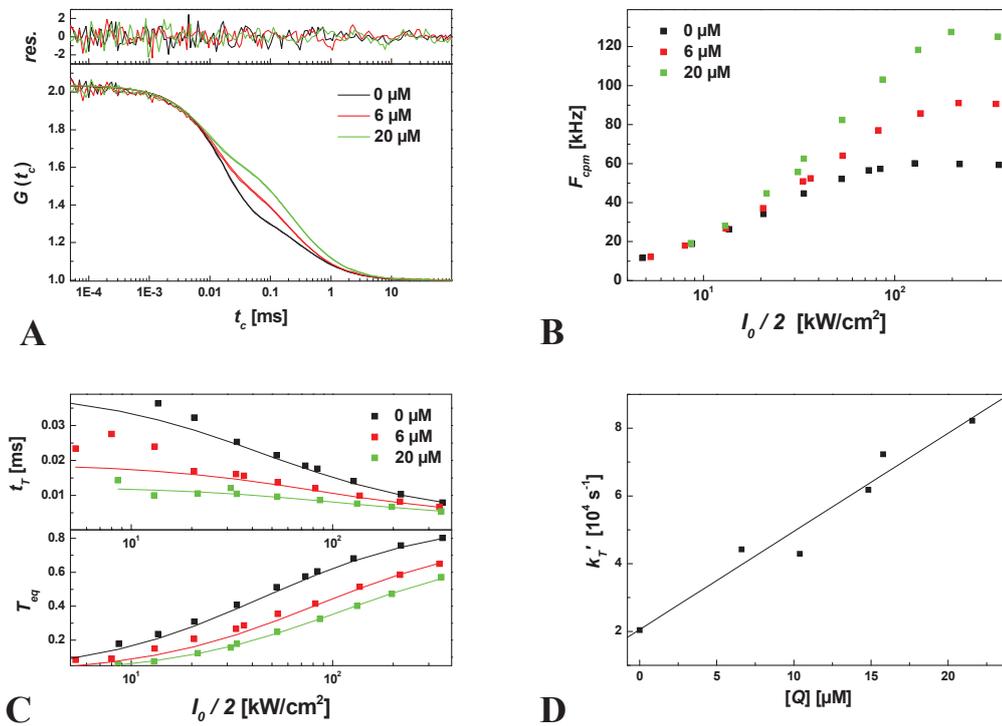
### 7.4.2 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie der DPHs

In diesem Abschnitt werden die Daten der FCS-Messungen an Rh123 mit den Additiven  $CF_3$ -DPH, F-DPH und bis- $CF_3$ -DPH in Ethanol bei einer Sauerstoffkonzentration von  $\sim 0.1\%$  dargestellt.

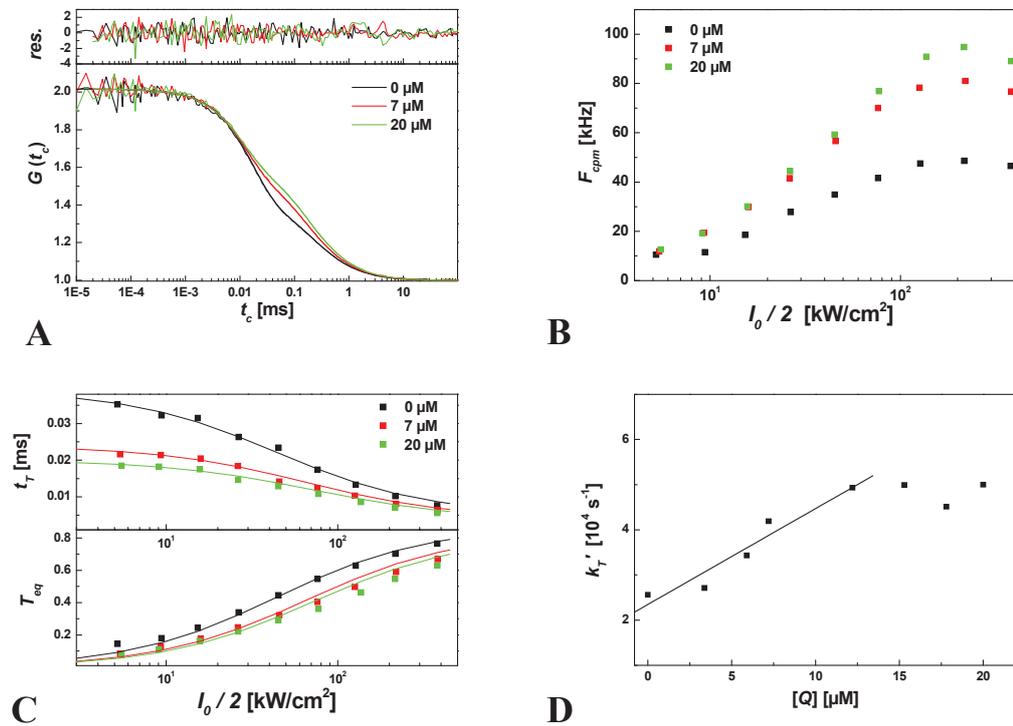
7.4.2.1  $CF_3$ -DPH

**Abbildung 7.4-2** (A) Normierte FCS-Kurven von Rh123 in Anwesenheit von  $CF_3$ -DPH bei  $80 \text{ kW/cm}^2$  für drei repräsentative Konzentrationen. (B) Zählraten pro Molekül sowie die (C) Triplettparameter in Abhängigkeit von der Leistungsdichte. (D) Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten.  $k_{qT} = 2.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

## 7.4.2.2 F-DPH

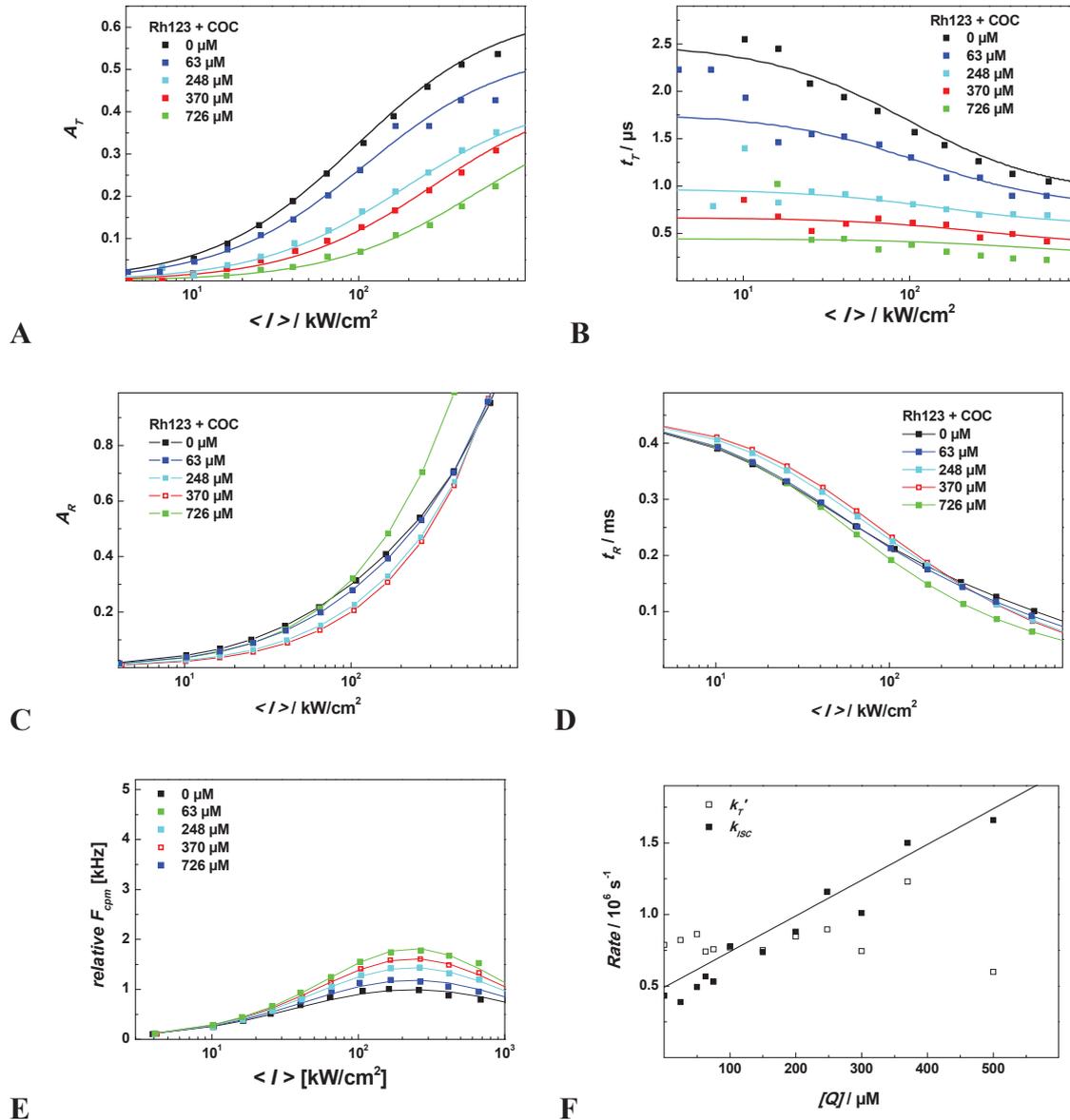


**Abbildung 7.4-3:** (A) Normierte FCS-Kurven von Rh123 in Anwesenheit von F-DPH bei  $80 \text{ kW/cm}^2$  für drei repräsentative Konzentrationen. (B) Zählraten pro Molekül sowie die (C) Tripletparameter in Abhängigkeit von der Leistungsdichte. (D) Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten.  $k_{qT} = 2.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

7.4.2.3 bis-CF<sub>3</sub>-DPH

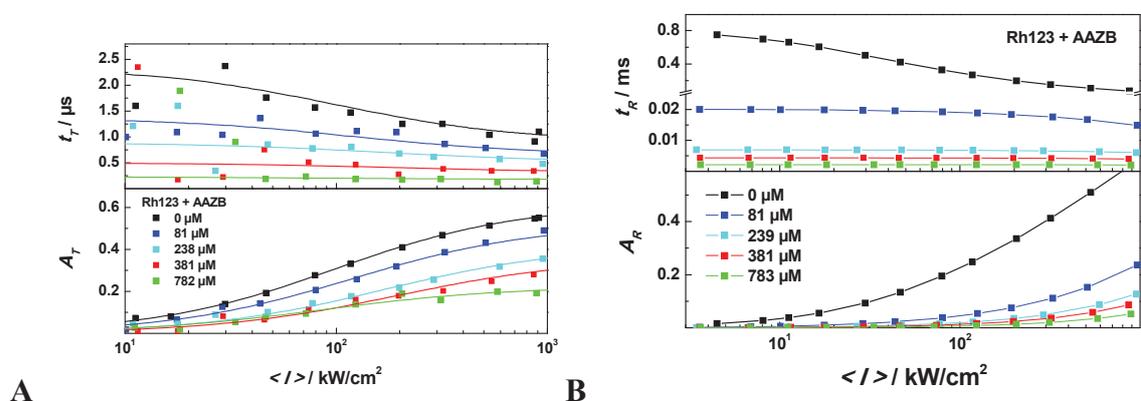
**Abbildung 7.4-4:** (A) Normierte FCS-Kurven von Rh123 in Anwesenheit von bis-CF<sub>3</sub>-DPH bei 80 kW/cm<sup>2</sup> für drei repräsentative Konzentrationen. (B) Zählraten pro Molekül sowie die (C) Triplettparameter in Abhängigkeit von der Leistungsdichte. (D) Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten.  $k_{qT} = 2.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

## 7.5 FCS-Messdaten von COC



**Abbildung 7.5-1:** FCS-Untersuchungen an Rh123 in Phosphatpuffer bei pH7 bei Zugabe von COC. (A) Tripletamplitude. (B) Triplettkorrelationszeit. (C) Radikalamplitude. (D) Radikalkorrelationszeit. (E) Zählrate pro Molekül. (F) Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante für die Deaktivierung des  $T_1$  und der Interkombinationsübergänge.

## 7.6 FCS-Messdaten der Azobenzole



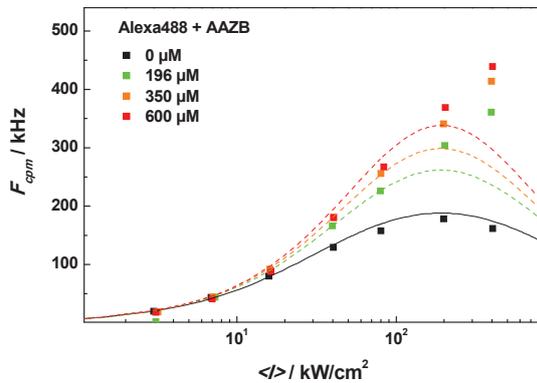
**Abbildung 7.6-1:** (A) Tripletamplitude und Triplettkorrelationszeit von Rh123 bei Zugabe von AAZB. (B) Korrelationszeit  $t_R$  und Amplitude  $A_R$  der Radikalkinetik von Rh123 in Anwesenheit von AAZB.

7.7 Vergleich der Ergebnisse aus den FCS- und  $F_{cpm}$ -Analysen

**Tabelle 7.7-1:** Vergleich der Ergebnisse aus der Analyse der FCS-Kurven und der Abhängigkeit der Zählrate  $F_{cpm}$  von der Laserleistung.

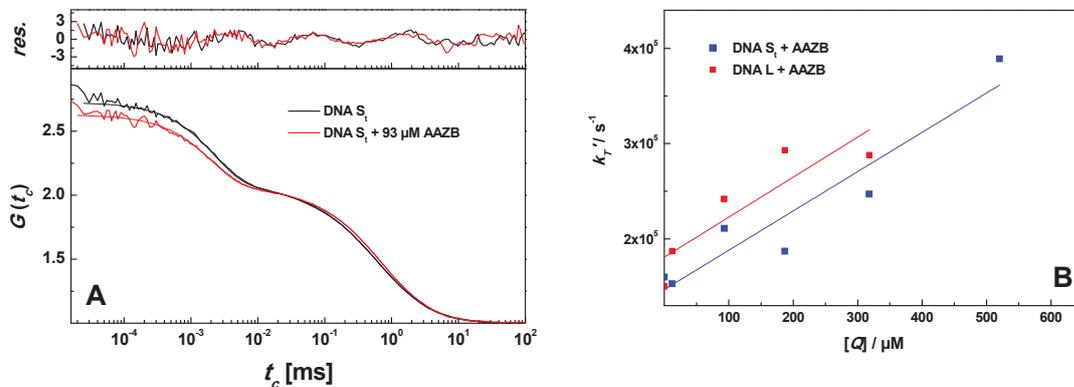
		$k_{oxn}$	$k_{red0}$	$k_{qR}$
		$\text{cm}^2 \text{W}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\text{s}^{-1}$	$10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
AZB	$F_{cpm}$	0.046	1470	0.03
	FCS	0.025	2440	0.019
AAZB	$F_{cpm}$	0.07	1000	0.64
	FCS	0.036	1000	0.6
COC	$F_{cpm}$	0.058	1300	0
	FCS	0.018	1300	0

## 7.8 Simulation der Fluoreszenzzählrate für Alexa 488



**Abbildung 7.8-1:** Theoretischer Verlauf der Fluoreszenzzählrate pro Molekül. Die simulierten Daten sind als gestrichelte Linien dargestellt, die Messwerte als Quadrate. Zur Berechnung wurden alle bekannten Parameter für Alexa 488 verwendet, die Geschwindigkeitskonstante für die Reduktion des Radikals  $k_{qR} = 0$  gesetzt. Alle weiteren Parameter wurden näherungsweise von Rh123 übernommen. ( $\Phi_{F(0)} = 0.92$ ;  $k_0 = 2.7 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_T = 2.1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{ISC} = 12.0 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ;  $t_d = 130 \text{ }\mu\text{s}$ ;  $\gamma = 2.5 \times 10^{18} \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ;  $\sigma_{0I} = 2.61 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ ;  $k_{bR} = 200 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{red0} = 1470 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{oxn} = 0.042 \text{ cm}^2 \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )

## 7.9 FCS-Messdaten der fluoreszenzmarkierten DNA-Proben



**Abbildung 7.9-1:** (A) Normierte Korrelationskurven der Alexa 488-markierten DNA-Probe  $S_t$  bei Zugabe von  $93 \text{ }\mu\text{M}$  AAZB. (B) Lineare Regression der Geschwindigkeitskonstante der  $T_1$ -Deaktivierung der beiden DNA-Proben.

## VERÖFFENTLICHUNGEN

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits publiziert bzw. in Vorträgen präsentiert:

### Publikationen

*Diphenylhexatrienes as Photoprotective Agents for Ultrasensitive Fluorescence Detection*

Pfiffi, D.; Bier, B.; Marian, C.; Schaper, K.; Seidel, C. A. M. *Journal of Physical Chemistry A* **2010**, *114*, 4099–4108.

*Maximizing the Fluorescence Signal and Photostability of Fluorophores by Quenching Triplet and Radical States*

Pfiffi, D.; Kalinin, S.; Dörr, D.; Kühnemuth R.; Overmann, S.; Bier, B.; Chmyrov, A.; Widengren, J.; Schaper, K.; Seidel, C. A. M. *Manuskript in Vorbereitung für "Journal of the American Chemical Society"*.

### Vorträge

*Improvement of Signal Strength and Photostability of Fluorophores by Quenching Triplet and Radical States*

„12th Carl Zeiss sponsored workshop on Fluorescence Correlation Spectroscopy and related methods“; 12. - 16. Oktober 2009, Cargese (Korsika, Frankreich)



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen ein Dankeschön aussprechen, die mich im Laufe der letzten Jahre begleitet haben und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein erster Dank gilt meinem Betreuer Prof. Claus Seidel, der mir dieses interessante Projekt anvertraut hat. Er hat mir ermöglicht, meine Arbeit unter hervorragenden experimentellen und wissenschaftlichen Rahmenbedingungen selbstständig durchführen zu können. Die zahlreichen Diskussionen mit ihm und seine Begeisterung für die Forschung haben sicherlich zu meiner wissenschaftlichen Prägung beigetragen.

Priv.-Doz. Dr. Klaus Schaper für die freundliche Übernahme des Koreferats, die stetige Hilfsbereitschaft und die zahlreichen Diskussionen im Rahmen unserer Kooperation.

Dr. Ralf Kühnemuth danke ich für die Hilfe bei der Lösung unzähliger technischer Probleme im Labor, für seine Diskussionsbereitschaft bei wissenschaftlichen Fragen und seine konstruktive Kritik in allen Situationen.

Dr. Stanislav Kalinin und Dr. Suren Felekyan danke ich ihre geduldigen Auskünfte und tatkräftigen Einsätze bei scheinbar unlösbaren theoretischen Fragestellungen und Auswerteproblemen. Ohne ihre Unterstützung wären viele Zeilen dieser Arbeit sicherlich nicht möglich gewesen.

Desweiteren möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. Klaus Schaper, der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J.J. Müller und bei Sebastian Overmann für die Unterstützung im Rahmen unserer Zusammenarbeit im Sonderforschungsbereichs SFB 663 bedanken,

Prof. Dr. C. Marian danke ich für ihre Unterstützung und unermüdliche Aktivität in einigen Projekten. Ihre quantenmechanischen Rechnungen sind eine äußerst wertvolle Bereicherung dieser Arbeit.

Brigitte Bier für die Bereitstellung ihrer Proben, und insbesondere für die nette Zusammenarbeit und die immerwährende gute Laune.

Mein herzliches Dankeschön gilt meinen Büropartnern Heike Hornen und Andreas Renner. Danke für die unzähligen Einblicke in die unterschiedlichsten biochemischen Arbeitsmethoden, für ein immer offenes Ohr und die vielen aufmunternden Worte.

Denis Dörr für seine Unterstützung bei den Photostabilitätsuntersuchungen, für die interessanten Beiträge zu zahlreichen (wissenschaftlichen) Diskussionen und für die Grundkurse in zweifellos wichtige Laborkenntnissen, wie die Herstellung von Zündschnüren.

Stefan Marawske, der mir von Beginn an bei der Justierung optischer Aufbauten mit Rat und Tat zur Seite standen.

Stephanie Grabowski, Thomas Peulen, Heike Hornen, Ralf Kühnemuth, Stefan Marawske, Denis Dörr, Paul Rothwell, Andreas Renner und Leoni Oberbarnscheidt für das Korrekturlesen dieser Arbeit, für die hilfreichen Kommentare und die konstruktive Kritik, die diese Arbeit zur finalen Form gebracht haben.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Seidel danke ich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern für ihre Unterstützung und Aufmunterung während dieser Zeit. Einen ganz besonderen Dank verdient meine Schwester Stefanie Pfiffi, die nicht nur fleißig korrekturgelesen hat, sondern mich durch ihr Beispiel angetrieben und bestärkt hat.

Mein größter Dank gilt meinem Freund Josuel. Für die liebevolle Unterstützung, das Verständnis und die Aufmunterungen, die alles viel leichter gemacht haben.

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Promotion mit dem Thema

„Steigerung der Signalstärke und der Photostabilität von Fluorophoren in der  
Einzelmolekülspektroskopie“

am Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Claus A.M. Seidel eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht habe.

Es existieren keine vorherigen Promotionsversuche.

Düsseldorf, den

## **Publikationen**

**Diphenylhexatrienes as Photoprotective Agents for Ultrasensitive  
Fluorescence Detection**



## Diphenylhexatrienes as Photoprotective Agents for Ultrasensitive Fluorescence Detection

Daniela Pffiff,<sup>ll,†</sup> Brigitte A. Bier,<sup>ll,‡</sup> Christel M. Marian,<sup>\*,§</sup> Klaus Schaper,<sup>\*,‡</sup> and Claus A. M. Seidel<sup>\*,†</sup>

Chair for Molecular Physical Chemistry, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstrasse 1, D-40225 Düsseldorf, Germany, Group for Organic Photochemistry, Division of Organic Chemistry, Institute for Organic Chemistry and Macromolecular Chemistry, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstrasse 1, D-40225 Düsseldorf, Germany, and Institute of Theoretical and Computational Chemistry, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstrasse 1, D-40225 Düsseldorf, Germany

Received: September 18, 2009; Revised Manuscript Received: February 1, 2010

Given the particular importance of dye photostability for single-molecule investigations, fluorescence fluctuation spectroscopy, and laser-scanning microscopy, refined strategies were explored for enhancing the fluorescence signal by selectively quenching the first excited triplet state of the laser dye Rhodamine 123 (**Rh123**). The strategy is to quench the  $T_1$  state by Dexter triplet energy transfer, while undesired quenching of the singlet state via Förster or Dexter singlet energy transfer and the generation of free radicals through electron transfer should be avoided. Diphenylhexatrienes (**DPHs**) were tested in ethanol for their beneficial effects as a novel class of photoprotective agents using fluorescence correlation spectroscopy. A library of **DPHs** with electron-donating (dimethylamino) and withdrawing substituents (e.g., trifluoromethyl) was synthesized to optimize the electronic properties. Quantum chemical calculations, optical spectroscopy, and cyclic voltammetry were used to determine the electronic properties. The computed  $T_1$  emission energy of **Rh123** and the  $T_1$  excitation energies of all **DPHs** allow for exergonic triplet energy transfer to the quencher. The parent compound quenches the  $T_1$  state of **Rh123** nearly diffusion controlled ( $4.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). All electron-deficient **DPHs** significantly increase (3 $\times$ ) the fluorescence rate of **Rh123** by reducing the triplet state population and by avoiding the formation of other long-lived dark radical states. The quenching constants are reduced by more than a factor of 2, if substituents with increasing size or electronegativity are introduced. The beneficial effect of triplet quenching of substituted **DPHs** is governed by a delicate interplay of steric, electronic, and intermolecular Coulombic effects.

## 1. Introduction

Due to their high fluorescence quantum yields and high photostability, rhodamines<sup>1–3</sup> are important tools in confocal and superresolution microscopy,<sup>4,5</sup> single-molecule spectroscopy,<sup>6</sup> and fluorescence correlation spectroscopy (FCS).<sup>7</sup> Their beneficial properties are based on small singlet–triplet intersystem crossing (ISC) rates ( $k_{\text{ISC}} \approx 10^5\text{--}10^6 \text{ s}^{-1}$ ). Despite the low probability of this process compared to fluorescence emission ( $k_0 \approx 10^9\text{--}10^{10} \text{ s}^{-1}$ ), ISC to the long-lived first excited triplet state ( $^3F_1$ ) is a major limitation in single-molecule spectroscopy where high repetition rates of excitation and fluorescence are required. Under these conditions, the fluorescence dyes **F** will accumulate in the triplet state at higher irradiances and thus the signal saturates. Furthermore, the triplet state is involved in the photochemical destruction of the chromophore. Many attempts have been made to reduce the triplet lifetime in order to increase signal strength and photostability of free dyes<sup>8,9</sup> and bichromophores.<sup>10–13</sup> To this end, various cocktails and procedures have been used.<sup>8,14–20</sup>

Here, we suggest using quenchers **Q**, which selectively quench the triplet state, for this purpose. In principle, three different quenching mechanisms are feasible, quenching by dipole–dipole interaction (Förster mechanism),<sup>21–23</sup> quenching by electron exchange interaction (Dexter mechanism),<sup>24</sup> and quenching by redox processes.<sup>25–28</sup> Among these, the Förster mechanism can be excluded for triplet energy transfer, since its efficiency depends on the oscillator strength of the involved transitions.

In order to achieve efficient triplet excitation energy transfer (TEET) by the Dexter mechanism, certain conditions have to be fulfilled (Figure 1A). The quenching should be exergonic, and, at the same time, a significant overlap of the phosphorescence spectrum of the donor fluorophore ( $^3F_1 \rightarrow ^1F_0$ ) and the triplet-absorption spectrum of the quencher ( $^3Q_1 \leftarrow ^1Q_0$ ) is necessary.<sup>29,30</sup> Furthermore, to avoid singlet excitation energy transfer (SEET) by the Förster and Dexter mechanisms, the first excited singlet state of the quencher ( $^1Q_1$ ) should be located energetically above the fluorescing state ( $^1F_1$ ) of the fluorophore (Figure 1B). Additionally, undesired singlet quenching by oxidation (ox) or reduction (red) of the fluorophore has to be prevented (Figure 1C). The thermodynamic properties of the latter processes can be estimated using the Rehm–Weller equation<sup>25,26</sup> based on absorption spectra and ground-state redox properties:

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: cm@theochem.uni-duesseldorf.de; fax: +49 211 81 13466; tel: +49 211 81 13209 (C.M.M.). E-mail: schaper@klaus-schaper.de; fax: +49 211 81 14324; tel: +49 211 81 12571 (K.S.). E-mail: cseidel@gwdg.de; fax: +49 211 81 12803; tel: +49 211 81 15881 (C.A.M.S.).

<sup>†</sup> Chair for Molecular Physical Chemistry.

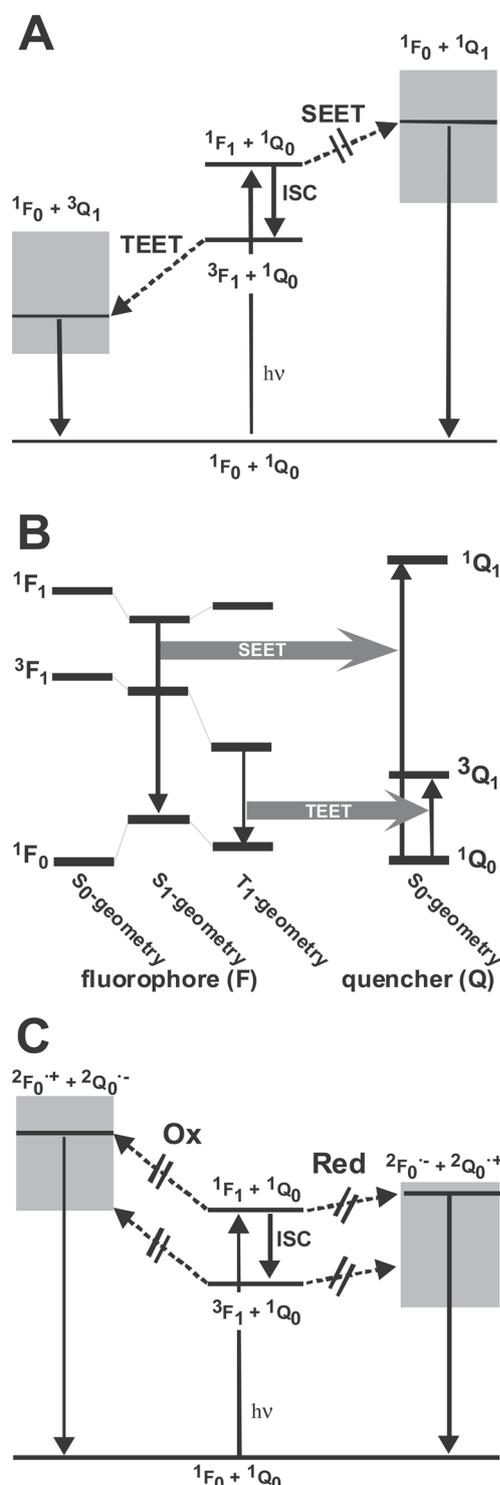
<sup>‡</sup> Institute for Organic Chemistry and Macromolecular Chemistry.

<sup>§</sup> Institute of Theoretical and Computational Chemistry.

<sup>ll</sup> These authors contributed equally to this work.

$$\Delta G_{\text{ET}} = E_{\text{ox}} - E_{\text{red}} - \Delta E_{\text{n}0} - \Delta G^0(\epsilon) \quad (1)$$

where  $E_{\text{ox}}$  and  $E_{\text{red}}$  are the oxidation and reduction potentials of the electron donor and acceptor, respectively,  $\Delta E_{\text{n}0}$  is the singlet or triplet excitation energy.  $\Delta G^0(\epsilon)$  contains two correction terms based on the Born equation: (I) the interac-



**Figure 1.** Overview of the energy of the states of fluorophore **F** and quencher **Q** involved in quenching processes. Depending on the nature of the quencher, these energies may vary (gray boxes). The desired values for these energies are marked by a black bar. (A) Energy balance for SEET and TEET. (B) Energies of individual states. (C) Possible electron transfer pathways.

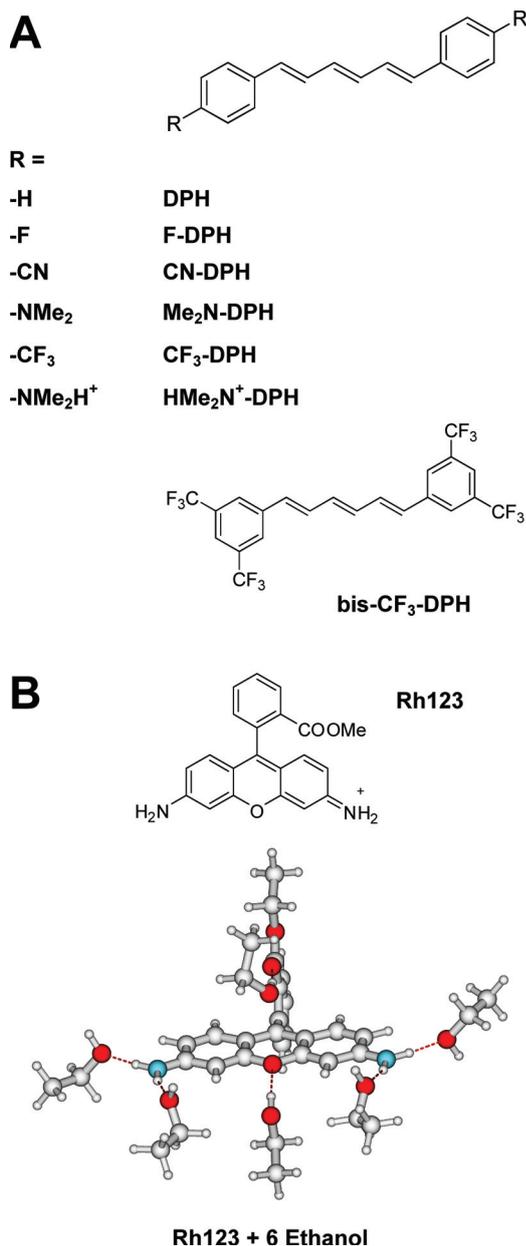
tion energy of radical ions in a complex and (II) the effects of ion solvation. Because the investigated electron transfer reactions start with Rhodamine 123 (**Rh123**) in its cationic ground state and end up with a cationic quencher molecule, we neglect  $\Delta G^0(\epsilon)$  describing the solvation and the Coulomb interactions of the solvent-separated ion pair. Moreover, it is likely in protic solvents that proton-coupled reactions occur, which increase the feasibility of quenching.<sup>31</sup> The driving force for triplet quenching by redox processes is always smaller than the one for the singlet case, because the excitation energy  $\Delta E_{\text{n}0}$  is smaller for the triplet case (eq 1, Figure 1, and Tables 1 and 3). Thus selective triplet quenching by this mechanism is impossible.

Carotenoids with 11–13 conjugated double bonds are present in photosynthetic centers.<sup>32</sup> Besides functioning as antenna complexes, they are known to quench the  $T_1$  state of chlorophylls selectively, which otherwise would be an efficient sensitizer for singlet oxygen. However, for our purpose of quenching the triplet population of fluorescence dyes, these long-chained carotenoids are not suited because their optically bright  $1^1B_u^+$  state ( $S_2$  or  $S_3$ ) is low-lying. In addition, a dipole-forbidden transition to the  $S_1$  state ( $2^1A_g^- \leftarrow 1^1A_g^-$ ) takes place in the low-energy regime.<sup>33–35</sup> This dark  $2^1A_g^-$  state might be involved in undesired singlet quenching. Possible candidates with the desired quenching properties are carotenoids with shorter conjugation lengths. Here, aromatic pseudocarotenoids were investigated because these systems allow us to easily adjust the electronic properties by changing the substituents of the aromatic system.

For this purpose, a small library of diphenylhexatrienes (**DPHs**) with different electronic properties was synthesized (Figure 2A). Electron-donating and electron-withdrawing groups were introduced into the aromatic system in order to create compounds that were either (I) electron-rich [(*all-E*)-1,6-bis-[4-(dimethylamino)phenyl]hexa-1,3,5-triene (**Me<sub>2</sub>N-DPH**)],<sup>37,38</sup> (II) neutral [(*all-E*)-1,6-diphenylhexa-1,3,5-triene (**DPH**)],<sup>37,39,40</sup> or (*all-E*)-1,6-bis-(4-fluorophenyl)hexa-1,3,5-triene (**F-DPH**)],<sup>39,41–44</sup> or (III) electron deficient [(*all-E*)-1,6-bis-[4-(trifluoromethyl)phenyl]hexa-1,3,5-triene (**CF<sub>3</sub>-DPH**)],<sup>45</sup> (*all-E*)-1,6-bis-(4-cyanophenyl)-hexa-1,3,5-triene (**CN-DPH**)],<sup>37</sup> or (*all-E*)-1,6-bis-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]hexa-1,3,5-triene (**bis-CF<sub>3</sub>-DPH**)]. The electronic structures of these **DPHs** were determined using theoretical methods, the photophysical and electrochemical properties of the compounds were investigated, and their ability to selectively quench the triplet state was measured.

## 2. Experimental Procedures and Computational Details

**2.1. Compounds.** The details of the synthesis and the analytical characterization of all products are given in the Supporting Information (SI, Section 1). In order to synthesize the desired compounds, we chose a strategy starting from substituted benzaldehydes and (*E*)-tetraethyl but-2-ene-1,4-diylidiphosphonate.<sup>40</sup> As a typical example, we describe the synthesis of **bis-CF<sub>3</sub>-DPH**. (*E*)-Tetraethyl but-2-ene-1,4-diylidiphosphonate (1.62 g, 4.93 mmol) was dissolved in 40 mL of dry tetrahydrofuran (THF). A 60% dispersion of sodium hydride in mineral oil (0.39 g, 9.8 mmol) was added with 10 mL of dry THF, and the mixture was stirred at room temperature for 30 min. To this mixture a solution of 2.73 g (11.3 mmol) of 3,5-bis(trifluoromethyl)benzaldehyde in 40 mL of dry THF was added dropwise over 5 min, and the mixture was stirred for another 30 min. A second dose of a 60% dispersion of sodium hydride in mineral oil (0.37 g, 9.3 mmol) was added with 10 mL of dry THF, and the mixture was stirred for 3 d at room temperature. Hydrolysis with 75 mL water causes the crude

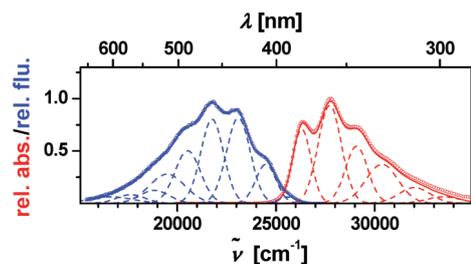


**Figure 2.** (A) Structures of **DPH** derivatives and (B) the **Rh123** structure<sup>36</sup> with six ethanol molecules.

product to precipitate, which was again solved in a little acetone and precipitated once more by adding hexane. Yield: 180 mg (7%). The absorption and fluorescence spectrum including a multi Gauss analysis are shown in Figure 3.

**Rh123** was purchased from Sigma Aldrich (R8004) and used as received. Solutions of **DPHs** in ethanol were prepared freshly and kept in the dark to avoid the photoinduced isomerization to a *cis*-isomere of the polyene.

**2.2. Calculations.** For the **DPHs** the valence triple- $\zeta$  basis set with (d) polarization function on all non-hydrogen atoms and (p) polarization function on hydrogen (TZVP)<sup>46</sup> was used. Test calculations on **Rh123** showed that excitation energies changed only marginally when the atomic orbital basis set was reduced to the less demanding split valence basis set with (d) polarization function on all non-hydrogen atoms (SV(P)).<sup>46</sup> For reasons of computer efficiency all calculations on **Rh123** were therefore carried out in the smaller SV(P) basis. The ground state geometries were determined using Kohn–Sham density functional theory (DFT)<sup>47</sup> with Becke’s three-parameter (B3LYP)



**Figure 3.** Absorption (red) and fluorescence (blue) spectra in THF (circles) and multi-Gauss analysis of the vibrational structure for **bis-CF<sub>3</sub>-DPH**. The resulting fits are given as solid lines; the individual Gauss curves are given as dashed lines.

exchange hybrid functional<sup>48</sup> and the correlation functional of Lee, Yang, and Parr.<sup>49</sup> Time-dependent density functional theory (TDDFT)<sup>50</sup> was employed for the <sup>1</sup>B<sub>u</sub> excited state geometry optimization of the **DPHs** and the S<sub>1</sub> state of **Rh123**. Unrestricted density functional theory (UDFT) was utilized for determining the minimum structures in the corresponding T<sub>1</sub> states. All geometry optimizations were performed with the TURBOMOLE 5.7 program package.<sup>51,52</sup> Solvent effects were taken into account only in case of the cationic dyes. To this end, explicit solvent molecules and a conductor-like screening model (COSMO) were employed.<sup>53</sup> The combined density functional theory/multireference configuration interaction (DFT/MRCI) method by Grimme and Waletzke<sup>54</sup> was used for single-point energy calculations at the obtained (TD)DFT equilibrium geometries. Recently, this method was shown to yield the correct order of excited states in  $\alpha,\omega$ -diphenylpolyenes<sup>55</sup> and  $\beta$ -carotenes.<sup>56</sup>

The technical parameters of the MRCI calculations were as follows. The 1s shells of all non-hydrogen atoms were kept frozen in the electron correlation treatments. The MRCI reference space was determined iteratively. The initial set was spanned by all single and double excitations from the five highest occupied molecular orbitals (HOMOs) to the five lowest unoccupied orbitals (LUMOs) of the ground state Kohn–Sham determinant. The final reference space consisted of all configurations that contributed with a squared coefficient of at least 0.003 to one of the six lowest roots in either the A<sub>g</sub> or B<sub>u</sub> irreducible representations (C<sub>2v</sub>-symmetric molecules), the six lowest roots in either the A<sub>g</sub> or A<sub>u</sub> irreducible representations (C<sub>7</sub>-symmetric molecules), or the 12 lowest roots (asymmetric molecules) in the first DFT/MRCI run.

The suitability of three different solvent models for describing the interaction between the **Rh123** chromophore and the solvent surrounding was tested at the ground-state geometry taking water as an exemplary solvent: (I) Microsolvation with six explicit water molecules that mimic the hydrogen bonds, (II) COSMO that accounts for the solvent polarity, and (III) a combination of I and II. It turned out that the red shifts brought about by COSMO alone (0.06 eV for S<sub>1</sub> and 0.08 eV for T<sub>1</sub>) are too small, whereas model I yields red shifts (0.15 eV for S<sub>1</sub> and 0.19 eV for T<sub>1</sub>) that are close to the solvent shifts (0.19 eV for S<sub>1</sub> and 0.23 eV for T<sub>1</sub>) obtained with our best model III. Moreover, model I has the advantage that it is applicable in excited state optimizations, too. We therefore chose model I for the calculation of the adiabatic singlet and triplet excitation energies of **Rh123** in ethanol solution (Figure 2B).

**2.3. Cyclic Voltammetry.** Redox potentials were determined by cyclic voltammetry (CV) in *N,N*-dimethylformamide (DMF). DMF (water-free, under nitrogen) was purchased from Aldrich. Tetra-*n*-butylammonium hexafluorophosphate (TBA PF<sub>6</sub>) was

used as received from Fluka and stored under argon. Dried argon was bubbled through the test solution for 15 min prior to and passed over the solution during the measurements. CV was performed with a potentiostat (Metrohm, AUTOLAB PGSTAT 20) and special software (GPES, Eco Chemie, version 4.9). The scan speed was 100 mV/s. A three electrode arrangement in a single cell was used for measurements: a thin Pt-sheet as the auxiliary electrode, a Ag/AgCl electrode as the reference electrode (Metrohm, 6.0726.100, 11040486), and a glassy carbon electrode (Metrohm, 6.1204.110) as the working electrode, which was polished with Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> powder in water after each measurement. The reference electrode was filled with 100 mM TBA PF<sub>6</sub> in acetonitrile. Ferrocene had an oxidation potential of 0.43 V against this reference electrode. As ferrocene has a half-wave potential of 0.69 V versus the normal hydrogen electrode (NHE), all reported potentials are cited against the NHE by adding 0.26 V to the measured ones. In electrochemical measurements, typical concentrations of the DPHs were 0.1–0.3 mM.

**2.4. Steady-State Spectroscopy.** All experiments were carried out at 25 °C in spectroscopic grade THF (nondegassed). Absorption spectra were recorded with a Varian-Cary 300 spectrometer. Fluorescence spectra were monitored with a Fluorolog-3 spectrometer (Jobin Yvon). To exclude polarization effects, the fluorescence of the probe was observed in a conventional 90° setup with a polarizer set to the magic angle (54.7°). For the measurements of the fluorescence quantum yields, the spectra were corrected for wavelength-dependent spectral sensitivity.

**2.5. Fluorescence Correlation Spectroscopy.** FCS was carried out with a confocal epi-illuminated microscope similar to that described before.<sup>15</sup> The fluorescent molecules are excited by a linearly polarized argon-ion-laser (Melles-Griot 35LAP431–230) at 496 nm in cw mode. The laser is focused into the sample by a water-immersion objective lens (UPLAPO 60 NA = 1.2, Olympus, Hamburg, Germany). In all measurements, the focal plane was 50 μm away from the coverslip. The fluorescence is collected by the same objective, separated from the excitation by a polychroic beam splitter (498 DCLP, AHF, Tübingen, Germany), and is detected by two avalanche photodiodes (Micro-Photon-Devices, PDM 50CT; Picoquant Berlin, Germany) in a beam splitting arrangement to eliminate dead time and afterpulsing artifacts. Fluorescence band-pass filters (HQ 533/46, AHF) block residual light and reduce Raman scattering from the solvent. A confocal pinhole of 80 μm diameter yields a characteristic diffusion time of 140 μs for **Rh123** in water. The signals of the two detectors are processed by a hardware correlator (ALV-5000, ALV-Laser, Langen, Germany). The measured correlation curves are fitted to different expressions for the FCS curves as stated, using a Levenberg–Marquardt nonlinear least-squares algorithm.

All measurements were performed in ethanol (Uvasol, Merck) at room temperature (20 ± 1 °C). To adjust the triplet lifetime, the solutions were purged with an O<sub>2</sub>–N<sub>2</sub> gas mixture with an oxygen content of approximately 0.1%.

### 3. Theory of Fluorescence Correlation Spectroscopy

FCS analyzes spontaneous fluorescence intensity fluctuations of fluorescent molecules excited in a focused beam with the correlation time  $t_c$ .<sup>57–59</sup> This fluctuation may be caused by a broad range of dynamic processes at the molecular level: changes in concentration of a fluorophore due to translation diffusion of the fluorescent molecules into and out of the sample volume element and changes in the excited singlet- or triplet-

state population. The time-dependent parts of the normalized correlation function can then be expressed as<sup>60</sup>

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N_F} \left( \frac{1}{1 + t_c/t_d} \right) \left( \frac{1}{1 + (\omega_0/z_0)^2 t_c/t_d} \right)^{1/2} \times \\ (1 - T_{eq} + T_{eq} \cdot e^{-t_c/t_T} - R_{eq} + R_{eq} \cdot e^{-t_c/t_R}) \quad (2)$$

$N_F$  is the mean number of fluorescent molecules within the sample volume element. The molecule detection function (MDF) is approximated by a three-dimensional Gauss distribution of the detected fluorescence with radial and axial  $1/e$  radii of  $\omega_0$  and  $z_0$ , respectively. The characteristic diffusion time  $t_d$  for the fluorescent molecules is related to the translational diffusion coefficient  $D$  by  $D = \omega_0^2/4t_d$ . Two bunching terms are possible: (I) the triplet bunching term is always needed, where  $T_{eq}$  is the mean fraction of fluorophores within the sample volume element being in their triplet states and  $t_T$  is the relaxation time of the triplet state, and (II) in case of radical formation a second bunching term is needed,<sup>8</sup> where  $R_{eq}$  is the mean fraction of fluorophore radicals and  $1/t_R$  is the radical relaxation rate given by the sum of rates for formation and decay of the radical. At low irradiances typical parameters of the MDF for **Rh123** in ethanol are as follows for the used O<sub>2</sub>–N<sub>2</sub> gas mixture:  $z_0/\omega_0 = 5.3$  and  $t_d = 240 \mu\text{s}$ . These parameters were left free in the fits of the data sets for a power series to compensate increasing optical saturation, which distorts the MDF.<sup>15,61</sup> As expected, both parameters increase significantly with rising irradiance and depend on the solvent as well as the degree of deoxygenation.

In the presence of micromolar concentrations of triplet quenchers [ $Q$ ] and making the simplifying assumption of a uniform excitation profile within the detection volume, the expressions for  $T_{eq}$  and  $t_T$  are given by<sup>15,60,62</sup>

$$T_{eq} = \frac{k_{ISC}k_{01}}{(k_{ISC} + k_T')k_{01} + k_T'k_0} \quad (3)$$

$$t_T = \frac{k_{01} + k_0}{(k_{ISC} + k_T')k_{01} + k_T'k_0} \quad (4)$$

Considering a photophysical model with the three states  $S_0$ ,  $S_1$ , and  $T_1$ ,  $k_0$  is the deactivation rate of the first excited singlet state  $S_1$  to the ground singlet state  $S_0$ .  $k_{ISC}$  refers to the rate of intersystem crossing from  $S_1$  to the lowest triplet state  $T_1$  and  $k_T'$  is the effective rate of triplet state deactivation. The average excitation rate within the detection volume element depends on the average excitation intensity within the detection volume  $I_0/2$  and is given by  $k_{01} = \sigma_{01}(\lambda)\gamma I_0/2$ , where  $\sigma_{01}$  is the excitation cross section,  $\lambda$  is the excitation wavelength, and  $\gamma = \lambda/(hc)$  is the reciprocal photon energy, with  $h$  being Planck's constant and  $c$  being the velocity of light. The average intensity  $I_0/2$  is determined by  $I_0/2 = P/(\pi\omega_0^2)$ , where  $P$  is the laser intensity measured with a power meter.

The triplet quenchers with the bimolecular quenching constant  $k_{qT}$  influence the triplet deactivation by

$$k_T' = k_T + k_{qT}[Q] \quad (5)$$

where  $k_T$  is the effective rate of triplet state deactivation without quencher. The fluorescence count rate per molecule  $F_{cpm}$  is computed by normalizing the measured fluorescence signal  $F$

**TABLE 1: Computed Energies of Various DPHs in the Gas Phase in Electron Volts**

	vertical excitation at S <sub>0</sub> minimum <sup>a</sup>				adiabatic excitation <sup>b</sup>		vertical excitation at S <sub>1</sub> minimum <sup>c,d</sup>	
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>	T <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>
	B <sub>u</sub> /A <sub>u</sub>	A <sub>g</sub>	B <sub>u</sub> /A <sub>u</sub>	A <sub>g</sub>	B <sub>u</sub> /A <sub>u</sub>	B <sub>u</sub> /A <sub>u</sub>	A <sub>g</sub>	B <sub>u</sub> /A <sub>u</sub>
<b>DPH</b>	3.34	3.51	1.81	2.85	3.10	1.39	2.79	2.94
<b>CF<sub>3</sub>-DPH</b>	3.28	3.46	1.77	2.80	3.06	1.37	2.75	2.90
<b>Me<sub>2</sub>N-DPH</b>	3.01	3.28	1.71	2.63	2.81	1.33	2.69	2.68
<b>F-DPH</b>	3.36	3.52	1.81	2.85	3.13	1.40	2.81	2.97
<b>CN-DPH</b>	3.05	3.26	1.69	2.64	2.84	1.31	2.60	2.69
<b>bis-CF<sub>3</sub>-DPH</b>	3.29	3.46	1.77	2.78	3.06	1.37	2.75	2.92
<b>HMe<sub>2</sub>N<sup>+</sup>-DPH</b>	3.18	3.43	1.75	2.79	2.97	1.36	2.80	2.84

<sup>a</sup> Comparable to the experimental absorption maximum (see Figure S5 and Table S1, SI). <sup>b</sup> Comparable to the 0–0 transition obtained from Gauss analysis of the experimental data (see Figure S5 and Table S1, SI). <sup>c</sup> Comparable to the experimental fluorescence maximum (see Figure S5 and Table S1, SI). <sup>d</sup> Except for **Me<sub>2</sub>N-DPH**, the order of the S<sub>1</sub> and S<sub>2</sub> states is reversed at this geometry.

**TABLE 2: Experimental Energies of the Spectra of Various DPHs Measured in THF**

	absorption				fluorescence	
	$\epsilon$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ] <sup>a</sup>	$f$ (L) <sup>b</sup>	$\Delta E_{\max}$ [eV] <sup>c</sup> ( $\lambda_{\max}$ [nm])	$E_{0,0}$ [eV] <sup>d</sup>	$\Delta E_{\max}$ [eV] <sup>c</sup> ( $\lambda_{\max}$ [nm])	$\Phi_F$ <sup>c</sup>
<b>DPH</b>	78 200	2.18	3.48(356)	3.30	2.73(455)	0.64
<b>CF<sub>3</sub>-DPH</b>	67 600	2.20	3.44(361)	3.26	2.86(434)	0.11
<b>Me<sub>2</sub>N-DPH</b>	69 300	2.49	3.06(408)	2.94	2.55(487)	0.33
<b>F-DPH</b>	59 200	2.11	3.50(354)	3.32	2.74(452)	0.58
<b>CN-DPH</b>	42 800	2.50	3.28(378)	3.09	2.74(453)	0.29
<b>bis-CF<sub>3</sub>-DPH</b>	62 300	2.08	3.44(360)	3.26	2.86(433)	0.08

<sup>a</sup> Extinction coefficients in ethanol. <sup>b</sup> Oscillator strengths obtained from DFT-MRCI calculations. <sup>c</sup> Maximum of the absorption/fluorescence spectra and fluorescence quantum yields in THF. The quantum yield of **DPH** was taken from literature and used as reference standard for the determination of the fluorescence quantum yields.<sup>64</sup> <sup>d</sup> Energy of the singlet state taken from the 0,0-transition from the multi-Gauss analysis (see Figure S5 and Table S1, SI).

to the total number of molecules  $N = N_F/(1 - R_{\text{eq}} - T_{\text{eq}})$  by taking the triplet fraction  $T_{\text{eq}}$  and the radical fraction  $R_{\text{eq}}$  into account:

$$F_{\text{cpm}} = \frac{F}{N_F}(1 - R_{\text{eq}} - T_{\text{eq}}) \quad (6)$$

## 4. Results and Discussion

**4.1. Energies and Spectra. Singlet States of DPHs.** Computed vertical excitation energies of all **DPHs** at their respective ground state geometries are collected in Table 1.

According to the calculations, the first excited singlet state is the <sup>1</sup>B<sub>u</sub> state (<sup>1</sup>A<sub>u</sub> in the lower symmetric **Me<sub>2</sub>N-DPH**) in the vertical absorption spectra of most compounds. It is mainly characterized by a single excitation from the HOMO to the LUMO. Geometry relaxation in the excited singlet state leads to an equalization of C–C bond lengths in the chain, similar to the situation in *all-E*-hexatriene.<sup>44</sup> For details, see Figure S4 of the SI.

The transition from the electronic ground state exhibits large oscillator strength  $f$  (2.1–2.5, see Table 2). The computed vertical excitation energy should be comparable to the Franck–Condon maximum of the corresponding experimental absorption spectrum.

The absorption and fluorescence spectra for all **DPHs** except **Me<sub>2</sub>N-DPH** are very similar (see Figures 3 and S5). Multi-Gaussian fits (full lines, Figures 3 and S5) were performed to characterize the spectral features of all spectra and the corresponding Stokes shifts. The progression of the lower vibronically excited states is about 1400 cm<sup>-1</sup> for all **DPHs** (see Table S1, SI). This value is typical for polyenes and averages two different vibrational modes at 1600 cm<sup>-1</sup> (C=C stretch) and 1200 cm<sup>-1</sup> (C–C stretch), which cannot be resolved in solution.<sup>63</sup> The

progression becomes smaller for higher excited states. The UV–vis absorption and fluorescence spectra show only a minute Stokes shift of approximately 600 ± 200 cm<sup>-1</sup>. All experimental spectral properties are summarized in Table 2 (for a detailed discussion, see sections 2.2 and 2.3 of the SI).

The calculated vertical absorption energies are in good agreement with the maximum of the absorption spectrum. It should be noted, however, that the good agreement between theory and experiment is somewhat fortuitous. Benchmark calculations on linear polyenes and  $\alpha,\omega$ -diphenyl-polyenes<sup>55</sup> have shown that our theoretical approach systematically underestimates the electronic excitation energies of these compounds in the gas phase. This error is partially compensated by solvent effects, which are known to be strong for the <sup>1</sup>B<sub>u</sub> ← <sup>1</sup>A<sub>g</sub> transition in **DPH**.<sup>65</sup>

Substitution in *para* or *meta* positions of the phenyl rings by CF<sub>3</sub> groups (**CF<sub>3</sub>-DPH**, **bis-CF<sub>3</sub>-DPH**) is found to have only minor effects on the electronic spectrum, but changes the redox potential significantly (see Table 3 below). In contrast, dimethylamination of **DPH** in *para* position (**Me<sub>2</sub>N-DPH**) or introduction of a cyano group (**CN-DPH**) in this position has a large influence on the spectral properties. Both types of substitution lead to an effective increase of the conjugation lengths and a red shift of the absorption maximum. The obtained data (Table 2, Figure S5 in the SI) show that the trends observed for the vertical and adiabatic absorption energies of the compounds are reproduced well by our theoretical approach. On the average, the calculated vertical absorption energies are too small by 0.1 to 0.15 eV, only for **CN-DPH** is the error 0.2 eV. For the adiabatic transitions, errors are slightly larger.

**Singlet States of Rh123.** Considering the fluorophore **Rh123** in vacuum, vertical excitation energies for absorption  $E_{S,\text{vac}}(^1F_1 \leftarrow ^1F_0) = 2.70$  eV and fluorescence  $E_{S,\text{vac}}(^1F_1 \rightarrow ^1F_0) = 2.60$  eV were computed. However, since rhodamines are highly

**TABLE 3: Measured Oxidation and Reduction Potentials and the Estimated Standard Free Energy of the Reductive Electron Transfer by Eq 1 between Quencher and the  $S_1$ ,  $T_1$  and Radical Cation State  $R^{+\cdot}$  of Rh123 in Ethanol<sup>a</sup>**

quencher	[V] vs NHE		$\Delta G_{ET}$ [eV] reduction of <b>Rh123</b>			$k_{qT}$ [ $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]
	$E_{ox}^b$	$E_{red}^b$	$S_1$	$T_1$	$R^{+\cdot}$	
<b>Me<sub>2</sub>N-DPH</b>	0.57 <sup>#</sup>	-1.92	-1.23	-0.72	-0.64	$6 \pm 1^c$
<b>F-DPH</b>	1.26	-1.73	-0.54	-0.03	0.05	$2.9 \pm 0.3$
<b>DPH</b>	1.28	-1.71	-0.52	-0.01	0.07	$4.9 \pm 0.6$
<b>CF<sub>3</sub>-DPH</b>	1.42	-1.50	-0.38	0.13	0.20	$2.5 \pm 0.2$
<b>CN-DPH</b>	1.42	-1.29 <sup>#</sup>	-0.38	0.13	0.20	n.d.
<b>bis-CF<sub>3</sub>-DPH</b>	1.52	-1.44	-0.28	0.23	0.30	$2.1 \pm 0.7$

<sup>a</sup> All oxidative processes were estimated to be  $\Delta G_{ET} > 0$ . For the calculation of the redox potentials of Rh123,  $E_{ox} = 1.21$  V vs NHE and  $E_{red} = -0.61$  V vs NHE, and the energies of the  $S_1$  and the  $T_1$  state,  $E_S = 2.41$  eV and  $E_T = 1.90$  eV were used. The contribution of the Coulomb term is assumed to be negligible. The estimated errors for the measured potentials are  $<0.05$  V. The precision for the quenching rates corresponds to the statistical error of the linear fit for the slope (eq 5). The accuracy (systematic error) is mainly due to errors in the determination of the quencher concentration via UV/vis absorption spectroscopy using the extinction coefficients in Table 2 ( $<5\%$ ). <sup>b</sup> All peaks were irreversible unless they are indicated with a number sign (#). <sup>c</sup> Estimated quenching rate due to additional dark state; see section 4.3.

polar molecules, a distinct solvent effect is expected. Complexation by six explicit ethanol molecules (Figure 2B, solvation model I) results in a reduction of the energies to  $E_{S,solv}(^1F_1 \rightarrow ^1F_0) = 2.44$  eV (508 nm) and  $E_{S,solv}(^1F_1 \rightarrow ^1F_0) = 2.32$  eV (534 nm), respectively. These calculated transition energies of **Rh123** in ethanol agree nicely with the experimental energies for the maximum absorption and fluorescence,  $\Delta E_A = 2.43$  eV (511 nm) and  $\Delta E_F = 2.34$  eV (530 nm), respectively.

**Triplet States of DPHs.** In the **DPH** derivatives two triplet states  $T_1(B_u/A_u)$  and  $T_2(A_g)$  are found below  $S_1$  (see Table 1). As for  $S_1$ , the electronic structure of  $T_1$  is mainly characterized by a single excitation from the HOMO to the LUMO. However, unlike  $S_1$ , geometry relaxation in the first excited triplet state leads to an inversion of single and double bonds in the chain, as observed previously for *all-E*-hexatriene<sup>55</sup> (for details see SI Section 2.1 and Figure S4). Within the accuracy of our computational method, the vertical  $T_1$  excitation energy  $E_T(^3Q_1 \leftarrow ^1Q_0) = 1.76 \pm 0.05$  eV is the same for all **DPHs**. This applies also to the adiabatic energy  $E_T(^3Q_1 \rightarrow ^1Q_0) = 1.36 \pm 0.04$  eV. Experimental values for the triplet energies  $E_T$  of the parent compound **DPH** are available from energy transfer experiments in solution ( $E_{T,solv} = 1.47-1.54$  eV).<sup>66-68</sup> As the computed energies agree satisfactorily with experimental values, we assume that the accuracy of these triplet calculations is as good as the ones for absorption and fluorescence of the singlet states. It is noteworthy that the effect of substituents on the adiabatic excitation energy of the  $T_1$  state is much less pronounced than in the singlet case.

**Triplet State of Rh123.** The vertical triplet excitation energy  $E_T(^3F_1 \leftarrow ^1F_0)$  of **Rh123** at the  $S_0$ -geometry was computed to 2.14 eV in vacuum and to 1.86 eV in ethanol. Similar to the singlet case, the formation of hydrogen bonds causes a substantial red shift of the excitation wavelength. At the triplet minimum geometry, a vertical emission energy of 2.02 eV (vacuum) and 1.76 eV (ethanol) is obtained. The calculated adiabatic  $^3F_1$  emission energy in ethanol solution (solvation model I) amounts to 1.82 eV. No experimental values have been reported for the triplet energy of **Rh123**. However, experimental triplet data (maximum of the phosphorescence spectrum,  $\Delta E_p = 1.90$  eV (651 nm)<sup>69,70</sup>) are available for the related derivative Rhodamine 110 (**Rh110**), where the carboxyphenyl residue is not esterified. We expect very similar molecular energies because the maxima of the absorption and fluorescence spectra of **Rh123** are only slightly red-shifted by 1 to 2 nm with respect to **Rh110** (maxima of singlet absorption,  $\Delta E_A = 2.43$  eV (510 nm); fluorescence,  $\Delta E_F = 2.35$  eV (528 nm)). Comparison of the experimental values for **Rh110** with our computed excitation energies for **Rh123** shows that

our DFT/MRCI results slightly underestimate the true excitation energies but are in the right ballpark, in line with general trends observed for this method.<sup>71</sup>

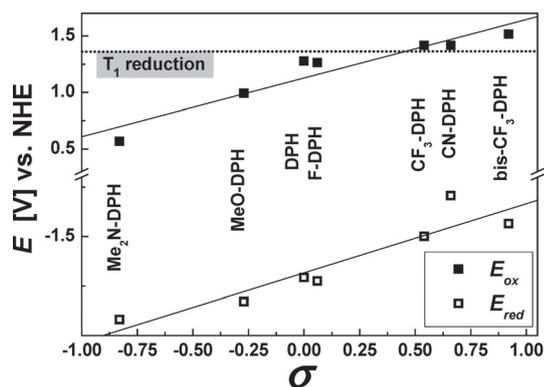
**Free Energies for Energy Transfer Reactions.** In order to avoid singlet quenching of a fluorophore by SEET (see Figure 1B), the condition  $E_S(F) < E_S(Q)$  must be fulfilled for the singlet energies. This condition is met even for the quencher **Me<sub>2</sub>N-DPH** with the most red-shifted absorption maximum, for which  $E_S(^1Q_1 \leftarrow ^1Q_0)$  was measured to be 3.01 eV, i.e. SEET of **Rh123** to any of these **DPHs** is endergonic. For our **DPHs**, the optically dark  $2^1A_g$  state, which constitutes the first excited singlet state in longer carotenes, is located slightly above the  $1^1B_u/1^1A_u$  state at the ground-state geometry.

The condition for efficient triplet quenching of **Rh123** by TEET (see Figure 1B),  $E_T(F) > E_T(Q)$ , is fulfilled by all **DPHs**, and the spectral overlap between donor and acceptor should be good.

**4.2. Redox Properties.** To judge whether photoinduced electron transfer reactions can be a relevant quenching pathway, the oxidation and reduction potentials,  $E_{ox}$  and  $E_{red}$ , of the **DPHs** were measured by CV in anhydrous DMF. The obtained potentials are compiled in Table 3. Typical cyclic voltammograms of all **DPHs** are shown in Figure S6 (SI). Moreover, the standard free energy changes of the electron transfer reaction  $\Delta G_{ET}$  of a **DPH** quencher with **Rh123** in its  $S_1$ ,  $T_1$ , or radical cation state  $R^{+\cdot}$  are given to check its energetic feasibility. The reaction with  $R^{+\cdot}$  also has to be considered, because it can be formed by two-step photolysis at very high irradiances.<sup>15</sup> The species-specific  $\Delta G_{ET}$  values were calculated by the Rehm–Weller eq 1 using the redox potentials and the excited state energies of the involved states of **Rh123**.<sup>31</sup>

Even though most redox reactions are electrochemically irreversible, the good linear correlation of the peak potentials with the Hammett  $\sigma$  coefficients<sup>72</sup> for the substituents of the aromatic **DPH** ring system support the interpretation that these potentials indeed reflect one-electron oxidation and reduction properties (Figure 4). Both the oxidation and the reduction potentials are reduced by electron donating groups (**Me<sub>2</sub>N-DPH**) and increased by electron withdrawing groups (**CF<sub>3</sub>-DPH**, **CN-DPH**, **bis-CF<sub>3</sub>-DPH**). The dotted line in Figure 4 indicates the substituent-specific feasibility for a triplet state reduction of **Rh123**. Quenchers with oxidation potentials that drop below this limit are able to quench the triplet state of **Rh123** by electron transfer.

All oxidizing processes of the excited states  $S_1$ ,  $T_1$ , and the photo-oxidized state  $R^{+\cdot}$  of **Rh123** are estimated to be endergonic ( $\Delta G_{ET} > 0$ ). Therefore, only the free energies of the reduction reactions of those states are given in Table 3. By



**Figure 4.** Oxidation and reduction potentials measured in DMF were plotted versus the Hammett coefficients. The linear relationship between the potentials and the Hammett coefficients is given by  $E_{\text{ox}} = 1.13 + 0.52 \times \sigma$  and  $E_{\text{red}} = -1.68 + 0.35 \times \sigma$ . The dotted line indicates the feasibility of the triplet state reduction of **Rh123**. Quenchers with oxidation potentials that drop below this limit are able to quench the triplet state of **Rh123** by electron transfer. In order to complete the Hammett plot on the side of the electron donating groups an additional methoxy-substituted **DPH** (**MeO-DPH**) ( $E_{\text{ox}} = 0.99$  V vs NHE,  $E_{\text{red}} = -1.83$  V) with a  $\sigma$  value of  $-0.27$  was measured. For further details, see SI.

introducing more electron withdrawing groups the quenching of the reduction reactions becomes less favorable. In order to avoid reduction of the  $S_1$  state of **Rh123** completely, even more electron deficient **DPHs** would be necessary. The  $T_1$  state of **Rh123** is expected to be also quenched effectively by electron transfer especially by **Me<sub>2</sub>N-DPH** (dotted line for  $\Delta G_{\text{ET}} = 0$  in Figure 4), whereas **bis-CF<sub>3</sub>-DPH** should not quench via electron transfer but still via TEET (for more discussions, see section 4.3).

**4.3. Fluorescence Correlation Spectroscopy Measures Triplet Quenching.** As the solubility of **DPHs** in water is very low, we studied them in ethanol. Because of the high solubility of the triplet quencher oxygen in ethanol, the rate constant for triplet relaxation  $k_T$  of **Rh123** is large, which results in a very low stationary triplet population in air-saturated solution. Therefore we bubbled the sample solution with a premixed  $O_2-N_2$  gas mixture, so that the oxygen concentration is reduced from 20% (air) to approximately 0.1%. To determine triplet parameters by FCS using eqs 2–4, a series of correlation curves at different mean irradiances  $I_0/2$  was measured.

**DPH.** Varying the irradiance, a typical set of correlation curves is displayed in Figure 5A for **Rh123** in the presence of the quencher **DPH** at a concentration of  $15.3 \mu\text{M}$ .

The analysis of correlation curves by eq 2 shows by equally distributed residuals that a diffusion term with the time  $t_d$  and a single triplet bunching term with the relaxation time  $t_T$  are sufficient to describe the data at low and medium irradiances. **DPH** is indeed a triplet quencher of **Rh123**, because the triplet amplitude  $T_{\text{eq}}$  (Figure 5C) and triplet time  $t_T$  decrease with increasing **DPH** concentration (Figure 5D). Global analysis of  $T_{\text{eq}}$  and  $t_T$  by eq 3 and 4 allowed us to compute  $k_{\text{ISC}}$  and  $k_T'$  for different **DPH** concentrations. Figure 5E shows that  $k_T'$  depends linearly on the **DPH** concentration as expected by eq 5, whereas  $k_{\text{ISC}}$  is independent of the quencher concentration  $[Q]$ . The determination of the slope yields a triplet quenching constant  $k_{\text{qT}}$  of **DPH** =  $4.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , which is close to the diffusion controlled value  $k_{\text{diff}} = 5.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .<sup>66</sup> It is important to note that  $k_{\text{ISC}}(0.1\% \text{ O}_2) = 2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$  is 4.5 times smaller than  $k_{\text{ISC}}(\text{air})$ . In agreement with previous findings,<sup>14,73–75</sup> this indicates that, for **Rh123** oxygen enhanced ISC, there is also

an important fluorescence quenching pathway that leads to the formation of reactive singlet oxygen.

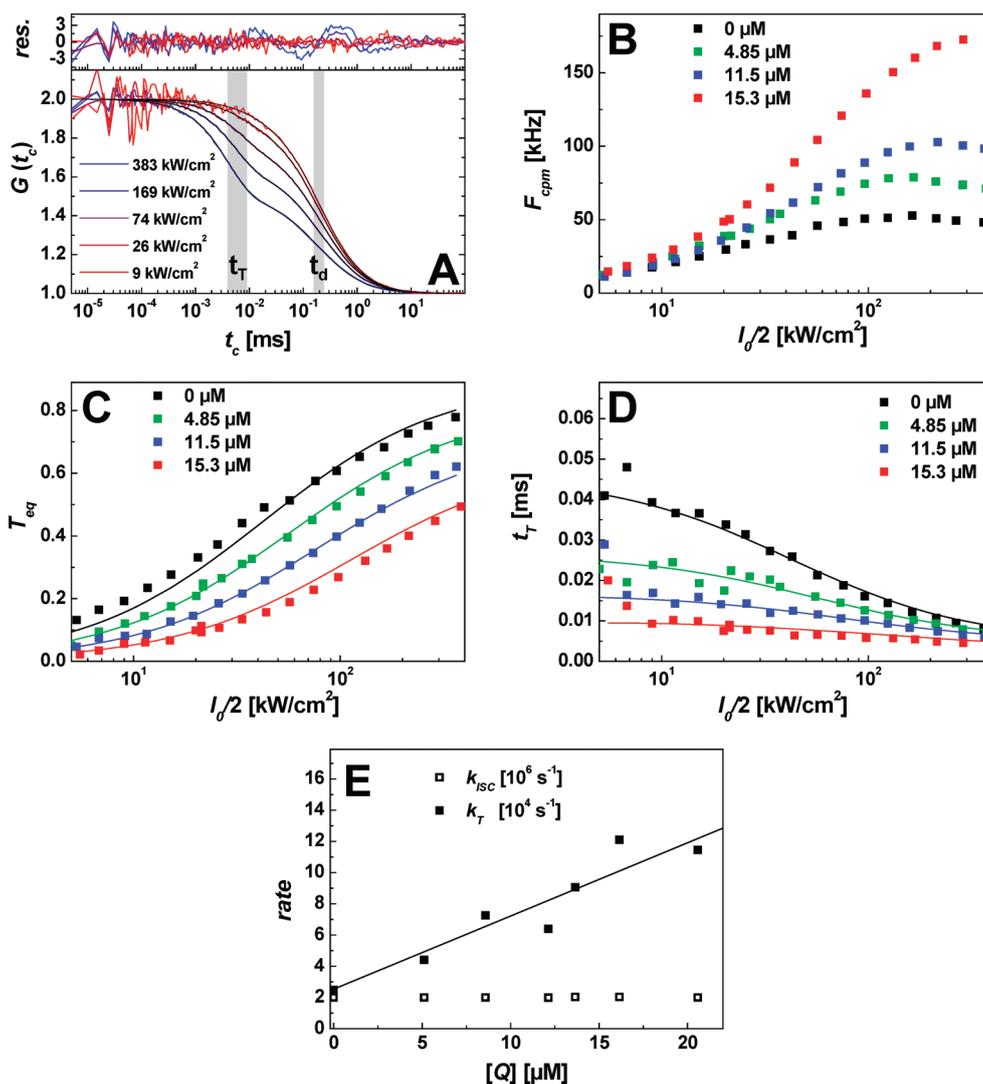
To discuss the distinct quenching effects on the  $T_1$  and  $S_1$  state, it is useful to define a quantum yield for quenching of the individual state  $X$  by  $\Phi_{\text{qX}} = (k_{\text{qX}} [Q]) / (k_X + k_{\text{qX}} [Q])$ . Here  $k_X$  is the inherent rate constant for the state deactivation, and  $k_{\text{qX}}$  is the bimolecular quenching constant. Considering a quencher with diffusion controlled  $k_{\text{diff}}$  at a concentration  $[Q] = 10 \mu\text{M}$  and the distinct  $S_1$  and  $T_1$  lifetimes of **Rh123** with  $1/k_0 = 4 \text{ ns}$  and  $1/k_T = 40 \mu\text{s}$ , the quantum yield of singlet quenching  $\Phi_{\text{qS}} = 0.02\%$  is more than 3000 times smaller than the quantum yield of triplet quenching  $\Phi_{\text{qT}} = 68\%$ . This selective quenching effect for **DPH** leads to a concomitant increase of the fluorescence count rate per molecule  $F_{\text{cpm}}$  (more than three times) and decrease of  $T_{\text{eq}}$  with increasing **DPH** concentration (Figure 5B and filled squares in Figure 6).

**Other DPHs.** In the following, we tested several substituted **DPHs** by FCS (**CF<sub>3</sub>-DPH** Figure S7, **F-DPH** Figure S8, **bis-CF<sub>3</sub>-DPH** Figure S9). The obtained triplet quenching constants  $k_{\text{qT}}$  are also listed in Table 3. Even if the limited accuracy (systematic error) may give errors of up to 5% and the precision (shot noise) is on average  $\pm 0.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , the difference of the quenching constants (approximately a factor of 2) is still significant and shows a systematic trend: The quenching constant decreases with increasing size or electronegativity of the **DPHs**. Moreover, considering size effects, the Smoluchowski equation predicts the opposite effect: the bimolecular quenching constant should rise and not decrease with increasing radius of the quencher; i.e., for the molecular dimensions of **Rh123** and the different **DPHs** (maximal radius increase 16%) an increase of  $k_{\text{qT}}$  of maximal 4.4% could be expected.

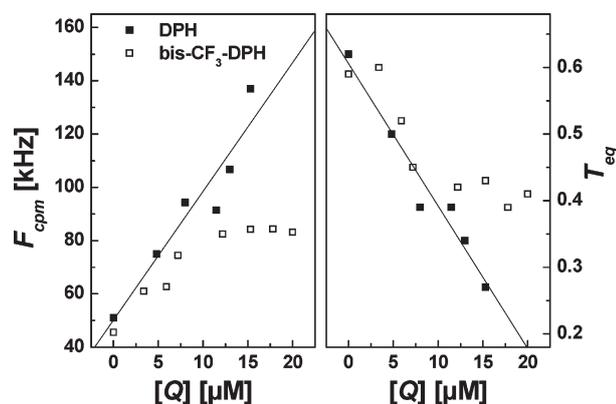
Another important aspect for applications as photoprotective agents is the solubility of triplet quenchers. In the case of **bis-CF<sub>3</sub>-DPH**, we observe a saturation of the beneficial effect above  $10 \mu\text{M}$ . Carotenoids and carotene derivatives are known to form complex aggregates in polar solvents already at low concentrations.<sup>76</sup> Therefore, in further studies, substituents should be used that improve the solubility of the **DPHs** in polar solvents or water.

**Effects of the Electron-Rich DPH: Me<sub>2</sub>N-DPH.** Figure 7A shows the FCS curves for **Rh123** in ethanol at a quencher concentration of  $8 \mu\text{M}$  **Me<sub>2</sub>N-DPH**. The correlation curves  $G(t_c)$  of **Rh123** measured in the presence of the quencher could not be described by eq 2 with a single bunching term. An additional bunching term is needed at a relaxation time of  $t_R = 77 \mu\text{s}$  with an amplitude  $R_{\text{eq}} = 0.30$ . Even though the decreased triplet amplitude  $T_{\text{eq}}$  indicates efficient triplet quenching (Figure 7B, upper panel,  $k_{\text{qT}} = 6 \pm 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), surprisingly a decrease in fluorescence signal  $F_{\text{cpm}}$  is observed (Figure 7B, lower panel). Considering the possible electron transfer pathways in Table 3, one expects the formation of **Rh123** free radical anions  $R^{*-}$  resulting from the reduction of the triplet state of the fluorophore by **Me<sub>2</sub>N-DPH**. As the oxygen concentration is low, this process produces another relatively long-lived dark state and competes with the beneficial effect of triplet quenching.

Next we changed the electron-donating dimethylamino groups in **Me<sub>2</sub>N-DPH** to electron-withdrawing quaternary ammonium groups to decrease the electron density of the quencher and thus to counteract its ability to reduce the  $T_1$  state of **Rh123**. At the same time, the solubility should be significantly increased. Using the Hammett  $\sigma$ -coefficient for  $\text{NH}_3^+$  ( $\sigma = 0.86$ ) and the relation of Figure 4, we are able to estimate  $E_{\text{ox}} = 1.58$  V vs NHE,



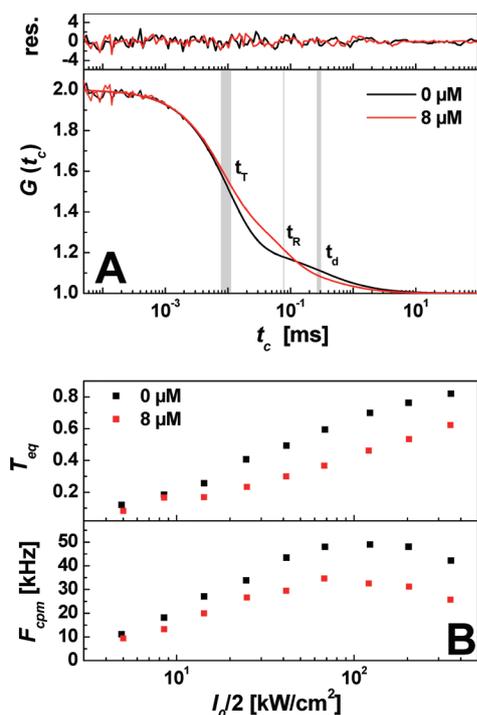
**Figure 5.** (A) Normalized correlation curves of **Rh123** in ethanol ( $[O_2] \sim 0.1\%$ ) with a quencher concentration of  $[Q] = 15.3 \mu\text{M}$  at different laser irradiances  $I_0/2$ . (B) Count rate per molecule  $F_{\text{cpm}}$ . (C,D) The parameters of the average molecule fraction in the triplet state  $T_{\text{eq}}$  and the triplet correlation time  $t_T$  according to eq 2 at 0, 4.85, 11.5, and 15.3  $\mu\text{M}$  **DPH** were plotted against the applied laser irradiance. The triplet parameters were fitted globally to eqs 3 and 4 to give  $k_{\text{ISC}}$  and  $k_T'$  for each concentration. (E) The slope of the observed triplet relaxation rates  $k_T'$  with the concentration is equal to the triplet quenching rate  $k_{\text{qT}} = 4.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .



**Figure 6.** Dependence of the fluorescence signal  $F_{\text{cpm}}$  and the triplet population  $T_{\text{eq}}$  of **Rh123** on the concentration of **DPH** (■) and **bis- $\text{CF}_3$ -DPH** (□) at a laser irradiance of  $I_0/2 = 100 \text{ kW/cm}^2$ .

which is similar to the potential of **bis- $\text{CF}_3$ -DPH** (see Table 3). Thus, no triplet quenching by electron transfer should be possible.

Two derivatives of **DPH** with quaternary ammonium groups have been studied (see Section 1, SI): (I) **Me<sub>2</sub>N-DPH** was dissolved in ethanol containing 1% sulfuric acid to give **HMe<sub>2</sub>N<sup>+</sup>-DPH** (*(all-E)*-1,6-bis-[4-(dimethylammonium)phenyl]hexa-1,3,5-triene bis hydrogen sulfate) (Figure S2, the acidic conditions do not affect the cationic dye **Rh123**). (II) An alkylated **DPH** with a quaternary ammonium group was synthesized (*(all-E)*-1,6-bis-[4-(ethyltrimethylammonium)phenyl]hexa-1,3,5-triene bis *p*-toluenesulfonate **EtMe<sub>2</sub>N<sup>+</sup>-DPH**) (Figure S3). It is noteworthy to mention that the specific spectral red shift in absorption of **Me<sub>2</sub>N-DPH** vanishes completely upon quaternization of the amino groups (see Figures S2 and S3). The resulting UV/vis absorption spectra are now identical to the other **DPHs**. Considering **HMe<sub>2</sub>N<sup>+</sup>-DPH**, the computed vertical T<sub>1</sub> energy for absorption  $E_T(^3Q_1 \leftarrow ^1Q_0) = 1.75 \text{ eV}$  does not deviate from the other **DPHs** (see section 4.1), so that TEET should be possible. Surprisingly, FCS experiments with **HMe<sub>2</sub>N<sup>+</sup>-DPH** and **EtMe<sub>2</sub>N<sup>+</sup>-DPH** showed no changes in signal strength or triplet population of **Rh123**. No differences were found in the FCS curves of **Rh123** measured in ethanol or ethanol with sulfuric acid as control. The count rate per molecule as well as the triplet amplitude and the diffusion time remained unchanged.



**Figure 7.** (A) Normalized correlation curves of **Rh123** in ethanol at  $I_0/2 = 200 \text{ kW/cm}^2$ . In the presence of  $8 \mu\text{M Me}_2\text{N-DPH}$ , an additional bunching term is needed to describe the curve. The fitted relaxation parameters were  $T_{\text{eq}} = 0.76$  and  $t_T = 11 \mu\text{s}$  for **Rh123** and  $T_{\text{eq}} = 0.53$ ,  $t_T = 7.7 \mu\text{s}$ ,  $R_{\text{eq}} = 0.30$  and  $t_R = 77 \mu\text{s}$  for **Me<sub>2</sub>N-DPH**. (B) Average fraction of molecules in the triplet state  $T_{\text{eq}}$  and fluorescence count rate per molecule  $F_{\text{cpm}}$  as a function of the applied laser irradiance.

It seems reasonable that the positive charges of the two **RMe<sub>2</sub>N<sup>+</sup>-DPH** derivatives are responsible for the lack of activity (see Conclusions).

## 5. Conclusions

**DPHs** quench the triplet state of **Rh123** effectively with specific quenching rates varying by more than a factor of 2 from nearly diffusion-controlled ( $4.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) to lower values. Possible reasons for the observed differences raise the question of the detailed mechanism. The best quenching effect is obtained with the parent compound **DPH**, whereas the quenching efficiency is reduced with larger substituents and increasing oxidation potentials. Two channels for triplet state deactivation by the **DPHs** can be discussed:<sup>77,78</sup> First, looking at the energetic levels from the quantum mechanical calculations, the free energy for Dexter TEET from the fluorescent dye to the **DPHs**  $\Delta G_{\text{TEET}}$  should be exergonic ( $\Delta G_{\text{TEET}} < -0.2 \text{ eV}$ , see section 4.1 and Table 1). Beyond that, triplet quenching by an additional electron transfer pathway<sup>17</sup> is considered to be feasible for those **DPHs**, where the free energy  $\Delta G_{\text{ET}}(T_1)$  is exergonic (see Table 3). In case of **Me<sub>2</sub>N-DPH** ( $\Delta G_{\text{ET}}(T_1) = -0.77 \text{ eV}$ ), a significant population of a newly long-lived dark state is detected by FCS, which could be assigned to free radicals. **DPH** and **F-DPH** differ in  $k_{\text{qT}}$ , but they have approximately the same  $\Delta G_{\text{TEET}}$  and  $\Delta G_{\text{ET}}(T_1)$ . Thus additional effects by substituents, which are important for the Dexter ET by influencing the spectral overlap, must be considered as well: (I) Altering steric hindrance,<sup>79,80</sup> (II) change in electron density in the relevant orbitals and orbital overlap,<sup>81</sup> or (III) introduction of intermolecular Coulombic attraction or repulsion.

For example, larger steric hindrance by the **CF<sub>3</sub>** groups might contribute to the reduced quenching efficiency of **CF<sub>3</sub>-DPH** and

**bis-CF<sub>3</sub>-DPH**. Moreover, the Coulomb repulsion between the two positively charged molecules **RMe<sub>2</sub>N<sup>+</sup>-DPH** and **Rh123** increases their interaction distance, which explains the complete loss of the ability for triplet quenching. To conclude, the ability of **DPH** derivatives to quench dye triplet states is governed by a delicate interplay of steric, Coulombic and electronic effects. Electron deficient **DPHs** have indeed beneficial effects on the fluorescence rate of **Rh123** by reducing the triplet state population and by avoiding the formation of other long-lived dark states.

**Acknowledgment.** The present work has been performed as a project of the SFB 663 (A8, C1) at the Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. We thank Jerker Widengren and Ralf Kühnemuth for very helpful discussions on FCS. This work is dedicated to the memory of Prof. Dr. Hans-Dieter Martin, who passed away on March 8, 2009.

**Supporting Information Available:** Section 1 contains a detailed description of the synthesis and characterization for the different **DPHs**. In Section 2, further information on excited state relaxation of the **DPHs** (2.1), the absorption (2.2), and the emission spectra (2.3) of the **DPHs** as well as the multi Gaussian analysis of these (2.2 and 2.3) are given. Furthermore, Section 2 gives the cyclic voltammograms for the **DPHs** (2.4) and the FCS data for the **DPHs** not shown in the main manuscript (2.5). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## References and Notes

- (1) Yamashita, M.; Kuniyasu, A.; Kashiwagi, H. *J. Chem. Phys.* **1977**, *66*, 986.
- (2) Drexhage, K. H.; Schäfer, F. P. Structure and properties of laser dyes. In *Topics in Applied Physics*; Springer Verlag: Berlin, 1973; Vol. 1, pp 144.
- (3) Gonçalves, M. S. T. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 190.
- (4) Pawley, J. B. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 3rd ed.; Springer: New York, 2006.
- (5) Hell, S. W. *Science* **2007**, *316*, 1153.
- (6) Widengren, J.; Kudryavtsev, V.; Antonik, M.; Berger, S.; Gerken, M.; Seidel, C. A. M. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2039.
- (7) Hausteine, E.; Schwill, P. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2007**, *36*, 151.
- (8) Widengren, J.; Chmyrov, A.; Eggeling, C.; Löfdahl, P. A.; Seidel, C. A. M. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 429.
- (9) Vogelsang, J.; Cordes, T.; Forthmann, C.; Steinhauer, C.; Tinnefeld, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 8107.
- (10) Hofkens, J.; Cotlet, M.; Vosch, T.; Tinnefeld, P.; Weston, K. D.; Ego, C.; Grimsdale, A.; Müllen, K.; Beljonne, D.; Bredas, J. L.; Jørgens, S.; Schweitzer, G.; Sauer, M.; De Schryver, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 13146.
- (11) Liphardt, B.; Lüttke, W. *Opt. Commun.* **1983**, *48*, 129.
- (12) Sauer, M.; Han, K. T.; Müller, R.; Schulz, A.; Tadday, R.; Seeger, S.; Wolfrum, J.; Arden-Jacob, J.; Deltau, G.; Marx, N. J.; Drexhage, K. H. *J. Fluoresc.* **1993**, *3*, 131.
- (13) Ernsting, N. P.; Kaschke, M.; Kleinschmidt, J.; Drexhage, K. H.; Huth, V. *Chem. Phys.* **1988**, *122*, 431.
- (14) Eggeling, C.; Widengren, J.; Rigler, R.; Seidel, C. A. M. Photostabilities of fluorescent dyes for single-molecule spectroscopy: Mechanisms and experimental methods for estimating photobleaching in aqueous solution. In *Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine*; Springer: Berlin, 1999; pp 193.
- (15) Eggeling, C.; Widengren, J.; Rigler, R.; Seidel, C. A. M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2651.
- (16) Widengren, J.; Rigler, R. *Bioimaging* **1996**, *4*, 149.
- (17) Vogelsang, J.; Kasper, R.; Steinhauer, C.; Person, B.; Heilemann, M.; Sauer, M.; Tinnefeld, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 5465.
- (18) Rasnik, I.; McKinney, S. A.; Ha, T. *Nat. Methods* **2006**, *3*, 891.
- (19) Ferguson, M. W.; Beaumont, P. C.; Jones, S. E.; Navaratnam, S.; Parsons, B. J. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, *1*, 261.
- (20) Ringemann, C.; Schöne, A.; Giske, A.; von Middendorff, C.; Hell, S. W.; Eggeling, C. *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 612.
- (21) Förster, T. *Discussions Faraday Soc.* **1959**, *7*.
- (22) Förster, T. *Ann. Phys.* **1948**, *2*, 55.

- (23) Förster, T. *Fluoreszenz Organischer Verbindungen*; Vandenhoeck and Ruprecht: Göttingen, Germany, 1951.
- (24) Dexter, D. L. *J. Chem. Phys.* **1953**, *21*, 836.
- (25) Rehm, D.; Weller, A. *Israel J. Chem.* **1970**, *8*, 259.
- (26) Rehm, D.; Weller, A. *Z. Phys. Chem.* **1970**, *69*, 183.
- (27) Marcus, R. A. *J. Chem. Phys.* **1956**, *24*, 966.
- (28) Kavarnos, G. J.; Turro, N. J. *Chem. Rev.* **1986**, *86*, 401.
- (29) In order to describe the transitions involved in these processes we followed IUPAC conventions and denoted the excited state first and the ground state last. Thus absorption is marked by “←” and an emission is marked by “→”.
- (30) Mills, I.; Cvitas, T.; Homann, K.; Kallay, K.; Kuchitsu, K. *Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry*, 2nd ed.; Blackwell Science: Oxford, U.K., 1993.
- (31) Wardman, P. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1989**, *18*, 1637.
- (32) Polívka, T.; Sundström, V. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 2021.
- (33) Furuichi, K.; Sashima, T.; Koyama, Y. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *356*, 547.
- (34) Hilinski, E. F.; McGowan, W. M.; Sears, D. F.; Saltiel, J. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 3308.
- (35) Ye, J. F.; Chen, H.; Note, R.; Mizuseki, H.; Kawazoe, Y. *Int. J. Quantum Chem.* **2007**, *107*, 2006.
- (36) For the calculations regarding RH123, the ethyl ester was used instead of the methyl ester.
- (37) Sonoda, Y.; Kawanishi, Y.; Ikeda, T.; Goto, M.; Hayashi, S.; Yoshida, Y.; Tanigaki, N.; Yaso, K. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 3376.
- (38) Zhuang, Z. P.; Kung, M. P.; Kung, H. F. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2841.
- (39) Trepanier, V. E.; Fillion, E. *Organometallics* **2007**, *26*, 30.
- (40) Kauffman, J. M.; Moyna, G. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 839.
- (41) Alford, P. C.; Palmer, T. F. *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *86*, 248.
- (42) Alford, P. C.; Palmer, T. F. *Chem. Phys. Lett.* **1986**, *127*, 19.
- (43) Sonoda, Y.; Kwok, W. M.; Petrasek, Z.; Ostler, R.; Matousek, P.; Towrie, M.; Parker, A. W.; Phillips, D. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, 308.
- (44) Sonoda, Y.; Morii, H.; Sakuragi, M.; Suzuki, Y. *Chem. Lett.* **1998**, 349.
- (45) Barluenga, J.; Moriel, P.; Aznar, F.; Valdes, C. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 347.
- (46) Schäfer, A.; Huber, C.; Ahlrichs, R. *J. Chem. Phys.* **1994**, *100*, 5829.
- (47) Kohn, W.; Sham, L. J. *Phys. Rev.* **1965**, *140*, A1133.
- (48) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.
- (49) Lee, C. T.; Yang, W. T.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785.
- (50) Furche, F.; Ahlrichs, R. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 7433.
- (51) Ahlrichs, R.; Bär, M.; Häser, M.; Horn, H.; Kolmel, C. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *162*, 165.
- (52) Schade, B.; Hagen, V.; Schmidt, R.; Herbrich, R.; Krause, E.; Eckardt, T.; Bendig, J. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9109.
- (53) Klamt, A.; Schüürmann, G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1993**, 799.
- (54) Grimme, S.; Waletzke, M. *J. Chem. Phys.* **1999**, *111*, 5645.
- (55) Marian, C. M.; Gilka, N. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 1501.
- (56) Kleinschmidt, M.; Marian, C. M.; Waletzke, M.; Grimme, S. *J. Chem. Phys.* **2009**, *130*, 044708.
- (57) Magde, D.; Elson, E. L.; Webb, W. W. *Biopolymers* **1974**, *13*, 29.
- (58) Elson, E. L.; Magde, D. *Biopolymers* **1974**, *13*, 1.
- (59) Magde, D.; Elson, E. L.; Webb, W. W. *Phys. Rev. Lett.* **1972**, *29*, 705.
- (60) Widengren, J.; Mets, Ü.; Rigler, R. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 13368.
- (61) Enderlein, J.; Gregor, I.; Patra, D.; Dertinger, T.; Kaupp, U. B. *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 2324.
- (62) Eggeling, C.; Volkmer, A.; Seidel, C. A. M. *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 791.
- (63) Christensen, R. L.; Barney, E. A.; Broene, R. D.; Galinato, M. G. I.; Frank, H. A. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *430*, 30.
- (64) Dupuy, B.; Montagu, M. *Analyst* **1997**, *122*, 783.
- (65) Kohler, B. E.; Itoh, T. *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 5120.
- (66) Murov, S. L.; Carmichael, I.; Hug, G. L. *Handbook of Photochemistry*; Marcel Dekker Inc.: New York, 1993.
- (67) Saltiel, J.; Crowder, J. M.; Wang, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 895.
- (68) Evans, D. F.; Tucker, J. N. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **1972**, *68*, 174.
- (69) Heupel, M.; Gregor, I.; Becker, S.; Thiel, E. *Int. J. Photoenergy* **1999**, *1*, 165.
- (70) Menzel, R.; Bornemann, R.; Thiel, E. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, *1*, 2435.
- (71) Kunavin, N. I.; Nurmukhametov, R. N.; Khachaturova, G. T. *Zh. Prikl. Spektrosk.* **1977**, *26*, 1023.
- (72) Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 165.
- (73) Gregor, I.; Heupel, M.; Thiel, E. *Chem. Phys.* **2001**, *272*, 185.
- (74) Stracke, F.; Heupel, M.; Thiel, E. *J. Photochem. Photobiol. A* **1999**, *126*, 51.
- (75) Schweitzer, C.; Schmidt, R. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1685.
- (76) Köpsel, C.; Moltgen, H.; Schuch, H.; Auweter, H.; Kleinermanns, K.; Martin, H. D.; Bettermann, H. *J. Mol. Struct.* **2005**, *750*, 109.
- (77) Balzani, V.; Bolletta, F.; Scandola, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 2152.
- (78) Nau, W. M.; Scaiano, J. C. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 11360.
- (79) Wamser, C. C.; Medary, R. T.; Kochevar, I. E.; Turro, N. J.; Chang, P. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4864.
- (80) Cheng, G.; Peng, X.; Hao, G.; Kennedy, V. O.; Ivanov, I. N.; Knappenberger, K.; Hill, T. J.; Rodgers, M. A. J.; Kenney, M. E. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 3503.
- (81) Albinsson, B.; Mårtensson, J. *J. Photochem. Photobiol. C* **2008**, *9*, 138.

**Maximizing the Fluorescence Signal and Photostability of  
Fluorophores by Quenching Triplet and Radical States**



# Maximizing the Fluorescence Signal and Photostability of Fluorophores by Quenching Triplet and Radical States

*Daniela Pfiffli<sup>†</sup>, Stanislav Kalinin<sup>†</sup>, Denis Dörr<sup>†</sup>, Ralf Kühnemuth<sup>†</sup>, Sebastian Overmann<sup>†</sup>, Brigitte A. Bier<sup>‡</sup>, Andriy Chmyrov<sup>#</sup>, Jerker Widengren<sup>#</sup>, Thomas J. J. Müller<sup>‡</sup>, Klaus Schaper<sup>‡</sup> and Claus A. M. Seidel<sup>†\*</sup>*

<sup>†</sup> Lehrstuhl für Molekulare Physikalische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstr. 1, D 40225 Düsseldorf

<sup>‡</sup> Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstr. 1, D 40225 Düsseldorf

<sup>#</sup> Experimental Biomolecular Physics, Department of Applied Physics, Royal Institute of Technology, SE-10691, Stockholm, Sweden

\*: To whom correspondence should be addressed: E-mail: cseidel@gwdg.de. FAX: +49 211 81 12803. Tel: +49 211 81 15881.

## 1. Introduction

## 2. Theoretical Background

### 2.1. The Electronic State Model

Figure 1 is based on the electronic energy diagram of a dye molecule in five electronic levels: the ground singlet state  $S_0$ , the first excited singlet state  $S_1$ , the lowest excited triplet state  $T_1$  and higher excited singlet and triplet states,  $S_n$  and  $T_n$ . The steady-state population probabilities are calculated with  $S_0 + S_1 + T_1 + S_n + T_n = 1$  and

$$S_{0eq} = \frac{k_{Tn1}k_{Sn1}k'_T k'_0}{X}; S_{1eq} = \frac{k_{01}}{k'_0} S_{0eq}; T_{1eq} = \frac{k_{ISC}}{k'_T} S_{1eq}; S_{neq} = \frac{k_{1n}}{k_{Sn1}} S_{1eq}; T_{neq} = \frac{k_{T1n}}{k_{Tn1}} T_{1eq} \quad (1)$$

Whereby

$$X = k_{Tn1}[k'_T(k_{Sn1}(k'_0 + k_{01}) + k_{01}k_{S1n})] + (k_{T1n} + k_{Tn1})(k_{ISC}k_{Sn1}k_{01}) \quad (2)$$

Considering this photophysical model with five states,  $k_{0'}$  is the deactivation rate of the first excited singlet state  $S_1$  to the ground singlet state  $S_0$ .  $k_{ISC}$  refers to the rate of intersystem crossing from  $S_1$  to the lowest triplet state  $T_1$  and  $k'_T$  is the effective rate of

triplet state deactivation. The bimolecular quenching constants of singlet state  $k_{qS}$  and triplet state  $k_{qT}$  influence the deactivation rates by

$$k_0' = k_0 + k_{qS} [Q] \quad \text{and} \quad (3)$$

$$k_T' = k_T + k_{qT} [Q], \quad (4)$$

where  $k_T$  and  $k_0$  are the effective rates of deactivation without quencher and  $[Q]$  is the concentration of the quencher. Every rate constant that could be affected by a suitable quencher is marked with '. For all absorption processes a common excitation rate  $k_{if}$  for an excitation from an electronic state  $i$  in a higher excited state  $f$  is defined. The average excitation rate  $k_{if}$  within the detection volume element depends on the mean excitation intensity within the detection volume  $\langle I \rangle$  and is given by  $k_{if} = \sigma_{if}(\lambda) \gamma \langle I \rangle$ , where  $\sigma_{if}$  is the excitation cross section,  $\lambda$  the excitation wavelength, and  $\gamma = \lambda / (hc)$  is the reciprocal photon energy, with  $h$  being Plank's constant and  $c$  being the velocity of light. The mean intensity  $\langle I \rangle$  is determined by  $\langle I \rangle = 0.75 P / (\pi \omega_0^2)$  where  $P$  is the laser intensity measured with a power meter (see methods 3.2).

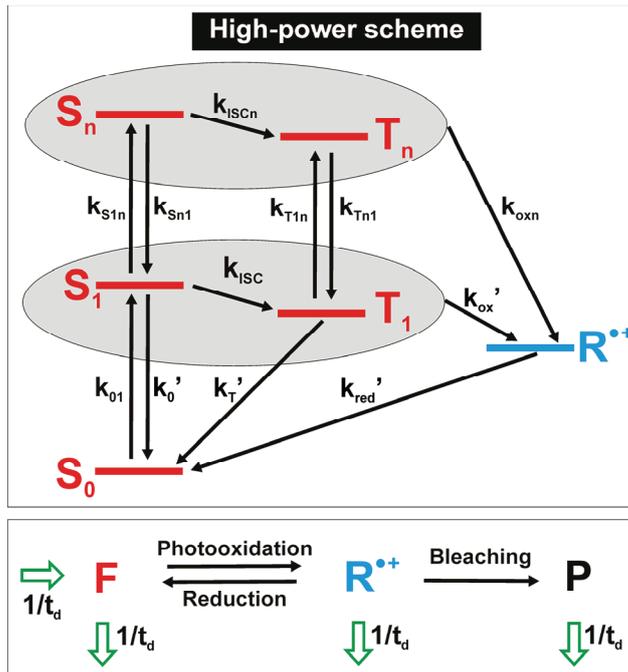


Figure 1: 6-state model for high-power applications. Electronic energy diagram of a dye molecule with five electronic levels regarding photobleaching from both first and higher excited singlet ( $S_1$  and  $S_n$ ) and triplet ( $T_1$  and  $T_n$ ) via a radical mechanism. (A) Microscopic description, (B) major features of photooxidation/reduction processes of a dye molecule.

Based on the five-state model in Figure 1 A, the formation of a radical cation  $R^{*+}$  via photooxidation is regarded. As in this paper only rhodamine 123 (Rh123) is used as

fluorophore one has to keep in mind that Rh123 has a cationic ground state and therefore photooxidation results in a twofold positively charged radical. The total rate constant for photooxidation  $k_{ox}$  is given by

$$k_{ox} = k_{oxS}S_{1eq} + k_{oxT}T_{1eq} + k_{oxSn}S_{neq} + k_{oxTn}T_{neq} + k_{ox(Q)}[Q]S_{1eq} = (k'_{ox} + k_{oxn}\langle I \rangle)S_{1eq} \quad (5)$$

and can be separated into the oxidation rate from the first excited electronic states  $k'_{ox}$  and from higher excited electronic states  $k_{oxn}$ .

$$k'_{ox} = k_{oxS} + k_{oxT} \frac{k_{ISC}}{k_T} + k_{ox(Q)}[Q] \quad (6)$$

$$k_{oxn} = \frac{k_{oxSn}}{k_{Sn1}} \sigma_{S1n} \gamma + \frac{k_{ISC}}{k_T} \frac{k_{oxTn}}{k_{Tn1}} \sigma_{T1n} \gamma. \quad (7)$$

In the oxidation rate  $k'_{ox}$  the processes are separated into oxidation reactions from  $S_1$  ( $k_{oxS}$ ) and  $T_1$  ( $k_{oxT}$ ) and an additional quencher induced process with the quenching rate constant  $k_{ox(Q)}$ . In the presence of a radical quencher the photooxidized dye radical can be reduced to its ground state with an observed radical quenching rate of  $k'_{red}$  depending on the quencher concentration  $[Q]$ , the reduction rate in absence of a quencher  $k_{red0}$  and the quenching rate constant of radical reduction  $k_{qR}$ :

$$k'_{red} = k_{red0} + k_{qR}[Q]. \quad (8)$$

## 2.2. The Correlation Function

FCS analyzes spontaneous fluorescence intensity fluctuations of fluorescent molecules excited in a focussed beam<sup>1-3</sup>. This fluctuation may be caused by a broad range of dynamic processes at the molecular level: changes in concentration of a fluorophore due to translation diffusion of the fluorescent molecules into and out of the sample volume element and changes in the excited singlet or triplet state population. The time-dependent parts of the correlation function can then be expressed as<sup>4</sup>:

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N_F} \cdot \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_d}} \cdot \frac{1}{\sqrt{(1 + (\omega_0/z_0)^2 t_c/t_d)}} \cdot \left( 1 - A_T + A_T \cdot e^{-\frac{t_c}{t_T}} \right) G_R(t_c) \quad (9)$$

$N_F$  is the mean number of fluorescent molecules within the sample volume element. A three-dimensional Gauss distribution of the detected fluorescence is assumed with radial and axial  $1/e$  radii  $\omega_0$  and  $z_0$ , respectively. The characteristic diffusion time for the fluorescent molecules is related to the translational diffusion coefficient,  $D$ , by  $D = \omega_0^2/4t_d$ .  $A_T$  is the mean fraction of fluorophores within the sample volume element being in their

triplet states and  $t_T$  is the correlation time of the triplet state. Assuming a simple three-state model  $A_T$  and  $t_T$  can be expressed by<sup>4-6</sup>

$$A_T = \frac{k_{ISC}k_{01}}{(k_{ISC} + k'_T)k_{01} + k'_T k'_0} \quad (10)$$

$$t_T = \frac{k_{01} + k'_0}{(k_{ISC} + k'_T)k_{01} + k'_T k'_0} \quad (11)$$

In case of formation of radicals a second bunching term  $G_R(t_c)$  is needed<sup>7</sup>.

$$G_R(t_c) = \left(1 + A_R e^{-t_c/t_R} + A_B e^{-t_c/t_B}\right) \quad (12)$$

$A_R$  and  $A_B$  are the radical amplitudes and  $t_R$  and  $t_B$  are the corresponding correlation relaxation times of the two terms. From simulated FCS curves,  $A_B$  is supposed to be smaller than 2% and  $t_B$  is expected to be presented at correlation times of 5 ms or longer. This second term is only considerable for an experimental setup where large focal volume elements are used to adjust the diffusion time at a millisecond time range.

$$A_R = \frac{-\lambda_1(1 - F_{eq}) - k_{ox}}{(\lambda_2 - \lambda_1)F_{eq}} \quad (13)$$

$$t_R = -1/(\lambda_2 + 1/t_d) \approx 1/(k'_{red} + k_{ox}) \quad (14)$$

with

$$\lambda_{1,2} = -1/t_d + \frac{1}{2} \left( -k'_{red} - k_{ox} - k_{bR} \pm \sqrt{k'^2_{red} + k^2_{ox} + k^2_{bR} - 2k_{ox}k_{bR} + 2k_{ox}k'_{red} + 2k'_{red}k_{bR}} \right) \quad (15)$$

### 2.3. The Fluorescence Signal

The fluorescence signal is calculated according to

$$F_{cpm} = G_{Detect} \Phi_{F(Q)} k'_0 S^5_{1eq} [F_{eq}], \quad (16)$$

whereby  $G_{Detect}$  is the detection efficiency and  $\Phi_{F(Q)}$  the fluorescence quantum yield of the fluorophore. The steady-state fraction of the “F” state (Figure 1 B) is given by

$$F_{eq} = \left[ 1 + \frac{k_{ox}(1 + k_{bR} t_d / \beta)}{k'_{red} + k_{bR} + \beta / t_d} \right]^{-1} \quad (17)$$

For the refreshment rate  $\beta/t_d$  the approximation of  $\beta \sim 1$  is reasonable which could be shown by re-analyzing simulated FCS curves as shown in the SI.

The fluorescence count rate per molecule  $F_{cpm}$  is computed by normalizing the measured fluorescence signal  $F$  to the total number of molecules  $\langle N \rangle = N_F / (1 - A_R - A_T)$  by taking the

triplet fraction  $A_T$  and the radical fraction  $A_R$  into account. As total number  $\langle N \rangle$  of molecules in the focus an average from FCS measurements at low irradiances was taken.

$$F_{cpm} = \frac{F}{N_F} (1 - A_R - A_T). \quad (18)$$

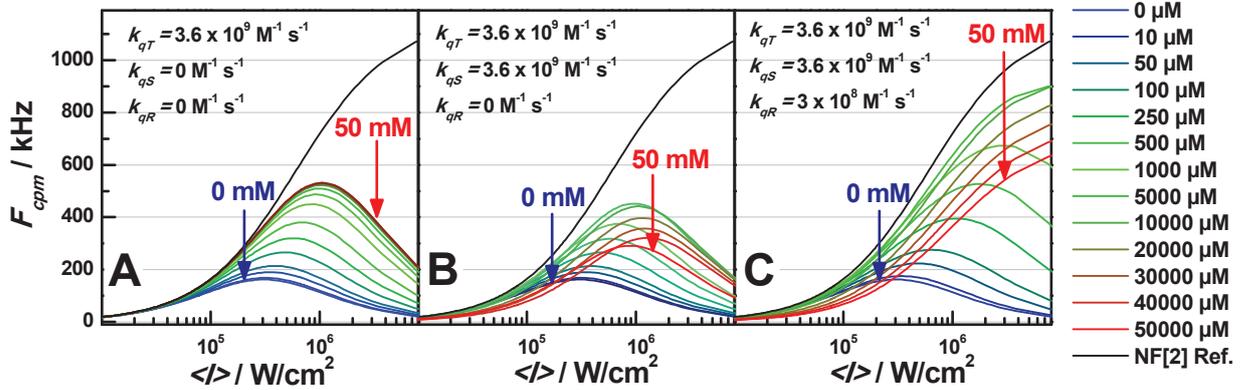


Figure 2: Simulated dependence of the fluorescence signal  $F_{cpm}$  on the excitation irradiance,  $\langle I \rangle$ . As reference for the maximal achievable signal  $F_{cpm}$  for a 2-level system is plotted (black line). The concentration varies from 0  $\mu\text{M}$  to 50 mM labelled with blue and red arrows. The quenching rates  $k_{qS}$ ,  $k_{qT}$  and  $k_{qR}$ , of three states  $S_1$ ,  $T_1$  and radical R are given in the legend. (A) Quenching of the triplet state. (B) Triplet and singlet quenching. (C) Quenching of  $S_1$ ,  $T_1$  and radical state R. For the simulation following parameters were used: excitation wavelength  $\lambda_{ex} = 496.5 \text{ nm}$ ;  $\gamma = 2.5 \times 10^{18} \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , detection efficiency  $G_{Detect} = 0.0047$ ,  $t_d = 1.17 \times 10^{-4} \text{ s}$ ;  $\sigma_{0I} = 2.5 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ ;  $k_{\theta} = 2.5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ ; fluorescence quantum yield  $\Phi_{F(0)} = 0.98$ ;  $k_{ISC} = 9.4 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_T = 4.3 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ;  $\sigma_{S1n} = 7.7 \times 10^{-18} \text{ cm}^2$ ,  $\sigma_{T1n} = 3.85 \times 10^{-17} \text{ cm}^2$ ;  $k_{S1n} = k_{T1n} = 5 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{ox} = 200 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{oxn} = 0.11 \text{ cm}^2 \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{red0} = 9 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{bR} = 200 \text{ s}^{-1}$ . The bimolecular quenching constants,  $k_{qS}$ ,  $k_{qT}$  and  $k_{qR}$ , for the  $S_1$ ,  $T_1$  and radical state are given in the chart.

#### 2.4. Steady-State Bleaching Experiments

The total rate constant for bleaching measured in steady-state cell-bleaching experiments consists of the rates for all reactions from the first excited singlet, triplet and the radical cation state,  $S_1$ ,  $T_1$ ,  $R^{+}$ , resulting in the photo destruction of the fluorophore. Theoretical detailed see <sup>5</sup> and SI.

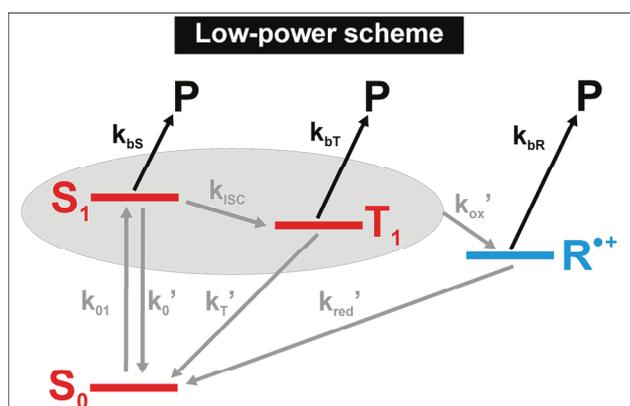


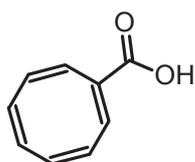
Figure 3: Pathways of irreversible photodestruction of the dye separated into reactions from singlet, triplet and radical cation state observed for low-power experiments.

The bleaching pathways via the individual states can be precisely studied in the cell bleaching experiments at low laser irradiances<sup>5</sup>. Under these conditions saturation effects and the presence of higher excited dye states can be neglected. The individual bleaching rate constants of the singlet triplet and radical state, respectively,  $k_{bs}$ ,  $k_{bt}$  and  $k_{br}$ , can be determined by adding specific quenchers, which however can also result in additional quencher induced bleaching processes  $k_{bs(Q)}$  and  $k_{bt(Q)}$ .

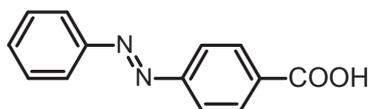
$$k_b = \left[ k_{br} \frac{k_{ox'}}{k_{red'}} + (k_{bt} + k_{bt(Q)}[Q]) \frac{k_{ISC}}{k_T'} + (k_{bs} + k_{bs(Q)}[Q]) \right] \frac{k_0}{k_0'} \quad (19)$$

### 3. Material and Methods

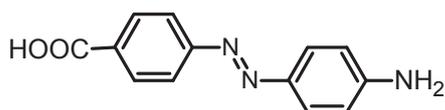
#### 3.1. Compounds



COT



AZB



AAZB

All measurements described below were performed in 25 mM phosphate buffer at pH7 and a temperature of  $20 \pm 1$  °C. Rhodamine 123 (Rh123) and 4-(Phenylazo)benzoic acid (AZB) were purchased from Aldrich (Rhodamine 123 (2-(6-Amino-3-imino-3H-xanthen-9-yl)benzoic acid methyl ester) #R8044; 4-(Phenylazo)benzoic #479624). Synthetic

procedures and characterization of COT and AAZB are described in the supporting information. Cyclic Voltammetry was performed with a three electrode arrangement with an Ag/AgCl electrode as reference electrode. The potentials were cited against the normal hydrogen electrode. For a detailed description of the measurement setup and conditions see SI.

### 3.2. Fluorescence Correlation Spectroscopy

**Setup.** Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) was carried out with a confocal epi-illuminated microscope as described before<sup>5</sup>. The fluorescent molecules are excited by a linearly polarized argon-ion-laser (35LAP431-230, Melles-Griot) at 496 nm in cw mode. The laser is focused into the sample by a water-immersion objective lens (UPLAPO 60 NA = 1.2, Olympus, Hamburg, Germany). The fluorescence is collected by the same objective, separated from the excitation by a polychroic beam splitter (498 DCLP, AHF, Tübingen, Germany) and was detected by two avalanche photodiodes (Photon counting Module SPCM-AQR-14, Perkin Elmer) in a beam splitting arrangement to eliminate dead time and afterpulsing artefacts. Fluorescence band pass filters (HQ 533/46, AHF) block residual light and reduce Raman scattering from the solvent. A confocal pinhole of 50  $\mu\text{m}$  diameter yields a characteristic diffusion time of 130  $\mu\text{s}$  for Rh123. The signals of the two detectors were processed by a hardware correlator (ALV-5000, ALV-Laser, Langen, Germany). The measured correlation curves were fitted to expression 9, using a Levenberg-Marquardt non-linear least squares algorithm.

**Estimation of mean intensity.** The mean excitation intensity can be estimated assuming a Gaussian-Lorentzian beam profile<sup>8</sup>. The beam width  $\omega_0 = 0.65 \mu\text{m}$  is determined from  $t_d = 0.3 \text{ ms}$  measured for Rh123 using a sufficiently large pinhole.  $\omega_0$  is calculated according to  $\omega_0 = (4Dt_d)^{1/2}$  with  $D = 3.5 \pm 0.3 \text{ m}^2/\text{s}$ . Photon collection efficiency (*CEF*) is modelled as described by Rigler et al (eq \*\* in ref<sup>8</sup>) using the following parameters: pinhole size = 50  $\mu\text{m}$ ; lens NA = 1.2; lens resolution = 0.2  $\mu\text{m}$ . In the absence of optical saturation the brightness (*Q*) of a molecule is proportional to both *I* and *CEF*. To calculate  $\langle I \rangle$  for FCS we note that contributions to correlation curves are generally proportional to  $Q^2$  and thus apply the weighting  $Q^2 = I^2 CEF^2$ . Numerical integration of  $\langle I \rangle = \langle IQ^2 \rangle / \langle Q^2 \rangle$  yields  $\langle I \rangle \cong 0.75I_0$ , where  $I_0$  is the excitation intensity at the center of the beam at the focal plane. For further details see SI.

### 3.3. Steady-State Bleaching

In the setup of the cell-bleaching experiment, a constantly stirred dye solution in a quartz cell ( $1 \times 1 \text{ cm}^2$ ) is illuminated by a continuous wave argon ion laser (Innova Sabre, Coherent, Palo Alto, CA) at 496 nm. Using appropriate long-pass filters (OG15, Schott and HQ 555-105, AHF), the fluorescence light is detected perpendicular to the excitation light by a photodiode (S1226-8BQ, Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan). A part of the excitation light is monitored by a second photodiode to correct for possible fluctuations. The two time-dependent amplified signals are read into a computer by an analog-to-digital converter PC board (WIN 30D, Meilhaus Electronic, Puchheim, FRG)<sup>5</sup>.

## 4. Results and Discussion

### 4.1. Triplet Quenching

The effects of quenchers on the triplet state population of Rh123 was investigated by fluorescence correlation spectroscopy. A series of FCS curves of Rh123 at varying quencher concentrations and laser irradiances were measured for each quencher (Figure 4). The analysis of correlation curves by eq. 9 shows that a diffusion term with the characteristic diffusion time  $t_d$  and two bunching terms with the amplitudes  $A_T$  and  $A_R$  and the relaxation times  $t_T$  and  $t_R$  are sufficient to describe the curves.

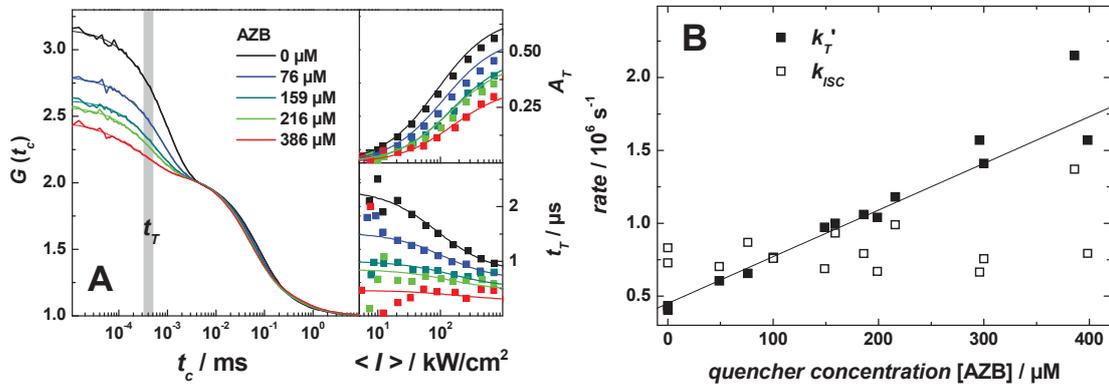


Figure 4: (A) The fluorescence correlation curves of Rh123 in presence of different concentrations of the quencher AZB at an irradiance of  $450 \text{ kW}/\text{cm}^2$ . The changes in triplet population  $A_T$  and triplet correlation time  $t_T$  with increasing quencher concentrations are given in the inset of Figure 4. The fit of the theoretical expressions 10 and 11 of  $A_T$  and  $t_T$  to these data with the fixed parameter  $k_0 = 2.5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$  were plotted as lines. (B) The resulting triplet parameters  $A_T$  and  $t_T$  were fitted globally to give the rate for intersystem crossing  $k_{ISC}$  and the rate of triplet relaxation  $k_T'$  for each concentration.

Comparing the normalized FCS curves at an irradiance of  $450 \text{ kW}/\text{cm}^2$  and varying concentrations of AZB (Figure 4 A) a clear effect on the triplet amplitude  $A_T$  and triplet

correlation time  $t_T$  was observed in the time range of several microseconds. The radical bunching term with the correlation time  $t_R$  ranging from 400  $\mu\text{s}$  for low intensities to 50  $\mu\text{s}$  for the highest irradiances revealed to be concentration independent for COT. AZB caused a decrease in  $t_R$  whereas the amplitude remained unchanged. The most pronounced influence on this radical term was caused by AAZB. For further discussion about this effect see section 4.2.

By plotting the triplet parameters  $A_T$  and  $t_T$  as a function of the laser irradiance (inset of Figure 4) and fitted the two data sets globally to eq 10 and 11 the rate of intersystem crossing  $k_{ISC}$  and triplet relaxation  $k_T'$  could be determined. During the fit procedure the deactivation rate of the first excited singlet state  $k_0$  was fixed to  $2.5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ . The dye specific rates of the triplet kinetic of Rh123 without quencher are given in Table 1. In Figure 4 B the rate of triplet population  $k_{ISC}$  and depopulation  $k_T'$  were plotted against the quencher concentration. The slope of the linear dependence of  $k_T'$  on the concentration determines the rate constant for triplet quenching of AZB ( $k_{qT} = 3.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) according to eq 4. The rate of intersystem crossing  $k_{ISC}$  remains constant. For the three quenchers the rate constants  $k_{qT}$  for quenching the triplet state of Rh123 are given in Table 2.

#### 4.2. Radical Quenching

In Figure 5 A the normalized fluorescence correlation curves for Rh123 with AAZB at an irradiance of 400  $\text{kW}/\text{cm}^2$  are plotted. The analysis of the triplet population  $A_T$  and the triplet correlation time  $t_T$  yielded a triplet quenching rate for AAZB of  $k_{qT} = 3.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . In addition, the concentration dependency of the radical bunching term became visible in the time range of several hundred milliseconds (Figure 5).

The correlation times of diffusion and radical kinetics appear in the same time range and could be separated by a global fit procedure in which the radical kinetics are included. Therefore, a series of FCS curves with varying irradiances but at constant quencher concentration were fitted to eq 9. During the fit procedure the rates for radical oxidation  $k_{ox}'$  and  $k_{oxn}$ , bleaching  $k_{bR}$ , reduction  $k_{red}'$  and quenching  $k_{qR}$  were set as global for all intensities.

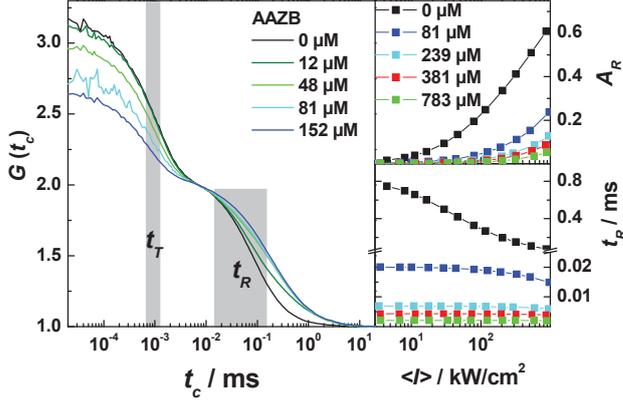


Figure 5: Normalized FCS curves of Rh123 in phosphate buffer pH7 at different concentrations of AAZB measured at an irradiance of  $\langle I \rangle = 400 \text{ kW/cm}^2$ . Inset: From the global fit procedure of a series of FCS curves the radical amplitude  $A_R$  and radical correlation time  $t_R$  were obtained and plotted as a function of the irradiance.

With this method one could distinguish between the two processes, the diffusion of the molecule into and out of the focal volume element with the diffusion time  $t_d$  and the oxidation and reduction processes from the Rh123 to the radical state with the radical correlation time  $t_R$ . As result of the fit, dye specific rate constants were found for the oxidation rate from the first excited states  $k_{ox}' = 16000 \text{ s}^{-1}$ , from higher excited states  $k_{oxn} = 0.042 \text{ cm}^2 \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , the radical reduction in absence of a quencher  $k_{red0} = 1470 \text{ s}^{-1}$ . The bleaching process from the radical cation state was found to be minute and the rate  $k_{bR}$  was set to  $200 \text{ s}^{-1}$  which is the upper limit that doesn't influence the fit quality (Table 1). The value for the reduction  $k_{red0}$  obtained from our FCS experiments is of the same order of magnitude than that reported in literature from laser flash photolysis<sup>9</sup>. All oxidation and reduction rates are found to depend strongly on measurement conditions like the buffer concentration, the temperature and the oxygen content.

Table 1: Dye specific rates for Rh123 in phosphate buffer at pH7 measured by FCS and photobleaching experiments.

	$k_T$	$k_{ISC}$	$k_{ox}$	$k_{oxn}$	$k_{red0}$	$k_{bR}$	$k_{oxS}$	$k_{oxT}$	$k_{bS}$	$k_{bT}$
	$10^5 \text{ s}^{-1}$	$10^5 \text{ s}^{-1}$	$10^4 \text{ s}^{-1}$	$\text{cm}^2 \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$\text{s}^{-1}$	$\text{s}^{-1}$	$10^3 \text{ s}^{-1}$	$10^3 \text{ s}^{-1}$	$\text{s}^{-1}$	$\text{s}^{-1}$
Rh123	4.2 <sup>a</sup>	7.6 <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>	0.042 <sup>b</sup>	1470 <sup>c</sup>	200 <sup>d</sup>	6.3 <sup>e</sup>	5.9 <sup>e</sup>	108 <sup>e</sup>	31 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> The standard deviation ranges from 3 - 13 % obtained by repeated measurements. <sup>b</sup> average from  $F_{cpm}$  and FCS fits;  $k_{oxn} = 0.058 \pm 0.012 \text{ cm}^2 \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ( $F_{cpm}$ );  $k_{oxn} = 0.026 \pm 0.009 \text{ cm}^2 \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (FCS) <sup>c</sup> taken from fitting the low concentrations of AAZB and kept constant for the following analysis <sup>d</sup> upper limit <sup>e</sup> The standard deviation ranges from 2 - 14 % received from the fit uncertainty.

The obtained amplitudes  $A_R$  and correlation times  $t_R$  of the radical bunching term are plotted as a function of the mean irradiance  $\langle I \rangle$  in Figure 5. Both parameters decrease

with increasing quencher concentration. Thus, AAZB reduces the radical state population and a radical quenching rate of  $k_{qR} = 6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  was found. The rate constants for radical quenching  $k_{qR}$  for each quencher are given in Table 2.

Table 2: Theoretical  $\Delta G$  values of the reductive and oxidative electron transfer between quencher and the  $S_1$ ,  $T_1$  and radical cation state  $R^{*+}$  of Rh123. Bimolecular rate constants for quenching the triplet state of Rh123 measured by FCS in phosphate buffer at pH7. Quencher induced reduction, oxidation and bleaching rates obtained from FCS and photobleaching experiments.

	$\Delta G$ (electron transfer) / eV <sup>a</sup>					$k_{qT}$ <sup>b</sup>	$k_{qR}$ <sup>b</sup>	$k_{ox(Q)}$ <sup>c</sup>	$\frac{k_{bS(Q)}^d}{k_{bT(O)}^d}$
	Reduction of			Oxidation of					
	$S_1$	$T_1$	$R^{*+}$	$S_1$	$T_1$				
COT	-0.06	0.41	0.54	0.04	0.51	2.5	0	$2.6 \pm 1.6$	$9.7 \pm 1.4$ $17.3 \pm 4.7$
AZB	0.31	0.78	0.91	-0.46	0.01	3.6	0.02 <sup>c</sup>	$15.0 \pm 1.8$	0 0
AAZB	-0.63	-0.16	-0.03	0.28	0.75	3.9	0.62 <sup>c</sup>	0	0 0

<sup>a</sup> For measured reduction and oxidation potentials and detailed description of the CV measurements see SI. The oxidative processes from the radical cation were estimated to be  $\Delta G > 0$  and therefore not shown. For the calculation the redox potentials of Rh123,  $E_{ox} = 1.21 \text{ V}$  vs. NHE and  $E_{red} = -0.61 \text{ V}$  vs. NHE, and the energies of the  $S_1$  and the  $T_1$  state,  $E_s = 2.42 \text{ eV}$  and  $E_T = 1.95 \text{ eV}$  were used. The contribution of the correction terms is assumed to be negligible. The estimated errors for the measured potentials are  $< 0.05 \text{ V}$ . <sup>b</sup> From FCS measurements, see section 4.1 and 4.2. The errors of the triplet quenching rates are  $\pm 0.3$ . <sup>c</sup> from fit of the concentration dependent oxidation rates, see section 4.3 <sup>d</sup> from steady-state bleaching experiments <sup>e</sup> average from  $F_{cpm}$  and FCS fits.

The addition of COT showed no change in the radical amplitudes and correlation times (data not shown) and therefore no quenching rate  $k_{qR}$  is needed in the fit which is also confirmed by the estimated feasibility for the electron transfer reaction. Surprisingly, AZB is reducing the rhodamine radical state with a comparatively small rate of  $k_{qR} = 0.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . This process should be energy-forbidden regarding the estimated  $\Delta G$ . The quenching rate might therefore arise due to impurities with reducing character. The rates for radical oxidation and reduction showed to be extremely sensitive to little changes in concentration which is shown below. Therefore even small amounts of impurities in the additives can cause visible effects on the rates. This is shown for AAZB in Figure 7 and discussed below.

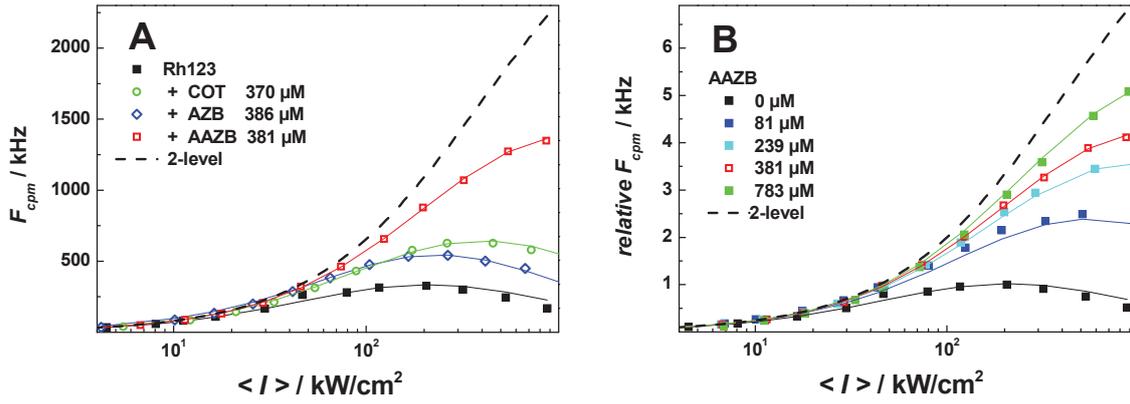


Figure 6: Experimental data and fitted curves for the relative fluorescence signal per molecule  $F_{cpm}$  plotted against the applied laser irradiance  $\langle I \rangle$  (A) for quencher concentrations of approximately 380  $\mu\text{M}$  and (B) at high concentrations of AAZB. Fit parameters:  $G_{Detect} = 0.0014$ ;  $\Phi_{F(0)} = 0.98$ ;  $k_0 = 2.5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_T = 4.2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{ISC} = 7.6 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ;  $t_d = 130 \mu\text{s}$ ;  $\gamma = 2.5 \times 10^{18} \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ;  $\sigma_{OI} = 2.6 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ ;  $k_{bR} = 200 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{red0} = 1470 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{oxn} = 0.042 \text{ cm}^2 \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . The quenching constants of triplet and radical quenching for each quencher are given in Table 2. In each figure the maximal achievable signal for a theoretical 2-state model is plotted as dashed lines.

In Figure 6, the fluorescence signal per molecule  $F_{cpm}$  as a function of the laser irradiance  $\langle I \rangle$  is plotted for Rh123 with COT, AZB or AAZB at comparable concentrations. Taking into account the difference in the  $k_{qT}$  values for AZB and COT, the increase in signal strength corresponds to their triplet quenching efficiencies. Comparing the two azobenzenes with regard to their  $k_{qT}$  the beneficial effect of AAZB on the fluorescence signal compared to that of AZB values is significantly higher. The addition of 380  $\mu\text{M}$  AZB and AAZB enhances the fluorescence signal from the maximal achieved count rate per molecule of 170 kHz for Rh123 without additives to 640 kHz and 1350 kHz, respectively. Addition of 783  $\mu\text{M}$  AAZB increases the fluorescence signal by a factor of 5 (Figure 6 B). Remarkable about these plots is that simultaneously with the increase in signal the maximum is shifted to higher irradiances. As shown in the simulated fluorescence signal in Figure 2 this fact is noticeable for all three effects but is more distinct for the radical quenching process.

The experimental data of the fluorescence signal can be described by the theoretical approach given in eq 16. In this expression the influence of the quencher on the radical state population is included in the total reduction rate  $k_{red}'$  which depends on the quencher concentration  $[Q]$  and the radical quenching rate  $k_{qR}$  (eq x). Regardless of the rates for the radical kinetic, the fluorescence signal of Rh123 depends on the detection efficiency  $G_{Detect}$  and several dye specific parameters like the quantum yield of fluorescence  $\Phi_{F(0)}$ , the deactivation rate of the  $S_1$   $k_0'$  and the steady-state population of the  $S_1$  state which includes

all excitation cross sections from the lower lying to an excited state ( $\sigma_{0l}$ ,  $\sigma_{S1n}$ ,  $\sigma_{T1n}$ ) and the deactivation rates from the excited singlet and triplet states to the corresponding lower states ( $k_0'$ ,  $k_T'$ ,  $k_{S1n}$ ,  $k_{T1n}$ ). At concentrations below the millimolar range as used in this measurements quenching processes from the singlet state should be negligible small and were therefore not regarded ( $k_{qS} = 0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). The parameters  $\Phi_{F(0)}$ ,  $k_0$ ,  $k_T$ ,  $k_{ISC}$ ,  $t_d$ ,  $\gamma$ ,  $\sigma_{0l}$  and the triplet quenching rates  $k_{qT}$  were fixed to the values given in the caption of Figure 6. The excitation cross section  $\sigma_{0l}$  from the singlet ground state to the first excited singlet state was calculated from the measured extinction coefficient in phosphate buffer pH7 at 496 nm. The curves are in good agreement with the experimental data and are shown in Figure 6. By fitting the signal strength to eq. x a radical quenching rate  $k_{qR} = 6.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  was found for AAZB which is in good agreement with the value obtained from the global FCS fit. For COT no additional radical reduction rate is needed to describe the fluorescence signal.

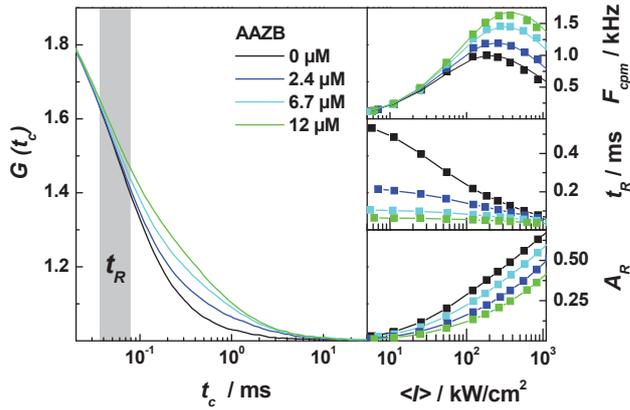


Figure 7: Effects of micromolar concentrations of AAZB on the normalized fluorescence correlation curves of Rh123 at  $\langle I \rangle = 850 \text{ kW/cm}^2$ . Inset: Relative fluorescence signal per molecule  $F_{cpm}$  plotted against the applied laser irradiance  $\langle I \rangle$  at low concentrations of AAZB. Radical amplitude  $A_R$  and correlation time  $t_R$  as a function of the applied laser irradiance.

The efficient concentration range for quenching a specific state depends on the lifetime and the quenching rate for that process. Due to its long lifetime the radical state of Rh123 (or low deactivation rate of  $k_{red0} = 1470 \text{ s}^{-1}$  respectively) is therefore addressed first when a suitable radical quencher is added. The influence of the radical reducing agent like AAZB on the fluorescence signal of Rh123 is already visible at concentrations of a few micromolar (inset of Figure 7). At such low amounts of quencher the triplet amplitude and correlation time remain unaffected whereas the radical bunching term with correlation times around  $200 \mu\text{s}$  shows a concentration dependent behavior. The amplitude  $A_R$  and correlation time  $t_R$  of the bunching term are plotted against the applied laser irradiance in

the inset of Figure 7. Neither AZB nor COT influences the correlation curves or the count rates per molecule below concentrations of 10  $\mu\text{M}$ .

#### 4.3. Oxidation rates

The oxidation rates from the first excited states  $k_{ox}'$  of Rh123 were obtained from the global fit of the FCS curves for each concentration and are shown in Figure 8.

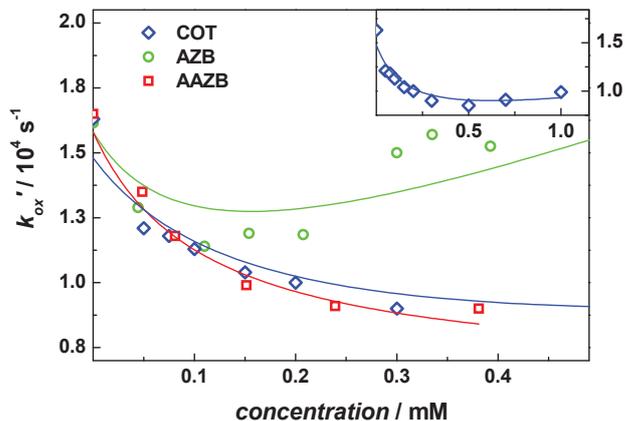


Figure 8: Rate of oxidation processes from the first excited triplet and singlet states of Rh123 in presence of azobenzene quenchers measured by FCS.

At concentrations up to 100  $\mu\text{M}$  all additives decrease the oxidation processes.  $k_{ox}'$  depends on the triplet deactivation rate and is therefore reduced by increasing the triplet deactivation rate  $k_T'$  (see eq 6). Further increase of the concentration results in higher oxidation rates for COT at concentration above 0.5 mM (inset of Figure 8). In the case of AZB the oxidation rate is already enhanced in the range of 0.2 mM. This effect can be explained by an oxidative electron transfer reaction between Rh123 and the quencher which is described in eq 6 by the quenching rate  $k_{ox(Q)}$ . Regarding the measured potentials the oxidation of Rh123 should be feasible for AZB (with  $\Delta G = -0.46 \text{ eV}$  for oxidation of the  $S_1$  state and 0.01 eV for  $T_1$ ). The change in free energy for oxidizing the  $S_1$  state of Rh123 by COT was estimated to be slightly positive  $\Delta G = 0.04 \text{ eV}$ . Nevertheless this process has to be considered as feasible due to the neglected contributions from Coulomb interactions and ion solvation.

Fitting the concentration dependent oxidation rate to eq 6 results in separated rate constants for the oxidation from the first excited singlet state  $k_{oxS}$  and the triplet state  $k_{oxT}$  and into a quenching rate for a bimolecular oxidizing process  $k_{ox(Q)}$ . Thereby,  $k_{oxS}$  and  $k_{oxT}$  are characteristic values for Rh123 and set as global for all three quenchers. The photooxidation of Rh123 from the triplet state  $T_1$  with a rate constant of  $k_{oxT} = 5900 \text{ s}^{-1}$  is comparable to the pathway via the  $S_1$  state ( $k_{oxS} = 6300 \text{ s}^{-1}$ ). The resulting values for the

dye specific rates are given in Table 1. The influence of AZB on the oxidation rate is given by a quenching rate of  $k_{ox(Q)} = 1.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . For AAZB no additional oxidizing character was expected from the electrochemical data and therefore the rate  $k_{ox(Q)}$  was set as zero. For the weak effect of COT in the higher concentration ranges a rate of  $k_{ox(Q)} = 2.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  was determined (rates are summarized in Table 2).

#### 4.4. Bleaching rates

The total rates of bleaching obtained from steady-state measurements of the exponential decay of the fluorescence signal are plotted against the quencher concentration in Figure 9 A. In this experiments laser intensities  $< 10 \text{ W/cm}^2$  were used to excite the fluorophore and therefore higher excited states could be neglected (see Figure 3 and section 2.4). The possibility of being bleached from the radical cation state can be disregarded due to the small population of that state at such low irradiances (see radical amplitude in Figure 5).

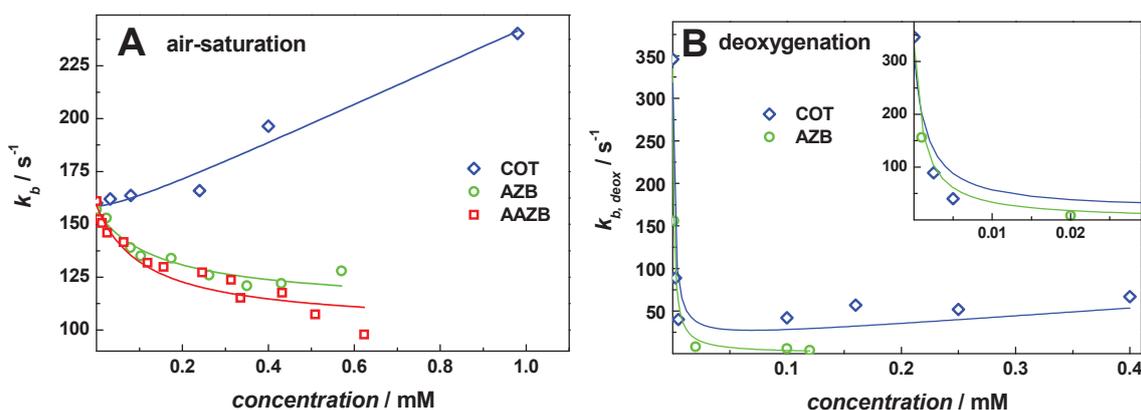


Figure 9: Bleaching rate  $k_b$  measured by steady-state cell-bleaching experiments in (A) air-saturated and (B) deoxygenated phosphate buffer. The data were fitted to eq 19 and the resulting parameters for air-saturated solution are given in Table 1 and Table 2. The parameters determined for deoxygenated conditions are  $k_{bS}^0 \sim 0 \text{ s}^{-1}$  and  $k_{bT}^0 = 6 \text{ s}^{-1}$ .

The bleaching rate for Rh123 in phosphate buffer under air-saturated conditions is found to be in good agreement with those in literature<sup>5</sup>. The decrease in  $k_b$  with increasing azobenzene concentrations confirms the photoprotective effect on Rh123. By depopulating the triplet state of Rh123 one can distinguish between bleaching processes occurring from the two excited states,  $S_1$  and  $T_1$ . The channel for photobleaching from  $T_1$  is inhibited and therefore the total rate  $k_b$  is lowered by 30 % at a concentration of 0.5 mM. The measured values were fitted to the theoretical expression for the bleaching rate  $k_b$  to eq 19. As a result of the fit the specific rates for bleaching channel via the first excited singlet state  $k_{bS}$  and triplet state  $k_{bT}$  and an additional contribution from a quencher induced deletion process described by the quenching rate of bleaching  $k_{bX(Q)}$  whereby  $X = S$  or  $T$ . Assuming

the rates  $k_{bS}$  and  $k_{bT}$  as characteristic values for Rh123 the data of AZB and AAZB were fitted globally and the rates are given in Table 1. Bleaching from the singlet state  $S_1$  with a rate constant of  $k_{bS} = 108 \text{ s}^{-1}$  is favored by more than a factor three compared to triplet channel. Triplet deactivation by molecular oxygen produces singlet oxygen which might cause the differences found in the singlet and triplet bleaching pathways. Nevertheless depopulating of the relatively long-living triplet state by adding AZB or AAZB reduces the total bleaching rate.

Conspicuous here is that the addition of COT increases the rate  $k_b$  with the quenching rates  $k_{bS(Q)} = 9.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $k_{bT(Q)} = 17.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . During the fit of the COT data the rates  $k_{bS}$  and  $k_{bT}$  were fixed to the values found for the azobenzenes. The enhanced destruction of Rh123 in presence of COT is attributed to a bleaching pathway which is facilitated by the formation of a radical anion. The reduction of Rh123 by COT was predicted by the estimated free energies (see Table 2). The slightly negative  $\Delta G$  value promote the formation of charge separated ion pairs with small recombination rates. Those long-living intermediates have due to their long lifetime a high probability to undergo secondary electron transfer reactions<sup>10-13</sup>. AAZB is also able to form rhodamine radical anions by electron transfer but the free energy for this reaction is distinctly negative and the charge separated ion pairs rapidly recombine back to the ground state.

#### 4.5. Influence of Oxygen

The steady-state bleaching experiments of Rh123 with AZB and COT in deoxygenated solution showed a complex decay kinetic with fluorescent intermediates. To examine those traces of photooxidizing and bleaching intermediates is beyond the scope of that paper and therefore the averaged decay time was used. For Rh123 a total rate of photobleaching in an argon-saturated buffer solution of  $k_{b, deox} = 346 \text{ s}^{-1}$  was found. Two major effects of oxygen on the photodynamic of Rh123 are common: (1) the triplet quenching effect with a  $k_{qT} = 1.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  calculated from FCS measurements in air-saturated and deoxygenated buffer which is very similar to that found in literature for Rh6G in ethanol<sup>14</sup>, and (2) the oxygen-enhanced intersystem crossing, for which the rate in deoxygenated solution was estimated based on literature values to be  $k_{ISC, deox} = 2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ . Taking into account the decrease in  $k_T'$  and  $k_{ISC}$ , due to the lack of  $O_2$  and using the bleaching rates from the singlet and triplet channels,  $k_{bS}$  and  $k_{bT}$  from air-saturated conditions, one can calculate a theoretical rate of photobleaching  $k_{b, calc} = 1800 \text{ s}^{-1}$ . As a consequence the difference in the experimental and theoretical value for  $k_b$  must therefore be attributed to

additional contributions from molecular oxygen and oxygen species to the bleaching channels from  $S_1$  and  $T_1$ . The concentration dependent series of  $k_b$  values measured under deoxygenated conditions were fitted according to eq 19 (Figure 9 B). The rate for bleaching processes via the triplet state of Rh123 is found to be  $k_{bT}^0 = 6 \text{ s}^{-1}$  whereas bleaching via the  $S_1$  is close to zero ( $k_{bS}^0 \sim 0 \text{ s}^{-1}$ ). The oxygen influence on bleaching from the first excited states can be described by  $k_{bX} = k_{bX}^0 + k_{qX}^{O_2}[O_2]$  whereby X = S or T. A linear regression of the rates obtained at the two oxygen concentrations, 0 and  $290 \mu\text{M}^{15}$ , allows a rough estimation of the oxygen species induced effects on the singlet and triplet state and results in the quenching rates  $k_{qS}^{O_2} = 35 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $k_{qT}^{O_2} = 9.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

## 5. Conclusions

The limitations of the signal strength in single molecule experiments are transitions to long-living dark states like the triplet state  $T_1$  and the photooxidized fluorophore  $R^{*\cdot}$ . By suppressing the population or increasing the deactivation rate of both species the theoretical signal limit of a 2-level system can be reached. In order to suppress blinking a new strategy of combined energy and electron transfer mechanisms was applied. To our knowledge we set a new record for the signal strength for a single fluorophore in aqueous solution detected by a confocal microscope. The count rate per molecule for Rh123 could be increased up to 1.8 MHz by the stabilizer AAZB. This corresponds to an enhancement by a factor of ten at an irradiance of  $900 \text{ kW/cm}^2$ , whereby 74 % of the theoretical limit of a 2-state system was achieved. Our additives are able to quench selectively the triplet state or simultaneously both dark states. We studied the influences of the combined triplet and radical quenchers from two approaches: FCS measurements were done to investigate the systems at high laser irradiances and cell-bleaching experiments at low irradiances give new insights in the photobleaching pathways of Rh123. Compared to other stabilizing systems known from literature the additives were nearly not exhausted by reactions between several ingredients<sup>16</sup>. The mean number of survived excitation cycles of Rh123 is limited due to irreversible chemical processes to  $1.6 \times 10^6$  and could be increased in air-saturated solution up to  $2.5 \times 10^6$  and in deoxygenated solution from  $7.1 \times 10^5$  to  $5.6 \times 10^7$  upon addition of 50 - 120  $\mu\text{M}$  of the triplet quencher AZB. Altogether the increase in the number of excitation cycles by a factor of 50 could be achieved by deoxygenating and addition of small concentrations of a triplet quencher. Selectively quenching of the  $T_1$  state provides an approach to the dye specific oxidation and bleaching rates from distinct states.

The main photobleaching processes are induced by oxygen and occur from the S<sub>1</sub> and T<sub>1</sub> state of Rh123 whereby the S<sub>1</sub> is most compromised ( $k_{bS} / k_{bT} = 3.5$ ). Even though AZB and AAZB have a contrary influence on the population of the radical cation state both showed a similar beneficial effect on the photodestruction of the dye. Consequently the radical cation state can be seen as a minor bleaching pathway in the photophysics of Rh123. Furthermore, some of the quenchers enhance the formation of undesired side products like the radical anion which results in strong photobleaching upon addition of COT.

- (1) Magde, D.; Elson, E. L.; Webb, W. W. *Biopolymers* **1974**, *13*, 29-61.
- (2) Elson, E. L.; Magde, D. *Biopolymers* **1974**, *13*, 1-27.
- (3) Magde, D.; Elson, E. L.; Webb, W. W. *Physical Review Letters* **1972**, *29*, 705-708.
- (4) Widengren, J.; Mets, Ü.; Rigler, R. *Journal of Physical Chemistry* **1995**, *99*, 13368-13379.
- (5) Eggeling, C.; Widengren, J.; Rigler, R.; Seidel, C. A. M. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 2651-2659.
- (6) Eggeling, C.; Volkmer, A.; Seidel, C. A. M. *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 791-804.
- (7) Widengren, J.; Chmyrov, A.; Eggeling, C.; Lofdahl, P. A.; Seidel, C. A. M. *Journal of Physical Chemistry A* **2007**, *111*, 429-440.
- (8) Rigler, R.; Mets, Ü.; Widengren, J.; Kask, P. *European Biophysics Journal* **1993**, *22*, 169-175.
- (9) Ferguson, M. W.; Beaumont, P. C.; Jones, S. E.; Navaratnam, S.; Parsons, B. J. *Physical Chemistry Chemical Physics* **1999**, *1*, 261-268.
- (10) Marcus, R. A. *Journal of Chemical Physics* **1956**, *24*, 966-978.
- (11) Marcus, R. A. *Journal of Chemical Physics* **1965**, *43*, 2654-2657.
- (12) Marcus, R. A. *Angewandte Chemie* **1993**, *8*, 1161-1280.
- (13) Kavarnos, G. J.; Turro, N. J. *Chemical Reviews* **1986**, *86*, 401-449.
- (14) Heupel, M.; Gregor, I.; Becker, S.; Thiel, E. *International Journal of Photoenergy* **1999**, *1*, 165-172.
- (15) Murov, S. L.; Carmichael, I.; Hug, G. L. *Handbook of Photochemistry*; Marcel Dekker Inc.: New York, 1993.
- (16) Vogelsang, J.; Kasper, R.; Steinhauer, C.; Person, B.; Heilemann, M.; Sauer, M.; Tinnefeld, P. *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, *47*, 5465-5469.
- (17) Wang, X. Y.; Ren, X. F.; Kahen, K.; Hahn, M. A.; Rajeswaran, M.; Maccagnano-Zacher, S.; Silcox, J.; Cragg, G. E.; Efros, A. L.; Krauss, T. D. *Nature* **2009**, *459*, 686-689.